

## Suppression of PMA-induced Differentiation via Foam Cell Formation in THP-1 Cells by 7-Ketocholesterol

Mi Sun Lee<sup>1</sup>, Si Eun Park<sup>1</sup>, Koanhoi Kim<sup>2</sup> and Young Chul Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology & Immunology, Pusan National University College of Medicine, Yangsan, Gyeongnam 50612, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Pusan National University College of Medicine, Yangsan, Gyeongnam 50612, Korea

Received December 6, 2021 / Revised December 22, 2021 / Accepted December 22, 2021

Oxysterols are known to be involved in the physiopathology of atherosclerosis. Since 7-ketocholesterol (7-KC) is found in large amounts in oxysterols and in atherosclerotic plaque, the study on how 7-KC may affect monocyte differentiation induced by phorbol myristate acetate (PMA) in the monocytic cell line, THP-1, is essential. 7-KC induced a dose-dependent reduction in cell proliferation without inducing cytotoxicity, and the substantial staining of Nile red demonstrates the increased absorption of intracellular lipids. Although 7-KC itself did not increase cell adhesion, it markedly decreased the adhesion of cells treated with PMA. Furthermore, by observing the effect of 7-KC on phagocytosis using fluorescent-labeled latex beads, 7-KC's ability to abolish phagocytosis in PMA-stimulated macrophages was illustrated. The effect of 7-KC on the expression of selected protein markers on the process of differentiation induced by PMA in THP-1 cells was also examined. 7-KC inhibited expression of ICAM-1, CD11a, SR-A1, and SR-B2 (CD36) in PMA-stimulated THP-1 cells. Conversely, 7-KC drastically increased the expression of SR-D1 (CD68) in PMA-stimulated THP-1 cells. In conclusion, these results suggest that 7-KC modulates monocyte differentiation and activation via the intracellular accumulation of lipid droplets.

**Key words** : Differentiation, 7-KC, oxysterols, phagocytosis, THP-1 cells

### 서 론

죽상경화증(atherosclerosis)은 만성적인 염증성 질환으로써 고지혈증(hyperlipidemia), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 흡연(smoking), 비만(obesity) 등이 관여하며, 동맥벽에 lipids의 축적과 대식세포(macrophage)로부터 형성되는 거품세포(foam cell)의 침착으로 인한 plaque의 형성으로 특징지어진다[11, 15]. 단핵구(monocyte)는 죽상경화증의 발달과 진행에 핵심적으로 관여한다는 사실이 잘 알려져 있다. 단핵구는 다양한 조절 물질에 의해 혈관 내막에서 대식세포로 빠르게 분화하며 다양한 cytokines, 혈관내피세포(endothelial cell) 부착에 관여하는 인자 및 청소수용체(scavenger receptors)를 발현하게 된다[20]. 이들 청소수용체는 low-density lipoprotein (LDL)의 변형된 형태인 acetylated LDL과 oxidized LDL을 인식하여 세포내로 가지고 온다. 대식세포로부터 lipids가 가득한 거품세포의 형성과 발달은 청소수용체에 의한 cholesterol을 포함한 lipids의 과도한 축적에 있다고 여겨진다[3, 18].

Oxysterols은 산화된 cholesterol의 형태로 죽상경화 plaque에서 많이 관찰되며, 27-oxygenated cholesterol, 7-ketocholesterol (7-KC), 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol 등이 있다[7, 9]. Oxysterols은 그 자체 혹은 oxidized LDL의 구성성분으로써 죽상경화증의 발달에 크게 관여한다고 알려져 있다[5]. 또한, oxysterols은 단핵구와 대식세포 뿐만 아니라 혈관내피세포에 작용하여 염증성 cytokines의 분비와 세포부착인자의 발현 및 apoptosis 유도 등에도 관여한다고 보고되고 있다[1, 4]. 7-KC는 oxidized LDL에 가장 풍부한 형태의 oxysterol으로써 죽상경화 plaque에서 관찰되며, 단핵구 분화와 거품세포 형성에 관여한다는 보고가 있다[9]. 또한, 7-KC와 7 $\beta$ -hydroxycholesterol를 포함한 oxidized LDL이 *in vivo* 조건에서 단핵구의 대식세포로의 분화에도 실제로 관여한다고 알려져 있다[6].

대식세포의 거품세포로의 발달에서 oxysterols의 관련성은 잘 알려져 있지만, 혈액에 존재하는 대식세포의 분화 전 단계인 단핵구에서 oxysterols의 영향은 완전히 규명되어 있지 않다. 본 연구에서는 7-KC가 단핵구 세포내 lipids의 축적을 유도하고, 이로 인한 단핵구의 분화 및 활성화에 어떤 영향을 주는지 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약

7-ketocholesterol (7-KC), phorbol 12-myristate 13-acetate

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8093, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ycpark@pusan.ac.kr

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>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(PMA), Nile red, protease inhibitor cocktail은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Pierce (Rockford, IL, USA) 제품을, 30% acrylamide/bis solution은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 제품을 사용하였다. ICAM-1, SR-A1, CD36, CD68,  $\beta$ -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을, horse radish peroxidase (HRP)가 부착되어 있는 이차 항체와 enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

### 세포배양 및 분화의 유도

인간 단핵구세포주 THP-1는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% heat-inactivated FBS (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 포함하는 RPMI-1640 medium (HyClone, Waltham, MA, USA)에서 5% CO<sub>2</sub> 조건의 37°C incubator에서 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

THP-1 세포를 12-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 분주하여 다양한 농도의 7-KC를 처리하여 48시간 배양하였다. 세포를 plate 용 원심분리기에서 800 rpm으로 바닥에 부착시킨 후, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 100  $\mu$ l을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응액을 제거하고 DMSO를 넣어 MTT formazan을 용해시킨 후 VERSA<sub>max</sub> ELISA reader (Molecular Devices, Toronto, Canada)를 이용하여 570 nm에서 값을 측정하였다.

### Nile red 염색

세포를 cover glass-bottom dishes에 분주하여 수행하였고, 7-KC를 실험에 요구되는 시간으로 처리한 후 100  $\mu$ g/ml 농도로 DMSO에 녹아있는 Nile red 용액을 세포배양액에 최종 농도가 0.1  $\mu$ g/ml로 첨가하고 15분 동안 배양한다. 그 후 PBS로 세포를 여러 번 세척하고, 2% paraformaldehyde로 15분 동안 상온에서 세포를 고정시켰다. 염색된 세포의 image는 LSM 510 laser-scanning confocal microscope (Zeiss, Göttingen, Germany)로 관찰하였다.

### 세포 부착능 측정

THP-1 세포를 12-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 분주하여 25  $\mu$ M 7-KC를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 PMA로 분화를 유도하였다. 24시간 후, 부유 세포 및 0.01% trypsin-EDTA를 이용하여 바닥에 부착한 세포를 각각 수확하여 trypan blue dye exclusion 방법으로 염색하여 EVE<sup>TM</sup> automatic cell counter (NanoEntek, Seoul, Korea)를 이용하여 살

아있는 세포와 죽은 세포의 수를 측정하였다. 세포의 부착율은 살아있는 세포의 전체 [N(t)]와 부착한 세포의 평균 [N(a)]을 이용하여  $[N(a)/N(t)] \times 100$ 으로 계산하여 세포수를 표현하였다.

### Phagocytosis 분석

세포를 24-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하여 사용하였다. THP-1 세포의 포식기능을 측정하기 위해서, 평균 직경이 0.5  $\mu$ m인 carboxylate-modified fluorescent-labeled latex beads (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 제조사가 공급한 protocols에 따라 실시하였다. 배양중인 각 well에 latex beads를 5  $\mu$ l 첨가하고 4시간 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시키고 PBS로 세포를 세척한 다음 543 nm excitation, 610 nm emission 조건에서 FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

### Western blot analysis

THP-1 세포를 60-mm dish에  $2 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 분주하여 사용하였고, 수확한 세포는 RIPA buffer (150 mM sodium chloride, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA)로 전체 단백질을 분리하였다. BCA protein assay kit를 이용하여 정량한 후, 동일한 양의 단백질(20  $\mu$ g)을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 electroblotting apparatus (Bio-rad, Richmond, CA)를 이용하여 300 mA에서 90분 동안 PVDF membrane으로 이동시켰다. Membrane은 TBS-T (TBS plus 0.1% Tween 20)에 5% skim milk로 1시간 동안 담궈 두었고, 그 후 적당한 일차 항체 및 HRP가 부착되어 있는 이차 항체를 반응시켰다. 면역복합체는 ECL kit를 이용하여 반응시킨 후 LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan) 기기에서 단백질 발현을 분석하였다.

### Statistics or reproducibility

모든 실험은 적어도 세번 이상 반복하여 결과를 means  $\pm$  standard deviations (SD)로 표현하였다. One-way analysis는 GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였고, 대조군과 실험군의 *p*-value <0.05를 구하여 통계적 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 단핵구세포주 THP-1의 viability와 Nile red 염색에서 7-KC의 효과

Oxysterols은 농도에 따라 다양한 세포에서 독성을 가지기 때문에, 본 연구에 앞서 7-KC가 THP-1 세포의 viability와 성장에 미치는 효과를 조사하고 적절한 농도를 선정하였다. 배

양중인 THP-1 세포에 다양한 농도(1, 5, 25, 50  $\mu\text{M}$ )의 7-KC를 처리하여 48시간 동안 배양한 후 trypan blue dye exclusion assay로 분석하였다. 50  $\mu\text{M}$  이상의 7-KC를 처리한 세포는 분명한 viability의 감소를 나타내기 때문에, 실험에서는 세포의 viability에는 영향을 주지 않는 25  $\mu\text{M}$  이하의 농도를 사용하

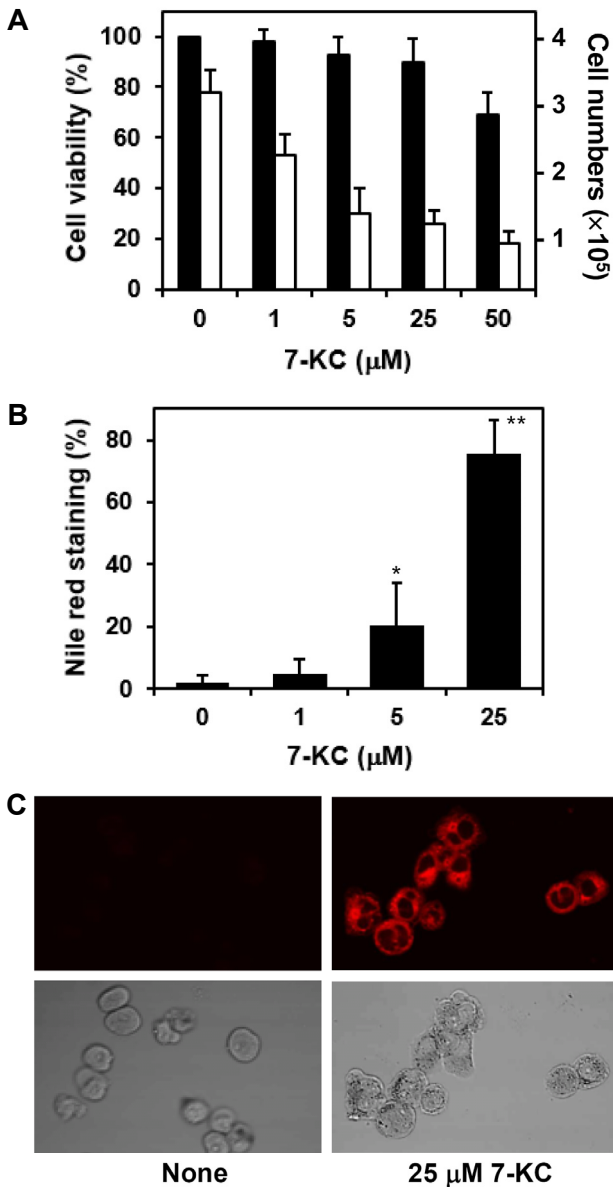


Fig. 1. Effects of 7-KC on viability, proliferation and Nile red staining. THP-1 cells were treated with various concentrations of 7-KC (0, 1, 5 and 25  $\mu\text{M}$ ) for 48 hr. (A) Cell viability (■, viable cells/total cells) and cell numbers (□, viable cells) were assessed by trypan blue dye exclusion assay. (B) Intracellular accumulation of lipid droplets was analyzed by Nile red staining. Data were shown as the means of  $\pm$  SDs of three independent experiments (\* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 vs. the untreated control). (C) Fluorescence images (x200).

였다. 7-KC를 48시간 동안 처리한 THP-1 세포는 세포증식에는 농도의존적으로 감소를 보이나(Fig. 1A), 세포내 lipids에 반응하는 Nile red 염색은 현저히 증가함을 보였다(Fig. 1B, Fig. 1C). 이는 7-KC가 THP-1 세포에서 세포내 lipids의 이동과 축적을 유도한다는 것을 의미한다.

### THP-1 세포의 부착능에서 7-KC의 효과

단핵구의 대식세포로의 분화 과정에서 세포의 부착에 관여하는 인자의 발현과 함께 부착능의 증가는 중요한 지표로 가장 먼저 나타나는 현상이다. 100 nM PMA를 48시간 동안 처리한 세포는 뚜렷한 부착능을 나타내나, 7-KC를 처리한 세포는 세포내 lipids의 축적은 있지만 부착능의 증가는 보이지 않았다(Fig. 2).

### THP-1 세포의 Nile red 염색에서 7-KC와 PMA의 비교

Nile red는 esterified cholesterol, monoglyceride, diglyceride, triglyceride 같은 neutral lipids와 phospholipid 같은 polar lipids를 염색시킨다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, PMA를 처리한 세포는 neutral lipids와 polar lipids를 의미하는 강한 fluorescence intensity를 보였다. 이는 배양중인 단핵구가 PMA 자극에 의해 대식세포로 분화가 진행되면서 거품세포로 전환될 수 있는 초기 과정을 의미한다. 7-KC를 처리한 세포에서도 뚜렷한 Nile red 염색을 관찰할 수 있으나, PMA에 비해 세포막에 가까운 fluorescence를 보이며 대식세포의 특징인 납작하며 amoeboid 형태의 모습을 보이지는 않았다.

### 자극한 THP-1 세포의 phagocytosis에서 7-KC의 영향

성숙한 대식세포의 기능적 특징인 phagocytosis 과정에서 7-KC의 역할을 분석하였다. THP-1 세포를 25  $\mu\text{M}$  7-KC로 24시간 동안 배양한 후 100 nM PMA로 세포의 분화를 자극하였

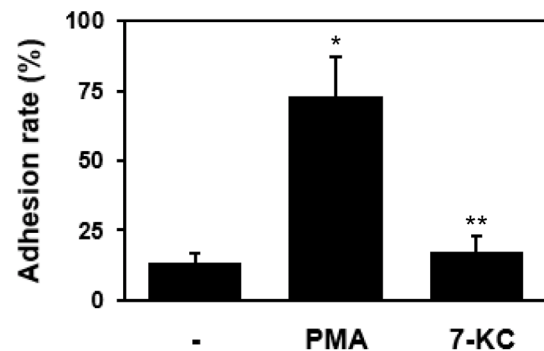


Fig. 2. Effect of 7-KC on cell adhesion in THP-1 cells. Cells were treated with 25  $\mu\text{M}$  7-KC or 100 nM PMA for 48 hr. Number of bound cells was scored by trypan blue dye exclusion assay using a hemocytometer. The results are presented as the means of  $\pm$  SDs of three independent experiments (\* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 vs. the untreated control).

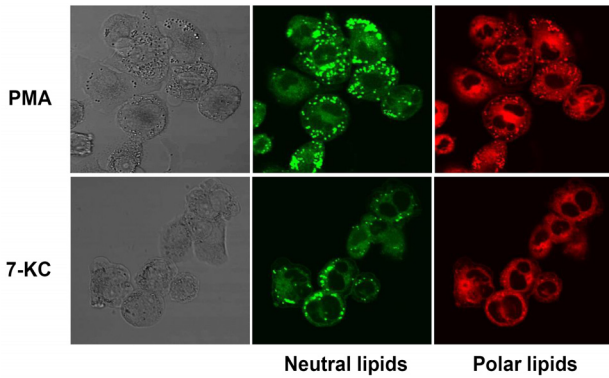


Fig. 3. Comparison of 7-KC and PMA on intracellular accumulation of lipid droplets. THP-1 cells were treated with 25  $\mu$ M 7-KC or 100 nM PMA for 48 hr. Then, the cells were stained with Nile red, and the staining efficiency was evaluated with confocal microscope. Neutral lipids (green) and polar lipids (red) were observed in the cells. Fluorescence images (x1,200).

다. 48시간 후, 분화된 대식세포에 carboxylate-modified red fluorescent latex beads를 첨가하여 4시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시키고 fluorescence intensity를 flow cytometry를 사용하여 측정하였다. PMA 자극으로 분화가 유도된 세포는 40.3%의 phagocytic activity를 보이는 반면 7-KC로 전처리한 후 PMA로 자극한 세포는 2.92%로 현저히 감소하였다(Fig. 4).

**대식세포의 scavenger receptor 발현에서 7-KC의 효과**

THP-1 세포의 분화과정에서 나타나는 막표면 단백질의 발현에서 7-KC가 미치는 영향을 조사하였다. THP-1 세포에 25  $\mu$ M 7-KC를 24시간 동안 처리한 후 100 nM PMA로 세포를 자극하였다. 24시간 후, 부유 세포와 부착한 모든 세포를 수확하여 단백질을 얻고 Western blot analysis를 이용하여 변화를 분석하였다. Fig. 5는 THP-1 세포에서 PMA의 자극은 ICAM-1, CD11a, scavenger receptor SR-A, CD36, CD68 등의 세포막 수용체 발현이 증가함을 보여준다. 반면에, 7-KC를 전처리한 세포의 경우는 ICAM-1, CD11a, SR-A, CD36의 발현이 현저히 감소함을 나타내었다. 특히하게도, 7-KC는 단독으로 CD68의 발현을 유도하였고 PMA로 자극한 경우에서도 현저한 증가양상을 보였다. 이 결과는 THP-1 세포에서 7-KC에 의한 세포내 lipids의 축적에 CD68이 관여한다는 것을 의미한다.

**고 찰**

혈액을 순환하는 단핵구는 혈관내피세포와 상호작용을 통해 다양한 신호전달물질과 chemotactic factors에 의해 대식세포로 성숙되어 phagocytosis, 염증, 조직의 복구 등의 면역반응에 관여한다. 또한, 단핵구는 죽상경화증을 유발할 수 있는 병변 부위의 시발점이 되는 세포로서 plaque의 형성을 위해

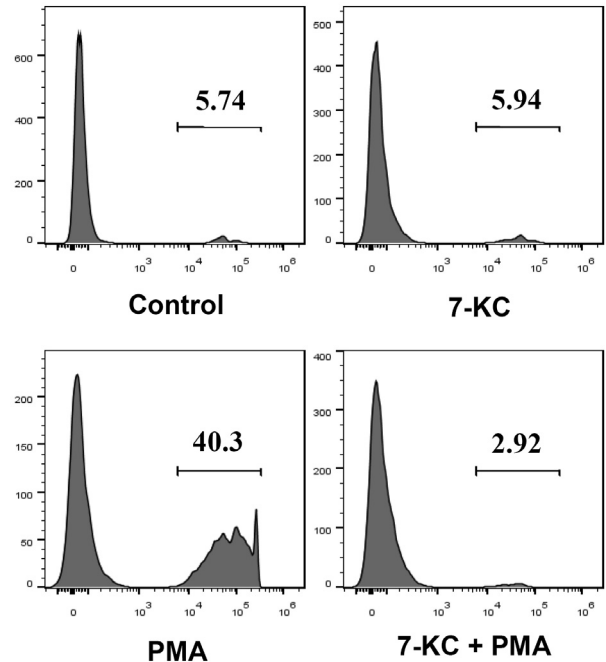


Fig. 4. Effect of 7-KC on PMA-induced phagocytosis of THP-1 cells. Cells were pretreated with 25  $\mu$ M 7-KC for 24 hr, and stimulated with 100 nM PMA for another 48 hr. Then, the cells were challenged with latex beads. The efficiency of phagocytosis was determined by flow cytometry analysis. The percentage of bead uptake in histogram was estimated by flow J software.

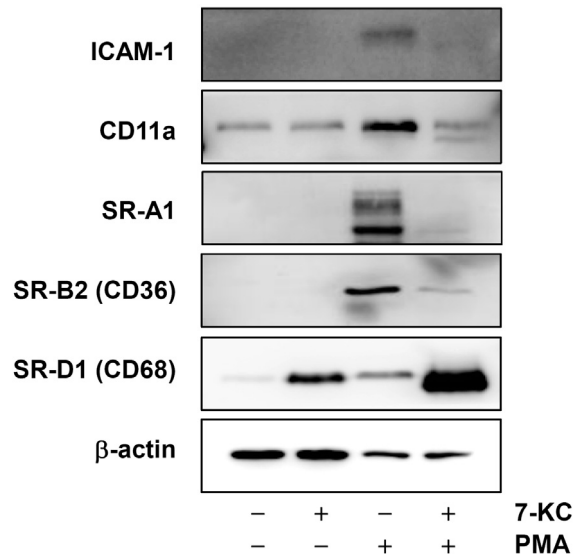


Fig. 5. Effect of 7-KC on the expression of macrophage differentiation marker. Cells were pretreated with 25  $\mu$ M 7-KC for 24 hr, and then stimulated with 100 nM PMA for another 24 hr. Whole cell lysates were analyzed by Western blot analysis using specific antibodies, as indicated. b-actin was used as an internal control to monitor equal protein loading.

축적되게 된다[12, 15]. 이들 단핵구로부터 유도되는 대식세포는 phagocytosis에 관여하는 다양한 단백질을 막표면에 발현시킨다[19]. 그 중 scavenger receptors는 주로 변형된 형태의 low density lipoproteins (LDL)인 oxidized LDL을 인식하고 제거하는 역할을 담당한다. 가장 먼저 밝혀진 SR-A1을 포함한 class A, N말단과 C말단이 세포내에 있는 loop 형태로 존재하는 SR-B2 (CD36)을 포함한 class B, 그리고 N 말단이 세포 외부에 존재하는 SR-D1 (CD68)을 포함하는 class C 등이 존재한다[8, 10].

Oxysterols은 정상 혈장에서는 cholesterol보다 약 10,000배 정도로 낮은 극히 적은 양이 존재하지만 강한 oxidative stress를 주는 환경에서는 증가하여 혈관내피세포 및 단핵구를 포함한 백혈구의 성장, 대사, 분화에 영향을 미친다[2, 14]. 이는 죽상경화증의 발생, 면역세포의 기능 이상과 세포사망을 포함한 병적인 상태로 진행되기도 한다[13, 16]. 이들 oxysterol은 아마도 oxidized LDL 형태로 청소수용체에 인식되어 세포내로 유입되고 과도한 oxidized LDL의 축적은 거품세포를 형성하게 된다. Lipid가 가득한 거품세포는 일부 대식세포의 특징을 가지지만 완전한 대식세포의 기능을 가지지 못하고 혈관벽에 plaque를 형성하고 죽상경화증을 일으키고 나아가 심장질환과 뇌졸중(stroke)을 촉진하는 원인이 된다.

거품세포의 침착으로 형성된 plaque이 죽상경화증의 발달과 진행에 중요한 역할을 담당하고 있으나, 거품세포의 형성과 침착에 관여하는 인자 및 그 상세한 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않는 실정이다. 그러므로, 단핵구의 대식세포로의 분화와 활성화 과정에서 oxysterols의 영향을 분석하는 것은 거품세포 생성과 plaque 형성과정의 분자기전을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 본다.

본 연구에서 7-KC가 단핵구의 분화와 활성화에 미치는 영향을 THP-1을 이용하여 조사하였다. 7-KC (25  $\mu$ M)는 THP-1 세포내 lipids의 축적을 크게 유도하였고, 단독으로 세포의 부착능에는 영향을 주지 않았지만 PMA로 자극한 세포의 부착능은 뚜렷한 감소를 일으켰다. 다른 논문에 따르면, 10  $\mu$ g/ml 농도의 7-KC를 7일 동안 처리한 경우 세포의 45%가 부착능을 보였다[9]. 7-KC에 의한 lipids의 축적은 7-KC가 거품세포의 초기 특징을 유도하며, PMA 자극에 의한 대식세포로의 분화와 활성화를 억제한다는 것을 의미한다. 대식세포의 분화와 활성화에서 phagocytosis에 관여하는 막표면 단백질에는 LFA-1 (CD11a+CD18), Mac-1 (CD11b+CD18)와 다양한 청소수용체가 존재한다[17]. 7-KC를 처리한 THP-1 세포는 대식세포의 막표면 인자인 ICAM-1, CD11a, SR-A1, SR-B2 (CD36)의 발현을 감소시켰지만, 7-KC는 단독으로 혹은 PMA로 자극한 세포에서 SR-D1 (CD68)의 발현을 현저히 증가시켰다. 이는 7-KC에 의해 유도되는 세포내 lipids의 축적에 SR-D1 (CD68)이 관여한다는 것을 의미하는 결과이지만, 실험의 조건에 따라 청소수용체를 포함한 막표면 인자들의 발현에 차이가 있어

깊은 연구가 필요한 실정이다[9, 20]. 이를 종합하면, 7-KC는 단핵구를 sterols이 풍부한 거품세포로 변형시킴으로써 생리적 자극에 의한 정상적인 단핵구의 대식세포로의 분화와 활성화를 억제한다는 것을 시사한다. 끝으로, 단핵구에서 oxysterols에 의한 lipids 축적 및 거품세포 생성의 정확한 기전의 연구는 죽상경화증을 포함한 혈관질환의 규명에 큰 도움이 되고, 나아가 치료와 예방을 위한 타겟 물질로의 oxysterols의 연구가 필요하다고 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Ball, R. Y., Stowers, E. C., Burton, J. H., Cary, N. R., Skepper, J. N. and Mitchinson, M. J. 1995. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* **114**, 45-54.
- Brown, A. J. and Jessup, W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **142**, 1-28.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 223-261.
- Colles, S. M., Irwin, K. C. and Chisolm, G. M. 1996. Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *J. Lipid Res.* **37**, 2018-2028.
- Colles, S. M., Maxson, J. M., Carlson, S. G. and Chisolm, G. M. 2001. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 131-138.
- Fuhrman, B., Partoush, A., Volkova, N. and Aviram, M. 2008. Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation *in vivo*: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis* **196**, 598-607.
- Garcia-Cruset, S., Carpenter, K. L., Guardiola, F., Stein, B. K. and Mitchinson, M. J. 2001. Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radic. Res.* **35**, 31-41.
- Geng, Y., Kodama, T. and Hansson, G. K. 1994. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 798-806.
- Hayden, J. M., Brachova, L., Higgins, K., Obermiller, L.,

- Sevanian, A., Khandrika, S. and Reaven, P. D. 2002. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J. Lipid Res.* **43**, 26-35.
10. Holness, C. L. and Simmons, D. L. 1993. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* **81**, 1607-1613.
11. Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241.
12. Mosser, D. M. and Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958-969.
13. Panini, S. R. and Sinensky, M. S. 2001. Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 529-533.
14. Reyk, D. M. V., Brown, A. J., Hultén, L. M., Dean, R. T. and Jessup, W. 2006. Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Rep.* **11**, 255-262.
15. Ross, R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am. Heart J.* **138**, S419-420.
16. Schroepfer, G. J. Jr. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361-554.
17. Shashkin, P., Dragulev, B. and Ley, K. 2005. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 3061-3072.
18. Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272**, 20963-20966.
19. Underhill, D. M. and Aderem, A. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623.
20. Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T. and Kodama, T. 1998. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 628-640.

## 초록 : THP-1 세포에서 거품세포 형성과 단핵구 분화 및 활성화에서 7-ketocholesterol의 역할

이미선<sup>1</sup> · 박시은<sup>1</sup> · 김관희<sup>2</sup> · 박영철<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실, <sup>2</sup>부산대학교 의과대학 약리학교실)

Oxysterols은 콜레스테롤의 산화 유도체로서 죽상경화증(atherosclerosis)에서 병태생리학으로 큰 관련성을 가진다. 본 연구는 oxysterols 중 많은 양을 차지하는 7-ketocholesterol (7-KC)이 단핵구(monocyte)의 분화와 활성화에 미치는 영향을 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 조사하였다. 7-KC를 처리한 THP-1 세포는 세포독성 없이 약간의 세포증식이 감소하였고, 세포내 lipids의 양이 크게 증가함을 Nile red 염색에 의해 관찰하였다. 7-KC는 단독으로 세포의 부착능(adhesion)에 영향을 주지 않았지만, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 자극한 THP-1 세포에서는 부착능의 뚜렷한 감소를 나타내었다. 그리고, 형광이 부착된 latex beads를 이용하여 7-KC의 phagocytosis (포식능)를 조사하였다. 7-KC는 PMA로 분화를 자극한 세포의 phagocytosis를 현저히 감소시켰다. 또한, 7-KC를 처리한 THP-1 세포는 대식세포(macrophage)의 막표면 인자인 ICAM-1, CD11a, scavenger receptor (SR, 청소수용체) SR-A1, SR-B2 (CD36)의 발현을 감소시켰다. 하지만, 7-KC는 단독으로 혹은 PMA로 자극한 세포에서도 SR-D1 (CD68)의 발현을 현저히 증가시켰다. 이를 종합하면, 7-KC는 단핵구를 sterols이 풍부한 거품세포(foam cell)로 변형시킴으로써 생리적 자극에 의한 정상적인 단핵구의 분화와 활성화를 저해한다는 것을 시사한다.