

백서 심근 허혈 모델에서 angiotensin AT₁ 수용체 차단제의 재관류 손상 감소 효과

최 준 영* · 최 동 주** · 안 혁***

=Abstract=

Attenuation of Reperfusion Injury with Angiotensin AT₁ Receptor Blockade in Rat Myocardial Ischemic Model

Jun Young Choi, M.D.*, Dong Ju Choi, M.D.**, Hyuk Ahn, M.D.***

Background: Although AT₁ receptor antagonist can protect myocardium against ischemia/reperfusion injury at the cellular level, the in vivo effect and the mechanisms of this effect have not yet been characterized. The present study was designed to examine the myocardial protective effect of irbesartan(an AT₁ receptor antagonist) in ischemia-reperfusion model of rats, and to elucidate the role of apoptosis as a biological mechanism mediating reperfusion injury. **Material and Method:** An inert vehicle(10% gum arabic: group I, n=14) or irbesartan(50mg/kg/day: group II, n=12) was administered to Sprague-Dawley rats orally every 24 hours for 3 days. Animals were subjected to a 45-minute left coronary artery ligation followed by a 2-hour reperfusion, then the hearts were harvested. The ratio of myocardial infarct area/ischemic risk area was assessed through TTC(triphenyltetrazolium chloride) staining. Degree of apoptosis was evaluated by analyzing the DNA fragmentation pattern on agarose gel electrophoresis and TUNEL(TdT-mediated dUDP nick end labeling) staining. Western blot analysis was performed to estimate the expression of the proteins known to regulate apoptosis such as Bcl-2(B-cell lymphoma 2 gene) and Bad, and the MAPKs(mitogen-activated protein kinases) implicated in signal transduction such as ERK (extracellular signal-regulated kinase) and p-38. **Result:** The ratio of infarct area/ischemic area at risk in group II was significantly smaller than that of group I(42.6±2.7% vs. 64.1±4.6% ; p<0.005). Agarose gel electrophoresis revealed discrete DNA laddering in the ischemic zone of group I, but DNA ladder formation was attenuated in group II. The expressions of Bcl-2 and ERK1 were higher in ischemic area of group II compared to that of group I. The

*경상대학교병원 흉부외과, 경상대학교 의과대학 심혈관 연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Gyeongsang National University Hospital Institute of Cardiovascular Research, College of Medicine, Gyeongsang National University

**경상대학교 의과대학 내과학 교실

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Gyeongsang National University

***서울대학교 의과대학 흉부외과학 교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Seoul National University

†본 논문은 2000년도 경상대학교병원 임상연구비의 일부 보조에 의한.

논문접수일 : 2001년 1월 15일 심사통과일 : 2001년 2월 20일

책임저자 : 최준영(660-702) 경남 진주시 칠암동 92, 경상대학교병원 흉부외과. (Tel) 055-750-8121, (Fax) 055-753-8138

E-mail: jychoi@nongae.gsnu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

Conclusion: AT₁ receptor antagonist, irbesartan, was effective in reducing myocardial reperfusion injury in vivo. This effect can be attributed partially to the attenuation of cardiomyocyte apoptosis, which was suggested by the increased expression of Bcl-2.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2001;34:203-11)

Key words : 1. Myocardial reperfusion injury
2. Angiotensin II
3. Cell death

서 론

관상동맥 혈류 차단으로 인한 지속적인 심근 허혈은 심근의 비가역적 손상과 괴사를 초래하여 심근경색을 유발한다. 허혈 상태의 심근을 구제하기 위해서는 신속한 재관류가 필수적이거나, 역설적으로 재관류로 인한 백혈구 침착, 산화물 축적 등이 오히려 심근 세포를 손상시키는 재관류 손상(Ischemia/Reperfusion Injury)을 유발할 수 있다^{1,2}. 재관류 손상은 임상적으로 구제 가능한 심근을 감소시킬 뿐 아니라, 심실성 빈맥이나 심실세동 등의 치명적인 부정맥을 일으키기도 한다. 최근의 연구들에 의하면 염증반응, 산소 유리기의 축적, 세포자멸(apoptosis), renin-angiotensin system(RAS)의 활성화 등이 재관류 손상을 일으키는 주요 기전으로 제시되고 있다.

동물 모델이나 인체에서 급성 심근경색이 일어나면 전신의 RAS가 활성화 될 뿐 아니라 심장에서도 국소적인 RAS가 활성화되어 angiotensin II가 생성되어 심장에 나쁜 영향을 미치게 된다^{3,4}. Angiotensin II는 RAS의 가장 중요한 매개체이며 심혈관계의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁵. 체외에서 합성한 독성 농도의 angiotensin II를 투여하면 심근의 괴사가 일어나며, 허혈 후의 재관류 손상을 증폭시킨다⁶. 그러나 체내에서 합성된 angiotensin II가 허혈 후의 재관류에 따른 심근의 손상에 어떤 영향을 미치는지는 아직 확실치 않으나, ACE 억제제에 의해 심근경색의 이환율이나 사망률이 감소한다는 보고들이 체내에서 합성된 angiotensin II가 재관류 손상에 어떤 중요한 작용을 하는 것을 시사한다.

Angiotensin II의 수용체는 네 가지가 존재하는 데, 이중 AT₁과 AT₂ 두 가지 아형이 사람에게 발현되는 것으로 알려져 있다. Angiotensin II type 1(AT₁) 수용체가 angiotensin II의 승압효과, 세포증식, 심근비후, 소디움 축적 등의 작용을 매개하는 것으로 알려져 있고, angiotensin II type 2(AT₂) 수용체는 심근에서 항-심근비후, 항-세포자멸 작용을 나타낸다는 보고가 있으나 아직 정확한 작용과 기전은 알려져 있지 않다⁷. Angiotensin I으로부터 angiotensin II로의 변환을 방해하는

angiotensin-converting enzyme(ACE) 억제제는 고혈압이나 심부전, 심근경색 환자들의 치료에 널리 사용되고 있고 동물 실험에서도 경색의 크기를 줄일 수 있음이 증명되었다⁸. 그러나 ACE 억제제는 angiotensin II의 생성을 억제할 뿐만 아니라 심근 보호 효과가 있는 bradykinin의 분해도 억제하는 효과가 있어, angiotensin II에 대해서 비특이적으로 작용한다. 또한 심근에서는 angiotensin의 생성이 ACE에 의존하는 경로 뿐 아니라 다른 경로들에 의해서도 일어난다⁹. 따라서 심근의 재관류 손상에 angiotensin II가 관여하는 기전을 밝히기 위해서는 angiotensin II의 효과를 보다 특이적으로 차단하는 길항제가 필요하다. 최근에 AT₁ 수용체 길항제들이 개발되어 고혈압과 심부전 치료에 쓰이기 시작하고 있으나, 심근의 재관류 손상에 미치는 영향에 대한 연구는 드물다.

연구적인 허혈시에 일어나는 심근세포의 괴사(necrosis)와는 달리 재관류시에 일어나는 세포의 손상은 주로 세포자멸이 유발되어 발생한다는 주장이 최근에 제시되고 있다¹⁰⁻¹². 또한 세포자멸은 심근 경색이나 심부전, 부정맥, 동맥경화 등의 여러 가지 심혈관계 질환에서도 중요한 기전으로 작용하는 것으로 밝혀지기 시작했다¹³⁻¹⁵. 세포자멸(apoptosis)은 1972년 Kerr 등이 처음 기술한 용어로, 세포 사망시 에너지가 소모되지 않는 "oncotic" 혹은 "necrotic"와는 대조적으로, 세포막과 미토콘드리아의 형태를 유지하며 핵의 응축을 동반하고 에너지를 사용하는 세포 사망의 다른 형태이다¹⁶. Piot 등¹⁷은 쥐의 생체를 이용한 실험에서 심근에 허혈성 전처치를 하면 재관류시에 경색의 크기도 감소하고 염색체의 단열도 줄어들어 재관류 손상이 감소하는 것을 관찰하였고, TUNEL염색으로 확인한 바 이는 세포자멸의 감소에 기인함을 제시하였다. Yaoita 등¹⁸은 쥐를 이용한 실험에서 세포자멸의 진행을 억제하는 caspase 억제제를 투여하면 허혈 후 재관류에 따른 심근 손상을 줄일 수 있다고 보고하였다. 근래에는 심혈관계에 일어나는 세포자멸을 유발하거나 조절하는 인자들 및 세포자멸과 세포복제 신호전달체계 사이의 연관성도 밝혀지기 시작하고 있으며, 세포자멸 기전이 염증반응, 산소 유리기, 체액 요소 등과 함께 주요한 재관류 손상의 원인으로 제시되고 있다.

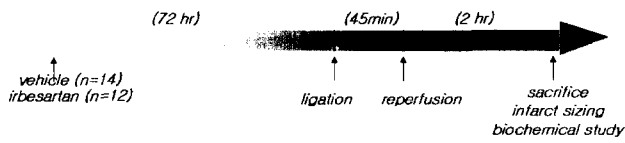


Fig. 1. The experimental protocol.

본 연구에서는 AT₁ 수용체 길항제중 하나인 irbesartan을 이용하여 재관류 손상에 대한 AT₁ 수용체 길항제의 효과를 알아보고, 이러한 효과를 나타내게 하는 생물학적 기전의 일단을 밝히고자 한다.

대상 및 방법

1) 실험 방법

가) 실험동물 모델

체중 200 g 정도의 Sprague-Dawley 수컷 백서를 두 군으로 나누어, 3일 동안 24시간마다 I군(개체수=14)에는 부형약인 10% gum arabic(Sigma Chemicals)을 투여하고, II군(개체수=12)에는 10% gum arabic에 녹인 irbesartan(Sanofi: 50 mg/kg/day)을 비위관을 통해 투여하였다. Ketamine(30 mg/Kg)과 xylazine(3 mg/Kg)을 혼합한 마취액을 복강에 주입하여 마취시킨 후, 기관을 절개하고 Harvard 인공호흡기에 연결하여 기계적 인공호흡을 시켰다(1회 호흡량, 1.5 mL, 분당 호흡수; 80회). 정중 흉골 절개를 통하여 개흉을 하고 심장을 노출시킨 다음, 좌 관상동맥의 근위부를 6호 견 봉합사로 결찰하였다. 사지유도 심전도상 ST분절이 상승함을 관찰하여 관상동맥이 완전히 결찰 되었음을 확인하였다. 결찰 후 45분이 지나면 결찰을 풀어 2시간 동안 재관류 시켰다(Fig. 1). 전체 실험과정 동안 체온이 일정하게(36.8°C-38°C) 유지되도록 유의하였다.

나) 심근경색의 크기 측정

2시간 동안 재관류 시킨 후에, 허혈 노출 부위를 구별하기 위해 30초 동안 좌 관상동맥을 결찰한 상태에서 대동맥 근위부에 Evans blue 0.05 cc를 주사한 직후 치사량의 pentobarbital을 좌심실 내에 주입하여 사망을 유도하였다. 심장을 절제해내어 심방과 우심실을 제거하고, 좌심실 조직을 수평으로 2 mm 두께의 절편으로 잘랐다. 절편들을 37°C 수조에서 1% TTC(Sigma Chemicals)용액에 15분간 담구어 두었다. 각 절편에서 허혈 노출 부위(Evans blue에 의해 염색되지 않은 부분)를 잘라 무게를 재고, 경색부위(TTC 의해 염색되지 않은 부

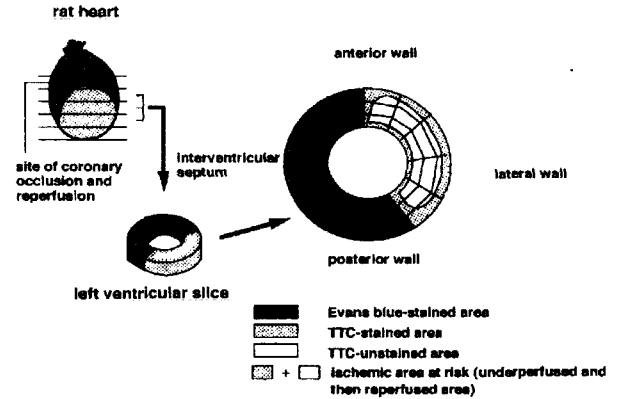


Fig. 2. Myocardial slices for assessment of infarct area and ischemic area at risk.

분)와 비경색 부위의 경계를 따라 칼로 도려내어 각 부분들을 함께 모은 다음, 허혈 노출 부위에 대한 경색부위들의 중량 비를 %로 나타내었다(Fig. 2).

다) Agarose gel 전기 영동을 이용한 DNA 분절 양상 관찰

I군의 경색부위와 I, II군의 경색 주변부위를 각각 따로 액체질소로 급속 동결시켜 분말로 만든 후, 분말을 50 mL 원심분리관에 10 vol 추출 완충액(10 mmol/L Tris-HCl[pH 8.0], 0.1 mol/L EDTA [pH 8.0], 0.5% SDS, 20 μg/mL pancreatic RNase)과 함께 넣어 상온에서 1시간 동안 배양한 다음, 같은 완충액에 200 μg/mL proteinase K(Sigma Chemicals)를 넣어 50°C에서 12시간 배양하였다. 1mol/L Tris 완충액(pH 8.0)과 평형시킨 동량의 phenol을 추가하여 1시간 동안 요동기로 흔들어 주었다. 상온에서 5000 g로 30분간 원심 분리하여 상층의 점액성 액층을 깨끗한 50 mL 관에 옮겨 동량의 phenol/chloroform으로 추출을 반복하였다. 두 번째 추출이 끝나면 상층액을 50 mL 원심분리관에 옮기고, 0.1 vol 3 mol/L sodium acetate와 2 vol 100% ethanol을 가하여 DNA를 침강시켰다. 상온에서 5000 g로 20분간 원심분리하여 DNA를 분리한 후 70% ethanol로 씻은 다음, 마지막으로 1.5 mL 미세 원심분리관에 추출 완충액 0.5mL를 더하여 resuspend시켰다. DNA internucleosomal cleavage를 찾기 위해 각 DNA 10 μg을 0.5 μg/mL의 ethidium bromide와 함께 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 분획하였다. Gel 위의 DNA를 자외선 등 아래서 사진으로 찍어 분절 양상을 관찰하였다.

라) TUNEL 염색을 이용한 세포자멸 정도의 관찰

생체에서 phthalocyanine blue dye로 관류시킨 후 즉시 백서의 심장을 적출하여 혈액을 세척하였다. 수평으로 2 mm 두

개의 절편으로 잘라 TTC에 12분간 담구었다가, phosphate-buffered 4% formaldehyde 용액으로 4℃에서 12시간 동안 고정하였다. 심장 절편을 ethanol과 xylene으로 탈수시켜 paraffin에 고정하고, 5μm 절편으로 잘라 Fisher SuperFrost Plus glass에 장착하였다. Section을 다시 가수하고, 상온에서 2% H₂O₂에 5분간 배양함으로써 내인성 과산화물의 작용을 배제하였다. 표본을 PBS로 5분씩 2회 세척한 후, equilibration buffer(13μL/cm²) 두 방울을 표본에 직접 떨어뜨렸다. Plastic coverslip을 덮고 상온에서 15초간 배양한 후, plastic coverslip을 제거하고 50μL의 working strength TdT 효소를 작용시켰다. 다시 plastic coverslip을 덮고 상온에서 가슴조에 넣어 1시간 동안 배양한 다음, plastic coverslip을 제거하고 표본을 working strength stop/wash buffer가 담긴 coplin jar에 넣고 15초간 흔든 다음 상온에서 10분간 배양하였다. 표본을 PBS로 5분씩 3회 세척한 후, anti-digoxigenin-peroxidase 두 방울을 떨어뜨리고, plastic coverslip을 덮고 가슴 chamber에 넣어 상온에서 30분간 배양하였다. Plastic coverslip을 제거하고 PBS로 5분씩 세 번 세척하였다. 세척하는 동안 신선한 0.05% diaminobenzidine(Sigma Chemicals)을 준비하여 표본을 완전히 덮도록 충분히 가하였다. 상온에서 5분간 염색한 후, 증류수로 1분씩 세 번 세척하였다. Methyl green으로 상온에서 10분간 대조염색을 하여, 증류수에서 10분씩 흔들면서 두 번 세척하고, 30초간 가만히 담가두어 세척하였다. 100% butanol에서 10분씩 흔들면서 두 번 세척하고, 30초간 가만히 담가두어 세척하였다. Xylene으로 2분씩 세 번 세척하고 glass coverslip을 장착하였다.

마) Western blot

대조군과 실험군에서 정상 심근조직과 허혈 부위의 심근조직을 각각 따로 채취한 다음, 각 심근 시료를 분쇄하여 lysis buffer(1% SDS, 0.1% Triton X-100, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)에 넣어 끓인 후, 4℃에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리 하였다. 시료를 1.2% SDS-PAGE gel에 걸어 단백질만 분리한 다음, nitro-cellulose 막으로 옮겨 100V에서 2시간 동안 두었다. 막을 PBS-T에 녹인 5% 탈지분유로 상온에서 1시간 동안 preblock하였다. 막을 PBS-T로 15분씩 두 번, 10분간 한 번 세척하였다. 막을 PBS-T로 1:5000으로 희석한 1차 항체 용액에 넣어 4℃에서 흔들면서 배양하였다. 항체는 Santa Cruz사에서 제조한 anti-Bcl-2, anti-Bad, anti-ERK, 및 anti-p-38 등 네 가지를 사용하였다. 다시 PBS-T로 세 번 세척한 후, 1:5000으로 희석한 2차 항체 용액에서 배양하였다. 다시 세 번 세척한 후, ECL(enhanced chemiluminescence) detection을 시행하였다. 동량의 detection 용액 1과 2를 섞은 용액에서 실온에서 정확히 1분간 배양하고 형광에 노출시켰다.

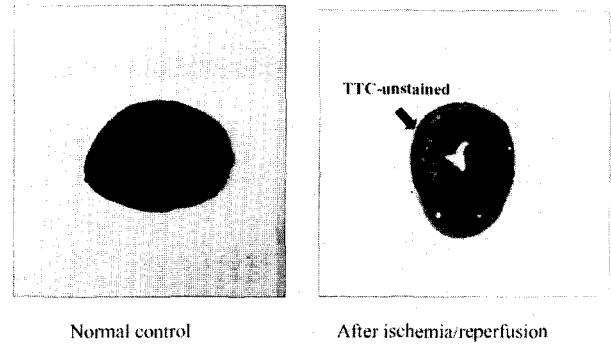


Fig. 3. Myocardial slice showing TTC-unstained infarct area.

2) 자료처리 및 분석

모든 측정치는 mean±SD으로 표시하였고, 두 군사이의 차이에 대한 통계적 유의성 검증에는 t-test를 적용하였으며, p 값이 0.05미만이면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1) Irbesartan이 심근경색의 크기에 미치는 영향

실험에 사용된 Sprague-Dawley 백서는 모두 생후 8~12주의 수컷이었으며, 두 군의 체중은 대조군인 I군에서 212.8±3.5g, irbesartan을 투여한 II군에서 219.2±3.7g으로 차이가 없었다. TTC 염색으로 허혈노출 부위와 경색부위의 경계를 구별할 수 있었다(Fig. 3). 허혈 노출부위의 크기는 I군에서 평균 162.6±2.7g, II군에서 141.2±3.1g으로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다(p<0.02). 허혈 노출부위에 대한 경색부위의 비율은 I군에서 64.1±4.6% (105.2/162.6), II군에서 42.6±2.7% (60.5/141.2)로 II군에서 현저히 작았다(p<0.005)(Fig. 4).

2) 경색 주변부위 심근에서 irbesartan에 의한 DNA laddering의 감소

Agarose gel 전기영동상에서 DNA “ladder”는 세포자멸에 의한 internucleosomal DNA 분절을 보여 주는 것으로서, 약 180 bp의 배수 크기의 띠로 나타난다. I군의 경색 주변부위에서 추출한 시료에서는 ladder 양상이 뚜렷하게 나타났으나, irbesartan을 투여한 II군의 경색 주변부위에서는 ladder 양상의 강도나 양이 감소되어 나타났다. I군의 경색이 완전히 일어난 부분에서 추출한 시료에서는 ladder 양상이 매우 희미하게 나타났다(Fig. 5). I, II군의 경색 주변부위에서 추출한 시료의 ladder의 배경에서 DNA 퍼짐 현상을 관찰할 수 있는데, 이는 DNA의 무작위 분절에 의한 현상으로 괴사에 의한

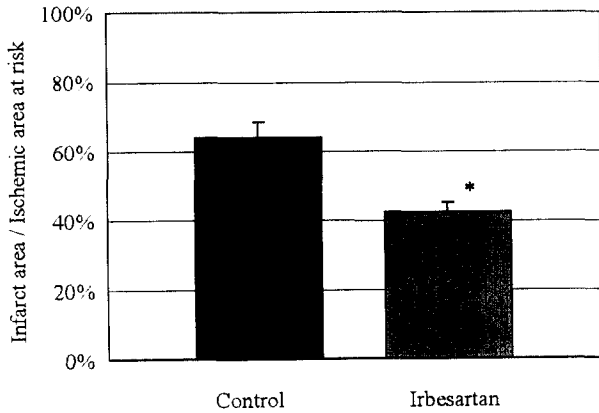


Fig. 4. Ratios of infarct area/ischemic area at risk. Ratio of irbesartan group(42.6±2.7%) was significantly smaller than that of the control group(64.1±4.6%). *p<0.005.

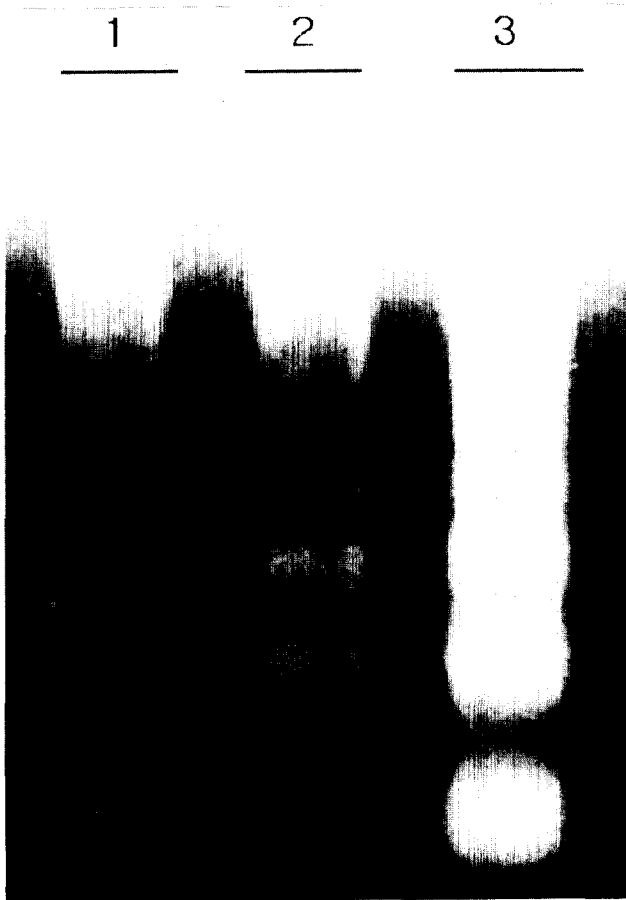


Fig. 5. Patterns of DNA fragmentation on agarose gel electrophoresis. Lane 1, sampled from the core of infarction of group I; lane 2 and 3; sampled from endocardial and lateral border zones of the ischemic area at risk of group II and I. DNA laddering was well defined in lane 3, but DNA ladder formation was attenuated in lane 1 or 2.

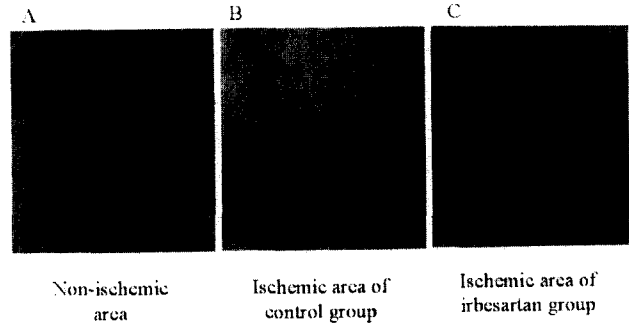


Fig. 6. Light microscopic findings of TUNEL staining of non-ischemic(A) and ischemic myocardium of control(B) and irbesartan group(C) at 2 hours after reperfusion. TUNEL-positive cardiomyocytes (arrows) were frequently detected in the endocardial layer in control group. In contrast, only a few TUNEL-positive cardiomyocytes were detected mainly in the endocardial side close to the core of infarction in irbesartan group.

세포사망도 함께 포함되어 있음을 나타낸다.

3) TUNEL 염색에 나타난 irbesartan에 의한 세포사멸의 감소

정상 부위의 심근세포의 핵은 TUNEL 염색에 의해 착색되지 않았으며 hematoxylin 배경염색에 의한 심근세포만 관찰할 수 있었다(Fig. 6A). 대조군에서 재관류 손상을 입은 허혈 부위의 심근에서는 암갈색으로 염색되는 다수의 응축된 apoptotic nuclei를 볼 수 있었다(Fig. 6B). Irbesartan을 투여한 II군에서도 암갈색으로 착색되는 apoptotic nuclei를 관찰할 수 있으나, I군에 비해 훨씬 드물게 나타났다(Fig. 6C).

4) Western blot상의 Bcl-2와 Bad의 발현 정도 변화

허혈 손상이 없는 정상 부위에서 Bcl-2의 발현은 irbesartan에 의해 영향을 받지 않았다. Ischemic area에서는 irbesartan을 투여한 군이 vehicle을 투여한 군에 비하여 Bcl-2 발현이 현저히 증가하였다(Fig. 7).

정상 심근에서의 Bad의 발현 정도는 irbesartan 투여에 영향을 받지 않았다. 전반적인 Bad의 발현 정도는 정상 심근에 비해 허혈에 노출된 부위에서 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 허혈에 노출된 부위에서의 Bad의 발현 정도는 irbesartan 투여 여부에 관계없이 두 군간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Fig. 8).

5) Western blot상의 ERK와 p-38의 발현 정도 변화

항체를 사용한 Western blot 분석으로 재관류 손상에 의한 ERK 1/2, p-38 MAPK의 발현 정도를 알아보았다. 모든 심근

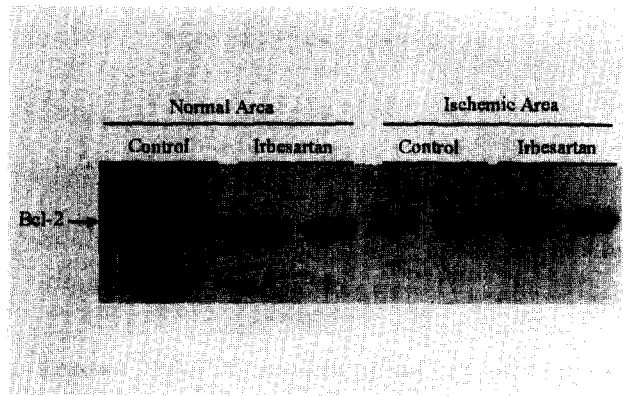


Fig. 7. The expression of Bcl-2 in normal and ischemic myocardium at 3 day-feeding with vehicle or irbesartan. No significant difference was found between the two groups in normal area, but higher expression was observed in ischemic area of the irbesartan group than that of the control group.

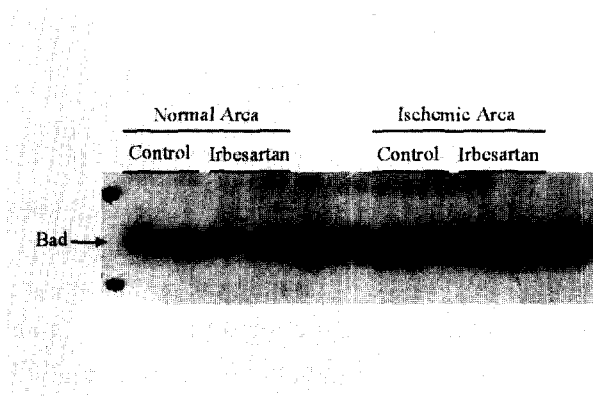


Fig. 8. The expression of Bad in normal and ischemic myocardium at 3 day-feeding with vehicle or irbesartan. A slightly higher expression was found in ischemic area than in normal area. No significant difference was found in ischemic area regardless of irbesartan administration.

시료에서 ERK가 발현되었으나 ERK2보다는 ERK1의 발현이 명확하였다. ERK2는 정상 심근이나 허혈 손상을 받은 부위에서 모두 비슷한 정도로 발현되었으나, ERK1은 허혈 손상을 받은 부위에서 정상 심근에서 보다 감소되어 나타났고, 특히 허혈 부위에서 감소 발현된 ERK1은 irbesartan 투여에 의해 뚜렷이 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 9).

p-38 MAPK도 정상 심근과 허혈 부위에서 모두 발현됨을 알 수 있다. 본 연구에 사용된 항체는 subtype non-specific form으로 허혈 부위에서 발현이 감소함을 관찰할 수 있었으며, irbesartan에 의해 발현의 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 10).

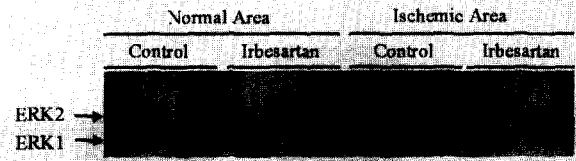


Fig. 9. The expression of ERK 1 / 2 in normal and ischemic myocardium at 3 day-feeding with vehicle or irbesartan. The general expression of ERK1 was attenuated in ischemic area compared to normal area. In ischemic area, irbesartan group showed increased expression of ERK1 compared to the control group.

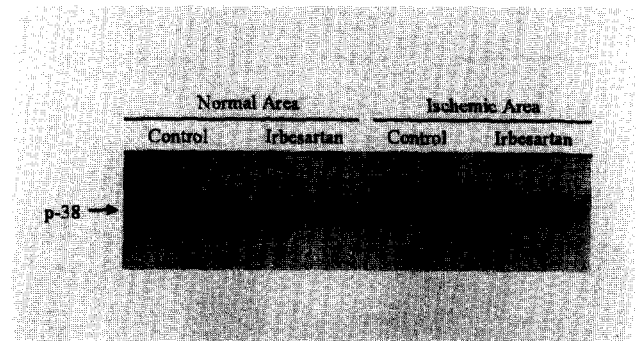


Fig. 10. The expression of p-38 in normal and ischemic myocardium at 3 day-feeding with vehicle or irbesartan. The general expression of p-38 was attenuated in ischemic area. Irbesartan had no effect on the expression of p-38.

고 찰

본 연구는 백서의 심근 허혈-재관류 손상 모델에서 AT₁ 길항제인 irbesartan 투여가 심근경색의 크기를 감소시킬 수 있으며, angiotensin II가 AT₁ 수용체를 통하여 허혈-재관류 손상에서 중요한 역할을 함을 보였다. Angiotensin II는 renin-angiotensin system에서 중심적인 역할을 하는 물질로서 심근을 비롯한 심혈관계의 생리적 작용을 조절할 뿐 아니라, 심근 허혈 및 심부전의 병리적 진행이나 심근 손상의 원인으로 작용하기도 한다. 관동맥의 혈류가 차단되어 심근 허혈이나 경색이 유발되면 전신의 RAS가 활성화되고 심장은 증가한 angiotensin II의 표적장기가 될 뿐 아니라, 국소적 RAS도 활성화되어 심근의 허혈성 손상은 더욱 심하게 된다^{3,4)}.

Angiotensin II는 직접적으로 심장에 심근 괴사 등 손상을 유발할 수 있으며, 재관류에 의한 심근 손상을 더욱 악화시킨다⁶⁾. RAS를 차단함으로써 심부전의 진행을 억제하고 심근 경색 후 심근의 remodeling을 제한 할 수 있음은 이미 임상 연구나 동물 실험을 통하여 널리 알려져 있다¹⁹⁾. 재관류 손상도 RAS 억제에 의해 심근의 손상을 감소시킬 수 있다. ACE 억제제인 captopril을 투여한 백서 모델에서 심근경색 크기를 감소시키는 것은 물론 사망률 및 심실 빈맥, 심실 세동에 대한 역치도 높일 수 있으며²⁰⁾, cilazapril도 NO와 cGMP에 의한 에너지 보존으로 허혈-재관류 손상에 대해 심근 세포를 보호한다²¹⁾. Guinea pig를 이용한 연구에서도 ACE 억제제가 모세혈관에서의 백혈구 응집을 억제함으로써 재관류 손상에 대해 심근을 보호할 수 있다고 보고하고 있다²²⁾.

ACE 억제제에 의한 RAS 차단은 ACE 비의존 경로에 의한 angiotensin II의 합성을 완전히 차단하지 못하며, bradykinin 분해를 억제하기 때문에 bradykinin에 의한 심근 보호 효과가 나타날 수 있으므로, 심근 보호 효과가 비특이적이라 할 수 있다⁹⁾. 따라서 angiotensin II를 좀 더 선택적으로 차단해야 angiotensin II에 의한 재관류 손상 억제 효과를 정확히 연구할 수 있다. 사람의 angiotensin II 수용체는 AT₁과 AT₂ 두 가지 아형이 알려져 있는데 심혈관계의 주요한 작용들은 주로 AT₁ 수용체에 의해 매개된다. 최근 재관류 손상 모델을 이용한 연구에서 재관류 손상에 의해 AT₁의 발현이 현저히 증가하는 반면 AT₂ 수용체의 발현은 변하지 않으며, losartan에 의해 AT₁의 발현은 억제된다고 보고하고 있다²³⁾. Losartan이나 candesartan 등의 AT₁ 수용체 차단제를 투여하면 재관류 손상으로부터 심장을 보호할 수 있는 것으로 알려져 있으며²⁴⁾, 이는 본 연구의 결과와도 일치한다.

재관류 손상의 정확한 발생기전은 아직 확실치 않으나 세포자멸이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{10,11)}. 본 연구에서도 경색 주변부에서 세포자멸에 의해 세포 손상이 발생함을 DNA 분절양상과 TUNEL 염색으로 증명하였으며, 이들 세포자멸은 AT₁ 차단제 투여에 의해 감소되었는데 이는 허혈 노출 부위에 대한 경색 부위의 비율 64.1±4.6%에서 42.6±2.7%로 감소시킨 TTC 염색 소견과 일치하였다. 허혈 손상에 대한 세포자멸의 중요성에 관해서는 아직 논란이 많다. 특히 세포자멸의 분석 방법이나 발생 이후 검사까지의 시간적 차이에 따라 다른 결과가 나타날 수도 있다²⁵⁾. 그러나 최근의 연구들에 의하면 caspase 억제제가 재관류 손상을 감소시키고¹⁸⁾, Bcl-2 family에 의해 경색크기가 영향을 받으며, 백서 모델에서 관동맥 절찰이 지속되면 괴사하는 세포의 수의 증가와 함께 자멸하는 세포의 수도 급격히 증가한다는 구체적인 증거들이 제시되고 있다. 이는 본 연구 결과처럼 세포자멸이 재관류 손상의 중요한 발생 기전의 하나임을 반

영한다.

본 연구에서 세포자멸의 감소를 동반한 Bcl-2의 발현이 AT₁ 차단제에 의해 증가함을 알 수 있다. Bcl-2 family는 Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w 등 항-세포자멸 작용을 하는 물질과 Bax, Bak, Bad 등 항-세포자멸 작용을 하는 물질로 구분된다. 특히 Bcl-2는 만성 심근 허혈, 심근 비후 및 만성 울혈성 심부전 등에서는 발현이 증가하지 않으나, 급성 심근 경색이나 허혈 / 재관류 등의 급성기에 발현되는 것으로 보고되고 있으며, 괴사가 완전히 일어난 부위에서는 발현되지 않는다. 본 연구에서 허혈 부위의 Bcl-2 발현은 irbesartan 투여에 의해 현저히 증가했으나 Bad의 발현은 차이가 없어, AT₁ 차단제가 Bcl-2를 통한 항-세포자멸 작용을 활성화 시켰을 가능성을 제시하고 있다. Fortuno 등에 의하면 spontaneously hypertensive rat에 losartan을 투여하면 좌심실에서 세포자멸 감소와 함께 Bcl-2 / Bax 의 발현비율이 증가하는 것으로 본 연구와 유사한 결과를 보고했다²⁶⁾. AT₁ 차단에 의한 Bcl-2 활성화 기전은 cNOS나 Fas 발현과 연관되거나, angiotensin II에 의한 MKP-1(mitogen activated protein kinase phosphatase-1)의 활성화가 차단되어 Bcl-2의 탈인산화가 저지되고 Bax의 발현이 억제되어 항-세포자멸 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

MAPK들의 세포자멸에 대한 작용으로 ERK1 / ERK2는 주로 세포의 증식과 생존을 촉진시켜 항-세포자멸 효과를 보이는 반면, JNK등 SAPK와 p-38은 세포자멸을 유발시키는 것으로 알려져 있다^{28,29)}. 본 연구의 결과에 의하면 허혈 손상에 의해 주로 ERK1의 발현이 감소하며, irbesartan 투여에 의해 ERK1의 발현이 증가되어 앞의 연구들과 일치된 소견을 보였다. 그러나 p-38 MAPK의 발현은 AT₁ 차단제 투여에 의해 일정한 변화를 관찰할 수 없었다. 최근 연구에 의하면 p-38은 α , β , γ 그리고 δ 등 4 가지 아형이 알려져 있는데, 그 중 심근에서 p-38 α 는 항-세포자멸 효과를 보이며 이와는 반대로 p-38 β 는 항-세포자멸 효과를 보인다²⁹⁾. 그러나 최근까지 합성된 항체나 kinase assay로는 p-38의 아형을 구분하기 힘들다. 본 연구에 사용된 항체도 비특이적인 것이어서 p-38 α 와 p-38 β 를 구분할 수 없었다. 향후 두 아형의 구분과 각 아형이 세포자멸에 미치는 영향에 관한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

본 연구는 백서 모델을 이용하여 AT₁ 차단제인 irbesartan이 허혈-재관류 손상을 감소시킬 수 있음을 증명하였으며, 이런 AT₁ 차단제의 작용은 Bcl-2와 ERK1 MAPK의 신호전달 체계를 통한 세포자멸 억제 효과로 추정된다. 그러나 구체적인 작용 기전을 밝히기 위해서는 첫째, AT₁ 수용체를 차단했을 때 AT₂ 수용체의 역할, 둘째, RAS 억제와 관련된 bradykinin, cytokine 등의 paracrine factor들의 작용, 셋째, MAPK

assay에 의한 ERK1 / 2 및 p-38 MAPK의 작용 변화, 넷째, death receptor 경로 혹은 미토콘드리아 경로등 재관류 손상에 관여하는 구체적 세포자멸 기전 연구가 수반되어야할 것이다.

결 론

본 연구의 결과에 의하면 Sprague-Dawley 백서 심근 재관류 모델에서 1) AT₁ 수용체 길항제인 irbesartan은 심근의 재관류 손상을 줄이는 효과가 있고, 2) irbesartan의 재관류 손상 억제 효과는 경색 주변부위의 apoptosis 감소에 부분적으로나마 기인한 것으로 해석할 수 있으며, 3) 이는 Bcl-2 발현의 증가와 그에 따른 항-세포자멸 효과로 추정되고, 4) MAPK 중 ERK1은 Bcl-2의 발현 혹은 작용에 일부 기여할 것으로 생각된다.

결론적으로 AT₁ 수용체 길항제인 irbesartan은 생체에서 심근의 재관류 손상을 감소시키는 효과를 보인다. 이런 효과는 적어도 부분적으로나마 심근세포의 세포자멸이 감소한 것에 기인한 것으로 설명할 수 있으며, 이 항-세포자멸 효과는 Bcl-2의 발현이 증가된 것과 관련이 있어 보인다.

참 고 문 헌

1. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994;28:1301-11.
2. Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R. Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am J Cardiol* 1994;73:2B-7B.
3. Ferrario CM, Flack JM. Pathologic consequences of increased angiotensin II activity. *Cardiovasc Drug Ther* 1996;10:511-8.
4. Henegar JR, Schwartz DD, Janicki JS. ANG II-related myocardial damage: role of cardiac sympathetic catecholamines and beta-receptor regulation. *Am J Physiol* 1998; 275:H534-41.
5. De Graeff PA, van Glist WH, Wesseling H. The cardiac renin-angiotensin system in different ischemic syndromes of the heart. In: Lindpaintner K, Ganten D. *The Cardiac-Renin Angiotensin System*. Futura Publishing, New York, NY, 1994. pp. 201-31.
6. Kabour A, Henegar JR, Janicki JS. Angiotensin II (A-II)-induced myocyte necrosis: role of the A-II receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;23:547-53.
7. Ford WR, Clanachan AS, Jugdutt BI. Opposite effects of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor antagonists on recovery of mechanical function after ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Circulation* 1996;94:3087-9.
8. Ertl G, Kloner RA, Alexander RW, Braunwald E. Limitation of experimental infarct size by an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation* 1982;65:40-8.
9. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 1998;97:1411-20.
10. Gottlieb RA, Bureson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-8.
11. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-59.
12. Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:2005-16.
13. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-41.
14. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996;335:1190-6.
15. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liau G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995;147:267-77.
16. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
17. Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, Sievers RE, Wolfe CL. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo. *Circulation* 1997;96:1598-604.
18. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998;97:276-81.
19. Ali SM, Brown EJ Jr, Nallapati SR, Alhaddad IA. Early angiotensin converting enzyme inhibitor therapy after experimental myocardial infarction prevents left ventricular dilation by reducing infarct expansion: a possible mechanism of clinical benefits. *Coron Artery Dis* 1998; 9:815-21.
20. Zhu B, Sun Y, Sievers RE, et al. Comparative effects of pretreatment with captopril and losartan on cardiovascular protection in a rat model of ischemia-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:787-95.
21. Matoba S, Tatsumi T, Keira N, et al. Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999;99:817-22.
22. Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, et al. ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1997;36:386-95.
23. Yang BC, Phillips MI, Ambuehl EJ, Shen LP, Mehta P, Mehta JL. Increase in angiotensin II type I receptor expression immediately after ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Circulation* 1997;96:922-6.
24. Shimizu M, Wang QD, Sjöquist PO, Rydén L. Angiotensin II type I receptor blockade with candesartan protects the porcine myocardium from reperfusion-induced injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:231-8.

25. Elsässer A, Suzuki K, Schaper J. *Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure.* J Mol Cell Cardiol 2000;32:711-24.
26. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. *Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT₁ blockade with losartan.* Hypertension 1998;32:280-6.
27. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. *Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis.* Endocr Res 1998;24:307-14.
28. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis.* Science 1995;270:1326-31.
29. Wang Y, Huang S, Sah VP, et al. *Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family.* J Biol Chem 1998;273:2161-8.

=국문초록=

배경: AT₁ 수용체의 길항제가 세포 수준에서 심근을 재관류 손상으로 부터 보호할 수 있다는 것은 알려져 있지만, 생체 내에서의 효과나 그 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 백서 심근 허혈 모델을 이용하여, AT₁ 수용체의 길항제들 중 하나인 irbesartan이 심근의 재관류 손상에 미치는 효과를 알아보고, 재관류 손상을 매개하는 한 가지 기전으로서 세포자멸의 기여에 대하여 연구하고자 하였다. **대상 및 방법:** Sprague-Dawley 백서에게 무작용 부형약(10% gum arabic: I군, 개체수=14)과 irbesartan(50mg/kg/day: II군, 개체수=12)을 각각 3일 동안 24시간마다 경구로 투여하였다. 실험동물의 좌 관상동맥을 45분간 결찰하였다가, 그 후 2시간동안 재관류시킨 다음 심장을 적출하였다. TTC (triphenyltetrazolium chloride) 염색법을 이용하여, 허혈 노출 부위에 대한 심근 경색 부위의 비율을 측정하였다. Agarose gel 전기영동상의 DNA 분절 양상과 TUNEL(TdT-mediated dUDP nick end labeling) 염색을 관찰하여 세포자멸이 일어난 정도를 평가하였다. 세포자멸을 조절하는 데 관여하는 것으로 알려진 Bcl-2(B-cell lymphoma 2 gene), Bad 등의 단백질과 ERK (extracellular signal-regulated kinase), p-38 등 신호전달체계에 작용하는 MAPKs(mitogen-activated protein kinases)의 발현을 측정하기 위하여 Western blot을 시행하였다. **결과:** 허혈 노출 부위에 대한 심근 경색 부위의 비율은 II군(42.6±2.7%)이 I군(64.1±4.6%)에 비해 유의하게 작았다(p<0.005). Agarose gel 전기영동상의 DNA laddering 양상은 I군의 허혈 부위에서는 뚜렷하게 나타났지만, II군에서는 뚜렷하지 않았다. Bcl-2와 ERK1은 II군의 허혈 부위에서 I군에서 보다 높게 발현되었다. Bad와 ERK2의 발현은 두 군 간에 유의한 차이가 없었다. **결론:** AT₁ 수용체 길항제인 irbesartan은 생체에서 심근의 재관류 손상을 줄이는 효과가 있었다. 이 효과는 적어도 부분적으로나마 심근세포의 세포자멸이 감소한 것에 기인한 것으로 설명할 수 있으며, 이 항-세포자멸 효과는 Bcl-2의 발현 증가와 관련이 있는 것으로 추정되었다.

- 중심 단어:** 1. 심근 재관류 손상
2. AT₁ 수용체 길항제
3. 세포자멸