

혈관내피세포에서 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 발현에 대한 혈장 지단백의 효과

박 성 희 · 강 영 희

한림대학교 자연과학대학 생명과학부 식품영양학과

Effects of Plasma Lipoproteins on Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Microvascular Endothelial Cells

Park, Sung Hee · Kang, Young Hee

Department of Food and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Kangwon-do

ABSTRACT

Although an elevated plasma level of high density lipoprotein(HDL) is known as a protective component against the development of atherosclerosis and ensuing coronary heart diseases, the related mechanisms are still not established. It has been clearly demonstrated in the early stages of atherogenesis that adhesion of monocytes and lymphocytes to the vascular endothelium is enhanced via adhesion molecules, and that monocytes and macrophages accumulate in the subendothelial space. The present study has investigated whether isolated plasma HDL plays a role in protection against atherogenesis by inhibiting the expression of vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) on the endothelial cells. Effects of plasma native low density lipoprotein (LDL) and acetylated LDL(AcLDL) on VCAM-1 expression were also examined by using an immunocytochemical technique. While plasma HDL did not alter the basal expression of VCAM-1, lipopolysaccharide(LPS) induction of this adhesion molecule was markedly inhibited at a physiological concentration of HDL. In contrast, 30µg protein/ml AcLDL increased significantly both basal VCAM-1 expression and its LPS induction, suggesting that this modified LDL enhances leukocyte adhesion to endothelial cells. Unlike AcLDL, plasma native LDL inhibited significantly VCAM-1 expression. This indicates that LDL did not undergo oxidative modification while incubated with endothelial cells. These results suggest that plasma HDL may inhibit atherogenesis by reducing the expression of adhesion molecules, which is a protective mechanism independent of its reverse cholesterol transport function. Modified LDL is a potent inducer for adhesion molecules in vascular endothelial cells and could play a role in the pathogenesis of atherosclerosis by adhering to blood cells. (*Korean J Nutrition* 31(8) : 1235~1243, 1998)

KEY WORDS : plasma lipoproteins · adhesion molecules · VCAM-1 · endothelial cells · lipopolysaccharide.

채택일 : 1998년 6월 26일

This study was supported by a grant from Hallym University

서 론

고농도의 혈중 콜레스테롤은 죽상경화과정(atherogenesis)의 중요한 작용요인으로 간주되고 있다¹⁻⁴⁾. 이미 보고된 연구논문^{3,6)}에 의하면 *in vitro*에서 배양된 low density lipoprotein(LDL)은 내피세포(endothelial cells), 평활근세포(smooth muscle cells) 및 macrophages에 의하여 산화되어 macrophages를 포말세포(foam cells)로 변화시키고 죽상경화성 병변(atherosclerotic lesions)을 초래한다. 반면에, high density lipoprotein(HDL)은 죽상경화과정과 관상동맥질환(coronary heart disease)을 방지하는 기능을 가진다고 한다⁷⁻⁹⁾. 이것은 콜레스테롤 역운반기능(reverse cholesterol transport)에 HDL이 관여하는 것으로 설명된다⁹⁾. 그러나, 죽상경화과정에 있어서 HDL의 억제 기전은 완전히 규명되지 못하고 있다. 여기서 HDL은 지질수송과는 무관한 또 다른 작용기전에 의하여 죽상경화과정에 억제작용을 발휘할 수 있다는 가능성을 생각해 볼 수 있다.

죽상경화과정의 초기에는 임파구(lymphocytes), 다핵다핵성 백혈구(polymorphonuclear leukocytes) 및 단핵세포(monocytes)가 혈관 내피조직에 부착하며, 이것은 유착성 분자물질(adhesion molecules)인 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)과 E-selectin에 의하여 수반된다. 유착성 분자물질은 유도분자로서 interleukin-1(IL-1)과 tumor necrosis factor- α (TNF- α)등 염증성 cytokines에 의하여 합성된다^{10,11)}. 게다가, 유착성 분자물질의 발현은 다양하게 나타나는 데 growth factors, platelet activators 및 chemotactic factors에 의한 복잡한 조절기전이 관여하는 것으로 추정된다.

VCAM-1은 주로 혈관 내피조직에 단핵성 백혈구가 부착하는 것을 담당하고, 연구자료^{12,13)}에 의하면 죽상경화성 병변 형성과 플라크 생성에 관여하는 것으로 보고되고 있다. VCAM-1 발현은 고콜레스테롤혈증 토끼의 초기 포말세포의 병변에서 나타나고 플라크 형성 부위인 동맥의 내피조직에서 발견되며, 신생혈관(neovascularization)이 형성되는 플라크 기저부위에서 또는 염증성 침범부위에서도 관찰된다¹⁴⁾. 죽상경화과정에 대한 유착분자의 역할은 산화 LDL이 내피조직에 백혈구와 단핵세포의 부착을 촉진시킨다고 보고한 연구논문들¹⁵⁻¹⁷⁾에 의하여 강조되고 있으며, 이것은 혈장 LDL이 일부 유착성 분자물질이 관여하는 작용기전에 의하여

죽상경화과정을 유발시킨다는 것을 제시하고 있다.

본 연구에서는 사람의 혈장에서 분리된 지단백이 내피세포의 VCAM-1 발현에 있어서 어떠한 효과를 발휘하며, 죽상경화과정의 초기 단계에서 직접적인 역할을 담당하는지를 조사하였다. 이를 통하여, 혈장 HDL이 콜레스테롤 역운반기능과는 무관한 독립적인 작용기전으로 죽상경화과정의 초기 단계에서 나타나는 혈액세포들의 부착성을 억제함으로써 죽상경화과정과 관상동맥질환을 방지하는 역할을 수행하는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 혈장 지단백의 준비

혈장 지단백은 냉동 보관된 사람의 혈장을 sequential discontinuous density gradient의 초원심분리 과정을 반복하여 분리되었다^{18,19)}. 우선, NaCl로 사람의 혈장 밀도를 1.063g/ml로 조정된 후 원심분리(150,000xg, 10 $^{\circ}$ C, 24시간)하여 plasma chylomicron, very low density lipoprotein(VLDL)과 LDL fraction을 HDL과 lipoprotein deficient serum(LDS) fraction에서 분리하였다. 그리고, LDL이 섞여있는 fraction은 밀도를 1.019g/ml로 조정하여 원심분리(150,000xg, 10 $^{\circ}$ C, 24시간)한 후에 상층부분의 chylomicron/VLDL fraction을 제거하였다. 나머지 하층부분은 다시 NaCl로 밀도를 1.063g/ml로 조정하고 같은 방법으로 원심분리하여 LDL fraction을 순수분리하였다. 분리된 LDL은 4 $^{\circ}$ C에서 0.154M NaCl/0.01% EDTA buffer(pH 7.4)로 16시간 투석하였다. 아세틸화된 LDL(AcLDL)은 순수분리된 혈장 LDL(1~7mg protein/ml)에 같은 부피의 sodium acetate 포화용액을 얼음 위에서 방울방울씩 가하고 acetic anhydride 8 μ l를 4번에 걸쳐 15분 간격으로 첨가하였다. 순수한 혈장 LDL과 AcLDL은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 electrophoretic mobility를 분석하여 확인하였다.

한편, 남은 HDL과 LDS fraction은 KBr로 fractions의 밀도를 1.21g/ml로 조정하여 원심분리(160,000xg, 10 $^{\circ}$ C, 48시간)하였다. 남은 HDL fraction은 밀도 1.21g/ml에서 원심분리하여 정제하고 같은 방식으로 투석하였다. 마지막 남은 LDS fraction은 밀도 1.25g/ml에서 같은 방법으로 원심분리와 투석과정을 거쳐서 순수분리하였다. 순수분리하여 나온 LDL, AcLDL, HDL 및 LDS 각각의 단백질 함량은 bicinchoninic acid reagent assay kit(Pierce Co., IL)를 사용하여 측정되었고, 중성지방, 총콜레스테롤 및 인지질의 함량

은 diagnostic kits(아산제약)로 분석하여 각 지단백의 순수분리정도를 확인하였다.

2. 혈관 내피세포의 준비

Human umbilical vein의 내피세포는 이미 선행연구²⁰⁾에서 기술된 collagenase 효소(collagenase type II, Worthington Biochemicals)를 이용한 일차배양으로 준비되었다. 분리된 미세혈관의 내피세포는 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가되어 있는 DMEM/F12 배지(Sigma Co.)에서 배양하였다. 배양된 내피세포들이 충분히 증식하면, 세포단층에 trypsin(0.5g/l, 1:250)+EDTA(0.2g/l) 용액을 가하여 부유시키고 2,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 세포 pellets은 40% FBS와 10% dimethylsulfoxide가 첨가된 배지에 분획하여 -70°C에서 냉동 보관하였다. 내피세포는 fluorescent DiI-labeled AcLDL(20µg protein/ml)의 uptake 실험을 통하여 확인하였다(Fig. 1).

3. 세포배양 실험

내피세포(1×10^4 cells)를 10% FBS가 첨가된 350µl DMEM/F12 배지가 담긴 chamber slides(permanox 또는 glass slides)에 seed 하였다. chamber slides에서 내피세포를 24시간 배양한 후에 phosphate buffer saline으로 세척하였다. 새 배지(+10% FBS 또는 0.5% LDS) 350µl에 각각 주어진 농도의 지단백 들인 LDL, HDL 또는 AcLDL과 E. coli endotoxin lipopolysaccharide(LPS, 2µg/ml)를 첨가하여 내피 세포를 다시 24시간 배양하였다.

4. VCAM-1의 면역세포화학적 분석

각각의 지단백과 LPS가 첨가된 배지로 24시간 배양

된 내피세포를 VCAM-1의 발현에 대한 면역세포화학적 분석에 이용하였다. 이 분석은 실온의 축축한 용기에서 실시하였다. 세포단층을 우선 Tris buffer saline(TBS)으로 2~3번 세척하고 10% formaline 찬 용액으로 10분간 고정시키고 다시 TBS로 세척하였다. 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 10% goat serum으로 15분간 배양하였다. 그런 후, 1차항체인 mouse monoclonal anti human VCAM-1(1:75, Novocastrolab.)을 고정된 내피세포에 가하여 1시간 배양하고 TBS로 철저히 세척하였다. 계속해서 2차항체인 alkaline phosphatase conjugate-goat anti mouse IgG(1:64, Sigma Co.)를 가하여 1시간 배양하고 TBS로 다시 철저히 세척하였다. 2차항체와의 결합을 돈독히 하기 위하여 goat anti mouse IgG와의 배양실험을 반복하였다. alkaline phosphatase의 발색반응은 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine(Sigma Co.)과 nitro blue tetrazolium(Sigma Co.)의 기질용액을 가하여 이루어졌다. 충분히 발색시킨 후에 TBS와 tap water로 세척하고 eosin Y 수용액으로 대조염색을 실시하였다. 영구보관 및 현미경상의 관찰을 위하여 mount solution(Biomed Corp.)을 가하여 cover glass로 덮어 고정하고 광학현미경상에서 각각의 지단백과 LPS에 의한 VCAM-1 발현을 비교하였다.

5. 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차로 계산되었고, 통계분석은 Statistical Analysis System package 통계 프로그램을 이용하여 이루어졌다. 각 주어진 지단백과 LPS에 의한 VCAM-1의 발현에 대한 효과는 실험 측정치를 백분율로 나타내어 ANOVA two way analysis로 분산분석하였고, 평균치간의 유의성은 $p < 0.05$ 의 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

죽상경화는 관상동맥질환과 뇌졸중의 극단적인 질환들의 주요 발병요인으로 선진국 사회에서 사망률 50%를 육박한다. 우리나라에서도 식생활 형태의 서구화로 인하여 에너지와 지방의 과다섭취로 인하여 발병율이 급증하고 있다^{21,22)}. 동맥경화는 혈관벽의 내피세포와 평활근세포의 손상에 의한 염증과 섬유병변(fibrous plaques)의 형성을 수반하는 과정이며, 이러한 현상이 심화되는 경우에 심각한 질환들로 나타나게 된다. 이러

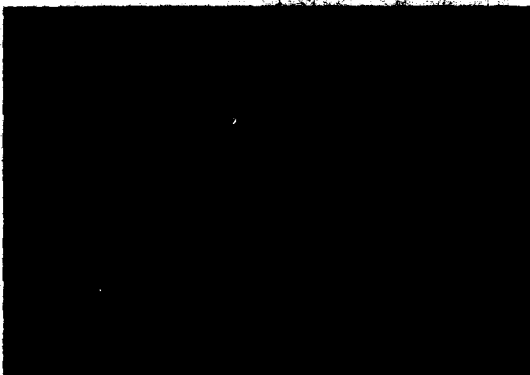


Fig. 1. Uptake of acetylated LDL(AcLDL) on human umbilical vein endothelial cells. These cells were evaluated with representative fluorescent photomicrograph using fluorescent dye DiI-labeled AcLDL(20µg/ml). Magnification $\times 200$.

한 죽상경화과정이 치명적인 질환으로 발전하기 때문에, 죽상경화과정에 대한 예방과 임상적 치료를 위한 많은 연구활동이 진행되고 있다. 지금까지 고전적인 방법의 동물실험과 유전적 소질을 대상으로 한 임상연구에서 죽상경화과정과 관련한 다양한 내재성 분자물질과 cytokines이 확인되었다¹⁾.

LDL은 혈중 콜레스테롤의 주요 운반체로서 작용하며, 고콜레스테롤혈증은 죽상경화과정을 일으키는 주요 요인으로 작용한다¹⁻⁴⁾. *In vivo* 대사과정에서 LDL의 산화적 변형(oxidative modification)은 혈관 내피에 손상을 초래하고, 내피 손상부위에 단핵성 백혈구, macrophages 및 T 림파구의 부착성을 증가시켜 죽상경화과정을 촉진시킨다고 한다¹⁵⁻¹⁷⁾. 내피 손상부위에서 혈관내막으로 이동한 단핵세포와 macrophages는 지방을 취하여 포말세포를 형성하게 되고 여기에 평활근 세포와 T 림파구가 결합하여 지방선조(fatty streak)로 발전하게 된다^{1,3,4)}.

1. Mitogen LPS에 의한 VCAM-1 발현에서 혈장 HDL의 억제효과

유착성 분자물질 VCAM-1은 내피세포에 대한 유도 분자로서 cytokines에 의해서 발현되고¹⁰⁻¹⁴⁾, 지단백들은 이러한 수용성 생성물들을 유도시키는 것으로 알려져 있다¹⁾. 염증성 cytokines인 TNF- α 와 IL-1은 VCAM-1을 신속히 유도하고 이것의 유도는 48~72시간 지속되는 것으로 알려져 있다. 역학연구^{7,8)}에서 혈장 HDL의 수준은 죽상경화과 판상동맥질환의 발병과 분명한 역상관 관계에 있다는 것이 보고되었다. 선행연구^{23,24)}에서 혈장 HDL은 콜레스테롤의 역전 운반 작용에 관여하며, 적어도 일부 HDL의 이러한 작용이 판상동맥 질환과 강력한 역상관 관계를 가지는데 기여한다고 보고되었다.

본 연구에서는 혈장 HDL의 이러한 콜레스테롤 역운반기능과는 다른 작용기전에 의하여 HDL이 죽상경화과정에 대한 억제효과를 발휘하는지를 살펴보았다. 죽상경화과정의 초기에는 유착성 분자물질에 의한 림파구와 다형다핵백혈구 및 단핵세포가 혈관 내피에 부착한다. 본 연구에서는 이러한 연구자료들을 근거로 하여, 혈장 HDL의 죽상경화과정에 대한 억제효과의 작용기전으로서 내피세포 표면에서 basal VCAM-1 발현에 대한 혈장 HDL($d=1.06\sim 1.21\text{g/ml}$)이 미치는 효과를 조사하였다. 또한, LPS에 의한 VCAM-1의 발현과 이것에 대한 HDL의 억제작용을 규명하였다. Fig. 2는 면역세포화학적 방법으로 조사된 혈장 HDL의 내피세포 VCAM-1 유도에 대한 결과를 나타낸 것이

다. 여기서 내피세포는 10% FBS 또는 0.5% LDS가 첨가된 배지에서 배양되었다. 내피성 mitogen인 LPS는 VCAM-1 기본발현과 비교하여 이 유착성 분자물질의 발현을 200~300%로 증가시켰다. LPS는 TNF- α 와 IL-1와 마찬가지로 내피세포 표면에서 VCAM-1의 발현을 촉진시킨다는 것을 보여주었다. 여기서 혈장 HDL의 생리적인 농도인 1mg/ml은 basal VCAM-1 발현에는 영향을 주지 않았다. 그러나, LPS에 의하여 증가된 VCAM-1의 발현은 주어진 농도의 HDL에 의하여 유의적인 수준으로 억제되었다. 최근의 한 보고서²⁵⁾에서 혈장 HDL과 인위적으로 재조합된 HDL 둘다 TNF- α 에 의하여 유발된 내피세포 유착성 분자물질의 발현을 억제한다고 발표하였다. 이러한 보고²⁵⁾와 본 연구에서 나온 결과를 종합하면, 어떤 이유로 인하여 mitogen과 cytokines에 의한 VCAM-1의 유도가 일어나는 경우에 혈장 HDL은 VCAM-1의 발현을 억제한다고 주장할 수 있을 것이다. 또한, 내피세포가 10% FBS가 첨가된 배지에서 배양되었을 때 LPS에 의한 VCAM-1 발현과 이것의 HDL에 의한 억제효과는 현저하였다. 이러한 결과는 FBS에 함유되어 있는 지단백들과 미확인 인자들이 내피성 VCAM-1의 발현에 영향을 준 것으로 사료된다. 그러므로, VCAM-1의 발현에 있어서

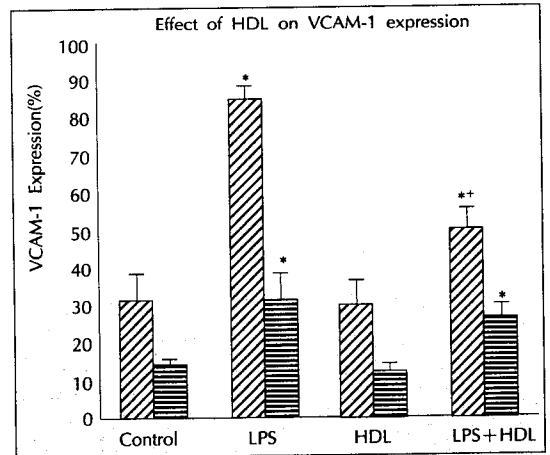


Fig. 2. Bar graph showing the effects of HDL-induced VCAM-1 expression. Confluent monolayers of human umbilical vein endothelial cells were incubated for 18-24 hours with LPS(2 $\mu\text{g/ml}$) and/or HDL(1mg/ml) in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% FBS (▨) or 0.5% LDS(▩). Expression of cell surface VCAM-1 was then measured by an immunocytochemical analysis. Data from four experiments are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$, compared to respective control expression + $p < 0.05$, compared to respective LPS-induced expression

소혈청에 의한 부차적인 작용요인을 제거하기 위하여 차후의 배양실험에서는 배지에 10% FBS 대신 0.5% LDS가 첨가되었다. 혈장 HDL이 LPS에 의하여 증가된 유착성 분자물질의 발현을 억제하는 것은 LPS에 의하여 나타나는 죽상경화과정의 초기 단계를 혈장 HDL이 직접 억제하는 효과와 상응한다. 이것은 단핵성 백혈구가 내피조직에 부착하는 것을 방해하여 죽상경화 과정을 억제할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

혈장 HDL은 콜레스테롤 운반에서의 역할과는 다른 기능들도 지니는 것으로 알려져 있다. 이러한 기능에는 HDL의 항산화제(antioxidant)²⁹⁾와 mitogen³⁰⁾로서 작용과 LPS와 결합하는 능력²⁸⁾ 등이 속한다. 내피세포에 대한 HDL의 mitogen 효과는 내피조직을 왕진하게 유지하여 혈관질환을 방지할 수 있도록 한다. 또한, 선행연구^{29,30)}에서는 HDL이 LPS와 결합하는 것은 단핵세포와 macrophages에 있는 LPS의 수용체에 이 특성이 특성이 접근하지 못하게 하여 IL-1, IL-6와 TNF- α 와 같은 cytokines의 부차적인 분비를 억제하므로써 패혈성 쇼크를 방지한다는 것을 보여주고 있다. 본 연구에서 혈장 HDL이 LPS에 의하여 증가된 내피상 VCAM-1 발현을 억제한다는 사실은 이러한 선행연구의 결과를 적용하여 HDL의 죽상경화과정 억제효과를 일부 설명할 수 있으리라 본다.

2. 혈관내피성 VCAM-1 발현에 대한 순수혈장 LDL과 AcLDL의 효과

Fig. 3은 사람의 혈장에서 분리된 LDL의 VCAM-1 발현에 미치는 작용효과를 요약한 것이고, Fig. 4는 AcLDL의 VCAM-1의 발현에 미치는 효과를 alkaline phosphatase conjugate-goat anti mouse IgG를 이용하여 광학현미경으로 관찰된 면역세포화학 염색법에 의한 micrographs를 나타낸 것이다. 순수혈장 LDL은 basal VCAM-1과 LPS에 의한 VCAM-1 유도에서 유의적인 억제효과를 보여주었다. 반면에, Fig. 4의 염색유형에서 AcLDL을 첨가한 경우에 염색이 강하게 관찰되었는데 이것으로 AcLDL은 이러한 VCAM-1 발현을 현저하게 증가시킨다는 것을 알 수 있다. 최근 Mehta 등의 논문³¹⁾에서 백색의 대동맥환(aortic rings)에 산화 LDL을 처리하였더니 산화 LDL은 내피조직에 의한 혈관 이완작용에 영향을 끼치지 않으면서 백혈구의 유착성 분자물질과의 부착성을 현저히 증가시켰고, 순수혈장 LDL이 처리된 경우에는 대동맥환에 이러한 현상이 발생하지 않았다고 보고하였다. 내피세포에 단핵세포의 부착성은 LDL이 최소한도로 산화가

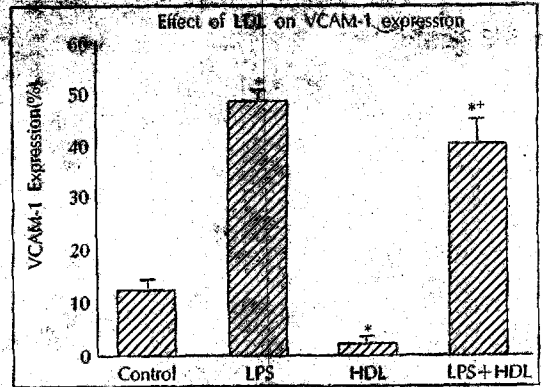


Fig. 3. Bar graph showing the effects of native LDL-induced VCAM-1 expression. Confluent monolayers of human umbilical vein endothelial cells were incubated for 18~24 hours with LPS(2 μ g/ml) and/or LDL(1.5mg/ml) in DMEM/F-12 medium supplemented with 0.5% LDS. Expression of cell surface VCAM-1 was then measured by an immunocytochemical analysis. Data from four experiments are presented as mean \pm SE.

*p < 0.05, compared to control expression

+p < 0.05, compared to LPS-induced expression

일어난다면 증가한다고 보고되었다^{32,33)}. 본 실험의 *in vitro* 상태에서 혈장 LDL에서 변형된 AcLDL이 VCAM-1 유도를 증가시키는 것은 산화 LDL이 작용하는 것과 같은 기전으로 죽상경화과정을 촉진한다는 것을 시사한다. 산화 LDL은 혈장 LDL이 손상된 내피에서 일차적인 산화가 일어나면서 생성되는 것으로 알려져 있다³⁾. 본 연구에서는 혈장 LDL과 내피세포의 배양과정에서 산화 LDL의 생성은 조사하지 않았다. 그럼에도 불구하고, 본 실험에서 혈장 순수 LDL이 basal VCAM-1 발현을 증가시키지 못한 것은 혈장 LDL을 내피세포와 18~24시간 배양한 후에도 VCAM-1의 발현에 영향을 미칠 정도로 충분히 산화 LDL이 생성되지 않았다는 것을 암시한다.

산화 LDL은 손상된 내피조직에서 뿐만 아니라 macrophages에 의하여 생성되기도 하며³⁾, 이것은 순수혈장 LDL과 함께 macrophages의 LDL scavenger 수용체에 의하여 취해져서 죽상경화성 병변에서 발견되는 포말세포 형성에 기여한다³⁴⁾. 게다가, 산화 LDL은 내피세포에서 scavenger 수용체를 활성화시킨다고 하였다³⁵⁾. 이러한 연구결과들은 죽상경화의 발병과정에 LDL의 scavenger 수용체가 관여한다는 것을 시사하고 있다. 그러나, 산화 LDL이 어떻게 내피세포를 손상시키는지는 그리고 어떤 경로로 세포내로 유입되어 이루어지는지는 완전히 규명되지 못하고 있다.

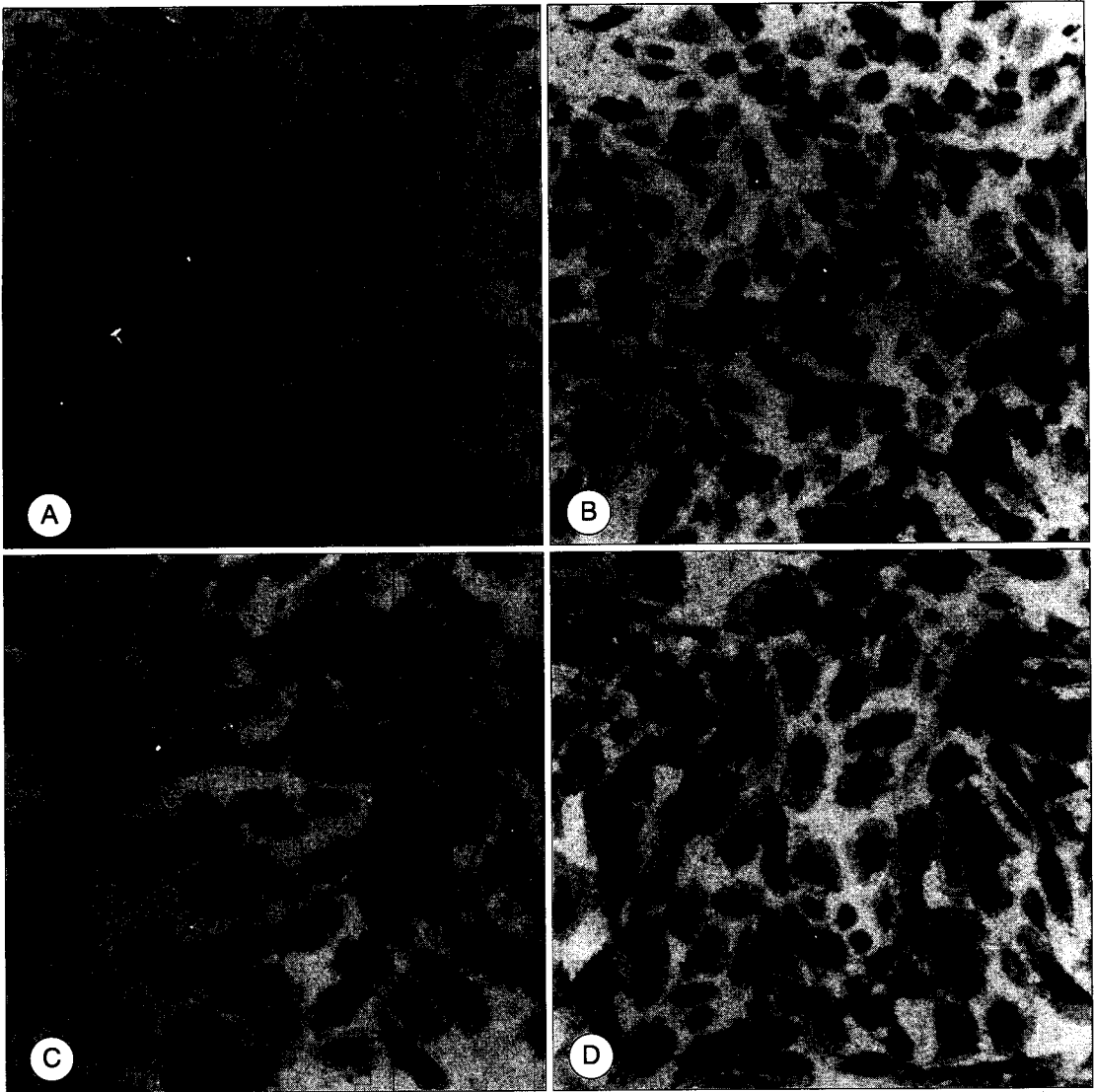


Fig. 4. Microphotograph showing the effect of AcLDL on VCAM-1 expression of human umbilical vein endothelial cells. These cells were incubated in DMEM/F-12 medium supplemented with 0.5% LDS and treated either with nothing(A panel), AcLDL(30µg/ml, B panel), LPS(2µg/ml, C panel) or with AcLDL and LPS combination(D panel) for 18-24hours. VCAM-1 expression was measured by an alkaline phosphatase conjugate antibody. Magnification ×150.

3. 유착성 분자물질과 죽상경화과정과의 관계

위에서 언급한 바와 같이, 단핵세포와 백혈구의 내피세포에 대한 부착은 유착성 분자물질인 VCAM-1, ICAM-1과 E-selectin에 의하여 죽상경화과정 초기 단계에서 나타난다. 이러한 분자들의 발현은 혈관손상이 전개되면서 죽상경화의 발병에 결정적인 요인으로 부각되기 때문에, 유착성 분자물질의 발현과 혈액 세포들의 부착성에 대한 연구는 최근 관상동맥질환의 예방과 치료차원에서 활발히 진행되고 있다. 대다수 연구들은 leukotrienes, chemotactic factors, platelet-activating

factor 및 유착성 분자물질에 의한 백혈구의 내피조직에 대한 부착성을 규명하고자 하였다^{15-17,25,31,35}. 또한, 죽상경화성 병변이나 죽종부위(atheroma)에서의 산화 LDL의 역할을 조사하기 위하여 산화 LDL에 의한 내피조직과 백혈구의 상호작용이 *in vivo*와 *in vitro* 상태에서 관찰되었다^{15,17,31,34}. 산화 LDL은 내피조직의 이완작용과 관련된 nitric oxide의 활성도에는 영향을 주지 않고 대동맥의 내막(intima)에 백혈구의 부착을 도모하며, 여기에는 P-selectin의 유착성 분자물질이 관여한다고 보고되었다³¹. 산화 LDL은 내피조직의 손상

부위에서 순환하고 있는 혈장 LDL로부터 생성되고, 내피세포의 손상을 한층 더 심화시키면서 죽상경화과정을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다.⁴⁸⁾ *In vitro* 상태에서 LDL을 내피세포, 혈관벽의 평활근세포 또는 macrophages와 배양하면 LDL은 산화적 변형을 경험하게 된다.³⁴⁾ 생성된 산화 LDL과 이것의 주된 구성요소로 알려진 lysophosphatidylcholine은 내피세포와 평활근세포에서 유착성 분자물질을 발현시키고³⁶⁾ 여기에서 단핵세포 등의 혈액세포가 포획되어 혈관내막으로 이동하여 macrophages로 되고 이것에 의하여 산화 LDL이 신속하게 취해진다. 이러한 기전에 의하여 적어도 일부 LDL이 죽상경화과정을 촉진한다고 볼 수 있다.³⁾ 본 연구에서도 *in vitro* 상태에서 혈장 LDL로부터 변형된 AcLDL은 혈장 순수 LDL과는 달리 산화 LDL과 같이 basal VCAM-1의 발현을 증가시켰으며, LPS와의 VCAM-1 발현에 대한 상승 작용을 보여주었다. 그러므로, AcLDL은 적어도 일부 산화 LDL에서 보여진 이러한 작용기전으로 죽상경화과정을 촉진시킨다고 본다.

혈관벽의 평활근세포는 정상적으로는 VCAM-1 유착성 분자물질이 결여되어 있지만, 죽종 부위의 평활근세포에서는 발견되고 있다. 혈관벽의 평활근세포에서의 유착성 분자물질은 *in vitro* 실험에서 TNF- α 와 IL-1 β 에 의하여 발현된다고 한다.^{37,38)} 혈관벽의 평활근세포는 동맥중막(arterial media)에 존재하는 수축성 세포이며, 죽상경화과정이나 열증과 같은 질병상태에서 혈액세포들이 중막을 침범하고 cytokines의 매개에 의한 중막의 평활근세포와 결합하여 이러한 질병의 병리현상에 깊은 영향을 끼친다고 할 수 있다.

최근에 와서는 유착성 분자물질의 발현을 억제하여 죽상경화과정의 발병을 방지하는 cytokines의 존재를 확인하고자 하는 연구활동이 진행되고 있다. 배양실험에서 사람 혈관벽의 평활근세포의 VCAM-1 발현은 transforming growth factor- β (TGF- β)에 의하여 억제된다고 한다.³⁷⁾ 또한, 평활근세포와 내피세포를 함께 배양하면 활성화된 TGF- β 가 생성되어 평활근세포에 VCAM-1 발현을 억제시킨다고 보고되었다.³⁷⁾ 정상적인 *in vivo* 상태에서 이러한 두 유형의 세포들이 서로 물리적으로 근접하여 존재하기 때문에, 혈관벽의 평활근세포에서 유착성 분자물질이 발현되지 않는 것으로 추측된다. Gamble 등³⁹⁾은 만약 내피세포와 평활근세포와의 이러한 접촉이 깨어지면 죽종부위에서 병리적인 상태가 발생한다고 제시하였다. 그러나, 아직까지 내피세포와 평활근세포에, 백혈구와 단핵세포의 부착에 대한 기전은 유착성 분자물질의 발현이 다양하고 세포

간의 상호작용에 의하여 분비되는 cytokines 및 혈액 인자들이 유착성 분자물질의 발현에 있어서 서로 상반된 작용으로 죽상경화과정에 관여하기 때문에, 여전히 규명되지 않고 있다.

죽상경화과정을 억제할 수 있는 HDL과 같은 지단백에 의하여 내피세포에서의 유착성 분자물질을 규명하는 것은 흥미로운 연구과제이다. 콜레스테롤 역운반기능에 관여하여 죽상경화과정을 억제시킨다고 알려진 HDL은 최근에 cytokine에 의하여 유도된 내피세포의 유착성 분자물질의 발현을 억제시킨다고 처음으로 발표되었다.²⁰⁾ 본 연구에서도 혈장 순수 HDL은 LPS에 의한 VCAM-1 유도를 억제하였다. 혈장 HDL에 의한 이 단백질의 발현 억제능력은 HDL의 지질 역운반작용과는 독립적으로 죽상경화성 병변과 플라크 형성의 진행을 방지한다는 것을 추정해 볼 수 있을 것이다. 이러한 제안은 토기에게 혈장 HDL을 투여하였을 때, 죽상경화성 병변이 감퇴한다고 보고한 선행연구와 부합한다고 본다. 본 연구에서 혈장 HDL의 내피성 VCAM-1 발현에 대한 억제효과는 HDL의 VCAM-1 단백질 발현에 대한 직접적인 효과와 HDL에 의한 IL-1, IL-6 및 TNF- α 와 같은 염증촉진성 cytokines의 분비억제 또는 TGF- β 의 분비촉진에 의한 간접적인 효과에 의하여 이루어진다고 설명될 수 있을 것이다. 그러나, 혈장 HDL의 유착성 분자물질의 발현에 대한 작용기전을 규명하기 위해서는 좀 더 많은 연구활동이 필요하리라 본다.

요약 및 결론

본 연구에서는 사람의 혈장에서 분리된 지단백이 내피세포의 basal VCAM-1 발현과 endotoxin meitogen인 LPS에 의하여 유도된 VCAM-1의 발현에 미치는 효과를 규명하였다. 1) 배양된 혈장 HDL은 생리적인 농도에서 내피성 VCAM-1의 basal 발현에는 별다른 영향을 주지 않고, LPS에 의하여 증가된 VCAM-1 발현을 현저하게 억제하였다. 이러한 현상은 혈장 HDL의 VCAM-1 발현에 대한 직접적인 효과일 수도 있고 HDL에 의한 TGF- β 와 같은 cytokines의 분비에 의한 간접적인 효과일 수도 있다고 추정된다. 2) *In vitro* 상태에서 혈장 LDL에서 준비된 AcLDL은 basal 발현을 증가시켰을 뿐만 아니라 LPS에 의한 VCAM-1 발현을 유도하는 데에 상승효과를 나타내었다. AcLDL은 적어도 일부 죽상경화과정을 촉진시킨다고 알려진 산화 LDL과 같은 작용기전으로 죽상경화과정에 관여한다고 본다. 3) 한편, 혈장 순수 LDL은 VCAM-1의 발현에서 유의적인 억제효과를 보여주었다. 특히, basal 발현의 억

제효과는 내피세포와의 배양에서 순수혈장 LDL은 18~24시간의 배양기간 동안에 산화적 변형을 경험하지 않은 것으로 추정할 수 있다.

결론적으로 혈장 지단백은 죽상경화과정의 초기 단계에서 내피조직과 백혈구의 부착을 매개하는 유착성 분자물질의 발현에 영향을 끼치며, 혈장 순수 LDL에 적어도 최소한의 산화적인 변형이 일어나는 경우에 유착성 분자물질의 발현이 증가되어 죽상경화과정이 촉진된다는 것을 알 수 있었다. 혈장 HDL의 죽상경화과정의 억제효과는 콜레스테롤 역운반기능 외에도 독립적으로 유착성 분자물질의 발현을 억제하여 내피조직에 단핵성 백혈구가 부착을 못하게 함으로서 나타나고, 이러한 효과로 인하여 혈장 HDL은 혈관순환계질환을 방지할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

Literature cited

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* 362 : 801-809, 1993
- Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 113 : 578-582, 1987
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JD, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320 : 915-924, 1989
- Witztum JL, Steinberg D. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88 : 1785-1792, 1991
- Lougheed M, Steinbrecher UP. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol Chem* 271 : 11798-11805, 1996
- Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4 : 357-364, 1984
- Gordon DJ, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease : the Framingham study. *Am J Med* 62 : 707-714, 1977
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison JR, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease : four prospective American studies. *Circulation* 79 : 8-15, 1989
- Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apo-lipoprotein AI. *Nature* 353 : 265-267, 1991
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule(ICAM-1). *J Immunol* 137 : 245-254, 1986
- Osborn L, Hessian C, Tizard R, Vassalio C, Lufowkyj S, Chi-Rosso S, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59 : 1203-1211, 1989
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251 : 788-791, 1991
- Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 141 : 161-168, 1992
- O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Furgerson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92 : 945-951, 1993
- Jeng JR, Chang CH, Shieh SM, Chiu HC. Oxidized low-density lipoprotein enhances monocyte-endothelial cell binding against shear-stress-induced detachment. *Biochim Biophys Acta* 1178 : 221-227, 1993
- Lehr HA, Seemuller J, Hubner C, Menger MD, Messmer K. Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction *in vivo* involves the receptor for platelet-activating factor. *Arterioscler Thromb* 13 : 1013-1018, 1993
- Lehr HA, Krober M, Hubner C, Vajkocz P, Menger MD, Nolte D, Kohlschutter A, Messmer K. Stimulation of leukocyte/endothelium interaction by oxidized low-density lipoprotein in hairless mice : involvement of CD 11b/CD18 adhesion receptor complex. *Lab Invest* 68 : 388-395, 1993
- Fisher WR. Heterogeneity of plasma low density lipoprotein : manifestation of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism* 32 : 283-291, 1983
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 3178-3182, 1976
- Wall RT, Harker LA, Quadracci LJ, Striker GE. Factors influencing endothelial cell proliferation *in vitro*. *J Cell Physiol* 96 : 203-213, 1978
- 공세권 공저. 한국인구보건원, 1983
- 이기열. 연세논총 21 : 297-316, 1985
- Frohlich JJ, Pritchard PH. The clinical significance of serum high density lipoproteins. *Clin Biochem* 22 : 417-

- 422, 1989
- 24) Tall AR. Plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest* 86 : 379-384, 1990
 - 25) Cockerill GW, Rye K-A, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 1987-1994, 1995
 - 26) Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 294 : 829-834, 1993
 - 27) Tauber J-P, Cheng J, Gospodarowicz D. Effect of high and low density lipoproteins on proliferation of cultured bovine vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 66 : 696-708, 1980
 - 28) Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 12040-12044, 1993
 - 29) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding proteins. *Science* 249 : 1431-1433, 1990
 - 30) Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249 : 1429-1431, 1990
 - 31) Mehta A, Yang B, Khan S, Hendricks JB, Stephen C, Mehta JL. Oxidized low-density lipoproteins facilitate leukocyte adhesion to aortic intima without affecting endothelium-dependent relaxation: role of P-selectin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 2076-2083, 1995
 - 32) Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interaction. *J Clin Invest* 85 : 1260-1266, 1990
 - 33) Pritchard KA Jr, Tota RR, Lin JH, Danishefsky KJ, Kurilla BA, Holland JA, Sterman MB. Native low density lipoproteins: EC recruitment of mononuclear cells. *Arterioscler Thromb* 11 : 1175-1181, 1991
 - 34) Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher F. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries: role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 83 : 2021-2030, 1991
 - 35) Pritchard KA Jr, Wang PY, Sterman MB. Atherogenic concentration of low-density lipoprotein enhances endothelial cell generation of epoxyeicosatrienoic acid products. *Am J Pathol* 136 : 1383-1391, 1990
 - 36) Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90 : 1138-1144, 1992
 - 37) Gamble JR, Bradley S, Noack L, Vadas MA. TGF- β and endothelial cells inhibit VCAM-1 expression on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 949-955, 1995
 - 38) Wang X, Feuerstein GZ, Gu J-L, Lysko PG, Yue T-L. Interleukin-1 β induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocyte to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 115 : 89-98, 1995
 - 39) Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol fed rabbit. *J Clin Invest* 85 : 1234-1241, 1990