creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

H9c2 심근세포에서 doxorubicin에 의해 유발된 세포자멸사에 대한 clusterin의 보호 효과

Protective effect of clusterin from doxorubicin induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes

2013년 2월

서울대학교 대학원

의학과 소아과학 전공

이 정 하

H9c2 심근세포에서 doxorubicin에 의해 유발된 세포자멸사에 대한 clusterin의 보호 효과

지도교수 노 정 일

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2012년 10월

서울대학교 대학원

의학과 소아과학 전공

이 정 하

이정하의 의학박사 학위논문을 인준함

2012년 12월

위 원 장 (인)

부위원장 (인)

위 원 (인)

위 원 (인)

위 원 (인)

Protective effect of clusterin from doxorubicin induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes

by

Jung Ha Lee

Directed by Prof. Chung Il Noh

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Medicine (Major in Pediatrics) in the Seoul National University, Seoul, Korea

December 2012

Doctoral Committee:

Professor _____ **Chairman**

Professor _____ **Vice Chairman**

Professor _____

Professor _____

Professor _____

초 록

서론: Doxorubicin(DOX)은 혈액암과 고형암의 치료에 근간이 되는 유용한 항암제이지만, 비가역적인 심근 독성으로 인해 사용이 제한되고 있다. Clusterin은 다양한 조직과 체액에서 발현되는 당단백질로서, 다양한 생리적 및 병적 스트레스 상황에서 세포를 보호하는 chaperone 역할을 수행한다. 본 연구는 백서의 심실조직과 H9c2 심근세포에서 DOX의 투여에 의해 clusterin의 발현이 상향조절 되는지 확인하고, clusterin이 DOX에 의해 초래되는 세포자멸사에 보호효과를 나타내는지 알아보기 위해 시행되었다.

방법: H9c2 심근세포에 DOX을 처치한 뒤 clusterin 발현의 변화를 western blot 분석을 통해 측정하였다. Clusterin이 세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 H9c2세포에 pcDNA3/hCLU를 유전자핵내주입하여 clusterin을 과발현시키는 H9c2/hCLU 심근세포를 제작하였다. H9c2/hCLU 심근세포와 H9c2 심근세포에 DOX을 처치하고, 두 군간의 세포생존율의 차이를 trypan blue 염색과 DAPI 염색을 통해 비교하였다. DOX을 처치한 두 세포군간에 세포자멸사의 공통경로인 cleaved casepase-3의 활성을 western blot 분석을 통해 측정하여 비교하였다. 8주령의 Spargue-Dawley 백서(30.7±2.7g)에게 DOX(2.5mg/kg, 실험군)과 식염수(대조군)를 각각 3일간격으로 18일간 복강 내로 주입하여 심근증을 유발하고, 23일째에 희생시켰다. 백서의 심장조직에 대해 hematoxylin-eosin 염색, Masson's trichrome 염색을 시행하고, 심장 조직의 세포자멸사를

관찰하기 위해 TUNEL 분석과 caspase-3에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역조직화학염색 및 면역형광염색을 통해 두 군의 심장조직에서 clusterin의 발현양상에 차이가 나타나는지 관찰하였다.

결과: H9c2 심근세포에 DOX을 처치하였더니 세포 lysate와 세포농축액 내에 clusterin의 발현이 증가하였다. 두 군에 DOX을 투여하고 trypan blue 염색을 시행하였더니 H9c2/hCLU 심근세포는 H9c2세포에 비해 DOX의 투여에 대해 세포 생존율이 유의하게 향상되었다(58.3±10.4% vs 78.4 ±1.23%, P<0.003). DAPI 염색에서 H9c2/hCLU 심근세포는 H9c2 심근세포에 비해 DOX에 의한 염색질의 분절과 세포핵의 응축 소견이 감소하였다. Western blot 분석에서 clusterin이 과발현 된 H9c2/hCLU 심근세포는 DOX 투여에 의한 caspase-3 활성이 H9c2 심근세포에 비해 감소되었다. 백서에게 DOX을 투여하면 백서의 심실근육세포의 세포질 내에 clusterin이 발현되는 것이 면역조직화학염색을 통해 확인되었다.

결론: DOX에 의한 손상자극에 대해 H9c2 심근세포와 백서의 심실근육세포는 세포질 내에 분비성 clusterin의 발현을 증가시킨다. H9c2/hCLU 심근세포모델에서 clusterin의 과발현은 DOX에 의한 세포사로부터 세포를 보호하는 효과를 나타내고, clusterin의 세포보호효과에는 세포자멸사의 공통경로인 caspase-3의 활성을 억제시키는 것이 하나의 기전으로 작용한다.

주요어: clusterin, doxorubicin, H9c2 세포, 세포자멸사, 보호효과

학 번: 2005-30642

목 차

국문 초록 ---------- i

목차 ---------- iii

표 목록 ---------- iv

그림 목록 ---------- v

서론 ---------- 1

연구 목적 ---------- 5

연구 방법 ---------- 6

연구 결과 ---------- 12

고찰 ---------- 29

참고 문헌 ---------- 37

Abstract ---------- 47

표목록

Table 1. Change of body weight in control and doxorubicin treated rats ---- 13

그림 목록

Figure 1. Schema of experimental design and pertinent events ---------- 14

Figure 2. Toxicity of DOX in H9c2 cardiomycocytes ---------- 15

Figure 3. Changes of clusterin expression in lysate and media of H9c2 cardiomycocytes after DOX treatment ---------- 16

Figure 4. H9c2/hCLU cardiomycocytes obtain the overexpression of clusterin ---------- 17

Figure 5. Effect of clusterin overexpression on DOX-induced cell death --- 18

Figure 6. Nuclear morphological changes in DOX treated H9c2 cardiomycocytes ---------- 19

Figure 7. Clusterin expression is inversely correlated with caspase-3 activation of DOX treated H9c2 cardiomycocytes ---------- 20

Figure 8. Hematoxylin-eosin stain of heart ventricle from rats after treatment with or without DOX treatment ---------- 21

Figure 9. Masson's trichrome stain of heart ventricle from rats after treatment with or without DOX treatment ---------- 22

Figure 10. Detection of apoptotic cells in rat myocardium with or without DOX treatment ----------23

Figure 11. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical stain for clusterin in rat atrium ---------- 24

Figure 12. Immunofluorescent stain of clusterin in rat atrium with or without DOX treatment ---------- 25

Figure 13. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical stain for clusterin in rat ventricular myocardium ---------- 26

서 론

1. Doxorubicin에 의한 심독성

Doxorubicin (DOX)은 anthracycline계 항암제로서 DNA 염기서열에 삽입되어 DNA와 RNA의 합성을 저해하고, Topoisomerase II를 억제함으로써 혈액암과 악성 고형종양의 항암요법에 근간이 되는 약물이다. DOX은 임상적인 유용성에도 불구하고, 장기간의 투여 시에 나타나는 급•만성의 심독성으로 인하여 사용이 제한되고 있다. DOX에 의해 발생하는 심근증은 투여 후 어느 시기든지 발생하고, 진행성의 경과를 보이며 울혈성 심부전을 초래한다(Grenier MA 등, 1998). 이러한 심독성은 축적량에 비례하여 발생하며, 현재까지 효과적인 치료법이 없다(Rhoden W 등, 1993). 성인에서는 500mg/m^2이하의 용량을 투여하는 것이 심독성을 줄이는 것으로 알려져 있지만, 개인에 따라서 더욱 적은 용량에서도 심독성이 발생한다(Lipshultz SE 등, 1991). 특히, 소아에서는 안전한 축적량이 알려져 있지 않고, 90mg/m^2와 같은 적은 축적량으로도 심장애가 발생한다(Sorensen K 등, 1997).

DOX에 의한 심근 손상의 병태생리학적 기전은 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않지만, 유리 산화기와 과산화수소(H_2O_2)의 생성에 의한 산화 스트레스로 인해 초래되는 세포자멸사가 주된 원인으로 생각되고 있다(Zhou S 등, 2001). 그 외에도 자유 라디칼 형성, 지질 과산화(peroxidation), 미토콘드리아 장애, 칼슘 조절 장애, 근육 특이 유전자의 직접적인 억제 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Sawyer

BB 등, 1999).

DOX에 의한 심독성을 예방하기 위해 많은 연구가 시행되어 왔다. 우선적으로 축적량을 제한하고, 약물의 투입 속도를 늦추어 약물의 최고 혈장 농도를 낮추는 방법이 시행되고 있다. 한편, 망상내피계 내의 섭취가 떨어지는 liposomal 제제의 anthracycline을 투여하면 항암효과의 감소가 없이 심부전의 발생을 줄인다는 보고가 있다(O'Brien ME 등, 2004). 그리고, 철 chelating제제인 dexrazoxane을 사전에 투여하여 anthracycline에 의한 심근 손상의 위험을 1/3 정도로 줄이는 시도가 시행되고 있는데(Sawyer 등, 1999), 장기적인 효과는 좀더 관찰이 필요하다(Pavia MG 등, 2005). 더욱이, 고가의 비용과 항암효과를 감소시킬 우려로 인해 dextrazoxane의 사용에 제한을 받고 있다.

여러 가지 노력에도 불구하고 여전히 DOX을 투여 받은 많은 환자들에서 치명적인 심부전 및 확장성 심근증이 발생하며, 이로 인해 효과적인 항암 치료가 제한을 받고 있다(van Dalen 등, 2008). 이를 극복하기 위해서는 DOX이 심독성을 초래하는 기전에 대한 연구와 심독성을 최소화하기 위한 생물학적 제제의 개발이 요구되는 실정이다.

2. Clusterin의 구조와 생체 내 기능

Clusterin은 1983년 양의 정액에서 발견된 75-80kDa의 당단백질인데, 적혈구 응집을 일으키는 것으로 알려져 clusterin이라 명명되었다(Fritz IB 등, 1983). Clusterin은 대다수의 포유동물의 체액과 다양한 조직에 편재하는데, 인간에서는 1989년에 보체

세포용해 억제제(Complement cytolysis inhibitor, CLI)로 기술되었고(Jenne DE 등, 1989), 발견되는 위치에 따라 apolipoprotein J, SP-40, XIP8 등 다양한 명칭으로 보고 되었다(Tenniswood M 등, 1998; Kirszbaum L 등, 1989). 인간조직에서는 1992년 처음으로 발견되었다(Jenne DE 등, 1992).

Clusterin의 유전자는 8p12-21에 위치한다(Purrello M 등, 1991). 세포질세망(endoplasmic reticulum)을 거치기 전의 cluterin 전구체는 60-64kDa의 당화되지 않은 단백질로 세포질 내에 존재한다. Clusterin 전구체는 분할과 당화를 거쳐서 34-36kDa의 alpha-나선과 36-39kDa의 beta-나선이 다섯 개의 이황결합(disulfide band)에 의해 연결되어 75-80kDa의 분비성 clusterin으로 만들어진다. 분비성 clusterin은 대부분이 골지체에서 완전히 성숙된 뒤 당단백질의 상태로 세포 밖으로 배출되는데, 거의 모든 종류의 체액에 존재한다. 핵 내에는 50kDa의 좀더 작은 clusterin이 존재하는데, 핵 clusterin의 발현은 세포사와 관련이 있는 것으로 생각된다(Caccamo AE 등, 2003; 2004; 2005).

Clusterin은 양매성(amphipatic)의 α-나선과 매우 유연한 결합부위를 가지고 있어, 소수성(hydrophobic) 분자와 각종 유해물질과 결합하여 생물학적 세정제로 작용한다(Bailey RW 등, 2001). Clusterin은 다양한 스트레스와 세포손상에 반응하여 세포보호효과를 나타내는 작은 열충격단백질(heat shock protein, Hsp)과 같은 chaperone역할을 할 뿐만 아니라(Humphreys DT 등, 1999), 다양한 경로를 통해 세포자멸사로부터 세포를 보호한다(Kim JH 등, 2007; Sallman DA 등, 2007). Clusterin의 생물학적 기능은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않지만, 적혈구의 응집, 보체의 활성, 정자의 성숙, 조직의 분화와

재형성, 세포막의 재생, 지질의 운송, 세포 간 혹은 세포-기저층 간의 상호반응, 세포의 증식, 생존 및 사망과 같은 다양한 생물학적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 신경변성, 노화, 암과 같은 다양한 병적 상태에 관여할 것으로 생각된다(Jones SE 등, 2002; Rizzi F 등, 2008; Rosenberg ME 등, 1995; Shannan B 등, 2006; Trougakos IP 등, 2002; Wilson MR 등, 2000).

심장의 정상 심실근육세포에서는 clusterin의 발현이 관찰되지 않으나, 심근염, 허혈성 심질환, 동맥경화증에서 clusterin의 과발현이 관찰되고, 이는 세포보호효과를 나타내는 것이 알려져 있다(Cubedo J 등, 2010; McLaughlin L 등, 2000; Poulakou MV 등, 2008). 또한, H_2O_2에 의해 가해진 산화스트레스에 대해 clusterin이 심근세포에 항자멸사효과를 나타냄이 보고되었다(Jun HO 등, 2011).

연구 목적

본 연구는 Hsp과 같이 광범위한 세포보호 인자로 알려진 clusterin이 DOX에 의한 심근세포사에 보호효과를 보이는지 알아보기 위해 시행되었다. DOX을 처치하면 심근세포에서 clusterin의 발현이 증가함은 이미 보고되었지만(Héon S 등, 2003), 이것이 세포에 어떠한 효과를 일으키는가에 대해서는 연구된 바가 없다.

저자는 *in vitro* DOX 유발성 H9c2 심근세포손상모델과 *in vivo* DOX 주입 백서 모델에서 clusterin의 발현양상을 관찰하고, clusterin이 심근세포에 보호효과를 일으키는지 확인하고자 하였다. 더불어 DOX에 의한 산화스트레스에서 심근손상의 주된 기전인 세포자멸사에 clusterin이 관여하는지 확인하고자 하였다.

연구 방법

1. *In vitro* H9c2 심근세포 모델

1) DOX의 H9c2 심근세포에 대한 독성확인

H9c2 심근세포(Korean cell line bank, seoul, Korea) 부유액을 37℃, 5% CO_2 하에서 10% fetal bovine serum (Gibco; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 1% penicillin/streptomycin을 혼합한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 배양하였다. Hemacytometer를 사용하여 세포 부유액을 5×10^4/ml로 희석하여 96 well plate의 각 well에 100ul씩 넣고 24시간 동안 배양한 뒤, well 내의 세포배양액을 제거하고, DOX의 농도가 각각 0.1, 1, 2, 5, 10μM이 되도록 세포 배양액을 100μl씩 첨가하였다. 37℃, 5% CO_2 하에서 12시간 동안 배양한 뒤 MTT 분석법을 이용해 세포생존율을 측정하였다. MTT 분석은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)용액(5mg/ml in PBS, Amresco, Solon, OH)을 세포에 처리하여 2시간 동안 반응시킨 뒤 MTT 용액을 제거하고, formazan precipitate는 200ul의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Darmstadf, Germany)에 용해시켜, DMSO를 맹검액 (blank)으로 삼아 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Clusterin 과발현 H9c2 심근세포주(H9c2/hCLU 심근세포)의 확립

사람으로부터 발생된 clusterin cDNA를 pcDNA3 벡터(Invitrogen, Carlsbad, California, USA)에 cloning하여 pcDNA3-hDNA를 제작한

뒤(Min BH, Korea University, Seoul, Korea), Lipofectin 시약(Invitrogen, Carlsbad, California, USA)의 protocol에 따라 H9c2 심근세포에 핵내주입시켰다.

3) Trypan blue 염색

1-2)의 방법으로 clusterin을 과발현시킨 H9c2/hCLU 심근세포와 대조군 H9c2 심근세포에 2μM 농도의 DOX을 섞은 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 환경에서 12시간 동안 배양하였다. 세포가 포함된 배양액을 원심 분리하여 PBS (phosphate-buffered saline)에 희석한 뒤 0.4% trypan blue 용액을 1:4로 첨가하고 5분간 반응시켰다. Luna TM automated cell counter (Logos biosystems, Anyang, Korea)을 이용하여 실험군과 대조군의 세포 생존율을 측정하였다.

4) DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 염색

두 세포군에서 세포자멸사의 정도를 비교하기 위해 chromatin의 응축과 분절을 관찰할 수 있는 DAPI 염색을 시행하였다. 1-2)의 방법으로 H9c2/hCLU 심근세포와 H9c2 심근세포에 2μM 농도의 DOX을 섞은 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 환경에서 12시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 상온에서 4% paraformaldehyde로 10분간 고정시켰다. PBS로 세척하고, 상온에서 5μg/ml의 DAPI 용액(Sigma-Aldrich)으로 5분간 처리하였다. PBS로 3회 세척한 뒤 면역형광현미경으로 관찰하였다.

5) Western blot 분석

H9c2 심근세포에 2μM의 DOX을 처치한 뒤 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24시간

동안 배양하여 세포 lysate와 세포배양농축액에서 각각 시간에 따른 clusterin 발현의 변화를 관찰하였다. Clusterin 정량을 위하여 배양한 H9c2 심근세포를 protease inhibitor (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)가 포함된 용해완충제[10mM Hepes (pH 7.9), 400mM NaCl, 0.1mM EDTA, 5% glycerol, 1mM DTT]로 얼음 안에서 반응시킨 뒤 냉동질소에 넣어 얼렸다 녹이는 것을 3회 반복하였다. 세포 lysate를 14,000×rpm으로 20분 간 원심분리하고, 상층액을 모아 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL)를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다. 동일량의 단백질을 8% SDS-PAGE로 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany)에 이동시켰다. 비특이적인 반응을 막기 위해 5% 탈지분유를 넣은 TBST 완충액(10mM Tris-NaCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 0.1% Tween-20)으로 한 시간 동안 반응시킨 뒤, 각각 clusterin M-18의 goat polyclonal 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)와 cleaved caspase-3의 항 rabbit polyclonal 항체(Cell signaling, Danvers, MA)에 결합시켜 4℃에 16시간 동안 반응시키고, horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체에 1시간 동안 반응시켰다. 단백질의 정량은 β-actin을 항체(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 반응시켜 비교하였다. Membrane을 Enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotechnology, CA, USA)을 이용하여 AGFA X-ray 필름(AGFA-Gevaert, Hortsel, Belgium)에 현상하여 단백질에 대한 반응을 확인하였다.

1-2)의 방법으로 H9c2 심근세포와 H9c2/hCLU 심근세포에 2μM 농도의 DOX을 12시간 동안 처치한 뒤 위와 같은 방법으로 western blot 분석을 시행하여 두 세포군 간의 clusterin 발현에 따른 cleaved

caspase-3 활성의 차이를 측정하였다.

2. *In vivo* DOX 주입 백서 모델

1) 실험 동물

8주령의 수컷 Sprague-Dawley 백서(Samtako, Seoul, Korea) 20마리를 사용하였다. 동물의 사육, 관리 및 처치 등은 서울대학교 동물실험 윤리 위원회(Seoul National University institutional animal care and use committees)에서 승인하였고, 규정을 준수 하였다.

2) In vivo DOX 주입 백서 모델

Sprague-Dawley 백서의 체중을 재고, ketamine (50mg/kg)과 Xyzaline (5mg/kg)을 혼합한 뒤 복강 내로 주사하여 가볍게 마취하였다. 실험군(12마리)에게는 DOX (2.5mg/kg)을 복강 내로 투여하였고, 대조군(8마리)에게는 같은 용적의 생리 식염수를 복강 내로 투여하였다. 3일 간격으로 체중을 측정하며 총 6회 반복하였다(Fig. 2). 약물 투입 23일째에 백서의 경추를 탈골 시켜 희생시켰다. 백서의 심장을 가능한 빨리 적출하여 4% 포름알데히드에 고정하였다. 심장 조직을 fixative에 고정한 뒤, paraffin에 침투시켜 블록을 만들고 4μmm로 절단하여 슬라이드를 제작하였다.

3) Hematoxylin-eosin 염색 및 Masson's trichrome 염색

백서의 심근 조직의 광학 현미경 관찰을 위해 Hematoxylin-eosin 염색을 시행하였고, 실험군과 대조군의 섬유화 정도를 판정하기 위해 Masson's trichrome 염색을 시행하였다.

4) TUNEL(transferase-mediated deoxyuridine-biotin nick end labeling) 분석

Paraffin에 고정한 백서 심장 조직의 슬라이드를 2-4)의 방법으로 탈파라핀화와 탈수를 시킨 뒤, 0.1M PBS으로 세척하였다. 슬라이드를 0.1M citrate buffer에 담근 채로 120℃의 autoclave에 10분간 가열 후 20분 간 식혔다. 상온에서 0.2% triton-X100에 15분간 반응시킨 뒤, enzyme kit (Roche/cat#11 684 795910)를 사용하여 enzyme 용액과 lavel 용액을 1:9의 비율로 혼합하여 잠길 정도로 슬라이드 위에 떨어뜨린 뒤 차광하고, 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1M PBS 1ml에 DAPI 용액 1μml을 혼합하여 조직이 잠길 정도로 슬라이드 위에 떨어뜨린 뒤 15분간 반응시키고, anti-digoxigenin peroxidase conjugate를 가하여 30분간 방치하였다. 각 반응 단계 사이에는 0.1M PBS를 이용하여 10분간 3번씩 세척하였다. Faramount aqueous mounting medium (DAKO)을 사용하여 mounting한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

5) 면역조직화학염색 및 면역형광염색

Paraffin에 고정한 백서 심근 조직의 슬라이드를 2-4)의 방법으로 탈파라핀화와 탈수를 시키고, 0.1M PBS으로 세척하였다. 내재된 과산화제의 활성을 억제하기 위하여 3% H_2O_2에 15분간 반응시켰다. 절편을 37℃에서 5분간 protease K로 처리한 후, 4℃에서 clusterin M-18의 anti-goat polyclonal 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)에 16시간 동안 반응시켰다. 면역형광염색을 위해 상온에서 anti-mouse IgG FITC를 차광상태로 1시간 동안 처리하고 PBS로 세척하였다. 1-4)와 같이 DAPI 염색을 시행하여 형광신호의 발현 부위를 구분하는데 참조하였다. 같은 방법으로 cleaved caspase-3 항

rabbit polyclonal 항체(Cell signaling, Danvers, MA)를 이용하여 면역형광염색을 시행하고, 형광현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학염색을 위해서는 1차 항체를 처리한 절편을 상온에서 1시간 동안 biotinylated anti-goat IgG로 반응시킨 후 상온에서 horseradish peroxidase-conjugated avidin으로 반응시켰다. 각 반응 단계 사이에는 0.1M PBS를 이용하여 10분간 3번씩 세척하였다. 절편을 ACE substrate (Zymed kit)로 처리하고 현미경으로 관찰해 가면서 발색 정도를 조절하였다. Faramount aqueous mounting medium (DAKO)을 사용하여 mounting 하고 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 통계 분석

결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군간의 비교는 student's t-test를 사용하였고, *P-value*가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하였다고 간주하였다

연구 결과

1. *In vitro* H9c2/hCLU 심근세포 모델

1) DOX의 H9c2 심근세포에 대한 독성확인

MTT 분석법으로 측정한 DOX의 농도변화(0, 0.05, 0.1, 0.5, 1. 2, 5, 10μM)에 따른 H9c2 심근세포의 생존율은 다음과 같았다(Fig. 2). DOX의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 감소하였고, 2∼5μM의 농도에서 약 60%의 세포생존율을 보였다.

2) DOX 처치가 H9c2 심근세포의 clusterin 발현에 미치는 영향

H9c2 심근세포의 배양액에 DOX를 처치하고 3시간 뒤부터 lysate 내의 clusterin 단백의 발현이 증가하는 것을 western blot 분석을 통해 확인하였다. H9c2 심근세포의 세포배양농축액에서도 DOX를 처치하고 2시간부터 24시간까지 clusterin의 발현이 시간에 따라 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

3) H9c2/hCLU 심근세포주의 확립

H9c2/hCLU 심근세포에서 H9c2 심근세포에 비해 clusterin이 과발현이 유도된 것을 westerin blot 분석을 통해 확인되었다(Fig. 4).

4) DOX 처치에 대한 H9c2/hCLU 심근세포의 생존율 향상

DOX를 처치한 후 trypan blue 염색법을 이용하여 측정한 H9c2 심근세포와 H9c2/hCLU 심근세포의 세포생존율은 각각 58.3±10.4%, 78.4±1.23% 이었다(Fig. 5). H9c2/hCLU 심근세포에서 DOX 처치에

대해 통계적으로 유의한 생존율의 향상을 보였다(P<0.003).

DAPI 염색에서 DOX의 처치에 의해 세포자멸사의 소견인 H9c2 심근세포의 크로마틴의 분절과 세포핵의 응축소견이 관찰되었다. H9c2/hCLU 심근세포에 DOX을 처치하였을 때는 세포핵의 변화가 H9c2세포에 비해 감소되었다(Fig. 6).

5) Clusterin 발현에 따른 cleaved caspase-3 활성의 변화

Clusterin이 과발현 된 H9c2/hCLU 심근세포는 H9c2 심근세포에 비해 DOX을 처치하였을 때, 세포자멸사의 공통경로인 cleaved casepase-3의 활성이 적게 일어나는 것을 western blot 분석을 통해 확인하였다(Fig. 7).

2. *In vivo* DOX 주입 백서 모델

1) 백서의 사망률 및 체중의 변화

실험군(12마리)과 대조군(8마리)에서 사망은 발생하지 않았다. DOX을 투여하고 23일 후에 측정한 체중은 실험군에서 유의하게 감소하였고(31.3 ± 2.87g vs 27.2 ± 2.82g, P=0.002), 대조군에서는 체중의 변화가 없었다(29.8 ± 2.31g vs 29.2 ± 1.30g, P=0.11) (Table 1).

2) DOX 주입에 따른 백서 심근 조직의 광학 및 형광현미경소견의 변화

실험군의 심근조직을 대조군과 비교하였을 때, 육안적으로 심실벽 두께의 감소나 심실 확장 소견은 관찰되지 않았다. Hematoxylin-eosin 염색에서 림프구의 침윤과 같은 이상 소견은 관찰되지 않았고(Fig.

8), Masson's trichrome 염색에서 심실 근육의 섬유화 증가 소견 또한 관찰되지 않았다(Fig. 9). TUNEL염색에서 실험군의 심실표본슬라이드 전 시야에서 1∼9개의 TUNEL양성 핵이 관찰되었고, 대조군에서는 0∼3개의 TUNEL양성 핵이 관찰되었다(Fig. 10). 두 군에서 심실근육세포에 cleaved caspase-3 항체에 대한 형광신호는 관찰되지 않았다. 이러한 소견들을 종합해 보았을 때, 실험군의 심근에 조직학적으로 명백한 심근증은 발생하지 않았다.

3) DOX 주입에 따른 백서 심장의 clusterin 발현양상의 변화

면역조직화학염색에서 실험군과 대조군의 심방조직 전반에서 심방근육세포의 세포질에 갈색의 과립 형태와 미만성의 clusterin 염색이 관찰되었다. 특히, 실험군에서는 대조군에 비해 세포질 내에 clusterin이 더욱 짙게 염색되었고, 세포 경계부위에 clusterin 발현이 확연히 증가하였다(Fig. 11). DAPI 염색과 clusterin에 대한 면역형광염색을 중첩하여 관찰하였을 때에도 이와 같은 소견을 관찰할 수 있었고, clusterin의 발현부위는 세포질 내에서도 특히 세포경계면과 핵 주위에 집중적으로 분포하였다(Fig. 12).

DOX를 주입한 실험군의 심실조직의 면역조직화학염색에서도 정상적으로는 관찰되지 않는 clusterin의 발현이 관찰되었다. Clusterin의 발현 부위는 심실 내에 산재된 형태로 분포하였고, clusterin은 심실근육세포의 세포질 내에 미만성 및 작은 과립형태로 존재하였다. 이러한 부위에서 광학현미경상의 변화는 없었다. 대조군의 심실조직에서는 clusterin의 발현이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 13).

Table 1. Change of body weight in control and doxorubicin treated rats

	Day 0	Day 23	*P* value
Control group (g) (n = 8)	29.8 ± 2.31	29.2 ± 1.30	*P = 0.11*
DOX group (g) (n = 12)	31.3 ± 2.87	27.2 ± 2.82	*P = 0.002*

Values are mean ± SD; n, number of animal; DOX, doxorubicin

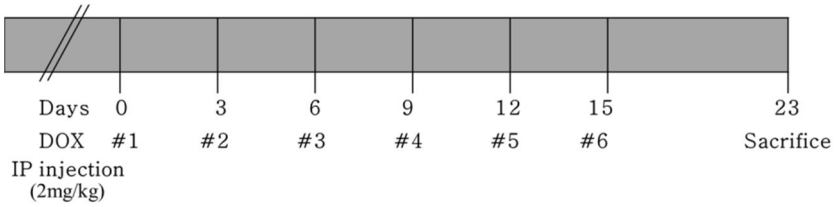


Figure 1. Schema of experimental design and pertinent events. Sprague Dawley rats were treated tridaily with intraperitoneal injection of DOX (2.5mg/kg, × 6times). On the 23th days, the rats were sacrificed.

IP, intraperitoneal

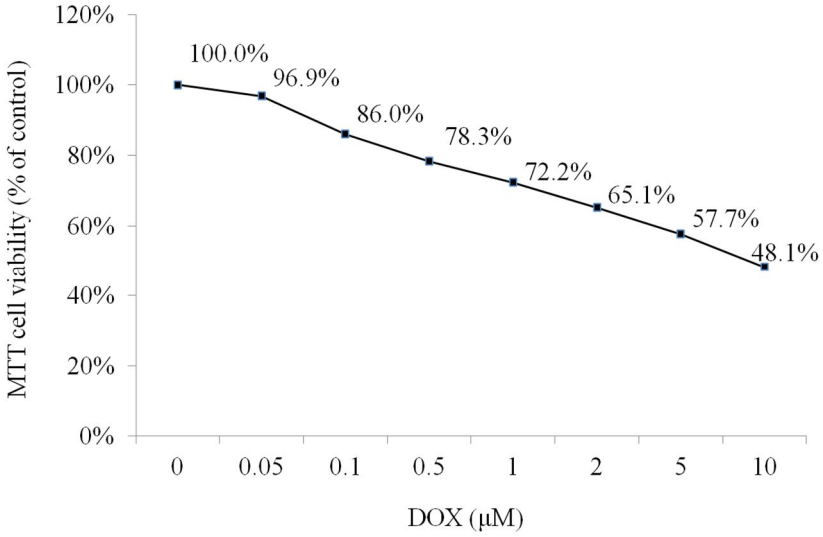


Figure 2. Toxicity of DOX on H9c2 cardiomyocytes. Cell viability of H9c2 cardiomyocytes was measured using MTT assay after 24hr treatment of DOX at 8 different concentrations of ranging from 0.1μM to 10μM (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1. 2, 5, 10).

MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

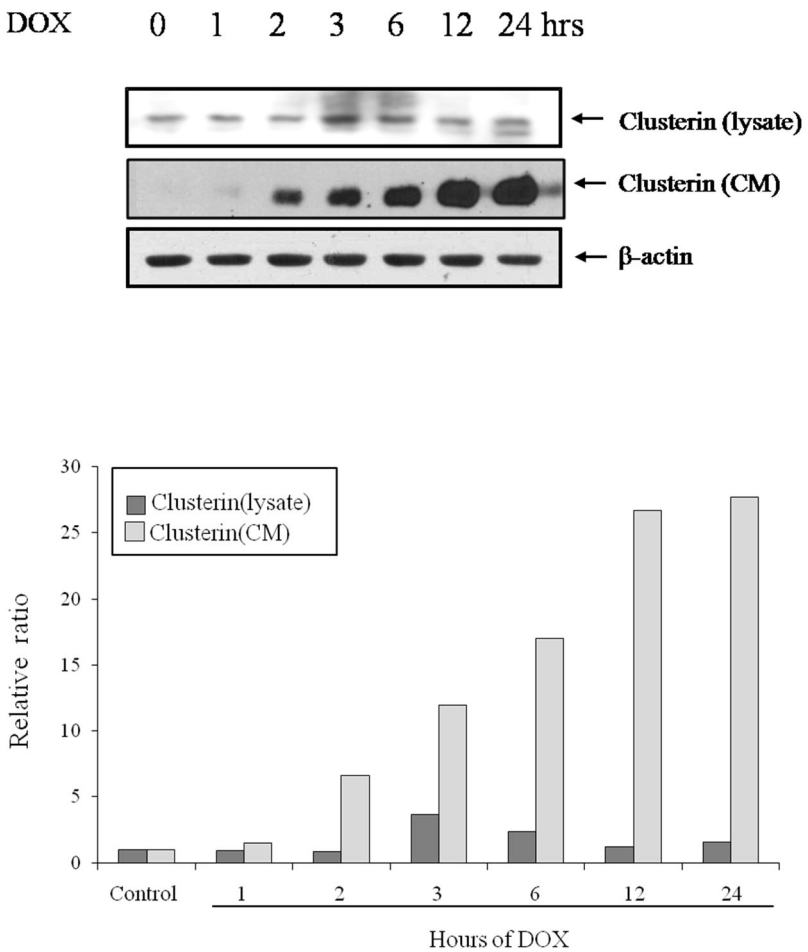


Figure 3. Changes of clusterin expression in lysate and media of H9c2 cardiomyocytes after DOX treatment. Total cellular lysate from cultured cells was analyzed for cytosolic clusterin. The media collected from individual cultures were also analyzed for secretory clusterin. Secretory clusterin levels began to increase at 2hours after DOX treatment to prominent increase by 24hours. β-actin served as the loading control. Expression of clusterin and β-actin was measured by western blot analysis.

CM, concentrated media

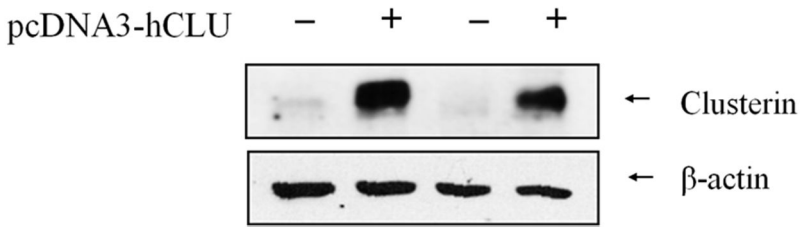


Figure 4. H9c2/hCLU cardiomyocytes obtained the overexpression of clusterin. Clusterin was overexpressed in H9c2/hCLU cardiomyocytes by the transfection of pcDNA3-hCLU to H9c2 cells. The expression of clusterin was measured by western blot analysis.

hCLU, human clusterin

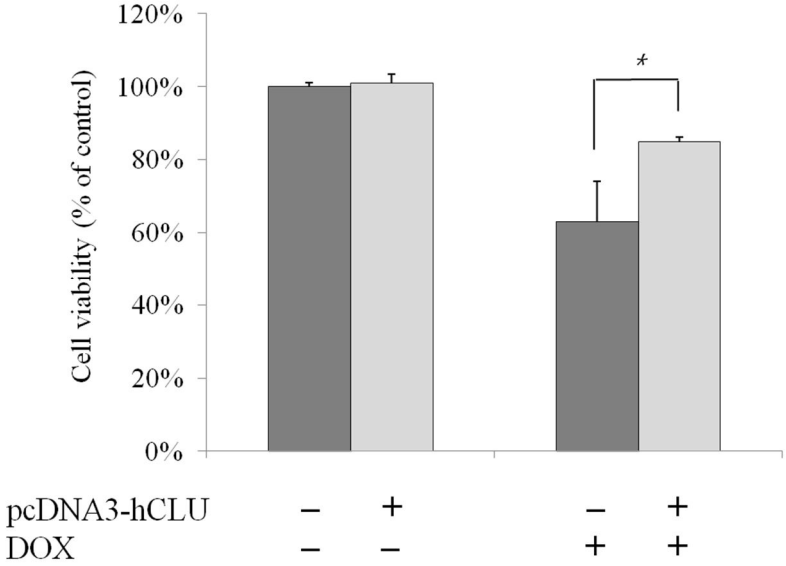
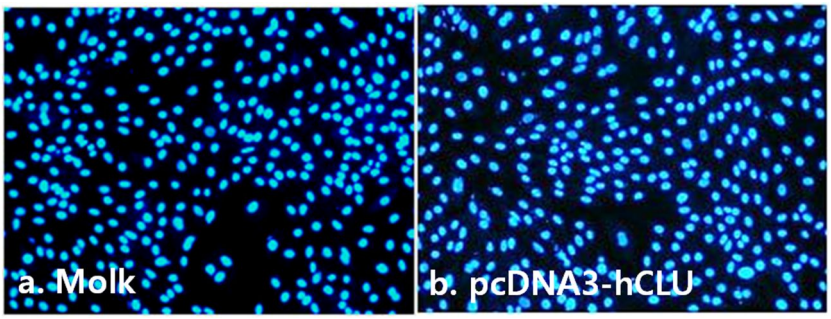


Figure 5. Effect of clusterin overexpression on DOX-induced cell death. H9c2/hCLU cardiomyocytes was made by the transfection of pcDNA3-hCLU to H9c2 cardiomyocytes. H9c2/hCLU cardiomyocytes show an improvement of survival against DOX treatment compared with H9c2 cardiomyocytes. Transfection of pcDNA3-hCLU shows no cytotoxic effect on H9c2 cardiomyocytes. Each value is the average of six replicates. Cell viability was assessed by trypan blue stain.

*$P<0.003$ compared with control group.

A



B

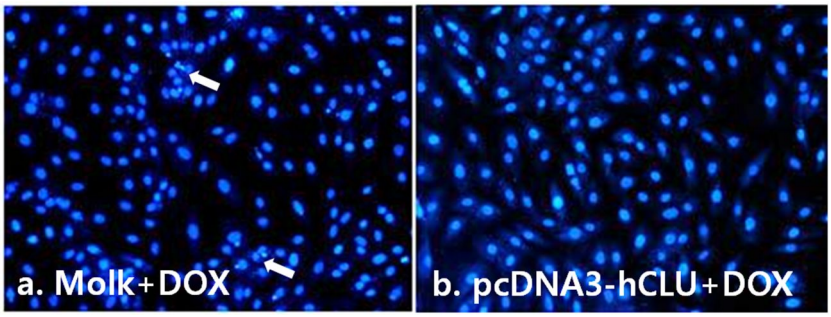


Figure 6. Nuclear morphological changes in DOX treated H9c2 cardiomyocytes. A: H9c2 cardiomyocytes were incubated in normal medium (a) or pcDNA3-hCLU-CM (b). pcDNA3-hCLU-CM causes no nuclear morphological change on H9c2 cardiomyocytes. B: H9c2 cardiomyocytes were incubated in normal medium (a) or pcDNA3-hCLU-CM (b), then both were treated with 2μM DOX for 12hrs. White arrow indicates intense DAPI stained nuclei that indicate cells undergoing apoptosis. Clusterin overexpression (b) attenuates the chromatic fragmentation and condensation caused by DOX. These data propose that clusterin has a protective role in DOX-induced apoptotic cell death of H9c2 cardiomyocytes. Nuclear morphology was showed by DAPI stain. DAPI nuclear stain was observed under fluorescence microscopy.

DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole; CM, concentrated media

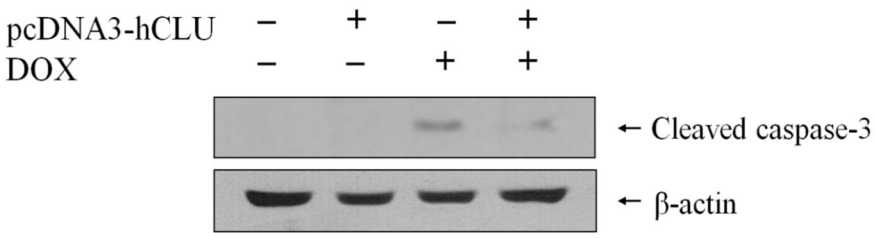


Figure 7. Clusterin expression is inversely correlated with caspase-3 activation of DOX treated H9c2 cardiomyocytes. After 48hr pre-incubation with pcDNA3-hCLU, H9c2 cardiomyocytes were treated with 2μM DOX for 12hrs. Clusterin overexpression inhibits DOX-induced caspase-3 activation in H9c2 cardiomyocytes. These finding indicates that clusterin attenuated DOX-induced apoptosis occurring through caspase-3 activation.

Expression of caspase-3 was measured by western blot analysis.

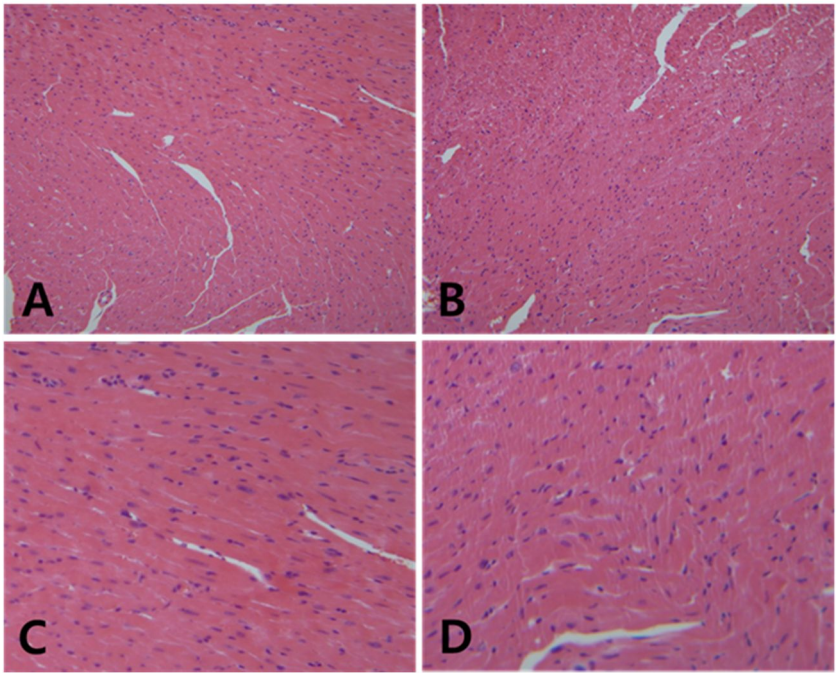


Figure 8. Hematoxylin-eosin stain of heart ventricle from rat after treatment with or without DOX. There is no significant difference between both groups. Intraperitoneal injection of DOX to Sprague-Dawley rat cause no histological change in ventricular myoctyes on hematoxylin-eosin stain. (A) Control rat (×100) (B) DOX rat(×100) (C) Control rat (×400) (D) DOX rat (×400).

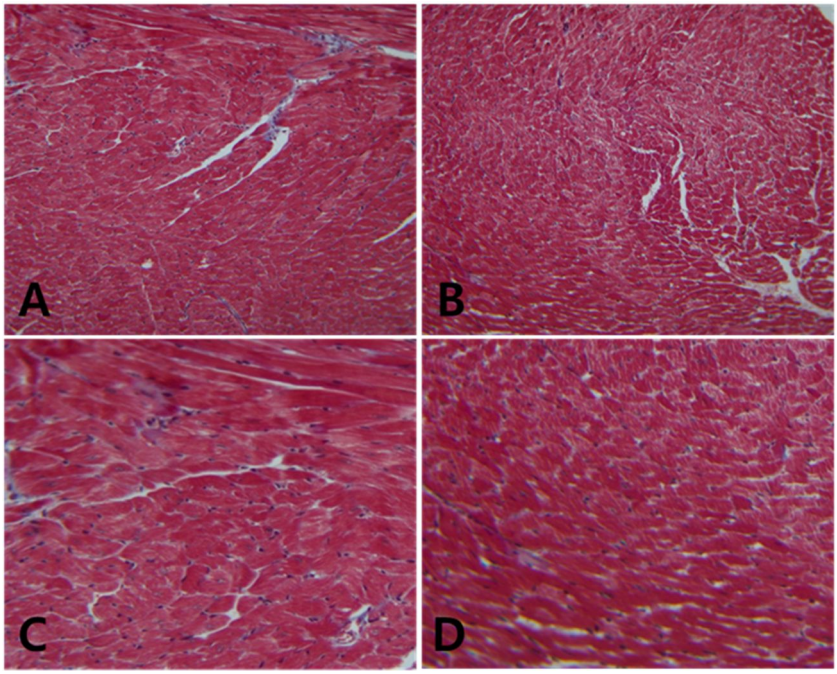


Figure 9. Masson's trichrome stain of heart ventricle from rat after treatment with or without DOX treatment. There is no significant difference between both groups. Intraperitoneal injection of DOX to Sprague-Dawley rat cause no histological change in ventricular myocytes on Masson's trichrome stain. (A) Control rat (×100) (B) DOX rat (×100) (C) Control rat (×400) (D) DOX rat (×400).

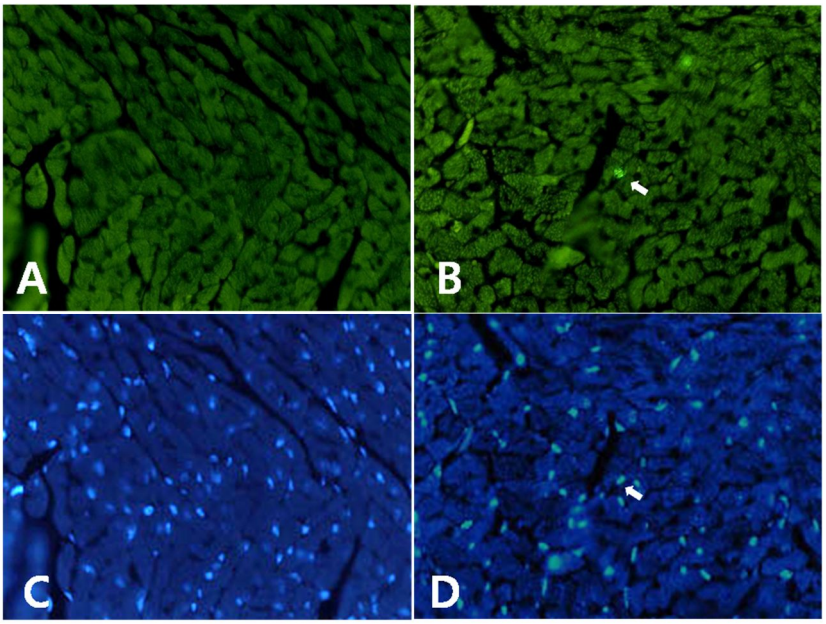


Figure 10. Detection of apoptotic cell in rat myocardium with or without DOX treatment. One apoptotic nucleus (white arrow) is observed by TUNEL stain in DOX treated rat myocardium. Intraperitoneal injection of DOX to Sprague-Dawley rat didn't cause definite apoptosis in rat ventricular cardiomyocytes. TUNEL images (A, B) show the green fluorescence and DAPI (C, D) stains show the blue fluorescence of nuclei. (A) Control rat (×400) (B) DOX rat (×400) (C) Control rat (×400) (D) DOX rat (×400).

TUNEL ; transferase-mediated deoxyuridine-biotin nick end labeling

DAPI : 4′,6-diamidino-2-phenylindole

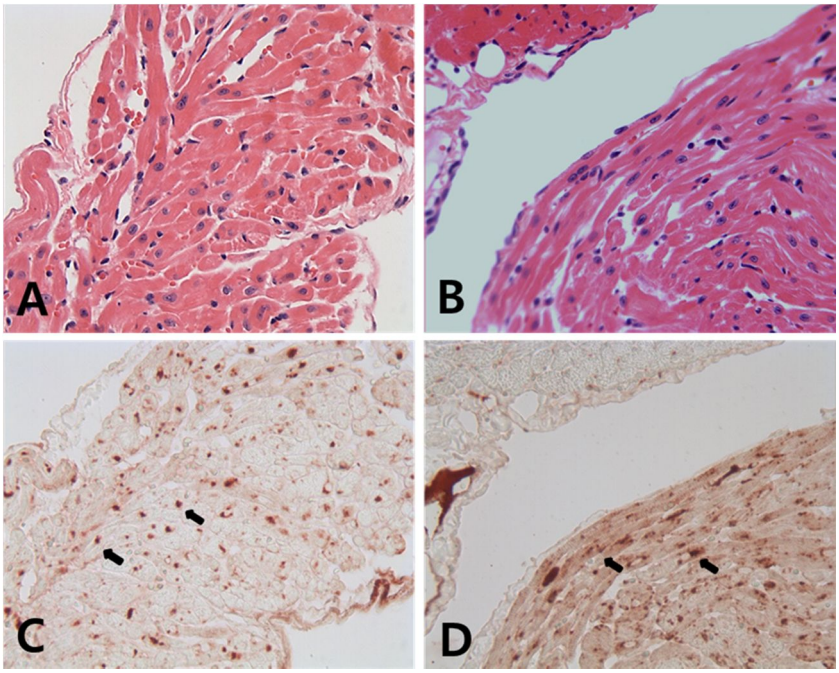


Figure 11. Hematoxylin-eosin stain and immunohistochemical stain for clusterin in rat atrium. Diffuse and dot-like cytoplasmic stain for clusterin (black arrow) is observed in atrial myocytes of both rat group. Compared with control group (C), DOX treated atrial myocytes show heavy immunostain for clusterin (D). Rat atrial myocytes express clusterin in normal status, but overexpress clusterin against DOX injection. (A) Control rat, H&E (×400) (B) DOX rat, H&E (×400) (C) Control rat, IHC (×400) (D) DOX rat, IHC (×400). Brown indicates positive stain of clusterin protein

H&E, Hematoxylin-eosin stain

IHC, immunohistochemical stain

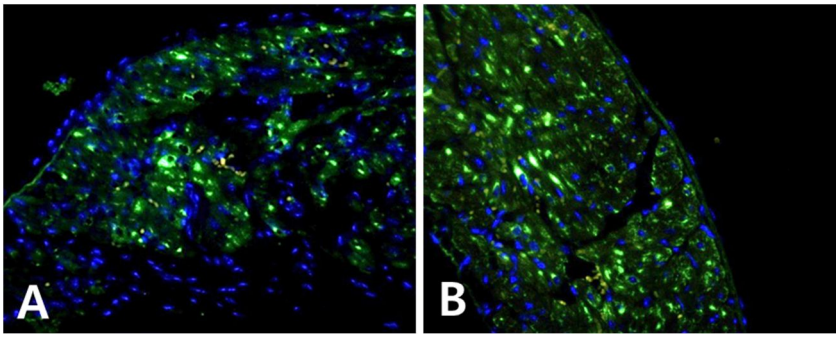


Figure 12.Immunofluorescent stain of clusterin (green) in rat atrium with or without DOX treatment. Nuclei were stained with DAPI (blue). Merging images show diffuse cytoplasmic stain of clusterin in both group. DOX treated rat's atrium show denser stain of cluterin which is predominantly observed in peri-nuclear and cell surface area. (A) Control rat (×200) (B) DOX rat (×200)

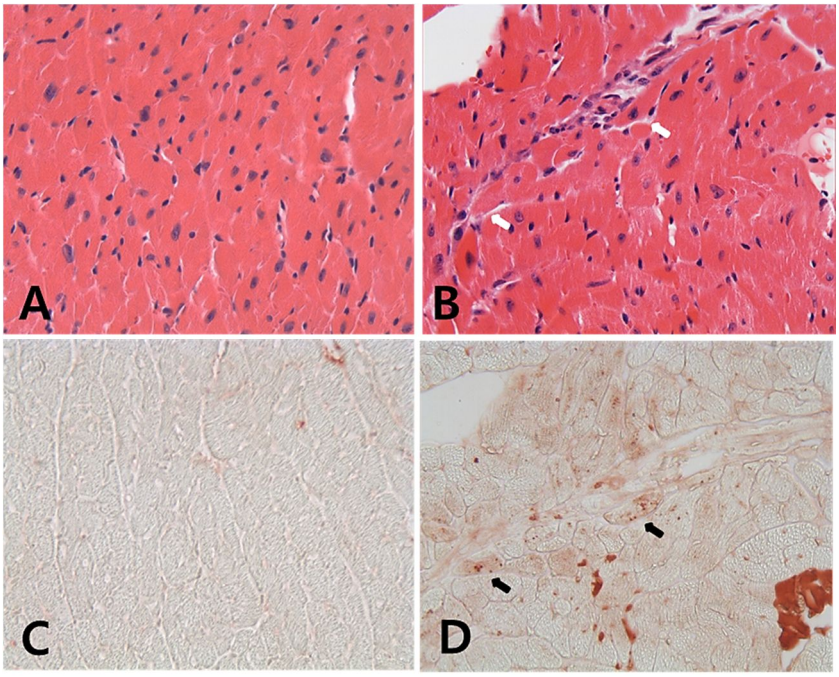


Figure 13. Hematoxylin-eosin stain and immunohistochemical stain for clusterin in rat ventricular myocardium. Compared with control group (B), DOX treated ventricular myocytes (D) show scattered cytoplasmic stain for clusterin (Black arrows). Rat ventricular myocytes doesn't express clusterin in normal status, but overexpress clusterin against DOX injection. Brown indicates positive stain of clusterin protein.

고 찰

DOX은 전체 소아암 환자의 60%에서 사용될 정도로 각종 고형암, 백혈병, 림프종, 유방암등에서 효과적인 약제이나, 치명적인 심근독성으로 인해 임상적 사용이 제한 받고 있다. Hershman 등의 보고에 따르면 림프종의 치료를 종료하고 15년 뒤에 약 10%에서 임상적인 심근증이 발생하였다고 한다(Hershman DL 등, 2008).

DOX이 심독성을 일으키는 기전에 대해 다양한 연구가 이루어져왔다(Octavia Y 등, 2012). 이 중에서 자유 라디칼의 생성에 의해 초래되는 산화스트레스에 의한 심근세포의 손상이 가장 주된 원인으로 제시되고 있다. 심장은 산화 스트레스에 고유한 취약성을 가지는데(Doroshow JH 등, 1980), 지난 30년 간 이에 대한 많은 연구들이 이루어졌다. DOX에 의한 심근 손상에는 미토콘드리아의 기능장애가 중요한 역할을 하는 것이 잘 알려져 있다. 고농도의 DOX은 미토콘드리아의 내막에 잔류되어 cardiolipin과 비가역적인 복합체를 형성함으로써 전자전달사슬(electron transport chain) 단백질의 기능을 억제하고 초과산화물(superoxide, O2-)의 생성을 증가시킨다(Schlame MD 등, 2000). 임상적인 용량의 DOX에 의해 미토콘드리아에 손상이 초래되면 긴사슬지방산(long chain fatty acid)의 산화가 감소하고 포도당의 대사가 증가하여 산소성 대사에서 무산소성 대사로의 전위가 일어난다(Carvalho RA 등, 2010). 이러한 현상은 심부전에서 공통적으로 나타나는 특징이다. DOX에 의해 초래되는 미토콘드리아의 대사변화는 미토콘드리아 뿐만 아니라 핵의 전사 단계에도 변화를 일으킨다(Piantadosi CA 등, 2008). 또한, DOX는 eNOS reductase domain에

결합하여 O2-의 생성을 일으킨다. DOX의 농도가 증가함에 따라 eNOS는 산화질소(NO) 생산자에서 초과산화물 생산자로 변하는데, 이렇게 생산된 O2-는 DOX에 의한 심근손상에 중요한 역할을 한다(Vasquez-Vivar J 등, 1997). 한편, DOX가 철과 복합체를 형성하면 지방산화를 초래하고(Kappus H 등, 1980), 자유 철의 존재 하에서 DOX의 환원은 자유 라디칼 생성을 촉진시킨다. DOX의 대사체인 doxorubicinol은 단백의 thiol group과 반응하여 세포에 손상을 초래한다(Xu X 등, 2005).

Reactive oxygen species(ROS)는 출처에 관계없이 DOX에 의한 심근손상에 치명적인 역할을 하는데, 심근세포의 방어효소를 파괴할 뿐 아니라, 조절단백과의 상호작용을 통해 유전자 발현 또한 변성시킨다. 그리고, 막결합단백을 비롯한 단백질의 3차원 구조를 변성 시키고, 칼슘이온의 방출을 증가시켜 심근의 손상을 초래한다(Dhalla NS 등, 2000). DOX에 의한 산화 스트레스에 의해 초래되는 심근 손상은 항산화제인 비타민 E를 투여 해도 완화되지 않는다(Bjelogrlic SK 등, 2005). 따라서, ROS를 제거하는 것 보다는 이에 의한 세포의 반응을 조절하는 방안을 연구하는 것이 DOX에 의한 심근 손상을 예방하는데 더욱 효과적일 것으로 생각된다. 분비성 Hsp은 proteasome의 기능을 보존하고(Ding 등, 2001), 세포구조물의 안정화에 관여하고(Singh BN 등, 2007), 세포자멸사의 신호전달체계를 cycochrome c와 apoptosome 단계에서 억제한다(Bruey JM 등, 2000; Paul C 등, 2002). 또한, caspase와 반응하고, Bax, Bcl, Xs을 억제함이 알려져 있다(Liu S 등, 2007). 분비성 clusterin 또한 이러한 기능을 가지는 것이 밝혀지고 있다. Clusterin gene promotor 내에 산화조절인자로 알려진 Activator Protein-1과 HSF-1이 함께 존재하는데(Jin G 등, 1997), clusterin gene promotor는 산화자극에 매우 민감하게 반응한다. Clusterin은 Hsp과 같은 기능을 가지지만, 세포질그물을 표적으로 하는

소수성 신호단백과 반응하여 세포의 막성분(세포질그물, 골지체, 분비단백질과 세포질)과 세포 외액에 발현하는 점이 특이하다(Calero M 등, 2005; Shannan B 등, 2006; Trougakos IP 등, 2002).

DOX에 의한 산화 스트레스가 심근세포의 자멸사를 일으키는데에는 세포자멸사의 내인성 및 외인성경로가 모두 관여할 것으로 생각된다(Nitobe J 등, 2003). DOX가 세포 자멸사에 관여하는 것은 ROS 생성에 관여하는 것 외에 매우 복합적이다. 예를 들어 DOX에 의해 유발된 산화스트레스는 heat shock factor-1 (HSF-1)을 활성화시켜 Hsp25를 생성시키고 이는 항자멸사단백질인 p53을 활성화 시킨다(Vedam K 등, 2010). Chaperone 분자로 알려진 heat–shock family는 단백을 안정화시켜 세포 보호 효과를 나타내는데, Hsp27은 산화 스트레스를 조절하고 미토콘드리아의 기능을 유지시켜 DOX에 의해 유발되는 세포자멸사를 억제한다. Hsp10과 Hsp60은 Bcl-2 단백의 post-transcriptional modification을 증가시켜 항사멸효과를 일으킨다(Shan YX 등, 2003). Hsp20은 세포 생존경로의 하나인 Akt 인산화를 지속시켜 DOX에 대한 보호효과를 유발한다(Fan GC 등, 2008). 어떤 Hsp은 세포 외로 분비되어 toll-like receptors(TLR)의 ligand로 작용한다(Kim SC 등, 2009). 생체 내에 DOX를 투여하였을 때, TLR 매개 신호는 proinflammatory nuclear-factor κB (NFκB)를 통해 cytokine의 생성과 세포자멸사, 심장 기능장애를 일으킨다(Nozaki N 등, 2004). 또한, caspase 활성도 DOX에 의해 영향을 받는데, DOX을 투여하면 세포자멸사의 공통경로인 caspase-3의 활성이 증가한다(Ueno M 등, 2006). DOX가 어떠한 경로를 통해 caspase-3를 활성화 시키는지는 아직 뚜렷이 밝혀지지 않았다.

이러한 사실을 바탕으로 저자는 세포 외로 분비되어 Hsp과 같이 chaperone역할을 수행하는 것으로 알려진 clusterin이 DOX에 의해

유발되는 심근 손상에 어떻게 관여하는가 알아보았다. H9c2 심근세포에 DOX를 처치하면 clusterin의 발현이 증가하는데, 농축된 세포배양액에서 clusterin의 발현이 증가되는 소견은 H9c2 심근세포가 분비성 clusterin을 생성함을 의미한다. 저자는 clusterin의 과발현이 유도된 H9c2/hCLU 세포주를 제작하여 H9c2 심근세포에 비해 DOX 처치에 대한 세포생존율이 유의하게 증가하고, cleaved-caspase 3의 활성이 감소하는 것을 관찰하였다. 이로써 clusterin은 DOX에 의해 유발되는 세포손상에 보호효과를 가지고, clusterin의 항사멸기전에는 세포자멸사 경로인 caspase-3가 일정 부분 관여 하는 것을 확인할 수 있었다. 정상 심근세포에서 clusterin이 어떠한 기전을 통해 DOX에 대해 세포보호효과를 가지는지는 아직까지 연구된 바가 없다.

Clusterin이 정상 심방조직 내에 clusterin이 발현하는 것은 이미 알려진 사실이지만, 본 연구에서는 DOX에 의해 심방 내의 clusterin의 발현이 더욱 증가하는 것이 관찰되었다. 주로 상피세포와 체액에 존재하는 clusterin이 심방의 근육세포에 존재하면서 심장의 병태생리에 어떠한 역할을 수행하는지 연구하는 것은 매우 흥미로울 것으로 생각된다. Clusterin은 정상 심실근육세포에서은 발현되지 않는데, DOX을 투여하면 백서의 심실근육세포에 clusterin이 발현되는 것이 관찰되었다. Clusterin의 발현부위가 세포질에 존재하는 것과 in vitro 실험결과를 종합해 볼 때, DOX에 의해 발현된 clusterin은 항사멸효과를 나타내기 위한 방어기전이 아닐까 추측해 볼 수 있다. 허혈성 심근 경색과 심근염에서 심실의 근육세포가 clusterin의 발현을 증가시키는 소견이 관찰되는데(Swertfeger DK 등, 1996), 이러한 변화는 압력 부하에 의한 심비대에서는 관찰되지 않는다. 따라서 clusterin의 과발현은 비특이적인 자극이 아닌 산화스트레스나 염증 반응과 같은 특정 자극에 대해 심근에 보호 역할을

할 것으로 유추할 수 있다(Krijnen PA 2005).

본 연구는 몇 가지 제한점을 가진다. 첫째로, H9c2/hCLU 심근세포의 생존율 향상을 좀더 객관적으로 확증하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 세포 생존율을 좀더 정량화된 계측 방법을 통해 측정하고, small interfering RNA를 이용하여 clusterin을 차단하였을 때 세포사가 증가함을 확인하여 clusterin의 DOX에 대한 세포보호효과를 확증하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 둘째로, 본 논문에 나타난 caspase-3의 활성 감소가 clusterin이 보인 세포보호효과의 주된 원인이라고 단언할 수는 없다. Clusterin은 chaperone 기능을 통해 다양한 기전으로 세포보호효과를 나타내므로 capase-3 저해제와 clusterin을 동시에 투여하여 비교 연구를 수행하면 clusterin이 보호효과를 나타내는 또 다른 기전이 존재하는지 추정해 볼 수 있다. 셋째로, clusterin에 의해 나타난 capase-3의 활성 감소가 어떠한 경로를 통하는지 좀더 세분화 시켜 규명할 필요가 있다. 이에 대해서는 다른 연구들을 참조해 볼 수 있다. DOX와 같이 산화 스트레스를 유발하는 H2O2를 H9c2 심근세포에 가하였을 때, clusterin을 전처치하면 DOX에 의한 세포자멸사가 완화된다. 이러한 보호효과에는 clusterin이 Akt/GSK-3β 인산화를 촉진시켜 Bcl-2 family를 조절하고, cytochrome c의 방출과 caspase 활성을 억제는 기전이 작용한다(Jun HO 등, 2011). Akt/GSK-3β경로 외에도 분비성 clusterin은 ku70/Bax 복합체를 안정화시켜 Bax에 의해 유도 되는 세포자멸사를 억제한다(Pucci S 등, 2009). 또한, clusterin은 iKbα를 안정화시켜, NF-κB의 방출을 도와 세포자멸사를 억제한다(Takase O 등, 2008). Clusterin의 이러한 세포보호기전이 DOX에 의한 심근세포손상에도 적용되는지 좀더 심도 있는 연구가 필요하다. 전립선세포에서 관찰되는 것과 달리 H9c2 심근세포에서 H_2O_2에 대한 clusterin의 보호효과는 megalin 수용체와는

독립적으로 나타남이 보고되어(Jun HO 등, 2011) clusterin의 보호효과는 작용기관에 따라 다른 기전을 사용할 수 있음을 유추할 수 있다. 따라서, 이미 다른 생체기관에서 입증된 clusterin의 세포보호효과가 심혈관계에서는 어떻게 작용하는지 좀더 많은 연구가 필요하다. 넷째로, 본 연구에서는 DOX의 주입에도 불구하고 백서에게 명확한 심근증이 유발되지 않아 제한점을 가진다. Clusterin은 핵 내 발현과 세포질 내 발현이 다른 효과를 보인다. 저용량의 방사선 조사에서는 분비성 clusterin이 발현하지만 고용량의 방사선 조사에서는 세포 내에 핵 clusterin이 출현한다(Klokov D 등, 2005). DOX에 의한 심근 독성은 투여 24-48시간과 3주경에 걸쳐 이상성으로 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 다양한 용량과 기간의 *in vivo* 모델을 통하여 clusterin의 발현 양상을 살펴보는 것은 DOX 유발성 심근증의 병태생리를 밝히는데 흥미로운 단서를 제공할 것으로 생각된다. 또한, *in vivo* 모델에 외인성 clusterin을 주입하거나 clusterin knock out mouse를 통한 실험으로 *in vivo* 모델에서도 clusterin이 DOX에 대해 세포보호효과를 가지는가 확인하는 연구를 계획해 볼 수 있다.

본 연구는 DOX에 의한 손상에 심근세포가 반응하는 기전을 밝히는데 도움을 줄 것으로 생각되지만, 임상적 이용에는 제한이 있다. Clusterin은 항세포자멸효과를 통해 암세포에서도 보호효과를 지니므로, DOX를 치료받는 악성종양환자에서 심근증을 예방하기 위해 clusterin을 사용하는 것은 어려울 것으로 생각된다. 역으로 현재 항암효과를 증대시키기 위해 시행되고 있는 항 clusterin 치료가 DOX 유발성 심근증의 위험인자로 작용하는가에 대한 주의 깊은 관찰이 필요하다. 그리고, DOX 유발성 심근증이 개인에 따라 서로 다른 축적량에서 발병하는 이유는 아직까지 확실히 밝혀지지 않았다. DOX를 투여 받는 환자에서 혈액 내에

clusteirn의 농도를 monitoring 하여 이것이 항암효과와 DOX 유발성 심근증의 발생과 상관관계를 가지는지 분석하여 나이, 성별, 기저질환과 같은 요소 외에 DOX 유발성 심근증의 위험군을 개별화하고, DOX 유발성 심근증의 예방 지침을 확립하는 단서를 제공하는지 연구해 보는 것도 가치가 있을 것으로 생각된다.

결 론

DOX을 투여하면 H9c2 심근세포와 백서의 심장근육세포에서 clusterin의 발현이 증가한다. 이 때, clusterin은 분비성 형태로 발현된다. 저자는 H9c2/hCLU 심근세포 모델을 통해서 clusterin의 발현은 DOX에 대해 세포보호효과를 나타내고, 이 과정에는 clustrin이 세포자멸사의 공통경로인 caspase-3의 활성을 억제하는 것이 하나의 기전으로 작용함을 확인하였다. *In vivo*에서 DOX 투여에 의해 나타나는 clusterin의 발현이 어떠한 의미를 가지는지는 좀더 연구가 필요하다.

참고문헌

Bailey RW, Dunker AK, Brown CJ, Garner EC, Griswold MD. Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. Biochemistry 2001;40(39):11828-11840.

Bartl MM, Luckenbach T, Bergner O, Ullrich O, Koch-Brandt C. Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. Exp Cell Res 2001;271(1):130-141.

Bettuzzi S, Hiipakka RA, Gilna P, Liao ST. Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis. Biochem J 1989;257:293–296.

Bjelogrlic SK, Radic JV, Jovic S. Radulovic Activity of d,l-alpha-tocopherol (vitamin E) against cardiotoxicity induced by doxorubicin and doxorubicin with cyclophosphamide in mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2005;97:311–319.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Gurbuxani S, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol 2000;2:645–652.

Caccamo AE, Desenzani S, Belloni L, Borghetti AF, Bettuzzi S. Nuclear clusterin accumulation during heat shock response: Implications for cell survival and thermo-tolerance induction in immortalized and prostate cancer cells. J Cell Physiol 2006;207:208–219.

Calero M, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J. Clusterin and Alzheimer's disease.

Subcell Biochem 2005;38:273–298.

Carvalho RA, Sousa, RP, Cadete VJ, Lopaschuk GD, Palmeira CM, Bjork JA. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. Toxicology 2010;270:92–98.

Choi-Miura NH, Takahashi Y, Nakano Y, Tobe T, Tomita M. Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). J Biochem 1992;112(4):557-561.

Cubedo J, Padró T, García-Moll X, Pintó X, Cinca J, Badimon L. Proteomic signature of Apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction. J Proteome Res 2011; 10(1):211-220.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J Hypertens 2000;18:655–673.

Ding Q, Keller JN. Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: Implications for heat shock proteins. J Neurochem 2001;77:1010–1017.

Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. Clin Invest 1980;65:128–135.

Fan GC, Zhou X, Wang X, Song G, Qian J, Nicolaou P, et al. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. Circ Res 2008;103:1270–1279.

Fritz IB, Burdzy K, Setchell B, Blaschuk O. Ram rete testis fluid contains a protein(clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. Biol Reprod 1983;28(5):1173-1188.

Gottdiener JS, Mathisen DJ, Borer JS, Bonow RO, Nyers CE, Barr LH, et al. Doxorubicin cardiotoxicity: assessment of the left ventricular dysfunction by radionuclide cineangiography. Ann Intern Med 1981;94:430-435.

Grenier MA, Lipshultz SE. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. Semin Oncol 1998;25(4 Suppl 10):72-85.

Hershman DL, McBride RB, Eisenberger A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 2008;26:3159–3165.

Héon S, Bernier M, Servant N, Dostanic S, Wang C, Kirby GM, Alpert L, Chalifour LE. Dexrazoxane does not protect against doxorubicin-induced damage in young rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(2):H499-506.

Jenne DE, and Tschopp J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: Identity tosulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:7123–7127.

Jenne DE, and Tschopp J. Clusterin: The intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. Trends Biochem Sci 1992;17:154–159.

Jin G, Howe PH. Regulation of clusterin gene expression by transforming growth

factor beta. J Biol Chem 1997;272(42):26620-26626.

Jones SE, Jomary C. Clusterin. Int J Biochem Cell Biol 2002;34(5):427-431.

Jun HO, Kim DH, Lee SW, Lee HS, Seo JH, Kim JH, et al. Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3β signaling pathway. Exp Mol Med 2011;43(1):53-61.

Kappus H, Muliawan H, Scheulen ME. In vivo studies on Adriamycin-induced lipid peroxidation and effects of ferrous ions. Dev Toxicol Environ Sci 1980;8:635–638.

Kim JH, Yu YS, Kim JH, Kim KW, Min BH. The role of clusterin in in vitro ischemia of human retinal endothelial cells. Curr Eye Res 2007;32:693–698.

Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, Wang Y, et al. Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. Circ Res 2009;105:1186–1195.

Kirszbaum L, Sharpe JA, Murphy B, d'Apice AJ, Classon B, Hudson P, et al. Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems. EMBO J 1989;8(3):711-718.

Klokov D, Criswell T, Leskov KS, Araki S, Mayo L, Boothman DA. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. Mutat Res 2004;568(1):97-110.

Krijnen PA, Cillessen SA, Manoe R, Muller A, Visser CA, Meijer CJ, et al. Clusterin: a protective mediator for ischemic cardiomyocytes? Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289(5):H2193-2202.

Liu S, Li J, Tao Y, Xiao X. Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2007;354:109–114.

McLaughlin L, Zhu G, Mistry M, Ley-Ebert C, Stuart WD, et al. Aronow BJ. Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. J Clin Invest 2000;106(9):1105-1113.

Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME, Ruccione K, et al. Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. Journal of Clinical Oncology 2001;19:3163-3172.

Miyake H, Chi KN, Gleave ME. Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. Clin Cancer Res 2000;6(5):1655-1663.

Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M, Nozaki N, Sata M, Miyamoto T, et al. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. Cardiovasc Res 2003;57:119–128.

Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. Circulation

2004;110:2869–2874.

O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Tendler C, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versusconventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. Ann Oncol 2004;15(3):440-449.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. J Mol Cell Cardiol 2012;52(6):121312-25.

Paiva MG, Petrilli AS, Moisés VA, Macedo CR, Tanaka C, Campos O. Cardioprotective effect of dexrazoxane during treatment with doxorubicin: a study using low-dose dobutamine stress echocardiography. Pediatr Blood Cancer 2005;45(7):902-908.

Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Virot S, Arrigo AP. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. Mol Cell Biol 2002;22:816–834.

Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker HB. Suliman Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. Circ Res 2008;103:1232–1240.

Poon S, Treweek TM, Wilson MR, Easterbrook-Smith SB, Carver JA. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. FEBS Lett 2002;513(2-3):259-266.

Poulakou MV, Paraskevas KI, Wilson MR, Iliopoulos DC, Tsigris C, Perrea D, et

al. Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease. In Vivo 2008;22(4):537-542.

Pucci S, Mazzarelli P, Sesti F, David AB, Spagnoli LG. Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax–Ku70–Clusterin interactions in human colon cancer progression Cell Cycle 2009;8: 473–481.

Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, et al. The gene for SP-40, 40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8. Genomics 1991;10(1):151-156.

Rhoden W, Hasleton P, Brooks N. Anthracyclines and the heart. British Heart Journal 1993;70:499–502.

Rizzi F, Bettuzzi S. Targeting Clusterin in prostate cancer. J Physiol Pharmacol 2008;59 Suppl 9:265-274.

Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: Physiologic and pathophysiologic considerations. Int J Biochem Cell Biol 1995;27:633–645.

Sallman DA, Chen X, Zhong B, Gilvary DL, Zhou J, Wei S, Djeu JY. Clusterin mediates TRAIL resistance in prostate tumor cells. Mol Cancer Ther 2007;6:2938–2947.

Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. Circ Res 1999;84(3):257-265.

Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Prog Lipid Res 2000;39:257–288.

Shan YX, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. J Mol Cell Cardiol 2003;35:1135–1143.

Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Reichrath J, et al. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. Cell Death Differ 2006;13(1):12-19.

Singh BN, Rao KS, Ramakrishna T, Rangaraj N, Rao CM. Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: Role in modulating actin filament dynamics in vivo. J Mol Biol 2007;366:756–767.

Sorensen K, Levitt G, Bull C, Chessells J, Sullivan I. Anthracycline dose in childhood acute lymphoblastic leukemia: issues of early survival versus late cardiotoxicity. J Clin Oncol 1997;15(1):61-68.

Stewart EM, Aquilina JA, Easterbrook-Smith SB, Murphy-Durland D, Jacobsen C, Wilson MR. Effects of glycosylation on the structure and function of the extracellular chaperone clusterin. Biochemistry 2007;46(5):1412-1422.

Swertfeger DK, Witte DP, Stuart WD, Rockman HA, Harmony JA. Apolipoprotein J/clusterin induction in myocarditis: A localized response gene to myocardial injury. Am J Pathol 1996;148(6):1971-83.

Takase O, Minto AW, Puri TS, Cunningham PN, Jacob A, Hayashi M, Quigg

RJ.Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. Kidney Int. 2008; 73(5):567-577.

Tenniswood, M, Wang X, Lakins, J, Morrissey, C, O'Sullivan, J, Tang, H. Clusterin in the male reproductive tract. J Androl 1998;191(5):508-516.

Trougakos IP, Gonos, ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer .Int. J Biochem Cell Biol 2002;34:1430–1448.

Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. J Pharmacol Sci 2006;101:151–158.

Van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LCM. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. Cochrane Database of Systematic Reviews 2008;16(2):CD003917.

Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard K, Kalyanaraman B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. Biochemistry 1997;36:11293–11297.

Vedam K, Nishijima Y, Druhan LJ, Khan M, Moldovan NI, Zweier JL, et al. Role of heat shock factor-1 activation in the doxorubicin-induced heart failure in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;298:1832–1841.

Xu X, Persson HL, Richardson DR. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. Mol Pharmacol 2005;68:261–271.

Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. Toxicol Lett 2001;121(3):151-157.

Abstract

Introduction: Doxorubicin(DOX) is highly effective anti-neoplastic agent used to treat many solid tumors and hematologic malignancy. The clinical use of DOX is limited by the risk of irreversible cardiotoxity. Clusterin is a glycoprotein found nearly ubiquitous in body fluids and tissues. Clusterin acts cytoprotective chaperone during many types of physical and pathological stresses. This study was performed to confirm the up-regulation of clusterin expression in DOX treated rat myocardial tissue and to investigate the cytoprotective effect of clusterin from DOX-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes.

Methods: Change of clusterin expression in H9c2 cardiomyocytes after DOX treatment was measured for 24ours by western blot. To investigate the effect of clusterin on cell survival, H9c2/hCLU cardiomyocytes which overexpress clusterin were made by the transfection of pcDNA3/hCLU to H9c2 cardiomyocytes. After DOX treatment, cell viability was compared between H9c2 cardiomyocytes and H9c2/hCLU cardiomyocytes by trypan blue stain and DAPI stain. As a common pathway of apoptosis, caspase-3 activity in both cells was compared by western blot after DOX treatment. Sprague-Dawley rats were treated tridaily with intraperitoneal injection of DOX (2.5mg/kg, study group) and saline (control group) for 18days. On the 23th days, the rats were sacrificed. Both atrial and ventricular tissues were analyzed with light microscopy and fluorescence microscopy; hematoxylin-eosin stain, Masson's trichrome stain, TUNEL assay, immunohistochemical stain and immunofluorescence stain for clusterin and cleaved caspase-3.

Results: Clusterin was up-regulated in lysate and media of H9c2

cardiomyocytes after DOX treatment. Trypan blue stain showed an increase of cell viability in H9c2/hCLU cardiomyocytes compared to H9c2 cardiomyocytes against DOX treatment (58.3±10.4% vs 78.4 ±1.23%, $P<0.003$). DAPI stain of H9c2/hCLU cardiomyocytes showed the decrease of chromatin fragmentation and nuclear condensation compared to H9c2 cardiomyocytes. Clusterin was inversely correlated with DOX-induced release of caspase-3 in H9c2 cardiomyocytes. In immunohistochemical stain of DOX-treated rat ventricular myocardium, reddish cytoplasmic staining of clusterin was observed in cardiomyocytes.

Conclusions: Secretory clusterin is up-regulated in H9c2 cardiomyocytes and rat ventricular cardiomyocytes against DOX-induced cell injury. In H9c2/hCLU cardiomyocytes models, clusterin showed cytoprotective effect from DOX-induced cell death. Anti-apoptotic effect via caspase-3 pathway take part in the cytoprotective role of clusterin against DOX.

Keywords: clusterin, DOX, H9c2 cardiomyocytes, apoptosis, protective effect

Student Number: 2005-30642