

Uncleaved Dystrophin Induce Cardiac Myocyte Apoptosis in Coxsackievirus Infected Balb/C Background Mice Heart

Jin-Ho Park, Hye-Sun Lee, Yun-Gyeong Lee and Byung-Kwan Lim*

Department of Biomedical Science, Jungwon University, Goesan-gun, Chungbuk, Korea

It has been previously demonstrated that dystrophin is cleaved in the cardiac myocyte by the viral protease 2A following infection with Coxsackievirus B3 (CVB3). The viral protease 2A mediated cardiomyopathy can be prevented by inhibiting cleavage of dystrophin. However, it is less clear whether uncleaved dystrophin have other heart protective effect in coxsackievirus infection. To address this, we generated a Balb/C background mouse that had a point mutation in dystrophin that prevents cleavage by protease 2A (KI). We show here that when mice expressing cleavage-resistant dystrophin were infected with CVB3, there was increased cardiac myocyte apoptosis. Bax and Bcl-X_L mRNA ratio was significantly increased in KI mice heart compare to wild type mice heart. We found cleavage-resistant dystrophin induced the apoptosis related enzyme caspase-3 and caspase-8 activity. In addition, TUNEL stain was observed many TUNEL positive cardiac myocyte in KI mice heart compare to wild type mice heart (3.7% vs 0.3%). However, zVAD treatment for apoptosis blocking was significantly decreased myocardium damage and fibrosis in KI mice heart. These findings indicated that uncleaved dystrophin may have a critical role in cardiac myocyte viral propagation. Uncleaved dystrophin mutant induced cardiac myocyte apoptosis. It delayed coxsackievirus propagation in cardiac myocyte and could prevent cardiac myocyte death.

Key Words: Dystrophin, Cardiac myocyte, Coxsackievirus, Apoptosis, Protease 2A

INTRODUCTION

Coxsackievirus (CV)는 엔테로바이러스 속에 picornavirus 과로 어린이와 어른에서 심근염과 심부전의 주요 원인 바이러스로 잘 알려져 있다 (1). 엔테로바이러스 protease 2A는 바이러스의 polyprotein를 잘라 각각의 기능을 할 수 있는 단일 단백질로 만든다. 하지만 이러한 엔테로바이러스 protease 2A는 숙주의 세포 내 구조 단백질인 dystrophin (2)과 동물세포 전사인자인 eIF4G-I과 II를 잘

라 세포의 증식을 억제하고 바이러스 감염세포를 파괴하게 된다 (3~5). 이전의 연구에서 dystrophin 유전자의 결핍은 duchenne muscular dystrophy 환자에서 심근병증을 유발하고 엔테로바이러스 감염 유발 심근염에서 바이러스의 감염을 증가시킨다는 것을 확인하였다 (6, 7). 그리고 이러한 dystrophin의 유지가 엔테로바이러스 감염에 의한 심근세포의 파괴와 심근병증 유발 억제에 매우 중요함을 증명하였다 (8). 하지만 엔테로바이러스 protease 2A에 의한 dystrophin 단백질의 파괴와 심근세포 sarcolemma 구조의 파괴에 의한 심근세포 사멸에 대한 상관관계는

Received: July 14, 2014/ Revised: July 21, 2014/ Accepted: July 24, 2014

*Corresponding author: Byung-Kwan Lim, Ph.D. Jungwon University, Department of Biomedical Science, 85 Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 367-700, Korea.

Phone: +82-43-830-8605, Fax: +82-43-830-8579, e-mail: bklim@jwu.ac.kr

**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (No. NRF-2014R1A1A1002824).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

잘 밝혀지지 않았다.

엔테로바이러스 감염으로 인한 심근세포의 파괴는 매우 급속하게 일어나며 처음에 감염된 심근세포의 주변세포로 재 감염을 일으키며 염증세포의 유입을 유발하고 파괴된 심근세포 자리에 섬유세포의 증식을 유도하게 된다(9). 하지만 심근세포는 증식을 하지 않는 분화가 마무리된 세포이기 때문에 다른 증식이 가능한 세포와는 다르게 가능하면 세포의 생존을 유지하며 세포 내부에 침입한 바이러스 등의 기타 병원균을 제거하고자 하는 메커니즘을 사용하게 된다. 이러한 심근세포의 바이러스 감염에 대한 생존 메커니즘을 파괴하는 것이 바로 엔테로바이러스의 protease 2A의 역할이며 심근세포 막의 중요 단백질인 dystrophin의 빠른 파괴를 통해 바이러스의 번식을 유도하여 심근염을 일으키고 점진적으로 심근병증을 유도하게 되는 것이다(2). 이러한 빠른 바이러스의 증식으로 인해 바이러스 감염 심근세포의 apoptosis는 매우 낮은 비율로 나타나며 확인되고 있어 바이러스에 의한 심근세포 사멸의 주요 원인이 apoptosis가 아님을 확인하였다(10~12).

이전의 연구에서 심근세포 막 dystrophin 단백질의 파괴 억제가 엔테로바이러스 증식 억제와 심근세포 생존유지와 보호에 매우 중요함을 uncleaved dystrophin 돌연변이 생쥐를 사용하여 증명하였다(8). 본 연구에서는 이러한 dystrophin의 파괴 억제가 심근세포에 감염된 바이러스의 증식과 주변세포로의 확산을 지연하며 이후 심근세포의 자살 유도를 통해 심근세포의 바이러스 감염으로 인한 손상을 최소화 하는 심장기능 유지를 위한 메커니즘임을 uncleaved dystrophin 돌연변이 생쥐를 통해 관찰하였으며 엔테로바이러스의 심근세포 내 증식과 심근세포 파괴 그리고 심근병증 유발의 순차적인 관계에 대해 규명하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

Uncleaved dystrophin 돌연변이(KI) 생쥐

Dystrophin 유전자의 엔테로바이러스 protease 2A 절단 위치인 hinge3의 amino acid leucine (L2425)과 serine (S2426)을 절단이 되지 않는 proline (P)와 aspartic acid (D)의 서열로 치환한 돌연변이 서열을 만들고 이를 생쥐의 배아줄기세포에 전달하여 homologous recombination을 통해 wild type 서열을 돌연변이 서열로 치환하였다. 돌연변이 서열

을 갖고 있는 배아줄기세포는 genomic DNA의 서열을 Southern blot을 통해 확인한 후 대량으로 배양하여 대리모에 삽입하여 돌연변이 서열이 삽입된 마우스를 생산하였다. 이후 PCR을 통해 생쥐의 genotype을 확인하였으며 돌연변이에 대해 형제 생쥐 중 wild type 형을 대조군으로 사용하여 실험을 수행하였다. Uncleaved dystrophin 돌연변이(KI) 생쥐는 이전에 발표된 논문과 같이 미국 University of California, San Diego 대학 Dr. Kirk Knowlton 교수 실험실에서 본 연구자가 제작하였으며 분양을 받아 사용하였다(8). Coxsackievirus 감염실험은 4주령의 uncleaved dystrophin 돌연변이 생쥐와 정상 dystrophin을 가진 형제 wild type 생쥐를 대조군으로 사용한다.

생쥐 coxsackievirus 감염

Uncleaved dystrophin 돌연변이(KI)와 정상 dystrophin 유전자 서열을 가지고 있는 형제 wild type (WT) 생쥐를 genotype을 통해 확보하고 생후 4주령에 2×10^3 PFU의 coxsackievirus B3 (CVB3)를 각각 10마리씩 복강 주사하여 감염시키고 감염 후 각각 4, 8일에 심장을 적출하여 일부는 단백질 실험을 위해 보관하고, 일부는 4% paraformaldehyde로 고정하고 paraffin 절편을 만들어 병리소견을 H&E와 Masson Trichrome (MT) stain을 통해 관찰하고 TUNEL stain을 통해 apoptosis의 발생을 관찰한다(8, 13). 또한 바이러스 감염과 함께 apoptosis의 억제제로 알려진 zVAD를(14) 1 mg/kg로 바이러스 감염 후 1, 2일에 복강으로 주사하여 처리하고 위와 동일하게 생쥐를 각각 4, 8일에 희생하여 심장을 적출하고 병리학적 소견을 관찰한다.

Real-time PCR

CVB3 감염 후 심장근육 세포에서 apoptosis의 발생 정도를 확인하기 위하여 잘 알려진 관련 유전자 Bax와 Bcl-X_L의 발현 변화를 확인하였다(15). CVB3 감염 4일, 8일에 각각 wild type (WT)과 uncleaved dystrophin 돌연변이(KI) 생쥐를 5마리 희생하여 심장을 적출하고 적출된 심장의 좌심실 부분을 TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)와 함께 분쇄하여 total RNA를 뽑아 낸다. Total RNA 2 μg을 주형으로 하여 SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 Bax sense (5'-CATGTTTCTGACGGCAACTTC-3'), anti-sense primer (5'-AGGGCCTTGAGCACCCAGTT-3')와 Bcl-X_L sense (5'-TGCATTGTTCCCATAGAGTTCCA-3'), anti-

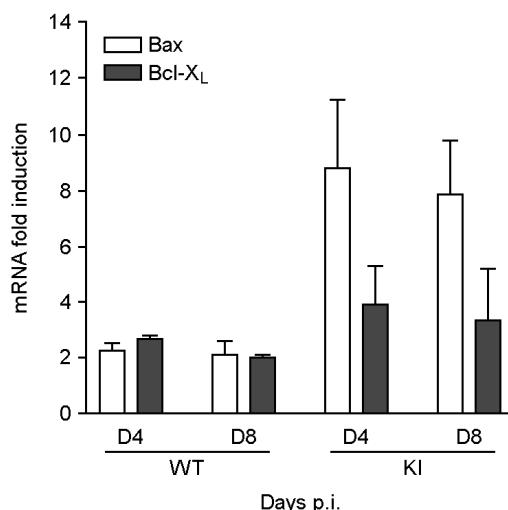
sense primer (5'-CCTGAATGACCACCTAGAGCCTT-3')를 사용하여 (12) 각각의 mRNA 양 변화를 SYBR Green real-time PCR을 통해 측정하여 바이러스 감염 동안 WT과 KI 생쥐의 심근세포에서 발생하는 apoptosis의 발생을 관찰한다.

Caspase-3, 8 protease activity 측정

Apoptosis 유발 초기에 세포 내부에서 증가되는 주요 효소인 caspase-3, 8의 활성을 CVB3 감염 4일 후 생쥐의 심장을 적출하여 측정한다. Caspase-3의 활성은 기질인 PARP 단백질의 절단 서열(DEVD:G)에 pND를 결합시킨 형태의 Ac-DEVD-pND (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide)와 caspase-8의 기질인 caspase-3 단백질의 절단 서열 Ac-IETD-pND (Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilide)을 기질로 사용하여 caspase-3, 8 효소의 활성을 측정한다 (16). 기질은 심장 적출 단백질과 37도에서 30분간 반응 후에 기질이 절단되어 발색되는 것을 multi-plate reader (Molecular Device, USA)를 사용하여 405 nm에서 측정하고 WT과 비교하여 상대적인 변화 값을 구한다.

TUNEL stain

CVB3 감염 4일 후 wild type 대조 군과 돌연변이 생쥐



의 심장을 적출하여 3.8% formaldehyde로 상온에서 10~15분간 고정하고, 25% Sucrose에 4도에서 18시간 동안 반응시킨다. 고정된 심장은 OCT compound (Sacura, Japan)에 넣어 빠르게 동결한다. 동결한 조직은 Cryostat을 사용하여 7 μ m로 절편을 만들고 잘 건조한 후 CardioTACS kit (R&D systems, Inc., USA)을 사용하여 Terminal deoxy-nucleotidyl Transferase (TdT) stain을 수행하여 apoptosis positive 세포를 검출하였다. 먼저 잘 건조된 심장조직 슬라이드를 1x PBS로 10분간 세척하고 Proteinase K solution으로 상온에서 30분간 반응하여 막 단백질의 투과성을 증가시킨 후 5% 과산화수소 용액에서 5분간 슬라이드를 반응하여 비 특이적인 기질의 반응을 제거한다. 5분간 TdT 용액에서 반응하여 파괴된 DNA와 결합시키고 최종적으로 Streptavidin-HRP 용액과 반응시키고 TACS blue 기질로 반응을 시켜 apoptosis positive 세포의 핵은 녹색으로 일반 핵은 분홍색으로 발색을 하여 광학현미경(Olympus, USA)을 사용하여 관찰한다.

조직병리학적 검사

4% paraformaldehyde에 고정하여 paraffin 절편을 만들어 놓은 조직을 5 μ m의 두께로 자른 후 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색을 하여 심근염의 정도를 광학현미

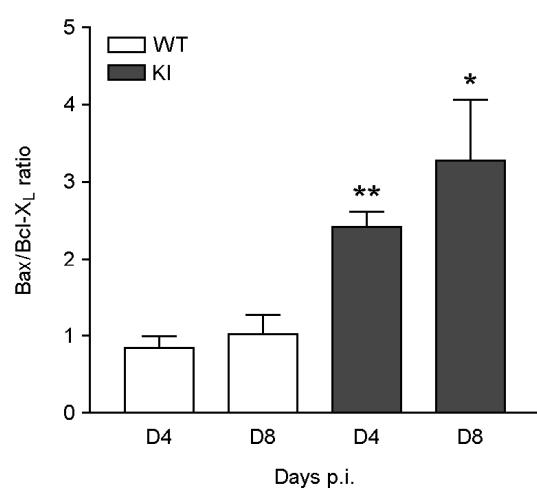


Figure 1. Real-time PCR for apoptosis detection. Bax and Bcl-X_L expression was confirmed by real-time PCR. After 4 and 8 days CVB3 infection, WT (n=5) and KI (n=5) mice heart was collected and RNA was extracted for rt-PCR. Bax level were significantly increased in KI mice heart compare to WT mice heart. The ratio of Bax/Bcl-X_L was significantly increased at day4 and 8 CVB3 post-infection in KI mice heart. Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (Mean \pm S.E.M, **p < 0.01, *p < 0.05, each data point is represented on graphs).

경상에서 관찰하고 Masson Trichrome 염색으로 섬유화(fibrosis)의 정도를 KI 그리고 WT 대조 군 생쥐의 심장에서 비교 관찰한다 (8).

RESULTS

Uncleaved dystrophin 돌연변이 생쥐 심근세포 Apoptosis 유도

모든 돌연변이 생쥐와 WT 대조 군 생쥐는 coxsackievirus의 감염실험이 가능한 Balb/C inbred strain으로 제작하여 사용하였다. 4주령 마우스에 2×10^3 PFU의 coxsackievirus B3 (CVB3)를 복강을 통해 감염하고 4일, 8일에 각각 생쥐를 희생하여 심장을 적출하고 단백질을 추출하고 바이러스가 감염되지 않은 WT 생쥐(n=3)의 심장에서 추출된 단백질을 함께 사용하여 apoptosis 유발 대표 효소로 알려진 caspase-3와 8 효소의 활성을 효소절단 기질을 사용하여 측정하였다. Caspase-3와 8 효소의 활성은 CVB3 감염을 통해 생쥐의 심장에서 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 WT 대조 군과 비교하여 caspase-3와 8 효소의 활성이 KI 생쥐의 심장에서 통계적으로 유의하게 증가되었다 (caspase-3, 2.5 ± 0.2 -fold vs 3.3 ± 0.1 -fold; caspase-8, 1.2 ± 0.1 -fold vs 1.7 ± 0.1 -fold; fold induction compare to uninfected control; $p < 0.001$) (Fig. 2). 이를 통해 CVB3의 감염 중 KI 생쥐의 심장에서 apoptosis 유발이 더욱 활발하게 일어나고 있음을 확인하였다.

안 심근세포에서의 apoptosis를 유도함을 알 수 있었다.

Caspase-3, 8 효소의 활성 변화

WT 대조 군(n=6)과 KI 생쥐(n=8)에 2×10^3 PFU의 CVB3를 복강을 통해 감염하고 4일, 8일에 각각 생쥐를 희생하여 심장을 적출하고 단백질을 추출하고 바이러스가 감염되지 않은 WT 생쥐(n=3)의 심장에서 추출된 단백질을 함께 사용하여 apoptosis 유발 대표 효소로 알려진 caspase-3와 8 효소의 활성을 효소절단 기질을 사용하여 측정하였다. Caspase-3와 8 효소의 활성은 CVB3 감염을 통해 생쥐의 심장에서 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 WT 대조 군과 비교하여 caspase-3와 8 효소의 활성이 KI 생쥐의 심장에서 통계적으로 유의하게 증가되었다 (caspase-3, 2.5 ± 0.2 -fold vs 3.3 ± 0.1 -fold; caspase-8, 1.2 ± 0.1 -fold vs 1.7 ± 0.1 -fold; fold induction compare to uninfected control; $p < 0.001$) (Fig. 2). 이를 통해 CVB3의 감염 중 KI 생쥐의 심장에서 apoptosis 유발이 더욱 활발하게 일어나고 있음을 확인하였다.

TUNEL stain을 통한 apoptosis 검증

CVB3가 감염된 WT 대조 군과 KI 생쥐 심장에서 apoptosis positive 심근세포를 TdT labeling 방법인 TUNEL

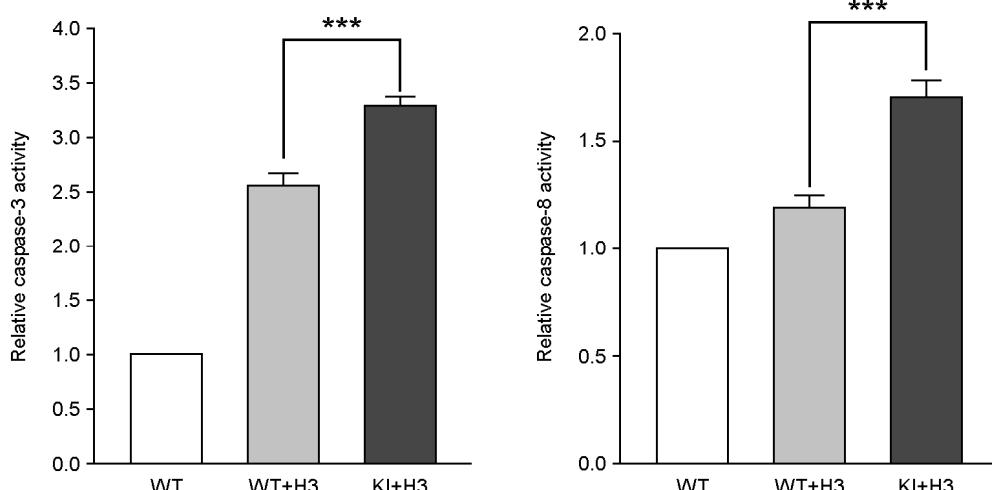


Figure 2. Caspase-3 and 8 protease activity. Caspase-3 and 8 protease activity was measured by PPAR and caspase-3 cleavage site mimic substrate Ac-DEVD-pND (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide) and Ac-IETD-pND (Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroanilide). Caspase-3 and 8 protease activity was significantly higher in KI mice (n=8) heart compare to WT mice (n=6) heart (caspase-3, 2.5 ± 0.2 -fold vs 3.3 ± 0.1 -fold; caspase-8, 1.2 ± 0.1 -fold vs 1.7 ± 0.1 -fold; fold induction compare to uninfected control). Mean \pm S.E.M, *** $p < 0.01$, each data point is represented on graphs.

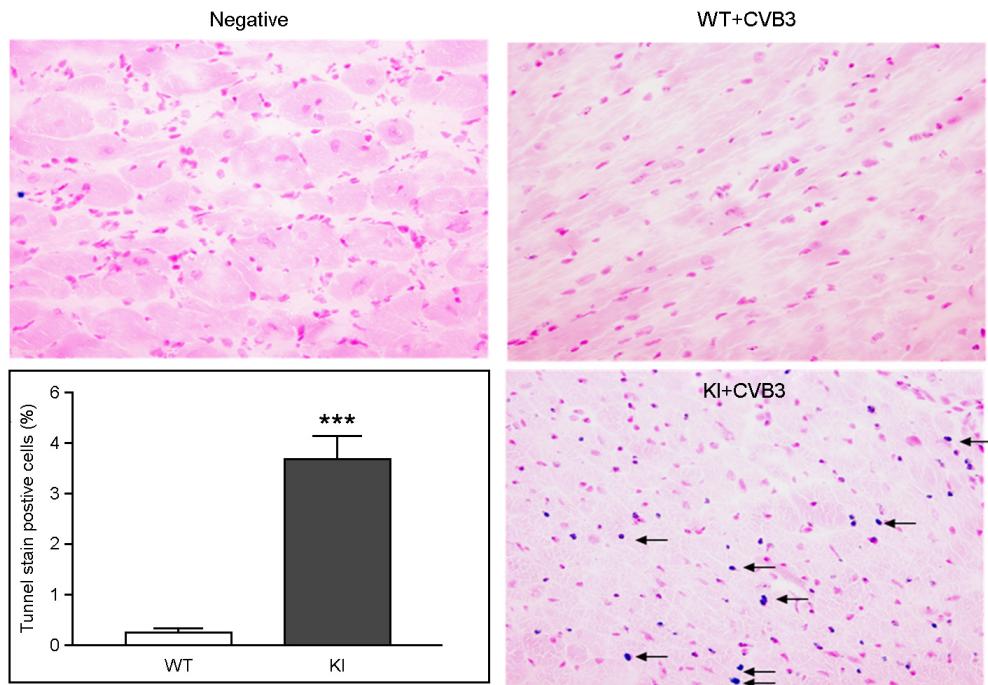


Figure 3. Increase TUNEL stain positive cardiac myocyte. TUNEL stain was performed in CVB3 infected WT and KI mice heart to detect apoptosis positive cardiac myocyte. TUNEL positive cells (arrow) were significantly higher detected in KI mice heart compare to WT mice heart ($3.5 \pm 0.4\%$ vs $0.3 \pm 0.1\%$). Inhibition of dystrophin cleavage induced apoptosis in CVB3 murine myocarditis model. Mean \pm S.E.M, *** $p < 0.01$, each data point is represented on graphs.

stain을 수행하여 확인하였다. WT 대조 군에서 TUNEL stain positive 심근세포는 $0.3 \pm 0.1\%$ 만이 확인되어 매우 낮은 apoptosis 유발이 관찰되었으나 급성 CVB3 감염에서도 심근세포에서 apoptosis가 일어남을 이전의 결과와 유사하게 확인할 수 있었다. 이와 비교하여 KI 생쥐의 심근세포에서는 바이러스에 의한 급격한 증식에 의한 세포막 파괴와 괴사가 억제되어 심근세포에서 확실한 apoptosis의 유도가 관찰되었다. KI 생쥐의 심장에서는 3.6% TUNEL stain positive 세포가 관찰되어 통계적으로 유의한 증가를 보여주었다(Fig. 3). TUNEL stain 결과를 통해 유전자나 효소의 간접적인 apoptosis의 변화요소가 아닌 바이러스 감염세포에서 직접적인 apoptosis를 확인하였다.

Apoptosis 억제를 통한 심근염 저해

CVB3 감염에 따른 심근세포의 파괴와 염증세포 침윤을 확인하기 위하여 병리학적 염색을 수행하였다. 또한 앞의 실험들을 통해 확인된 KI 생쥐 심장의 apoptosis 증가에 따른 심근세포 손상을 확인하였다. 염증세포를

H&E 염색으로 근섬유세포를 Masson Trichrome 염색으로 확인하였다(Fig. 4). WT 대조 군의 심근세포 파괴와 염증세포 침윤이 KI 생쥐와 비교하여 더욱 많은 부분에서 확인되었으며 전반적인 섬유화 또한 WT 생쥐의 심장에서 더욱 많이 관찰되었다(CVB3). Apoptosis의 억제제로 알려진 zVAD의 투여는 KI 생쥐의 심근세포 파괴와 섬유화를 WT 대조 군과 비교하여 유의하게 감소시켰다(CVB3+ zVAD). 본 병리학적 결과는 CVB3 감염에 의한 심근세포 파괴가 uncleaved dystrophin에 의해 일부 억제됨을 보여주었으며 특히 심근세포 내부에서 유도된 apoptosis의 억제가 심근세포의 생존을 유의하게 개선함을 확인할 수 있었다.

DISCUSSION

Apoptosis는 유전적으로 조절 받는 세포의 자살로 caspase 효소의 활성에 의한 중간 매개 단백질의 절단 및 파괴 그리고 이로 인한 세포 소기관과 핵의 변화로 DNA

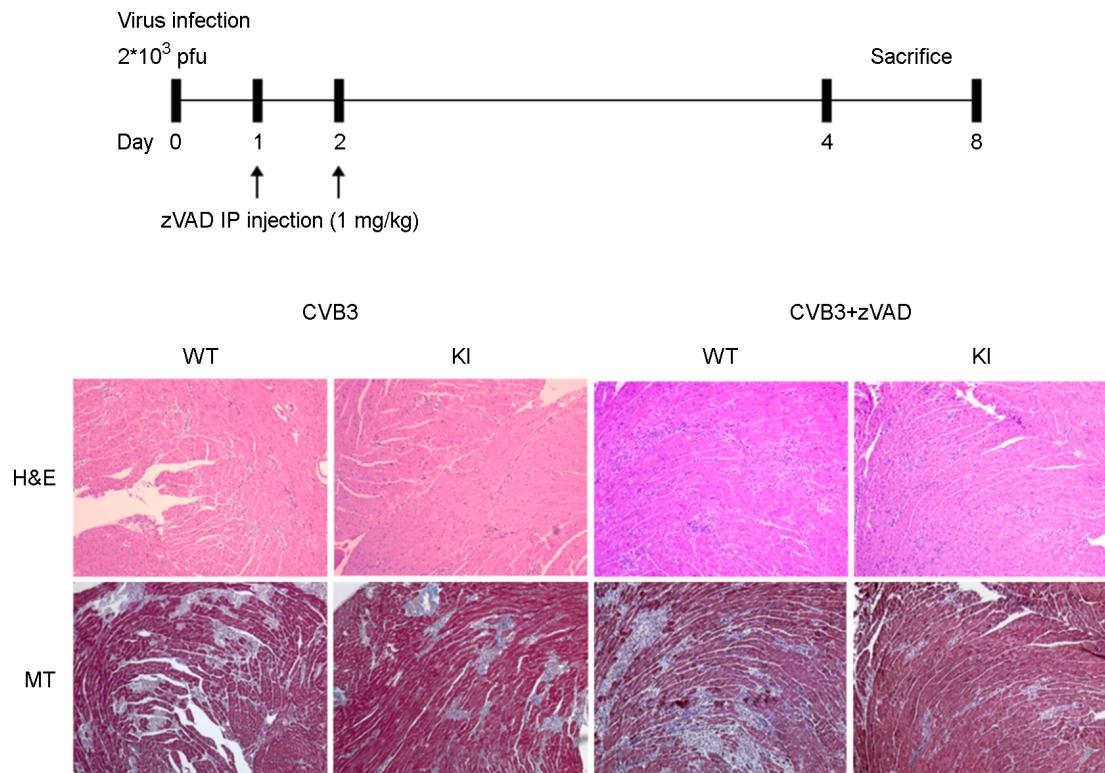


Figure 4. Decrease cardiac myocyte inflammation and fibrosis. Schematic diagram of animal experiment for zVAD treat in murine myocarditis model. Uncleaved dystrophin was effectively blocked enterovirus replication and propagation in the heart. Inflammation (H&E) and fibrosis (MT) were decreased in KI mice heart compare to WT mice heart. In addition, apoptosis inhibitor (zVAD) treatment with CVB3 was dramatically decreased heart inflammation and fibrosis in KI mice heart.

가 일정한 크기로 절단되어 세포의 괴사가 발생하도록 한다 (17). 심근병증 또한 심근세포의 coxsackievirus 감염과 심근염 발생 그리고 apoptosis의 진행으로 심근세포의 괴사가 발생함으로 발생된다는 것이 이전의 연구에서 잘 밝혀졌다 (18). 특히 caspase-3의 활성이 apoptosis의 진행에 필수적이며 초기 apoptosis 진행의 표지로 잘 알려져 있다. 또한 pro, anti-apoptotic member로 알려진 Bax, Bad 나 Bcl-X_L, Bcl-2 단백질의 발현 비율은 apoptosis 발생을 조절하는 중요한 역할을 하고 있으며 Bcl-2의 심근세포 발현은 실험적 바이러스 심근염 모델에서 확인된 바 있다 (10, 11).

Balb/C strain 생쥐에 coxsackievirus B3 (CVB3) 감염을 통해 유도한 심근염 모델에서는 빠른 바이러스 증식과 급속한 심근세포 괴사의 유도로 감염 초기 감염 5일 이전 매우 낮은 비율로 apoptosis가 확인되었으며 sarcomere membrane의 파괴로 인해 외부의 immunoglobulin의 유입

이 빠르게 일어나며 바로 세포의 괴사가 발생하게 된다. 또한 직접적인 바이러스 작용과 바이러스 감염에 의한 면역작용으로 cytotoxic T cells의 심근세포와의 상호작용으로 심근세포의 apoptosis가 발생된다는 보고가 되었다 (19). 하지만 이러한 모든 작용은 매우 빠르게 바이러스 감염 초기에 확인되었으며 TUNEL stain을 통한 apoptosis positive 심근세포의 비율이 바이러스 감염 5일째에 0.6%의 심근세포에서만 확인되었다 (12). 이는 우리의 연구 결과에서도 유사하게 CVB3 감염 정상 dystrophin을 가지고 있는 wild type 생쥐 심장에서 TUNEL positive 심근세포의 비율이 0.4%로 비슷하게 관찰되었다. 그러나 uncleaved dystrophin 돌연변이 생쥐의 심장에서는 TUNEL positive 심근세포가 3.5%의 높은 비율로 검출되었다. 이러한 결과는 심근세포에서 dystrophin의 절단이 바이러스의 급성 증식에 매우 중요하며 2차 감염을 위해 필수적임을 보여주는 것이다. Dystrophin의 절단 억제는 바이러

스가 심근세포 내에 오랫동안 머물러 있게 하였으며 이는 WT 생쥐와 비교하여 많은 심근세포의 apoptosis를 유도하였으며 전체적인 심근세포의 괴사와 염증세포 침윤에 의한 심근염 유발을 감소시켰다.

이전의 연구에서 CVB3 감염 생쥐 심근염 모델에서 anti-apoptotic 유전자 Bcl-2는 증가를 보였으나 pro-apoptotic 유전자 Bax는 큰 변화를 보이지 않았다 (11). 이와는 상반되게 KI 생쥐의 심장에서는 Bax mRNA의 양이 WT 생쥐와 비교하여 4배 이상의 유의한 증가가 관찰되어 apoptosis의 유도가 바이러스의 증식, 즉 세포 내에 머무르는 시간에 의해 크게 영향을 받으며 이러한 작용은 아마도 면역활성을 위한 충분한 시간을 제공하여 바이러스를 제거할 수 있게 할 것이라고 생각된다. 실제로 본 연구의 Fig. 4에서 apoptosis의 억제 물질인 zVAD를 (14) 1 mg/kg 농도로 CVB3 감염 1, 2일에 두 번에 걸쳐 복강에 주사하였을 때 KI 생쥐의 심근세포의 괴사와 심장의 염증이 WT 생쥐와 비교하여 급격히 감소하였다. 특히 심근세포 괴사 이후 발생하는 섬유화도 유의하게 억제하였다.

본 연구를 통해 dystrophin의 결단 억제에 의한 CVB3 감염 심근세포의 점진적 apoptosis 유발은 급격한 바이러스의 확산을 저해하여 CVB3 감염에 의한 심근염 유발을 막고 심장을 보호하였다. 특히 apoptosis가 CVB3 감염 심근세포를 제거하기 위한 한 메커니즘이며 동시에 심근세포의 괴사와 심근염을 최소화하여 심장기능을 유지할 수 있도록 하는 중요한 조절기능임을 증명하였다.

REFERENCES

- 1) Knowlton KU, Jeon ES, Berkley N, Wessely R, Huber S. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J Virol* 1996;70:7811-8.
- 2) Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999;5:320-6.
- 3) Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S, et al. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 1998;18:334-42.
- 4) Lamphear BJ, Yan R, Yang F, Waters D, Liebig HD, Klump H, et al. Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J Biol Chem* 1993;268:19200-3.
- 5) Castelló A, Alvarez E, Carrasco L. Differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J Biol Chem* 2006;281:33206-16.
- 6) Xiong D, Lee GH, Badorff C, Dorner A, Lee S, Wolf P, et al. Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: a genetic predisposition to viral heart disease. *Nat Med* 2002;8:872-7.
- 7) Mavrogeni S, Papavasiliou A, Spargias K, Constandoulakis P, Papadopoulos G, Karanasios E, et al. Myocardial inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy as a precipitating factor for heart failure: a prospective study. *BMC Neurol* 2010;10:33.
- 8) Lim BK, Peter AK, Xiong D, Narezkina A, Yung A, Dalton ND, et al. Inhibition of Coxsackievirus-associated dystrophin cleavage prevents cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2013;123: 5146-51.
- 9) Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;223:31-52.
- 10) Colston JT, Chandrasekar B, Freeman GL. Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis. *Cardiovasc Res* 1998;38:158-68.
- 11) Peng T, Sadusky T, Li Y, Coulton GR, Zhang H, Archard LC. Altered expression of Bag-1 in Coxsackievirus B3 infected mouse heart. *Cardiovasc Res* 2001;50:46-55.
- 12) Kytö V, Lapatto R, Lakkisto P, Saraste A, Voipio-Pulkki LM, Vuorinen T, et al. Glutathione depletion and cardiomyocyte apoptosis in viral myocarditis. *Eur J Clin Invest* 2004;34:167-75.
- 13) Yun SH, Lee WG, Kim YC, Ju ES, Lim BK, Choi JO, et al. Antiviral activity of coxsackievirus B3 3C protease inhibitor in experimental murine myocarditis. *J Infect Dis* 2012;205: 491-7.
- 14) Van Noorden CJ. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* 2001;103:241-51.
- 15) Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-911.
- 16) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.

- Nature 1995;376:37-43.
- 17) Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. Circulation 1999;99:1091-100.
- 18) Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsässer A, Schaper J. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 2001;33:983-94.
- 19) Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. Cardiovasc Res 2000; 45:579-87.
-