



■ 김중환

■ 용인대학교 보건복지대학 물리치료학과

The Activity of Hypertension-related Protein Kinase C and the Relationship of Physical Therapy

Jung-Hwan Kim, PT, PhD

Dept. of Physical Therapy, College of Health & Welfare, Yongin University

Purpose: Protein kinase C (PKC) is a member of a family of serine/threonine kinases that are activated by diacylglycerol (DG) and PKC stimulants. PKC play a key role in signal transduction, including muscle contraction, cell migration, apoptosis, cell proliferation and differentiation. However, the mechanism relating mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and PKC, especially in the volume-dependent hypertensive state, remains unclear.

Methods: In the present study, I investigated the relationship between PKC and MAPKs for isometric contraction, PKC translocation, and enzymatic activity from normotensive sham-operated rats (NSR) and aldosterone-analogue deoxycorticosterone acetate (DOCA) hypertensive rats (ADHR).

Results: Systolic blood pressure was significantly increased in ADHR than in NSR. Physiological salt solution (PSS)-induced resting tension and the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were different in the ADHR and NSR. The expression of PKC α , PKC β II, PKC δ , PKC ϵ and PKC ζ were different between the cytoplasmic and membranous fractions. However, expression of the PKC isoforms did not differ for the ADHR and NSR. The use of 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate (DPB, a PKC stimulant) induced isometric contraction in Ca^{2+} -free medium, which was diminished in muscle strips from ADHR as compared to NSR. Increased vasoconstriction and phosphorylation induced by the use of 1 μ M DPB were inhibited by treatment with 10 μ M PD098059 and 10 μ M SB203580, inhibitors of extracellular-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 MAPK from ADHR, respectively.

Conclusion: These results suggest that the development of aldosterone analogue-induced hypertension is associated with an altered blood pressure, resting tension, $[Ca^{2+}]_i$, and that the Ca^{2+} -independent contraction evoked by PKC stimulants is due to the activation of ERK1/2 and p38 MAPK in volume-dependent hypertension. Therefore, it is suggested that PKC activity affects volume-dependent hypertension and the need to develop cardiovascular disease-specialized physical therapy.

Key Words: Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension, Protein kinase C (PKC), Mitogen-activated protein kinase, Physical therapy.

논문접수일: 2008년 5월 22일

수정접수일: 2008년 8월 23일

게재승인일: 2008년 9월 15일

교신저자: 김중환, junghwankim3@yongin.ac.kr

1. 서론

모든 세포에 광범위하게 존재하는 세린-트레오닌 부활효소 (ubiquitous Serine-Threonine kinase)로서 12종 이상의 동위

효소 형태로 존재하는 단백질 부활효소 C (protein kinase C, PKC)는 효소활성의 경로를 거쳐 활성화될 경우, 핵의 분열과 전사조절 및 단백질 합성 등의 생리 반응을 유발하게 된다 (Nishizuka, 1984, 1986, 1992). 이러한 PKC 동위효소는

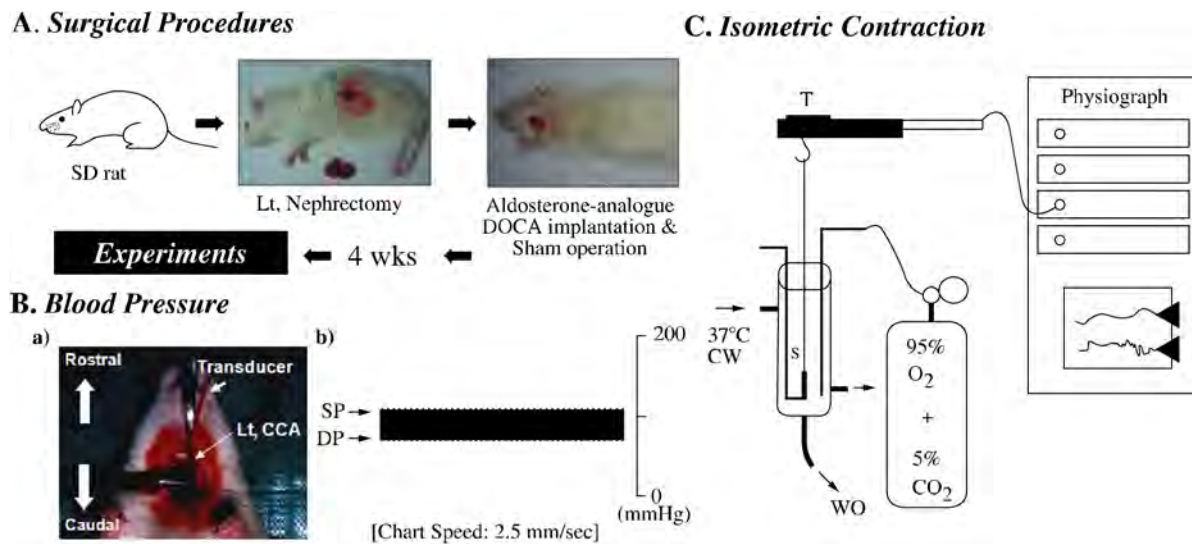


Figure 1. The photograph and schematic representation on surgical procedures (A), measurement of direct blood pressure (B), and of isometric contraction (C) from normotensive sham-operated rats and aldosterone-analogue DOCA-salt hypertensive rats.

SD rat: Sprague-Dawley rat, DOCA: deoxycorticosterone acetate, SP: systolic blood pressure, DP: diastolic blood pressure, T: transducer, CCA: common carotid artery, CW: circulating water, WO: wash out, S: sample.

Ca²⁺ 의존적 마이오신경쇄(myosin light chain, MLC)의 인산화 의존적으로 활성화되는 PKC(classical 혹은 conventional PKC 동위효소, cPKC; PKC α , PKC β _I, PKC β _{II}, PKC γ 가 존재), Ca²⁺ 비의존적이나 MLC 인산화에 의존적인 PKC (novel PKC 동위효소, nPKC; PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , PKC η (L)가 존재), Ca²⁺과 MLC 인산화 모두에서 비의존적으로 활성화될 수 있는 PKC (atypical PKC, aPKC; PKC ζ , PKC λ /I가 존재)로 분류하고 있다(Nishizuka, 1992, 1995). 이와 함께 PKC μ (혹은 protein kinase D, PKD로 명명)와 PKC ν 가 보고되었으며 nPKC에 속하는 것으로 여겨진다(Newton, 1995). 또한 PKC의 활성 유·무는 암의 유발 및 악화, 통증 유발과 연관성이 존재하는 무수축삭 C 신경(unmyelinated C fiber) 활성 증가와 염증 연관 물질의 활성 증가로 유인된 통증의 유발 및 유해자극에 대한 감수성의 증가 등은 PKC의 병태, 생리현상을 이해하는데 매우 중요한 요소이다(Distler 등, 2003; Lahn 등, 2004; Mayer 등, 1999). 그러나 심혈관질환 연관 PKC의 역할 특히, 알도스테론-유도체 소금염 의존성 고혈압(aldosterone-analogue DOCA [deoxycorticosterone acetate]-salt hypertensive rats) 유·무에 대한 PKC의 기능에 대한 연구결과는 미흡하다(Calderone 등, 1994; Turla와 Webb, 1991). 본 연구에서 사용한 알도스테론-유도체로 유도되는 고혈압은 신장의 세뇨관에서 Na⁺ 이온의 재흡수와 연관성이 있는 알도스테론의 과도한 역할로 혈액의 양이 증가하여 유발되는 고혈

압으로 용량 의존성 고혈압으로 알려져 있다(Bae 등, 2007; Kim 등, 2004a). 이러한 고혈압의 이환은 뇌졸중과 같은 중추신경계 손상환자 물리치료 영역에서 매우 중요한 원인-위험인자로 인식되고 있는 이유로 그 중요성이 인정받고 있다(Chi와 Jaff, 2008; Kim 등, 2004a; Samal 등, 2007). PKC 활성화는 유사분열-활성 단백질부활효소(mitogen-activated protein kinase, MAPK)의 신호전달기전에 있어서 중요한 매개체 혹은 효과기임이 보고되었다(Clark와 Murray, 1995; Lee 등, 2006; Zhong 등, 2005). 일반적으로 MAPK는 모든 진핵세포(eukaryote)에 존재하면서, 호르몬이나 성장인자 및 환경 스트레스 등으로 활성화 될 경우, 세포의 성장과 자연사, 근 수축유발 및 염증반응 등의 역할을 담당한다(Kim 등, 2004a, 2005, 2006). 이러한 MAPK에는 4종류가 존재하며, extracellular signal-regulated protein kinase 1과 2(ERK1/2), p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase(SAPK/JNK), big MAPK-1(BMK1) (혹은 extracellular signal-regulated protein kinase 5[ERK5]로 명명)이다(Kyriakis와 Avruch, 2001). 이러한 MAPK의 활성화경로가 고혈압을 비롯한 통증의 유발과 악화 및 연관된 기전에서 중요한 역할을 한다(Bae 등, 2007; Ciruela 등, 2003; Kim 등, 2004a).

한편, 노르에피네프린(norepinephrine) 혹은 세로토닌(serotonin) 등과 같은 심혈관질환-연관 물질(cardiovascular disease-relat-

ed substances) 및 혈압의 억제와 조절을 목적으로 「침·자극, 뜸·자극 및 은침·점전기자극」 등과 같은 몇몇 연구결과가 보고 되어 있으나 매우 미비하다(천기영 등 2004; Lee 등, 1997; Lee와 Kim, 1994). 특히, 물리치료 영역에서 운동치료 및 수 치료 등의 적용 유무에 대한 효과는 거의 전무한 상태에 있다. 또한, 심혈관질환 전문물리치료 영역의 연구 및 활성을 위한 PKC 관련 MAPK 활성화에 대한 연구는 많은 부분에서 이루어져 있지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 용량-의존성 고혈압에 대한 PKC-MAPK 활성화 경로를 확인하여, 심혈관질환 전문물리치료 영역의 연구 및 임상적 접근에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 용량-의존성 고혈압 모델 쥐의 작성 및 혈압의 측정

체중 190~200g, 웅성의 흰쥐 40두를 본 실험에 사용하였다. 흰쥐를 1주일간 실험환경에 적응시킨 후 왼쪽 신장제거수술을 시행하였다. 수술시행 후 1주일간 회복기간을 거쳐 알도스테론-유도체 deoxycorticosterone acetate (DOCA)를 각 200mg/kg을 피하에 이식하고 봉합술을 30두에 시행하였다. 대조군인 정상혈압군(normotensive sham-operated rat, NSR군)은 DOCA를 이식하지 않고 피부절개 수술을 10두에 실시하였다(Figure 1A). 알도스테론-유도체 DOCA 적용군(aldosterone-analogue DOCA hypertensive rat, ADHR군)에는 0.9% 염화나트륨과 0.2% 염화칼륨 혼합음료와 함께 실험동물 전용사료(대한바이오텍, 충북음성소재)를 공급하였으며 대조군에는 정상 음료와 함께 사료를 무제한 공급하였다. 본 실험은 DOCA를 이식한 4주에 실시하였다(Kim 등, 2004a) (Figure 1A). 수술 후 4주에 NSR군과 ADHR군에 전신마취를 실시한 후, 수술용 고정판에 위치시키고 경부를 절개하였다. 좌측경동맥을 확인한 후 한쪽 끝이 장력변환기(Force Displacement Transducer, FT.03, Grass, USA)에 연결된 혈압 측정기를 삽입하여 수축 및 이완기 혈압(systolic and diastolic pressure)을 측정하였다(Kim 등, 2004a) (Figure 1B, 3A-a).

2. 근 장력 측정

본 연구에서는 용량-의존성 고혈압 유·무에 대한 장력(isometric contraction)의 특성을 살펴보기 위해 흰쥐의 흉대동맥과 신동맥 및 장간막동맥 조직을 적출하여 본 연구를 시행하였다. 준비된 조직은 생리적 식염수(physiological salt solution, PSS)로 옮긴 후 결합조직과 지방을 제거하였다. 준비된 각 조직은 길이 2 mm로 절단하여 내피세포를 제거한 후 한쪽 끝은 근육 고정

기에 다른 한쪽 끝은 장력변환기에 연결하여 생리현상기록기(7WC, Grass, USA)로 기록하였다(Kim 등, 2005) (Figure 1C).

3. 세포 내 Ca^{2+} 농도 ($[Ca^{2+}]_i$)의 측정

용량 의존성 고혈압 유·무에 대한 세포 내 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$)의 변동은 Kim 등(1992)의 연구에서 사용한 동일한 방법으로 Ca^{2+} 의 형광지시약인 fura-PE3/AM을 이용하여 측정하였다. 실험진행은 수축 측정 시와 동일한 방법으로 작성된 근조직을 사용하였다. 작성된 근조직은 340nm와 380nm의 두 파장을 48Hz로 순차적으로 조사하였고, 이때 발생하는 500nm의 형광(F340과 F380)을 형광광도계(CAF110, JASCO, Japan)로 분석하였다. $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화는 F340과 F380의 비율(R340/380)로서 표시하였다. 세포질에서 Ca^{2+} 에 대한 fura-PE3의 결합계수는 실험체(*In Vitro*)에서의 결과와 차이가 있으므로 $[Ca^{2+}]_i$ 의 절대치를 산정하지 않고 정지 시와 고농도의 KCl의 자극 시에 얻어진 비율을 각각 $[Ca^{2+}]_i$ 의 0%와 100%로 하였다(Kim 등, 1992).

4. PKC 동위효소의 translocation을 확인하기 위한 세포막과 세포질 성분의 분리

PKC 동위효소의 발현과 효소의 translocation을 관찰하기 위해 Kim 등(2003)의 방법과 동일한 과정으로 본 연구를 실시하였다. 근 장력 측정과 동일한 방법으로 조직을 준비한 후, 조직분쇄용 균질화 용액으로 파쇄하였다(Homogenizer, Ultra-turrax T8, Ika, Germany). 파쇄된 표본은 100,000×G에서 60분간 원심분리(Ultracentrifuge, TL 100, Beck-man, USA)하여 상층액을 세포질 성분(cytoplasmic fraction, C)으로 분리하였고 침강 성분은 Triton X-100 0.1%를 첨가 및 100,000×G에서 60분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 세포막성분(membranous fraction, M)으로 분리하였다. SDS-PAGE 겔을 작성한 후 전기영동용 수조에 장착하여 영동용 완충액으로 전기영동을 실시하였다. 전기영동된 겔은 40mA로 전사하였다. 전사된 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막은 5% 탈지분유로 진탕한 후 1차 항체를 넣고 4°C에서 12시간 반응시켰다. 다음 2차 항체와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL Kit를 이용하여 암실에서 X-ray 필름에 노출시켜 면역활성밴드를 확인하였다. X-ray 필름에 나타난 밴드는 이미지 분석기(Biopprofil, Vilber Lourmat, France)로 정량화하였다(Kim 등, 2003).

5. MAPK의 발현과 인산화 측정

MAPK의 발현과 인산화를 측정하기 위해 Kim 등(2006, 2004b)이 실시한 내용과 동일한 과정으로 본 연구를 실시하였

다. 근 장력 측정과 동일한 방법으로 조직을 준비하여 조직분쇄 용 균질화 용액에서 파쇄하였다. 표본을 14,000×G에서 10분간 원심분리(High-speed centrifuge, Micro 17R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea)하여 상층액을 취하였다. SDS-PAGE 겔을 작성한 후 전기영동용 수조에 장착하여 영동 용 완충액으로 전기영동을 실시하였다. 이하 모든 과정은 PKC 활성 측정과 동일한 조건으로 실시하였다.

6. 자료처리

본 연구결과에 대한 자료 분석은 SAS 통계프로그램 ver. 6.12를 사용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 유의수준 α 는 .05로 설정하여 Student's t-test로 검정하였다. 또한 형태학적 변동에 의의가 있는 결과는 그림으로 그 해당 내용을 제시하였다.

III. 결과

1. 용량-의존성 고혈압 유·무에 대한 조직 반응성의 비교

1) 혈압 및 근 수축반응의 변화

고혈압 모델자성을 위한 수술조작 후 4주에 ADHR군과 NSR군에 해당하는 쥐의 혈압을 직접 혈압법(Kim 등, 2004a)으로 측정하였다. 결과 NSR군(124.7±2.0mmHg)에 비해 ADHR군(178.4±3.5mmHg)에서 혈압의 유의한 증가를 나타냈으며, 본 모든 실험과정에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Systolic blood pressure of normotensive sham-operated (NSR) and aldosterone-analogue DOCA hypertensive rats (ADHR).

Systolic Blood Pressure (mmHg)	
NSR	ADHR
124.7±2.0	178.4±3.5*

*p<.05

용량-의존성 고혈압 유·무에 대한 전압-의존성 Ca^{2+} 통로의 변동 등으로 유발되는 근장력 반응을 관찰하기 위해 NSR과 ADHR의 혈관조직(흉대동맥과 신동맥 및 장간막동맥)을 적출하여 60~70mM 염화칼륨을 적용하여 근 수축을 유발한 후 PSS로 근 이완을 유도하여 반응의 형태를 비교하였다. 그 결과 NSR군과 ADHR군의 흉대동맥과 신동맥 및 장간막동맥에서 고농도 염화칼륨의 적용으로 초기의 위상성 수축(phasic contraction)에 이어 긴장성 수축(tonic contraction)이 유지되었다(Figure 2A-a~d). 이러한 수축반응의 형태에는 고혈압 유·무

에 별다른 차이를 나타내지 않았다(Figure 2d). 그러나 PSS를 적용한 혈관조직에서는 근 이완반응에 현저한 차이가 나타났다. 즉, NSR군에서는 PSS 적용 직후 급격한 이완반응을 나타냈으나(Figure 2A-a~c), ADHR군에서는 느린 이완반응과 함께 불규칙한 긴장성 반응과 울동적인 극파가 반복되는 이완의 형태 및 NSR군에 비해 긴 시간의 안정장력으로 회복되는 양상으로 나타났다(Figure 2B-a~b, 2C-a~b, 2D-a~b). 또한 흉대동맥과 장간막동맥의 평활근 조직에서는 PSS를 적용함에 따라 긴장성 수축의 양상으로 역전되는 수축형태가 나타났다(Figure 2B-a~b, 2D-a~b).

2) 용량-의존성 고혈압 유·무에 대한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화

$[Ca^{2+}]_i$ 농도의 증가는 평활근 수축유발에 매우 중요한 요소이다. 따라서 수축과 동일한 방법으로 고농도 염화칼륨의 적용 후, PSS로 유도되는 $[Ca^{2+}]_i$ 농도의 변동 및 변화를 관찰하였다. 결과 NSR군과 ADHR군 모두에서 고농도 염화칼륨 적용으로 초기에는 위상성 성분의 증가에 이어 일정 수준으로 $[Ca^{2+}]_i$ 농도가 유지되었다(Figure 2E-a~b). 또한, NSR군에 적용한 PSS에 의해 증가된 $[Ca^{2+}]_i$ 농도는 급격히 감소되어 안정-상태로 회복되었다(Figure 2E-c). 그러나 ADHR군에 적용한 PSS는 완만한 감소의 이완반응을 나타냄과 동시에 간헐적으로 급격히 증가하는 $[Ca^{2+}]_i$ 농도의 증감반응이 나타났으며, 이러한 양상은 근이완 반응과 유사하였다(Figure 2E-d).

3) 용량-의존성 고혈압 유·무에 대한 PKC 활성의 변화

cPKC에 해당되는 PKC 동위효소인 $PKC\alpha$, $PKC\beta$ II, aPKC인 $PKC\zeta$ 는 고혈압 유·무에는 별다른 차이를 나타내지 않았으나 세포질성분의 발현이 현저하였다(Figure 2F). 또한 nPKC에 해당되는 $PKC\delta$ 와 $PKC\epsilon$ 은 고혈압 유·무에 유의한 차이를 나타내지 않았으나 세포막성분의 발현이 현저하였다(Figure 2F).

2. 용량-의존성 고혈압에 대한 PKC 효현제의 감수성 차이와 고혈압 연관 MAPK의 상관성

본 연구에서는 용량-의존성 고혈압에 대한 PKC 효현제(12-deoxyphorbol 13-isobutyrate, DPB, 1 μ M)-적용 수축의 반응형태를 관찰하기 위해 EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid, 1mM)를 30분간 전처리하여 세포 외 Ca^{2+} 을 제거한 상태에서 유발되는 수축반응을 관찰하였다. 결과, PKC-효현제의 농도-의존적(100nM과 1 μ M)으로 유의한 수축반응의 증가가 나타났다(Figure 3A). 또한 PKC-효현제의 효과 유·무와 MAPK의 상관성이 용량-의존성 고혈압 이환 시 영향을 받는 경향을 살펴보기 위해 효소활성을 측정하였다. 그 결과 ERK1/2와

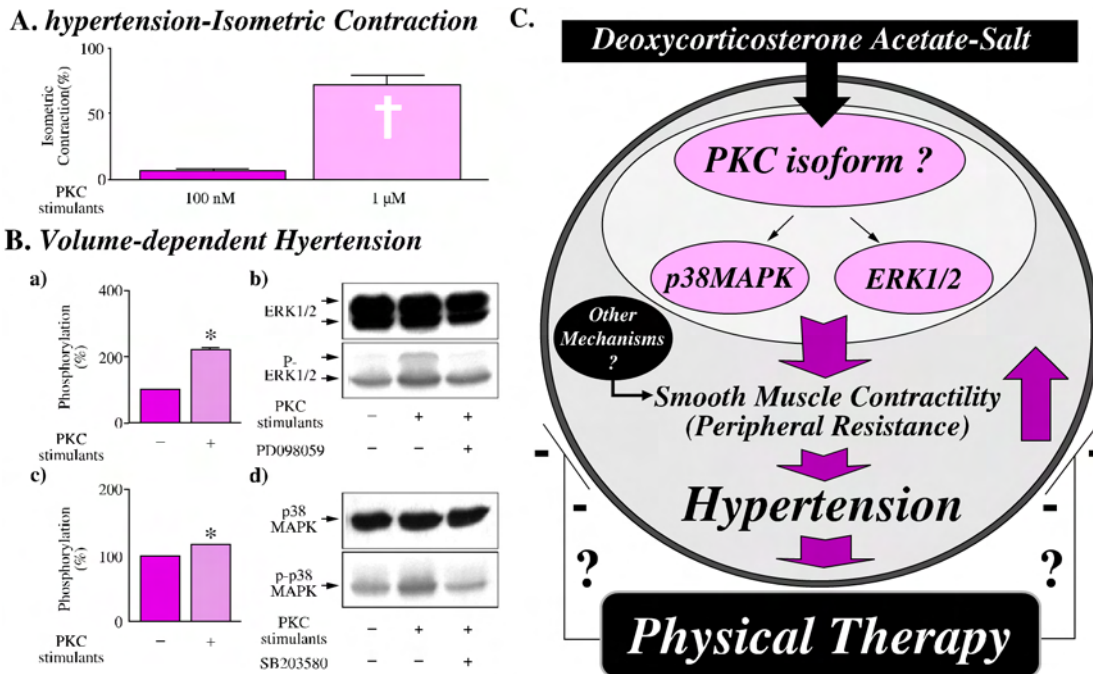


Figure 3. The effects of PKC stimulants on isometric contraction and MAPK phosphorylation in aortic smooth muscle strips from aldosterone-analogue DOCA-salt hypertensive rats. PKC: protein kinase C, ERK1/2: extracellular-regulated protein kinase 1/2, p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase, PD098059: a potent inhibitor of ERK1/2, SB203580: a selective inhibitor of p38MAPK, PKC: protein kinase C, p-: phosphorylated enzyme, ↑: increase, -: inhibition. †*p<.05.

p38 MAPK의 인산화가 PKC-효현제의 적용으로 유의한 증가 (ERK1/2; 219.5±7.5%, p38MAPK; 117.0±2.0%)를 나타냈으며, 각각 특이적 억제제(inhibitors of ERK1/2, PD098059 10μM; inhibitors of p38 MAPK, SB203580 10μM)에 의해 각각 감소의 경향을 나타냈다(Figure 3B).

IV. 고찰

생리반응의 중간 전달자로서 PKC는 세포의 증식 및 분화, 근 수축, 신경전달물질의 유리와 같은 세포기능에 중요한 역할을 수행하는 단백질질이 보고되었다(Nishizuka, 1984, 1986, 1992). 이러한 PKC는 호르몬과 성장인자와 같은 물질이 여러 활성화단계를 거쳐 PLC(phospholipase C)를 활성화시키고, 기질인 PIP₂(phosphatidylinositol bisphosphate)를 가수분해하여 생성된 DAG(diacylglycerol)에 의해 활성화되거나 혹은 phorbol ester 및 PDBu와 같은 암유발 물질이 직접 PKC를 활성화시킨다(Nishizuka, 1992, 1995). PKC의 분자적 구조는 C1과 C2, V1~V3의 일부를 포함한 NH₂-말단으로 구성된 조절부분과 C3와 C4, V4 및 V5를 포함한 COOH-말단으로 이루어진 촉

매부분으로 구성되어 있다(Newton, 1995). 이러한 분자구조 중 C1 부분은 PKC의 자동억제조절의 역할(Orr 등, 1992)과 함께 cysteine-rich zinc finger-유사 부위를 가지고 있는 특성으로 DAG 또는 phorbol ester와 결합함으로써 PKC의 활성이 일어나게 된다(Newton, 1995; Nishizuka, 1995). 활성화된 PKC는 세포질로부터 세포막 쪽으로 이동하여 세포막과 결합함으로써 실질적 생리작용을 나타낸다(Nishizuka, 1992). 그러나 고혈압 특히 이차성 용량의존성-고혈압 모델을 이용한 PKC의 상관성 및 MAPK의 활성경로에 대한 내용은 그 보고가 미흡하며, 물리치료 영역 중 심혈관질환-전문물리치료 영역에서는 거의 없는 상태에 있다. 따라서 본 연구에서는 DOCA-고혈압 모델을 작성하였으며, 본 연구의 결과와 다른 연구자들의 고혈압 모델의 특성을 비교한 결과 본 연구를 위해 제작한 용량의존성 고혈압 모델동물의 적절성을 확인할 수 있었다(Watts, 1998; Watts와 Webb, 1996). 또한 고농도 KCl의 적용 후, PSS-유도 근-이완 반응이 이전 연구의 이완반응과 일치하는 양상을 확인할 수 있었다(Tostes 등, 1995; Watts와 Webb, 1996). 그러나 조직의 차이와 모델유형의 특성에 따른 특이성은 배제할 수 없다.

[Ca²⁺]_i 농도의 증가는 골격근과 심근을 비롯한 평활근의

수축반응에 매우 중요한 요소임이 잘 알려져 있다. 일반적으로 근세포에서 증감된 $[Ca^{2+}]_i$ 은 MLCK의 활성화증가와 MLC의 인산-탈인산화 및 근 수축-이완반응을 촉발시킨다(Somlyo와 Somlyo, 1993). PKC 효현제의 약리학적 특성은 평활근 조직에서 긴장성 수축의 형태를 서서히 증가시켜 유지하는 특징을 가지고 있으며(Nishizuka, 1986), $[Ca^{2+}]_i$ 농도와 MLC의 인산화 증감에 관계없이 근수축을 유발시킨다(Ozaki 등, 1990). 이것은 EGTA를 전처리하여 세포 외 Ca^{2+} 을 제거한 상태에서 유발되는 수축반응을 정상 쥐와 고혈압 모델 쥐 모두에서 관찰함으로써 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과는 심도 있고 체계적인 실험이 요구되며, 용량-의존성 고혈압 유·무에 따라 nPKC의 활성이 다른 동위효소에 비해 PKC-활성-연관 근수축 반응에 영향을 미칠 수 있음을 추정할 수 있다. PKC 동위효소의 translocation 유·무에 대한 실험의 결과 nPKC에 해당되는 동위효소인 PKC δ 와 PKC ϵ 의 발현과 aPKC인 PKC ζ 의 발현이 확인됨을 근거로 본 연구의 타당성을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구의 결과 용량의존성 고혈압 이환 시 혈관조직에서 나타나는 PKC에 대한 민감성에 차이를 보이는 특이성을 인지할 수 있었다. 이와 함께 PKC-연관 혈관반응 기전에 MAPK의 활성 특히, ERK1/2와 p38 MAPK의 인산화의 증감이 직접적으로 관여함을 관찰할 수 있었다(Figure 3C).

본 연구의 결과를 근거하여 심혈관질환 전문물리치료의 연구 및 활성화방안과 상관성이 중요함을 인지할 수 있었다. 현재까지 PKC 활성의 조절이나 PKC-MAPK 공동활성화 조절에 대한 물리치료 적용에 대한 연구보고는 거의 없는 상태에 있으나 MAPK와 PKC의 활성 증감이 통증을 비롯한 고혈압 유발-악화에 직접적 상관성이 보고되어 그 중요성을 이해할 수 있다(Gao 등, 1995; Kanayama 등, 1994). 이러한 내용과 연관성이 있는 보고로서 Xu와 Fan(1990)은 전기침자극으로 유도된 lymphocyte proliferation-inhibitory factor의 생성-증가 및 활성화기전에 PKC 활성-연관 B-와 T-lymphocyte를 억제함으로써 유도된다고 하였다. 이러한 내용은 염증원인물질-유도 통증 유발경로에 PKC 동위효소가 관여한다는 내용과 통각과민과 이질통의 연관경로에 PKC와 MAPK의 활성 증감이 직접적으로 연관되어 있다는 보고가 이를 뒷받침해 준다(Shumilla 등, 2005; Tsuda 등, 2004). 그러나 물리치료영역 특히, 운동치료와 수치료 및 전기, 광선치료 영역 등에 대한 PKC 혹은 MAPK의 활성 조절에 관한 연구보고는 거의 전무한 상태에 있다. 더욱이 환자의 병증별 상태에 대한 임상보고는 전무한 상태에 있다. 따라서 심혈관질환 전문물리치료 영역의 일환으로 전기자극을 비롯한 마사지, 온열 및 운동요법 등의 체계적인 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

V. 결론

본 연구는 심혈관질환 전문물리치료의 연구 및 활성화에 기초자료로 활용하기 위해 PKC(protein kinase C) 관련-MAPK(mitogen-activated protein kinase) 공동-활성에 대한 연구를 용량-의존성 고혈압 모델 쥐를 작성하여 시행하였다. 연구결과 근수축 반응 기법과 단백질의 인산화 측정, 세포내 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 농도의 측정 및 PKC 동위효소의 translocation을 확인하였으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 용량-의존성 고혈압 유·무에 따라 흉대동맥과 신동맥 및 장간막동맥 조직에서 유발되는 수축 후 이완의 형태에는 차이가 있었다.
2. 용량-의존성 고혈압 유·무에 따라 흉대동맥에서 유발되는 $[Ca^{2+}]_i$ 농도의 증가 후 안정상태로 $[Ca^{2+}]_i$ 농도가 변동되는 형태에는 차이가 나타났다.
3. 용량-의존성 고혈압 유·무에 따라 흉대동맥에서 유발되는 PKC의 활성에는 유의한 차이를 나타나지 않았으나 각 동위효소(PKC α , PKC β II, PKC ζ , PKC δ , PKC ϵ)의 세포막 성분과 세포질 성분의 발현양상에는 차이가 있음을 관찰할 수 있었다.
4. 용량-의존성 고혈압에 이환됨에 따라 PKC 효현제의 적용으로 수축증가 반응과 MAPKs(ERK1/2와 p38 MAPK)의 인산화가 관여함을 확인할 수 있었다.

이러한 본 연구를 통하여 이차성 고혈압 유·무에 따라 수축 및 $[Ca^{2+}]_i$, PKC 발현의 차이 및 PKC 효현제의 효과를 통해 PKC의 활성으로 혈관수축 반응에 중요한 매개체임을 확인할 수 있었다. 그러나 심혈관질환 전문물리치료의 영역에서 이에 대한 조절 및 그 효과, 기전 등에 대한 연구보고는 거의 없는 상태이다. 따라서 향후, 보다 객관적이면서 체계적이고 심도 있는 기초물리치료학 및 임상의학적 측면에서 연구가 이루어질 경우, 심혈관질환 전문물리치료의 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 천기영, 김임술, 최경규 등. 소금염-의존성 고혈압의 유해성과 고혈압-관련 교감신경전달물질의 변동에 대한 물리적 자극의 효과—노인종합복지회관 내 물리치료시설의 활용을 중심으로—. 한국노년학. 2004;24(3):1-11.
- Bae YM, Kim A, Lee YJ et al. Enhancement of receptor-operated cation current and TRPC6 expression in

- arterial smooth muscle cells of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens.* 2007;25(4): 809-17.
- Calderone A, Oster L, Moreau P et al. Altered protein kinase C regulation of phosphoinositide-coupled receptors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 1994;23(6):722-8.
- Chi YW, Jaff MR. Optimal risk factor modification and medical management of the patient with peripheral arterial disease. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008;71(4): 475-89.
- Ciruela A, Dixon AK, Bramwell S et al. Identification of MEK1 as a novel target for the treatment of neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 2003;138(5):751-6.
- Clark KJ, Murray AW. Evidence that the bradykinin-induced activation of phospholipase D and of the mitogen-activated protein kinase cascade involve different protein kinase C isoforms. *J Biol Chem.* 1995;270(13): 7097-103.
- Distler C, Rathee PK, Lips KS et al. Fast Ca^{2+} -induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *J Neurophysiol.* 2003;89(5):2499-505.
- Gao PJ, Zhao GS, Yuan XY et al. Expression of protein kinase C gene in the brain and heart of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1995;22(1):S204-6.
- Kanayama Y, Negoro N, Okamura M et al. Modulation of protein kinase C in aorta of spontaneously hypertensive rats with enalapril treatment. *Osaka City Med J.* 1994; 40(2):83-97.
- Kim B, Kim J, Bae YM et al. p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the diminished aortic contraction by endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 2004a;43(5):1086-91.
- Kim B, Kim J, Kim A et al. Ligusticum wallichii-induced vasorelaxation mediated by mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle. *J Ethnopharmacol.* 2004b;90(2-3):397-401.
- Kim B, Kim YS, Ahn J et al. Conventional-type protein kinase C contributes to phorbol ester-induced inhibition of rat myometrial tension. *Br J Pharmacol.* 2003; 139(2):408-14.
- Kim BK, Mitsui M, Karaki H. The long-term inhibitory effect of a Ca^{2+} channel blocker, nisoldipine, on cytosolic Ca^{2+} and contraction in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1992;223(2-3):157-62.
- Kim J, Lee CK, Park HJ et al. Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2006;101(2): 135-43.
- Kim J, Lee YR, Lee CH et al. Mitogen-activated protein kinase contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2005;514(2-3):209-15.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001;81(2): 807-69.
- Lahn M, Köhler G, Sundell K et al. Protein kinase C alpha expression in breast and ovarian cancer. *Oncology.* 2004;67(1):1-10.
- Lee CK, Park HJ, So HH et al. Proteomic profiling and identification of cofilin responding to oxidative stress in vascular smooth muscle. *Proteomics.* 2006;6(24):6455-75.
- Lee HS, Kim JY. Effects of acupuncture on blood pressure and plasma renin activity in two-kidney one clip goldblatt hypertensive rats. *Am J Chin Med.* 1994; 22(3-4):215-9.
- Lee HS, Yu YC, Kim ST et al. Effects of moxibustion on blood pressure and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Am J Chin Med.* 1997;25(1):21-6.
- Mayer DJ, Mao J, Holt J et al. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(14): 7731-6.
- Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1995;270(48):28495-8.
- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992;258(5082):607-14.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995;9(7):484-96.
- Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 1986;233(4761):305-12.

- Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*. 1984;308(5961):693-8.
- Orr JW, Keranen LM, Newton AC. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol Chem*. 1992; 267(22):15263-6.
- Ozaki H, Ohyama T, Sato K et al. Ca^{2+} -dependent and independent mechanisms of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. *Jpn J Pharmacol*. 1990;52(3):509-12.
- Samal D, Greisenegger S, Auff E et al. The relation between knowledge about hypertension and education in hospitalized patients with stroke in Vienna. *Stroke*. 2007;38(4):1304-8.
- Shumilla JA, Liron T, Mochly-Rosen D et al. Ethanol withdrawal-associated allodynia and hyperalgesia: age-dependent regulation by protein kinase C epsilon and gamma isoenzymes. *J Pain*. 2005;6(8):535-49.
- Somlyo AV, Somlyo AP. Intracellular signaling in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol*. 1993;346:31-8.
- Tostes RC, Traub O, Bendhack LM et al. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake is not decreased in aorta from deoxycorticosterone acetate hypertensive rats: functional assessment with cyclopiazonic acid. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995;73(11):1536-45.
- Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*. 2004;45(1): 89-95.
- Turla MB, Webb RC. Vascular responsiveness to protein kinase C activators in mineralocorticoid-hypertensive rats. *J Hypertens*. 1991;9(3):209-15.
- Watts SW. The development of enhanced arterial serotonergic hyperresponsiveness in mineralocorticoid hypertension. *J Hypertens*. 1998;16(6):811-22.
- Watts SW, Webb RC. Vascular gap junctional communication is increased in mineralocorticoid-salt hypertension. *Hypertension*. 1996;28(5):888-93.
- Xu H, Fan SG. Possible mechanisms of the action of lymphocyte proliferation-inhibitory factor(s) in rat serum receiving electroacupuncture stimulation. *Sheng Li Xue Bao*. 1990;42(6):555-61.
- Zhong Z, Davidescu A, Ehren I et al. C-peptide stimulates ERK1/2 and JNK MAP kinases via activation of protein kinase C in human renal tubular cells. *Diabetologia*. 2005;48(1):187-97.