

급성 관동맥 증후군 환자에서 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도

고신대학교 의학부 내과학 교실
이재우, 주승재, 차태준, 홍관표, 유호대

Platelet Cytoplasmic Ca^{2+} Concentration in Patients with Acute Coronary Syndromes

Jae Woo Lee, M.D., Seung Jae Joo, M.D., Tae Joon Cha, M.D.,
Kwan Pyo Hong, M.D., Ho Dae Yoo, M.D.
Department of Internal Medicine, Kosin Medical College

— Abstract —

Platelets aggregation on a fissured atherosclerotic plaque in the coronary artery can reduce coronary blood flow and lead to the acute coronary syndromes of unstable angina, acute myocardial infarction and ischemic sudden death. To evaluate the platelet activation in patients with unstable angina or acute myocardial infarction, we measured the resting platelet cytoplasmic Ca^{2+} concentration in 11 patients with the acute coronary syndromes (6 patients with unstable angina, 5 patients with acute myocardial infarction) 7 to 10 days after admissions and in 10 normal controls. After loading of a fluorescent probe, quin2, we measured platelet cytoplasmic Ca^{2+} concentration with a spectrofluorometer. Platelet cytoplasmic Ca^{2+} concentration of patients with the acute coronary syndromes ($213 \pm 41 \text{ nM}$) was not different from that of normal controls ($205 \pm 38 \text{ nM}$). These results suggested that circulating platelets from patients with the acute coronary syndromes during recovery periods were not in a activated state.

* **Key Words** : Acute coronary syndromes, Platelet cytoplasmic Ca^{2+} concentration

서 론

동맥 경화성 관동맥 질환의 임상 양상은 무 증상, 안정형 협심증, 불안정형 협심증, 급성 심근 경색증, 급사 등으로 다양하다. 관동맥 질환 환자의 약 30%는 불안정형 협심증, 급성 심근 경색증, 급사로 급성 발현이 되며, 이 질환군들을 급성 관동맥 증후군(acute coronary syndromes)으로 총칭한다.^{20,21)} 이 중 불안정형 협심증은 급성 관동맥 증후군의 병태 생리를 이해하는데 중요한 모델로 사용된다. 혈소판 응집이 불안정형 협심증의 발생에 중요한 역할을 하는데, 부분적인 관동맥 협착과 내피 손상을 만든 실험 동물 모델에서, 간헐적인 혈소판 응집에 의한 관동맥 폐쇄와 소동 및 이로 인한 관동맥 혈류의 주기적인 변화가 관찰된다.^{20,21,26)} 또한, 불안정형 협심증 환자의 혈액과 소변에서 혈소판 활성화 생성되는 β -thromboglobulin, platelet factor 4, thromboxane A_2 와 B_2 , prostaglandin, serotonin, p-selectin 등과 혈소판 thromboxane A_2 / prostaglandin H_2 수용체 수가 증가되어 있으며,^{1,7,10,12,18,22,23,26)} 급사한 불안정형 협심증 환자의 부검 소견상 44%에서 심근내 혈관에 혈소판 응집체가 발견되고, 이는 죽상경화반(atherosclerotic plaque)이 균열되어 혈전이 형성된 심외막 동맥의 분지에 국한되어 있었다는 보고⁵⁾와 불안정형 협심증 환자에게 아스피린을 투여하면, 급성 심근 경색증으로의 이행을 줄일 수 있다는 연구들^{4,16,24)}은 모두 혈소판 활성화와 응집이 불안정형 협심증의 발생에 중요한 역할을 한다는 증거이다.

혈소판이 활성화되면 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도가 증가한다. 또한 혈소판내 칼슘 이온 농도가 증가되어 있으면 칼슘 결합 물질의 완충능이 감소하여, 혈소판 응집에 필요한 세포질내 칼슘 농도의 역치에 도달하는데 필요한 칼슘 양이 적어지므로 혈소판 응집능이 증가한다. Jy 등¹³⁾은 정맥 혈전증, 뇌경색, 하지 동맥 폐쇄 등의 혈전성 질환이 있는 환자의 휴지기 혈소판 세포질과 dense tubule내에 칼슘 이온 농도가

증가되어 있으며, collagen 첨가시 혈소판 응집이 더 잘 된다고 보고하였다. 또한, 고혈압 환자의 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도가 증가되어 있고, 이는 고혈압의 혈전 색전성 합병증의 발생과 관련이 있을 것으로 생각되고 있다.^{3,6,17)} 그러나, 아직 급성 관동맥 증후군에서 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도의 변화에 관한 연구는 없다. 이에 저자들은 급성 심근 경색증, 불안정형 협심증 환자의 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 형광 탐침자인 quin2²⁵⁾를 사용하여 측정하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

고신대학교 복음병원 내과에 입원한 급성 관동맥 증후군 환자 11예(남 5예, 여 6예; 평균 연령 62 ± 8.4 세)를 대상으로 입원 후 7~10일 사이에 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 측정하였다. 이중 불안정형 협심증이 6예, 급성 심근 경색증이 5예였다. 불안정형 협심증의 진단은 안정시 흉통이 있거나, 최근 흉통의 빈도 및 지속시간이 증가하면서 심전도상 심근 허혈이 증명된 경우로 하였다. 급성 심근 경색증의 진단은 전형적인 흉통, 심전도 변화, 혈청 심근 효소치의 상승 중 2개 이상을 만족시키는 경우로 하였다. 환자군 모두에게 관동맥 조영술을 시행하여, 관동맥에 동맥 경화 병변이 있음을 확인하였다. 대조군은 심질환의 과거력이 없으며 혈압이 정상인 10예(남 6예, 여 4예; 평균 연령 58 ± 10 세)로 하였다.

2. 연구 방법

1) 채혈

압박대를 사용하지 않고 전주 정맥에서 10ml를 채혈한 후, 즉시 항응고제(2.73% citric acid, 4.48% trisodium citrate, 2% glucose)와 1:10 (v:v)의 비율로 혼합하였다. 이후 실온 $530 \times g$ 에서 5분간 원심 분리하여 platelet-rich plasma (PRP)를 분리하였다.

2) 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도의 측정

PRP에 형광 탐침자인 quin2/acetoxymethyl ether(AM)(Molecular Probe)를 20 M의 농도가 되도록 첨가한 후, 37°C에서 30분간 배양하였다. 이후 완충 용액(NaCl 145mM, KCl 5mM, MgSO₄ 1mM, Na₂HPO₄ 0.5mM, glucose 5mM, HEPES 10mM, pH 7.4 at 37°C)으로 5배 희석하고, 실온 270×g에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 혈소판 농도가 1×10⁸ cells/ml가 되도록 완충 용액에 재부유시켰다. 혈소판 수는 Coulter counter로 측정하였다. 형광 측정 직전에 Ca(NO₃)₂를 첨가하여 최종 농도가 1mM이 되도록 조절하였다. 형광(fluorescence; F)은 spectrofluorometer(SLM 4800C, SLM AMINCO)로 측정하였다. Cuvette 내의 온도를 37°C로 유지하고, magnetic stirring시켰다. excitation wavelength는 339nm, emission wavelength는 490nm에 고정시키고 형광을 측정하였다. digitonin을 투여하여(최종 농도 50 μ M), 혈소판 세포질내 quin2를 세포밖으로 빠져나오게 해서 칼슘 이온 포화 상태를 만들어 최대 형광치(Fmax)를 측정한 후, ethyleneglycol bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid(EGTA)를 최종 농도 5mM이 되도록 첨가하여 칼슘 이온 결핍 상태를 만들고 최소 형광치(Fmin)를 측정하였다(Fig 1). 최소 형광치 측정시 cuvette내 pH가 8.3이상 되도록 조절하였다. 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도는 다음 공식²⁵⁾에 의해서 계산하였다.

$$\text{cytosolic Ca}^{2+} (\text{nM}) = 115\text{nM} \times \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도의 측정은 채혈 후 3시간 이내에 완료하였다.

3) 통계 분석

모든 통계치는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. 환자군과 대조군 사이의 비교는, 연속 변수인 경우는 Mann-Whitney U test, 비연속 변수인 경우는 chi-square test로 비교하였다. 모든 통계 처리에 SPSS/PC를 사용하였다.

결 과

환자군과 대조군 사이에 연령, 성비, 체질량 지수, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 흡연율 등의 차이는 없었다(Table 1). 환자군의 혈소판 세포질내 칼슘 이온의 농도는 213 $\pm$ 41nM로, 대조군의 205 $\pm$ 38nM과 차이가 없었다. 환자군을 불안정형 협심증과 급성 심근 경색증으로 구분하였을 때 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도는 각각 208 $\pm$ 31nM, 219 $\pm$ 54nM로, 역시 대조군과 차이가 없었다(Table 2).

고 찰

관동맥내 죽상경화반의 균열은 급성 관동맥 증후군을 유발하는 기본 병리소견으로, 여기에 혈소판 응집, 혈관 수축, 혈소판-섬유소 혈전 등에 의한 일시적인 관동맥 폐쇄가 동반되면 불안정형 협심증으로, 관동맥 폐쇄가 오래 지속되면 급성 심근 경색으로 발현된다.^{20,21)} 균열된 죽상경화반에 혈소판이 응집되면, 그 자체가 관동맥을 폐쇄시켜 관동맥 혈류를 감소시킬 수 있다. 또한 serotonin이나 thromboxane과 같은 체액성 매개체를 분비하여 혈관 수축을 유발할 수도 있다.^{2,8,11,14,27)} 그리고, 떨어져 나간 혈소판 혈전은 심근 허혈이나 경색을 일으켜서 심박동과 전도에 치명적인 장애가 생길 수 있을 것으로 추측된다. 따라서 활성화된 혈소판이 급성 관동맥 증후군의 발생과 진행에 핵심적인 역할을 하므로, 치료를 위해서 혈소판 응집을 억제하기 위한 약물을 투여한다.

지금까지의 급성 관동맥 증후군의 연구에서 혈소판 활성도를 측정하는 방법으로 주로 혈소판에서 분비된 체액성 매개체나 그 수용체의 양을 측정하는 방법이 사용되었고, 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 측정하는 경우는 없었다. 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 측정하는 방법으로, 형광 탐침자인 quin2²⁵⁾나 fura2²⁶⁾를 칼슘 이온과 결합시킨 후, spectrofluorometer로 형광의

변화를 측정하는 방법이 흔히 사용된다. 이중 quin2가 먼저 개발되어 사용되었다. quin2는 칼슘 이온과 1:1로 결합하는 tetracarboxylic acid이다. 칼슘 이온과 결합하면, 결합전에 비해서 형광 신호가 약 5배 증가한다. 그러나, quin2는 친수성이 있어서 세포막을 통과하지 못하므로, AM과 결합시켜서 세포질내로 들어 보낸다. 세포질내에서 quin2/AM는 esterase에 의해서 가수 분해되고, quin2는 세포질내 칼슘 이온과 결합한다. 세포질 속으로 들어간 quin2는 세포막 통과를 할 수 없으므로, 세포질내에만 존재하게 된다. fura 2에 비해서 더 많은 양의 세포질내 quin2가 있어야만 칼슘 이온 측정이 가능한데, 이러한 양(10mM 이상)의 quin2는 완충제로 작용하므로 칼슘 이온 농도의 순간적인 변화를 기록하는데는 부적합하다는 단점이 있으나, 본 연구에서는 휴지기 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도만을 측정하므로, 오히려 더 안정적인 측정치를 제공할 수 있다는 장점이 될 수도 있어서 형광 탐침자로 quin2를 사용하였다.¹⁵⁾

본 연구에서 급성 관동맥 증후군 환자의 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도는 $213 \pm 41 \text{ nM}$ 로, 대조군의 $205 \pm 38 \text{ nM}$ 와 차이가 없었다. 급성 관동맥 증후군을 불안정형 협심증과 급성 심근 경색으로 나누어 비교하여도 대조군과 차이가 없어서, 급성 관동맥 증후군, 특히 불안정형 협심증에서 혈소판이 활성화되어 있다는 기존의 보고와 상이한 결과가 나왔다. 이러한 결과가 생긴 가능한 이유로 첫째, 검사의 시기를 들 수 있다. 본 연구에서는 흉통이 없어진 후, 안정된 상태에서 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 측정하였다. 불안정형 협심증에서 혈장 p-selectin을 측정한 연구에서, 흉통 발생 후 1시간, 3시간에 채혈한 검체에서는 p-selectin이 상승되어 있었으나 5시간 후에는 대조군과 차이가 없었다고 한다.¹²⁾ 본 연구에서는 흉통 발생 즉시 채혈하여 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 3시간 이내에 측정하는 것이 힘들었기 때문에, 흉통이 없는 안정된 상태에서 채혈이 되었다. 그러므로,

흉통이 없는 안정시에는 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도가 대조군과 차이가 없었지만 흉통이 발생한 후 1~3시간 이내에는 증가했었을 가능성이 있다. 둘째로 채혈 위치의 문제점을 생각할 수 있는데, 말초 정맥보다는 심근 혈류가 직접 유입되는 관정맥동에서 채혈하였을 때, 관동맥에서의 혈소판 칼슘 이온 농도의 변화를 더 정확하게 반영할 수 있을 것이다. 그러나, 관정맥동에서 채혈하기 위해서는 관혈적인 도관 삽입이 필요하므로 모든 환자에게 이 방법을 사용하는 데는 문제가 있다. 셋째로 급성 관동맥 증후군 환자들은 모두 칼슘 길항제를 복용하고 있었는데, 이것이 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도에 영향을 미쳤을 수 있다. 그러나, 불안정형 협심증 환자에서 관동맥을 확장시키기 위해서 칼슘 길항제의 투여가 필수적이므로, 본 연구를 위해서 칼슘 길항제를 48시간 이상 중단 후에 검사한다는 것은 불가능하였다. 또한, 칼슘 길항제인 verapamil과 nitrendipine이 혈소판이 활성화될 때 세포질 밖에서 안으로 유입되는 칼슘 이온의 이동을 차단하는데 비교적 효과가 없어 voltage-gated calcium channel이 큰 역할을 하지 않는다고 하여,¹⁹⁾ 본 연구에서는 칼슘 길항제를 복용하는 상태에서 연구가 진행되었다. 넷째로 검체 처리 과정에서 혈소판이 활성화 되었을 가능성이 있다. 본 연구에서 대조군의 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도는 $205 \pm 38 \text{ nM}$ 로서 기존 보고들의 정상 대조군에서의 측정치인 110 nM ^{6,13)} 보다 훨씬 높아서, 칼슘 이온 농도 측정 과정에서 혈소판이 활성화 되었을 가능성을 시사한다. 따라서 급성 관동맥 증후군에서 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도의 변화를 정확히 규명하기 위해서는 급성기에 채혈하여 검사하고, 검체 처리과정에서 혈소판 활성을 최소화하는 새로운 연구의 수행이 필요하다.

요 약

연구 목적 : 관동맥 죽상경화반(atherosclerotic plaque)의 균열에 뒤따르는 혈소판 응집은 급성

관동맥 증후군(acute coronary syndromes)에서 관동맥 혈류를 감소시키는데 중요한 역할을 한다. 혈소판이 활성화되면 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도가 증가하고, 혈소판 응집에 필요한 세포질내 칼슘 농도의 역치에 도달하는데 필요한 칼슘 양이 적어지므로 혈소판 응집능이 증가한다. 본 연구에서는 불안정형 협심증, 급성 심근 경색증 환자의 혈소판 활성화 정도를 알아 보기 위해서 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 측정하였다. 연구 방법: 급성 관동맥 증후군 환자 11예(남 5예, 여 6예; 평균 연령 62 ± 8.4 세)를 대상으로, 입원 후 7~10일 사이에 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도를 측정하였다. 이중 불안정형 협심증이 6예, 급성 심근 경색증이 5예였다. 대조군은 심 질환의 과거력이 없으며, 혈압이 정상인 10예(남 6예, 여 4예; 평균 연령 58 ± 10 세)로 하였다. 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도 측정을 위해서 형광 탐침자인 quin2를 혈소판과 배양시킨 후, spectrofluorometer로 형광을 측정하였다. 결과: 급성 관동맥 증후군 환자와 정상인의 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도는 각각 213 ± 41 nM, 205 ± 38 nM로 차이가 없었다. 결론: 회복기 급성 관동맥 증후군 환자의 혈소판 세포질내 칼슘 이온 농도는 정상이나, 심근 허혈이나 심근 경색 발생 직후에는 증가한 가능성이 있으므로, 향후 다른 연구에서 이에 대한 확인이 필요하다.

참 고 문 헌

1. van den Berg EK, Schmitz JM, Benedict CR et al. : Transcardiac serotonin concentration is increased in selected patients with limiting angina and complex coronary lesion morphology. *Circulation* 79 : 116-24, 1989
2. Brown BG, Bolson EL, Dodge HT : Dynamic mechanisms in human coronary stenosis. *Circulation* 70 : 917-22, 1984
3. Bühler FR, Resink TJ, Tkachuk VA et al. : Abnormal cellular calcium regulation in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 8 (suppl 8) : S145-9, 1986
4. Cairns JA, Gent M, Singer J et al. : Aspirin, sulfinpyrazone, or both in unstable angina. *N Engl J Med* 313 : 1369-75, 1985
5. Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA et al. : Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* 73 : 418-27, 1986
6. Erne P, Bolli P, Brgisser E et al. : Correlation of platelet calcium with blood pressure : Effect of antihypertensive therapy. *N Engl J Med* 310 : 1084-8, 1984
7. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F et al. : Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315 : 983-9, 1986
8. Golino P, Ashton J, Buja LM et al. : Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo : Thromboxane A_2 and serotonin are possible mediators. *Circulation* 79 : 154-66, 1989
9. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY : A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 : 3440-50, 1985
10. Hirsh PD, Hillis LD, Campbell WB et al. : Release of prostaglandins and thromboxane into the coronary circulation in patients with ischemic heart disease. *N Engl J Med* 304 : 685-91, 1981
11. Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM : Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries : Role of serotonin, thromboxane A_2 and adenine nucleotides. *J Clin Invest* 78 : 539-44, 1986
12. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K et al. : Increased

- soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 92 : 1693-6, 1995
13. Jy W, Ahn YS, Shanbaky N et al. : Abnormal calcium handling by platelets in thrombotic disorders. *Circ Res* 60 : 346-55, 1987
 14. Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM et al. : Is vasospasm related to platelet deposition ? : Relationship in a porcine preparation of arterial injury in vivo. *Circulation* 75 : 243-8, 1987
 15. Le Quan Sang KH, Montenay-Garestier T, Devynck MA : Alterations of platelet membrane microviscosity in essential hypertension. *Clin Science* 80 : 205-11, 1991
 16. Lewis HD, Davis JW, Archibald DG et al. : Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. *N Engl J Med* 309 : 396-403, 1983
 17. Lindner A, Kenny M, Meacham AJ : Effects of a circulating factor in patients with essential hypertension on intracellular free calcium in normal platelets. *N Engl J Med* 316 : 509-13, 1987
 18. Modesti PA, Colella A, Cecioni I et al. : Increased number of thromboxane A_2 -prostaglandin H_2 receptors in active unstable angina and causative role of enhanced thrombin formation. *Am Heart J* 129 : 873-9, 1995
 19. Rink TJ, Sage SO : Calcium signaling in human platelets. *Ann Rev Physiol* 52 : 431-9, 1990
 20. Shah PK : Pathophysiology of unstable angina. *Cardiol Clin* 9 : 11-26, 1991
 21. Shah PK, Forrester JS : Pathophysiology of acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 68 : 16C-23C, 1991
 22. Smitherman TC, Milam M, Woo J et al. : Elevated beta thromboglobulin in peripheral venous blood of patients with acute myocardial ischemia : Direct evidence for enhanced platelet reactivity in vivo. *Am J Cardiol* 48 : 395-402, 1981
 23. Sobel M, Salzman EW, Davies GC et al. : Circulating platelet products in unstable angina pectoris. *Circulation* 63 : 300-6, 1981
 24. Thérout P, Ouimet H, McCans J et al. : Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 319 : 1105-11, 1988
 25. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ : Calcium homeostasis in intact lymphocytes : Cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94 : 325-34, 1982
 26. Willerson JT, Golino P, Eidt J et al. : Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions : Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 80 : 198-205, 1989
 27. Willerson JT, Hillis LD, Winniford M et al. : Speculation regarding mechanisms responsible for acute ischemic heart disease syndromes. *J Am Coll Cardiol* 8 : 245-50, 1986

Table 1. Demographic Findings of Patients and Normal Controls

	ACS Group (n=11)	Control Group (n=10)	Value
Age	62± 8.4	58± 10	NS
Male(%)	5(45)	6(60)	NS
Body mass index(kg/m ²)	22.2± 3.8	21.3± 3.6	NS
Systolic BP(mmHg)	135± 14	126± 14	NS
Diastolic BP(mmHg)	87± 9.0	84± 11	NS
Smoker(%)	5(45)	4(40)	NS

ACS=Acute coronary syndromes ; NS=Not significant

Table 2. Comparison of Platelet Cytoplasmic Ca^{2+} Concentrations between ACS and Control Groups

ACS Group			Control Group
Total(n=11)	UA(n=6)	AMI(n=5)	(n=10)
213±41nM	208±31nM	219±54nM	205±38nM

ACS=Acute coronary syndromes ; AMI=Acute myocardial infarction ; UA=Unstable angina

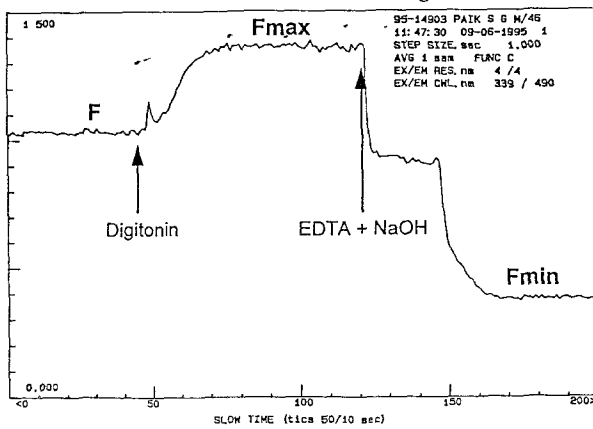


Figure 1. Representative trace recording from measurement of platelet cytoplasmic Ca^{2+} . First, the fluorescence(F) signal from a quin2-loaded cell suspensio was recorded. Then maximum fluorescence(Fmax) and minimum fluorescence (Fmin) were recorded after addition of digitonin(final concentration $50 \mu M$) and EGTA(final concentration 5mM, pH>8.3) respectively.