

심방 이노호르몬의 분비조절에서 Ca^{2+} 이 protein kinase C 활성화에 미치는 영향

강창원 · 김진상 · 이호일

전북대학교 생체안전성연구소
(1998년 9월 20일 접수)

Effects of Ca^{2+} on protein kinase C activation in atrial natriuretic peptide regulation

Chang-won Kang, Jin-shang Kim, Ho-il Lee

Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Chonju 521-756, Republic of Korea

(Received Sep 20, 1998)

Abstract : Atrial natriuretic peptide(ANP) is a hormone with potent natriuretic, diuretic and relaxing properties on vascular smooth muscle. Specific chemical modulator in response for the ANP secretion has not been found yet. Therefore, we have investigated the role of Ca^{2+} responsible for the regulation of ANP induced by protein kinase C(PKC) on mechanically stretch-induced ANP secretion in the rat atria. The results obtained were as follows ;

1. ANP secretion and ANP concentration were increased to more in Ca^{2+} -free buffer than in the Krebs-Henseleit buffer on mechanically stretch-induced ANP secretion($p < 0.05$), but extracellular fluid translocation(ECF) was not significant. Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA, $10^{-7}M$) induced ANP secretion and ANP concentration in Ca^{2+} -free buffer shown to more accentuate on mechanically stretch-induced ANP secretion than in the Ca^{2+} -free buffer($p < 0.05$), but ECF translocation was not significant.

2. In the presence of ryanodine($3 \times 10^{-6}M$), PMA($10^{-7}M$) induced ANP secretion and ANP concentration in the Krebs-Henseleit buffer were shown to more increase on mechanically stretch-induced ANP secretion than in the ryanodine($3 \times 10^{-6}M$) with the Krebs-Henseleit buffer($p < 0.05$), but ECF translocation was not significant.

3. In the presence of ryanodine($3 \times 10^{-6}M$), PMA($10^{-7}M$) induced ANP secretion and ANP concentration in the Ca^{2+} -free buffer was shown to more increase on mechanically stretch-induced ANP secretion than in the ryanodine($3 \times 10^{-6}M$) with the Ca^{2+} -free buffer on mechanically induced ANP secretion($p < 0.05$), but ECF translocation was not significant.

이 논문은 1997년 전북대학교 지원 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Chang-woo Kang, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea(Tel : 82-652-270-3715).

The results suggest that PKC-induced ANP secretion may not be related to the change of Ca^{2+} on mechanically induced ANP secretion in the rat atria.

Key words : PKC, atrial natriuretic peptide, PMA, ryanodine, Ca^{2+} .

서 론

Atrialnatriuretic peptide(ANP)는 심근 세포외액 조절에 깊은 관련성이 있다고 Henry *et al*¹에 의해 보고된 이후 심방근 세포내에 독특한 분비과립이 존재함을 Kisch²에 의해 발견되었다. 이러한 ANP는 혈관을 이완시켜 나타나는 혈압 하강작용, 신장에 작용하여 이뇨와 Na^+ 배설의 증가작용 및 모세혈관 투과력을 증가시켜 혈관내의 물을 간질액으로 이동시키는 작용 등이 밝혀짐으로써^{3,4} ANP에 대한 생리적 기능 즉, ANP 작용점의 다양성이 제시되었다.

심장으로부터의 ANP 분비는 심장의 확장에 의하여 촉진될 수 있고, 심방 내압의 증가, 심박동수의 증가, adrenergic과 cholinergic drug 및 몇 종의 peptide hormone 등⁵⁻⁹의 자극으로 증가될 수 있다. 또한 생리적 세포기능조절 중에서 phosphoinositide 대사에 의한 inositol triphosphate (IP_3)와 diacylglycerol(DAG)는 호르몬 분비조절에 매우 중요하다^{10,11}. 이중 DAG는 PKC를 활성화 시키며^{11,12} PKC 활성화와 Ca^{2+} 은 ANP 분비조절에 필수적인 요인으로 잘 알려져 있다¹³⁻¹⁵.

그러나 심방의 기계적인 압력과 동반된 ANP 분비기전은 아직 명확하지 않고 이에 따른 PKC의 작용에 대한 Ca^{2+} 의 역할이 구명되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 Cho *et al*¹⁶에 의하여 발전된 방법인 적출 심방관류 모델을 이용하여 기계적 자극에 의한 백서의 ANP 분비조절에서 Ca^{2+} 이 PKC 활성화에 미치는 효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 체중 250-350g의 백서(Sprague-Dawley, 암컷)를 사용하였다.

적출 심방 관류모형 : 적출 심방 관류모형으로 ANP

분비와 세포외액 이동량 변동을 동시에 측정할 수 있도록 고안된 Cho *et al*¹⁶의 방법을 수정 발전시킨 모형을 이용하였다. 분비된 ANP량은 방사면역 측정법에 의하여 측정하였다. 심방근 세포외액 이동량의 측정은 [³H]-inulin clearance¹⁷로 심방의 심낭강으로부터 심방내로 이동하는 세포외액 이동량의 변동을 측정할 수 있도록 심낭강에 [³H]-inulin을 포함한 영양액을 넣었다. 수출관의 tip을 1, 2, 4 및 6cmH₂O를 올려 심방내압을 증가시키에 따라 심장의 확장을 유도하였다. 관류액의 pH 및 가스 분압은 자동측정기(Corning 175 Automatic pH/Blood Gas system, USA)로 연속 측정하였으며 심방내압의 변화는 압력변환기(Statham P23Db, USA)를 거쳐 생리기록기(MK-IV, Narco Bio System, USA)에 기록하였다.

실험방법 : 적출 심방 관류모형에 장치된 심방은 약 30분동안 관류하여 ANP의 분비가 일정하도록 preincubation 시킨 다음, 8분 간격으로 1, 2, 4 및 6cmH₂O를 주어 심방을 확장시키고 2분 후에 수축시켰다. 즉, 2분 간격으로 4회 반복하고 2분동안 압력을 주어 심방을 확장시키며, 다시 압력을 제거하여 심방이 원래의 상태로 수축하게 하였다. 심방을 통한 관류액은 얼음물 속에 담겨져 있는 시험관에 취했다. 심방의 확장후 수축시 용적변화의 측정은 심낭강과 연결된 눈금이 있는 calibrated microcapillary tube내 용액의 길이변화로 하였다¹⁷. 2분동안에 분비된 ANP 양은 그 농도와 관류액의 용적을 곱하여 ng ANP/2min/g로 표시하였다. 이러한 모델을 이용하여 대조군으로 Krebs-Henseleit bicarbonate 관류액만을 이용하고 다른 organ chamber에는 실험군으로써 관류액에 Ca^{2+} 를 제거한 즉, Ca^{2+} 를 제거한 관류액, Ca^{2+} 를 제거한 관류액과 PMA($10^{-7}M$)를 혼합한 관류액, ryanodine($3 \times 10^{-6}M$)과 PMA($10^{-7}M$)를 혼합한 관류액 및 Ca^{2+} 를 제거한 관류액에 ryanodine($3 \times 10^{-6}M$)과 PMA($10^{-7}M$)을 혼합한 관류액을 사용하여 실험을 실시하였다.

심방의 용적변화 측정 : Organ chamber내 심낭강에 내경 1mm의 calibrated microcapillary tube를 연결하였다. 심

낭강내에는 관류하지 않고 관류액으로 채워져 있으며 오직 microcapillary tube를 통하여서만 열려있으므로 심방내 용적의 변동은 심낭강 용적을 변동시키고 변동정도는 calibrated microcapillary tube 상에서의 변화로 나타나도록 하였다. Hamilton syringe를 이용하여 일정량의 관류액을 심방내로 주입하거나 확장후 수축에 의하여 나오는 관류액의 무게를 측정하여 microcapillary tube상의 용적 변동량과 비교하여 측정의 정확도를 점검하였다.

심방 이노호르몬(ANP)의 방사면역 측정법 : AP III의 방사면역 측정은 0.2% neomycin, 10^{-3} M EDTA, 50BAEE/ml SBTI, 0.02% sodium azide 및 1% BSA를 포함한 0.1M tris-acetate buffer(pH 7.4)를 사용하였다¹³. 관류액내 ANP는 추출과정을 거치지 않고 직접 측정하였으며 시료의 양은 100 μ l이었으며 전체용적은 300 μ l로 하였다. 통상적인 ANP 측정방법은 equilibrium assay에 의하였으나 경우에 따라 disequilibrium assay도 사용였고 이때는 역가가 8,000인 항체 100 μ l과 시료 100 μ l을 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 [¹²⁵I]-APIII를 동량 첨가한 다음 24시간 후에 bound form과 free form을 분리하였다. Bound form과 free form의 분리는 1 l dH₂O에 12.1g trizma, 2.0g neomycin, 0.034g PMA를 첨가한 다음 pH 7.4로 보정시킨 후 0.625g dextran, 600mg charcoal을 넣어서 조제한 charcoal suspension을 1 ml 첨가하여 3,000rpm으로 원심분리시킨 다음 상층액을 gamma-counter(Packard, USA)로 측정하였다.

세포외액 이동량의 측정 : 적출 심방 관류모형의 심낭강에 표식자인 5,000 dalton인 [³H]-inulin을 방치하여 심방의 기계적인 자극에 의한 심방내 inulin의 이동을 측정하였다²⁰. Cocktail solution(Bray solution) 5ml에 관류액 100 μ l을 첨가하여 liquid scintillation counter(Tri-Carb 300C, Packard, USA)로 측정하였다. 이때 cocktail solution의 제조는 880ml dioxane, 100ml methanol, 20ml ethylene glycol, 60g naphthalene, 16g PPO, 200mg POPOP를 사용하였다. 심방의 심낭강으로부터 심방내로 이동되는 세포외액량의 측정은 세포외액의 측정용 표식자인 [³H]-inulin을 사용하여 liquid scintillation counter로 측정하였다.

세포외액 이동량으로 보정한 ANP 농도는 아래와 같이 산출하였다.

$$\text{ANP concentration (}\mu\text{M)} = \frac{\text{ANP pg/2 min/g}}{\text{ECF translocation in }\mu\text{l/2 min/g}} / 3060$$

사용약물 및 통제처리 : PKC 활성화제인 phorbol 12-my-

ristate 13-acetate(PMA)와 근형질세망의 Ca²⁺ 유리 차단제인 ryanodine(이상 RBI, USA)을 사용하였다. 실험결과와 통제처리는 Duncan's multiple range test와 Student's t-test로 하였으며, p-value는 0.05를 유의한 차이의 한계로 하였다. 실험결과는 Mean \pm S.E.로 표시하였다.

결 과

심방근 세포외액에 Ca²⁺ 변동이 PMA 효과에 미치는 영향 : 대조군 즉, 2.5mmM의 Ca²⁺이 함유된 Krebs-Henseleit buffer에서 ANP 분비는 심방내압을 1, 2, 4 그리고 6cmH₂O로 증가시킴에 따라 각각 21.5 \pm 5.4, 29.7 \pm 7.24, 42.9 \pm 8.2 및 45.6 \pm 21.6ng/2min/g로 증가되었다. Ca²⁺을 제거한 처리군에서 ANP 분비는 심방내압을 1, 2, 4 및 6cmH₂O 증가시킴에 따라 28.1 \pm 6.8, 50.3 \pm 9.04, 116.2 \pm 9.7 및 135.8 \pm 19.6ng/2min/g으로 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다(p < 0.05)(Fig 1A). ECF 이동량은 대조군에 비하여 증가하였지만 유의한 증가는 관찰되지 않았다(Fig 1B). ANP 농도는 대조군에 비하여 Ca²⁺을 제거한 처리군의 basal ANP 농도는 유의성 있게 증가하였고(p < 0.05) 이때 basal ANP 농도는 0.51 \pm 0.051 μ M이었다(Fig 1C).

Ca²⁺을 제거한 관류액에 PMA(10^{-7} M) 처리군에서도 역시 ANP 분비, ECF 이동량과 ANP 농도는 1, 2, 4 및 6cmH₂O의 심방내 압력변동에 따라 압력 의존적인 증가를 관찰할 수 있었다. 이때 Ca²⁺을 제거한 관류액에 PMA 처리군의 ANP 분비는 63.6 \pm 6.7, 96.3 \pm 17.7, 173.6 \pm 20.0 및 243.7 \pm 50.5ng/2min/g으로써 대조군과 Ca²⁺을 제거한 처리군에 비하여 현저한 증가(p < 0.05)를 관찰할 수 있었다(Fig 1A). 각각의 심방내압의 압력의 변화에 의한 ECF 이동량은 Ca²⁺을 제거한 관류액에 PMA 처리군에서도 역시 증가는 하였으나 유의한 증가는 관찰되지 않았다(Fig 1B). ANP 농도에서는 대조군과 Ca²⁺을 제거한 처리군보다도 Ca²⁺을 제거한 관류액에 PMA 처리군이 유의성 있는 증가(p < 0.05)를 관찰할 수 있었다. 이때 PMA 처리군의 basal ANP 농도는 0.76 \pm 0.06 μ M이었다(Fig 1C).

Ryanodine이 PMA에 의한 ANP 분비, ECF 이동량 및 ANP 농도변동에 미치는 영향 : 심방근 세포내 Ca²⁺변화를 일으키고자 근형질 세망으로부터 Ca²⁺ 유리를 차단하는 ryanodine(3×10^{-6} M)을 처리하였다. Ryanodine 처리군에서 기계적으로 심방내압을 1, 2, 4 및 6cmH₂O로

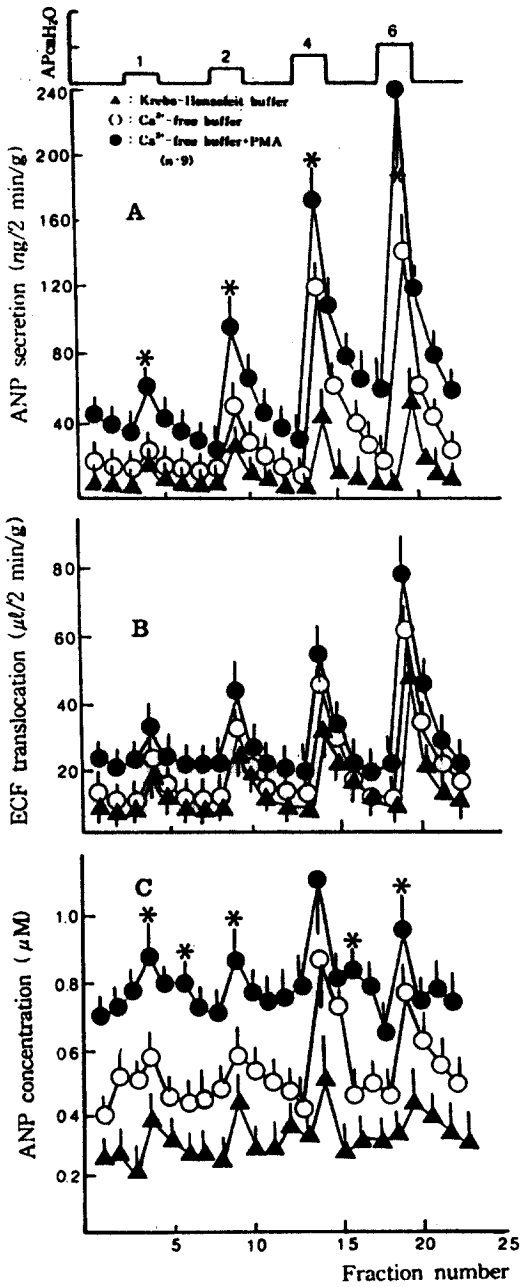


Fig 1. Effects of PMA(10^{-7} M) on ANP secretion(A), ECF translocation (B) and ANP concentration (C) in the Ca^{2+} -free buffer. ANP was induced by changing the elevation of the out-flow catheter tip by 1, 2, 4 and $6\text{cmH}_2\text{O}$ above the atria. ANP, natriuretic peptide; ECF, extracellular fluid; AP, atrial pressure. * $p < 0.05$.

ANP 분비는 압력 의존적으로 40.2 ± 10.4 , 56.8 ± 14.2 , 81.1

± 18.0 및 $96.5 \pm 27.5\text{ng}/2\text{min}/\text{g}$ 증가되었다(Fig 2A). Ryanodine에 PMA 처리군에서 심방내압의 증가로 역시 압력의존적으로 ANP 분비가 57.8 ± 10.4 , 84.5 ± 14.0 , 132.2 ± 17.3 및 $174.6 \pm 25.4\text{ng}/2\text{min}/\text{g}$ 로 증가되었다($p < 0.05$). Ryanodine

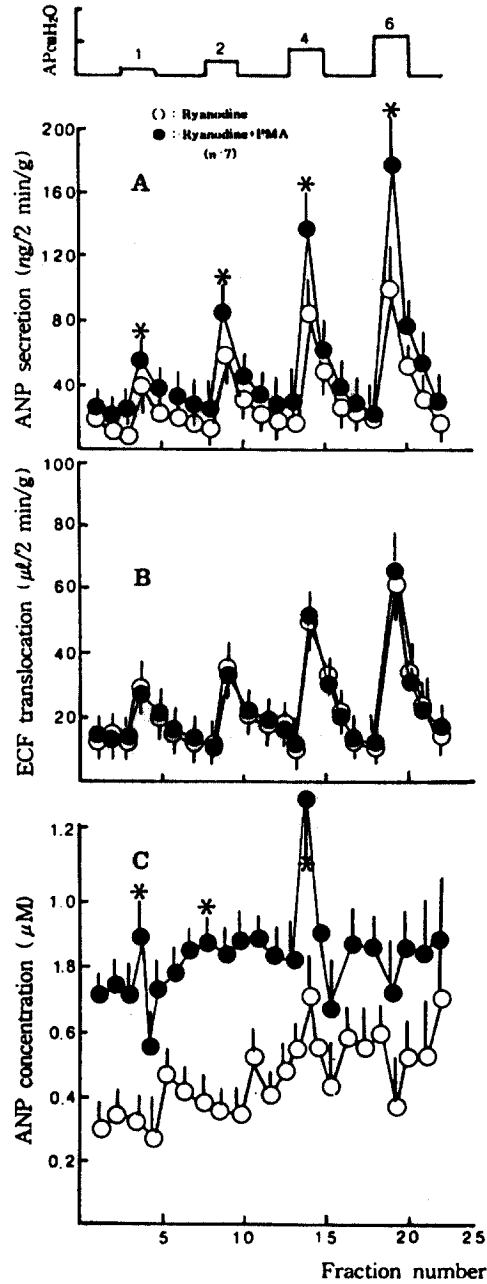


Fig 2. Effects of PMA(10^{-7} M) in the presence of ryanodine(3×10^{-6} M) on ANP secretion (A), ECF translocation (B) and ANP concentration. * $p < 0.05$.

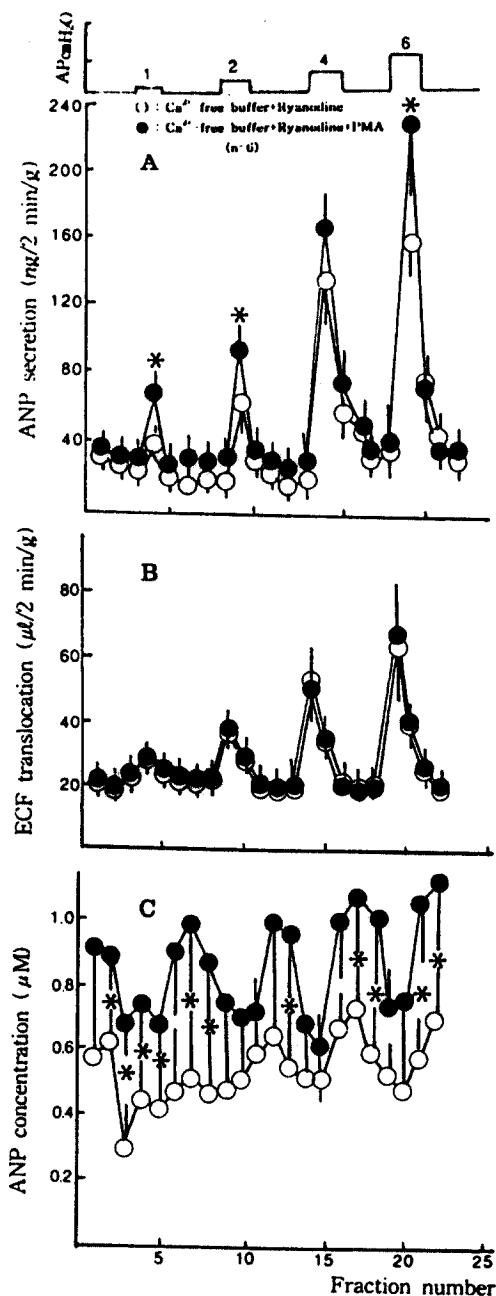


Fig 3. Effects of PMA($10^{-7}M$) in the presence of ryanodine($3 \times 10^{-6}M$) on ANP secretion (A), ECF translocation (B) and ANP concentration in the Ca^{2+} -free buffer. * $p < 0.05$.

dine에 PMA 처리군과 ryanodine 처리군간에 심방내압의 증가에 따른 ECF 이동량의 증가를 관찰할 수 없었으나 ANP 농도는 PMA 처리군에 의하여 현저한 증가($p < 0.$

05)를 관찰하였다(Fig 2B,C).

심방근 세포내·외 Ca^{2+} 변동에 의한 PMA 효과 : 심방근 세포내·외 Ca^{2+} 변동에 의한 PMA 효과를 관찰하기 위하여 대조군으로 Ca^{2+} 을 제거한 관류액에 ryanodine($3 \times 10^{-6}M$) 처리하였고 처리군으로 Ca^{2+} 을 제거한 관류액에 ryanodine과 PMA($10^{-6}M$)를 첨가하였다. 처리군에서 ANP 분비는 1, 2, 4 및 $6cmH_2O$ 의 심방내 압력증가에 따라 압력 의존적으로 $65.2 \pm 5.1, 93.9 \pm 13.9, 168.3 \pm 21.6$ 및 $230.3 \pm 48.1ng/2min/g$ 으로써 대조군에 비하여 현저히 증가($p < 0.05$)하였다(Fig 3A). 심방 압력변동에 의한 ECF 이동량은 대조군과 처리군과의 유의한 차이가 없었으나 (Fig 3B) ANP 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig 3C). 따라서 심방근 세포내·외의 ANP의 분비는 Ca^{2+} 의 변동과 관계없이 PMA에 의해 증가되었다.

고 찰

자율신경계 및 자율신경계 약물에 의한 ANP 분비조절이 보고된 바 있으나⁵⁻⁹ 그 견해에서는 많은 이견이 있으며 많은 종류의 호르몬 분비자극제에 의한 ANP 분비 촉진에 대한 실험은 박동심장과 정지심장에서 결과를 보았을 때 서로 다른 기전에 의하여 조절될 것으로 생각된다.

Cho *et al*¹⁷의 ANP 분비기전에 관한 연구결과에 의하면 ANP 분비는 심방의 확장과 이완에 의하여 증가하며, ANP의 분비는 심방의 확장후 이완 때 즉, 심방의 확장후 수축때 나타나고 ANP 분비의 증가는 심방의 확장후 수축시 용적변동¹⁷와 용적변동의 빈도 즉, 전기자극 빈도에 의존적임¹⁸이 이미 밝혀져 있다. 즉, 심방의 ANP 분비에는 심방의 기계적 수축과정이 필수적임이 주장되었다^{18,19}. 더욱이 심방의 체계적인 일의 동반(1, 2, 4 및 $6cmH_2O$) 효과에 대한 많은 종류의 호르몬 분비조절에 있어서 이온의 역할이 아직 명확하지 않은 상태이다.

ANP 분비 역시 Ca^{2+} 에 의하여 조절될 수 있는데 이는 PKC 활성화가 관여하고 있다고 보고한 바 있다^{12-14,20}. 그러나 이는 심방근 세포내의 Ca^{2+} 의 존재하에서의 영향이며 심방 beating 모델과 심방근의 수축력의 효과에서의 Ca^{2+} 존재하에서의 PKC 활성화는 이미 많은 연구자들에 의하여 보고되었다. 즉, PKC 활성화는 Ca^{2+} 의 의존적이었으며 PKC activator인 phorbol ester는 Ca^{2+} 의 존재하에서 생리적 기능이 가능하다¹¹. Karmazyn *et al*²¹은 세포

의액의 Ca^{2+} 농도에 따라 PMA 효과가 저농도 Ca^{2+} 에서는 수축력 증가효과와 고농도 Ca^{2+} 에서는 수축력 감소효과를 보고하였고 PMA가 ANP 분비기전에 관련된다는 보고²²를 종합하면 ANP 분비조절에 PKC가 관련되어 있고 이 PKC 활성화는 Ca^{2+} 에 의존적일 수 있다. 그러나 이 연구결과에는 심방근 세포의 저 Ca^{2+} 환경에서도 PKC의 활성화에 의하여 ANP 분비가 일어날 수 있음을 알 수 있었다. 이는 심방근 세포내의 ANP 분비가 저 Ca^{2+} 과는 관계없이 PKC의 활성화에 의존되어 있음을 암시하고 있었다. 또 다른 차이점으로 많은 연구자들의 연구 모델은 심방근 수축력과 심방 beating에서의 연구이기 때문에 저 Ca^{2+} 존재하에서의 실험을 수행할 수 없는 관계로 Ca^{2+} 의 존재없이 PKC의 역할을 연구하기란 어려울 것으로 사료되나 본 연구에서의 실험은 non-beating 모델에서 실시하였으므로 수동적으로 심방에 1, 2, 4 그리고 6cmH₂O의 압력을 일정하게 증으로써 심방근 세포의 저 Ca^{2+} 상태에서 PKC의 활성화에 의한 ANP 분비를 관찰할 수 있었다.

이를 근거로 심방근 세포내 저 Ca^{2+} 상태에서 PKC의 활성화를 관찰하기 위하여 ryanodine을 처치하여 실험을 실시하였다. 이 약물의 효과^{23,24}는 골격근의 근형질세망에서 ryanodine은 Ca^{2+} 유리를 차단한다. 이 연구에서는 심방근 세포의액의 Ca^{2+} 이 존재하는 상태에서 ryanodine을 사용하여 심방근 세포내의 Ca^{2+} 이 가장 많이 저장되어 있는 근형질 세망의 Ca^{2+} 유리를 차단하여 PMA 효과에 미치는 영향을 관찰한 바 대조군에 비하여 처리군에서 ANP 분비 및 ANP 농도증가를 관찰할 수 있었다. 따라서 ANP 분비는 근형질 세망의 Ca^{2+} 유리를 차단하여도 PMA에 의한 효과는 PKC의 활성화로 일어날 수 있음을 시사하였다.

그러나 Castagna *et al*²⁵은 PKC가 Ca^{2+} 의존적인 효소이기 때문에 세포내에 Ca^{2+} 이 없이는 PKC의 효과를 볼 수 없다고 보고하였고 최근 Hayet *et al*²⁶은 백서의 심방 조직에서 angiotensin-II를 투여하여 ANP 분비를 증가시킨 상태에서의 세포내 Ca^{2+} 과 PKC가 서로 중요한 역할을 하고 있다고 보고하였다. 또한 Bogoyevitch *et al*²⁷에 의하면 PKC는 α , β , γ , ϵ , ζ 및 η 의 isotype 중 Ca^{2+} 의존적인 α , β , γ 와 Ca^{2+} 비의존적인 ϵ , ζ 및 η 등이 있다고 주장하였고, 이중에 PKC- ϵ 이 PMA에 특히 선택적인 친화성이 있다고 하였으며, PKC- ϵ 의 존재는 심방 세포막에 현저하게 많이 존재하고 있음을 보고하였다. 본 연구결과

에 의하면 심장에 존재하는 PKC의 isotype 중 어떠한 종류의 isotype이 작용하는지는 알 수 없으나 Ca^{2+} 비의존적인 PKC isotype이 심근세포내에 존재함을 암시하고 있다.

따라서 본 연구를 통하여 심방내 기계적인 자극이 동반된 상태에서의 PKC 활성화에 의한 ANP 분비의 증가는 세포내·외의 Ca^{2+} 이 제거된 환경에서도 작동함을 암시하고 있다.

결 론

심방근세포는 ANP의 합성과 분비에 가장 중요한 장소이다. ANP 분비는 여러 요인에 의하여 조절되고 있으나 잘 알려져 있지 않으며 ANP에 관련된 신호전달 체계에 대해서도 아직 확립되어 있지 않다. 더욱이 심방의 기계적인 자극에 의한 ANP 분비기전에서 PKC 활성화에 대한 심방근 세포내·외의 Ca^{2+} 의 역할은 아직 구명되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 백서의 적출 심방 관류모형을 이용하여 심방근 세포내·외의 Ca^{2+} 환경변동에 의한 PKC의 효과를 관찰한 결과 다음과 같다.

1. Ca^{2+} 을 제거한 처리군이 Krebs-Henseleit buffer인 대조군에 비하여 심방의 기계적인 자극에 의한 ANP 분비 그리고 ANP 농도를 증가($p < 0.05$)시켰다. 그러나 ECF 이동량에서는 유의성 있는 증가를 관찰할 수 없었다.

2. Ca^{2+} 을 제거한 관류액에 PMA($10^{-7}M$)를 첨가한 처리군이 Ca^{2+} 을 제거한 대조군에 비하여 역시 심방의 기계적인 자극에 의한 ANP 분비 그리고 ANP 농도를 증가($p < 0.05$)시켰다. 그러나 ECF 이동량에서는 유의성 있는 증가를 관찰할 수 없었다.

3. Krebs-Henseleit buffer에 ryanodine($3 \times 10^{-6}M$)과 PMA($10^{-7}M$)를 첨가한 처리군이 Krebs-Henseleit buffer에 ryanodine을 첨가한 대조군에 비하여 심방의 기계적인 자극에 의한 ANP 분비 그리고 ANP 농도를 증가($p < 0.05$)시켰다. 그러나 ECF 이동량은 유의성 있는 증가를 관찰할 수 없었다.

4. Ca^{2+} 을 제거한 관류액내 ryanodine($3 \times 10^{-6}M$)과 PMA($10^{-7}M$)를 첨가한 처리군은 Ca^{2+} 을 제거한 관류액내 ryanodine($3 \times 10^{-6}M$)를 처리한 대조군에 비하여 ANP의 분비와 ANP의 농도의 증가($p < 0.05$)를 관찰하였으며 ECF 이동량은 증가하지 않았다.

따라서 심방내 기계적인 자극이 동반된 PKC 활성화에 의한 ANP 분비는 심방근 세포내·외의 Ca^{2+} 변동과

관계없이 작동하고 있음을 추측케 하였다.

참 고 문 헌

1. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res*, 4:85-90, 1956.
2. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg*, 14:99-112, 1956.
3. De Bold AJ, Borenstein HB, Sonnenberg H, *et al.* Rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rat. *Life Sci*, 28: 89-94, 1981.
4. Gutkowska J, Neumer M. Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extracardiac tissues. *Endocrine Rev*, 10:519-536, 1989.
5. Ruskoaho H, Thoenken H, Lang RE. Increase in atrial pressure releases atrial natriuretic peptide from isolated perfused rat hearts. *Pfluegers Arch*, 407:170-174, 1986.
6. Katsube N, Schwartz D, Needleman P. Release of atriopeptin in the rat by vasoconstrictors or water immersion correlates with changes in right atrial pressure. *Biochem Biophys Res Commun*, 133:937-944, 1985.
7. Bilder GE, Schofield TL, Blaine EH. Release of atrial natriuretic factor: effect of repetitive stretch and temperature. *Am J Physiol*, 251:F817-F821, 1986.
8. Forsmann WG. Cardiac hormones. I. Reviews on the morphology, biochemistry, and molecular biology of the endocrine heart. *Eur J Clin Invest*, 16:439-451, 1986.
9. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, *et al.* Atrial stretch, not pressure, is the principal determinate controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res*, 62:191-195, 1988.
10. Farago A, Nishizuka Y. Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS Lett*, 268:350-354, 1990.
11. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308:693-698, 1984.
12. Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messenger. *Ann Rev Biochem*, 56:159-195, 1987.
13. 강창원, 강형섭, 이호일. 백서의 심방관류모델에서 PKC의 활성화가 ANP 조절에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 37:735-744, 1997.
14. Matsubara H, Hirata Y, Yoshimi H, *et al.* Role of calcium and PKC in ANP secretion by cultured rat cardiocyte. *Am J Physiol*, 263:H405-H409, 1988.
15. Lacerda AE, David R, Brown AM. Effects of protein kinase C activator on cardiac Ca^{2+} channels. *Nature*, 335:249-251, 1988.
16. Cho KW, Seul KH, Kim SH, *et al.* Redution volume dependence of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria. *J Hypertension*, 7:371-375, 1989.
17. Cho KW, Seul KH, Ryn H, *et al.* Epicardial release of immunoreactive atrial natriuretic peptides inside-out perfused atria. *Biochem Biophys Res Commun*, 153: 811-817, 1988.
18. Cho KW, Seul KH, Ryu H, *et al.* Charateristics of distension-induced release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria. *Regul Peptides*, 22:333-345, 1988.
19. Cho KW, Seul KH, Kim SH, *et al.* Sequential mechanism of atrial natriuretic peptide secretion in isolated perfused rabbit atria. *Biochem Biophys Res Commun*, 172:423-431, 1990.
20. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334:661-665, 1988.
21. Karmazyn M, Haist JV. Calcium dependent positive inotropic effects of low phorbol ester concentrations in isolated rat hearts. *Cardiovascular Res*, 27:390-395, 1993.
22. Doubell AF. The second messenger system mediating the secretion of atrial natriuretic peptide from the isolated rat heart during rapid cardiac pacing. *Life Sci*, 45: 2193-2200, 1989.
23. Gerhard M. Ryanodine activative and inhibition of the Ca^{2+} Release Channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 261:6300-6306, 1986.

24. Sutko JL, Willerson JT. Ryanodine alteration of contractile State of rat ventricular myocardium. *Circ Res* , 46:333-343, 1980.
 25. Castagna M, Taai Y, Kaibuchi K, *et al.* Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* , 257:7847-7851, 1982.
 26. Hayet S, Francoise M, Christiane B, *et al.* Cellular mechanism of angiotensin II-induced atrial natriuretic peptide release in rat right atrial tissue. *Life Sci* , 58: 1621-1629, 1996.
 27. Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH. Characterization of PKC isotype expression in adult rat heart. *Circ Res* , 74:757-767, 1993.
-