

피부화상으로 유도된 심근손상에서 Protein Kinase C의 역할

문혜정*, 조현국¹, 박원학
영남대학교 이과대학 생물학과, ¹경운대학교 안경광학과

The Role of Protein Kinase C in the Cardiac Injury Induced by Skin Burn

Hye-Jung Moon*, Hyun Gug Cho¹ and Won-Hark Park
Department of Biology, Yeungnam University, Kyungbuk 712-749, Korea
¹Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi 730-852, Korea
(Received November 29, 2003; Accepted December 11, 2003)

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the role of protein kinase C (PKC) in the development of cardiac injury following scald burn. Sprague Dawley rats were induced a scald burn a 15% total body surface area. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 2 mg/kg) and bisindolylmaleimide (BIS, 0.05 mg/kg) were immediately administered i.p. after burn injury. 5 h and 24 h later, heart was removed and examined biochemical assay, ultrastructural changes and stereological analysis.

The activity of serum aspartate aminotransferase was significantly increased at 5 h ($p < 0.01$) and 5 h+BIS ($p < 0.001$) after burn compared with that of control. The activity of serum creatinine was significantly decreased in PMA treated groups after burn compared with postburn 5 h. PMA caused a decrease in MPO activity and induced wavy fibers in cardiac myocytes at postburn 5 and 24 h. BIS induced contraction band, separation of intercalated disk and abnormal mitochondria in cardiac myocytes at postburn 5 and 24 h. In stereological analysis, treatment of rats with PMA increased volume density of myofibril and mitochondria compared with postburn 5 and 24 h.

Our data suggest that the activation of PKC in scald burned heart decreases inflammation and protects the myocardium.

Key words : Burn injury, Inflammation, Protein kinase C

서 론

피부에 가해진 화상 손상은 화상부위 뿐만 아니라

다른 장기에도 손상을 유도하여 multiple organ dysfunction syndrome (MODS)을 유발시키게 된다(Horton et al., 1999; Sener et al., 2002). 특히 심장은 피부화상

*Correspondence should be addressed to Hye-Jung Moon, Department of Biology, Yeungnam University, Kyungbuk 712-749, Korea. Ph.: 053-810-2371, FAX: 053-815-3061, E-mail: huryzia@yumail.ac.kr
Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

으로 인해 혈류의 변화를 포함한 근세포 내 칼슘 항상성에 변화를 일으켜 심근 수축력을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Horton et al., 1996; Jeschke et al., 2001; Xia et al., 2001). 그리고 화상에 의해 생성된 독성 산소 대사산물로 인해 세포막 구조가 손상되어 세포 내 칼슘 이용력이 변화되어 심근 수축력이 감소된다고 하였다.

일반적으로 열손상에 대한 세포반응은 protein kinase pathways에 의해 조절되는데(Horton et al., 1998), protein kinase C(PKC)는 세포 외 물질의 신호전달과 세포 내 단백질 조절에 중심적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Koide et al., 1992; Merritt et al., 1997; Ogita et al., 1992). 심근에서 발견된 여러 종류의 PKC isoform들(Forbes & Sperelakis, 1980)은 심기능에 대단히 중요한 역할을 담당하는 인자로 인식되고 있다(Sugden & Bogoyevitch, 1995). 구체적으로 PKC는 기질의 인산화, 칼슘과 다른 이온들의 조절, 유전자 발현, cardiac factor의 분비 등을 조절하며, troponin, myosin을 포함한 심근 조절단백질들이 PKC에 의해 인산화되는 등(Venema & Kuo, 1993) 심근조직을 보호하는 하나의 기작으로 활성화된다고 하였다(Battaini, 2001). 활성화된 PKC는 세포막, 세포골격 성분, 핵과 다른 세포내 성분에서 발견되며(Mochly-Rosen & Gordon, 1998), 심근의 수축력을 증가시키며(Pi & Walker, 2000), 심근의 산소소비량을 감소시킨다는 보고가 있다(Noguchi et al., 2001). PKC activator 중 하나인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 phorbol ester의 일종으로 PKC의 natural regulator인 diacylglycerol (DAG)과 유사하게 작용하며, 막과 관련된 kinase를 안정화시킨다(Nishizuka, 1992; Fournier & Murray, 1987). 또한 심근에서는 수축에 관련된 요소들을 구성하고 수축력을 증가시키며(Johnson et al., 1996; Noguchi et al., 2001) 단백질 합성을 자극하여(Bogoyevitch et al., 1993) 다양한 생리적 반응을 유도하지만, 반대로 phorbol ester에 의한 PKC의 활성이 심근기능부전을 야기시켜 세포의 수축력을 감소시키고 세포막을 통한 칼슘 유입을 감소시킨다는 의견이 있다(Buenaventura et al., 1995; Karmazym et al., 1990). 그리고 PKC inhibitor는 여러 세포에 apoptosis를 증가시키고 superoxide radicals을 생성시킬 뿐만 아니라 phospholipase D (PLD)를 직접적으로 저해해 PKC의

활성을 저해하며(Clerk, 2001), PKC 저해로 인해 ischemia reperfusion과 심근 손상 모델에서 심근 손상을 감소시키는데 효과적이라고도 하였다(Lasley et al., 1997; Vogt et al., 1996). 특히 bisindolylmaleimide (BIS)는 모든 PKC isoform을 효과적으로 저해하여(Cain et al., 1998) 심근세포에서 apoptosis를 증가시킨다고 하였다. 한편 PKC는 leukotriene, prostaglandin, platelet activating factor 등 염증반응 유발물질을 증가시켜 피부화상으로 야기된 염증반응에도 관여한다고 하였다(Horton et al., 1998; Youn et al., 1992).

따라서 본 연구는 피부화상 유발 후 PKC activator와 inhibitor를 투여하여 화상에 의해 손상된 심근이 염증반응과 심근 기능에 있어서 어떠한 변화를 일으키는지 알아보기 위해 생화학적 분석, 입체해석학적 분석 그리고 심근의 미세구조 변화 관찰을 통해 고찰해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 화상유발 및 처치

실험동물은 체중 250 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 사용하여 ketamine hydrochloride로 마취시킨 다음, Spector(1973)의 계산법에 따라 TBSA (total body surface area) 15% 되도록 등쪽 면의 털을 깎고 100°C 물로 10초간 화상을 가하였다. Phorbol 12-myristate 13-acetate (2 mg/kg, Sigma)와 bisindolylmaleimide (0.05 mg/kg, Sigma)의 투여는 화상 유발 10분 후에 실시하였으며 각각 5시간, 24시간 경과 후에 처치하고 실험에 사용하였다.

동물의 처치는 효소 활성의 일 중 변동을 고려하여 일정시간에 실시하였고, ether 마취하에서 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사 시킨 후 심장을 적출하였다. 적출한 심장은 생리식염수로 세정한 후, 혈액을 제거한 다음 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에 30분간 방치시킨 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 혈청을 얻어 생화학적 활성 측정에 사용하였다.

실험동물군은 대조군, 화상 후 5시간군, 화상 후 5시간+PMA 투여군, 화상 후 5시간+BIS 투여군, 화상

후 24시간군, 화상 후 24시간+PMA 투여군, 화상 후 24시간+BIS 투여군으로 구분하였다.

2. 혈청 내 효소 활성도 측정

1) Aspartate aminotransferase (AST) 활성도 측정
혈청 내 AST의 활성 측정은 kit 시액(아산제약(주))을 사용하였으며, 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit로 표시하였다.

2) Creatinine 활성도 측정

혈청 내 creatinine의 활성도 측정은 kit 시액(아산제약(주))을 사용하였으며, 단위는 mg/dl로 표시하였다.

3. 심근 조직 내 myeloperoxidase (MPO) activity 측정

피부화상 후 심근내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 Goldblum et al. (1985)의 방법에 따라 측정하였다. MPO의 활성도 측정은 1g의 심장조직에 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) 용액 4.0 ml를 가하여 4°C에서 균등마쇄한 후(Polytron homogenizer, Swizland) 4°C, 18,000 rpm (Beckman, USA)에서 30분간 원심분리하였다. 그 후 침전층을 0.5% hexadecyltetramethylammonium bromide (HTAB)가 함유된 50 mM potassium phosphate (pH 6.0) 용액 4.0 ml에 부유시킨 다음 냉장하에 90초간 초음파 분쇄(Vibracell, USA)하였다. 이후 균질액을 60°C에서 120분간 방치시킨 후 조직분쇄액 1.0 ml을 상온에서 12,000 rpm으로 2분간 원심분리한 뒤 상층액 0.1 ml을 분리하여 *o*-dianisidine이 함유된 500 μ M 과산화수소 용액 3.0 ml과 반응시켜 파장 460 nm에서 시간의 변화에 따른 흡광도의 변화를 측정하고(UV 1601, Shimadzu) MPO의 활성도(U/g of wet heart)를 계산하였다.

4. 심근 조직 내 KC (neutrophil chemoattractant) level 측정

피부화상 후 심근내 호중구 침윤 유도물질인 KC의 양을 측정하기 위하여 mouse KC immunoassay kit (R & D, MN, USA)를 사용하였다. 심장을 적출하여 4.0 ml의 50 mM potassium phosphate (pH 7.4) 하에서 조

직을 분쇄한 후, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 다음 상등액을 채취하여 분석과정에 따라 반응시키고 microtiter plate reader (BioRad 550, CA, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정한 다음 KC의 함량을 계산하였다.

5. 심근 조직 내 protein kinase C (PKC) assay를 위한 시료 조제

심장 적출 후 그 무게를 측정하고 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.05% Triton X-100, 10 nM β -mercaptoethanol, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin로 조제된 extraction buffer 5 ml에 담가 빙냉 하에 균질기로 마쇄하였다. 마쇄균질액을 14,000 \times g에서 5분간 원심분리시켜 상등액을 채취한 다음 extraction buffer로 미리 안정화시킨 DEAE cellulose column에 통과시켜 200 mM NaCl이 포함된 extraction buffer로 PKC-containing fraction을 분리하였다.

6. 심근 조직 내 protein kinase C (PKC) activity 측정

PKC 측정은 SignaTECT protein kinase C assay kit (promega, USA)를 이용하였다. [γ -³²P]ATP가 포함된 PKC activation buffer에 PKC-containing fraction 5 μ l을 첨가하여 30°C에서 5분간 incubation시킨 후, termination buffer를 가하여 반응을 종로시켰다. 그 중 반응액 10 μ l을 SAM membrane에 점적하여 수세한 다음 membrane을 알루미늄 호일로 봉한 후 실온에서 30~60분 동안 건조시키고 1 ml의 scintillation cocktail에 담가 scintillation counter (Beckman, USA)를 이용하여 PKC 활성을 측정하였다.

7. 심근 미세구조의 관찰

적출한 심장의 좌심실 부분을 세절하여 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)에 2~4시간 전고정시키고, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 충분히 세척한 후 다시 1% osmium tetroxide에 90분간 후고정시켰다. 고정이 완료된 조직은 0.1 M

phosphate buffer (pH 7.4)로 세척한 다음 알코올의 농도를 순차적으로 증가시켜 탈수시키고, propylene oxide로 치환하여 epoxy resin에 침투 및 포매시킨 다음, 37°C에서 12시간, 60°C에서 48시간동안 열중합시켜 불력을 제작하였다. 만들어진 불력은 초박절편기 (Reichert Supernova, Sweden)를 이용하여 1 μm 두께로 박절한 다음 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰부위를 선정한 다음, 60~70 nm로 초박절하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 투과전자현미경 (H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

8. 심근의 입체해석학적 관찰

1) 양 평가를 위한 표본의 선택

근원섬유, 사립체, 근형질세망의 양적 조사를 위해 미세구조 관찰표본을 이용하여 심근조직의 종단면으로 잘려진 표본을 무작위로 선택하여 5,000배로 촬영하고, 인화 과정에서 3배로 확대하여 15,000배의 사진을 얻었다.

2) 체적 밀도 (volume density)

근원섬유와 미토콘드리아의 체적 밀도의 측정은 10 d (d = 10 mm)인 단일 격자 (single lattice) test grid를 사용하였고, 근형질세망의 체적 밀도는 격자의 비가 $q^2 = 16$ 이고 8 d (d = 12.5 mm)인 이중 격자 (double lattice) test grid를 사용하여 Loud et al. (1978)의 방법에 의해 근원섬유의 장축에 대해 19°의 기울기로 grid를 배치하여, grid에 intersection 되는 것을 Park et al. (1989)의 점계수법 (point counting method)으로 계수 한 후 다음 식에 적용하였다.

$$V_v = \frac{V_c}{V_T} = \frac{P_c}{P_T}$$

(V_v = 체적 밀도, V_c = 대상물의 체적, V_T = 전체 체적, P_c = intersection 된 대상물 점의 수, P_T = 전체 점의 수)

3) 수 밀도 (numerical density)

사립체의 수 밀도 계산은 10 d (d = 10 mm)인 단일 격자 test grid를 사용하여 계수 한 후 다음 식에 적용하였다.

$$N_v = \frac{1}{1.58} \times \frac{N_A^{3/2}}{V_v^{1/2}}$$

(N_v = 수 밀도, N_A = 단위 면적당 대상물의 수, V_v = 단위 체적)

9. 통계처리

계수되어진 모든 표본은 SPSS WIN 통계 프로그램을 이용하여 유의수준을 95%로 하여 ANOVA test를 실시하였다.

결 과

1. 혈청 내 효소 활성 변동

피부화상에 의한 혈청 AST와 creatinine 활성변화를 관찰한 결과 (Table 1), 혈청 AST 활성은 화상 후 5시간군과 24시간군이 대조군과 비교하여 각각 4.5배 ($p < 0.01$), 4.0배 ($p < 0.05$) 증가되었고, PMA 투여군에서는, 5시간군이 화상군보다 낮게 나타났고, 24시간군에서는 화상군보다 높게 나타났다. BIS 투여군은 대조군과 비교하여 5시간군에서는 가장 높은 활성을 나타내었고, 24시간군에서는 가장 낮게 나타났다.

혈청 creatinine 활성은 화상 후 5시간군에서 대조군과 비교하여 1.17배 ($p < 0.01$) 증가되었고, 24시간군에서도 약간 높게 나타났다. 화상 후 5시간+PMA 투여

Table 1. Changes of serum AST and creatinine activities in scald burned rats

Groups	AST (Karmen unit/ml)	Creatinine (mg/dl)
Control (10)	31.50 ± 3.699	0.406 ± 0.0198
Burn 5 h (10)	143.00 ± 44.306***a)	0.477 ± 0.0402***a)
Burn 5 h+PMA (10)	115.00 ± 26.192	0.401 ± 0.0106***b)
Burn 5 h+BIS (10)	156.33 ± 26.102***a)	0.437 ± 0.0233
Burn 24 h (10)	127.67 ± 25.325**a)	0.419 ± 0.0240**b)
Burn 24 h+PMA (10)	135.50 ± 38.662***a)	0.409 ± 0.0088**b)
Burn 24 h+BIS (10)	111.60 ± 33.374	0.423 ± 0.0178

Each value represents the mean + S.E.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

a): Significantly different from the control

b): Significantly different from the burn 5 h

The numbers of determinations are in the parentheses.

군에서는 화상 후 5시간군보다 낮게 나타났고, 화상 후 24시간+PMA 투여군에서도 화상 후 24시간군보다 낮게 나타났다. 화상 후 5시간+BIS 투여군은, 화상 후 5시간+PMA 투여군보다 높게 나타났으며, 화상 후 24시간+BIS 투여군은, 화상 후 24시간군과 화상 후 24시간+PMA 투여군보다 높게 나타났다.

2. 피부화상 유도 후 심근 내 KC, MPO 및 PKC 활성도 측정

피부화상 후 심근내 호중구 침윤 유도물질의 활성을 나타내는 KC와 호중구 침윤 정도를 나타내는 MPO의 활성 및 PKC 활성의 변화를 관찰한 결과 (Table 2), KC의 활성은 대조군과 비교하여 화상 후 5시간군에서 증가하였고, 24시간군에서는 낮게 나타났다. 또한 시간이 지날수록 KC 활성이 감소되는 추세로 나타났다. 화상 후 5시간+PMA 투여군은, 화상 후 5시간군보다 낮게 나타났고, 화상 후 5시간+BIS 투여군에서는 화상 후 5시간+PMA 투여군보다 높게 나타났다. 그리고 화상 후 24시간군에서는 PMA 투여군이 BIS 투여군보다 낮게 나타났다.

심근내 MPO 활성은 화상 후 5시간군에서는 PMA 투여군이 화상 후 5시간군과 유사하게 나타났고, BIS 투여군은 높게 나타났다. 화상 후 24시간군에서는,

PMA 투여군과 BIS 투여군이 화상 후 24시간군보다 낮은 활성을 나타내었다.

심근내 PKC 활성은 시간이 지날수록 감소되는 추세였는데, 화상 후 5시간군은 대조군보다 높게 나타났고, 화상 후 5시간+PMA 투여군은 화상 후 5시간군보다 높게, 화상 후 5시간+BIS 투여군은 화상 후 5시간군보다 낮게 나타났다. 화상 후 24시간군에서는 대조군과 유사한 활성을 나타내었으며, 화상 후 24시간+PMA 투여군은, 화상 후 24시간군보다 높게, 화상 후 24시간+BIS 투여군은, 화상 후 24시간+PMA 투여군보다 낮게 나타났다.

3. 미세구조적 관찰

피부화상으로 유도된 심근의 미세구조 관찰 결과, 대조군(Fig. 1)과 비교하여 화상군에서 심한 형태적 변화가 관찰되었다. 화상 후 5시간군에서는 핵이 불규칙하게 분열된 것이 관찰되었고, 과수축대가 다수 형성되었으며, muscle fraying 현상이 소수 관찰되었다. 또한 사이원반의 분리현상이 주로 관찰되었고, 근세포막의 파괴가 부분적으로 나타났다. 사립체 종창과 크리스트의 일부 소실이 관찰되었다(Figs. 2, 3). 화상 후 5시간+PMA 투여군은, 화상 후 5시간군보다는 손상이 완화된 양상을 나타내었다. 근세포내 근원섬유가 세포의 장축을 따라 잘 배열되어 있었고 수축대는 관찰되지 않았으며 과동형 섬유가 관찰되었다. 사이원반도 대조군보다는 분리되어 나타났다(Figs. 4, 5). 화상 후 5시간+BIS 투여군에서는 가장 심한 손상을 나타내어, 수축대가 빈번하게 관찰되었고, 사이원반의 분리현상도 나타났다. 비정상적인 형태의 사립체도 일부 관찰되었다(Figs. 6, 7).

화상 후 24시간군에서는 과수축대의 형성은 적어지고 muscle fraying이 관찰되었고, 근세포막이 파괴된 형태로 나타났으며 사립체의 공포화 현상이 나타났다. 사이원반의 분리현상이 소수 관찰되었지만 대부분 정상적인 모습으로 관찰되었다(Fig. 8). 화상 후 24시간+PMA 투여군은 손상이 완화되어 대조군과 유사한 형태로 나타났다. 근세포막이 잘 보존되어 있었고, 사이원반도 정상적인 형태로 관찰되었으며, 약간의 지방소적이 관찰되었다(Fig. 9). 화상 후 24시간+BIS 투여

Table 2. Changes of neutrophil chemoattractant (KC), myeloperoxidase (MPO) and protein kinase C (PKC) activities in heart following scald burn injury

Groups	KC (pg/ml)	MPO (U/g of weight)	PKC (pmol/min/μg)
Control(10)	164.5±4.09	0.025±0.0064	0.25±0.068
Burn 5h (10)	175.0±13.00	0.008±0.0053	0.44±0.020
Burn 5h +PMA (10)	150.7±5.03*** ^{a)}	0.011±0.0016	0.53±0.016
Burn 5h+BIS (10)	161.5±4.93	0.022±0.0202	0.39±0.017
Burn 24h (10)	129.5±4.95	0.017±0.0125	0.25±0.039
Burn 24h +PMA (10)	133.3±3.79	0.013±0.0026	0.34±0.012
Burn 24h +BIS (10)	153.8±2.99** ^{b)}	0.013±0.0031	0.32±0.013

Each value represents the mean ± S.E.

**, p < 0.01

^{a)} Significantly different from the burn 5h

^{b)} Significantly different from the burn 24h

The numbers of determinations are in the parentheses.

Table 3. Results of stereological analysis in myocardium induced by scald burn injury

Groups	Volume density ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$)		Numerical density (Number/ μm^3)
	Myofibril (n=120)	Mitochondria (n=120)	Mitochondria (n=120)
Control	0.450±0.0838	0.292±0.0937	10.362±4.7884
Burn 5h	0.448±0.1277	0.246±0.0795****)	8.013±3.8443****)
Burn 5h +PMA	0.467±0.0900	0.281±0.0606**b)	9.612±3.1159*b)
Burn 5h +BIS	0.463±0.1087	0.261±0.1057	8.745±5.3806
Burn 24h	0.401±0.1240****)	0.257±0.0832****)	8.560±3.8523****)
Burn 24h +PMA	0.490±0.1101	0.266±0.0877	9.041±4.4325
Burn 24h +BIS	0.460±0.1058	0.339±0.0930	12.889±5.0936****)

Each value represents the mean±S.E.

*, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001

^{a)} Significantly different from the control

^{b)} Significantly different from the burn 5 h

The numbers of determinations are in the parentheses.

군에서는 불규칙적으로 분열된 핵이 관찰되었고 사립체가 소실된 부분에서 공포를 볼 수 있었다. 또한 사이원반의 분리현상도 관찰되었다(Fig. 10).

4. 입체해석학적 관찰

피부화상에 의한 심근조직 내에 포함된 근원섬유, 사립체의 양적변화를 분석한 결과(Table 3), 근원섬유의 체적밀도는 화상 후 5시간군과 24시간군이 대조군에 비하여 감소되었고, 특히 24시간군에서는 12% 유의하게 감소되어 나타났다. 화상 후 5시간+PMA 투여군과 BIS 투여군 모두 대조군과 화상 후 5시간군에 비하여 증가되었다. 화상 후 24시간+PMA 투여군과 BIS 투여군에서도 대조군과 화상 후 24시간군보다 증가되었고, 화상 후 24시간+PMA 투여군은 화상 후 5시간+PMA 투여군보다 증가되어 나타났으며, 화상 후 24시간+BIS 투여군에서는 화상 후 5시간+BIS 투여군보다 감소되었다.

사립체의 체적밀도는 화상 후 5시간군과 24시간군이 대조군에 비하여 각각 18% (p < 0.001), 13% (p < 0.001) 유의하게 감소되어 나타났다. 화상 후 5시간+PMA 투여군과 BIS 투여군은 대조군보다는 감소되었으나, 화상 후 5시간군보다 증가되었다. 화상 후 24

시간+PMA 투여군은 대조군보다는 감소되었고 화상 후 24시간군보다는 약간 증가되었다. 화상 후 24시간+BIS 투여군에서는 모든 실험군 중 가장 높게 나타났다.

사립체의 수 밀도는 $1\mu\text{m}^3$ 내에 포함되는 사립체의 수를 나타내주는 것으로, 화상 후 5시간군과 24시간군이 대조군과 비교하여 각각 13% (p < 0.001), 12% (p < 0.01) 감소되었다. 화상 후 5시간+PMA 투여군과 BIS 투여군에서는 대조군보다는 낮게 나타났으나 화상 후 5시간군보다는 증가되었고 특히 화상 후 5시간+PMA 투여군은 화상 후 5시간군보다 19% 유의한 증가를 나타내었다. 화상 후 24시간+PMA 투여군은, 대조군보다는 낮았지만 화상 후 24시간군보다는 높게 나타났으며, 화상 후 24시간+BIS 투여군에서는 대조군보다 24% (p < 0.001) 유의하게 증가되어 나타났다.

고 찰

Protein kinase C (PKC)는 세포막을 통해 다양한 형태의 신호를 세포내로 전달하여 단백질을 인산화시켜 PLA_2 가 활성화되면 염증반응을 유도하기도 하고, lipocortin 합성을 유도하여 세포막 인지질로부터 arachidonic acid를 생성하게 하는 phospholipase A_2 (PLA_2)를 억제하여 염증반응 유발물질들의 합성을 억제함으로써 혈관 투과성 항진, 부종, fibrin 침착, 백혈구의 염증부위 이동 등의 일련된 염증반응을 억제하기도 한다(Chang et al., 1987). 이러한 PKC의 양면적인 역할들을 바탕으로 PKC가 화상에 의해 손상된 심근에서 염증반응을 증가시키는지 혹은 억제시키는지 를 알아보고자 PKC activator인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 PKC inhibitor인 bisindolylmaleimide (BIS)를 각각 피부화상 유발 후 투여하고 심근의 손상에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

먼저 화상으로 유도된 심근의 손상정도를 알아보기 위해 혈중 AST의 활성을 측정한 결과, 화상 후 5시간군에서 대조군과 비교하여 높게 나타났던 활성은 24시간군에서는 낮은 활성을 보였으며(Yang et al., 1997), 화상 후 5시간+BIS군이 가장 높은 활성을 나타내어 심근손상이 가장 심하게 나타났음을 알 수 있었다. 또

한 심장 손상 시 혈액에서 가장 먼저 활성이 증가되는 creatinine은 화상에 의해서 활성이 증가되었지만, PMA 투여군에서는 낮은 활성을 나타내어 PMA가 화상에 의한 심근의 손상정도를 완화시킴을 알 수 있었다.

Horton et al. (1998)은 PKC를 전신에 투여하면 열손상에 의한 염증반응을 감소시키고 심근을 보호하는 등 많은 세포 반응을 바꿀 수도 있다고 하였는데, 화상시 심근 내에서는 심근을 보호하는 기작으로 PKC가 대단히 중요한 인자로 작용한다고 하였다.

화상 후 PKC와 염증반응과의 관계를 알아보기 위해 심근조직 내 호중구 침윤 유도물질인 KC와 호중구로부터 유리되는 myeloperoxidase (MPO)의 활성을 측정하였다. 그 결과 화상군에서 증가되었던 KC 함량이 PMA 투여군에서 감소되었고, BIS 투여군에서는 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 화상은 심근 내 KC 생성을 촉진시키며 (Faunce et al., 1999), PMA 투여에 의한 PKC의 활성화는 호중구 침윤 유도물질의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다. 그리고 실험군 모두에서 MPO 활성이 대조군과 비교하여 감소되었는데, 이는 폐와 간에서는 화상손상 후 MPO 활성이 증가하지만 신장과 회장에서는 감소되었다는 보고 (Dries et al., 2001)가 있어 화상으로 유도된 허혈성 손상이 MPO 활성을 증가시키는 (Yin et al., 2000) 것만을 아님을 알 수 있었다. 그리고 화상 후 5시간군에서 PMA 투여군보다 BIS 투여군이 더 높은 MPO 활성을 나타내어, BIS 투여군에서 호중구의 침윤정도가 높음을 알 수 있었다. 일반적으로 MPO와 PKC는 PMA에 의해서 호중구를 활성화시킨다고 알려져 있지만 피부 화상에 의해서 심근 내 호중구는 소실이 일어나는 것으로 판단되었다.

화상 후 심근 내 PKC의 활성은 증가되는 경향이었는데, 화상 후 5시간군에서 높았던 활성이 24시간군에서는 감소되었고, PMA 투여군이 가장 높은 활성을 나타내었고, BIS 투여군에서 낮게 나타났다. 이러한 결과는 PKC 활성증가는 염증유발물질인 KC의 생성과 반비례하는 것으로 Cho et al. (2001)이 PKC 활성저하는 허혈성 심근손상을 완화시킬 수 없다고 한 결과를 보면 결국 PKC의 활성증가는 심근조직 내 염증반응을 감소시키는 것으로 추론되었다.

PKC는 다양한 심혈관계의 기능 즉, 혈관 투과성, 세포 이동과 성장, 세포외 기질 생성, 다양한 cytokines의 발현에도 영향을 미칠 수 있다고 (Cain et al., 1999) 하여 화상에 의한 심근 손상의 미세구조적 변화를 유도할 것으로 가정하였는데, 실험 결과 근원섬유의 감소 또는 소실, 사립체의 중창과 크리스테의 소실, 심근세포 핵의 변형 등이 관찰되었다. 화상군에서 나타난 이러한 형태적 변화들은 심근 수축력의 변화를 초래할 수 있는 (Chi et al., 1998; Sheeran et al., 1998) 것으로 판단되었다. 화상 후 5시간군과 화상 후 5시간+BIS 투여군에서 과수축대 (Ganote, 1983)가 사이원반의 분리현상과 동반되어 나타나 심근의 변성이 비가역적 상태에 처해 있음을 반영해 주었으며, PKC inhibitor의 일종인 calphostin C 투여 (50~100 nM)는 조면소포체와 골지체 같은 세포내 막구조를 빠르게 파괴시키고, 세포 성장을 저해하고 apoptosis를 촉진시킨다는 보고 (Sciorra et al., 2001) 또한 BIS 투여군의 심근 상태 정도를 뒷받침해주고 있다. 반면 PMA 투여군에서는 화상군의 심근 손상정도를 어느 정도 완화시켜줄 수 있을 수 있었었는데, 이것은 PMA가 오랫동안 심근의 PKC activation을 유도하여 심근을 보호한 것으로 판단되었다. 일반적으로 피부화상으로 인해 심장 내 세포질의 칼슘 항상성을 방해해 세포질 칼슘이 축적되어 심근저해의 원인이 되는데 (Xia et al., 2001), 최근 연구보고에 의하면 PKC에 의해 인산화된 단백질이 수용체의 기능, 막 수송, 평활근 수축과 같은 칼슘을 중재하는 기능들을 조절한다고 하였다 (Horton et al., 1998).

심근기능의 변화에 대한 구체적인 형태변화를 알아보기 위하여 입체해석학적 분석을 실시하였다. 그 결과 화상군에서 근원섬유의 체적밀도가 감소되어 피부 화상이 심근세포 내 근원섬유의 양을 저하시켜 심장 수축력에 영향을 미친 것으로 생각되며, PMA 투여군에서 근원섬유의 체적밀도가 시간이 갈수록 증가되어 PKC의 활성증가가 심근손상을 저해한다는 결과를 뒷받침해 주고 있다. 또한 사립체의 체적밀도를 측정 한 결과에서도 화상 후 5시간+PMA 투여군에서는 화상군과 비교하여 증가되었으며, 사립체 수밀도도 증가되어 전반적으로 심근기능이 화상군보다 향상된 것으로 나타났다. 그러나 본 실험결과 BIS 투여군에서 증가된

사립체의 체적밀도 증가현상은 사립체의 종창현상으로 생각되며, 화상 후 24시간+BIS 투여군에서는 사립체 개개의 활동성 저하로 인해 심근세포의 정상적인 활동성 제공을 위한 보상현상으로 사립체가 분획되어 사립체의 수밀도가 증가된 것으로 판단되었다.

이와 같은 결과들을 종합해 볼 때, PKC의 활성화는 화상으로 인해 손상된 심근에서 염증반응을 감소시켜 심근의 손상을 완화시키는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Battaini F: Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res* 44(5) : 353-361, 2001.
- Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH: Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C ϵ is a major isotype present and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ Res* 72 : 757-767, 1993.
- Buenaventura P, Cao Danh H, Glynn P, Takeuchi K, Takahashi S, Simplaceany E, McGowan FX, Nido PJ: Protein kinase C activation in the heart: Effects on calcium and contractile proteins. *Ann Thorac Surg* 60 : S505-508, 1995.
- Cain BS, Meldrum DR, Harken AH: Protein kinase C in normal and pathologic myocardial states. *J Surg Res* 81 : 249-259, 1999.
- Cain BS, Meldrum DR, Meng X, Shames BD, Banerjee A, Harken AH: Calcium preconditioning in human myocardium. *Ann Thorac Surg* 65 : 1065-1070, 1998.
- Chang J, Musser JH, McGregor H: Phospholipase A₂: Function and pharmacological regulation. *Biochemical Pharmacology* 36(15) : 2429-2436, 1987.
- Chi L, Yang Z, Huan Y: Effects of abnormal distribution of calcium on impairment of myocardial mechanics in the early stage of thermal injury. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi* 14(1) : 33-36, 1998.
- Cho H, Youm JB, Earm YE, Ho WK: Inhibition of acetylcholine activated K⁺ current by chelerythrine and bisindolylmaleimide I in atrial myocytes from mice. *Eur J Pharmacol* 424 : 173-178, 2001.
- Clerk A: Death by protein kinase C inhibitor: a stressful event. *J Mol Cell Cardiol* 33 : 1773-1776, 2001.
- Dries DJ, Lorenz K, Kovacs EJ: Differential neutrophil traffic in gut and lung after scald injury. *J Burn Care Rehabil* 22(3) : 203-209, 2001.
- Faunce DE, Llanas JN, Patel PJ, Gregory MS, Duffner LA, Kovacs EJ: Neutrophil chemokine production in the skin following scald injury. *Burns* 25(5) : 403-410, 1999.
- Forbes MS, Sperelakis N: Structures located at the level of the Z bands in mouse ventricular myocardial cells. *Tissue Cell* 12 : 467-489, 1980.
- Fournier A, Murray AW: Application of phorbol ester to mouse skin causes a rapid and sustained loss of protein kinase C. *Nature* 330(6150) : 767-769, 1987.
- Ganote CE: Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 15 : 67-73, 1983.
- Goldblum SE, Wu KE, Jay M: Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* pp. 1978-1985, 1985.
- Horton JW, Mileski WJ, White DJ, Lipsky P: Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 reduces cardiac contractile dysfunction after burn injury in rabbits. *J Surg Res* 64 : 49-56, 1996.
- Horton JW, White J, Maass D: PKC inhibition improves ventricular function after thermal trauma. *J Trauma* 44(2) : 254-264, 1998.
- Horton JW, White DJ, Maass D, Sanders B, Thompson M, Giroir B: Calcium antagonists improve cardiac mechanical performance after thermal trauma. *J Surg Res* 87 : 39-50, 1999.
- Jeschke MG, Low JF, Spies M, Vita R, Hawkins HK, Herndon DN, Barrow RE: Cell proliferation, apoptosis, NF-kappa B expression, enzyme, protein and weight changes in livers of burned rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(6) : G1314-1320, 2001.
- Johnson JA, Gray MO, Che Hong Chen, Mochly Rosen D: A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem* 271(40) : 24962-24966, 1996.
- Karmazyn M, Watson JE, Moffat MP: Mechanisms cardiac depression induced by phorbol myristate acetate in working rat hearts. *Br J Pharmacol* 100 : 826-830, 1990.
- Koide H, Ogita K, Kikkawa U, Nishizuka Y: Isolation and characterization of the ϵ subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 1149-1153,

- 1992.
- Lasley RD, Noble MA, Mentzer RM: Effects of protein kinase C inhibitors in in situ and isolated ischemic rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 3345-3356, 1997.
- Loud AV, Anversa P, Giacomelli F, Wiener J: Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size. *Lab Invest* 38 : 586-596, 1978.
- Merritt JE, Sullivan JA, Tse J, Wilkinson SE, Nixon JS: Different sensitivities of neutrophil responses to a selective protein kinase C inhibitor, Ro 31 8425; Redundancy in signal transduction. *Cell Signal* 9(1) : 53-57, 1997.
- Mochly Rosen D, Gordon AS: Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB* 12 : 35-42, 1998.
- Nishizuka Y: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258 : 607-613, 1992.
- Noguchi T, Chen Z, Bell SP, Nyland L, LeWinter MM: Activation of PKC decreases myocardial O₂ consumption and increases contractile efficiency in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(5) : H2191-2197, 2001.
- Ogita K, Miyamoto S, Im Yamaguchi K, Koide H, Fujisawa N, Kikkawa U, Sahara S, Fukami Y, Nishizuka Y: Isolation and characterization of δ subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 1592-1596, 1992.
- Park WH, Chung HJ, Kim DH: Effect of chlorambucil on cardiac ultrastructure of mouse. *Korean J Electron Microscopy* 16(1) : 47-62, 1989. (Korean)
- Pi YQ, Walker JW: Diacylglycerol and fatty acids synergistically increase cardiomyocyte contraction via activation of PKC. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 279 : H26-34, 2000.
- Scierra VA, Hammond SM, Morris AJ: Potent direct inhibition of mammalian phospholipase D isozymes by calphostin c. *Biochem* 40 : 2640-2646, 2001.
- Sener G, Sehirli AO, Satiroglu H, Keyer Uysal M, Yeğen BC: Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns* 28 : 419-425, 2002.
- Sheeran PW, Maass DL, White DJ, Turbeville TD, Giroir BP, Horton JW: Aspiration pneumonia induced sepsis increases cardiac dysfunction after burn trauma. *J Surg Res* 76 : 192-199, 1998.
- Spector: In: Handbook of Biological Data. Philadelphia, PA: Saunders, p. 157, 1973. Sugden PH, Bogoyevitch MA: Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res* 30 : 478-492, 1995.
- Venema RC, Kuo JF: Protein kinase C mediated phosphorylation of troponin I and C protein in isolate myocardial cells is associated with inhibition of myofibrillar actomyosin MgATPase. *J Biol Chem* 268 : 2705-2711, 1993.
- Vogt AM, Htun P, Arras M, Podzuweit T, Schaper W: Intramyocardial infusion of tool drugs for the study of molecular mechanisms in ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 91(5) : 389-400, 1996.
- Xia ZF, Horton JW, Tang HT, Yang Y: Metabolic disorder in myocardial intracellular free calcium after thermal injury. *Burns* 27 : 453-457, 2001.
- Yang J, Yang Z, Chen F: The measurement of cardiac myosin light chain I in diagnosis of postburn cardiac injury. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi* 13(1) : 34-36, 1997.
- Yin Z, Zhou J, Cai S, Wang Z: On line dynamic measurement of blood viscosity, hematocrit and change of blood volume. *Chin J Traumatol* 15 : 3(2) : 102-106, 2000.
- Youn YK, LaLonde C, Demling R: The role of mediators in the response to thermal injury. *World J Surg* 16(1) : 30-36, 1992.

< 국문초록 >

본 연구는 피부화상으로 유도된 심근손상에서 protein kinase C (PKC)의 역할을 알아보고자 하였다. 수컷 흰 쥐(SD계)에 15%의 피부전층화상을 유도한 뒤, PKC activator인 phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA)와 PKC inhibitor인 bisindolylmaleimide (BIS)를 투여하여 5시간, 24시간 후에 심장을 적출하여 생화학적·미세구조적·입체해석학적 방법을 실시하였다. 혈청 AST와 creatinine은 화상 후 5시간군과 화상 후 5시간+BIS 투여군에서 높게 나타났고, KC와 MPO 활성은 PMA 투여군이 BIS 투여군보다 낮게 나타났다. 미세구조적 관찰 결과 PMA 투여군에서는, 화상으로 인한 핵의 분열, 과수축대 형성, 사이토플라즘의 분리 현상이 다소 완화된 형태로 관찰되었고, BIS 투여군에서는 화상 단독군에서 나타나는 형태적 변화 뿐만 아니라 비정상적인 형태의 사립체도 일부 관찰되었다. 전체적으로 5시간에서 24시간군으로 가면서 손상

이 완화된 양상을 나타내었다. 입체해석학적 결과에서는 화상으로 인한 근원섬유의 체적밀도 감소가 PMA와 BIS 투여로 인해 증가되었고, 사립체의 체적밀도와 수밀도의

증가는 BIS군에서 가장 높게 나타났다. 결론적으로 PKC의 활성화는 화상으로 인해 손상된 심근에서 염증반응을 감소시켜 심근 손상을 보호한다고 사료된다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrograph of normal cardiac muscle in rats. The myocyte was shown well-preserved feature. Myofibrils appeared intact and formed a regular array. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 2.** Electron micrograph of cardiac muscle at 5 h following skin burn in rats. Hypercontraction band (asterisk) and muscle fraying (double asterisks) were shown. M : mitochondria, My : myofibril. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 3.** Electron micrograph of cardiac muscle at 5 h following skin burn in rats. The intercalated disk (arrow) was separated. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 4.** Electron micrograph of cardiac muscle at 5 h following skin burn with treatment of PMA in rats. Wavy fiber (arrow) was shown. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 5.** Electron micrograph of cardiac muscle at 5 h following skin burn with treatment of PMA in rats. The intercalated disk (arrow) was partially separated. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 6.** Electron micrograph of cardiac muscle at 5h following skin burn with treatment of BIS in rats. Hypercontraction band (asterisk) was observed. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 7.** Electron micrograph of cardiac muscle at 5 h following skin burn with treatment of BIS in rats. Separation of intercalated disk (arrow) was noted. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 8.** Electron micrograph of cardiac muscle at 24 h following skin burn in rats. Vacuolization of mitochondria (arrow) was shown. M : mitochondria. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 9.** Electron micrograph of cardiac muscle at 24 h following skin burn with treatment of PMA in rats. Intercalated disk (arrow) appears intact. Lipid droplets (LD) were shown. Scale bar indicates 2 μ m.
- Fig. 10.** Electron micrograph of cardiac muscle at 24 h following skin burn with treatment of BIS in rats. Nucleus (N) was cloven in a few lobes and vacuolization of mitochondria (arrow) was observed. Scale bar indicates 2 μ m.









