백서의 적출된 흉부대동맥에서 Protamine의 이완작용과 Heparin이 미치는 영향

충남대학교 의과대학 마취과학고실

윤 석 화 · 김 윤 희 · 권 성 범
이 정 은 · 김 해 자 · 최 세 진

- Abstract -

The Vasodilation of Protamine and the Influence of Heparin on its Actions in the Isolated Aortic Arteries of Rats

Seok Hwa Yoon, M.D., Yoon Hee Kim, M.D., Sung Bum Kwon, M.D.
Jung Eun Lee, M.D., Hae Ja Kim, M.D. and Sae Jin Choi, M.D.

Department of Anesthesiology, College of Medicine, Chung Nam University, Daejeon, Korea

Background: When used to reverse the anticoagulant effect of heparin, protamine administration after cardiovascular bypass often can lead to systemic hypotension. During the reversal of heparin-induced anticoagulation, the effects of protamine on both a heparin-protamine complex and free protamine on the cardiovascular system should be considered.

Method: To determine whether the hypotensive effect of heparin-protamine and/or protamine could be caused by endothelium-dependent and-independent component, we studied rings of the aortic arteries in rats suspended in organ chambers containing Tris Tyrode solution at 37°C and 100% O₂. Arterial rings with or without endothelium were contracted with 40 mM KCl or 3×10^{-6} M phenylephrine and then exposed to increasing concentrations of protamine(final organ bath concentration, 40~400 µg/ml) both in the absence and presence of heparin(200 U/ml).

Results: Protamine induced concentration-dependent relaxation in arterial rings with endothelium, which were significantly greater than in rings without endothelium. The endothelium-dependent relaxation induced by protamine was inhibited by N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (10^{-3} M) pretreatment, but was not inhibited by indomethacin(3×10^{-6} M) pretreatment on rings with endothelium. Furthermore, the contractile inhibition was enhanced by superoxide dismutase (100 U/ml). Also, such vasodilating actions were not influenced in the presence of heparin(200 U/ml). In endothelium-denuded strips, protamine(400 µg/ml) inhibited Ca⁺⁺ induced contraction, which was evoked in Ca⁺⁺-free solution containing 40 mM K⁺, and also inhibited the norepinephrine(NE)-induced contraction. Protamine inhibited on the NE-induced contraction, but not the caffeine-induced contraction in Ca⁺⁺ free, 2 mM EGTA solution. Also, such inhibition of contractions were not influenced in the presence of heparin(40 U/ml).

Conclusion: This study demonstrates that protamine (in the presence or absence of heparin) acts on endothelial cell receptors to stimulate the production of nitric oxide and inhibits both Ca⁺⁺-influx and the NE-induced Ca⁺⁺ release from intracellular stores. (Korean J Anesthesiol 1997; 33: 591~603)

Key Words: Animals: rats. Arteries: aorta. Blood: anticoagulants; heparin; protamine. Blood vessels: vasodilation.

서 론

Protamine sulfate는 심혈관 수술환자에서 혈전생성을 예방하기 위하여 투여되는 heparin의 항응고 효과를 환원시키기 위하여 사용되고 있다¹⁾. 이러한 protamine 투여시 혈압하강, 폐고혈압, 서맥, 기관지수축 등과 같은 여러 임상적 부작용이 보고되고 있다²⁻⁵⁾. 혈압하강은 protamine을 빠른속도로 정맥투여시 빈번하게 나타날 수 있으며, 심한 경우 생명을 위협하는 심혈관 허혈상태까지도 초래할 수 있다⁶⁻⁷⁾. 더욱이 심기능이 완전히 회복되지 않은 체외순환 직후에 발생하는 혈압하강은 매우 위험한 상태로, protamine 투여시 혈압하강의 예방은 심혈관 수술의 마취관리 시 중요한 사안 중의 하나이다.

Protamine에 의한 혈압하강이 유발되는 기전은 동물실험과 연구를 통하여 직접 심근의 억제에 의한 것⁸⁻¹⁰⁾과 말초혈관저항의 감소에 의한 것³⁾으로 설명하고있다. Ignarro등¹¹⁾에 의하여 L-arginine이 포함된 polypeptide는 내피세포인자(endothelium derived relaxing factor, EDRF)와 3',5'-cyclic guanosine monophosphate(cGMP)의 분비를 촉진시켜 혈관이완을 초래한다고 보고된 이래, L-arginine을 다수 함유하고 있는 protamine은 nitric oxide(NO)의 전구물질을 공급함으로써 nitric oxide synthase(NOS)의 활성화시켜 혈관을 이완시킨다고 설명하였고¹²⁾, 또한 Pearson등¹³⁾은 protamine이 혈관내피세포에 존재하는 수용체를 자극하여 EDRF인 NO의 분비를 촉진시킨다고 주장하였다. 한편 Akata등¹⁴⁾은 내피세포 의존성 혈관이완과 더불어 Ca^{++} 이동의 억제와 같은 내피세포 비의존성 혈관이완에 의해서도 protamine이 혈압을 하강시킨다고 보고하였다.

Protamine은 67%가 L-arginine으로 구성된 sulfated polycationic peptide인 반면 heparin은 sulfated polyanionic mucopolysaccharide로 구성되어있어^{15,16)}, protamine을 투여하면 혈중에서 강력한 이온결합으로 heparin-protamine 혼합물이 생성되며 동시에 free protamine으로도 존재한다고 한다^{17,18)}. 따라서 혈압하강의 원인이 protamine 자체 또는 heparin-protamine 혼합물에 의할 수도 있다고한다. 일부 임상연구에서 heparin없이 protamine만 체내 투여시 혈액학적 변화를 초래하지 않아 protamine 자체만으로는 혈관이완 작

용이 나타나지 않고, 다만 heparin-protamine 혼합물에 의해 혈압하강이 나타난다는 주장¹⁹⁾도 있었지만, Akata등²⁰⁾은 heparin은 음이온 물질이기 때문에 protamine의 양전위(positive charge)에 의한 혈관이완기전을 오히려 억제시키며 따라서 heparin-protamine 혼합물은 혈관이완작용이 없다고 주장하고 있으며, Evora등¹²⁾도 heparin이 protamine의 NO 생성을 감소시킨다고 주장하면서 heparin-protamine의 혼합물의 혈관이완효과를 부정하였다. 그렇지만 Pearson등¹³⁾은 protamine 자체뿐만 아니라 heparin-protamine 혼합물 모두에서 NO의 생성을 촉진시킨다고 보고하였으며, Hajarizadeh등²¹⁾은 heparin과 protamine, 또 heparin-protamine 혼합물 모두에 의하여 NO의 생성을 촉진시킨다고 보고하였다. Protamine의 혈관이완작용과 이에 heparin이 미치는 영향에 대한 상반된 연구결과에 때문에 heparin-protamine 혼합물의 혈관이완작용에 대하여서는 아직까지 논란이 되고있다.

따라서 백서의 흉부대동맥을 이용한 체외실험을 통하여 protamine의 혈관이완기전을 규명하고, 이러한 이완작용에 대한 heparin의 영향을 밝히고자 본 연구를 시도하였다.

대상 및 방법

1) 실험동물과 표본제작

한국화학연구소에서 4주령되는 웅성백서(Sprague-Dawley)를 분양받아, 본 실험실의 동물사육실에서 4~5주간 사육하여 체중이 200~250 gm된 백서를 실험대상으로 하였다. 두부타격법으로 일시 실신시킨 뒤, 즉시 흉곽을 절개하고 심폐부분을 적출하여 100% 산소가 통기되고 있는 상온의 Tris 완충 Tyrode 용액에 20분정도를 넣어두었다. 이후 흉부대동맥을 조심스럽게 박리하였으며 이때 동맥평활근의 장력에 영향을 주지 않도록 현미경하에서 혈관 주위의 지방 및 결체조직을 제거한 후 두께가 1.5~2 mm 정도 되게 환형절편 고리를 만들었다. 이때 대동맥 내피세포를 제거하기 위하여 가는 편모양의 stainless wire를 사용하여 혈관내경을 5~6회 정도 부드럽게 문질러 내피세포의 손상을 주었다. 이 환형절편 고리를 20 ml들이 Tris 완충 Tyrode용액 수조에 넣고 표본의 한쪽은 L-자형 stainless 철사에 고정하고 다른 쪽은 장력측정기(force displacement transducer, Hugo Sachs

Co., 독일)에 연결된 L-자형 철사에 연결하여, 수축시 발생하는 평활근의 장력을 장력변환기 및 다중기록기(Linear Co., 미국)를 이용하여 기록하였다. 조직 수조의 용액은 100% 산소를 계속 통기 시키면서, 온도 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH 7.35 ± 0.05 로 유지되도록 하였다. 환형 절편 고리를 초기에 60분간 안정화 시킨 후 점진적으로 장력을 증가시켜 기초장력이 2 g을 유지하도록 하였다.

2) 실험 방법

(1) Heparin에 의한 혈관이완반응: 40 mM KCl 또는 $3 \times 10^{-6}\text{M}$ phenylephrine(PE) 용액으로 대동맥 혈관 절편을 최대 수축시킨 후 이 절편을 heparin 농도가 8, 40, 80, 200, 500, 1,000 Unit/ml 되도록 점차적으로 증가시킨 수조에서 혈관이완 반응정도를 평가하였다. 또한 혈관내피인자와의 관련성을 증명하고자 혈관내피가 정상인 혈관과 혈관내피가 제거된 혈관을 구분하여 위와 동일한 실험방법을 시행하였다. 이때 절편의 혈관내피 유무를 확인하기 위하여 수축제로 최대 수축시킨 후에 혈관 절편에 acetylcholine(Ach) 10^{-6}M 을 투여하여, 최대 수축력의 80% 이상 유지되는 것을 내피가 제거된 절편으로 간주하였다. 그리고 L-arginine으로부터 NO생성의 억제제인 L-NMMA(N^G -monomethyl-L-arginine) 10^{-5}M 을 전처리하고, PE으로 수축시킨 후 heparin 농도를 점차적으로 높여가며 혈관이완 반응을 비교 관찰하였다.

(2) Protamine의 혈관내피인자와의 연관성과 heparin과 결합에 따른 영향: 40 mM KCl 또는 10^{-7}M NE 용액으로 혈관 절편을 최대 수축시킨 후 이 절편을 protamine의 수조내의 최종농도가 15, 40, 120, 200, 280, 400 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 점차적으로 증가시켜 혈관이완 반응정도를 평가하였다. 다음에는 PE $3 \times 10^{-6}\text{M}$ 용액으로 혈관 절편을 최대 수축시킨 후 이 절편을 protamine의 수조내의 최종농도가 15, 40, 120, 200, 280, 400 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 점차적으로 증가시켜 혈관이완 반응정도를 평가하였으며, 혈관내피인자와의 연관성을 증명하고자 혈관내피가 정상인 혈관과 혈관내피가 제거된 혈관을 구분하여 위와 동일한 실험방법을 적용하였다. 그 다음 혈관내피가 정상 절편을 사용하여 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin $3 \times 10^{-6}\text{M}$ 과 L-NMMA 10^{-5}M , 그리고 NO의 작용을 연장시키는 superoxide dismutase 100 U/ml

을 각각 20분전에 전처리하고, PE으로 수축시킨 혈관절편의 protamine의 농도변화에 따른 이완반응정도를 비교하였다. 위의 모든 실험은 heparin이 존재하는 군과 heparin이 존재하지 않은 군으로 구분하여 실험하였으며, heparin은 200 U/ml를 수축제에 의하여 혈관이 최대 수축직후 처리하고, protamine을 투여하면서 수조내의 생리수가 탁해지는 것으로 heparin-protamine 혼합물 생성을 확인하면서 혈관이완 반응정도를 평가하였다.

(3) Protamine의 Ca^{++} 의 이동과의 연관성과 heparin과 결합에 의한 영향: 혈관내피인자의 영향을 배제하고자 내피를 제거한 혈관 절편만을 실험재료로 하였다. 첫째 protamine의 voltage-dependent Ca^{++} channel을 통한 세포외액의 Ca^{++} 의 유입에 미치는 영향을 관찰하고자, 먼저 정상 Tyrode용액에서 KCl 40 mM로 최대 수축을 관찰하였으며, 그 뒤 절편을 세척한 후 Ca^{++} 제거 Tyrode용액에서 heparin이 존재하지 않은 군은 protamine 400 $\mu\text{g/ml}$, heparin이 존재하는 군은 heparin 40 U/ml과 protamine 400 $\mu\text{g/ml}$ 을 넣어 20분간 처리하였다. 이때 Ca^{++} 제거 Tyrode용액에서 KCl 40 mM를 첨가하여 탈분극을 시킨 10분 후 CaCl_2 을 0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 mM을 누적시키며 수축반응을 비교하였다. 둘째 norepinephrine(NE)에 의한 세포내 저장된 Ca^{++} 의 분비와 receptor-dependent Ca^{++} channel을 통한 세포외액의 Ca^{++} 의 유입에 미치는 영향을 관찰하고자 정상 Tyrode용액에서 KCl 40 mM로 최대 수축을 관찰 하고, 절편을 세척한 후 Ca^{++} 제거 Tyrode용액에서 heparin이 존재하지 않은 군은 protamine 400 $\mu\text{g/ml}$, heparin이 존재하는 군은 heparin 40 U/ml과 protamine 400 $\mu\text{g/ml}$ 을 넣어 20분간 처리하고, 이어서 voltage-dependent Ca^{++} channel을 통한 Ca^{++} 의 이동을 차단하고자 nifedipine 10^{-6}M 을 20분간 전처리하고 Ca^{++} 제거 Tyrode용액에서 NE 10^{-7}M 10분간 수축자극 한 후 CaCl_2 을 0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 mM을 누적적으로 투여하여 수축반응을 비교하였다. Ca^{++} 투여에 따른 수축반응의 결과는 정상 Tyrode용액에서 수축제에 의한 최대수축을 100%로 하여 각 Ca^{++} 농도에 의한 수축크기를 백분율로 나타냈다. 세째 세포내의 Ca^{++} 방출과 관련된 효과를 실험하기 위하여 NE 10^{-7}M 또는 caffeine 20 mM으로 수축시킨 후 정상 Tyrode용액을 Ca^{++} 제거용액으로 교체하고 이때 잔존하는 Ca^{++} 을 제거하기 위하여

ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA) 2 mM을 처리하였다. 다시 NE 또는 caffeine을 투여하여 수축크기를 측정하였다. 이때 NE 또는 caffeine으로 수축전 15분간 heparin이 존재하지 않은 군은 protamine 400 μ g/ml, heparin이 존재하는 군은 heparin 40 U/ml과 protamine 400 μ g/ml을 Ca^{++} 제거 용액에 전처리하여 수축제로 수축시켜 수축크기를 대조치와 비교하였다.

3) 용액 조성 및 실험약물

실험용액은 Tris 완충 Tyrode용액을 이용하였으며 그의 조성은 NaCl: 158 mM, KCl: 4 mM, $CaCl_2$: 2 mM, $MgCl_2$: 1 mM, Tris: 6 mM, Glucose: 6 mM이다. 고농도 KCl 용액은 등장성을 유지하기 위하여 정상 Tyrode용액의 NaCl을 감소한 KCl 40 mM Tyrode용액을 사용하였다. 이러한 용액은 100% 산소로 통기시키고 pH가 7.3~7.4을 유지하도록 하였다. Ca^{++} 제거 용액은 정상 Tyrode용액에서 $CaCl_2$ 을 제거하고 $MgCl_2$ 로 대체하였으며 2mM EGTA를 첨가하였다..

Protamine, heparin, NE, Ach, indomethacine, L-NMMA, superoxide dismutase(bovine liver), caffeine, EGTA, nifedipine등의 약제들은 Sigma Co(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. protamine은 실험직전 생리 식염수에 용해시켜서, nifedipine은 alcohol로 용해시킨다음 증류수로 희석하여 사용하였으며, 그 밖의 약제들은 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

4) 통계처리

혈관이완정도의 결과는 처음 KCl과 PE에 의한 최대수축을 100%로 하여 수축정도를 백분율로 나타냈다. Ca^{++} 이동에 대한 실험에서는 처음 KCl과 NE에 대한 최대수축을 100%로 하여 각각의 농도로 투여된 $CaCl_2$ 에 의한 수축을 백분율로 나타내었다. 모든 값은 평균 $\pm$ 표준편차로서 나타내었으며, 각 군간의 비교는 반복이 있는 이원배치 분산분석(ANOVA)을 이용하여 통계처리하였으며, 또한 Ca^{++} 방출에 관련된 실험 결과는 Wilcoxon signed rank test을 이용하여 통계처리하였다. 이때 p값이 0.05 이하를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) Heparin에 의한 혈관이완

Heparin은 KCl에 의한 수축시 내피세포 존재유무에 관계없이 혈관이완반응이 낮은 농도에서는 나타나지 않고, 500 U/ml 농도에서부터 의미있는 혈관이완작용을 관찰하였다. PE에 의한 수축시 KCl에서의 수축보다 혈관이완 효과가 크게 나타났다. 내피세포가 제거된 절편에서의 이완정도는 내피세포가 존재하는 절편에서보다 이완정도가 감소되었으며, 내피세포가 존재하는 절편에서 L-NMMA를 전처리시 heparin에 의한 이완정도가 의미있게 감소되었다(Table 1).

Table 1. Inhibition Response(%) of Heparin to Contractions Induced by KCl 40 mM or Phenylephrine 3×10^{-6} M in the Endothelium Intact and-Denuded Strips of Rat Aortic Arteries.

	Concentration of heparin(Unit/ml)					
	8	40	80	200	500	1000
KCl						
ED intact(n=4)	99.0 $\pm$ 1.4	97.5 $\pm$ 1.1	94.5 $\pm$ 2.4	91.5 $\pm$ 3.5	86.7 $\pm$ 4.2	80.3 $\pm$ 4.5
ED denude(n=4)	98.7 $\pm$ 0.6	96.2 $\pm$ 1.8	93.0 $\pm$ 3.4	93.2 $\pm$ 2.8	90.0 $\pm$ 4.4	84.5 $\pm$ 5.1
Phenylephrin						
ED intact(n=4)	96.5 $\pm$ 2.5	90.6 $\pm$ 4.4	88.4 $\pm$ 5.4	86.6 $\pm$ 7.5	56.6 $\pm$ 4.2	38.8 $\pm$ 9.8
ED denude(n=4)	99.0 $\pm$ 0.5	96.3 $\pm$ 2.1*	96.6 $\pm$ 2.3*	93.5 $\pm$ 4.7*	84.9 $\pm$ 4.2*	69.6 $\pm$ 14.5*
ED intact						
L-NMMA(n=4)	100.0 $\pm$ 2.6	98.3 $\pm$ 8.4*	104.6 $\pm$ 8.3*	104.7 $\pm$ 4.8*	86.9 $\pm$ 6.2*	76.5 $\pm$ 8.5*

Values(%) are Mean $\pm$ SEM, n; Numbers of sample, ED: endothelium, L-NMMA: N^G-monomethyl-L-arginine(10^{-3} M) pretreatment, *: significantly different from the endothelium intact strip(p<0.05)

Fig. 1. Representative traces for the effects of protamine(in the absence or presence of heparin) on the contraction induced by pheylephrien(PE) 3×10^{-6} M in the rat aortic arteries(intact or denuded endothelium). ED(+); endothelium intact, ED (-); denuded endothelium.

Fig. 2. Inhibition response(%) of protamine on the tonic contraction induced by norepinephrine(NE) 10^{-7} M or KCl 40 mM in rat aortic arteries.

2) Protamine의 혈관내피인자와의 관련성과 Heparin의 영향

Protamine(40~400 µg/ml)에 의하여 혈관내피세포가 존재하는 절편에서 40 mM KCl과 NE 10^{-7} M의 농도로 수축을 유발한 후에 protamine을 누적적으로 투

여하였을 때 농도에 비례하여 혈관이 이완되었다. Protamine 80 µg/ml 농도에서 의미있게 이완되기 시작하였으며, 400 µg/ml 농도에서는 60% 정도 이완되었다(Fig 1). Protamine(40~400 µg/ml)에 의하여 혈관내피세포가 존재하는 절편에서 40 mM KCl과 NE 10^{-7} M의 농도로 수축을 유발한 후에 protamine을 누적적으로

Fig. 3. Inhibition response(%) to protamine on the tonic contraction induced by phenylephrine $3 \times 10^{-6}M$ in intact or denuded endothelium of rat aortic arteries.

Fig. 4. Inhibition response(%) to protamine with pretreatment of L-NMMA in rat aortic arteries. Segments were caused to contract with phenylephrine $3 \times 10^{-6}M$

Fig. 5. Inhibition response(%) of protamine with pretreatment of indomethacin($3 \times 10^{-6}M$) or superoxide dismutase(100 U/ml) in rat aortic arteries. Segments were caused to contract with phenylephrine $3 \times 10^{-6}M$.

Fig. 6. Representative traces for the effect of protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (in the absence or presence of heparin 40 U/ml) on the tonic contractile responses of rat aortic artery to CaCl_2 (0.25 ~ 2.5 mM) in Ca^{++} -free solution containing KCl 40 mM.

투여하였을 때 농도에 비례하여 혈관이 이완되었다. 수축제인 KCl과 NE에서 모두 protamine에 의하여 수축이 억제되었으며, KCl과 NE에 의한 이완양상의 변화는 없었다. 또한 이러한 protamine의 이완양상은 heparin이 존재시에도 변화가 없었다(Fig. 2). $\text{PE } 3 \times 10^{-6}\text{M}$ 로 수축시킨 후 protamine을 누적적으로 투여하였을 때 역시 농도에 비례하여 혈관이 이완되었다. 이러한 이완반응은 혈관내피가 제거된 절편에서 protamine에 의한 혈관이완반응이 억제되었으며, heparin이 존재시에도 이러한 반응은 변화가 없었다(Fig. 3). 또한 NOS의 억제제인 L-NMMA를 전처리 하였때에도 혈관내피세포를 제거한 절편에서의 반응과 유사하게 protamine의 혈관이완반응을 억제하였다(Fig. 4). 한편 indomethacin을 전처리한 절편에서는 protamine의 혈관이완반응의 변화를 초래하지 않았나, superoxide dismutase의 전처리시에 protamine의 혈관이완반응이 의미있게 증가하였다(Fig. 5). Heparin 200 U/ml가 든 수조에서 protamine을 투여하였을 때 생리수가 혼탁해 지는 것으로 heparin-protamine의 혼합물의 생성을 확인할 수 있었다. Heparin이 존재하는 상태에서 protamine의 혈관이완반응은

Fig. 7. Effect of protamine on tonic contractile responses (%) of rat aortic artery to CaCl_2 in Ca^{++} -free solution containing KCl 40 mM in endothelium-denuded strips. Protamine: 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, heparin + protamine: heparin 40 U/ml and protamine $\mu\text{g}/\text{ml}$, *: significantly different from control ($p < 0.05$).

heparin이 존재하지 않은 protamine의 반응과 유의적인 차이는 없었으며, 또한 내피를 제거한 절편의 반응에서도 protamine의 이완정도가 감소되었으며, L-

Fig. 8. Representative traced for the effects of protamine(in the absence or presence of heparin) on the tonic contractile responses of rat aortic arteries to CaCl_2 (0.25–2.5 mM) in Ca^{2+} -free solution containing norepinephrine(NE) 10^{-7}M .

NMMA의 전처리시에도 heparin이 존재하지 않은 protamine의 반응보다 감소정도는 적었으나, protamine과 heparin의 혼합물에 의한 이완반응이 감소되었다(Fig. 3~5). 즉 protamine에 의하여 heparin의 유무에 관계 없이 모두에서 혈관을 이완시켰으며, 혈관내피 제거와 L-NMMA에 의하여 이러한 혈관이완반응이 감소되었다.

3) Protamine의 Ca^{2+} 이동과 heparin의 영향

Ca^{2+} free Tyrode 용액에서 KCl로 탈분극화한 상태로 Ca^{2+} 를 누적적으로 투여하여 수축율을 측정하고 결과 Ca^{2+} 의 농도가 증가함에 따라 수축 크기가 증가되었고, protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에 의하여 이러한 수축율이 감소하였다. Ca^{2+} 의 농도가 0.5 mM에서 통계적으로 유의있게 수축율이 감소되었다. 이러한 수축의 감소는 heparin 40 U/ml 존재시에도 같은 양상을 보여 heparin의 존재유무에 관계없이 protamine에 의하여 Ca^{2+} 에 의한 수축율을 감소시켰다(Fig. 6, 7). NE에 의한 수축 유발 방법에서도 Ca^{2+} 의 농도가 증가함에 따라 수축 크기가 증가되었고, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protamine과 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protamine과 40 U/ml heparin에 의하여 이러한 수축율이 감소되었다. 또한 이러한

Fig. 9. Effect of protamine on tonic contractile responses (%) of rat aortic artery to CaCl_2 in Ca^{2+} -free solution containing norepinephrine 10^{-7}M in endothelium-denuded strips. Protamine; protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *: significantly different from control ($p < 0.05$).

protamine에 의한 수축억제는 heparin의 존재시 변화가 없었다(Fig. 8, 9). 세포내에서의 Ca^{2+} 의 방출에 대한 protamine의 영향을 알아보기 위하여 protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 Ca^{2+} -free 용액에서 NE에 의한 수

Fig. 10. Representative traces for the effects of protamine in the absence or presence of heparin(40 U/ml) on the norepinephrine(NE) 10^{-7} M or caffeine(20 mM) induced contractions evoked in the Ca^{++} -free solution containing 2 mM EGTA.

Fig. 11. Effect of protamine on contractile tension(g) evoked by norepinephrine 10^{-7} M or caffeine 20 mM in the Ca^{++} -free solution. Protamine; protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, heparin+protamine; heparin 40 U/ml and protamine 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *: significantly different from the control($p < 0.05$).

축의 크기를 관찰한 결과 대조치와 비교하여 의미 있게 감소되었으나, caffeine으로 수축시에는 이러한 수축 크기의 변화는 없었다. 한편 heparin이 존재시 NE과 caffeine에 의한 수축크기의 의미있는 변화는 없었다(Fig. 10, 11).

고 찰

본 실험에서 protamine의 혈판이완작용의 기전을 내피세포 의존성 이완작용과 내피세포 비의존성 이완작용을 통하여 관찰하고자 하였다. 혈판 평활근의 장력은 신경성 전달물질, 내피세포인자, 대사산물, 체액성 물질등 여러 인자에 의하여 조절되며, 이 중 내피세포와 교감신경계가 의하여 주로 조절된다. 즉 혈판에 작용하는 여러 물질이 내피세포에서 분비되거나, 또는 신경말단에서 분비되는 물질과 상호작용으로 평활근의 이완과 수축을 조절한다²²⁾. 내피세포에서 내인성 혈관확장제 즉 내피세포인자와 cyclooxygenase 대사산물을 합성한다. 내피세포인자는 NO로 간주되고 있고, NOS의 활성화에 의하여 L-arginine으로부터 합성되며, 평활근내 cGMP의 농도를 증가시켜 혈판의 장력을 조절한다^{23,24)}. 또한 평활근 수축과 이완의 조절기전은 궁극적으로 평활근 세포내의 Ca^{++} 의 농도에 따라 이루어지며, Ca^{++} 의 근원은 근세포막을 통한 세포 밖의 Ca^{++} 의 유입이나, 또는 세포내의 sarcoplasmic reticulum(SR)에서의 Ca^{++} 방출에 의한다. 이때 세포밖에서의 Ca^{++} 의 유입은 전위-작동통로(voltage-operated channel), 수용체-작동통로

(receptor-operated channel), nonselective cation channel (NSCC), 또는 reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange 등에 의한 다^{22,29}.

본 실험결과, 첫째 내피세포를 제거한 혈관절편에서 protamine의 이완반응이 감소되었으며, 둘째 NOS의 경쟁적인 억제제인 L-NMMA를 전처리시에 이완정도가 감소되었다. 셋째 내피세포에서 prostacyclin과 같은 다른 혈관이완제를 분비하므로 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 전처리시 이완반응이 변화되지 않았으며, 넷째 NO 생성을 증가시키는 superoxide dismutase를 전처리시에는 이완반응이 증가되었다. 위와 같은 결과는 protamine는 내피세포에 의존적으로 NO의 생성을 촉진하여 혈관이완이 이루어진다고 여겨진다. Protamine의 내피세포와의 관련성에 대하여는 여러연구를 통하여 증명되고 있다. Pearson 등¹³은 고양이의 관상동맥과 고동맥, 신동맥의 혈관을 적출하여 실험한 결과, 모든 혈관에서 protamine의 혈관이완은 EDRF와 밀접한 관계가 있다고 보고하였으며, Hajarizadeh 등²¹은 배양한 porcine의 관상동맥 내피세포에서 protamine는 NO의 분비를 촉진시킨다고 보고하였다. 이와같은 protamine의 내피세포에서의 NO 생성촉진에 대한 기전 역시 다양하게 보고되고 있다. Ignarro 등¹¹은 poly-L-arginine과 같은 arginine-rich basic polypeptide는 NOS를 활성화시켜 내피세포와 관련된 이완작용을 갖는다고 보고하였다. 그러므로 protamine의 NO의 분비의 촉진은 protamine이 대사되면서 exogenous L-arginine의 공급증가에 의한 것으로 여겨졌다²³. 그러나 고농도의 L-arginine을 투여하여도 혈관내피의존성 혈관이완이 일어나지 않는다는 것과 protamine 자체나 heparin-protamine 혼합물은 내피세포막을 통과할 수없기 때문에 L-arginine의 전구체라는 주장은 합당하지 않으며, protamine 또는 heparin-protamine 혼합물은 내피세포에 존재하는 EDRF 수용체와 결합하여 NO 분비를 촉진시킨다고 주장하고 있다¹³. 반면에 Akata 등¹⁴은 내피세포막의 수용체에 작용하여 EDRF의 분비를 촉진하는 Ach보다 protamine에 의한 이완작용이 매우 느리게 나타나므로 내피세포내 수용체와 결합 가능성을 부정하였다. 그러면서 protamine의 내피세포 의존성 혈관이완의 기전을 protamine의 양전위 성질 때문에 내피세포막을 손상시키고 내피세포내 Ca^{++} 유입이 증가되어 결과적으로 EDRF의 분비를 촉진시킨다고 주장하고 있

다. 즉 세포막내의 carboxyl group of sialic acid 때문에 혈관의 내피세포 막은 음전위를 갖는다^{26,27}. 따라서 양전위를 갖은 protamine등과 같은 물질은 내피세포막을 손상시키고, 내피세포의 기능적 구조의 변화를 초래하기 때문으로 설명하고 있다²⁸.

임상에서 환자에게 투여되는 용량 0.75 mg/kg의 protamine을 10분간 걸쳐 서서히 정맥주입후 정상적으로 대략 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈중농도에 도달하며, 반감기는 대략 2분 정도이지만 2시간이 경과한 후에도 30% 정도가 혈중에 존재한다고 보고하고 있다^{29,30}. 본 실험에서 protamine 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 의미있는 혈관이완이 나타났으며, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 50~60% 정도 수축제에 의한 수축을 억제하였다. 이러한 protamine의 내피세포 의존성 혈관이완정도는 heparin의 존재 유무에 영향을 받지 않았다. 본 실험에서 먼저 heparin 자체의 혈관이완반응을 관찰하여 heparin의 투여량을 200 U/ml을 정하였다. 이는 수축제에 의한 수축시 이완정도가 비교적 적은 최대농도이었다. KCl에 의한 수축시 PE에 의한 수축시 보다 heparin에 의한 이완반응이 적었으며, 또한 heparin의 이완반응은 내피세포를 제거한 절편과 L-NMMA를 전처리시 이러한 이완반응이 회복되었다. 따라서 heparin 역시 내피세포에 의존적으로 NO 생성을 촉진시켜 혈관을 이완시키는 것으로 여겨진다. Yokokawa 등³¹은 Ach에 자극에 의한 cGMP 생성이 증가되고, L-NMMA에 의하여 감소되는 것으로 보아 heparin 자체 역시 내피세포에서 NO 분비를 증가시킨다고 보고하였으며, Hajarizadeh 등²¹은 heparin은 내피세포막의 NOS 수용체와 결합하여 NO 생성을 활성화시킨다고 보고하였다. 또한 체내실험을 통하여 heparin이 말초혈관저항을 감소시킨다는 보고가 있다³². 따라서 본 실험에서 이러한 heparin의 내피세포 의존적 혈관이완작용이 최소화하기 위하여 위의 농도를 선택하였다. Heparin의 반전을 위한 protamine을 투여시 혈중에는 heparin-protamine 혼합물과 free protamine, free heparin 모두 존재하고 따라서 혈압하강과 같은 심혈관부작용이 heparin-protamine 혼합물과 protamine 자체에 의하여 발생할 수있다고 알려져있다^{17,18}. 임상적으로 heparin의 반전을 위하여 투여되는 protamine의 농도는 heparin/protamine ratio(H/P ratio)가 0.075~0.1 U/ μg or 1~2 mg/mg 되도록 한다³. 따라서 본 실험에서는 heparin 200 U/ml 수조 농도에서 점차적으로 prota-

mine을 농도를 증가시켜 H/P ratio가 5, 2.5, 1.7, 1, 0.75, 0.5 U/ μ g로 변화에 관계없이 protamine의 농도에 의하여 혈관이완이 증가되었다. 이는 H/P ratio의 변화에 의한 혈관이완 정도의 변화를 비교할 수 없으나, heparin이 존재하지 않은 절편에서의 protamine에 의한 혈관이완 정도의 차이가 없는 것으로 보아 protamine에 의한 혈관이완반응은 heparin에 의하여 영향을 받지 않은 것으로 여겨진다. Akata 등³³⁾은 H/P ratio가 1.4 U/ μ g에서는 protamine의 이완반응이 영향을 받지 않았으나, H/P ratio가 4.7 U/ μ g 이상시 protamine의 이완반응이 억제되었다고 보고하였다. 일정한 H/P ratio에 의한 혈관수축 이완반응이 아니라, 일정한 heparin의 농도하에서 점차적으로 protamine 농도를 증가시켰기 때문에 Akata 등의 실험 결과와 본 실험과 상이한 결과를 나타나는 것으로 여겨진다. 그러나 혈중에서의 heparin과 protamine이 결합시 분해상수가 아직까지 정확히 알려져있지 않아 실험상태에서 얼마나 많은 heparin과 protamine의 혼합물 그리고 free protamine이 존재하는지 알 수 없으며 이러한 분해상수에 여러 요소에 의하여 변화될 수 있기 때문이다.

한편 protamine의 내피세포의 비의존적 혈관이완작용을 관찰하기 위하여 내피세포를 제거한 절편을 이용하여 Ca^{++} 이동에 관련성을 관찰하였다. 본 실험은 Ca^{++} 의 세포내로의 이동에 미치는 영향을 연구하기 위하여 Ca^{++} 이 제거된 상태에서 고농도의 KCl로 세포를 탈분극시키거나 NE를 투여 한 후 Ca^{++} 농도를 증가시켜 혈관의 수축크기를 비교 관찰함으로써 전위-작동통로 및 수용체-작동통로에 의한 Ca^{++} 의 세포내로 유입에 protamine의 효과를 증명할 수 있었다. 이때 NE에 의한 혈관 수축은 전위-작동통로의 개방에 의한 수도 있으므로, 전위-작동통로 차단제인 nifedipine을 먼저 투여하여 순수한 수용체 작동통로의 작용을 증명하였다. 본 실험에서는 protamine에 의해 KCl에 의한 탈분극 후 Ca^{++} 농도가 0.25 mM 이상에서 수축 정도가 의의있게 감소되었다. 또한 NE하에 의한 Ca^{++} 농도가 0.125 mM 이상에서 수축크기가 의의있게 감소하였다. 이러한 것은 protamine에 의하여 세포내로 Ca^{++} 유입을 억제함을 나타내고 있으며, 이때 heparin이 존재하에서도 변화되지 않았다. 세포내의 Ca^{++} 방출에 대한 관찰은 NE과 caffeine으로 평활근을 수축시켜 SR내의 저장된 Ca^{++}

을 고갈시킨 후 Ca^{++} -free 용액에서 수축크기를 비교한 결과 protamine에 의하여 NE에 의한 수축의 크기가 의미있게 변화되었으나, heparin이 존재할 경우와 caffeine에 의한 수축크기는 변화가 없었다. 이러한 것은 protamine에 의하여 세포내의 NE-induced Ca^{++} 방출을 억제하는 것으로 여겨진다. Akata 등¹⁴⁾은 protamine은 분자량이 때문에 세포내로 들어가지 못하기 때문에 단지 평활근 세포막에 작용하고 또한 세포내의 Ca^{++} 이동을 변화시키는 것으로 보고하고 있다. 즉 protamine이 세포 표면의 음이온 Ca^{++} binding site와 결합하여 세포내로 Ca^{++} 유입을 억제하고, phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate(PIP2)와 결합하여 세포내 저장된 IP3-induced Ca^{++} 분비를 억제한다고 설명하고 있다. 실제 임상적으로 protamine을 투여후 발생된 혈압하강을 예방하기 위하여 적절한 수액과 $CaCl_2$ 를 투여하는 것을 추천하는 이도 있다^{34,35)}. 본 실험에서 이러한 Ca^{++} 의 이동에 대한 heparin의 영향은 큰 차이는 없었으나, NE-induced Ca^{++} 방출 억제작용에 영향을 미치는 것으로 나타났다. Heparin 자체 역시 분자량이 크고 또한 낮은 지질용해도를 갖고 있기 때문에 세포막을 통과하기가 어렵다. 따라서 세포내에서의 직접적인 Ca^{++} 방출에는 영향을 미치지 않은 것으로 여겨진다. Ca^{++} 이동에 대한 본 실험에서 임상적인 H/P ratio인 0.1 U/ μ g을 유지하기 위하여, heparin 40 U/ml와 protamine 400 μ g/ml의 농도를 선택하여 실험을 실시하였다. 그러나 이러한 임상적 H/P ratio를 체외실험에 적용하기에는 어려움이 있다. 실험수조 내에는 생체내의 antithrombin III가 존재하기 않기 때문에 혈장내의 heparin과 protamine의 결합에 커다란 영향을 미치는 여러인자가 차이가 나며, 또한 heparin-protamine 혼합물의 분해상수 역시 차이가 나기 때문이다^{17,18)}. 결론적으로 본 실험을 통하여 protamine의 혈관이완반응에 heparin의 존재유무에 의하여 영향을 받지 않은 것으로 보인다. Akata 등²⁰⁾은 heparin이 음이온 물질이기 때문에 heparin-protamine 혼합물이 생성되면서 protamine의 양전위를 중화시켜 혈관이완작용을 오히려 억제한다고 주장하고, Evora 등¹²⁾ 역시 protamine에 의하여 폐혈관이 EDRF의 분비의 증가에 의하여 혈관이 이완되나 heparin에 의하여 이러한 이완작용이 억제될 수 있다고 주장하였다. 그러나 Wakefield 등³⁶⁾은 토끼의 심장의 관상동맥 혈류를 이용한 실험을 통하여, prota-

mine이 250 µg/ml의 농도에서 관상동맥 혈관이완효과가 나타났으며, 이러한 혈류는 heparin이 존재시 일시적으로 증가되었다가 일정한 혈류를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 protamine에 대한 heparin의 영향은 H/P ratio에 따라서 좌우되는 것으로 여겨진다. 임상적으로 protamine을 빠른 속도로 정맥내 주입하거나 또는 재차 protamine을 투여시 혈압하강이 빈번히 또한 심하게 나타난다. H/P ratio가 적어질수록 protamine에 의한 혈압하강의 정도가 감소된다. 그렇지만 부적절한 protamine의 투여는 결과적으로 heparin의 rebound를 나타나게한다³⁷⁾.

결론적으로 protamine의 혈관이완 기전은 내피세포에 의존적이며 NO의 생성을 촉진시키며, 또한 세포외에서의 Ca⁺⁺유입을 차단하여 혈관이완작용이 나타나는 것으로 여겨지며, 이러한 작용은 heparin에 의하여 영향을 받지않는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Horrow JC: Protamine: A view of its toxicity. *Anesth Analg* 1985; 64: 348-61.
2. Hakim TS, Picone A, O'Leary CE, Camporesi EM: Protamine-induced pulmonary veno-constriction in heparinized pigs. *Anesth Analg* 1995; 81: 38-43.
3. Shapira N, Schaff HV, Pichler JM, White RD, Pluth JR: Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 84: 505-14.
4. Lindblad B, Wakefield TW, Whitehouse WM, Stanley JC: The effect of protamine sulfate on platelet function. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 22: 55-9.
5. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg B: Protamine-induced fatal anaphylaxis: prevalence of antiprotamine immunoglobulin E antibody. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985; 90: 86-90.
6. Lowenstein E, Zapol WM: Protamine reactions, explosive mediator release, and pulmonary vasoconstriction. *Anesthesiology* 1990; 73: 373-5.
7. Coleman WL: Humoral mediators or catastrophic reactions associated with protamine neutralization. *Anesthesiology* 1987; 66: 595-6.
8. Hird BR, Crawford FA Jr, Mukherjee R, Zile MR, Spinale FG: Effects of protamine on myocyte contractile function and β -adrenergic responsiveness. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 1066-75.
9. Wakefield TW, Wroblewski SK, Nichol BJ, Kadell AM, Stanley JC: Heparin-mediated reductions of the toxic effects of protamine sulfate on rabbit myocardium. *J Vasc Surg* 1992; 16: 47-53.
10. 박윤근, 방서옥, 홍용우, 신호선: Protamine의 심근독성에 대한 연구. *대한마취과학회지* 1994; 27: 333-46.
11. Ignarro LJ, Gold ME, Buga GM: Basic polamino acids rich in arginine, lysine, ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res* 1989; 64: 315-29.
12. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV: Protamine induces endothelium-dependent vasodilatation of the pulmonary artery. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 405-10.
13. Pearson PJ, Evora PRB, Ayrancioglu K, Schaff HV: Protamine releases endothelium-derived relaxing factor from systemic arteries: A possible mechanism of hypotension during heparin neutralization. *Circulation* 1992; 86: 289-94.
14. Akata T, Yoshitake JJ, Nakashima M, Itoh T: Effects of protamine on vascular smooth muscle of rabbit mesenteric artery. *Anesthesiology* 1991; 75: 833-46.
15. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G: Structure-activity relationship in heparin; a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116: 492-9.
16. Racanelli A, Fareed J, Walenga JM, Coyne E: Biochemical and pharmacologic studies on the protamine interactions with heparin, its fractions and fragments. *Semin Thromb Hemost* 1985; 11: 176-89.
17. Kitani T, Nagarajan SC, Shanberge JN: Effect of protamine on heparin-antithrombin III complexes. In vitro studies. *Thromb Res* 1980; 17: 367-74.
18. Shanberge JN, Murato M, Quattrocioni-Long T, Neste LV: Heparin-protamine complexes in the production of heparin rebound and other complications of extracorporeal bypass procedures. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 210-7.
19. Hobbhahn H, Conzen PF, Zenker B, Goetz AE, Peter K, Brendel W: Beneficial effect of cyclooxygenase inhibition on deverse hemodynamic responses after protamine. *Anesth Analg* 1988; 67: 253-60.
20. Akata T, Kodama K, Yoshitake J: Heparin prevents the vasodilating actions of protamine on human small mesenteric arteries. *Anesth Analg* 1993; 76: 1213-21.
21. Hajarizadeh JLH, Rosa CAR, Rohrer MJ, Salm JV, Cutler BS: Heparin and protamine stimulate the production of nitric oxide. *J Cardiovasc Surg* 1996; 37: 445-52.

22. Bosnjak ZJ: Ion channels in vascular smooth muscle. *Anesthesiology* 1993; 79: 1392-1401.
23. Furchgott RF, Zawadzki JV, Cherry PD: Role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol* 1984; 24: 175-97.
24. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
25. Hudgins PM, Weiss GB: Differentail effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 159: 91-9.
26. Loutzenhisser R, Rettori V, Yeyatil N: Calcium exchange and distribution in the arterial wall. *Am J Physiol* 1987; 264: 6149-54.
27. Quinton PM, Phipott CW: A role for anionic sites in epithelial architecture. *J Cell Biol* 1973; 56: 787-96.
28. Chang SW, Voelkel NF: Charge-related lung microvascular injury. *Am Rev Respir dis* 1989; 139: 534-44.
29. Lindbald B, Wakefield TW, Whitehouse WM, Stanley JC: The effect of protamine sulfate on platelet function. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 22: 55-9.
30. Wakefield TW, Till GO, Lindblad B: Complement depletion and persistent hemodynamic-hematologic responses in protamine-heparin reactions. *J Surg Res* 1988; 45: 320-6.
31. Yokokawa K, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Horio T, Takeda T: Stimulation by heparin of cGMP production in cultured endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscl Thromb* 1991; 11: 1573a.
32. Sternbergh WC III, Makhoul RG, Adelman B: Heparin prevents postischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg* 1993; 17: 318-27.
33. Akata T, Kodama K, Takahashi S: Effects of heparin on the vasodilator action of protamine in the rabbit mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 1247-53.
34. Gourin A, Streisand RL, Greinder JK, Stuckey JH: Protamine sulfate administration and the cardiovascular system. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1971; 62: 193-204.
35. Fadari MA, Ledbetter M, Papacostas CA, Duke LF, Lemole GM: Mechanism responsible for the cardiovascular depressant effect of protamine sulfate. *Ann Surg* 1974; 180: 232-5.
36. Wakefield TW, Beis LE, Wrobiesk SK, Bolling SF, Stanley JC, Kirsh MM: Impaired myocardial function and oxygen utilization due to protamine sulfate in and isolated rabbit heart preparations. *Am Surg* 1990; 212: 387-94.
37. Shanberge JN, Murato M, Quattrociocchi-Longe T, Neste LV: Heparin-protamine complexes in the production of heparin rebound and other complications of extracorporeal bypass procedures. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 210-7.