

---

# 배양된 혈관내피세포에서 uncoupling protein 2 유전자 과발현이 세포내 산화스트레스 및 endothelin-1 mRNA 발현에 미치는 영향

김하영 · 박중열 · 남궁일성 · 한정희 · 박기영<sup>2</sup> · 박혜선<sup>2</sup> · 이재담<sup>1</sup> · 강효경<sup>3</sup> · 이인규<sup>3</sup> ·  
홍성관 · 이기업

울산대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실<sup>1</sup>, 아산명과학 연구소<sup>2</sup>,  
계명대학교 의과대학 내과학교실<sup>3</sup>

## Effect of UCP2 Gene Transfection on Intracellular Redox State and Endothelin-1 mRNA Expression in Cultured Human Aortic Endothelial Cells

Kim HY · Park JY · Nam-Goong IS · Han JH · Park KY<sup>2</sup> · Park HS<sup>2</sup>  
Lee JD<sup>1</sup> · Kang HK<sup>3</sup> · Lee IK<sup>3</sup> · Hong SK · Lee KU

*University of Ulsan, College of Medicine, Department of Internal Medicine, Department of Biochemistry<sup>1</sup>,  
Institute of Asan Life Science<sup>2</sup>, University of Keimyung, College of Medicine<sup>3</sup>, Korea*

### Abstract

**Objectives:** It has been hypothesized that atherosclerosis is an inflammatory disease. Risk factors for atherosclerosis can induce generation of reactive oxygen species (ROS) and this ROS increases inflammatory gene expression in endothelium by acting as secondary messenger. Uncoupling proteins are mitochondrial inner membrane proteins with proton transport activity. In contrast to UCP1 which is expressed only in the brown fat, UCP2 is expressed widely. Although the biological function of UCP2 is not yet clear, it was recently suggested that the uncoupling activity of UCP2 is important in modulating the generation

---

책임저자: 박중열

서울시 송파구 풍납동 388-1 서울중앙병원 내분비내과, Tel: 02-3010-3246, FAX: 02-3010-6962  
E mail : jypark@www.amc.seoul.kr

of reactive oxygen species (ROS) from mitochondria. The aim of this study is to determine whether overexpression of UCP2 can affect fatty acid-induced endothelin-1 (ET-1) mRNA expression, NFkB activity and ROS generation in cultured human aortic endothelial cells (HAECS).

**Methods:** UCP2-containing adenovirus was transfected into HAECS. ET1-mRNA and NFkB binding activity was determined by Northern blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Intracellular ROS production was investigated by analyzing intercellular dichlorofluorescin (DCFH<sub>2</sub>) oxidation.

**Results:** When the cells were treated with 450uM linoleic acid or 300 uM oleic acid, both ET-1 mRNA expression and NFkB activity in HAEC were increased. Adenoviral overexpression of UCP2 significantly decreased ET-1 mRNA expression and NFkB activity. When the cells were treated with 2% Intralipid, ROS production was significantly increased. Adenoviral overexpression of UCP2 significantly decreased ROS production induced by Intralipid.

**Conclusion:** Increased availability of fatty acid increased ROS production, NFkB activity, and ET-1 mRNA expression in vascular endothelium. Overexpression of UCP2 blocked this process by reducing ROS generation. These data are the first to demonstrate the role of UCP2 in vascular endothelium, and support the notion that UCP2 is antiatherogenic via regulation of oxidative stress.

**Key Words:** UCP2, Endothelin-1, Oxidative stress

## 서 론

혈액내 중성지방 및 유리지방산이 증가되어 있는 인슐린저항성 상태에서 혈관 기능의 장애 및 심혈관 질환의 발생 증가가 관찰되나 이의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았다. 최근 동맥경화증의 위험인자들이 혈관세포에서 반응성 산소기 (reactive oxygen species; ROS)의 생성을 유도하고, 이 ROS가 second messenger로 작용하여 혈관의 염증성 유전자 발현을 증가시키므로써 동맥경화증을 일으킬 것이라는 가설이 제시되면서<sup>1</sup> 이와 관련된 많은 연구 결과들이 보고되고 있다.

Uncoupling protein (UCP) 은 체내에 과다한

에너지가 섭취되었을 때 이를 열로 발산시키는 물질로, 전자전달계를 통하여 생산된 intermembrane space에 놓축된 H<sup>+</sup> ion ( $\Delta\mu$  H<sup>+</sup>)을 ATP를 생산하는데 사용하지 않고 유출시키므로써 ATP 생산을 억제하는데, 최근 이로 인한  $\Delta\mu$  H<sup>+</sup>의 감소가 결과적으로 전자전달계의 활동을 원활히 하므로써 세포내 ROS 생산을 감소시킬 가능성이 제시되었다<sup>2</sup>. UCP2는 UCP1, UCP3 와 달리 여러조직에서 다양하게 발견되며<sup>3,4</sup>, 혈관 조직에서도 발현됨이 알려져 있다<sup>5</sup>.

본 교실의 이전 연구에서 동맥혈관내피세포에 지방질을 가했을 때 강력한 혈관수축 물질인 endothelin-1 (ET-1) mRNA 발현이 증가되며 여기에 NFkB경로가 관여한다는 내용을 보고한 바 있는데<sup>6</sup>, 본 연구에서는 혈관 조직에 있는

UCP2의 기능과 동맥경화증과의 관계를 알아보고자 adenovirus를 이용해 UCP2를 혈관내피세포에 과발현시킨 후 유리지방산에 의한 ET-1 mRNA의 발현 및 NFkB의 활성도 증가에 미치는 영향을 알아보고자 하였고, ROS 생성정도를 측정하여 산화스트레스와의 관련을 알아보고자 하였다.

## 대상, 재료 및 방법

### 1. UCP2 adenovirus vector의 제작

하버드 의대 김영범교수에게서 UCP2 cDNA를 기증받아 계명대학교 의과대학 이인규교수의 연구실에서 다음과 같은 방법으로 만든 adenovirus vector를 이용하였다. Full length의 사람 UCP2 cDNA를 adenovirus의 shuttle vector인 pACC-CMV에 삽입하여 재조합 plasmid를 만든 후 calcium phosphate precipitation 방법으로 E1A-transcription factor가 없는 adenoviral genomic vector JM17와 함께 HEK-293 E1A-transformed cells에 cotransfection 하였다. HEK-293 cell lysate에서 recombinant adenovirus expressing UCP2 (AdV-CMV-UCP2)를 Southern blot analysis로 확인하고, UCP2 cDNA를 포함하지 않는 pACC-CMV vector만을 삽입한 adenovirus를 대조군에 사용하였다 (adenoviral control). 만들어진 Recombinant adenoviruses를 cesium chloride gradient centrifugation 방법으로 정제 후 desalt시키고 HEK-293 세포에서 감염정도를 분석하였다.

### 2. 혈관세포의 배양과 transfection

사람대동맥혈관내피세포 (human aortic endo-

thelial cells: HAECS)는 BioWhittaker 회사 (Bio-Whittaker, Inc., Walkersville, MD)에서 구입하여 freezing vial에 나누어 보관해 놓았다가 1 vial에 담긴 1106 개의 세포를 100mm 페트리접시에 녹인 후 Endothelial basal medium에 hEGF, hFGF-B, VEGF, IGF-1, heparin, 2% FBS 등이 함유된 EGM<sup>®</sup>-2 Bullet kit (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD)에서 배양하였다. 4~5일간 배양하여 40~50%정도 포화될 때까지 키운 후 포화된 세포층을 0.01% trypsin, 0.05% EDTA로 처리하여 계대배양을 시행하였고 2107 cells/ml 까지 2주동안 3회의 계대배양을 하였다. 배양이 끝나면 배양액을 버리고 serum free minimum essential medium (MEM) 을 사용하여 세포를 씻어낸 후  $1.3 \times 10^7$  PFU/mL의 농도로 정제해 놓은 UCP2 adenovirus vector 1 mL을 점액하였다. 이후 15분 간격으로 1시간 동안 incubator에서 흔들어 주고는 EGM<sup>®</sup>-2 배양액으로 바꾸고 2일간 배양하였다. 2일 후 다시 serum free MEM 배양액으로 바꾸고 나서 300 uM oleic acid, 450 uM linoleic acid를 처리한 군과 대조군으로 나누어 16~18시간 배양하였다.

### 3. ET-1 mRNA expression (Nothern blot analysis)

UCP2 gene을 transfection시킨 동맥혈관내피세포를 300 uM oleic acid, 450 uM linoleic acid를 처리한 군과 대조군으로 나누어 16~18시간 처리 후 phenol-chloroform을 사용한 guanidium thiocyanate 방법으로 total RNA를 분리하여 전기영동하여 크기별로 분리하였다. 이것을 nylon membrane에 전이 시킨 후 <sup>32</sup>P-labeled human ET-1 cDNA probe로 hybridization 하였고 이후 X-ray film에 노출시켜 ET-1 mRNA 발현정도를 densitometer로 정량하였다.

#### 4. NFkB activity (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

배양한 세포를 homogenize 한 후, 원심분리하고 pellet를 homogenization buffer로 세척 후, 10% glycerol과 0.05M NaCl를 포함한 동량의 homogenization buffer로 4C에서 15분간 둔 뒤에 NaCl과 glycerol을 포함한 homogenization buffer에 4°C에 1시간 둔 뒤 DNA 농도를 1mg/mL로 맞추었다. 원심하여 상층액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 넣고 4°C에 30분간 둔 뒤 원심한 뒤에 보관하였다.

NFkB에 대한 결합부위를 encoding하는 double-stranded oligonucleotide를 3' end-labeling kit (clontech, Palo Alto, CA)으로 표지하고 <sup>32</sup>P-labeled probe를 Nick column을 이용하여 정제하였다. 1g의 nuclear extract에 <sup>32</sup>P labeled primer (0.5~1ng, 10,000~15,000 cpm)를 가해서 30분간 상온에서 배양한 후 5% polyacrylmaide gel에 2시간 동안 150V에서 전기영동 하였다. gel을 말린 후 autoradiography를 시행하여 정량화하였다.

#### 5. 세포내 ROS 생성 측정

동맥혈관내피세포를 2% Intralipid를 처리한 군과 대조군으로 나누어 24시간 배양한 후 10 uM/mL carboxydichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>-DCFDA)와 37°C water bath에서 15분간 반응 시키고 carboxy-DCF 생성을 FACScan으로 측정하였다<sup>7,8</sup>.

#### 6. 통계학적 분석

모든 자료는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, UCP2를 발현시키지 않은 대조군과 비교하였을 때의 변화량을 백분율로 표시하였다. UCP2를 발현 여부에 따른 차이에 대한 분석은 SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)의 Mann-Whitney U test상 P < 0.05인 경우에 통계적인 의의가 있는 것으로 간주하였다

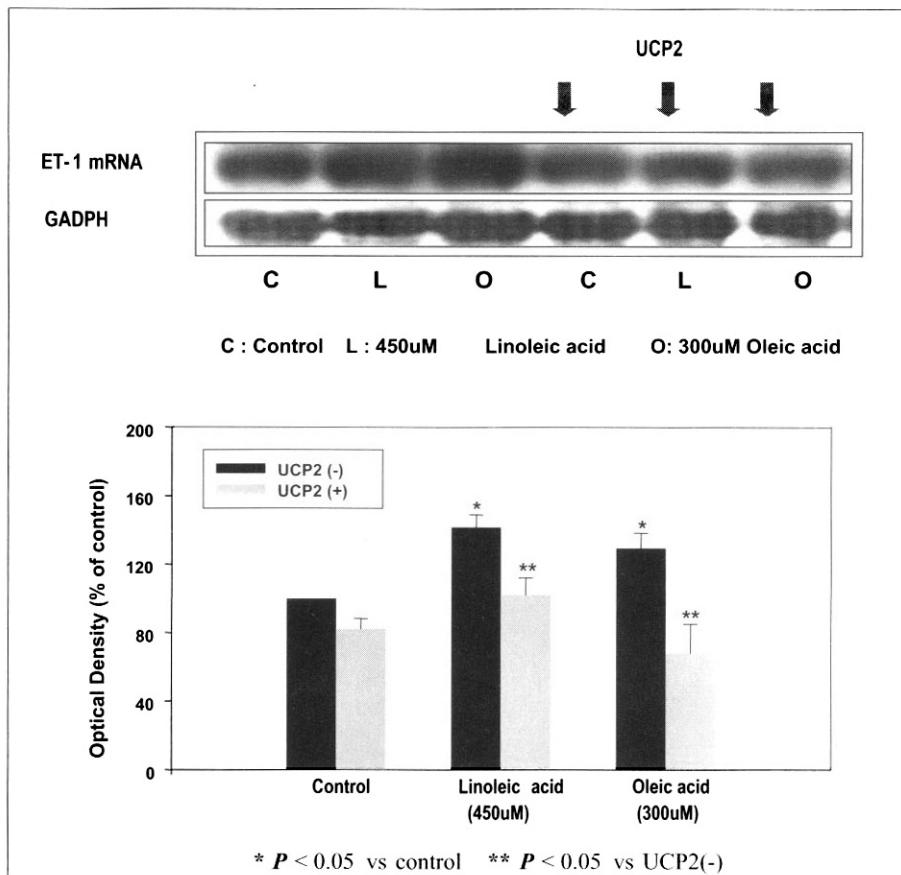
### 결 과

#### 1. ET1 mRNA의 발현.

450 uM linoleic acid, 300uM oleic acid로 동맥혈관내피세포를 처리하였을 때 ET-1 mRNA 발현이 대조군에 비해 각각 39.5±10.3 %, 31.2±20 % 증가하였고 (n = 3, P < 0.05), UCP2를 과발현시켰을 때 대조군에서 ET-1 mRNA 발현이 17.9±6.3 % 감소하였고 유리지방산을 처리한 경우 ET-1 mRNA 발현 증가가 각각 36.9±14.6 %, 59.3±14.2 % 억제되었다 (n = 3, P < 0.05) (Fig. 1).

#### 2. NFkB 활성도

전사인자인 NFkB의 활성화를 gel mobility shift assay (EMSA)로 관찰시 450uM linoleic acid, 300uM oleic acid로 동맥혈관내피세포를 처리하였을 때 NFkB의 활성도가 대조군에 비해 linoleic acid 처리군은 31.7±14.8 %, oleic acid 처리군은 74.2±40.1 % 증가하였고 (n = 3, P < 0.05), UCP2를 과발현시켰을 때 대조군에서 NFkB의 활성도가 18.1±12.8 % 감소하였다. 유리지방산을 처리한 경우 adenoniral control을 transfection시킨 군에서 증가했던 NFkB의 활성도가 linoleic acid 처리군은 66.3±54.4 %, oleic acid 처리군은 79.4±16.4% 감소하였다 (n = 3, P < 0.05)(Fig. 2).



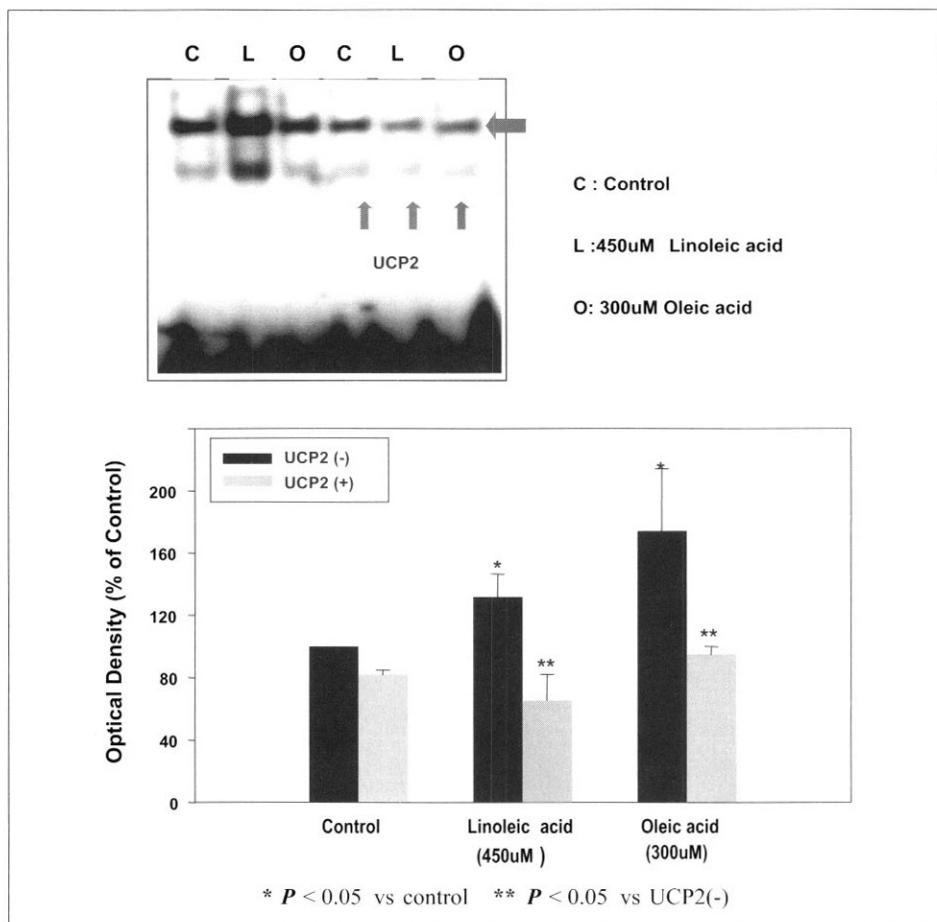
**Fig. 1.** Effect of UCP2 transfection on fatty acid induced expression of ET-1 mRNA in cultured HAECS.

HAECS were incubated with 450 uM linoleic acid or 300 uM oleic acid for 16-18 hours after transfection of adenoviral UCP2 (UCP2(+)) or adenoviral control (UCP2(-)). Total mRNA was isolated for Nothern blot analysis. (A) Representative blot illustrating ET-1 mRNA in untreated culture (control) and in fatty acid-treated cultures at the end of treatment. The three right lanes show results from the experiment in which UCP2 containing adenovirus were transfected. The bottom panels demonstrated 18S RNA expression on same blot. (B) Densitometry analysis of data from 3 different experiments. For each sample, ET-1 signal was normalized to the expression of 18S RNA in that sample on the same membrane and expressed as a percentages of the untreated control on the same blot. Data are means  $\pm$  SEM. \* P <0.05 vs control; \*\* P <0.05 vs UCP2 (-)

### 3. 세포내 ROS 생성

동맥혈관내피세포에 2% Intralipid를 주었을 때 ROS의 생성이 대조군에 비해  $32.5 \pm 3.9\%$  증가하였다 ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ). UCP2를 과발현시켰

을 때 대조군에서도 ROS 생성이  $23.2 \pm 13.0\%$  감소하였으며, 2% Intralipid를 처리한 경우는 증가한 ROS 생성이  $43.7 \pm 5.7\%$  감소하였다 ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3).



**Fig. 2.** NFκB DNA binding activity in HAECs determined by EMSA.

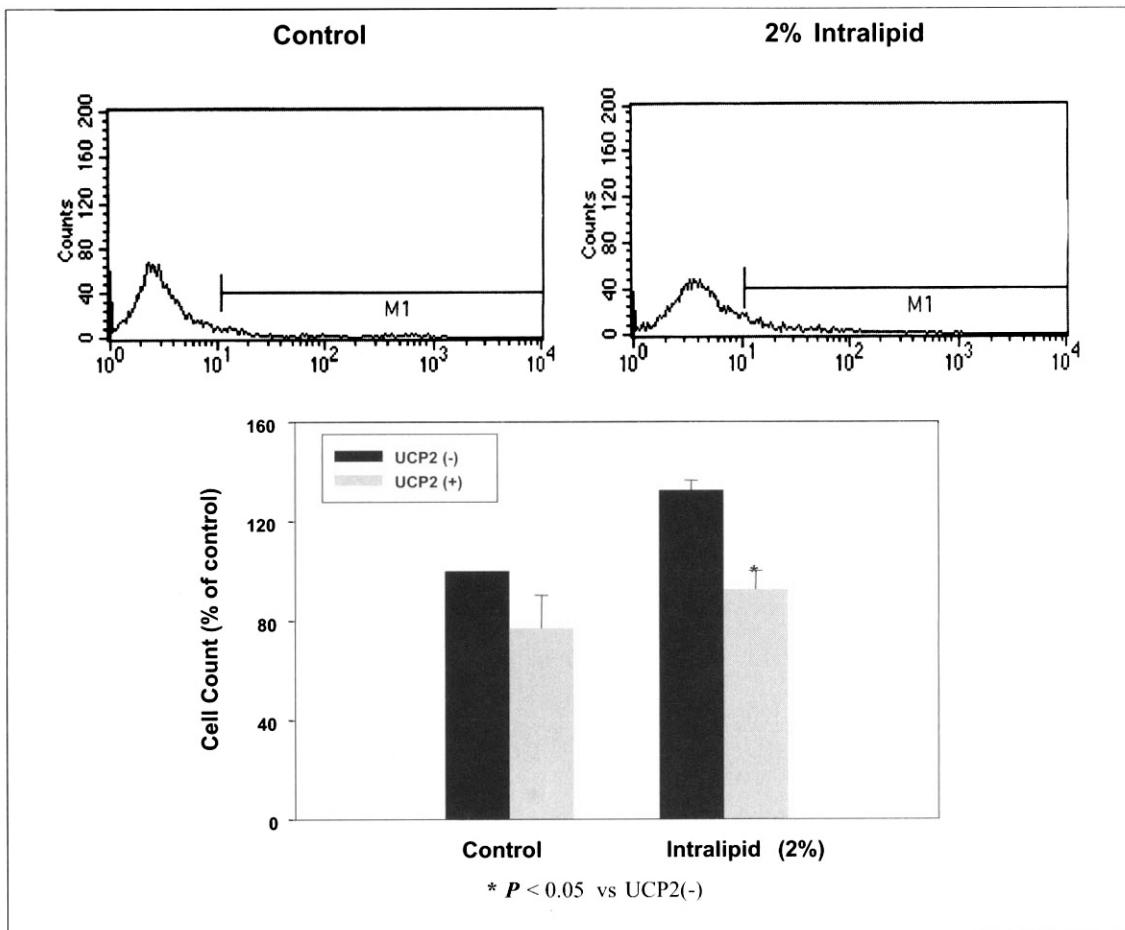
Nuclear extracts were prepared from HAECs cultured with 450 uM linoleic acid or 300 uM oleic acid after transfection of adenoviral UCP2 (UCP2(+)) or adenoviral control (UCP2(-)). Gel mobility shift assays were performed using nuclear proteins/reaction plus an annealed 32P labeled oligonucleotide fragment containing a kB binding site. Extracts were separated by electrophoresis on 5% polyamide gels; gels were dried, evaluated with densitometry. EMSA detected NFκB binding to the potential NFκB binding site. The three right lanes show results from the experiment in which UCP2 containing adenovirus were transfected. Data are means  $\pm$  SEM. \* P < 0.05 vs control ; \*\* P < 0.05 vs UCP2 (-)

## 고찰

이와 같은 작용에 ROS의 생산 감소가 관여할 것으로 생각되었다.

포도당, 지방산 등의 영양분에 있는 energy가 ATP로 전환되기 위해서는 TCA cycle에서 생산된 NADH가 미토콘드리아 내막에 있는 전자전달체계에서 oxidative phosphorylation이라는 과

본 연구 결과 UCP2를 혈관내피세포에 과발현 시켰을 때 유리지방산(지방질)에 의한 ET-1 mRNA의 발현 증가가 감소함을 알 수 있었고,



**Fig. 3.** Effect of UCP2 transfection on Intralipid induced DCFH2 oxidation in cultured HAECS.

HAECs were incubated with 2% Intralipid for 24 hours after transfection of adenoviral UCP2 (UCP2(+)) or adenoviral control (UCP2(-)). Increase in DCFH2 oxidation in HAECS . HAECs were loaded with DCFH2 for 15 min. A region of highly fluorescent cells was selected that contained the 9-11% of cells giving strongest fluorescent signal. M1 ; highly fluorescent cells (A)

Quantification of any increased in DCFH2 oxidation in response to a treatment was in terms of an increase in the proportion of cells that fell in this region. (B)

Data are means  $\pm$  SEM. \* P < 0.05 vs UCP2 (-)

정을 거쳐야 한다. 1970년대에 ADP phosphorylation이 억제되어 있음에도 미토콘드리아의 산소소비가 지속되는 것이 발견되면서, 미토콘드리아의 respiration과 ATP 합성과의 coupling이 불완전하다는 uncoupling의 개념이 도입되었다<sup>9,10</sup>. 이러한 uncoupling은 주로 산화에너지를 열로 발산시키므로써 추위에 노출된 동물

의 체온을 조절하는 기능과 함께 체내에 과도한 에너지가 섭취되었을 때 체중증가를 예방하는 기능을 가지는 것으로 생각되었다.

1978년에 추위에 노출된 동물의 열발생에 중요한 역할을 하는 갈색지방조직의 미토콘드리아에서 uncoupling을 조절하는 32-kDa의 단백질이 증명되어<sup>11</sup> uncoupling protein, UCP라 명

명되었다. 이후 갈색지방조직 외에 다른 조직에서도 uncoupling에 관여하는 물질을 찾으려는 노력이 지속되어 현재까지 5종류의 UCP1, UCP2<sup>12</sup>, UCP3<sup>13</sup>, UCP4<sup>14</sup>, BMCP1<sup>15</sup>이 발견된 상태이다. 이 중 1997년 발견된 UCP2는 UCP1과 59% 동일한 amino acid sequence를 가지고 있으며 갈색지방조직에만 국한되어 나타나는 UCP1과는 달리 여러조직에 다양하게 분포하는 것으로 알려져 있다<sup>12,16</sup>. 최근 몇 년간 UCP2의 기능에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나 아직 정확한 기능은 밝혀지지 않은 상태이다.

체내에서 열을 발산시키는 주기관인 갈색지방조직에 주로 발현하는 UCP1과는 달리 UCP2가 여러 조직에서 발견된다는 점을 고려할 때 이 단백질이 열생산과는 다른 중요한 역할을 할 가능성이 제시되었는데<sup>2</sup> 최근 ROS의 생성을 조절하는 것이 UCP2의 주요 기능이라는 주장이 제기되면서 이를 뒷받침하는 내용들이 보고되고 있다<sup>17</sup>. Pecqure 등은 Lipopolysaccharide를 처리시 폐와 위에서 UCP2 mRNA가 증가함을 보고했고<sup>18</sup>, Cortez 등은 간세포에 intralipid와 그 주요성분인 linoleic acid 및 oleic acid를 각각 가했을 때 ROS의 생성이 증가하고 UCP2 mRNA의 발현이 증가함을 보고하면서 산화스트레스와 관련한 NFkB의 활성도 증가가 관여함을 시사한 바 있다<sup>19</sup>.

체내에서 생성되는 대부분의 ROS는 미토콘드리아에서 전자전달체계를 거친 전자가 O<sub>2</sub>와 반응하여 H<sub>2</sub>O가 되는 과정에서 만들어지는데 정상적으로 약 1~5%의 산소만이 H<sub>2</sub>O가 되지 못하고 O<sub>2</sub><sup>•</sup>이 된다. 그러나, 전자전달체계가 어떤 이유에서든지 원활히 활동을 하지 못하는 경우에는 전자전달체계내의 semiquinolone 같은 물질이 축적되면서 O<sub>2</sub><sup>•</sup> 생산이 증가하며 동시에 intermembrane space에 농축된 H<sup>+</sup> ion ( $\Delta\mu\text{H}^+$ )도 증가하게 된다. UCP2가 proton leak를 통해

이러한  $\Delta\mu\text{H}^+$ 를 줄이게 되면 결국 전자전달계에서의 전자의 흐름을 원활히 하여 ROS가 생성이 감소하게 될 것이다. 본 연구의 결과 혈관내피세포에 UCP2를 과발현시켰을 때 지방질에 의해 증가한 ROS의 생성이 감소함을 보여 UCP2가 ROS의 생성에 관여함을 보여주고 있다.

Endothelin (ET)은 강력한 혈관수축의 기능을 가진 21개의 아미노산으로 구성된 패티드로 ET-1, 2, 3의 3가지의 isoform이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>21</sup>. ET의 활성도가 관상동맥 이상 및 조기 죽상 경화증 환자의 관상동맥 및 전신 순환계에 증가되어 있고<sup>22,23</sup>, 협심증을 보이는 환자의 atherosclerotic plaque의 평활근세포나 탐식세포에서도 ET-1의 활성도가 증가됨이 보고되어<sup>24,25</sup> ET-1이 죽상경화증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다. 혈관내피세포에서의 ET-1의 분비에는 oxygen radicals, interlukin-1, TNF, thrombin, angiotensin II 등의 여러 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>26-30</sup>. 이 중 산화스트레스의 증가에 의한 ET-1 생성증가는 혈관내피세포외에 평활근세포나 심근세포등에서도 보고되고 있으나 그 기전에 대해서는 정확히 밝혀진 바가 없고 유전자 발현에 관여하는 다양한 신호전달체계가 관여할 것으로 여겨지고 있다<sup>31,32</sup>. ROS에 의한 promotor의 활성도 조절에는 antioxidant response element, CC(A/T)6GC sequence나 activator protein-1 (AP-1), NFkB와 같은 전사인자 결합부위가 중요한 것으로 알려져 있다<sup>33-35</sup>. 최근 Quchenberger 등<sup>36</sup>은 혈관내피세포에 AGE를 가했을 때 NFkB의 활성도가 증가하고 ET-1 mRNA의 발현이 증가함을 보고하면서 ET-1 유전자의 promotor에 NFkB 결합부위가 있음을 보고한 바 있다. 본 연구팀의 이전의 연구결과에서도 지방산에 의한 ET-1 발현증가가 NFkB 억제제에

의해 억제됨을 관찰하여 지방산에 의한 ET-1 발현증가에 NFkB 활성이 중요한 기전임을 보고한 바 있다.

UCP2를 과발현시킨 경우 지방산에 의해 증가된 ROS의 생성, NFkB 활성도와 ET-1 mRNA 발현이 감소한 본 연구의 결과는 산화스트레스가 ET-1 발현 조절에 관여한다는 이전의 보고들을 지지하며 여기에 NFkB를 통한 신호전달 체계가 관여함을 시사하고 있다.

결론적으로 지방산은 세포내 산화스트레스를 증가시켜 ET-1과 같은 혈관 활성 물질의 증가를 초래하는데 여기에는 NFkB 같은 세포내 전사인자가 관여하게 된다. UCP2를 과발현 시킨 경우 증가된 세포내 산화스트레스를 감소시키므로써 여러 신호전달경로를 통해 ET-1의 감소하게되고, NFkB와 같은 전사인자 활성도 감소도 이러한 산화스트레스의 감소를 입증하고 있다. UCP2가 혈관에 미치는 영향에 대한 연구는 본 연구가 국내외 학계에서 최초로 시도된 것이다. 그러나 본 연구의 결과는 배양된 혈관 내피세포에서 관찰한 것으로 UCP2의 과발현이 *in vivo* 상태에서 실제 혈관의 수축 및 확장 기능이나 동맥경화증의 발생에 미치는 영향에 대해서는 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 감사의 글

UCP2 cDNA를 제공해주신 하버드 의과대학의 김영범 박사님께 깊은 감사를 드린다. 본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구 개발사업 (HMP-99-M-08-0004)과 아산생명과학연구소의 우수연구팀사업의 지원으로 이루어졌다.

### 참고문헌

- Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85: 753-66
- Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 2000;49:143-156
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997;15:269-272
- Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 1997;46: 900-906.
- Prunet-Marcassus B, Moulin K, Carmona MC, Villarroya F, Penicaud L, Casteilla L. Inverse distribution of uncoupling proteins expression and oxidative capacity in mature adipocytes and stromal-vascular fractions of rat white and brown adipose tissues. *FEBS Lett* 1999; 464:184-188
- 박중열, 김영미, 홍성관, 이재남, 이기업. 혈관내피세포에서 지방질이 endothelin-1 발현에 미치는 영향. 2000; 제13차 대한당뇨병학회 춘계학술대회 (Abstract)
- van Reyk DM, King NJ, Dinauer MC, Hunt NH. The intracellular oxidation of

- 2',7'-dichlorofluorescin in murine T lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 2001;30: 82-88
8. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983;130:1910-1917
9. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77:731-758
10. Rolfe DF, Brand MD. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep* 1997; 17:9-16
11. Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A Jr, Nicholls DG. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* 1978;82:515-521
12. Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 1997;46:900-906
13. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 1997;408:39-42
14. Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 1999;443:326-330
15. Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Goubern M, Huang Q, Neverova M, Gregoire F, Easlick J, Raimbault S, Levi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 1998;273: 34611-34615
16. Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, Viguerie-Bascands N, Levi-Meyrueis C, Fleury C, Pecqueur C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Ricquier D. Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:760-764
17. Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 1997;11:809-815
18. Pecquerer C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. Uncoupling protein 2: In vivo distribution, induction upon oxidative stress and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 2001;27:8705-8712
19. Cortez-Pinto H, Zhi LH, Qi YS, Odwin DC, Diehl AM. Lipid up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1999;116:1184-1193

20. 한정희, 박중열, 정윤이, 홍성관, 박승정, 이 기업. 제 2형 당뇨병 동물 모델인 OLETF 쥐에서  $\alpha$ -lipoic acid에 의한 혈관 기능장애의 회복. 2001; 제14차 대한당뇨병학회 춘계학술대회 (Abstract)
21. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1981;332:411-415
22. Hasdai D, Lerman A: The atherogenic potential of endothelin. *Coron Artery Dis* 1995; 11:901-904
23. Lerman A, Holmes DR Jr, Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC Jr: Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995;92:2426-2431
24. Zeiher AM, Ihling C, Pistorius K, Schachinger V, Schaefer HE: Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994;8934:1405-1406
25. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C: Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1995;91:941-947
26. Mitchell MD, Branch DW, Lamarche S, Dudley DJ: The regulation of endothelin production in human umbilical vein endothelial cells: unique inhibitory action of calcium ionophores. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:665-668
27. Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, Yamashita T, Oh-hashi Y, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y: Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;16: 324-329
28. Marsden PA, Brenner BM: Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1992;262:C854-861
29. Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett JC Jr, Vanhoutte PM: Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1989;165:333-334
30. Chua BH, Chua CC, Diglio CA, Siu BB: Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:201-206
31. Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Wang DL, Chen JJ: Reactive oxygen species modulate endothelin-1-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 1999;41: 654-662
32. Fei J, Viedt C, Soto U, Elsing C, Jahn L, Kreuzer J: Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1244-1249
33. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB: The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 1991; 266:11632-11639
34. Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi

- SA, Weichselbaum R, Kufe DW: Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:2419-2422
35. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. EMBO J 1993;12: 2005-2015
36. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP: Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. Diabetes 2000; 49:1561-1570