

백서의 혈관평활근세포에서 알파-리포산(alpha-lipoic acid)이 종양괴사인자-알파에 유도된 Fractalkine 발현에 미치는 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실¹, 소아과학교실², 경북대학교 의과대학 내과학교실³

박근규¹ · 김혜순¹ · 류성열¹ · 남창욱¹ · 최병규² · 정의달³ · 김정국³ · 김보완³ · 이인규³

Alpha-Lipoic acid Inhibits TNF- α -Induced Fractalkine Expression in Rat aortic Smooth Muscle Cells

Keun-Gyu Park¹, Hye-Soon Kim¹, Seong-Yeol Ryu¹, Chang-Wook Nam¹,
Byung Kyu Chae², Eui-Dal Jung³, Jung-Guk Kim³, Bo-Wan Kim³ and In-Kyu Lee³

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

Department of Pediatrics², Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Department of Internal Medicine³, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

- Abstract -

Background: The induction of vascular inflammation via the proinflammatory cytokine/nuclear factor (NF)- κ B pathway is one of the key mechanisms in the development and progression of atherosclerosis. Accumulating evidence suggests a recently identified chemokine, fractalkine, is involved in arterial inflammation and atherogenesis; however, few studies have examined the effects of pharmacological agents on this process. The purposes of this study were to determine if alpha-lipoic acid (ALA) inhibits the expression of tumor necrosis factor (TNF)- α -stimulated fractalkine in vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Methods: Rat VSMCs were isolated and cultured. Northern and Western blot analyses were performed to evaluate the effects of ALA on the expression of TNF- α -stimulated fractalkine in VSMCs. A gel shift assay was performed to examine the mechanism by which ALA inhibits the expression of fractalkine.

Results: TNF- α markedly induced the expression of fractalkine in primary cultured VSMCs. ALA inhibited the expression of TNF- α -stimulated fractalkine in cultured VSMCs. The result of the gel shift assay suggested the inhibitory effects of AS-6 on the expression of TNF- α -stimulated fractalkine were mediated via the NF- κ B pathway.

Conclusion: This study has shown that ALA has anti-inflammatory effects on VSMCs, which are mediated by the inhibition, at least in part, of the NF- κ B dependent inflammatory signal-stimulated expression of fractalkine. Our data suggest the possibility that antioxidants, such as ALA, inhibit the NF- κ B pathway, which may be used to prevent the development and progression of atherosclerosis (*J Kor Diabetes Assoc* 29:409~417, 2005).

Key Words: Alpha-lipoic acid, Atherosclerosis, Fractalkine, NF- κ B, Vascular smooth muscle cell

서 론

비만, 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 등의 질환에서는 죽상

동맥경화증과 같은 혈관 합병증의 발생빈도가 높다^{1,2)}. 이들 질환에서는 산화스트레스가 증가되어 있고, 증가된 산화스트레스는 혈관내피세포 및 혈관평활근세포의 염증반응에

중요한 역할을 하는 전사인자 nuclear factor (NF)-kB를 활성화하여 혈관세포부착물질 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1), 세포간유착물질 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 및 단핵구 주화성 인자 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 등의 발현을 증가시킨다³⁻⁵⁾. 결과적으로 혈관평활근세포는 급속히 증식하게 되며 지방반은 세포성분이 증가된 병변으로 발전하게 된다. 한편으로는 활성화된 혈관평활근세포는 콜라겐, 엘라스틴 (elastin), 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan) 등과 같은 세포외기질을 생산하여 죽상경화반 (atheromatous plaque)의 부피를 더욱 증가시킨다⁶⁾. 따라서, 혈관세포의 염증반응은 비만, 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 등의 질환에서 죽상동맥경화증의 발생에 중요한 병태생리이다.

최근 연구에 의하면, 혈관세포의 염증반응에 fractalkine이라는 chemokine이 중요한 역할을 한다는 것이 알려지면서 죽상동맥경화증의 병태생리에 있어 fractalkine의 역할에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. fractalkine은 CX3C 계열에 속하는 chemokine으로⁷⁾ 혈관내피세포, 상피세포, 신경세포 및 대식세포에서 발현되어 chemoattractant의 기능뿐만 아니라 세포부착물질 (adhesion molecule)의 기능을 가진다⁸⁻¹¹⁾. 현재까지의 연구에 의하면 fractalkine은 초기 죽상경화증 병변에서 발현되어 다른 chemokine 및 세포부착물질과 함께 동맥경화증의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{12,13)}. 최근 Chandrasekar 등은 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파에 의한 NF-kB 활성에 의해 fractalkine의 발현이 촉진되고 증가된 fractalkine의 발현으로 혈관평활근세포의 증식이 유도됨을 보고하였다¹⁴⁾. 또한 Lesnik 등과 Comadiere 등은 fractalkine 수용체 (CX3CR1)가 knock out된 마우스는 죽상반 형성이 감소됨을 보고하였고^{12,15)} Moatti 등은 fractalkine 수용체의 유전자 다양성이 있는 사람에서 관상동맥질환의 발생률이 감소함을 보고 하였다¹³⁾. 따라서, 혈관세포에서 fractalkine 발현을 억제할 수 있는 약제는 혈관의 염증반응을 감소시킴으로써 죽상동맥경화증의 발생을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

알파-리포산 (alpha-lipoic acid)은 thiol 계열에 속하는 항산화제로서¹⁶⁾ 당뇨병환자의 말초신경병증의 치료제로 널리 사용되고 있다¹⁷⁾. 알파-리포산은 히드록시 라디칼 (hydroxyl radical), 하이포아염소산 (hypochlorous acid)과 단일항 산소 (singlet oxygen)을 제거하며 철, 구리등과 결합하여 퀄레이트 화합물을 형성한다^{18,19)}. 또한 알파-리포산은 체내에 흡수되어 환원형인 디하드로리포산 (dihydrolipoic acid, DHLA)으로 변환되어 더 강력한 항산화효과를 가지는데, DHLA는 하이포아염소산과 과산화 라디칼 (peroxyl radical) 그리고 히드록시 라디칼을 제거할 뿐만 아니라, 다른 항산화제인 토코페롤 (tocopherol), 아스코르빈산 (ascorbic acid), 글루타티온 (glutathione), thioredoxin을 환원형으로 변화시켜 항

산화 효과를 증가시킨다^{18,19)}. 최근의 연구에 의하면 알파-리포산은 항산화 작용 외에도 산화스트레스에 의해 활성화된 전사인자 NF-kB를 억제하여 VCAM-1, ICAM-1 및 MCP-1의 발현을 억제하여 혈관세포에서 염증반응을 완화 하는 것으로 알려져 있다^{20,21)}.

이에 저자들은 알파-리포산이 혈관평활근세포에서 fractalkine의 발현에 미치는 효과를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

헝fractalkine 항체 및 유전자재조합 종양괴사인자-알파는 R&D system (Minneapolis, MN)에서 구입하였고, NF-kB 억제제인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)와 항actin 항체는 Sigma (Saint Louis, Mo)에서 헝rabbit 항체는 Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)에서 구입하였다. 방사선 표지 소식자 (radiolabelled probe, [α -³²P]dCTP, [γ -³²P]dATP)는 Amersham Bioscience에서 구입하였다. 실험에 사용된 알파-리포산은 Viatris GmbH & Co. KG (Frankfurt, Germany)로부터 기증받아 사용하였다.

2. 세포 배양

혈관평활근세포는 Sprague-Dawley 백서 (280~320g)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 80에서 90% 가량 자랐을 때 0.5% FBS DMEM 배지에서 24시간동안 배양하여 세포들을 휴지기로 들어가게 하였다. 종양괴사인자-알파 (5 ng/mL)를 처리하기 전 1시간 동안 알파-리포산을 처리하고 각 실험에 필요한 조건을 주어 fractalkine 발현 변화를 관찰하였다.

3. NF-kB decoy의 제작

전사인자 NF-kB의 DNA 결합부위 (밀줄로 표시)를 포함하는 NF-kB decoy 서열은 다음과 같다. NF-kB decoy, 5'-GGATCCGGGGACTTCCCGCACAAAGTGCAGG-3'; Mismatched NF-kB decoy, 5'GGA-TCCCTATAACTTCCCGCACAAAGTGCAGGAAAG TTATAG-3'. 각각의 oligo를 물에 녹인 후 80°C에서 5분간 가열한 후 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 이후 T₄ ligase를 넣고 overnight ligation 시킨다. Ligation이 되었는지를

전기영동을 하여 확인하고 ligation이 90% 이상 되었으면 phenol/chloroform으로 추출하여 oligo를 회수하여 적당한 양의 물에 녹인 후 실험에 사용하였다.

4. 노던 블롯 (Northern blot analysis)

노던 블롯에 사용된 fractalkine에 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 Hyb™ 용액에서 2시간 동안 65 °C에서 보합결합 (hybridization)시킨 후 mRNA 발현을 밀도계측기 (densitometer)를 이용하여 분석하였다.

5. 웨스턴 블롯 (Western blot analysis)

IPH 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 100 μ M PMSF), 1 μ g/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 항체에서 반응시킨 후, horseradish peroxidase-conjugated 이차 항체 (goat 항체)에 반응시켰다. ECL plus (Amersham Biosciences, Little Chalfnot, UK)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. Membrane을 항actin 항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

6. 겔 지연 분석법 (Gel mobility shift assay)

혈관평활근세포가 80에서 90% 수준으로 배양되었을 때 차가운 PBS 용액으로 두 번 세척 후 세포를 모았다. 이 세포들을 400 μ L의 ice-cold buffer A (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 10 μ g/ μ L aprotinin 및 10 μ g/ μ L leupeptin)에서 균질화 시킨 후 얼음 위에서 15분 동안 방치하였다. 이 세포를 NP-40 25 μ L로 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 혼란 추출물로 수집하였고 혼란 단백질의 양은 단백 분석 키트 (Bio-Rad, Richmond, CA)로 측정하였다.

NF- κ B에 대한 방사선 표지 소식자 (5'-AGTTGAGGG-GACTTCCCAGGC-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 혼란 추출물 6 μ g, poly (dI:dC) 100 μ g/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 템침 DNA를 사용하였다. 반응을 시킨 후 샘플을 0.5×TRIS-borate-EDTA buffer 내에서 4% 천연 폴리아리아미드 겔에 접종한 후 150 볼트에서 2시간 동안 전기영동을 시행한 후 분석하였다.

7. 통계처리

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

결과

1. 백서의 혈관평활근세포에서 fractalkine 단백질의 발현

백서의 혈관평활근세포에 종양괴사인자-알파를 처리하지 않은 상태에서 fractalkine 단백질의 발현은 아주 약하게 측정되었다. 종양괴사인자-알파 (5 ng/mL)를 처리하고 시간대별로 fractalkine 단백질의 발현을 측정한 결과 fractalkine 단백질 발현은 종양괴사인자-알파에 노출된 시간이 많을수록 증가하였다 (Fig. 1A). 또한 혈관평활근세포에서 fractalkine 단백질의 발현은 종양괴사인자-알파에 용량의존적으로 증가하였다 (Fig. 1B).

2. 알파-리포산이 fractalkine mRNA 발현 및 단백질 발현에 미치는 효과

알파-리포산이 백서의 혈관평활근세포에서 fractalkine 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 노던 블롯 분석과 웨스턴 블롯 분석을 시행하였다. 우선 백서의 혈관평활근세포에 알파-리포산을 각기 다른 용량으로 1시간 동안 전처치를 하고 종양괴사인자-알파 (5 ng/mL)를 처리하여 fractalkine 발현 변화를 관찰하였다. 백서의 혈관평활근세포에 알파-리포산을 전처치한 결과 종양괴사인자-알파에 의해 유도된 fractalkine mRNA의 발현과 단백질의 발현이 용량의존적으로 감소하였다 (Fig. 2 & 3).

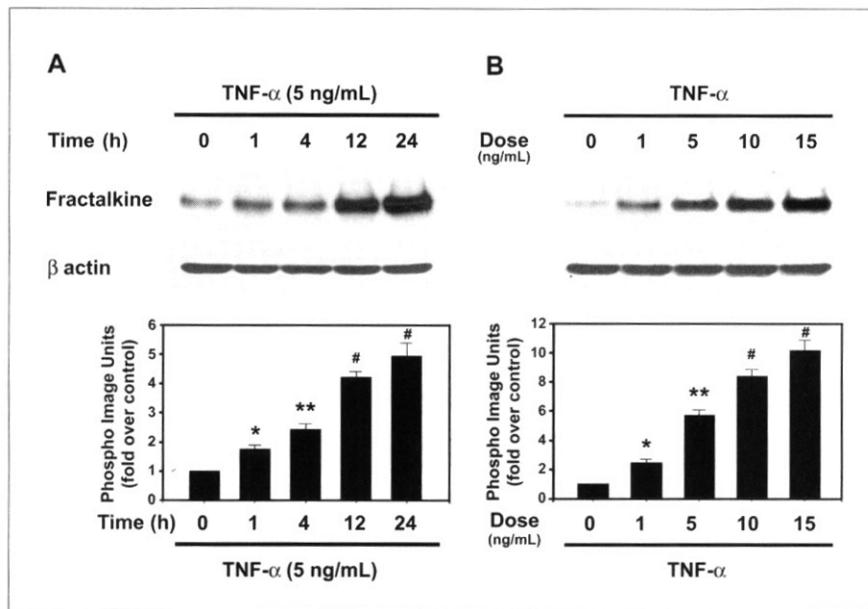


Fig. 1. TNF- α -induced fractalkine expression in primary cultured VSMCs. A, Western blot analysis of the time-course expression of fractalkine in TNF- α stimulated VSMCs. VSMCs were incubated for the indicated times with TNF- α (5 ng/mL) after serum starvation for 48h. B, Western blot analysis of the dose response expression of fractalkine in TNF- α stimulated VSMCs. VSMCs were incubated with the indicated amounts for 24 h after serum starvation for 48h. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 separate measurements (lower). Statistical significance was determined as * P < 0.05, ** P < 0.01 and # P < 0.005 compared with basal expression.

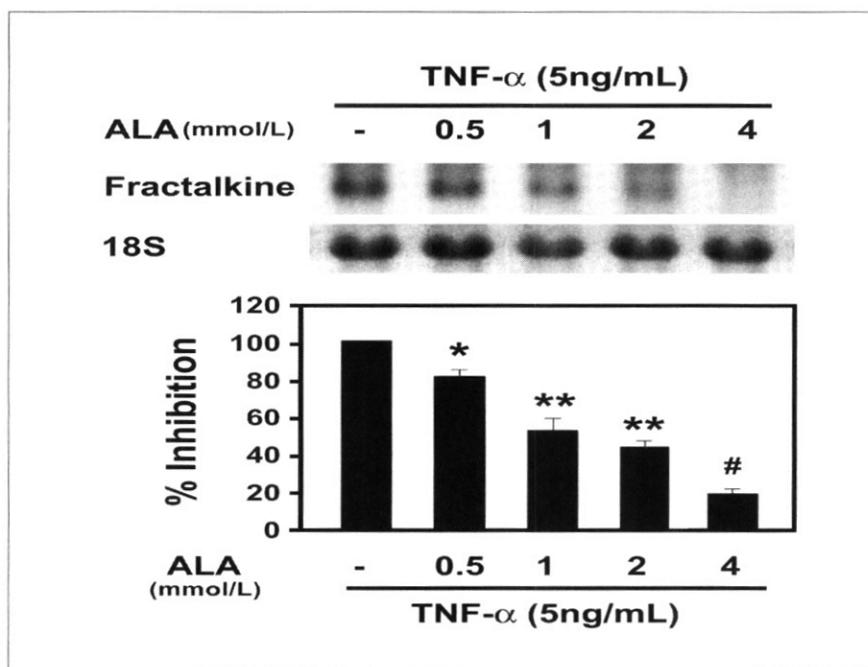


Fig. 2. Effect of α -lipoic acid on TNF- α stimulated fractalkine mRNA expression. Northern blot analysis of fractalkine mRNA expression. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 h with or without pretreatment with α -lipoic acid at the indicated dose for 1 h. Data are expressed as the mean \pm SEM of 3 separate measurements (lower). Statistical significance was determined as * P < 0.05, ** P < 0.01 and # P < 0.005 compared with TNF- α only.

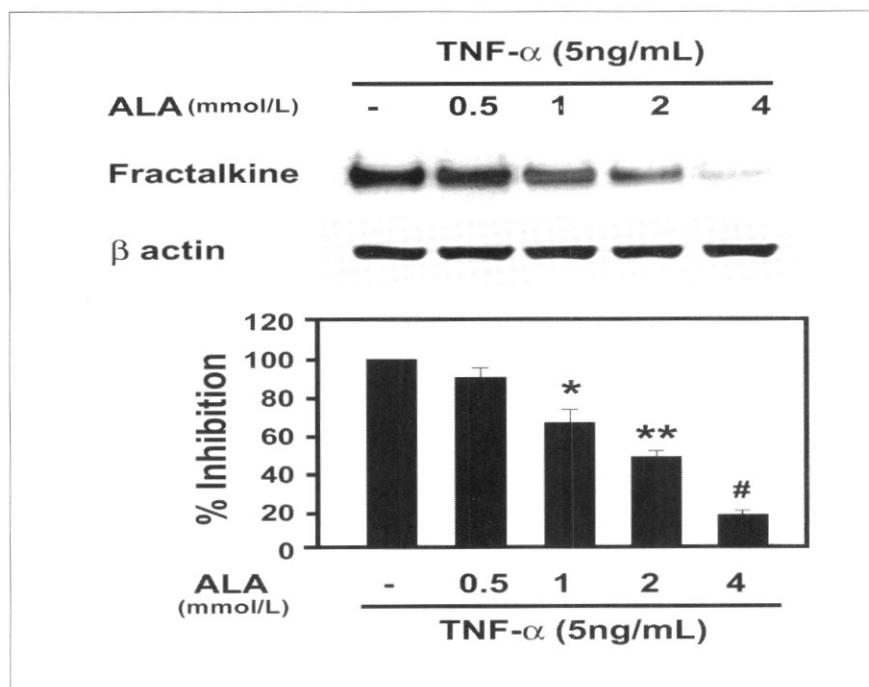


Fig. 3. Effect of α -lipoic acid on TNF- α stimulated fractalkine protein expression. Western blot analysis of fractalkine protein expression. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 h with or without pretreatment with α -lipoic acid at the indicated dose for 1 h. Data are expressed as the mean \pm SEM of 3 separate measurements (lower). Statistical significance was determined as * P < 0.05, ** P < 0.01 and # P < 0.005 compared with TNF- α only.

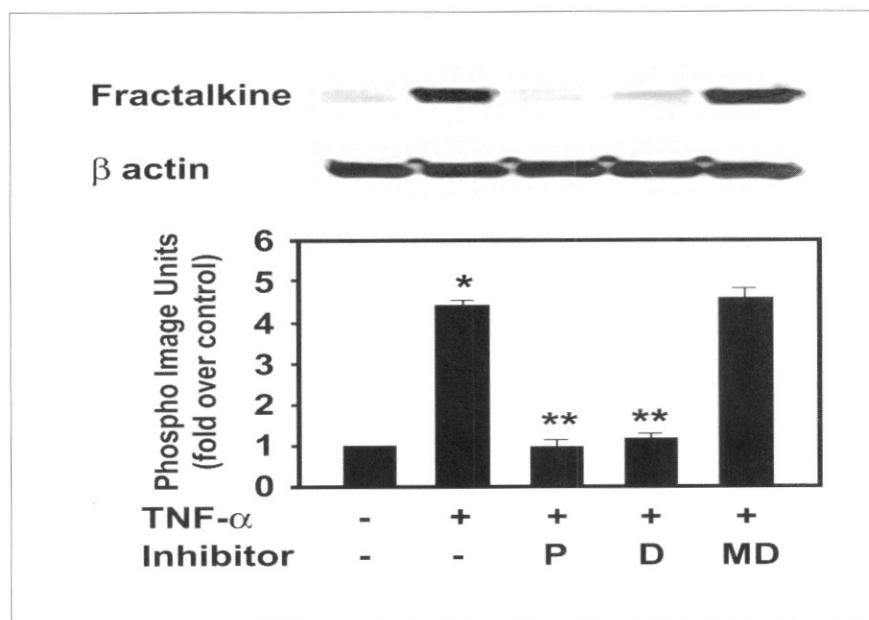


Fig. 4. TNF- α -stimulated fractalkine expression is mediated by NF- κ B pathway. Western blot analysis of VSMCs treated with either NF- κ B inhibitor or decoy ODN. VSMCs were incubated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 h in the presence of either PDTC (P, 100 mol/L), NF- κ B decoy ODNs (D, 100 nmol/L) or mismatched NF- κ B decoy ODN (MD, 100 nmol/L). Data are presented as the mean \pm SEM of 3 separate measurements (lower). Statistical significance was determined as * P < 0.005 compared with basal expression and ** P < 0.005 compared with TNF- α only.

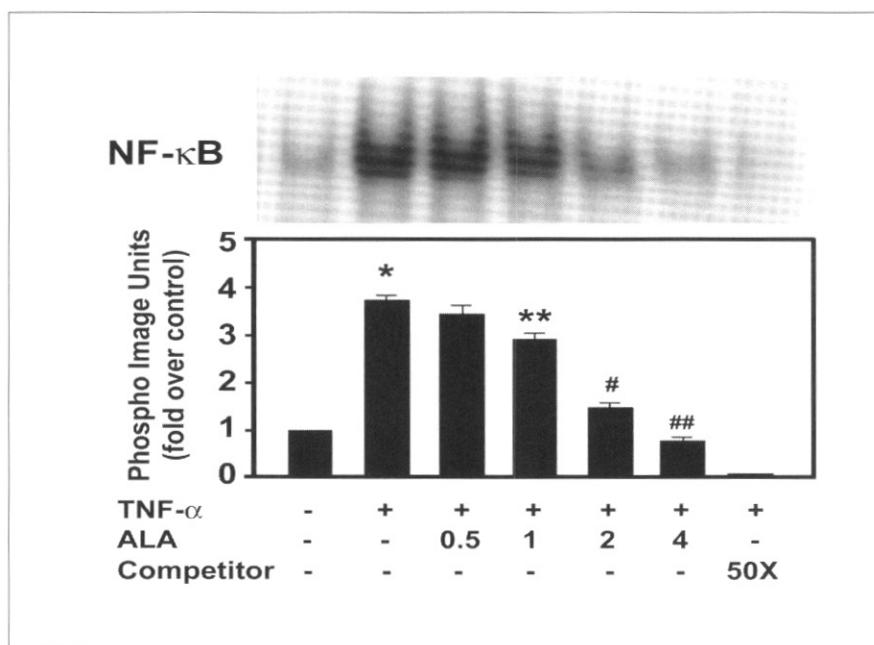


Fig. 5. Effect of α -lipoic acid on TNF- α stimulated NF- κ B DNA binding activity. Typical gel shift assay of α -lipoic acid treated VSMC lysates. VSMCs were treated with TNF- α (5 ng/mL) for 24 h with or without pretreatment of the indicated dose of α -lipoic acid for 1 h. Data are presented as the mean \pm SEM of 3 separate measurements (lower). Statistical significance was determined as * P < 0.005 compared with control, ** P < 0.05, # P < 0.01 and ## P < 0.005 compared with TNF- α only.

3. 종양괴사인자-알파의 NF- κ B 활성을 통한 fractalkine 발현

종양괴사인자-알파에 의해 증가된 fractalkine 발현이 전사인자 NF- κ B의 활성을 통해 일어나는지를 알아보기 위해 NF- κ B 억제제인 PDTC (100 μ mol/L)와 NF- κ B decoy로 NF- κ B의 활성을 억제하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 PDTC와 NF- κ B decoy는 종양괴사인자-알파에 의해 유도된 fractalkine 단백질의 발현을 저지치 수준으로 억제하였다. 불일치 NF- κ B decoy의 경우 종양괴사인자-알파에 의한 fractalkine 발현에 아무런 효과가 없었다.

4. 알파-리포산이 NF- κ B 활성에 미치는 효과

알파-리포산의 fractalkine 발현억제 효과가 종양괴사인자-알파에 의해 증가된 NF- κ B 활성을 억제하여 이루어지는 것을 확인하기 위해 겔지연 분석법을 시행하였다. 종양괴사인자-알파 (5 ng/mL)는 NF- κ B의 DNA 결합능력을 현저히 증가시켰고 알파-리포산은 NF- κ B의 DNA 결합능력을 용량의존적으로 억제시켰다 (Fig. 5). NF- κ B에 대한 방사선을 표지하지 않은 소식자로 경쟁적으로 반응시켜 단백질-DNA 복합체가 NF- κ B에 대해 특이적임을 확인하였다 (Fig. 5).

고 칠

비만, 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 등에 의해 죽상동맥경화증을 일으키는 기전으로 산화스트레스의 증가와 이에 따른 전사인자 NF- κ B의 활성이 중요한 매개체로 알려지면서 죽상동맥경화증의 예방을 위해 산화스트레스를 줄임과 동시에 NF- κ B의 활성을 억제할 수 있는 약제에 대한 연구가 많이 진행되고 있다²²⁻²⁶. 저자들은 본 연구를 통하여 당뇨병환자의 말초신경병증의 치료제로 사용되고 있는 알파-리포산이 기존에 알려진 항산화 효과에 더하여 전사인자 NF- κ B의 활성을 억제하여 백서의 혈관평활근세포에서 fractalkine의 발현을 억제함을 확인하여 알파-리포산이 죽상동맥경화증의 예방 혹은 치료에 사용될 가능성이 있음을 보고하는 바이다.

최근에 발견된 fractalkine은 CX3C chemokine에 속하는 염증 매개 물질로 종양괴사인자-알파와 같은 염증유발 사이토카인에 의해 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다^{14,27}. 일반적으로 chemokine이 세포에서 용해성 물질 (soluble molecule)로 분비되어 염증세포를 불러 모으는 기능을 하듯이 fractalkine도 MCP-1과 같은 chemokine처럼 이러한 chemotaxis의 기능이 있어 fractalkine 수용체인 CX3CR1을 발현하는 단핵구, T세포, natural killer cell들을 불러모아 염증반응을 유발한다. 또한 fractalkine은 다른 chemokine과는

달리 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 상피세포 및 신경세포 등에서 세포막에 부착된 형태로 존재하여 fractalkine 수용체인 CX3CR1을 표현하는 세포와 결합함으로써 VCAM-1이나 ICAM-1처럼 세포결합물질(adhesion molecule)의 기능도 나타낸다⁸⁻¹¹⁾. 앞서 언급한 바와 같이 fractalkine은 염증매개성 전사인자인 NF-κB를 활성 시키는 사이토카인인 종양괴사인자-알파, 인터루킨 및 인터페론-감마 등에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 그러나 현재까지 혈관평활근세포에서 fractalkine의 발현이 NF-κB에 의해 매개됨은 PDTc와 같이 비특이적으로 NF-κB를 억제하는 약제를 통해 알려졌을 뿐 NF-κB를 직접 억제하는 실험기법을 통해 증명된 바는 없다. 본 연구에서는 fractalkine이 종양괴사인자-알파에 의해 발현이 증가함을 확인하고 NF-κB 억제제인 PDTC 뿐만 아니라 NF-κB decoy를 사용하여 NF-κB를 직접 억제한 후 종양괴사인자-알파에 의한 fractalkine 발현 효과가 완전히 차단됨을 확인하였다. 현재까지 연구에 의하면 알파-리포산은 혈관세포에서 전사인자 NF-κB의 활성을 억제하여 혈관세포에서 항염증효과가 있음을 알려져 있으나^{20,21)} 혈관평활근세포에 대한 연구는 미진한 상태이다. 이에 저자들은 본 연구를 통해서 혈관평활근세포에서도 알파-리포산이 종양괴사인자-알파에 의해 활성된 NF-κB-DNA 결합능력을 억제함을 확인하였다. 또한 본 연구에서는 기존에 알려진 알파-리포산의 VCAM-1, ICAM-1 및 MCP-1 등과 같은 혈관염증매개인자의 억제 효과에 추가하여 fractalkine 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 본 연구에서 나타난 알파-리포산의 fractalkine 억제효과는 기준에 보고된 알파-리포산의 항염증효과의 기전과 동일하게 종양괴사인자-알파가 NF-κB 활성을 증가시키는 과정을 차단하여 이루질 것으로 사료된다.

Zhang 등은 통상적인 용량의 알파-리포산을 경구 투여하였을 경우 혈중에 도달될 수 있는 농도를 혈관내피세포에 처리하였을 경우 종양괴사인자-알파에 의해 활성된 NF-κB를 억제하고 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin의 발현을 억제함을 보여 주었다²⁰⁾. 알파-리포산의 약물역동학적 연구결과에 의하면 임상에서 주로 사용되는 용량인 600 mg을 매일 투여할 경우 혈중 농도는 50에서 60 μmol/L에 도달하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 본 연구에서는 이정도 농도의 알파-리포산은 혈관평활근세포에서 fractalkine 발현을 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 현재까지 사람에게 안전성이 입증된 용량은 ALADIN III 연구에서 경구로 하루 1800 mg을 사용한 경우가 있고³⁰⁾ 주사제로 사용할 경우 이보다 더 높은 농도에 도달할 수 있지만 본 연구에서 나타난 알파-리포산이 fractalkine 발현 억제 효과를 보이는 용량은 통상적으로 임상에서 사용되는 용량보다 매우 높은 용량임은 틀림이 없다. 저자들은 과거 알파-리포산을 백서의 복강으로 투여하여 신생내막형성억제 효과를 관찰하였는데, 알파-리포산

25 mg/kg에서 신생내막형성억제가 되었고 100 mg/kg에서 신생내막형성이 완전히 억제됨을 관찰하였다³¹⁾. 그리고 고용량의 알파-리포산에서 특별한 부작용은 관찰되지 않았다. 그러나 동물실험 결과를 그대로 사람에게 적용할 수 없으므로 알파-리포산을 사람에게 전신투여 하였을 경우 어느 정도의 농도에서 죽상동맥경화증을 예방할 수 있는지와 고용량의 투여에 따른 독성에 대한 면밀한 연구가 선행되어야 할 것이다. 아울러, 최근 관상동맥의 재협착을 방지하기 위해 sirolimus나 paclitaxel과 같은 약물을 코팅한 스텐트(drug-eluting stent)가 고용량의 약물을 전신 부작용 없이 국소적으로 필요한 부위에 전달하여 좋은 성적을 보인 점³²⁾을 감안하여 알파-리포산을 이러한 방법으로 손상된 혈관평활근세포에 전달하는 방법 또한 고려되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 알파-리포산은 백서의 혈관평활근세포에 종양괴사인자-알파에 의해 증가된 fractalkine의 발현을 성공적으로 억제하였다. 백서의 혈관평활근세포에서 종양괴사인자-알파는 전사인자 NF-κB의 활성을 통해 fractalkine 발현을 증가시켰고 알파-리포산은 종양괴사인자-알파에 의해 증가된 전사인자 NF-κB의 활성을 억제하였다. 따라서 알파-리포산이 fractalkine의 발현을 억제하는 기전은 염증매개성 전사인자인 NF-κB의 활성억제에 의한 것으로 사료된다. 향후 비만, 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 등과 같이 죽상동맥경화증의 고위험군을 대상으로 알파-리포산의 항동맥경화 치료는 유망하리라 사료되며 이에 대한 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 혈관세포의 염증반응은 죽상동맥경화증의 중요한 병태생리이다. 최근 연구에 의하면, 혈관세포의 염증반응에 fractalkine이라는 chemokine이 중요한 역할을 힘이 보고되어 죽상동맥경화증의 병태생리에 있어 fractalkine의 역할에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 저자들은 알파-리포산이 혈관평활근세포에서 fractalkine의 발현에 미치는 효과를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방법: 실험에 사용된 혈관평활근세포는 백서의 대동맥에서 분리하여 배양하였다. 알파-리포산이 fractalkine의 발현에 미치는 효과를 평가하기 위해서 노던 블롯과 웨스턴 블롯을 하였다. 종양괴사인자-알파가 혈관평활근세포에서 전사인자 NF-κB의 활성을 통해 fractalkine 발현을 유도하는지를 알아보기 위해 NF-κB를 특이적으로 억제할 수 있는 decoy를 제작하였다. 알파-리포산의 fractalkine의 발현억제 효과가 종양괴사인자-알파에 의해 증가된 NF-κB 활성을 억제하여 이루어지는 것을 확인하기 위해 겔지연 분석법을 시행하였다.

결과: 혈관평활근세포에 종양괴사인자-알파를 처리한 결과 fractalkine의 발현이 현저히 증가하였다. 알파-리포산은 종양괴사인자-알파에 의해 유도된 fractalkine의 발현을 현저히 억제하였다. 갤지연 분석결과를 통해 알파-리포산이 fractalkine의 발현을 억제한 기전이 NF-κB 활성을 억제함으로써 이루어짐을 확인하였다.

결론: 본 연구를 통해 알파-리포산이 혈관평활근세포에서 fractalkine의 발현을 억제하여 항염증작용이 있음을 확인할 수 있었다. 알파-리포산과 같이 항산화효과와 더불어 전사인자 NF-κB를 억제할 수 있는 약제들이 죽상동맥경화증의 예방에 유용하게 사용될 수 있기 위해 임상연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KM, Giles WH, Vinicor F, Deedwania PC: *Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications.* *Cardiol Clin* 22:485-504, 2004
2. Prabhakaran D, Anand SS: *The metabolic syndrome: an emerging risk state for cardiovascular disease.* *Vasc Med* 9:55-68, 2004
3. Kunsch C, Medford RM: *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature.* *Circ Res* 85:753-66, 1999
4. Braun M, Pietsch P, Zepp A, Schror K, Baumann G, Felix SB: *Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2568-75, 1997
5. 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* 159:4532-38, 1997
6. Russel R: *The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990s.* *Nature* 362:801-9, 1993
7. Burke-Gaffney A, Brooks AV, Bogle RG: *Regulation of chemokine expression in atherosclerosis.* *Vascul Pharmacol* 38:283-92, 2002
8. 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* 385:640-4, 1997
9. 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* 164:1663-72, 2004
10. 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* 95:10896-901, 1998
11. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR: *The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo.* *Am J Pathol* 158:855-66, 2001
12. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF: *Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis.* *J Clin Invest* 111:333-40, 2003
13. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel-W, Seknadj 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* 97:1925-28, 2001
14. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin 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* 373:547-58, 2003
15. 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* 107:1009-16, 2003
16. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ: *Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant.* *Free Radic Biol Med* 19: 227-50, 1995
17. Ametov AS, Barinov A, Dyck PJ, Hermann R, Kozlova N, Litchy WJ, Low PA, Nehrdich D, Novosadova M, O'Brien PC, Reljanovic M, Samigullin R, Schuette K, Strokov I, Tritschler HJ, Wessel K, Yakhno N, Ziegler D: *The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial.* *Diabetes Care* 26:

770-76, 2003

18. Packer L, Kraemer K, Rimbach G: *Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications.* Nutrition 17:888-95, 2001
19. Lester P, Hans JT: *Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant.* Free Radical Biology & Medicine 20: 625-26, 1996
20. Zhang WJ, Frei B: *Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells.* FASEB J 15:2423-32, 2001
21. Kunt T, Forst T, Wilhelm A, Tritschler H, Pfuetzner A, Harzer O, Engelbach M, Zschaebitz A, Stofft E, Beyer J: *Alpha-lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with advanced glycation end products.* Clin Sci (Lond) 96: 75-82, 1999
22. Yi S, Rodica N, Dian W, Sachin P, Kelly LD, Andrew Z: *Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:739-45, 2001
23. Greene EL, Velarde V, Jaffa AA: *Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cell.* Hypertension 35:942-27, 2000
24. Igarashi M, Takeda Y, Ishibashi N, Takshashi K, Mori S, Tominaga M, Saito Y: *Pioglitazone reduces smooth muscle cell density of rat carotid arterial intima induced by balloon catheterization.* Horm Metab Res 29:444-9, 1997
25. Ronald EL, Stephan G, Xiao-ping X, Simon J, Yasuko K, Linda D, Michael CF, Woerner PM, Willa AH: *Expression and function of PPAR in rat and human vascular smooth muscle cells.* Circulation 101: 1311-8, 2000
26. Ronald EL, Woerner PM, Xiao-ping X, Kristof G, Daniel AW, William C, David F, Willa AH: *Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia.* J Clin Invest 98:1879-905, 1996
27. 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 138:950-8, 2003
28. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T: *Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:34-40, 2004
29. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R: *Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers.* J Clin Pharmacol 43:1257-67, 2003
30. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Hasche H, Lobisch M, Schutte K, Kerum G, Malessa R: *Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid.* Diabetes Care 22:1296-301, 1999
31. 신동우, 이동욱, 이상준, 김혜순, 강효경, 안종덕, 이인규: 백서 혈관평활근 세포에서 α-Lipoic acid가 PAI-1 발현, 세포의 증식, 주유능 및 신생내막 형성억제에 미치는 효과. 당뇨병 25:446-59, 2002
32. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R; RAVEL Study Group: *A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization.* N Engl J Med 346:1773-80, 2002
33. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK, Lee CW, Choi D, Jang Y, Lam R, Weissman NJ, Mintz GS: *A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis.* N Engl J Med 348:1537-45, 2003