

# 아드리아마이신으로 유도된 심근증에서 Metalloproteinase, Metalloproteinase 조직억제자, Cytokine 유전자 발현에 대한 연구

이화대학교 의과대학 동대문병원 소아과

홍 영 미

## Gene Expression of Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Cytokines in Adriamycin-induced Cardiomyopathy

Young Mi Hong, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

**Purpose :** Changes in metalloproteinases(MMP) activity have been demonstrated in several disease states, including rheumatoid arthritis and tumor metastasis. More importantly, increased myocardial MMP activity has been reported to occur in both clinical and experimental forms of dilated cardiomyopathy. There was no report about MMP in adriamycin(ADR)-induced cardiomyopathy. The purpose of this study was to investigate gene expression of MMP and tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP) in ADR-induced cardiomyopathy and clarify the relationship between MMP and cytokines.

**Methods :** Male Sprague-Dawley rats were divided into two groups. The first group was control. The second group was given intraperitoneal injections of ADR(5 mg/kg) twice a week over two weeks. Serum concentrations of MMP, TIMP, interleukin(IL)-6 and tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  were measured. RNA extraction was performed from frozen rat hearts. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was employed. cDNA Microarray analysis was performed by using a set of 5,184 sequence-verified rat cDNA clones.

**Results :** Serum MMP and TIMP levels were not significantly different between the two groups. IL-6 was  $36.8 \pm 2.8$  pg/mL and TNF- $\alpha$   $2.2 \pm 2.7$  pg/mL in the ADR group. They were significantly higher than in the control group. Serum MMP correlated significantly with TNF- $\alpha$  ( $r=0.41$ ,  $P<0.05$ ). There was no gene expression of MMP, IL-6 or TNF- $\alpha$  in the hearts of both groups. Gene expression of TIMP was significantly depressed in the hearts of the ADR group.

**Conclusion :** These results suggested a potential role for TNF- $\alpha$  in the regulation of extracellular matrix remodeling in ADR induced cardiomyopathy. Rapid screening of multiple decreased gene expression by DNA chip may be a useful diagnostic test to detect early cardiac injury before developing ADR induced cardiomyopathy. (Korean J Pediatr 2005;48:197-203)

**Key Words :** Gene, Metalloproteinases, Cytokines, Adriamycin

### 서 론

아드리아마이신은 널리 쓰이고 있는 항암제이나, 심장 독성으로 인해 사용이 제한되고 있다. 아드리아마이신으로 인한 심장 독성의 급성 효과는 약 투여 중단 후에 사라지는 일시적인 심전도 변화와 저혈압, 빈맥, 다양한 부정맥을 들 수 있다<sup>1)</sup>. 심장 독성의 만성 효과는 심부전증으로 용량이 누적되어 일어나고, 증상

이화여자대학교 동대문병원 임상 연구비로 이루어진 논문임.

접수 : 2004년 9월 10일, 승인 : 2004년 10월 9일

책임저자 : 홍영미, 이화의대 동대문병원 소아과

Correspondence : Young Mi Hong, M.D.

Tel : 02)760-5427 Fax : 02)745-9545

E-mail : hongym@chollian.net

이 점점 진행되고 비가역적으로 일어난다<sup>2)</sup>. 심부전증은 심근 조직의 손상 정도와 직접 관계가 있다. 아드리아마이신으로 심근 손상이 오면 질병 경과가 진전함에 따라 심근 섬유화나 피사 및 석회화가 일어나고 그 이후 좌심실 개조 과정을 거치면서 심실 벽 긴장의 증가, 연속적인 펌프 기능의 이상을 초래한다. 확장성 심근증으로 진행되면서 좌심실 안에서 콜라겐 구조와 성분의 변화가 일어나고 이것이 좌심실 기하에 영향을 미칠 수 있음이 보고되었다<sup>3-5)</sup>.

최근에 cytokine은 만성 심부전<sup>6)</sup>, 바이러스 심근염<sup>7-9)</sup>, 심근증<sup>10, 11)</sup>, 심근 경색<sup>12)</sup>, 심장 이식<sup>13)</sup>, 패혈증에 인한 쇼크가 있을 때에 증가하며 cytokine의 증가가 이들 질환의 병인과 진행에 관계가 있다고 알려져 있다. 심부전증과 관련해서 전염증성(proinflammatory) cytokine에 대한 관심이 많아졌다<sup>14-16)</sup>. 만성 심부전증 환자에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6와 같은 cytokine이 증가되어 있으나 증가되는 기전과 형성되는 장소에 대해서는 아직 확실치 않아 알려져 있지 않다<sup>14)</sup>. 심근에서의 TNF- $\alpha$ 의 발현은 확장형 심근증의 병인에 중요한 역할을 하고 있다는 것이 제시되었고, 바이러스 복제와 자가면역 기전에 의해 유발되는 IL과 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 cytokine은 확장형 심근증의 병인적 요인일 수 있다<sup>10, 11, 17-19)</sup>. 그러나 아드리아마이신으로 유발된 심근 손상에서의 cytokine의 변동에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

최근 조직 손상에 따르는 조직 재생에서의 MMP와 TIMP에 대한 중요성이 크게 대두되고 있다. 이들 MMP나 TIMP에 대하여 최근에 연구되고 있으나 심근염이나 심근증과 같은 심장병에서의 연구는 적은 실정이다.

아드리아마이신으로 유도된 심근증에서 MMP, TIMP 유전자 발현을 연구하고 cytokine과의 관련성을 알아보려고 본 연구를 실시하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

250 g 내외의 Sprague Dawley 쥐 60마리를 2군으로 나누어 실험하였다. 1군을 대조군으로 하고, 2군은 아드리아마이신 5 mg/kg을 1주일에 2번씩 복강 내 주사하였다. 모든 동물은 아드리아마이신 투여 후 2주에 전신 상태를 관찰하였다. 아드리아마이신을 투여한 쥐에서는 투여 2주에 복수를 비롯한 심부전증 증상이 관찰되었다. 투여 후 2주에 쥐를 희생시키기 전에 복부 대동맥에서 혈액을 채취하였고 심장은 -70°C에 분리하여 보관하였다.

### 2. 방법

#### 1) Enzyme linked-immuno-sorbent assay(ELISA)

##### (1) 혈청 IL-6, TNF- $\alpha$ 측정

쥐에 특이한 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 단 클론 항체가 microtiter strip에 코팅되어 있는 Amersham(Minneapolis, USA) 사 kit를

이용하여 ELISA 원리로 검사하였다. 여기에 검체 및 알고 있는 표준 시약을 넣어 배양하였고, 세척과정을 하고 biotinylated된 IL-6, TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 첨가하여 2번째 배양하였다. 2번째 세척과정을 실시한 후 Streptavidin peroxidase를 넣고 3번째 배양하였다. 3번째 세척과정을 실시한 후 기질 용액을 넣고 발색시켰다. 반응 정지액을 넣고 450 nm에서 ELISA 판독기로 측정하였다.

##### (2) 혈청 MMP-2와 TIMP-3의 측정

ELISA 원리를 이용하여 Amersham(Minneapolis, USA) 사의 MMP-2와 TIMP-3 kit을 이용하였다. 각 kit의 standard well에 각각 100  $\mu$ L의 buffer 및 표준 시약을 넣은 후 검체 역시 100  $\mu$ L를 well에 분주하였다. 플레이트 뚜껑을 닫은 후 실온에서 2시간 배양하였다. 완충액을 이용하여 4번 wash buffer를 이용하여 세척한 후 종이를 사용하여 검체가 남지 않도록 blot 하였다. 다시 100  $\mu$ L의 peroxidase conjugate를 well에 분주한 후 다시 뚜껑을 닫은 후 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 같은 방법으로 다시 세척한 후 실온에 보관 중인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함되어 있는 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 용액 100  $\mu$ L씩 well에 분주한 후 뚜껑을 닫고 30분 실온에서 배양하여 발색이 되면 630 nm에서 ELISA 판독기로 측정하였다.

##### 2) 심장 조직의 RT-PCR

심장의 일부를 분쇄하여 total RNA를 추출하였고, RNA 1  $\mu$ g을 주형으로 oligo-dT primer와 reverse transcriptase를 사용하여 42°C에서 1시간 반응시켜 첫 번째 가닥 DNA를 얻었다. 각각의 첫 번째 DNA를 주형으로 GAPDH, IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-2, TIMP-3 유전자 primer(Table 1)를 이용하여 PCR (denaturation 94°C, 30초; annealing 58°C, 1분; extension 72°C, 1분; 28 cycle)로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 전기 영동하여 polaroid 필름으로 촬영하였다.

##### 3) DNA chip을 이용한 유전자 검색

Annealing 반응은 Cy3와 Cy5로 RNA 100  $\mu$ g을 사용하였으며 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N-3'을 oligo dT primer로 사용하였다. 10분 동안 65°C까지 가열하였다.

**Table 1.** Gene-specific Primer Sequences for Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Control	HYM-1	5'-CTCTGATCGAGGCTCACTTC-3'
	HYM-2	5'-TTCTGGTTGTCGTTGATCCT-3'
IL-6	HYM-3	5'-CCGAGAGGAGACTTCACAG-3'
	HYM-4	5'-GAGCATTGGAAGTTGGGGTA-3'
TNF- $\alpha$	HYM-5	5'-TGCCTCAGCCTCTTCTCATT-3'
	HYM-6	5'-CCCATTTGGGAACCTCTCCT-3'
MMP-2	HYM-7	5'-TCCCGTTATGAGACCTGAG-3'
	HYM-8	5'-GACGCAGAGAACCCTGAGAG-3'
TIMP-3	HYM-9	5'-CACGGAAGCCTCTGAAAGTC-3'
	HYM-10	5'-TCTCCACAAAGTTGCACAGC-3'

IL: Interleukin, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , MMP: Metalloproteinase, TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases

열음에 냉각시키고 Cy3 and Cy5 반응의 각각을 반응전 혼합물 9.6  $\mu\text{L}$ 에 섞었다. Cy3-dUTP(NEN, 1mM)와 Cy5-dUTP(NEN, 1 mM)을 각각 Cy3 반응 튜브와 Cy5 반응 튜브에 3  $\mu\text{L}$ 씩 넣었다. Superscript II(Gibo-BRL, 200  $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ ) 효소를 2  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 빨리 돌린후 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 배양하였다. 각각의 산물을 QIA quick PCR purification kit(Qiagen, Hiden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 마지막 세척분리한 용적을 각각 100  $\mu\text{L}$ 로 세척분리하였다. PolyA RNA와 yeast RNA는 물에 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 완전히 녹인 후에 aliquot하여 냉동보관한 후 두 개의 probe를 섞었다. 섞은 probe를 Microcon-30 tube(millipore)에 적용하였다. 원하는 용적(32  $\mu\text{L}$ )을 상층에 얻을 때까지 14,000 g에서 돌렸다. 깨끗한 튜브로 옮긴 다음 20X SSC와 10% SDS를 첨가하였다. 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 동안 변성(denaturation)시키고, 14,000 g에서 2분 동안 돌렸다. GT hybridization chamber<sup>TM</sup>의 well에 3X SSC을 넣고 그 위에 반응할 chip 슬라이드를 놓았다. 핀셋과 yellow tip을 이용하여 cover slip을 덮었다.

라벨된 DNA probe를 잘 섞어서 cover slip 바깥쪽에 대고 조심스럽게 넣었다. 뚜껑을 덮고 GT chamber station<sup>TM</sup>에 얹어서 65 $^{\circ}\text{C}$  water bath에 담갔다. 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 hybridization하였다. 세척 용액을 준비하여 세척하고 600 rpm에서 5분 동안 건조하게 돌리고 scan array 하였다(Fig. 1).

### 3. 통계처리

평균치와 표준편차를 구하고 t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다. 혈청 MMP와 TNF- $\alpha$ 와의 상관관계는 Pearson 상관계수로 구하였다.

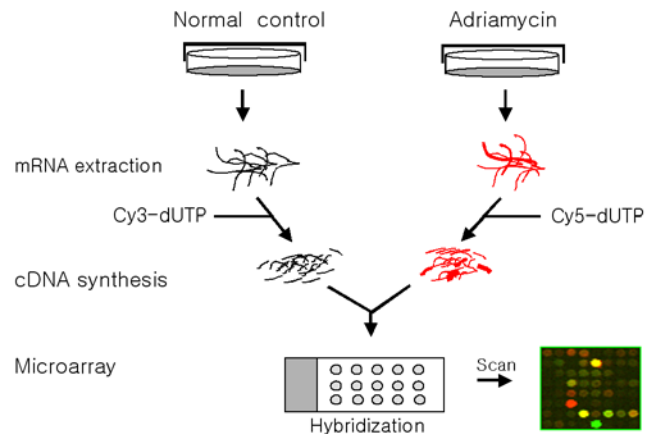
## 결 과

### 1. 혈청 IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-2, TIMP-3 수치

혈청 IL-6는 아드리아마이신군에서 36.8 $\pm$ 2.8 pg/mL, 정상군에서 0 pg/mL으로 아드리아마이신군에서 유의하게 증가하였고 ( $P<0.05$ ), TNF- $\alpha$ 도 아드리아마이신군에서 2.2 $\pm$ 2.7 pg/mL, 정상군에서 0 pg/mL으로 아드리아마이신군에서 유의한 증가를 보였다( $P<0.05$ ). 혈청 MMP-2는 아드리아마이신군에서 0.1 $\pm$ 0.1 ng/mL, 대조군은 0 ng/mL이었고, TIMP-3는 아드리아마이신 투여군과 정상군에서 0 ng/mL로 두 군간에 유의한 차이가 없었다(Table 2). 혈청 MMP와 TNF- $\alpha$ 는  $r=0.41$ 로 유의한 양의 상관관계를 나타냈다(Fig. 2).

### 2. 심근 조직의 RT PCR에 의한 유전자 발현

심근 조직 PCR에 의한 유전자 발현을 보면 아드리아마이신 투여군에서 MMP-2, IL-6, TNF- $\alpha$ 는 발현되지 않았고, TIMP-3는 대조군에 비해 유전자 발현이 감소되었다(Fig. 3).

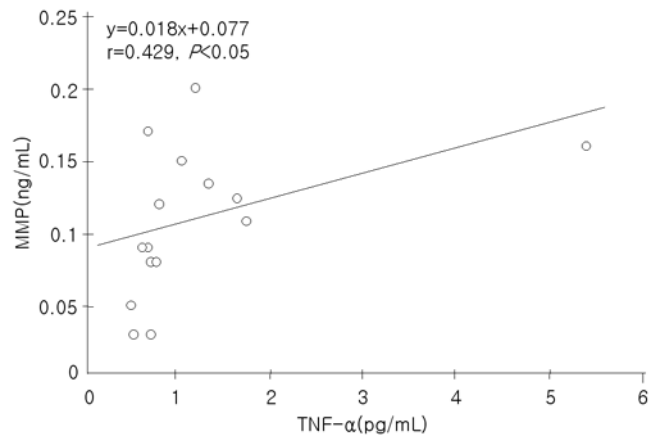


**Fig. 1.** cDNA microarray analysis by cDNA chips. cDNA microarray analysis was performed by using a set of 5,184 sequence-verified rat cDNA clones. N: normal control, Test: adriamycin group.

**Table 2.** Serum Cytokines Levels in Adriamycin and Control Group

Cytokines	Adriamycin	Control	P value
IL-6(pg/mL)	36.8 $\pm$ 2.8	0	<0.05
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	2.2 $\pm$ 2.7	0.5 $\pm$ 0	<0.05
MMP-2(ng/mL)	0.1 $\pm$ 0.1	0	>0.05
TIMP-3(ng/mL)	0	0	>0.05

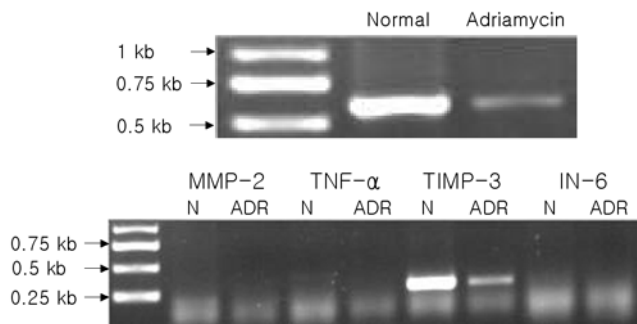
IL: Interleukin, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ , MMP: Metalloproteinase, TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases



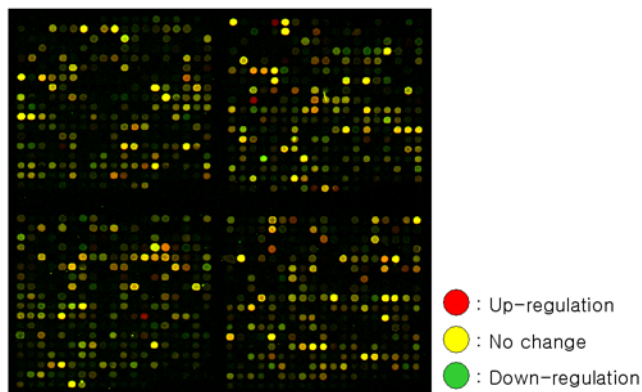
**Fig. 2.** Linear correlation between serum MMP and TNF- $\alpha$  levels. Serum MMP correlated significantly with TNF- $\alpha$  ( $r=0.41$ ,  $P<0.05$ ). MMP: Metalloproteinase, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### 3. DNA chip을 이용한 유전자 발현의 변화

본 연구에서는 5,184 유전자를 검색하였으며 아드리아마이신 투여 후에 발현이 세 가지 양상으로 나타났다. 빨간색으로 나타



**Fig. 3.** Gene expression of MMP, TIMP, TNF- $\alpha$  and IN-6 in the heart by PCR. Gene expression of TIMP was significantly depressed in the heart of adriamycin group. PCR: Polymerase chain reaction, MMP: Metalloproteinase, TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases, IL: Interleukin, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ .



**Fig. 4.** Scan Image by cDNA chips. Red color means up-regulation of gene expression. Yellow color means no change of gene expression. Green color means down-regulation of gene expression.

난 것은 아드리아마이신 투여 후 유전자 발현의 증가를 의미하고, 초록색은 유전자의 감소를 의미하고, 노란색은 유전자 발현의 변화가 없는 경우를 말한다(Fig. 4). 본 연구에서는 심근증에 주로 관여하는 MMP-2, TIMP-3, IL-6, TNF- $\alpha$  유전자 변화를 관찰하였다. 아드리아마이신군에서 IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-2 유전자는 발현되지 않았고, TIMP-3의 유전자 발현은 0.474로 억제되었다.

## 고 찰

아드리아마이신은 소아에서 흔히 사용되고 있는 항암제이나 심근에 대한 독성으로 인하여 사용에 많은 제한을 받고 있다. 누적 용량이 450-500 mg/m<sup>2</sup> 이상인 경우에는 심부전증의 빈도가 증가한다. 심근 독성은 누적 용량과 관련이 있다. 본 연구에서는 아드리아마이신을 1주일에 2번씩 2주간(누적 용량: 20 mg/kg) 투여하여 급성 독성을 일으켰으며, 저자는 이전 연구<sup>20</sup>에서 호흡 곤란, 복수 등의 심부전증의 임상적 관찰과 심장 체중의

증가, 심실 내경의 증가 등의 부검 소견을 보고하여 심근증 모델을 제시하였다. 또한 이전 연구<sup>21</sup>에서 아드리아마이신 투여 후 fetal troponin isoform의 증가로 심근 손상을 증명한 바 있다. 본 연구에서는 아드리아마이신으로 급성 심근증을 유발하여 MMP, TIMP, 및 cytokine 발현에 대해 연구하고자 하였다.

IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 는 면역계에서 유래되었으며 일차적으로 염증을 시작하는 역할을 한다고 생각되어서 항염증성 cytokine으로 분류되고 있으나 근래에 와서는 이 cytokine들은 심근에 존재하는 모든 유핵 세포에서 발현될 수 있다는 것이 보고되었다<sup>22, 23</sup>. 이 cytokine들은 정상 상태에서는 발현되지 않으나 심장이 스트레스를 받으면 신속히 반응하여 표현된다. 심장의 과부하, 허혈, 경색, 심부전, 심근염, 심폐 바이패스, 마그네슘 결핍 등 여러 가지 요인이 스트레스로 작용할 수 있다. 즉 이 cytokine들은 심장이 환경으로부터 어떤 스트레스를 받았을 때 심근이 이에 대한 반응을 시작하고 조정하는 역할을 한다. 염증성 cytokine은 심근세포 비대, 성장, 세포사멸사(apoptosis)의 유도를 포함한 심근 개조(remodeling)와 심부전에 영향을 미칠 수 있다<sup>24</sup>. 심근 개조의 다른 기전으로 세포의 기질의 변형을 들 수 있고 이것은 심근 구조 통합(integrity)을 감소시킨다. IL-1과 TNF- $\alpha$ 는 간질에 있는 콜라겐(interstitial collagen)의 개조를 촉진시킴으로 심실 확장과 심부전에 기여할 수 있다<sup>24</sup>. Cytokine이 단기간 발현되었을 때는 심장에 유리하게 반응하지만 스트레스가 오래 지속되거나 cytokine의 증가가 과도할 때에는 cytokine은 심장에 불리한 반응을 나타낸다. 최근에 심장에 대해서 cytokine이 나쁜 영향을 주는 많은 연구들이 발표되고 있다<sup>9, 10, 25, 26</sup>. Cytokine의 불리한 작용으로는 좌심실 기능 저하, 심근증 발생, 심근 대사 장애, 미토콘드리아의 변화 등이 나타난다.

심부전이 있는 환자에서 cytokine이 증가되어 있으며 이것이 심부전의 병인과 관계가 있을 것이라는 많은 연구자들의 보고가 있다<sup>9, 10, 25, 26</sup>. 그리고 대부분 심부전의 정도가 심할수록 cytokine의 혈청 농도가 높은 것을 볼 수 있다. 만성 심부전증을 가진 환자에서 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6과 같은 전염증성 cytokine이 증가되어 있으나 증가되는 기전과 형성되는 장소에 대해서는 아직 확실히 알려지지 않았다<sup>14</sup>. 심부전 환자에서 cytokine이 상승하는데 세 가지 학설로 설명되고 있다<sup>27</sup>. 첫째는 동물 실험에서 심부전에 빠져있는 심근 자체가 cytokine을 만들 수 있다는 것이다<sup>16, 28</sup>. 두번째 학설은 심부전 때 동반될 수 있는 장벽의 부종으로 인하여 장의 투과성에 변화가 와서 세균이나 내독소가 순환으로 들어가 cytokine을 활성화시킨다는 것이다<sup>29</sup>. 세번째 학설은 저산소증이 cytokine의 상승을 자극한다는 것이다<sup>30, 31</sup>. 혈중 TNF- $\alpha$ 치가 심부전증 환자, 특히 매우 마른 환자에서 올라가 있으며 심부전이 심한 환자일수록 올라가 있음이 관찰되었다<sup>32</sup>. 심부전 환자에서 IL-6이 상승되어 있으며 그 상승은 New York Heart Association의 기능 분류나 심실 기능 장애의 정도와 비례하고 있다<sup>25, 26</sup>.

최근에 확장성 심근증의 발전은 순환하는 특이 cytokine의 증

가와 동반된다고 보고되었다<sup>3)</sup>. 본 연구에서는 대조군에 비해 아드리아마이신 투여군에서 혈중 IL-6, TNF- $\alpha$ 가 유의하게 증가하였으나 심근 조직에서 IL-6, TNF- $\alpha$  유전자는 발현되지 않았다. 본 연구에서 급성 심근증 모델을 만들었기 때문에 심근 세포에서 유전자 발현의 변화는 관찰되지 않았고 만성 심근증 모델에서의 유전자 발현에 대해서 더 연구되어야 할 것이다.

MMP는 세포의 기질 분해와 재생에 책임이 있는 효소로 아연 의존적인 효소이다<sup>33)</sup>. 심근 섬유아세포, 내피세포, 심근세포는 세포의 기질 성분 합성의 일차적인 근원으로 이러한 세포들이 MMP를 생성한다. MMP 활동은 TIMP로 알려진 조직억제자에 의해 정상 심근에서는 조절된다<sup>3)</sup>. TIMP-1은 MMP-1과 복합체를 형성하고, TIMP-2는 MMP-2와 복합체를 형성한다<sup>33)</sup>. TIMP는 세포의 기질로 접근을 차단함으로써 MMP의 활동 장소에 결합한다. MMP/TIMP 복합체는 1:1 비율을 형성하고 생체내에서 MMP 활동을 조절하는데 필요한 중요한 내인 체계를 형성한다. 그러나 TIMP 발현이 MMP 발현과 독립적으로 조절된다는 보고도 있다<sup>3)</sup>. MMP는 일반적인 염증, 호흡기 질환, 재생, 류마티스성 심근염, 암 전이를 포함한 여러 질환 상태에서 상승되어 있음이 보고되었다<sup>3)</sup>. MMP와 TIMP는 심근을 포함한 다양한 조직에 존재하고 콜라겐 재생에 관여한다. MMP는 심근 손상, 혈관 동맥류, 죽상경화증(atherosclerosis), 재협착과 같은 심혈관 질환의 병리에 중요한 역할을 한다<sup>34)</sup>. 더욱이 단핵구에서 유도된 대식세포(macrophage)는 MMP 활동의 증가에 관여한다. 불안정한 협심증을 가진 환자에서 MMP-9의 증가가 보고되었다. MMP-9 유전자가 심혈관 질환의 존재와 심각도와 관련이 있다고 보고되었지만 심혈관 질환에서 순환하는 MMP-9의 증가의 중요성에 대해서는 거의 알려지지 않았다<sup>33)</sup>.

좌심실 재생과 확대는 말기 좌심실 부전으로 진행될 때 함께 일어난다고 알려져 있다<sup>3)</sup>. 심부전의 원인이 다양하지만 질병이 진행될 때 흔히 일어나는 사건은 좌심실 개조이고 이것은 증가된 심실 벽 긴장, 연속적인 펌프 기능 이상을 초래한다. 심부전증의 중요한 원인이 확장성 심근증이고 확장성 심근증에서 좌심실 개조와 심실 강 기하의 변화는 질병 경과와 중요한 예후 인자이다. 여러 심질환에서 좌심실 안에서 콜라겐 구조와 성분의 변화가 일어난다고 보고되었고 이것이 좌심실 기하에 영향을 미칠 수 있다<sup>4,5)</sup>. 여러 기초 및 임상 실험은 좌심실 콜라겐 기질의 변화가 확장성 심근증과 함께 좌심실 확장을 동반함을 보고하였다<sup>4,5)</sup>.

확장성 심근증의 임상이나 기초 실험에서 심근 MMP 활동의 증가가 일어난다고 보고되었으나<sup>35)</sup>, 확장된 좌심실안에서의 MMP 형태와 활동과의 관련에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다. 확장성 심근증 후에 MMP 활동이 유발되고 세포의 기질의 분해로 이끈다. 확장성 심근증이 있는 심근에서 TIMP의 감소는 TIMP 유전자의 변이 때문일 수 있다. 확장성 심근증 후 세포의 기질 대사의 이상에 책임 있는 세포는 전이 표현된 근육병이 있는 섬유아세포(myopathic fibroblast)이다. MMP는 확장성 심근

증 환자에서 활성화된다. MMP-1이 정상 조직에 비해 확장성 심근증을 가진 심장에서 3-4배 증가되고<sup>3,24)</sup> TIMP는 정상 심장 조직에 비해 12-20배 정도 억제된다고 알려져 있다<sup>3,24)</sup>.

이전 연구들은 MMP 발현은 다양한 cytokine과 생물에 작용하는 peptide에 의해 영향을 받을 수 있다고 하였다<sup>3)</sup>. TNF- $\alpha$ 와 같은 전염증성 cytokine은 MMP 유전자 발현을 조절하는 중요한 작용을 갖고 있다<sup>24)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 심근 MMP를 자극하고 심근내에 세포의 기질의 분해로 이끈다. MacNaul 등<sup>36)</sup>의 윤활 섬유아세포(synovial fibroblast)를 이용한 연구에서 IL-1과 TNF- $\alpha$ 가 MMP-3의 지속적인 증가를 일으키고, 반면에 MMP-1 발현은 시간이 지나면 정상화됨을 보고하였다<sup>3)</sup>. 확장성 심근증에서 순환하는 MMP와 TNF- $\alpha$ 에 관한 임상적 연구는 적다<sup>24)</sup>. 확장성 심근증을 가진 환자에서 순환하는 TNF- $\alpha$ 의 증가가 보고되었고,  $\beta$ -차단제 치료 후 TNF- $\alpha$ 가 감소됨이 보고되었다<sup>24)</sup>. IL-1과 TNF- $\alpha$ 는 콜라겐 합성을 감소시키고, 콜라겐을 분해하는 MMP 활동을 증가시켜서(MMP-13, MMP-2, MMP-9)<sup>24)</sup> 간질 재개조를 촉진함으로써 심실 확장과 심근 부전을 일으키는 데 기여한다<sup>24,37)</sup>. 확장성 심근증으로 발전함에 따라 특수한 cytokine이 증가하게 되는데 이것은 MMP 양을 조절한다. 확장성 심근증에서 일어나는 신경호르몬과 cytokine과 같은 세포의 자극의 증가는 MMP-1과 MMP-3 발현을 유발시킬 수 있다.

염증성 cytokine은 MMP를 활성화시키거나 MMP 활동을 억제하는 TIMP 활동을 조절한다. 심부전된 심근에서 TIMP 활동은 감소되고 MMP 활동은 증가된다<sup>24)</sup>.

심근 콜라겐 기질의 변화와 기질 이용은 확장성 심근증과 함께 MMP 활동과 발현을 조절할 수 있다. 비허혈성 및 허혈성 확장성 심근증에서 MMP-9의 심근 수치가 증가하였으나, MMP-2는 비허혈성 심근증에서만 증가하였다. 확장성 심근증의 발전은 norepinephrine과 TNF- $\alpha$ 의 증가와 같은 신경 호르몬 체계의 활동과 동반된다<sup>37)</sup>.

확장된 심근증 환자에서 순환하는 MMP-1, 3, 9의 증가가 관찰되었고, MMP-1, MMP-3, MMP-9과 TNF- $\alpha$  사이에 의미 있는 관련을 보고하였다( $r=0.647$ ,  $P=0.022$ ). Siwik 등<sup>24)</sup>은 TNF- $\alpha$ 에 대한 심근 섬유아세포의 노출은 MMP-9의 노출을 일으키고 carvedilol은 확장된 심근증에서 증가되어 있는 TNF- $\alpha$ 의 감소를 일으킴을 보고하였다.

최근의 연구는 다양한 질환에서 합성 MMP 억제자(inhibitor)의 사용이 보고되었고, 특히 특발성 확장성 심근증에서 MMP-3, MMP-9에 대한 MMP 억제제가 치료 목표가 됨을 제시하였다. 확장성 심부전에서 MMP 활동과 발현의 조절은 이러한 질병 경과를 위한 새로운 의미있는 치료의 목표이다. 앞으로 심부전증을 가진 환자에서 anticytokine 치료가 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

최근 cDNA microarray 분석이 암에서 응용되기 시작하였다<sup>38,39)</sup>. 하나의 유전자의 발현을 검사하는 northern blotting 대신

에 천개 이상의 유전자의 발현을 관찰하기 위해 사용되기 시작하였다. 이 분석의 장점은 주어진 시간에 동시에 유전자 발현을 관찰함으로써 암을 조기에 발견하고, 유전자의 변화를 알아내고, 약작용의 기전을 알 수 있고, 약물에 대한 반응을 예측하는데 사용될 수 있다. 본 연구를 통하여 아드리아마이신 투여 후 심장 독성에 관여되는 유전자 발현을 동시에 관찰할 수 있었다. 아드리아마이신 투여 후에 발현이 감소되는 유전자, 증가되는 유전자, 변화가 없는 유전자 등의 세 가지 양상을 나타냈지만 본 연구에서는 심근증에 주로 관여되는 MMP, TIMP, IL-6, TNF- $\alpha$  유전자를 관찰하였으며, 급성 심근증 모델을 만들었기 때문에 심근에서는 TIMP 유전자 발현의 감소만 관찰되었다. 앞으로 아드리아마이신으로 유도된 만성 심근증 모델을 만들어 연속적으로 cDNA microarray 분석을 이용하여 심장 독성에 관련된 유전자 발현의 변화를 관찰함으로써 심근증으로 진행을 조기에 예방할 수 있고 앞으로 유전자 치료에도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적** : MMP 활동의 변화는 류마치스 관절염과 암 전위를 비롯한 여러 질환에서 보고되고 있다. 최근에 확장성 심근증에서 MMP 활동의 증가가 발표되었다. 아드리아마이신으로 유도된 심근증에서 MMP에 대한 보고는 없는 실정이다. 아드리아마이신으로 유도된 심근증에서 MMP, TIMP 유전자 발현을 연구하고 cytokine과의 관련성을 알아보고자 본 연구를 실시하였다.

**방법** : Sprague Dawley 쥐에 아드리아마이신 5 mg/kg을 1 주일에 2번씩 2주간(누적 용량: 20 mg/kg) 복강내 주사하였고, 정상쥐를 대조군으로 하였다. 2주 후에 쥐를 희생시켜서 혈청과 심장조직을 얻었다. 혈청에서 ELISA 원리로 MMP-2, TIMP-3, IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정하였다. 심장에서 total RNA를 추출하였고, MMP-2, TIMP-3 IL-6, TNF- $\alpha$  primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 전기 영동하였고 UV light 아래에서 필름으로 촬영하였다.

**결과** : 혈청 MMP-2와 TIMP-3는 두 군 간에 유의한 차이가 없었다. 아드리아마이신군에서 IL-6은  $36.8 \pm 2.8$  pg/mL, TNF- $\alpha$ 은  $2.2 \pm 2.7$  pg/mL로 정상군에 비해 유의한 증가를 보였다. 혈청 MMP-2와 TNF- $\alpha$ 와는  $r=0.41$ 로 유의한 상관관계가 있었다. 심근 조직에서 MMP-2, IL-6, TNF- $\alpha$ 는 발현되지 않았고, TIMP-3는 아드리아마이신군에서 대조군에 비해 유전자 발현이 감소되었다.

**결론** : 아드리아마이신으로 유도된 급성 심근증 모델에서는 심근에서 MMP, IL-6, TNF- $\alpha$ 가 발현되지 않았고, TIMP 발현이 감소함을 알 수 있었다. 혈청 MMP와 TNF- $\alpha$ 와의 상관성이 유의하게 높았으므로 TNF- $\alpha$ 가 MMP 발현을 조절함을 시사해 준다. 앞으로 만성 심근증 모델에서 MMP, TIMP 발현에 대하여 연구할 예정이다.

## References

- 1) Buzadar AV, Marcus CS, Smith TL, Blumenschein GR. Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer* 1985;55:2761-5.
- 2) Kantrowitz ME, Bristow MR. Cardiotoxicity of antitumor agents. *Prog Cardiovasc Dis* 1984;27:195-200.
- 3) Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinases activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998;97:1708-15.
- 4) Weber KT, Pick R, Janicki JS, Gadodia G, Lakier JB. Inadequate collagen tethers in dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1988;116:1641-6.
- 5) Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy: role of metalloproteinases and pyridinoline cross links. *Am J Pathol* 1996;148:1639-48.
- 6) Levine J, Kalman L, Mayer H, Fillit H, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:236-41.
- 7) Huber SA, Graveline D, Born WK, O'Brien RL. Cytokine production by V $\gamma$ (+)-T-cell subsets is an important factor determining CD4+/-Th-cell phenotype and susceptibility of BALB/c mice to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* 2001;75:5860-9.
- 8) Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice. A study using mice lacking TNF- $\alpha$ . *Circulation* 2001;103:743-9.
- 9) Mann DL. Tumor necrosis factor and viral myocarditis: The fine line between innate and inappropriate immune responses in the heart. *Circulation* 2001;103:626-9.
- 10) Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gibert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996;77:723-7.
- 11) Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta M, Filella X, Perez-Villa F, et al. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;82:688-90.
- 12) Munkvad S, Gram J, Jespersen J. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha in plasma of patients with acute ischemic heart disease who undergo thrombolytic therapy: a randomized, placebo-controlled study. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10:325-7.
- 13) Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995;92:1487-93.
- 14) Petretta M, Condorelli GL, Spinelli L, Scopacasa F, De Caterina M, Leosco D, et al. Circulating levels of cytokines and their site of production in patients with mild to severe chronic heart failure. *Am Heart J* 2000;144:e28.
- 15) Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Ele-

- vated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:236-41.
- 16) Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996;93:704-11.
  - 17) Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM. Tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1996;347:1151-5.
  - 18) Henke A, Mohr C, Sprenger H, Graebner C, Stelzner A, Nain M, et al. Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in human monocytes. *J Immunol* 1992;148:2270-7.
  - 19) Satoh M, Tamura G, Segawa I, Tashiro A, Hiramori K, Satodate R. Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Virchows Arch* 1996;427:503-9.
  - 20) Hong YM, Kim SS. The role of apoptosis in adriamycin induced cardiotoxicity and preventive effect of L-carnitine in rat. *Korean J Pediatr* 1998;41:760-8.
  - 21) Hong YM, Lim BK, Shin JO, Jeon ES. Change of serum cardiac troponin T and fetal troponin T isoform in rats with adriamycin-induced cardiac injury. *Korean Cir J* 2002;32:485-91.
  - 22) Mann DL. Stress activated cytokines and the heart. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:341-54.
  - 23) Eddy LJ, Goeddel DV, Wong GH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  pretreatment is protective in rat model of myocardial ischemia-perfusion injury. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;184:1056-9.
  - 24) Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblast in vitro. *Cir Res* 2000;86:1259-65.
  - 25) Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gibert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996;77:723-7.
  - 26) Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:391-8.
  - 27) Sharma R, Coats AJ, Anker MD. The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *Int J Cardiol* 2000;72:175-86.
  - 28) Kapadia S, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res* 1997;81:187-95.
  - 29) Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schmann RR, Rauchhaus M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* 1999;353:1838-42.
  - 30) Hasper D, Hummel M, Klebel FX, Reindl I, Volk HD. Systemic inflammation in patients with heart failure. *Eur Heart J* 1998;19:761-5.
  - 31) Yamaguchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto Y. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* 1995;91:1520-4.
  - 32) Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, et al. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation* 1997;96:526-34.
  - 33) Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja K, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579-85.
  - 34) Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Cir Res* 1995;77:863-8.
  - 35) Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem* 1996;155:13-21.
  - 36) MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discordant expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid human synovial fibroblast: synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990;265:17238-45.
  - 37) Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000;102:1944-9.
  - 38) Mariadason JM, Augenlicht LH, Arango D. Microarray analysis in the clinical management of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17:377-87.
  - 39) Pattern-Hitt E. Gene chips and cancer diagnosis. *Nature Med* 2001;7:673-79.