

백서 혈관평활근 세포에서 α -Lipoic acid가 PAI-1 발현, 세포의 증식, 주유능 및 신생내막 형성억제에 미치는 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실, 계명대학교 의과대학 의과학 연구소¹

신동우·이동욱·이상준·김혜순·강효경¹·안종덕¹·이인규

The Effect of α -Lipoic Acid on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration, Neointimal Formation and PAI-1 Expression

Dong-Woo Shin, Dong-Wook Lee, Sang-Jun Lee, Hye-Soon Kim, Hyo-Gyoung Kang¹, Jong-Deok Ahn¹, In-Kyu Lee

Department of Internal Medicine, Keimyung University Dongsan Medical Center
Institute for Medical Science, Keimyung University Dongsan Medical Center¹

- Abstract -

Background: Exposure to large amounts of glucose causes a characteristic dysfunction and morphologic changes of the endothelium by an increased production of reactive oxygen species (ROS) in diabetes. The plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), which modulates fibrinolysis and cell migration, may influence proteolysis and neointimal formation in vascular smooth muscle cells (VSMC). Antioxidants have been proposed to inhibit multiple proatherogenic events. This study investigated the effect of α -lipoic acid on PAI-1 expression and VSMC proliferation and migration both *in vivo* and *in vitro*.

Methods: In the *in vitro* study, cultured rat aortic smooth muscle cells (RASMC) were incubated in a medium containing high glucose (22 mM) and 100 nM angiotensin II for 4 hour. After α -lipoic acid treatment, a -migration and growth assay of the RASMC, and a gel mobility shift assay and reporter gene analysis for nuclear factor- κ B (NF- κ B) and northern blot analysis for PAI-1 were performed. In the *in vivo* study, the effect of α -lipoic acid on neointimal hyperplasia in a rat carotid balloon injury model was evaluated.

Results: RASMC migration was inhibited significantly by α -lipoic acid ($p<0.01$), but their proliferation was not inhibited. The NF- κ B DNA binding activity and NF- κ B promoter activity was inhibited by α -lipoic acid significantly ($p<0.01$). α -lipoic acid inhibited PAI-1 mRNA expression by high glucose and angiotensin II in dose dependent manner ($p<0.05$). In the rat carotid artery balloon injury model, neointimal

formation was reduced by α -lipoic acid treatment in a dose dependent manner significantly ($p < 0.01$).

Conclusion: α -lipoic acid suppresses migration, but not proliferation in RASMC. α -lipoic acid also reduce neointima formation in a rat carotid balloon injured model. This effect might be related to the blocking of NF- κ B which increase the expression of the genes associated with atherosclerosis including TNF- α , IL-1, IL-6, endothelin-1, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, tissue factor (J Kor Diabetes Asso 25:446 ~ 459, 2001).

Key Word: Rat aortic smooth muscle cell, Neointimal hyperplasia, Oxidative stress, Nuclear factor- κ B, α -lipoic acid

서 론

동맥경화증의 위험인자인 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등은 산화스트레스를 증가시켜 혈관 내에 동맥경화성 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다^{1~3)}. 이러한 산화스트레스는 산화스트레스에 민감한 전사인자인 nuclear factor-kappa B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1) 등을 활성화시키고 이러한 전사인자에 의해 동맥경화증과 관련되는 여러 유전자의 발현을 증가시킨다^{4~5)}.

산화스트레스가 당뇨병을 비롯한 여러 성인병에서 혈관병변을 일으키는 중요한 매개체로 알려지면서 이런 산화스트레스를 줄일 수 있는 약제에 대한 연구가 많이 진행되고 있다^{6~11)}. 현재까지 알려진 항산화제로는 토코페롤 (tocopherol), 아스코르빈산 (ascorbic acid), 글루타티온 (glutathione), superoxide dismutase, dithiothreitol, N-ethylmaleinimide 등이 있으며^{1,12~13)} 현재 당뇨병 환자의 말초신경병증의 치료제로 사용되고 있는 알파-리포산 (α -lipoic acid, Thioctic acid[®], 6,8-dithiooctanoic acid, 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid)도 강력한 항산화능이 있는 것으로 알려져 있다^{14~20)}.

알파-리포산은 생체 내에서 쉽게 흡수되며, 미토콘드리아에서 탈수소 효소반응을 매개하여 에너지를 생성하는데 조효소로서 필수적인 역할을 한다¹⁵⁾. 알파-리포산은 그 자체보다 환원형인 디하이드로리포산 (dihydrolipoic acid, DHLA)에 의해 더 강력한 항산화 효과를 나타낸다. 알파-리포산의 경우는 히드록시 라디칼 (hydroxyl radical), 하이포아염소산 (hypochlorous

acid)과 단일항 산소 (singlet oxygen)을 제거하며 철, 구리등과 결합하여 킬레이트 화합물을 형성한다. 이에 반해 DHLA의 경우는 하이포아염소산과 과산화 라디칼 (peroxyl radical) 그리고 히드록시 라디칼을 제거할 뿐만 아니라, 다른 항산화제인 토코페롤, 아스코르빈산, 글루타티온, thioredoxin을 환원형으로 변화시켜 항산화 효과를 증가시킨다¹⁶⁾.

알파-리포산은 항산화 작용 외에도 GLUT4를 활성화시켜 인슐린 감수성을 증가시키고²¹⁾ 활성화된 전사인자 NF- κ B를 억제시켜 혈관접착물질인 혈관세포유착분자 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)와 세포간 유착분자 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)을 억제시키는 등³⁾ 다양한 작용이 알려지고 있다. 그러나 아직까지 동맥경화증 등의 혈관병변에서 알파-리포산의 역할에 대한 연구보고는 국내외적으로 미미한 실정이다.

이에 저자들은 산화스트레스가 중요한 병인으로 알려져 있는 동맥경화증에 대한 알파-리포산의 효과를 알아보고자 이 연구를 시작하였다. 알파-리포산이 동맥경화증에 미치는 영향을 알아보기 위해 *In vitro* 실험으로 동맥경화증의 발생과정 중 가장 중요한 역할을 한다고 알려진 혈관 평활근세포를 이용하여 알파-리포산이 NF- κ B 발현에 미치는 효과와 혈관 평활근 세포의 증식속도와 유주능에 미치는 영향을 조사하였으며 이와 동시에 *In vivo* 실험으로 백서의 혈관 손상 모델을 이용하여 알파-리포산이 신생내막 증식에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

실험에 사용한 혈관 평활근세포는 Sprague-Dawley 백서 (200 ~ 250 g)의 흉부대동맥에서 분리하여 사용하였다. 이 혈관 평활근세포를 20% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 배양된 혈관 평활근세포의 확인은 평활근세포 특이 α -actin 단일클론 항체 (Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 염색하여 확인하였다.

배양된 혈관 평활근세포가 100 mm 조직배양접시에 80 ~ 90%가량 자랐을 때 이들 세포를 24시간동안 혈청이 없는 배지에 둔 후 2% serum과 5.5 mmol/L D-glucose를 포함한 정상농도 포도당 배양액과 2% serum과 22 mmol/L D-glucose를 포함한 고농도 포도당 배양액의 조건을 주어 실험하였다. 그리고 안지오텐신 II의 효과를 보기 위해 100 nmol/L의 안지오텐신 II를 고농도의 포도당 배양액에 추가하여 실험을 진행하였다.

2. 노던 블롯 (Northern blot analysis)

노던 블롯에 사용된 PAI-1에 대한 방사선 표지 소식자 (radiolabelled probe)는 [α - 32 P]dCTP를 이용한 임의 프라이머 라벨링법 (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 제작하였다. 상기 처리 후 방사선 표지 소식자는 NAP-5 칼럼 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)에서 정제하였다. 노던 블롯에 사용된 RNA는 RNeasy RNA 추출 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 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 여러 차례 정해진 규칙에 따라 세정을 시행하였다. 이 막을 24 ~ 48시간동안 X선 필름에 노출시킨 후 mRNA발현을 밀도계측기 (densitometer)를 이용하여 분석하였다.

3. 성장속도 분석 (Growth assay)

백서의 대동맥 평활근 세포를 96-well 조직배양접시에 접종시킨 후 앞에서 언급했듯이 정상농도의 포도당, 고농도의 포도당, 고농도의 포도당과 안지오텐신 II의 조건을 주고 배양시킨 후 각각에 알파-리포산 2 mM을 처리하여 다시 3일간 배양하였다. 상기조건에서 배양한 세포의 증식을 알아보기 위해 WST 세포계측 키트 (Wako, Osaka, Japan)를 이용하여 각 well에 WST 10 μ L 씩을 주입한 후 37°C, CO₂ 배양기에서 4시간동안 정색반응을 일으켰다. 그 후 ELISA방법을 사용해 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

4. 유주능 분석 (Migration assay)

챔버 슬라이드에 백서의 대동맥 평활근세포를 배양한 후 80 ~ 90%정도 세포가 자랐을 때 마이크로펩트의 황색 끝부분을 이용하여 직선으로 세포의 일부분을 긁어낸 후 PBS용액으로 두세 차례 세척을 하였다. 각각의 세포에 배양액을 조건별로 처리한 후 60시간동안 세포를 배양하였다. 그 후 세포가 이동한 정도를 디지털 타이저 (WACOM. Co, Japan)를 이용하여 측정한 후 이동한 면적을 계산하고 이를 백분율로 환산하여 비교하였다.

5. NF- κ B 보고 유전자 분석 (NF- κ B reporter gene analysis)

알파-리포산에 의한 NF- κ B의 활성화제 정도를 알아보기 위해 4개의 NF- κ B 결합부위를 가진 luciferase construct인 pNF- κ B-Luc (Clontech, Palo Alto, California, USA)를 백서의 대동맥 평활근세포에 Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)-liposome방법을 이용하여 transfection하였다¹⁷⁾. Transfection 하루 전 날, 6 well plate의 각 well마다 2×10^5 개의 세포를 접종하였다. transfection 24시간 후, 세포를 PBS용액으로 두 번 세척한 후 250 μ L의 Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 가하여 세포 추출물을 얻어서 luciferase 활성도를 luminometer를 이용하여 측정하였다.

6. 겔 지연 분석법 (Gel Mobility Shift Assay)

핵산 추출물 (nuclear extracts)은 전에 기술한 것과 같이 혈관 평활근세포로부터 분리하였다²²⁾. 간단히 기술하면, 백서의 혈관 평활근세포가 80 ~ 90%수준으로 배양되었을 때 차가운 PBS 용액으로 두번 세척 후 모은다. 이 세포들을 400 μ L의 ice-cold buffer A (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 10 μ g/ μ L aprotinin과 10 μ g/ μ L leupeptin)에서 균질화 시킨 후 얼음 위에서 15분동안 방치하였다. 이 세포를 NP-40 25 μ L로 처치 후에 buffer B (20 mmol/L HEPES, 0.4 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT와 1 mmol/L PMSF)에 넣어서 10분동안 12,000 g으로 원심분리를 시행하였다. 원심분리 후 상층액은 핵산 추출물로 수집하였고 핵산 단백질의 양은 단백 분석 키트 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)로 측정하였다.

NF- κ B에 대한 방사선 표지 소식자 (5' -AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3')는 [γ -³²P] ATP와 T₄ polynucleotide kinase를 이용하여 제작하였다. ³²P 표지 소식자는 NAP-5 칼럼에서 정제하였으며 단백질-DNA 반응은 20분 동안 실온에서 시행하였다. 반응 물질은 핵산추출물 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 탐침 DNA를 사용하였다. 반응을 시킨 후 샘플을 0.5 $\times$ TRIS-borate-EDTA buffer내에서 4% 천연 폴리아릴아마이드 겔에 점중한 후 150 볼트에서 2시간 동안 전기영동을 시행한 후 분석하였다.

1) 백서의 혈관손상모델

실험대상으로는 체중 300 g 전후의 수컷 Sprague-Dawley 백서 29마리를 사용하였다. 실험동물은 대조군 4마리와 실험군 25마리로 나누고 4마리는 정상혈관을 얻는 데 사용하였다. 실험군은 다시 투여용량에 따른 변화를 보기 위한 투여용량 변화군 (n=15)과 투여시간에 따른 변화를 보기 위한 투여시간 변화군 (n=10)으로 나누었다. 투여용량 변화군은 알파-리포산

을 각각 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg로 처리한 3군 (n=5)으로 나누어 실험을 진행하였다. 이 군에서는 혈관손상 3일전부터 혈관손상 후 14일까지 백서의 복강을 통해 알파-리포산을 투여하였다. 시간 차이에 의한 실험은 100 mg/kg의 알파-리포산을 이용하였으며 혈관손상 주기 전 3일간만 투여한 손상전 투여군 (n=5)과 혈관손상 준 후 2주간만 투여한 손상 후 투여군 (n=5)으로 나누어 실험을 진행하였다. 그리고 손상 전과 후에 모두 투여한 손상 전후 투여군에 대한 자료는 투여 용량 변화군에서 100 mg/kg로 처리한 군의 실험결과를 같이 사용하였다.

혈관손상 방법은 백서의 복강에 펜토바비탈 (pento-barbital)을 그람 당 0.9 μ L 투여하여 전신마취 시킨 후 경부 좌측의 피부를 절개하고 경동맥을 분리하였다. 경동맥을 노출시킨 후 총경동맥 기저부와 내경동맥 원위부를 실을 이용하여 절찰하였다. 그 후 외경동맥의 원위부를 묶고 그 근위부의 혈관을 부분적으로 절제한 후 2F Fogarty 풍선 카테타 (Baxter. Co. Irvine, CA, USA)를 절개부위를 통해 총경동맥 근위부까지 삽입하였다. 카테타에 0.4 mL의 생리식염수를 주입하여 풍선을 부풀린 후 천천히 당겨서 삽입부위 직전까지 오도록 하고 이 조작을 3회 반복 실시하여 혈관에 손상을 주었다. 풍선 카테타를 혈관으로부터 제거한 후 혈관 내에 있는 혈액을 두세 번 흘려보낸 후 외경동맥의 절개부위 근위부를 묶고 총경동맥과 내경동맥의 절찰을 풀어 혈류를 통하게 한 후 피부를 봉합하였다.

2) 혈관 내막 비후의 측정

광학현미경으로 H&E 염색된 혈관 절편을 40배 확대한 후 촬영한 사진을 디지털라이저 (WACOM. Co, Japan)를 이용하여 컴퓨터에 입력시키고 각 부위의 내경 및 두께를 측정하였다. 신생내막 안쪽의 내경과 신생내피와 중피의 경계부위로 구성된 곡면의 내경을 측정하여 각각의 면적을 계산한 후 후자에서 전자를 빼어 신생내막의 면적을 NIH 프로그램을 이용하여 계산하였다.

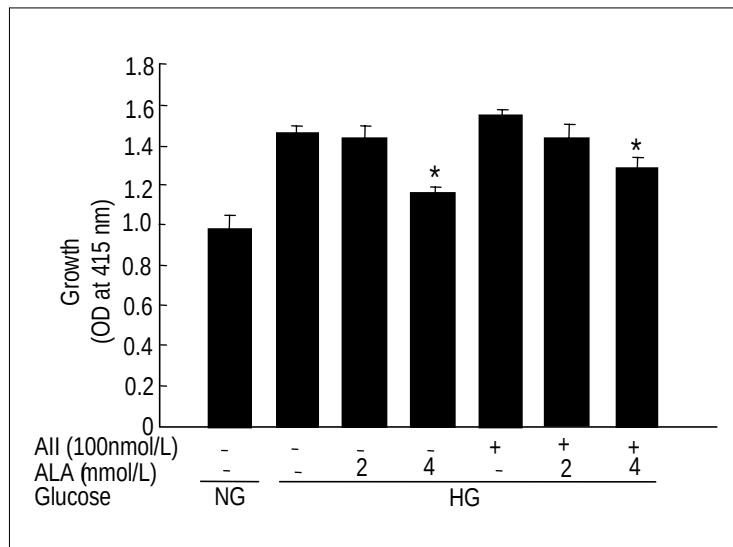


Fig. 1. Effect of α -lipoic acid on cell proliferation in RASMC by growth assay. Degree of cell proliferation was measured by WST cell counting kit (Wako, Osaka, Japan). Data are given as mean $\pm$ standard error (n=3 different cell lines). NG, VSMC cultured with normal glucose; HG, VSMC cultured with high glucose; HG+All, VSMC cultured with high glucose and Angiotensin II; ALA, α -lipoic acid. *p<0.05 compared HG.

(1) 통계처리

자료의 통계분석은 SPSS 10.0을 이용하였으며, 통계수치는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 각 통계수치는 one-way ANOVA로 분석하고 변수의 분석은 Duncan's test를 사용하였다. p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의하다고 판정하였으며 모든 실험은 독립적으로 3차례 이상 실시하여 통계처리 하였다.

연구 결과

1. 혈관 평활근 세포의 증식속도와 유주능 억제

증식속도 분석은 고농도의 포도당 상태와 고농도의 포도당에 안지오텐신 II를 추가한 상태에서 배양한 백서의 평활근세포에 각각 알파- 리포산 2 mM와 4 mM을 처리하여 정상 포도당 상태에서 배양한 세포를 비교하였으며 2 mM의 알파- 리포산을 처리하였을 경우에는 성장속도에 차이가 없었으며 고농도의 포도당에 안지오텐신 II를 추가한 상태에서 배양한 백서의 평활

근세포에 4 mM의 알파- 리포산을 처리한 경우에만 성장속도의 유의한 감소가 있었다 (p<0.05) (Fig. 1).

그러나 유주능 분석에서는 Fig. 2에서 보듯이 고농도의 포도당에 안지오텐신 II를 추가한 상태에서 배양한 백서의 평활근세포에 2 mM의 알파- 리포산을 처리한 경우 유주능의 유의한 감소를 보였으며 TNF- α 를 조건으로 주고 배양한 평활근세포에서도 2 mM의 알파- 리포산을 처리한 경우 유주능의 유의한 감소를 보였다 (p<0.01) (Fig. 2).

2. PAI-1 mRNA 발현의 감소

알파- 리포산이 고혈당 상태의 백서의 대동맥세포에서 PAI-1발현에 미치는 영향을 보기 위해 노던 블롯 분석을 시행하였다 (Fig. 3). 알파- 리포산을 각각 250 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 4 mM로 처리하였을 때 고혈당 상태에서 증가한 PAI-1 mRNA의 발현은 용량에 비례하여 감소하였다. 그리고 2 mM 이상으로 알파- 리포산의 농도를 더 올려도 더 이상의 의미있는 PAI-1

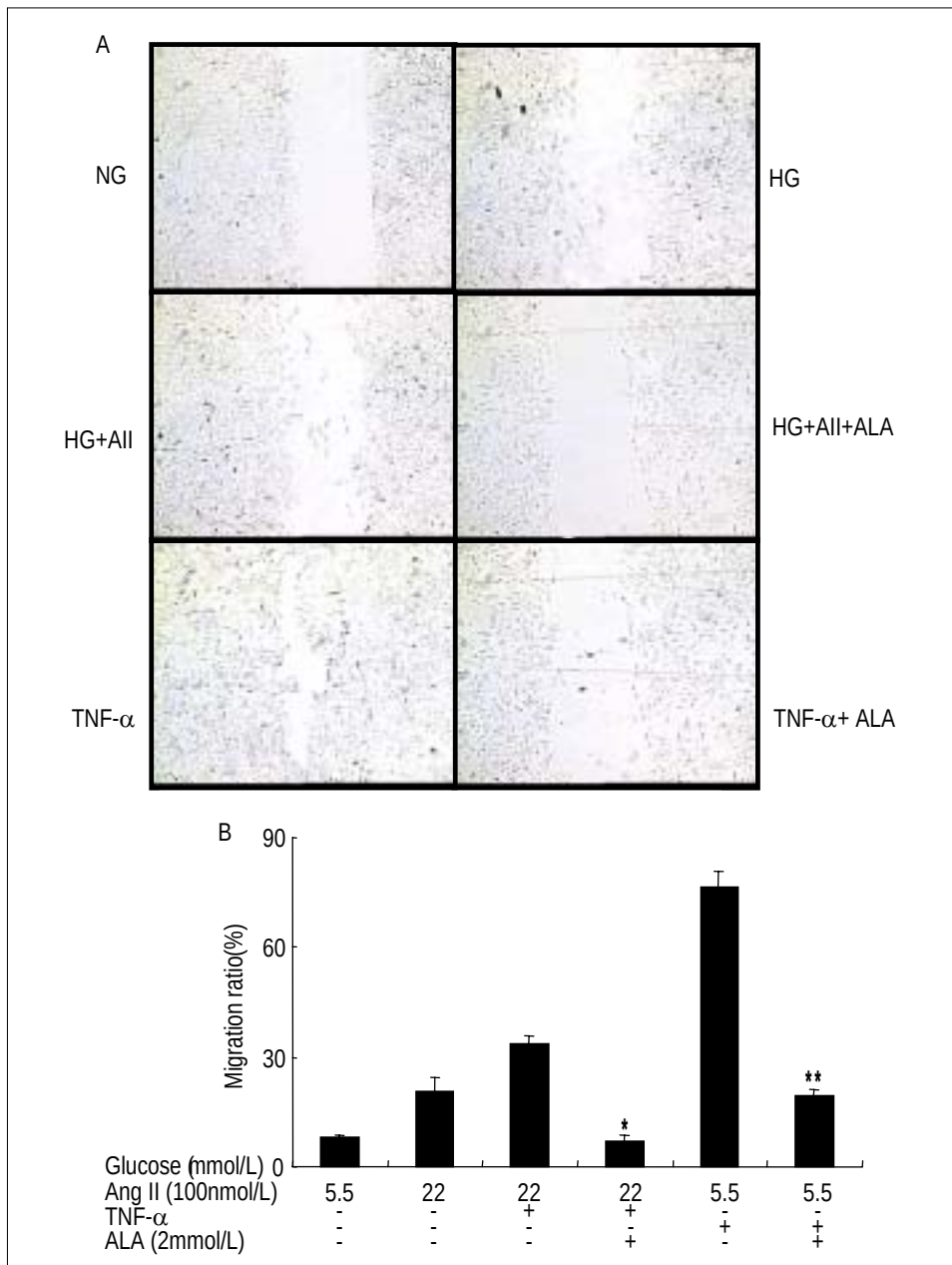


Fig. 2. A. Effect of α -lipoic acid on cell migration in RSMC by migration assay. B. Degree of cell migration was analyzed by Digitizer (WACOM. Co, Japan). Data are given as mean $\pm$ standard error (n=3 different cell lines). TNF- α , tumor necrosis factor- α . *p<0.01 compared HG+All, **p<0.01 compared TNF

mRNA 발현 감소는 없었으므로 이후의 실험에서는 알파-리포산 2 mM로 실험을 진행하였다. 또한 고혈당

상태에 안지오텐신 II를 첨가하여 배양한 세포에 알파-리포산 2 mM을 처리한 경우에도 PAI-1 mRNA가 유

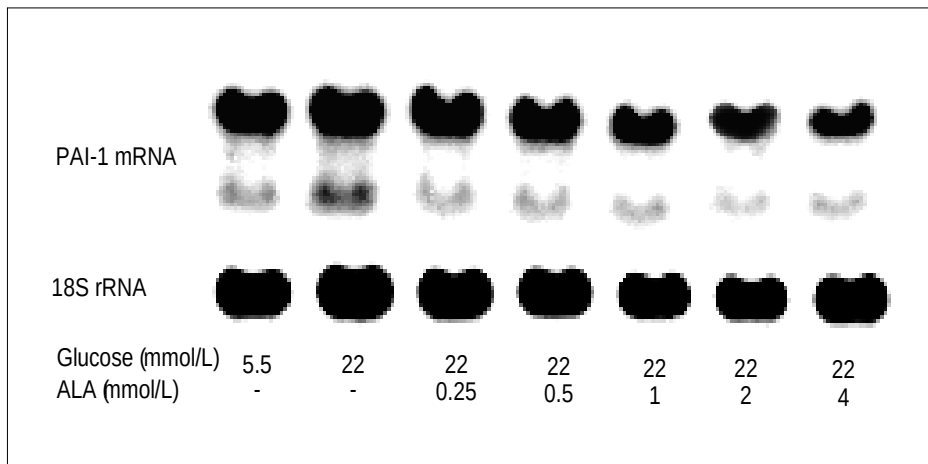


Fig. 3. Effect of α -lipoic acid on PAI-1 expression on high glucose condition by northern blot analysis. α -lipoic acid suppressed PAI-1 mRNA expression in dose dependent manner.

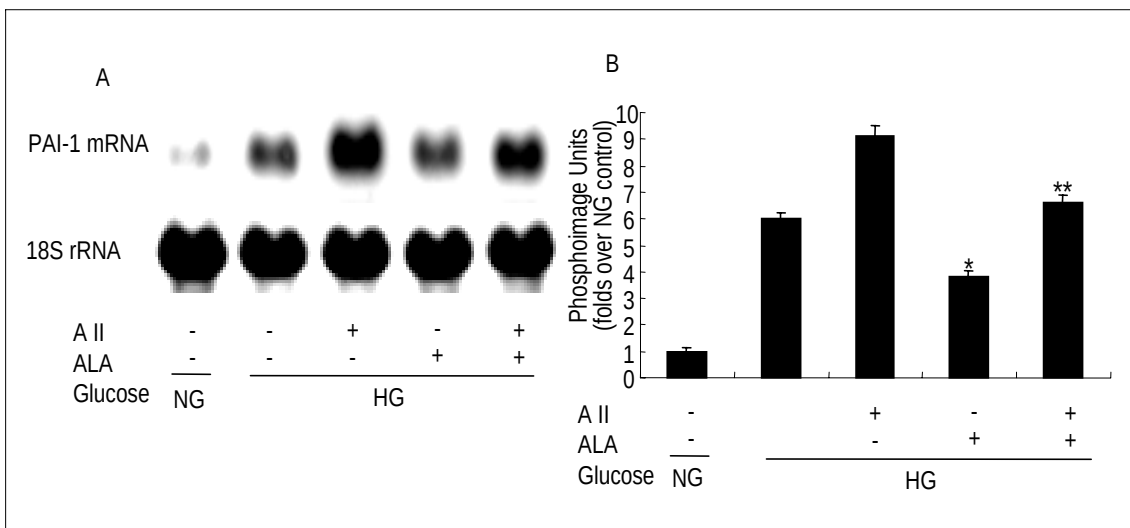


Fig. 4. Effect of α -lipoic acid on PAI-1 expression on high glucose and angiotensin II by northern blot analysis. α -lipoic acid suppressed PAI-1 mRNA expression which increased in high glucose and angiotensin II. Data are given as mean $\pm$ standard error (n=3 different cell lines). *p<0.01 compared HG, **p<0.01 compared HG+AII

의하게 감소하였다 (p<0.05) (Fig. 4).

3. NF- κ B의 발현에 미치는 영향

알파-리포산이 NF- κ B의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 젤 지연 분석을 시행하였으며 백서 평활

근세포를 고농도의 포도당 상태와 여기에 안지오텐신 II를 추가한 상태에서 배양하여 2 mM의 알파-리포산을 처리한 경우에는 알파-리포산을 처리하지 않은 경우에 비해 NF- κ B DNA 결합 활성도가 유의하게 감소하였다. 그리고 정상 포도당 상태에서 TNF- α 를 처리

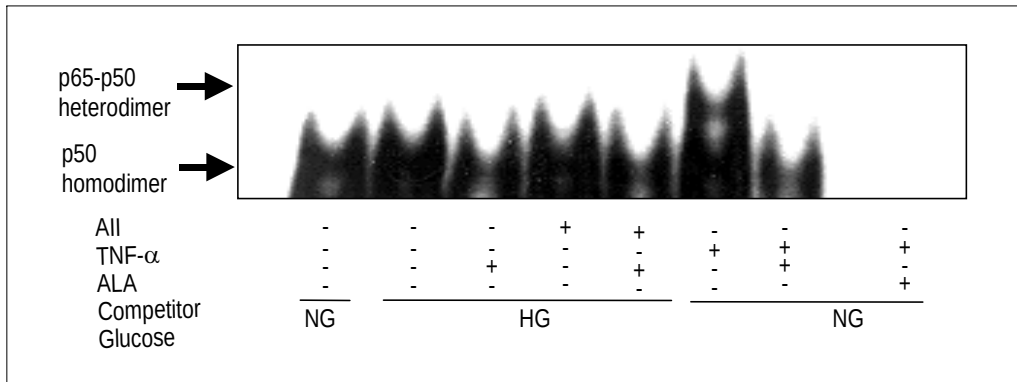


Fig. 5. Gel mobility shift assay. α -lipoic acid suppress NF κ B DNA binding activity increased by high glucose and angiotension II (competition).

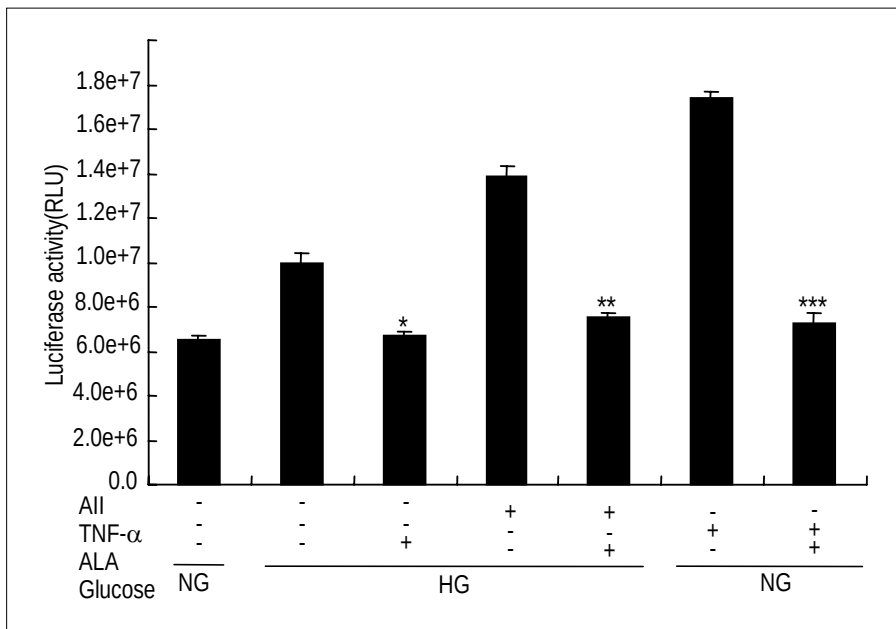


Fig. 6. NF κ B reporter gene assay. α -lipoic acid suppress NF κ B promotor activity increased by high glucose and angiotension II. Data are given as mean $\pm$ standard error (n=3 different cell lines). *p<0.01 compared HG, **p<0.01 compared HG+All, ***p<0.01 compared NG+TNF.

한 세포에 2 mM의 알파- 리포산을 처리한 경우에도 NF- κ B DNA 결합 활성도가 유의하게 감소하였다 (Fig. 5). 추가적으로 시행한 NF- κ B 보고 유전자 분석에서도 위와 같은 조건으로 실험을 진행하였으며 2 mM의 알파- 리포산을 처리한 세포에서 NF- κ B 프로모

터 활성도가 유의하게 감소하였다 (p<0.01) (Fig. 6).

4. 신생내막 형성의 억제

H&E stain상 투여용량 변화군에서는 알파- 리포산의 모든 농도에서 풍선손상만 준 군과 비교하여 신생

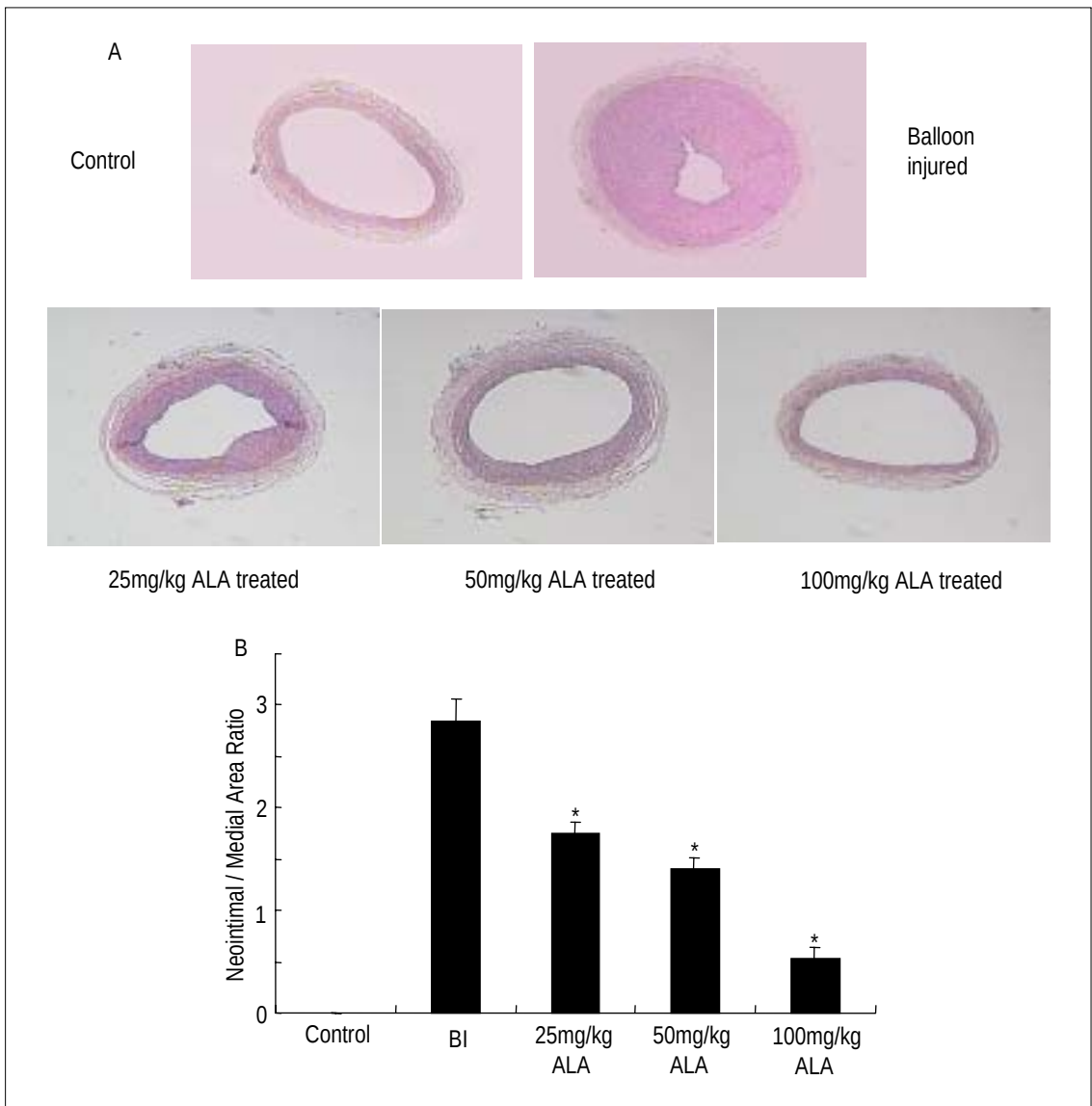


Fig. 7. A. Photomicrographs of representative rat carotid artery cross sections at day 14 after balloon injury (hematoxylin-eosin stain, $\times 100$). B. Schematic diagram of neointimal proliferation measured by Digitizer (WACOM. Co, Japan). Data are given as mean $\pm$ standard error ($n=3$ different cell lines). Control: normal artery, Balloon injury: artery injured with balloon catheter, 25 mg/kg ALA: artery treated with α -lipoic acid 25 mg/kg, 50 mg/kg ALA: artery treated with α -lipoic acid 50 mg/kg, 100 mg/kg ALA : artery treated with α -lipoic acid 100 mg/kg

내막의 비후가 유의하게 감소되었다 (Fig. 7A). 위의 결과를 신생내막/중막의 비를 이용하여 도식화하였을 경우 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg를 사용한 모든

군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 이 결과는 용량이 증가 할 수록 신생내막의 형성이 더욱 억제됨을 보여주었다 ($p<0.01$) (Fig. 7B). 그리고 투여시간 변

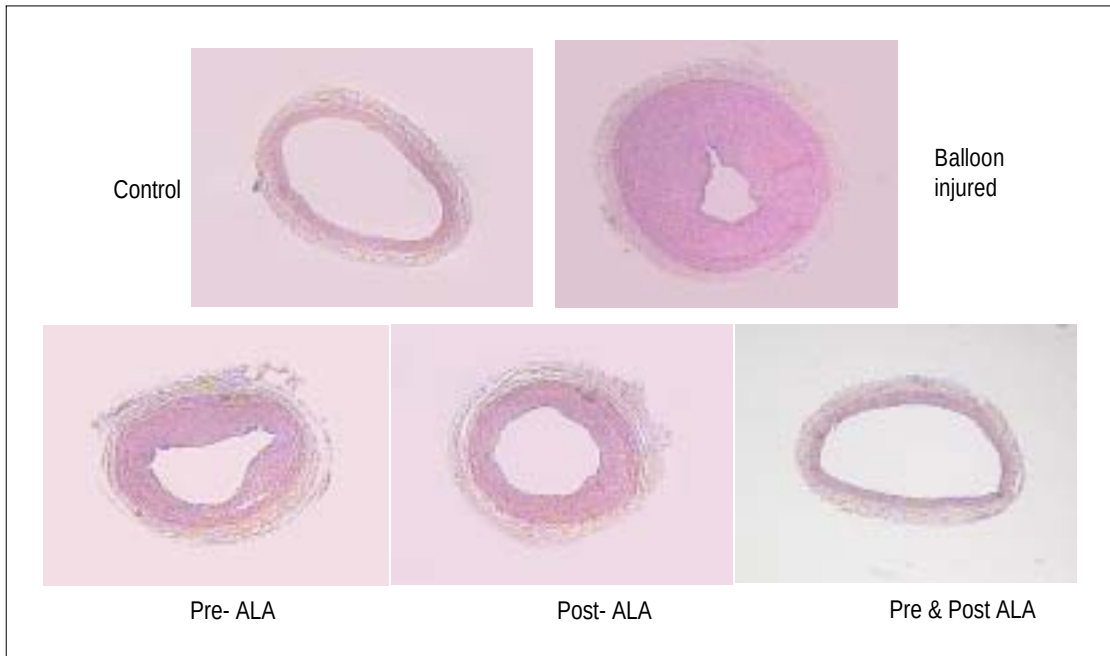


Fig 8. Photomicrographs of representative rat carotid artery cross sections at day 14 after balloon injury (BI) (hematoxylin-eosin stain, $\times 100$). Control: normal artery, Balloon injury: artery injured with balloon catheter, Pre-ALA: artery treated only before BI with α -lipoic acid 100 mg/kg, Post-ALA: artery treated only after BI with α -lipoic acid 100 mg/kg, Pre & Post ALA: artery treated before and after BI with α -lipoic acid 100 mg/kg

화군에서는 손상 전 투여군과 손상 후 투여군에 비하여 손상 전과 후 모두 투여한 군에서 신생내막의 형성을 가장 유의하게 억제하는 결과를 보여주었다 (Fig. 8).

고 찰

본 연구에서 알파-리포산 투여는 *In vitro* 상태에서 혈관 평활근세포의 유주능을 유의하게 감소시켰으며 혈관손상모델을 이용한 *In vivo* 연구에서도 신생내막의 형성을 성공적으로 억제하였다. 또한 알파-리포산 투여로 산화스트레스에 민감한 전사인자인 NF- κ B의 프로모터 활성도와 DNA 결합 활성도가 억제됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 예상과는 달리 알파-리포산을 투여하여 혈관 평활근세포의 증식을 억제시키는 것은 고농도의 알파-리포산 (4mM) 처리상태에서만 가능하였다. 현재까지 알파-리포산 투여가 혈관 평활근세포

의 증식에 미치는 직접적인 영향에 대한 연구는 없는 상태이다. 그러나 Bierhaus 등²⁾은 사람의 태반 정맥 내피세포를 이용한 실험에서 알파-리포산을 처리하면 NF- κ B 활성도는 감소하나 AP-1 활성도는 감소하지 않는다고 보고하고 있다. 이러한 내용을 토대로 볼 때 알파-리포산이 평활근세포의 증식에 영향을 미치지 않은 것은 세포의 증식을 조절하는 유전자들과 관계가 큰 AP-1 경로는 억제하지 못함으로서 이러한 결과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이 부분은 향후 추가적인 연구를 통해 정확한 기전의 규명이 필요할 것이다.

이에 반해 알파-리포산은 2 mM의 농도에서 고혈당과 안지오텐신 II 처리로 증가된 세포의 유주능을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 Kunt 등³⁾이 알파-리포산이 최종당화산물에 의해 자극된 사람의 태반 정맥 내피세포에서 VCAM-1의 발현과 단백질의 유주를 억제하였다는 보고와 잘 일치한다. 그러므로 알파-리

포산은 단핵구세포의 유주 뿐만 아니라 혈관 평활근세포의 유주도 강력하게 억제하여 동맥경화증의 진행을 방지하는 것으로 보인다.

실제로 평활근세포의 유주에 관련된 물질로는 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 등이 관련이 있다^{1~3)}. 이러한 세포접착 물질들은 산화스트레스에 민감한 전사인자인 NF- κ B에 의해 조절을 받고 있으며 그 외에도 NF- κ B에 의해 조절되는 물질로 TNF- α , IL-1 β , M-CSF, tissue factor 등이 있다^{4~6,23~27)}. 본 연구팀도 알파-리포산이 NF- κ B 경로에 미치는 영향에 대해 조사하였으며 Fig. 5와 6에서 보는 것과 같이 젤 지연 분석과 보고 유전자 분석을 통해 혈관 평활근세포에서 알파-리포산 처리로 NF- κ B의 발현을 감소시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 이것은 Bierhaus 등²⁾의 정맥 내피세포를 이용한 연구에서 밝혀진 결과와 동일한 결과로 알파-리포산의 NF- κ B경로에 대한 영향을 잘 보여주고 있다. 그리고 이번 연구는 정맥내피세포 뿐만 아니라 혈관 평활근세포에서도 동일한 결과가 일어난다는 것을 보여주고 있다.

본 연구팀은 동맥경화증과 관련된 중요한 인자중의 하나인 PAI-1에 미치는 알파-리포산의 영향에 대한 연구도 진행하였다. Fig. 3과 4에서 보듯이 혈관 평활근세포에서 고농도 포도당과 안지오텐신 II를 처리한 경우 PAI-1 mRNA의 발현이 증가하며 이러한 증가는 알파-리포산의 처리로 억제된다는 사실을 알 수 있었다. PAI-1은 당뇨병과 고혈압을 가진 환자의 혈청에서 증가되어 있으며, PAI-1 수치의 증가는 동맥경화증의 발생과도 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{6,28~32)}. 그러므로 알파-리포산에 의해 PAI-1의 발현이 억제된다는 것은 알파-리포산이 동맥경화증의 진행을 방지할 수 있다는 것을 뒷받침해주는 또 다른 하나의 소견이다. 그러나 알파-리포산이 어떤 경로로 PAI-1 유전자의 발현을 억제하는지에 대해서는 아직 알려져 있지 않으며 이에 대해서는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

알파-리포산을 당뇨병 환자의 합병증 방지나 PTCA 후에 재협착 방지 등에서와 같이 임상에서 직접 사용하기 위해서는 사람의 경우에는 어느 정도의 용량에서 이러한 효과가 나타나는 지 알아보는 것이 중요하다.

백서를 이용한 실험에서는 각각 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 용량을 사용하였으며, 이러한 용량은 Yutaka Kishi 등¹⁹⁾이 스트렙토조토신으로 당뇨병을 유도한 쥐에서 당뇨병성 신경병증에 미치는 알파-리포산의 영향을 본 실험에서 사용한 용량 중에서 (10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg) 신경전도에 유의한 차이를 보이기 시작한 25 mg/kg부터 본 실험에 사용하였다. 현재까지 사람에게 안전성이 입증된 용량은 ALADIN III 연구에서 경구로 1800 mg/day를 사용한 경우이며²⁰⁾ 이를 체중 60 kg기준으로 보면 30 mg/kg의 용량을 사용한 것이다. 본 실험의 결과에서 25 mg/kg를 사용한 경우에도 신생내막의 형성을 유의하게 감소시켰으나 용량 의존적으로 그 효과는 증가하여 100 mg/kg에서 가장 큰 효과가 있었다. 그리고 사용한 용량에서 특별한 부작용은 관찰되지 않았다. 그러나 이러한 백서에서의 결과를 그대로 사람에게 적용한다면 백서에서 나타나는 결과와 상이할 뿐만 아니라 예기치 못한 부작용이 발생할 수도 있다. 그러므로 위의 결과를 임상에 접목시키기 위해서는 비침습적인 연구를 통하여 사람에서는 어느 정도 용량에서 혈관 합병증을 예방할 수 있는 지에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구팀에서는 Celermajer 등³³⁾에 의해 소개된 초음파를 이용한 상완동맥 확장능 연구를 통해 이러한 효과를 증명하기 위해 실험을 진행하고 있다.

결론적으로 알파-리포산은 백서의 혈관손상모델에서 25 mg/kg이상의 농도에서 의미 있게 신생내막의 형성을 억제하였으며 이것은 NF- κ B 경로를 차단하여 그것에 의해 영향을 받는 유전자의 발현을 억제시켜서 나타난 결과로 보여진다. 그 이전에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요하겠으나, 만일 신생내막 형성을 억제하는 용량에서의 안정성만 확립된다면 이러한 결과는 알파-리포산이 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등과 같이 동맥경화를 유발하는 여러 상황에서 시도될 수 있을 것이라는 가능성을 보여주는 것이며 그와 더불어 경피적 관상동맥 성형술 후의 재협착 같이 신생내막의 형성이 문제가 되는 상황에서도 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 당뇨병의 혈관 합병증의 발생에 있어서 산화스트레스는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 혈관 평활근세포에서 고혈당은 안지오텐신 II와 더불어 활성산소종(ROS)을 증가시키며, 산화스트레스에 민감한 전사인자들을 활성화시켜 동맥경화증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 항산화제로 알려진 알파-리포산이 혈관 평활근세포의 증식속도와 이주에 미치는 영향과 PAI-1발현에 미치는 영향을 조사하였고 이와 동시에 백서의 혈관 손상 모델을 이용하여 알파-리포산이 신생내막 증식을 억제시킬 수 있는지를 알아보았다.

방법: *In vitro* 실험은 백서의 대동맥 평활근세포를 고농도의 포도당 (22 mM)과 100 nM의 안지오텐신 II로 4시간 배양하였다. 알파-리포산을 처리 후, PAI-1 mRNA의 발현을 보기 위해 노던 블롯을 시행하였고 평활근세포의 유주능과 증식속도에 미치는 영향을 보기 위해 성장속도와 유주능 분석을 시행하였다. 또한 평활근세포의 유주능에 NF- κ B 경로가 미치는 영향을 보기 위해 겔 지연 분석과 NF- κ B 보고 유전자 분석을 시행하였다. *In vivo* 실험으로는 백서의 혈관손상 모델을 이용하여 알파-리포산 처리 후 혈관의 신생내막 두께를 비교하였다.

결과: *In vitro* 실험에서 고농도 포도당과 안지오텐신 II에 의해 유도된 PAI-1 mRNA 발현증가는 알파-리포산 처리에 의하여 용량에 비례하여 억제되었다 ($p < 0.05$). 알파-리포산 처리로 혈관 평활근세포의 유주능은 유의하게 억제되었으나 ($p < 0.01$), 증식속도는 유의하게 억제되지 않았다. 또한 알파-리포산 처리로 NF- κ B 발현도 유의하게 억제되었다 ($p < 0.01$). *In vivo* 실험에서는 알파-리포산을 주입한 군에서 혈관손상에 의한 신생내막의 증식이 유의하게 억제되는 것을 보여주었다 ($p < 0.01$).

결론: 알파-리포산은 백서의 대동맥 평활근 세포의 증식속도는 억제하지 못했으나 유주능은 유의하게 억제하였으며, 혈관 손상 모델에서 신생 내막 증식도 유의하게 억제함을 확인할 수 있었다. 이러한 작용은 알파-리포산에 의한 NF- κ B 경로의 억제와 연관이 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Xueliang D, Karin SF, Peter R: *Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF- κ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? Free Radical Biology & Medicine* 27:752-763, 1999
2. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berenshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP: *Advanced glycation end product-induced activation of NF κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. Diabetes* 46:1481-1490, 1997
3. Kunt T, Forst T, Wilhelm A, Tritschler H, Pfuctzner A, Harzer O, Engelbach M, Zschaebitz A, Stofft E, Beyer J: *α -Lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with advanced glycation end products. Clinical Science* 96:75-82, 1999
4. Kunsch C, Medford RM: *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. Circ Res* 85:753-766, 1999
5. Hazel L, Kenneth AR: *Oxidative stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol* 280:719-741, 2001
6. 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* 21:739-745, 2001
7. Eddie LG, Victoria V, Ayad AJ: *Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cell. Hypertension* 35:942-927, 2000
8. 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* 29:444-449, 1997
9. Ronald EL, Stephan G, Xiao-ping X, Simon J, Yasuko K, Linda D, Michael CF, Woerner PM, Willa AH: *Expression and function of PPAR- γ in rat and human vascular smooth muscle cells. Circulation* 101:1311-1318, 2000
 10. 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* 98:1879-1905, 1996
 11. Mori T, Durand J, Chen YF, Thompson JA, Bakir S, Oparil S: *Effects of short-term estrogen treatment on the neointimal response to balloon injury of rat carotid artery. Am J Cardiol* 85:1276-1279, 2000
 12. Azzi A, Boscoboinik D, Marilley D, Ozer NK, Stauble B, Tasinato A: *Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state, American Journal of Clinical Nutrition* 62:S1337-S1346, 1995
 13. Orbe J, Rodriguez JA, Calvo A, Grau A, Belzunce MS, Martinez-Caro D, Paramo JA: *Vitamins C and E attenuate plasminogen activator inhibitor-1 expression in a hypercholesterolemic porcine model of angioplasty. Circ Res* 49:484-492, 2001
 14. Obrosova I, Cao X, Greene DA, Stevens MJ: *Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL- α -lipoic acid. Diabetologia* 41:1442-1450, 1998
 15. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ: *Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology & Medicine* 19:227-250, 1995
 16. Lester P, Hans JT: *Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. Free Radical Biology & Medicine* 20:625-626, 1996
 17. Thomas H, Barbara F, Sylvia A, Karoline K, Alfried K, Thomas M: *Beneficial effects of α -lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine* 31:53-61, 2001
 18. Phillip AL, Kim KN, Hans JT: *The role of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. Diabetes* 46:38-42, 1997
 19. Kishi Y, Schjmelzer JD, Yao JK, Zollman PJ, Nickander KK, Tritschler HJ, Low PA: *α -lipoic acid: Effect on glucose uptake, sorbitol pathway, and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. Diabetes* 48:2045-2051, 1999
 20. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Hasche H, Lobisch M, Schutte K, Kerum G, Malessa R: *Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant α -lipoic acid, Diabetes Care* 22:1296-1301, 1999
 21. Konrad D, Somwar R, Sweeney G, Yaworsky K, Hayashi M, Ramlal T, Klip A: *The antihyperglycemic drug α -lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation. Diabetes* 50:1464-1471, 2001
 22. Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Lee KU, Park JY, Jeon YJ, Song HS, Lee IK: *Transcription factor decoy for activator protein-1 inhibits high glucose- and angiotensin II-induced type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells. Diabetologia* 44:713-720, 2001
 23. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D: *Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. J Clin Invest* 97:1715-1722, 1996
 24. Lenardo MJ, Baltimore D: *NF- κ B: A pleiotropic*

- mediator of inducible and tissue-specific gene control. Cell* 58:227-229, 1989
25. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Khalek AKMA, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP: *Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B. Diabetologia* 42:222-232, 1999
 26. Stangl V, Gunther C, Jarrin A, Bramlage P, Moobed M, Staudt M, Baumann G, Stangl K, Felix SB: *Homocysteine inhibits TNF- α -induced endothelial adhesion molecule expression and monocyte adhesion via nuclear factor- κ B dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun* 280:1093-1100, 2001
 27. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Markiewski M, Ciechanowicz A, Kaxzmarczyk M, Naruszewicz M: *Selective inhibition by α -tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun* 274:609-615, 2000
 28. Ken K, Hiroaki S, Yuichi E, Daishiro Y, Sanae M, Wakano S, Kenji M, Teizo F, Kazuhisa T, Tsuyoshi W: *Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPAR γ in endothelial function. Biochem Biophys Res Commun* 258:431-435, 1999
 29. Wolfgang D, Ann S, Per E, Isabel G, Federico C, Cristina B, Mikko PSA, Anders H, Jan N: *Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:3025-3032, 1999
 30. Masaru M, Junji K, Toshimasa Y: *Association of TGF- β signaling in angiotensin II-induced PAI-1 mRNA upregulation in mesangial cells: role of PKC. Biochimica et Biophysica Acta* 1449:217-226, 1999
 31. Feener EP, Xia P, Inoguchi T, Shiba T, Kunisaki M, King GL: *Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II- induced plasminogen activator inhibitor expression. Contrib Nephrol* 118:180-187, 1996
 32. Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, King GL: *Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. J Clin Invest* 95:1353-1362, 1995
 33. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Milledr OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE: *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. The Lancet* 340:1111-1115, 1992