

허혈 손상 종류에 따른 심근 세포 사멸과 생존 양식의 차이

동아대학교 의과대학 내과학교실,¹ 충북대학교 병원 순환기내과²

양창호¹ · 김영대¹ · 박은희¹ · 박태호¹ · 차광수¹ · 김무현¹ · 김종성¹ · 황경국²

Modes of Cell Death and Survival in Cardiomyocytes Under Various Type of Ischemic Injury

Chang-Ho Yang, MD¹, Young-Dae Kim, MD¹, Eun-Hee Park, MD¹, Tae-Ho Park, MD¹

Kwang-Soo Cha, MD¹, Moo-Hyun Kim, MD¹, Jong-Seong Kim, MD¹ and Kyung-Kuk Hwang, MD²

¹Department of Internal Medicine, College of Medicine, Dong-A University, Busan,

²Department of Cardiology, Chungbuk National University Hospital, Chungju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The dominant mode of cell death in cardiomyocytes under acute ischemic insult, either necrosis or apoptosis, remains to be clearly shown. **Materials and Methods** : Cultured neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) were incubated under hypoxic (mixture gas of 95%N₂/5%CO₂ in glucose containing media), ischemic (hypoxia plus glucose depletion in the media), ischemic and acidic conditions (ischemia with media pH 7.1). The level of cell death was assessed by trypan blue staining. To differentiate the mode of cell death, genomic DNA extraction and electrophoresis, Annexin V/propidium iodide staining, western blot for caspase activation and transmission electron microscopy were employed. **Results** : The number of cell deaths in the NRVM cultured under hypoxic conditions was similar to that of the controls. The rate of cell death was significantly increased in the NRVM cultured under ischemic conditions, and was accelerated further in an acidic milieu, which simulated the accumulation of metabolic byproducts in ischemia. No signs of apoptotic cell death were observed in the NRVM cultured under ischemic conditions. The morphological examination of the cells in ischemia mostly revealed necrotic death. **Conclusion** : The presence of glucose protected the cardiomyocytes from cell death under hypoxic conditions. Incubation of the NRVM in ischemia resulted in increased cell deaths, which was accelerated in an acidic milieu. In our model of acute ischemia, without reoxygenation, the cardiomyocyte cell deaths appeared to be primarily induced via necrosis rather than apoptosis. (Korean Circulation J 2003;33(10):949-956)

KEY WORDS : Cardiac myocyte ; Ischemia ; Cell death.

서론

허혈은 심근 손상을 일으키는 가장 흔한 원인이며 허

논문접수일 : 2003년 8월 8일

심사완료일 : 2003년 9월 26일

교신저자 : 김영대, 602-715 부산시 서구 동대신동 3가 1

동아대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (051) 240-2959 · 전송 : (051) 255-8174

E-mail : kimyd@donga.ac.kr

혈을 일으키는 주된 질환인 관상 동맥 질환은 오늘날 심부전의 가장 중요한 병인이다.¹⁾ 심장에 혈액을 공급하는 관상 동맥에 심한 협착이나 폐색이 발생하면 세포의 생존에 필요한 산소 및 영양소 공급이 차단되고 이 결과, 세포는 사멸하거나 심각한 기능 장애를 나타내게 된다. 특히 심근 세포는 재생, 증식하는 능력이 미약한 세포로서²⁾ 허혈로 인한 심근 세포의 소실은 심장 기능의 악화에 큰 영향을 미친다.

급성 허혈에 의한 심근 세포 사망은 급작스런 손상에 의한 세포구조의 해체 즉, 괴사(necrosis)의 형태를 띠고 알려져 있었지만 근래에는 세포고사(apoptosis)에 의한 사망양식도 관찰되고 있다. 고사에 관련된 경로로서 Fas의 발현³⁾과 caspase-9의 활성화가 관찰되어⁴⁾ 수용체 경로(receptor pathway)와 미토콘드리아 경로(mitochondrial pathway)가 간여하는 것으로 보고된 바 있다. 그렇지만 허혈에 의한 세포 사망의 기전은 아직 확실하지 않다. 예를 들어 일부 실험에서 저산소(hypoxia)만으로 세포고사가 일어난다는 보고가 있는 반면,³⁾ 다른 연구에서는 저산소환경(hypoxia) 만으로는 고사가 일어나지 않고 산성 환경(acid milieu)이 추가되거나 혹은 산소 재공급(reoxygenation)이 있어야 세포고사가 발생하였다고 보고하였다.⁵⁾ 또한 저산소환경 혹은 영양소를 제거한 배양 조건하의 심근세포는 주로 세포 고사에 의해 죽게 되지만 양쪽이 모두 있는 허혈 상태에서는 괴사에 의한 죽음이 대부분을 차지한다는 보고도 있다.⁶⁾ 사람에 있어 급성 허혈 손상을 대표하는 심근 경색의 경우 중심부를 비롯한 경색 조직의 대부분은 괴사를 나타내지만 경색과 정상 경계부에 있는 부위에서는 세포 고사가 관찰되었다.⁷⁾ 이같이 급성 허혈에 의한 심근 세포 사망의 양상은 실험에 따라 그리고 실험 대상 세포에 따라 상이하게 나타난다. 따라서 본 연구는 동일한 심근 세포를 대상으로 하여 여러 가지 허혈 조건을 부가하여 각각의 상황에서 세포 사망의 정도와 양식이 어떻게 다른지를 보고자 수행되었다. 심근 세포는 일차 배양한 신생쥐의 심근 세포를 대상으로 하였으며 허혈 조건은 저산소(hypoxia), 저산소 및 양분 박탈 즉 허혈(ischemia), 그리고 생체에서 경색시 조직내 대사산물의 축적이 나타나는 것을 모방하기 위하여 허혈에 산성 환경을 조성(ischemia and acidosis)한 3가지로 하였다. 또한 세포고사의 여부와 그 경로를 알기 위해 고사에 관련된 caspase-9와 caspase-3의 활성화 여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

재 료

실험 동물은 생후 1~2일 지난 Sprague-Dawley rat 을 사용하였다.

심근세포의 분리 및 배양

심근세포의 분리 배양은 효소에 의한 소화법을 이용하였다.⁸⁾ 약술하면 무균적인 방법으로 절제한 심장을 HBSS 용액에 담그고 가위로 잘게 자른 후 trypsin/EDTA 액에 넣고 4℃ shaker에서 overnight 시켰다. 다음날 trypsin 효소액은 버리고 10% FCS/DMEM 액을 더하여 소화를 중단시킨 다음 FCS/DMEM 액을 버리고 collagenase 용액을 더하여 37℃ shaking bath에 3분 정도 두었다가 상층액만 conical tube에 모았다. 이같은 과정을 세차례 정도 반복하여 모은 용액을 750 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 pellet은 10% FCS/DMEM 용액으로 resuspend 시킨 다음 이를 culture flask에 옮기고 37℃에서 75분간 배양하였다. 이후 suspension 액을 다시 새 culture flask에 옮기고 다시 75분간 배양후 suspension을 conical tube로 옮긴 후 cell number를 count한 후 plating하였다. 분주된 세포들은 10% FCS/DMEM 배지에서 3~4일간 배양하여 confluence에 이른 다음 serum을 제거한 Ca⁺⁺-free Henseleite 배지로 교환하여 허혈 조건을 부과하였다.

허혈 조건의 부과

각 실험군은 밀폐된 용기에 놓고 튜브를 통하여 각 조건의 혼합기체를 공급하였다. 대조군은 95% O₂/5% CO₂의 혼합기체를 공급해주고 glucose가 포함되어 있는 Ca⁺⁺-free Henseleite 배지에서 배양하였다. 저산소군(hypoxia)은 95% N₂/5% CO₂ 혼합기체를 공급하였으며 허혈군(ischemia)은 저산소군과 같은 기체를 공급하면서 Ca⁺⁺-free Henseleite 배지에서 glucose 대신 deoxyglucose를 넣어서 산소와 함께 에너지를 박탈하였다. 대사 산물의 축적을 보기 위한 허혈 및 산성(ischemia and acidosis)군은 허혈군과 같은 조건에서 배양액에 12시간 간격으로 250 mM의 HEPES와 250 mM의 NaOH를 가하여 pH가 7.1이 되도록 조정하였다.

심근세포의 생존/사망 평가

이는 trypan blue 염색법을 이용하였다. 즉 trypan blue와 세포 부유액을 동량으로 혼합한 후 실온에서 약 2분간 두었다가 이를 haemocytometer slide에 옮겨서 광학 현미경으로 관찰하여 생존/사망 세포수를

계상하였다.

DNA ladder assay

2500 rpm으로 5분간 원심한 심근 세포를 100 μ L의 용해 완충액(1% Triton-X 110, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% NP)과 혼합하여 4°C에서 10분간 배양하였다. 상층액을 따서 2 μ L의 RNase를 가한후 37°C에서 1시간 배양하였다. 이후 다시 2 μ L의 proteinase K를 가하고 37°C에서 1시간 배양하였다. 여기에 5 M의 NaCl 20 μ L과 120 μ L의 propanol(최종 농도 NaCl 0.5 M, Propanol 50%)를 가한후 -20°C에서 하루밤 배양시켰다. 다음날 이를 14,000 rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 버리고 침전을 20 μ L의 TE buffer에 resuspend하였다. 이렇게 마련된 DNA 시료를 5 μ g 취하여 2% agarose gel에서 분리하고 이를 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

Annexin V/Propidium Iodide 염색

세포 고사와 괴사를 감별하기 위해서 상용 kit(Apo-Alert Annexin V-FITC, Clontech, USA)의 protocol을 사용하여 annexin V와 propidium iodide(PI) 동시 염색을 시행하였다. 이 염색에서 고사의 과정에 있는 세포는 녹색으로 염색되며 세포가 사망하여 세포막이 파손되면 PI의 붉은색으로 염색된다.

Western blot

세포를 찬 용해 완충액(50mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptin, 2 μ g/mL aprotinin)에서 용해하여 차게한 상태로 30초간 2번 vortex한 후 4°C에서 10분간 14,000 g로 원심분리 하였다. 상층액을 따서 단백질 농도를 측정하고 균일한 양의 단백질 시료를 12% SDS-polyacrilamide gel에서 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 먼저 0.05% Tween-20이 포함된 TBS 완충액에 포함된 5% nonfat milk로 1시간 blocking 한 후 1차 항체(anti-body against caspase-9, caspase-3, Santacruz, Avenue, CA, USA)가 포함된 완충액으로 2~4시간 배양하였다. Membrane을 세척한 후 1 : 7500 비율의

HRP-conjugated anti-rabbit IgG(Santacruz, CA, USA)로 다시 1시간 동안 배양한 후 상용화된 chemiluminescence detection system을 이용하여 blot을 관찰하였다.

Electron microscopic examination

세포를 2.5% glutaldehyde에 1.5시간 동안 고정 한 후 1% osmic acid 용액에 2시간 동안 후 고정 하였다. 세포를 epoxy resin에 포매한 후 초박질 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였고, 이를 히다치 H600-3 투과전자현미경으로 관찰 후 사진 촬영하였다.

세포사망의 정량

세포 사망의 정량을 위해 trypan blue 염색은 3~5개의 시야에서 관찰하여 계상하였으며 세포 사망의 양식을 보기위한 형태학적 검사는 10개 이상의 다수 시야에서 사망세포 및 괴사/고사 세포를 구분하여 계상하였다. 모든 실험은 동일한 과정을 3회 반복 실시하였다.

결 과

각 허혈 조건에서의 심근 세포 사망

Trypan blue 염색에서 dye를 배출하지 못하는 세포는 사망한 것으로 간주되었다. 저산소군의 경우는 사망 세포의 수가 대조군과 큰 차이가 없었으며 허혈군의 경우 시간이 지나면서 세포 사망이 증가하여 24시간 후 대조군에 비해 유의한 세포 사망 증가를 보였다. 허혈 및 산성 환경군에서는 세포 사망이 허혈군 보다 더 급속히 진행하여 24시간 경과 후에는 생존 세포를 거의 찾을 수 없었다(Fig. 1). 시간 경과에 따른 세포 사망률은 Fig. 2에 나타나 있다. 저산소군의 사망률은 대조군과 유사하였으며 허혈군은 시간 경과에 따라 세포 사망이 점진적으로 증가하였으나 허혈 및 산성 환경군은 세포 사망이 4시간 이후에 급증하여 허혈군보다 유의하게 높은 사망률을 나타내었다.

허혈군에서 세포 사망의 양식

각 군에서 발생한 세포 사망의 양식을 살피기 위해서 DNA fragmentation, Annexin V/PI staining, caspase에 대한 western blot, 전자 현미경 검경을 시행하였다.

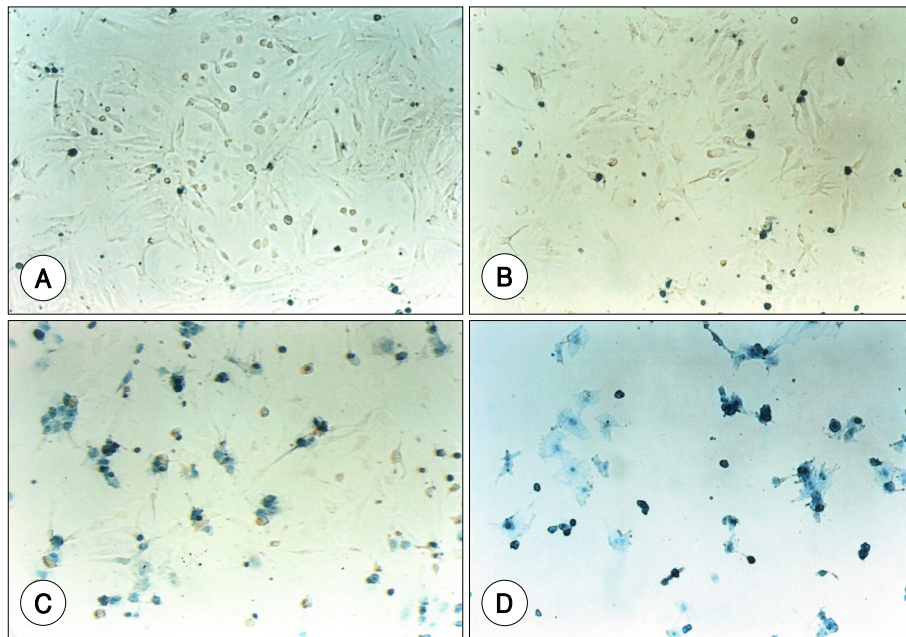


Fig. 1. Trypan blue staining of NRVM (neonatal rat ventricular myocytes) under different culture conditions for 24 hours. A : control, B : hypoxia, C : ischemia, D : ischemia with acidic milieu. Cells staining blue color was counted for death. Number of dead cell in hypoxia (B) is similar to that of control (A), while there is apparent increase in dead cells in ischemia (C). Cell death is further accelerated in ischemia and acidosis (D).

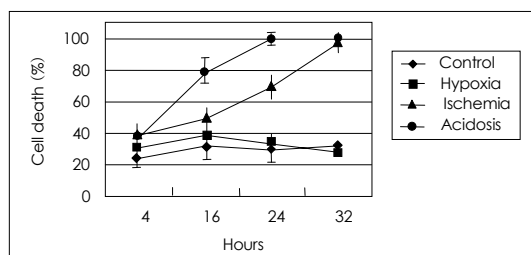


Fig. 2. Rate of cell death in neonatal rat ventricular myocyte incubated under indicated conditions of hypoxia, ischemia, and ischemia with acidic milieu.

Fig. 3은 허혈 조건 6시간 및 24시간 경과 후 각 군의 세포에서 DNA를 추출하여 전기 영동하여 분리한 것으로서 각 군에서 세포고사를 나타내는 DNA laddering 여부를 관찰하였으나 저산소, 허혈, 허혈 및 산성 환경에서 DNA laddering은 관찰되지 않았다. Fig. 4는 Annexin V/PI의 동시 염색의 결과이다. 저산소군에서는 대조군과 비슷한 정도의 세포 사멸을 보여주고 있으며 허혈군과 허혈 및 산성 환경군에서는 다수의 세포가 사망하였으나 주로 PI 염색(붉은색)이 되어 세포 고사보다는 세포 괴사에 의한 사망임을 나타내었다. 세포 고

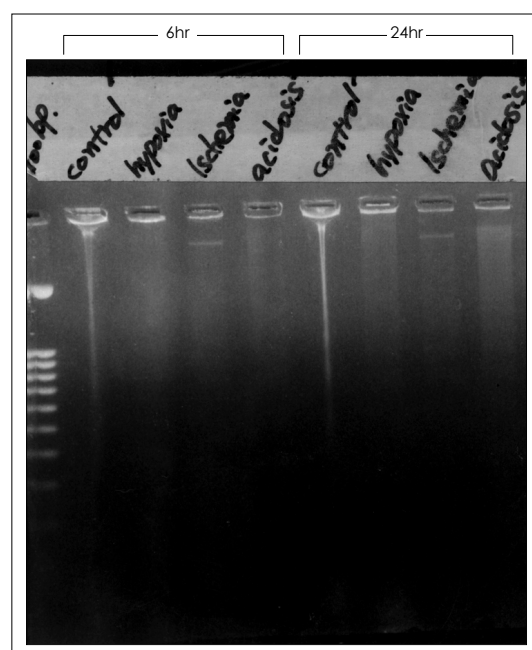


Fig. 3. Genomic DNA extraction from NRVM (neonatal rat ventricular myocytes) under different conditions and separation in 2% agarose gel. DNA laddering pattern was not observed both after 6 hours and 12 hours culture.

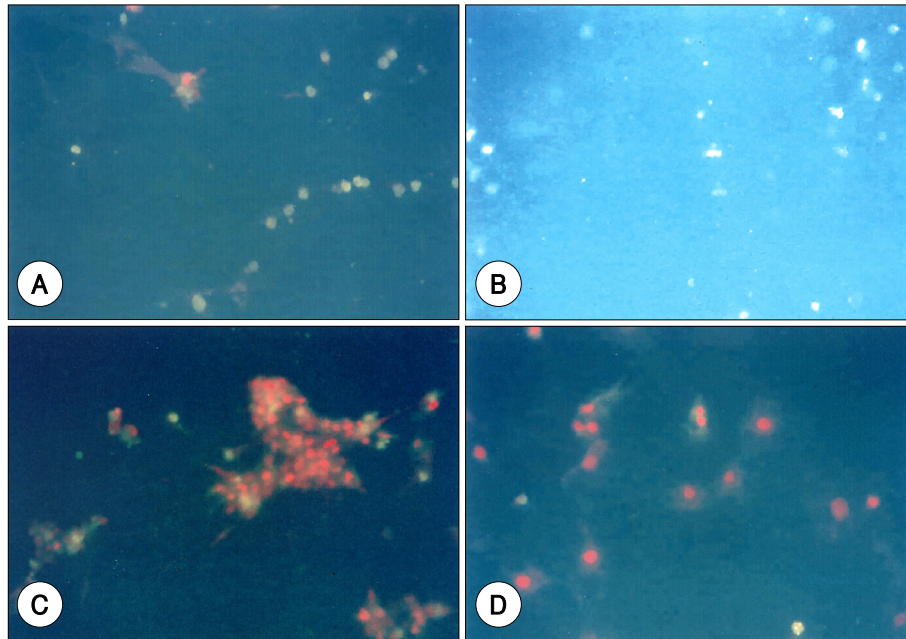


Fig. 4. Annexin V/propidium iodide (PI) staining of NRVM under different conditions. A : control, B : hypoxia, C : ischemia, D : ischemia with acidic milieu. In ischemic conditions (C and D), dead cells are stained red, which signifies uptake of PI into cell interior as result of cell membrane disintegration.

사에 관여하는 효소인 caspase에 대한 western blot에서도 각 허혈군에서 caspase 3 혹은 caspase 9에 대한 활성화 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 5). 투과전자현미경으로 세포의 미세구조를 관찰한 결과 대조군에서 핵의 농축이나 조각남이 관찰되지 않았고 apoptotic body도 관찰할 수 없었다. 반면 허혈군과 허혈 및 산성 환경군 세포는 핵의 가장자리가 톱니 바퀴모양으로 농축되는 전형적인 괴사의 소견을 보였다(Fig. 6).

고 찰

본 연구에서 급성 허혈 조건에서 신생쥐 심근 세포의 사망은 산성 환경에서 가속되며 사망 양식은 세포 고사보다는 세포 괴사의 양상을 띠는 것으로 관찰되었다. 이전의 실험들에서 저산소나 허혈 상태에서 세포 사망이 어떤 양상을 띠는지에 대해서는 실험 대상과 방법에 따라서 다양한 결과가 보고 되었다. Tanaka 등³⁾은 신생쥐 심근을 저산소 환경에 두어 이들 세포에서 Fas 항원이 발현과 함께 DNA ladder링을 특징으로 하는 세포 고사가 일어남을 보고하였다. 그러나 다른 실험에서는 같은 신생쥐 심근 세포를 대상으로 하였음에도 저산

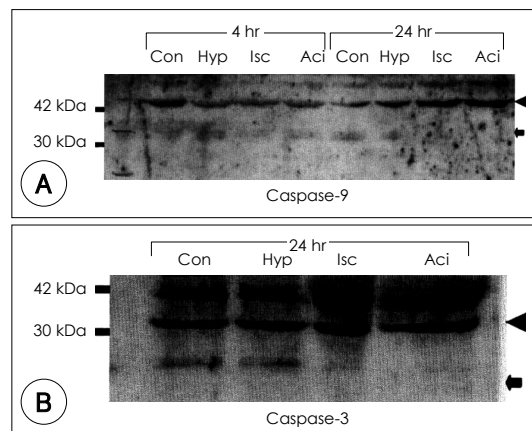


Fig. 5. Western for activation of caspase-9 and caspase-3, which are the executor of apoptotic process in mitochondrial pathway and final common pathway, respectively. Arrowhead indicates location of precursor form (caspase-9 ; 46 kDa, caspase-3 ; 32 kDa) arrow indicates location of active form of caspase (caspase-9 ; 35 kDa, caspase-3 ; 19 kDa). Con : control, Hyp : hypoxia, Isc : ischemia, Aci : ischemia with acidic milieu. Enzyme activation was not seen either for caspase-9 or caspase-3 in NRVM cultured in ischemic conditions.

소 만으로는 세포 사망이 관찰되지 않고 6일 동안 세포가 건재함이 관찰되었으며 저산소에 더하여 산성 환경을 제공하였을 때 비로소 세포고사의 소견이 나타난다

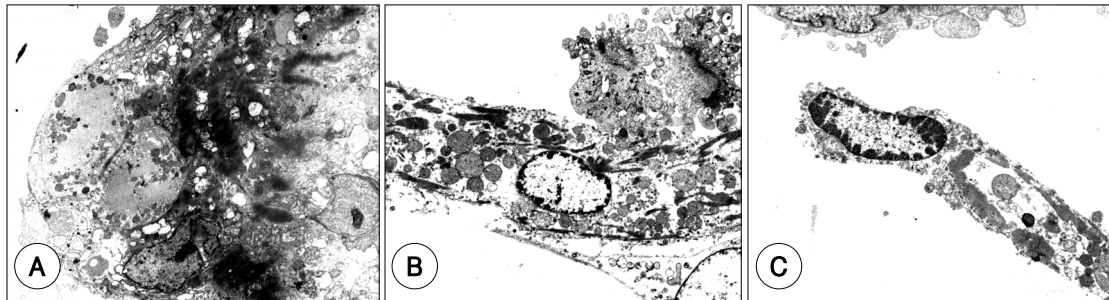


Fig. 6. Transmission electronmicrographs. NRVM (neonatal rat ventricular myocytes) were incubated under the conditions of normal (A), ischemia (B), and ischemia with acidic milieu (C). Compared to the control ventricular myocyte which has the typical control nucleus (A), the myocyte, which were incubated under ischemia (B), and ischemia with acidic milieu (C), has the nucleus with the serrated clumping of peripheral chromatin. No myocyte having nuclear condensation or fragmentation or apoptotic body was observed. Original magnification, $\times 3000$ (A-C).

고 하였다.⁵⁾ 본 연구에서 쓰인 신생쥐 심근 모델에서도 저산소 단독 환경 즉, 산소는 박탈하였으나 에너지원인 포도당을 공급해주는 경우에 세포 사멸은 증가하지 않았으며 대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 이는 포도당이 세포를 허혈 손상으로부터 보호해주는 역할을 가지고 있음을 시사한다. 이전의 연구에서도 포도당이 저산소 상태의 심근 세포의 고사를 억제한다고 보고하였으며⁹⁾ 사람에서 심근경색의 초기에 적량의 포도당을 공급해줄 경우 사망률을 줄일 수 있었다는 임상 보고도 있었다.¹⁰⁾ 포도당의 역할은 당분해 작용으로 ATP를 생성하고 이는 세포막에 존재하는 이온 통로를 유지시켜 생존에 필수적인 세포 형태를 유지한다고 알려져 있다.¹¹⁾

산소 및 영양원을 제거한 허혈 환경에서의 세포 사망 역시 동일한 형태로 나타나지는 않는다. 실험 동물을 이용한 생체 실험의 경우에서 많은 경우에 허혈 단독으로는 대부분의 세포가 괴사의 형태로 사망하였으며 재산소 공급(reoxygenation)이 있을 때에 세포 고사가 관찰되었다.¹²⁻¹⁴⁾ 사람의 경우 급성 심근 경색에서 세포의 고사 소견이 발견되는 것은 주로 경색 조직과 정상조직의 경계부였으며 경색 중심부에서는 고사의 증거가 발견되지 않았다.⁷⁾ 본 연구에서도 허혈군과 허혈 및 산성 환경군에서 세포 사망이 유도되었으나 이들에서 세포 고사의 소견은 관찰되지 않았다. Umansky 등⁶⁾의 실험 역시 신생쥐 심근 세포를 대상으로 하였는데 허혈 8시간 후의 세포 사망은 소수의 고사가 있기는 하였지만 대부분 괴사의 소견을 보이고 이후 산소와 영양원을 재공급하였을 때 세포 고사의 소견이 나타났었다. 한편 성체쥐에서 분리된 심근세포를 대상으로 한 실험에서는

일정 기간의 허혈 뿐 아니라 허혈 후 산소를 재공급한 조건에서도 대부분의 세포 사망은 괴사의 형태로 나타났다.¹⁵⁾ 그러므로 심근 세포에 포도당이나 혈청 등의 영양원 존재 없이 산소가 동시에 박탈되는 허혈 조건에서는 급격한 에너지 고갈로 인하여 세포가 사망하게 되며 이는 수행과정에서 어느 정도의 에너지가 필요한 세포 고사보다는 괴사의 양상을 띠게 되는 것으로 보인다.

허혈에서 고사 양식의 세포 사망이 보고된 것에 대해서 몇 가지 기전이 제시된다. 먼저 분리 배양된 세포가 아닌 전체 심장을 분리한 모델(isolated perfused heart)에서는 심근 조직내의 비심근 세포(non-myocyte cell)의 영향을 생각할 수 있다. 예를 들어 Suzuki 등¹⁶⁾은 관상동맥 결찰 후 심근 조직내에서 대식세포(macrophage)에 의해 생성된 nitric oxide가 심근 세포의 고사와 관계있다고 보고하였다. 두 번째로, 허혈에 이은 산소 재공급에서 발생한다고 보고된 세포 고사는 산화 스트레스(oxidative stress)가 중요한 역할을 할 수 있다.¹⁴⁾¹⁷⁾ 세포의 사망 양식을 가름하는 또 하나의 요인은 세포내의 에너지 보유량이다. 세포 괴사와 고사는 상이한 사망 양식이나 세포에 가해지는 위해에 따라서 특이적으로 결정되기 보다는 양자 모두 나타날 수 있으며,¹⁸⁾ 자극의 정도에 따라 주된 사망 양식이 결정되고 이를 위해 세포내의 에너지원인 ATP가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ 쥐 심근세포에서도 세포내 ATP에 따른 세포 사망의 양식 변동이 관찰된 바 있다.²⁰⁾

이들을 종합하면 허혈시의 심근 세포의 사망 양식을 결정하는 것은 허혈 조건, 비심근 조직과의 상호작용, 산화 스트레스 등과 함께 세포내 에너지 원이 중요한 인

자라고 할 수 있다. 따라서 심근 괴사나 고사의 여부는 자극의 성질보다는 자극의 강도나 발생 속도, 그리고 보호 인자의 여부 등에 의해 더욱 좌우된다고 사료된다. 본 연구의 결과에서도 포도당이 존재하의 저산소 상태에서 심근 세포는 사망으로부터 보호를 받았으나 포도당이 동시에 박탈되고 산소 재공급이 없는 급성 허혈조건에서 심근세포의 사망은 대부분 괴사의 양상을 취하는 것으로 관찰되었다.

요 약

배경 및 목적:

심근 세포의 사멸 양식은 세포 고사와 괴사가 있으며 허혈 손상에서 어떤 것이 주된 사망 경로인지는 확실하게 밝혀져 있지 않다.

방 법:

생후 1~2일 된 신생 백서 심근을 분리 배양하고 이를 각기 다른 허혈 조건하에서 배양후 세포 사멸 정도와 양식을 관찰하였다. 허혈 조건은 배양 공기에서 산소를 제거하고 95% 질소/5% 이산화탄소의 혼합기체를 공급한 저산소군, 저산소 조건에서 배지에 에너지 원인 포도당을 제거한 허혈군, 허혈군에서 배지 pH를 7.1로 조절하여 허혈 상태의 대사 산물의 축적 상태를 제공한 허혈 및 산성조건 군으로 분류하였다. 세포의 생사 정량은 trypan blue 염색으로 하였으며 사멸 양식을 분간하기 위해서 DNA fragmentation, Annexin V/propidium iodide 염색, caspase 활성도를 보기 위한 western blot, 투과전자 현미경 검경을 실시하였다.

결 과:

저산소군의 심근 세포 사망률은 대조군과 유사하였으나 허혈군에서는 유의한 증가를 보였으며 허혈 및 산성 조건하에서는 세포 사망은 더욱 증가하였다. 세포의 고사와 괴사를 감별하기 위한 여러 가지 검사 결과 급성 허혈 조건하의 심근 세포의 사망에서 세포 고사의 소견은 관찰되지 않았으며 형태학적으로 세포 괴사의 소견이 주로 관찰되었다.

결 론:

포도당 존재하의 단순한 저산소 상태에서는 심근 세포는 사멸로부터 보호 받았으나 허혈 조건하에서는 세포 사망이 유의하게 증가하였다. 허혈 조건하의 심근 세포 사망은 산성 환경에서 더욱 증가하였으며 그 과정

은 세포 괴사의 양식을 취하였다.

중심 단어 : 심근세포 ; 허혈 ; 세포사망.

■ 감사문

이 실험에서 전자 현미경 소견을 비롯하여 형태학적 세포 관찰에서 실험 과정을 감독하고 세포 사망의 양식 감별에 많은 도움을 준 동아의대 해부학 교실의 유 영현 교수에게 감사드립니다.

이 연구는 2001년도 대한순환기학회 산학협동 연구비의 지원에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

- 1) Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. *Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects.* *Circulation* 1993;88:107-15.
- 2) Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. *Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure.* *Circ Res* 2003;92:139-50.
- 3) Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. *Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured rat cardiomyocytes.* *Circ Res* 1994;75:426-33.
- 4) Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A, Kitsis RN. *The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes.* *Circ Res* 1999;85:403-14.
- 5) Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, Hernandez O, Sato B, Bishooric NH. *Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53.* *J Clin Invest* 1999;104:239-52.
- 6) Umansky SR, Cuenco GM, Khutuzian SS, Barr PJ, Tomei R. *Post-ischemic apoptotic cell death of rat neonatal cardiomyocytes.* *Cell Death Differ* 1995;2:235-41.
- 7) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. *Apoptosis in human acute myocardial infarction.* *Circulation* 1997;95:320-3.
- 8) Springhorn JP, Claycomb WC. *Preproenkephalin mRNA expression in developing heart and in cultured ventricular cardiac muscle cells.* *Biochem J* 1989;258:73-8.
- 9) Malhotra R, Brosius FC 3rd. *Glucose uptake and glycolysis reduces hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes.* *J Biol Chem* 1999;274:12567-75.
- 10) Diaz R, Paolasso EA, Piegas LS, Tajer CD, Moreno MG, Corvalan R, Isea JE, Romero G. *Metabolic modulation of acute myocardial infarction.* *Circulation* 1998;98:2227-34.
- 11) Oliver MF, Opie LH. *Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischemia and arrhythmias.* *Lancet* 1994;343:155-8.
- 12) Fliss H, Gattinger D. *Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium.* *Circ Res* 1996;79:949-56.
- 13) Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes.* *J Clin Invest* 1994;94:1621-8.
- 14) Maulik N, Yoshida T, Das DK. *Oxidative stress developed*

- during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic Biol Med* 1998;24:869-75.
- 15) Taimor G, Lorenz H, Hofstaetter B, Schluter KD, Piper HM. Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovasc Res* 1999;41:147-56.
 - 16) Suzuki H, Wildhirt SM, Dudek RR, Narayan KS, Bailey AH, Bing RJ. Induction of apoptosis in myocardial infarction and its possible relationship to nitric oxide synthesis in macrophage. *Tissue Cell* 1996;28:89-97.
 - 17) Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol today* 1994;15:7-10.
 - 18) Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86-107.
 - 19) Leist M, Single B, Castoldi AE, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-6.
 - 20) Shirashi J, Tatsujimi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M. Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1637-47.