

糖尿 白鼠에서 心筋原纖維 ATPase 活性도에 관한 研究

中央大學校 醫科大學 內科學教室

柳 王 盛 · 柳 彦 浩

서울大學校 醫科大學 內科學教室

徐 正 燾 · 李 迎 雨

= ABSTRACT =

A Study on the Cardiac Myofibrillar ATPase Activity in Diabetic Rats

Wang Seong Ryu, M.D., Un Ho Ryoo, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chung Ang University

Jung Don Seo, M.D., Young Woo Lee, M.D.

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

Diabetes mellitus is known to be associated with a specific cardiomyopathy. This is evident from the clinical-pathological work and the epidemiologic data.

An investigation was made in this study to determine whether diabetic cardiomyopathy in rats is associated with an alteration of biochemical characteristics of cardiac contractile proteins.

Rats were made diabetic with intravenous injection of streptozotocin and hearts removed 8 weeks later for the isolation of myofibrils. The basal ATPase activity of myofibrils from diabetic hearts was significantly lower than that of the controls, suggesting the presence of some subtle structural and conformational changes in diabetic myofibrils. The activating effect of Mg ions on the myofibrillar actomyosin system of rat heart muscle was also demonstrated.

Sodium dodecylsulfate gel electrophoresis showed the presence of myosin heavy chain, light chain 1 and 2, actin and troponin but failed to reveal differences in the patterns of these contractile proteins of light subunits between diabetics and controls.

The deficiency in utilization of energy rich phosphates by the myofibrillar protein may be one of the main mechanisms of cardiodepression observed in diabetic hearts.

The cardiac myofibrillar ATPase activity may be one of useful measurements in evaluating pathophysiological states of cardiac contractile proteins.

Key words: Diabetic Cardiomyopathy · Streptozotocin-induced diabetes · Rat myocardium · Myofibrillar ATPase activity.

緒 論

心筋의 收縮에 있어서 分子의 構造나 機能의 力學에 關하여 많은 研究가 이루어졌다. 일찌기 心筋 收縮力의 저하는 心筋內 전체 고에너지원의 감소때문에 나타날 수도 있지만 에너지 이용의 효율성 즉, 代謝로 얻은 化學에너지를 機械的에너지로 전환시키는 과정에 있어서의 이상에 더욱 기인한다는 사실이 밝혀진 바 있다¹⁾.

최근까지 알려진 心筋收縮力의 조절인자로서는 심근수축단백질중 특히 myosin의 효소적 활성도, 筋纖維膜(sarcolemma)에 의해서 조절되는 각종 이온의 동태 및 전류, 筋形質細網(sarcoplasmic reticulum)에 의한 칼슘의 섭취와 유리, 細胞內 칼슘 농도에 영향을 미치는 미토콘드리아의 역할 등이 제시되고 있지만^{1, 2)} 결국 心筋의 收縮과정은 actin과 myosin의 상호결합작용을 반드시 거쳐야하며 이와 동시에 ATP가 분해되는 것이다. 따라서 심근수축단백질의 機能的 單位가 되는 心筋原纖維(myofibril)나 혹은 순수분리된 myosin의 ATPase 활성도는 많은 心臟病의 病態生理學的 評價에 유용한 지표가 되고 있다.

특히 최근 糖尿病 患者 중에서 일반적으로 心不全에 빠질 수 있는 원인들 즉, 有意한 冠狀動脈의 粥狀硬化라든지 瓣膜이상, 고혈압이나 알코올 중독증 등이 없는 상태에서도 울혈성 심부전이 발생한 환자들의 보고가 있는 이래³⁾ 糖尿病의 합병증중 하나로서 糖尿病性 心筋症이 제시되고 있다⁴⁻⁷⁾. 그러나 糖尿病性 心筋症을 하나의 독립된 心筋症으로 분류하자는 주장은 이미 대두되었지만 이疾患의 기전에 대해서는 현재까지 많은 論難이 있다. 눈에 보이지 않는 微細血管에 생긴 病變의 결과이며 한정된 基質 관계로 에너지 이용이 불충분하여 心筋症이 발생한다는 보고가 있으며^{3, 8)} 또 心臟間質內에 糖蛋白質 양이 증가하여 심실벽의 순응도가 감소한다는 說^{5, 9)}, 심장수축단백질인 myosin의 isozyme 형태에 변화가 와서 心筋收縮力이 저하된다는 보고도 있다^{10, 11)}.

이에 實驗的 糖尿病이 실제로 심근수축단백질의 기능적 단위가 되는 心筋原纖維의 化學的 特性에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하기 위하여 本研究를 계획하였으며 白鼠에 스트렙토조토신을 투여하여 人爲的인 糖尿病을 일으켜서 약 2개월간 成長시킨 후 基礎心筋原纖維 ATPase 活性度를 測定하고 마그네슘 및 ATP농도에 따른 活性度의 변화를 관찰하여 所期의 成績을 얻었다.

研究對象 및 方法

1) 實驗動物群

성에 관계없이 생후 4내지 6개월째의 체중 150~200g인 Wistar Rat 100 마리를 대상으로 우선 44mg/kg 용량의 ketamine을 근육주사하여 전신마취를 시킨 후 무작위로 正常對照群 및 糖尿群 두군으로 나누었다. 糖尿群은 마취된 상태에서 tail vein을 통하여 Streptozotocin을 single dose로 65mg/kg 용량으로 정맥주사하여 人爲的인 糖尿病을 유발시켰으며 對照群은 동량의 생리적 식염수를 정맥주사하였다.

약 8주일 경과후 cervical dislocation 방식으로 白鼠를 희생시키고 心臟만 추출하여 0.9% 냉식염수에 洗滌하여 무게를 測定한 후 心筋原纖維를 분리하였다. 血糖量은 포도당산화효소 방법(Glucose-E Kit, 영동제약)으로 측정하였다.

2) 心筋原纖維 分離

추출된 白鼠心臟을 4℃ 0.9% NaCl로 세척한 뒤 지방과 결합조직, 혈관들을 제거하고 房室溝를 따라서 心室만 잘라내어 Solaro 등¹²⁾의 방식에 따라 心筋原纖維를 분리하였다. 心室을 가위로 잘게 썰은 후 0.3M Sucrose와 10mM imidazole(PH 7.0)이 들어있는 용액에서 均等器(Dupont社製 Sorvall Omnimixer)로 30초간 均質化시켰으며 모든 단계의 처리는 0~4℃에서 실시하였다. 그 均等質을 17,300xg로 20분간 초원심분리하고 (BECKMAN MODEL L5-75 ultracentrifuge), 시험관 하단에 가라앉은 pellet를 다음 성분의 표준완충용액(60mM

KCl, 30mM imidazole, 2mM $MgCl_2$, PH 7.0) 에 현탁시켰다. 이 현탁액을 750 × g 에서 15분간 원심분리후 이러한 재현탁, 균질화, 그리고 원심분리하는 과정을 4회 반복하였다. 여기서 얻은 均等質(homogenate)은 밝은 갈색을 띠고 있으며 washed myofibril 이라고命名하였고 이후부터 균질화는 Teflon-glass hand homogenizer 를 사용하였다.

Washed myofibril을 2 mM EGTA를 함유한 표준완충액에 현탁시킨 후 750 × g 에서 15분간 원심분리시키고 더욱 心筋原纖維를 순수분리하기 위해서 1% Triton X-100 처리를 거친뒤 표준완충액에서 다시 재현탁-균질화-원심분리 과정을 4회 이상 반복하여 순수한 心筋原纖維를 분리하였다. 최종분리된 心筋原纖維는 100mM KCl, 20mM Tris-HCl(PH 7.0) 용액에 현탁시키고 단백질 정량은 소혈 청알부민을 표준으로하여 Lowry방식¹³⁾으로 측정하였다.

3) 心筋原纖維 ATPase 活性度 측정

基礎心筋原纖維 ATPase 活性도는 20mM imidazole(PH 7.0), $MgCl_2$ 2mM, Na_2ATP 2mM, NaN_3 10mM, KCl 50mM를 함유한 媒質에서 0.5~1.0mg의 心筋原纖維와 5분간 30℃ 水槽에서 반응시켰는데 반응의 시작은 ATP를 첨가하면서부터 시간을 재어 5분후 12% Trichloroacetic acid 1 ml를 첨가함으로써 종식시켰다. 이어서 반응혼합액을 1000 × g로 10분간 원심분리후 단백질이 없는 상층액의 유리된 무기인을 Horwitz 방식¹⁴⁾에 의하여 측정하였다. 그리고 對照群 및 糖尿病群에서 분리한 각각의 心筋原纖維 ATPase 活性도를 ATP농도 2mM 고정 상태에서 $MgCl_2$ 농도를 0.05, 0.5, 2, 5mM로 증가시키면서 각각 측정하였고 또 $MgCl_2$ 2 mM 농도에서 ATP농도 2, 5, 10, 20mM로 변화시키면서 ATPase 활성도를 측정관찰하였다. ATPase 활성도는 心筋原纖維 1mg당 5분간 유리된 무기인을 다음의 방식에 의하여 계산하였다. 무기인은 ATP가 없을때는 心筋原纖維에 의하여 전혀 유리되지 않았다.

$$ATPase \text{ 活性度} = (A - B) / C$$

A; 心筋原纖維와 ATP를 함께 5분간 반응시킨 후 유리된 무기인

B; 心筋原纖維는 없고 ATP만 함유한 반응액에서 측정한 무기인

C; 心筋原纖維 蛋白質量(mg)

4) Polyacrylamide Gel 전기영동

순수분리한 心筋原纖維 속에 어떠한 심근수축단백질이 함유되어 있는지 확인하고 나아가서 糖尿病이 이러한 심근수축단백질에 어떤 영향을 미치는지 관찰하기 위하여 7.5% SDS-polyacrylamide 전기영동을 시행하였다. Weber와 Osborn의 방식¹⁵⁾에 따라서 gel완충액은 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 8.8g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 51.6g과 SDS(sodium dodecyl sulfate) 2g을 증류수 1 l에 녹여(PH 7.0) 4℃에 보관하였으며 7.5% acrylamide gel을 만들기 위하여 acrylamide 30g과 N, N'-methylene bisacrylamide 0.8g을 증류수 100cc에 녹여 whatman No.1 여과기로 여과시키고 탈공기시킨후 이 용액 75cc를 gel완충액 7.5cc, 10% SDS 0.3cc, 15% ammonium persulfate 1.5cc, 증류수 13.2cc를 넣고 TEMED 0.015cc를 첨가한 후 각각의 유리 gel 관(길이 10cm, 내경 6mm)에 2cc씩 채워 만들었다. 試料는 心筋原纖維를 3배의 Guba-Straub씨 완충액에 넣어서 약 15분간 추출한 후 9000 × g로 20분간 원심분리하여 상층액을 원추막에 넣어 3000 r.p.m으로 재원심분리하였다. 여기서 얻은 단백질을 표준완충액에 녹여서 2시간동안 37℃에서 보온한 후 약 50~100 μg의 단백질을 전기영동(BIORAD社製 MODEL 751 Gel Electrophoresis Cell)하였는데 조건은 일정 전류 30mA로 양극이 하부실에 오도록 하였고 전기영동을 마친 Gel은 고정액에서 10시간 가량 고정하고 Coomassie brilliant blue로 염색시킨뒤 gel densitometer를 이용하여 550nm에서 주사시킨후 표준교정선에서 분자량을 산출하였다.

Table 1. Blood glucose, body weight and heart weight in control and diabetic rats

	Control [n= 26]	Diabetic [n= 24]	P value
Blood glucose [mg / dl]	123.3 ± 15.0	315.8 ± 49.9	< 0.005
Body weight [g]	231.7 ± 26.8	191.4 ± 24.1	< 0.005
Heart weight [g]	0.89 ± 0.08	0.80 ± 0.09	< 0.05
Heart / Body weight ratio [%]	0.39 ± 0.05	0.42 ± 0.04	< 0.05

Results are expressed as the mean ± standard deviation.

5) 통계

측정 및 관찰된 성적은 평균과 표준편차로 표시하였으며 검정은 Student's t test에 의하여 P value < 0.05 이면 통계적으로 有意하다고 판정하였다. 두 변수사이의 상관관계는 相關分析法에 의한 직선회귀법을 이용하여 회귀방정식을 구하고 그 상관계수에 대하여 검정하였다.

研 究 成 績

Streptozotocin을 체중 kg당 65mg을 정맥주사하고나서 糖尿病의 유발여부를 확인하기 위하여 白鼠의 小便을 빼내어 尿糖測定 strip(Glukotest, 베링거社製)으로 검사한 결과 이미 정맥주사 3일째부터는 血糖이 양성으로 나왔다.

8주일동안 成長시킨 후 血糖量을 측정한 결과 正常對照群은 123.3 ± 15mg/dl, 糖尿病群은 315.8 ± 49.9 mg/dl로서 糖尿病群이 현저히 높았으며 (P < 0.005), 체중 및 심장무게는 正常對照群이 평균 231.7g, 0.89g 인데 비하여 糖尿病群은 평균 191.4g 및 0.80g 으로서 糖尿病群에서 유의하게 저하되어 있었다(P < 0.05). 심장무게의 체중에 대한 비율은 正常對照群이 평균 0.39%, 糖尿病群이 0.42%로서 糖尿病群에서 유의하게 (P < 0.05) 증가되어 있었다(표 1).

基礎心筋原纖維 ATPase 活性度는 正常對照群의 경우 0.241 ± 0.041 μmol Pi / mg / 5min, 糖尿病群에서는 0.187 ± 0.033 μmol Pi / mg / 5min로서 糖尿病群에서 약 20%의 活性度 감소가 관찰되었다(P < 0.01) (Fig. 1).

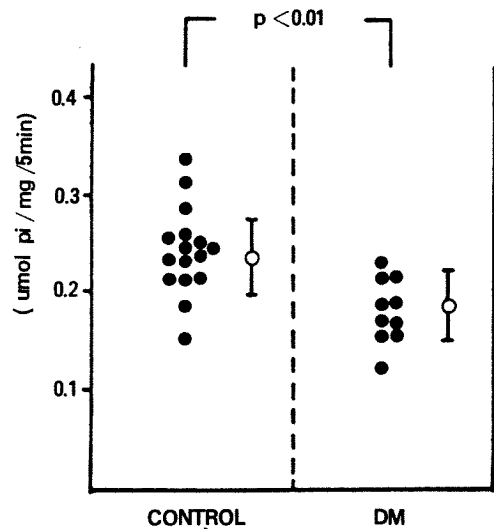


Fig. 1. Comparison of basal myofibrillar ATPase activity in control and diabetic rats. Open circle and bars in each group represent mean ± S.D.

心筋原纖維 ATPase 活性도와 $MgCl_2$ 농도 사이의 관계를 관찰한 결과 正常對照群 및 糖尿病群 양쪽 모두 같은 농도의 ATP 속에서는 $MgCl_2$ 농도를 증가시키에 따라 ATPase 活性도가 증가하는 모습을 보였으며, 正常對照群의 경우 $MgCl_2$ 농도 0.05 mM과 0.5mM 사이에는 유의한 활성화 증가가 있었지만 0.5mM 이상의 $MgCl_2$ 농도에서는 ATPase 活性度 증가가 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2).

한편 正常對照群 및 糖尿病群 사이에는 각 $MgCl_2$ 농도 0.05, 0.5, 2, 5mM 모두에서 유의한 차이가 있었으며 糖尿病群의 활성화도 감소가 지속되었다(Fig. 3).

같은 농도의 $MgCl_2$ 조건하에서 ATP 농도의 변

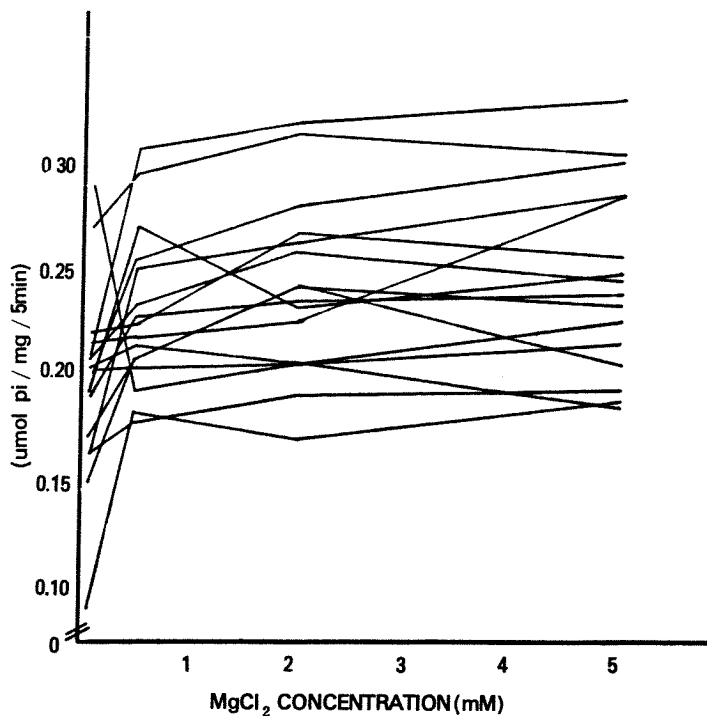


Fig. 2. Correlation between MgCl_2 concentration and myofibrillar ATPase activity in normal controls.

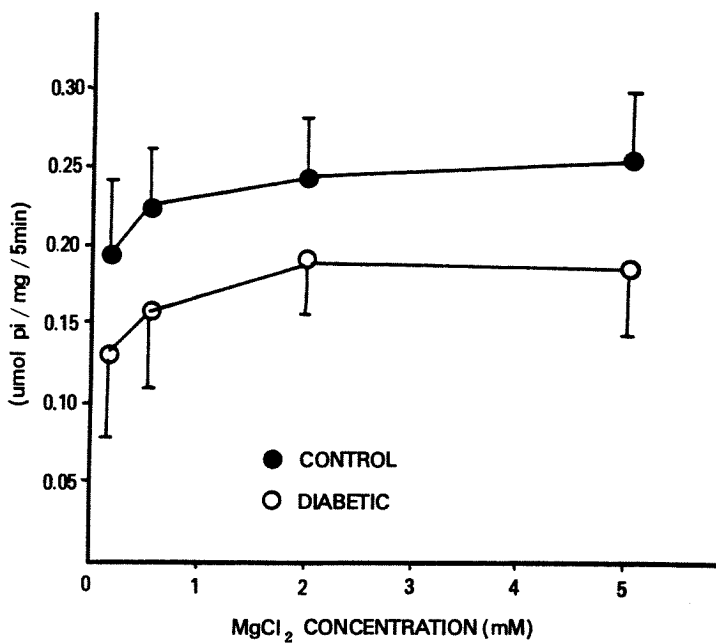


Fig. 3. Correlation between MgCl_2 concentration and ATPase activity.

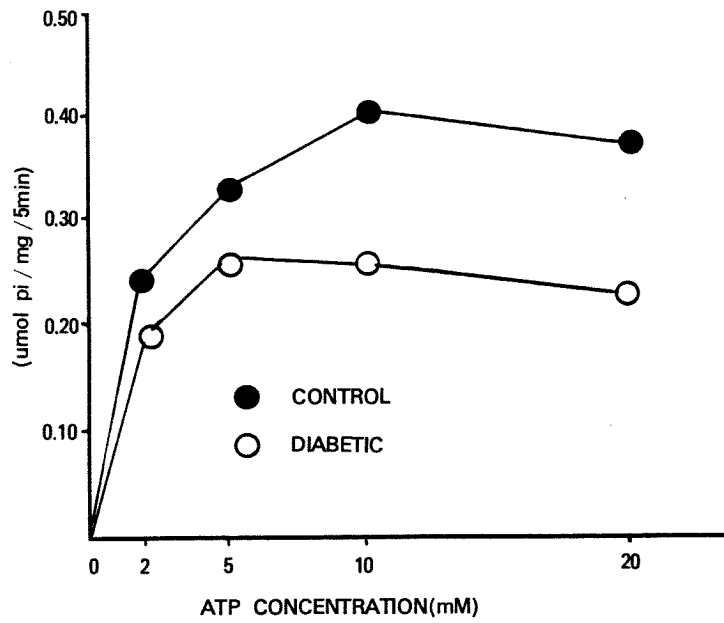


Fig. 4. Correlation between ATP concentration and ATPase activity.

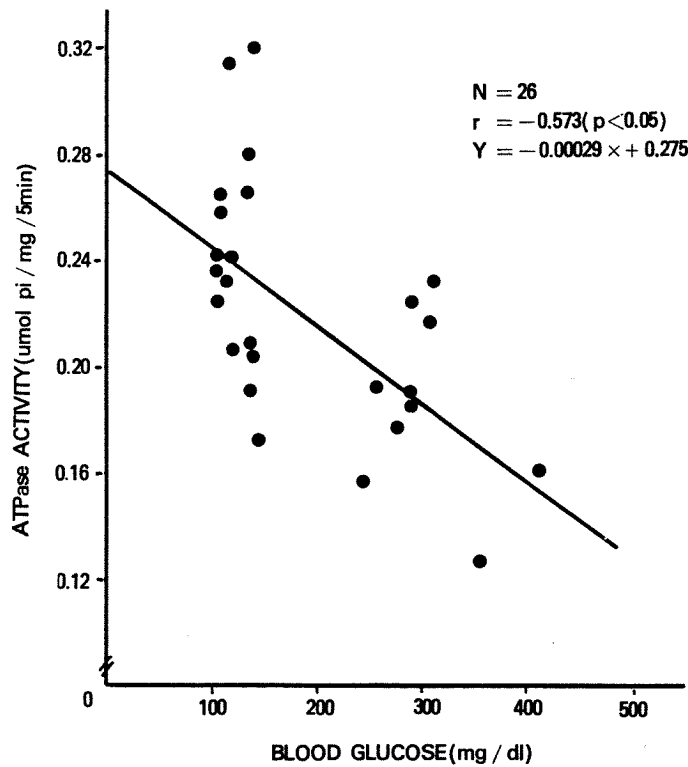


Fig. 5. Relationship of blood glucose concentration and basal myofibrillar ATPase activity.

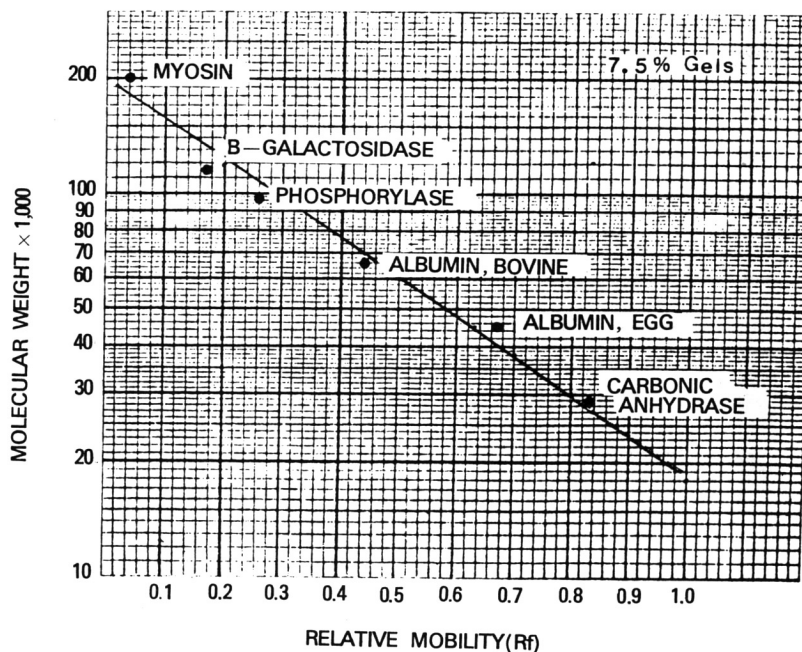


Fig. 6. Calibration curve of molecular weights.

화에 따른 心筋原纖維 ATPase 活性度を 측정 관찰한 결과 正常對照群에서는 ATP 10mM 일때 평균 $0.399 \mu\text{mol Pi/mg/5min}$ 로서 가장 높은 ATPase 活性度を 보였다가 이후 감소하는 추세를 나타내었으며 糖尿群에서는 ATP 5mM 일때 ATPase 活性도가 $0.267 \mu\text{mol Pi/mg/5min}$ 로서 최고치에 달했다가 역시 그 이상의 농도에선 감소하는 추세를 나타내었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 正常對照群과 糖尿群사이의 관계를 살펴보면 ATP 농도 2mM, 10mM, 20mM에서 양군 사이에는 계속 유의한 活性度の 차이가 관찰되었다(Fig. 4).

正常對照群 및 糖尿群 모두에서 血糖量과 基礎心筋原纖維 ATPase 活性度 사이의 상관관계를 분석한 결과 회귀계수는 -0.00029 , 상관계수 $r = -0.573$ ($P < 0.05$)인 역상관관계를 나타내었다(Fig. 5).

그리고 실제로 ATPase 활성도를 측정한 心筋原纖維 내에 어떠한 심근수축단백질이 함유되어있는지 확인하기 위하여 心筋原纖維에서 추출한 단백용액 $50 \sim 100 \mu\text{g}$ 을 7.5% SDS-polyacrylamide 전기영동을 시행한 결과 myosin 중사슬, 경사슬1, 경

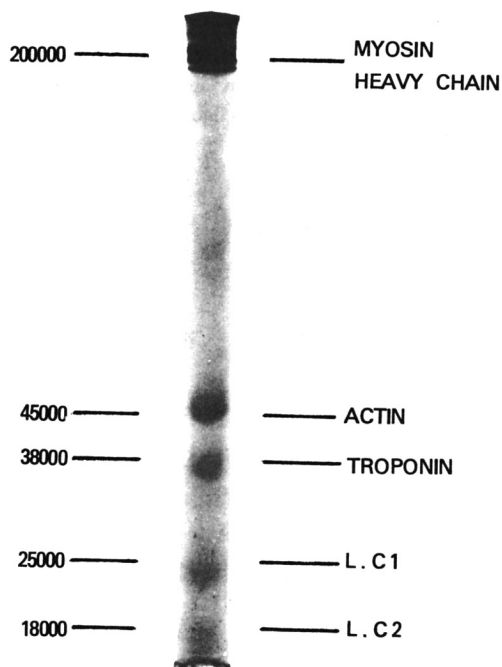


Fig. 7. 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of control myofibril proteins. Gel contained 50-100 μg protein.

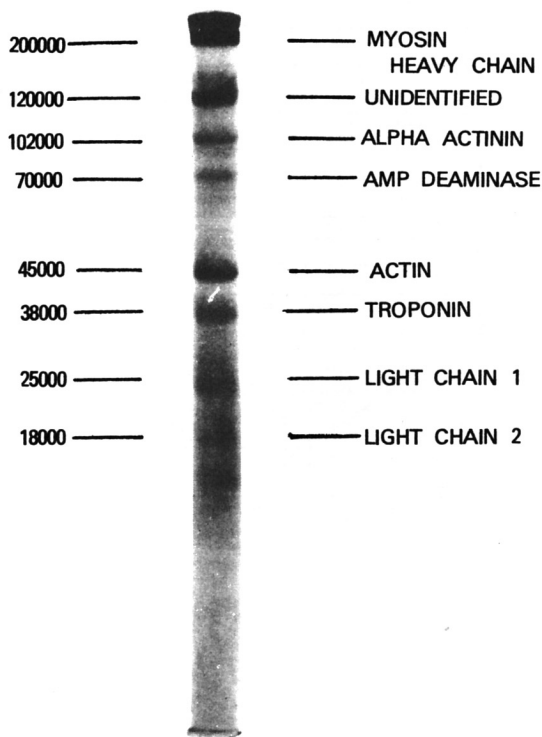


Fig. 8. 75% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of diabetic myofibril proteins. Gel contained 50-100 μ g protein. Bands are labeled as myosin heavy chain (H. C.), myosin light chains 1 (L.C.1) and 2 (L.C.2).

사슬2, actin, troponin 등이 분리되었다(Fig. 6, 7, 8).

考 察

心筋의 收縮機能에 관한 근본적인 기전을 밝히고자 組織學的, 生理學的으로 그리고 生化學的인 면에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 그중에서도 특히 심근수축단백질의 효소적 활성도와 심근기능 사이의 相關性에 대한 관심은 대단히 높아지고 있으며 Alpert 등이 心不全으로 사망한 사람의 心筋原纖維ATPase 活性도가 正常人보다 감소되어 있음을 보고한 이래¹⁾ 실험적으로 심장에 부담을 준 상태에 있는 動物의 心筋原纖維 또는 myosin의 ATPase 活性도가 변한다는 사실이 증명되었다¹⁶⁻¹⁸⁾.

心筋의 기능을 調節하는 많은 단계 중에서 筋

纖維膜을 통해서 調節되는 각종 이온의 動態와 電流, 筋形質細網(sarcoplasmic reticulum)에 의한 칼슘의 역동, 트로포닌-트로포마이오신 계의 조절 역할 등이 重要하다고 알려져 있지만^{2, 19)} 결국 이들 과정을 거친 이후에 心筋이 收縮하는 시점에서 actin과 myosin이 相互作用으로 ATP를 분해하면서 結合하는 최종 과정이 存在하고 있다. 心臟내에서의 ATPase를 측정할 수 있는 방법은 心筋原纖維(myofibril)나 actomyosin, myosin 또는 그보다 작은 myosin의 중사슬이나 Subfragment에서도 측정할 수가 있다.

本 研究에서 心筋原纖維를 심장기능을 나타내는 ATPase 활성도의 測定 對象으로 決定한 이유는 心筋原纖維 자체가 여러 심장수축단백질이 모여있기 때문에 심장수축에 있어서 가장 최소한의 生理學的인 單位를 이루고 있다고 생각했기 때문이다. 그리고 從來에는 분리된 心筋原纖維내에 또 다른 ATPase 活性도를 가지고 있는 미토콘드리아나 筋形質細網, 筋纖維膜 등이 不純物로 들어있어서 순수한 心筋原纖維만의 ATPase 活性도로 평가하는 것이 문제점이 있었으나 Solaro 등이 非이온性 洗淨劑인 Triton X-100 처리를 통하여 筋纖維膜, 筋形質細網 그리고 미토콘드리아의 ATPase를 제거하는데 成功했으며¹²⁾ 本 研究에서도 Triton X-100 處理를 충분히 하여 純粹한 心筋原纖維 ATPase 活性도를 측정할 수가 있었다.

마그네슘이온은 actin으로 조절되는 myosin ATPase에 生理學的으로 가장 重要한 이온이며 순수한 myosin만 따로 분리해서 측정하는 myosin ATPase 활성도를 억제하는 경향이 있어서 myosin ATPase 활성도 측정에는 사용하지 않는다. 그러나 myosin이 actin과 結合하여 actomyosin 상태에서는 마그네슘 및 칼슘이온 양쪽 모두 ATPase 활성도를 刺戟하는 作用이 있다.

本 研究에서는 마그네슘 濃度を 增加시킬수록 心筋原纖維 ATPase 活性도는 增加하는 傾向을 보였으며 正常對照群 및 糖尿病 양군에서 서로 增加하는 정도는 차이가 있었으나 各各의 마그네슘 濃度에서 糖尿病의 ATPase 活性도가 有意하게 低下되어 있었다. 그러나 正常對照群의 경우 마그네

습 0.5mM 이상에서 통계적으로 유의한 증가가 나타나지 않았던 것은 아마測定結果의標準偏差가 비교적 크기 때문인 것으로 간주된다.

心筋原纖維 혹은 myosin ATPase 活性度 研究는 이들이 근육의收縮速度와相應한다는 보고이래²⁰⁾ 心不全 상태의 각종生理學的研究뿐만 아니라 內分泌疾患에對한 연구로서 대표적으로 갑상선기능항진증 때 ATPase 활성도가 증가하였고²¹⁾ -²⁴⁾ 갑상선기능저하증²⁵⁾, 부신적출후의 상태²⁶⁾, 뇌하수체 적출후의 변화 등이 보고된 바 있으며²⁷⁾ 운동훈련된 백서의 心筋 actomyosin ATPase 活性度の有意한增加도 관찰되었다²⁸⁾.

本 研究에서는 마그네슘 농도 및 ATP 농도에 따라서 糖尿群과 正常對照群 사이의 서로 다른 양식의 心筋原纖維 ATPase 活性도가 관찰되었는데 이것은 糖尿病으로 因하여, 心筋原纖維 蛋白質에 어떤 변화가 왔음을 示唆하는 것이며 이것은 마그네슘-효소 혹은 마그네슘-기질-효소 복합체를 변화시켜 ATPase 活性度の減少를 가져왔으리라 생각된다.

Gicomelli와 Wiener는 遺傳的으로 糖尿病인 쥐에서 점진적인 심근세포의 손상과 심근내 細小動脈의 筋細胞 손상을 發見했으며 이후 毛細血管의 기저막이 두터워지고 血管주위 말단신경부 역시變性에 빠지는 것을 관찰하고서는 糖尿病에 의한 心臟이상은 心筋細胞에 먼저 出現하므로 血管의 病變에 따른 이차적 손상이 아니라고 하면서, 그 기전으로서 미토콘드리아의 지질 처리 이상 그리고 혹은 라이소좀의 活性度 減少를 제시하였다²⁹⁾. Regan 등은 糖尿犬에서 左心室 擴張期末容積이 작고 心拍出量 역시 감소되어있음을 확인했으며 病理學的으로 心臟의 간질내에 糖蛋白質으로 看做되는 PAS 양성 물질이 축적되었음을 보고하였다⁹⁾. 糖尿白鼠의 心臟만을 따로 분리하여 體外循環을 시키면서 心房充滿壓力을 올림에 따른 수축기혈압과 심박출량을 측정한 결과 정상에 비해 역시 감소되어 있었으며 관상동맥혈류는 정상이더라도 포도당 섭취와 조직내 ATP 농도는 감소하였고 후부하를 증가시킬수록 最大 左心室壓力과 dP/dT 는 감소했다는 보고도 있다³⁰⁾. 糖尿心臟에서 심

한 虛血狀態를 유도하면 정상보다 心室不全 現象이 훨씬 빨리 나타나며 무산소증에서의 回復期 심장기능도 심히 저하되어있고³¹⁾, 뿐만 아니라 回復期에 후부하를 증가시키면 心臟機能은 더욱惡化되지만 代用血液에 인슐린과 초성포도산염, 구연산, 초산 등 각종 기질을 함께 投與하면 그 異常이 好轉된 研究도 있다³²⁾. 慢性的 糖尿白鼠에서 분리한 심실유두근은 수축속도도 감소되어있지만 이완속도 역시 감소해있으며³³⁾ 인슐린 치료를 하면 正常速度로 돌아오고³⁴⁾, 糖尿心臟에 대한 체외순환 분리연구에서 비록 수축기혈압과 심박출량이 감소했더라도 관상동맥혈류량 및 유산생산량은 正常임을 미루어 糖尿心臟은 허혈심장이 아니라고 주장하는 학자도 있다³⁵⁾.

糖尿白鼠에 對한 生化學的研究로서는 心室의 myosin ATPase 活性도는 감소하고 myosin isozyme 양태가 ATPase 活性도가 낮은 쪽으로 移動된다는 說이 유력하며¹¹⁾ 糖尿白鼠의 心臟에서 분리한 筋形質細網의 칼슘결합도 감소되었다가 인슐린 치료로써 정상화된 보고도³⁶⁾ 위의 生理學的研究들과 일치하는 것이다.

그러나 糖尿病性 心筋症의 病態生理學的 기전에 대해선 아직 잘 모르고 있다. 病理學的으로 증명된 心筋內動脈, 細小動脈 및 毛細血管의 변화만으로는 이 疾患을 설명할 수 없으며, 糖尿를 가진 犬이나 원숭이에서처럼 左心室의 間質에變化가 와서 左心室順應도가 저하됨으로써 심장기능이 떨어진다는 說도 유력하나 向後 심근수축단백질의 isozyme 변화나 세포내 칼슘대사에 이상이 있던 것이 인슐린 치료로서 정상화되는 기전을 더욱 糾明해 나가야 할 것이다.

그리고 심장수축단백질에 대하여 수많은 研究가 進行되고 있지만 심장수축단백질의 生化學的特性이 그 生理學的인 機能에 미치는 相關性에對한 理解는 遼遠한 狀態이며 收縮蛋白質의 구조에 대한 分子生物學的 研究과 나아가서 生理學的, 病態生理學的 適應에 關한 生化學的 根據를 밝혀야 할 것으로 사료된다.

Streptozotocin으로誘發한 糖尿白鼠를 8주간 成長시킨 후 心筋原纖維를 분리해서 기초심근원섬유 ATPase 活性度を測定하여 正常白鼠와 비교 검토하였으며 마그네슘농도 및 기질농도에 따른 ATPase 活性度の變化를 관찰하고 血糖量과 心筋原纖維 ATPase 活性度 사이의 相關關係를 分析하였으며 心筋原纖維에서 추출한 心臟收縮蛋白質을 電氣泳動 方法으로 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 糖尿群의 體重 및 心臟 무게는 正常對照群에 比하여 有意하게 低下되었으며 心臟의 體重에 對한 比率은 增加되었다.

2) 糖尿群에서 분리한 基礎心筋原纖維 ATPase 活性度は 正常對照群에 比하여 有意하게 減少되어 있었으며, 마그네슘의 濃度增加에 따라서 ATPase 活性度は 增加하는 모습을 나타내고 0.05 mM 내지 5mM 의 마그네슘 濃度에서 糖尿群 및 正常對照群 사이에는 有意한 差異가 계속되었다.

3) ATP 농도의 增加에 따라서 心筋原纖維 ATPase 活性度は ATP 5~10mM 에서 가장 높은 活性度を 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 活性度が 減少하는 모습을 보였으나 統計적으로 有意한 減少는 아니었다.

4) 血糖量과 基礎心筋原纖維 ATPase 活性度 사이의 相關關係를 分析한 結果 비교적 낮은 상관계수를 가진 역상관계를 관찰할 수 있었다.

5) 心筋原纖維에서 추출한 蛋白質을 표본으로 하여 SDS-polyacrylamide 전기영동을 시행한 결과 myosin 중사슬, 경사슬1, 경사슬2, actin, tropomyosin 등이 확인되었다.

6) 以上の 結果로서 糖尿病性 心筋症은 心臟收縮蛋白質이 고에너지 인산을 분해하는데 있어서의 缺陷이 그 주요기전 중의 하나라고 사료되며, 本研究에서 使用한 心筋原纖維 ATPase 活性度 測定方法은 많은 心臟病의 病態生理學의 特性을 評價하는데 있어서 有用한 方法이라고 생각된다.

- 1) Alpert NR and Gordon MS: *Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestive heart failure*. *Am J Physiol.* 202:940, 1962
- 2) Scheuer J and Bhan AK: *Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphatase activity and physiological function*. *Circ Res.* 45:1, 1979
- 3) Rubler S, Dlugash J and Yuceoglu YZ: *New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis*. *Am J Cardiol.* 30:595, 1972
- 4) Ahmed SS, Jaferi GA and Narang RM: *Preclinical abnormality of left ventricular function in diabetes mellitus*. *Am Heart J.* 89:153, 1975
- 5) Regan TJ, Lyons MM and Ahmed SS: *Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus*. *J Clin Invest.* 60:885, 1977
- 6) Seneviratne BIB: *Diabetic cardiomyopathy: The preclinical phase*. *Br Med J.* 1:1444, 1977
- 7) Kannel WB, Hjortland M and Castelli WP: *Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham Study*. *Am J Cardiol.* 34:29, 1974
- 8) Hamby RI, Zoneraich S and Sherman L: *Diabetic cardiomyopathy*. *JAMA.* 229:1749, 1974
- 9) Regan TJ, Ettinger PO and Khan MI: *Altered myocardial function and metabolism in chronic diabetes mellitus without ischemia in dogs*. *Circ Res.* 35:222, 1974
- 10) Dillmann WH: *Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin in the rat*. *Diabetes.* 29:579, 1980
- 11) Malhotra A, Penpargkul S and Fein FS: *The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile pro-*

- teins. *Circ Res.* 49:1243, 1981
- 12) Solaro RJ, Pang DC and Briggs FN: *The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. Biochim Biophys Acta.* 245 : 259, 1971
 - 13) Lowry OH, Rosebrough NJ and Farr AL: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem.* 193:265, 1951
 - 14) Horwitt BN: *Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. J Biol Chem.* 193:537, 1952
 - 15) Weber K and Osborn M: *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem.* 244:4406, 1969
 - 16) Chandler BM, Sonnenblick EH and Spann JF Jr: *Association of depressed myofibrillar adenosine triphosphatase and reduced contractility in experimental heart failure. Circ Res.* 21:717, 1967
 - 17) Luchi RJ, Kritcher EM and Thyrum PT: *Reduced cardiac myosin adenosine triphosphatase activity in dogs with spontaneously occurring heart failure. Circ Res.* 24:513, 1969
 - 18) Katagiri T and Morkin E: *Studies on the substructure of myosin in cardiac hypertrophy. Characterization of light chains. Biochim Biophys Acta.* 342:262, 1974
 - 19) Caroni P and Carafoli E: *An ATP-dependent Ca^{2+} -pumping system in dog heart sarcolemma. Nature.* 283:765, 1980
 - 20) Barany M: *ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J Gen Physiol.* 50:197, 1967
 - 21) Goodkind MJ, Dambach GE and Thyrum PT: *Effect of thyroxine on ventricular myocardial contractility and ATPase activity in guinea pigs. Am J Physiol.* 226:66, 1974
 - 22) Banerjee SK, Kabbas EC and Morkin E: *Enzymatic properties of the heavy meromyosin subfragment of cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits. J Biol Chem.* 252:6925, 1977
 - 23) Banerjee SK and Morkin E: *Actin-activated adenosine triphosphatase activity of native and N-ethylmaleimide-modified cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits. Circ Res.* 41:630, 1977
 - 24) Conway G, Heazlitt RA and Fowler NO: *The effect of hyperthyroidism on the sarcoplasmic reticulum and myosin ATPase of dog hearts. J Mol Cell Cardiol.* 8:39, 1976
 - 25) Yazaki Y and Raben MS: *Effect of the thyroid state on the enzymatic characteristics of cardiac myosin: A difference in behavior of rat and rabbit cardiac myosin. Circ Res.* 36:208, 1975
 - 26) Royetto MJ, Hjalmarson AC and Morgan HE: *Hormonal control of cardiac myosin adenosine triphosphatase in the rat. Circ Res.* 31:397, 1972
 - 27) Hjalmarson AC, Whitefield CF and Morgan HE: *Hormonal control of heart function and myosin ATPase activity. Biochem Biophys Res Commun.* 41:1584, 1970
 - 28) Resink TJ, Gevers W and Noakes TD: *Increased cardiac myosin ATPase activity as a biochemical adaptation to running training. J Mol Cell Cardiol.* 13:679, 1981
 - 29) Giacomelli F and Wiener J: *Primary myocardial disease in the diabetic mouse. An ultrastructural study. Lab Invest.* 40:460, 1979
 - 30) Miller TB Jr: *Cardiac performance of isolated perfused hearts from alloxan diabetic rats. Am J Physiol.* 236:H808, 1979
 - 31) Feuvray D, Idell-Wenger JA and Neely JR: *Effects of ischemia on rat myocardial function and metabolism in diabetes. Circ Res.* 44:322, 1979
 - 32) Ingebrechtsen CG, Moreau P and Hawelu-Johnson C: *Performance of diabetic rat hearts: effects of anoxia and increased work. Am J Physiol.* 239:H614, 1980
 - 33) Fein FS, Kornstein LB and Strobeck JE: *Altered myocardial mechanics in diabetic rats. Circ Res.* 47:922, 1980
 - 34) Fein FS, Strobeck JE and Malhotra A: *Reversibility of diabetic cardiomyopathy with insulin in rats. Circ Res.* 49:1251, 1981

34) Penpargkul S, Schaible T and Yiptinsoi T: *The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. Circ Res. 47: 911, 1980*

36) Lopaschuk GD, Tahiliani AC and Vadlamudi RVSV: *Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin or carnitine-treated diabetic rats. Am J Physiol. 245:H969, 1983*
