

Isoproterenol로 유발된 흰쥐 심장비대에서의 심근세포사

김수경¹ · 장은숙 · 권지윤¹

계명대학교 의과대학 병리학교실
'약리학교실

Cardiac Myocyte Cell Death in Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats

Soo-Kyung Kim¹, Eun-Sook Chang and Gee-Youn Kwon¹

Departments of Pathology, ¹Pharmacology and ¹Cardiovascular Research Institute, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Background : Although cardiac hypertrophy contributes to cardiac failure, the underlying mechanism has not yet been precisely determined. This study was planned in order to determine the pathogenesis of heart failure following cardiac hypertrophy induced by β -adrenergic stimulation. **Methods :** The extent of cardiac hypertrophy was assessed after administrating isoproterenol (ISO, 5 mg/kg) intraperitoneally for 6 hours, 1, 3, 5, 7 and 10 days. The hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and phosphotungstic acid hematoxylin stains along with immunohistochemical stainings for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 were performed in the paraffin-embedded left ventricle sections. Apoptosis was assessed by DNA laddering and terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay. TUNEL positive myocytes and some nonmyocytes appeared in the subepicardium at 6 hours after ISO administration. The localization of these cells was shifted to the subendocardium within 24 hours, and the TUNEL positive cells were seen throughout the myocardium on the 5th day after ISO treatment. Necrotic myocyte death occurred on the 3rd day of ISO administration in the subendocardium, and initial pericellular fibrosis was followed and increased thereafter, with replacement fibrosis accompanied by further necrotic myocyte cell death. **Conclusions :** Our data showed that ISO treatment induced apoptotic myocyte death and superimposed necrotic myocyte death with subsequent fibrosis. The observed cardiac myocyte death may reflect myocardial dysfunction.

Key Words : Isoproterenol, Hypertrophy, Left ventricle, Apoptosis

접 수 : 2001년 1월 6일
게재승인 : 2001년 5월 7일

책임저자 : 장 은 숙
우 700-712 대구시 중구 동산동 194
계명대 병리학교실
전화: 053-250-7481
Fax: 053-250-7852
E-mail: a349@dsme.or.kr

심장비대는 증가된 작업부하에 대한 기능적인 적응성 반응이지만 그 형태는 자극의 종류에 따라 다르다. 비대를 일으키는 원인은 두 가지 형의 신호, 즉 신장(stretch)과 같은 기계적 자극에 의한 신호와 교감신경계의 자극 및 angiotensin II, endothelin, cytokine 등에 의한 신경호르몬성 자극 신호가 있다.¹ 비선택적 β -아드레날린성 효현제인 isoproterenol (ISO)은 1959년 Rona 등²에 의해서 심장 무게가 증가된 심장질환을 유발시키는 약물로 소개된 이후 심장질환을 실험적으로 유도할 목적으로 널리 응용되고 있다. 심근 비대가 발생하는 분자생물학적 기전은 아직 확실하지 않으나, 심근 비대시에 더 이상 보상할 수 없는 한계에 도달하면 세포는 손상을 받게 된다. 이 때에 심근 변성이 일어나는데 가장 중요한 변화는 수축성 근섬유세포의 용해 또는 소실이다. 또한 이러한 비대상성 심근 비대시에는 심근세포사가 초래될 때 비심근세포 및 간질 부분에 섬유화도

초래된다.³⁻⁵ 또한 심근내 소동맥의 비후로 내강이 좁아지는 소견도 관찰된다⁶고 한다. 이렇게 심근 구조의 재구성 과정이 시작되고 더 진행되면 심부전이 뒤이어 일어나게 된다. ISO 투여에 의한 심근 비대시 직접적으로 β -아드레날린성 수용체의 자극으로, 신호전달계에 의한 수축과 관련된 심근세포의 여러 유전자 발현과 단백질 합성이 증가되어 심장의 근수축성과 수축 주기는 증가되지만 실제적인 심장의 기능적 수축력에 대해서는 감소한다는 상반된 보고들이 있다. 즉 ISO로 인한 심근 비대시에 심장의 펌프운동은 감소된다⁷고도 하고, 적출 심장에서는 증가되었다⁸고도 하며 Taylor 등⁹은 변화가 없었다고 보고하였다. 한편, 비후된 심근세포가 수축력을 잃게 되는 기전에 대하여 교감신경계 흥분에 대한 반응성의 감소¹⁰ β -아드레날린성 수용체 수의 감소,¹¹ inhibitory guanine nucleotide binding proteins (Gi proteins)의 증가 등¹² 많은 보고가 있으나 아직 확실하지 않다.

최근에는 심근세포의 Ca^{2+} 평형에 관계하는 단백질 phospho-lamban이나 sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 활성의 감소에 의하여 수축력이 감소된다는 보고가 있다.¹³

이 연구에서는 고혈압이 유발되지 않는 저용량의 ISO를 사용하여 흰쥐의 심장이 재구성되는 과정 중에 나타나는 심근세포 및 비심근세포의 구조적 변화, 그리고 세포 증식과 관련 있는 단백질 PCNA (proliferative cell nuclear antigen)와 Ki-67를 조사하여, 지속적인 β -아드레날린성 흥분이 가해질 때 자멸사 및 괴사 형태의 심근세포 사멸과 심장 섬유화가 속발로 일어남으로 인한 심근 비대 발생을 관찰하였다.

재료와 방법

실험동물

실험동물은 동일 장소에서 3주 이상 일정한 사료로 사육한 체중 280-350 g의 Sprague-Dawley종의 수컷 흰쥐를 사용하였다. Isoproterenol (Sigma, U.S.A.) 처리는 5 mg/kg를 6시간(실험 1군), 1일(실험 2군), 3일(실험 3군), 5일(실험 4군), 7일(실험 5군) 및 10일(실험 6군) 동안 각각 복강내 주사하였으며, 각 실험군당 4-5마리의 흰쥐를 사용하였다.

실험방법

병리조직학적 관찰

적출한 심장 조직을 10% phosphate buffered formalin에 하루 동안 고정하고 계열 에탄올로 탈수한 후 파라핀에 포매하여 4 μ m 두께의 초박 절편을 제작하여 HE, Masson's trichrome 및 phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) 염색을 실시하고 광학현미경 하에서 관찰하였다.

면역조직학적 검색

Avidin/biotin immunoperoxidase system (DAKO LSAB kit, U.S.A.)을 이용하여 PCNA와 Ki-67의 단백질 발현을 검색하였다. 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma, U.S.A.)에 subbed된 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치하였다. Xylene과 계열 에탄올로 탈파라핀 및 흡수하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 수세하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위해 조직절편을 메탄올로 희석한 3% 과산화수소 용액에 25분간 실온에서 처리한 후 PBS로 수세하였다. Antigen retrieval을 위해 조직절편을 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)에 넣어 microwave에서 10분간 처리하였다. PBS로 수세된 조직절편에 일차항체인 PCNA (1:200, Novocastra, U.K.)와 Ki-67 (1:40, Dako, U.S.A.)을 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 동안

반응시켰다. PBS로 수세 후 각각 이차항체인 biotinylated link antibody를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 streptavidin peroxidase reagent를 첨가하여 37°C에서 30분간 방치하였다. PBS로 수세한 조직절편을 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하여 synthetic mountant로 봉입한 후 광학현미경 하에서 관찰하였다.

TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling]

In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany)을 사용하여 세포의 자멸사를 관찰하였다. 파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma, U.S.A.)에 subbed된 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치하였다. Xylene과 계열 에탄올로 탈파라핀 및 흡수하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 수세하였다. Target retrieval을 위하여 조직절편을 proteinase K (20 μ g/mL in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4-8.0)로 상온에서 15분간 처리한 후 PBS로 수세한 후 TUNEL reaction mixture (TdT and Fluorescein-dUTP)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 수세한 후 anti-fluorescein antibody-alkaline phosphatase로 tagging하고 nitro blue tetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate로 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

DNA fragmentation assay

-80°C에 보관되었던 동결 심장조직 100 mg을 PBS (pH 7.2, 4°C)에서 잘게 잘라서 1 mL의 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL proteinase K]와 0.1 mg/mL RNase A를 첨가하여 55°C에서 6시간 이상 방치하였다. 얻어진 세포용해액을 원심분리(12,000 g, 15 min, 4°C)하여 상층액을 분리하고 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v)로 DNA를 추출한 후, 0.1 mg/mL RNase A를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v)로 다시 처리한 후 100% 에탄올과 sodium acetate로 침전시켜 genomic DNA를 추출하였다. 분리된 genomic DNA를 TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]에 녹이고, 10 μ g의 DNA를 2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 투시기로 관찰하였다.

결 과

병리조직학적 관찰 (Table 1)

정상 대조군의 좌심실 심근층은 가지치는 근섬유와 그 중앙에

Table 1. Histological findings of the left ventricle

	Normal	Experimental Group					
	Control	1 (6h)	2 (1D)	3 (3D)	4 (5D)	5 (7D)	6 (10D)
Cellular degeneration	-	+f	++f.s.	+++f.e.d.	++	+	+
Inflammatory cell infiltration	-	-	++e.s.	++s	+++d	++d	++s
Cell proliferation (PCNA)*	-	+f	++s	++s	+++d	++d	++s
Apoptosis (TUNEL)#	-	+p	+e	++e	+++t.d.	++d	++f/d
Interstitial and perivascular fibrosis (Masson trichrome)	-	-	-	+f	+++	+++	+++
Myocyte necrosis (PTAH)	-	-	-	+f.s.	+++d	+++d	+++d
Replacement fibrosis (Masson trichrome)	-	-	-	+	++e	+++t	+++t

-: absent, +: mild, ++: moderate, +++: severe, f: focal, s: scattered, d: diffuse, p: near epicardium, e: near endocardium, t: transmural, D: day, *: nonmyocyte only, #: myocyte and nonmyocyte. PCNA: proliferating cell nuclear antigen, TUNEL: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, PTAH: phosphotungstic acid hematoxylin.

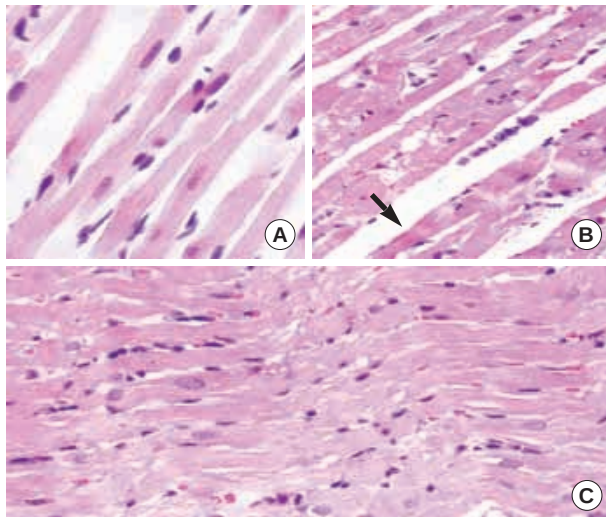


Fig. 1. HE stain in the left ventricle of normal (A) and ISO (isoproterenol)-induced cardiac hypertrophy (B & C: 6 hours after ISO administration). B showed multiple various minute focal areas of vacuolization with focal widening of intercellular spaces, and hypercontraction bands (arrow), and C shows wavy fibers with elongation of myocardium near the epicardium.

핵이 있고 핵 주위에 근형질을 가지고 있으며 근섬유는 HE와 PTAH 염색에서 뚜렷한 가로 줄무늬가 잘 보였다(Fig. 1A). 실험 1군(ISO 주사하고 6시간 후)은 심근세포에 근형질 공포화로 다양한 크기의 초점적 근형질 공포와 수축대가 여러 군데 형성되어 있으며(Fig. 1B) 근섬유의 파동상 변화가 심외막과 가

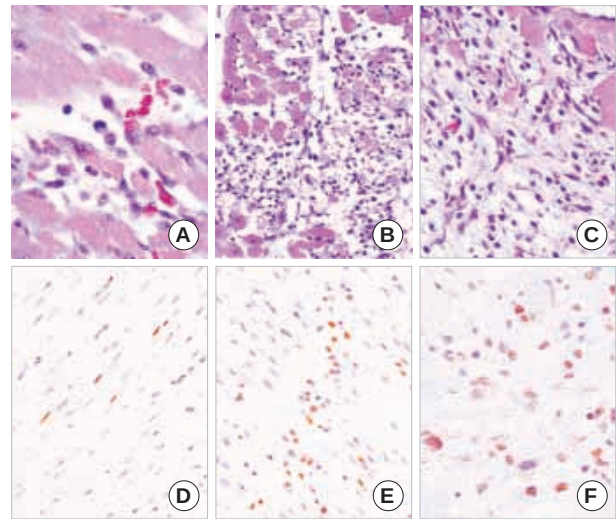


Fig. 2. HE (A, B, C) and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (D, E, F) stain in ISO (isoproterenol)-induced cardiac hypertrophy. A: Experimental group 2 (1 day after ISO administration) shows significantly widened intercellular spaces with collection of some macrophages and extravasated red blood cells, and mitotic figures of nonmyocytes. B: Experimental group 3 (3 days after ISO administration) shows a marked myocytolysis with increased macrophages, incomplete removal of necrotic myocytes by phagocytosis, and increased number of fibroblast. C: Experimental group 4 (5 days after ISO administration) shows complete removal of necrotic myocytes with early deposit of collagen. D: Experimental group 1 shows some PCNA positive nonmyocytes, macrophages and fibroblast. E: Experimental group 2 shows moderately increased number of same cells. F: Experimental group 5 (7 days after ISO treatment) shows PCNA positive macrophages scattered throughout the myocytolytic background.

까운 심근조직에서 나타났다(Fig. 1C). 실험 2군(1일 후)은 초점적 근형질 공포화가 현저하였으며 뚜렷한 섬유모세포의 증식이 나타났으며 넓어진 세포간 간격 공간 내에 대식세포수의 증가와 더불어 핵분열하는 비심근세포들도 관찰되었다(Fig. 2A). 실험 3군(3일 후)은 심한 근형질 공포화와 세포 용해 등 세포상해 소견이 심내막쪽 심근 조직에 미만성 혹은 국소적으로 나타났다 대식세포 및 섬유세포의 수가 증가하였다(Fig. 2B). 또한 Masson's trichrome 염색시 세포 주위에 가늘게 섬유화가 시작되고 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3C). 실험 4군(5일 후)은 세포용해가 좌심실의 내측 3분의 1 정도를 거의 점유했고 괴사 심근세포는 거의 모두 대식세포에 의해서 제거되었으며, 이 부위에 대식세포 및 만성 염증세포의 침윤이 미만성으로 나타났고 대식성 섬유화가 나타나기 시작하였다(Fig. 3A). 심외막 근처, 특히 전면 심실 중격의 심근에서 근섬유의 파동상 변화를 볼 수 있었다. 실험 5군(7일 후)은 그 심근 괴사 정도가 실험 4군보다 더 심해졌고 좌심실 벽의 내측 3분의 1 내지 2분의 1 정도가 거의 소실되고 간혹 소실되지 않은 심근섬유가 심외막 근

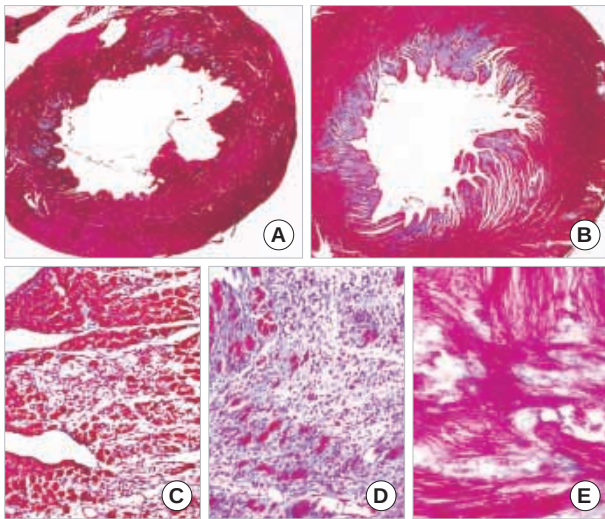


Fig. 3. Masson's trichrome stain showing ISO (isoproterenol)-induced cardiac hypertrophy. A and B represent horizontal sections of the left ventricle. A: Experimental group 4 (5 days after ISO administration) shows blue stained fibrotic myocardium near the subendocardial region. B: Experimental group 5 (7 days after ISO administration) shows that about one third of the subendocardial myocardium is replaced by blue stained fibrous tissues. C: Experimental group 3 (3 days after ISO administration) shows barely visible initial pericellular fibrosis in the myocardium near the endocardium. D: Experimental group 6 (10 days after ISO administration) shows replacement of the necrotic fibers by dense collagenous connective tissues with scattered residual myocytes. E: Experimental group 6 (10 days after ISO administration) shows histologic appearance of haphazard disarray of bundles of myocytes and interstitial fibrosis.

처에 띄엄띄엄 섬처럼 보이는 곳도 있었다(Fig. 3B). 실험 6군(10일 후)은 심근의 괴사 정도가 실험 5군보다 더 심하였고 심근 섬유가 띄엄띄엄 작은 섬같이 산재해 있었으며(Fig. 3D), 심근세포의 불규칙한 주행 및 불규칙한 근섬유 분절을 볼 수 있었다(Fig. 3E).

PCNA 및 Ki-67 면역조직화학적 관찰

정상 및 실험군의 심근세포에서는 PCNA와 Ki-67 양성 세포가 관찰되지 않았다. 그러나 정상 대조군 심근의 비심근세포에서 PCNA 양성 반응이 아주 드물게 간혹 나타났으며, 실험 1군(6시간 후)에서는 초점적으로 PCNA 양성 반응이 섬유세포와 대식세포들에서 관찰되었다(Fig. 2D). 실험 2군(1일 후)에서는 중등도로 증가한 PCNA 양성 세포들이 흩어져 나타났다(Fig. 2E). 실험 3군(3일 후)에서는 심내막 및 심내막 쪽 심근에서 중등도의 PCNA 양성 세포가 나타났고 심근의 나머지 부분에서도 여기저기 흩어져 나타났다. 실험 4군(5일 후)에서도 심내막 및 심내막에 인접한 심근에서 상당히 많은 수의 PCNA 양성 대식세포가 미만성으로 나타났고 심실벽 전체에 흩어져 있었

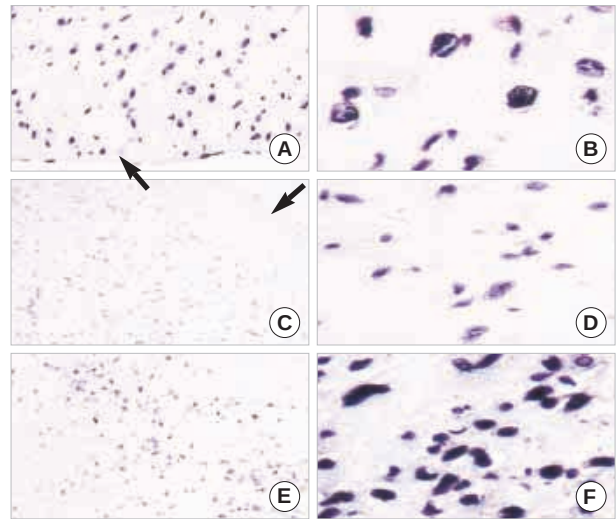


Fig. 4. TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) staining showing myocyte apoptosis. A: Experimental group 1 (6 hours after ISO (isoproterenol) administration) shows TUNEL positive myocytes and some nonmyocytes in the subepicardial (arrow indicated) myocardium. B: Higher magnification of A. C: Experimental group 2 (1 day after ISO administration) shows TUNEL positive myocytes and nonmyocytes in the subendocardial (arrow indicated) myocardium. D: Higher magnification of C. E: Experimental group 3 (3 days after ISO administration) shows increase number of TUNEL positive myocytes and nonmyocytes in the myocardium. F: Experimental group 5 (7 days after ISO administration) shows increase number of TUNEL positive myocytes and nonmyocytes.

다. 실험 5군(7일 후)에서는 심내막 쪽 심근의 섬유화가 생성되면서 PCNA 양성 세포수가 실험 4군보다 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2F). Ki-67 양성 반응은 PCNA 양성 반응 세포 중에서 일부만이 양성 반응을 나타냈으며 대부분은 음성 반응을 나타내어서 두 반응이 일치하지 않았다.

자멸사 세포의 관찰

정상 대조군 심근에서는 TUNEL 양성 반응이 나타나지 않았으나, 실험 1군(6시간 후)에서는 주로 심외막하 심근에서 심근세포와 비심근세포가 모두 양성으로 염색되어 심외막을 따라 가느다란 띠를 형성하였다(Fig. 4A, B). 대부분의 TUNEL 양성인 자멸사 세포들은 대개가 심근세포의 초기 손상을 보이는 부위나 경한 염증세포 침윤 및 간질성 부종이 있는 부위에서 나타났다. 실험 2군(1일 후)에서는 TUNEL 양성인 심근세포와 비심근세포가 심외막 쪽에서는 없어지고 심내막쪽에서 약하게 나타나기 시작하였고(Fig. 4C, D), 역시 심근세포의 구조적 이상을 보이는 부위에서 나타났다. 실험 3군(3일 후)에서는 심내막 쪽 심근세포와 비심근세포에서 양성 반응이 군데군데 중등도로 나타났다(Fig. 4E). 심한 심근세포 공포화 및 세포질용해가

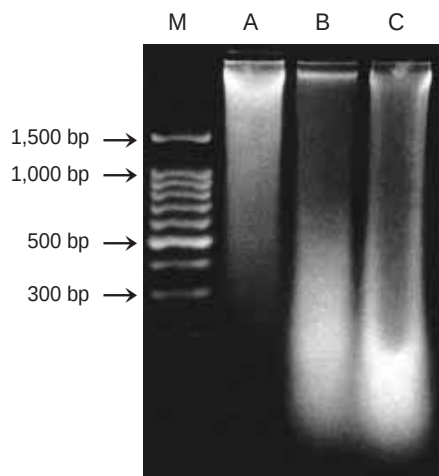


Fig. 5. Detection of DNA fragmentation in the left ventricle of ISO (isoproterenol)-induced cardiac hypertrophy. Lane A: normal, Lane B: Experimental group 3 (3 days after ISO administration), Lane C: Experimental group 4 (5 days after ISO administration). Lane M: size marker. DNA samples (10 μ g) were loaded onto 2% agarose gel and imaged by ethidium bromide staining.

일어난 부위에서 나타났다. 실험 4군(5일 후)에서는 심내막 쪽에 가장 밀도가 높고 여기서 확대되어 심근층 전체에 미만성으로 양성 세포가 나타났고, 그 후 실험 5군(Fig. 4F)에서도 이 시기에 TUNEL 양성 반응과 심근층의 구조 변화가 가장 현저하였다. 실험 5군과 6군에서는 실험 4군과 비슷한 범위에서 그 심한 정도가 점차 감소되었으나 섬유화는 증가하였다. 또한 실험 3군(3일 후) 및 실험 4군(5일 후)의 심실 조직 DNA 전기영동상에서 뚜렷한 DNA 도말 현상이 관찰되었다(Fig. 5).

고 찰

본 실험에서는 아고혈압 용량인 체중 kg당 5 mg의 ISO를 매일 투여하고 지속적인 β -아드레날린성 자극을 주어 흰쥐 심장비대를 유도하였다. 심장비대는 ISO를 5일간 투여한 후부터 현저하였다. ISO를 투여한 6시간 후(실험 1군)에 나타난 심근의 조직학적 변화는 Bloom과 Cancilla¹⁴의 보고와 일치하는 국소적 세포질의 공포성 변성, 심근섬유의 과동성 변화 등 급성 허혈의 초기 변화 소견을 나타내었다. TUNEL 염색에서 양성 반응을 보이는 심근세포와 섬유세포 또는 대식세포 등의 비심근세포들이 있었다. 역시 동일 심장 절편에서 시행한 PCNA 염색에서는 비심근세포에서 양성 반응을 나타냈으나, 이들 중 일부를 제외하고 대부분이 Ki-67 염색에는 음성인 것으로 보아 이들 TUNEL 양성 세포가 DNA 손상과 함께 DNA 보수 과정에서 있음을 추측할 수 있었다.

Teiger 등¹⁵은 심근 비대는 초기 단계부터 심근세포의 자멸사

를 동반한다고 보고하였다. 본 실험에서 자멸사는 ISO 투여 후 6시간 후에 나타났으며, 비대는 그 후 제5일에 뚜렷하였다. 심근의 세포사 중에서 자멸사는 허혈, 허혈 후 재관류, 심근경색, 압의 과부하, 산소압 저하 또는 기계적 신장 등 여러 인자에 의해서 시작된다.¹⁶ 또 angiotensin,¹⁷ tumor necrotic factor- α (TNF- α),¹⁸ 그리고 atrial natriuretic peptide (ANP) 등¹⁹도 자멸사를 자극한다고 하였다. 염색체 DNA의 분절은 자멸사의 생물학적 현상이며, 자멸사에 의해 심근세포가 소실될 때에는 염증과 복구성 섬유화를 유발하지 않고 지방 조직으로 심근세포가 치환된다. 본 실험에서 TUNEL 염색상 DNA 분절을 보이며 자멸사하는 심근세포들이 ISO 투약 6시간 후에 심외막하 심근에서 처음 나타났다. 이는 ISO에 의한 심근세포의 수축력 증가로 인하여 발생한 허혈 때문에 자멸사가 초래되고, 동시에 비심근세포인 섬유세포와 대식세포가 증식하기 시작하였다는 점을 보여 주는 것이다. 자멸사가 심외막하에서 나타난 것은, 이 실험 결과에서 보이는 심근외막하 심근의 현미경적 변화를 즉, 근섬유의 과동성 변화, 근형질 공포성 변성 및 심근의 과도한 수축으로 인한 수축대 형성이 관찰된 점으로 미루어 보아, ISO에 의한 교감신경계 흥분으로 인한 심박동의 증강 및 심근경색 전 초기 현상의 일시적 허혈 현상과 관계가 있는 것으로 생각한다. Kajstura 등²⁰은 쥐 실험으로 심근 경색 후 심실 심근세포사에서 심근세포 자멸사와 괴사는 각기 독립적으로 일어나며, 자멸사가 경색 후 계속적으로 일어나서 4, 5 내지 6시간 후까지 계속되는 데 반해서 괴사는 제1일과 제2일에 우세하였다고 하였다. 일과성인 허혈은 심근세포의 자멸사를 유발하는 반면, 지속적인 관상동맥 혈류의 감소는 심근세포의 괴사를 초래한다고 하였다.²¹ 세포사가 괴사 또는 자멸사할 것인지는 ATP에 의해서 결정되며 ATP치가 높을 때는 자멸사가 일어나고 반대로 낮을 때는 괴사가 일어난다고 한다.²² 따라서 미토콘드리아의 내막에 비선택적 투과공인 MPT (mitochondrial permeability transition)가 형성되면 미토콘드리아의 결합이 저지되고 ATP가 고갈되어 괴사형의 세포사가 일어난다.

본 실험에서 심장은 동심형의 비대를 보였는데 심장비대는 진행 경과에 따라서 3기로 구분한다. 제1기는 비대가 발생하기 시작하는 시기이며 에너지 생성과 단백질 합성이 증가한다. 제2기는 심기능 향진이 안정된 상태로 존재하는 시기이다. 제3기는 심장의 단백질 합성능이 점진적으로 쇠퇴하고, 근사상체와 미토콘드리아의 갱신의 더 이상 이루어지지 않아 근원섬유가 손상을 입고, 더 나아가 세포가 위축되는 특징을 보이는 시기이다. 이때 비대에는 심근세포뿐만 아니라 비심근세포의 성장이 동반되며 이로써 간질의 구조적 재형성이 이루어진다.³⁻⁵ 예를 들어 운동훈련²³ 동정맥루²⁴ thyroxin 혹은 성장 호르몬의 투여 시에^{25,26} 발생하는 심근세포 성장은 심근 교원질 농도에 섬유아세포의 관여가 불균등하지 않고 정상을 유지하므로 적응성 비대라고 한다. 그러나 반응성 섬유화에 의한 좌심실 비대에서는 교원질의 농도가 증가하여 심근세포 비대와 비심근세포의 성장이 불균

등하다. 이와 같이 비심근세포 성장 및 구획간 정상 비율의 손실에 비례한 심근 구조 내의 불균등은 병적 비대를 일으킨다.

본 실험에서 관찰된 이런 일련의 변화는 ISO 투여로 인한 심장 재형성의 초기에 자멸사가 일어나는 자멸사기(apoptosis phase)가 있음을 시사하고 있다. 즉 심근세포의 반응적 비대일 경우, 심장 재형성을 위해 비심근세포의 증식과 동시에 심근세포와 비심근세포 모두가 자멸사되고 있음을 알 수 있었다. 이는 허혈로 인한 전 초기 심근 경색에서 보는 소견²⁷으로 생각된다. 비대가 발생하는 동안 심실벽 안의 세포들은 허혈성 상해가 일어나는데, 이 때의 세포사는 자멸사 과정에 의한 것으로 생각된다. 본 실험에서 투약 후 제1일(실험 2군)에 세포 자멸사가 심의막하에는 일과성으로 급격히 없어지고 대신 심내막하 심근에 나타나기 시작하였는데, 이는 반복되는 ISO 투여로 인해 심내막하에 지속적인 허혈 상태가 발생되어 일어나는 현상으로 보인다. 그 후 제3일(실험 3군)에는 심내막하 심근의 심근세포 용해가 미만성으로 다량 관찰됨과 동시에 같은 자리에 여전히 많은 TUNEL 양성 세포가 나타났고, DNA 전기영동상에서도 도말 현상을 나타내었다. 이 때 ISO 투여로 인해 비심근세포의 산발적인 세포 증식과 함께 나타난 자멸사 형의 세포사와 괴사형의 세포사도 초래된 것이라고 생각된다. 또한 이 때에 최초로 섬유화가 가시화되기 시작하여 세포간 혹은 혈관 주위에 섬세한 섬유화가 관찰되었고 섬유세포의 증식도 관찰되었다. 제5일(실험 4군)에는 이 부위의 괴사 세포가 대식세포에 의해 거의 완전히 제거되었고 대체성 섬유화현상이 뚜렷이 관찰되었다. 이때 자멸사세포 수는 더욱 증가하였으며 그 후에는 그 밀도가 점차 감소되면서 전층으로 확산되었다. 허혈성 심근세포의 비가역적인 상해는 최초로 심내막하 구역에서 일어나 상해가 진행됨에 따라 세포사의 구역이 확대되어 심근을 더 많이 잠식하며 심근벽 전체로 확대되었다. 그리하여 제5일(실험 4군)에는 전체 좌심실 두께의 3분의 1 이상을, 제7일(실험 5군)에는 거의 심실 내막층의 2분의 1정도, 제10일(실험 6군)에는 거의 심근의 전체 벽을 차지하였으며 이 부위에 대체성 섬유화가 뚜렷이 나타났다.

심실의 재형성의 기전에는 많은 인자들이 관여되며 이미 저자들은 심근 비대 시에 atrial natriuretic peptide (ANP)와 brain natriuretic peptide (BNP)의 발현을 조사한 바 있다.²⁸ 적응성 및 병적 비대의 개념은 심근세포, 혈관 및 교원질 구획간의 비율과 세포 성장의 비율에 의한다. 처음부터 심근층의 재형성이 병적일 수도 있지만 적응성 비대의 과정 중에 비심근세포의 성장이 불균등하게 일어남으로써 어느 시기에 발생할 수도 있다. 심근층을 구성하는 세포 집단들은 많은 서로 다른 세포들로 구성되어 있으며, 심근세포가 이들 중에서 가장 크기가 크고 심근층 구조 공간의 75%를 차지하나 전체 세포 종류별 집단 수의 3분의 1에 불과하다. 나머지 세포들은 심장 간질에서 발견되는데, 이들은 관상동맥, 림프관, 심내막을 싸는 내피세포, 혈관성 평활근, 심섬유아세포, 대식세포 및 미만세포로 구성되어 있다. 심섬유아세포는 정상 구조 단백질을 구성하는 심근층의 주

된 원섬유 교원질인 I형 및 III형 교원질을 함유하고 있고, 이 교원질이 간질 및 혈관 주위의 섬유화에 관여한다.^{29,30} 본 실험에서 ISO 주사 6시간 후에 자멸사가 관찰되고 제3일째에 괴사가 관찰되었는데, 괴사는 시기적으로 자멸사 후에 뒤따라 발생함을 알 수 있었다. ISO 투여 후 5일에는 괴사한 반흔 자리에 대체성 섬유화가 뚜렷이 나타나서 병적 비대로 변하고 점차 증가하여 제10일에는 거의 심실벽 전체가 교원질 섬유 조직으로 대체된 현저한 심근 섬유화가 관찰되었다. 그리하여 심장 고유의 수축 기능이 상실되어 심박동 장애가 발생하게 되고 결국 심부전으로 진행될 것으로 추정되었다.

참고문헌

- Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997; 80: 15L-25L.
- Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Am Med Assoc Arch Pathol* 1959; 67: 99-111.
- Anversa P, Kajstura J, Olivetti G. Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 245-55.
- Masson S, Arosio B, Luvara G, *et al.* Remodelling of cardiac extracellular matrix during beta-adrenergic stimulation: upregulation of SPARC in the myocardium of adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1505-14.
- Schaper J, Froede R, Hein S, *et al.* Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991; 83: 504-14.
- Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, *et al.* Quantitative analysis of narrowing of intramyocardial small arteries in normal hearts, hypertensive hearts, and hearts with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1987; 75: 1130-9.
- Vassallo DV, Vasquez EC, Cabral AM. Contractile performance of papillary muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. *Pharmacol Res Commun* 1988; 20: 61-72.
- Cihak R, Kolar F, Pelouch V, Prochazka J, Ostadal B, Widimsky J. Functional changes in the right and left ventricle during development of cardiac hypertrophy and after its regression. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 845-50.
- Taylor PB, Helbing RK, Rourke S, Churchill D. Effect of catecholamine-induced cardiac hypertrophy on the force-interval relationship. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 67: 40-6.
- Stein B, Bartel S, Kirchhefer U, *et al.* Relation between contractile function and regulatory cardiac proteins in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 1996; 270: H2021-8.
- Mende U, Eschenhagen T, Geertz B, *et al.* Isoprenaline-induced

- increase in the 40/41-kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; 345: 44-50.
12. Eschenhagen T, Mende U, Diederich M, *et al.* Long term β -adrenoceptor-mediated up-regulation of $G_i\alpha$ and $G_o\alpha$ mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 773-83.
 13. Linck B, Boknik P, Baba HA, *et al.* Long-term beta-adrenoceptor mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca^{++} -ATPase in mammalian ventricle. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 531-8.
 14. Bloom S, Cancilla PA. Myocytolysis and mitochondrial calcification in rat myocardium after low doses of isoproterenol. *Am J Pathol* 1969; 54: 373-91.
 15. Teiger E, Than VD, Richard L, *et al.* Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2891-7.
 16. Davies MJ. Apoptosis in cardiovascular disease. *Heart* 1997; 77: 498-501.
 17. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, *et al.* Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 859-70.
 18. Krown KA, Page MT, Nguyen C, *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854-65.
 19. Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 14860-6.
 20. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, *et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.
 21. Guerra S, Leri A, Wang X, *et al.* Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res* 1999; 85: 856-66.
 22. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57: 1835-40.
 23. Tomanek RJ, Taunton CA, Liskop KS. Relationship between age, chronic exercise, and connective tissue of the heart. *J Gerontol* 1972; 27: 33-8.
 24. Michel JB, Salzmann JL, Ossondo Nlom M, *et al.* Morphometric analysis of collagen network and plasma-perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 1986; 81: 142-54.
 25. Holubarsch CH, Holubarsch T, Jacob R, Medugorac I, Thiedemann K. Passive elastic properties of myocardium in different models and stages of hypertrophy; a study comparing mechanical, chemical and morphometric parameters. *Perspect Cardiovasc Res* 1983; 7: 323-36.
 26. Gilbert PL, Siegel RJ, Melmed S, Sherman CT, Fishbein MC. Cardiac morphology in rats with growth hormone producing tumors. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 805-11.
 27. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 547-9.
 28. Kim S-K, Kwon G-Y, Chang E-S. Expression of natriuretic peptide mRNAs is isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2000; 4: 235-41.
 29. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, *et al.* Localization of types I, III and I collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 103-13.
 30. Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, *et al.* Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 267-76.