

Dexrazoxane과 Pentoxifylline의 Adriamycin 유발성심근증에 대한 예방 효과

서울대학교 의과대학 소아과학교실*, 병리학교실†

주 령* · 배은정* · 하일수* · 서정욱† · 노정일* · 최정연* · 윤용수*

The Preventive Effect of Dexrazoxane and Pentoxifylline on Adriamycin Induced Cardiomyopathy

Zhu Ling, M.D.*, Eun-Jung Bae, M.D.*, Il-Soo Ha, M.D.*, Jung-Wook Seo, M.D.†
Chung-II Noh, M.D.*, Jung-Yun Choi, M.D.* and Yong-Soo Yun, M.D.*

Department of Pediatrics*, Department of Pathology†
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : We hypothesized dexrazoxane(DXR) and pentoxifylline(PTX) may prevent myocardial damage in adriamycin(ADR)-induced cardiomyopathic rat model. We also investigated their effects on the myocardial apoptosis and fibrosis in ADR induced cardiomyopathy.

Methods : The six-week old female Spregue-Dawley rats were divided into control group(CNT, n=4), ADR group(n=6), ADR+DXR group(DXR, n=5), ADR+PTX group(PTX, n=6), ADR+DXR+PTX group(DXPT, n=5). ADR(5 mg/week, twice) was administrated intravenously to rats except CNT group to induce cardiomyopathy. The PTX(50 mg/kg/day) was administered daily from day-0 to Day-21. The DXR(100 mg/kg) was administered 30 minutes before each ADR injection. On day 21, the rats were sacrificed and the degree of histopathologic changes of hypercontraction band necrosis, cytoplasmic vacuolar change and fibrosis were scored. Immunohistochemical staining for Bcl-2 expression and RT-PCR for TNF- α and CTGF were performed.

Results : Histopathological scores of myocardial damage were significantly higher in ADR rats than CNT rats($P<0.05$), and significantly lower in DXPT rats than ADR rats($P<0.01$). Myocardial fibrosis was prevented in both PTX rats and DXPT rats. The expression of Bcl-2 was weaker in ADR rats than that in CNT rats($P<0.05$), and stronger in both DXR and DXPT rats than that in ADR rats ($P<0.05$). TNF- α concentration of ADR rats was not different from that of treated groups.

Conclusion : DXR prevented myocyte apoptosis with increased Bcl-2 expression, and PTX prevented myocardial fibrosis in ADR induced cardiomyopathic rats. The combination therapy of DXR and PTX showed prevention of cardiomyopathy in ADR induced cardiomyopathy rat model. (**Korean J Pediatr** 2005;48:1378-1384)

Key Words : Adriamycin, Cardiomyopathy, Dexrazoxane, Pentoxifylline, Fibrosis

서 론

Anthracycline 계의 항생제인 adriamycin(ADR)은 DNA 염기서열에 삽입하여 DNA와 RNA 합성을 막는 기전으로 백혈병

본 논문은 2003년 남양학술상 연구비 지원받았음.

본 논문은 2004년 제54차 대한소아과학회 추계학술대회에서 발표되었음.

접수 : 2005년 3월 11일, 승인 : 2005년 8월 3일

책임저자 : 배은정, 서울대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Eun-Jung Bae, M.D.

Tel : 02)2072-3097 Fax : 02)743-3455

E-mail : eunjbae@plaza.snu.ac.kr

과 고형 종양에서 치료 효과가 매우 우수한 항암제이다. 그러나 장기간 사용할 때에 발생하는 치명적인 급·만성 심독성으로 인해 치료 기간이 제한 받게 되어 그 임상적 유용성에 한계를 가지고 있다¹⁾. ADR의 축적으로 인한 돌이킬 수 없는 심근 세포의 손상은 확장성심근증을 일으키고 치명적인 울혈성심부전을 초래하는 경우도 있다. 이러한 심독성의 병태 생리학적 기전으로는 유리산화기의 생성에 의한 세포자멸사가 주된 발생 기전으로 생각되²⁾ 지금까지 심근 조직의 세포자멸사의 기전은 확실하지 않다.

ADR으로 인한 심독성을 예방하는 약제의 선정에 관한 연구도

대부분 유리산화기를 위주로 진행이 되고 있으나 심독성을 예방할 수 있다고 알려져 있는 약제로는 dexrazoxane(DXR)이 유일하다. DXR이 ADR 유발성심근증을 예방 혹은 경감시키는 기전으로는 DXR이 iron chelator로서 ADR과 Fe의 복합체의 생성을 막음으로써 이 과정에 생성되는 유리산화기를 줄여서 이로 인한 심근세포의 자멸을 억제시킨다고 한다²⁻⁴⁾. 그러나 최근 실험 쥐에 단일 용량의 ADR과 DXR을 투여한 뒤, 세포자멸사의 지표인 Bax와 Bcl-2를 관찰한 결과 어린 연령의 쥐에서는 DXR은 ADR 유발성심근증에 예방 효과가 없었다고 보고되어⁵⁾ 소아 연령에서는 이 약제의 효과에 대해 다시 의문이 생기게 되었다.

또한 pentoxifylline(PTX)은 비선택적 phosphodiesterase (PDE) 억제제로 혈액의 점성을 떨어뜨리고 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성을 억제하며 중성구의 활성을 억제하는 효과가 있다. 심혈관계에서 PTX은 TNF- α 의 생성을 억제하여 심근 세포의 자멸사를 억제하므로 울혈성심부전증에 효과가 있다고 보고된 바가 있다⁶⁻⁹⁾. 또한 PDE 억제제로 세포내의 cAMP 분해를 억제하여 cAMP의 농도를 증가시키므로 transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)로 인한 connective tissue growth factor(CTGF)의 발현증가를 억제하여 섬유화 과정을 억제하는 효과를 보일 가능성이 있다¹⁰⁾. 그러나 ADR 심근증에 대한 PTX의 효과는 아직 보고된 바 없다.

본 연구는 ADR 유발성심근증 쥐 모델에서 PTX와 DXR를 단독 그리고 병용 투여하여 그들의 심근증 억제 효과를 확인 비교하고 이에 동반되는 세포자멸사, 섬유화의 변화를 분석함으로써 그 병태 생리학적인 기전을 알아보려 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 대상 및 방법

총 26마리의 Spregue-Dawley 암컷 쥐(213 \pm 7.64 g, 6주) (Orient, Korea)를 무작위로 정상대조군(n=4), 질환대조군(n=6), DXR군(n=5), PTX군(n=6), 병용치료군(n=5)으로 나누고 정상대조군을 제외한 군에 1주 한번씩 2회 ADR(5 mg/kg)(Dong A-Pharma, Seoul, Korea)을 주사용 증류수에 희석하여 미정맥으로 투여하여 심근증을 유발하였다. DXR군은 DXR 100 mg/kg (Chiron, CF, France)을 주사용 생리 식염수에 희석하여 ADR 투여 30분 전에 미정맥으로 투여하였고 PTX군은 PTX 50 mg/kg(Handok-Aventis, Seoul, Korea)을 증류수에 희석하여 매일 일정한 시간에 gavage tube로 3주간 경구투여하였다. 병용치료군은 두 가지 약제를 함께 위와 같은 방법으로 투여하였으며 대조군에는 생리 식염수만을 투여하였다.

2. 도살 및 검체 획득

3주 후 쥐를 ether로 깊이 마취한 뒤 복부와 늑골을 열고 완전한 심-폐정지가 오기 전에 전체 심장을 적출하였다. 좌심실벽의 일부를 10% 포르말린용액에 고정하고 좌심실의 나머지 조

직은 두 부분으로 나누어 RNA 추출과 ELISA에 이용하였다.

3. 광학현미경 검사

10% 포르말린 용액에 고정한 조직을 파라핀에 포매한 뒤 5 μ m의 두께로 절편하고 hematoxylin-eosin과 Masson trichrome으로 염색하였다. 심근세포의 손상 정도의 판정은 과수축 밴드 괴사(hypercontraction band necrosis)와 세포질의 공포형성으로 하였고 현미경하 400배율에서 10개의 시야를 임의로 선정하고 아래와 같은 점수제에 따라 반정량법으로 비교하였다. 심근조직의 섬유화 정도 판정도 마찬가지로 점수제로 하였다. 각각의 손상 및 섬유화 변화에 대한 점수는 다음과 같다. ① 과수축 밴드 괴사: 0-없음, 1-보일 듯 말듯함, 2-출혈을 동반하지 않은 과수축 밴드 괴사, 3-출혈을 동반한 과수축 밴드 괴사. ② 세포질의 공포형성: 0-없음, 1-보일 듯 말듯함, 2-미소한 공포형성, 3-큰 공포형성. ③ 섬유화 정도: 0-없음, 1-보일 듯 말듯함, 2-심근세포의 괴사를 동반하지 않은 섬유화, 3-심근세포의 괴사를 동반한 섬유화.

4. Bcl-2 면역조직학적 염색

파라핀에 포매한 조직을 약 5 μ m의 두께로 절편하고 순차적 농도의 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 그리고 조직 내의 항원 추출을 위해서 citrate buffer(DAKO, Carpinteria, CA, USA)에 슬라이드를 담근 후 15분 정도 가열하였다. 다음 3% 과산화수소로 상온에서 10분간 처리하여 내재적 peroxidase를 차단하고 염소 혈청을 상온에서 20분간 반응시켜 비특이적 반응을 차단하였다. 순서대로 일차항체 anti-Bcl-2 monoclonal antibody (BD Biosciences, Clontech, CA, USA)를 phosphate buffered saline(PBS)에 1:150으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 이차항체 biotin-conjugated goat anti-mouse IgG(DAKO, Carpinteria, CA, USA)와 반응시키고 streptavidin-HRP를 처리한 후 NOVARED로 1차 염색하고 대조염색은 Hematoxylin으로 하였다. 매 단계 사이에 3차 증류수 혹은 PBS로 씻어주고 마지막에 permanent mounting medium(VECTOR, Burlingame, CA, USA)로 mounting을 하였다. Bcl-2 발현의 정도 판정은 칼라 영상 분석기를 이용하였다. 400 배율에서 10개의 시야를 임의로 선정하고 점수를 정하여 반정량법으로 비교하였다. 점수 판정은 아래와 같이 하였다. 0-염색이 되지 않음, 1-조금 염색이 됨, 2-중등도로 염색이 됨, 3-많이 염색이 됨¹¹⁾.

5. 역전사 종합효소 연쇄반응(RT-PCR)

좌심실 조직을 얼음판 위에서 면도날을 이용하여 1 mm³ 미만으로 작게 다지고 TRIZOL reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 1 μ g으로 RT-for-PCR kit(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 역전사하였다. 우선 CTGF, TNF- α , glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 각 signal gene에 특이한 시발체(primer set)를 Table 1과 같이 제작하였다. PCR tube에 5 \times

Table 1. Sequence of Primers Used for Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

GAPDH	Sense	5'-ACGACCCCTTCATTGACCTCAACTA-3'
	Antisense	5'-TGGTGAAGACGCCAGTAGAC-3'
CTGF	Sense	5'-ATCCCTGCGACCCACACAAG-3'
	Antisense	5'-CAACTGCTTTGGAAGGACTCGC-3'
TNF- α	Sense	5'-GCAGCTGGAGTGGCTGAGCC-3'
	Antisense	5'-GCAATGACTCCAAAGTAGACCTGC-3'

Abbreviations : GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; CTGF, connective tissue growth factor; TNF- α , tumor necrosis factor- α

Table 2. Conditions of Polymerase Chain Reaction for Each Gene

	Denaturation		Annealing		Elongation		Cycle number	Target size
	Temperature(°C)	Time(sec)	Temperature(°C)	Time(sec)	Temperature(°C)	Time(sec)		
GAPDH	94	30	70	30	72	30s	35	210 bp
CTGF	94	30	65	30	72	30s	35	145 bp
TNF- α	94	30	70	60	72	30s	35	393 bp

Abbreviations : GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; CTGF, connective tissue growth factor; TNF- α , tumor necrosis factor- α

PCR buffer 5 μ L dNTP 4 μ L, MgCl₂, 각각의 시발체를 넣고 증류수를 가하여 50 μ L를 만든 후 Taq bead(Promega, Madison, WI, USA)를 tube 당 1개씩 넣고 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elimer, Germany)을 이용하여 PCR 하였다. 각각의 PCR 조건은 Table 2와 같다. 다음 1.5% agarose 젤에서 전기영동법으로 분리하고 ethidium bromide로 염색한 뒤 densitometer(Bio-ID software, Vilberlourmat, USA)를 이용하여 정량하였으며 GAPDH band로 표준화하였다.

6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

1 mm³ 미만으로 작게 다진 좌심실 조직을 멸균한 생리 식염수로 3회 세척한 후 serum free RPMI(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)에 37°C에서 48시간 동안 배양하고 배양액을 회수한 후 상층액 만들 거두어 TNF- α ELISA kit(R&D systems)을 이용하여 정량하였다. Micro-BCA protein assay kit (Pierce Biotech, IL, USA)를 이용하여 총 단백량을 정량하였고 측정 결과를 이용하여 각각의 총 단백질과의 비율을 계산하여 비교하였다.

7. 통계 분석

실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS for Windows 12.0을 이용하여 Mann-Whitney U test로 분석하고 5%의 유의수준으로 검증하였다.

결 과

1. 광학현미경 소견상 심근증과 섬유화 정도의 평가

Hematoxylin-eosin 염색을 하여 심근증의 소견을 관찰하였

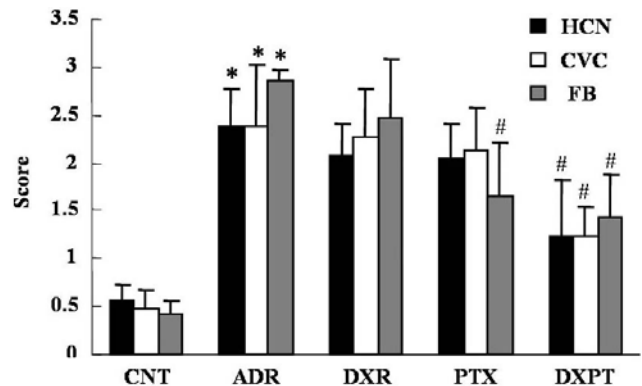


Fig. 1. Pathological scoring of left ventricular myocardial damage in each group. Values are presented as the mean±SD, *Indicates significant difference with CNT($P<0.05$). #Indicates significant difference with ADR group($P<0.05$). The pathological scores decreased in combination group(DXPT group) than those in adriamycin group(ADR group). Myocardial fibrosis was also less prominent in PTX group. Hematoxylin & eosin and Masson trichrome staining(Abbreviations : HCN, hypercontraction band necrosis; CVC, cytoplasmic vacuolar change; FB, fibrosis; CNT, normal control group; ADR, Adriamycin-induced cardiomyopathy disease control group; DXR, dexrazoxane treated disease group; PTX, pentoxifylline treated disease group; DXPT, disease group with combination therapy of dexrazoxane and pentoxifylline).

다. 과수축 밴드 괴사 점수는 정상대조군에서 0.55±0.19, 질환대조군에서 2.38±0.39, DXR군에서 2.06±0.34, PTX군에서 2.05±0.36, 병용치료군에서 1.24±0.59로 질환대조군은 정상대조군에 비해 의미 있는 증가를 보여주었고 병용치료군에서 뚜렷한 감소를 보여주었다($P<0.05$). 세포질의 공포형성의 점수는 정상대조군에서 0.47±0.21, 질환대조군에서 2.38±0.64, DXR군에서 2.26±0.52, PTX군에서 2.13±0.45, 병용치료군에서 1.24±0.29로 질

환대조군 역시 정상대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보여주었고 병용치료군에서 의미 있는 감소를 보여주었다($P<0.05$) (Fig. 1, 2). 섬유화 점수는 정상대조군에서 0.42 ± 0.15 , 질환대조군에서 2.86 ± 0.10 , DXR군에서 2.45 ± 0.62 , PTX군에서 1.66 ± 0.55 , 병용치료군에서 1.42 ± 0.45 로 질환대조군에서 유의하게 증가되었고 PTX군과 병용치료군에서 의미 있는 감소를 보였다($P<0.05$)(Fig. 1, 3).

2. Bcl-2의 발현정도

면역조직화학적 염색에 의한 각 군의 심근 조직에서의 Bcl-2 발현은 정상대조군에서 2.70 ± 0.25 , 질환대조군에서 0.93 ± 0.59 , DXR군에서 2.25 ± 0.27 , PTX군에서 1.22 ± 0.26 , 병용치료군에서 2.38 ± 0.47 로 질환대조군에서 발현의 유의한 감소를 보였고 DXR군과 병용치료군에서 의미 있는 발현의 증가를 보였다($P<0.05$)(Fig. 4).

3. TNF- α 의 양과 TNF- α mRNA의 발현

심근조직의 조건배지에서 ELISA로 측정된 TNF- α 를 총 단백질량으로 보정한 값은 정상대조군에서 10.73 ± 5.69 pg/mg이었고 질환대조군에서 23.42 ± 11.01 pg/mg로 증가되었으나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며 세 치료군에서 발현의 감소는 보이지 않았다. 심근조직에서의 TNF- α mRNA 발현 역시 정상대조군에서 0.65 ± 0.08 , 질환대조군에서 0.62 ± 0.08 , DXR군에서 0.75 ± 0.05 , PTX군에서 0.81 ± 0.06 , 병용치료군에서 0.64 ± 0.16 로 각 군간에 통계적인 차이는 없었다.

4. CTGF mRNA의 발현

CTGF mRNA 발현은 정상대조군에서 0.95 ± 0.10 이었고 질환대조군에서 1.11 ± 0.25 로 증가하는 양상을 보였으며 병용치료군에서 1.00 ± 0.10 로 감소하였지만 각 군에서 통계적인 차이는 보

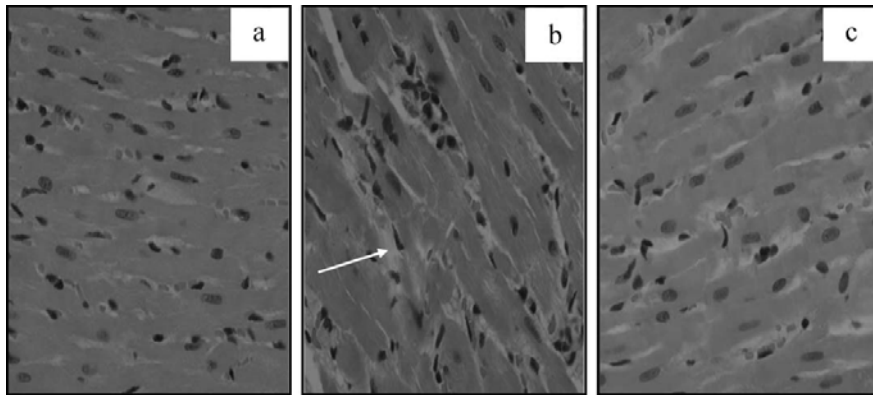


Fig. 2. Photomicrographs of left ventricular myocardium stained by Hematoxylin & Eosin. (a) CNT group (b) ADR group (c) DXPT group. There was marked hypercontraction band necrosis and cytoplasmic vacuolar change(white arrow) in ADR rats than CNT rats. Both pathologic findings were not prominent in DXPT rats(c). Original magnification $\times 400$. The same abbreviations as Fig. 1.

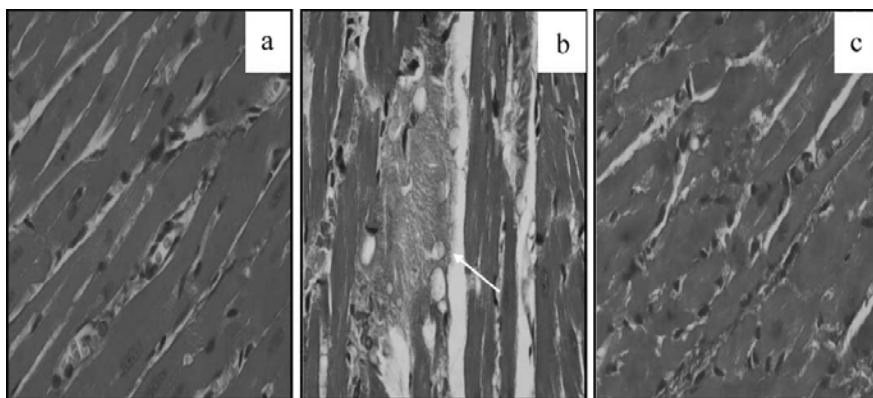


Fig. 3. Photomicrographs of left ventricular myocardium with Masson Trichrome staining. (a) CNT group (b) ADR group (c) DXPT group. Markedly increased interstitial fibrosis(white arrow in figure 3b) is shown in ADR rats than CNT rats. And the interstitial fibrosis is less prominent in DXPT rats than that in ADR rats. Original magnification $\times 400$. The same abbreviations as Fig. 1.

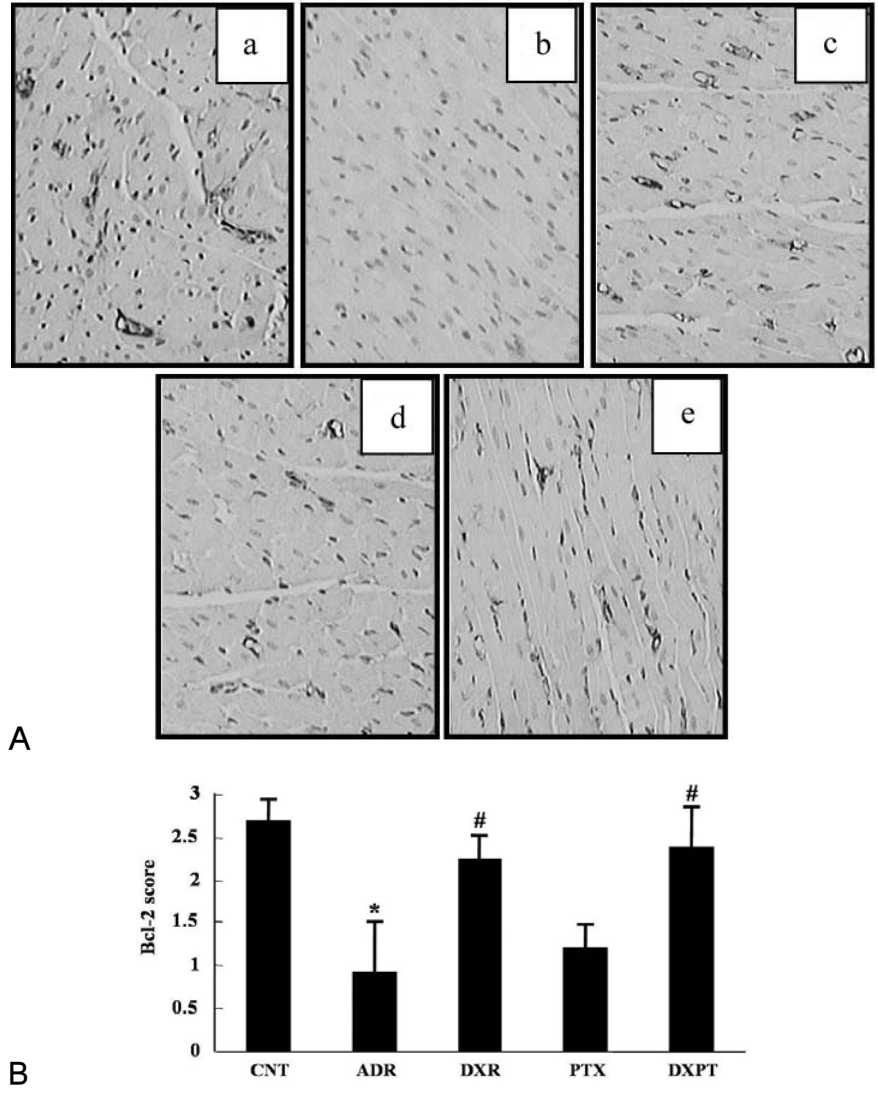


Fig. 4. Bcl-2 expression of each groups. **(A)** Photomicrographs of immunohistochemical staining for Bcl-2(upper panel, original magnification $\times 100$) in the rat hearts. **(B)** Semiquantitative analysis of bcl-2 expression in each groups(lower panel). (a) CNT rats (b) ADR rats (c) DXR rats (d) PTX rats (e) DXPT rats. The Bcl2 expression was diminished significantly in ADR group and improved in DXR and DXPT group. *Significant difference from CNT $P < 0.05$; #Significant difference from ADR $P < 0.05$. The same abbreviations as Fig. 1.

이지 않았다.

고 찰

ADR에 의한 심독성의 기전은 명확하지는 않으나 일부 실험에서 ADR이 효소 또는 철에 의해 촉매 되어 화학적 환원반응을 통해 유리산화기를 생성하여 심근세포의 자멸사를 일으킨다고 알려져 있다²⁾. 하지만 심근세포의 자멸사 후의 섬유화 과정에 관한 연구는 보고된 바가 없었다. 본 연구에서는 ADR 유발성심근증에서 세포자멸사와 섬유화를 확인하였고 DXR과 PTX

의 심근증 예방 효과 및 이에 연관된 기전을 규명하고자 하였다.

우선 ADR 유발성심근증에서 심근 손상을 확인하기 위해 Hematoxylin-Eosin 염색을 해서 광학현미경으로 형태학적 분석을 시행하였다. 그 결과 질환대조군은 정상대조군에 비해 유의한 과수축 밴드 괴사와 세포질의 공포형성을 보여주고 있어서 심근증에 합당한 병리학적 변화를 확인 할 수 있었다. Bcl-2는 미토콘드리아를 경유하여 Caspase 9을 활성화시키는 과정에서 억제작용을 하여 세포자멸사 과정을 약화시키는 단백질로 세포자멸사를 확인하는 하나의 지표이다¹²⁾. 보고된 연구에 의하면 ADR 유발성심근증에서도 Bcl-2의 발현은 감소된다고 한다¹³⁾. 본 연구

에서 면역 조직학적 염색으로 Bcl-2를 관찰 비교한 결과 질환대조군에서 유의한 Bcl-2 발현의 감소를 보여주는 것으로 보아 ADR 유발성심근증의 발병과정에 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다. 한편 TNF- α 는 염증반응, 세포의 성장과 죽음 등에서 그 역할이 널리 알려져 있는 cytokine으로 최근 연구에 의하면 특발성 확장성심근증, 심근염 환자와 ADR 유발성 심 질환에서 혈장 속의 TNF- α 는 질환군에서 유의한 증가를 보였고 아울러 PDE-4 inhibitor인 rolipram은 혈장내의 TNF- α 를 억제하는 기전으로 ADR 유발성심근증에 예방작용이 있다고 보고된 바 있다¹⁴⁻¹⁷. 본 연구에서 심근조직의 TNF- α mRNA와 단백질의 발현은 질환대조군에서 의미 있는 증가를 보여주지 않아 위의 보고와 일치하지는 않았지만, 최근 ADR 유발성심근증에서 심근조직의 TNF- α mRNA와 단백질의 발현은 증가되지 않는다는 다른 보고가 발표된 바 있다¹⁸. 저자들은 이번 연구에서 ADR 유발성심근증의 심근세포의 자멸사는 TNF- α 의 발현과 무관하게 진행이 됨을 관찰하였고 앞으로 이에 연관된 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다.

DXR은 iron chelator로서 ADR과 철의 복합체의 생성을 억제하는 기전으로 심근세포의 자멸사를 경감시킨다고 보고되었으나 아직 소아에서는 임상적 사용경험이 없다. 면역 조직학적 염색에서 Bcl-2의 발현을 관찰한 결과 ADR 투여로 인한 Bcl-2의 발현 저하는 DXR군과 병용투여군에서 의미 있게 완화되었고 또한 병용치료군은 정상에 가까운 병리학적 소견을 보여 DXR이 심근세포의 자멸사를 억제하는 약리학적 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 하지만 어린 연령의 암컷 쥐에서 심근조직에서 세포자멸사의 지표인 Bcl-2와 Bax의 발현을 관찰한 결과 DXR은 ADR으로 인한 심독성을 약화시키는 작용이 없었다는 보고가 있어⁹ DXR의 작용은 아직도 논란의 여지가 있다고 본다.

섬유화 정도의 판정을 위한 Masson-Trichrome 염색에서 질환대조군은 의미 있는 심근 섬유화의 진행을 나타냈고 PTX군과 병용치료군에서 유의한 감소를 보여주었다. 이러한 소견으로 PTX가 특히 심근 섬유화를 억제하는데 큰 기여를 한 것으로 볼 수 있었다.

PTX는 비선택적 phosphodiesterase 억제제로 혈액의 점성을 떨어뜨리고 TNF- α 의 생성을 억제하고 중성구의 활성화를 억제하는 기전으로 임상에서 말초혈관질환에 널리 쓰이고 있다. 또 세포내의 cAMP를 증가하는 기전을 가지고 있고 최근 연구에 의하면 cAMP는 섬유화 과정에 기여하는 TGF- β 1이 심근조직에서의 CTGF의 발현을 증가시키는 과정에 억제작용을 한다고 한다^{10, 19}.

본 연구에서는 PTX가 세포내의 cAMP를 증가하여 TGF- β 1이 CTGF의 발현을 증가시키는 과정에서 억제작용을 할 가능성이 있으므로 심근조직의 섬유화 과정을 약화시키는 작용을 할 수 있다고 가설을 세웠으며 이와 함께 PTX가 TNF- α 의 생성을 억제하는 기전으로 심근세포의 자멸사를 억제하여 ADR 유발성심근증에 예방효과가 있으리라고 추정하였다. 연구 결과에

서 보면 PTX군과 병용투여군에서 현저한 섬유화 억제를 증명할 수 있었고 통계적으로 유의한 차이는 보여주지 않았지만 CTGF의 감소 또한 앞에 제시한 가설을 지지해주었다. 또 PTX군에서 세포자멸사의 지표인 Bcl-2의 발현은 유의한 증가를 나타내지 않았고, TNF- α 발현 역시 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 이는 PTX는 ADR 유발성심근증에서 TNF- α 를 통한 세포자멸사 억제기전은 미미한 반면, 주로 섬유화 억제 기전으로 ADR 유발성심근증에 예방 및 치료를 보인다는 것을 알 수 있다.

결론적으로 DXR과 PTX를 함께 투여하였을 경우 DXR은 Bcl-2의 발현을 증가하는 것으로 심근세포의 자멸사를 억제하고 PTX는 심근조직의 섬유화 과정을 억제하여 병용치료군에서 최대의 효과를 보여 병리학적 소견 상 거의 정상대조군에 가까운 유의한 호전 양상을 보여주었다. 본 연구는 향후 ADR 유발성심근증에 또 하나의 가능한 예방 약제를 제시했고 DXR과 PTX를 병용 투여하였을 경우 최대의 효과를 볼 수 있다는 가능성을 제시하였다. 하지만 개체수가 작아 CTGF의 변화는 규명하기 곤란하였기에 향후 개체 수를 증가시켜 CTGF와 TGF- β 1 변화를 확인해 볼 필요가 있겠다. 본 연구는 ADR 유발성심근증에서 PTX의 예방 및 치료 효과에 관한 최초의 연구이므로 그 작용 기전에 관한 더 많은 실험적 연구와, 임상적 연구를 필요로 한다고 사료된다.

요 약

목적 : ADR 유발성심근증 생쥐 모델에서 PTX와 DXR의 심근증에 대한 예방 및 치료 효과를 알아보고자 하였다.

방법 : 생후 6주된 Sprague-Dawley rat를 정상대조군(n=4), 질환대조군(n=6), DXR군(n=5), PTX군(n=6), 병용치료군(n=5)으로 나누고 정상 대조군을 제외한 4군에 ADR(5 mg/kg)을 1주 간격으로 2회 미정맥으로 투여하여 심근증을 유발하였다. DXR군은 매 ADR 투여 30분 전에 DXR(100 mg/kg)을 미정맥으로 주사하였다. PTX군은 3주간 매일 PTX(50 mg/kg/day)을 경구투여하였다. 5군 모두 3주 뒤에 희생시켜 좌심실 조직의 광학현미경적소견을 관찰하여 심근증의 정도를 분석하였다. 면역조직학적 염색을 통해 Bcl-2 발현의 변화를 조사하였고 TNF- α 와 CTGF에 대한 RT-PCR을 시행하였다.

결과 : 광학현미경 소견상 세포질의 공포형성과 과수축 밴드 피사 그리고 섬유화는 정상대조군에 비해 질환대조군에서 유의하게 증가하였고 병용치료군에서 감소하였다($P<0.01$). 심근 섬유화는 PTX군과 병용치료군에서 ADR군에 비해 유의하게 감소하였다. Bcl-2의 발현은 질환대조군에서 낮았으며 DXR군과 병용치료군에서 질환대조군에 비해 Bcl-2의 발현이 증가하여 호전되었다($P<0.05$). TNF- α 는 mRNA와 단백질의 발현상 정상대조군과 질환대조군에서 차이가 없었다.

결론 : ADR 유발성심근증에 DXR과 PTX를 함께 투여하였

을 경우 DXR은 bcl-2의 발현을 증가시키고 심근세포의 자멸사를 억제하였고 PTX는 심근 섬유화를 억제하였다. 그리고 ADR과 PTX를 병용 투여하였을 경우 최대의 심근증 예방 효과를 볼 수 있었다.

References

- 1) Grenier MA, Lipshultz SE. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol* 1998;25(4 Suppl):72S-85S.
- 2) Robert TD. Cytoprotective agents for antracyclines. *Semin Oncol* 1996;23:23-34.
- 3) Herman EH, Zhang J, Rifai N, Lipshultz SE, Hasinoff BB, Chadwick DP, et al. The use of serum levels of cardiac troponin T to compare the protective activity of Dexrazoxane against doxorubicin and mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48:297-304.
- 4) Della TP, Mazue G, Podesta A, Moneta D, Sammartini U, Imondi AR. Protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in weanling rats by Dexrazoxane. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:151-6.
- 5) Heon S, Bernier M, Servant N, Dostanic S, Wang C, Kirby GM, et al. Dexrazoxane does not protect against Doxorubicin-induced damage in the young rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:499-506.
- 6) Dousa TP. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 1999;55:29-62.
- 7) Takehana H, Inomata T, Niwano H, Nishii M, Matsuda C, Kohno K, et al. Immunomodulatory effect of pentoxifylline in suppressing experimental autoimmune myocarditis. *Circ J* 2002;66:499-504.
- 8) Us MH, Ozkan S, Ogus T, Acar HV, Ege T, Cakir O, et al. Efficacy of topically applied glutamate-aspartate and solutions in decreasing myocardial damage during open-heart surgery in rats. *J Int Med Res* 2001;29:497-502.
- 9) Sliwa K, Woodiwiss A, Candy G, Badenhorst D, Libhaber C, Norton G, et al. Effects of pentoxifylline on cytokine profiles and left ventricular performance in patients with decompensated congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2002;90:1118-22.
- 10) Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1805-19.
- 11) Chana JS, Wilson GD, Cree IA, Alexander RA, Myatt N, Neale M, et al. C-myc, p53, and Bcl-2 expression and clinical outcome in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:110-4.
- 12) Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000;301:19-31.
- 13) Park CS, Youn HJ, Cho EJ, Oh YS, Baek SH, Lee JH, et al. Cardioprotective effect of IGF-1 in mouse with ADR induced cardiomyopathy. *Korean Circulation J* 2002;32:1116-23.
- 14) Gluck B, Schmidtke M, Merkle I, Stelzner A, Gemsa D. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1615-26.
- 15) Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994;72:561-6.
- 16) Usta Y, Ismailoglu UB, Bakaloglu A, Orhan D, Besbas N, Sahin-Erdemli I, et al. Effects of PTX in ADR-induced renal disease in rats. *Pediatr Nephrol* 2004;19:840-3.
- 17) Mohamed HE, Asker ME, Ali SI, El-Fattah TM. Protection against doxorubicin cardiomyopathy in rats: role of phosphodiesterase inhibitors type 4. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56:757-68.
- 18) Lou H, Danelisen I, Singal PK. Cytokines are not upregulated in ADR-induced cardiomyopathy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:683-90.
- 19) Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor- β in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-58.