

苦蔘이 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포 고사 및 전체 단백질 발현에 미치는 영향

전인철 · 정재은 · 손인환 · 이주석 · 정승원¹ · 장재호¹ · 이선우¹ · 이 인 · 문병순^{1*}

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 1: 원광대학교 한의학 전문대학원 제3의학과

Study of *Sophorae Radix* on H₂O₂-mediated Apoptosis and Total Protein Expression Pattern in Vascular Smooth Muscle Cells

In Cheol Jeon, Jae Eun Jeong, In Hwan Son, Ju Seok Lee, Seung Won Jeong¹, Jae Ho Jang¹, Seon U Lee¹, In Lee, Byun Soon Moon^{1*}

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.

1: Department of 3rd Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Apoptosis of vascular smooth muscle cells(VSMCs) is essential in atherogenesis, being a factor that modulates its early progression rather than a terminal event in the course of the disease. Various stimuli, including oxide lipoproteins, altered hemodynamic stress and free radical, can induced VSMCs apoptosis in vitro. The protective effects of *Sophorae Radix* (SR) on apoptotic cell death induced by H₂O₂ were investigated in VSMCs. The viability of VSMCs was markedly decreased by H₂O₂. *Sophorae Radix* protected the H₂O₂-induced apoptotic death of VSMCs, which was characterized as nuclear fragmentation and increase of sub-G0/G1 fraction.. *Sophorae Radix* decreased the activation of caspase-3 like protease induced by H₂O₂ and recovered control level from H₂O₂-induced PARP, Bak, Bcl-XL and mitochondrial membrane potential. These results suggest that *Sophorae Radix* protected VSMCs apoptotic death induced by H₂O₂ via inactivation of caspase-3 and modulation of mitochondrial function. Also, the expression profile of proteins by using two-dimensional (2-D) gel electrophoresis was screened. Future investigations will need to explore the use of an antiatherosclerotic therapy of *Sophorae Radix*, which relies on inhibition of the proapoptotic activation of the vascular smooth muscle cells.

Key words : *Sophorae Radix*, caspase-3, PARP, Bak, Bcl-XL, total protein expression

서 론

허혈성 심장질환과 말초혈관 폐쇄 등 순환기계 질환 발생의 직접적인 원인으로 여겨지고 있는 동맥경화증은¹⁾ 흡연, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 등이 위험인자로 지적되고 있으며²⁾, 어떤 특정 원인에서 기인되는 단일 질환이 아니고 여러 가지 다양한 원인이 복합적으로 작용한 결과로 생각되고 있다³⁾. 동맥경화증은 동맥이 굳어지고 내강이 좁아져서 혈액의 흐름이 원활하지 않게 된 상태로, 동맥경화증의 형태학적 분류 중 죽상동맥경화증은 허혈성 심장질환에 중요한 원인으로 작용한다고 알려져 있다.

고혈압, 동맥경화증과 같은 질병의 발생과정에서 중요한 인자로 알려지고 있는 H₂O₂, O₂, O₂⁻, OH⁻ 등의 활성산소종은 허혈성 심장질환에서 재관류에 의한 심근손상을 일으킬 뿐만 아니라 특히 대동맥 평활근세포의 고사를 유도함이 보고되어 왔으며, 이러한 활성산소에 의한 산화적 손상을 방어하는 치료약물의 개발에 관한 많은 연구들이 진행되고 있다.

苦蔘(*Sophorae Radix*)은 《神農本草經》에 최초로 기재된 약물로서 淸熱燥濕, 利尿, 健腸胃, 祛風殺蟲의 효능으로 濕熱下痢, 黃疸, 赤白帶下, 陰部搔痒, 疥瘡頑癬 等の 症狀에 사용되어 왔다. 苦蔘에 대한 실험적인 연구로는 李⁴⁾ 등이 급성 附子 草烏 중독에서 不整脈과 頻脈을 억제할 수 있음을, 宋⁵⁾은 循環器 anaphylaxis에 대하여 억제효과가 있음을, 또한 金⁶⁾은 ADR에 의한 心筋毒性에 대한 방어효과가 있음을, 徐⁷⁾는 苦蔘 煎湯液 分割

* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원

· E-mail : mbs@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-2102

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

물이 배양심근세포에 미치는 영향을 보고하여 苦蔘이 심혈관계 질환에 대하여 효과가 있음을 시사하고 있다. 이에 저자는 대동맥 평활근세포의 고사에 대한 苦蔘의 방어효과를 확인하고 단백질 발현 양상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay, 광학현미경적 관찰, 유식세포 분석 등의 방법으로 조사하였다. 또한 세포고사 신호전달계의 활성화를 caspase-3, PARP, Bak, Bcl-2 단백질의 발현과 caspase family cysteine protease-3의 활성을 측정하고 苦蔘이 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근 세포에 대한 전체적인 단백질 발현 양상을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 대동맥 평활근 세포 배양

대동맥 평활근 세포를 6주된 Sprague-Dawley Rat의 흉부에 있는 대동맥에서 분리하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아 혈청(Gibco BRL Co., Gaithersburg, MD)이 포함된 DMEM(Sigma Co., Missouri, USA)으로 배양하였으며 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 苦蔘을 전처리 한 뒤 H₂O₂를 처리하여 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

2) 약제

본 실험에서 사용한 苦蔘(*Sophorae Radix*)은 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

3) 시약

세포 및 핵 염색관찰에 이용한 세포배양판은 Falcon Co.(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium blomide (MTT)와 peroxidase(HRP), 염색시약 DAPI, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Co.(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다. Trypsin, 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. PARP, caspase-3, Bak, Bcl-XL, Fas, Fas-L와 actin등에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

검액은 물을 용매로 사용한 추출방법을 이용하여 조제하였다. 苦蔘 20 g 분량을 증류수 500 ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕을 한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 여과지로 여과하였다. 여과된 용액을 감압 회전 증발기를 이용하여 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 0.5 g의 분말을 얻었다. 분말 상태의 苦蔘 추출물을 DMSO에 100 mg/ml이 되도록 녹여 -20°C

에 보관하였다. 대동맥 평활근 세포에 苦蔘 추출물을 처리하기 전에 고압 살균된 phosphate buffered saline(PBS)에 희석하여 사용하였다.

2) 세포생존율 측정

세포생존율은 Mosmann⁸⁾의 방법에 따라 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 세포 배양판(96-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포/ml)를 100 μl/well 씩 분주하여 18시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 시약들을 처리한 다음, 배양 상층액을 제거하고 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 배양액 부피의 1/10을 첨가하였다. 4시간 후 상층액을 제거하고 상온에서 건조하여 1 ml의 DMSO로 녹인 후 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DAPI 염색

H₂O₂와 苦蔘을 처리한 대동맥 평활근 세포를 PBS로 2번 세척하였다. 대동맥 평활근 세포에 4% formaldehyde을 처리하여 고정시킨 후 PBS로 세척하고 10μM DAPI(Sigma Co., Missouri, USA) 염색약을 10분간 처리하여 염색하였다. 염색된 대동맥 평활근 세포를 PBS로 세척하여 남은 DAPI 염색약을 제거하고 형광현미경 아래에서 DNA의 분절현상을 관찰하였다.

4) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

H₂O₂와 苦蔘을 처리한 대동맥 평활근세포를 4°C에서 15분 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고, 12,000 rpm으로 15분 원심 분리시켰다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid(Sigma Co., Missouri, USA)로 단백질을 정량하고, 단백질 양이 100 μg에 해당하는 세포 파쇄액을 분석 완충용액(100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. Caspase-3의 활성측정은 형광기질(fluorogenic substrate)인 Ac-DEVD-AMC(Calbiochem Co., San Diego, CA)를 각각 50 μM로 사용하였으며, 형광기질의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. Caspase-3의 활성측정은 excitation wavelength(380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하여 fluorometer(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

5) FACS 분석

대동맥 평활근세포의 대조군에 PBS를 처리하고, 처리군에 H₂O₂를 단독처리 그리고 苦蔘을 1시간 전처리한 후 H₂O₂를 처리하였다. 그 이후 세포를 포집하여 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 세포에 PBS 300 μl를 넣고, 대동맥 평활근세포의 DNA를 propidium iodine (PI) solution (0.1% Triton X-100, 20 μg/ml PI, 200 μg/ml RNase) 600 μl를 넣어 20분간 반응시킨 후 1×10⁶ 세포를 유식세포 분석기(Becton-Dickinson, Mountain View Co., CA, USA)로 sub-G1 으로 나타나는 세포고사를 분석하였다.

6) Mitochondria의 막전위 측정

대동맥 평활근세포를 PBS에 두 번 세척하고, JC-1을 DMEM

배지에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석한 후 세포에 분주하여 37°C 세포 배양기에서 20분 배양하였다. JC-1으로 염색된 대동맥 평활근세포를 PBS로 2회 세척하고, 형광현미경 아래에서 mitochondria의 막전위를 관찰하였다.

7) Western blotting

대동맥 평활근세포에 H_2O_2 와 苦蔘를 처리한 일정시간 후에 세포를 채취하여 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 EB 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)으로 얼음 속에서 30분 용해하였다. 동량의 용해 세포 파쇄액(단백질: 200 μg)에 2X sample buffer와 섞어 100°C에서 3분간 끓인 후 12.5% sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 electrotransfer system(IIard Co., Seattle, WA, USA: 4°C, 30V에서 16시간)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 후 blocking buffer(10% skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Anti-Bcl-XL, anti-Bak, anti-Fas ligand, anti-Fas, anti-PARP 및 anti-caspase-3 항체를 0.05% Tween-20이 함유된 Tris-buffered sample buffer(TBST)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시킨 후, 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase (HRP)(Santa cruz, CA, USA)를 상온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

8) 2-Dimensional Gel Electrophoresis

배양된 VSMC 세포에 일정 시간 시약을 처리한 후 세포를 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(8M urea, 4% CHAPS, 0.2% ampholyte, 2 μM PMSF, 50 mM DTT)을 넣고 파쇄하고, sonication을 시행한 후, 13,000rpm에서 20분 원심 분리하였다. 얻은 세포 파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(200 μg)에 rehydration solution(8M urea, 4% CHAPS, 0.2% ampholyte, 18 mM DTT, bromophenol blue)를 혼합하여 상용화된 IPG dry strip 3-10 nonlinear(BIO-RAD, CA, USA)을 이용하여 rehydration tray에서 16시간동안 rehydration을 시행하였다. Rehydration을 시행한 strip은 PROTEAN IEF Cell(BIO-RAD, CA, USA)을 이용하여 등전위 전기영동을 시행하였다(60,000Vhr). Strip을 평형화용액 I(50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT)과, 평형화 용액 II(50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 2.5% Idoacetamide)로 각각 20분씩 반응시킨 후, PROTEAN II XL System(BIO-RAD, CA, USA)를 이용하여 gel 당 40 mA로 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 silver staining kit(Amersham사, Buckinghamshire, England)를 이용하여 silver staining을 시행하였다. Stain이 끝난 gel은 Fluor-S Multi Imager(BIO-RAD, CA, USA)을 이용하여 gel spot을 digital form으로 얻은 후 PDQuest analysis software(BIO-RAD, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

9) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 결과를 표시하였다. 통계처리는 paired student's t-test 검정을 통하여 수행하였으며, p-value가 0.05이하일 때 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. H_2O_2 가 대동맥 평활근세포의 세포생존율에 미치는 영향 및 苦蔘이 H_2O_2 에 의한 대동맥 평활근 세포의 죽음에 미치는 방어효과
산화적 손상을 초래하는 H_2O_2 의 대동맥 평활근세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 다양한 농도의 H_2O_2 를 처리한 후 세포 생존율의 변화를 MTT assay로 측정하였다. 그 결과 대동맥 평활근세포에 H_2O_2 를 400 μM 까지 처리 시 유의한 세포 사멸은 관찰되지 않았으나 그 이상의 농도에서는 세포생존율이 감소되었다. 그러나 우태아혈청이 들어있지 않은 DMEM 배지에 대동맥 평활근세포를 넣어주었을 때 H_2O_2 에 의한 산화적 손상이 유도되었다⁹⁾. 우태아혈청이 들어있지 않은 DMEM 배지를 대동맥 평활근세포에 넣어준 후 H_2O_2 를 24시간 150 μM 에서 처리한 군에서는 45%의 세포생존율이 감소되었으나 10% 우태아혈청이 들어있는 배지를 넣어준 군에서는 150 μM H_2O_2 처리 시에도 유의한 세포 생존율의 감소가 나타나지 않았다 (Fig. 1). 대동맥 평활근세포를 우태아혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지에 150 μM H_2O_2 처리 시 55%의 세포생존율을 보여 이후의 실험에서는 우태아혈청이 함유되지 않은 배지에서 산화적 손상을 유도한 후 실험을 시행하였다. 대동맥 평활근 세포의 세포죽음에서 물추출한 苦蔘의 효과를 알아보기 위하여 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별로 1시간 전처리한 후 150 μM H_2O_2 를 처리하였다. 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 H_2O_2 단독 처리군과 苦蔘를 전처리한 후 H_2O_2 를 처리한 군의 세포생존율을 MTT assay를 통하여 측정하였다. 그 결과 苦蔘를 전처리 한 실험군에서 H_2O_2 에 의한 세포죽음이 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 1).

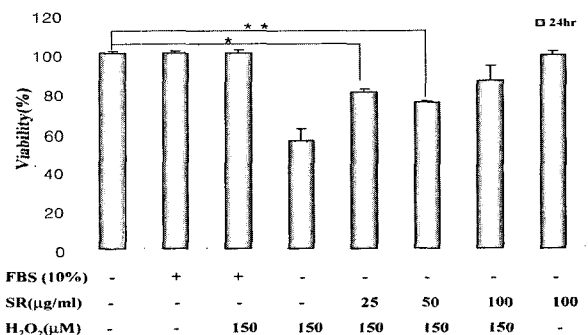


Fig. 1. Effects of H_2O_2 on cell viability in media containing with or without serum and effects of *Sophorae Radix* on H_2O_2 -induced vascular smooth muscle cell death. VSMCs were pretreated with various concentrations of *Sophorae Radix* (12.5 ~ 100 μg) for 1hr and then treated with 150 μM H_2O_2 for 24 hr. Cell viability was determined by MTT assay. The results present the mean \pm S.D. of four independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

2. 苦蔘이 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포의 고사에 미치는 영향

H₂O₂에 의해 일어나는 대동맥 평활근 세포의 세포죽음이 핵산의 분절을 보이는 세포고사에 의한다고 보고되고 있어⁹⁻¹²⁾, 광학현미경으로 전체적인 세포의 형태학적인 관찰을 먼저 수행하고 (Fig. 2A-D), DAPI 염색한 후 형광현미경 아래에서 관찰하였다 (Fig. 2E-H). H₂O₂ 단독처리 한 실험군에서는 chromatin의 응축과 분절이 관찰되었다 (Fig. 2F). 그러나 苦蔘을 단독처리한 군에서와 苦蔘을 1시간 전처리 한 후 H₂O₂를 처리한 군에서는 위의 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 2E, G, H). H₂O₂에 의해 유도되는 대동맥 평활근 세포의 세포고사를 유식세포분석기로 측정하였을 때 나타나는 sub-G1의 DNA를 PI염색법으로 분석하였다. 대동맥 평활근 세포에 대조군, H₂O₂를 처리한 실험군, 그리고 苦蔘을 1시간 전처리한 후 H₂O₂를 처리한 군을 처리 후 24시간이 지난 후에 세포를 포집하였다. 세포막을 투과시킬 수 있는 완충용액을 포함한 세포에 넣고, PI 염색액으로 염색하였다. 유식세포 분석기로 DNA를 삽입된 PI 양을 측정하였을 때, 대조군에서는 나타나지 않았던 sub-G1 DNA가 H₂O₂를 처리한 군에서 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 苦蔘을 1시간 전처리 한 후 H₂O₂를 처리한 군에서는 sub-G1이 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

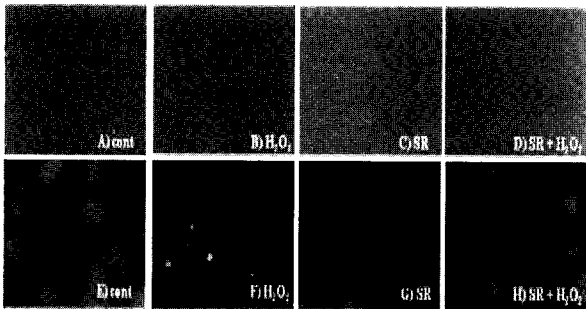


Fig. 2. Effects of *Sophorae Radix* H₂O₂-induced chromatin fragmentation and cell shrinkage in VSMC. VSMCs were pretreated with 100 μ g/ml *Sophorae Radix* for 1 hr and then treated with 150 μ M H₂O₂ for 24 hr. Then, the cells were stained without(A-D)/with(E-H) DAPI dye. Cells observed by microscopy (A-D) fluorescence microscopy (E-H).

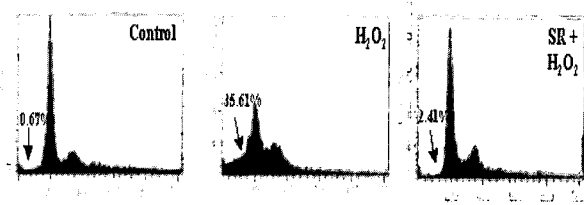


Fig. 3. *Sophorae Radix* inhibits H₂O₂-induced apoptosis in VSMCs. VSMCs were pretreated with 100 μ g/ml *Sophorae Radix* for 1 hr and then treated with 150 μ M H₂O₂ for 24 hr. Then, the cells were stained with PI staining solution and analyzed by flow cytometry.

3. 苦蔘이 caspase-3 like protease의 활성화에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포의 세포독성이 세포고사 이전에 기인하고, 이를 苦蔘이 방어하였기에 세포고사 신호전달기의 중요한 분자인 caspase family cysteine protease-3의 효소활

성에 대한 苦蔘의 효과를 관찰하였다. 동맥 평활근세포에 H₂O₂와 苦蔘을 단독 그리고 병용처리한 이후에 12시간 및 24시간 후에 세포를 채집, 분쇄한 세포 부유액에서 단백질 농도를 정량한 후 세포질 내의 caspase의 효소활성을 각 caspase의 형광기질을 이용하여 이들 기질의 분해정도를 fluorospectrometer로 측정하였다. Caspase-3의 활성은 H₂O₂ 단독처리시 12시간 후에 2.5배 정도의 활성증가가 관찰되었으며, 24시간 처리군에서는 활성이 5배 증가하였다. 그러나 苦蔘을 1시간 전처리한 실험군에서는 증가된 caspase-3 효소활성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4) H₂O₂에 의해 유도된 대동맥 평활근 세포의 세포죽음에 대해 방어작용을 하는 苦蔘을 처리했을 경우의 procaspase-3 및 PARP 단백질의 발현 양상 변화를 조사하였다. 이를 위해 배양된 대동맥 평활근 세포에 苦蔘을 1시간 전처리한 후 H₂O₂를 처리한 세포를 포집하여 세포 파쇄액(cell lysate)을 얻었다. 이후 전기영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착 등을 거친 후 procaspase-3 및 PARP 단백질에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. 먼저 H₂O₂ 단독으로 24시간 처리한 군에서는 procaspase-3의 감소와 함께 이의 세포 내 기질 단백질인 PARP의 분절을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 5). 동시에 苦蔘을 1시간 전처리하여 24시간 이후 포집한 처리군에서는 H₂O₂에 의해 감소되었던 procaspase-3 단백질의 발현이 증가하였고 분절되었던 PARP가 대조군에 비슷한 수준으로 회복되어졌다 (Fig. 5).

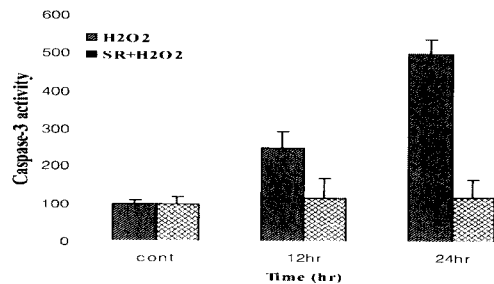


Fig. 4. Effects of *Sophorae Radix* H₂O₂-induced caspase-3 activation in VSMCs. VSMCs were pretreated with 100 μ g/ml *Sophorae Radix* for 1 hr and then treated with 150 μ M H₂O₂ for 12 hr and 24 hr. Cell extracts from VSMCs were measured the enzymatic activation of caspase-3 protease by using a fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC. The results present the mean \pm S.D. of four independent experiments.

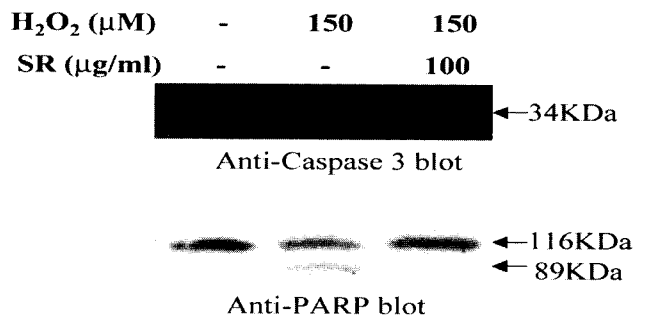


Fig. 5. Effects of *Sophorae Radix* H₂O₂-induced expression of caspase-3 and PARP in VSMCs. VSMCs were pretreated with 100 μ g/ml *Sophorae Radix* for 1 hr and then treated with 150 μ M H₂O₂ for 24hr. Cells were harvested at the indicated time and were lysed in EB buffer. The extracts were subjected to Western blotting with antibodies to caspase-3 (proform) and PARP. Data shown are representative of four independent experiments.

4. 苦蔘이 mitochondria의 막전위에 미치는 영향과 Bcl-XL 및 Bak 단백질의 발현에 미치는 영향

최근 세포고사 신호전달 기전에 있어서 mitochondria의 중요성이 커지고 있다. Mitochondria는 세포 자극에 의한 세포죽음의 신호를 감지하고 이를 증폭 및 하방으로 세포고사 신호전달을 전달한다. Mitochondria의 세포고사 신호 전달에 있어 mitochondria의 막전위가 중요하며, 막전위가 상실되었을 때 세포고사를 유도한다^{13,14}. JC-1염색은 mitochondria의 막전위에 의해 mitochondria로 들어가서 다복합체를 형성하면 주황색을 띠고, 세포질에 남아 있을 때는 녹색을 띤다. 본 실험에서 아무것도 처리하지 않은 대조군에서는 주황색의 mitochondria가 150µM의 H₂O₂에 의하여 녹색으로 변함을 관찰할 수 있었고, 또한 苦蔘에 의한 H₂O₂의 mitochondria 막전위 교란의 방어효과를 알 수 있었다 (Fig. 6).

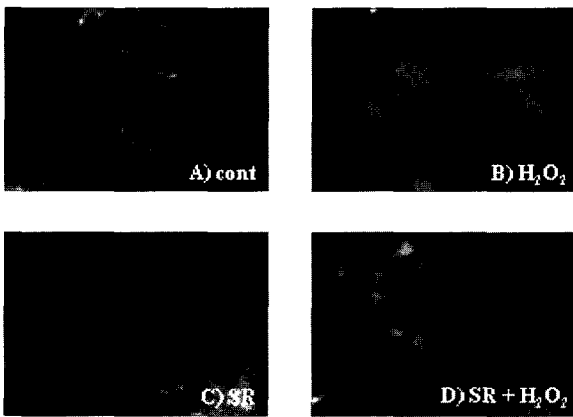


Fig. 6. *Sophorae Radix* inhibits H₂O₂-induced depolarization of mitochondrial membrane in VSMCs. VSMCs were pretreated with 100 µg/ml *Sophorae Radix* for 1 hr and then treated with 150 µM H₂O₂ for 24 hr. VSMCs stained with the mitochondria-selective JC-1 dye. Cells observed by fluorescence microscopy.

세포고사를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암 유발 유전자 산물의 하나인 Bcl-2 단백질은 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포 증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절하는 기능이 있다^{59,61}. 본 실험에서는 H₂O₂에 의해 유도된 대동맥 평활근 세포의 세포죽음에 대해 방어작용을 하는 苦蔘을 처리했을 경우의 Bcl-XL 및 Bak 단백질의 발현 양상 변화를 조사하였다. 이를 위해 배양된 대동맥 평활근 세포에 苦蔘을 1시간 전처리한 후 150 µM H₂O₂를 처리한 세포를 포집하여 세포파쇄액(cell lysate)을 얻었다. 이후 전기 영동 및 nitrocellulose membrane 상으로의 흡착 등을 거친 후 Bcl-XL 및 Bak 단백질에 대한 항체를 사용하여 western blotting을 시행하였다. 먼저 H₂O₂ 단독으로 24시간 동안 처리하여 Bak 단백질의 발현 증가되었고, Bcl-XL 단백질의 약간의 발현감소가 관찰되었다. 동시에 苦蔘을 1시간 전처리하여 24시간 이후 포집한 처리군에서는 H₂O₂에 의해 증가되었던 Bak 단백질의 발현이 감소되었고 Bcl-XL 단백질은 대조군에 비슷한 수준으로 회복되었다 (Fig 7).

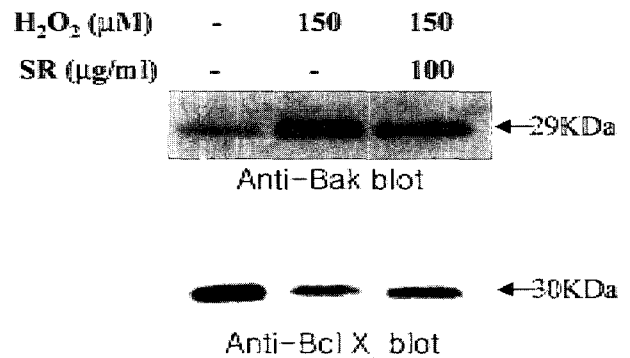


Fig. 7. Effects of *Sophorae Radix* H₂O₂-induced expression of Bak and Bcl-2 in VSMCs. VSMCs were pretreated with 100 µg/ml *Sophorae Radix* for 1 hr and then treated with 150 µM H₂O₂ for 24hr. Cells were harvested at the indicated time and were lysed in EB buffer. The extracts were subjected to Western blotting with antibodies to Bak and Bcl-XL. Data shown are representative of four independent experiments.

5. 苦蔘이 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근 세포의 세포고사에서 전체 단백질의 발현에 미치는 영향

대동맥 평활근 세포에서 苦蔘에 의한 단백질 발현 변화를 2-dimensional 전기영동을 통한 silver 염색으로 단백질 발현을 관찰하였다(Fig. 8A, 8B, 8C). 대동맥 평활근 세포에 H₂O₂를 24시간 처리한 군(B), 苦蔘을 1시간 전처리한 후 H₂O₂를 24시간 처리한 군(C) 과 아무것도 처리하지 않은 대조군(A)의 세포군의 세포를 파쇄하고 파쇄액(단백질 200 µg/ml)을 등전위 전기영동과, SDS-PAGE를 통한 2-dimensional 전기영동을 시행하고, 단백질은 silver 염색으로 가시화 하여 전체적인 단백질 발현을 관찰하였으며, PDQuest analysis software(BIO-RAD, CA, USA)를 통하여 분석하였다. 그 결과 총 300여개의 spot이 나타났다. 苦蔘 + H₂O₂ 처리군에서 새로이 생긴 5개의 spots (Fig. 9-B), 대조군(control)과 비교하여 H₂O₂ 처리시 감소한 3개의 spots이 苦蔘을 전처리 함으로써 다시 증가한 spots (Fig. 9-A), 대조군과 비교하였을 때 H₂O₂ 처리군에서 감소한 spots이 다시 苦蔘을 전처리 하였을 때 복구되지는 않았다(Fig. 9-C, D, E).

고 찰

苦蔘은 고대 한의학 서적인 <神農本草經>에 “主心腹結氣 癥瘕 積聚 黃疸 溺有餘瀝 逐水 除癰腫 補中 明目止淚”라고 최초로 기재되었으며, 현대 本草學 기원상 豆科에 속하는 다년생 草本인 도독놈의 지광이(*Sophora flavescens* Ait)의 근을 말한다. 그 性味는 苦 寒 無毒하며 歸經은 心, 肝, 胃, 大腸, 膀胱經에 작용하고, 淸熱燥濕 利尿 健胃 祛風殺蟲 解毒 등의 효능으로 濕熱 下痢 黃疸 赤白帶下 陰部瘙癢 疥瘡頑癬 小便不利 등의 병증에 사용되어 왔다. 苦蔘의 성분은 matrine, oxymatrine, sophoranol, hydroxymatrine, anagryne, methylcytisine, baptifoline 및 sophocarpin 등의 alkaloid와 xanthohumol, isoxanthohumol 등의 flavonoid가 함유되어 있고¹⁵⁻¹⁷, 약리작용으로는 강심, 건위, 자궁수축, 항괴양, 살충, 이뇨, 항부정맥 등의 작용이 있으며, 특히 순환기계 질환인 부정맥 및 빈맥을 억제하고, 감심작용 및 관

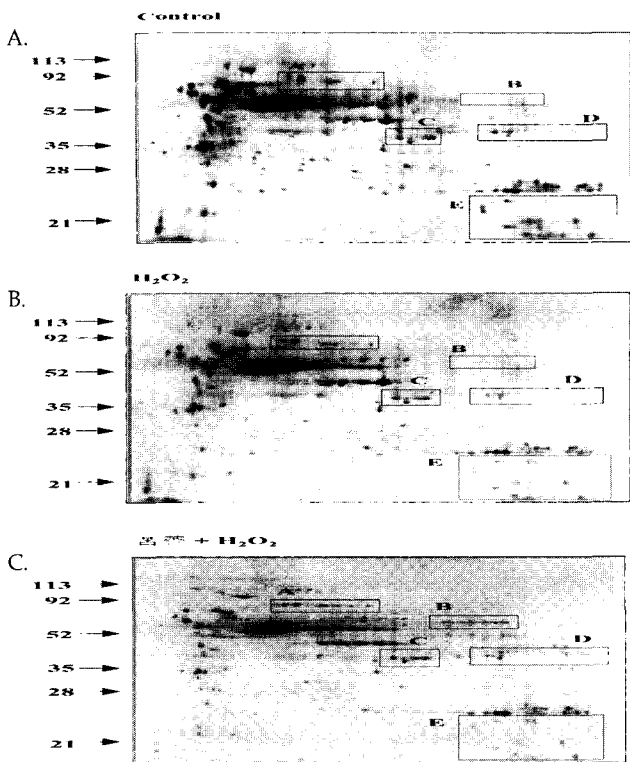


Fig. 8. 2-DE pattern of total protein from non-apoptotic VSMC cells.
 A) The proteins from lysate(200µg) were separated on IPG strip (pH 3-10, NL, 17cm) followed by 12% SDS-PAGE. After silver staining, gels were scanned by using the Molecular Imager FX multimager system. Gated regions were analyzed and presented as Gate A-E. B) The proteins from lysate(200µg) in 150µM H₂O₂-treated VSMC cells were separated on IPG strip (pH 3-10, NL, 17cm) followed by 12% SDS-PAGE. After silver staining, gels were scanned by using the Molecular Imager FX multimager system. Gated regions were analyzed and presented as Gate A-E. C) 2-DE pattern of total protein from *Sophorae Radix* H₂O₂-induced expression VSMC cells. The proteins from lysate(200µg) in pretreated 100µg/ml *Sophorae Radix* for 1hr and then treated 150µM H₂O₂ were separated on IPG strip (pH 3-10, NL, 17cm) followed by 12% SDS-PAGE. After silver staining, gels were scanned by using the Molecular Imager FX multimager system. Gated regions were analyzed and presented as Gate A-E.

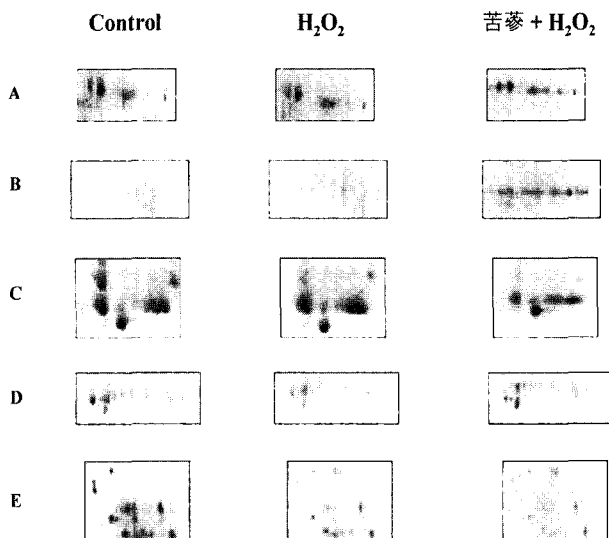


Fig 9. The comparison of the 2-DE pattern of non-apoptotic VSMC cells(control), apoptotic VSMC cells(H₂O₂ treated) and VSMC cells(*Sophorae Radix* H₂O₂ treated).

상동맥 확장을 통하여 관상동맥 혈류를 증가시키는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 동맥경화증은 순환기계 질환 발생에 중요한 원인으로 알려진 대표적인 질환으로 동맥이 굳어지고 내공이 좁아져서 혈액의 흐름이 원활하지 않게 된 상태를 말한다¹⁾.

동맥경화증은 형태학적으로 죽상동맥경화증, Mönckberg 경화증, 세동맥 경화증의 세 종류로 분류된다^{1,18)}. 특히 죽상동맥경화증이 임상적으로 중요한데 그 이유는 합병증이 관상동맥이나 뇌혈관에 다발하며, 혈관을 서서히 폐색시켜 허혈성 심장질환 및 허혈성 뇌혈관질환 등의 위험한 결과를 초래하기 때문이다^{1,18)}. 이에 따라 많은 연구를 통하여 죽상동맥경화증의 형성 과정에 관한 새로운 사실들이 밝혀지고 있으며, 이와 관련된 새로운 약제 및 치료법을 개발하기 위한 노력이 진행 중에 있다. 한의학에서 동맥경화라는 병명은 없으나 頭痛 眩暈 中風 肝陽上亢 胸痺 등의 병증이 동맥경화의 범주에 속한다고 여겨지며, 臟腑의 氣血이 고르지 못하여 잘 순환하지 못하거나 痰瘀이 血脈을 막아서 생기는 것, 생리적 기능을 상실한 혈액이 응취하여 형성한 일종의 병리적인 산물인 瘀血 등을 대표적인 원인으로 보고 있다. 그러나 그 병인병리는 비교적 복잡하여 痰, 瘀血, 氣滯, 肝火 등도 포함한다고 볼 수 있다¹⁾. 죽상경화반 생성의 최초단계는 혈관내피세포의 기능부전에 의해 시작되며, 기능부전을 일으키는 혈관내피세포의 손상 원인으로는 흡연, 고혈압, 산화된 저밀도 지단백, 당뇨병, 유전적 요인, 혈장 homocysteine 상승, 미생물에 의한 감염 등이 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾. 혈관내피세포 손상 후에 대동맥 평활근세포의 고사가 대식세포에서 분비되는 활성산소종 외 다양한 자극에 의해 유도되고(Table 1)^{9,19-21)}, 동맥 내벽에 지질과 혈소판이 침착되어 국소적 비후, 섬유화, 괴사가 일어나는 병리적 과정으로 죽종을 형성, 혈관내 흐름을 방해하게 되며, 이로 인하여 혈관내 혈전이 발생한다(Fig. 10)²²⁻²⁴⁾.

Table 1. Factors that induce apoptosis in vascular smooth muscle cells.

Growth factor withdrawal	Bennet et al. 1995
Growth factors	Bone et al. 1997
Nerve Growth Factor	Hishikawa et al. 1999
Connective Tissue Growth Factor	
Oxidative stress/ROS vs. antioxidants	Li et al. 1997 ; Jung et al. 2000
Neurohormonal agonists(controversial)	Yanada et al. 1998;
Angiotensin II / AT2 receptors	Tee et al. 2000
Endothelin-1	A11R : Antibiotic(Pollman et al. 1996)
	Cattaruzza et al. 2000
	Antiapoptotic(Shichiri et al. 2000)
Cytokines	Geng et al. 1996
TNFα/IL -1 IFN -γ	Geng et al. 1997 ; Schaub et al. 2000
Fas	

이러한 혈전이 동맥경화증에 의한 순환기계 질환의 직접적인 원인으로 작용하며 대동맥 평활근의 세포고사 기전이 죽상동맥경화증 발생에 중요한 역할을 담당한다는 것이 최근에 보고되고 있다²⁴⁾. 이에 저자는 苦蔘을 이용하여 대동맥 평활근세포의 고사에 미치는 영향을 알아보려 본 실험을 시행하였다. 활성산소종은 H₂O₂ 및 O₂, O₂⁻, OH⁻ 등이며, ballon angioplasty 후에 고혈압, 동맥경화증과 같은 질병의 병변 발생과정에서 중요하다. 그 중 특히 H₂O₂는 대동맥 평활근세포의 고사를 유도하는 것으로







Stage	Histopathological event	Scheme	Apoptosis
1.	Injury Of the endothelium		Endothelial activation by neohumoral stimuli, cytokines, and ROS induces endothelial cell apoptosis and cause endothelial dysfunction
2.	Proliferation Formation of the neointima		Enhanced susceptibility of proliferating smooth muscle cells to undergo apoptosis
3.	Plaque Development Inflammatory cells Lipid enrichment		Proinflammatory cell-cell signaling by apoptotic VSMC via MCP-1 lead to macrophage immigration
4.	Plaque Destabilization Foam cells		Apoptosis of VSMC contributes to thinning of the fibrous cap, destruction of the extracellular matrix, and increased plaque vulnerability
5.	Plaque Rupture/ Erosion		Endothelial cell apoptosis leads to plaque erosion, endothelial and smooth muscle cell apoptosis might be involved in triggering plaque rupture
6.	Lumen Thrombosis		Procoagulant activity of apoptotic vascular cells and shed membrane particles enhances thrombus formation

Fig. 10. Histopathological events and apoptosis in the vascular wall during atherosclerotic lesion development and plaque rupture.

보고되었다. 본 실험에서도 대동맥 평활근세포에 H₂O₂를 농도별로 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 세포 사멸이 증가하고 이러한 세포 사멸이 세포고사에 의한 것을 확인하였다. 혈관 평활근 세포에 H₂O₂를 처리한 후 세포고사의 전형적인 현상 중 하나인 DNA 분절과 sub G0/G1 분획의 증가가 관찰되어 세포고사가 일어나고 있음을 확인할 수 있었고, 이러한 세포고사는 썬살을 전처리함으로써 현저히 억제되었다. Caspase family cysteine protease는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화된다. Caspase-3 protease는 caspase cascade의 하방(downstream)에 위치하여 상방(upstream)에 위치한 caspase-8 및 -9의 활성신호가 합류하는 효소로서 32 kDa procaspase-3 protease가 활성화형인 20 kDa 및 11 kDa으로 분해되어 DNA 회복과 stress 관련 발현 유전자의 활성 및 기능 유지에 중요한 PARP를 분해하여 세포고사에 작용한다²⁵⁻²⁷. 대동맥 평활근세포에서 caspase-3 protease의 활성이 H₂O₂에 의해 5 배 이상 활성화되는 것을 확인 하였으며, 썬살을 1시간 전처리한 군에서는 H₂O₂에 의한 caspase-3 활성이 나타나지 않은 것을 확인하였다. 또한 H₂O₂에 의해 활성화된 caspase-3에 의하여 procaspase-3의 감소와 PARP의 분절도 확인하였다. 그러나 썬살을 1시간 전처리한 군에서는 procaspase-3와 PARP가 대조군과 비슷하게 회복됨을 알 수 있었다.

세포고사 신호전달 기전에 있어서 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 mitochondria의 막전위를 JC-1 염색한 후 관찰하였다. H₂O₂에 의해 대동맥 평활근 세포의 mitochondria가 손상을 입은 것을 형광현미경으로 관찰한 결과, 썬살을 전처리한 군에서는 mitochondria의 막전위가 대조군과 유사하게 회복됨을 관찰하였다. Bcl-2 단백질은 lymph종(human follicular lymphoma)과 밀접하게 관련된 유전자로서 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포고사의 억제기능에 관여하고 있다. Bcl-2에 의한 세포사멸 방지 기전에는 산화환원(redox cycle) 상태조

절, 세포 내 ion의 분포조절, caspase protease 활성, mitochondria 막전위, DNA 분절화, stress 연관 MAP kinase 등이 관련되어 있다¹⁰. 본 연구에서는 대동맥 평활근 세포의 Bak 단백질의 발현이 증가와 Bcl-XL 단백질의 발현이 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이는 H₂O₂에 의한 혈관 평활근 세포의 세포고사가 mitochondria 기능과 연관되어 있음을 알 수 있었으며, 이는 썬살이 H₂O₂에 의해 증가된 Bak 단백질과 감소된 Bcl-XL 단백질이 발현을 억제하여 mitochondria의 막전위를 조절함으로써 세포고사를 억제하는 것을 확인하였다.

1980년대 20년 동안 유전자 조작기술의 발달과 더불어 DNA 및 RNA를 포함한 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되어 high-throughput 유전자 분석기술이 크게 발달되었다. 이를 이용한 인간 게놈 프로젝트가 진행되어 전체 인간 유전자의 염기 서열이 모두 밝혀졌으나 그 유전자에서 발현되는 단백질의 기능에 대한 연구는 현재 진행중이다³¹⁻³³. 본 연구에서는 VSMC 세포의 H₂O₂에 의한 세포고사에서 전반적인 단백질의 발현 변화와 썬살을 전처리한 후 H₂O₂의 전반적인 단백질 발현변화를 2-dimensional gel electrophoresis를 이용하여 분석하였다. 그 결과 총 300여개의 spot이 나타났다. 썬살 + H₂O₂ 처리군에서 새로이 생긴 5개의 spots, 대조군(control)과 비교하여 H₂O₂ 처리시 감소한 3개의 spots이 썬살을 전처리함으로써 다시 증가한 spots, 대조군과 비교하였을 때 H₂O₂ 처리군에서 감소한 spots이 다시 썬살을 전처리 하였을 때 복구되는 않았다. 발현의 변화를 나타낸 각각의 spot는 MALDI-TOF와 아미노산 서열 분석 등을 통한 분석과정이 필요할 것으로 사료된다. 썬살은 H₂O₂에 의해 발생된 대동맥 평활근 세포의 세포고사를 억제하였다. 썬살은 Bcl-XL과 Bak 단백질의 발현을 조절하고, caspase-3의 활성을 억제함으로써 H₂O₂에 의해 유도된 대동맥 평활근 세포의 세포고사를 저해하였다. 따라서 썬살이 동맥경화증을 비롯한 각종 循環器系 疾患의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 썬살은 H₂O₂에 의해 발생된 대동맥 평활근세포의 고사에 대하여 Bcl-XL과 Bak 단백질 발현과 caspase-3의 활성을 억제함으로써 H₂O₂에 의해 유도된 대동맥 평활근 세포의 세포고사를 저해하였다. 따라서 썬살이 동맥경화증을 비롯한 각종 심혈관계 질환의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 사료되며 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

썬살이 대동맥 평활근세포의 고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay 그리고 광학현미경적 관찰, 유식세포 분석 등의 방법으로 실험하였다. 또한 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포의 고사에서 이를 억제하는 썬살의 기전을 caspase-3, PARP, Bcl-XL과 Bak 단백질 발현과 caspase family cysteine protease-3의 활성과 전체적인 단백질 발현양상을 통하여 조사한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다. H₂O₂는 대동맥 평활근세포의 우태아 혈청을 포함하지 않는 DMEM 배지에서 세포생존율을 현저히 감

소시켰다. 苦蔘은 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포의 죽음을 억제시켰다. 苦蔘은 대동맥 평활근세포에서 H₂O₂에 의한 핵의 응축, DNA 분절을 감소시켰다. 苦蔘은 대동맥 평활근세포에서 H₂O₂에 의한 sub-G1 DNA를 대조군 수준으로 회복시켰다. 苦蔘은 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포의 고사에서 caspase-3 like protease의 활성화와 PARP 분절을 억제시켜 세포고사를 방지하였다. 苦蔘은 H₂O₂에 의한 대동맥 평활근세포의 고사에서 mitochondria의 막전위를 정상수준으로 회복시킴으로써 세포고사를 억제시켰다. 苦蔘은 대동맥 평활근 세포의 고사에서 H₂O₂에 의해 증가된 Bax 단백질과 감소된 Bcl-XL 발현을 저해하였다. H₂O₂에 의한 대동맥 평활근 세포의 고사에서 苦蔘에 의한 전반적인 단백질 변화를 확인하였다. 이상의 결과로 보아 苦蔘은 H₂O₂에 의해 유도된 대동맥 평활근세포의 고사에 대하여 Bcl-XL과 Bax 단백질의 발현 및 caspase-3의 활성화와 PARP의 분절을 조절함으로써 대동맥 평활근세포의 고사를 억제시키는 효과가 있으므로 동맥경화증을 비롯한 순환기계 질환에 대한 예방 및 치료에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 心系內科學教室 : 東醫心系內科學(上), pp. 437-444, 書苑堂, 서울, 1995.
2. Goldman L., & Cook E. F: The decline of ischemic heart disease mortality rates: Analysis of the comparative efforts of medical intervention and changes in life style. *Annals of Internal Medicine*, pp.101, 825, 1984.
3. Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature*, 362:801-9, 1993.
4. 李承武 外 : 急性附子草烏中毒에서 甘豆湯과 苦蔘의 應用. *大韓韓醫學會誌*, 14(2): 399-405, 1993.
5. 宋澈旻 : 苦蔘煎湯液에 의한 循環器 Anaphylaxis의 抑制 效果, 원광대학교 대학원, 1997.
6. 金賢奎 外 : 苦蔘煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響, *大韓韓醫學會誌*, 20(1): 142-150, 1999.
7. 徐在鈴 外 : 苦蔘 煎湯液 分割物이 培養 心筋細胞에 미치는 影響, *동의생리학회지*, 15(1): 149-155, 2000.
8. Mossmann, T. : *J. Immunol, Methods*, 65: 55, 1983..
9. Bennet M.R., Evan G.I., Schwartz S.M. : Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques, *J. Clin. Invest.*, 95: 2266-2274, 1995.
10. Baumgartner-Parzr S.M., Wagner L., Pettermann M., Grillari J., Gessl A., Waldhausl W. : High glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells, *Diabetes*, 44: 1323-1327, 1995.
11. Dimmeler S., Haendeler J., Galle J., Zeiher A.M. : Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP-32 like protease : A mechanistic clue to the response to injury hypothesis, *Circulation*, 95: 1760-1763, 1992.
12. Buchman T.G., Abello P.A., Smith E.H., Bulkley G.B. : Induction of heat shock response leads to apoptosis in endothelial cells previously exposed to endotoxin, *Am. J. Physiol.*, 265: 165-170, 1993.
13. Guido K., John C.R. : Mitochondrial control of cell death, *Nature*, 6(5): 513-519, 2000.
14. Finbarr E.C. : Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy, 111: 52-60, 2000.
15. 문관심 : 약초의 성분과 이용, pp.342-344, 일월서각, 서울, 1991.
16. Huang, K.C. : *The pharmacology of Chinese herbs*, Florida, CRC press, pp. 63-67, 1993.
17. W. Tang 외 : *Chinese Drugs of plant Origin*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 931-943, 1992.
18. 이문호 : *내과학(下)*, pp.1450-1471, 학림사, 서울, 1986.
19. Bono F., Lamarche I., Herbert J.M. : NGF exhibits a pro-apoptotic activity for human vascular smooth muscle cells that is inhibited by TGF-beta I, *FEBS Lett*, 416: 243-246, 1997.
20. Li P.F., Dietz R., Von Harsdorf R. : Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell, *FEBS Lett*, 404: 249-252, 1997.
21. Geng Y.J., Henderson L.E., Levesque E.B., Muszynski M., Libby P. : Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17: 2200-2208, 1997.
22. Ross R. : Atherosclerosis-an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.*, 340: 115-126, 1999.
23. Dimmeler S., Haendeler J., Rippmann V., Nehls M., Zeiher A.M. : Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells, *FEBS Lett*, 399: 71-74, 1996.
24. Lothar R., Stefanie D., Andreas M. : Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis, *Basic Res. Cardiol.*, 96: 11-22, 2001.
25. Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M. : Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, *Nature*, 376: 37-43, 1995.
26. Alemri E.S. : Mammalian cell death proteases : a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases, *J. Cell. Biochem.*, 64: 33-42, 1997.
27. Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. and Dixit V.M. : An induced proximity model for caspase-8 activation, *J. Biol. Chem.*, 273: 2926-2930, 1998.
28. Shigeomi S., Masashi N., Yoshihide T. : Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c

- by the mitochondrial channel VDAC, *Nature*, 399: 483-487, 1999.
29. Adams J.M., Cory S. : The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 281: 1322-1326, 1998.
 30. Reed J.C. : Bcl-2 and the regulation of programmed cell death, *J. Cell. Biol.* 124:1-6, 1994.
 31. Pandey A, Mann M. : Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, 405(6788):837-46, 2000.
 32. Wilkins, M. R. et al : From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis, *BioTechnology*, 14, 61-65, 1996.
 33. Anderson, N. G. & Anderson, N. L : Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future, *Electrophoresis*, 17, 443-453, 1996.