

Ascochlorin 유도체(AS-6)가 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파 유도 Fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현에 미치는 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실¹, 이비인후과학교실²

장영윤¹ · 김상윤¹ · 김남경¹ · 김미경¹ · 김희경¹ · 김혜순¹ · 남창욱¹ · 류성열¹ · 남성일² · 박근규¹

Ascochlorin Derivative, AS-6, Inhibits TNF- α -Induced fractalkine, MCP-1 and VCAM-1 Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells

Young-Yun Jang¹, Sang-Yoon Kim¹, Nam-Keong Kim¹, Mi-Kyung Kim¹, Hee-Kyoung Kim¹, Hye-Soo Kim¹, Chang-Wook Nam¹, Seong-Yeon Ryu¹, Sung-II Nam², and Keun-Gyu Park¹

Department of Internal Medicine¹, Department of Otolaryngology², Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

- Abstract -

Background: Inflammation is one of the key mechanisms in the development and progression of atherosclerosis. Accumulating evidence suggests that peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) plays an important role in the prevention of arterial inflammation and the formation of atherogenesis. This study was designed to evaluate whether the new synthetic PPAR γ , ascochlorin-6 (AS-6) has anti-inflammatory and anti-atherogenic effects in primary cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Methods: Rat VSMCs were isolated and cultured. Northern and Western blot analyses were performed to evaluate the effects of AS-6 on the expressions of tumor necrosis factor (TNF)- α -stimulated fractalkine, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in VSMCs. A gel shift assay was performed to examine the mechanism by which AS-6 inhibits the expressions of fractalkine, MCP-1 and VCAM-1.

Results: TNF- α markedly induced the expressions of fractalkine, MCP-1 and VCAM-1 in primary cultured VSMCs. AS-6 inhibited the expressions of TNF- α -stimulated fractalkine, MCP-1 and VCAM-1 in primary cultured VSMCs. The result of the gel shift assay suggested the inhibitory effects of AS-6 on the expressions of TNF- α -stimulated fractalkine, MCP-1 and VCAM-1 were mediated through a nuclear factor κ B associated pathway.

Conclusion: The present study shows that AS-6 has anti-inflammatory effects on VSMCs, suggesting the possibility for the use of AS-6 for prevention of the development and progression of atherosclerosis (*J Kor Diabetes Assoc* 29:401~408, 2005).

Key Words: Ascochlorin-6, Atherosclerosis, Fractalkine, MCP-1, VCAM-1, Vascular smooth muscle cell

서 론

내피세포의 손상에 따른 염증세포와 혈관세포 간의 염증

반응은 초기 죽상동맥경화증의 중요한 병태생리이다^{1,2)}. 고 혈압, 고혈당, 저산소증, 산소라디칼, 콜레스테롤 등의 유발 인자에 의해 손상된 혈관내피세포가 혈관의 방어벽 기능을

하지 못하게 되면 혈액 속에 있는 지질과 백혈구가 내피하조직으로 침투하게 된다. 저밀도지단백-콜레스테롤(LDL-cholesterol)은 산화형 저밀도지단백-콜레스테롤로 변형되고 단백구가 이를 탐식하여 포말세포로 변화되면서 동맥경화증의 초기병변인 지방반(fatty streak)을 형성한다^{1,2)}. 이 과정에서 활성화 된 대식세포 및 T 림프구, 내피세포, 그리고 손상된 혈관내피에 흡착한 혈소판 등에 의해 분비된 여러 성장인자(growth factor)와 사이토카인(cytokine) 등은 혈관중막에 있는 혈관평활근세포를 내막으로 이동시키고 혈관평활근세포를 증식하게 한다³⁾. 내막으로 이동한 혈관평활근세포는 사이토카인 및 성장인자와 반응하여 혈관세포부착물질 1 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1), 단백구 주화성 인자 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 및 fractalkine 등을 분비하여 급속히 증식하게 되며³⁻⁶⁾ 이 결과로 지방반은 세포성분이 증가된 병변으로 발전하게 된다³⁾. 결과적으로 혈관내막에 모인 혈관평활근세포는 콜라겐, 엘라스틴(elastin), 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 등과 같은 세포외기질을 생산하여 죽상경화반(atheromatous plaque)의 부피를 더욱 증가시켜 동맥의 내경을 더욱더 좁아지게 한다¹⁾. 따라서 죽상동맥경화증의 발병에 혈관세포 특히 혈관평활근세포의 염증반응이 아주 중요한 역할을 할 수 있다.

핵수용체(nuclear receptor) 대가족(superfamily)에 속하는 peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ)는 지방세포의 분화와 지방조직에서 지방산의 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다⁷⁾. PPAR γ 는 혈관내피세포와 혈관평활근세포에서도 발현되고 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 등과 같은 염증성 사이토카인에 의해 활성화 된 전사인자 nuclear factor(NF- κ B를 억제하여 염증반응을 완화시키는 작용을 한다^{8,9)}. 지금까지 PPAR γ 합성 리간드로 troglitazone, rosiglitazone 및 pioglitazone이 개발되어 있고 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prosta-glandin J2 (15d-PGJ₂)가 체내에 존재하는 PPAR γ 리간드로 알려져 있다¹⁰⁻¹³⁾. 최근 실험결과 및 임상연구결과는 이러한 PPAR γ 리간드들이 죽상동맥경화증의 병태생리의 예방 및 치료에 중요한 역할을 할 수 있다¹⁰⁻¹³⁾.

Prenyl-phenol 항생제인 ascochlorin은 곰팡이(fungus)인 *Ascochyta viciae*에서 추출된 물질이다^{14,15)}. 여러 문헌보고에 의하면 ascochlorin과 그 유도체들은 지질강하효과^{16,17)} 및 혈압강하효과가 있고 제1형 및 제2형 당뇨병의 경과를 호전시킬 뿐만 아니라^{18,19)} 면역반응을 조절하고^{20,21)} 종양세포의 성장 및 전이에도 영향을^{21,22)} 미치는 것을 알 수 있다. 최근 Togashi 등은 ascochlorin 유도체인 4-O-carboxy-methylated derivative (ascochlorin 6, AS-6)가 PPAR γ 에 리간드로 작용하여 지방세포의 분화를 유도한다는 사실을 보고하였다²³⁾. 따라서 AS-6가 다른 PPAR γ 리간드처럼 대사증

후군과 관련된 동맥경화증에도 효과가 있을 것으로 예상된다. 이에 저자들은 PPAR γ 리간드로서 AS-6가 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파에 의한 NF- κ B 활성에 미치는 효과를 알아보고 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1 발현에 미치는 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Hfractalkine 항체 및 유전자재조합 종양괴사인자-알파는 R&D system (Minneapolis, MN)에서 구입하였고, 항VCAM-1 항체와 항goat 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. NF- κ B 억제제인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)와 항actin 항체는 Sigma (Saint Louis, MD)에서 항rabbit 항체는 Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)에서 구입하였다. 방사선 표지 소식자(radiola-belled probe, [α -³²P]dCTP, [γ -³²P]dATP)는 Amersham Bioscience에서 구입하였다. 실험에 사용된 AS-6는 Magac 박사 (Institute of Research and Innovation, Chiba, Japan)로부터 기증받아 사용하였다.

2. 세포 배양

혈관평활근세포는 Sprague-Dawley 백서(280~320 g)의 흉부대동맥에서 분리하여 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco)에서 배양하였다. 혈관평활근세포의 특이성은 α -actin 단일클론 항체(Sigma)로 염색하여 확인하였다. 본 실험에는 5~8회 사이로 계대 배양한 혈관평활근세포를 사용하였다. 배양된 혈관평활근세포가 100 mm 조직배양접시에 80~90% 가량 자랐을 때 0.5% FBS DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하여 세포들을 휴지기로 들어가게 하였다. 종양괴사인자-알파(5 ng/mL)를 처리하기 전 1시간 동안 AS-6를 처리하고 각 실험에 필요한 조건을 주어 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현 변화를 관찰하였다.

3. 노던 블롯(Northern blot analysis)

노던 블롯에 사용된 MCP-1에 대한 방사선 표지 소식자는 [α -³²P]dCTP를 이용한 임의 프라이머 라벨방법(Amersham, Arlington Heights, IL)으로 제작하였다. 이후 방사선 표지 소식자는 NAP-5 칼럼(Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 정제하였다. 노던 블롯에 사용된 RNA는 RNeasy RNA 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 분리하였다. 10 μ g의 RNA를 1% 포름알데하이드-아가로스 겔에서 전기영동을 시행한 후 나일론 막으로 이동시켰다. 나일론

막을 방사선 표지 소식자와 함께 Express HybTM 용액에서 2시간동안 65°C에서 보합결합(hybridization)시킨 후 mRNA 발현을 밀도계측기(densitometer)를 이용하여 분석하였다.

4. 웨스턴 블롯(Western blot analysis)

IPH 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 100 μM PMSF), 1 μg/mL 단백질 분해효소 억제제, 1 mM DTT를 사용하여 전체 단백질을 분리하였다. 각 시료를 시료 완충액과 섞어 5분간 끓인 후 얼음 위에서 식혔다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 겔에서 전기영동하여 크기별로 분리한 후 Immobilon-P transfermembrane(Millipore, Billerica)으로 전기를 이용하여 옮겼다. 차단 완충액(blocking buffer)으로 차단하고 항fractalkine 항체 및 항VCAM-1 항체에서 반응시킨 후, horse-radish peroxidase-conjugated 이차 항체(항goat 항체)에 반응시켰다. ECL plus(Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. Membrane을 항actin 항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

5. 겔 지연 분석법(Gel mobility shift assay)

혈관평활근세포가 80~90% 수준으로 배양되었을 때 차가운 PBS 용액으로 두 번 세척 후 세포를 모았다. 이 세포들을 400 μL의 ice-cold buffer A(10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 10 μg/μL aprotinin 및 10 μg/μL leupeptin)에서 균질화 시킨 후 얼음 위에서 15분 동안 방치하였다. 이 세포를 NP-40 25 μL로 처리 후에 buffer B(20 mmol/L HEPES, 0.4 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF)에 넣어서 10분 동안 12,000 g으로 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액은 핵산 추출물로 수집하였고 핵산 단백질의 양은 단백 분석 키트(Bio-Rad, Richmond, CA)로 측정하였다.

NF-κB에 대한 방사선 표지 소식자(5'-AGTTGAGGGG ACTTCCCCAGGC-3')는 [γ -³²P]ATP와 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 제작하였다. ³²P 표지 소식자는 NAP-5 칼럼에서 정제하였으며 단백질-DNA 반응은 20분 동안 실온에서 시행하였다. 반응물질은 핵산추출물 6 μg, poly(dI:dC) 100 μg/mL, Tris/HCl(pH 7.5) 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 0.5 mmol/L, DTT 0.5 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, 4% glycerol과 60,000 cpm ³²P-라벨 탐침 DNA를 사용하였다. 반응을 시킨 후 샘플을 0.5×TRIS-borate-EDTA buffer 내에서 4% 천연 폴리아리아미드 겔에 접종한 후 150볼트에서 2시간 동안 전기영동을 시행한 후 분석하였다.

6. 통계처리

결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고 변수의 분석은 Duncan's test를 사용하였다. *P*값이 0.05미만인 경우에 통계적으로 유의하다고 판정하였으며 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하여 통계처리 하였다.

결과

1. AS-6가 fractalkine 발현에 미치는 효과

백서의 혈관평활근세포에서 fractalkine 단백질 발현은 종양괴사인자 - 알파(5 ng/mL)에 의해 현저히 증가하였다. 종양괴사인자 - 알파에 의해 증가된 fractalkine 발현에 AS-6가 미치는 영향을 알아본 결과 AS-6는 fractalkine의 발현량을 용량 의존적으로 억제하여 30 μM 농도에서 기저치에 가까이 감소 시켰다(Fig. 1). 그러나 rosiglitazone(30 μmol/L)과 pioglitazone(30 μmol/L)의 경우 fractalkine 단백질 발현을 억제하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

2. AS-6가 MCP-1 발현에 미치는 효과

MCP-1은 종양괴사인자 - 알파를 처리하지 않은 조건에

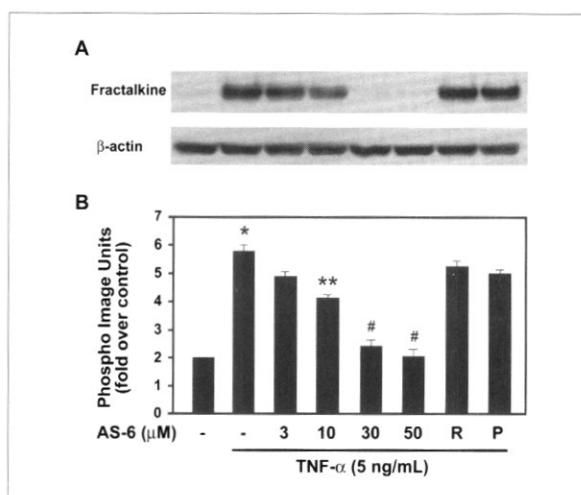


Fig. 1. Effect of AS-6 on TNF- α -stimulated fractalkine expression. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 hours with or without pretreatment with indicated amounts of AS-6, rosiglitazone (30 μmol/L) and pioglitazone (30 μmol/L) for 1 hour. A, Western blot analysis of fractalkine protein expression. Western blot was probed with anti-fractalkine antibody. B, Quantification of data expressed as means \pm SEM of 3 separate measurements. R, rosiglitazone; P, pioglitazone. Statistical significance was determined as * *P* < 0.001 compared with control, ** *P* < 0.05 and # *P* < 0.01 compared with TNF- α only.

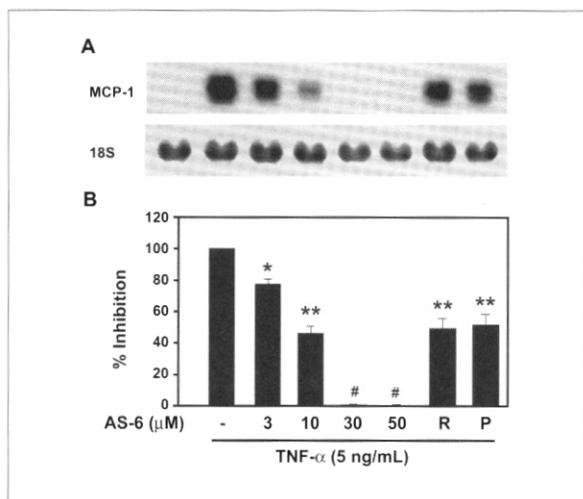


Fig. 2. Effect of AS-6 on TNF- α -stimulated MCP-1 expression. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 hours with or without pretreatment with indicated amounts of AS-6, rosiglitazone (30 μ mol/L) and pioglitazone (30 μ mol/L) for 1 hour. A, Northern blot analysis of MCP-1 mRNA expression. Each lane contains 20 μ g of total RNA isolated from the cells. Northern blot is probed with radiolabelled MCP-1. B, Quantification of data expressed as means \pm SEM of 3 separate measurements. R, rosiglitazone; P, pioglitazone. Statistical significance was determined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and # $P < 0.001$ compared with TNF- α only.

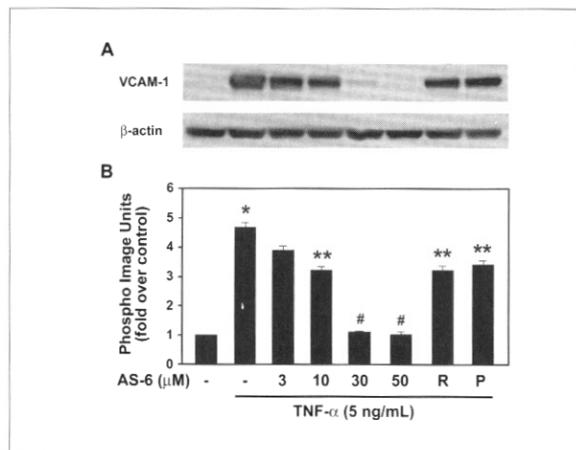


Fig. 3. Effect of AS-6 on TNF- α -stimulated VCAM-1 expression. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 hours, with or without pretreatment with indicated amount of AS-6, rosiglitazone (30 μ mol/L) and pioglitazone (30 μ mol/L) for 1 hour. A, Western blot analysis of VCAM-1 protein expression. Western blot was probed with anti-VCAM-1 antibody. B, Quantification of data expressed as means \pm SEM of 3 separate measurements. R, rosiglitazone; P, pioglitazone. Statistical significance was determined as * $P < 0.001$ compared with control, ** $P < 0.05$ and # $P < 0.01$ compared with TNF- α only.

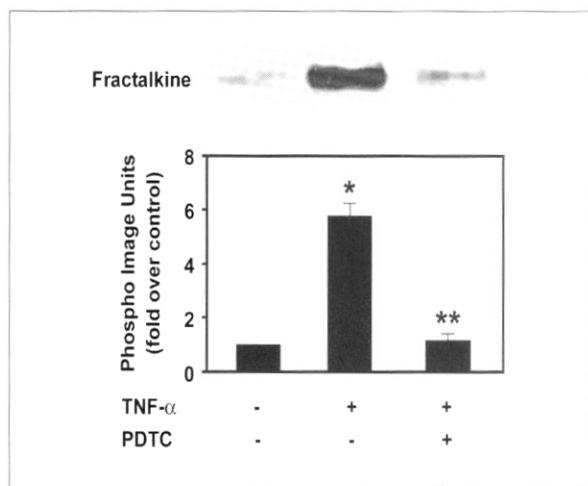


Fig. 4. TNF- α -stimulated fractalkine expression is mediated by NF- κ B pathway. A, Western blot analysis of VSMCs treated with NF- κ B inhibitor. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 hours in the presence of PDTC (100 μ mol/L). B, Quantification data are presented as means \pm SEM of 3 separate measurements. Statistical significance was determined as * $P < 0.001$ compared with control, ** $P < 0.001$ compared with TNF- α only.

서 백서의 혈관평활근세포에서는 발현되지 않았으나 종양괴사인자-알파(5 ng/mL) 처리에 의해 발현량이 현저히 증가하였다. 백서의 혈관평활근세포에 AS-6를 전처치한 결과 종양괴사인자-알파에 의해 유도된 MCP-1 mRNA의 발현을 용량 의존적으로 감소시켰다. AS-6의 농도가 30 μ mol/L 이상에서는 종양괴사인자-알파에 의한 MCP-1의 발현이 기저치에 가까이 억제되었다 (Fig. 2). Rosiglitazone (30 μ mol/L)과 pioglitazone (30 μ mol/L)도 종양괴사인자-알파에 의해 유도된 MCP-1 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰으나 억제정도가 AS-6 (30 μ mol/L)에 미치지 못하였다.

3. AS-6가 VCAM-1 발현에 미치는 효과

백서의 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파 (5 ng/mL)는 VCAM-1 단백질의 발현을 현저히 증가시켰다. 백서의 혈관평활근세포에 AS-6를 전처치한 결과 종양괴사인자-알파에 의해 증가된 VCAM-1 발현을 용량 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 3). 그러나 rosiglitazone (30 μ mol/L)과 pioglitazone (30 μ mol/L)의 경우 VCAM-1 단백질 발현을 억제하였으나 억제정도가 AS-6 (30 μ mol/L)에 미치지 못하였다.

4. AS-6가 NF-κB 활성에 미치는 효과

종양괴사인자-알파에 의해 증가된 fractalkine 발현이 NF- κ B 활성을 통해 일어나는지를 알아보기 위해 NF- κ B 억제제인 PDTC (100 μ mol/L)를 종양괴사인자-알파를 처리한 혈관평활근세포에 첨가하였다. Fig. 4에서 보는 바와

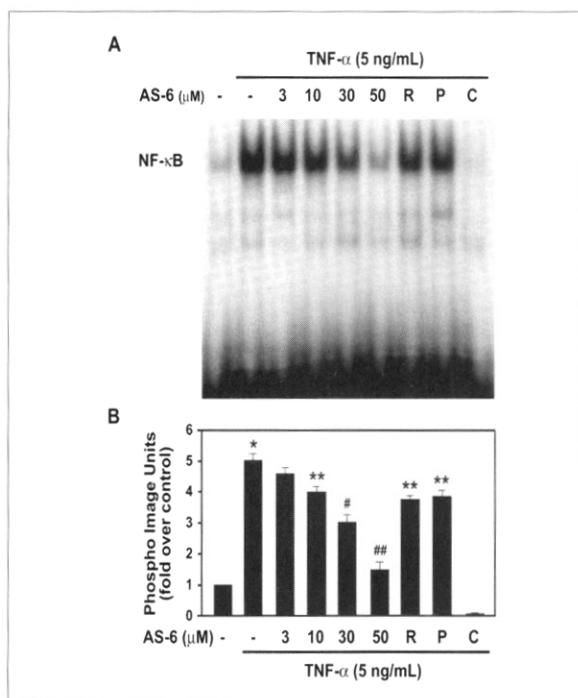


Fig. 5. Effect of AS-6 on TNF- α -stimulated NF- κ B DNA binding activity. A, Typical gel shift assay of VSMCs lysates treated with AS-6. VSMCs were treated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 hours with or without pretreatment with indicated amount of AS-6, rosiglitazone (30 μ mol/L) and pioglitazone (30 μ mol/L) for 1 hour. The binding activity of NF- κ B in nuclear extracts were assayed by electrophoretic mobility shift assay. In competition experiments with consensus NF- κ B oligonucleotides, nuclear extracts from VSMCs treated with TNF- α (5 ng/mL) were preincubated with 50-fold molar excess of unlabelled consensus NF- κ B probe. B, Quantification data are presented as means \pm SEM of 3 separate measurements. R, rosiglitazone; P, pioglitazone; C, cold probe. Statistical significance was determined as * $P < 0.001$ compared with control, ** $P < 0.05$, # $P < 0.01$ and ## $P < 0.001$ compared with TNF- α only.

같이 PDTc는 종양괴사인자 - 알파에 의해 유도된 fractalkine 단백질의 발현을 기저치 수준으로 억제하였다.

AS-6의 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현억제 효과가 종양괴사인자 - 알파에 의해 증가된 NF- κ B 활성을 억제하여 이루어지는 것을 확인하기 위해 NF- κ B 겔지연 분석법을 시행하였다. 종양괴사인자 - 알파 (5 ng/mL)는 NF- κ B의 DNA 결합능력을 현저히 증가시켰고 AS-6는 NF- κ B의 DNA 결합능력을 용량 의존적으로 억제시켰다 (Fig. 5). Rosiglitazone (30 μ mol/L)과 pioglitazone (30 μ mol/L)도 종양괴사인자 - 알파에 의해 증가된 NF- κ B의 DNA 결합능력을 유의하게 억제시켰다 ($P < 0.05$).

고 찰

Ascochlorin이 곰팡이로부터 추출된^{14,15)} 이후 여러 종류의 ascochlorin 유도체가 합성되었고 이들의 탄수화물 및 지질 대사에 대한 연구는^{16-18,24)} 당뇨병을 포함한 대사증후군 관련 질환의 치료에 효과가 있을 수 있음을 암시한다. AS-6은 ascochlorin의 장흡수율을 개선시킨 4-O-carboxymethylated 유도체로 Hosokawa 등에 의해 합성되었다¹⁸⁾. AS-6는 정상 쥐와 스트렙토조토신으로 당뇨병이 유발된 쥐에서 혈당강하효과와 인슐린의 작용을 강화시키는 효과가 있을 뿐만 아니라 인슐린저항성이 있는 db/db 마우스에서도 인슐린 감수성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다^{18,19)}. 더욱이 최근 Togashi 등은 AS-6가 핵수용체 PPAR α 및 PPAR δ 에는 작용하지 않지만 PPAR γ 에 강력한 리간드로 작용하는 것으로 보고하여 AS-6가 대사증후군과 관련된 질환에 치료 물질로서 사용될 가능성이 있음을 제시하였다²³⁾. PPAR γ 는 혈관세포에서 항염증작용 및 혈관평활근세포의 증식을 억제하여 죽상동맥경화증의 발병을 억제하는 기능을 가진다^{8,9,25)}. Wang 등은 혈관내피세포에 PPAR γ 를 과발현 시키면 NF- κ B 활성을 억제하여 세포부착물질의 발현을 감소시킴을 보고하였다⁸⁾. 또한 혈관평활근세포에서 PPAR γ 리간드는 NF- κ B 활성을 억제하여 MCP-1과 같은 혈관염증매개 물질의 발현을 감소시키는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 저자들은 본 연구를 통해 새로이 PPAR γ 리간드로 밝혀진 AS-6가 혈관평활근세포에서 NF- κ B 활성을 억제하여 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현을 감소시키는 작용이 있음을 확인하였다.

내피세포의 손상에 따른 염증세포와 혈관세포간의 염증반응은 초기 죽상동맥경화증의 중요한 병태생리이다^{1,2)}. 염증세포로부터 분비된 종양괴사인자 - 알파와 같은 염증성 사이토카인들은 혈관평활근세포의 단백질 발현 양상에 변화를 일으킨다. 종양괴사인자 - 알파에 의해 활성된 혈관평활근세포는 NF- κ B 경로를 통해 MCP-1과 VCAM-1의 발현을 증가시켜 죽상동맥경화증의 진행을 가속화 시킨다^{4,5)}. 본 연구에서 AS-6 및 rosiglitazone과 pioglitazone은 종양괴사인자 - 알파에 의한 NF- κ B의 활성을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. MCP-1과 VCAM-1의 발현은 AS-6 및 rosiglitazone과 pioglitazone에 의해 모두 억제되었으나 동일 용량에서 AS-6가 rosiglitazone 및 pioglitazone보다 MCP-1과 VCAM-1을 강력히 억제함을 확인하였다.

더욱이 저자들은 본 연구를 통해 종양괴사인자 - 알파에 의해 유발된 fractalkine의 발현을 억제하는 데에는 rosiglitazone과 pioglitazone은 효과가 없는데 반하여 AS-6는 용량 의존적으로 억제함을 확인하였다. 최근 알려진 fractalkine은 CX3C 계열에 속하는 chemokine으로²⁷⁾ 혈관내피세포, 상피세포, 신경세포 및 대식세포에서 발현되어 chemo-

ttractant의 기능뿐만 아니라 세포부착물질(adhesion molecule)의 기능을 가진다²⁸⁻³¹⁾. 현재까지의 연구에 의하면 fractalkine은 초기 죽상경화증 병변에서 발현되어 다른 chemokine 및 세포부착물질과 함께 동맥경화증의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다^{32,33)}. 최근에는 fractalkine이 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파에 의한 NF-κB 활성에 의해 발현이 촉진되어 혈관평활근세포의 증식을 유도함이 보고되었다^{6,34)}. 또한 fractalkine 수용체(CX3CR1)가 knock out된 마우스는 죽상반 형성이 감소되어 있음이 보고되었고^{32,35)} Moatti 등은 fractalkine 수용체의 유전자 다양성이 있는 사람에서 관상동맥질환의 발생률이 감소함을 보고하였다³³⁾. 이러한 결과들과 함께 본 연구에서 나타난 혈관평활근세포에서 AS-6의 fractalkine 발현의 억제 결과는 AS-6가 다른 PPAR γ 리간드보다 우수한 항동맥경화 효과를 나타낼 수 있음을 암시한다.

본 연구에서 AS-6는 염증매개 전사인자인 NF-κB의 활성을 다른 합성 PPAR γ 리간드보다 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 죽상동맥경화증의 발병에 산화스트레스와 전사인자 NF-κB의 활성이 관여함은 잘 알려진 사실이다^{36,37)}. 종양괴사인자-알파와 같은 사이토카인에 의해 혈관평활근세포에서 산화스트레스가 유발되면 염증매개성 전사인자인 NF-κB가 활성되고 VCAM-1, MCP-1 및 fractalkine과 같은 염증매개물질의 발현이 증가하게 된다³⁻⁶⁾. 결과적으로 혈관평활근세포의 증식과 이주가 증가하여 죽상동맥경화증의 발생을 가속화하게 된다. 따라서 본 연구에서 나타난 AS-6의 혈관평활근세포에서 항염증효과가 rosiglitazone이나 pioglitazone보다 우수하게 나타난 것은 보다 강력한 NF-κB 활성 억제 효과에서 기인하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면, 최근 새로이 PPAR γ 리간드로 밝혀진 AS-6는 혈관평활근세포에서 fractalkine 및 MCP-1과 VCAM-1의 발현을 성공적으로 억제하여 항염증작용 및 항동맥경화 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서 향후 AS-6의 항동맥경화 효과를 동물실험을 통해 검증하고 아울러 독성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 나아가 대사증후군의 새로운 치료제로 사용되기 위해서는 동물실험 결과를 바탕으로 전임상 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 염증세포와 혈관세포 간의 염증반응은 죽상동맥경화증의 중요한 병태생리이다. 특히 사이토카인에 의해 활성화된 혈관평활근세포는 fractalkine과 MCP-1 및 VCAM-1과 같은 염증매개성 물질의 발현을 증가시켜 죽상동맥경화증의 진행을 가속화시킨다. 혈관평활근세포에서 핵수용체 PPAR γ 는 NF-κB 활성을 억제하여 이러한 염증반응을 완화하는 작용을 한다. 저자들은 최근 새로이 PPAR γ 리

간드로 밝혀진 ascochlorin-6 (AS-6)가 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파에 의한 NF-κB의 활성에 미치는 효과를 알아보고 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현에 미치는 효과를 평가하였다.

방법: 실험에 사용된 혈관평활근세포는 백서의 대동맥에서 분리하여 배양하였다. AS-6가 fractalkine과 VCAM-1의 발현에 미치는 효과를 평가하기 위해서 웨스턴 블로트를 하였다. AS-6가 MCP-1 발현에 미치는 효과를 평가하기 위해서 노던 블로트를 하였다. AS-6의 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현억제 효과가 종양괴사인자-알파에 의해 증가된 NF-κB 활성을 억제하여 이루어지는 것을 확인하기 위해 겔지연 분석법을 시행하였다.

결과: 혈관평활근세포에 종양괴사인자-알파를 처리한 결과 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현이 현저히 증가하였다. AS-6는 종양괴사인자-알파에 의해 유도된 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현을 현저히 억제하였다. 겔지연 분석결과를 통해 AS-6의 fractalkine, MCP-1 및 VCAM-1의 발현 억제 효과는 종양괴사인자-알파에 의한 NF-κB 활성을 억제함으로써 이루어짐을 확인하였다.

결론: 본 연구를 통해 AS-6는 혈관평활근세포에서 항염증작용을 가짐으로써 항동맥경화 효과가 있을 수 있음을 알 수 있었다. AS-6가 다른 PPAR γ 리간드처럼 대사증후군의 치료에 유용하게 사용될 수 있도록 향후 동물실험 및 전임상 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Russel Ross: *The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990s.* Nature 362:801-809, 1993
- Steinberg DS: *Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime.* Nat Med 8:1211-1217, 2002
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG: *Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies.* Nat Med 8:1249-1256, 2002
- Barks JL, McQuillan JJ, Iademarco MF: *TNF-alpha and IL-4 synergistically increase vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured vascular smooth muscle cells.* J Immunol 159:4532-4538, 1997
- Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Perez F, Diaz C, Hernandez G, Egido J: *HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis.* J Am Coll Cardiol 32:2057-2064, 1998
- Chandrasekar B, Mummidis S, Perla RP, Bysani S, Duliu NO, Liu F, Melby PC: *Fractalkine (CX3CL1)*

- stimulated by nuclear factor kappaB (*NF-kappaB*)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* 373:547-558, 2003
7. Spiegelman BM: PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507-514, 1998
8. Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM, Stemerman MB: Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277:34176-34181, 2002
9. Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B: The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 8:422-430, 2002
10. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE: Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:365-371, 2001
11. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106:523-531, 2000
12. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA: Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 101:1311-1318, 2000
13. Roberts AW, Thomas A, Rees A, Evans M: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in atherosclerosis: current evidence and future directions. *Curr Opin Lipidol* 14:567-573, 2003
14. Tamura G, Suzuki S, Takatsuki A, Ando K, Arima K: Ascochlorin, a new antibiotics, found by the paper-disc agar-diffusion method. I. Isolation, biological and chemical properties of ascochlroin. (Studies on antiviral and antitumor antibiotics. I). *J Antibiot* 21:539-544, 1968
15. Nawata Y, Ando K, Tamura G, Arima K, Iitake Y: The molecular structure of ascochlorin. *J Antibiot* 22: 511-512, 1969
16. Hosokawa T, Sawada M, Ando K, Tamura G: Enhanced excretion of fecal neutral sterols and the hypercholesterolemic properties of 4-O-methylascochlorin. *Agric Biol Chem* 44:2461-2468, 1980
17. Hosokawa T, Sawada M, Ando K, Tamura G: Alteration of cholesterol metabolism by 4-O-methylascochlorin in rats. *Lipids* 16; 433-438, 1981
18. Hosokawa T, Ando K, Tamura G: An ascochlorin derivative, AS-6 potentiates insulin action in streptozotocin diabetic mice and rats. *Agric Biol Chem* 46: 775-781, 1982
19. Hosokawa T, Ando K, Tamura G: An ascochlorin derivative, AS-6 reduces insulin resistance in the genetically obese diabetic mice. *Diabetes* 34:267-274, 1985
20. Magae J, Suzuki S, Nagai K, Yamasaki M, Ando K, Tamura G: In vitro effects of an antitumor antibiotic, ascofuranone, on the murine immune response system. *Cancer Res* 46:1073-1078, 1986
21. Magae J, Hayasaki J, Matsuda Y, Hotta M, Hosokawa T, Suzuki S, Nagai K, Ando K, Tamura G: Antitumor and antimetastatic activity of an antibiotic, ascofuranone and activation of phagocytes. *J Antibiot* 40:959-965, 1987
22. Magae J, Hosokawa T, Ando K, Nagai K, Tamura G: Antitumor protective property of an isoprenoid antibiotic, ascofuranone. *J Antibiot* 35:1547-1552, 1982
23. Togashi M, Masuda H, Kawada T, Tanaka M, Saida K, Ando K, Tamura G, Magae J: PPARgamma activation and adipocyte differentiation induced by AS-6, a prenyl-phenol antidiabetic antibiotic. *J Antibiot* 55: 417-422, 2002
24. Hosokawa T, Okutomi T, Sawada M, Ando K, Tamura G: Unusual concentration of urine and prevention of polydipsia by fungal prenylphenols in DOCA hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 69:429-438, 1981
25. Benson S, Wu J, Padmanabhan S, Kurtz TW, Persaudsingh HA: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma expression in human vascular smooth muscle cells: inhibition of growth, migration, and c-fos expression by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activator troglitazone. *Am J Hypertens* 13:74-82, 2000
26. Hattori Y, Matsumura M, Kasai K: Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 58:186-195, 2003
27. Burke-Gaffney A, Brooks AV, Bogle RG: Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. *Vascul*

- Pharmacol* 38:283-292, 2002
28. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.* *Nature* 85:640-644, 1997
29. Ahn SY, Cho CH, Park KG, Lee HJ, Lee S, Park SK, Lee IK, Koh GY: *Tumor necrosis factor-alpha induces fractalkine expression preferentially in arterial endothelial cells and mithramycin A suppresses TNF-alpha-induced fractalkine expression.* *Am J Pathol* 164:1663-1672, 2004
30. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L: *Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia.* *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10896-10901, 1998
31. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR: *The trans- membrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo.* *Am J Pathol* 158:855-866, 2001
32. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF: *Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis.* *J Clin Invest* 111:333-340, 2003
33. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel-W, Seknadji P, McDermott DH, Debre P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadiere C: *Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease.* *Blood* 97: 1925-1928, 2001
34. Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS: *Inhibition by pentoxifylline of TNF-alpha- stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-kappa B down- regulation.* *Br J Pharmacol* 138:950-958, 2003
35. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z: *Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice.* *Circulation* 107:1009-1016, 2003
36. Yokoyama M: *Oxidant stress and atherosclerosis.* *Curr Opin Pharmacol* 4:110-115, 2004
37. Bourcier T, Sukhova G, Libby P: *The Nuclear Factor kappa-B Signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis.* *J Biol Chem* 272:15817-15824, 1997