

# 심장에서 CR6-interacting Factor 1의 미토콘드리아 활성조절

진선아\*, 이영달\*, 윤정연, 김선경, 안계택, 박수진, 김준형, 박재형, 이재환, 최시완, 성인환, 정진욱

충남대학교 의학전문대학원 충남대학교병원 권역심뇌혈관센터

## Cardiac Mitochondrial Integrity Is Regulated by CR6-interacting Factor 1 in the Heart

Seon-Ah Jin, MD\*, Young Dal Lee, MD\*, Jung Yeon Yoon, MS, Sun-Kyeong Kim, BS, Kye Taek Ahn, MD, Soo Jin Park, MD, Jun Hyung Kim, MD, Jae-Hyeong Park, MD, Jae-Hwan Lee, MD, Si Wan Choi, MD, In-Wan Seong, MD, Jin-Ok Jeong, MD

Department of Internal Medicine, Cardiovascular Center, Chungnam National University Hospital, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

### ABSTRACT

**Background:** The major cause of metabolic syndrome and diabetes is reduced cellular performances in fuel metabolism, but the underlying pathways and mechanisms are not completely understood. Dysregulation of energy homeostasis can lead to metabolic disturbances and it predisposes diabetes, cardiovascular disease, aging, and cancer. CR6-interacting factor 1 (CRIF1) contacts coiled-coil domain that is required for both genomic stability and mitochondrial integrity. We performed this study to determine the role of CRIF1 on the mice hearts. **Methods:** CRIF1-deficient mouse was embryonic lethal and we made heart specific CRIF1-deficient mouse using Cre-loxP system. We made thoracotomy and directly injected adeno-Cre virus into the heart of CRIF1-loxP mice. Beta-gal virus was used as a control. **Results:** Serial echocardiography showed decreased left ventricular ejection fraction and fractional shortening in the CRIF1-deficient mice at four and seven weeks later compared to wild type mice ( $p < 0.05$ ). H&E showed increased myocardial inflammation in the CRIF1-deficient mice. Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling staining and LC3 staining showed increased apoptosis and autophagy in CRIF1-deficient mice compared with wild type ( $p < 0.01$ ). Electron microscopy revealed that the mitochondria in CRIF1-deficient cardiomyocytes showed abnormal morphogenesis. For example, the cells showed excessively fragmented mitochondria, intracristal swelling, and thinning of myocardial fiber. The stability of mitochondrial complexes in CRIF1-deficient cells showed marked derangements. **Conclusions:** CRIF1 is required for maintenance of normal mitochondrial function and modulate apoptosis and autophagy in the heart.

(J Korean Soc Hypertens 2012;18(3):117-125)

**Key Words:** CRIF1 protein, mouse; Heart failure; Mitochondria, heart

### 서론

논문접수일: 2012.7.5, 수정완료일: 2012.9.15, 게재승인일: 2012.9.18

교신저자: 정진욱

주소: 대전시 중구 문화로 282 충남대학교병원 심장내과, 권역심뇌혈관센터

Tel: 042) 280-8227, Fax: 042) 280-8238

E-mail: jojeong@cnu.ac.kr

\*These authors equally contributed to work.

대사증후군의 혈관합병증은 대사성 손상(metabolic injury)에 의한 혈관벽의 손상과 고혈압 등에 의한 물리적

인 손상과 관련이 있다. 이러한 혈관합병증의 발생기전에는 혈관 내피세포 손상 및 산화스트레스 증가, 손상된 혈관 내피세포를 통한 지질 축적, 포말세포(foam cell)형성 등 다양한 원인이 존재하는데, 특히 미토콘드리아에서의 활성산소종의 증가와 미토콘드리아 DNA damage 축적 및 전자 전달계의 손상은 고지혈증, 고혈압, 비만 등 동맥경화증을 유발한다고 알려져 있다.<sup>1)</sup> 따라서 증후군의 치료제로 미토콘드리아의 활성을 조절할 수 있는 물질을 개발하면 이런 동맥경화의 합병증을 줄여서 고지혈증, 고혈압, 비만을 조절할 수 있을 거라 기대되고 있다.

CR6-interacting factor 1 (CRIF1)은 Gadd45 단백질과 STAT3를 결합하는 단백질로서 CRIF1 knockout mice phenotype을 관찰한 결과 early embryogenesis에 결정적인 역할을 한다.<sup>2)</sup> 이러한 CRIF1에 대한 세포생물학적 연구를 보면 CRIF1은 특정 세포에서 핵 내에 존재하는 특성을 보이고 있으며 일차구조에서 C-terminal 부위에 coiled-coil domain을 가지고 있다. 또한 yeast-two hybrid study 및 immunoprecipitation 실험을 통하여 여러 단백질과 결합하며 특히 Nur77,<sup>3)</sup> Gadd45-gamma<sup>4)</sup>의 기능을 조절함이 알려져 있다. 또한  $\Delta$  CRIF1 세포는 fragmented mitochondria 소견을 보이고 CRIF1을 과발현시키거나 CRIF1 siRNA의 transfection했을 때 미토콘드리아의 변형을 유발한다.

이에 본 논문에서는 미토콘드리아의 변형과 관련이 있을 것으로 생각되는 CRIF1의 활성을 심근에서 조절함으로써 미토콘드리아의 변형이 심근세포에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 심장 특이적 CR6-interacting factor 1 결핍 생쥐

CRIF1-deficient homozygote mice는 embryonic day 6.5 day에 early embryonic lethality를 보이기 때문에 adult tissue에서 CRIF1의 기능을 확인하기 위해서는 Cre-loxP CRIF1 transgenics를 개발하는 것이 필요하다.<sup>3)</sup> 따라서 본 연구에서는 심장에서 CRIF1의 생물학적인 기능을

확인하기 위해 Cre-loxP 시스템을 이용하여 CRIF1 conditional knockout mice를 제작하였다. 8주령의 CRIF1 flox/flox (+/+, +/-, -/-) 생쥐를 케타민 마취 후 인공호흡기 하에서 개흉하여 adeno-Cre virus ( $1 \times 10^9$  ifu/mL, 700  $\mu$ L) 혹은 beta-gal virus(정상 대조군)를 심장근육 4곳에 직접 30 gage 주사기를 통해 나누어 근주하였고, 이후 개흉술에서 회복한 생쥐는 일정 연구기간 동안 정상적으로 배양하였다. Adeno-Cre virus가 제대로 작동하는지는 주입 2주 후 시행한 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 CRIF1의 감소를 확인하였다. 웨스턴 블롯은 adeno-Cre virus를 근주한 생쥐의 심장조직에 proprep 400  $\mu$ L (intron, Seongnam, Korea)를 넣고 tissue lyser (Qiagen, Hilden, Germany)에 조직을 갈아 밤새 냉동보관한 후 전기영동과정을 걸쳐 CRIF1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 처리를 하고 membrane에 horseradish peroxidase (HRP) substrate peroxide solution (Millipore, Billerica, MA, USA)을 1-2분 처리하여 X-ray film에 감광 후 확인하였다.

### 2. 심초음파

심장 특이적 CRIF1 결핍 생쥐의 심장기능을 평가하기 위해 케타민 마취 후에 adeno-Cre virus 혹은 beta-gal virus(정상 대조군)를 심근에 주입한 뒤 각 군당 3마리, 총 9마리 생쥐에서 0, 3, 7주에 심초음파를 시행하였다. 심초음파는 13-MHz linear 탐촉자(GE VIVID 7; GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA)를 이용하였으며, 좌심실 분획단축률(fractional shortening, FS)과 좌심실 구혈률(ejection fraction, EF)은 다음과 같은 공식으로 구하였다.

$$FS = ([LVEDd - LVESd] / LVEDd) \times 100, EF = ([LVEDd^2 - LVESd^2] / LVEDd^2) \times 100$$

LVEDd, left ventricle end-diastolic dimension

LVESd, left ventricle end-systolic dimension

### 3. 전자현미경 및 면역조직화학적 분석

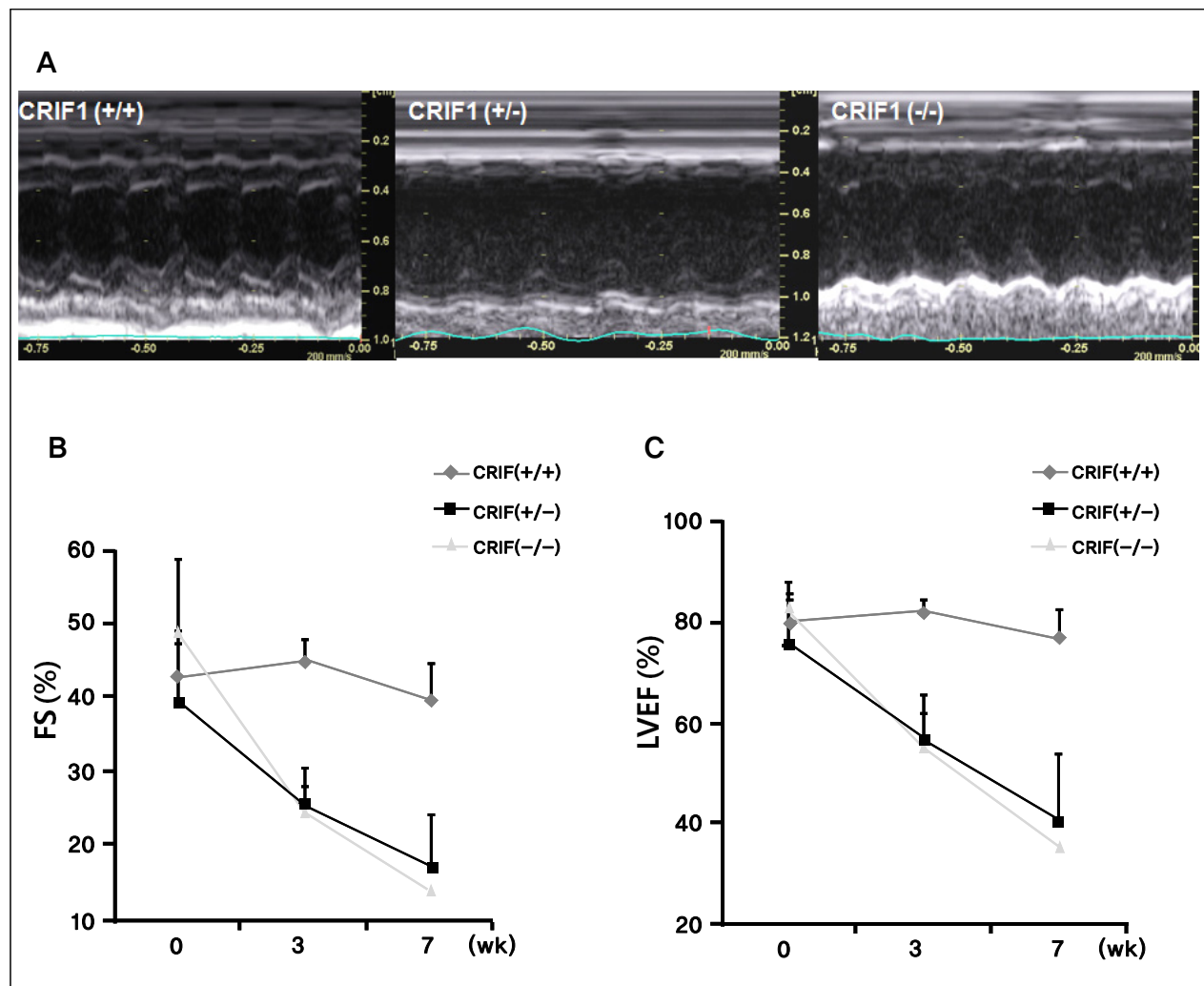
Adeno-Cre virus 혹은 beta-gal virus(정상 대조군)를 심근에 주입한 뒤 각 군당 3마리, 총 9마리 생쥐에서 4-8주

뒤에 심장조직을 얻어서 조직학적 분석을 하였다. 심근의 미토콘드리아를 보기 위해 혈액을 제거한 심장조직을 전자현미경 용액(electron microscope solution; Polysciences, Warrington, PA, USA)에 보관하여 전자현미경(H-7650; Hitachi, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

세포사멸(apoptosis) 및 자식작용(autophagy)을 보기 위한 면역조직검사는 adeno-Cre virus 혹은 beta-gal virus (정상 대조군)를 심근에 주입한 후 2-4 주 뒤에 얻은 심장 조직을 4% 포르말린으로 고정한 뒤 파라핀 블록으로 제

작하였다. 면역조직검사 역시 adeno-Cre virus 혹은 beta-gal virus(정상 대조군)를 심근에 주입한 뒤 각 군당 4 마리, 총 12마리 생쥐에서 면역조직학적 분석을 하였다. 또한 면역조직학적 분석을 위해서 제작한 슬라이드를 10 군데 고배율 사진을 찍어서 정량화하였다.

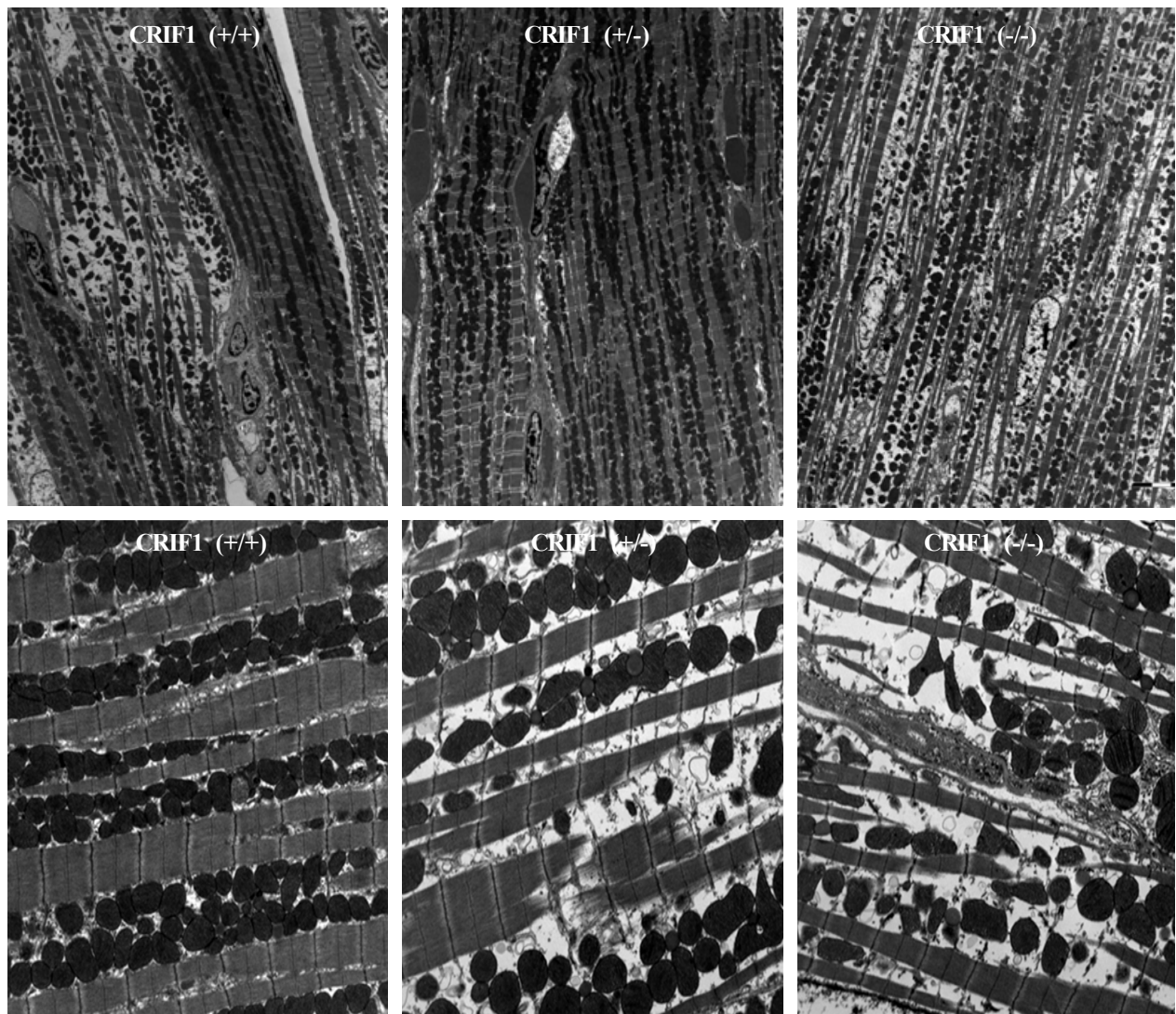
먼저 세포사멸을 보기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL)염색을 시행하였는데, 이는 TUNEL apoptosis detection kit (Millipore, Billerica, MA, USA)에 기술된 방법을 써서



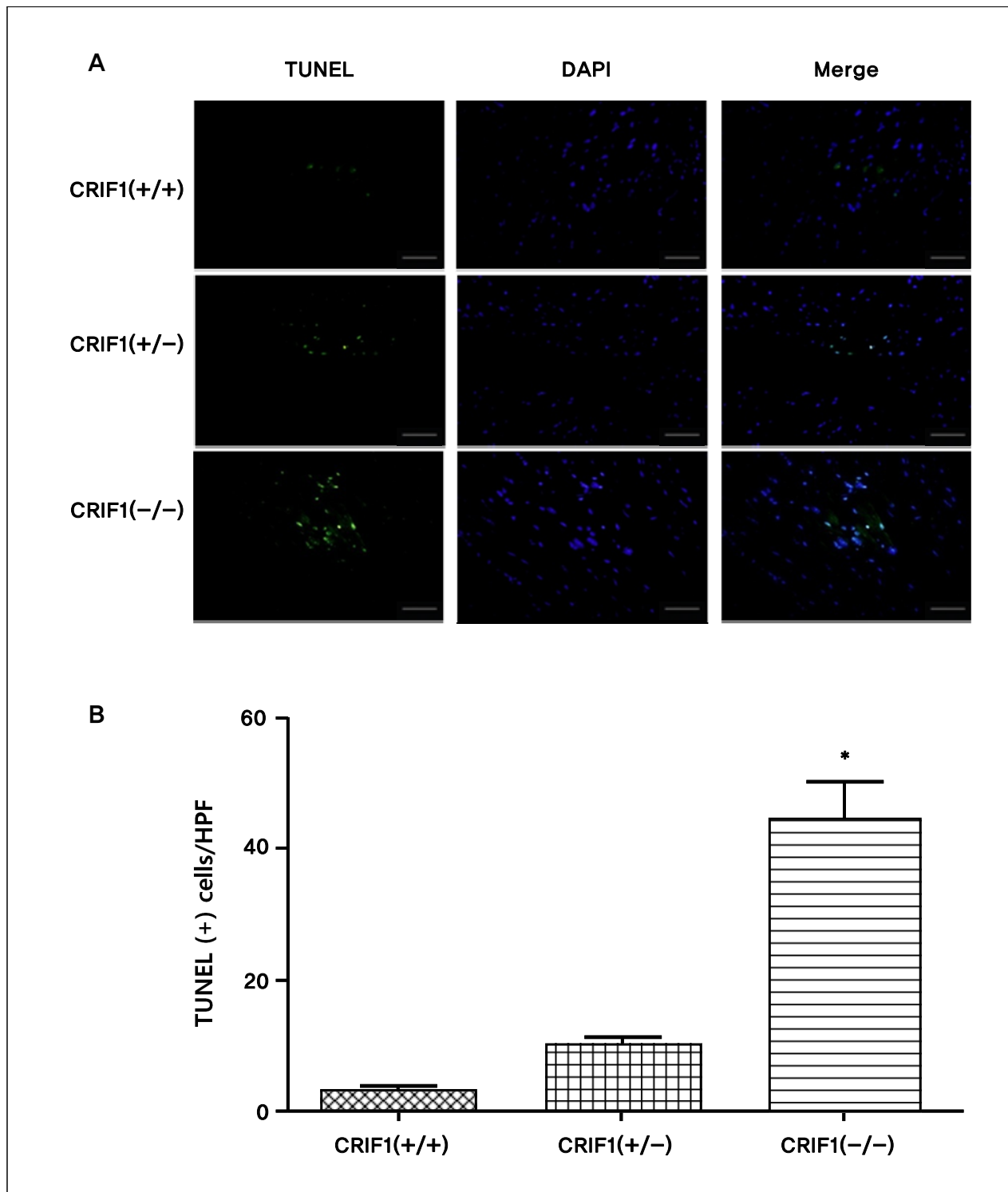
**Fig. 1.** Loss of heart-specific CR6-interacting factor 1 (CRIF1) results in heart failure. We made thoracotomy and directly injected adeno-Cre virus into the heart of CRIF1-loxP mice. Beta-gal virus was used as a control. Serial echocardiography showed decreased left ventricular (LV) ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) in the CRIF1-deficient heart ( $n = 3$  for each group,  $p < 0.05$ ). (A) M-mode echocardiographic images of contracting hearts in 7-week-old mice. (B) FS: in serial echocardiography. (C) LVEF: EF in serial echocardiography.

deparaffin하고 avidin-FITC 형광염색 후 대비염색으로 4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (1 ug/mL) 로 핵염색하여 Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)로 고정 후 형광현미경(IX70; Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 자식작용을 보기 위해서는 autophagosome의 주요 성분인 microtubule-associated proteins 1A/1B light chains 3A/LC3A, 3B/LC3B (MAP1LC3A/B, LC3)를 이용해 면역염색을 하였다. 간단

히 기술하면 xylene에 4분씩 3번, 100% ethanol에 2분씩 3번 담근 후 90%, 80%, 70% 에탄올과 증류수에 각각 2분씩 담가 deparaffin하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 5분씩 2번 씻어주고 10 mM citrate buffer (pH6)로 10분간 끓여준 뒤 실온에서 식혀 PBS로 5분씩 4번 씻는다. 이후 3% hydrogen peroxide로 10분간 blocking해주고 PBS로 5분씩 4번 씻어 Ultravision LP large volume detection system HRP polymer (Thermo Fisher Scientific,

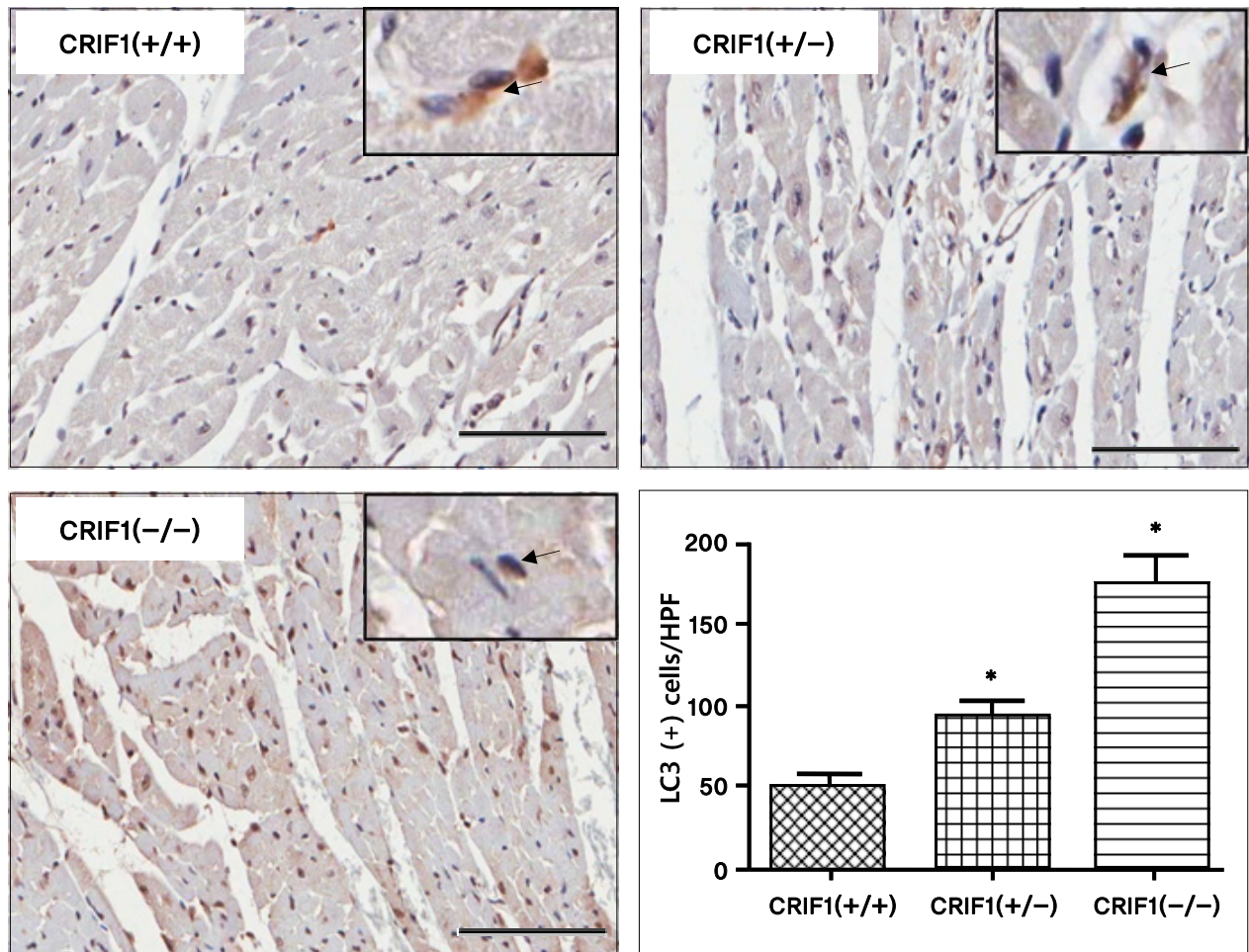


**Fig. 2.** Electron microscope of left ventricular heart sections. The hearts were harvested 7 weeks after injection of adeno-Cre virus or beta gal virus into the heart of CR6-interacting factor 1 (CRIF1)-loxP mice. Electron microscopy revealed that ultrastructure of the myofibril and mitochondria in CRIF1-deficient cardiomyocytes showed abnormal morphogenesis such as excessively fragmented mitochondria, intracriatal swelling, and thinning of myocardial fiber (n = 3 for each group, upper panels represent X2,500, low panels represent X10,000).



**Fig. 3.** Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) assay of left ventricular heart sections. The hearts were harvested 2 to 4 weeks after injection of adeno-Cre virus or beta gal virus into the heart of CR6-interacting factor 1 (CRIF1)-loxP mice. Note the increased apoptosis in CRIF1 deficient heart (n = 4, 40 high power fields [HPF] images for each group, bars 50  $\mu$ m). DAPI, 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride. \*p < 0.05.





**Fig. 4.** Immunohistochemistry using autophagic marker, anti-LC3 in left ventricular heart sections. The hearts were harvested 2–4 weeks after injection of adeno-Cre virus or beta gal virus into the heart of CRIF1-loxP mice. Note the increased autophagy (increased expression of stained brown cytosol at hematoxylin stained nuclear periphery) in CRIF1 deficient heart (n = 4, 40 HPF images for each group, Bars 100  $\mu$ m). \*p < 0.05.

Fremont, CA, USA)에 있는 Ultra V Block을 5분간 처리 (10분을 넘지 않도록 함) 후 anti-LC3 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 antibody diluent (Dako, Carpinteria, CA, USA)와 1:1000으로 희석해서 4°C에서 overnight한다. PBS로 5분씩 4번 씻어준 후 kit 내에 있는 HRP polymer를 15분 처리하여 이를 PBS로 5분씩 4번 씻어준 후 diaminobenzidine (DAB, Dako) 발색을 10초 하고 DW로 5분씩 4번 씻어 대비염색으로 hematoxylin으로 핵염색하고 DW로 씻어준 후 Canada balsam (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)으로 mounting 후 현미경(IX70)으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 심장 특이적 CR6-interacting factor 1 결핍 생쥐의 감소된 심장 수축기 기능

심장 특이적 CRIF1 결핍이 심장의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 adeno-Cre virus 혹은 beta-gal virus(정상 대조군)를 심근에 주입한 뒤 각 군당 3마리, 총 9마리 생쥐에서 연속적인 심초음파검사를 시행하였다. Adeno-Cre virus 주입 3주 후부터 심장의 수축기 기능이 감소하여 좌심실 FS와 EF 모두 유의하게 감소하였으며(FS: CRIF1 [+/-] vs. [+/-], vs. [-/-]: 45.0%  $\pm$  2.8% vs. 25.5%

$\pm 4.9\%$ ,  $24.5\% \pm 3.5\%$ ; EF:  $82.5\% \pm 2.1\%$  vs.  $56.5\% \pm 9.2\%$ ,  $55.0\% \pm 7.1\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1), 이러한 변화는 이후 관찰 기간인 7주까지 지속되었다(FS:  $39.5 \pm 4.9\%$  vs.  $17.0 \pm 7.1\%$ ,  $13.8 \pm 2.5\%$ ; EF:  $77.0 \pm 5.7\%$  vs.  $40.5 \pm 13.4\%$ ,  $34.9 \pm 5.4\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

## 2. 심장 특이적 CR6-interacting factor 1 결핍 생쥐의 심장근육 미토콘드리아의 형태 변화

심장 특이적 CRIF1의 결핍에 따른 심장의 수축기 기능 감소가 미토콘드리아의 변형과 관련이 있는지를 확인하기 각 군별로 3마리씩 총 9마리의 생쥐의 심장을 전자현미경검사로 확인하였다. 정상 대조군에 비해 CRIF1의 결핍 시 심근에 존재하는 미토콘드리아의 형태가 변화함을 확인할 수 있었다. 정상 대조군의 심근은 근원 섬유구조(myofibrillar architecture)와 미토콘드리아가 순차적으로 질서 있게 배열되어 있는 반면, CRIF1 결핍 심근은 근원 섬유구조와 미토콘드리아의 분열과 해체로 인한 무질서한 형태를 보였으며, CRIF1-/+에 비해 CRIF1-/-에서 훨씬 심하게 손상됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

## 3. 심장 특이적 CR6-interacting factor 1 결핍 생쥐에서 증가된 세포사멸

조직학적 검사에서는 CRIF1 결핍 생쥐에서 염증세포가 증가된 것 외에는 특이 소견이 없었다(data not shown). 이런 염증세포의 증가가 CRIF1의 결핍 자체에서 기인한 것인지 아니면 심장 특이적 CRIF1 결핍을 유도하기 위해 주입한 adeno-Cre virus의 영향인지는 구분할 수 없었다.

CRIF1 결핍으로 인한 심장근육의 형태 변화와 수축기 기능의 감소가 심근세포사멸과 관련되어 있을 것으로 생각하고 확인한 TUNEL염색에서는 정상 대조군과 CRIF1-/+에 비하여 CRIF1-/- 생쥐에서 유의하게 세포사멸이 증가하였으며(CRIF1 [+/+] vs. [+/+] vs. [-/-];  $2.5 \pm 3.3$  vs.  $9.6 \pm 6.6$  vs.  $44.2 \pm 25.8$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 3), 세포사멸 외 자식작용은 정상 대조군에 비해 CRIF1-/+와 CRIF1-/- 생쥐에서 유의하게 증가하였다( $51.4 \pm 29.4$  vs.  $93.5 \pm 27.2$  vs.  $173.4 \pm 53.1$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

## 고 찰

노령화에 따라 고혈압을 비롯한 심혈관질환, 퇴행성 신경근육질환 및 대사증후군이 폭발적으로 증가하였으며 이는 우리나라를 포함한 선진국의 주요 사망원인이 되었다.<sup>5,6)</sup> 이러한 만성 질환, 즉 비만, 인슐린 저항성, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 및 동맥경화증의 발생은 미토콘드리아의 수나 기능의 이상과 관련이 있음은<sup>1,7-11)</sup> 이미 잘 알려져 있는 사실로 생체 에너지 대사의 요구에 의해 미토콘드리아의 수와 기능은 조직 특이적으로 조절되는데, 미토콘드리아의 수와 기능조절 즉, 미토콘드리아 가소성 조절의 핵심적 요소는 대사 신호경로와 관련이 있어서 대사성 질환의 중요한 요소로 생각된다. 따라서 대사성 증후군의 근본적 해결을 위해서는 세포 내 에너지 대사를 총체적으로 조절하는 master 조절 단백을 이용한 치료가 새로운 치료법으로 대두되고 있다.

CRIF1은 Gadd45 단백질과 STAT3에 결합하는 단백질로서 심근에 상당한 양이 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 이는 심근의 조직학적인 특성상 심근 수축을 위해 상당한 에너지 대사가 필요하기 때문으로 생각된다. 본 연구에서는 심장근육에서 CRIF1의 결핍이 심장의 수축기 기능을 감소시킬 뿐 아니라 미토콘드리아의 변형과 세포사멸의 증가를 일으킴을 확인하였다. 따라서 CRIF1의 결핍은 심장근육의 에너지 대사 경로 중 미토콘드리아의 형태 변형을 통한 에너지 생성의 문제와 그로 인한 심근 세포의 사멸과 자식작용의 증가로 이어지고 궁극적으로 심근의 수축력 감소 등이 일어나는 것으로 생각된다. 급성 심근경색증과 같이 심근의 에너지 경로가 급격하게 바뀌는 경우 심근 내의 미토콘드리아의 변형 및 파괴는 심근 허혈의 가장 초기에 일어난다는 점을 기반으로 생각해 보면 심근 허혈, 혹은 고혈압 등과 같은 심혈관질환에서 에너지 대사는 중요한 문제로 이를 조절하는 단백질 결핍으로 이를 확인할 수 있었다.<sup>12,13)</sup>

본 연구의 제한점으로는 심장의 수축기 기능감소가 실제 미토콘드리아의 변형 외에 바이러스 주입에 따른 염증 반응으로 인하여 발생했을 가능성이 있다. 이는 결국 심장

특이적 생쥐와의 교배를 통해 확인될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 실험결과에서 확인된 미토콘드리아의 변형이 어떠한 분자생물학적인 인과관계를 통하여 유발되었는지를 밝히기에는 부족하다는 점도 본 연구의 제한점으로 들 수 있다. 따라서 이들을 확인하고자 심장 특이적 생쥐를 이용한 추가적인 연구를 계획 중에 있다.

결론적으로 심근의 미토콘드리아 변형은 심근 수축력의 감소, 세포사멸, 자식작용의 증가와 연관되어 있다. 따라서 향후 심근 미토콘드리아의 변형과 관련이 있는 CRIF1을 조절함으로써 세포의 에너지 대사를 조절할 수 있는 장기적인 연구가 필요하다.

## 요 약

**연구배경:** 미토콘드리아의 수와 기능 이상은 비만, 인슐린 저항성, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 및 동맥경화증과 같은 만성 질환의 발생과 관련되어 있다고 알려져 있으며, CR6-interacting factor 1 (CRIF1) 단백질의 이상은 이러한 미토콘드리아의 수적, 기능적 이상을 유발한다고 한다. 본 연구에서는 심근에서 CRIF1의 활성을 조절함으로써 심근의 미토콘드리아에 미치는 영향 및 나아가 심장기능에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

**방법:** Cre-loxP system을 이용하여 heart specific CRIF1 deficient mice를 만들기 위해 케타민 마취 후에 개흉술을 시행 후 adeno-Cre virus 혹은 beta-gal virus(정상 대조군)를 심근에 주입한 뒤 심초음파검사와 전자현미경, 면역조직학적 검사를 시행하였다. 심초음파검사는 9마리 생쥐에서 0, 3, 7주에 시행하였다. 또한 2-8주 차에 3군의 심장조직을 얻어 미토콘드리아의 관찰을 위한 전자현미경 검사 및 세포사멸을 보기 위한 면역조직학적 검사를 하였다.

**결과:** 심장 특이적 CRIF1 결핍에 따른 심기능의 영향을 알아보기 위해 시행한 연속적인 심초음파검사상에서 heart specific CRIF1 deficient mice는 1주 후부터 fractional shortening과 ejection fraction이 감소하기 시작하여 7주 후까지 지속된 감소 소견을 보였다. 전자현미경검사에서는 CRIF1 결핍 시 심근의 myofibrillar architecture와 미토콘드리아의 분열 및 해체로 인한 무질서한 형태가 관찰

되었다. 또한 심근의 세포사멸 및 세포사멸 외 자식작용을 보기 위하여 시행한 terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling 염색과 LC3염색에서 세포사멸의 증가 및 자식작용의 증가가 확인되었다.

**결론:** 심장 특이적 CRIF1의 결핍은 생쥐에서 심장 수축기 기능의 감소를 일으켰으며 이는 심근 내의 미토콘드리아의 변형으로 인한 심근세포사멸 및 자식작용의 증가와 관련이 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2009년도 대한고혈압학회 연구비 및 보건복지부(A100588) 지원을 받아 수행되었다.

**이해상충:** 해당사항 없음.

## References

1. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*. 2007;100:460-73.
2. Chung HK, Yi YW, Jung NC, Kim D, Suh JM, Kim H, et al. CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle. *J Biol Chem*. 2003;278:28079-88.
3. Kwon MC, Koo BK, Moon JS, Kim YY, Park KC, Kim NS, et al. Crif1 is a novel transcriptional coactivator of STAT3. *EMBO J*. 2008;27:642-53.
4. Park KC, Song KH, Chung HK, Kim H, Kim DW, Song JH, et al. CR6-interacting factor 1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and inhibits its transactivation. *Mol Endocrinol*. 2005;19:12-24.
5. Lee TY. Reconsideration of hypertension awareness, treatment, and control. *Korean Hypertension J*. 2009;15:1-6.
6. Rosenberg P. Mitochondrial dysfunction and heart disease. *Mitochondrion*. 2004;4:621-8.
7. Cha MJ, Lee HY, Ahn SV, Han KR, Park JB, Lim SJ, et al. Prevalence and clinical characteristics of metabolic syndrome in Korean hypertensive patients. *Korean Hypertension J*. 2009;15:37-44.
8. Ballinger SW. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:1278-95.



9. Coskun P, Wyrembak J, Schriner SE, Chen HW, Marciniack C, Laferla F, et al. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:553-64.
10. Mitchell T, Darley-USmar V. Metabolic syndrome and mitochondrial dysfunction: insights from preclinical studies with a mitochondrially targeted antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:838-40.
11. Wallace DC, Lott MT, Shoffner JM, Brown MD. Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. *J Inherit Metab Dis*. 1992;15:472-9.
12. Tompkins AJ, Burwell LS, Digerness SB, Zaragoza C, Holman WL, Brookes PS. Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:223-31.
13. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1065-89.