

# 심부전 발생 이전 용적 과부하에 따른 인간 좌심실 심근 조직의 유전자 발현 양상

동아대학교 의과대학 내과학교실,<sup>1</sup> 울산병원,<sup>2</sup> 흉부외과학교실,<sup>3</sup> 병리학교실,<sup>4</sup> 약리학교실,<sup>5</sup> 동아대학교 암분자치료 연구센터<sup>6</sup>

양창호<sup>1</sup> · 이수훈<sup>2</sup> · 박태호<sup>1</sup> · 차광수<sup>1</sup> · 김무현<sup>1</sup> · 김영대<sup>1</sup> · 우종수<sup>3</sup> · 노미숙<sup>4,6</sup> · 황태호<sup>5,6</sup>

## Gene Expression Profile of Volume-Overloaded Human Ventricular Myocardium Prior to Developing Heart Failure

Chang-Ho Yang, MD, PhD<sup>1</sup>, Soo-Hoon Lee, MD<sup>2</sup>, Tae-Ho Park, MD, PhD<sup>1</sup>, Kwang-Soo Cha, MD, PhD<sup>1</sup>, Moo-Hyun Kim, MD, PhD<sup>1</sup>, Young-Dae Kim, MD, PhD<sup>1</sup>, Jong-Su Woo MD, PhD<sup>3</sup>, Mee-Sook Roh, MD, PhD<sup>4,6</sup> and Tae-Ho Hwang, MD, PhD<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, <sup>3</sup>Cardiac Surgery, <sup>4</sup>Pathology, <sup>5</sup>Pharmacology, <sup>6</sup>Research Center for Cancer Molecular Therapy, Dong-A University School of Medicine, Busan, <sup>2</sup>Ulsan Hospital, Ulsan, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives :** Left ventricle burdened by longstanding volume-overload, undergoes various structural and functional alterations. Accordingly, the expressions of multiple classes of genes are likely to be altered. However, the profile of gene expressions, specifically in a volume-overloaded left ventricle in humans, has not been explored. **Subjects and Methods :** The pattern of gene expression was studied, using a cDNA microarray, in myocardium from 4 normal subjects and 5 patients with chronic regurgitant valvular heart disease whose end-diastolic left ventricular dimension measures 65 mm or more, but whose systolic function remained preserved. **Results :** We identified 58 differentially expressed genes that were functionally classifiable in the volume-overloaded myocardium. Those genes involved in cell cycle/growth (up/down-regulation: 9/1), signal transduction (4/1) were mostly overexpressed in the volume-overloaded myocardium. The distributions of the gene expressions were variable for those involved in transcription/translation (up/down-regulation: 6/7) and apoptosis (2/2). The genes related to the myocyte structure (troponin T3, tropomyosin, etc) (up/down-regulation: 1/10), as well as those related to metabolism (2/5), were underexpressed. The gene expression patterns from RT-PCR and Western blot, with randomly selected genes, were similar to those from the cDNA microarray. **Conclusion :** Altered expression was identified in multiple genes in the volume-overloaded human left ventricle prior to the development of heart failure. The genes related to cell growth and signal transduction were mostly overexpressed, while those related to cellular structure and metabolism appeared to be underexpressed. These results might help in the elucidation of cellular mechanisms for the remodeling process associated with chronic volume-overloading. (Korean Circulation J 2005;35:649-657)

**KEY WORDS :** Volume overload ; Human ; Myocardium ; Gene expression ; DNA microarrays.

### 서 론

장기간에 걸쳐 과부하에 노출된 심근 조직은 여러 가지의

구조적, 기능적 변화를 겪게 된다. 용적과부하의 경우 부하는 주로 확장기에 가해지며 이로 인해 좌심은 내부 용적이 확장되고 구형에 가까운 형태로 되는 재형성 과정을 겪게

논문접수일 : 2005년 4월 6일

심사완료일 : 2005년 6월 23일

교신저자 : 김영대, 602-715 부산광역시 서구 동대신동 3가 1 동아대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (051) 240-2959 · 전송 : (051) 255-8174 · E-mail : kimyd@mail.donga.ac.kr

된다. 심근경색으로 인한 심부전도 처음에는 경색으로 인한 조직의 손실이 심기능 저하의 주된 기전으로 작용하나 경색의 크기가 클 경우 수축기 장애로 인해서 늘어난 확장기말의 좌심 용적이 비경색 부위의 심근 조직에 부하로 작용하게 되어 해당부위의 신장(stretch)과 수축력 저하를 초래한다. 따라서 이 같은 경색 후 재형성(post-myocardial infarction remodeling)에서 심부전으로의 진행 과정도 용적 과부하에 의한 결과로 설명될 수 있다.<sup>1)</sup>

용적 과부하를 받는 심장은 구조적인 변화에 병행하여 기능적인 변화가 수반된다. 동물 실험에서 용적 과부하가 부가된 좌심실은 질량 증가, 심실의 확장 뿐 아니라 확장기말 압의 점진적인 증가와 경직도의 감소를 나타내었다.<sup>2)</sup> 또한 등용적 압력-용적 곡선에 의한 평가에서 용적 과부하 심실의 고유 수축기능이 현저하게 저하되는 것이 관찰되었다.<sup>2)</sup>

과부하에 의한 심장의 재형성 과정에서 발생하는 구조적, 기능적 변화는 심근 세포 및 세포 내부의 분자 구조의 변화와 연관되어 나타난다. 용적 과부하에서는 심근세포의 형태 변화, 세포 고사,<sup>3)</sup> 세포간 미끄러짐(slippage)과<sup>4)</sup> 같은 현상들이 심실의 확장과 심부전의 진행에 기여하며 이 과정에는 세포내 미세구조와 이들을 구성하는 단백질의 변화가 동반된다. 심근세포내 수축기관(contractile apparatus)을 구성하는 단백질인 actin과 myosin, 그리고 troponin은 과부하 심장에서 아형(isoform) 변화가 나타나며<sup>5,6)</sup> 흥분-수축 연결(excitation-contraction coupling)에 관련된 물질들 즉, sarcoplasmic reticulum  $Ca^{++}$ -ATPase(SERCA), phospholamban,  $Ca^{++}$  release channel의 발현에도 변화가 나타난다.<sup>7-9)</sup> 이 밖에 심근의 간질을 형성하고 있는 기질들의 변화도 심실재형성의 구도 변화에 기여한다.<sup>10)</sup>

과부하 심근 조직에서는 또한 심근 조직의 에너지 대사에 변화가 초래된다. 심부전에서는 에너지 생성의 감소와 함께 세포내 에너지 저장의 감소가 관찰되는데<sup>11)</sup> 이는 직접적인 심부전의 원인은 아니라 할지라도 적어도 진행에 관여할 것으로 추측된다. 용적 과부하 상태인 만성 승모판 폐쇄 부전증의 경우 환자들의 심근에서 측정된 PCr/ATP의 비는 확장기의 좌심내경에 비례하여 감소함이 관찰되었다.<sup>12)</sup>

이상과 같이 용적 과부하에 따른 심실의 재형성에는 다양한 형태학적, 기능적인 변화와 분자 수준에서의 미세 구조 변화가 수반되며 이러한 소견들은 세포의 운명을 조절하는 유전자의 발현 양상의 변화와 연관된 결과일 가능성이 많다. 최근에 발전한 genomics는 개체의 광범위한 유전자 발현 양상을 분석함으로써 유전자 발현 변화를 연구할 수 있는 수단들을 제공하고 있다.<sup>13)</sup> 순환기학 영역에서도 동물실험에서 유도된 각종 질환 모델에서 DNA microarray에 의거한 유전자 발현 변화가 보고되고 있다.<sup>14)</sup> 이에는 압력 과부하 심장이나 관상 동맥 결찰에 의한 인위적인 심근 경색이 포함된다.<sup>15)</sup> 임상적으로도 심실 확장이 동반된 말기의 심

부전 환자에서의 유전자 발현이 보고된 적이 있다.<sup>16)</sup> 그러나 아직 인간을 대상으로 용적 과부하 상태가 심부전 발생 이전에 심근에서 어떠한 유전자의 발현 변화를 초래하는지를 관찰한 연구는 없었다. 그러므로 본 연구는 만성 판막 폐쇄 부전증으로 인한 좌심 확대를 가진 환자에서 DNA microarray 방법을 이용하여 장기간의 용적 과부하에 의한 유전자 발현 양상을 알아보고자 시행되었다.

## 대상 및 방법

### 대상 및 시료 채취

만성 판막 폐쇄 부전증을 가진 환자로서 확장기 좌심 내경이 65 mm 이상으로 좌심실 확장조건이 있고 임상적으로 적응이 된다고 판단되어 판막 수술을 받은 5명의 환자의 심근조직을 대상(질환군)으로 하였다. 대조군으로서는 심장과 관계없는 이유로 사망하여 부검을 받은 4명의 심근 조직을 사용하였다. 질환군은 서면으로 작성된 승낙서를 사전에 얻었으며 조직은 수술중에 생검관(biotope)으로 채취한 것을 이용하였다. 채취된 조직은 유전자 분석을 위한 시료와 검증을 위한 시료로 나누어서 처리하였다. 수술장(질환군)과 부검실(대조군)에서 획득한 조직은 즉시 병리과로 옮겨져서  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 저온에서 냉동 보관하였다. Microarray 및 RT-PCR을 위해 필요한 total RNA는 냉동된 시료에서 TRI reagent(Molecular Research Center, Inc., Cinninnati, OH, USA)를 사용하여 추출하였다.

### Microarray analysis

5명의 판막 질환 환자의 시료와 4명의 부검에서 얻어진 시료에서의 유전자 발현을 검색하기 위해서 MAGIC<sup>TM</sup> microarray(Macrogen, Inc., Korea)를 사용하였다. 이는 사람의 유방암 조직에서 추출한 4,600개의 cDNA가 밀식되어 있으며 기왕에 알려진 4,370의 유전자와 230개의 알려지지 않은 유전자(EST)로 구성되어 있다. 조직 시료에서 얻어진 RNA를 cDNA probe로 전환하는 것은 Macrogen에서 제공한 labeling kit를 사용하였으며 Microarray hybridization은 제작사의 지침서에 따라서 시행하였다.

### Data analysis

Microarray의 image는 ImaGene<sup>TM</sup> analysis software(BioDiscovery, Inc., Marina del Rey, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 신호가 없거나 뚜렷한 결함을 나타내는 점들은 분석에서 제외하였다. 그 외의 점들은 배경신호(local background)를 제거하고 각 점에서의 Cy5-specific channel과 Cy3-specific channel에서 방출되는 형광의 세기를 산출하여 그 비(ratio)를 구하였다. 그 비는 log-transformation 시킨 후 평균  $1\log$ -transformed ratio가 0이 되도록 표준화

(normalize)하였다. 질환군의 시료는 5명 중 적어도 3명 이상에서 양질의 자료가 얻어진 경우를 분석 대상에 포함시켰으며 이중에서 양군의 표현비가 적어도 2배 이상의 차이를 보이는 것들을 선택하였다. 이같은 방법으로 선별된 gene은 미국 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Online Medelian Inheritance in Man(OMIM) 프로그램을 이용하여 확인하였으며 이들을 유전자 발현의 기능에 따라서 유사한 것들을 모아서 분류하였다.

### Validation of DNA microarray results

#### Semiquantitative RT-PCR

시료 조직으로부터 cDNA를 합성하기 위해 SuperScript Preamplication System(Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA)을 사용하였으며 얻어진 cDNA 1  $\mu$ L을 유전자에 고유한 primer와 Taq polymerase를 사용하여 94℃에서 2분간 1주기, 다음에 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 1분간을 25주기 배양하는 방식으로 증폭하였다. 표적 유전자가 정확하게 증폭되었는지의 여부는 gel electrophoresis 상의 이동성(mobility)과 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 subclone한 후의 염기서열 분석을 시행함으로써 확인하였다. 비교대상이 되는 대조군의 시료는 4명의 부검 심근 조직을 합쳐서 사용하였다.

#### Western blotting

조직을 찬 용해 완충액(50 mM Tris-Cl[pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 ug/mL leupeptin, 2 ug/mL aprotinin)에서 용해하여 30초간 2번 vortex한 후 4℃에서 10분간 14,000 g로 원심분리 하였다. 상층액을 채취하여 단백질 농도를 측정하고 균일한 양의 단백 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 먼저 0.05% Tween-20이 포함된 TBS 완충액이 포함된 5% nonfat milk로 1시간 blocking 한후 1차 항체가 포함된 완충액으로 2~4시간 배양하였다. Membrane을 세척한 후 1 : 7,500비율의 HRP-conjugated anti-rabbit IgG(SantaCruz, CA, USA)로 다시 1시간동안 배양한 후 상용화된 chemiluminescence detection system을 이용하여 blot을 관찰하였다.

**Table 1.** Characteristics of patients population

Patient	Sex	Age (years)	Diagnosis	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	EF (%)	Operation
1	Male	78	AR+MR	65	53	48.1	AVR+MVP
2	Male	61	AR+aortic aneurysm	76	53	55	Bentall op.
3	Female	46	AR	66	38	54.9	AVR
4	Male	41	AR	66	41	67	AVR
5	Female	70	AR	65	44	52	AVR

LVIDd: left ventricular internal dimension at diastole, LVIDs: left ventricular internal dimension at systole, EF: ejection fraction, AR: aortic regurgitation, MR: mitral regurgitation, AVR: aortic valve replacement, MVP: mitral valvuloplasty, op.: operation

## 결 과

### 대상 환자의 특성

대상 환자는 만성적인 판막 폐쇄 부전증으로 수술을 받은 5명의 환자로서 이중 남자가 3명, 여자 2명이었고 평균 나이는 59.2세 이었다(Table 1). 수축기능 지표인 좌심 구혈율은 평균 55.4%로서 유의한 기능저하는 없었다. 모든 환자에서 인공판막술을 시행하였으며 이중 한 명에서는 동반된 상행 대동맥류를 치료하기 위해서 Bentall operation을 시행하였다.

### cDNA microarray

정상에 비해서 log transformation 한 질환군과 대조군의 발현 비율이 2배 이상 차이가 나고 5명 중 3명 이상에서 양질의 신호가 나타났던 경우를 선택기준으로 하였을 때 주요 기능별로 분류가 가능한 유전자는 58개가 검색되었다. 이들은 세포 주기(cell cycle) 및 세포 성장(cell growth)에 관련된 유전자가 10개, 신호전달(signal transduction)에 관련된 것이 5개, 유전자 전사/번역(transcription/translation)에 관련된 것 13개, 세포 고사(apoptosis)에 관련된 것 4개, 세포 구조(cell structure)에 관련된 것 11개, 세포 대사(metabolism)에 관련된 것 7개, 기타 7개 이었다(Table 2).

용적 과부하된 심근 조직에서의 이들 유전자 변화에서 주로 발현이 증가한 것은 세포 주기 및 성장에 관련된 유전자(증가 9, 감소 1)와 신호전달에 관련된 유전자(증가 4, 감소 1)이었으며 전사/번역에 관련된 유전자(증가 6, 감소 7)와 세포 고사에 관련된 유전자(증가 2, 감소 2)는 증가와 감소가 비슷하였다(Fig. 1). 특징적으로 용적 과부하 심근에서 감소된 것은 세포 구조에 관련된 유전자로서 해당하는 11개 중 10개의 유전자의 발현이 감소하는 소견을 보였으며 세포 대사에 관련된 유전자도 증가한 것 2개 감소 5개로서 발현이 감소하는 양상을 나타내었다.

### RT-PCR 및 Western blot

DNA microarray에서 나타난 유전자 발현 양상의 결과를 확인하기 위해서 semiquantitative RT-PCR과 Western blot을 시행하였다. RT-PCR의 대상으로는 DNA microarray 분석에서 발현이 증가된 angiotensin-receptor(AT<sub>1</sub>; 세포주기/성장)와 cAMP responsive element binding protein(CR-

**Table 2.** Genes with altered expression in volume-overloaded ventricle

Function	Accession no.	Gene	2 log (C/P)	Frequency
Cell cycle/cell growth				
	U90551	H2A histone family, member L	-5.640	5
	AF042378	Spindle pole body protein	-4.233	3
	U66616	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily C, member 2	-3.945	4
	NM-005162	Angiotensin receptor-like 2	-3.614	3
	AF068007	Microspherule protein 1	-3.320	3
	Y09858	Spindle-like	-3.169	4
	M87339	Replication factor C (activator 1) 4 (37 kd)	-3.076	2
	AB032252	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	-2.614	3
	X05299	Centromere protein B (80 ka)	-1.560	4
	M11353	H3 histone, family 3A	9.861	5
Signal transduction				
	AF058921	Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	-4.779	3
	NM-013412	RAB, member of RAS oncogene family-like 2A	-2.431	4
	L78440	Signal transducer and activator of transcription 4	-1.937	5
	U88528	cAMP responsive element binding protein 3 (lumen)	-1.752	4
	AF263541	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 4	17.447	5
Transcription/translation				
	NM-020347	Leucine zipper transcription factor-like 1	-3.725	4
	X85237	Splicing factor 3a, subunit 1, 120kd	-3.485	3
	D21851	Leucyl-trna synthetase, mitochondrial	-3.258	3
	D30612	Zinc finger protein 282	-2.290	4
	U72355	Scaffold attachment factor B	-1.782	4
	U94832	KH-type splicing regulatory protein (KSRP)	-1.446	4
	X65233	Zinc finger protein 80 (pt17)	9.885	5
	L41067	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3	16.331	5
	AB037801	Thyroid hormone receptor interactor 8	16.396	5
	M85289	Heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)	16.825	5
	AL050254	F-box only protein 7	17.340	5
	AF116508	Ets transcription factor TEL-2a	17.508	5
	X70944	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract-binding protein-associated)	22.508	5
Apoptosis/anti-growth				
	X86779	Fas-activated serine/threonine kinase	-1.504	3
	X60592	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	-1.310	3
	NM-013258	PYD and CARD domain containing (PYCARD), transcript variant 1	13.783	5
	AF016266	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	17.403	5
Structure				
	AF062075	Leupaxin	-3.354	3
	M21984	Troponin T3, skeletal, fast	11.887	5
	AB014547	Myotubularin related protein 4	12.336	5
	X06825	Tropomyosin 2 (beta)	12.394	5
	U48734	Actinin, alpha 4	12.919	5
	AL031228	Collagen, type XI, alpha 2	14.150	5
	AL050318	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform	14.289	5
	U97105	Dihydropyrimidinase-like 2	14.516	5
	NM-001154	Annexin A5	16.311	5
	Y10129	Myosin-binding protein C, cardiac	18.100	5
	U61234	Tubulin-specific chaperone C	22.299	5

Table 2. Continued

Function	Accession no.	Gene	2 log (C/P)	Frequency
Metabolism	U30255	Phosphogluconate dehydrogenase	-3.134	3
	U29607	Methionine aminopeptidase; eif-2-associated p67	-2.445	4
	X63422	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	12.184	5
	M60922	Flotillin 2	14.296	5
	M11560	Aldolase A, fructose-bisphosphate	14.572	5
	M14328	Enolase 1, (alpha)	18.323	5
	M98045	Folypolyglutamine synthase	18.521	5
Others	AF124250	Breast cancer anti-estrogen resistance 3	-6.009	4
	AL117392	DKFZp566L083	-4.076	5
	NM-020246	Cation-chloride cotransporter-interacting protein	-3.029	3
	NM-005780	Lipoma HMGIC fusion partner (LHFP)	15.333	5
	AF206019	REV1 protein	15.717	5
	NM-000954	Prostaglandin D2 synthase (21 kD, brain)	18.422	5
	M22333	Human factor VIII gene L1 elementinsestion DNA	18.543	5

H2A: histone 2A, ATP: adenosine triphosphate

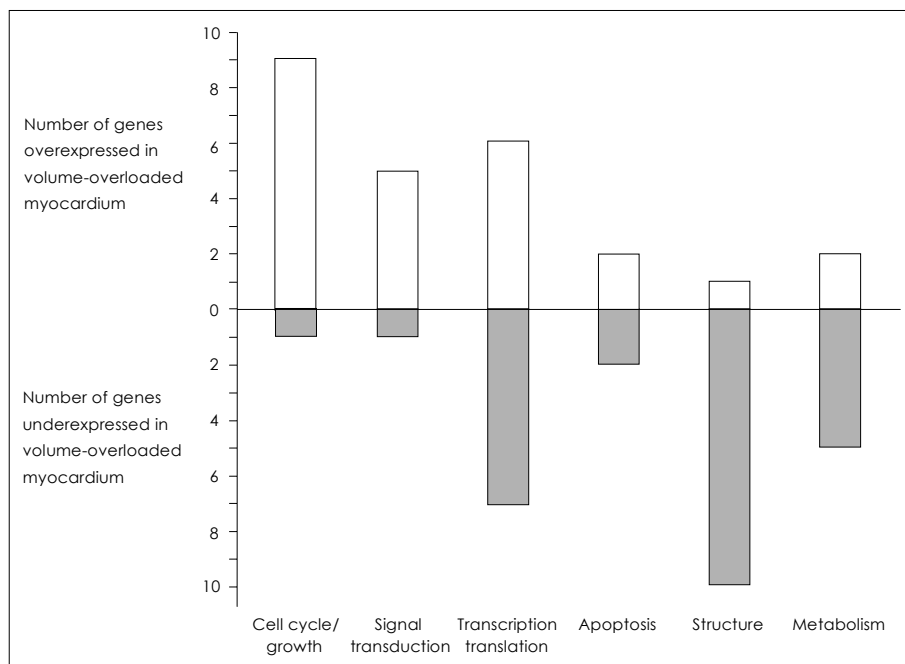


Fig. 1. Numbers of genes in each functional group whose expression was changed 2-fold or greater in the myocardial tissue of chronic regurgitant valvular disease compared with control group.

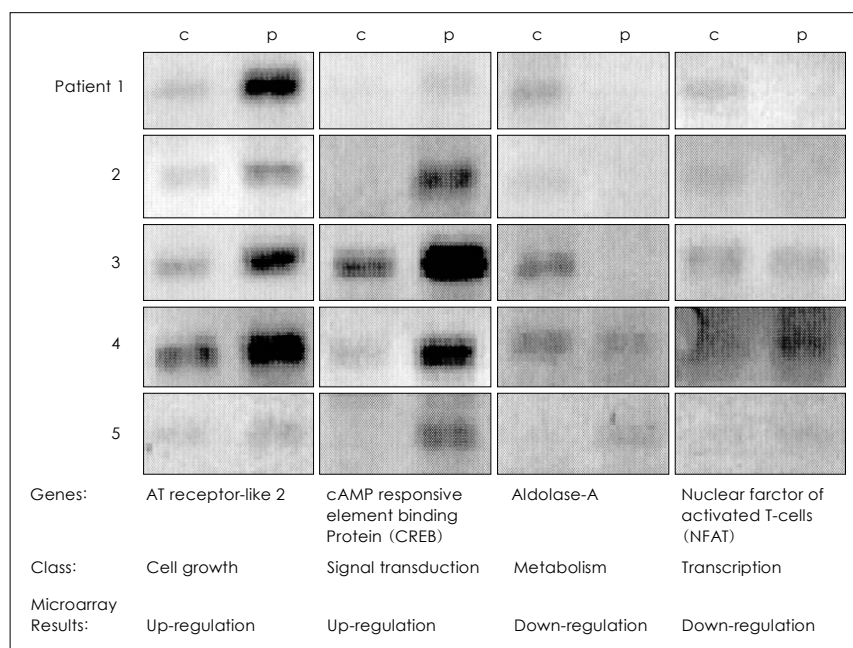
EB; 신호전달), 그리고 발현이 감소된 aldolase A(세포 대사)와 nuclear factors of activated T cells(NFAT; 유전자 전사)를 선정하여 증폭하였다. Fig. 2에서 각 유전자의 RT-PCR의 증폭 정도는 AT<sub>1</sub>와 CREB의 경우 5명의 환자에서 대조군에 비해서 증가된 소견을 보였으며 aldolase A와 NFAT의 경우 5명 중 4명에서 대조군에 비해서 감소된 소견을 나타내었다.

Western blot은 2명의 환자와 2명의 대조군에서 AT<sub>1</sub>에 대하여 시행되었다. 이 결과에서 용적 과부하 심근에서 대조군

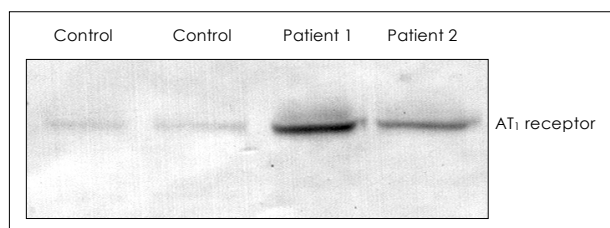
에 비해 AT<sub>1</sub>의 단백 생성이 증가하였음을 확인하였다(Fig. 3).

## 고 찰

부하에 의해 초래된 심근세포의 구조적, 기능적 변화는 최종적으로 심부전으로 진행되며 많은 연구들이 이 과정에 관련된 기전을 규명하고자 노력하였다. 근래 의학과 생물학 분야에 등장한 genomics는 세포 변화에 관련된 광범위한 유전자 발현 변화를 검색할 수 있는 기회를 제공해주고 있는



**Fig. 2.** The results of semiquantitative RT-PCR for the tested genes in the myocardial tissues from 5 patients with chronic regurgitant valvular heart disease and 4 normal controls. RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, CRE: cAMP response element, NFAT: nuclear factors of activated T cells.



**Fig. 3.** The result of Western blot for angiotensin receptor, type 1, in the myocardial tissues from 2 patients with chronic regurgitant valvular heart disease and 2 normal control subjects, showing increased expression of AT<sub>1</sub> receptor in the patients' tissues, compatible with DNA microarray result. AT: angiotensin, DNA: deoxyribonucleic acid.

며 이는 각종 심부전 모델에서의 유전자 발현 양상을 분석하는데 사용되었다. Johnatty 등<sup>17)</sup>은 subtractive hybridization의 기법을 이용하여 대동맥 결찰에 의한 압력 과부하의 쥐 심장 모델에서 100가지의 유전자 발현이 변화됨을 관찰하였고 염기 서열을 밝혀 이중 약 70%에서 GenBank library와 일치하는 알려진 유전자를 동정하였다. 또한 쥐에게 isoproterenol과 angiotensin II를 주입하여 만든 심비대 모델에서 Friddle 등<sup>18)</sup>은 DNA microarray 기법을 이용하여 기존에 변화한다고 알려진 25개의 유전자 외에 새로이 30개의 유전자에서 심비대의 유도 혹은 퇴축단계에서 발현 변화가 나타난다고 보고하였다. 광상동맥을 결찰하여 심근 경색을 유도한 동물 실험에서는 DNA microarray를 통하여 심근 조직에서 200개가 넘는 유전자의 발현이 변화되었음이 관찰되었다.<sup>15)</sup> Microarray 기법은 인간의 심질환에서도 적용되어 심장 이식 수술을 받는 확장성 심근병증 환자의 심근에서 각종 유전자의 발현 변화를 관찰하였고<sup>16)</sup> 팔로씨 4중이

나 심실 중격 결손 같은 선천성 심질환에서도 질환별 혹은 부위별로 따라 별도의 유전자 발현에 변화가 나타남을 보고한 바 있다.<sup>19)</sup> 그러나 일차적으로 용적 과부하가 주된 병리로 작용한 심실 재형성 과정에서 유전자 발현 양상을 관찰한 연구는 없었으며 특히 인간에서 용적 과부하에 따른 심근 조직의 유전자 발현에 대해서도 밝혀진 바가 없다. 본 연구는 용적 과부하가 심근에 미치는 영향을 이의 대표적인 임상 증례인 만성 판막 폐쇄 부전증 환자들을 통하여 보고자 하였으며 심기능의 심각한 저하가 나타나기 전 단계에서 심근세포의 유전자 발현 변화를 조사하였다.

본 연구에서 DNA microarray의 결과는 용적 과부하에 장기간 노출된 환자의 심근에서 심부전이 나타나기 전에도 다양한 유전자들의 발현 변화가 있음을 보여주었다. 변화를 보인 유전자 중에서 세포 주기/성장에 관련된 유전자들은 발현이 대부분 증가하였다. 이에 속하는 것으로서 U90551 H2A histone family, M87339 replication factor C(activator 1) 4(37 kD) 등은 DNA의 복제에 연관된 것이고 AF042378 spindle pole body protein, X05299 centromere protein B(80 kD)들은 세포의 분열에 관여하며 NM\_005162 angiotensin receptor-like 2는 성장인자의 수용체이다. 이 소견들은 용적 과부하가 심실의 확장 뿐 아니라 심근 조직의 비대를 일정 부분 유도할 수 있음을 나타낸다. 실제 용적 과부하에 의한 심실의 확장은 심실 내경을 증가시켜서 심실의 벽 스트레스를 증가시키며 이는 심실 세포의 비후를 자극하는 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup> 용적과부하에서는 신호 전달에 관여하는 유전자의 발현도 증가하였는데 이에 속한 NM\_013412 RAB, member of RAS oncogene family-like 2A, L78440 sig-

nal transducer and activator of transcription 4, U88528 cAMP responsive element binding protein 3(human) 들 역시 주로 세포의 성장과 비후에 관여하는 유전자들이다.

세포 주기/성장과 신호전달 유전자의 증가 외에 용적 과부하 심근에서 주목할 만한 변화는 구조와 세포 대사에 관련된 유전자 발현이 감소한 소견이다. 세포 구조에 연관된 것들은 M21984 troponin T3, skeletal, fast, X06825 tropomyosin 2(beta), AL050318 myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform, Y10129 myosin-binding protein C, cardiac과 같이 근세사(myofibril)의 구성 혹은 관련 단백질 유전자이거나 AL031228 collagen, type XI, alpha 2와 같은 세포 기질(matrix) 유전자, 혹은 NM\_001154 annexin A5와 같은 cytoskeleton 연관 유전자로서 모두 그 발현이 감소하였다. 이러한 소견은 압력 과부하에서 나타나는 심근 비후에서 나타나는 양상과는 상이하다. 즉 용적 과부하나 압력 과부하에서 세포의 성장에 연관된 유전자의 발현은 공통적으로 증가하지만 압력 과부하에서는 세포의 구조에 관련된 유전자의 발현이 증가한 반면,<sup>21)</sup> 본 연구에서 용적 과부하 심근에서는 전반적으로 감소함을 보여주었다.

용적 과부하 심장에서는 세포 구조 관련 유전자 외에 세포 대사에 관련된 유전자들도 발현이 감소하는 추세를 보였다. 여기에는 X63422 ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit 같은 미토콘드리아의 ATP 생성 유전자, M11560 aldolase A, fructose-bisphosphate 같은 당분해 대사 관련 효소 유전자가 포함되어 있었다. 용적 과부하 심근에서 세포 성장에 관한 유전자의 발현이 증가함에도 세포 구조나 대사 유전자의 발현이 감소하는 것은 용적 과부하를 보상할 심근의 조직 반응이 불충분 함을 시사한다. 실제 압력 과부하의 심장에서도 대상부전(decompensation)을 일으키면 세포내 구조인 근세사의 질량이 감소함이 보고된 바 있다.<sup>22)</sup> 그러나 용적 과부하 심근 조직에서 나타난 성장과 구조, 성장과 대사의 불균형을 설명하기 위해서는 향후의 연구가 필요할 것이다.

사람을 대상으로 심장의 확장을 특징으로 하는 심실질환에서의 유전자 발현 연구로서는 Yang 등<sup>16)</sup>이 허혈성 심근병증(ischemic cardiomyopathy)과 확장성 심근병증(dilated cardiomyopathy)을 대상으로 보고한 바가 있어 본 연구와 비교된다. 전자의 연구에서는 환자들이 심근에서 세포 구조나 대사 관련 유전자의 변화 외에 세포 단백질의 해체에 관여하는 유전자( $\alpha_1$ -antichymotrypsin, ubiquitin, gelsolin)과 스트레스 단백질 관련 유전자( $\alpha$  B-crystallin,  $\mu$ -crystallin)의 발현이 변화하였다. 그러나 두 연구의 대상이 모두 심실의 확장을 특징으로 하였지만 Yang 등<sup>16)</sup>의 연구에서 대상 환자의 좌심기능은 구혈율 20% 미만으로 심장이식이 필요하였던 말기 심부전 상태였던 반면 본 연구의 대상은 평균 구혈율 55.4%로서 수축기능이 대체로 정상이었다. 병인에서도 전자가 일차적으로 심근 조직을 침범하는 질환이었던

데 비해 본 연구에서는 폐쇄 부전을 일으킨 판막이 일차 병변이었고 심근은 이차적인 영향을 받은 환자들이었다. 그리고 전자의 연구는 심부전의 종말 단계로서 각종의 심근 손상과 이에 대한 심장의 반응이 복합적으로 나타나지만 본 연구는 수축 기능 저하가 나타나기 전의 단계로서 심근에 대한 용적 과부하의 영향이 보다 순수하게 반영되었을 것으로 생각된다.

심부전에서 신경액상의 변화는 주요 병태생리로서 전신적 변화 뿐 아니라 심근과 같은 국소 조직에서의 활성화가 주요 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>23)</sup> 주 요소는 레닌-알도스테론-안지오텐신계(renin-aldosterone-angiotensin system; RAS)<sup>24)</sup>와 교감신경-아드레날린계(sympathoadrenal system)<sup>25)</sup>로서 이들의 활성화는 체액의 저류, 심근세포의 비후, 혈관의 수축, 세포 고사(apoptosis) 등과 같은 유해한 변화를 초래한다. 본 연구에서도 microarray에서 angiotensin receptor의 발현이 증가되었을 뿐 아니라 조직내 단백질 변화에서도 이의 증가가 확인되어 용적과부하가 사람의 심근에서 실제 RAS 발현이 전사 단계에서 상향 조절됨을 보여주고 있다. 부전을 일으킨 심근에서의 angiotensin receptor의 발현 증가는 동물 실험을 통해서 관찰된 바가 있으나<sup>26)</sup> 사람의 심근 조직에서 이러한 소견이 보고된 적은 없었다. 심부전에서 RAS나 교감-아드레날린계의 역할은 이에 대한 길항제가 심부전의 진행을 저지하고 사망률과 이환율을 유의하게 감소시킨다는 사실에 의해 확인해졌으며<sup>27)</sup> 이는 병리를 이해함으로써 질병 치료의 발전을 이룩한 대표적인 예이다.

본 연구에서 조직 채취는 수술을 받은 환자를 대상으로 하였으므로 그 수가 충분하지 못하였으며 microarray 분석시 질환군/대조군의 비율이 2이상 이면서 3명 이상에서 양질의 신호가 있는 경우로 국한되어 실제로 용적 과부하 심근에서 발현이 변화했을 유전자가 누락되는 위음성(false negative)의 오류가 있을 수 있다. 또한 microarray의 cDNA 집점이 4,600여개로 비교적 수가 적었고, 분석 결과를 확인하기 위한 RT-PCR이나 Western blot의 대상 유전자 수도 부족한 한계점을 가지고 있다. 그러나 본 연구는 cDNA microarray를 이용하여 사람에서 용적 과부하를 일으킨 심장 조직에서 다양한 종류의 유전자 발현이 변화함을 관찰하였으며 기능적으로 세포의 성장에 관련된 유전자의 발현이 증가하면서 세포 구조와 대사에 관련된 유전자의 발현이 감소하는 특성을 확인할 수 있었다. 이는 DNA microarray의 기법이 실험적인 연구에서 뿐 아니라 임상에서 심질환의 발생과 진행과정에서 기여하는 유전자를 검색할 수 있는 유용한 수단임을 보여준 실례이다. 향후 보다 많은 수의 유전자가 집적된 DNA chip를 사용한다면 용적과부하가 초래하는 세포내 유전자 발현 변화에 대해 광범위한 정보를 얻을 수 있을 것이며 이를 바탕으로 용적과부하가 심부전으로 진행되는 과정의 병리를 이해하고 이에 대한 최적의 치료수단을 마련

하는데 큰 기여를 할 수 있을 것이라 사료된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

장기간 용적 과부하를 받는 심근 조직은 여러 가지의 구조적, 기능적 변화가 일어난다. 이러한 심실의 재형성 과정에는 미세구조, 분자의 변화와 그에 상응하는 유전자의 발현 변화가 수반된다. 본 연구는 DNA microarray의 기법을 이용하여 사람에서 용적 과부하에 의한 심실의 확장 과정에서 발생하는 유전자의 발현 양상을 확인하고자 시행되었다.

### 방 법 :

만성 판막 폐쇄 부전 질환으로 인하여 좌심실 수축기 내경이 65 mm 이상으로 증가한 5명의 환자와 심질환이 없는 4명의 심장에서 채취한 심근 조직을 대상으로 하였으며 유전자 발현 양상은 4,600개의 cDNA가 집적된 chip을 이용하여 분석하였다.

### 결 과 :

DNA microarray의 분석 결과 용적 부하 심근에서 기능적으로 분류 가능한 유전자의 변화는 57개에서 관찰되었으며 세포 주기/성장(10), 신호 전달(5), 전사/번역(13), 세포 고사(4), 세포 구조(11), 세포 대사(7), 기타 기능(7)에 관련된 유전자들이었다. 세포 주기와 신호 전달된 유전자들은 발현 증가가 우세하였으며(세포 주기, 증가 9/감소 1; 신호 전달, 증가 4/감소 1), 전사(증가 6/감소 7)나 세포 고사(증가 2/감소 2)에서는 증가가 유사한 정도로 관찰되었다. 이에 반해서 세포 구조(증가 1/감소 10)와 세포 대사(증가 2/감소 5)에 관련된 유전자들의 발현은 정상 대조군에 비해 현저하게 감소되었다. Microarray의 결과를 확인하기 위해 임의로 선택한 유전자를 대상으로 시행한 semiquantitative RT-PCR 및 western blot에서도 같은 유형을 발견할 수 있었다.

### 결 론 :

이상의 결과에서 사람에서 장기간 용적 과부하에 의한 좌심실의 확장 과정에서 다양한 유전자의 발현이 변화함을 발견하였으며 세포 성장에 관한 유전자의 발현이 증가하는 반면 세포 구조와 대사에 관한 유전자는 발현이 감소하는 양상을 관찰하였다. Microarray는 향후 심질환의 병리를 이해하고 치료 방침을 구축하는데 유용한 수단이라고 생각된다.

**중심 단어 :** 용적 과부하 ; 인간 ; 심근 조직 ; 유전자 발현 ; DNA microarrays.

## REFERENCES

- Shin WJ, Park CG, Kim YH, et al. Ventricular remodelling after acute myocardial infarction. *Korean Circ J* 1993;23:921-7.
- Brower GL, Henegar JR, Janicki JS. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *Am J Physiol* 1996;271:H2071-8.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-41.
- Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocyte participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rat. *Circ Res* 1990;67:23-4.
- Kitsis RN, Scheuer J. Functional significance of alterations in cardiac contractile protein isoforms. *Clin Cardiol* 1996;19:9-18.
- Kim YD, Kim IH, Kim JS, et al. The change of expression of Troponin T and I isoforms in the failing myocardium of rat after myocardial infarction. *Korean Circ J* 1996;26:872-86.
- Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 1994;74:555-64.
- Flesch M, Schwinger RH, Schnabel P, et al. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{++}$  ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 1996;74:321-32.
- Studer R, Reinecke H, Bilger J, et al. Gene expression of the cardiac  $Na^{+}$ - $Ca^{++}$  exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 1994;75:443-53.
- Mann DL, Spinale FG. Activation of matrix metalloproteinase in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation* 1998;98:1699-702.
- Hardy CJ, Weiss RG, Bottomley PA, Gerstenblith G. Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1991;122:795-801.
- Conway MA, Bottomley PA, Ouwerkerk R, Radda GK, Rajagoplan B. Mitral regurgitation: impaired systolic function, eccentric hypertrophy, and increased severity are linked to lower phosphocreatine/ATP ratios in humans. *Circulation* 1998;97:1716-23.
- Wilgenbus KK, Lichter P. DNA chip technology ante portas. *J Mol Med* 1999;77:761-8.
- Cook SA, Rosenzweig A. DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine. *Circ Res* 2002;91:559-64.
- Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res* 2000;86:939-45.
- Yang J, Moravec CS, Sussman MA, et al. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 2000;102:3046-52.
- Johnatty SE, Dyck JR, Michael LH, Olsen EN, Abdellatif M. Identification of genes regulated during mechanical load-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:805-15.
- Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J. Expression profile reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6745-50.
- Kaynak B, Heydebreck A, Mebus S, et al. Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts. *Circulation* 2003;107:2467-74.
- Cohn JN, Ferrari R, Sherpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
- Weinberg EO, Mirosou M, Gannon J, Dzau VJ, Lee RT, Pratt RE. Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload. *Physiol Genomics* 2003;12:113-27.
- Schwarz F, Schaper J, Kittstein D, Flameng W, Walter P, Schaper W. Reduced volume fraction of myofibril in myocardium of patients with decompensated pressure overload. *Circulation* 1981;63:1299-304.
- Dzau VJ. Contributions of neuroendocrine and autocrine-paracrine mechanisms to the pathophysiology and pharmacology of congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1988;62:76E-81E.



- 24) Varagic J, Frolich ED. *Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. J Mol Cell Cardiol* 2002;34: 1435-42.
- 25) Esler M, Kaye D, Lambert G, Esler D, Jennings G. *Adrenergic nerve system in heart failure. Am J Cardiol* 1997;80 (11A):7L-14L.
- 26) Hoffmann S, Krause T, van Geel PP, et al. *Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. J Mol Med* 2001;79:601-8.
- 27) Jeon ES. *Role of angiotensin II receptor blockers in the treatment of congestive heart failure. Korean Circ J* 2002;32:1039-45.