

## Adriamycin 투여 후 흰쥐 원심실근육층에서 세포사멸의 발현에 미치는 vitamin C의 영향

서윤경, 박준섭, 윤지희, 백두진  
한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

**간추림** : 저자들은 임상에서 유용하게 사용되는 고농도의 ADR 투여 후와 저농도의 ADR 투여 후 흰쥐 원심실 근육층에서 나타나는 세포사멸의 빈도를 관찰하고 이에 미치는 vitamin C의 영향을 비교 관찰하기 위하여 본 실험을 시행하였다. 실험동물은 체중 250~300g의 흰쥐를 사용하였으며 체중 kg당 20mg 또는 5mg의 ADR을 복강내 투여한 다음 1000mg/마리/day에 해당되는 vitamin C를 식음수에 녹여 마시게 하였다. 약제 투여 1일, 3일, 5일과 14일 경과 후 실험동물을 희생시켜 심장을 적출하여 6 $\mu$ m의 파라핀 절편을 제작하였다. 세포사멸은 TUNEL 분석방법을 이용하여 염색하였고 갈색의 핵을 세어 통계 처리하였다.

이상의 실험결과는 다음과 같다.

1. 정상대조군 흰쥐 원심실근육층에서는 4.2 $\pm$ 12.3개의 세포사멸 양성세포가 나타났다.
2. 20mg-ADR 투여군에서는 흰쥐 원심실근육층에서 1일 경과시 26.7 $\pm$ 43.2개, 3일 경과시 17.7 $\pm$ 41.4개와 5일 경과시 17.8 $\pm$ 31.8개의 세포사멸 양성세포가 나타났다.
3. 5mg-ADR 투여군에서는 흰쥐 원심실근육층에서 1일 경과시 10.8 $\pm$ 19.5, 3일 경과시 4.1 $\pm$ 12.4, 5일 경과시 5.6 $\pm$ 10.2개와 14일 경과시 10.8 $\pm$ 17.3개의 세포사멸 양성세포가 나타났다.
4. 20mg-ADR과 vitamin C 병용투여시에는 흰쥐 원심실근육층에서 1일 경과시 8.8 $\pm$ 19.5개, 3일 경과시 4.1 $\pm$ 12.4개와 5일 경과시 16.2 $\pm$ 33.6개의 세포사멸 양성세포가 나타났다.
5. 5mg-ADR과 vitamin C 병용투여시에는 흰쥐 원심실근육층에서 1일 경과시 17.0 $\pm$ 32.3개, 3일 경과시 12.2 $\pm$ 19.7개, 5일 경과시 7.1 $\pm$ 14.0개와 14일 경과시 7.2 $\pm$ 16.7개의 세포사멸 양성세포가 나타났다.

이상의 결과에서 5mg의 ADR 투여시보다 20mg의 ADR 투여시 흰쥐 원심실근육층에서 세포사멸이 다수 발현되었으며, vitamin C 투여로 세포사멸의 발현이 감소되는 것으로 결론 지을 수 있다.

**찾아보기 낱말** : ADR, 원심실근육, 세포사멸, Vit. C

### 서 론

Adriamycin (ADR)은 daunomycin을 만드는 *Streptomyces peucetius*의 돌연변이인 *Streptomyces peucetius* var. *caesius*에서 추출된 항암성 항생제 (Arcamone 등 1969)로 갑상샘암, 전이성 유방암, 육종, 림프종 등에 효과를 나타내며 특히 림프구성 백혈병의 치료에 매우 우수한 치료효과를 나타내

교신저자: 백두진 (한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)  
전자우편: paikdj@hanyang.ac.kr

는 것으로 알려져 있다.

Au 등 (1981)은 DNA 이중나선구조에 편입된 ADR이 이중나선구조의 분리를 억제하여 DNA polymerase가 DNA에 결합되지 못하게 되어 DNA의 합성이 억제된다고 하였다. Sugioka 등 (1984)은 ADR의 대사 중 형성된 반응성수산기에 의해 DNA가 파괴된다고 하였다. Burke 등 (1987)과 Keizer 등 (1990)은 ADR이 aglycone으로 대사되거나 amino-sugar 부위의 구조가 변화되는 과정에서 형성되는 반응성수산기는 항암효과보다 약제에 의한 부작용

을 일으키는 원인물질이라고 하였다.

Bristow 등(1978)은 환자에게 ADR 투여하면 심장에서는 근육원섬유의 소실, 근육세포질세망구조의 팽대, 세포질내 공포형성, 사립체 팽대와 용해소체의 수가 증가한다고 하였으며, 이러한 변화는 토끼(Olson 등 1974), 생쥐(Rosenhoff 등 1975)와 흰쥐(Mettler 등 1977)에서도 나타나며, 특히 흰쥐의 경우 심부전까지 유발되는 것으로 알려져 있다. Doroshow (1983)는 ADR의 임상사용은 용량 의존적인 심장근육병증의 유발에 의해 제한된다고 하였고, Steinherz 등(1991)은 ADR에 의한 심장독작용은 치료 후 4~20년 경과시에도 나타난다고 하였다.

Stephens 등(1996)은 vitamin 중 특히 vitamin E가 산화자극을 감소시켜 심장질환의 위험율을 감소시킨다고 하였고, Farre와 Casado (2001)는 심부전시 심장에서 형성되는 활성산소가 심장근육세포에서 세포사멸을 일으켜 심장기능을 더욱 악화시키며 항산화물질인 vitamin C를 투여하면 개선이 가능하다고 하였으며, Qin 등(2001)은 흰쥐의 심장근육세포의 배양에서 vitamin C를 투여하면 norepinephrine의 작용으로 감소하는 Bax에 대한 Bcl-2의 비율을 역전시켜 세포사멸을 감소시킨다고 하였다.

이에 본 연구자들은 저용량과 고용량의 ADR 투여 후 흰쥐 심장에서 세포사멸 발현에 미치는 vitamin C의 영향을 알아보기로 본 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군

체중 250~300 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 실험동물로 사용하였고, 실험기간 동안 식수와 먹이는 무제한으로 공급하였다.

실험동물은 대조군과 실험군으로 나누었고, 실험군은 20 mg-ADR (adriamycin) 투여군과 비타민 C (vitamin C) 병용투여군, 5 mg-ADR 투여군과 비타민 C 병용투여군으로 나누었고 희생시킨 시기를 기준으로 1일, 3일, 5일과 14일 경과군으로 다시 나

누었으며, 각 군당 6마리의 실험동물을 사용하였다.

정상대조군은 생리식염수를 복강내 1회 주사하였고, 실험군은 ADR (아드리아마이신, 일동제약주식회사)을 20 mg/kg 또는 5 mg/kg을 복강내 1회 주사하였으며, vitamin C 병용투여군은 ADR 주사 후 1000 mg/마리/day에 해당되는 vitamin C (경남비타민-씨 정, 경남제약주식회사)를 식수에 녹여서 매일 공급하였다.

각 실험군의 동물은 ADR 투여 후 1일, 3일, 5일 및 14일에 희생시켜 심장을 적출하였다. 20 mg의 ADR을 투여한 실험군의 동물은 6일 이상을 생존하지 못하여 14일째의 심장조직은 얻을 수 없었다.

### 2. 세포사멸 검색

절취한 심장 조직은 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액 (pH 7.4)에 18시간 이내 고정시킨 후 6  $\mu$ m 두께의 파라핀절편을 제작하였다.

세포사멸을 확인하기 위한 방법으로 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated nick labeling) 분석원리를 이용한 ApopTag kit (Intergen Co., USA)를 사용하였다. 탈과라핀 및 합수과정을 거친 뒤 0.02% proteinase K (DAKO Co., USA)를 실온에서 15분, 3% 과산화수소를 5분간 처리하였다. TdT를 이용하여 digoxigenin을 분절된 DNA 가닥의 3'-OH 말단에 부착하는 과정을 37°C에서 1시간 시행하였고 이어서 stop-wash buffer를 10분간 적용하였다. Peroxidase가 부착된 anti-digoxigenin 항체를 실온에서 30분 적용한 후에 DAB (Vector Lab., USA)를 이용하여 7분간 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색을 실시하였다. 세포사멸 검색이 확실한지 알아보기 위하여 TdT를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하였다. 흰쥐의 작은창자조직을 이용하여 양성대조군염색을 시행하여 반응을 확인하였으며, 사진은 본 실험결과에 포함하지 않았다.

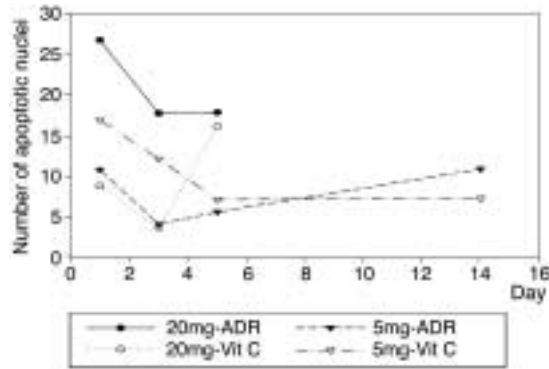
염색된 조직은 광학현미경하에서 원심실을 중심으로 갈색으로 염색된 핵을  $\times 400$ 로 관찰하였다. 각 조직에서 사진 63장의 사진을 고르게 찍어 세

**Table 1.** Number of apoptotic nuclei in the left ventricle of the rats Mean ± S.D. (P-value)

	1 day		3 day		5 day		14 day	
	ADR	ADR+VitC	ADR	ADR+VitC	ADR	ADR+VitC	ADR	ADR+VitC
Control	4.2 ± 12.3							
5 mg	10.8 ± 19.7	17.0 ± 32.3 (0.18)	4.1 ± 12.4	12.2 ± 19.7 (0.005)	5.6 ± 10.2	7.1 ± 14.0 (0.477)	10.8 ± 17.3	7.2 ± 16.7 (0.237)
20 mg	26.7 ± 43.2	8.8 ± 19.5 (0.002)	17.7 ± 41.4	3.7 ± 12.4 (0.008)	17.8 ± 31.8	16.2 ± 33.6 (0.77)		

P-value between 20 mg-ADR and 5 mg-ADR < 0.05

Abbreviations : 20 mg-ADR : 20 mg-adriamycin treatment; 20 mg-Vit C : 20 mg-adriamycin treatment with vitamin C; 5 mg-ADR : 5 mg-adriamycin treatment; 5 mg-Vit C : 5 mg-adriamycin treatment with vitamin C



**Fig. 1.** Number of apoptotic nuclei in the left ventricle of the rats. Abbreviations : 20mg-ADR : 20 mg-adriamycin treatment; 20 mg-Vit C : 20 mg-adriamycin treatment with vitamin C; 5 mg-ADR : 5 mg-adriamycin treatment; 5 mg-Vit C : 5 mg-adriamycin treatment with vitamin C.

포사멸 양성반응 핵의 수를 평균을 내었고, Table 1과 Fig. 1에 정리하였다.

## 결 과

### 1. 세포사멸검색조건

#### 1) 대조군

TDT를 적용하지 않고 반응을 시킨 음성대조군에서 세포사멸 양성세포는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 정상대조군에서는 원심실벽 심장근육층에서 평균 4.2 ± 12.3개의 세포사멸 양성세포가 관찰되었다(Fig. 3).

#### 2) 실험군

세포사멸은 원심실 근육층에서 심장바닥쪽(base)과 심장끝(apex)에서 주로 관찰되었고, 심장속막(endocardium)쪽과 심장바깥막(epicardium)쪽에서 많이 관찰되었으며 원심실의 근육층 가운데부분에서는 드물게 관찰되었다.

##### (1) 20 mg-ADR 투여군

약제 투여 후 1일군 원심실 근육층에서는 26.7 ± 43.2개 (Fig. 4), 3일군에서는 17.7 ± 41.4개 (Fig. 5), 5일군에서는 17.8 ± 31.8개의 세포사멸 양성세포가 관찰되었다(Fig. 6).

##### (2) 20 mg-ADR과 비타민 C 병용투여군

1일군 원심실 근육층에서는 8.8 ± 19.5개 (Fig. 7), 3일군에서는 3.7 ± 12.4개 (Fig. 8), 5일군에서는 16.2 ± 33.6개의 세포사멸 양성세포가 관찰되었다(Fig. 9).

##### (3) 5 mg-ADR 투여군

약제 투여 후 1일군 원심실 근육층에서는 10.8 ± 19.5개 (Fig. 10), 3일군에서는 4.1 ± 12.4개 (Fig. 11), 5일군에서는 5.6 ± 10.2개 (Fig. 12), 14일군에서는 10.8 ± 17.3개의 세포사멸 양성세포가 관찰되었다(Fig. 13).

##### (4) 5 mg-ADR과 비타민 C 병용투여군

약제 투여 후 1일군 원심실 근육층에서는 17.0 ± 32.3개 (Fig. 14), 3일군에서는 12.2 ± 19.7개 (Fig. 15), 5일군에서는 7.1 ± 14.0개 (Fig. 16), 14일군에서는 7.2 ± 16.7개의 세포사멸 양성세포가 관찰되었다(Fig. 17).

## 고 찰

임상적으로 매우 유용하게 사용되고 있는 ADR은 치명적인 심장독성작용 때문에 제한적으로 사용되고 있다. Singal 등(1997)은 ADR 처치시 급성 부작용으로 나타나는 저혈압, 빠른맥박, 부정맥 등은 일시적이고 처치가능하지만 수주에서 수개월 뒤에 나타나는 만성부작용인 저혈압, 빠른맥박, 심장팽대와 심실부전은 치명적이라고 하였으며, De Beer 등(2001)은 강력한 항암제인 ADR은 세포내 분포하는 양의 60%가 핵에 위치하고 DNA 이중나선구조에 끼어들어 핵산의 합성과 DNA polymerase를 억제한다 하였으며, 이러한 약물의 작용으로 암세포는 세포사멸에 빠지게 되지만 생후 2개월까지만 세포가 증식하는 심장에서는 ADR이 DNA에 편입되는 것이 심장독성작용의 원인으로 중요하지 않다고 하였다.

100 $\mu$ M 이상의 고농도 ADR으로 처치할 경우 반응성수산기가 발생하여 DNA를 손상시키거나 지질과산화물을 유발하지만 치료용량 범위의 ADR을 투여하면 과산화수소가 발생된다(Bustamante 등 1990, Fukuda 등 1992, Feinstein 등 1993, Ubezio와 Civoli 1994)고 하였으며, Cheeseman과 Slater(1993)는 ADR이 3가 철이온( $Fe^{+++}$ )과 반응하면서  $Fe^{++}$ -doxorubin 자유기 복합체를 만들고 이 복합체가 산소에 전자를 전달하여 활성산소를 형성하면 세포의 구성원인 핵산, 지방과 단백질을 손상시킨다고 하였다.

Olson과 Mushlin(1990), Olson 등(1981)은 심장에는 SOD, catalase, glutathion 등과 같은 항산화물질이 간이나 신장에 비하여 적게 존재하기 때문에 자유기에 대해 예민하게 반응한다고 하였다.

Arola 등(2000)은 널리 알려진 ADR의 심장독성작용은 심장근육세포의 괴사없이 세포사멸에 의한 것으로 예방 가능한 현상이라고 하였으며, Kunisada 등(2002)은 ADR의 처치로 심장근육세포에서 나타나는 세포사멸은 투약방법과 용량에 따라 다르게 나타난다고 하였다.

Arola 등(2000)은 ADR을 투여하면 흰쥐 심장에

서 세포사멸은 용량의존적으로 일어나 약물투여후 24~48시간 사이에 많이 나타나며 투여 후 3일이 경과하면 정상과 차이가 없어진다고 하였고 연속적으로 ADR을 투여한 경우에도 가중효과(additive effect)는 나타나지 않는다고 하였다. Auner 등(2000)은 치료용량보다 많은 15 mg/kg의 ADR을 투여하였을 때는 2주가 경과되면서 심부전이 발생하고 이때부터 심장에서 세포사멸이 나타난다고 하였다.

심장에서 ADR투여 후 형성되는 활성산소의 작용으로 나타나는 부작용을 줄이기 위해 철이온과 결합하는 dexrazoxane(ICRF-187)(Imondi 등 1996, Speyer 등 1988)과 항산화작용과 철킬레이트화작용을 하는 flavonoid(Haenen 등 1993, van Acker 등 1996)를 투여하면 심장독성작용이 감소하는 것으로 알려져 있다. Myers 등(1977)은 vitamin E가 ADR이 DNA 합성에 미치는 영향을 억제하지 않으면서 약물의 독성을 예방한다고 하였고, Zhou와 Kang(2000)은 산화손상을 예방하는 효소인 metallothionein이 과발현되는 생쥐에서는 ADR의 작용으로 심장에서 나타나는 세포질내 공포형성, 근육 미세섬유와 핵의 손상, 사립체 손상 등이 거의 나타나지 않는다고 하였다.

Padayatty와 Levine(2000)은 수용성 항산화물질인 vitamin C가 초산소기(superoxide radical), 반응성 수산기(hydroxyl radical), 반응성 산소원자(single oxygen) 등과 반응한다고 하였으며, Scarpa 등(1984)은 vitamin C가  $\alpha$ -tocopherol기를  $\alpha$ -tocopherol로 변환시켜 항산화효과를 증가시킨다고 하였다.

Butterworth(1995)는 vitamin C를 치료로 쓸 경우에는 사용되는 용량은 체중에 비례하며 정상식이 용량의 3~10배 사이라고 하였고, Haendeler 등(1996)은 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol은 지질다당질(lipopolysaccharide)에 의해 유도되는 Bax와 Bcl-2의 발현비율을 조절하여 세포사멸을 억제시킨다고 하였다.

Qin 등(2001)은 족제비에게 지속적으로 norepinephrine을 주입하면 동맥혈압의 증가나 심장근육세포의 비후를 야기시키지 못하는 농도에서도 산

화자극을 증가시키고 Bax를 증가시키며 Bcl-2를 감소시켜 세포사멸을 일으킨다고 하였다. 이러한 효과는 vitamin C의 투여로 감소시킬 수 있다고 하였으며, Chen 등(2001)은 항산화성을 가지는 vitamin C와 E가 NADPH oxidase를 감소시키고 SOD의 활성을 증가시켜 고혈압 흰쥐에서 나타나는 혈관변화를 개선시킨다고 하였다.

본 실험에서는 ADR 투여로 원심실근육층에서 세포사멸 양성세포가 증가하였으며 5 mg의 ADR 투여시 보다 20 mg 투여시가 통계적으로 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 증가하였다. 세포사멸은 ADR 투여후 1일 경과시 증가하지만 3일 경과 후에는 감소하였으며, 5일 경과시에는 다소 증가하거나 유지되었다. 20 mg의 ADR을 투여한 경우 동물이 6일 이상 생존하지 못하여 14일 경과군의 결과는 얻지 못하였다.

Vitamin C 투여로 ADR 투여시 나타나는 세포사멸 양성세포가 감소되었다. 20 mg의 ADR과 vitamin C를 병용투여한 경우 세포사멸 양성세포는 1일 경과후 현저히 감소하였으나 점점 증가하여 5일 경과시에는 ADR 단독 투여군과 유사하였다. 1일 경과시와 3일 경과시에 세포사멸은 vitamin C 투여로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 5 mg의 ADR과 vitamin C를 병용 투여한 경우 세포사멸은 오히려 증가하였으나 14일 경과시에는 vitamin C 병용투여군에서 감소하였다. 3일 경과시의 세포사멸에서만 통계값이 유의하게 차이가 있었다. 이 결과는 1000 mg의 vitamin C를 계속 투여하면 고용량인 20 mg의 ADR을 준 경우 즉각 항산화효과를 발휘하여 세포사멸 양성세포를 감소시키지만, 약물의 심장독성작용 뿐 아니라 전신독성작용이 심하게 나타나 실험동물은 6일 경과 후 모두 죽었다. 저용량인 5 mg의 ADR을 준 경우에는 초기 ADR의 작용으로 발생하는 산화물질의 양이 다소 적어 vitamin C에 의한 산화자극이 나타난 것이며 약물의 작용이 지속되면서 vitamin C의 효과가 나타났다. 그러나 두 군 모두에서 vitamin C의 작용으로 세포사멸이 정상대조군의 수준으로 감소하지 못하는 것은 첫째, vitamin C의 용량이 부족하거나 둘째, vitamin C가 ADR의 작용으로 발생하는 산화물질

에 대한 항산화물질로 부적절하거나 셋째, ADR의 작용으로 나타나는 세포사멸이 산화물질에 의한 것과 약물이 직접 DNA 손상을 일으켜 나타나는 것이 합쳐진 결과인 것으로 생각되었다. 본 실험에서 세포사멸 핵의 표준편차가 평균보다 크게 나온 것은 원심실의 사진을 촬영할 때 세포사멸 양성반응이 많이 관찰된 부분 뿐만 아니라 세포사멸이 관찰되지 않는 원심실 부분도 고르게 실험자료에 포함시켰기 때문이다. 앞으로는 vitamin C가 세포사멸에 중요한 역할을 하는 Bcl-2와 Bax이 비율을 변화시킬 수 있는지에 대해서 더 연구되어야 할 것으로 생각한다.

이상의 결과를 종합하면 고용량의 ADR을 투여하면 약물에 의해 발생하는 산화물질과 약물의 직접적인 작용으로 원심실근육층에서 세포사멸이 나타났으며, 저용량투여시보다 다수 발현되었고, vitamin C는 심장근육층에서 나타나는 세포사멸의 발현을 억제할 수 있는 것으로 결론 지을 수 있었다.

## 참 고 문 헌

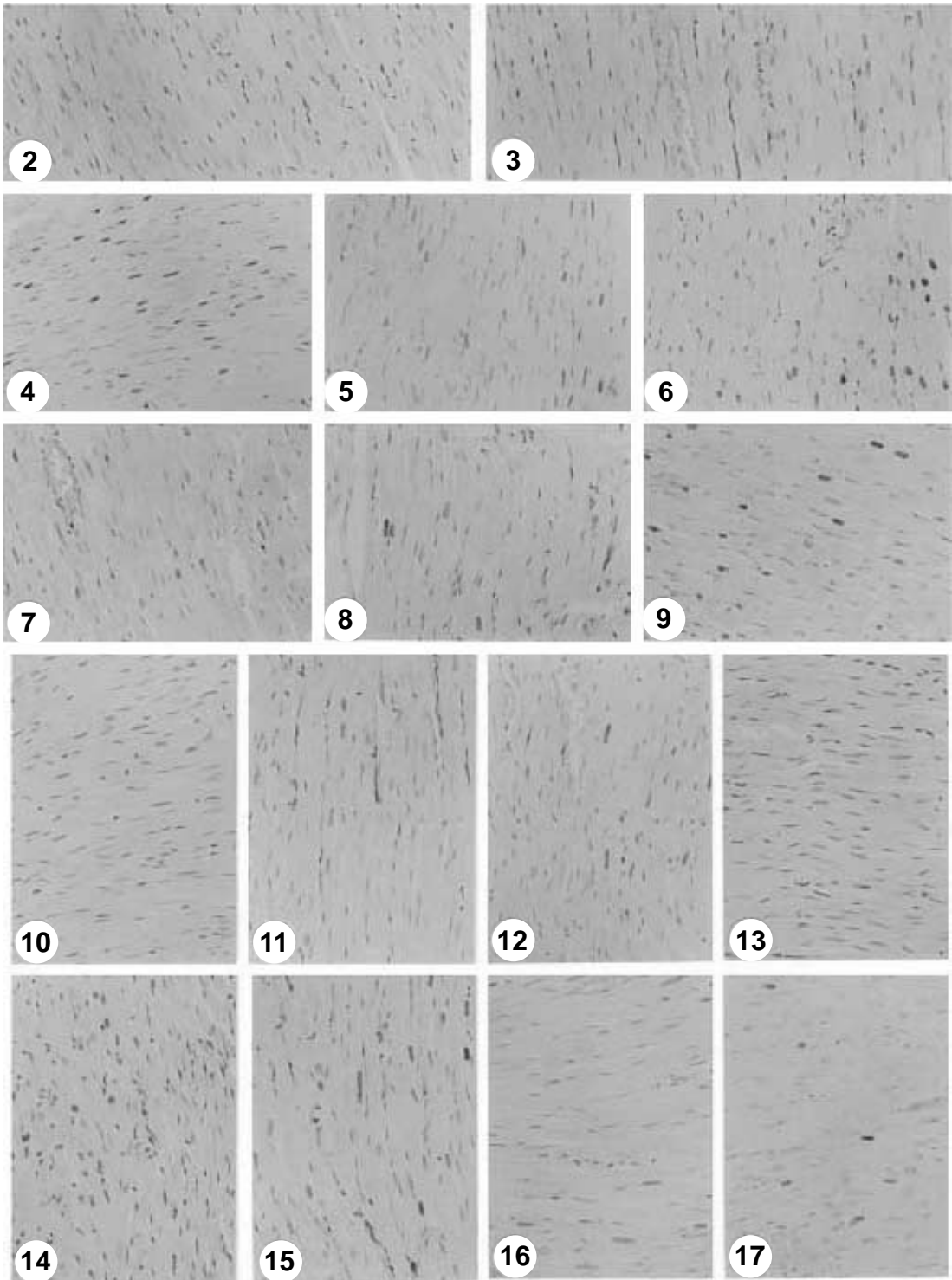
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C : Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetis* var. *caesius*. *Bio-technol Bioeng* 9 : 1101-1110, 1969.
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM : Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 60 : 1789-1792, 2000.
- Au WW, Butler MA, Matney TS, Loo TL : Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. *Cancer Res* 41 : 376-379, 1981.
- Auner HW, Tinchon C, Linkesch W, Holwachs-Baumann G, Sill H : Correspondence re: O. J. Arola et al., Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 60 : 1789-1792, 2000.
- Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, Mason JW, Bollingham ME, Harrison DC : Early anthracycline cardiotoxicity. *Am J Med* 65 : 823-832, 1978.
- Burke TG, Pritsos CA, Sartorelli AC, Tritton TR : The struc-

- tural basis for anthracycline antibiotic stimulation of oxygen consumption by HL-60 cells and mitochondria. *Cancer Biochem Biophys* 9 : 245-255, 1987.
- Bustamante J, Galleano M, Medrano EE, Boveris A : Adriamycin effects on hydroperoxide metabolism and growth of human breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat* 17 : 145-153, 1990.
- Butterworth Jr. CE : Vitamin safety, a current appraisal, 1994 update in Vitamin nutrition information service, Vol 5, Parsippany, NJ : Roche Vitamins Inc 1-10, 1995.
- Cheeseman KH, Slater TF : An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49 : 481-493, 1993.
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL : Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 38 : 606-611, 2001.
- De Beer EL, Bottone AE, Voest EE : Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment : a review. *Eur J Pharmacol* 415 : 1-11, 2001.
- Doroshov JH : Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 43 : 460-472, 1983.
- Farre AL, Casado S : Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension* 38 : 1400-1405, 2001.
- Feinstein E, Canaan E, Weiner LM : Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. *Biochemistry* 32 : 13156-13161, 1993.
- Fukuda F, Kitada M, Horie T, Awazu S : Evaluation of adriamycin-induced lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 44 : 755-760, 1992.
- Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S : Vitamin C and E : Prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur J Pharmacol* 317 : 407-411, 1996.
- Haenen GRMM, Janssen FP, Bast A : The antioxidant properties of five (O- $\beta$ -hydroxyethyl)rutosides of the flavonoid mixture Venoruton. *Phlebol Suppl* 1 : 10-17, 1993.
- Imondi AR, Della TP, Mazue G, Sullivan TM, Robbins TL, Hagerman LM, Podesta A, Pinciroli G : Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. *Cancer Res* 56 : 4200-4204, 1996.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H : Doxorubicin (adriamycin) : a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 47 : 219-231, 1990.
- Kunisada K, Tone E, Negoro S, Nakaoka Y, Oshima Y, Osugi T, Funamoto M, Izumi M, Fujio Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K : Bcl-xl reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation. *Cardiovasc Res* 53 : 936-943, 2002.
- Mettler FP, Young DM, Ward JM : Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res* 37 : 2705-2713, 1977.
- 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* 197 : 165-167, 1977.
- Olson HM, Young DM, Prieur DJ, LeToy AF, Reagan RL : Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am J Pathol* 77 : 439-454, 1974.
- Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS : Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci* 29 : 1393-1401, 1981.
- Olson RD, Mushlin PS : Doxorubicin cardiotoxicity : analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* 4 : 3076-3086, 1990.
- Padayatty SJ, Levine M : Vitamin C and myocardial infarction : the heart of the matter. *Am J Clin Nutr* 71 : 1027-1028, 2000.
- Qin F, Rounds NK, Mao W, Kawai K, Liang CS : Antioxidant vitamins prevent cardiomyocyte apoptosis produced by norepinephrine infusion in ferrets. *Cardiovas Res* 51 : 736-748, 2001.
- Rosenhoff SH, Olson HM, Young DM, Bastic F, Young RC : Adriamycin-induced cardiac damage in the mouse : small animal model of cardiotoxicity. *J Nat Cancer Inst* 55 : 191-194, 1975.
- Scarpa M, Rigo A, Maiorino M, Ursini F, Gregolin C : Formation of alpha-tocopherol radical and recycling of alpha-tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron paramagnetic resonance study. *Biochim Biophys Acta* 801 : 215-219, 1984.
- Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D : Adriamycin cardiomyopathy : pathophysiology and prevention. *FASEB J*

- 11 : 931-936, 1997.
- Speyer JL, Green MD, Kramer E, Rey M, Sanger J, Ward C, Dubin N, Ferrans V, Stecy P, Zeleniuch JA : Protective effect of the bispiperazinedione ICRF-187 against doxorubicin-induced cardiac toxicity in women with advanced breast cancer. *N Engl J Med* 318 : 745-752, 1988.
- Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CTC, Heller G, Murphy L : Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA* 266 : 1672-1677, 1991.
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ : Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease : Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347 : 781-786, 1996.
- Sugioka K, Nakano H, Tsuchiya J, Nakano M, Sugioka Y, Tero Kubota S, Ikegami Y : Clear evidence for the participation of OH in lambda DNA breakage induced by the enzymatic reduction of adriamycin in the presence of iron. Importance of local OH concentration for DNA strand cleavage. *Biochem Int* 9 : 237-242, 1984.
- Ubezio P, Civoli F : Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* 16 : 509-516, 1994.
- Van Acker SA, Kramer K, Voest EE, Grimbergen JA, Zhang J, Van Der Vijgh WJ, Bast A : Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 : 95-101, 1996.
- Zhou Z, Kang YJ : Immunocytochemical localization of metallothionein and its relation to doxorubicin toxicity in transgenic mouse heart. *Am J Pathol* 156 : 1653-1662, 2000.

## Legends for Figures

- Fig. 2.** Negative control, there are no apoptotic nuclei in the myocardium of left ventricle of the rat.
- Fig. 3.** Apoptotic reactions in the left ventricle of the normal control rat.
- Fig. 4.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 1 day after 20 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 5.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 3 day after 20 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 6.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 5 day after 20 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 7.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 1 day after 20 mg-adriamycin treatment with vitamin C.
- Fig. 8.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 3 day after 20 mg-adriamycin treatment with vitamin C.
- Fig. 9.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 5 day after 20 mg-adriamycin treatment with vitamin C.
- Fig. 10.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 1 day after 5 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 11.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 3 day after 5 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 12.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 5 day after 5 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 13.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 14 day after 5 mg-adriamycin treatment.
- Fig. 14.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 1 day after 5 mg-adriamycin treatment with vitamin C.
- Fig. 15.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 3 day after 5 mg-adriamycin treatment with vitamin C.
- Fig. 16.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 5 day after 5 mg-adriamycin treatment with vitamin C.
- Fig. 17.** Apoptotic reactions in the left ventricle, 14 day after 5 mg-adriamycin treatment with vitamin C.



Abstract

## Effect of Vitamin C on the Expression of Apoptosis in the Adriamycin-Treated Rats

Youn-Kyoung Seo, Joon-Sup Park, Jeehee Youn, Doo-Jin Paik

*Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea*

Adriamycin, a member of anthracycline class isolated from the culture medium of *Streptomyces peucetius* var. *caesioides*, is one of the most effective and useful anti-neoplastic agents for the treatment of hematological and solid malignancy. The efficacy of adriamycin has been shown to mainly rely on free radicals generated during its inhibitory activity of DNA synthesis and its metabolism. However, the production of free radicals elicited side effects including chronic cardiotoxicity. Such aspect occasionally limits the therapeutic use of adriamycin.

This study was aimed to investigate the dose effect of adriamycin on apoptosis induction of the myocardium of left ventricle along with the effect of vitamin C on adriamycin activity. SD rats weighing 250 ~ 300 g were injected intraperitoneally with either 20 mg/kg or 5 mg/kg of adriamycin and drunk vitamin C at 1000 mg/animal/day. Rats were sacrificed at days 1, 3, 5, and 14 after injection but rats injected with 20 mg adriamycin died at day 6. The heart were paraffin-sectioned at 6  $\mu$ m thickness, stained following TUNEL methods. Stained cells undergoing apoptotic death in myocardium of left ventricle were counted and statistically analyzed.

The results were obtained as follows;

1. The muscular layer of left ventricle from normal rats contained  $4.2 \pm 12.3$  apoptotic cells.
2. Distributions of apoptotic cells from rats treated with 20 mg/kg adriamycin were  $26.7 \pm 43.2$ ,  $17.7 \pm 41.4$ , and  $17.8 \pm 31.8$  at days 1, 3, and 5, respectively.
3. Distributions of apoptotic cells from rats treated with 5 mg/kg adriamycin were  $10.8 \pm 19.5$ ,  $4.1 \pm 12.4$ ,  $5.6 \pm 10.2$ ,  $10.8 \pm 17.3$  at days 1, 3, 5, and 14, respectively.
4. Coadministration of 20 mg/kg adriamycin and vitamin C resulted in  $8.8 \pm 19.5$ ,  $4.1 \pm 12.4$ , and  $16.2 \pm 33.6$  apoptotic cells at days 1, 3, and 5 post administration.
5. Coadministration of 5 mg/kg adriamycin and vitamin C resulted in  $17.0 \pm 32.3$ ,  $12.2 \pm 19.7$ ,  $7.1 \pm 14.0$ , and  $7.2 \pm 16.7$  apoptotic cells at days 1, 3, 5, and 14 post administration.

Taken together, these results demonstrated that treatment of rats with 20 mg/kg adriamycin induced more apoptotic cells than that with 5 mg/kg adriamycin and vitamin C reduced such cytotoxic effects of adriamycin.

**Key words** : ADR, Myocardium of left ventricle, Apoptosis, Vitamin C