

심장근육모세포주에서 Adriamycin으로 유발된 세포 사멸에 대한 Cardiotrophin-1의 효과

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 삼성서울병원 심장혈관센터

신재옥 · 주은선 · 송현미 · 윤수현 · 임병관 · 최진호 · 김덕경 · 전은석

Effects of Cardiotrophin-1 on Adriamycin-Induced Apoptosis in H9c2 Cardiomyoblasts

Jae-Ok Shin, MS, Eun-Seon Ju, BS, Hyun-Mi Song, MS, Soo-Hyeon Yun, MS,

Byung-Kwan Lim, PhD, Jin-Ho Choi, MD, Duk-Kyung Kim, MD and Eun-Seok Jeon, MD

Department of Medicine, Sungkyunkwan University School of Medicine, Cardiac and Vascular Center, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives: Adriamycin (doxorubicin, ADR) is a highly effective anti-neoplastic drug, but its clinical use is limited by its adverse side effects on the heart. Cardiotrophin (CT-1), a potent cardiac survival factor, is capable of inhibiting apoptosis in cardiac myocytes. The aim of this study was to investigate the cytoprotective effects of CT-1 against ADR-induced apoptosis *in vitro*. **Materials and Methods:** We determined a reasonable ADR concentration for inducing cell death by utilizing a cell survival test performed in a dose-dependent manner. To determine the requirements for apoptosis in ADR-treated cardiac myocytes (H9c2 cells), we examined the effect of CT-1 on survival and apoptotic changes using a cell counting kit (CCK), RT-PCR, and Western blotting. **Results:** In analyzing cell survival as determined by CCK, ADR-induced cell death was found to occur in a dose-dependent manner (50% death at 24 hours after 2 μ M of ADR), and ADR was shown to decrease procaspase-3. On RT-PCR, expression of Bax- α mRNA increased and Bcl-2 decreased during the 24 hours after ADR treatment. Consequently, the ratio of Bax- α /Bcl-2 mRNA peaked at 24 hours after ADR treatment. In contrast, CT-1 effectively attenuated the ADR-induced cell death in a dose-dependent manner. The changes in Bax- α and Bcl-2 mRNA expression after ADR treatment were reversed by CT-1 (1 ng/mL) treatment. The protein levels of procaspase-3 decreased after ADR treatment, an effect which was reversed by CT-1 treatment. Akt phosphorylation was also increased by CT-1, demonstrating that CT-1 inhibited apoptosis induced by ADR. **Conclusion:** These data demonstrated that ADR-induced apoptosis of cardiomyocytes can be prevented by CT-1; therefore, it may be possible to use CT-1 as a cardioprotective agent during ADR chemotherapy in patients with cancer. (Korean Circ J 2008;38:264-269)

KEY WORDS: Adriamycin; Cardiotrophin-1; Apoptosis; Cell protection.

서 론

Adriamycin (doxorubicin, ADR)은 널리 쓰이고 있는 항

Received: April 27, 2007

Revision Received: January 22, 2008

Accepted: February 19, 2008

Correspondence: Eun-Seok Jeon, MD, Department of Medicine, Sungkyunkwan University School of Medicine, Cardiac and Vascular Center, Samsung Medical Center, 50 Ilwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea
Tel: 82-2-3410-3448, Fax: 82-2-3410-3849
E-mail: esjeon@smc.samsung.co.kr

암제이나, 심장독성으로 인해 사용이 제한되는데,¹⁾ 심장독성은 진행하여 누적 용량이 500~600 mg/m² 이상인 경우에 일어나고,²⁾ 비가역적인 심근증으로 진행된다. ADR의 심장독성 기전은 확실히 밝혀지지는 않았으나, 여러 가지 설이 관여되는 것으로 알려져 있다. 세포 독성 자유 radical의 형성,³⁾⁴⁾ 미토콘드리아의 기능 장애,⁵⁾ 칼슘 과부하 및 기저막에 결합된 분자의 억제,⁶⁾ 지질 과산화 (peroxidation),⁷⁾⁸⁾ DNA intercalation, topoisomerase II의 억제, DNA 중합효소의 억제, RNA 중합효소 및 DNA 복원 효소의 억제, 핵산이나

핵산의 복합체와 상호작용을 한다는 것이 알려져 있다.⁹⁻¹²⁾

태아 줄기 세포 (Embryonic stem cell)에서 분리된 CT-1은 아미노산 서열상 interleukin (IL)-6/interleukin (IL)-11/leukemia inhibitory factor (LIF)/ciliary neurotrophic factor (CNTF)/Oncostatin M 계열에 속하여 gp130를 통해 신호전달 되는 cytokine으로 심장 발생 초기에 심근 세포에서 발현되고, endocardial cushion 등의 결체 조직에서는 발현되지 않아 심근 세포의 분화 및 심장 형태 형성에 중요한 역할을 한다.¹³⁾ CT-1은 gp-130를 통한 신호전달 후 심근 비후의 신호전달 (주로 JAK/STAT 경로)과 세포 생존 및 세포 사멸 방지에 관련된 신호전달 체계 (MAP kinase 경로)가 다르다.¹³⁻¹⁵⁾ 따라서, CT-1은 여러 자극에 대한 심근 비후 반응뿐 아니라 심근세포의 생존에도 관여하여 임상적으로 세포 손상 후 심장 기능 유지에 효과적인 약물로 사용될 가능성이 있다. 특히, CT-1은 심근 손상 후 분열하지 않는 심근세포의 비후를 유발할 뿐 아니라 심근세포의 손상에 대해 심근세포의 생존을 유지하는 기능이 있어 심근 손상의 정도를 작게 하여 심근 손상 후 심장 기능을 유지할 수 있는 심부전 치료 또는 예방제로 사용될 가능성이 있다. 본 연구에서는 심장근육모세포주에서 세포 사멸을 ADR로 유발하고 CT-1의 심근 손상 보호 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

세포 배양

실험에 사용한 H9c2 세포주 (CRL-1446, ATCC, Rockville, MD, USA)는 쥐 (Rat)의 심장에서 분리한 심장근육모세포이다. 배양액은 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco), sodium bicarbonate, 항생제 (penicillin G, streptomycin)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's minimum essential medium, Gibco)을 사용하였고, 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

세포 생존율 검사

세포의 생존율은 Cell Counting Kit-8 (CCK, Dojindo laboratories, Japan)를 이용하여 측정하였다. 세포를 96-well plate에 배양한 후, 각 well에 CCK를 넣고 4시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후 450 nm의 파장을 사용하여 ELISA-reader로 흡광도를 측정하여 세포 생존 정도를 비교하였다.¹⁶⁾¹⁷⁾

Bax-α와 Bcl-2 유전자 발현 측정을 위한 RT-PCR

Total RNA는 TRIzol reagent (Gibco BRL, USA)를 이용하여 추출하였고, RNA 1 μg을 주형으로 ThermoScript™ RT-PCR Systems (Gibco BRL, USA)을 이용하여 DNA를 얻었다. 각각의 DNA를 주형으로 Bax-α와 Bcl-2를 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel에서 전기영

동하여 확인하였다. Total RNA에 대한 internal standard는 GAPDH를 사용하였다. PCR에 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

Bax-α (147 bp) sense 5'-CCAAGAAGCTGAGCGAG-TGTCTC-3' and

anti-sense 5'-AGTTCGGATCAGCAAACATGTCA-3';

Bcl-2 (293 bp) sense 5'-AGTGCACCTGACGCCCTT-3' and

anti-sense 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3';

GAPDH (187 bp) sense 5'-GCCAAGGATATCCATGA-CAACT-3' and

anti-sense 5'-CTGGGATGACCTTGCCCACAGCCTTG-3'.

전기영동 결과는 densitometry program (BioRad, USA)으로 분석하였고, Bax-α와 Bcl-2의 발현량은 Glyceride 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현량으로 반정량화 (semi-quantify)하였다.

Western blotting

세포에서 추출한 단백질로 procaspase 3, phospho-Akt와 Akt (Cell signaling, USA)에 대한 항체를 사용하여 immunoblotting을 시행하였다. 6 cm 배양접시에서 자란 세포들을 cold PBS로 세척한 후, SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.01% w/v bromophenol blue)를 넣고 세포를 용해시킨 후 sonication 하였다. 동량의 단백질로 SDS-PAGE를 수행한 다음 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 blocking buffer (5% nonfat milk and 0.1% Tween 20 in PBS)로 2시간 동안 blocking 후 항체를 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)에 희석하여 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. PBST로 membrane을 세척한 후 HRP-conjugated anti-rabbit IgG를 blocking buffer에 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 PBST로 세척 후 chemiluminescence system WESTZOL kit (iNtRON Biotechnology, Korea)을 사용하였다.

통계처리

실험 결과는 mean±SEM으로 표시하였고, 각 군간의 수치 결과는 t-test 또는 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 검정하였으며, p값 0.05미만인 경우 통계학적 유의성을 인정하였다.

결 과

세포 생존율 검사

H9c2 세포주에 대한 다양한 농도의 ADR과 CT-1의 영향을 확인하기 위하여 세포 생존율을 Cell Counting Kit-8 (CCK, Dojindo, Japan)로 측정하였다 (Fig. 1). ADR 0.25,

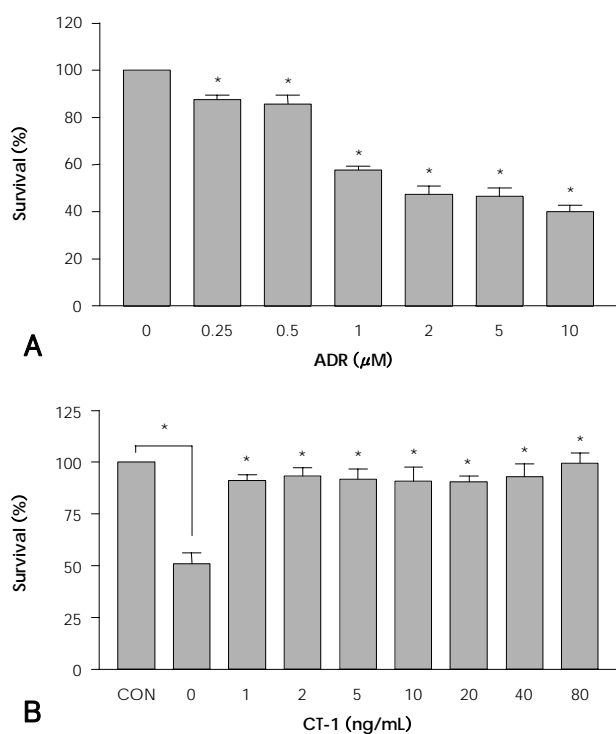


Fig. 1. Cell viability test performed at 24 hr after treatment with ADR (A), with or without CT-1 (B). ADR induced cell death in a dose dependent manner (Panel A) and CT-1 prevent ADR-induced cell death from the concentration of 1 ng/mL. Result presented in bar graph are mean \pm SEM of three experiments. * $p < 0.01$ when compared with control cells. ADR: adriamycin, CT-1: cardiotrophin-1.

0.5 μ M 농도에 18시간 동안 배양 결과 ADR을 처리하지 않은 세포의 생존율과 큰 차이를 보이지 않았지만, ADR 1 μ M 이상의 농도에서의 세포 생존율은 급격히 감소하여 ADR 농도가 10 μ M일 때 세포 생존율이 40% 이하로 감소하였다 (Fig. 1A). ADR 2 μ M과 CT-1을 다양한 농도로 동시에 24 시간 동안 처리한 후 CCK로 세포 생존율을 관찰한 결과 (Fig. 1B), ADR만을 처리한 세포 생존율은 50% 정도였으나, CT-1을 처리하였을 때 생존율이 90% 이상으로 증가하여 CT-1이 ADR에 의한 세포 생존율에 영향을 주었음을 확인할 수 있었다.

Bax- α 와 Bcl-2 유전자 발현

H9c2 세포주에서의 ADR에 의한 세포 손상 기전을 확인하기 위해, anti-apoptotic protein Bcl-2와 pro-apoptotic protein인 Bax- α 의 RNA 표현 정도를 RT-PCR 방법으로 확인하였다 (Fig. 2). ADR을 처리하지 않은 세포에서는 Bcl-2와 Bax- α 의 발현량의 차이를 보이지 않았으나, ADR을 처리한 세포에서는 Bcl-2 mRNA의 발현은 감소하였고, Bax- α 는 증가하였다. Bax- α : Bcl-2의 비율은 ADR을 처리하지 않은 세포에 비해 ADR 12시간 처리 후에는 2.0배 증가하였으며 24시간 후에는 3.5배로 증가하였다.

반면 ADR 2 μ M과 CT-1을 농도 별로 동시에 24시간 동

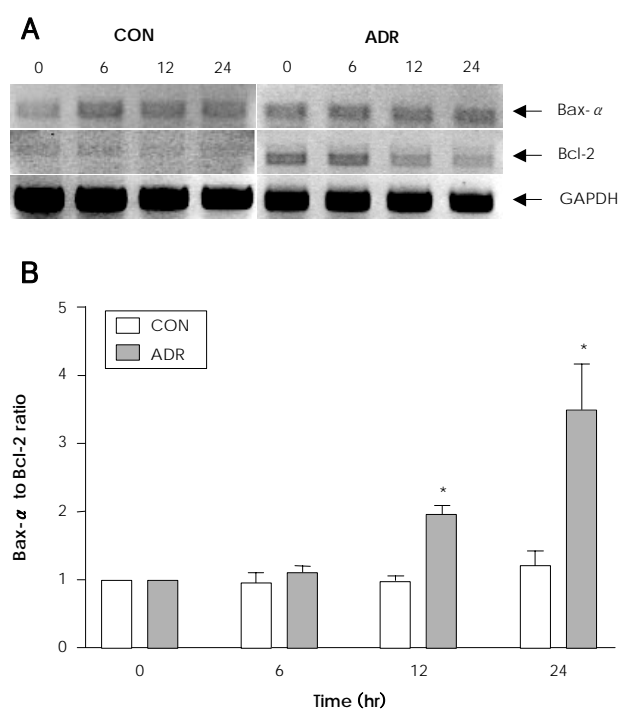


Fig. 2. Bax- α and Bcl-2 mRNA expression in H9c2 after ADR 2 μ M treatment. Normalization relative to GAPDH was performed. Mean mRNA levels in untreated control cells are expressed as 1. * $p < 0.01$ when compared to control cells. CON: untreated control cells, ADR: Adriamycin, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

안 처리하였을 때, ADR과 CT-1을 동시에 처리한 세포에서 아무것도 처리하지 않은 세포와 비슷한 수준의 Bax- α :Bcl-2의 비율을 보였으며 (0.951 \pm 0.264), CT-1만 처리하였을 경우 세포 내 Bax- α 의 발현은 감소하고, Bcl-2의 발현은 현저히 증가하였음을 확인하였다 (Fig. 3).

ADR에 의해 유발된 Caspase-3 및 Akt signal 변화

H9c2 세포주에 ADR을 처리한 후, Bcl-2와 Bax- α 의 downstream인 apoptotic signal의 변화를 procaspase-3의 감소로 확인하였다 (Fig. 4). Procaspase-3의 감소는 ADR 처리 6시간 이후 나타났으며, 24시간 후에는 대부분의 Procaspase-3가 없어짐을 관찰하였다.

반면, ADR 10 μ M과 CT-1 500 ng/mL을 6 hr, 24 hr 별로 동시에 처리하였을 때, ADR만 처리한 세포에 비해 Procaspase-3의 감소가 줄어들어 ADR에 의한 세포 손상의 기전은 세포 사멸임을 확인하였다. 또, CT-1 1 ng/mL을 H9c2 세포주에 처리한 후 Akt의 인산화를 western blot으로 확인하였는데, CT-1은 Akt의 인산화에 관여함을 알 수 있었다 (Fig. 5).

고 찰

ADR은 효과적인 항암제이나 심장 독성으로 인해 사용이

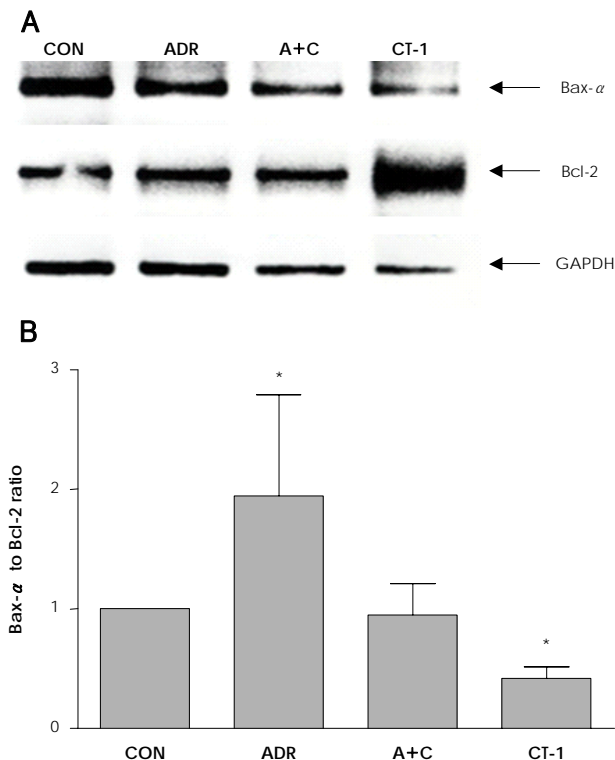


Fig. 3. Bax- α and Bcl-2 mRNA expression in H9c2 after ADR (2 μ M) and CT-1 (1 ng/mL) treatment. Normalization relative to GAPDH was performed. The mean mRNA levels in untreated control cells are expressed as 1. * p <0.01 when compared with control cells. CON: untreated control cells, ADR: Adriamycin, A+C: Adriamycin 2 μ M and Cardiostrophin-1 1 ng/mL, CT-1: cardiostrophin-1, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

많이 제한되어 왔다. 심근 독성의 정확한 기전은 분명히 알려지지 않았다. 세포 독성 자유 radical의 형성,^{3,4)} 미토콘드리아의 기능 장애,⁵⁾ 칼슘 과부하 및 기저막에 결합된 분자의 억제,⁶⁾ 지질 과산화 (peroxidation),^{7,8)} DNA intercalation, topoisomerase II의 억제, DNA 중합효소의 억제, RNA 중합효소 및 DNA 복원 효소의 억제, 핵산이나 핵산의 복합체와 상호작용을 한다는 것이 알려져 있다.⁹⁻¹²⁾ ADR에 의한 심근 세포의 세포 사멸에 대한 경로는 Wang 등¹⁸⁾은 심근 세포를 이용한 실험에서 Bax의 유도를 보고했고, Jeon 등¹⁹⁾은 caspase-3 활성도의 증가를 보고한 바 있다. Nakamura 등²⁰⁾은 Fas-Fas ligand를 매개로 한 세포 사멸의 경로를 항 Fas 항체에 의한 세포 사멸의 억제를 이용하여 동물 실험에서 보고한 바 있다. Kumar 등²¹⁾은 ADR에 의한 심근증 동물모델에서 항 산화제인 probucol의 효과를 Bax- α 의 발현 증가와 Bcl-2의 발현 감소로 세포 사멸 기전을 설명하고 있다. Bcl-2 동종영역의 각기 다른 조합에 따라 세포 사멸을 촉진하기도 하고 억제하기도 하는데, Bcl-2, Bcl-x는 세포 사멸을 억제하고 Bax, Bak 등은 세포 사멸을 촉진한다.²²⁾ ADR에 의한 심근증은 주로 Bax 발현의 증가와 Bcl-2발현의 감소에 따른 세포 사멸로 인해 유도된다.²³⁾ 본 연구에서는 ADR 유발 심근증에서 세포 사멸의 역할과

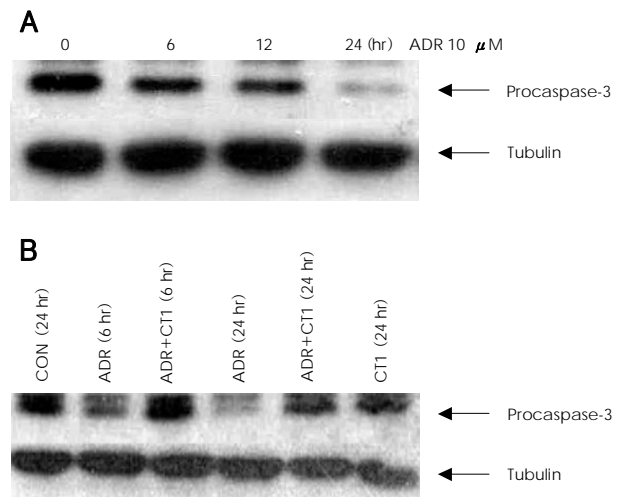


Fig. 4. ADR induces apoptosis in H9c2. A: H9c2 cells were treated with 10 μ M ADR for various time and analyzed by western blotting using anti-caspase-3 antibody. B: H9c2 cells were treated with ADR (10 μ M) and CT-1 (500 ng/mL). ADR induces apoptosis were decreased by CT-1 treatment. α -tubulin level was also examined as a loading control. ADR: adriamycin, CT-1: cardiostrophin-1, CON: untreated control cells.

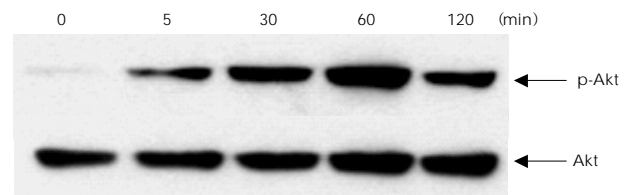


Fig. 5. CT-1 phosphorylated Akt. H9c2 cells were exposed to CT-1 (1 ng/mL) for the indicated times. Representative western blot for p-Akt are shown. CT-1: cardiostrophin-1.

경로를 알아보고, CT-1의 심근 보호 효과를 확인하였다.

Sheng 등¹⁴⁾과 Sung²⁴⁾은 1997년 Coxsackievirus B3에 대한 심근 세포의 세포 사멸에서 CT-1이 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 경로를 통하여 세포 사멸을 감소시킨다고 보고하였으며, Kunisada 등¹⁵⁾은 glycoprotein 130 (gp-130)의 downstream adapter molecule인 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)를 심장 특이적 과발현 형질전환 쥐에 심근 비후 경로와 세포 생존 경로가 동시에 작용하여 ADR에 의한 심근증에 효과가 있다고 보고하였다. Lopez 등²⁵⁾은 CT-1이 성인 심근 세포의 non-ischemic 사멸 자극에서 세포의 생존을 보호하는 효과가 있다고 보고하였다. 하지만 ADR 유발 심근증에서의 CT-1의 직접적인 효과는 아직 보고된 바 없다.

CT-1은 201 아미노산으로 구성되어 있는데 LITF, CNTF, IL-11, 그리고 oncostatin M과 같은 IL-6 cytokine superfamily에 속해 있다.²⁶⁾ Pennica 등²⁶⁾에 발견된 CT-1은, 심장 초기 발생시 gp130을 통하여 심근 세포의 비후와 심근 세포 보호 기능을 한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 심근 세포에서 phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K)-의존적 경로를 통하여 Akt와 pro-apoptotic 요소인 BAD를 인산

화하여 세포의 생존에 관여한다.²⁷⁾

본 연구는 먼저 ADR 유발 심근증에서 병태 생리학적인 전 중 하나인 세포 사멸이 그 자체로 심근증을 유발할 수 있을 것인가에 대해 알아보기 위해 세포 사멸과 심근증과의 관계를 살펴보았다. 우선 ADR에 대한 세포 사멸을 확인하기 위해 ADR을 농도별로 처리한 후 세포 생존율을 측정하여 ADR을 처리하지 않은 세포 생존율을 비교한 결과 ADR만을 처리하였을 때 세포 생존율이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었고, ADR, CT-1 병합 투여하였을 경우에서 처치 전과 비슷한 상태의 세포 생존율을 유지하고 있었다. 이를 통해 CT-1은 ADR에 의한 세포 사멸에 대한 보호 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 ADR과 CT-1을 동시에 처리하였을 때 세포 사멸이 현저히 감소하여 CT-1의 심근 보호 효과는 세포 사멸을 억제함으로써 나타난다는 것을 알 수 있었다. 이러한 세포 사멸의 경로는 크게 mitochondria를 경유하는 Bax- α 와 Bcl-1의 영향에 의한 caspase-9의 활성화를 통해 공통경로인 caspase-3를 활성화시키는 경로이다. ADR에 의한 세포 사멸의 경로를 알아보기 위해 western blot을 시행한 결과, ADR을 단독 처리하였을 때 ADR과 CT-1 동시 처리 때보다 Bax- α 의 활성도가 높아져 있고 Bcl-2의 활성도가 떨어져 있는 것으로 미루어 보아 ADR에 의한 심근증에서 세포 사멸의 경로는 Bax- α 의 활성도 증가, Bcl-2의 활성도 감소에 의한 세포 사멸의 신호가 caspase-3를 활성화에 의한다는 것을 확인하였다. 또, CT-1만 처리하였을 경우 Bcl-2의 발현이 ADR만을 처리한 경우에 비해 증가되어 있어 CT-1이 Bcl-2의 발현에 영향을 주는 것으로 생각되며, 특히 Bax- α 의 발현은 ADR만 처리한 경우에 비해서는 높지만 Bcl-2의 발현이 현저히 높은 활성도를 보임으로써 CT-1의 심근 보호의 효과는 주로 Bax- α 와 Bcl-2의 발현에 영향을 주어 세포 사멸의 경로를 억제하는 것으로 생각된다. 또한 Bcl-2의 발현뿐 아니라 세포 생존에 중요한 분자인 Akt의 인산화를 시켜 활성화 시킴으로써 ADR에 유발된 세포 사멸에 CT-1의 효과가 있는 것으로 사료된다. 따라서, CT-1은 ADR에 의한 심근 세포의 손상에 대해 심근 세포의 생존을 유지하는 기능이 있어 심근 손상의 정도를 작게 하여 심근 손상 후 심장 기능을 유지할 수 있는 심부전 치료 또는 예방제로 사용될 가능성이 있다.

요 약

배경 및 목적

ADR은 널리 쓰이고 있는 항암제이나, 심장독성으로 인해 사용이 제한되고 있다. 하지만 ADR로 인한 심장독성 기전은 확실히 밝혀지지 않았다. CT-1은 심근세포의 손상에 대해 심근세포의 생존을 유지하는 기능이 있어 심근 손상 후 심장 기능을 유지할 수 있는 심부전 치료 또는 예방제

로 사용될 가능성이 있다. 본 연구는 ADR으로 세포 사멸을 유발하고 CT-1의 효과를 *in vitro*에서 확인하였다.

방 법

심장근육세포주인 H9c2를 이용하여 ADR로 세포 사멸을 유발하고, CT-1으로 인한 세포 생존율과 세포 사멸의 변화를 알기 위해 세포 생존율 검사, RT-PCR와 Western blot을 시행하였다.

결 과

ADR 2 μ M을 24시간 처리하였을 때 세포 생존율은 50%로 감소하였고, procaspase-3 역시 감소하였다. 또, ADR 처리 후 Bax- α 의 발현은 증가, Bcl-2의 발현은 점차 감소하는 것을 RT-PCR로 확인하였고, Bax- α /Bcl-2 비는 ADR을 처리 24시간 동안 지속적으로 증가하여 ADR으로 인한 세포 사멸의 기전은 세포 사멸로 확인되었다. 상기한 ADR의 세포 독성은 CT-1을 처리하였을 때 감소하였고, 세포 사멸에 관여하는 Bax- α /Bcl-2의 비 및 procaspase-3의 감소를 방지할 수 있었고, 특히 CT-1은 Akt 인산화에 직접 관여하여 ADR으로 인한 세포 사멸을 감소시킴을 확인하였다.

결 론

본 연구에서 심근 세포에 ADR으로 유발된 세포 사멸을 CT-1으로 감소시킬 수 있으며 ADR 치료 환자의 심근 손상의 정도를 작게 하여 심근 손상 후 심장 기능을 유지할 수 있는 심부전 치료 또는 예방제로 사용될 가능성을 확인하였다.

중심 단어: 아드리아마이신; Cardiotrophin-1; 세포사멸; 세포보호.

Acknowledgments

This work was supported by the Samsung Biomedical Research Institute grant, #SBRI C-A5-123-1.

REFERENCES

- 1) Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;339:900-5.
- 2) Buzdar AU, Marcus C, Smith TL, Blumenschein GR. Early and delayed cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer* 1985;55:2761-5.
- 3) Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 1983;43:460-72.
- 4) Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res* 1988;48:4766-9.
- 5) Papadopoulou LC, Theophilidis G, Thomopoulos GN, Tsiftoglou AS. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochem Pharmacol* 1999;57:481-9.
- 6) Mijares A, Lopez JR. L-carnitine prevents increase in diastolic $[Ca^{2+}]$ induced by doxorubicin in cardiac cells. *Eur J Pharmacol* 2001;425:117-20.
- 7) Mimnaugh EG, Trush MA, Gram TE. Enhancement of rat heart microsomal lipid peroxidation following doxorubicin treatment

- in vivo*. *Cancer Treat Rep* 1983;67:731-3.
- 8) Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977;197:165-7.
 - 9) Potmesil M, Israel M, Silber R. Two mechanisms of adriamycin-DNA interaction in L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 1984;33:3137-42.
 - 10) Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984;226:466-8.
 - 11) Lampidis TJ, Johnson LV, Israel M. Effects of Adriamycin on rat heart cells in culture: increased accumulation and nucleoli fragmentation in cardiac muscle vs non-muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:913-24.
 - 12) Goldenberg GJ, Wang H, Blair GW. Resistance to adriamycin: relationship of cytotoxicity to drug uptake and DNA single- and double-strand breakage in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia. *Cancer Res* 1986;46:2978-83.
 - 13) Latchman DS. Cardiotrophin-1: a novel cytokine and its effects in the heart and other tissues. *Pharmacol Ther* 2000;85:29-37.
 - 14) Sheng Z, Knowlton K, Chen J, Hoshijima M, Brown JH, Chien KR. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway: divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1997;272:5783-91.
 - 15) Kunisada K, Negoro S, Tone E, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:315-9.
 - 16) Lim BK, Choi JH, Jeon ES, et al. Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc Res* 2006;71:517-26.
 - 17) Kim JM, Lim BK, Jeon ES, et al. TNFR-Fc fusion protein expressed by *in vivo* electroporation improves survival rates and myocardial injury in coxsackievirus induced murine myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:765-71.
 - 18) Wang L, Ma W, Markovic R, Chen JW, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998;83:516-22.
 - 19) Jeon MH, Youn HJ, Lee JH. Adriamycin induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes via a caspase-independent pathway. *Korean Circ J* 2004;34:76-83.
 - 20) Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: *In vivo* study. *Circulation* 2000;102:572-8.
 - 21) 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.
 - 22) Park SW, Seo HS, Kim JW, et al. Effect of human Bcl-2 gene expression on the peripheral atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mouse. *Korean Circ J* 2005;35:725-33.
 - 23) Park CS, Youn HJ, Cho EJ, et al. Cardioprotective effect of IGF-1 in mouse with adriamycin-induced cardiomyopathy. *Korean Circ J* 2002;32:1116-23.
 - 24) Sung JD, Jeon ES. Pathogenesis of myocardial cell death and effect of cardiotrophin-1 in coxsackieviral myocarditis. *Korean J Cardiovasc Dis* 2002;3:34-42.
 - 25) Lopez N, Diez J, Fortuno MA. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. *Cytokine* 2005;30:282-92.
 - 26) Pennica D, King KL, Shaw KJ, et al. Expression cloning of cardiotrophin1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1142-6.
 - 27) Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, et al. Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1385-94.