

백서에서 Phenylephrine 반복 투여로 유발된 심근 비후에서의 Phospholipase C- γ_1 의 과발현*

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

김 성 숙

단국대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실*

한동선 · 이학중 · 박이태*

포항공과대학 생명공학과

서 판 길

= Abstract =

Increased Expression of Phospholipase C- γ_1 in Phenylephrine Induced Cardiac Hypertrophy of Rats

Sung Sook Kim, M.D.

Department of Pathology, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Dong-Sun Han, M.D., Hak Choong Lee, M.D., Yee Tae Park, M.D.*

Department of Internal Medicine, Department of Thoracic Surgery, Medical College, Dankook University,
Cheonan, Korea*

Pann Ghill Suh, Ph.D.

Department of Life Science, Pohang Institute of Science and Technology, Pohang, Korea

Background : Cardiac hypertrophy is an adaptive mechanisms in response to an increased cardiac work load. Alterations in gene expression play an important role in this adaptive process. Recent investigations have indicated that the α -1 adrenergic stimulation in vitro induces hypertrophic change of neonatal cardiomyocytes. The signalling mechanisms of this α -1 agonist induced cardiomyocyte hypertrophy are largely unknown. However, recent evidence favors an effector pathway that involves phospholipase C(PLC) mediated hydrolysis of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. It should be recognized that the demonstration of enhanced phosphoinositol turnover in the presence of α -1 adrenergic agonist in vitro does not necessarily imply that a similar response is operative in vivo. Furthermore, the role of subtypes of phospholipase C in this system should be determined. In this context, we produced in vivo cardiac hypertrophy by repeated injection of α -1 adrenergic agonist, phenylephrine, and tried to evaluate any change of phospholipase C subtypes by immunohistochemistry and immunoblotting technique and also measured the phosphatidylinositol hydrolyzing activity of the enzyme.

Method : To produce cardiac hypertrophy, we injected phenylephrine 12mg/kg i.p. to the 28 female S-D rats weighing 150-250g daily for 5 days. This measures produced 22% increase

*본 논문은 1992년도 교육부 기초의학 학술연구비 지원을 받았음.

of heart weight/body weight ratio. After 5 days, rats were sacrificed and hearts were rapidly excised and frozen for next procedure. The immunohistochemical stainings of myocardium were carried out using monoclonal antibodies against PLC- β_1 , - γ_1 , - δ_1 with Avidin-Biotin Complex method. Immunoblotting was done with monoclonal anti-PLC- γ_1 antibody after immunoprecipitation. The activity of PLC- γ_1 was determined in the assay mixture containing [^3H] phosphatidylinositol of 20,000 cpm. The reaction was performed by incubating with resuspended immunoprecipitate for 10 min and supernatant was collected for -scintillation counting.

Results : Immunohistochemical staining demonstrated increased staining of PLC- γ_1 in the phenylephrine induced hypertrophied heart as compared with normal control heart. PLC- β_1 and - δ_1 did not show any change. Eighteen out of 20 hypertrophied cardiac tissue (90%) demonstrated increased expression of the PLC- γ_1 compared with control heart tissue in immunoblotting. [^3H] PI hydrolyzing activity of PLC- γ_1 in the immunoprecipitates of the hypertrophied hearts (4650 ± 614 cpm) were increased consistently in 6 samples as compared with control normal hearts (2387 ± 651 cpm).

Conclusion : In the present experiments we demonstrated that Phospholipase C- γ_1 was overexpressed compared with control normal heart of rat by immunohistochemistry and immunoblotting technique and showed that the activity of this isoenzyme was elevated. Our findings of increased PLC- γ_1 expression in the 1-adrenergic agonist induced cardiac hypertrophy tissue suggest that the phosphatidylinositol signalling pathway is important in the genesis of cardiac hypertrophy and the isoenzyme of PLC- γ_1 may play a central role in this mechanism.

KEY WORDS : Cardiac hypertrophy · Phospholipase C · Signal transduction.

서 론

심근 비후는 심장에 가하여지는 압력 혹은 용적의 과부하나 기타 여러가지 자극들에 의하여 유발되는 적응성 반응^{1,2)}이지만 그 자체로서 심혈관계 합병증을 일으킬 수 있는 독립적 위험 인자로 간주되고 있다³⁾. 심장 세포 내에서의 여러가지 유전자의 발현과 여기에 따른 단백질의 증가는 이 반응에서의 가장 중요한 변화라고 할 수 있다^{4,5)}. 그러나 이와 같은 여러가지 자극들이 심장에 어떻게 작용하며 어떤 신호전달기전(signal transduction mechanism)을 거쳐 심장세포내에서 생화학적인 변화를 유발하여 세포의 크기가 커지는 지에 대하여는 아직 정확하게 밝혀진 것이 없다¹⁾.

최근 여러 학자들은 배양된 태생기 심근세포^{6,7)} 또는 성년 백서 심근세포⁸⁾에서 α_1 -agonist를 투여하여 α_1 -아드레날린 수용체를 자극하였을 때 이들 세포에서 비후성 변화를 볼 수 있었다고 하여 심근비후 발생에 있어서의 α_1 -아드레날린 자극의 중

요성을 말한 바 있다^{9,10)}. 또한 백서에서 연구된 카테콜아민 유발성 심근 비후 모델에서도 혈액학적 과부하 보다는 α - 또는 β -아드레날린 수용체에 대한 자극이 심근비후 발생에 중요한 역할을 하고 있다고 하였다¹¹⁾.

한편 이 α -아드레날린 수용체에 대한 자극은 phospholipase C(PLC)를 통한 phosphatidylinositol pathway를 통하여 세포내로 그 신호가 전달(signal transduction)됨이 알려져 있고^{12,13)}, 배양된 세포에서 phorbol ester와 같이 protein kinase C를 자극시키는 제제를 주었을 때 단백질의 합성이 증가함도 보고되었다¹⁴⁾.

그러나 이와 같이 배양된 심근세포에서 알려진 현상들이 실제 생체내에서도 비슷하게 발생하는지에 대하여는 아직까지 알려진 바 없다. 또한 phospholipase C(PLC)는 이 신호전달체계(signal transduction pathway)에 있어서의 핵심효소로서 작용하고 있으나 세포 또는 생체에 α -아드레날린 자극을 가하였을 때 이 PLC 효소 자체의 표현정도가 어

떻게 되는지에 대하여서도 알려진 바 없다.

Phospholipase C(PLC)는 현재까지 9개의 동위 효소들이 알려져 있다¹⁵⁾. 이 중 PLC- γ 는 세포 증식등의 신호 전달에 특히 작용하리라고 생각되어 지고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 즉 PLC- γ 는 여러 성장인자들에 대한 반응으로서 활성화되어 세포 증식에 중요 역할을 하고 있으며 실제 생체에서의 여러 증식성 질환에 PLC- γ 가 과발현되어 있음이 보고된 바 있다^{20,21)}. 저자들은 이 PLC- γ 가 심근 비후의 발생에 있어서도 신호전달 효소로서 중요한 역할을 할 것으로 생각하여, α_1 agonist 반복 투여 후에 발생하는 백서 비후 심근에서의 PLC- γ 의 표현 정도를 면역조직 화학염색(immunohistochemical staining)과 면역 블롯(immunoblotting), 효소 활성도 측정등의 방법으로 평가하여 보았다.

연구대상 및 방법

1. 심근 비후의 유발 및 심근조직의 준비

실험동물로는 몸무게 약 150~250g 사이의 Sprague-Dawley rat 40마리를 사용하였다. 실험군 28마리는 증류수에 10mg/cc의 농도로 용해된 phenylephrine(Sigma Co.) 12mg/Kg를 5일간 매일 복강내로 주사하였고 대조군 12마리는 phenylephrine 대신 생리식염수를 0.2cc씩 같은 방법으로 주사하였다. 주사 후 6일째 백서를 희생시킨 후 신속히 심장을 적출하여 생리식염수로 세척한 후 무게를 측정하였다. 주사기간 중 사망한 실험군 8마리와 대조군 1마리는 분석에서 제외되어 실험군 20마리와 대조군 11마리가 본 실험에 이용되었다. 적출된 심장은 좌심실 중간 부위를 횡으로 절단하여 기저부 절반은 면역조직화학염색을 위하여 10% buffered formalin에 저장하였고 침부 절반은 분자 생물학적 분석을 위하여 액화질소에 급냉하여 보관하였다.

2. 면역조직화학염색

파라핀에 포매된 조직에서 5 μ m 두께의 절편을 얻은 후 PLC- β_1 , - γ_1 , - δ_1 에 대한 단클론 항체를 이용하여 Avidin Biotin Complex Method로 면역조직화학염색을 시행하였다. 절편은 xylene과 ethyl alcohol을 이용하여 탈파라핀과 hydration을 시킨후 준비된 일차항체²²⁾를 실온에서 두시간 동안 반응

시켰다. 이차 항체로는 Dako사의 LSAB(labelled streptavidin biotin) Kit를 사용하였고 AEC(3-amino-9-ethyl carbazole)를 발색제로 하여 염색하였다. 음성대조군으로는 일차항체 대신 phosphate buffered solution으로 처리하였고 그 외의 과정은 똑같이 시행하였다.

3. Phospholipase C- γ_1 immunoblotting

분리된 심근 조직을 homogenize buffer(20mM HEPES(N-2'-hydroxy ethyl piperazine-N-2'-chane-sulfonic acid), pH 7.2, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM Na_3VO_4 , 50mM NaF, 1% Triton X-100, 10 μ g/ml leupeptin, 1mM PMSF(phenyl-methyl sulfonyl fluoride))에 담근 후 polytron homogenizer로 균일하게 분쇄한 후 4°C에서 20,000 rpm으로 30분간 원심 분리하였다. 상층액에서 단백질 정량을 한 뒤 단백질 2mg에 해당하는 상층액을 취하여 20% pensorbin(Calbiochem., San Diego, USA) 30 μ l를 첨가한 후 1시간 방치하여 preclearing 시켰다. 이를 다시 원심분리하여 상층액을 취한 후 F7(monoclonal anti-PLC- γ_1 antibody) coated pensorbin 30 μ l를 첨가하여 2시간 동안 면역침전을 시켰다. 이를 10,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 침전물을 얻어 세척 버퍼(50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate)로 5회 세척하였다. Laemmli cooking buffer를 첨가한 후 95°C로 5분간 가열한 뒤 원심분리하고 상층액을 취하여 8% SDS-PAGE에서 전기영동하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 monoclonal anti-PLC- γ_1 antibody를 4시간 동안 반응시켰다. 면역반응은 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG antibody(Kirkegaard and Perry Laboratories, INC., Gaithersburg)를 이용하여 발색시킨 후 관찰하였다.

4. Phospholipase C- γ_1 activity의 측정

대조군 6마리와 실험군 6마리의 심근에서 PLC- γ_1 의 활성도를 측정하여 보았다. Immunoblotting을 위하여 얻은 면역침전(immunoprecipitate)의 일부를 10 μ l씩 취하여 20mM Tris-HCl(pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EGTA가 포함된 버퍼로 3회 세척한 후 같은 버퍼 100 μ 에 다시 녹였다. PLC- γ_1 효소 활성도는 50M phosphatidylinositol(20,000 cpm, [^3H]phosphatidylinositol), 1mM EDTA(ethylenedia-

mine tetraacetic acid), 10mM calcium chloride, 0.1 % sodium deoxycholate, 50mM HEPES, pH 6.8이 포함된 200 μ l의 assay mixture를 이용하여 측정하였다. 반응은 10 μ l의 면역침전물을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 시킨 뒤 중지시켰다. 0.3ml의 5mM EDTA, 1mM HCl 용액을 첨가한 후 상층액 0.5ml를 얻어 β scintillation counting을 하였다.

결 과

1. Phenylephrine 주사 후 심장 무게의 변화

대조군 11마리의 평균 체중은 194.9 ± 65.1 g 이었고 심장의 무게는 0.61 ± 0.09 g(심장무게/체중 : 0.31 ± 0.03 %)인데 반하여 phenylephrine 12mg/Kg를 5일간 매일 복강내로 주사한 백서 20마리의 평균 체중은 192.0 ± 30.1 g 이었고 심장의 무게는 0.73 ± 0.06 g(심장무게/체중 : 0.38 ± 0.05 %)으로서 평균 22%의 심장무게의 증가를 볼 수 있었다($P < 0.01$).

2. 면역조직화학염색

PLC- β_1 , - γ_1 , - δ_1 에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색상에서 PLC- β_1 과 PLC- δ_1 에 대한 염색은 비 특이적이고 심장비후군의 심근에서도 대조군에 비하여 특별한 변화가 보이지 않았다. 그러나 PLC- γ_1 에 대한 염색에서는 대조군에서 약한 염색상을 보였으나 이에 비하여 phenylephrine 반복투여군에서는 염색이 강하게 발현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 염색은 phenylephrine 반복투여군

에서 미만성으로 모든 심근섬유에 대하여 비슷한 정도로 나타났으나 심내막하(subendocardium) 부분이 심외막하(subepicardium) 부분보다 더 진하게 발현되었다.

3. Phospholipase C- γ_1 western blot analysis

Monoclonal anti-PLC- γ_1 antibody를 이용한 immunoblotting 상 PLC- γ_1 단백질은 145 KDa protein으로 인식되었다. 대조군에 비하여 phenylephrine 투여군에서 PLC- γ_1 이 과발현되어 band가 비교적 진한것을 확인할 수 있었고(Fig. 2) 이는 실험군 20마리중 18마리에서 관찰되었다(90%).

4. Phospholipase C- γ_1 활성도의 측정

실험군 6마리와 대조군 6마리에서 시행한 phospholipase C- γ_1 의 효소 활성도($[^3\text{H}]$ phosphatidylinositol hydrolyzing activity)의 측정 결과도 대조군에 비하여 phenylephrine 반복투여군에서 높은 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 대조군은 평균 2387 ± 651 cpm을 보인데 반하여 실험군은 평균 4650 ± 614 cpm을 보였다($P < 0.01$).

고 안

본 연구에서 저자들은 α_1 -adrenergic agonist인 phenylephrine을 반복 투여하여 유발시킨 백서 비후 심근 조직에서 phospholipase C(PLC) 효소의 표현을 면역 조직화학 염색 방법으로 관찰 하였을

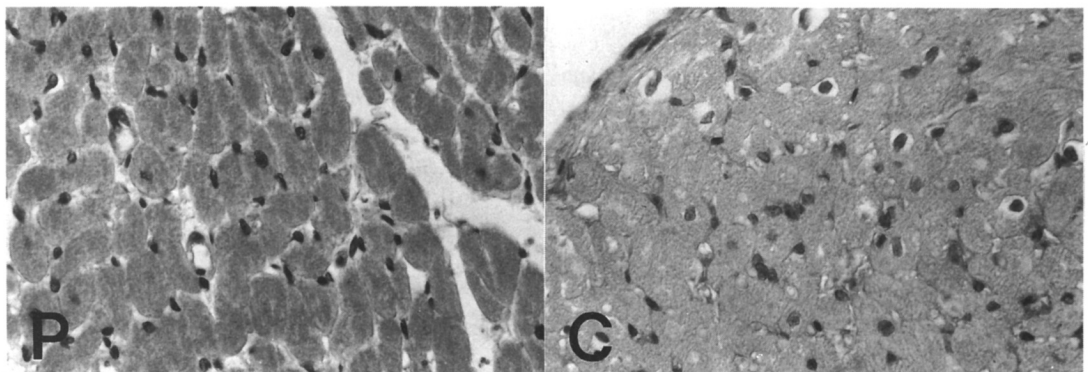


Fig. 1. The representative results of immunohistochemical staining with monoclonal anti-PLC- γ_1 antibody in the phenylephrine induced hypertrophic heart(P) and control heart(C). PLC- γ_1 was detected at a higher level in the hypertrophic heart compared with control heart(Immunostain with ABC method, $\times 200$).

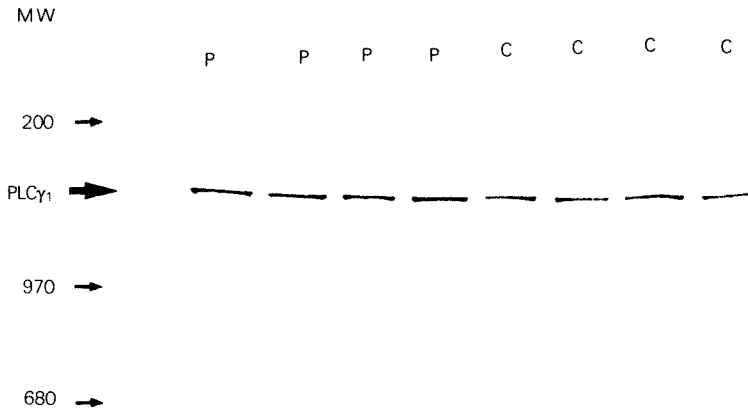


Fig. 2. Immunoblot showed increased expression of PLC- γ_1 in phenylephrine induced cardiac hypertrophy(P) compared with control normal heart(C). Each lane represents 2 mg of protein.

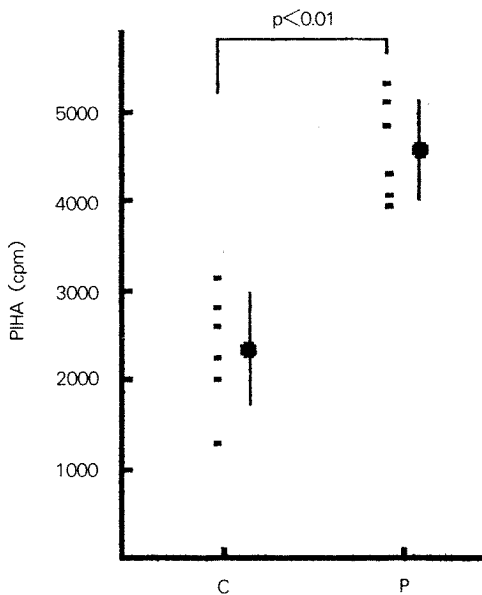


Fig. 3. The [^3H] phosphatidylinositol hydrolyzing activity(PIHA) of PLC- γ_1 in immunoprecipitates of the phenylephrine induced hypertrophied hearts (P) as compared with normal control heart(C). The average activity was significantly higher in the hypertrophied heart myocardium.

때, PLC- β_1 및 PLC- δ_1 표현의 변화는 보이지 않았으나 PLC- γ_1 동위효소는 증가됨을 볼 수 있었다. 이 소견은 면역 블롯 방법으로도 대부분의 비후 심근에서 표현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 비후심근 조직에서의 PLC- γ_1 의 phosphatidylinositol hydrolyzing activity도 측정 해본 결과 역시 증가함을

알 수 있었다. 이 결과로 저자들은 α_1 -agonist를 투여하여 발생시킨 심근비후에서 이 자극에 대한 세포내 신호전달은 phosphatidylinositol pathway를 통할 것이며, phospholipase C의 여러 동위효소 중에서도 PLC- γ_1 이 심근비후를 일으키는 신호전달 체계(signal transduction mechanism)에서 중요한 역할을 할 것이라고 생각할 수 있었다. 심근세포에서 α_1 -agonist를 투여하였을 때 세포의 비후가 발생하고⁶⁾ phosphatidylinositol turnover가 증가함은^{12,13)} 이미 알려져 있었으나, 이는 배양된 세포에서 얻은 결과이고 이제까지 생체에서 발생한 비후 심근에서 실제 이 phosphatidylinositol pathway가 활성화 되는 지 또한 이 경로의 핵심효소인 phospholipase C 자체의 표현에 변화가 있는 지에 대하여는 아직까지 알려진 바 없었다.

이노시톨 인지질 특이성 phospholipase C(inositol phospholipid-specific phospholipase C)는 여러 agonist등에 의하여 세포 밖으로부터 전달되는 신호에 따라 phosphatidyl inositol 4, 5-bisphosphate(PIP_2)를 가수분해하여 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP_3)와 diacylglycerol(DAG)를 생성하는 효소로서^{23,24)} 세포내 신호전달 경로(signal transduction pathway)에 있어서 중추적 역할을 하고 있다고 알려져 있다. 이때 생성되는 IP_3 와 DAG는 세포내에서 2차 전달 물질로 작용하여 여러가지 생리적 현상을 조절한다. IP_3 는 세포내 Ca^{++} 저장기관으로부터 Ca^{++} 을 세포질로 유리시켜 세포내 칼슘 농도를 증가시키며²⁵⁾, DAG는 protein Kinase C(PKC)를 활성화 시키고,

이는 다시 여러가지 효소들을 인산화 시켜 세포의 분비, 대사, 수축, 분화등의 여러가지 반응을 조절하게 된다²⁶⁾. PLC는 여러 동위효소들이 분리 정제되어 그 특성이 밝혀져 있는데²⁷⁾ 지금까지 알려진 PLC 동위효소는 9가지(PLC- β_1 , - β_2 , - β_3 , - β_4 , - γ_1 , - γ_2 , - δ_1 , - δ_2 , - δ_3) 이다¹⁵⁾. 이들은 서로 다른 기전에 의해 활성화되어 신호전달을 하는 것으로 알려져 있다. PLC- β_1 는 G 단백질에 의하여 활성화되나 PLC- γ_1 는 여러가지 성장인자에 의하여 tyrosine이 인산화되어 활성화 된다. 즉 PLC- γ_1 은 platelet derived growth factor¹⁶⁾, epidermal growth factor^{17, 18)}, fibroblast growth factor¹⁹⁾ 등에 의하여 인산화되어 효소의 활성도가 증가함이 알려져 이 PLC- γ_1 은 세포의 증식에 있어서 중요한 역할을 하리라고 생각되고 있다.

최근 또한 인체에서의 증식성 질환인 hyperproliferative epidermal disease²⁰⁾나 유방암종²¹⁾ 등에서 PLC- γ_1 가 과발현 되어 있음이 발표되어 역시 이 효소가 세포 증식에 중요할 것임을 암시하였다. 본 연구에서도 비후된 심근에서 각 PLC의 동위효소에 대한 면역조직화학염색상 PLC- β_1 및 PLC- δ_1 의 염색 정도는 대조군에 비하여 별 변화가 없었는데 반하여 PLC- γ_1 만 증가하여 있었다. 이도 역시 PLC- γ_1 가 세포의 증식성 변화에 특히 중요한 역할을 함을 말해주고 있다. 단지 심장에서는 심장비후가 발생할 때 심장세포의 증식은 일어나지 않고 세포의 비후만 일어나기는 하지만 세포의 비후성 변화는 핵 내 DNA의 증가도 같이 일어나는 것으로 보아²⁸⁾ 기본적으로 비후와 증식은 비슷한 변화이며 단지 세포 비후는 세포 증식 사이클(cell cycle) 중 G₂ 기 정지가 되는 상태로 이해되고 있다.

저자들의 결과는 PLC- γ_1 이 α_1 -agonist 반복투여로 발생한 심근 비후시 과발현됨을 보였는데, 압력과 부하나 기타 다른 원인에 의한 심근 비후의 경우에도 비슷한 양상으로 나올지에 대하여는 아직 연구되지 않아 알 수 없다. 그러나 본 저자들의 연구에서 면역조직화학검사상 PLC- γ_1 표현이 내측 심근에서 외측심근에 비하여 더 진하게 염색됨이 관찰 되었는데 이는 phenylephrine이 혈관수축과 혈압상승등을 유발하여 내측심근에 더 많은 긴장(tension)을 가함으로서 발생하였음을 암시하는 소견이라고 할수 있다. 또한 phospholipase C는 자

연발생 고혈압 백서에서도 효소 활성도가 증가되었다고 발표된 바 있다²⁹⁾. Kawaguchi 등은 자연 발생고혈압백서의 심근에서 PLC 활성도가 증가되어 있으며 protein kinase C(PKC)의 활성도도 증가되어 있고 이는 이 동물의 나이 증가에 비례하여 증가하는 것으로 보아 이 phosphatidylinositol pathway가 이 동물의 심장에서 단백질 합성의 증가와 심장비대의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다고 하였다. 또한 Brophy 등은 내피 세포에 물리적 힘이 가하여 질 때 phospholipase C가 활성화되어 IP₃ 생성이 증가 된다고 하였다³⁰⁾. 이는 압력과부하에 의한 심근비후의 발생시 PLC가 물리적수용체(mechanoreceptor)와 세포내에서의 비후성 변화를 연결하는 전달 역할(mechanotransducer)을 하고 있을 가능성을 말해주는 소견이다. 그러나 자연발생고혈압백서나 물리적 자극을 가한 내피세포에 대한 연구에서도 역시 PLC 활성도만 측정하였고, PLC 자체의 표현이 증가하였는지 또한 PLC의 여러 이형효소 중 어떤 종류가 역할을 했을지에 대해서는 연구되지 않았다. 앞으로 여러가지 경우의 심근 비후에서 비후 발생의 기전이 어떻게 되는지 그리고 이 경우 각기 세포 내 신호전달체계(signal transduction mechanism)가 어떻게 되는지에 대하여 더욱 광범위한 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

연구배경 :

심근비후는 심장에 가하여지는 자극들에 의하여 유발되는 적응성 반응으로서 심장 세포 내에서의 여러가지 유전자의 발현과 단백질의 증가는 이 반응에서의 가장 중요한 변화이다. 그러나 이와 같은 여러가지 자극들이 심장에 어떻게 작용하며 어떤 신호전달기전(signal transduction mechanism)을 거쳐 심장세포의 비후를 유발하는지에 대하여는 아직 정확하게 밝혀진 것이 없다. 최근 심근 배양 세포에서 α_1 -agonist를 투여하였을 때 세포의 비후성 변화가 유발되었다는 보고가 있고, 또한 phospholipase C(PLC)를 통한 phosphatidylinositol pathway가 α_1 -agonist로 부터의 신호 전달에 중요한 역할을 하는것도 알려져 있다. 그러나 배양된 심근세포에서의 이와같은 소견들이 실제 생체에서도 일어나

는지에 대하여는 아직까지 알려진 바 없다. 또한 이 PLC의 여러 동위효소 중에서 어떤 형이 이 신호전달체계에 주로 관여하는지에 대하여도 알려진 바 없다. 이에 저자들은 백서에서 γ_1 -agonist를 반복적으로 투여하여 심장의 비후를 유발시킨 뒤, phosphatidylinositol signal transduction pathway에서의 핵심적 효소라고 할 수 있는 PLC의 표현정도를 면역 블롯(western blotting), 면역조직화염색(immunohistochemistry) 및 효소 활성도(enzyme activity)의 측정 등 여러가지 방법으로 평가하여 그 표현 정도에 변화가 있는지 보았다.

방 법 :

실험동물로는 Sprague Dawley rat 40마리를 사용하였다. 실험군 28마리는 phenylephrine 12mg/Kg를 5일간 매일 복강내로 주사하였고 대조군 12마리는 생리식염수를 대신 주사하였다. 주사기간 중 사망하지않은 실험군 20마리 및 대조군 11마리를 분석에 이용하였다. 6일째 백서를 희생시켜 심장을 분리한 후 심근의 일부는 PLC- β_1 , γ_1 , δ_1 단 클론 항체를 사용하여 ABC 방법으로 면역 화학조직검사를 시행하였고, 나머지 심근은 분쇄한 후 PLC- γ_1 항체로 면역침전을 시키고 PLC- γ_1 에 대한 면역블롯(immunoblotting) 과 효소 활성도 측정(phosphatidylinositol hydrolyzing activity)을 시행하였다.

결 과 :

Phenylephrine을 5일간 반복 투여한 후 심장의 무게는 평균 22%의 증가를 보였다($P < 0.01$). 면역조직화염색상 비후된 심근에서 대조군의 심근에 비하여 PLC- β_1 및 δ_1 의 표현은 별로 차이를 보이지 않았으나 PLC- γ_1 의 표현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있었고, 이는 면역블롯(immunoblotting) 상 확인되었다. 또한 PLC- γ_1 의 phosphatidylinositol hydrolyzing activity도 실험군(4650 ± 614 cpm)에서 대조군(2387 ± 651 cpm)에 비하여 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다($P < 0.01$).

결 론 :

이상의 결과에서 연자들은 α_1 agonist를 투여하여 발생시킨 심근비후에서 PLC- γ_1 효소의 표현이 증가함을 관찰함으로써, 이 자극에 대한 심근세포내 신호전달은 phosphatidylinositol pathway를 통한 것이며, PLC- γ_1 이 여기서 심근비후를 일으키는

중요한 역할을 할 것이라고 생각할 수 있었다.

References

- 1) Morgan HE, Baker KM : *Cardiac hypertrophy, mechanical, neural, and endocrine dependence. Circulation* 83 : 13, 1991
- 2) Grossman W : *Cardiac hypertrophy, useful adaptation or pathologic precess. Am J Med* 69 : 576, 1980
- 3) Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP : *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. N Engl J Med* 322 : 1561, 1990
- 4) Schneider MD, Parker TG : *Cardiac myocytes as targets for the action of peptide growth factors. Circulation* 81 : 1443, 1990
- 5) Simpson PC : *Protooncogenes and cardiac hypertrophy. Annu Rev Physiol* 51 : 189, 1988
- 6) Simpson P : *Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an α_1 adrenergic response. J Clin Invest* 72 : 732, 1983
- 7) Bishopric NH, Simpson PC, Ordahl CP : *Induction of the skeletal α -actin gene in a α_1 adrenoreceptor mediated hypertrophy of rat cardiac myocytes. J Clin Invest* 80 : 1194, 1987
- 8) Ikeda U, Tsuruya Y, Tshoi Y : *α_1 adrenergic stimulation is coupled to cardiac myocytes hypertrophy. Am J Physiol* 260 : H953, 1991
- 9) Lee HR, Henderson SA, ReynoldR, Dunnom P, Yuan D, Chein KR : *α_1 adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells : Effect on myosin light chain-2 gene expression. J Biol Chem* 263 : 7352, 1988
- 10) Meggs LG, Tillotson J, Huang H, Sonnenblick EH, Capasso JM, Anversa P : *Noncoordinate regulation of α_1 adrenoreceptor coupling and reexpression of α skeletal actin in myocardial infarction induced left ventricular failure in rats. J Clin Invest* 86 : 1451, 1990
- 11) Zierhut W, Zimmer HG : *Significance of myocardial α - and β -adrenoreceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. Circ Res* 65 : 1417, 1989
- 12) Kohl C, Schmitz W, Scholz H, et al : *Evidence for α_1 adrenoreceptor mediated increase of inositol trisphosphate in the human heart. J Cardiovasc Phar-*

macol 13 : 324, 1989

- 13) Kohl C, Schmitz W, Scholz H, Scholz J : *Evidence for the existence of inositol tetrakisphosphate in mammalian heart. Effect of α_1 adrenoceptor stimulation.* Circ Res 66 : 580, 1990
- 14) Volz A, Piper HM, Siegmund B, Schwartz P : *Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture.* J Mol Cell Cardiol 23 : 161, 1991
- 15) Rhee SG : *Inositol phospholipids-specific phospholipase C, interaction of the γ_1 isoform with tyrosine kinase.* Trends Biochem Sci 16 : 297, 1991
- 16) Whal MI, et al : *Platelet-derived growth factor induces rapid and sustained tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ in quiescent BALB/c 3T3 cells.* Mol Cell Biol 9 : 2934, 1989
- 17) Margolis B, et al : *EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II : a potential mechanism for EGF receptor signaling.* Cell 57 : 1101, 1989
- 18) Meisenheider J, et al : *Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro.* Cell 57 : 1109, 1989
- 19) Buerge WH, et al : *Characterization and cDNA cloning of phospholipase C- γ , a major substrate for heparin-binding growth factor 1 (acidic fibroblast growth factor)-activated tyrosine kinase.* Mol Cell Biol 10 : 4770, 1990
- 20) Nanney LB, Gates RE, Todderud G, King LE Jr, Carpenter G : *Altered distribution of phospholipase C- γ_1 in benign hyperproliferative epidermal diseases.* Cell Growth Diff 3 : 233, 1992
- 21) Arteaga CL, Johnson MD, Toderud G, Coffey RJ, Carpenter G, Page DL : *Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ_1 in primary human breast carcinomas.* Proc Natl Acad Sci USA 88 : 10435, 1991
- 22) Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, Rhee SG : *Monoclonal antibodies to three phospholipase C isoenzymes from bovine brain.* J Biol Chem 263 : 14497, 1988
- 23) Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal VS, Wilson DB : *The metabolism of phosphoinositide derived messenger molecules.* Science 234 : 1519, 1986
- 24) Rhee SG, Suh PG, Rhu SH : *Studies of inositol phospholipid specific phospholipase C.* Science 244 : 546, 1989
- 25) Berridge MJ, Irvine RF : *Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.* Nature 312 : 315, 1984
- 26) Nishizuka Y : *Studies and perspectives of protein kinase C.* Science 233 : 305, 1986
- 27) Rana RS, Hokin LE : *Multiple forms of phospholipase C isoenzymes and their activation mechanisms.* Physiol Rev 70 : 155, 1990
- 28) 김성진 · 방인숙 · 박연휘 · 김홍주 · 김도현 · 이예봉 · 윤성철 · 한동선 · 김성숙 : 비후된 심근에서의 유세포 분석을 통한 Nuclear DNA의 관찰. 대한내과학회지 45(2) : 213, 1993
- 29) Kawaguchi H, Shoki M, Sano H, Kudo T, Sawa H, et al : *Polyphosphoinositide metabolism in hypertrophic rat heart.* J Moll Cell Cardiol 24 : 1003, 1992
- 30) Brophy CM, Mills I, Rosales O, Isales C, Sumpio BE : *Phospholipase C : a putative mechanotransducer for endothelial cell response to acute hemodynamic changes.* Biochem Biophys Res Commun 190 : 576, 1993