

가토 허혈-재관류 심근에서의 Bcl-2 단백질 발현

류 재욱* · 김 삼현* · 서 필원* · 박 성식* · 최 창휴* · 류 경민*
김 영권** · 박 이태*** · 김 성숙****

=Abstract=

Expression of Bcl-2 Protein in Ischemia-Reperfused Myocardium of Rabbit

Jae-wook Ryu, M.D. *, Sam-Hyun Kim, M.D. *, Pil-Won Seo, M.D. *, Sung-Sik Park, M.D. *,
Chang-Hyu Choi, M.D. *, Kyoung-Min Ryu, M.D. *, Young-Kwon Kim, M.D. **,
Yee-Tae Park, M.D. *** , Sung-Sook Kim, M.D. ****

Background: Myocardial cell death after myocardial infarction or reperfusion is classified into necrosis and apoptosis. Bcl-2 protein is a cytoplasmic protein, which inhibits apoptosis and is expressed in acute stage of myocardial infarction but not in normal heart. This study was performed to investigate whether Bcl-2 protein was expressed respectively to the reperfusion time. **Material and Method:** Thirty nine New Zealand white rabbits weighing 1.5-4.8 kg (mean, 2.9kg) were allotted into 7 groups(n=5 in each group) which underwent left anterior descending coronary artery(LAD) occlusion for 30 minutes, followed by reperfusion. The animals were sacrificed at 1, 4, 8, 12, 24 hours, and 3, 7 days after occlusion. Ventricle was excised immediately after intervention. Tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Bcl-2 protein was detected by immunohistochemical stain with using monoclonal antibody against Bcl-2 protein. **Result:** The positive immunohistochemical reactivity for Bcl-2 protein was observed in 12, 24 hours, and 3 days reperfusion groups. Bcl-2 protein was detected in salvaged myocytes surrounding the infarcted area. **Conclusion:** Bcl-2 protein is expressed at the late acute stage of infarct. Therefore, the expression of Bcl-2 protein may not protect acute cell death, but may play a role in the prevention of late cell death after myocardial ischemia-reperfusion.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:924-30)

Key word : 1. Myocardial reperfusion
2. Myocardial protection

* 단국대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Cardiothoracic Surgery, College of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea

** 단국대학교 의과대학 내과학교실

Department of Internal Medicine, Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea

*** 청주성모병원 흉부외과

Department of Cardiothoracic Surgery, Chungju St. Mary's Hospital, Chungju, Korea

**** 울산대학교 의과대학 병리학교실

Department of Pathology, College of Medicine, University of Ulsan, Ulsan, Korea

논문접수일 : 98년 3월 31일 심사통과일 : 98년 5월 27일

책임저자 : 류재욱, (330-715) 충남 천안시 안서동 산16-9, 단국대의 흉부외과. (Tel) 0417-550-3983, (Fax) 0417-550-3984

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

다세포 생물이 생존하고 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해서는 세포증식과 세포사의 균형이 필요하다¹⁾.

세포사의 조절기전이 세포증식의 조절기전 못지않게 복잡하고 중요하다는 사실²⁾이 알려지면서 이에 대한 연구가 활발해지고 있다. 세포사는 내재되어 있는 사전계획된 세포사(programmed cell death)인 세포고사(apoptosis)와 유독한 자극 또는 손상에 의한 병적인 형태의 세포사인 괴사(necrosis)로 나뉘어진다³⁾.

세포고사의 형태학적 특성으로는 세포가 위축되며, 미토콘드리아의 팽창이 없거나 적고 세포막의 형태와 기능이 유지된다. 또한 세포질과 핵이 농축되고 핵 DNA가 약 180염기쌍으로 균일하게 분해되며 염증반응이 보이지 않는다. 반면 괴사는 세포와 미토콘드리아가 팽창되고 세포막의 기능이 소실되며, 핵 DNA가 불균일한 크기로 분해되고 심한 염증반응을 유발한다⁴⁾.

세포고사는 초기에는 손가락, 구개, 생식기, 신경 등의 발생과정과 같은 생리적 현상에서 발견되었으나 최근에는 바이러스 감염, 암, 항암제에 대한 세포독성, 방사선에 의한 세포독성, 온열 등 세포에 대한 스트레스, 재관류손상 등과 같은 병리적 현상에서도 발견되고 있다⁵⁾. 사멸의 역치(apoptotic threshold)를 변화시키면 이런 질환의 진행에 영향을 미칠 것이므로 새로운 치료분야로서 유용성이 기대된다⁵⁾.

심근 허혈-재관류에서 재관류의 영향을 평가하고자 했던 과거의 많은 연구에서 조직손상의 형태로서 괴사에 초점을 두었다. 그러나 세포사에는 괴사와 세포고사가 있으며⁶⁾, 최근 심장 재관류시 재관류손상으로 세포고사가 관여한다고 보고된 바 있다^{6,7)}.

심근세포의 재관류손상과 세포고사의 관계는 처음 Gottlieb(1994) 등이 가토 심근의 허혈-재관류 모델에서 세포고사가 정상심근 또는 허혈심근에서는 보이지 않았으나 허혈-재관류 심근에서만 관찰되어 세포고사가 심근세포의 재관류손상의 특징적인 형태이며 세포의 후기 사멸을 유발할 것이라고 처음 보고한 이후⁸⁾ 백서의 허혈 심근^{8,9)}과 허혈-재관류 심근⁹⁾, 사람의 경색 심근¹⁰⁾과 허혈-재관류 심근¹¹⁾에서도 세포고사가 존재하는 것으로 알려졌다.

세포고사의 대표적인 억제인자로서 *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma-2) 유전자의 생성물인 Bcl-2 단백질이 잘 알려져 있다. Bcl-2 단백질은 분자량 약 25KD의 세포질 단백질로 사람의 여포성 림프종의 14:18 염색체 전위(chromosomal translocation)를 포함하는 유전자에서 처음 발견되었으며 세포고사를 예방 또는 지연시켜 세포의 생존을 연장시킨다¹²⁾.

내외부로부터의 자극, 즉 사망 수용체의 활성화, 성장인자

의 저하, DNA 손상, 대사 또는 세포주기의 동요(metabolic and cell cycle perturbation)로부터 중심적인 세포사의 신호(central cell death signal)가 형성되고 이로부터 단백질분해효소의 활성화(activation)가 이루어지고 세포 표면에 변동이 생겨 세포탐식(phagocytosis)이 일어난다는 일련의 세포고사의 조절에 대한 모델에서, Bcl-2 단백질은 세포내 칼슘 또는 신호전달을 조절하여 중심세포사 신호와 단백질분해효소 활성화 사이의 과정을 차단하여 세포고사를 억제하는 것으로 설명되고 있다¹⁾.

Bcl-2 단백질이 존재하는 장기는 림프절, 흉선, 골수, 유방, 갑상선, 전립선, 췌장, 위장관계, 피부와 신경계 등이 있으며 정상심근에서는 존재하지 않는다고 알려졌으나¹³⁾, 최근 여러 연구에 의해 심장의 병적 상태에서 Bcl-2 단백질의 발현됨이 알려져 있다.

출생 직후 발육과정의 백서 심근에서 사전계획된 세포사(programmed cell death)와 Bcl-2 단백질의 발현이 확인되었으며 세포고사는 Bcl-2 단백질의 발현과 서로 상반된 관계라고 알려졌다¹⁴⁾.

사람의 심근경색에서의 세포고사에 관한 연구에서 세포고사는 이의 억제인자인 Bcl-2 단백질과 촉진인자인 Bax간의 비(ratio)에 따라 결정될 것이라는 가정하에 급성 심근경색, 진구성 심근경색 및 정상심근에서 Bcl-2 단백질과 Bax의 발현을 면역조직화학적(immunohistochemical) 방법으로 검색한 결과, Bcl-2 단백질은 급성 심근경색 환자에서 경색된 심근 주변의 구제된 심근에서만 발현되었으며, Bax는 정상심근, 급성 심근경색의 일부에서 미약하게 발현되었고 진구성 심근경색에서는 심하게 과발현되는 현상을 보고 Bcl-2 단백질의 발현과 Bax의 과발현이 심근 허혈 또는 허혈-재관류 후의 사람 심근을 세포고사로부터 보호하거나 이를 악화시키는데 매우 중요한 역할을 할 것이라고 보고된 바 있다¹⁵⁾.

치료를 반응하지 않는 울혈성 심부전 때문에 심장이식을 받은 수여자의 심근과 정상심근에서의 세포고사와 Bcl-2 단백질의 발현에 관한 연구에서 세포고사와 Bcl-2 단백질이 정상심근에 비해 심부전심근에서 높게 발현되어 탈보상된 사람 심장은 Bcl-2 단백질의 발현에도 불구하고 프로그램화된 세포사, 즉 세포고사가 유발된다고 알려졌다. 또한 이러한 현상이 심장기능부전의 점진적인 진행에 기여하는 것으로 보인다고 하였다¹⁶⁾.

한편, 가토 심근의 허혈 및 허혈-재관류 모델을 이용한 연구에서 재관류 시간을 달리하여 각군에서 Bcl-2 단백질과 세포고사를 검색한 결과, Bcl-2 단백질은 경색의 급성기 후기에 구제된 심근세포에서 발현되어 Bcl-2 단백질이 초기세포사는 예방하지 못하고 후기세포사를 예방할 것이라는 의견이 제시되었다¹⁷⁾.

그러나 심근 허혈-재관류에 있어서 재관류 시간을 더욱 세분화했을 때의 구체적인 Bcl-2 단백질 발현 양상의 변화에 대해서는 현재까지 연구된 바가 별로 없다. 이에 본 연구는 가토의 허혈-재관류 심근, 허혈 심근, 정상 심근조직에서 Bcl-2 단백질 발현 여부와, 허혈-재관류 심근에서 재관류 시간을 1, 4, 8, 12, 24시간, 3, 7일로 세분화하여 재관류 시간에 따른 발현의 변화를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 모델

실험동물은 평균무게 2.9Kg(1.5-4.8Kg)의 New Zealand 산 가토 39마리를 이용하였다. 정상 심근군(2마리)에서 심장에 아무런 조작을 하지 않고 심장을 적출하였다. 재관류 심근군(35마리)은 재관류의 각 시점당 5마리씩 7군으로 나누어 30분간 허혈 후 1, 4, 8, 12, 24시간, 3, 7일 동안 재관류한 후 심장을 적출하였다. 허혈 심근군(2마리)은 30분간 허혈 후 재관류 없이 바로 심장을 적출하였다.

정상심근을 채취하였던 가토에서 심장 적출후 흉선을 적출하여 Bcl-2 단백질 면역조직화학적 염색의 음성대조와 양성대조에 이용하였다.

2. 수술적 처치

1) 심근 허혈-재관류 모델

24G 혈관용 주사침으로 외이정맥을 확보하여 하트만/텍스트로즈 용액을 40cc/h 속도로 정주하였다. Thiopental sodium 10 mg/Kg을 정주하여 전신마취를 유도하였으며 필요에 따라 같은 용량을 반복하여 주사하였다. 마취된 가토를 수술대에 양위로 눕힌 후 기관지 절개 및 삽관을 하고 소동물용 인공호흡기(Harvard Rodent Ventilator; model 683)를 이용하여 room air로 호흡량 30cc, 분당 호흡수 35회로 양압호흡을 시켰다. 수술 부위의 체모를 제거한 후 좌측 네번째 늑간을 통해 개흉하고 심낭을 절개하여 심장을 노출시켰다. 관상동맥의 좌전하행지 주행부위인 좌심방이와 우심실 유출로 사이의 시야를 확보하여 좌전하행지를 6-0 prolene과 nelaton snaring으로 일시 결찰하였다. 효과적인 결찰 여부는 좌전하행지 주행 부위의 심근이 허혈로 인하여 색조의 변화를 보이며 국소심근운동이 변화하고 좌심방이 커지는 것으로 판정하였다. 좌전하행지를 결찰한지 30분 후에 실을 잘라 심근을 재관류시켰다. 재관류가 일어나는 것은 혈류의 재통으로 심근의 명백한 색조의 변화가 있거나 재관류 부정맥의 출현 중 한 가지 이상이 있으면 효과적인 재관류가 일어난 것으로 판정하였다. 절개 늑간보다 2번 아래의 늑간에 흉관을 삽입한 후 늑간 봉합, 근육층 봉합, 피부 봉합을 차례로 시행하

였다. 자발적인 호흡이 회복되는 것을 관찰하면서 미리 삽입했던 흉관에 음압을 가하여 흉강내 공기를 흡인한 후 흉관을 제거하였다. 가토를 호흡기로부터 이탈시켰다. 재관류 시작 후 정해진 시간(1, 4, 8, 12, 24시간, 3, 7일)이 경과하면 다시 같은 방법으로 마취를 하여 심장을 적출한 후 가토를 희생시켰다.

2) 심근 허혈 모델

심근 허혈 가토는 허혈-재관류 모델과 같은 방법으로 마취를 한 후 수술을 하였으나 좌전하행지를 30분간 결찰한 후 재관류 없이 즉시 심장을 적출하였다.

3) 정상 심근 모델

같은 방법으로 마취 유도하여 30분간 양압호흡을 시켰으며, 바로 심장을 적출하였다.

3. 조직처리 및 검사방법

적출한 심장을 생리식염수로 세척한 후 허혈-재관류 또는 허혈 부위가 포함되도록 횡으로 절개하여 심근조직을 채취하였다. 이를 10% buffered formalin에 고정하였다. 고정된 심근은 paraffin에 포매하였다. 정상심근은 허혈-재관류 부위와 유사한 부분의 심근을 횡으로 절개하여 채취한 후 마찬가지로 10% buffered formalin에 고정된 다음 paraffin에 포매하였다.

Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학 검사의 양성대조와 음성대조를 위하여 흉선조직을 심근조직과 같은 방법으로 paraffin에 포매하였다.

면역조직화학적 염색;

Bcl-2 단백질 발현 여부는 Bcl-2 단백질 발현되는 것으로 이미 알려진 흉선조직을 양성대조로 정하고 아래와 같은 방법으로 염색하여 Bcl-2 단백질 발현됨을 확인한 다음 심근조직을 검사하였다. Bcl-2 단백질에 대한 일차항체는 상판되는 것(monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein, M887, Dako Inc. Denmark)을 사용하였다. Paraffin에 포매된 조직을 5 μ m의 절편으로 깎아 xylene과 alcohol을 이용하여 탈파라핀과 함수화를 시켰다. Xylene에는 5분간 3회씩 담구었으며 alcohol은 100%, 90%, 80%, 70%의 순으로 각 2번씩 2분간 처치하였다. 비특이적인 단백질의 결합을 막기 위해 10% 염소 혈청으로 20분간 반응시키고 조직내 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3% hydrogen peroxide에 15분간 반응시켰다. 그 후 증류수로 2번 수세하고 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 5분간 담근 후 Bcl-2 단백질의 일차항체를 각각 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 다음 PBS로 5분간 3

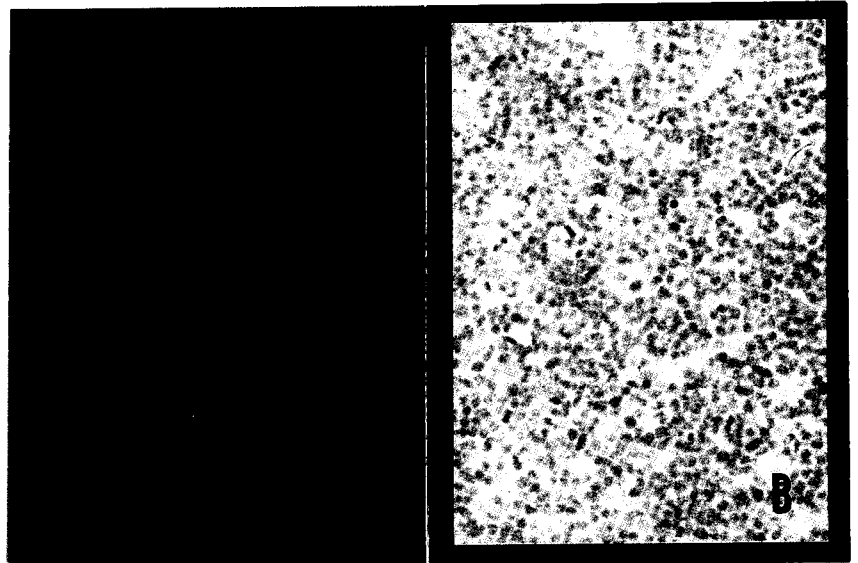


Fig. 1. Immunohistochemical findings of positive control(A) stained with dark brown color, and negative control(B) for Bcl-2 protein in thymic tissue(x400)

회색 수세한 후 antimouse IgG antibody Kit(Dako Inc.)를 사용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. Biotin이 결합된 link antibody를 20분간 반응시키고 PBS로 수세한 후 peroxide가 배합된 streptavidin을 20분 반응시킨 후 다시 PBS로 수세하였다. AEC(3-Amino-9-ethyl carbazole)로 발색하고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색한 후 수성 메디아로 포매하고 현미경으로 검색하였다. 음성대조로는 양성대조와 동일한 흉선 조직을 이용하여 Bcl-2 관련 항원에 대한 일차항체 대신 인산완충액으로 대체시키고 나머지 과정은 그대로 하여 이를 사용하였다.

결 과

Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학적 염색의 양성 대조군(흉선 조직, Fig. 1)과 심근 허혈-재관류군(Fig. 2)에서는 Bcl-2 단백질이 발현되었으나 허혈 심근군(Fig. 3), 정상 심근군(Fig. 4), 음성 대조군(Fig. 1)에서는 Bcl-2 단백질이 발현되지 않았다.

허혈-재관류군 중에서 12시간 재관류군의 5마리 중 3마리, 24시간 재관류군의 5마리 중 4마리, 3일 재관류군의 5마리 중 1마리에서 Bcl-2 단백질에 대한 양성염색반응이 관찰되었다.

Bcl-2 단백질이 발현된 심근세포는 구제된 심근에 분포하였다.

고 찰

심근 허혈-재관류에서 세포고사가 재관류손상의 특이한 형태일 가능성이 있다고 보고된 이후 여러 연구에 의해 심

근에서 세포고사의 존재가 확인되었다. Kajstura(1996) 등은 백서의 경색 심근에서 세포고사가 심근 허혈손상의 주된 형태라고 하였으며⁸⁾, Fliiss(1996) 등은 백서의 허혈-재관류 심근에서 재관류손상으로서 세포고사가 기여한다고 하였다¹⁸⁾. Veinot(1997) 등은 사람 심근에서 세포고사가 경색 직후의 초기 세포사의 주된 형태라고 보고하였다¹⁹⁾. 또한 Saraste(1997) 등은 사람의 허혈-재관류 심근에서 세포고사의 존재를 확인하고 세포고사가 재관류손상의 일부로 작용한다고 하였다¹¹⁾.

급성 심근경색¹⁵⁾, 울혈성 심부전¹⁶⁾ 등과 같은 병적 상태인 심근에서의 Bcl-2 단백질의 발현에 대해서는 이미 알려진 바 있으나 그 이외의 병적인 상태, 특히 재관류 심근에서 Bcl-2 단백질의 발현에 관해서는 알려진 바가 많지 않다.

Misao(1996) 등이 급성 심근경색(15명)과 진구성 심근경색(12명) 그리고 심장 이외의 질병으로 사망한 환자(정상심근, 10명)들의 사망 후 6시간 이내의 부검 심장을 대상으로 Bcl-2 단백질의 발현에 대해 조사한 연구에서, 급성 심근경색의 60%(15명 중 9명)에서만 Bcl-2 양성염색반응이 구제된 심근에서 관찰되었고 진구성 심근경색과 정상심근에서는 관찰되지 않았다. 즉 Bcl-2는 경색의 급성기에서만 발현되어 Bcl-2 단백질의 발현이 허혈 또는 허혈-재관류 후에 발생하는 사람 심근의 세포고사를 예방하는데 중요한 역할을 할 것이라고 하였다¹⁵⁾.

Ohno(1996) 등은 가토 심근의 허혈 및 허혈-재관류 모델을 이용하여 재관류 시간을 0, 4, 24시간, 2주일로 달리하여 western blotting 및 면역조직화학적 방법으로 Bcl-2 단백질을 검색하고 in situ nick end labeling(TUNEL)으로 세포고사를 검색한 결과 24시간 재관류군과 2주일 재관류군에서 Bcl-2 단백질이 발현되었고 4시간 재관류군과 24시간 재관류군에서 세

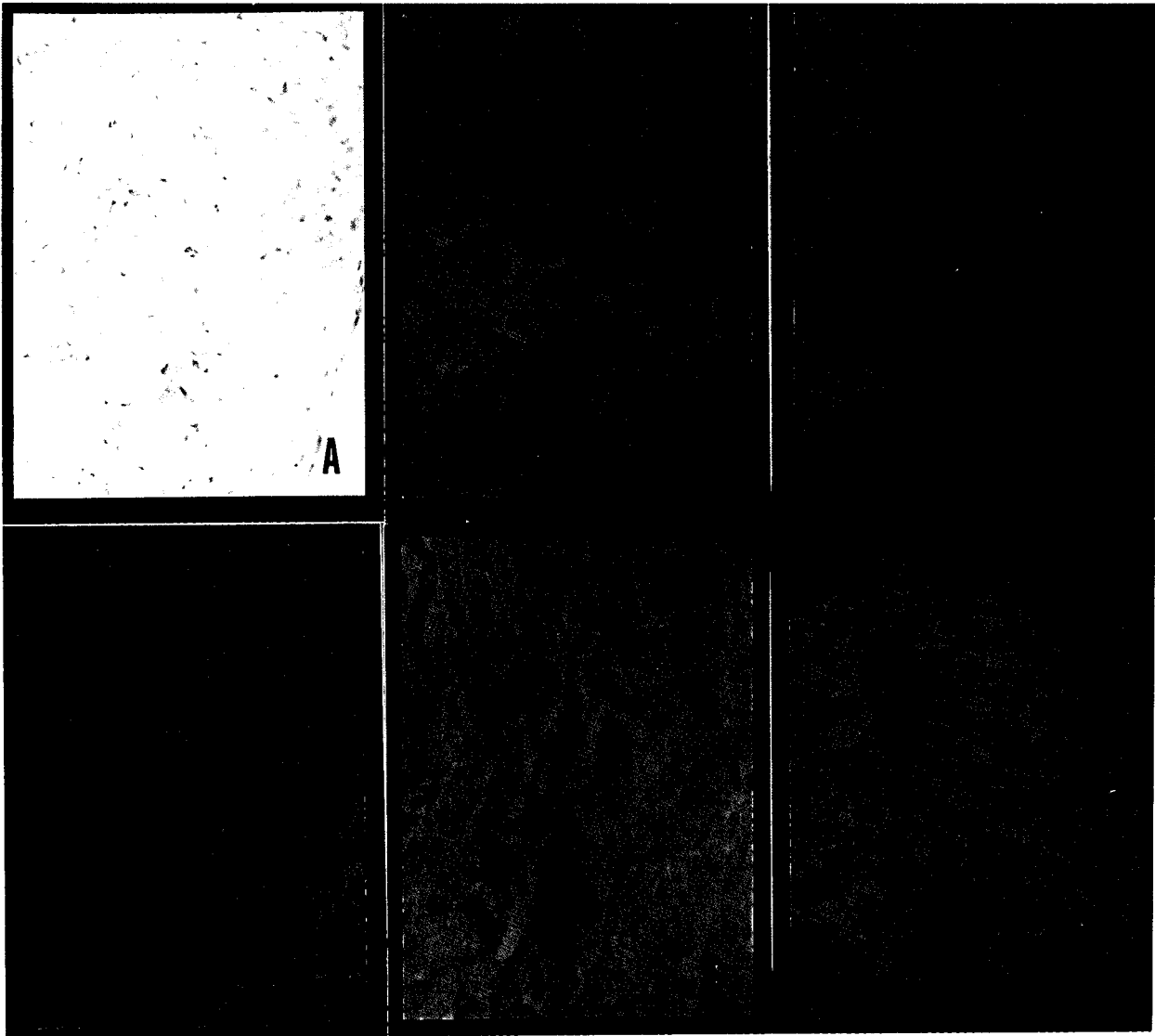


Fig. 2. Immunohistochemical findings of Bcl-2 protein in ischemia-reperfused myocardium. A, 1 hour reperfusion, Bcl-2(-),^{*}($\times 200$). B, 4 hour reperfusion, Bcl-2(-), ($\times 400$). C, 8 hour reperfusion, Bcl-2(-), ($\times 400$). D, 12 hour reperfusion, Bcl-2(+), ($\times 400$). E, 24 hour reperfusion, Bcl-2(+), ($\times 400$). F, 3 day reperfusion, Bcl-2(+), ($\times 400$).

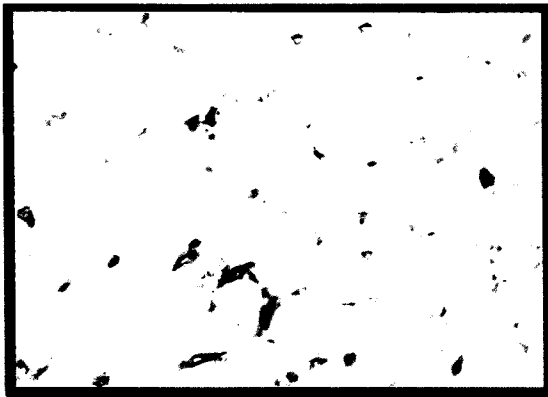


Fig. 3. Immunohistochemical finding of infarcted myocardium, Bcl-2(-), ($\times 400$).

포고사가 발현되었다고 보고하였다¹⁷⁾. 본 연구에서는 재관류 시간을 0, 1, 4, 8, 12, 24시간, 3, 7일로 더욱 세분화하여 Bcl-2 단백을 검색한 결과 12시간, 24시간, 3일 재관류군에서 Bcl-2 단백질에 대한 양성염색반응이 관찰되어 Ohno 등의 연구에서 검사하지 않았던 재관류 시간군(12시간, 3일)에서도 Bcl-2 단백질의 발현이 본 연구에서 확인되었으며, 24시간 재관류군은 Ohno 등의 연구와 본 연구에서 공히 Bcl-2 단백질이 발현되었다. Bcl-2의 발현이 처음 관찰된 재관류군은 Ohno 등의 연구에서 24시간 재관류군이었으나 본 연구에서는 12시간 재관류군이었다. 이는 Bcl-2가 재관류한지 24시간 이전에도 발현된다는 사실을 시사한다. 한편 Ohno 등의 2주일 재관류군에서 Bcl-2 단백질이 발현되었으나 본 연구의 1주일 재

관류군에서는 발현되지 않았다. 이러한 차이는 아마도 실험 동물에 대한 마취방법, 수술방법, 조직처리 및 Bcl-2 단백질의 검색방법에 대한 차이 때문일 것으로 생각된다. 그러나 Ohno의 주장대로 Bcl-2 단백질이 심근의 허혈-재관류에서 급성기의 비교적 후기에 발현된다는 사실은 본 연구에서도 확인할 수 있었다.

본 연구에서 사용한 면역조직화학적 염색에서는 Bcl-2 단백질에 대한 일차항체로 사람 Bcl-2 단백질에 대한 백서의 단일 클론항체(monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein, M887, Dako Inc.)를 이용하였으므로 실험에 사용된 일차항체와 가토의 Bcl-2 단백질이 반응할 것이라고 단정할 수는 없었다. 따라서 이러한 제한점을 보완하기 위해서 면역조직화학적 염색시 심근조직을 검사하기전에 우선 Bcl-2 단백질이 존재하는 것으로 이미 알려진 흉선조직을 검사하여 Bcl-2 단백질 발현됨을 알아보았다(양성대조). 그리고 양성대조와 동일한 흉선조직을 이용하여 Bcl-2 관련 항원에 대한 일차항체 대신 인산완충액으로 대체시키고 나머지 과정은 그대로 하여 Bcl-2 단백질이 발현되지 않음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 시행한 심근의 면역조직화학적 염색에서 양성으로 염색된 세포는 Bcl-2 단백질이 발현된다고 판정할 수 있었으며 이는 이전에 알려져 있는 바와 같이 본 연구에서도 정상 심근군에서 음성으로 염색되는 것으로 보아 간접적으로 알 수 있었다. 그러나 허혈군이나 허혈-재관류군의 일부에서 음성으로 염색된 것이 Bcl-2 단백질의 발현이 되지 않는다고는 확정적으로 말할 수 없다고 하겠다. 일차항체가 가토에 특이한 항체가 아니므로 Bcl-2 단백질과 결합의 정도가 미약할 때 Bcl-2 단백질의 발현이 되더라도 그 정도가 높지 않다면 음성으로 염색될 가능성을 고려할 수 있기 때문이다.

가토 심근에서 허혈-재관류시 세포고사가 존재하는 가에 대해서는 이전에 발표된 김 등(1997)의 가토 허혈-재관류 심근에서의 세포고사에 대한 연구⁷⁾에서 재관류 시간을 30분, 1, 3, 4시간으로 달리 했을 때 모든 군에서 고사세포(apoptotic cell)의 존재가 확인되었기 때문에 본 연구에서 세포고사에 대한 검색은 동시에 시행하지 않았다. 그러나 각각의 허혈-재관류 심근군에서 Bcl-2 단백질 검색과 더불어 세포고사의 발현 여부와 그 정도를 확인하였다면 허혈-재관류 심근에서 세포고사와 Bcl-2 단백질의 관계에 대해서 좀더 접근할 수 있었을 것이라 생각된다.

또한 Olivetti(1997) 등의 Bcl-2와 세포고사에 대한 정량화 방법¹⁰⁾을 허혈-재관류 심근에 적용하여 Bcl-2와 세포고사의 발현을 정량적으로 비교 분석하여 서로의 관계를 알아보는 것도 필요하다고 하겠다.

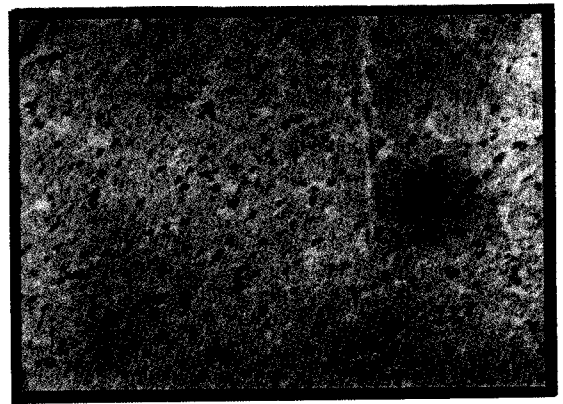


Fig. 4. Immunohistochemical finding of normal heart, Bcl-2, (x200)

결 론

Bcl-2 단백질은 심근의 허혈-재관류에서 급성기의 비교적 후기에 발현되며, 이는 재관류 초기에서 세포고사를 억제하기 보다는 후기에서 세포고사를 억제하는데 일부 역할을 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Thompson CB. *Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease*. Science 1995;267:1456-62.
2. Ellis RZ, Yuhani J, Horvitz HR. *Mechanism and function of cell death*. Annu Rev Cell Biol 1991;7:663-98.
3. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon wide-ranging implantations in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972;26:239-57.
4. Yeh ETH. *Life and death in the cardiovascular system*. Circulation 1997;95:782-6.
5. Kim WH. *Apoptosis and disease*. Medical Postgraduates 1996;24:275-88.
6. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes*. J Clin Invest 1994;94:1621-1628.
7. 김영권, 한동선, 이학중, 박이태, 김삼현, 김성숙. 가토 허혈-재관류 심근에서의 Apoptosis. 순환기 1995;25(부록 5):151.
8. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. *Apoptosis and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats*. Lab Invest 1996;74:86-107.
9. Hotta K, Nakai K. *Is cell death of rat cardiomyocyte following transient ischemic apoptosis?* Circulation 1995; 92(suppl I):I-772.

10. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, et al. *DNA fragmentation of human infarcted myocardial cell, demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis.* Am J Pathol 1995;146:1325-31.
11. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Hendriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki L-M. *Apoptosis in human acute myocardial infarction.* Circulation 1997;95:320-23.
12. Bakshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. *Cloning the chromosomal break point of t(14:18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18.* Cell 1985;41:899-906.
13. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer ST. *Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death.* Proc Natl Acad USA 1991;88:6961-65.
14. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, et al. *Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocyte during postnatal maturation of the heart.* Experimental cell research 1995;219:110-21.
15. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. *Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction.* Circulation 1996;94:1506-12.
16. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. *Apoptosis in the failing human heart.* N Engl J Med 1997;336:1131-41.
17. Ohno M, Misao J, Hayagawa Y, et al. *Expression of Bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, in rabbit hearts with myocardial infarction.* Circulation 1996;94(suppl): I-226.
18. Fliss H, Gattinger DA. *Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium.* Circ Res. 1996;79:949-56.
19. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. *Early apoptosis in human myocardial infarcts.* Hum Pathol 1997;28:485-92.

=국문초록=

배경: 심근의 허혈 또는 재관류에 의한 세포사에는 괴사 이외에 세포고사가 존재함이 알려져 있다. Bcl-2 단백질은 세포질에 존재하는 단백질로 세포고사를 억제하는 기능을 하며 정상심근에서는 발현되지 않으나 심근경색의 급성기에서 발현됨이 보고되어 있다. 본 연구는 가토 허혈-재관류 심근에서 Bcl-2 단백질의 발현 여부와 재관류의 시간에 따른 발현의 변화를 알아보려고 하였다. **방법:** 평균 무게가 2.9Kg(1.5-4.8Kg)인 가토 39마리를 이용하였다. 허혈-재관류 모델의 각 실험동물에서 좌전하행지를 30분간 결찰한 다음 1, 4, 8, 12, 24시간, 3, 7일 동안 재관류시켰다. 이후 즉시 실험동물을 희생시킨 다음 심장을 적출하여 심근 조직을 얻고 10% buffered formalin에 고정하였다. Bcl-2 단백질의 발현은 파라핀에 포매된 조직에서 단일클론항체를 이용한 면역조직화학적 염색으로 확인하였다. **결과:** 허혈-재관류 심근 중 12, 24시간, 3일 재관류군에서 Bcl-2 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으며, 특히 24시간 재관류 심근에서 잘 관찰되었다. Bcl-2 양성염색의 심근세포는 위험부위의 구제심근에서 관찰되었다. **결론:** Bcl-2 단백질은 심근의 허혈-재관류에서 급성기의 비교적 후기에 발현되며, 이는 재관류 초기에서 보다는 후기에서 세포고사를 억제하는데 일부 역할을 할 것으로 사료된다.