

cGMP/PKG 의존성 신호전달기전에 의한 심장보호효과

박 경 록

고신대학교 의과대학 치과학 교실

Cardioprotective Effect of cGMP/PKG-dependent Signaling Mechanism

Kyeong-Lok Park, D.D.S.

Department of Dentistry, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Backgrounds: The present investigation tested the hypothesis that cGMP-dependent protein kinase (PKG) activates ATP-sensitive K⁺ (KATP) channels and thus could be associated with the cardioprotective response of ischemic preconditioning.

Methods: PKG-induced KATP channel activation and its cardioprotective effects were studied in rabbit ventricular myocytes using patch-clamp techniques and in heart slice model for simulated ischemia and preconditioning.

Results: NO donors and PKG activators facilitated KATP channel activity in a concentration-dependent manner, and their effects were suppressed by PKG inhibitors. Exogenous PKG increased KATP channel activity by a phosphorylation-dependent mechanism. Heart slices preconditioned with a single 5-min anoxia followed by 15-min reoxygenation were protected against subsequent 30-min anoxia and 60-min reoxygenation. The beneficial effects of anoxia were almost completely prevented by glibenclamide and PKG inhibitor. Pretreatment with NO donor or PKG activator mimicked anoxic preconditioning. In heart slices pretreated with NO donor or PKG activator, the cardioprotection was blocked by the concomitant presence of glibenclamide or PKG inhibitor.

Conclusion: Taken together with the above results showing that the KATP channel acts downstream of the PKG-pathway in the mediating the protective effect, these data indicate that this mechanism, at least in part, contributes to a signaling pathway that induces ischemic preconditioning.

Key words : cGMP-dependent protein kinase(PKG), ATP-sensitive K⁺(KATP) channels, ischemic preconditioning, rabbit ventricular myocyte

서 론

단백질 인산화는 허혈전처치가 경색의 크기를 감소시키는 기전으로 추정되고 있는데¹⁾, 이에 의하면 미리 짧은 시간 동안 허혈 및 재관류 처치를 하면 그 후에 발생하는 장시간의 허혈 및 재관류에 의한 손상으로부터 심장을 보호한다고 한다²⁾.

phosphorylation level이 전처치를 하지 않은 심장에서

는 허혈 동안에 감소하지만, 전처치를 한 심장에서는 증가함이 입증되었다.³⁾ stress proteins과 cytoskeletal proteins과 같은 몇몇 세포단백질이 허혈전처치를 한 심장에서 phosphorylation target으로 제시된 바 있다.⁴⁻⁶⁾ 미토콘드리아내의 ATP 의존성 K⁺ 이온통로 (KATP 이온통로)가 인산화에 의해 조절됨이 입증되었다.⁷⁻⁸⁾ KATP 이온통로의 인산화가 허혈전처치의 심장보호에 미치는 영향에 대한 연구의 대부분은 protein kinase C (PKC)의 역할에 중점을 두고 있었다. PKC는 인산화에 의해 KATP 이온통로의 활성을 증가시키며, 하나 이상의 수용체가 매개하는 경로에서 연결고리로서 역할을 할 수도 있다고 한다.⁹⁾ 허혈전처치의 기전 중의 하나로서 adenosine, bradykinin,

교신저자 : 박 경 록

606-702 부산시 서구 압남동 34 고신의대 복음병원 치과
고신대학교 의과대학 치과학 교실
TEL. 051-990-6150

nitric oxide (NO) 그리고 prostacyclin과 같은 내인성 물질의 방출이 주장되었고^{10,12)}, 전처치를 한 심장에서의 cGMP의 수준이 전처치를 하지 않은 심장보다 높다는 것이 보고된 바 있다^{13,15)}. cGMP가 protein kinase G (PKG)의 활성화를 통해 단백질 인산화를 유도할 수 있다는 것을 고려하면, 허혈전처치에 PKG-dependent phosphorylation이 관여하는 것을 예상할 수 있으나, 오늘날까지 허혈전처치에서의 PKG의 역할과 PKG의 target proteins에 대하여는 상세하게 밝혀져 있지 않다.

KATP 이온통로가 serine/threonine residues를 포함하는 phosphorylation sites를 가지고 있으며^{16,19)}, serine/threonine residues의 인산화에 의해 활성화된다²⁰⁾고 한다. PKG가 serine/threonine protein kinase라는 것을 고려하면, PKG는 허혈전처치를 중재하는 KATP 이온통로의 단백질 인산화를 일으킬 수도 있다. 실제로 cGMP에 의해 KATP 이온통로가 조절되는 것은 난모세포^{21, 22)}, 췌장 β -세포^{23, 24)}, 혈관 평활근세포^{25, 26)}, 그리고 심근세포^{24,27)}에서 증명되었으며, PKG의 활성화에 의하여 중재된다고 주장되기도 하였으나, PKG가 KATP 이온통로를 활성화하는 것은 직접 관찰되지 않았다.

본 실험은 PKG-dependent phosphorylation에 관여하는 신호전달경로를 알아보기 위하여 고안하였다. 또한 허혈 및 전처치에 심장박편 모델을 사용하여 PKG/KATP 이온통로가 매개하는 전처치의 생화학적 기전도 연구하였다.

재료 및 방법

1. 심장에 대한 처리

체중 150-280g의 토끼를 sodium pentobarbital (50 mg/mL, 1 mL/kg body weight) 과 heparin (300 IU/mL)으로 마취 시킨 후 심장을 노출시켰다. 대동맥에 삽관을 하여 심장에 대한 인공관류를 시행하였다. 제거된 심장을 Langendorff 관류장치에 넣은 후, 효소법을 이용하여 전기생리학적 실험에 사용하기 위하여 단일 심실근세포로 분리하였다.²⁸⁾ 또한 malondialdehyde (MDA) 함유량과 lactate dehydrogenase (LDH) 방출량도 측정하였다.

2. 전기생리학적 측정치의 기록 및 자료의 분석

cell-attached patch와 inside-out patch에서 단일 이온통로 전류를 측정하였다.²⁹⁾ patch-clamp amplifier (EPC-7, LIST, Darmstadt, Germany; Axopatch-1D, Axon Instruments, Foster City, CA)를 이용하여 이온통로 활성을 측정하였다. DAD-12 superfusion system (Adams & List Associates, New York, USA)를 이용하여 100 ms 이내에 발생하는 급격한 변화를 측정하였다. 실험은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 실온에서 시행하였다. 막전류는 0.1-10 kHz에서 역과되어서 0.4-20 kHz에서 디지털화 하였다. open state를 판정하는 한계치는 단일 이온통로 진폭의 절반으로 설정하였다.³⁰⁾ 60초 이상의 연속 기록으로부터 open time histogram을 형성하였다. 다음 공식을 이용하여 open probability (PO)를 계산하였다.

$$PO = \frac{\sum_{j=1}^N t_j}{N \cdot T_d}$$

t_j 는 open state에서 $j = 0, 1, 2, \dots, N$ 이온통로에 상응하는 전류수준에서 소비된 시간이고, T_d 는 기록의 지속시간이며, N 은 patch 내에서 활성화된 이온통로의 숫자이다. patch 내의 이온통로의 수는 zero ATP에서 연장된 기간 동안에 관찰된 최대 전류를 평균단위전류진폭으로 나눔으로써 측정된다. PO는 30초 이상의 기록들에서 계산하였다.

3. MDA content와 LDH release의 측정

심장 박편의 준비 : 마취 후 심장을 Langendorff 장치에 장치하고 육안상 혈액이 보이지 않을 때 까지 산소 처리된 정상 Tyrode 용액으로 5-6분간 역으로 관류하였다. Stadie-Riggs microtome을 이용하여 심장의 박편(0.4-0.5 mm thick)을 제작하여 4°C 의 modified Cross-Taggart medium에 보관하였다.

Experimental protocol : 평형에 도달할 때까지 기다린 후 (60 min), 심박편은 5분간의 처치 시간을 주었다 (Fig. 6A). 이 시간 동안에 심장박편은 300 μM SNAP, 10 μM Sp-8-Br-PET-cGMPS으로 전처치 하거나 허혈을 만들기 위하여 95% N₂-5% CO₂로 전처치 하였다. 이러한 전처치는 KATP 이온통로의 기능과 PKG 경로를 알아보기 위하여 30 μM glibenclamide나 1 μM Rp-8-Br-PET-cGMPS이 존재하는 경우에서도 반복하였다. 대조군으로 사용된

심장박편과 무산소 상태에 노출시키기만 한 심장박편은 초기 5분 동안 어떠한 처치도 하지 않았다. 처치를 한 후 수세를 하고 15분간 방치하였다. 다음 대조군을 제외한 모든 군의 심장 박편을 100% O₂ 를 95% N₂-5% CO₂ 로 치환한 후 30분이 경과하게 한 후 60분간 산소를 공급하였다. 그리고 난 후 MDA와 LDH의 방출을 측정하였다.

4. 자료 분석

통계자료의 검정을 위하여 unpaired Student's t test와 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하였으며, ANOVA의 사후 검정은 Student-Newman-Keuls test로 시행하였다. $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 모든 자료는 means $\pm$ S.E로 나타내었다.

결 과

1. SNP가 토끼 심실근 세포의 KATP 이온통로 활성화에 미치는 효과

KATP 이온통로가 NO의 작용에 관련되어 있다는 사실을 알아보기 위하여, cell-attached patches의 KATP 이온통로에 NO 제공물질이 미치는 영향을 조사 하였다. (Fig. 1A & B). 그러기 위하여 NO 제공물질(49)로 알려진 sodium nitroprusside (SNP)을 사용하였다. giga-seal 형성 후 bath solution을 정상 Tyrode 용액에서 high K⁺ 용액으로 바꾸었다. -40 mV의 pipette potential에서, inward rectifier K⁺ 이온통로를 통한 단위전류를 기록하였다. 이러한 상황에서 KATP 이온통로는 1 mM SNP이 존재할 때에도 활성화되지 않았으나, pinacidil(50 μ M)을 적용하면 KATP 이온통로가 개방되었다(Fig. 1A).

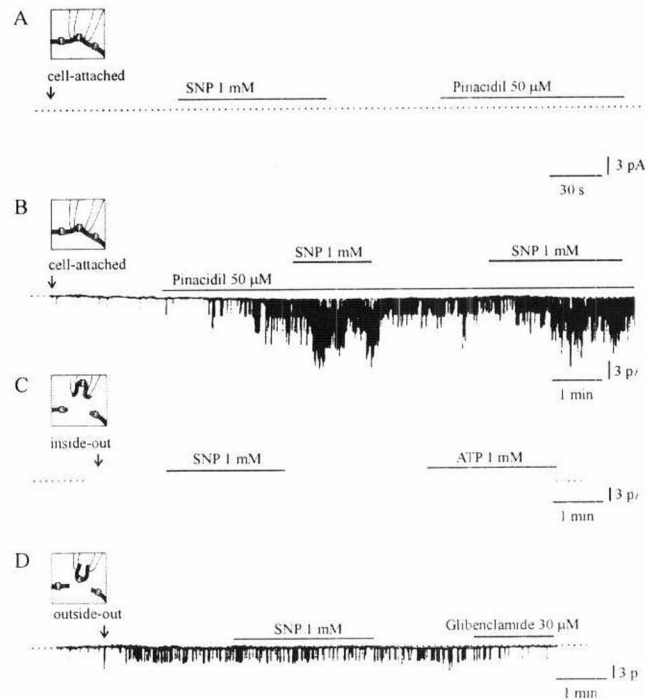


Fig.1 The effect of SNP on the KATP channel activity in rabbit ventricular myocytes. SNP (1 mM), Pinacidil (50 μ M), ATP (1 mM), and glibenclamide (30 μ M) were added to the bath solution for the periods indicated by the bars. A. The effect of SNP on the activation of KATP channels in the absence of pinacidil in cell-attached patches. B. Reversible activating effect of SNP on the pinacidil-induced KATP channel activity in cell-attached patches. The pipette potential was held at -40 mV in the cell-attached patch experiments. C. The effect of SNP on the KATP channel activity in inside-out patches held at -40 mV. D. The effect of SNP on the KATP channel activity in outside-out patches held at -40 mV. Data were sampled at 20 kHz and filtered at 1 kHz. Dashed line indicates the zero current level.

그러한 이온통로의 I-V relations은 약 76 pS의 평균 단일 이온통로 conductance, 거의 0 mV의 reversal potential을 보였다. SNP (1 mM)을 첨가함으로써 pinacidil-induced KATP 이온통로의 활성이 증강되는 것이 12 patches에서 관찰되었다(Fig. 1B). 이렇게 증강된 것은 SNP를 제거하지 않고도 역전되었다. SNP는 단일 이온통로 전류진폭에는 영향이 없었다.

SNP가 KATP 이온통로 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. Fig.1C는 inside-out patch에서 얻어진 대표적인 결과를 보여준다. 6 patches에서 평균 Po는 SNP를 넣기 전에 0.184 ± 0.055 였고, 넣은 후에는 0.176 ± 0.071 이었

다 ($P > 0.05$, $n = 6$ patches). SNP (1 mM)를 outside-out patch의 extracellular surface에 적용하여도 이온통로 활성을 증가시키지 못하였다 (Fig. 1C); 평균 P_o 는 SNP를 적용하기 전에는 0.135 ± 0.081 이었고, 적용한 후에는 0.141 ± 0.069 이었다($P > 0.05$, $n = 3$ patches). ATP (1 mM, Fig. 1B) 와 glibenclamide (30 μ M, Fig. 1D)를 첨가하면 이온통로 활성을 즉각 억제하였다.

SNP가 cGMP/PKG-dependent mechanism을 통하여 pinacidil에 의한 KATP 이온통로 활성을 도와주는지 조사하기 위하여 선택적 PKG 억제제인 Rp-pCPT-cGMP를 사용하였다(Fig. 2).

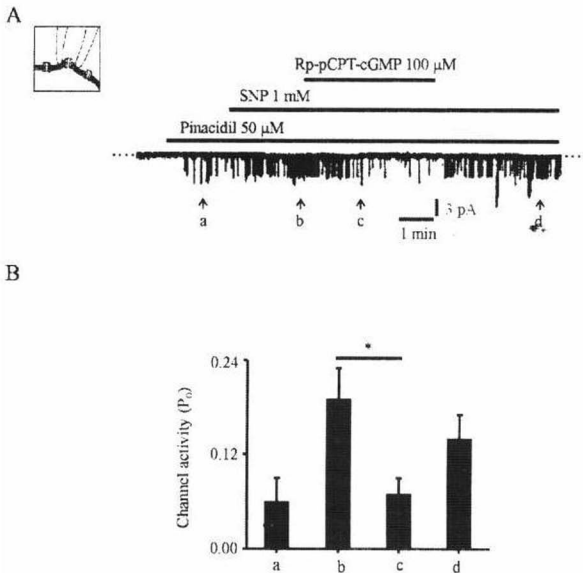


Fig. 2 The effect of a selective inhibitor of PKG on the SNP-induced KATP channel activity. A. Current recording from cell-attached patches held at -40 mV. The solution exchange protocol for pinacidil, SNP, and Rp-pCPT-cGMP is shown above current trace. Data were sampled at 20 kHz and filtered at 1 kHz. Dashed line indicates the zero current level. Channel activities of the records at the times marked by “*” are shown in B. B. Histogram showing the pooled data (mean $\pm$ S.E.) for P_o for the following conditions: 50 μ M pinacidil alone (a), 50 μ M pinacidil + 1 mM SNP in the bath solution (b), additional application of 100 μ M Rp-pCPT-cGMP (c), and washout of 100 μ M Rp-pCPT-cGMP (d). * Significant ($P < 0.05$) difference from control (before application of Rp-pCPT-cGMP) value.

KATP 이온통로 활성에 대한 SNP의 증강효과는 Rp-pCPT-cGMP (100 μ M)에 의해 억제되었다(Fig. 2A); Rp-

pCPT-cGMP를 첨가하기 전의 평균 P_o 는 0.237 ± 0.049 이었고, 첨가후에는 0.092 ± 0.053 이었다($P < 0.05$, $n = 5$ patches, Fig. 2B).

2. 막투과성 cGMP 유사 화합물이 KATP 이온통로에 미치는 효과

cGMP/PKG 의존성 기전이 SNP의 적용과 유사한 효과를 발휘하는지 알아보기 위하여 강력한 PKG 활성화물질인 8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-pCPT-cGMP)가 pinacidil에 의한 단일 이온통로의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. pinacidil에 의한 KATP 이온통로 활성은 8-pCPT-cGMP (100 μ M)을 첨가함으로써 감소하였다(Fig. 3A).

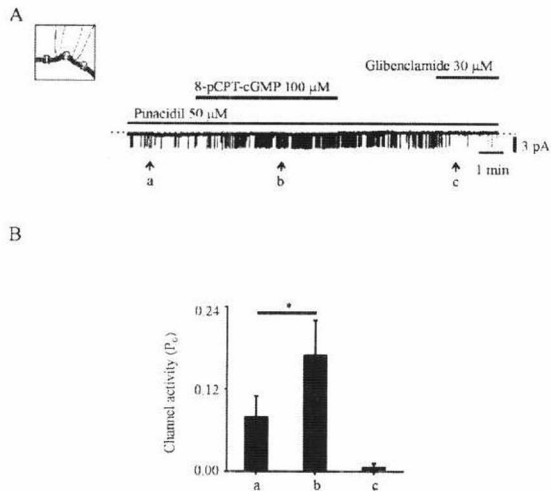


Fig. 3 The effect of a potent activator of PKG on pinacidil-induced single channel activity. The pipette potential was held at -40 mV in cell-attached patches. A. Representative record of the effect of 100 μ M 8-pCPT-cGMP followed by 30 μ M glibenclamide on the pinacidil-induced single-channel activity. Glibenclamide applied extracellularly caused a marked inhibition of pinacidil-induced single-channel activity. Data were sampled at 20 kHz and filtered at 1 kHz. Dashed line indicates the zero current level. Channel activities of the records at the times marked by “*” are shown in B. B. Histogram showing the pooled data (mean $\pm$ S.E.) for P_o for the following conditions: pinacidil alone (a), pinacidil + 8-pCPT-cGMP (b), and subsequent application of glibenclamide (c). * $P < 0.05$ relative to pinacidil alone group.

6 patches에서 8-pCPT-cGMP를 첨가함으로써 평균 P_o 가 2.13 ± 0.12 배 증가하였다($P < 0.05$, $n = 6$). pinacidil에

의한 단일 이온통로 활성화는 $30 \mu\text{M}$ glibenclamide를 첨가함으로써 억제되었다($P_0 = 0.007 \pm 0.005$). 이 자료는 Fig. 3B에 요약되어 있다.

3. 절제한 inside-out patches에서 PKG의 활성이 KATP 이온통로에 미치는 효과

KATP 이온통로의 활성화에 cGMP/PKG 의존성 기전이 관여되어 있는지를 평가하기 위하여 절제한 inside-out patches에서 cGMP, PKG, 그리고 ATP의 다양한 조합을 사용하여 시험하였다.

절제한 inside-out patches에서 KATP 이온통로의 활성이 증가되는 것은 ATP와 cGMP가 함께 있는 상태에서 PKG를 적용할 때에만 관찰되었다(Fig. 4A). patch의 절제 후, ATP ($100 \mu\text{M}$)와 cGMP ($100 \mu\text{M}$)는 자발적인 KATP 이온통로의 개방을 억제하였다. ATP와 cGMP가 계속 존재하면 PKG의 농도 증가가 이온통로의 활성을 증강시켰다.

이러한 자극효과에 대한 K_d 값은 $0.08 \pm 0.02 \text{ U}/\mu\text{L}$ 였다(Fig. 4B). Rp-8-Br-PET-cGMPS은 PKG-induced KATP 이온통로의 활성을 농도에 따라 증가시켰다(Fig. 4C). 이러한 억제효과에 대한 K_d 값은 $0.09 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 였다(Fig. 4D). Fig. 4E에서 ATP를 ATP γ S로 치환하였다. KATP 이온통로는 ATP γ S ($100 \mu\text{M}$)와 cGMP ($100 \mu\text{M}$)에 의해 억제되었으며 P_0 는 0.317에서 0.063으로 감소하였다(Fig. 4E).

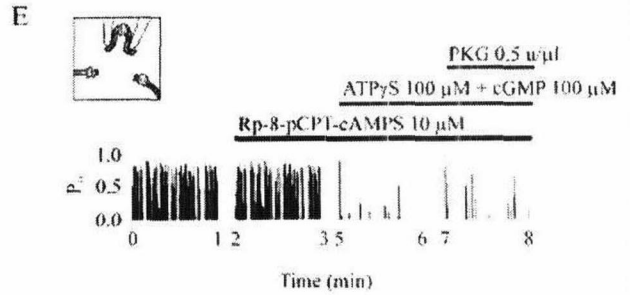
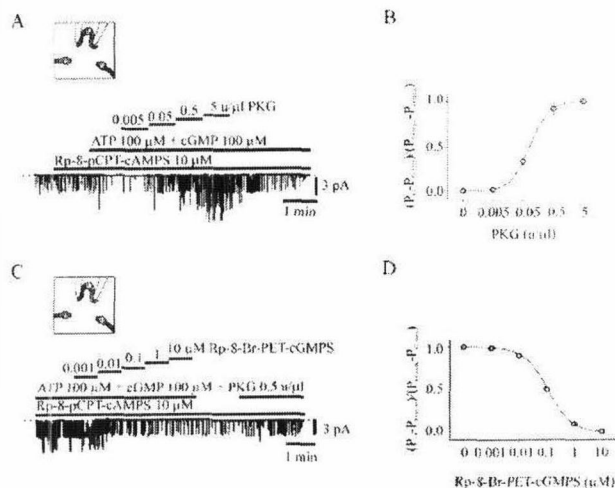
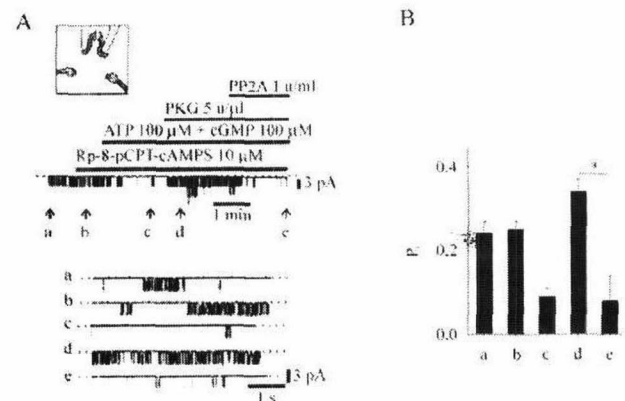


Fig. 4 Effects of exogenous PKG on KATP channel activity in inside-out patches. ATP and cGMP are cofactors required for PKG activity. A, continuous current traces from representative experiments showing the effect of the sequential addition of PKG to the cytoplasmic surface of an inside-out. C, the effect of the PKG inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMP on PKG activation-induced KATP channel activity, demonstrating the specificity of PKG in stimulating the KATP channel activity. D, the relationship between Rp-8-Br-PET-cGMP concentration and relative channel activity from a series of experiments similar to that shown in C. E, the effect of replacing ATP with ATP γ S on the channel activity in inside-out patches.

그러나 그 후 PKG ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$)를 추가로 첨가하여도 이온통로 활성을 증가시키지 못하였다($P_0 = 0.083$).

4. PKG에 의해 활성화된 KATP 이온통로의 protein phosphatase에 의한 역전

PKG에 의한 KATP 이온통로의 활성화에 대한 protein phosphatase의 효과에 대하여 시험하였다.



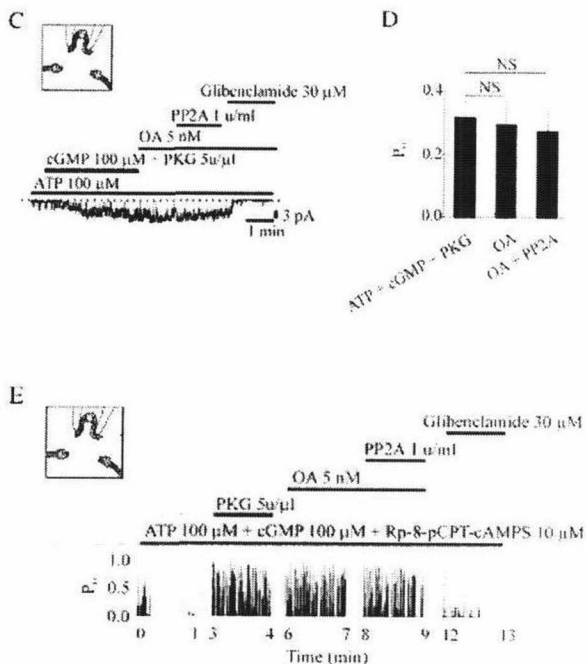


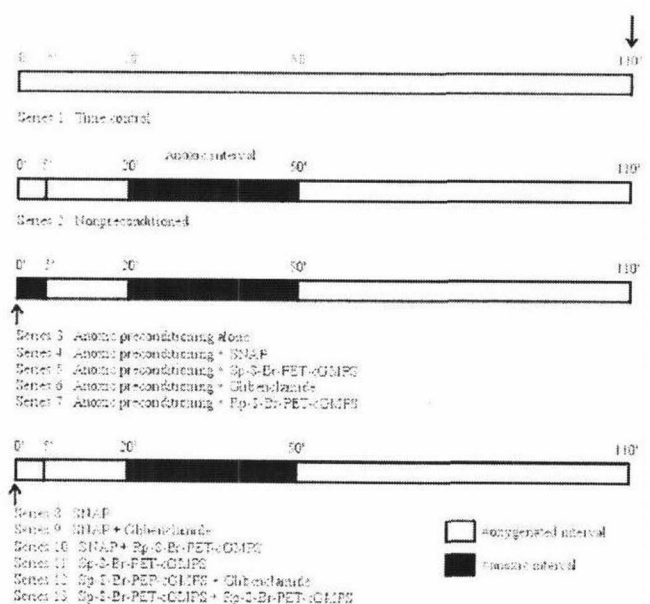
Fig. 5 Effects of exogenous PP2A on the KATP channel activity stimulated by PKG. A, current recording from an inside-out patch held at -40 mV. B, change of channel activity in response to PP2A in inside-out patches. C, effect of exogenous PP2A on the KATP channel activity stimulated by PKG activation in the presence of OA. D, the changes in channel activity in response to PP2A in the presence of OA. Similar results were observed in the presence of Rp-8-pCPT-cAMPS (E).

Fig. 5A는 PKG가 활성화 되어 있을 때 PP2A (1 U/mL)를 적용한 효과를 나타낸다. patch의 절제후 ATP (100 μ M)와 cGMP (100 μ M)는 자발적인 KATP 이온통로의 개방을 억제하였으며 PO는 0.163에서 0.012로 감소하였다. ATP와 cGMP가 계속 존재하면 PKG (5 U/ μ L)는 이온통로 활성을 증가시켰다(PO = 0.122). 외인성 PP2A의 적용은 PKG가 중재하는 KATP 이온통로 활성을 억제하였다(PO = 0.032). PP2A에 의해 이온통로 활성이 감소하는 것은 다른 5 patches에서도 관찰되었다(Fig. 5B). 더욱이 PP2A의 효과는 강력한 protein phosphatase인 okadaic acid (OA)에 의해 억제되었다(Fig. 5C). ATP와 cGMP가 존재할 때 PKG를 적용하면 이온통로 활성의 증가를 야기하였다(PO = 0.27). ATP, cGMP 및 PKG를 세척해 내고 OA를 적용하면 KATP 이온통로는 유지되었다(PO = 0.28). OA가 있을 때 PP2A는 이온통로 활성에

변화를 일으키지 않았다(PO = 0.27). 이 결과는 7 patches중 6개에서 동일하였다(Fig. 5D). Fig. 5E에서처럼 PKA 억제제가 존재할 때에도 유사한 효과가 관찰되었다.

5. 산소결핍과 산소결핍 전처치에 대한 PKG에 의한 KATP 이온통로 활성의 역할

PKG에 의해 유도된 KATP 이온통로 활성이 산소결핍을 이용한 심근허혈의 동물 모델에서 산소결핍 전처치의 생리학적 효과를 약리학적으로 모방할 수 있는지를 알아보기 위하여 전처치를 한 근육과 전처치를 하지 않은 근육에서 60분간 산소결핍 처치 후 lipid peroxidation (Fig. 6B)와 LDH 방출 (Fig. 6C)에 대한 NO 제공물질, PKG 활성화물질, glibenclamide 그리고 PKG 차단제의 효과를 알아보았다(Fig. 6A). 대조군에서 MDA 형성과 LDH 방출은 250 ± 120 pmole/mg protein, $5 \pm 2\%$ 였다 (Series 1). 처치하지 않은 근육에서 30분간 산소결핍 처리 후 60분간 산소재공급을 하였는데 (Series 2), 실험이 끝날 때 대조군과 비교하여 현저하게 증가하였다. 5분간 산소결핍을 1회 부여한 근육 (Series 3)에서는 MDA형성과 LDH방출이 현저하게 감소하였다($P < 0.05$ vs Series 2). 산소결핍의 효과는 30 μ M glibenclamide (Series 6; $P < 0.05$ vs Series 3)와 1 μ M Rp-8-Br-PET-cGMPS (Series 7; $P < 0.05$ vs Series 3)에 의하여 거의 완전히 방지되었다.



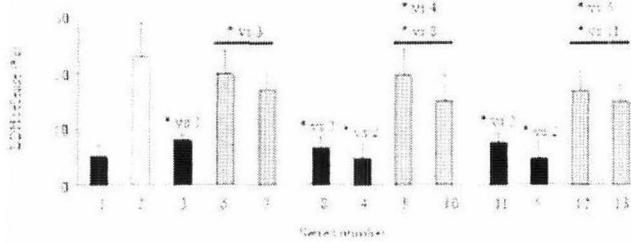


Fig. 6 Lactate dehydrogenase (LDH) release of rabbit heart slices 60 min after a 30-min anoxic insult. Heart slices exposed to the preconditioning by anoxia (series 3), NO donor (series 8), and PKG activator (series 11) released significantly less LDH compared with nonpreconditioned heart slices (series 2) where they were exposed to the 30-min anoxia only.

300 μ M SNAP (Series 8) 혹은 10 μ M Sp-8-Br-PET-cGMPS (Series 11)로 전처치를 하면 MDA 형성과 LDH 방출을 현저히 감소시켰으며 Series 3와 차이가 없었다 ($P > 0.05$). 산소결핍 전처치와 동시에 300 μ M SNAP (Series 4) 혹은 10 μ M Sp-8-Br-PET-cGMPS를 투여하였을 때 (Series 5) 산소결핍 전처치에 의한 심장보호 정도를 변경시키지 않았다 ($P > 0.05$ vs Series 3). 30 μ M glibenclamide (Series 9 and 12; $P < 0.05$ vs Series 4 and 8) 과 1 μ M Rp-8-Br-PET-cGMPS (Series 10 and 13; $P < 0.05$ vs Series 5 and ¹¹⁾로 전처치를 하면 300 μ M SNAP 과 10 μ M Sp-8-Br-PET-cGMPS로 전처치를 한 근육에서의 심장보호 효과를 차단 하였다.

고찰

심장근육에서 KATP 이온통로는 허혈로부터 심장을 보호하는 기전인 허혈 전처치에 관련되어 있다고 알려져 있는데 세포내 ATP 농도[ATP]_i가 특정 수준 이하로 감소하면 개방된다.³³⁻³⁵⁾ 또한 adenosine³⁶⁾, PKC³⁷⁾, ADP³⁸⁾ 그리고 lactate³⁹⁾와 같은 다양한 extracellular modulators와 intracellular modulators가 KATP 이온통로의 활성을 일으켜서 허혈전처치에 기여하는 것으로 알려졌다. 또한 cGMP/PKG경로도 허혈-재관류 손상에 대하여 심장보호 역할을 한다는 주장도 있었고^{10, 11, 15)}, Ca²⁺ 획득능력의 조정^{40, 41)}, Ca²⁺에 대한 근섬유의 예민도 감소⁴²⁾, 그리고 항혈소판 효과를 동반한 혈관확장⁴³⁾ 등이

심장보호 역할에 연관되어 있다는 문헌도 있다. 비록 cGMP/PKG-pathway와 KATP 이온통로가 허혈전처치의 심장보호 효과에 관련되어 있다는 것이 확인되었지만 신호전달 기전은 완벽하게 이해할 수 없다.

본 실험에서 NO 제공물질과 PKG 활성화 물질인 pinacidil에 의한 KATP 이온통로를 활성화 시키고, PKG를 선택적으로 차단하는 물질은 그 효과를 차단함이 확인되었다. PKG는 cGMP와 ATP가 모두 존재할 때 이온통로 활성을 증가시켰다. 이러한 PKG의 작용은 열-불활성화, ATP를 ATP γ S로 치환, PKG 억제제 혹은 외인성 PP2A의 적용에 의해 차단되었다. 이러한 결과들은 일련의 신호전달 경로가 KATP 이온통로의 조절에 관련되어 있다는 것을 의미한다. NO 제공물질은 NO를 방출하고, NO는 심근세포에서 guanylate cyclase를 활성화 하여 cGMP의 축적과 PKG의 활성화를 유발하고, KATP 이온통로를 인산화하여 활성화 시킨다.

그러나 다른 보고도 있는데, Shinbo와 Iijima²⁷⁾는 guinea-pig의 심실근 세포에서 K⁺ 이온통로 개방물질에 의하여 야기된 KATP 이온통로의 활성을 NO가 증강시키는 증명하였다. 그러나 동일한 조건 하에서 조차도 8-Br-cGMP가 KATP 이온통로를 억제한다는 사실이 확인되었다. 그래서 그들은 NO에 의한 KATP 이온통로의 증강 기전은 cGMP/PKG 신호전달 경로와 무관하다고 주장 하였다. 게다가 Tsuura 등²⁴⁾은 쥐의 심실근세포에서 NO 제공물질이 KATP 이온통로에 영향을 미치지 않는다고 보고 하였다. 여러 연구에서 서로 다른 결과가 나오는 이유는 확실하지 않지만 실험조건과 실험동물의 차이에 있지 않은가 하고 생각해 볼 수 있는데, 실험조건의 주된 차이점은 patch recordings의 방법과 사용한 화합물에서 발견되었다. Shinbo와 Iijima²⁷⁾, Tsuura 등²⁴⁾은 whole-cell mode와 cell-attached mode에서 실험하였지만 본 연구에서는 cell-attached mode에서만 실험을 하였다. NO/cGMP가 KATP 이온 통로에 미치는 영향에 직접적인 관계가 있는 것이 아니고 PKG 활성화와 phosphorylation에 관련된 일련의 신호전달을 요한다는 사실을 고려해 보면 (Fig. 1), whole-cell mode의한 세포성분의 회석이 NO/cGMP의 효과를 완화한다는 것은 가능하다고 생각된다.

Shinbo와 Iijima²⁷⁾는 8-Br-cGMP는 PKG의 특이성 활성화 물질이라고 주장하였다. 그러나 8-Br-cGMP (100-

500 μ M)는 실험결과를 해석 하는데 한계가 있다.

본 연구에서는 inside-out patches에서 PKG의 효과를 직접 시험하였다. Shinbo 와 Iijima²⁷⁾, 그리고 Tsuura 등²⁴⁾도 KATP 이온통로에 대한 PKG의 효과를 직접 시험하지는 않았다. 본 실험에서 발견된 것은 토끼 심실 근세포에서 PKG-dependent phosphorylation을 통하여 KATP 이온통로를 개방시킬 수 있다는 소견을 확인하였다. PKG가 이온통로에 직접 작용한다는 결론을 얻기 위하여 PKA가 억제된 상황에서 실험을 하였다. 게다가 inside-out patches에서 OA와 PP2A의 효과를 증명하였으며, 이는 외인성 PP2A가 KATP 이온통로의 PKG-mediated activation을 역전 시키는 원인이며, KATP 이온통로가 PKG와 PP2A 둘 다의 통제하에 있다는 것을 의미한다. 그러므로 KATP 이온통로의 활성화는 net phosphorylation state에 의존하는 것 같으며, 결국 PKG와 phosphatase의 활성화 사이의 균형에 의존하는 것 같다.

KATP 이온통로 활성화는 다양한 자극에 의한 심장보호에 관련되어 있음이 입증되어 있으며, 짧은 허혈과 비허혈 자극이 포함되어 있다.³⁵⁾ 더욱이 KATP 이온통로를 개방시킬 수 있는 약제는 심장보호 효과를 일으킬 수 있다.³⁵⁾ 비록 KATP 이온통로 활성화가 심장 보호 효과를 일으키는 정확한 기전은 완벽하게 알 수는 없지만, 최근의 연구에 의하면 미토콘드리아의 KATP 이온통로가 허혈 전처치에서 심장보호 효과에 관여한다는 것을 의미한다.^{44, 45)} cGMP/PKG 신호전달 경로가 KATP 이온통로를 증강킨다는 본 연구의 결과는 cGMP/PKG 신호전달 경로가 심장 미토콘드리아의 KATP 이온통로를 조절할 수 있다는 것을 의미한다. 실제로 근섬유막의 KATP 이온통로를 조절하는 약물이나 second messengers가 미토콘드리아의 KATP 이온통로를 조절한다는 것이 증명된 바 있다.^{45, 46)} 그리하여 미토콘드리아의 KATP 이온통로 혹은 근섬유막의 KATP 이온통로에서 PKG-mediated activation이 허혈전처치에 의한 심장보호 효과를 일으킨다는 것은 실험에 의하여 밝혀내어야 할 것으로 사료된다.

결론

산화질소/cGMP/cGMP-의존성 인산화효소로 이어지는

생체신호 전달기전이 ATP 의존성 K 이온통로 및 그와 관련된 세포막 단백질을 인산화 시켜 ATP 의존성 K 이온통로의 활성을 조절할 수 있으며, 상기한 기전은 토끼 심실근세포에서 산화질소가 허혈전처치의 심장보호기전에 관여하는 생체신호전달기전으로 생각된다.

참고문헌

1. Rapundalo, S. T. : Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-588, 1988
2. Murry, C. E., Jennings, R. B., and Reimer, K. A. : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136, 1986
3. Weinbrenner, C., Liu, G. S., Cohen, M. V., and Downey J. M. : Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2383-2391, 1997
4. Auchampach, J. A., and Gross, G. J. : Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 264: H1327-H1336, 1993
5. Cohen, M. V., and Downey, J. M. : Ischaemic preconditioning: can the protection be bottled? *Lancet* 342: 6, 1993
6. Ganote, C., and Armstrong, S. : Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res* 27: 1387-1403, 1993
7. Yao, Z., and Gross, G. J. : A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs. Efficacy, time course, and role of KATP channels. *Circulation* 89: 1229-1236, 1994
8. Van Winkle, D. M., Chien, G. L., Wolff, R. A., Soifer, B. E., Kuzume, K., and Davis, R. F. : Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel. *Am J Physiol* 266: H829-H839, 1994
9. Light, P. E., Sabir, A. A., Allen, B. G., Walsh, M. P., and French, R. J. : Protein kinase C-induced changes in the stoichiometry of ATP binding activate cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. A possible mechanistic link to ischemic preconditioning. *Circ Res* 79: 399-406, 1996
10. Parratt, J. R. : Protection of the heart by ischaemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *Trends Pharmacol Sci* 15: 19-25, 1994
11. Parratt, J. : Possibilities for the pharmacological exploitation of ischaemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 27: 991-1000, 1995
12. Parratt, J. R., Vegh, A., and Papp, J. G. : Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular

- reference to ischemic preconditioning--a brief review of the evidence. *Can J Physiol. Pharmacol* 73: 837-842, 1995
13. Yamaguchi, F., Nasa, Y., Yabe, K., Ohba, S., Hashizume, Y., Ohaku, H., Furuhashi, K., and Takeo, S. : Activation of cardiac muscarinic receptor and ischemic preconditioning effects in in situ rat heart. *Heart Vessels* 12: 74-83, 1997
 14. Billman, G. E. : Effect of carbachol and cyclic GMP on susceptibility to ventricular fibrillation. *FASEB J* 4: 1668-1673, 1990
 15. Iliodromitis, E. K., Papadopoulos, C. C., Markianos, M., Paraskevaidis, I. A., Kyriakides, Z. S., and Kremastinos, D. T. : Alterations in circulating cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) during short and long ischemia in preconditioning. *Basic Res Cardiol* 91: 234-239, 1996
 16. Ashford, M. L., Bond, C. T., Blair, T. A., and Adelman, J. P. : Cloning and functional expression of a rat heart KATP channel. *Nature* 370: 456-459, 1994
 17. Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. : The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins. *Nature* 374: 135-41, 1995
 18. Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Velimirovic, B., Wickman, K., Navarro, B., and Clapham, D. E. : The cardiac inward rectifier K⁺ channel subunit, CIR, does not comprise the ATP-sensitive K⁺ channel, IKATP. *J Biol Chem* 270: 28777-28779, 1995
 19. Inagaki, N., Tsuura, Y., Namba, N., Masuda, K., Gonoi, T., Horie, M., Seino, Y., Mizuta, M., and Seino, S. : Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* 270: 5691-5694, 1995
 20. Kwak, Y. G., Park, S. K., Cho, K. P., and Chae, S. W. : Reciprocal modulation of ATP-sensitive K⁺ channel activity in rat ventricular myocytes by phosphorylation of tyrosine and serine/threonine residues. *Life Sci* 58: 897-904, 1996
 21. Sakuta, H., Okamoto, K., and Watanabe, Y. : Modification by cGMP of glibenclamide-sensitive K⁺ currents in *Xenopus* oocytes. *Japan J Pharmacol* 61: 259-262, 1993
 22. Sakuta, H., Okamoto, K., and Tandai, M. : Atrial natriuretic factor potentiates glibenclamide-sensitive K⁺ currents via the activation of receptor guanylate cyclase in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 267: 281-287, 1994
 23. Ropero, A. B., Fuentes, E., Rovira, J. M., Ripoll, C., Soria, B., and Nadal, A. : Non-genomic actions of 17 β -oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol* 521: 397-407, 1999
 24. Tsuura, Y., Ishida, H., Hayashi, S., Sakamoto, K., Horie, M., and Seino, Y. : Nitric oxide opens ATP-sensitive K⁺ channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells. *J Gen Physiol* 104: 1079-1099, 1994
 25. Kubo, M., Nakaya, Y., Matsuoka, S., Saito, K., Kuroda, Y. : Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 471-476, 1994
 26. Wellman, G. C., Quayle, J. M., and Standen, N. B. : ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 507: 117-129, 1998
 27. Shinbo, A., and Iijima, T. : Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K⁺ current induced by K⁺ channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 120: 1568-1574, 1997
 28. Han, J., Kim, E., Lee, S. H., Yoo, S., Ho, W. K., and Earm, Y. E. : cGMP facilitates calcium current via cGMP-dependent protein kinase in isolated rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 435: 388-393, 1998
 29. Hamill, O. P., Marty, A., Nether, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 391: 85-100, 1981
 30. Colquhoun, D., and Sigworth, F. J. : Fitting and statistical analysis of single channel records: Single-channel Recording, Plenum, NY, 1983
 31. Ahlner, J., Andersson, R. G. G., Torfgård, K., and Axelsson, X. L. : Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions. *Pharmacol Rev* 43: 351-423, 1991
 32. Southam, E., and Garthwaite, J. : Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neurosci Lett* 130: 107-111, 1991
 33. Noma, A. (1983) *Nature* 305, 147-148
 34. Cameron, J. S., and Baghdady, R. : Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress. *Cardiovasc Res* 28: 788-796, 1994
 35. Duncker, D. J., and Verdouw, P. D. : Role of K⁺ATP channels in ischemic preconditioning and cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther* 14: 7-16, 2000
 36. Kim, E., Han, J., Ho, W., and Earm, Y. E. : Modulation of ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit ventricular myocytes by adenosine A1 receptor activation. *Am J Physiol* 272: H325-H333, 1997
 37. Zhu, Z., Li, Y. L., Li, D. P., and He, R. R. : *Pflügers Arch Eur J Physiol* 439: 808-813, 2000
 38. Han, J., Kim, E., Ho, W. K., and Earm, Y. E. : *Heart Vessels* 9: 94-96, 1995
 39. Han, J., So, I., Kim, E. Y., and Earm, Y. E. : ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 425: 546-548, 1993
 40. Lincoln, T. M., and Keely, S. L. : Regulation of cardiac cyclic GMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Acta* 676: 230-244, 1981
 41. Wahler, G. M., and Dollinger, S. J. : Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 268: C45-54, 1995

42. Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G., and Sollott, S. J. : Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 1020-1031, 1999
43. Radomski, M. W., Palmer R. M. J., and Moncada, S. : The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 1482-1489, 1987
44. Liu, Y., Sato, T., O' Rourke, B., and Marban, E. : Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97: 2463-2469, 1998
45. Sato, T., O' Rourke, B., and Marban, E. : Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ Res* 83: 110-114, 1998
46. Grover, G. J., Garlid, K. D. : ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mo. Cel. Cardiol* 32: 677-695, 2000