

The Korean Journal of Pathology
2004; 38: 378-87

Doxorubicin 투여 백서 심장의 심근과 신경 손상에 대한 Probucol과 Verapamil의 효과

이상엽 · 조상호¹ · 양우익¹

관동대학교 의과대학 병리학교실
¹연세대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2004년 8월 19일
게재승인 : 2004년 10월 27일

책임저자 : 양 우 익
우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-361-5262
Fax: 02-362-0860
E-mail: wiyang9660@yumc.yonsei.ac.kr

Effect of Probucol and Verapamil on Injury to Myocardium and Nerve Fibers in Rat Heart Induced by Doxorubicin

Sang Yeop Yi, Sang Ho Cho¹ and Woo-Ick Yang¹

Department of Pathology, Kwandong University College of Medicine, Goyang;
¹Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Doxorubicin is considered to be one of the most effective drugs to treat a variety of human cancers. However, the dose-dependent cardiotoxicity of doxorubicin limits its clinical usefulness. This study aimed to evaluate the effect of probucol and verapamil on the cardiac neurotoxicity and cardiomyopathy induced by the long-term use of doxorubicin. **Methods :** Sprague-Dawley male rats were grouped as the control group, the doxorubicin treated group, the doxorubicin treated with probucol group, and the doxorubicin treated with verapamil group. The rats were treated for 4, 6, 8 and 10 weeks. H&E staining and immunohistochemical staining for protein gene product 9.5, caspase-3, heat shock protein 70, and hsp 25 were performed. **Results :** The degree of interstitial inflammatory cell infiltration was mildest in the probucol treated group. The reduction in the number of nerve fibers in the probucol treated group was less than the other treatment groups. There was a negative correlation between the treatment duration and stained nerve fibers in all the treatment groups. The number of caspase-3 positive cells was more increased in the doxorubicin group and the verapamil treated group than in the control and probucol treated group. **Conclusions :** It is suggested that probucol partly contributed to the inhibition of doxorubicin-induced cardiac neurotoxicity and cardiomyopathy, whereas the verapamil had no effect.

Key Words : Doxorubicin; Probucol; Cardiomyopathies; PGP 9.5 protein, rat; Caspase-3

Doxorubicin은 인체 암중에 매우 효과적인 치료제 중의 하나이며, 특히 백혈병, 림프종 및 충실성 암중에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹ 그러나 doxorubicin은 부정맥 등의 급성 부작용, 또는 울혈성 심부전을 초래하는 만성 심근병증 등의 심장 독성을 유발할 수 있기 때문에 사용에 주의를 요한다.² 울혈성 심부전 등의 독성은 doxorubicin의 투여량에 비례하며, doxorubicin으로 치료하여 암증이 완치된 시기에는 심장 독성의 증상이 없었으나 그 후 4에서 20년 내에 심근병증 등의 심장혈관계 합병증이 현저히 높은 비율로 발생한다는 보고가 있다.³ 이러한 위험에도 불구하고 doxorubicin은 높은 항암효과 때문에 아직도 암중 치료에 많이 사용되고 있다.

Doxorubicin에 의한 심근병증이 처음 보고된 이래,⁴ doxorubicin에 의한 울혈성 심부전의 병태 생리를 이해하기 위하여 기초 및 임상 연구가 광범위하게 이루어졌다. Doxorubicin에 의한 심근병증의 병인에 대하여 여러 가지 기전이 제시되고 있음을 볼

때 그 원인이 매우 다양하고 복잡하다는 것을 알 수 있다. 그 중의 하나로, 산소 자유라디칼의 형성과 지질 과산화의 증가에 의한 산화성 스트레스의 증가가 항산화제 및 sulfhydryl군의 감소와 함께 작용한다는 견해가 대두되고 있다.⁵ 또한 Doxorubicin에 의한 심근독성은 심근세포의 세포자멸사를 수반한다는 연구 결과도 보고되었다.⁶ Doxorubicin의 신경 독성에 대한 연구에서, 신경세포는 doxorubicin이 만들어낸 산소 자유라디칼에 의해 손상되며 그 이전에 DNA의 손상이 포함된다고 하였다.⁷ 또한 doxorubicin은 포유류 심장 조직에서 세포 내 Ca²⁺의 이동을 변화시킨다.⁸ 그 외에도 쥐에서는 doxorubicin의 투여량에 비례하여 신경섬유 수가 감소하였으며,⁹ 악성 림프종의 치료를 위해 사용한 doxorubicin 때문에 심근병증으로 사망한 환자의 심장에서는 신경섬유의 위축과 섬유화가 일어났다는 보고도 있다.¹⁰

한편, 지질 감소 효과와 강력한 항산화 작용으로 각광을 받게 된 probucol은 지질 용해성으로, 산소 자유라디칼 생성에는 영향

을 주지 않지만 doxorubicin이 유발하는 심근병증의 방지에 효과적이었고 동물 모델에서도 신뢰할 만한 결과를 얻었다.¹¹ 또한 probucol은 단독 또는 doxorubicin과 혼합하여 투여하였을 때 심장의 내인성 항산화 효소인 과산화 디스무타아제, 글루타티온 과산화효소의 활성을 증가시킨다.⁵ Verapamil은 칼슘통로 차단제로서 칼슘의 저속통로 유입과 카테콜라민의 분비를 억제하며, doxorubicin에 의한 일반 독성과 기능성 심장 독성에 제한적으로 효과적인 작용을 한다. 그리고, 세포 내 칼슘 과축적을 억제하여 심장 독성을 막아주므로, verapamil을 적정량으로 투여한다면 doxorubicin에 의한 심장독성을 감소시킬 수 있을 것이라고 보고된 바 있다.¹² 반면에 P당단백질 유출 펌프를 효과적으로 봉쇄하여 doxorubicin의 독성을 증가시킨다는 보고도 있다.¹³

Doxorubicin에 의한 심장 독성의 기전으로 세포자멸사에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, caspase는 세포자멸사의 과정에 중요한 역할을 담당하고 있다. Caspase는 세포 내에 비활성 procaspase 형태로 존재하며, 세포자멸사 신호에 반응하여 여러 단계를 거쳐 caspase-3이 활성화 된다. 이 활성화 caspase-3은 세포자멸사 과정의 중요 효소가 단백질로 작용한다.¹⁴ Heat shock protein (hsp)은 다양한 스트레스 자극에 반응하여 생성된다. Hsp의 발현은 세포 손상에 대한 저항의 증가와 부합하는데, 이 저항성은 세포자멸사의 억제에 부분적으로 작용한다. 최근의 연구에 따르면 hsp70은 세포자멸사 과정 중 cytochrome c 분비로부터 일어나는 apoptosome 형성을 방해한다.¹⁵ Hsp27은 사립체에서 cytochrome c의 분비를 방해하거나¹⁶ cytochrome c 또는 procaspase-3과 작용하여 apoptosome 형성과 caspase-3 활성을 방해한다.¹⁷

지금까지 장기간 투여한 doxorubicin의 신경 독성에 대한 실험이 소수 있으나 독성을 억제하는 약물을 병행 투여한 실험은 없으며, 심근에 대한 병행 투여 실험은 단기간의 실험이 대부분이다. 세포자멸사에 관한 실험도 배양한 심근세포에 doxorubicin을 투여하고 밤 사이 배양한 다음 측정하거나 단기간 동안 동물에 투여한 다음 관찰한 결과가 대부분이며, 장기간 투여 후 관찰한 경우는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 probucol과 verapamil이, 장기간 투여한 doxorubicin에 의해 유발되는 심장의 신경 독성과 심근병증에 어떤 영향을 미치는지 분석하고, 최근 심근과 신경 독성의 기전으로 대두되고 있는 세포자멸사 과정의 중요 효소가 단백질인 caspase-3의 발현과, 억제 인자인 hsp70과 hsp27의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였다.

재료와 방법

재료

실험군에는 doxorubicin RDF (Pharmacia and Upjohn, Milan, Italy), probucol (SIGMA, St. Louis, MO, USA), verapamil

(Keun Wha, Seoul, Korea)을 투여하였다. 면역조직화학 염색에는 protein gene product (PGP) 9.5 (Ultrasclone, Cambridge, UK), 활성화된 caspase-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), hsp70, hsp25 (Stressgen Biotechnologies Corporation, Victoria, Canada) 항체를 일차 항체로 사용하였다. 실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(평균 체중 220±26 g)를 실험 전 1주일간 고행사료로 사육하면서 환경에 적응시킨 후 실험하였다. 동물의 사육 환경은 온도 섭씨 22°, 습도 50%로 항상 일정하게 유지하였으며, 이들의 사육 및 관리는 본 기관의 실험 동물 사용 및 관리에 관한 지침을 준수하여 시행하였다.

약물 투여

Doxorubicin 주사액은 속효성 용해형으로 제조된 50 mg의 doxorubicin 바이알을 25 mL의 생리식염수에 용해하여 2 mg/mL 농도의 용액을 만든 다음 체중 100 g 당 0.1 mL씩 사용하였으며, probucol 주사액은 야자유 5 mL에 160 mg의 probucol을 녹여 32 mg/mL 농도의 용액을 만든 다음 체중 100 g 당 0.05 mL씩 사용하였다. 그리고, verapamil 투여액은 10% 포도당액 10 mL에 verapamil 10 mg을 녹여 1 mg/mL 농도의 용액을 만들어서 체중 100 g당 0.1 mL씩 사용하였다. 흰쥐는 무작위로 배정하였으며, doxorubicin 단독 투여군은 2 mg/kg의 doxorubicin 주사액과 유산염나트륨 부형제를, doxorubicin과 probucol 동시 투여군(이하 probucol 치료군)은 16 mg/kg의 probucol 주사액과 2 mg/kg의 doxorubicin 주사액을, doxorubicin과 verapamil 동시 투여군(이하 verapamil 치료군)은 1 mg/kg의 verapamil 투여액과 2 mg/kg의 doxorubicin 주사액을, 대조군은 유산염나트륨 부형제와 생리식염수를 각각 투여하였다. Doxorubicin, probucol, 유산염나트륨 부형제, 생리식염수는 일주일에 한번씩 각각 4주, 6주, 8주, 10주 동안 복강 내로 주사하였다. Verapamil은 실험 기간 동안 격일로 기구를 이용하여 강제로 경구 투여하였다. Probucol, verapamil, 유산염나트륨 부형제는 doxorubicin 또는 생리식염수를 주사하기 1시간 전에 투여하였다. 실험동물은 각 시기별로 약물 투여 완료 후 2주 후에 희생시켰다.

조직화학 염색

적출한 심장을 10% 중성포르말린에 고정시키고 일정 간격의 절편으로 육안 검사한 후 파라핀에 포매하였다. 그 다음 4 μm 두께로 박절하고 통상의 탈파라핀과 함유과정을 거친 뒤 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행하였다.

면역조직화학 염색

항체 반응 전 공통과정

10% 중성포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 심장 절편

조직을 4 μm 두께로 박절하고, poly-L-lysine으로 처리한 유리 슬라이드 위에 조직을 부착하여 60°C에서 2시간 건조하였다. Xylene에 10분간 2회 두어 파라핀을 제거하고 계열 알코올에서 흡수한 다음, 3% 과산화수소수에 10분간 전처리하여 내인성 과산화효소를 억제하였다.

항체 반응 과정

PGP 9.5: 수세 후 인산염 완충액에 5분간 담근 다음 1:1,200 비율로 희석시킨 PGP 9.5 (토끼, 다클론)에 대한 항체를 일차 항체로 하여, 4°C로 하룻밤 동안 반응시켰다. 인산염 완충액으로 세척하고 Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 비오틴이 부착된 항-토끼 항체와 과산화효소가 부착된 스트렙타비딘을 순서대로 반응시켰다.

Caspase-3: 수세 후 0.1 M citrate buffer (pH 6.0)에서 압력용기를 이용하여 전자오븐(750 w)에서 20분간 가열하였다. 20분간 실온에서 식힌 후 인산염 완충액에 5분간 담근 다음 1:20 비율로 희석시킨 활성화된 caspase-3 (토끼, 다클론)에 대한 항체를 일차 항체로 하여, 4°C로 하룻밤 동안 반응시켰다. 인산염 완충액으로 세척하고 Elite ABC Kit를 이용하여 비오틴이 부착된 항-토끼 항체와 과산화효소가 부착된 스트렙타비딘을 순서대로 반응시켰다.

Hsp70: 수세 후 인산염 완충액에 5분간 담근 다음에 차단 혈청과 배양한 후 1:100 비율로 희석시킨 hsp70 (생쥐, 단클론)에 대한 항체를 일차 항체로 하여, 4°C로 하룻밤 동안 반응시켰다. 인산염 완충액으로 세척하고 MOM kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 비오틴이 부착된 항-생쥐 항체와 과산화효소가 부착된 스트렙타비딘을 순서대로 반응시켰다.

Hsp25: 수세 후 0.1 M citrate buffer (pH 6.0)에서 압력용기를 이용하여 전자오븐(750 w)에서 20분간 가열하였다. 20분간 실온에서 식힌 후 인산염 완충액에 5분간 담근 다음에 1:100 비율로 희석시킨 hsp25 (토끼, 다클론)에 대한 항체를 일차 항체로 하여, 4°C로 하룻밤 동안 반응시켰다. 인산염 완충액으로 세척하고 Elite ABC Kit를 이용하여 비오틴이 부착된 항-토끼 항체와 과산화효소가 부착된 스트렙타비딘을 순서대로 반응시켰다.

항체 반응 후 공통과정

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, DAKO, Glostrup, Denmark)를 이용하여 발색한 뒤 Harris' hematoxylin으로 대조 염색하고 봉입하였다.

염색 결과의 판정 및 결과 분석

H&E 염색을 시행한 슬라이드를 검색하여 간질 내 염증세포의 침윤 정도와 심근세포의 공포성 변화를 분석하였다. 면역조직화학 염색 결과를 판정하기 위하여 심장의 횡단면을 8등분하

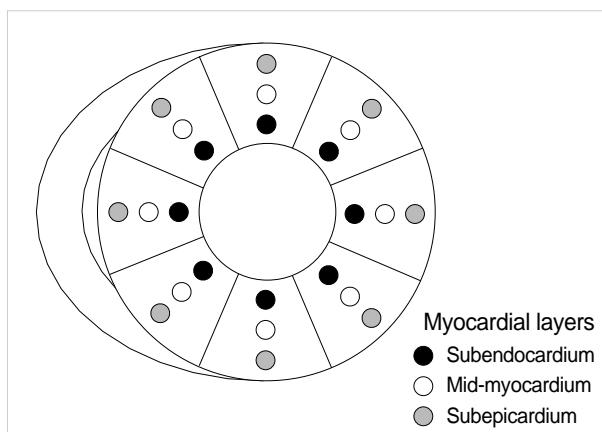


Fig. 1. The 24 regions of interest of left ventricle are defined at the 8 sectors in the subendocardium, mid-myocardium, and subepicardium.

고, 각 구역을 심내벽, 심근벽, 심외벽으로 구분하여 총 24구역의 관심 영역을 설정하였다(Fig. 1).

PGP 9.5 면역조직화학 염색 결과의 판정: 설정한 각각의 관심 영역에서 광학현미경 400배 시야의 10×5 격자 내에 포함된 PGP 9.5 면역조직화학 염색에 반응한 신경섬유의 수를 계수하였다.

Caspase-3 면역조직화학 염색 결과의 판정: 설정한 각각의 관심 영역에서 광학현미경 고배율 시야의 10×10 격자 내에 포함된 세포 중 세포질에 과립상의 양성반응을 보인 세포의 수를 계수하였다.

Hsp70과 hsp25 면역조직화학 염색 결과의 판정: Hsp는 전층의 심근세포 세포질에 미만성으로 양성반응을 보였기 때문에 계수를 통한 정량적 분석이 불가능하였다. 이에 전반적인 면역조직화학 염색의 양성반응 정도를 판정하고자 총 24구역의 관심 영역에서 동일한 크기의 영역을 선택하여 흡광도(optical density) 분석을 시도하였다. 필름 스캐너(SprintScan 35 Plus, Polaroid corporation, Cambridge, MA, USA)를 컴퓨터의 small computer system interface 카드에 연결하고, 편광필터를 사용하여 특수 제작한 어댑터에 면역조직화학 염색한 유리 슬라이드를 넣은 뒤, 필름 스캐너와 PolaColor Insight 3.5 (Polaroid corporation, Cambridge, MA, USA) 프로그램을 사용하여 2,700 DPI의 해상도로 획득한 유리 슬라이드의 1:1 디지털 사진을 Tagged-Image File Format으로 컴퓨터에 저장하였다. 저장된 사진은 Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) 프로그램을 이용하여 각각의 관심 영역에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 분석은 물질을 투과하는 빛의 양을 측정함으로써 재료에서 물질의 양을 판별하는 방법으로 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Optical density}(x, y) = -\log((\text{Intensity}(x, y) - \text{Black}) / (\text{Incident} - \text{Black}))$$

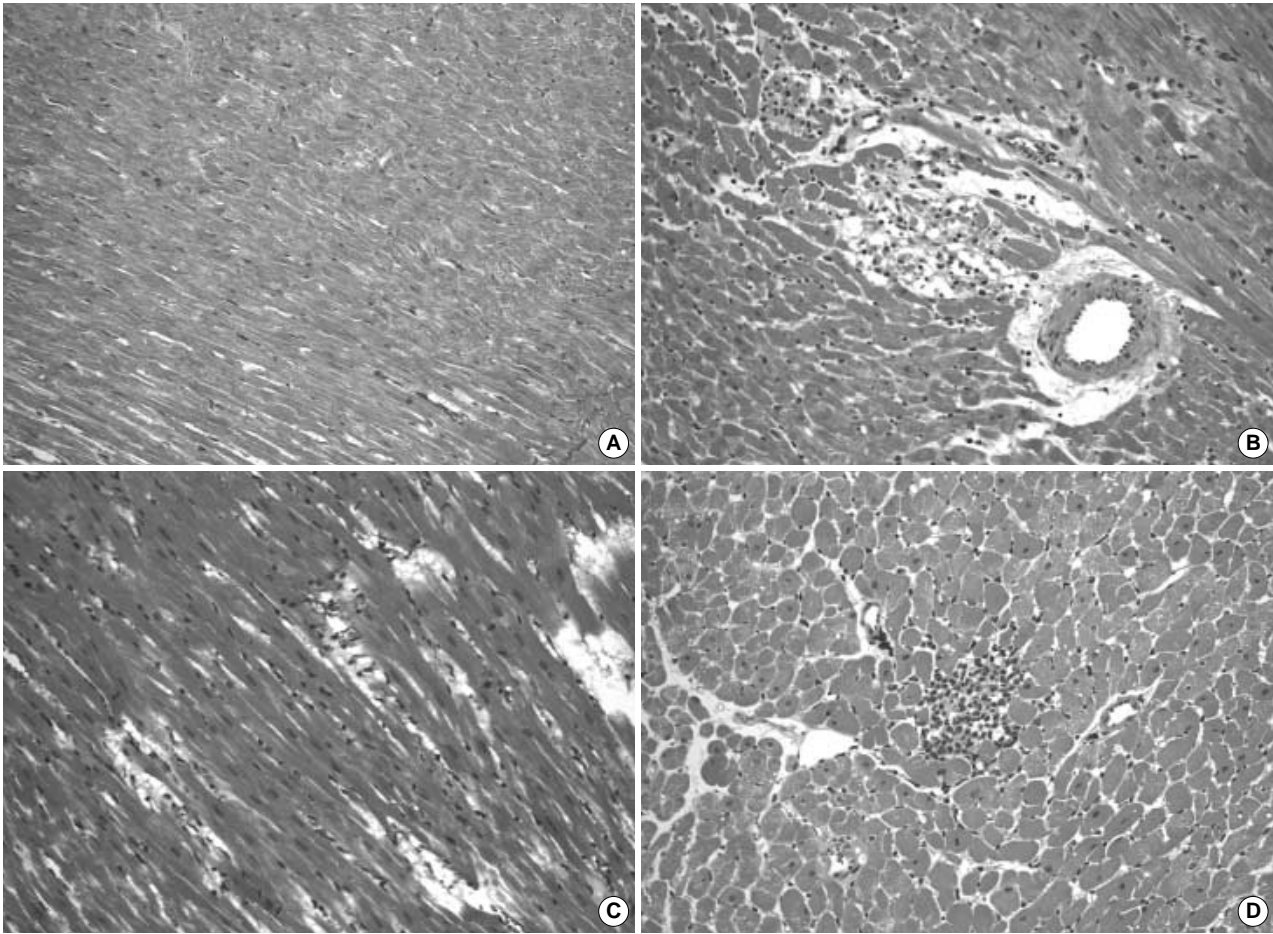


Fig. 2. Light microphotographs of the rat heart at 6 weeks. (A) There is no specific lesion in control group. (B) In a case of doxorubicin group, it shows mild lymphocytic and histiocytic infiltration with focal necrosis in the myocardium. (C) Doxorubicin with probucol group, there are scattered focal vacuolization of the myocytes. (D) Doxorubicin with verapamil group, it reveals focal lymphocytic infiltration in the myocardium.

Intensity(x, y): 픽셀 휘도값(x, y)

Black: 빛이 재료를 전혀 투과하지 못하는 상태의 픽셀 휘도값

Incident: 빛이 재료를 완전히 투과하는 상태의 픽셀 휘도값

자료는 평균(mean)±표준편차(standard deviation of the mean, SD)로 표시하였다. 실험군 사이의 통계학적 비교는 일원 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하고, 각 집단 간의 개별 비교를 위한 다중비교는 쉐페 검정(Scheffe test)을 사용하였다. 심외벽/심내벽 비율은 비모수통계 검정법인 맨-휘트니 검정(Mann-Whitney U test)⁹을 시행하여 비교하였다.

결 과

광학현미경 소견

간질 내 염증세포 침윤의 정도는 doxorubicin 단독 투여군이

가장 심하였으며, verapamil 치료군, probucol 치료군 순으로 정도가 약한 소견을 보였다. 침윤된 염증세포는 주로 림프구 등 단핵구로 구성되어 있었으며, 일부 심근 세포에서 괴사소견을 보였으나 투여 기간에 따른 차이는 발견할 수 없었다. 심근세포의 공포성 변화는 doxorubicin 단독 투여군과 probucol 치료군에서 국소적으로 관찰되었다(Fig. 2).

PGP 9.5에 대한 면역조직화학 염색 결과

PGP 9.5에 양성반응을 보인 대조군의 신경섬유 수는 투여 기간에 따른 유의한 차이가 없었다. Doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군의 경우 4주부터 신경섬유의 수가 감소하기 시작하였다. 신경섬유 수는 투여 기간에 비례하여 감소하였다. Doxorubicin 단독 투여군의 경우에는 8주(142.20±41.95)와 10주(96.00±23.62)에서 4주(361.40±109.08)에 비하여 유의한 차이를 보였고, verapamil 치료군의 경우에는 8주(147.80±36.02)에서 4주(354.20±110.83)에 비하여 유의한 차이를 보였으며(p<

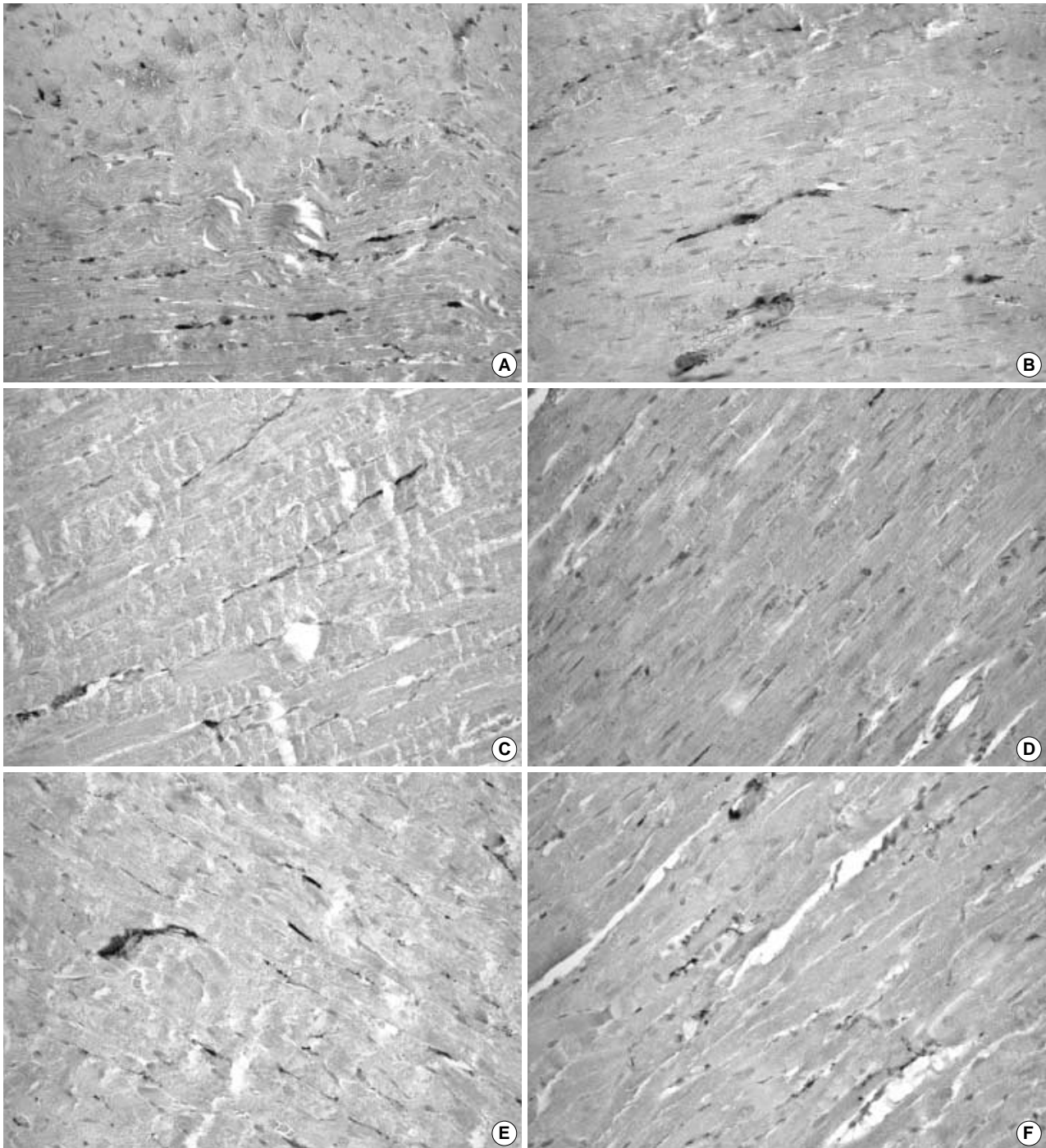


Fig. 3. Immunohistochemical stains for PGP 9.5 of the rat heart. The numbers of positively-reacted nerve fibers are not decreased at 4 weeks (A) and 10 weeks (B) in the control group. The nerve fibers are decreased at 4 weeks (C) and decreased markedly at 10 weeks (D) in the doxorubicin group. In the doxorubicin with probucol group, the nerve fibers are decreased minimally at 4 weeks (E) and decreased mildly at 10 weeks (F). (Fig. 3 continued next).

0.05), 10주(115.75 ± 34.75)의 경우 4주 및 6주(277.67 ± 79.99)와 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). Probucol 치료군의 경우 역시 4주부터 신경섬유의 수가 감소하였는데, 다른 두 군에 비하여 신경섬유의 감소 정도가 덜 심한 소견을 보였으며, 투여 기

간에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

Doxorubicin 투여 기간, 즉 누적용량과 염색된 신경섬유의 수 사이의 관계를 보기 위하여 상관분석을 시행하였다. Pearson 상관계수는 doxorubicin 단독투여군과 verapamil 치료군의 경우 각

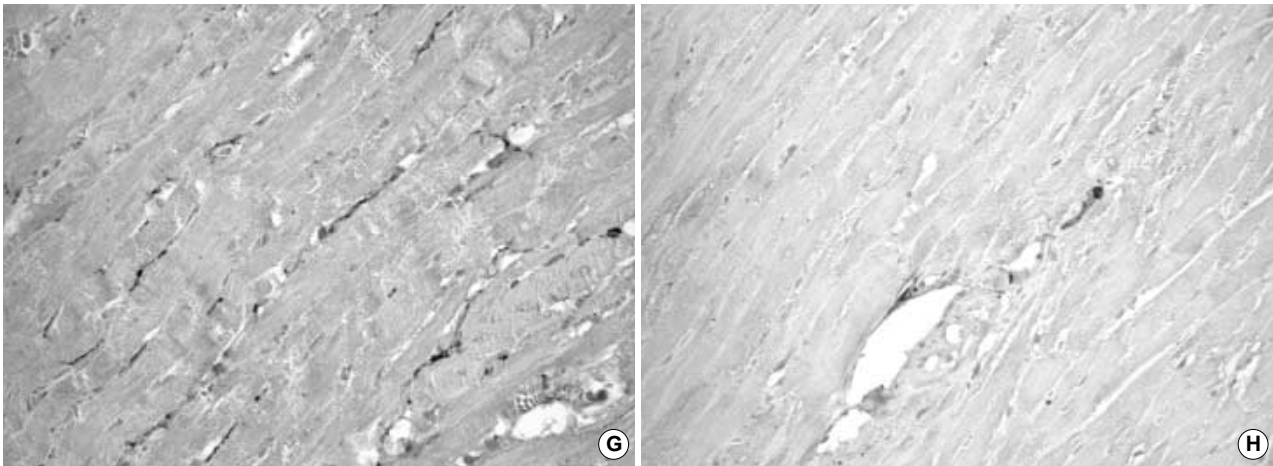


Fig. 3. (Continued from the previous page) The nerve fibers are decreased at 4 weeks (G) and decreased markedly at 10 weeks (H) in the doxorubicin with verapamil group.

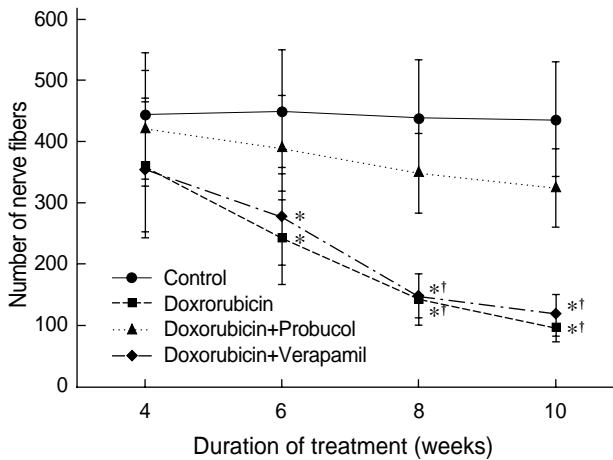


Fig. 4. The numbers of the nerve fibers positively reacted to immunohistochemical stain for PGP 9.5 are decreased gradually according to the duration of doxorubicin administration. The values are expressed as mean \pm standard deviation. The nerve fibers in the doxorubicin and doxorubicin with verapamil groups are lower than control (*) and doxorubicin with probucol groups (†) ($p < 0.05$).

각 -0.8279 와 -0.7956 이었으며, probucol 치료군의 경우 -0.4598 으로 역 상관관계를 보였다($p < 0.05$).

투여 기간별로 분산분석을 시행한 결과, 4주군의 경우에는 집단간에 평균값의 차이가 없었으나, 6주군부터 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군이 대조군에 비하여 유의한 차이로 감소하였다($p < 0.05$). 8주군부터는 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군이 probucol 치료군에 비하여 유의한 차이로 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 4).

심근을 심내벽, 심근벽, 심외벽의 3층으로 나누어 비교한 결과, 3층 모두 전체 신경섬유의 수를 비교한 경우와 비슷한 양상을 보였다. 심근의 3층 중 심외벽과 심내벽의 신경섬유의 수 비율은 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석하였다.⁹ 투여군별로 비교하였을 때 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료

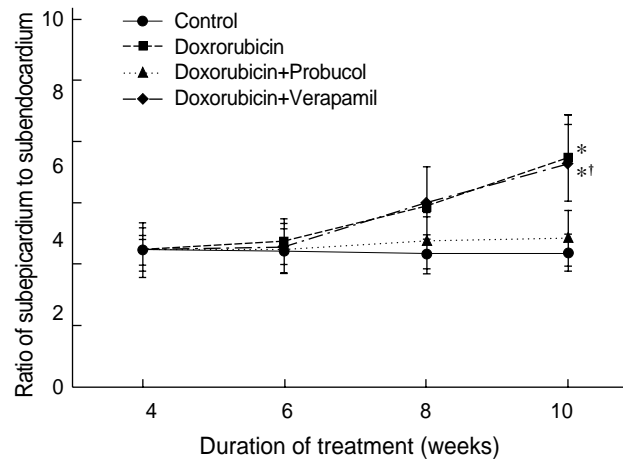


Fig. 5. The ratio of nerve fibers positively reacted to immunohistochemical stain for PGP 9.5 in the subepicardium to subendocardium is increased gradually according to the duration of doxorubicin administration in the doxorubicin and doxorubicin with verapamil groups. The values are expressed as mean \pm standard deviation. The ratio of nerve fibers in the doxorubicin and doxorubicin with verapamil groups are higher than control (*) and doxorubicin with probucol groups (†) ($p < 0.05$).

군에서, 10주(6.24 ± 1.15 및 6.08 ± 1.05)의 경우는 4주(3.71 ± 0.73 및 3.73 ± 0.58) 및 6주(3.95 ± 0.63 및 3.87 ± 0.56)에 비하여 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 투여 기간별로 비교하였을 때는 10주군에서, doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군이 대조군(3.64 ± 0.49)에 비하여 유의한 차이가 있었고($p < 0.05$), verapamil 치료군은 probucol 치료군(4.05 ± 0.76)과도 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$) (Fig. 5).

Caspase-3에 대한 면역조직화학 염색 결과

Caspase-3은 심근세포의 세포질에 과립상의 양성반응을 보였

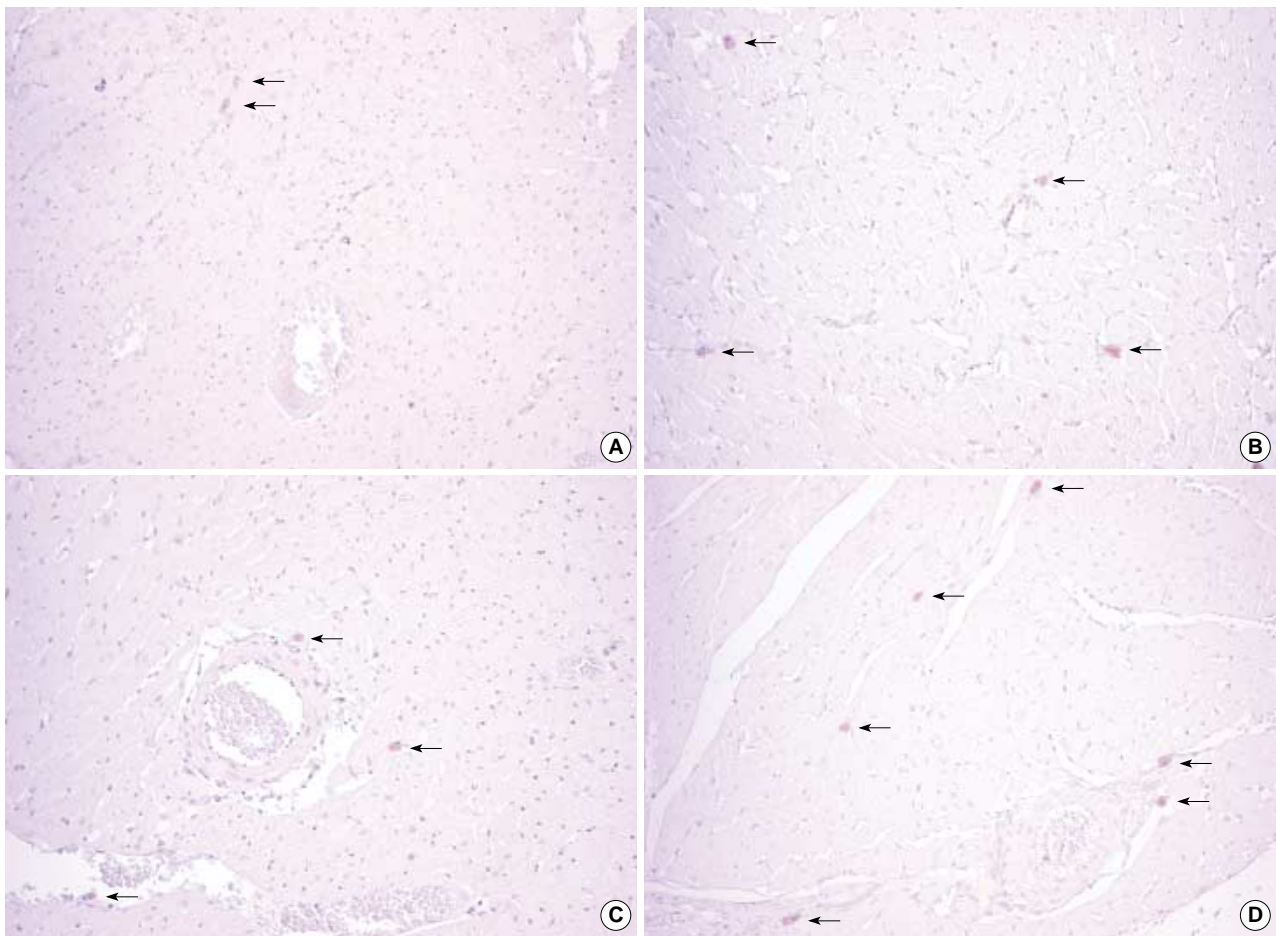


Fig. 6. Immunohistochemical stains for caspase-3 of the rat heart. The positive-reacted cells are usually located near the blood vessels. The numbers of positive-reacted cells in the doxorubicin (B) and doxorubicin with verapamil (D) groups are generally higher than control (A) and doxorubicin with probucol (C) groups.

으며, 염색 강도는 균일하지 않고 다양하였다. 양성반응을 보인 심근세포의 분포는 균일하지 않았으나 혈관과 가까운 부위에서 양성반응을 보인 심근세포를 비교적 자주 관찰할 수 있었다. 심내벽, 심근벽, 심외벽 등 구역에 따른 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

Caspase-3에 양성반응을 보인 세포의 수는 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군이 대조군 및 probucol 치료군에 비하여 전반적으로 많았다. Probucol 치료군의 경우 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며, 투여 기간에 따른 변화도 유의한 차이를 보이지 않았다. Doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군의 경우, 4주와 8주에 비하여 6주와 10주에 더 증가한 결과를 보였다. 그러나 투여 기간에 따른 유의한 차이나 상관관계는 보이지 않았다. 투여 기간별로 분산분석을 시행한 결과, 6주에서 doxorubicin 단독 투여군(55.60 ± 6.54)이 대조군(40.20 ± 7.46)에 비하여 caspase-3에 양성반응을 보인 세포의 수가 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), verapamil 치료군(61.17 ± 9.28)은 대조군 및 probucol 치료군(46.83 ± 5.42)과 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 그리고 10주에서는 doxorubicin 단독 투여군(64.25

± 13.07)이 대조군(44.80 ± 7.09) 및 probucol 치료군(43.40 ± 6.54)과 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$) (Fig. 7).

Hsp에 대한 면역조직화학 염색 결과

Hsp70과 hsp25는 심벽 전 층의 심근세포 세포질에 양성반응을 보였고, 심내벽, 심근벽, 심외벽 등 구역에 따른 유의한 차이는 없었다.

Hsp70에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 슬라이드에서 측정된 흡광도는, 약물별로 비교하였을 때 doxorubicin 단독 투여군, probucol 치료군, verapamil 치료군의 경우 4주와 8주에 비하여 6주와 10주에 더 감소한 결과를 보였으나 투여 기간에 따른 유의한 차이는 없었다. 투여 기간별로 분석하였을 때에도 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Hsp25에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 슬라이드에서 측정된 흡광도는 약물별로 비교하였을 때 투여 기간에 따른 유의한 차이는 없었으며, 투여 기간별로 분석하였을 때는 doxorubicin 단독 투여군이 4주와 6주

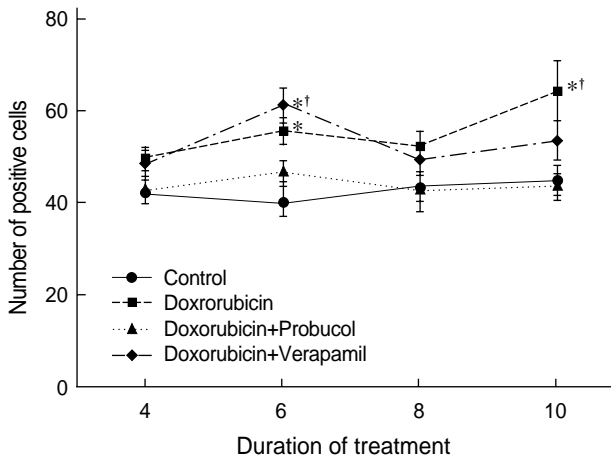


Fig. 7. The numbers of the cells positively reacted to immunohistochemical stain for caspase-3 in the doxorubicin and doxorubicin with verapamil groups are higher than control (*) and doxorubicin with probucol groups (†) ($p < 0.05$). The values are expressed as mean \pm standard deviation.

군에서 감소한 수치를 보였으나 대조군과 유의한 차이를 보이지는 않았다.

고찰

Doxorubicin의 항암 작용을 방해하지 않으면서 심장 독성을 방지할 수 있는 효과적인 혼합 요법의 개발을 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 그러나 이들 연구는 배양한 심근세포를 이용하거나 단기간의 동물 실험이 대부분이어서,^{11,12,18,19} 본 연구에서는 약물을 장기간 투여한 동물 실험을 시행하였다.

광학현미경 소견에서 심장 간질 내 염증세포의 침윤 정도는 doxorubicin 단독 투여군에서 가장 심했으며, 4주군부터 염증세포의 침윤이 나타나기 시작해서 6주와 8주에 심한 소견을 보여 Jeon 등⁹이 보고한 결과와 유사하였다. Probucol 치료군과 verapamil 치료군은 doxorubicin 단독 투여군에 비하여 간질 내 염증세포의 침윤 정도가 경한 소견을 보였으며, probucol 치료군이 조금 더 경한 편이었다. 심부전을 동반한 심근에서 산소 자유라디칼은 pro-inflammatory cytokine인 interleukin (IL)-1 β 와 IL-6의 발현을 자극하는데, probucol은 항산화 작용을 통하여 이 과정을 현저히 억제하는 효과를 나타낸다고 한다.²⁰ Verapamil은 pro-inflammatory gene signaling을 방해하여 대식세포의 반응성을 줄인다는 보고도 있으며,²¹ superoxide가 Ca²⁺ 의존성 방법으로 인간 단백질을 활성화시킨다는 가정하에 superoxide의 자극에 의한 종양괴사인자- α 의 분비를 verapamil 처치를 통하여 억제하였다는 보고도 있다.²² 본 연구에서도 probucol 치료군과 verapamil 치료군이 doxorubicin 단독 투여군에 비하여 염증세포 침윤 정도가 적게 나타나, 이들 약제가 어느 정도 염증세포의 침윤을 억제하는 효과가 있었다.

실험군에서 PGP 9.5에 반응한 심장 내 신경섬유의 수는 4주군부터 감소되기 시작하였다. Doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군의 경우 8주부터는 4주에 비하여 유의한 차이의 감소를 보여 다른 연구 결과와 유사하였다.^{9,10} Probucol 치료군의 경우에 역시 4주부터 신경섬유의 수가 감소하였지만, 다른 두 군에 비하여 신경섬유의 감소 정도가 덜 심한 소견을 보였다. 이는 probucol이 신경섬유 손상을 일부분 방지하는 것으로 해석할 수 있다. 그러나 이 결과는 probucol이 doxorubicin에 의한 심근 손상 및 기타 부작용을 완전히 방지하였다는 이전의 보고와는 일치하지 않으며,¹¹ 이는 신경섬유의 손상에 산소 자유라디칼의 작용 및 항산화 효소의 감소 외에도 다른 원인이 작용할 가능성을 생각할 수 있기 때문에 지속적으로 연구를 해야 할 것이다.

모든 실험군에서 doxorubicin 투여 기간(누적 용량)과 염색된 신경섬유의 수 사이에는 역의 상관관계를 보였다. Doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군은 높은 상관관계를 보였고, probucol 치료군은 비교적 높은 상관관계를 보여 신경섬유의 손상이 doxorubicin 투여 누적 용량에 비례하는 것을 알 수 있었으며, 이는 다른 연구 결과와 일치하는 소견이다.⁹ 투약 기간별로 비교했을 때 4주 군에서는 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이를 보이지 않다가 6주가 지나면서 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군이 대조군과 유의한 차이를 보이기 시작했는데, 이는 역시 Jeon 등⁹의 결과와 비슷한 소견이다. Probucol 치료군의 신경섬유가 다른 실험군에 비해 작은 비율로 감소하였기 때문에, 8주 군에서는 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군이 probucol 치료군과도 유의한 차이를 보였다.

정상인 심장에서는 베타-아드레날린성 수용체가 심내벽과 심외벽에서 분포의 차이가 없으나, 심부전 환자에서는 심내벽에 심한 감소를 보인다.²³ Doxorubicin을 투여한 쥐의 심장 신경섬유에 대한 실험에서 심내벽이 심외벽에 비하여 doxorubicin에 취약하다는 사실이 알려져 있다.⁹ Doxorubicin 치료 후 21일이 지난 쥐의 심근에 세포자멸사가 증가하였는데, 특히 심내벽에 집중적으로 나타났으며 이 세포들이 형태학적으로 Purkinje 세포의 모양을 나타냈다는 보고가 있다.¹⁹ 본 실험에서도 doxorubicin 투여량이 증가함에 따라 심내벽의 신경섬유 수가 심외벽에 비하여 더 감소하여 신경섬유 수의 심외벽/심내벽 비율이 증가하였다. 그러나 probucol 치료군의 경우에는 증가 정도가 미약하였다. 이는 probucol 치료군이 doxorubicin 단독 투여군에 비하여 세포자멸사 비율이 현저히 낮았지만 대조군에 비해서는 유의하게 높아, probucol이 doxorubicin에 의한 세포자멸사를 완전히 방지하지는 못했다는 보고와 비슷하다.¹⁹

Doxorubicin에 의한 심근병증 환자와 동물의 심장에 대한 형태학적 소견에서, 증가된 산화 스트레스에 의한 세포자멸사 과정이 심근세포의 죽음에 관여한다는 보고가 있다.^{19,24} 본 연구에서 doxorubicin 단독 투여군과 verapamil 치료군은 대조군 및 probucol 치료군에 비하여 전반적으로 caspase-3에 양성반응을 보이는 세포의 수가 많았으며, 6주와 10주의 경우에는 유의한 차이를

보였다. 이는 doxorubicin을 단기간 투여한 동물실험에서 투여 후 4일과 21일째에 세포자멸사 백분율이 유의하게 높고, probucol로 치료한 경우 치료 후 21일째에 세포자멸사 백분율이 doxorubicin 단독 투여군에 비하여 현저하게 낮은 수치를 보이고, 정상 대조군에 비해서는 유의하게 높은 수치를 보인 보고와 비슷하였다.¹⁹

심장에서 Bax와 caspase-3의 발현은 세포자멸사를 촉진한다고 보고되었는데,^{25,26} doxorubicin에 의한 심근병증 실험에서도 세포자멸사의 증가가 Bax 발현의 증가와 상관관계를 보였다. 동일한 실험에서 caspase-3도 투여 후 4일째에 최고로 활성화되었으며, 10일과 16일째에는 감소하였다.¹⁹ 또한 bovine aortic endothelial cell 세포배양을 통한 실험에서도 doxorubicin을 투여하고 밤 사이 배양한 경우 caspase-3가 대조군에 비하여 4배 증가된 소견을 보였다.²⁷ 본 연구에서는 caspase-3에 대한 계측치가 비교적 낮게 나타났다. 이는 본 실험에서 활성화된 caspase-3에 특이성을 갖는 항체를 사용하였고, 약물 투여 후 14일째에 희생하여 조직을 채취하였기 때문에 caspase-3에 양성반응을 보인 세포의 수가 상당히 감소하였을 가능성이 있다.

식도의 편평상피암종 조직을 대상으로 시행한 hsp27과 hsp70에 대한 면역조직화학 염색의 결과에서, hsp27과 hsp70 발현의 정도와 림프구 침윤의 정도가 서로 상관관계를 보여 hsp 발현이 숙주의 면역력을 증가시키는 것으로 추정된 보고가 있다.²⁸ 그러나 본 연구에서는 간질 내 염증세포 침윤 결과와 hsp 발현의 정도가 유의한 상관관계를 보이지는 않았다. 심근 세포 배양 실험에서 doxorubicin은 shock protein의 합성을 억제하였고,²⁹ 갖태어난 쥐에 단기간 doxorubicin을 투여하고 장기간 사육한 실험에서 hsp25는 doxorubicin 투여 직후에는 심장에 대한 직접 독성에 대한 반응으로 증가하고, 8주의 경우에는 심실 벽 두께의 감소에 따른 스트레스성 자극에 대한 반응으로 증가한 것으로 분석되었다.³⁰ 본 연구에서는 현재 상품화된 hsp27 항체가 사람과 원숭이 조직용만 있기 때문에, 쥐에 사용 가능한 hsp25 토끼 다클론 항체를 이용하여 실험하였다. Hsp70과 25에 대한 면역조직화학 염색으로 얻은 결과는 각 실험군 및 투여 기간 사이에 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이에 대하여 기존의 연구에서 관측한 시점과 본 연구의 관측 시점이 다르기 때문에 확실한 결론을 내리기는 어렵다. 기간 및 용량에 따른 hsp의 발현 정도의 변화에 대한 자세한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

이상의 결과를 통해 doxorubicin에 의한 심장 내 신경섬유 수의 감소는 doxorubicin 누적 용량에 비례하며, doxorubicin을 투여했을 때 심근세포에서 활성화된 caspase-3의 발현이 증가한 소견을 보여 doxorubicin에 의한 심근 손상에 세포자멸사가 일부 관여한다는 점을 확인할 수 있었다. Verapamil은 doxorubicin에 의한 심장 내 신경 독성을 줄이지 못했고, caspase-3, hsp70 및 hsp25의 발현에 영향을 주지 못하여 심장 보호 효과가 별로 없다는 사실을 알 수 있었다. 반면에 probucol은 각 시기별로 doxorubicin에 의한 심장 내 신경 독성의 억제에 부분적으로 기

여하고 심근병증의 억제에도 도움을 주며, 비록 hsp70과 hsp25의 발현에는 영향을 주지 못했으나 활성화된 caspase-3 발현의 억제에 부분적으로 기여하여 세포자멸사의 억제에 일부 효과가 있음을 확인하였다.

참고문헌

- Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 339: 900-5.
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 1973; 32: 302-14.
- Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA* 1991; 266: 1672-7.
- Bonadonna G, Monfardini S, De Lena M, Fossati-Bellani F, Beretta G. Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). *Cancer Res* 1970; 30: 2572-82.
- Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas TP, Li T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1055-63.
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 1789-92.
- Lee YC, Byfield JE. Induction of DNA degradation in vivo by adriamycin. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 221-4.
- Harris RN, Doroshov JH. Effect of doxorubicin-enhanced hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation on calcium sequestration by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 739-45.
- Jeon TJ, Lee JD, Ha JW, Yang WI, Cho SH. Evaluation of cardiac adrenergic neuronal damage in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy using iodine-131 MIBG autoradiography and PGP 9.5 immunohistochemistry. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 686-93.
- Takano H, Ozawa H, Kobayashi I, et al. Myocardial sympathetic dysinnervation in doxorubicin cardiomyopathy. *J Cardiol* 1996; 27: 49-55.
- Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its anti-tumor effect. *Circulation* 1995; 91: 10-5.
- Rossi F, Filippelli W, Russo S, Filippelli A, Berrino L. Cardiotoxicity of doxorubicin: effects of drugs inhibiting the release of vasoactive substances. *Pharmacol Toxicol* 1994; 75: 99-107.
- Estevez MD, Wolf A, Schramm U. Effect of PSC 833, verapamil and amiodarone on adriamycin toxicity in cultured rat cardiomyocytes. *Toxicol In Vitro* 2000; 14: 17-23.

14. Gill C, Mestral R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target? *FASEB J* 2002; 16: 135-46.
15. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 25665-71.
16. Samali A, Robertson JD, Peterson E, *et al.* Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 49-58.
17. Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 2001; 9: 195-201.
18. Iliskovic N, Singal PK. Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *Am J Pathol* 1997; 150: 727-34.
19. Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, Danelisen I, Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 135-45.
20. Sia YT, Lapointe N, Parker TG, *et al.* Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat. *Circulation* 2002; 105: 2549-55.
21. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Slow channel calcium inhibition blocks proinflammatory gene signaling and reduces macrophage responsiveness. *J Trauma* 2002; 52: 434-42.
22. Volk T, Gerst J, Faust-Belbe G, Stroehmann A, Kox WJ. Monocyte stimulation by reactive oxygen species: role of superoxide and intracellular Ca^{2+} . *Inflamm Res* 1999; 48: 544-9.
23. Beau SL, Tolley TK, Saffitz JE. Heterogeneous transmural distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in failing human hearts. *Circulation* 1993; 88: 2501-9.
24. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997; 11: 931-6.
25. Kajstura J, Liu Y, Baldini A, *et al.* Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death. *Am J Cardiol* 1998; 82: 30K-41K.
26. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83: 516-22.
27. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* 2001; 276: 47266-76.
28. Nakajima M, Kuwano H, Miyazaki T, Masuda N, Kato H. Significant correlation between expression of heat shock proteins 27, 70 and lymphocyte infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2002; 178: 99-106.
29. Low-Friedrich I, von Bredow F, Schoeppe W. In vitro studies on the cardiotoxicity of chemotherapeutics. *Chemotherapy* 1990; 36: 416-21.
30. Strauss M, Anselmi G, Hermoso T, Tejero F. Carnitine promotes heat shock protein synthesis in adriamycin-induced cardiomyopathy in a neonatal rat experimental model. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2319-25.