

부동스트레스 (immobilization stress)가 심방근육세포에 미치는 영향에 관한 미세형태학적 관찰

이무삼, 송창호, 김형태, 한의혁, 이광소, 김완철, 신혜영
전북대학교 의과대학 해부학교실 및 의과학 연구소

간추림 : 부동스트레스(immobilization stress)가 심방근육세포 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐를 2시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 움직일 수 없는 좁은 관에 넣어 부동스트레스를 준 다음 심방의 미세형태학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 부동스트레스 2시간군에서는 심방근육세포의 미세구조 변화가 별로 관찰되지 않았다. 부동스트레스 6시간부터 12시간군에서는 심방근육세포의 미세구조 중 특히 사립체, 근육원섬유, 과립의 위치 변화가 관찰되었으며 부동스트레스 및 24시간군에서는 일부 세포가 6시간군 보다 심한 변화 양상을 보인 반면 대부분의 세포는 6시간군에서 보다 약한 미세구조 변화를 보였다. 부동스트레스에 의한 심방근육세포의 미세구조 변화는 사립체의 팽대, 사립체능선의 파괴, 부분적인 세포질의 과립화, 말미집구조를 갖고 있는 소포, 심방근육세포의 세포자멸사, 사이원반 사이의 넓어짐, 근육원섬유의 용해, 큰 못소포체의 형성 등이었다.
2. 부동스트레스 24시간군에서는 크기가 매우 작은 사립체들과 크기가 다양한 분비과립이 핵의 한 극 부위의 세포질 속에서 다수 관찰되었다.
3. 부동스트레스 후 분비과립은 구심적으로 세포의 가운데로 몰리는 경향이였으며 이때 크기가 큰 과립의 전자밀도는 강했고 크기가 작은 과립의 전자 밀도는 약했다.

이상의 결과는 심방의 기능을 좀더 잘 이해할 수 있게 해주며, 또한 앞으로 심방의 분비과립 동태를 연구하기 위한 모델로 이용될 수 있으리라 생각된다.

찾아보기 낱말 : 부동스트레스, 심방근육세포, 미세구조

서 론

Selye (1969)가 각종 스트레스에 관한 이론을 정립한 후 스트레스가 심장에 형태학적 및 생리학적 이상을 일으킨다는 많은 연구 보고가 있다(Selye 와 Côté 1968, Selye 등 1969, Selye 1970, Soldani 등 1997). 실험실에서 동물 실험을 할 때 그리고 임상에서 치료 목적으로 결박하여 못 움직이게 하는 경우가 있는데 이러한 부동 (immobilization) 상태는 그대

로 해당 동물의 심장이나 그 외의 장기에 영향을 미쳐 형태학적 및 생리적 변화를 일으키고 심하면 사망에 이르는 경우도 있다. Tóth (1990)는 이러한 원인을 구명하기 위하여 125 g 정도의 흰쥐를 부동 상태로 해 놓으면 6시간만에 사망하게 되는데 이때 아드레날린을 처리하면 사망률이 높아지는 것을 관찰하여 카테콜아민이 부동스트레스와 밀접한 관계에 있음을 밝힌 바 있다. Bozner 등 (1983)과 Bozner 등 (1984)은 흰쥐의 경우 부동 상태를 유지시킨 지 120분만에 심장근육세포의 세포소기관 중 사립체와 세포질세망의 모양이 심하게 변하고 지방소적이 많이 나타날 뿐만 아니라 괴사의 징후를 보이는 세포도 보인다고 하였으며, 이러한 변화는

이 연구는 1998년도 한국과학재단 특정기초연구비(연구과제 번호 98-0403-10-01-5)에 의해 이루어졌음.
correspondence to : 이무삼(전북대학교 의과대학 해부학교실)

어린 쥐에서 더욱 심하다고 하였다. 또한 Soldani 등(1997)은 소리스트레스에 의한 심방근육세포의 미세 형태 변화를 관찰한 실험에서 사립체와 근육 미세섬유 그리고 atrial natriuretic peptide (ANP)를 함유하고 있는 과립의 위치 변화를 관찰한 바 있으나 과립의 동태에 관한 언급은 없었다. 위와 같은 연구 보고들을 종합하여 보면, 소리스트레스를 제외한 부동스트레스 실험은 심실근육세포를 대상으로 한 것으로 내분비기능을 갖고 있는 심방근육세포에 관한 것은 아니다. 따라서 부동스트레스가 심실근육에 변화를 일으키면 심방근육에도 변화를 일으켜 심방근육세포에서 분비되는 ANP의 분비율에도 변화가 있으리라 예상되나 이에 관한 생리학적 및 형태학적 실험보고는 극히 희박하다.

한편 심장의 심방근육세포에 분비과립이 존재한다는 것이 발견된 후(Kisch 1956, Jamiesson와 Palade 1964) 이 과립에 체액조절물질인 ANP가 함유되었다는 것이 밝혀짐으로서(DeBold 등 1981, Currie 등 1983, DeBold 등 1986, DeBold 1986) 심장은 혈액을 순환시키는 펌프기능 이외에 내분비기능도 갖고 있음이 밝혀졌다(Garcia 등 1982, Forssmann 등 1983). 심방근육세포에서 분비되는 ANP의 생화학적 성상, 생리적 역할, 분비기전 등에 관한 것들이 많은 연구자들에 의하여 밝혀졌으나(Sonnenberg와 Veress 1984, Lang 등 1985, Ledson 등 1985, Cho 등 1988) 심방근육세포 내에서의 과립동태에 관하여는 아직도 명확히 밝혀져 있지 않다. 그 원인으로서는 심장근육세포가 펌프작용을 하기 위해 항상 움직이고 있기 때문에 세포내 과립이 언제 어떻게 이동하는가를 밝히는 것이 어렵고, 세포마다 과립의 함유량과 분포상태가 다르며, ANP의 합성과정이 명확히 밝혀져 있지 않고, 생리학적 으로 과립의 동태에 미치는 이온, 호르몬, 물리적 또는 생화학적 조절이 확실히 밝혀져 있지 않다는 점을 들 수 있다.

최근 Ogawa 등(1999)은 성숙한 동물의 심방근육세포에서 ANP와 BNP (brain natriuretic peptide)생산의 특성을 연구한 결과, ANP와 BNP는 같은 심방근육 세포에서 생산되지만 세포 내에서 구조적 차이로 분류되고 사실상 단 한가지 방법으로 그 과

정이 조절되는데, 특히 일상적인 방법과 자극에 의한 ANP와 BNP의 분비는 대부분이 다른 내분비기관에서 이미 밝혀진 “constitutive-like secretion” 방식을 취할 것이라는 것을 밝힌 바 있다. 이러한 방법의 분비는 미성숙 과립으로부터 생긴 호르몬이 공포를 통하여 우선 분비된다는 것에 기초를 둔다고 하였으며, 자극의 반응으로 야기되는 ANP와 BNP의 분비 역량은 저장된 호르몬의 양보다는 미성숙 과립의 형성율을 자극하는 것에 더 의존한다고 하였다. 이러한 연구 결과는 심방근육세포에서 ANP가 대사되는 과정의 일부를 밝힌 것이며, 심방근육세포에서의 호르몬 분비는 심방근육세포가 박동을 하기 위하여 움직이고 있는 것에 기초를 두고 있기 때문에 심방의 분비 능력은 미성숙과립의 대사와 깊은 관계에 있음을 암시하는 중요한 연구 결과라 생각한다. 그러나 이에 관한 형태학적 연구가 거의 없어서 미성숙과립과 성숙과립과의 상관관계와, 과립의 세포 내 이동 및 분비 과정을 알 수가 없기 때문에 Ogawa 등(1999)의 생리학적 연구에 기초를 둔 심방근육세포의 형태학적 연구가 필요하다.

이러한 연구를 하기 위하여는 심방근육세포의 변화가 거의 없는 정상 동물을 사용하는 것보다, 짧은 시간 안에 세포의 변화를 볼 수 있는 여러 가지 병적 모델 중 부동스트레스를 이용한 병적 모델을 개발하기 위하여 시행되었다. 그 결과 짧은 시간 동안의 부동스트레스가 심방근육세포의 미세구조와 분비과립의 동태에 영향을 미치는 것이 관찰되었다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험 동물로는 체중 160 g내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 사용하기 전에 물과 사료를 충분히 주고 조용하고 안락한 상태에서 3일간 사육하였다.

실험 동물을 대조군과 실험군으로 나누었으며 실

험군은 다시 2시간 부동군, 6시간 부동군, 12시간 부동군, 24시간 부동군으로 구분하였다. 각 대조군은 각 실험군의 시간만큼 물과 사료를 주지 않은 상태로 사육 상자 안에서 사육한 군으로 하였으며 각각의 대조군과 실험군에는 흰쥐를 5마리씩 배정하였다.

2. 실험 방법

1) 부동스트레스 방법

부동스트레스는 흰쥐의 몸체가 꼭 길 만한 직경을 갖고 있는 플라스틱관에 동물을 넣는 방법으로 하였다. 즉 플라스틱관의 전체 모양은 짧은 연필 모양으로, 동물의 몸통이 들어갈 부분은 동물을 넣고 직경을 조절할 수 있도록 고안되었으며, 동물의 머리 부분이 들어갈 부분은 끝에 숨을 쉴 만한 구멍(직경 5~7mm)이 뚫린 원뿔 모양의 관으로 막았고, 꼬리 부분은 꼬리가 밖으로 나오게 구멍이 뚫린 고무마개로 막았다. 결박 상태에서의 쥐는 앞발과 뒷발을 앞뒤로 뻗은 자세였으며 몸통에 가해지는 압박은 쥐가 통 안에서 자세를 뒤집지 못할 정도로 하였으며 조용한 장소에 머리가 30도 각도로 위를 향하게 하여 각각의 부동 시간 동안 놓아 두었다.

2) 전자현미경 관찰용 표본 제작

각각의 동물에서 왼쪽과 오른쪽 심방을 떼어 낸 다음 1 mm³ 내외의 조직 편으로 만들어 2%의 glutaraldehyde (0.1 M cacodylic acid 완충액, pH 7.4)로 90분간 전고정 하였다. 전고정된 조직을 역시 cacodylic acid 완충액으로 완충시킨 1%의 OsO₄ (pH 7.4)액에 후고정한 다음 0.1 M cacodylic acid 완충액으로 20분씩 3회 세척하고, 알콜 농도 순으로 탈수하였다. 탈수된 조직을 propylene oxide로 치환시킨 후 poly-bed 812 혼합액에 포매 하였으며, 초박절편기(LKB)로 1 μm 정도의 두께로 절편하여 toluidine blue로 염색한 다음 광학 현미경으로 관찰 하였다. 광학현미경 관찰에서 조직의 변화가 관찰된 부분을 초박절편기(LKB)로 70~80 nm의 초박절편을 만든 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 전자현미경(JEOL-1200EX)으로

심방근육세포의 미세구조 및 분비과립의 동태를 관찰하였다.

결 과

대조군 심방근육세포의 세포질내에는 각종 띠(band)가 잘 구별되는 근육원섬유가 세포의 긴축을 따라 조밀하게 배열되어 있으며 그 사이에는 사립체능선이 잘 발달한 사립체가 줄을 지어 위치하고 있었다. 핵은 비교적 창백하고 이질염색질은 핵막 주위에 얇게 위치해 있었으며 핵인은 간혹 관찰되었다. 분비과립은 세포질내에 퍼져있으나 주로 골지장치 부근이나 사립체가 많이 있는 곳에 모여 있는 경향이였다. 근세포막의 바로 안쪽에있는 세포질에서는 작은 소포들이 많이 관찰되었으며 세포와 세포사이에서는 결합조직세포와 모세혈관이 위치해 있고, 결합조직 기질은 전자밀도가 비교적 약했으며 세망섬유, 탄력섬유도 간혹 관찰되었으나 아교섬유가 주종을 이루고 있었다(Fig. 1).

2시간 부동스트레스를 준 쥐의 심방근육세포를 보면 근원섬유, 근육원섬유 사이에 있는 사립체의 모양, 과립의 모양과 분포 등은 대조군과 별 차이가 없었다.

6시간 부동스트레스를 준 쥐의 심방근육세포의 변화는 세포에 따라 달랐다. 일부 세포는 대조군의 세포 모양과 별 차이가 없었으나 대부분의 세포에서는 세포소기관과 세포질에 다양하고 심한 변화를 보였다. 즉 어떤 세포에서는 세포질의 한 부분이 창백하였으며 과립모양이었다. 크기가 작은 사립체는 핵 주위와 근육원섬유 근처에 서로 모여 있는 경향이였으며, 근육미세섬유의 배치가 엉성하고 근육섬유의 어두운 띠가 두꺼워져서 과수축을 보이는 것도 있었다(Fig. 2). 또 다른 세포에서는 분엽화 된 질은 핵과 핵 주위의 세포질 속에서 크고 작은 소포를 다수 관찰 할 수 있었는데, 그 소포 속에는 말이집 모양의 막성 구조나 전자밀도가 약한 미만성의 구조, 퇴화 과정의 사립체 등이 관찰되어 세포자멸사(apoptosis)의 초기 단계를 보이기도 하였다(Fig. 3). 어떤 세포에서는 세포질이 전체적으로 창백해지고, 크기가 커진 사립체는 세포

의 가운데에 모여 있으며, 근육미세섬유의 사이는 넓어져 있고, 다수의 분비과립은 군집을 이루고 있는 사립체 근처에서 다수 관찰되었다(Fig. 4).

일부 세포에서는 많은 수의 큰 과립과 불규칙한 능선을 갖고 있는 사립체가 세포 중간에 위치해 있는 골지복합체와 매우 작은 소포 모양의 구조들을 고리 모양으로 둘러싸고 있었다(Fig. 5).

12시간 부동스트레스를 받은 심방근육세포의 변화는 개별적으로 심한 차이를 보였다. 일부 세포가 세포소기관과 과립의 모양이 잘 보존되어 있어서 정상 세포처럼 보이는 것과는 달리 어떤 세포는 심한 변화를 보였다. 즉 일부 세포의 세포질은 주위의 세포보다 창백하였으며 세포질 속에서는 작고 능선의 변화가 심한 사립체가 산재해 있었고, 큰 공포 구조도 관찰되었다. 이 세포 속에서는 전자밀도가 약하고 근육미세섬유의 배열이 불규칙한 근육원섬유도 관찰되었다(Fig. 6).

일부 세포에서는 세포의 가운데로 모여 있는 많은 수의 분비과립이 관찰되었는데 과립의 크기는 다양하였고 일부 과립은 골지장치에 둘러 싸여 있었다. 또한 과립 주위에서는 크기가 작은 사립체들이 관찰되었는데 어떤 큰 사립체는 말미집 모양의 능선을 갖고 있었다(Fig. 7).

24시간 부동스트레스를 받은 심방근육세포 모양의 변화 정도는 세포에 따라 다르나 전반적으로 보아 6시간이나 12시간군의 것에 비하여 심하지 않았다. 스트레스에 의하여 심한 변화를 보인 세포는 좀더 이른 시간에 손상을 받은 것들로 생각되는 변화를 보였다. 즉 큰포식세포에 둘러싸인 어떤 세포는 전자밀도가 낮아 창백하게 보이는 세포질을 갖고 있었으며, 세포질 속에서는 변성된 작은 사립체, 분절화된 핵의 일부, 다수의 소포와 사립체, 골지복합체, 세포질세망, 등 여러 가지 세포소기관이 들어 있는 불규칙한 큰 소포가 관찰되었으나 근육원섬유는 관찰되지 않았다(Fig. 8).

또 어떤 세포에서는 밝은 소포로 채워진 크기가 큰 못소포체가 관찰되었는데 그 주위에는 잘 발달된 능선을 갖고 있는 사립체가 위치해 있었고, 이 세포 속의 근육원섬유마디의 모양은 정상 세포와 큰 차이 없었다(Fig. 9). 이러한 세포는 자가포식소

체에 의하여 스트레스 동안 손상 받은 세포소기관이 소화 처리되고 회복 단계에 있는 세포로 생각된다.

세포마다 정도는 다르나 사립체의 크기가 더욱 커져 있어서 근육원섬유보다 사립체가 더 많은 것 같이 보이는 세포도 있었는데 사립체능선은 잘 보존되어 있었다. 사립체가 집단으로 모여 있는 핵 주변부에서는 전자밀도가 높은 큰 과립과 전자밀도가 낮은 작은 과립이 집단을 형성하고 있었으며 과립 사이에서는 과립 크기 만한 작은 사립체가 다수 관찰되었다. 사립체 부근이나 사이에서는 전자밀도가 높은 두꺼운 막으로 둘러 싸여 있으며 그 속에 사립체능선이 들어 있는 구조가 12시간군에서 보다 더 자주 관찰되었다. 분비과립의 수는 대조군 수준으로 감소해 있었으며 크기가 일정치 않은 과립도 세포의 중앙부나 사립체가 많이 있는 곳에 모여 있었다. 과립 중 크기가 큰 것은 12시간 부동스트레스를 준 세포에서 보다 더욱 커져 있었다(Fig. 10).

이와는 대조적으로 대부분의 세포는 일부 구조적 차이를 제외하고는 대조군의 것과 별차이 없었다. 즉 어떤 세포는 분엽화 된 핵과 세포의 주변부에 위치한 분비과립을 갖고 있었으나 근육미세섬유의 배치와 사립체의 모양은 비교적 규칙적이었다(Fig. 11). 또 어떤 세포는 대조군의 심방근육세포와 별차 없는 근육미세섬유를 갖고 있었으며, 핵 주위에서 사립체능선이 잘 발달한 다수의 큰 사립체와 골지복합체 그리고 많은 수의 분비과립이 관찰되었다(Fig. 12).

고 찰

부동스트레스는 심실근육세포의 여러 가지 미세구조적 변화를 일으키는 원인이 되는데, 특히 사립체의 팽창, 세포질세망의 확장, 핵의 분엽화, 세포용해와 지방조직의 증가를 수반하는 괴사 등은 부동스트레스에 의하여 일어나는 세포 구조 변화의 대표적 예이다(Bozner 등 1984). 뿐만 아니라 부동스트레스는 심실근육세포의 T-system의 확장과 근

세포막의 손상, 핵막의 손상, 그리고 모세혈관벽의 포음세포 증가 등을 야기하기도 한다(Bozhko 등 1987). 이와 같이 부동스트레스가 심장에 미치는 세포학적 연구는 주로 심실근육을 대상으로 한 것이며 내분비기능을 갖고 있는 심방근육세포를 대상으로 한 것은 아니다. 근래 Soldani 등(1997)은 소리스트레스가 심방과 심실근육에 미치는 영향을 관찰한 결과 소리스트레스에 노출된 흰쥐 심장의 심방근육세포는 심실근육세포와 같이 세포질세포막이 확장되고, 근형질의 밀도가 부분적으로 소실되며, 사이원반의 간격이 넓어지고 막성분이 부분적으로 파괴되고, 사립체의 능선이 파괴되며 사립체 속에 소포가 생성되고 한계막이 파괴되는 등의 변화를 관찰한 바 있다.

본 실험의 결과 부동스트레스에 의해서도 심방근육세포의 사립체가 비대되었으며 사립체능선은 불규칙하게 되고 사립체 바탕질의 전자밀도가 낮아지면서 형성되는 것들이 관찰되었으며, 근형질이 부분적으로 과립모양으로 변하고 근육원섬유의 배열이 불규칙해지고 심하면 용해되는 과정의 것도 관찰된 점은 소리스트레스에 의한 심방근육세포의 변화(Soldani 등 1997)와 비슷하였다. 그러나 소리스트레스는 심방근육세포에 전반적으로 손상을 주는 반면 부동스트레스는 심방근육세포의 일부에만 손상을 주었는데 그 원인은 소리스트레스가 청각을 통한 자율신경의 흥분과 호르몬에 의한 영향인데 반하여 부동스트레스는 물리적인 압박과 이에 따른 신경적 반응으로 평상시 환경변화에 약한 근육세포들이 손상을 받았을 가능성이 높다. 또한 본 실험에서 세포자멸사과정을 거치는 세포가 자주 관찰되고, 변형되는 사립체 이외에 심방 특수과립 크기 만한 작은 사립체가 심방근육세포의 핵 주위에서 많이 관찰되었음과 과립이 세포 중앙으로 이동했음은 소리스트레스 실험 동물에서 관찰되지 않았던 것이다. 부동스트레스 24시간 후에 크기가 작은 사립체가 분비과립과 섞여서 핵의 한쪽 극에 모여 있는 세포와, 자가포식소체로 생각되는 큰 못소포체와 대조군과 별 차이 없는 세포소기관을 갖고 있는 세포가 관찰되었는데 이러한 실험 결과는 매우 흥미있는 결과로 이는 심방근육세포가 긴 시

간의 스트레스에 적응하기 위한 일련의 회복 과정이 아닌가 생각된다. 즉 스트레스에 의하여 손상을 받은 세포들 중 일부 세포는 괴사나 세포자멸사에 의하여 제거되는 반면 일부 세포는 사립체의 증식과 자가포식소체에 의하여 스트레스 동안 손상 받은 세포소기관이 소화 처리되고 회복 단계를 통한 세포 활성화 쪽으로 변화하는 것 같다. 이러한 사실은 부동스트레스와 소리스트레스에 의한 심방근육세포의 변화 기전이 서로 다른 것을 암시하는 것으로 생각되기 때문에 앞으로 이에 관한 연구가 진행되어 부동스트레스에 의한 심방근육세포의 사립체 변화 뿐만 아니라 세포 손상 기전의 특징이 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

심방근육세포의 변화는 소리스트레스 뿐만 아니라 허혈과 같은 다른 스트레스 인자(Lopes 등 1992)나 병리학적 조건(Ghadially 1988)하에서도 일어난다고 알려졌는데 그 기전을 보면, Ferrans와 Roberts(1971-1972)는 동물에 catecholamine을 투여하면 심장에 변화를 초래하며, Tóth(1990)는 부동스트레스 때 아드레날린(adrenalin)을 투여하면 동물이 죽는 비율이 높아짐을 밝힌 바 있으며, 부교감신경자극(Anichkow와 Vedeneva 1961)도 스트레스에 깊이 관련되어 있음이 밝혀졌다. 카테콜아민은 경종(alarm)과 같은 급성 스트레스 때와 같이 여러 조건하에서 증가하게 되는데(Selye 1950), 이것은 심장혈관계통에 일차적으로 작용하여 혈압을 높이고 심각한 허혈 변화를 일으킨다(Yamamura와 Aoshima 1980)고 알려져 있다. 심장허혈은 사립체를 포함한 세포내 변화를 초래하고(Caulfield와 Klionsky 1959), 사이원반의 공간을 증가(Ashraf와 Halverson 1978) 시킴으로서 심장근육세포의 대사가 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한 Jennings 등(1969)은 허혈 개 심장근육으로부터 분리된 사립체의 구조와 Krebs citric acid cycle 사이의 상관관계를 알아본 결과 oxidative phosphorylation은 저농도의 산소 하에서 ATP형성에 관여함을 관찰하였다. Burlington 등(1970)은 저산소증의 심장근육세포에서는 glycolytic influx가 증가되고, 저산소증에서 심장의 기능을 유지하기 위해서는 당 분해가 증가되는데, 이것은 심장근육의 대사를 변화시킴

로서 허혈이 심장근육의 형태학적 변화를 초래하는 것 같다고 하였다. Soldani 등(1997)도 소리스트레스에 의한 사립체막 구조의 변화는 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2-}$ exchange에 영향을 주는 ATP의 구조적 결핍과 효소계의 연쇄적인 잘못에서 기인한다고 주장한 바 있다. 본 실험에서 관찰된 심방근육세포에서의 변화 중 사립체의 능선과 막이 일정치 않고 일부 안전성을 잃은 것은 사립체 수준의 저산소 정도와 밀접한 관계에 있는 것 같으며, 사이원반이 넓어져 있음은 Forbes와 Sperelakis (1985)가 주장한 바와 같이 사이원반 근처에 있는 Ca^{2+} 이온의 농도가 낮아졌기 때문으로 생각되는데 이는 추후 Ca^{2+} 이온과 친화성이 있는 이온을 이용하여 연구 될 것이다.

한편 본 실험에서 세포자멸사(apoptosis)의 양상을 보이는 세포가 자주 관찰되었는데 부동스트레스의 시간이 경과할수록 세포자멸사의 뚜렷한 진행 과정을 보이는 경향이였다. 심장의 발생 과정에서 관찰되는 세포자멸사 외에 실험적 세포자멸사에 관한 연구도 많이 이루어졌다(Chakrabarti 등 1997, Bialike 등 1999, Knaapen 등 2001). 특히 Chakrabarti 등(1997)은 급성허혈심장에서 세포자멸사가 많이 일어나는데 이것은 sodium hydrogen exchange inhibitor인 HOE642 (Cariporide) 에 의하여 억제되는 것으로 보아 심장 세포자멸사에 sodium hydrogen exchange가 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 Bialik 등(1999)은 심방근육세포에서 사립체 자멸사가 혈장과 포도당 고갈에 의하여 활성화됨을 밝혀 낸바 있다. 본 실험에서도 부동스트레스 6시간 때에 사립체의 능선이 불규칙해지고 12시간 후에는 큰 공포안에 손상된 사립체들이 들어 있으며 24시간 후에는 손상된 사립체들이 덩어리를 이루어 세포질 분절을 이루는 세포자멸사의 과정에 있는 세포가 관찰되었다. 이러한 사실은 Bialik 등(1999)이 제시한 바와 같이 사립체 막의 투과성이 증가되어 cytochrome C의 유출에 의한 사립체 자체가 손상되고 이것은 심방근육세포의 sodium hydrogen exchange를 증가시켜 결국 세포의 세포자멸사를 야기하는 것으로 추측할 수 있으나 앞으로 이에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

심방근육세포에서 분비되는 것으로 알려진 ANP와 BNP의 세포내 저장과 분비는 서로 다른 양상을 보인다(DeBold 등 1996). 이 두 단백질은 구성 성분에 따라 따로 구성되고 분비될 때는 심방근육세포의 단일 방법 즉 세포가 만들어져 분비되는 방식의 소위 'constitutive-like' 분비 방식을 취한다(Ogawa 등 1999)고 알려져 있다. Iida와 Shibata (1994)는 배양중인 성숙한 흰쥐의 심방근육세포를 이용하여 실험한 결과 새로 만들어진 ANP의 40% 정도가 자극이 없는 조건하에서 분비되며 나머지는 저장되거나 후에 천천히 분비된다고 하였다. Mangat와 DeBold (1993)도 배양중인 심방근육세포에 잡아다니는(stretch) 자극을 가하면 새로 만들어진 ANP가 분비되고 오래된 것은 변화가 없음을 증명한 바 있다. 심방근육세포에서 보이는 과립에는 두 종류가 있는데 한 종류는 미성숙 과립으로 전자 밀도가 약한 것이며 또 한 종류는 전자밀도가 강한 성숙 과립이다(Jamieson와 Palade 1964). 이 두 종류 과립의 동태를 밝히는 것은 위 연구자들의 생리학적 실험을 형태학적으로 증명할 수 있는 계기가 되는 것으로 생각된다.

본 실험에서 부동스트레스를 가한 후 시간별 과립의 동태를 관찰한 결과, 부동스트레스 6시간군과 12시간군에서는 과립의 크기가 다양하지 않고 핵 주위나 세포 전체에 걸쳐 산재해 있었으나 24시간 부동스트레스군에서는 과립의 수가 증가하고, 크기가 매우 다양하였으며 세포의 중앙에 몰려 있었는데, 분비 과립 중 크기가 큰 것은 전자밀도가 높아 오래된 과립으로 추측되었다. 이러한 실험 결과는 부동스트레스가 짧은 시간 안에 심방근육세포의 ANP 분비 기능에도 영향을 미치는 것으로 사료되기 때문에 이에 관한 생리학적 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다. 본 실험 결과와 타 연구자들의 결과를 종합하여 볼 때 Ogawa 등(1999)이 주장한 바와 같이 오래된 분비 성분은 오랜 동안 세포 안에 머무는 것이 아닌가 추측되나, 앞으로 자기방사선법 등을 이용하여 과립의 동태를 좀더 자세히 밝힐 필요가 있을 것으로 생각된다.

또한 앞서 기재한 바와 같이 부동스트레스 시간이 경과할수록 많은 분비과립이 세포 중앙의 핵

주위로 이동하여 골지복합체 및 사립체와 더불어 근집을 형성하고 있음이 본 실험에서 관찰되었다. 이러한 변화는 심방을 생체와 시험관내에서 5회 내지 6회 잡아다니는(stretch) 실험을 실시한 결과 과립이 원심성으로 중앙에서 세포 주변부로 이동한다는 보고(Angnoletti 등 1989)와 상반된 결과였다. Angnoletti 등(1989)은 이러한 과립의 세포주변으로의 이동은 과립이 세포막과 융합하여 심방을 잡아 다닐 때 쉽게 세포 밖으로 분비하기 위한 것이라 하였다. 세포 내에서 핵 또는 세포포함물이나 세포소기관의 이상 이동은 약물이나 물리적 자극에 의하여 세포뼈대가 변화하기 때문이라는 것은 잘 알려진 사실이다. 그러나 Angnoletti 등(1989)의 실험 결과와 달리 과립이 세포 중앙으로 몰리는 본 실험의 결과는 부동스트레스가 미세관이나 미세섬유 같은 세포뼈대의 변형에 영향을 미치는 것 이외에도 다른 요인이 작용했기 때문으로도 생각된다. 즉 부동스트레스시 과립의 수가 증가하는 것과 분비과립에 함유된 ANP가 콩팥의 이뇨작용을 증가시켜 혈압을 떨어뜨린다는 사실(De Bold 등 1981, De Bold 1986)을 참고하여 볼 때 부동스트레스시 수분 손실을 줄이기 위하여 ANP 분비를 억제하기 위한 일련의 과정으로도 생각할 수 있으나 이에 관하여서도 추후 더 자세한 연구를 통한 설명이 필요하다.

Soldani 등(1997)은 소리스트레스를 준 후 심방근육과 심실근육의 세포 모양 변화를 관찰한 결과 심방근육의 변화는 소리스트레스를 6시간 가할 경우 가장 심하였으며 12시간군에서는 오히려 변화가 심하지 않았음을 보고한 바 있다. 그러나 심실근육에서는 6시간보다는 12시간군에서 더 변화가 심하였는데 이러한 실험 결과는 심방근육세포와 심실근육세포의 스트레스 반응에 차이가 있음을 뜻한다고 하였다. 본 실험에서도 부동스트레스 6시간군에서 심방근육세포의 모양 변화가 가장 심하였으나 12시간 24시간군에서는 오히려 변화가 심하지 않았는데 이러한 원인이 생체의 환경 적응 반응이나 어떤 보상작용에 의한 것인지는 스트레스에 대한 세포 손상 억제 물질인 감삼샘호르몬(Bozhko 등 1987) 등을 이용한 실험에서 추후 밝혀질 것으로

기대된다.

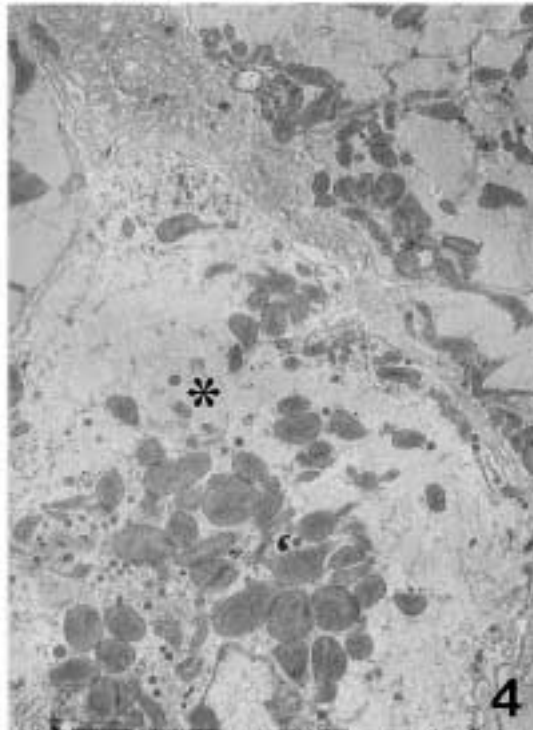
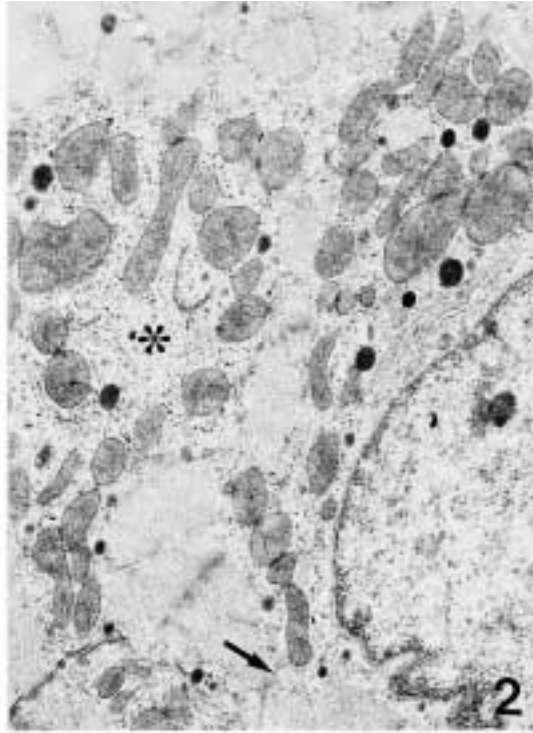
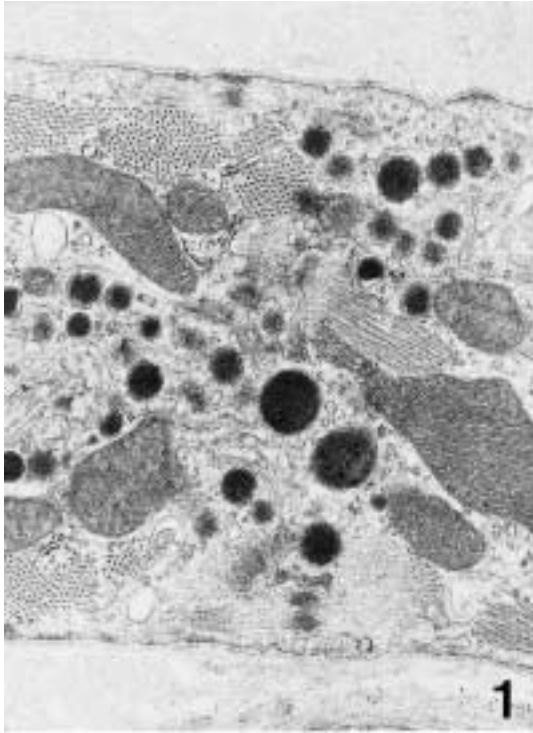
참 고 문 헌

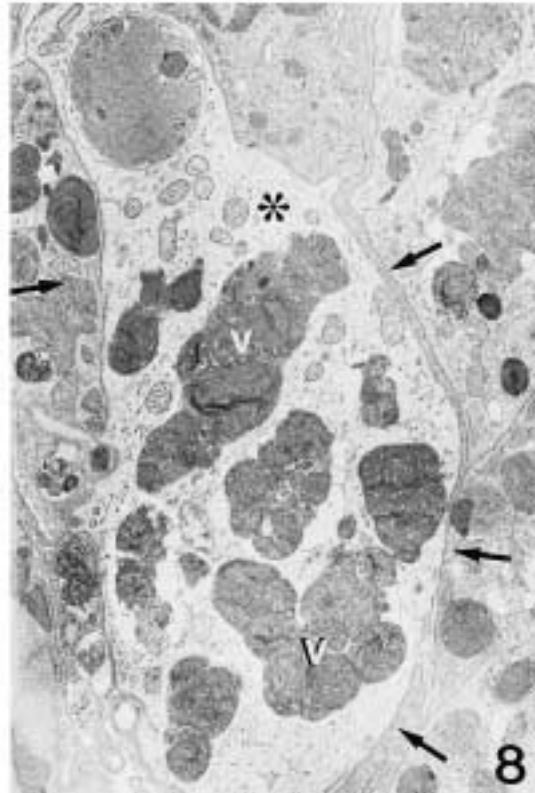
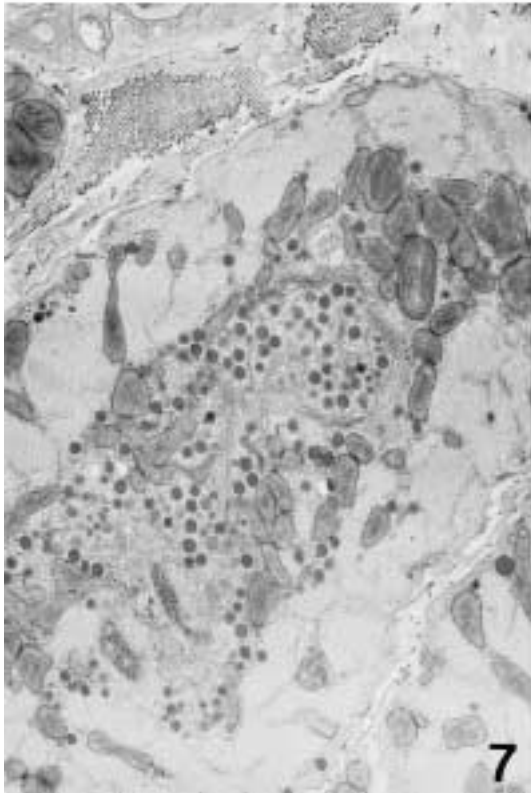
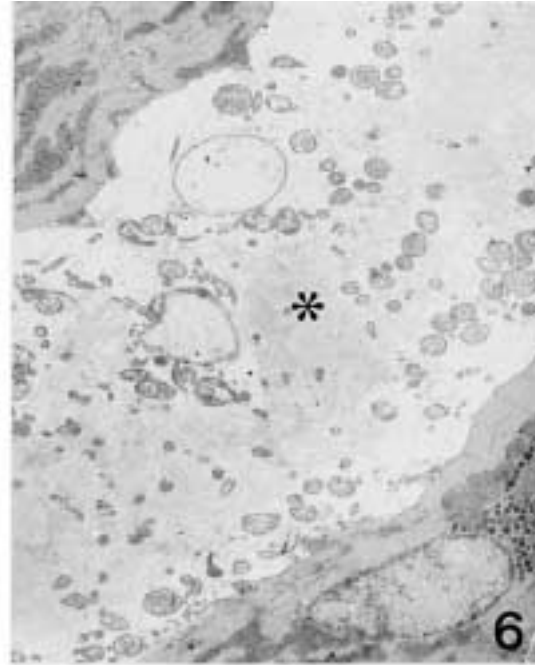
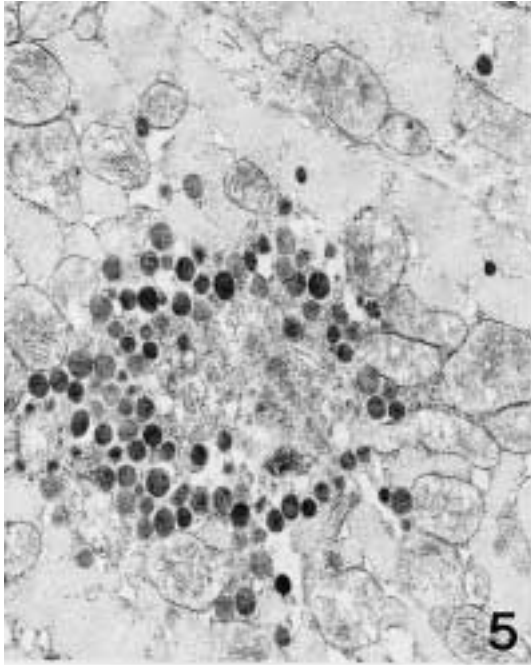
- Angnoletti G, Ferrari R, Slade AM, Severs NJ, Harris P : Stretch-induced centrifugal movement of atrial specific granules—a preparatory step in atrial natriuretic peptide secretion. *J Mol Cell Cardiol* 21 : 235-239, 1989.
- Anichkow SV, Vedeneeva ZJ : Irritation of the sympathetic nerve as a cause of myocardial lesions. *Acta Physiol* 19 : 17-18, 1961.
- Ashraf M, Halverson C : Ultrastructural modifications of nexuses (gap junctions) during early myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 10 : 263-269, 1978.
- 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* 85 : 403-414, 1999.
- Bozhko AP, Sukhorukova TA, Archakova LI : Myocardial damage during immobilization stress and the protective effect of thyroid hormones. *Arkh Anat Gistol Embriol* 92 : 25-27, 1987.
- Bozner A, Bal ZV, Dost LJ, Szigetiov A : Electron microscopy morphometric analysis of the effect of immobilization stress on the structure of the myocardium in rats belonging to 2 age groups. *Cesk Patol* 20 : 146-150, 1984.
- Bozner A, Bal ZV, El Gabri H : The effect of immobilizing stress on the ultrastructure of the myocardium in rats in different age groups. *Cesk Patol* 19 : 108-115, 1983.
- Burlington RF, Whitten BK, Sidel CM, Posiviata MA, Salkovits IA : Effect of hypoxia on glycolysis in perfused heart from rats and ground squirrels (*Citellus lateralis*). *Comp Biochem physiol* 35 : 403-414, 1970.
- Caulfield J, Kliensky B : Myocardial ischemia and early infarction: An electron microscopic study. *Am J Pathol* 35 : 389-523, 1959.
- Chakrabarti S, Hoque AN, Karmazyn M : A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *J Mol Cell Cardiol* 29 : 3169-3174, 1997.
- Cho KW, Seul KH, Ryu H, Kim SH, Koh GY : Characteristics of distension-induced release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria. *Regul Peptides* 22 : 333-345, 1988.

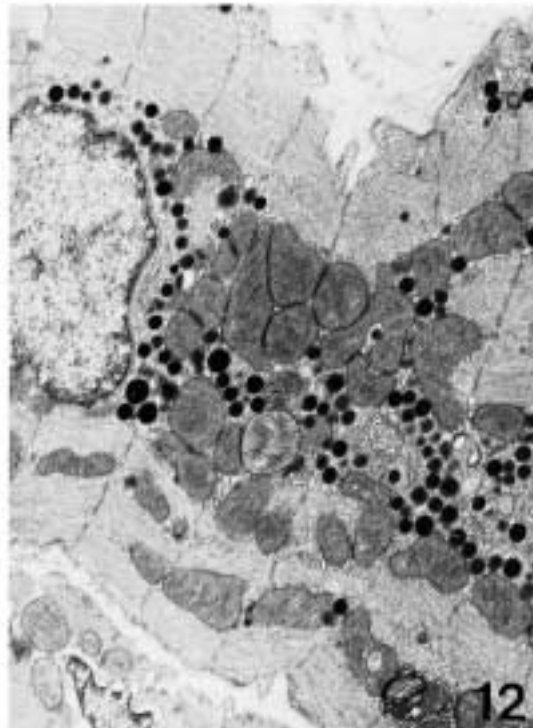
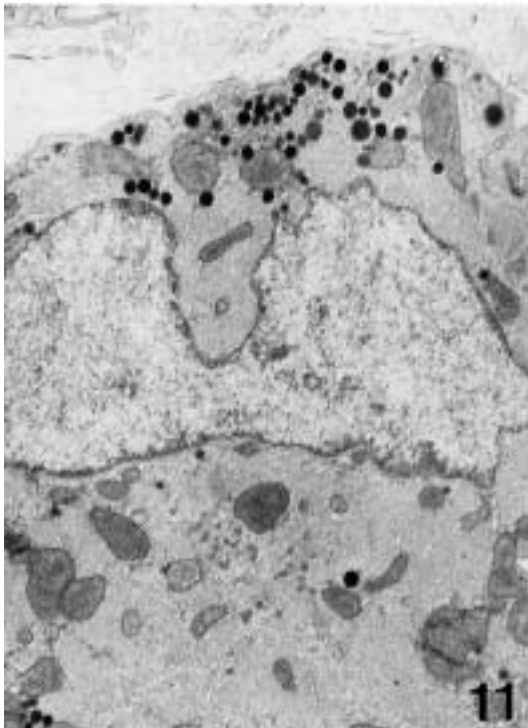
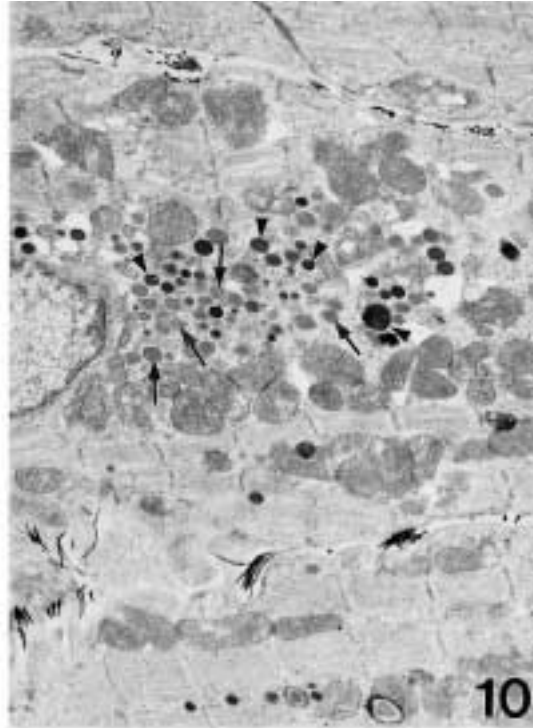
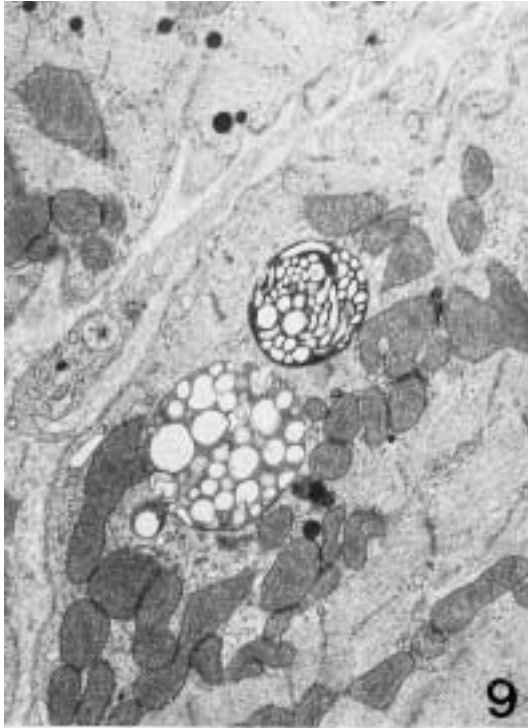
- Currie MG, Geller DM, Cole BR, Boylar JC, Yasheng W, Holmberg SW, Needleman P : Bioactive cardiac substances: potent basorelaxant activity in atria. *Science* 221 : 1-73, 1983.
- DeBold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H : A rapid and potent natriuretic response to intravenous injections of atrial myocardial extracts in rats. *Life Sci* 28 : 9-94, 1981.
- DeBold AJ, Bruneau BG, DeBold ML : Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 31 : 7-18, 1996.
- DeBold AJ, DeBold ML, Sarda I : Functional- morphological studies on in vitro cardionatriin release. *Hypertension Dallas* 4 : S3-S7, 1986.
- DeBold AJ : Atrial natriuretic factor : an overview. *Federation Proc* 45 : 2081-2085, 1986.
- Ferrans VJ, Roberts WC : Myocardial ultrastructure in acute and chronic hypoxia. *Cardiology* 56 : 146-160, 1971-1972.
- Forbes MS, Sperelakis N : Intercalated discs of mammalian heart: A review of structure and function. *Tissue Cell* 17 : 605-648, 1985.
- Forssmann WG, Hock D, Lottspeich F, Henschen A, Kreye V, Christmann M, Reinecke M, Metz J, Carlquist M, Mutt V : The right auricle of the heart is an endocrine organ. Cardiodilatation as a peptide hormone candidate. *Anat Embryol* 168 : 307-313 1983.
- Garcia R, Cantin M, Thibault G, Ong H, Jenest J : Relationship of specific granules to the natriuretic and diuretic activity of rat atria. *Experientia* 38 : 1071-1073, 1982.
- Ghadially Fn : Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 3rd ed. Butterworths London pp. 240-244, 1988.
- Iida H, Shibata Y : Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture. *Circ Res* 74 : 659-668, 1994.
- Jamieson JD, Palade GE : Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol* 123 : 151-172, 1964.
- Jennings RB, Herdson PB, Sommers HM : Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab Invest* 20 : 548-558, 1969.
- Kisch B : Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 14 : 99-112, 1956.
- Knaapen MW, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM : Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 51 : 304-312, 2001.
- Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger TH : Atrial natriuretic factor—a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature Lond* 314 : 264-266, 1985.
- Ledsome JR, Wilson N, Courneya CA, Lankin AJ : Release of atrial natriuretic peptide by atrial distention. *Can J Physiol Pharmacol* 63 : 739-742, 1985.
- Lopes AC, Borrotchin L, Sasso WS, DiDio LJ : Action of propranolol on the atrial cardiomyocytes of rats submitted to cold stress. *J Submicrosc Cytol Pathol* 24 : 187-191, 1992.
- Mangat H, DeBold AJ : Stretch-induced atrial natriuretic factor release utilizes a rapidly depleting pool of newly synthesized hormone. *Endocrinology* 133 : 1398-1403, 1993.
- Ogawa T, Vatta M, Bruneau BG, DeBold AJ : Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria. *Am J Physiol* 276 : H1977-H1986, 1999.
- Selye H, Côté G : Stress and cardiopathies. *Union Med Can* 97 : 1036-1045, 1968.
- Selye H, Somogyi A, Savoie L : Prevention of stress-induced cardiac necrosis by amiloride. *Angiologica* 6 : 249-254, 1969.
- Selye H : Development of the stress concept. *Stress and heart diseases. Med Welt* 16 : 915, 1969.
- Selye H : Stress and cardiovascular disease. *Cardiovasc Med* 4 : 183-187, 1979.
- Selye H : Stress: The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on concepts of the general adaption syndrome and the diseases of adaption. *Acta Inc Montreal* 1950.
- Selye H : The evolution of the stress concept. *Stress and cardiovascular disease. Am J Cardiol* 26 : 289-299, 1970.
- Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Lenzi P, Cristofani R, Paparelli A : SEM/TEM investigation of rat cardiac subcellular alterations induced by changing duration of noise stress. *Anat Rec* 248 : 521-532, 1997.
- Sonnenberg H, and Veress AT : Cellular mechanism of release of atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 124 : 443-449, 1984.
- Tóth T : The role of catecholamines in lethal immobilization stress. *Acta Physiol Hung* 75 : 95-99, 1990.
- Yamamura K, Aoshima K : An investigation of biological responses induced by intermittent noise. *Eur J Appl Physiol* 44 : 9-16, 1980.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Atrial myocyte of a control rat.
Well-preserved mitochondria, atrial specific granules, Golgi apparatus, sarcoplasmic reticulum, and myofibrils are seen in cross section. $\times 25000$.
- Fig. 2.** TEM micrograph of atrial section from a 6-hr immobilization group.
Note altered mitochondria, cytoplasmic granulation (*), and atypical Z line (arrow) are evident. $\times 12000$.
- Fig. 3.** TEM micrograph of atrial myocytes from 6-hr stressed rat.
Segmentation of nucleus, large vesicles with myelin figured structure (*) and small vacuole are seen in a myocyte. $\times 10000$.
- Fig. 4.** TEM micrograph of atrial myocyte from 6-hr stressed rat.
A myocyte has pale cytoplasm (*). Mitochondria and small secretory granules are aggregated in the central region of the atrial myocyte. $\times 6000$.
- Fig. 5.** TEM micrograph of an atrial myocyte from 6-hr stressed rat.
Many atrial specific granules and altered mitochondria showing disintegration of cristae located in the central region of myocyte. $\times 15000$.
- Fig. 6.** Rat atrial myocyte after 12-hr immobilization stress.
An atrial myocyte (*) with lysed organelle and pale stained cytoplasm is seen. $\times 6000$.
- Fig. 7.** Rat atrial myocyte after 12-hr immobilization stress.
Many atrial specific granules associated with Golgi apparatus and altered mitochondria are aggregated in the central region of the cell. $\times 9000$.
- Fig. 8.** Rat atrial myocyte after 24-hr immobilization stress.
A myocyte (*) has pale cytoplasm and irregular shaped large vacuole (v) with various cell organelles and significant altered mitochondria. This cell surround by phagocytic cell (arrows). $\times 12000$.
- Fig. 9.** Rat atrial myocyte after 26-hr immobilization stress.
Large multivesicular vesicles are seen in an atrial myocytes. $\times 12000$.
- Fig. 10.** Rat atrial myocyte after 24-hr immobilization stress.
Centrally located atrial specific granules (arrow heads) and small sized mitochondria (arrows) are seen in longitudinal section. Note various sizes of atrial specific granules are evident. $\times 15000$.
- Fig. 11.** Rat atrial myocytes after 24-hr immobilization stress.
The atrial myocyte has well developed mitochondria, myofibrils and atrial specific granules. But nucleus is lobulated. $\times 15000$.
- Fig. 12.** Rat atrial myocytes after 24-hr immobilization stress.
Many atrial specific granules and mitochondria are concentrated in perinuclear region. $\times 20000$.







Abstract

**The Effects of Immobilization Stress on the Ultrastructure of
Rat Atrial Myocytes**

Moo Sam Lee, Chang Ho Song, Hyung Tae Kim, Eui Hyeog Han,
Guang Zhao Lee, Wan Chul Kim, Hae young Shin

*Department of Anatomy and Institute for Medical Science,
Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea*

This study was performed to investigate the subcellular changes of rat atrial muscle cells by immobilization stress.

Sprague-Dawley rats weighting 200 gm were immobilized in small round plastic tube for 2, 6, 12, and 24 hours respectively. The atrial tissue obtained from each animals were observed by transmission electron microscopes.

In the heart of rat subjected 2 hours immobilization stress no significant morphological changes were found in electron microscopy, similarly as in control animal.

After 6 and 12 hours immobilization stress, the following electron-microscopic changes of atrial myocytes were observed at the swelling of mitochondrial matrix with disturbance in crista, focal loss of cytoplasmic matrix, vacuoles with myeline-like structure, apoptotic changes of myocytes, focal widening of intercalated disc interspace and lysis of myofibrils.

After 24 hours immobilization stress, very small sized mitochondria, similarly as small sized secretory granules and various sized granules are observed in the perinuclear region of atrial myocytes.

Atrial specific granules are moved centripetally toward the central region of the atrial myocytes after immobilization stress.

Above results will be aid in understanding the structures of atrium with dual function of blood circulation and endocrine, and in research of modulation of secretory granules in atrial muscle cells.

Key words : Immobilization stress, Atrial myocyte, Ultrastructure