

생쥐의 심장발생과정에서 세포증식과 세포고사의 역할

서울대학교 의과대학 병리학교실 및 ¹내과학교실, 서울대학교 의학연구원 심장연구소

김 어 진 · 김 호 수¹ · 서 정 욱

The Role of Cell Proliferation and Apoptosis in the Cardiac Development

Eo-Jin Kim, Hyo-Soo Kim¹, and Jeong-Wook Seo

Departments of Pathology and ¹Internal Medicine, Seoul National University
College of Medicine; Heart Reseach Institute, Medical Research Center,
Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

The functional and morphologic cardiac developments are determined by the morphogenesis, growth and remodeling of the heart resulted from the cell proliferation and apoptosis. We studied the distribution of the proliferation and apoptotic activity of myocardial cells according to the developmental stages in embryos of C57bl/6 mice. Serial histologic sections were stained with PCNA and TUNEL method and were analyzed with image analyzer (BMI, Seoul). The ventricular myocardium of an embryonic heart could be divided into trabecular, inner compact and outer compact layers. Proliferation indices at layers of the left ventricular myocardium on embryonal days (ED) 13, 14, 16, 17 and 18 were 19.9%/47.4%/60.4%, 16.1%/45.8%/60.3%, 24.6%/45.6%/38.1%, 23.3%/17.7%/18.3% and 31.2%/28.0%/19.4% (trabecular/ inner compact/ outer compact) and the right ventricle, 11.0%/34.4%/60.5%, 23.0%/44.0%/69.0%, 29.2%/42.9%/35.1%, 30.4%/30.5%/22.3% and 32.4%/28.4%/16.3%. The apoptotic indices of the left ventricle/VIF were 0.23%/3.66% on ED 13~14, 0.42%/1.31% on ED 16 and 0.05%/0.60% on ED 17~18. The results show that the proliferation of the myocytes was maximal at the outer compact layer on ED 13 and 14 but lowest on ED 17 and 18. This decrease was more pronounced at the left ventricle. The innermost trabecular layer showed a constant proliferation activity of 11.0~32.4%. The presence of spatiotemporal differences in the cell proliferation reveals regional regulation in the developmental timing of cardiac development. Functional maturation is considered to be responsible for the change of proliferation activity. The apoptosis was most frequent and intense in the VIF and crux throughout the periods of each embryonal day where as rarely seen in the ventricular myocardium, especially in the trabecular layer of myocardium. These findings suggest that the apoptosis plays the role in the development of atrioventricular, ventriculoarterial septation and valve formation. Our results also reveal that the participation of apoptosis in formation of the trabeculation can be denied. (**Korean J Pathol 1998; 32: 1049~1057**)

Key Words: Heart, Development, Cell proliferation, Apoptosis

서 론

심장의 기능과 형태의 발달은 심장세포의 수적 증가

접 수: 1998년 8월 11일, 게재승인: 1998년 11월 3일
주 소: 서울특별시 종로구 연건동 28, 우편번호 110-799
E-mail: jwseo@plaza.snu.ac.kr
서울대학교 의과대학 병리학교실, 서정욱
본 연구에 소요된 경비는 기초 의학 연구비(1996)의 보조에 의함.
ISSN : 0379-1149

와 세포질의 수축력 획득의 결과이다. 형태발생, 성장, 재구성 등으로 요약되는 심장 발달의 각 단계에서 심근 세포의 수적 증가가 어떻게 일어나는지, 그리고 이러한 수적 증가가 혈역학적 변화 및 형태학적 재구성과 어떤 연관이 있는지를 밝히는 것은 심장의 정상 및 이상 발달 그리고 손상후의 재생을 이해하는 데 중요하다. 이 과정에서의 분자적 기전은 심근 세포의 분열과 세포고사에 의하여 상호 조절될 것으로 추정되며 이들은 세포수를 균형 있게 유지하여 세포동태 (kinetics)의 항상성

을 유지하며 노화 및 질환과 관련한 변형 과정에서 중요한 역할을 한다.¹⁻⁵

세포분열중인 심근세포에 관한 많은 연구⁶⁻⁹가 있었지만 심장 형태 발생에서 세포분열의 조절기전과 부위별 특이성 및 출생 후에는 더 이상의 세포증식이 없는 이유에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 또한 심근 세포의 수를 개략적으로 결정하는 과정을 담당하는 세포분열과 더불어 형태 발생과 발생 후기 및 출생후의 재구성 및 질환의 발생에 관여할 것으로 예상되는 세포고사가 발생과정중의 심장에서 관찰되고 있다. 지난 수년동안 정상 심장 발생 과정중의 세포죽음에 관한 몇몇 연구가 발표되었으며,^{1,3,10-16} 세포죽음 양상의 변화와 심장의 비정상 발생과의 관계를 연결하려는 많은 시도가 있어 왔다.^{1,2} 과거의 연구들은 Nile blue sulfate를 이용한 생체 염색으로 세포고사를 조사하는 수준이었으나 최근의 세포고사에 대한 분자 생물학적 이해와 연구 기법의 개발로 세포고사의 DNA 분절화 특징을 이용한 연구기법들^{17,18}이 등장하여 심장 발생에 대한 새로운 연구가 가능하게 되었으며 여러 연구자가 시도하고 있다. 그러나 심장의 연구가 그 3차원적 형태와 기능적 측면에 대한 이해가 특히 중요하기 때문에 이러한 연구 기법의 발달에도 불구하고 발표된 연구는 매우 드물다. 따라서 본 저자들은 심장발생과정에서 세포증식 및 세포고사의 양상을 관찰하고 심장의 각 부위 및 발생 단계에 따라 어떠한 특이성이 있으며 이러한 특이성이 심장의 정상 및 이상 발달에 어떤 영향을 주는지를 밝히고자 본 연구를 하였다.

연구재료 및 방법

본 연구에서 사용한 생쥐 (C57bl/6) 태자는 각 해부학적 구조가 잘 관찰되는 절편을 선택하여 각각의 재태기간에 2마리씩 총 10마리를 이용하였다.

1. 관찰대상 생쥐 태자의 마린 및 연속절편 현미경 검사

C57bl/6 암컷 생쥐 2~3마리를 수컷 생쥐 1마리와 밤에 약 12시간정도 같은 쥐장에 넣어 놓은 후, 아침에 암컷 생쥐의 질도말검사를 시행하여 응고된 분비물이 관찰되면 이날을 임신 0일로 정한다. 각 재태기간에 따라 임신한 생쥐를 제왕절개하여 생쥐 태자를 적출하고 약 8시간동안 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 만든다. 파라핀 연속 절편에서 5개당 1개씩 H&E 염색을 하여 현미경 관찰 후 필요한 파라핀 절편을 추가 염색하여 관찰한다.

2. 세포증식 정도의 측정

1) **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)염색법:** 연속절편한 슬라이드를 xylene (3회)과 alcohol (2회)를 거쳐 증류수에 흡수 시키고 3% H₂O₂로 6분간 처리하여

조직내의 내재성 페록시다아제를 억제시킨다. 일차 및 이차 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 조직 슬라이드에 산양 혈청을 1시간동안 가한 후 PCNA에 대한 일차 항체를 도포 하여 4°C에서 18시간동안 반응시킨다. 바이오틴화 이차 항체를 도포 하여 30분간 반응시킨 후 스트렙토아비딘을 30분간 반응시킨다. 발색제인 diaminobenzidine (DAB)를 2분간 반응시키고 헤마톡실린으로 대조 염색한다.

2) 컴퓨터 영상분석을 이용한 세포증식 측정:

(1) **컴퓨터 영상분석 기기:** 면역조직화학염색한 조직 슬라이드를 광학현미경 (Olympus BH2)을 이용하여 400배로 확대한 후 CCD카메라 (Toshiba IK-40)로 영상을 포착하였다. 포착한 영상은 200 MHz 펜티엄프로 개인용 컴퓨터와 영상 보드를 이용하여 BMI plus 영상분석 프로그램으로 분석하였다. 영상은 TIF (Tagged Image File) 형식으로 저장 또는 변형하였다.

(2) **영상 선택:** 생쥐 태자의 심장단면 중 좌심실과 우심실의 외측벽부위에서 현미경을 이용하여 일정 밝기 하에서 400배 영상을 각각 두 개씩 포착하였는데 조직 절편 상태와 염색 상태가 양호하며 PCNA 염색 정도가 가장 높은 곳에서 얻었다.

(3) **영상분석 프로그램:** 프로그램은 세포 수 측정과 PCNA 표지 지수 측정을 위한 것으로 크게 나눌 수 있다.

① **세포 수 측정 프로그램:** 세포 수는 헤마톡실린으로 염색되는 세포핵을 세어서 측정하였다. 영상분석을 통해 세포핵을 확인하기 위해서는 조직의 영상을 흑백 영상으로 변화시킨 후 적절한 흑백수치와 크기를 가지는 것만 택하여 그 개수를 세었다. 흑백영상은 원래 영상에서 빛의 밝기 값만으로 영상을 얻어낸 것으로 BMI plus 프로그램에서는 그 값을 0에서 255까지로 나누어 어두울수록 0에 가까운 값을 가지며 밝을수록 255에 가까운 값을 갖게 하였다. 그러므로 영상 내에서 어둡게 나타나는 세포핵만을 지정하고 밝은 세포질이나 조직이 없는 배경 등을 제외시키기 위해 임의로 흑백 색 계수치를 정해 이보다 수치가 적은 부분 즉, 어두운 부분만 선택하고 이보다 큰 수치를 갖는 밝은 부분은 버렸다. 이 계수치는 개개의 세포핵들이 크기를 유지하면서 가능한 한 서로 겹치지 않도록 적절하게 정하였다. 세포핵의 크기는 최소 최대 직경과 둘레를 정하여 그 범위 내에 들어가는 것만 선택하였다.

② **면역조직화학염색 양성 세포핵 수 측정 프로그램:** 면역조직화학염색에서 PCNA 양성인 세포 수를 측정한다는 것은 곧 DAB발색에 의해 갈색으로 착색된 세포핵을 세는 것이다. 따라서 선택된 조직 영상을 청색 성분의 분리를 이용하여 갈색 빛을 띠는 부분이 어둡게 나타나는 흑백영상으로 만들고 앞서 세포 수 측정 때와 마찬가지로 적정 흑백계수치와 세포핵의 크기 범위를 정하여 DAB에 발색된 PCNA 양성 세포 수를 측정하였다.

③ **영상보정방법:** 광학현미경으로 가장 적절한 영상

을 얻기 위하여 처음에 조직의 영상을 얻을 때 현미경 빛의 강도와 BMI plus내의 영상 조절기능을 이용하여 실제 염색정도와 가장 유사한 영상을 만들었다. 광학현미경으로 얻은 조직 영상의 배경조건을 일정하게 유지하기 위해 조직 없는 유리 슬라이드로만 얻은 영상을 빼주고 일정 강도의 밝기 (120)를 더해 주었다. 흑백 영상으로 변환한 후 배경의 빛정도의 불규칙함을 보정하고자 배경 일정화 기능을 시행하였다. 또한 지정된 대상 (예: 세포핵)이 여러개 겹쳐져서 실제 크기보다 커져 크기가 범위를 벗어나는 것을 방지하기 위해 지정된 대상이 완전한 블록 폐곡선이 아닌 경우에는 각각의 블록한 부분을 분리하여 날개로 나누어 주었다. 마지막으로 각각의 프로그램을 시행한 후 눈으로 다시 확인하여 잘못 지정된 것을 가감하였다.

④ **적정조건 선택:** 세포 수 측정 시에는 흑백경계수치와 세포핵의 크기 범위를, DAB발색에 의한 면역조직화학염색 양성 세포핵 수 측정 시에는 갈색 경계 수치와 세포핵의 크기를 조사자의 임의에 따라 몇 종류 선택하여 측정한 후 같은 영상을 직접 눈으로 보고 측정한 것과 수치를 비교하여 가장 적절한 조건을 선택하였다.

3) **세포핵 수와 PCNA 양성 세포핵 수의 측정:** 위에서 얻은 가장 적절한 컴퓨터 영상분석방법으로 각 부위별로 전체 세포핵 수와 PCNA 양성 세포핵 수를 측정하여 세포증식지수를 조사하였다.

$$\text{증식지수} = (\text{PCNA 양성 세포 수} / \text{전체 세포 수}) \times 100$$

3. 세포고사 (Apoptosis) 여부 조사

1) **Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) 표지법:** 연속절편한 배자 슬라이드를 xylene (3회)과 alcohol (2회)을 거쳐 증류수에 함수 시키고 proteinase K를 20 µg/ml의 농도로 상온에서 15분간 반응시킨다. 평형완충액을 각 슬

라이드에 도포하여 상온에서 10분간 반응시키고 TdT와 digoxigenin-11-dUTP, dATP가 섞인 반응액을 각각의 슬라이드에 도포하여 37°C에 30분간 반응시킨 후 반응중지 완충액에 넣어 30분간 반응시킨다. anti-digoxigenin-peroxidase을 도포하여 상온에서 30분간 처치한 후 DAB 발색제 용액을 2분정도 반응시킨다. 헤마톡실린으로 대조염색한 후 결과를 판독한다.

2) 연속절편 슬라이드를 광학현미경 저배율 시야에서 검색하여 심장이 포함된 부위를 확인하고 그 3차원적인 형태를 재구성하여 각 부위가 심장의 어느 부위에 해당하는지를 확인하였고 이러한 재구성을 근거로 세포고사가 나타난 세포의 위치를 판별하였다.

3) **컴퓨터 영상분석을 이용한 세포고사의 측정:** 컴퓨터 영상분석기를 이용하여 세포증식 측정 때와 마찬가지로 각 부위별 전체 세포 수와 TUNEL 양성 세포 수를 측정하여 세포고사지수를 계산하였다.

$$\text{세포고사지수} = (\text{TUNEL 양성 세포 수} / \text{전체 세포 수}) \times 100$$

결 과

1. 세포증식능의 관찰 (Table 1)

재태 13일에는 현미경적 관찰만으로도 차이가 느껴질 만큼 심실벽 각 층의 세포증식능의 차이가 뚜렷하였다. 좌심실은 외측 조밀심근층이 60.4%였고 내측 조밀심근층이 47.4%, 육주심근층이 19.9%였다. 우심실은 외측 조밀심근층이 60.5%였고 내측 조밀심근층은 34.4%, 육주심근층이 11.0%였다. 즉 육주심근층에 비해 조밀심근층의 세포증식이 월등히 높았고 조밀심근층내에서도 외측 조밀심근층의 세포증식이 내측에 비해 높게 측정되었다 (Fig. 1). 심실벽 전체의 세포증식능을 관찰하였을 때는 좌심실이 37.0%, 우심실이 31.7%로 양측 심실간의 차이가 없었다. 재태 14일에는 좌심실은 외측 조

Table 1. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells in each layer of both ventricles on embryonal day 13, 14, 16, 17 and 18

		ED13			ED14			ED16			ED17			ED18		
		CN	PCNA	%	CN	PCNA	%	CN	PCNA	%	CN	PCNA	%	CN	PCNA	%
LV	OCL	618	373	60.4	863	520	60.3	1331	507	38.1	323	59	18.3	402	78	19.4
	ICL	397	188	47.4	592	271	45.8	1106	504	45.6	322	57	17.7	339	95	28.0
	TL	1087	216	19.9	1339	216	16.1	1264	311	24.6	322	79	24.5	474	148	31.2
RV	OCL	423	256	60.5	455	314	69.0	796	279	35.1	282	63	22.3	313	51	16.3
	ICL	305	105	34.4	332	146	44.0	659	283	43.0	256	78	30.5	264	75	28.4
	TL	629	69	11.0	582	134	23.0	1069	312	29.2	171	52	30.4	401	130	32.4

ED, embryonal day; CN, total cell number; PCNA, PCNA positive cell number; %, percentage of PCNA positive cells among total cells; LV, left ventricle; RV, Right ventricle; OCL, outer compact layer; ICL, inner compact layer; TL, trabecular layer

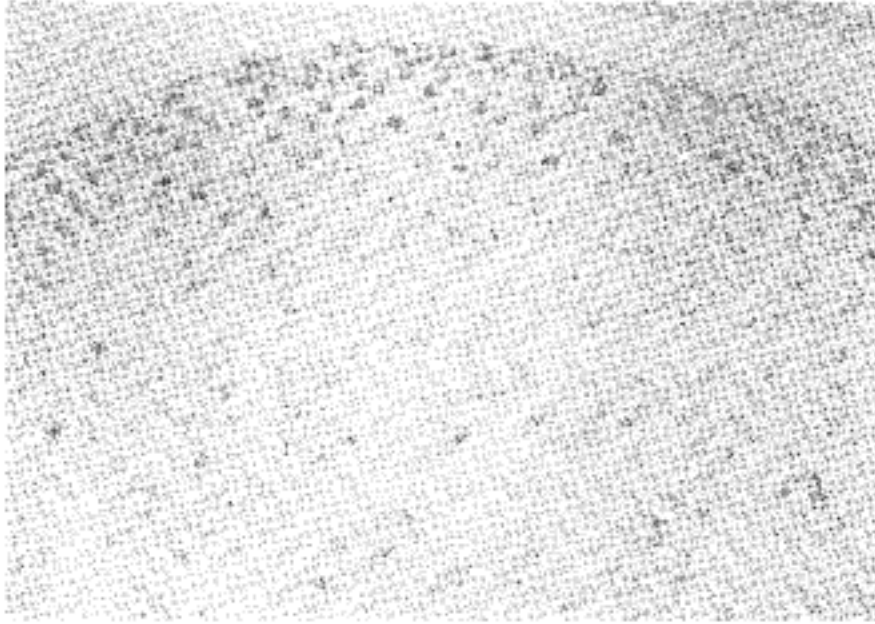


Fig. 1. Light microscopic finding for PCNA staining of ventricular wall on ED 13. Note dense and numerous PCNA positive cells in compact myocardium especially in outer layer.

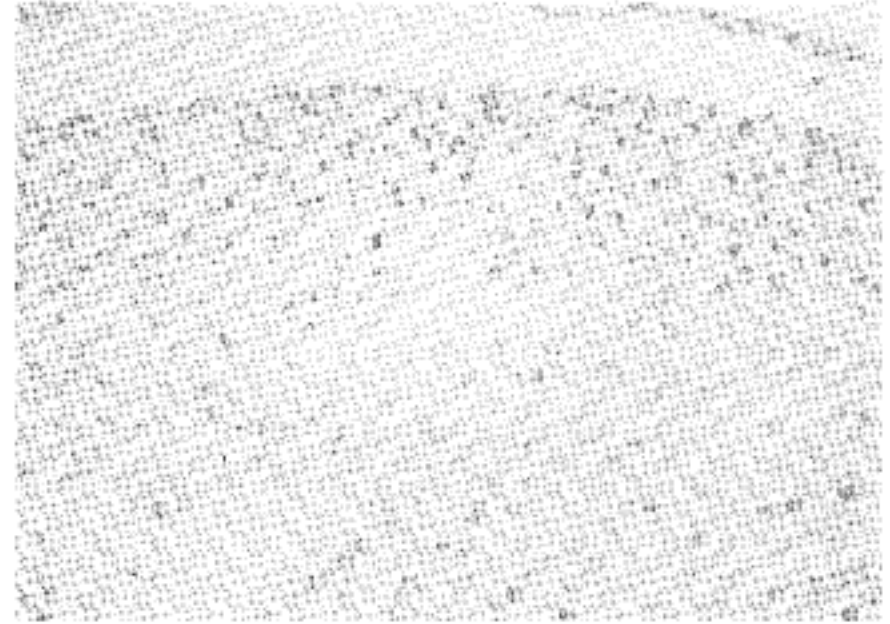


Fig. 2. Light microscopic finding for PCNA staining of ventricular wall on ED 14. The distribution of PCNA positive cells are similar to that on ED 13.

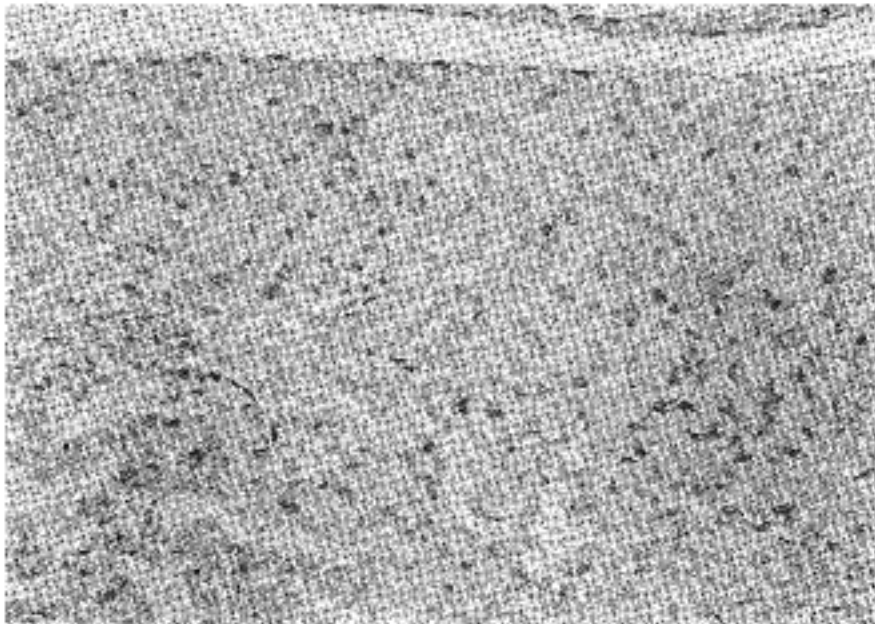


Fig. 3. Light microscopic finding for PCNA staining of ventricular wall on ED 16. The outer layer of compact myocardium shows a decrease of number of PCNA positive cells. As a result of that, the whole layer of ventricular wall reveals even distribution of PCNA positive cells.

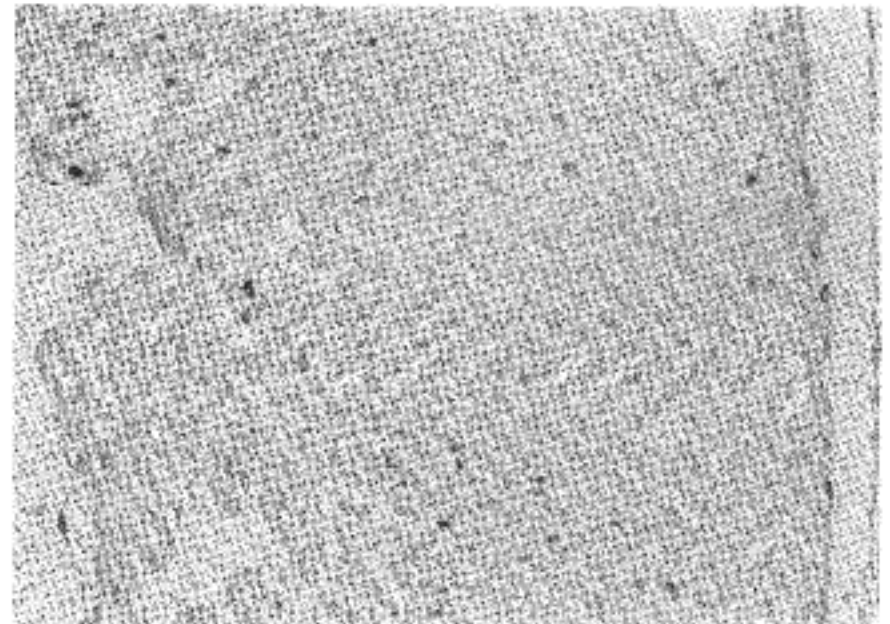


Fig. 4. Light microscopic finding for PCNA staining of ventricular wall on ED 18. The outer and inner layer of compact myocardium shows markedly decreased number of PCNA positive cells. The trabecular layer exhibits relatively high distribution of PCNA positive cells.

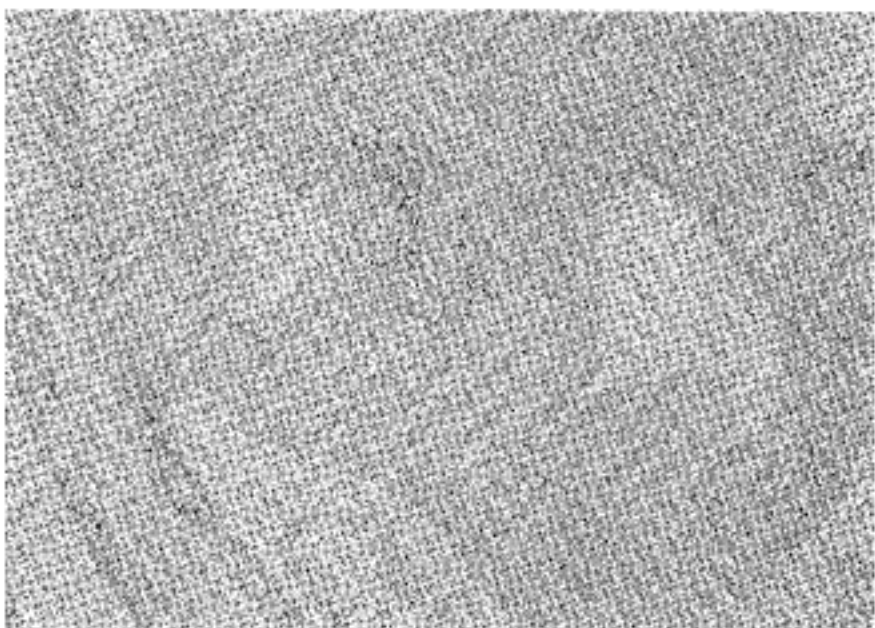


Fig. 5. Light microscopic finding for TUNEL staining of outflow tract on ED 13. Numerous TUNEL positive apoptotic bodies are visible.

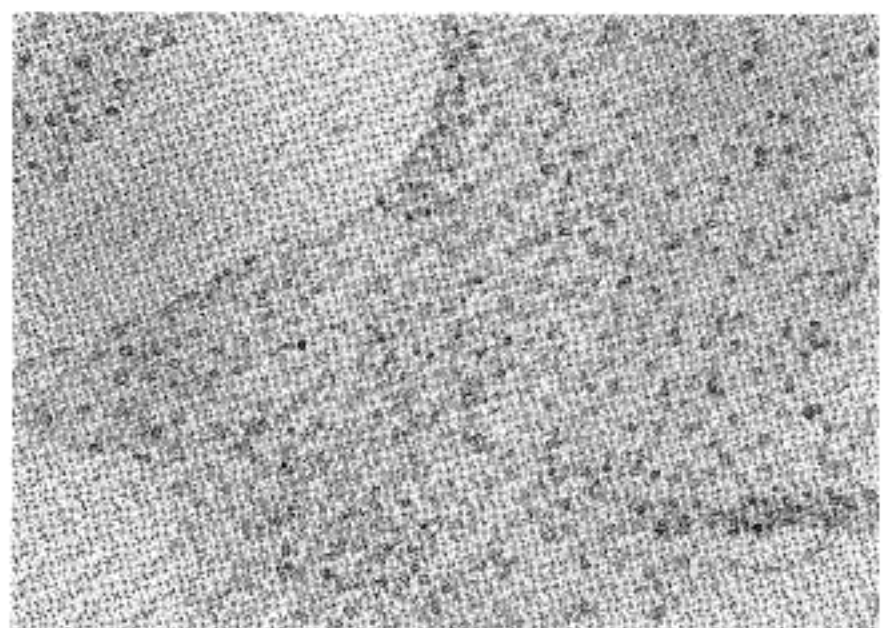


Fig. 6. Light microscopic finding for TUNEL staining of crux on ED 14. Many scattered TUNEL positive apoptotic bodies are visible.

밀심근층이 60.3%였고 내측 조밀심근층이 45.8%, 육주심근층이 16.1%였다. 우심실은 외측 조밀심근층이 69.0%였고 내측 조밀심근층은 44.0%, 육주심근층이 23.0%였다. 재태 13일에 비해 우심실의 세포증식능이 증가하였으나 여전히 육주심근층에 비해 조밀심근층의 세포증식이 월등히 높았고 조밀심근층내에서도 외측 조밀심근층의 세포증식이 내측에 비해 높게 측정되었다 (Fig. 2). 심실벽 전체의 세포증식능을 관찰하였을 때는 좌심실이 36.0%, 우심실이 43.4%로 우심실의 증식능이 증가하는 소견을 보였다.

재태 16일에는 좌심실은 외측 조밀심근층이 38.1%였고 내측 조밀심근층이 45.6%, 육주심근층이 24.6%였다. 우심실은 외측 조밀심근층이 35.1%였고 내측 조밀심근층은 42.9%, 육주심근층이 29.2%였다. 외측 조밀심근층의 세포증식능이 감소하여 내측 조밀심근층과의 차이가 없어졌으며 육주심근층과의 차이도 감소하여 세 층간의 세포증식의 분포가 비슷해졌다 (Fig. 3). 심실벽 전체의 세포증식능을 관찰하였을 때는 좌심실이 35.7%, 우심실이 34.6%로 양측 심실간의 차이는 관찰되지 않았다. 재태 17일에는 재태 16일에 비하여 육주심근층의 세포증식은 큰 변화가 없었으나 조밀심근층의 세포증식은 현저히 감소하여 육주심근층의 세포증식능이 상대적으로 높게 측정되었다. 즉 좌심실은 외측 조밀심근층이 18.3%였고 내측 조밀심근층이 17.7%, 육주심근층이 23.3%였다. 우심실은 외측 조밀심근층이 22.3%였고 내측 조밀심근층은 30.5%, 육주심근층이 30.4%였다. 심

실벽 전체의 세포증식능을 비교하였을 때는 좌심실이 19.8%, 우심실이 27.2%로 우심실의 증식능이 높게 관찰되었다. 재태 18일은 재태 17일과 비슷한 결과로 외측 조밀심근층의 세포증식이 현저히 감소하여 육주심근층의 세포증식능이 높게 측정되었다 (Fig. 4). 즉 좌심실은 외측 조밀심근층이 19.4%였고 내측 조밀심근층이 28.0%, 육주심근층이 31.2%였다. 우심실은 외측 조밀심근층이 16.3%였고 내측 조밀심근층은 28.4%, 육주심근층이 32.4%였다. 심실벽 전체의 세포증식능을 비교하였을 때는 좌심실이 26.4%, 우심실이 26.2%로 양 심실간의 증식능의 차이는 관찰되지 않았다.

2. 세포고사의 관찰 (Table 2)

재태 13일에는 좌심실 벽과 우심실 벽에서 세포고사 양성세포가 각각 6개와 5개가 관찰되어 0.24%와 0.20%의 세포고사지수를 보였다. 각각의 양성세포는 날개의 세포가 드물게 흩어져 있는 양상이었고 좌심실 벽에서는 5개 (0.20%)가 심실벽 첨부의 조밀심근층에서 관찰되었으며 1개 (0.04%)가 육주심근층에서 관찰되었다. 우심실 벽에서는 4개 (0.16%)가 심실벽 첨부의 조밀심근층에서 관찰되었으며 1개 (0.04%)가 육주심근층에서 관찰되었다. 심실중격에서는 6개가 관찰되어 0.29%의 세포고사지수를 보였다. 좌 우측 심방과 심방중격에서는 양성세포가 전혀 관찰되지 않았다. 대동맥판에서는 양성세포가 관찰되지 않았고 폐동맥판에서는 1개가 관찰되어 0.26% 세포고사지수를 보였다. 위의 부위들과는

Table 2. TdT-mediated d-UTP nick end labelling (TUNEL) positive cells in each area on embryonal day 13, 14, 16 and 17

	ED13			ED14			ED16			ED17		
	CN	TUNEL	%	CN	TUNEL	%	CN	TUNEL	%	CN	TUNEL	%
LV	2457	6	0.24	2198	5	0.23	1428	6	0.42	2101	1	0.05
RV	2448	5	0.20	1388	2	0.14		0	0			
IVS	2070	6	0.29	1562	5	0.32	2208	6	0.27		4	
LA		0	0		0	0		0	0		0	0
RA		0	0		0	0		0	0		0	0
IAS		0	0		0	0		0	0		0	0
MV	605	40	6.61	347	6	1.73		0	0	235	1	0.42
TV				369	6	1.63		0	0	229	2	0.87
AV		0	0					0	0		0	0
PV	384	1	0.26				212	1	0.47		0	0
OFS	932	128	13.73									
VIF				246	9	3.66	689	9	1.31	168	1	0.60
crux				814	65	7.99						
AMC	906	23	2.54	626	76	12.14		0	0		0	0

ED, embryonal day; CN, total cell number; TUNEL, TUNEL positive cell number; %, percentage of TUNEL positive cells among total cells; LV, left ventricle; RV, right ventricle; IVS, interventricular septum; LA, left atrium; RA, right atrium; IAS, interatrial septum; MV, mitral valve; TV, tricuspid valve; PV, pulmonary valve; AV, aortic valve; OFS, outflow septum; AMC, aortic-mitral fibrous continuity; VIF, ventriculoinfundibular fold

달리 승모판부위와 심실유출로 격막 (outlet septum)부위에서는 국소적으로 몰려 있는 세포고사 양성세포가 다수 관찰되어 각각 40개, 128개로 6.6%와 13.7%의 세포고사지수를 보였다 (Fig. 5). 승모판부위중에서도 승모판-대동맥관 섬유성 연결로 이어질 것으로 예상되는 전엽부위에서 39개 (전엽의 7.9%, 전체의 6.4%)가 관찰되었고 후엽부위에서 1개 (후엽의 0.98%, 전체의 0.2%)가 관찰되었다. 재태 14일에는 좌심실 벽과 우심실 벽에서 세포고사 양성세포가 각각 2~3개와 0~2개가 관찰되어 0.19~0.26%와 0~0.28%의 세포고사지수를 보였고 심실중격에서는 세포고사 양성세포가 2~3개가 관찰되어 0.27~0.36%의 세포고사지수를 보였다. 좌 우측 심방과 심방중격에서는 양성세포가 전혀 관찰되지 않았다. 이는 재태 13일과 유사한 소견으로 세포고사의 차이가 없었다. 좌 우측 심실과 심방에 비하여 심실누두부 주름 (ventriculoinfundibular fold; VIF)부위와 심십자부 (crux cordis)부위에서는 양성세포가 각각 9개와 31~34개가 관찰되어 3.7%와 7.5~8.6%로 월등히 높은 세포고사지수를 보였다 (Fig. 6). 승모판과 삼첨판부위에서는 세포고사 양성세포가 각각 2~4개와 3개가 관찰되어 1.1~2.4%와 1.7%의 세포고사지수를 보여 세포고사가 높은 부위였고 승모판-대동맥관 섬유성 연결부위에서는 세포고사 양성세포가 34~42개가 관찰되어 10.8~13.5%의 세포고사지수를 보여 가장 높은 세포고사지수를 나타내었다.

재태 16일에는 좌심실 벽과 심실중격에서 세포고사 양성세포가 각각 6개씩 관찰되어 0.42%와 0.27%의 세포고사지수를 보였지만 우심실 및 좌 우측 심방과 심방중격에서는 양성세포가 전혀 관찰되지 않았다. 좌심실 벽에서의 양성세포는 5개 (0.35%)가 심실벽 첨부의 조밀심근층에서 관찰되었으며 1개 (0.07%)가 육주심근층에서 관찰되었고 심실중격에서는 6개 모두 조밀심근층에서 관찰되어 육주심근층에서의 유의한 분포차이는

없었다. VIF부위에서는 양성세포가 3~6개가 관찰되어 1.1~1.5%로 여전히 높은 세포고사지수를 보였고, 누두부 (aortic infundibulum) 부위에서 3개의 양성세포가 관찰되었으며 이 부위는 승모판-대동맥관 섬유성 연결부위일 가능성이 있었다. 재태 17일에는 좌심실 벽과 심실중격에서 세포고사 양성세포가 각각 1개씩 관찰되어 좌심실은 0.05%의 세포고사지수를 보였고, 좌심실의 양성세포는 심실벽 첨부의 조밀심근층에서 관찰되었다. 좌우측 심방과 심방중격에서는 양성세포가 전혀 관찰되지 않았다. VIF부위에서는 양성세포가 1개가 관찰되어 0.6%로 여전히 상대적으로 높은 세포고사지수를 보였다. 승모판과 삼첨판부위에서도 세포고사 양성세포가 각각 1개와 2개가 관찰되어 0.42%와 0.87%의 높은 세포고사지수를 보였다. 재태 16일과 유사하게 누두부에서 세포고사 양성세포가 3개 관찰되었다.

고 찰

심장의 이상발달의 분자적 기전을 밝히는데 있어 가장 중요한 과정은 각 발생단계별로 나타나는 형태학적 변화를 정량적으로 밝히는 일이다. 1980년대 이후 이에 대한 연구가 시도되었으나 가설을 세우는 수준이었으며 면역조직화학검사와 TUNEL방법이 보편화된 최근에 본격적인 연구가 시행되고 있다. 세포증식의 속도를 측정하는 방법으로는 전체세포수의 시간적 변화를 측정하는 법과 세포주기의 특정시기에 나타나는 변화를 인지하여 전체 세포중 증식단계 세포의 비율을 측정하는 방법이 있다. 전체 세포 중 증식단계 세포의 비율을 측정하는 방법으로는 유사분열 정도의 측정 (mitotic index)이 있으나 조직학적으로 관찰 가능한 유사분열은 매우 단시간에 종료되므로 큰 한계가 있다.¹⁹ ³H-thymidine uptake법은 매우 정확하게 세포증식단계를 측정할 수 있으나 고정되지 않은 신선한 상태로 유지되어야 하

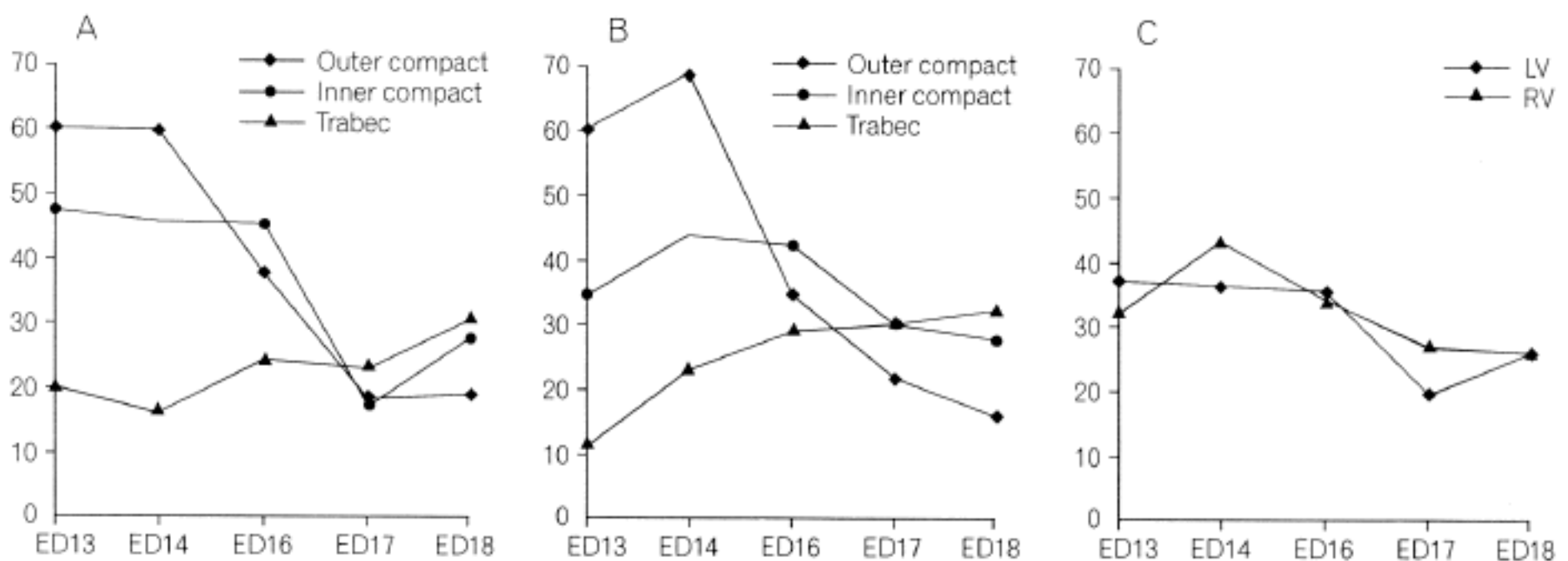


Fig. 7. PCNA labeling index of cardiomyocytes in each layer according to embryonal day. A, left ventricle. B, right ventricle. C, both ventricles.

고 자가방사를 시행해야하는 불편한 점이 있다. BrdU 투여 후 면역조직화학염색으로 세포증식을 알아보는 법 또한 생존시에 미리 BrdU를 투여하거나 시험관에서는 신선한 상태에서 배양해야 함으로 연구에 어려움이 있다.¹⁹ 이에 반하여 증식중인 세포핵에서 세포주기에 따라 발현하는 물질에 대한 면역조직화학적 방법으로 측정하는 증식항체의 측정법은 그 편이성 때문에 널리 이용되고 있으며 이러한 면역화학적 표지자로는 PCNA, PAA,²⁰ C5F10,²¹ Ki-67 등이 있다. PCNA는 특히 포르말린고정이나 파라핀 포매 후에도 정확하게 인식할 수 있으며,²² 다른 세포증식 측정법과 매우 좋은 일치도를 보이고 있다.²³

심근 세포 증식의 정량적 검색에 관한 최근의 연구결과들을 보면 표지자 지수나 단위 면적당의 세포핵의 수가 좌 우측 심실에서 차이가 없다는 주장²⁴이 있는가 하면 출생 후 초기에는 심근세포의 분열이 우심실보다 좌심실에서 더 많고 늦게까지 계속된다는 보고도 있다.²⁵ 본 연구에서의 재태기간에 따른 세포증식능의 변화를 보면 재태 13일에 비해 재태 14일에는 좌심실은 약간 감소하고 우심실은 증가하였으나 이후 재태 18일에 좌심실의 증식능이 약간 증가한 것을 제외하고는 재태 18일 까지 양측 심실 모두 꾸준히 감소하는 소견을 보였다. 이는 ³H-thymidine uptake법을 이용하여 재태 14일부터 측정된 생쥐의 후기 재태기간의 표지자 지수 변화 양상²⁴과 동일한 소견이었다. 출생후의 세포증식의 변화는 출생 5일에 약간 증가되기는 하나 전체적으로 서서히 감소하여 출생 21일에는 표지자 지수가 0.5%에 이른다²⁴고 한다.²⁴ 부위별로는 형태발생기인 재태 13~14일에는 세포증식능의 부위별 차이가 뚜렷하여 조밀심근층의 세포증식이 활발하였고 심근 재구성 시기인 재태 16~17일에는 각 부위별 세포증식이 비슷해졌다. 이러한 세포증식능의 부위별 차이를 종합해보면 출생전 심근세포의 분열은 우심실이 좌심실과 같은 시기에 세포증식을 시작하였으나 더 늦게까지 계속되는 것을 알 수 있고 심실 내에서는 조밀심근층보다 육주심근층에서 더 늦은 시기에 세포분열이 시작되어 늦게까지 계속됨을 알 수 있다. 이는 pump기능의 주 역할을 담당하는 조밀심근층이 많이 증식하고 먼저 성숙되는 것으로 생각할 수 있고 양측 심실의 역할과 기능을 고려해 볼 때 부합되는 소견이다. 즉 태자기때는 태반순환과 체순환의 관계에 의하여 우심실이 우세하며 박출량도 우심실이 좌심실보다 약 50%정도 많은데 이러한 기능을 수행하기 위해서는 우심실벽이 좌심실벽보다 성장을 많이 해야 하며 이를 위한 세포증식 또한 우심실이 많아야 하기 때문이다.²⁶ 이와는 반대로 출생 후 양측 심실의 성장 양상 차이를 유발하는 주 인자는 세포고사인 것으로 알려져 있는데 바이오틴화 dUTP를 이용한 DNA 분절을 측정하여 세포고사를 관찰한 연구²⁷에 따르면 출생 1일, 5일, 11일의 우심실의 세포고사는 좌심실에 비해 4.2배, 1.9배, 2.3배인 것으로 나타났다. 이는 세포고

사를 억제하는 것으로 알려진 bcl-2 mRNA level을 RT-PCR을 이용하여 측정함으로써 간접적으로도 증명되었다. 또한 BrdU uptake법을 이용한 세포 증식의 측정에서는 태생기에 비해 출생 후 현저히 감소하였으며 좌심실이 우심실보다 높았다. 위의 내용을 볼 때 태생기로부터 출생 후 순환체계의 전환에 있어서 심근세포수의 조절은 태생기 때는 세포 증식을 통하여, 출생 후에는 세포고사에 의하여 결정되며 이에 따라 양측 심실의 성장이 결정됨을 알 수 있고 이러한 변화는 혈액학적 변화에 의하여 자극될 것이 예상된다.²⁶

배자기 심근 세포의 발생에 관한 몇몇 연구에 따르면 근원섬유를 함유하는 세포는 더 이상 세포 분열을 하지 않는다고 한다. 발생 과정중의 심근층에서의 유사분열은 미분화 세포 군에만 제한됨을 제시한 연구⁶와 심근 세포 배양을 이용하여 광학 현미경상에서 관찰되는 근원섬유를 함유하는 세포에서는 유사분열상을 발견할 수 없다고 보고한 연구⁸가 그것이다. 이후 광학 현미경상 근원섬유가 보이는 배양된 쥐 심장세포에서도 유사분열을 관찰하였다고 보고되었고,⁷ 배양된 배자기 병아리 심장 세포에 잘 수축하는 분화된 세포를 함유하는 배자기 추출물을 첨가하였을 때 유사분열 비율이 증가하는 것을 보고 특정 상태에서는 미분화 세포 뿐 아니라 분화된 수축하는 세포도 세포분열을 할 수 있음을 제시한 연구⁹가 있다. 본 연구에서는 심근세포 증식의 부위별 차이 및 분포 양상이 α -MHC 및 β -MHC와 α -SMA, calponin 그리고 desmin을 심근세포성숙의 지표로 이용하여 관찰한 재태기간 및 부위에 따른 미성숙 심근세포의 분포²⁸와 일치하는 소견을 보였다.

세포고사는 형태적으로 염색질의 축합, 핵의 분절화, 세포질의 축합 및 분절화등을 통해 세포가 조각남으로써 apoptotic body를 형성하는 특징을 나타내는 세포죽음의 한 유형으로써,^{29,30} 병적이 아닌 생리적 과정일 뿐만 아니라 정상 발생에 중요하기 때문에 흔히 예정 혹은 생리적 세포 죽음 (programed or physiological cell death)이라 부른다. 예정 세포죽음은 프로그램 되어 있기 때문에 성장이나 분화만큼 발생에 중요한 개념이며,³¹ 정상 세포죽음의 분포에서 벗어난 기형의 유발과 관련되어 있다.^{32~34}

심장의 형태 발생에서 세포고사를 생각하는 단계는 대혈관 기시부 및 심실유출로 격막의 형성, 승모판-대동맥판 섬유성 연결 (mitral-aortic fibrous continuity)의 형성, 심근 육주 및 판막의 형성이다. 세포의 형태학적 특징과 생체 염색을 통하여 심장 대혈관 기시부와 심실유출로의 세포고사를 확인한 연구^{2,11,35}에 따르면 닭배자의 경우 Hamburger & Hamilton stage 25~26에서부터 누두동맥간 중격 (conotruncal ridge)에 세포고사가 미미하나 나타남과 원위부 동맥간 (truncus)이 분리되는 stage 27~28에는 원추부 (conus)의 심근층에 현저한 세포고사가 관찰되고 대동맥-폐동맥 격막 (aortopulmonary septum)에도 많은 세포고사가 관찰됨을 보고하였다.³⁵ 또한

DNA 분절화를 확인하는 TUNEL기법을 이용하여 누두부에서의 세포고사를 확인한 연구³⁶에 따르면 누두부는 재태 12일에 뚜렷해지며 대혈관으로의 분리는 재태 16일에 완료되고, 누두-동맥간 쿠션 (conotruncal(bulbar) cushions)에서의 세포고사 양성세포들은 재태 9일부터 재태 13일까지는 관찰되지 않으며 재태 14일부터 재태 16일 사이에 관찰되는 것으로 보고하였고 특히 재태 14일과 15일에 가장 많으며 현저하게 관찰된다고 하였다. 본 연구에서는 대혈관 기시부 및 심실유출로 격막에서 재태 13일에 이미 현저한 세포고사가 관찰되어 13.7%의 세포고사 지수를 보였으며 이는 심실유출로 격막의 형성에 세포고사가 중요한 역할을 함을 시사한다. 승모판-대동맥관 섬유성 연결 (mitral-aortic fibrous continuity)의 형성에 있어서는 좌측 심실유출로 부위 VIF의 근육층 흡수를 주장한 연구^{37,38}와 심장 내측면 (inner heart curve)으로 부터 기원한 조직의 소실에 의한 섬유성 조직의 형성을 제시한 연구^{39,40} 등이 있다. 본 연구에서는 승모판-대동맥관 연결부위와 승모판의 전엽부위에서 형태발생기 때부터 2.5%와 6.4%의 월등히 높은 세포고사지수를 보여 그 세포들의 기원은 밝힐 수 없었으나 승모판-대동맥관 섬유성 연결 (mitral-aortic fibrous continuity)의 형성에 세포고사가 관여함을 알 수 있었다. 심근 육주 및 판막의 형성에도 세포고사가 작용할 것이 예상되지만 이를 확인한 연구는 아직 없다. 본 연구결과에 따르면 재태 13일에서 17일 사이에 좌 우측 심실의 세포고사는 0.04%~0.42%로 비교적 일관되게 낮게 측정되었고 특히 육주심근층에서의 세포고사는 0.04%~0.07%로 거의 관찰되지 않았다. 따라서 육주형성에서 세포고사가 작용할 것이라는 예상은 배제할 수 있었다. 판막의 원시 심장관 이후의 심장의 발달은 심실 고리 (ventricular looping)와 중격형성의 과정을 통하여 다양한 혈관 연결 상태를 갖게 되는데 이 과정이 복잡하고 중요하며 여러 가지 심기형의 발생과 관련된다고 알려져 있다.⁴¹ 이러한 과정에 있어서 심실 고리의 형성은 형태발생의 시작이라 할 수 있으며 그 내측면 (inner heart curve)을 이루는 VIF부위는 그 구조적 형태를 생각해 볼 때 많은 세포고사가 있을 것으로 추정되나 이에 대한 연구는 찾을 수 없었다. 본 연구에서는 VIF 및 심실자부에서 세포고사가 0.6%~3.7%와 7.5%~8.6%로 일관되게 높게 관찰되어 좌우 방실판 형성 및 누두-심실 발달에서 세포고사가 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

결 론

심장의 형태 발생 과정에서 심근의 발육에는 발생단계 및 부위에 따라 세포증식능의 조절이 작용한다. 즉, 형태발생기인 재태 13~14일에는 육주심근층에 비해 조밀심근층의 세포증식이 월등히 높고 조밀심근층 내에서도 외측 조밀심근층의 세포증식이 내측에 비해 높

다. 심근 재구성 시기 중 재태 16일에는 외측 조밀심근층의 세포증식이 감소하여 각 부위별 세포증식이 비슷하며 재태 17~18일에는 외측 조밀심근층의 세포증식이 더욱 감소하여 육주심근층의 세포증식이 오히려 높다.

심근층 중에서 육주 심근층은 조밀 심근층보다 늦게 형성되고 그 형성기전은 이미 증식된 세포의 고사에 의한 것이 아니라 세포분열을 통한 증식에 의한 것이다. 또한 이러한 심장 발생과정 중의 심근세포의 분열은 미성숙 세포군에서 제한됨을 간접적으로 추정할 수 있다.

세포증식능과 더불어 세포고사가 심장 발생 과정에 관여하며 VIF 및 심실자부에서 세포고사가 일관되게 나타나는 사실은 좌우 방실판 형성 및 누두-심실 발달에서 세포고사가 중요한 역할을 하는 것을 시사한다. 승모판-대동맥관 섬유성 연결 (mitral-aortic fibrous continuity)의 형성에도 세포고사가 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있고 심장 대혈관 기시부와 심실유출로의 형태발생에 있어서의 세포고사를 확인할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Pexieder T. Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1975; 51: 6-100.
2. Okamoto N, Satow Y. Cell death in bulbar cushion of normal and abnormal developing heart. *Developmental and physiological correlations of cardiac muscle*. New York: Raven press, 1976; 51-66.
3. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* 1994; 90: 556-73.
4. Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-8.
5. 서정욱, 최정연, 서경필, 지제근. 심장의 정상 및 이상 발생. *대한흉부외과학회지* 1996; 29: 136-46.
6. Manasek FJ. Mitosis in developing cardiac muscle. *J Cell Biol* 1968; 37: 191-6.
7. Mark GE, Strasser FE. Pacemaker activity and mitosis in cultures of newborn rat heart ventricle cells. *Exp Cell Res* 1966; 44: 217-33.
8. Rumery RE, Rieke WO. DNA synthesis by cultured myocardial cells. *Anat Rec* 1967; 158: 501-7.
9. DeHaan R. Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Dev Biol* 1967; 16: 216-49.
10. Pexieder T. The tissue dynamics of heart morphogenesis. I. The phenomena of cell death. B. Topography. *Zeitsch Anat Entwicklungs* 1972; 138: 241-54.
11. Krstic R, Pexieder T. Ultrastructure of cell death in bulbar cushions of chick embryo heart. *Zeitsch Anat Entwicklungs* 1973; 140: 337-50.

12. Lemanski LF. Heart development in the Mexican salamander *Ambystoma mexicanum*. II. Ultrastructure. *Am J Anat* 1973; 136: 487-526.
13. Ojeda JL, Hurle JM. Cell death during the formation of the tubular heart of the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 33: 523-34.
14. Hendrix MJ, Morse DE. Atrial septation. I. Scanning electron microscopy in the chick. *Dev Biol* 1977; 57: 345-63.
15. Hurle JM, Lafarga M, Ojeda JL. Cytological and cytochemical studies of the necrotic area of the bulbus of the chick embryo heart : phagocytosis by developing myocardial cells. *J Embryol Exp Morphol* 1977; 41: 161-73.
16. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanism. *Anat Embryol* 1990; 181: 195-213.
17. Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation technique. *Lab Invest* 1994; 71: 219-25.
18. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
19. Anthony PP, MacSween RNM eds. *Histopathology*. Churchill Livingstone. 1992; 24-7.
20. Dubey DP, Staunton DE, Parekh AC, et al. Unique proliferation-associated marker expressed on activated and transformed human cells defined by monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78: 203-2.
21. Lloyd RV, Wilson BS, Vaarani J, et al. Immunocytochemical characterization of a monoclonal antibody that recognizes mitosing cells. *Am J Pathol* 1985; 121: 275-83.
22. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol* 1989; 134: 733-9.
23. Hall PA, Levinson DA, Woods AL, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin section: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasm. *J Pathol* 1990; 162: 285-94.
24. Cluzeaut F, Maurer-Schutze B. Proliferation of cardiomyocytes and interstitial cells in the cardiac muscle of the mouse during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Kinet* 1986; 19: 267-74.
25. Anversa P, Olivetti G, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia and binucleation of myocytes. *Circ Res* 1980; 46: 495-502.
26. Anderson PAW. The heart and development. *Semin Perinatol* 1996; 20: 482-509.
27. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, et al. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995; 219: 110-21.
28. Ya J, Markman MW, Wagenaar GT, Bloommaart PJ, Moorman AF, Lamers WH. Expression of the smooth-muscle actin and calponin, and of the intermediate filament protein desmin are parameters of cardiomyocyte maturation in the prenatal rat heart. *Anat Rec* 1997; 249: 495-505.
29. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication on tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
30. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
31. Saunders JW. Death in embryonic systems; death in cells in the usual accompaniment of embryonic growth and differentiation. *Science* 1966; 154: 604-12.
32. Hinchliffe JR, Ede DA. Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless(ws) chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1973; 30: 753-72.
33. Hinchliffe JR, Thorogood PV. Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid³ (ta³) mutant chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1974; 31: 747-60.
34. Scott W, Ritter E, Wilson J. Delayed appearance of ectodermal cell death as a mechanism of polydactyly induction. *J Embryol Exp Morphol* 1977; 42: 93-104.
35. Hurle JM, Ojeda JL. Cell death during the development of the truncus and conus of the chick embryo heart. *J Anat* 1979; 129: 427-39.
36. Kazuyo T, Zu-Xi Y, Toshio N, et al. Apoptosis and DNA fragmentation in the bulbus cordis of the developing rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 209-15.
37. Anderson RH, Wilkinson RA, Arnold R. Morphogenesis of bulboventricular malformations. I. Consideration of the embryogenesis in the normal heart. *Br Heart J* 1974; 36: 242-55.
38. Goor DA, Sische R, Lillehei CW. The conotruncus, I. Its normal inversion and conal absorption. *Circulation* 1972; 46: 375-84.
39. Rosequist GC, Clark EB, Sweeny LJ, McAllister HA. The normal spectrum of mitral and aortic valve discontinuity. *Circulation* 1976; 54: 298-301.
40. Lamers WL, Wessels A, Verbeek FJ, et al. New findings concerning ventricular septation in the human heart. Implications for maldevelopment. *Circulation* 1992; 86: 1194-205.
41. 서정욱, 지제근. 사람 심장의 발달에 관한 형태학적 연구(1): 사람 및 계 배아를 이용한 초기 심장발생 관찰. *대한병리학회지* 1989; 23: 187-97.