한국전자현미경학회지 제 27 권 제 2 호 1997
Korean J. Electron Microscopy 27(2), 121~130(1997)

Isoproterenol 투여로 유발된 심근세포 손상에 미치는 diltiazem의 영향*

김 현 · 장대영 · 라봉진 · 김호덕
중앙대학교 의과대학 조직학교실

Effects of Diltiazem on Isoproterenol-induced Myocardial Cell Wounding in the Rabbit

Kim Hyun, Dae Yung Chang, Bpng-jin Rah and Ho-dirk Kim
Department of Histology, College of Medicine,
Chung-Ang University Seoul 156-756, Korea
(Received March 25, 1997)

ABSTRACT

It has been demonstrated that majority of cells in the mammalian body such as myocytes and epithelial cells of skin and intestine respond to mechanical force or environmental factors and exhibit partial disruption of cell membrane, i.e., cell wounding, even in a physiological condition. Myocardial cells are rather apt to be wounded than other cells since they are definitely exposed to mechanical stress by contraction-relaxation and blood flow. However, the mechanism how myocardial cells protect themselves against cell wounding is not yet clarified. On this background, the present study was performed to elucidate whether albumin leakage is related to cell wounding and to assess whether diltiazem, a potent calcium channel blocker, is beneficial in isoproterenol-induced cell wounding in the heart. Hearts isolated from New Zealand White rabbits (1.5~2.0 kg body weight, n=20) were perfused with Tyrode solution by Langendorff technique. After stabilization of baseline hemodynamics, the hearts were subjected to bolus administration of isoproterenol and diltiazem as following order: 1.6 μM isoproterenol at zero min (the beginning point); 16 μM diltiazem at 20 min; 1.6 μM isoproterenol at 25 min; 16 μM isoproterenol at 45 min; 160 μM diltiazem at 65 min; 16 μM isoproterenol at 70 min. During all experiments, the left ventricular function was recorded, albumin leakage in the coronary effluents was analyzed by electrophoresis and Western blot, and myocardial cell membranes were examined by conventional transmission electron microscopy. Data were analyzed by t-test and linear regression test. Isoproterenol significantly increased the inotropic and chronotropic contractions, coronary flow, and frequency of arrhythmia,

* 이 연구는 1996년도 중앙대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

however, diltiazem did not influence on hemodynamics except decrease in the frequency of arrhythmia and a slight decrease in contractility. Isoproterenol also resulted partial disruption of myocardial cell membrane and increse in albumin leakage, while diltiazem pretreatment showed number of electron-dense plaques in the cell membrane and a tendency of decrease in albumin leakage. These results indicate that albumin leakage may be an indirect index of cell wounding in the heart and diltiazem may be beneficial to protect myocardial cells against isoproterenol-induced cell wounding. It is likely that diltiazem promotes resealing process of the cell membrane.

Key words : Albumin leakage, Diltiazem, Isoproterenol, Myocardial cell wounding, Rabbit heart

서 론

포유동물의 신체를 구성하는 모든 세포는 정상적으로도 손상을 받을 수 있는 스트레스, 즉 기계적인 힘(mechanical force)에 노출되어 있다. 골격근을 일예로 들면 여러 단계의 스트레스에 대하여 미묘한 차이의 반응을 나타내는데 과도한 운동을 할 경우에는 근세포의 비대가 일어나고 사용치 않을 때는 위축이 일어난다. 이와 같이 골격근 세포는 손상을 받은 경우 고유의 길이를 잃기 때문에 근세포속에 들어 있던 효소들이 혈중으로 유출되거나 근원섬유의 형태학적 변형 등이 나타나게 된다. 포유류의 조직중 특히 피부는 기계적인 스트레스에 대하여 끊임없이 반응하여 새로운 세포를 만들어 냄으로서 기계적인 스트레스에 의하여 손상된 세포나 조직의 항상성을 적절히 유지할 수 있다(McNeil, 1993). 이와 같이 정상적인 상태에서도 포유동물에서는 세포가 사망에 까지는 이르지 않으나 세포막의 부분적인 결손을 나타내는 이른바 세포손상(cell wounding)이 끊임없이 일어나고 있다. 심장은 발생시점부터 개체의 사망까지 수축-이완을 계속하며 혈류역학적으로도 어떤 다른 세포보다 많은 기계적인 스트레스를 받는 기관임은 주지의 사실이다. 그러나 심근세포는 피부조직 등과는 달리 재생능이 거의 없는 조직으로 알려져 있어 계속되는 기계적인 스트레스에 대하여 어떻게 스스로를 보호하는가 하는 점에 대하여는 세포생물학적인 측면뿐 아니라 임상적인 측면에서도 중요한 관심사가 아닐 수 없다. 이에 관한 기전은 잘 알려져 있지 않으나 심근세포 세포골격(김호덕, 1996; Kim, 1996), 심근세포내에서 유리되는 보호물질(Clarke *et al.*, 1993) 등이 기계적인 스트레스에 대하여 세포를 보호할 것으로 추측하고 있다.

Isoproterenol (dl-β-[3, 4-dihydroxyphenyl]-α-isopropylaminoethanol, 이하 Iso)은 β아드레날린성 수용체에 주로 작용하는 교감신경흥분성의 아민(amine)으로서 임상적으로는 기관지확장 또는 강심을 목적으로 사용되고 있다. 그러나 Iso 사용으로 부정맥 발생이 빈번히 일어나며 반복 혹은 다량 사용할 때에는 심정지까지도 일어날 수 있음이 보고되었고(Lockett, 1965), Rona (1985) 등은 Iso 투여로 심근괴사를 수반하는 여러 가지 중독증상이 일어남을 실험적으로 증명하였다. Jennings와 Ganote (1974)는 Iso 투여시 심근세포 미세구조에 현저한 변화가 일어남을 관찰하였으며 이러한 미세구조의 변화는 심근세포에 칼슘과부하를 유발함으로서 일어남이 밝혀진 바 있다(Fleckenstein *et al.*, 1975). 한편, 칼슘통로 차단제로 알려진 diltiazem (이하 Dz)의 전투여에 의하여 카테콜아민이나 과량의 칼슘투여로 유발된 심근세포손상을 억제하는 효과가 있음이 실험적으로 증명되었으며(Kim and Rah, 1988) 이러한 심근세포 손상억제 효과는 아마도 Dz에 의하여 심근세포막의 통합성(integrity)이 적절히 유지됨으로서 나타날 것으로 추측되고 있다(Rah *et al.*, 1994).

이상으로 본 연구에서는 비교적 적은 용량 투여에서도 심근세포에 세포손상을 초래하는 것으로 알려진 Iso를 투여하여 세포막 손상의 표지로 제안되고 있는

알부민 유출(McNeil, 1993)이나 심근세포막의 형태학적 변화를 관찰하고 Dz를 전투여했을 때 알부민 유출 및 심근세포막의 통합성 유지에 어떤 차이가 있는지를 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

일정한 환경하에서 복합사료와 물을 제한없이 주어 사육한 New Zealand White종 토끼(체중 1.5~2.0 kg; n=20)를 암수의 구별없이 실험동물로 사용하였다. 실험동물에게는 도살 24시간 전부터는 물만 주었으며 무작위로 선택하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 화학약품은 모두 Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물의 처치

모든 실험은 미국 생리학회에서 추천하는 실험동물 사용지침에 따라 실시하였다. Heparin (300 IU/kg)을 복강내로 투여하고 30분이 경과한 후 실험동물의 후두부를 강타하여 실신시켜 즉시 흉부를 절개하고 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 미리 냉각시켜둔 생리식염수에 담구어 대동맥에 카눌라를 삽관하고 견봉합사로 묶은 후 심장관류장치(Size 5, Hugo Sachs Elektroniks, March-Hugstetten, Germany)에 고정하여 non-recirculating Langendorff 방법에 따라 산소로 포화된 Tyrode용액 (containing in mmol: NaCl 140.0, KCl 4.4, $CaCl_2$ 1.5, $MgCl_2$ 1.0, HEPES buffer 3.0, and glucose 10.0; pH 7.4)으로 관류하였다. 심장 적출후 관류장치에 매달기까지는 60초 이내에 이루어졌으며 실험중 관류액의 온도와 심장을 매다는 방의 온도는 37°C로, 관류압과 관류량은 각각 60 mmHg, 35 ml/min으로 유지하였다.

3. 실험원안

심장을 Tyrode용액으로 15~20분 동안 관류하여 심박동이 비교적 일정히 유지되기 시작하면 suction electrode를 우심방 외벽에 2~3 mm 간격으로 붙이고 전기자극기(Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)로 심박동수는 150/min (4V, 0.5 msec interval)로 좌심실이완말기압(LVEDP)은 10 mmHg를 넘지 않도록 조정한 후 50분 동안 관류하여 심장기능이 일정히 유지되게 하여(이 기간을 기준선 혈류역학값(baseline hemodynamics)으로 설정함) Fig. 1에 제시된 것과 같이 실험을 실시하였다. Iso 단독투여와 Dz 전투여후 Iso 투여로 일어나는 좌심실의 반응을 보기위하여 실험시작점에서 1.6 μM의 Iso를 일차 투여하였다. 20분후 다시 16 μM의 Dz를 투여하고 5분후 1.6 μM의 Iso를 재투여하였다. 20분후 다시 16 μM의 Iso를 일차 투여하고 20분이 경과한 후 160 μM의 Dz를 투여하였다. 5분후 다시 16 μM의 Iso를 재투여하고 20분 동안 Tyrode 용액으로 계속하여 관류하였다. Dz와 Iso는 각각 1 ml의 Tyrode용액에 녹여 대동맥에 연결된 카눌라를 통해 bolus로 투여하였다. 전 실험기간 중 latex balloon을 폐정맥을 통하여 좌심실에 삽입하고 압력전달장치(pressure transducer, Harvard Apparatus)에 연결하여 좌심실압, 이의 미분값(dP/dt), 심박동수 등을 curvilinear polygraph (Harvard Apparatus)에 각각 기록하였다.

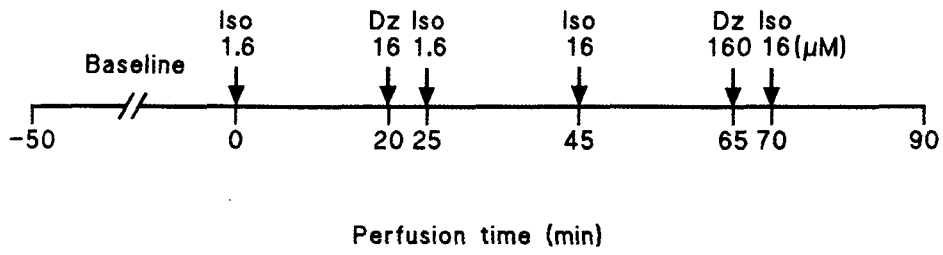


Fig. 1. Schematic illustration of experimental protocol. Arrows indicate points of bolus administration of isoproterenol (Iso) and diltiazem (Dz).

4. 관혈류 (coronary flow, CF)의 측정

관류를 시작하여 심장기능이 일정히 유지되게 한 후 관류액의 누출을 방지하기 위하여 폐동맥과 대정맥을 견봉합사로 묶은 후 우심방을 통하여 우심실내로 카뉼라를 삽관하고 관류액이 잘 흐르도록 고정하여 관혈류를 측정하였으며 ml/min으로 표기하였다.

5. 알부민 유출

Iso와 Dz를 투여한 직후 각각 1분 동안 폴리에틸렌 시험관에 유출된 관류액을 모아 vortex로 균질화하고 150 μl를 취하여 Laemmli (1970)의 방법으로 12.5% acrylamide 젤을 사용하여 전기영동(30 mA, 4 hrs)하였다. 전기영동후 Coomasie blue (0.1%)로 염색하여 10% 초산과 50% 메타놀로 탈색하였다.

전기영동에서 나타난 단백질 띠의 알부민 여부를 가리기 위하여 항알부민 다클론 항체(1 : 50)를 이용, Western blot를 각각 3회 실시하여 확인하였으며 이들의 반응정도(intensity)를 완충액 150 ml중 알부민 2 μg을 포함하는 대조 sample의 반응정도와 비교하였다.

6. 투과전자현미경 관찰

위의 실험과는 별도로 Iso 및 Dz 투여로 인한 심근세포막의 미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 기준선 혈류역학치가 유지되면 1.6 μM의 Iso를 10분 동안 관류하거나(n=3) 16 μM의 Dz를 5분 동안 관류하고 1.6 μM의 Iso를 10분 동안 관류하여(n=3) 서로 비교하였다. 실험조작후 각각의 좌심실을 일부 분리하여 3% glutaraldehyde (in 0.1 M carcodylate buffer, pH 7.4, 4℃)로 고정한 후 veronal acetate buffer로 씻고 통상적인 시료처리 과정을 거쳐 Epon 812에 포매하였다. 준박절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 심근세포를 확인한 후 70 nm 두께의 박절편을 만들어 uranyl acetate 및 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(Jeol 200CX, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

7. 통계처리

모든 통계수치는 평균±표준편차(SD)로 표기하였다. 약물투여후 각각의 척도의 변화 정도를 기준선의 혈류역학값과 비교하기 위하여 t-test로 검정하였으며, 심박동수의 변화추이는 회기직선식으로 유의성을 검정하였다. p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 좌심실의 기능 척도의 변화

기준선의 LVDP (left ventricular developed pressure, 좌심실 수축기 최대압과 이완말기압의 차), 심근수축력(dP/dt), 심박동수 및 LVEDP는 각각 83.5±6.6 mmHg, 925±96 mmHg/sec, 150±0 bpm (beats/min), 8.0±0.0 mmHg이었다.

Iso를 투여하면 양성변력성(inotropic) 및 변시성(chronotropic) 수축이 크게 증가하였으며 심실 조기수축 등 부정맥의 발생이 현저한 반면, Dz 투여시에는 변력성 수축이 약간 저하되었으며 부정맥 발생을 거의 볼 수 없었다(Fig. 2). 1.6 μM의 Iso를 일차 투여하면 LVDP는 기준선 값의 194%까지 급상승하였다가 1분 이내에 81% 정도로 감소한 후 서서히 증가하여 97% 정도를 유지하였다. Dz (16 μM) 투여후 LVDP는 1분 이내에 기준선 값의 76%까지 감소하였으며 이후 서서히 증가하여 95% 정도로 유지되었다. Iso (1.6 μM)를 이차 투여하면 LVDP는 기준선 값의 190%까지 증가하였다가 2~3분이 지나면 기준선 값의 74%로 감소하였으며 이후 서서히 증가하여 기준선 값의 96% 정도로 유지되었다. 16 μM의 Iso를 다시 투여하면 LVDP는 기준선 값의 204%까지 급격히 증가하였다가 1분 이내에 감소하여 5분이 경과하면 기준선 값의 78%까지 도달하였으며 이후 서서히 증가하여 기준선 값의 90% 정도로 유지되었다. 다시 160 μM의 Dz를 투여하면 LVDP는 기준선 값의 51%까지 감소한 후 상승하기 시작하여 3~4분이 경과하면 79%까지 증가하였다. Iso (16 μM)를 이차 투여하면 LVDP는 기준선 값의 202%까지 증가하였다가 2~3분 이내에 71%로 감소후 서서히 증가하여 기준선 값의 92% 정도를 유지하였다. 이상으로 Iso를 투여하면 LVDP는 급격히 상승하고 Dz를 투여하면 감소함을 알 수 있었으며 심근수축력도 LVDP와 비슷한 변화양상을 나타

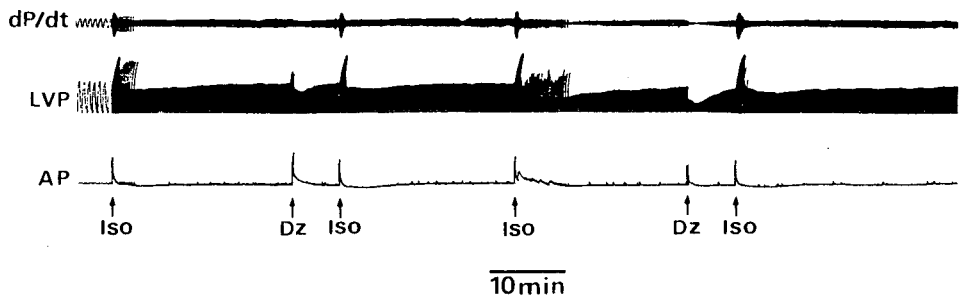


Fig. 2. Polygraph tracing of dP/dt, left ventricular pressure (LVP) and aortic pressure (AO) during experiment. Isoproterenol (Iso) increases inotropic and chronotropic contraction and frequency of arrhythmia; in contrast, diltiazem (Dz) reduces frequency of arrhythmia.

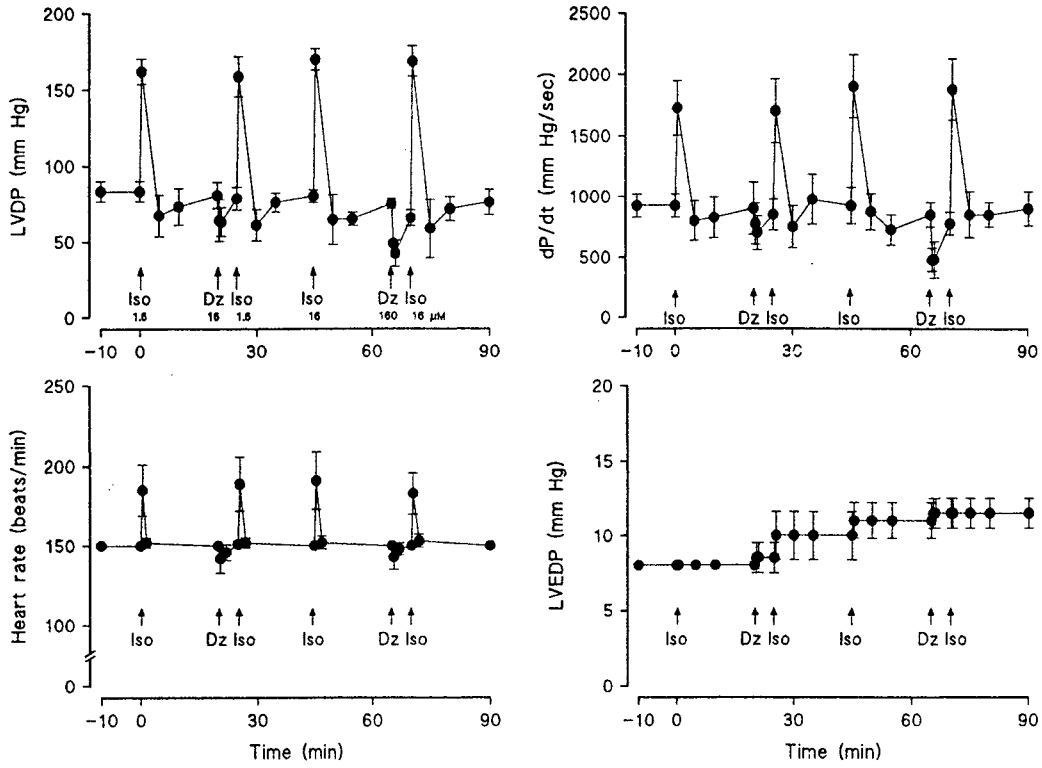


Fig. 3. Changes in the left ventricular developed pressure (LVDP), contractility (dP/dt), heart rate, and the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) after administration of isoproterenol (Iso) and diltiazem (Dz). Iso significantly increases the LVDP, dP/dt and heart rate, while Dz slightly decreases these parameters. LVEDP is tended to progressively increase in accordance with perfusion time.

내었다.

1.6 μM의 Iso를 일차 투여하면 심박동수는 185±16 bpm으로 급상승하였다가 1분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. Dz (16 μM)를 투여하면 1분 이내에 142±9 bpm으로 감소하였다가 기준선 값으로 회복하였으며 Iso (1.6 μM)를 이차 투여하면 심박동수는 189

±17 bpm으로 증가하였다가 2~3분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. 16 μM의 Iso를 다시 투여하면 심박동수는 191±18 bpm으로 급격히 증가하였다가 1분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. 다시 160 μM의 Dz를 투여하면 심박동수는 143±8 bpm으로 감소하였다가 기준선 값으로 회복되었으며 Iso (16 μM)를 이차 투여하면 183±13 bpm으로 증가하였다가 2~3분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. 이상으로 Iso를 투여하면 심박동수는 현저히 증가하나 Dz 투여는 심박동수에 큰 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다(Fig. 3).

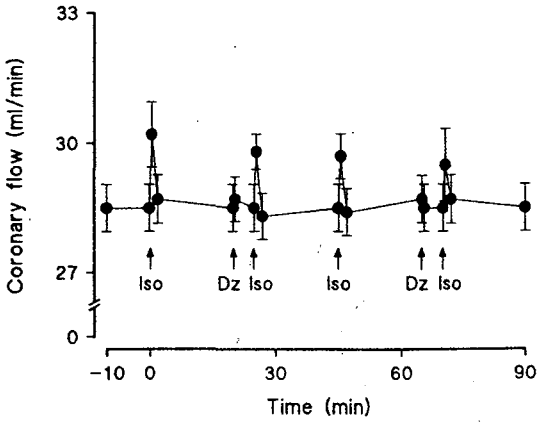
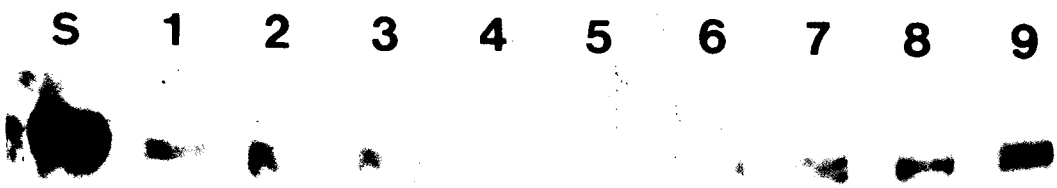


Fig. 4. Changes in the coronary flow after administration of isoproterenol (Iso) and diltiazem (Dz). Iso significantly increases the coronary flow but Dz does not influence on the coronary flow.

Iso나 Dz를 투여하더라도 LVEDP에는 큰 변화를 나타내지 않았으며 관류시간이 증가함에 따라 LVEDP는 서서히 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3; Y=7.98+0.05X, r2=0.89, p<0.01).

2. 관혈류량(CF)의 변화

기준선의 관혈류량은 28.5±0.55 ml/min이었다. 1.6 μM의 Iso를 일차 투여하면 CF는 30.2±0.75 ml/min으로 증가하였다가 2분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. Dz (16 μM) 투여후 CF는 28.7±0.52 ml/min으로 기준선 값과 큰 차이를 나타내지 않았으나 Iso (1.6 μM)를 이차 투여하면 29.8±0.41 ml/min으로 증가하였다가 2~3분이 지나면 기준선 값으로



S: standard containing 2 μg albumin in 150 μl buffer
1: Baseline
2: Just after 1.6 μM Iso treatment
3: 20 min after 1.6 μM Iso treatment
4: Just after 16 μM Dz treatment
5: Just after 16 μM Dz and 1.6 μM Iso treatment
6: Just after 16 μM Iso treatment
7: 20 min after 16 μM Iso treatment
8: Just after 160 μM Dz treatment
9: Just after 160 μM Dz and 16 μM Iso treatment

Fig. 5. Western blot analysis of albumin leakage. Albumin leakage significantly increases after isoproterenol (Iso) administration, however, diltiazem (Dz) does not change or increase albumin leakage.

감소하였다. 16 μM의 Iso를 투여하면 CF는 29.7±0.52 ml/min으로 증가하였다가 2분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. 다시 160 μM의 Dz를 투여하면 CF는 28.5±0.55 ml/min으로 변화가 없었으며 Iso (16 μM)를 이차 투여하면 29.5±0.84 ml/min으로 증가하였다가 2~3분 이내에 기준선 값으로 감소하였다. 이상으로 Iso 투여는 CF를 현격히 증가시키나($p<0.01$) Dz 투여는 CF에 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

3. 알부민 유출

항알부민 다클론항체에 대한 대조 sample의 반응 정도에 비해 기준선에서는 적은 양의 알부민 유출이 관찰되었으나 1.6 μM의 Iso를 일차 투여하면 심근세포로부터의 알부민 유출은 비교적 뚜렷히 관찰되었고 20분이 경과한 후에는 약간 감소하였다. 16 μM의 Dz를 투여하면 알부민 유출이 뚜렷히 감소함을 나타내었으며 5분후 1.6 μM의 Iso를 이차 투여하더라도 알부민 유출 정도에는 큰 변화를 나타내지 않았다. 그러나 16 μM의 Iso를 다시 투여하면 알부민 유출은 다시 증가하는 경향을 나타내었으며 이와 같은 경향은 16 μM의 Iso 투여후 20분이 경과하였거나, 160 μM의 Dz 투여, 16 μM의 Iso 이차 투여에도 큰 변화를 나타내지 않았다(Fig. 5).

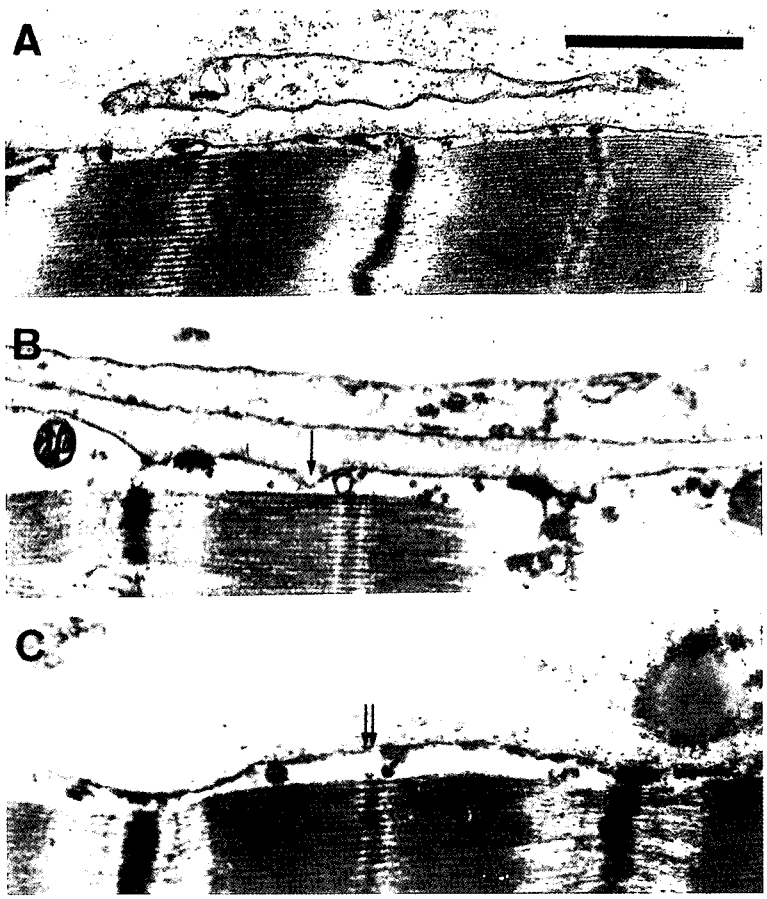


Fig. 6. Ultrastructure of the myocardial cell membrane. Cell membrane is intact and the glycocalyx is well preserved in the control (A); however, partial disruption of the cell membrane (arrow) is seen in the wounded cell by isoproterenol (B); cell membrane in the diltiazem-pretreated heart (C) is relatively intact and contains numbers of electron-dense plaques (double-arrow). Bar=1 μm.

4. 심근세포막의 미세구조 변화

아무런 처리를 하지않은 정상의 심근세포막은 세포막의 연속성이 뚜렷하였으며 당피(glycocalyx)층도 비교적 잘 보존되어 있었다(Fig. 6A). Iso를 투여한 실험군의 심근세포막은 곳곳에 세포막의 불연속을 나타내었으나 당피층의 변화는 뚜렷치 않았다(Fig. 6B). 그러나 Dz를 먼저 투여하고 Iso를 투여한 경우의 심근세포막에서는 세포막에서 많은 전자밀도가 높은 플라크(plaque)들이 관찰되었고 연속성을 이루었다(Fig. 6C).

고 찰

1. Isoproterenol 및 diltiazem이 심근세포에 미치는 영향

Iso는 Konzett (1940)에 의해 처음으로 약리작용이 알려진 이래 동물실험이나 임상 연구대상으로 자주 사용되고 있는 약물이다. Iso는 α아드레날린성 수용체에는 거의 작용하지 않고 β아드레날린성 수용체의 N-alkyl기를 치환하여 작용을 나타내는 강력한 교감신경흥분성의 아민이다. Iso는 모든 β아드레날린성 수용체에 강력한 작용을 나타내기 때문에 심장, 기관평활근, 골격근의 혈관계, 장관 등에 주로 그 작용을 나타낸다. 따라서 Iso를 약용량으로 사용하면 말초혈관 저항을 저하시키므로 심박출량과 수축기 혈압이 상승되며 기관과 장관 평활근이 이완되는 작용이 있어서 임상적으로는 강심이나 기관지확장을 목적으로 사용되고 있으나 독성이 매우 강한 것으로 알려져 있다. Iso의 투여로 일어나는 급성 중독이나 부작용은 같은 카테콜아민 계통 약물인 에피네프린 투여로 일어나는 것보다 그 정도가 덜 심한 것으로 알려져 있으나 Rona들(1959)은 흰쥐에 경피적으로 Iso를 투여하여 심근괴사를 수반하는 여러 가지 독성 증상이 일어남을 실험적으로 증명하였으며 Lockett (1965)는 임상적으로 Iso 투여시 부정맥 발생이 빈번하며 반복 혹은 대량 사용으로 심근괴사가 유발되어 심정지까지도 일어날 수 있음을 보고하였다. 이후 Iso 투여로 심근세포막 파괴, 사립체 종창, Z선의 비후, 세포사이 연접의 해리, 심근세사 해리, 핵질의 농축, 심근세포내 수분축적 등 심근세포 미세구조의 현저한 변화가 초래됨이 밝혀졌고(Jennings and Ganote, 1974) 이러한 독성 증상들은 칼슘과부하가 그 유발인자인 것으로 알려져 있다(Fleckenstein *et al.*, 1975). 또한 적출 관류 토끼심장을 이용한 실험으로 과량의 칼슘을 투여할 경우 Iso 투여로 일어나는 위에서 열거한 심근세포 미세구조의 변화들과 같은 변화들이 일어남이 증명되었다(Kim and Rah, 1988).

본 실험에서도 비교적 낮은 농도의 Iso를 bolus로 투여한 결과 양성 변시성 및 변력성 수축, 관혈류량 등이 일시적으로 증가하였으며 특히 심근세포막에서는 국소적으로 손상을 입은 부위들이 자주 관찰되었다. 이에 반하여 Dz를 전투여하고 5분후 Iso를 투여한 경우(특히 Dz 160 μM을 전투여하면) 양성 변력성 수축은 감소하였으나 변시성 수축에는 변화가 없었고 관혈류에도 큰 영향을 미치지 않았다. Iso 투여시 관혈류량이 증가한 원인은 확실치 않으나 본 실험결과로 미루어 β아드레날린성 수용체 자극에 따라 양성 변시성 및 변력성 수축의 증가로부터 초래된 이차적인 현상으로 추측된다. 그러나 Dz를 전투여할 경우 Iso를 투여한 후 나타나는 부정맥의 발생빈도가 현저히 감소한 것은 Dz 자체가 β아드레날린성 수용체에 직접 작용하여 일어난 것인지 또는 다른 기전으로 나타난 것인지는 명확하지 않으나 Dz 전투여후 심근세포막에 나타난 전자밀도가 비교적 높은 플라크의 출현으로 미루어 볼 때 Dz는 심근세포막의 인지질층의 통합성을 유지하게 하여 일차적으로 심근세포 밖에서 안으로 들어오는 칼슘량을 조절 가능하게 함으로서 심근세포를 보호하는 것으로 추측된다. 심근세포막에 나타난 플라크가 어떤 물질들을 포함하고 있는지는 알 수 없지만 그 형태학적 특성으로 미루어 플라크는 기니픽을 대상으로 한 실험에서 Dz를 전투여할 경우 심근세포막, 특히 심근세포막의 내측에서 관찰된 칼슘을 포함한 다수의 미소과립과 동일한 구조물일 가능성이 높다. 따라서 Dz에 의한 심근세포 보호효과는 사립체나 근형질내세망 등에서의 칼슘조절에 의한 것이라기 보다는 심근세포막의 통합성 유지로부터 기인하는 칼슘차단 효과와 보다 더 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다(Rah *et al.*, 1994).

2. 심근세포막 손상과 알부민 유출

알부민은 약 69 kDa의 비교적 작은 분자량을 가진 혈장 단백질로서 간에서 만들어지며 혈장 삼투압 유지에 가장 핵심적인 기능을 수행하는 이외에 혈장내에 존재하는 약물이나 이온 등을 세포내로 전달해주는 운반체(carrier) 역할을 수행함은 잘 알려져 있다. 알부민은 정상적인 구조를 가진 세포막은 통과할 수 없으나 세포막중 정상 구조를 상실한 부분을 통해 세포내를 들어갈 수 있다. 심근세포는 부단히 수축-이완을 함으로서 지속적인 기계적인 힘에 노출되어 치명적 손상은 아니라 하더라도 이른바 세포손상(cell wounding)을 입을 수 있고 이러한 현상 즉, 부분 결손은 정상상태에서도 25% 정도의 심근세포에서 관찰되는 것으로 보고되고 있다(Clarke *et al*., 1993). 그러나 정상 상태에서는 손상을 입은 세포막은 재건되지 못하고 완전히 파괴에 이르는 것이 아니라 재구축(resealing)으로 형태학적 및 기능적으로 재건되는 것으로 알려져 있는데, Iso를 투여한 심근세포(Padua and Kardami, 1993)나 운동후의 골격근(Morrow *et al*., 1990)에서는 bFGF (basic fibroblast growth factor)에 대한 mRNA 표현이 증가되며 특히 적출 관류 흰쥐심장에서 Iso를 투여하면 관류액중에 bFGF 유리의 증가가 일어나는 것으로 미루어 세포막의 결손부위를 통해 세포내에서 밖으로 유리되는 bFGF에 의하여 결손부위의 재건이 일어나는 것으로 추측하고 있다(Clarke *et al*., 1993).

본 연구 결과 심장 유출액에 포함된 알부민의 양은 기준선 값에 비하여 Iso를 투여한 경우 현저히 증가하였으나 Dz 16 μM을 전투여한 경우 알부민 유출은 감소하였다. 이와는 대조적으로 160 μM의 Dz를 전투여하고 16 μM의 Iso를 투여한 경우 심장 유출액중의 알부민 양에는 거의 변화가 나타나지 않았다. 16 μM의 Dz를 전투여한 후 알부민 유출이 감소한 것은 관류액에 의하여 wash-out되는 알부민 양이 시간의 흐름에 따라 감소하여 나타난 결과로 해석할 수 있으나 16 μM의 Iso 투여후 Dz 전투여와는 관계없이 알부민 유출이 계속된 것은 알부민 유출양과 관류액에 의한 wash-out 사이에는 관계가 거의 없음을 나타내는 것이다. 이상의 결과는 비교적 낮은 농도의 Iso 투여로 유발될 수 있는 심근세포막 손상은 Dz 전투여로 예방할 수 있으나 높은 농도의 Iso에서는 그 가능성이 매우 적어짐을 간접적으로 나타내고 있다. 이러한 결과로 미루어 알부민의 유출 정도는 세포막 손상정도를 추측할 수 있는 지표가 될 수 있을 것으로 생각되며 심근세포막에서 나타난 플라크는 Dz가 심근세포막의 결손부위 재구축 촉진과정에 관여함을 시사하는 것으로 생각된다.

결 론

근세포, 피부와 장관의 상피세포 등은 기계적인 힘이나 환경적 요인으로 정상상태에서도 세포막의 부분적 결손을 특징으로 하는 이른바 세포손상(cell wounding)을 나타내는 것으로 알려져 있다. 심근세포는 수축-이완으로 계속적인 기계적인 힘에 노출되어 있는 관계로 다른 어떤 조직이나 세포에 비하여 세포손상을 일으킬 수 있는 기회가 높다. 본 연구에서는 적출 토끼심장을 이용하여 심근세포에 세포손상을 일으키는 것으로 알려진 Iso를 투여한 후 심근세포막의 변화와 알부민 유출 정도를 관찰하고 칼슘길항제인 Dz를 전투여하여 Dz가 세포손상에 어떤 효과를 나타내는가를 관찰하였다. Iso 투여시 양성변력성 및 변시성 수축력, 심박수, 관혈류량 등은 현저히 증가하였으며 부정맥 발생이 현저하였으나, Dz 전투여시에는 변력성 수축만 다소 감소하였을 뿐 심박수, 관혈류량 등에는 거의 변화를 나타내지 않았으며 부정맥 발생빈도고 현저히 감소하였다. Iso를 투여한 경우 국소적으로 심근세포막의 손상과 알부민 유출이 증가하였으나 Dz를 전투여한 경우 심근세포막에는 전자밀도가 높은 플라크의 형성이 관찰되었으며 알부민 유출도 감소하는 경향을 나타내었다. 이상으로 Dz는 심근세포막의 결손부위 재구축을 촉진함으로서 Iso 투여로 일어난 세포손상으로부터 심근세포를 보호하는 것으로 생각되며 알부민 유출양은 심근세포막의 부분 결손 정도를 추측할 수 있는 간접적인 지표가 될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

김호덕, 김 현, 김현철, 라봉진, 1996. 사람태아 심장 근육세포에서 세포뼈대의 발육에 관한 연구: α- 와 β-

tubulin. 대한해부학회지 29, 31-40.

Clarke MSF, Khakee R, McNeil PL, 1993. Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. J. Cell Sci. 106, 121-133.

Fleckenstein A, Janke J, Döring HJ, Leder O. Key role of calcium in the production of noncoronarogenic myocardial necroses, in: Pathophysiology and Morphology of Myocardial Alteration, Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, vol. 6, Baltimore, University Park Press, 1975, pp.21-32.

Jennings RB, Ganote CE, 1974. Structural changes in myocardium during acute ischemia. Circ. Res. 34, 35(Suppl III), 156.

Kim HD, 1996. Expression of intermediate filament desmin and vimentin in the human fetal heart. Anat. Rec. 246, 271-278.

Kim HD, Rah BJ, 1988. Effects of diltiazem on isoproterenol- or Ca-induced ventricular myocardial cell injuries in isolated perfused rabbit heart: an electron microscopic study. Anat. Rec. 222, 260-271.

Konzett H, 1940. Neue broncholytisch hochwirksame Körper der Adrenalinreihe. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 197, 27.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophagè T4. Nature 227, 681-5.

Lockett M, 1965. Dangerous effects of isoprenaline in myocardial failure. Lancet ii, 104.

McNeil PL, 1993. Cellular and molecular adaptation to injurious mechanical stress. Trends Cell Biol. 3, 302-7.

Morrow NG, Kraus WE, Moore JW, Sanders-Williams R, Swain JL, 1990. Increased expression of fibroblast growth factor in a rabbit skeletal muscle model of exercise conditioning. J. Clin. Invest. 85, 1816-1820.

Padua RR, Kardami E, 1993. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) accumulation and distinct patterns of localization in isoproterenol-induced cardiomyocyte injury. Growth Factors 8, 291-306.

Rah BJ, Kim HD, Park YW, 1994. Effect of pretreatment with diltiazem on left ventricular function and intracellular calcium distribution in postischemic reperfused guinea-pig hearts. Coronary Artery Dis. 5, 415-423.

Rona G, 1985. Catecholamine cardiotoxicity. J. Mol. Cell. Cardiol. 17, 291-306.

Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R, 1959. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. Arch. Pathol. 67, 443.