대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthropol
19(3): 165 ~ 178, 2006

허혈양상화와 K_{ATP} 이온통로 활성이 허혈-재관류된 흰쥐 심장에서 PKC-ε, NF-κB와 AP-1발현에 미치는 영향

안동춘[1], 전승하, 서윤경, 전수경,
박현주, 이상완, 심정하[2], 백두진
한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실
[1]강원대학교 수의학부(대학) 수의학과, [2]의과대학 예방의학교실

간추림 : 본 연구는 허혈-재관류된 흰쥐 심장에서 허혈손상을 감소시켜주는 허혈양상화와 K_{ATP} 이온통로 활성화 혹은 억제가 PKC-ε, NF-κB, AP-1 활성 변동에 미치는 영향을 조사하여 직접적인 관련성이 있는지 검증하고자 본 실험을 시도하였다.

실험군은 9군으로 즉, 대조군(sham: S), 허혈양상화군(IPC), 지속적 허혈양상화군(continuous preconditioning: CP), K_{ATP} 이온통로 활성군(K_{ATP} opening: KO), K_{ATP} 이온통로 억제군(K_{ATP} blocking: KB), 허혈군(ischemia: IS), 허혈양상화 후 허혈군(IPC+IS), K_{ATP} 이온통로 억제 후 허혈양상화와 허혈군(KB+IPC+IS), K_{ATP} 이온통로 활성과 허혈군(KO+IS)으로 나누었다. IPC는 5분 허혈 - 5분 재관류를 3회 반복하였으며, CP는 5분 허혈 - 8분 재관류를 8회 반복하였다. 허혈은 30분 시켰으며, KO군은 pinacidil (1.0 mg/kg)을 허혈 개시 5분 후 정맥주사 하였고, KB군은 glibenclamide (1.0 mg/kg)를 IPC 20분 전 정맥주사 하였다. 재관류 혹은 처치 후 3, 6, 24시간에 심장을 얻어 PKC-ε, NF-κB, AP-1에 대하여 면역조직화학염색과 Western blotting을 이용하여 관찰하였다.

PKC-ε 활성은 IPC, pinacidil 단독 투여군에서 가장 많이 증가하였고, NF-κB의 활성은 오직 30분 허혈이 있었던 군(IS, IPC+IS, KB+IPC+IS, KO+IS)에서 증가하였으며 AP-1의 활성은 PKC-ε 결과에 반비례하였다.

이 결과는 IPC에 따른 K_{ATP} 이온통로 활성이 PKC-ε 활성에 직접 영향을 주고, K_{ATP} 억제는 AP-1 활성에 직접적인 영향을 미치는 것이라고 결론지을 수 있다.

찾아보기 낱말 : 허혈양상화, 흰쥐 심장, PKC-ε, NF-κB, AP-1

서 론

허혈양상화(ischemic preconditioning : IPC)는 장시간 허혈 후 재관류에 앞서 시행하는 짧은 허혈-재관류 처치로서 허혈-재관류로 나타나는 세포 손상을 보호하며, 개 심장에서 실험한 Murry 등(1986)이 처음 명명하였다. 이후 많은 동물, 토끼(Ping 등 1997, Ohnuma 등 2002), 흰쥐(Gray 등 1997, Yoshida 등 1997, Inagaki 등 2003, Murriel과 Mochly-Rosen 2003), 생쥐(Ping 등 2002), 돼지(Schulz 등 1994) 등과 사람의 심장(Hu 등 1996)에서도 허혈-재관류 손상을 줄이는 데 효과가 있다고 밝혀졌다.

Gross와 Auchampach (1992)가 처음으로 K_{ATP} 이온통로가 IPC 효과에 관련이 있음을 개 심장에서 밝힌 이후 Schulz 등(1994), Haruna 등(1998)과 Suzuki 등(2002)은 IPC로 나타나는 심근 보호효과

*이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-015-E00219)
교신저자 : 백두진(한양대학교 의과대학 해부 세포생물학교실)
전자우편 : paikdj@hanyang.ac.kr

에 근육세포막에 위치하는 sarcK_{ATP} 이온통로가 속사립체막에 위치하는 mitoK_{ATP} 이온통로보다 더 중요한 역할을 한다고 하였으나, Garlid 등(1997), McCully와 Levitsky(2003), Nozawa 등(2003)은 mitoK_{ATP} 이온통로가 더 중요하다고 주장하였다.

PKC는 IPC 효과에 중요한 역할을 하며(Ytrehus 등 1994), IPC 이후 활성화되는 NF-κB와 AP-1을 조절(Li 등 2000b, Jancso 등 2004)하거나 열충격단백질을 생성하여 보호효과를 나타내는 것으로(Jancso 등 2004) 알려졌다.

심근세포에서 IPC로 활성화 되는 것은 주로 PKC-δ와 PKC-ε이다(Mackay와 Mochly-Rosen 2001, Nozawa 등 2003). 개에서는 PKC-α가 IPC 효과를 보이는데 중요하지만(Kitakaze 등 1997), 토끼(Ping 등 1997, Ohnuma 등 2002), 흰쥐(Gray 등 1997, Yoshida 등 1997, Inagaki 등 2003, Murriel과 Mochly-Rosen 2003), 생쥐(Ping 등 2002), 닭(Liu 등 2001)에서 IPC로 인해 활성화와 전위(translocation)되어 중요하게 작용하는 것은 공통적으로 PKC-ε이다.

최근에 mitoK_{ATP} 이온통로는 PKC의 영향을 받으며 IPC 효과를 나타내지만(Gross와 Peart 2003), Liu 등(2002)에 의하면 배양한 닭 심근세포에서는 mitoK_{ATP} 이온통로가 PKC를 경유하여 세포자멸사를 억제할 것이라고 하여 PKC는 mitoK_{ATP} 이온통로의 아래쪽 단계반응(downstream)에 있다 하였고, Gaudette 등(2000)이 면양 심장에서 K_{ATP} 이온통로 활성제인 pinacidil, 억제제인 glibenclamide, PKC 활성제인 4β-phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu)와 차단제인 chelerythrine을 병용 투여한 후 심근경색 크기를 관찰한 결과 억제제 혹은 차단제를 투여한 군에서 심근경색의 크기가 줄지 않아 K_{ATP} 이온통로와 PKC는 상호의존적이라 하였다.

이에 저자는 K_{ATP} 이온통로가 PKC-ε을 직접 활성화하는지, NF-κB와 AP-1 발현에 직접 영향을 미칠 수 있는지 관찰하고자 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 실험군

실험동물은 체중 300～350 g인 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 오리엔트(주)에서 분양받아 사용하였고, 모든 처치는 미국 국립보건원 실험지침(NIH guidline)에 따라 수행하였다.

실험동물을 대조군(sham: S), 허혈양상화군(ischemic preconditioning: IPC), 지속적 허혈양상화군(continuous ischemic preconditioning: CP), K_{ATP} 이온통로 활성군(K_{ATP} opening: KO), K_{ATP} 이온통로 억제군(K_{ATP} blocking: KB), 허혈군(ischemia: IS), 허혈양상화와 허혈군(IPC+IS), K_{ATP} 이온통로 억제 후 허혈양상화와 허혈군(KB+IPC+IS), K_{ATP} 이온통로 활성과 허혈군(KO+IS)으로 나누어 처리하였다.

허혈양상화를 위한 짧은 시간(5분), 혹은 긴 시간(30분) 허혈조작을 한 군에서는 재관류 경과시간에 따라 3, 6, 24시간 군으로 나누었고, 약제만을 투여한 군에서는 투여 후 경과시간에 따라 각각 3, 6, 24시간 군으로 세분하였다(Fig. 1).

2. 동물 처치

졸레틸 50(Virbac, France)을 사용하여 실험동물을 마취하였으며, 이때 10 mg/kg은 정맥주사 하였고, 마취기간을 연장하기 위해 정맥주사에 이어 20 mg/kg을 근육주사 하였다. 마취 5분 전 황산아트로핀[동명제약(주), Korea] 0.2 mg을 근육주사 하였다. 16G 혈관주사바늘(Abocath)을 마취된 흰쥐의 구강을 통해 기관에 삽입하고 실험동물 인공호흡기(ventilator)에 연결하였으며 일회 박출량(stroke volume)은 20 mL/kg, 횟수는 70～80회로 조정하였다. 넷째갈비사이공간(fourth intercostal space)을 무균상태로 유지하여 절개하고, 심장을 노출하여 해부현미경하에서 왼심장동맥을 확인하였다. 7-0 polyprolen으로 PE-50 tube와 함께 왼심장동맥 주가지(left main descending artery)를 왼심방귀 근처에서 결찰하여 왼심실 일부에 허혈을 유발하였다. 허혈은 왼심실 근육의 색이 변하는 것으로 확인하였다. 결찰을 풀어 재관류 하였으며 심실의 색이 다시 원래대로 회복하는 것으로 확인하였다.

허혈양상화는 5분 허혈-5분 재관류를 3회 반복하였고, 지속적 허혈양상화는 5분 허혈-5분 관류를 8회 반복하였다. 허혈은 30분간 결찰 하였으며, K_{ATP}

이온통로를 활성화시키기 위하여 pinacidil (RBI co, USA)을 허혈 시작 5분 후에 외측꼬리정맥으로 정맥주사 하였다. pinacidil은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹였고 DMSO의 최종농도가 5%가 되도록 희석한 용액에 체중 kg당 1.0 mg의 용량을 사용하였다. glibenclamide는 K_{ATP} 이온통로를 억제하기 위하여 사용하였으며, 1.0 mg/kg (in 5% DMSO) 용량으로 시술 20분 전에 정맥주사 하였다. 대조군에는 5% DMSO를 정맥주사하였고, 가슴안 (thoracic cavity)을 열고 왼심장동맥 주위로 바늘과 봉합사를 통과시켰다.

3. 심장 적출

재관류 할 때 7-0 polyprolen 일부를 남겨 놓아 결찰위치를 확인할 수 있도록 한 다음, 재관류 3, 6, 24시간에 헤파린 (중외제약) 400 I.U를 정맥주사하고, 다시 마취한 다음 1M KCl 용액으로 심장을 정지시켰고, 개복하여 후대정맥 (caudal vena cava)을 절개하고 배대동맥 (abdominal aorta)으로 삽관한 다음 1X PBS (pH 7.2)로 관류 세척하였다.

심장을 가로 절단 하여 심근경색 유발부위 중 심장바닥 (base)에 가까운 부위의 절편 (두께 3 mm)은 western blotting에 사용하기 위하여 액체질소에 동결한 후 −70℃에 보관하였고, 심장끝 쪽은 면역조직화학염색에 사용하였다.

4. 면역조직화학염색

PKC-ε, NF-κB, AP-1의 분포와 발현 양상을 관찰하기 위하여 조직을 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4℃에서 하룻밤 고정하고 일반조직처리 과정을 거쳐 파라핀 절편을 6 μm 두께로 제작하였다. 절편은 탈 파라핀 처리하고 3% 과산화수소수를 함유한 메탄올에 두어 과산화효소를 불활성화 하였고, 항원을 노출하기 위해 0.4% 펩신 용액으로 처리하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 37℃에서 1시간 동안 blocking 용액으로 처리하였으며, 일차항체 rabbit anti-PKCε (Upstate, USA), mouse anti-NF-κB (p65) (Santa Cruz Biotechnology, USA), rabbit anti-AP-1 (c-Jun) (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 각각 50 : 1, 20 : 1, 20 : 1로 희석하여 4℃에서 15시간 반응시키고 이차항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Lab, USA)와 biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (Vector Lab, USA)를 실온에서 40분, ABC 용액 (Vector Lab, USA)을 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 3, 3′-diaminobenzidine kit (DAB substrate kit, Vector Lab, USA)를 약 3～5분 동안 반응시켜 발색하고 대조염색은 1% methyl green으로 하였다. 음성대조군은 일차항체를 제외한 반응을 모두 시행하여 면역반응의 특이성을 확인하였다.

염색 후 400배 현미경 시야에서 디지털카메라 (Olympus 3020, Japan)를 이용하여 촬영하고, 포토샵 (Photoshop version 7.0) 프로그램과 엑셀프로그램을 이용하여 발색정도를 16진법에서 10진법으로 환산하였다. 가장 강한 발색과 음성대조군의 차이를 백분율로 환산한 다음 20% 간격으로 발색 강도를 정하고 다섯 등급 (음성 : −, 미약한 : ±, 경도 : +, 중등도 : ++, 강한 : +++)으로 나누었다. 한편 이 등급은 실험을 모르는 3인이 평가 확인토록 하였다.

5. Western blotting 법

Yoshida 등 (1996)의 방법을 변형하여 사용하였다. −70℃에 보관했던 심장조직의 무게를 재고 3 부피의 RIPA 완충액 (50 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/mL leupeptin, 1 μg/mL aprotinin, 1 mM Na_3VO_4)을 넣어 13,500 rpm에서 10초씩 두 번 균질화 하였다. 40분 동안 얼음에서 배양한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액에서 단백질을 얻어, Bio-Rad사의 단백질분석키트 (Protein Assay Kit)를 이용하여 농도를 측정하였다. 50 μg의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하고, PVDF 막 (PVDF membrane, Amersham, USA)으로 전달 (transfer) 하였다. 그 막을 0.1% Tween 20이 들어있는 TBST에 5% 지방제거건유 (non-fat dry milk)를 첨가한 용액으로 실온에서 1시간 동안 차단 (blocking)하였다. 일차항체 anti-PKCε (Upstate, USA), anti-NF-κB (Chemicon, USA), anti-AP-1 (Stressgen, Canada)을 각각 1 : 2000으로 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시키

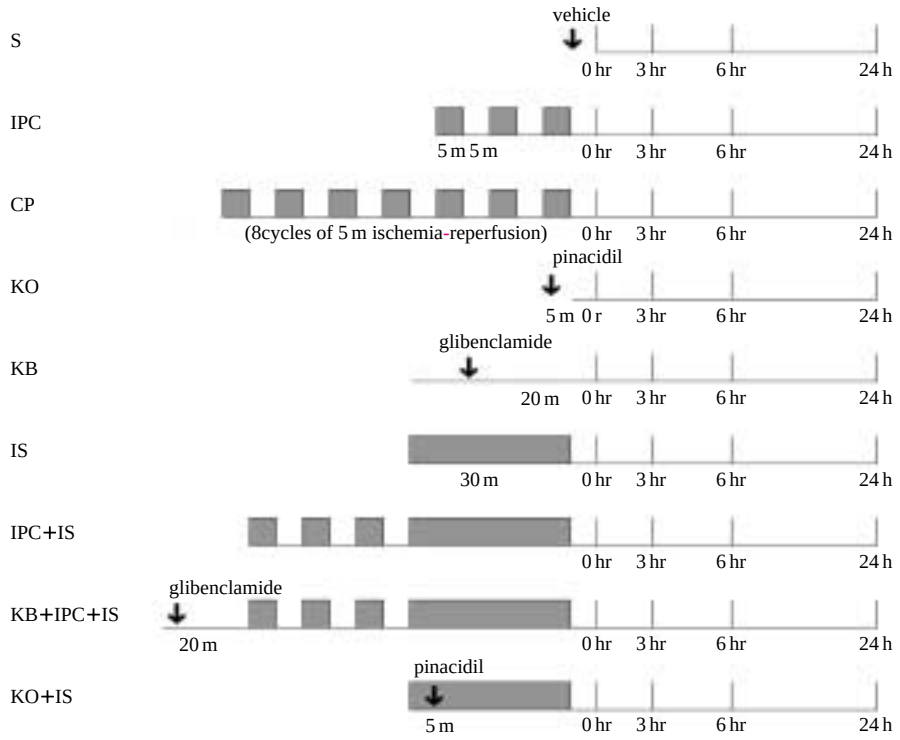


Fig. 1. Experimental design. Ischemia was performed by 30 min of occlusion of the left main descending artery near the left auricle. Ischemic preconditioned hearts received 3 cycles of 5 min ischemia and 5 min reperfusion (IPC). Continuous preconditioning (CP) consisted of 8 cycles of 5 min ischemia and 5 min reperfusion. Glibenclamide treated group (KB) received a single injection within lateral caudal vein. The injection was performed at 20 min before IPC in the group of KB+IPC+IS. Pinacidil for opening of K_{ATP} channel (KO) was given to the group of KO+IS at 5 min after occlusion. and to the group KO. At 3 h, 6 h and 24 h after reperfusion or treatment, hearts were harvested for immunohistochemistry and western blotting.

고, ECL anti-rabbit IgG HRP-linked whole antibody (Amersham, USA)를 1 : 2,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. ECL Western blotting 검색시약 (Amersham, USA)을 이용하여 X선 필름 (Fuji, Japan)에 노출시켰다.

결 과

1. 면역조직화학염색

1) PKC-ε 면역조직화학염색

음성대조군에서 반응은 관찰할 수 없었으며, 대조군에서 PKC-ε에 대한 반응은 처치 후 3 (Fig. 2), 6, 24시간에 각각 미약한, 음성, 미약한 반응으로 나타났고, IPC 군에서 3시간 (Fig. 3), 6시간 경과 후 심근세포의 근육원섬유 (myofibrils)를 포함한 세포질과 사이원반 (intercalated disc)에서 강한 양성반응이 나타났고, 핵에서도 강한 반응이 나타났다. 그러나 24시간 경과 군에서는 이러한 반응이 미약한 정도로 나타났으나 핵에서는 뚜렷하지 않았다. CP 3시간 경과 군에서 세포질과 핵에서 경도의 반응이, 6시간 경과 군에서는 미약한 반응이 나타났으며, 24시간 경과 군의 세포질에서는 세포 주변에서 중증도의 반응이 나타났으나 핵에서는 미약한 반응이 나타났다. Pinacidil을 투여하여 K_{ATP} 이온통로를 활성화한 군 (KO)에서는 처치 후 3시간에 핵에서는 중등도,

Table 1. Immunoreactivities of PKC-ε on rat cardiomyocytes

Reperfusion time & location / Groups (PKC)	3 hours		6 hours		24 hours	
	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm
S	± (23)	± (32)	− (10)	− (10)	± (37)	± (37)
IPC	+++(100)	+++(93)	+++(96)	+++(100)	± (30)	± (30)
CP	+ (59)	+ (59)	± (38)	± (38)	± (37)	++(70)
KO	++(60)	+ (52)	++(63)	++ (71)	++(66)	++(74)
KB	± (20)	± (38)	± (26)	± (38)	± (26)	± (38)
IS	++(72)	++(66)	± (20)	± (22)	± (27)	± (27)
IPC+IS	++(60)	+ (48)	++(76)	+++(81)	+ (40)	+ (51)
KB+IPC+IS	± (21)	± (31)	± (22)	± (35)	++(65)	+++(86)
KO+IS	+ (43)	++(69)	++(60)	+ (46)	++(64)	+ (45)

Abbreviation: S: sham, IPC: ischemic preconditioning, 3 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, CP: continuous preconditioning, 8 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, IS: 30 min of ischemia, KO: K_{ATP} channel opening by pinacidil (1 mg/kg) injection, KB: K_{ATP} channel blocking by glibenclamide (1 mg/kg) injection.
Score of immunoreactivities: −: negative, ±: trace, ++: moderate, +++: strong reactivity, respectively, dependent on the percent (%) of the brown maximum intensity on cardiomyocytes

세포질에서 경도의 반응을 보였고, 특히 사이원반에서 강한 반응을 볼 수 있었다. 6시간과 24시간 경과 군에서는 핵과 세포소기관 모두 중등도의 반응을 나타냈고 특히 사이원반에서 뚜렷하였다. K_{ATP} 이온통로를 억제한 군(KB)에서는 처치 후 3, 6, 24시간에서 모두 미약한 반응을 보였고 6시간 경과 군에서는 사이원반에서 약간 뚜렷하였다. IS 군에서는 재관류 3시간(Fig. 4)에 핵과 세포질에서 중등도의 반응이 나타났고, 6시간과 24시간에서는 미약한 반응이 나타났다. IPC+IS군에서는 3시간 경과 후 핵에서 중등도, 세포질에서는 경도의 반응이 나타났으나 6시간에는 세포질에서 중등도로 증가하였으며, 24시간(Fig. 5)에는 경도로 약화되었다. Glibenclamide를 투여하여 K_{ATP} 이온통로를 억제한 후 허혈양상화와 허혈을 시행한 군(KB+IPC+IS)에서는 재관류 6시간까지 핵과 세포질 모두 미약한 반응이 나타났으나 24시간 경과 후 핵에서는 중등도의 반응을, 세포질 주변에서 강한반응을 보였다. 허혈 개시 후 pinacidil을 투여하여 K_{ATP} 이온통로를 활성화한 군(KO+IS)에서는 재관류 3시간에 핵에서 경도, 세포질에서 중등도의 반응을 보였으며, 6, 24시간 군에서는 핵에서 중등도, 세포질에서 경도의 반응을 보였다(Table 1).

2) NF-κB 면역조직화학염색

NF-κB 면역조직화학염색 결과 음성대조군에서 반응은 관찰할 수 없었으며, IPC나 KO, KB+IPC와 같은 사전 처리와 관계없이 30분 허혈-재관류를 시행한 군에서 변화가 나타났다. 대개 세포질에서 중등도 이상의 반응이 있는 경우 핵에서도 양성반응을 보여 핵으로 전위(translocation) 되었음을 나타냈다. 각 실험군에서 대조군 모두 음성이었고, IPC군, CP군에서는 모두 음성 반응을 보였으나(Fig. 6), CP 24시간 경과 군에서는 미약한 반응을 보였다. 그리고 KO군에서도 모두 음성반응을 보였다. KB군에서는 모두 미약한 반응을 보였다(Fig. 7). IS 군에서는 재관류 3시간과 24시간(Fig. 8)에 세포질에서 강한 반응을 보였고 핵에서는 경도의 반응을 나타냈다. 6시간 경과 군에서는 세포질에서 경도의 반응이 나타났고 핵에서는 미약한 반응이 나타났다. IPC 후 IS를 시행한 군에서는 재관류 3, 6시간에 핵에서 미약한 반응이, 세포질에서는 경도의 반응이, 24시간 경과 군에서는 핵과 세포질에서 모두 경도의 반응이 나타났다. KB와 IPC 후 IS를 시행한 군에서는 재관류 3, 6, 24시간 모두 핵에서 경도의 반응이, 세포질에서는 중등도의 반응이 나타났다. KO+IS 군에서는 재관류 3, 6시간에 핵과 세포질에서 경도의 반응이 나타났고, 24시간(Fig. 9)에는 핵에서 경도의 반응이, 세포질에서는 중등도의 반응이 나타났다(Table 2).

Table 2. Immunoreactivities of NF-κB on rat cardiomyocytes

Reperfusion time & location / Treatments	3 hours		6 hours		24 hours	
	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm
S	− (5)	− (5)	− (5)	− (5)	− (5)	− (5)
IPC	− (5)	− (8)	− (9)	− (6)	− (8)	− (8)
CP	− (10)	− (8)	− (8)	− (9)	± (20)	± (20)
KO	− (11)	− (11)	− (12)	− (12)	− (11)	− (11)
KB	± (27)	± (23)	± (27)	± (23)	± (23)	± (20)
IS	+ (59)	+++ (98)	± (33)	+ (56)	+ (58)	+++ (100)
IPC+IS	± (36)	+ (57)	± (20)	+ (41)	+ (40)	+ (44)
KB+IPC+IS	+ (51)	++ (64)	+ (42)	++ (62)	+ (40)	++ (63)
KO+IS	+ (44)	+ (51)	+ (40)	+ (49)	+ (42)	++ (74)

Abbreviation: S: sham, IPC: ischemic preconditioning, 3 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, CP: continuous preconditioning, 8 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, IS: 30 min of ischemia, KO: K_{ATP} channel opening by pinacidil (1 mg/kg) injection, KB: K_{ATP} channel blocking by glibenclamide (1 mg/kg) injection.
Score of immunoreactivities: −: negative, ±: trace, ++: moderate, +++: strong reactivity, respectively, dependent on the percent (%) of the brown maximum intensity on cardiomyocytes

3) AP-1 면역조직화학염색

AP-1에 대한 면역염색 결과 음성대조군에서 반응은 관찰할 수 없었으며, 대조군에서 6시간 경과 군의 상당수 심근세포의 핵에서 중등도의 반응이 나타난 것을 제외하고, 핵에서는 미약한 반응, 세포질에서 음성반응이 나타났다(Fig. 10). 허혈양상화만을 시행한 군에서는 핵에서 미약한 반응이, 세포질에서는 음성 반응이 나타났다. 그러나 지속적 허혈양상화(CP) 군에서는 핵과 세포질에서 강한 혹은 중등도의 반응이 나타났으며, 단 6시간 경과 군의 세포질에서는 경도의 반응이 나타났다. KO군에서는 처치 후 3, 6, 24시간 경과 후 핵에서 미약한 반응이, 세포질에서는 음성 반응이 나타났다. KB군에서는 3시간 경과 후 핵에서 강한 반응이, 세포질에서는 중등도의 반응이 나타났고, 6시간과 24시간에서는 핵과 세포질에서 각각 중등도와 경도의 반응이 나타났다. 30분 허혈(IS)-재관류 3시간 경과 군에서는 핵에서 강한 반응이, 세포질에서는 중등도의 반응이 나타났고(Fig. 11), 6시간 경과 군에서는 모두 강한 반응이, 24시간 경과 군에서는 핵에서 중등도의 반응이, 세포질에서는 경도의 반응이 나타났다. 반면 허혈양상화와 허혈 후 3시간 재관류 군에서는 핵에서 중등도의 반응이, 세포질에서는 경도의 반응이 나타났고(Fig. 12), 6시간 경과 후 반응이 감소하여 핵과 세포질에서 미약한 반응이 나타났다. 그리고

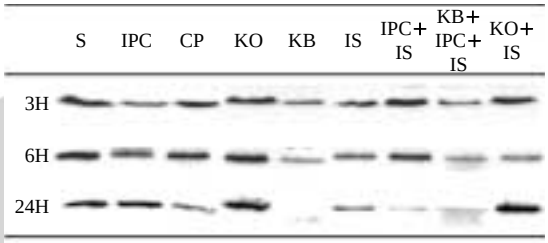


Fig. 14. Western blotting for PKC-ε in cytosolic fraction at 3 hours (3H), 6 hours (6H) and 24 hours (24H) after treatments : S: sham, IPC: ischemic preconditioning, 3 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, CP: continuous preconditioning, 8 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, IS: 30 min of ischemia, KO: K_{ATP} channel opening by pinacidil (1 mg/kg) injection, KB: K_{ATP} channel blocking by glibenclamide (1 mg/kg) injection.

24시간 경과 군에서 다시 증가하여 핵에서 강한 반응이, 세포질에서는 중등도의 반응이 나타났다. KB와 IPC 후 IS를 시행한 군에서는 재관류 3시간에 핵에서 중등도의 반응이, 세포질에서는 경도의 반응이 나타났지만, 6시간(Fig. 13), 24시간 경과 후 핵과 세포질에서 모두 강한 반응이 나타났다. KO+IS군에서는 재관류 3, 6, 24시간 모두에서 반응 정도가 감소하여 핵에서 중등도, 세포질에서 경도의 반응이 나타났다(Table 3).

Table 3. Immunoreactivities of AP-1 on rat cardiomyocytes

Groups (AP) \ Reperfusion time & location	3 hours		6 hours		24 hours	
	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm
S	± (23)	− (6)	++ (71)	− (9)	± (21)	− (5)
IPC	± (32)	− (7)	± (24)	− (5)	± (24)	− (10)
CP	+++ (100)	++ (70)	++ (71)	+ (51)	+++ (91)	++ (77)
KO	± (30)	− (13)	± (39)	− (11)	± (38)	− (11)
KB	+++ (84)	++ (70)	++ (67)	+ (58)	++ (61)	+ (45)
IS	+++ (99)	++ (64)	+++ (100)	+++ (100)	++ (66)	+ (50)
IPC+IS	++ (70)	+ (55)	± (20)	± (30)	+++ (81)	++ (63)
KB+IPC+IS	++ (63)	+ (44)	+++ (82)	+++ (87)	+++ (86)	+++ (93)
KO+IS	++ (77)	+ (48)	++ (66)	+ (50)	++ (60)	+ (48)

Abbreviation: S: sham, IPC: ischemic preconditioning, 3 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, CP: continuous preconditioning, 8 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, IS: 30 min of ischemia, KO: K_{ATP} channel opening by pinacidil (1 mg/kg) injection, KB: K_{ATP} channel blocking by glibenclamide (1 mg/kg) injection.
Score of immunoreactivities: −: negative, ±: trace, ++: moderate, +++: strong reactivity, respectively, dependent on the percent (%) of the brown maximum intensity on cardiomyocytes

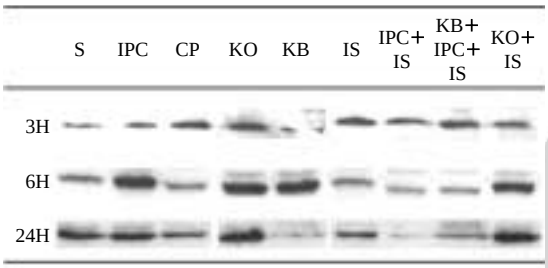


Fig. 15. Western blotting for NF-κB in cytosolic fraction at 3 hours (3H), 6 hours (6H) and 24 hours (24H) after treatments: S: sham, IPC: ischemic preconditioning, 3 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, CP: continuous preconditioning, 8 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, IS: 30 min of ischemia, KO: K_{ATP} channel opening by pinacidil (1 mg/kg) injection, KB: K_{ATP} channel blocking by glibenclamide (1 mg/kg) injection.

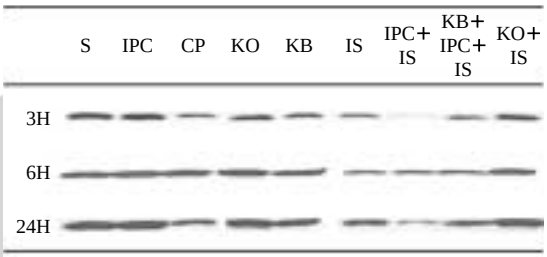


Fig. 16. Western blotting for AP-1 in cytosolic fraction at 3 hours (3H), 6 hours (6H) and 24 hours (24H) after treatments: S: sham, IPC: ischemic preconditioning, 3 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, CP: continuous preconditioning, 8 cycles of 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion, IS: 30 min of ischemia, KO: K_{ATP} channel opening by pinacidil (1 mg/kg) injection, KB: K_{ATP} channel blocking by glibenclamide (1 mg/kg) injection.

2. Western blotting

1) PKC-ε에 대한 western blotting 결과

세포의 세포질 액상 부분(cytosolic fraction)만을 얻어 시행한 Western blotting 결과, 처치 또는 재관류 후 3시간 경과 후에는 IPC, KB, IS, KB+IPC+IS 군에서 감소하고, 6시간 경과 후에는 IPC군에서 약간 감소하였고, KB, IS, KO+IS, KB+IPC+IS군에서 감소하였다. 24시간 경과 후에는 대조군 (S), IPC, KO, KO+IS군을 제외한 모든 군에서 감소하였다 (Fig. 14).

2) NF-κB에 대한 Western blotting 결과

세포의 세포질 액상 부분 (cytosolic fraction)만을 얻어 시행한 결과 처치 또는 재관류 후 3시간 경과 군에서는 KO군을 제외하고 다소 증가하였고, CP, KO, IS, KB+IPC+IS군에서 뚜렷하였다. 6시간 경과 후에는 IPC, KO, KB, KO+IS군에서 증가하였으며,

24시간 경과 후에는 KB, IPC+IS, KB+IPC+IS군에서 감소하였다(Fig. 15).

3) AP-1에 대한 Western blotting 결과

AP-1에 대한 Western blotting 결과 3시간 경과 후에는 CP, IS, KB+IPC+IS군에 감소하였고, 특히 IPC+IS군의 세포질 액상 부분(cytosolic fraction)에서 거의 나타나지 않았다. 6시간 경과 후에는 IS, IPC+IS, KB+IPC+IS군에서 다소 감소하였으며, 24시간 후에는 CP, IS, KB+IPC+IS군에서 다소 감소하였고, IPC+IS군에서 뚜렷하게 감소하였다(Fig. 16).

고 찰

Gross와 Auchampach (1992)가 K_{ATP} 이온통로가 IPC 효과에 관련이 있음을 개 심장에서 처음 밝힌 이후 많은 연구들이 이어지고 있다.

Disatnik 등(1994)은 심근세포가 자극을 받으면 PKC-δ, PKC-ε, PKC-βI이 활성화 되고, PKC가 활성화되는 위치는 서로 다르다고 하였다. PKC-ε는 핵에서 핵주위(perinuclear), 세포-세포 접촉부위(cell-cell junction), 가로무늬구조(cross-striated structures)로 이동하고 PKC-δ는 핵에서 핵주위로, PKC-βI은 세포질(fibrillar structure)에서 핵으로 이동한다고 하였다. Nozawa 등(2003)은 흰쥐에서 5분 허혈-5분 재관류를 2회 반복한 결과 PKC-δ와 PKC-ε이 모두 전위 되었고 심근경색 크기도 위험지역 대비 72%에서 28%로 줄였다고 하였다. Inagaki 등(2003)은 PKC-δ 억제제의 처리로 재관류 손상을 막았고, PKC-ε의 활성화가 재관류 시 심근 손상을 막지 못하였지만 허혈 전에 투여하면 보호효과가 있음을 밝히면서, PKC-δ와 PKC-ε은 서로 다른 시기에 보호효과를 나타낸다고 하였다.

Wang 등(1999)은 흰쥐에서 $mitoK_{ATP}$ 이온통로 활성제인 diazoxide를 투여한 경우 PKC-ε은 세포의 90% 이상이 사이원반(intercalated disc)으로 이동하였지만, $mitoK_{ATP}$ 이온통로 억제제인 5-HD를 투여하면 흩어져 존재한다고 하였다. 또한 diazoxide 투여로 이동하는 PKC-α, PKC-δ, PKC-βI과 달리 PKC-βII, PKC-γ, PKC-η, PKC-ζ는 전위하지 않았고, 5-HD를 투여하여도 PKC-δ는 그대로 존재하는 것은 PKC가 $mitoK_{ATP}$ 이온통로의 내림경로(downstream)에 있음을 시사한다고 하였다. Liu 등(2002)은 배양한 닭 심근세포에서 저산소-재관류 후 나타나는 세포자멸사를 억제하는 $mitoK_{ATP}$ 이온통로의 효과가 PKC-ε 활성을 통해 일어난다고 하였다.

본 실험결과에서 IPC에 따른 PKC-ε 활성과 전위는 K_{ATP} 이온통로 활성과 직접적 관련이 있음을 나타내고 있다. 즉, IPC와 K_{ATP} 이온통로 활성제인 pinacidil을 투여한 군에서는 증가하였고, 핵과 세포사이원반, 근육원섬유 등에서 발현되었으며, IS나 glibenclamide를 투여하여 K_{ATP} 이온통로를 억제한 군에서는 낮게 발현되어 K_{ATP} 이온통로 활성이 PKC-ε 활성과 전위(translocation)를 유발함을 알 수 있다. 본 연구에서 사용한 pinacidil과 glibenclamide는 비 특이적 K_{ATP} 이온통로 활성 또는 억제제이므로 $sarcK_{ATP}$ 이온통로와 $mitoK_{ATP}$ 이온통로가 각각 PKC-ε의 활성과 억제에 관여하였는지를 구분하는 것은 어려웠다. 현재까지 알려진 특이적 $sarcK_{ATP}$ 이온통로 활성제는 없지만, $mitoK_{ATP}$ 이온통로의 특이적 억제제인 5-HD와 활성제인 diazoxide을 사용하거나 특이적 $sarcK_{ATP}$ 이온통로 억제제인 HMR-1098을 이용하여 K_{ATP} 이온통로와 PKC-ε의 상관관계를 명확하게 밝혀야 할 것으로 생각한다.

또 흥미로운 결과로는 보호효과가 클 것으로 예상했던 지속적 허혈양상화 군에서 PKC-ε의 활성이 상대적으로 낮았는데, IPC에서 횟수(1～4회)를 증가하더라도 PKC-ε의 활성은 증가하지 않는다는 Ping 등(1997)의 보고를 고려하면 짧은 허혈과 재관류를 여러 차례 고려하면 반복한 경우 손상을 초래할 수도 있다고 생각된다. 특히 세포자멸사와 직접 관련이 있는 AP-1의 활성이 높게 나타난 본 연구 결과는 이러한 이론을 뒷받침한다.

Western blotting은 오직 세포질 액상 부분(cytosolic fraction) 만을 검증한 것으로, PKC-ε이 활성화되면 근육원섬유(myofibril)나 사립체, 핵으로 이동(Disatnik 등 1994, Yoshida 등 1996) 한다고 하였으나 본 실험에서 이들 분획에 대하여 활성을 검증할 수 없었으므로 단지 적게 나온 부분은 이동한 것으

로 보았다. 본 실험의 면역조직화학염색에서는 강한 반응을 보였으나, Western blotting 결과 감소한 것은 이러한 점과 연관 있을 것으로 생각되었다.

허혈양상화로 NF-κB가 활성화되고 DNA 결합능력을 높아지지만 AP-1은 그 반대로 저하(down-regulate) 되는 것으로 보이며, AP-1은 장시간 허혈이나 장시간 허혈-재관류시 활성화 되는 것으로 알려지고 있다. Sasaki 등(1999)은 NF-κB가 허혈 15분 후 활성화 하여 핵으로 이동하고, 허혈 60분에 더욱 강하고, 허혈양상화시에도 강하게 발현하였으나, AP-1은 허혈-재관류시 증가하고, 허혈양상화로 감소한다고 하면서 NF-κB와 AP-1이 허혈-재관류, 혹은 허혈양상화에 의해 서로 다르게 조절된다고 하였다. Maulik 등(2000)은 분리한 흰쥐 심장 연구에서 NF-κB와 AP-1은 허혈시간에 따라 점차 증가하고 재관류하면 NF-κB는 감소하지만 AP-1은 지속적으로 증가 상태를 유지한다고 하였으며, 허혈양상화를 하면 NF-κB는 증가 상태를 유지하고, AP-1은 감소하는 것으로 보아 세포자멸사를 서로 다른 경로를 통해 조절할 것이라고 하였다. Hiasa 등(2001)은 본 실험에 쓰인 동물과 같은 SD 흰쥐를 사용하여 30분 허혈 후 3시간 재관류 시키거나 5분 허혈-10분 재관류 시키는 허혈양상화를 4회 반복한 다음 재관류 30분, 1, 2, 3시간에 관찰 한 결과, NF-κB의 핵결합 활성도는 허혈-재관류 30분 경과 후 나타났다가 감소한 다음 3시간 경과 후에 다시 높아지는 이봉성(biphasic) 변화를 보였지만, 허혈양상화 시킨 경우 허혈양상화 직후 증가한 후 점차 감소하여 3시간 경과 후에는 거의 관찰할 수 없다고 하였다. Jancso 등(2004)은 토끼에서 5분 허혈 후 재관류 10, 30분, 1, 2, 3, 4시간에 NF-κB와 AP-1의 활성을 측정한 결과 NF-κB는 재관류 30분과 3시간에 높게 나타나는 이봉성 증가를 보인 반면, AP-1은 1시간째 높아졌다 점차 감소하는 변화를 관찰하였고, 허혈양상화의 횟수를 증가하여도 이들의 활성이 더 많이 증가하지 않는다고 하였다.

본 연구결과에서 NF-κB는 면역염색에서 오직 30분 허혈-재관류가 있었던 군(IS, IPC+IS, KB+IPC+IS, KO+IS)에서 변화가 나타나는 것은 허혈이 길어질수록 증가한다(Sasaki 등 1999, Maulik 등 2000)는 점과, 허혈- 재관류 하였을 때 재관류 30분, 3시간 후 이봉성(biphasic) 상승과 관련이 있고, IPC 처치로 재관류 후 상승하였다가 감소하기 때문(Xuan 등 1999, Hiasa 등 2001, Jancso 등 2004)으로 생각되었다. 특히 K_{ATP} 이온통로의 직접적인 활성과 억제에도 NF-κB의 변화가 뚜렷하게 나타나지 않은 것은 서로 직접적인 관련성은 적은 것을 시사하고 있다. NF-κB는 K_{ATP} 이온통로 이외의 다른 경로를 통해 활성화 될 수 있고, K_{ATP} 이온통로 활성・억제에 따른 NF-κB의 활성 변화가 매우 이른 시간에 일어나 짧은 시간 지속된 것을 고려할 수도 있다. 그리고 본실험에서 관찰된 면역염색과 Western blotting 결과가 다양하게 나타나 일관성있는 PKC-ε와 NF-κB의 상호 관계를 추정하기 어려웠다.

또 NF-κB의 활성이 허혈양상화 후 오래 지속하지 못하고 감소한 것은 허혈양상화시 증가하는 아데노신(adenosine)이 NF-κB의 결합능력을 억제하고, AP-1의 결합능력을 강화한 결과(Li 등 2000a)로 생각되었다.

AP-1 면역염색 결과는 PKC-ε의 분포양상과 반대의 결과를 보였으며, 특히 세포자멸사(미발표자료)와 직접적인 관련이 있었다. IPC를 하거나 pinacidil을 투여하여 직접 K_{ATP} 이온통로를 활성화한 군에서는 CP, IS, KB+IPC+IS, KB군보다 낮은 경향을 나타내었다. 특히 glibenclamide만을 투여하여 직접 K_{ATP} 이온통로를 억제한 군에서 강한 반응을 보여 AP-1의 활성과 K_{ATP} 이온통로 억제가 직접적인 관계가 있음을 보여 주었다.

세포질액상 성분만을 대상으로 한 AP-1의 Western blotting 결과에서는 세포자멸사가 많은 군(미발표 자료)인 CP, IS, KB+IPC+IS군에서 AP-1의 분포가 주로 감소하는 면역염색 소견과 반대되는 양상으로 원인을 규명할 수 없었으나 허혈자극의 결과로 AP-1이 핵으로 이동한 후 세포질의 결과가 반영된 것으로 추측하였다. 이후 세포분획에 따른 AP-1의 변동상황을 규명해야 할 것이다.

이 결과는 IPC에 따른 K_{ATP} 이온통로 활성이 PKC-ε 활성에 직접 영향을 주고, K_{ATP} 억제는 AP-1 활성에 직접적인 영향을 미치는 것이라고 결론지을 수 있다.

참 고 문 헌

Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D : Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. Exp Cell Res 210: 287-297, 1994.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy Y, Murray HN, Darbenzio RB, Darbenzio R, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ : Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. Circ Res 81: 1072-1082, 1997.

Gaudette GR, Krukenkamp IB, Saltman AE, Horimoto H, Levitsky S : Preconditioning with PKC and the ATP-sensitive potassium channels: a codependent relationship. Ann Thorac Surg 70: 602-608, 2000.

Gray MO, Karliner JS, Mochly-Rosen D : A Selective ε-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. J Biol Chem 272: 30945-30951, 1997.

Gross GJ, Auchampach JA : Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. Circ Res 70: 223-233, 1992.

Gross GJ, Peart JN : K_{ATP} channels and myocardial preconditioning: an update. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H921-H930, 2003.

Haruna T, Horie M, Kouchi I, Nawada R, Tsuchiya K, Akao M, Otani H, Murakami T, Sasayama S : Coordinate interaction between ATP-sensitive K^+ channel and Na^+, K^+-ATPase modulates ischemic preconditioning. Circulation 98: 2905-2910, 1998.

Hiasa G, Hamada M, Ikeda S, Hiwada K : Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor-κB activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia-reperfused rat heart. Jpn Circ J 65: 984-990, 2001.

Hu K, Duan D, Li GR, Nattel S : Protein kinase C activates ATP-sensitive K^+ current in human and rabbit ventricular myocytes. Circ Res 78: 492-498, 1996.

Inagaki K, Hahn HS, Dorn II GW, Mochly-Rosen D : Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. Circulation 108: 869-875, 2003.

Jancso G, Lantos J, Borsiczky B, Szanto Z, Roth E : Dynamism of NF-κB and AP-1 activation in the signal transduction of ischaemic myocardial preconditioning. Eur Surg Res 36: 129-135, 2004.

Kitakaze M, Funaya H, Minamino T, Node K, Sato H, Ueda Y, Okuyama Y, Kuauya T, Hori M, Yoshida K : Role of protein kinase C-alpha in activation of ecto-5′-nucleotidase in the preconditioned canine myocardium. Biochem Biophys Res Commun 239: 171-175, 1997.

Li C, Ha T, Liu L, Browder W, Kao RL : Adenosin prevents activation of transcription factor NF-kappa B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart. Surgery 127: 161-169, 2000a.

Li RCX, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R : PKC-ε modulates NF-κB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279: H1679-H1689, 2000b.

Liu H, McPherson BC, Yao Z : Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C-ε and -δ isoforms. J Physiol Heart Circ Physiol 281: H404-H410, 2001.

Liu H, Zhang HY, Zhu X, Shao Z, Yao Z : Preconditioning blocks cardiocyte apoptosis: role of K_{ATP} channels and PKC-ε. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282: H1380-H1386, 2002.

Mackay K, Mochly-Rosen D : Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. J Mol Cell Cardiol 33: 1301-1307, 2001.

Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK : Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. FEBS Lett 485: 7-12, 2000.

McCully JD, Levitsky S : Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in surgical cardioprotection. Arch Biochem Biophys 420: 237-245, 2003.

Murriel CL, Mochly-Rosen D : Opposing roles of δ and εPKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. Arch Biochem Biophys 420: 246-254, 2003.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 74: 1124-1136, 1986.

Nozawa Y, Miura T, Miki T, Ohnuma Y, Yano T, Shimamoto K : Mitochondrial K_{ATP} channel-dependent and -inde-

pendent phases of ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rat. Basic Res Cardiol 98: 50-58, 2003.

Ohnuma Y, Miura T, Miki T, Kuno A, Shimamoto K : Opening of mitochondrial K_{ATP} channels occurs downstream of PKC-ε activation in the mechanism of preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H440-H447, 2002.

Ping P, Song C, Zhang J, Guo Y, Cao X, Li RC, Wu W, Vondriska TM, Pass JM, Tang XL, Pierce WM, Bolli R : Formation of protein kinase C (epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection. J Clin Invest 109: 499-507, 2002.

Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R : Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. Circ Res 81: 404-414, 1997.

Sasaki H, Galang N, Maulik N : Redox regulation of NF-κB and AP-1 in ischemic reperfused heart. Antioxide Redox Signal 1: 317-324, 1999.

Schulz R, Rose J, Heusch G : Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. Am J Physiol 267: H1341-H1352, 1994.

Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E, Nakaya H : Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. J Clin Invest 109: 509-516, 2002.

Wang Y, Ashraf M : Role of protein kinase C in mitochondrial K_{ATP} channel-mediated protection against Ca^{2+} overload injury in rat myocardium. Circ Res 84: 1156-1165, 1999.

Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, Qiu Y, Li JJ, Bolli R : Nuclear factor-κB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. Circ Res 84: 1095-1109, 1999.

Yoshida K, Hirata T, Akita Y, Mizukami Y, Yamaguchi K, Sorimachi Y, Ishihara T, Kawashiama S : Translocation of protein kinase C-α, δ and ε isoforms in ischemic rat heart. Biochim Biophys Acta 1317: 36-44, 1996.

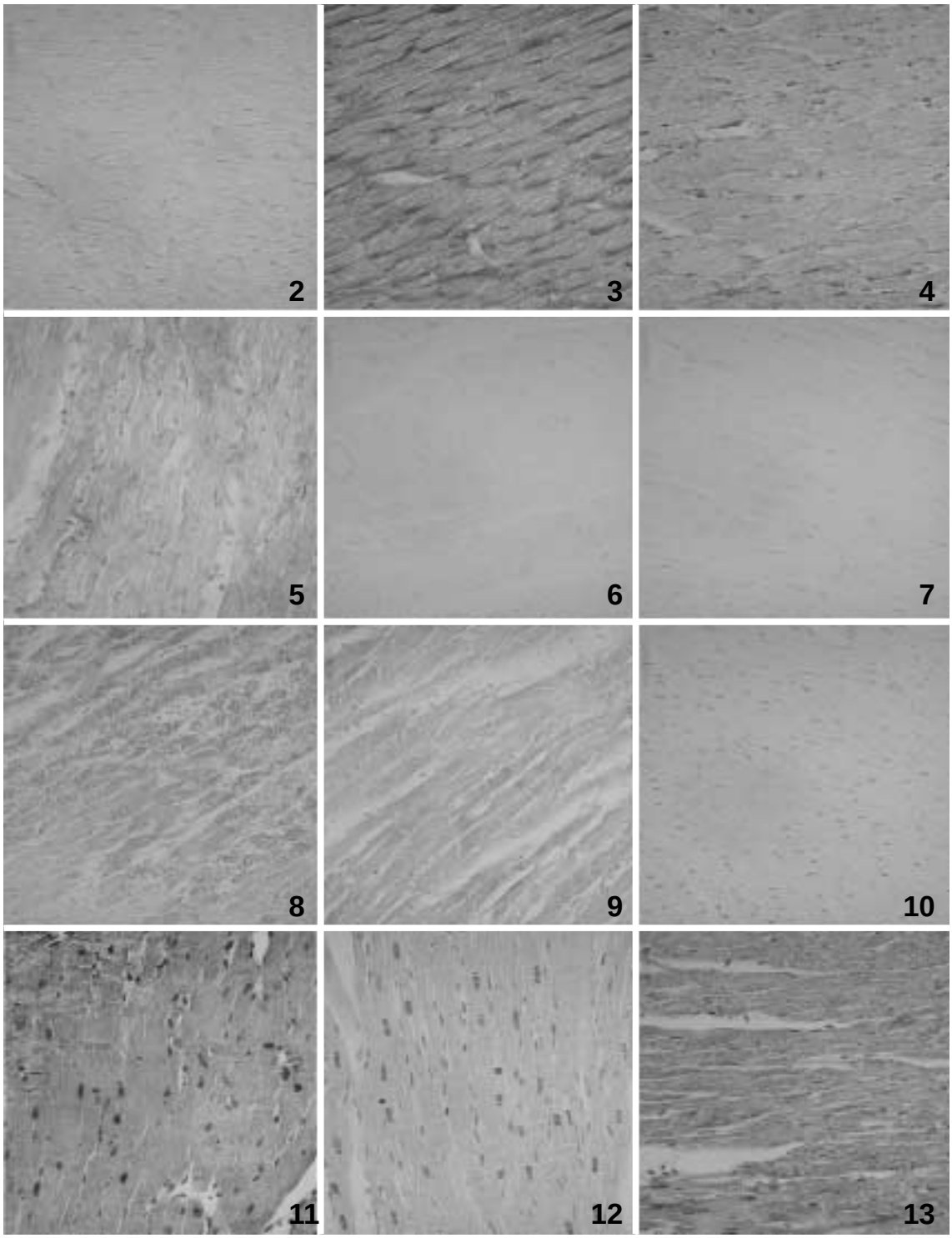
Yoshida K, Kawamura S, Mizukami Y, Kitakaze M : Implication of protein kinase C-alpha, delta, and epsilon isoforms in ischemic preconditioning in perfused rat hearts. J Biochem 122: 506-511, 1997.

Ytrehus K, Liu Y, Downey JM : Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 266: H1145-H1152, 1994.

Legends for Figures

Fig. 2. Trace immunoreactivities of PKC-ε on the cardiomyocytes at 3 hours after Sham operation.
Fig. 3. Strong immunoreactivities of PKC-ε on the cardiomyocytes at 3 hours after 3 cycles of ischemic preconditioning.
Fig. 4. Moderate immunoreactivities of PKC-ε on the cardiomyocytes at 3 hours reperfusion after 30 min ischemia.
Fig. 5. Weak immunoreactivities of PKC-ε on the cardiomyocytes at 24 hours reperfusion after ischemic preconditioning and 30 min ischemia.
Fig. 6. Negative immunoreactivities of NF-κB on the cardiomyocytes at 6 hours after 8 cycles of ischemic preconditioning.
Fig. 7. Trace immunoreactivities of NF-kB on the cardiomyocytes at hours after glibenclamide injection for K_{ATP} inhibition.
Fig. 8. Weak immunoreactivities of NF-κB in the nuclei and strong immunoreactivity in the cytoplasm of the cardiomyocytes at 24 hours reperfusion after 30 min ischemia.
Fig. 9. Weak immunoreactivities of NF-κB in the nuclei and moderate immunoreactivities in the cytoplasm of cardiomyocytes at 24 hours reperfusion after pinacidil injection and 30 min ischemia.
Fig. 10. Trace immunoreactivities of AP-1 in the nuclei and negative immunoreactivities in the cytoplasm of cardiomyocytes at 3 hours after 3 cycles of ischemic preconditioning.
Fig. 11. Strong immunoreactivities of AP-1 in the nuclei and moderate immunoreactivities in the cytoplasm of cardiomyocytes at 3 hour reperfusion after 30 min ischemia.
Fig. 12. Moderate immunoreactivities of AP-1 in the nuclei and weak immunoreactivities in the cytoplasm of cardiomyocytes at 3 hours reperfusion after 3 cycles of ischemic preconditioning and 30 min ischemia.
Fig. 13. Strong immunoreactivities of AP-1 in the nuclei and the cytoplasm of cardiomyocytes at 6 hours reperfusion after glibenclamide injection and 3 cycles of ischemic preconditioning followed by 30 min ischemia.

KCI


2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

Korean J Phys Anthropol
19(3): 165 ~ 178, 2006

Abstract

The Effects of Ischemic Preconditioning and K_{ATP} channel Activation on the Expression of the PKC-ε, NF-κB and AP-1 in Ischemia-reperfused Rat Heart

Dong-Choon Ahn[1], Seung-Ha Chun, Youn-Kyoung Seo, Su-Kyoung Jeon, Hyun-Joo Park, Sang-Wan Lee, Jeong-Ha Sim[2], Doo-Jin Paik

Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University
[1]*Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Kwangwon National University*
[2]*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Kangwon National University*

This study was aimed to elucidate the effects of K_{ATP} activation during IPC on the PKC-ε, NF-κB and AP-1 in ischemia-reperfused rat hearts. SD male rats weighting from 300 to 350 g were split into 9 groups, such as sham control (S), IPC, 3 cycles of 5 min ischemia and 5 min reperfusion, continuous preconditioning (CP), 8 cycles of 5 min ischemia and 5 min reperfusion, K_{ATP} opening (KO) with pinacidil (1.0 mg/kg), K_{ATP} blocking with glibenclamide (1.0 mg/kg) injection, ischemia (IS), 30 min ischemia, IPC followed by IS, 8) K_{ATP} blocking and IPC followed by IS (KB+IPC+IS), IS and K_{ATP} opening (KO+IS). Heart were subjected to ligation of left descending coronary artery and reperfusion in groups of IPC, CP, IS with or without IPC. Immunohistochemistry and Western blotting for PKC-ε, NF-κB and AP-1 were performed at 3, 6, 24 hours after reperfusion or treatment.

Immunoreactivities against PKC-ε antibody were observed stronger in the groups of IPC, KO, IPC+IS and KO+IS than groups of KB, IS and KB+IPC+IS. NF-κB activation and translocation were only observed in the groups of including 30 min ischemia and reperfusion. AP-1 activation and translocation were opposite to the results of PKC-ε activation. In the group of CP, KB, IS and KB+IPC+IS, reactivities of AP-1 antibody were stronger than IPC+IS, KO+IS, and weaker in the groups of S, IPC and KO.

These results suggest that K_{ATP} opening with IPC or pharmacological methods may direct effect on the PKC-ε activation and that K_{ATP} blocking has effect on the AP-1 activation and translocation in the heart of ischemia-reperfused of rats.

Key words : Ischemic peconditioning, Rat heart, PKC-ε, NF-κB, AP-1

Correspondence to : Doo-Jin Paik (Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University)
E-mail : paikdj@hanyang.ac.kr