원 저

알파-리포산(Alpha-lipoic Acid) 투여가 혈관평활근세포의 세포증식 억제 및 세포사멸(Apoptosis)에 미치는 효과

경북대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교 자연과학대학 미생물학과[1], 한양대학교 자연과학대학 분자생명과학부[2],
계명대학교 의과대학 내과학교실[3]

김혜진[1], 이인규, 김영호[1], 신순영[2], 이영한[2], 김정국, 김보완, 김혜순[3], 김미경[3], 박근규[3], 류성열[3]

The Effect of Alpha-lipoic Acid on the Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Hye-Jin Kim[1], In-Kyu Lee, Young-Ho Kim[1], Soon-Young Shin[2], Young-Han Lee[2], Jung-Guk Kim, Bo-Wan Kim, Hye-Soon Kim[3], Mi-Kyoung Kim[3], Keun-Gyu Park[3], Seong-Yeol Ryu[3]

Department of Internal Medicine, Kyungpook National University, School of Medicine;
Department of Microbiology[1], Kyungpook National University, College of Science and Technology;
Division of Molecular and Life Sciences[2], College of Science and Technology, Hanyang University; and
Department of Internal Medicine[3], Keimyung University School of Medicine

Abstract

Background: The proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) is a hallmark of atheroscelrosis and post-angioplasty restenosis. We previously showed that alpha-lipoic acid (ALA) inhibited neointimal hyperplasia and has potential anti-atherosclerosis effect in rat carotid artery balloon injured model. Here, we investigated whether alpha-lipoic acid inhibited proliferation of cells and induced apoptosis in rat vascular smooth muscle cells.

Methods: VSMCs were treated with ALA under each condition, harvested and protein was extracted. Same amount of protein was loaded into SDS-PAGE and western blot analysis was performed with various cell cycle regulation protein. To examine ALA induce apoptosis in VSMCs, FACS and DNA fragmentation assay were performed. Antioxidant effect of ALA was determined by DCF-DA staining.

Results: ALA induced VSMCs cell cycle arrest and induced p21, p27 and p53 proteins. Also ALA induced PTEN expression and AMPK phosphorylation. Increased AMPK phosphorylation reduced Erk-2 phosphorylation and finally arrested cell cycle promotion. The apoptotic effect was also shown by ALA treatment. Also we confirmed that ALA reduced ROS generation in VSMCs.

Conclusion: The present data suggest that ALA has anti-proliferative effect and arrests cell proliferation. Therefore, ALA may provide new strategies for the prevention of neointimal hyperplasia after angioplasty.
(J Kor Diabetes Assoc 31:200~207, 2007)

Key Words: Alpha lipoic acid, vascular smooth muscle cell, cell cycle, apoptosis

서 론

대사증후군(metabolic syndrome)이란 인슐린의 저항성이나 내당능장애가 고혈압, 고지혈증, 비만 등과 함께 나타나는 경우를 말하며 이들 환자의 가장 중요한 사망원인은 동맥경화증으로 인한 심혈관질환이다[1]. 동맥경화증은 다양한 용해성 매개체들, 단핵구, 내피세포, 혈관평활근세포 간의 상호작용에 관여하는 만성 염증성 질환이며[2,3], 혈관평활근

접수일자: 2007년 1월 12일, 통과일자: 2007년 4월 25일, 책임저자: 이인규, 경북대학교 의과대학 내과학교실

세포의 과도한 증식이 중요한 원인으로 알려져 있다. 이들 질환에서는 산화스트레스가 증가되어 있고[4], 이러한 스트레스는 혈관내피세포 손상과 면역세포의 활성을 유발하여[5] 혈관평활근세포가 혈관벽 중막에서 내막으로 이동, 증식하여 지방반을 형성하게 되며 병변으로 발전하게 된다. 따라서 혈관세포의 과도한 증식은 비만, 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 등의 질환에서 죽상동맥경화증의 발생에 중요한 병태생리이다[6]. 또한 이러한 죽상동맥경화증의 치료에 이용되고 있는 경피적 관상동맥 혈관성형술(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)의 치료 성공률은 84~92%로 괄목할 만한 발전을 보이고 있으나 시술 후 다시 혈관이 막히는 재협착의 문제는 아직도 해결되지 않고 있다[7,8]. 이러한 혈관재협착의 병리학적인 기전으로도 역시 과다한 혈관평활근세포의 증식 등으로 인한 신생내막의 증식(neointimal hyperplasia)이 가장 중요한 기전으로 보고된다[2,8]. 최근 연구에 의하면 혈관재협착 부위의 과도하게 증식한 혈관평활근세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도한 경우 그 협착률이 줄어드는 것과 협착이 진행되는 부위에서는 혈관평활근세포의 세포사멸이 감소됨이 보고되었다[9-11]. 이러한 사실로 미루어 볼 때 죽상동맥경화증의 치료뿐만 아니라 혈관재협착의 억제를 위해서는 혈관평활근세포의 증식을 억제함과 더불어 증식하는 혈관평활근세포를 세포사멸로 유도하는 약물의 개발이 절실하다.

알파-리포산(alpha-lipoic acid)은 thiol 계열에 속하는 항산화제로서 당뇨병환자의 말초신경병증의 치료제로 널리 사용되고 있다[12,13]. 최근에는 알파-리포산이 중추신경계와 말초조직에서 AMPK (AMP-activated protein kinase)의 활성을 조절하여 체내 에너지대사에 중요한 역할이 있음이 밝혀져 있고[14] 혈관세포에서도 알파-리포산이 항동맥경화증의 효과가 있음이 보고되고 있다[15,16]. 저자들은 이전 연구에서 알파-리포산이 산화스트레스에 의해 활성화된 전사인자(transcriptional factor)인 NF-κB를 억제하여 혈관세포부착물질(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), fractalkine (CX3CL1) 및 단핵구 주화성 인자-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)의 발현을 억제함으로써 혈관평활근세포에서 염증반응을 완화하여 죽상동맥경화증을 예방할 수 있음을 보고한 바 있다[17]. 최근 몇몇 연구자에 의하면, 여러 암세포주에서 알파-리포산의 처리는 암세포의 세포사멸을 유도하며 nontransformed cell (dermal fibroblast)에서는 세포성장을 저해한다고 보고되었다[18,19]. 하지만 알파-리포산이 혈관평활근세포의 세포주기 조절 및 세포사멸을 직접 유발하며, 이는 어떤 경로를 통하는지에 대한 연구는 없는 실정이다.

이제 저자들은 알파-리포산 투여가 혈관평활근세포에서 세포주기저해를 통하여 성장을 억제하고 세포사멸이 증가됨을 확인해보고자 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

웨스턴 블롯에 사용한 일차항체는 항 Cyclin D, B, A, E, Cdk2는 Santa Cruz Biotechnology (CA)에서 구입하였으며, PCNA와 p21 항체는 BD bioscience (CA)에서, p27, p53, PTEN, pAMPK, c-fos, c-jun, c-myc, pErk, Erk2, 등의 항체는 Cell Signalling Technology (MA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 알파-리포산은 Viatris GmbH & Co. KG (Frankfurt, Germany)로부터 기증받아 사용하였다.

2. 세포 배양

백서의 혈관평활근세포는 Sprague-Dawley 백서(280~320 g)의 흉부대동맥에서 분리하여[20] 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY)에서 배양하였다. 혈관평활근세포의 특이성은 α-actin 단일클론 항체(Sigma, St Louis, Missouri)로 염색하여 확인하였다. 본 실험에는 5~6회 사이로 계대 배양한 혈관평활근세포를 사용하였다. 배양된 혈관평활근세포를 100 mm 조직배양접시에 80~90% 정도 차게하여 0.5% FBS DMEM 배지에서 24시간동안 배양하여 세포들을 휴지기로 들어가게 하였다.

3. 유세포분리법(FACS Analysis)

세포주기 분석을 위해서 백서의 혈관평활근세포에 PDGF (50 ng/mL)와 insulin (1 μM)를 처리하고 또는 PDGF, insulin과 알파-리포산(2 mM)을 처리하고 세포주기의 분석을 위해서는 24시간 후 세포를 수집하였고 세포사멸의 분석을 위해서는 24, 48, 72시간 배양한 후 세포를 수집하고 세포주기 분석을 시행하였다. 회수한 세포는 2% FBS를 포함한 PBS (Phosphate buffered saline pH 7.4)로 세척하고 차가운 70% ethanol로 고정시켰다. 세포는 50 μg/mL의 RNaseA와 30분 반응한 후 50 μg/mL의 PI (propidium iodide) 용액과 30분 염색하여 유세포분석기(FACSCallbur, BD bioscience, San Jose, CA)로 DNA 용적히스토그램을 얻고 G0피크를 구하여 세포사멸을 확인하였고, 각 세포주기당 세포수의 백분율을 구하여 세포주기를 분석하였다.

4. DNA 분석

휴지기에 들어간 백서의 혈관평활근세포에 알파-리포산을 2 mM로 처리하여 24, 48, 72시간에 회수하였다. 세포는 완충액(10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% triton X-100)에서 4°C에서 30분 동안 반응한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. Nucleic acid를 포함한 상등액은 페놀-클로로포름을 이용하여 정제한 후 에탄올 침전하였다. RNA를 없애기 위해 50 μg/mL의 RNaseA와 함께 37°C에

서 1시간 반응 하였다. 결과물은 1.2% 아가로즈 젤에 전기영동하여 확인하였다.

5. 웨스턴 블롯(Western Blot Analysis)

배양된 혈관평활근세포를 100 mm 조직배양접시에 80~90% 정도 차게하여 2 mM의 알파-리포산을 처리한 후 시간에 따라 회수하였다. IPH 완충액(5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 100 uM PMSF)에 1 μg/mL 단백질 분해효소 억제제, 1 mM DTT를 첨가하여 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, MA)으로 전기를 이용하여 옮겼다. 차단 완충액(Blocking buffer)으로 차단하고 각각의 일차항체와 반응하였다. 일차항체와 반응이 끝난 membrane은 다시 horseradish peroxidase-conjugated 이차 항체에 반응시킨 후 ECL plus (Amersham Biosciences, Little Chalfnot, UK)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. Membrane을 항 actin 항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

6. 세포 내 ROS 생성의 측정

6 well 세포배양접시에 90% 가량 자랐을 때 0.5% FBS DMEM 배지에서 24시간동안 배양하였다. H_2O_2 (100 uM)를 포함하는 배지에 알파-리포산(2 mM, 1 h) 을 포함하거나 하지 않은 조건에서 한 시간 동안 배양한 후 ROS에 예민한 형광 소식자인 40 μmol/L 2',7'-dichlorofluorecin diacetate (DCF-DA; Invitrogen)을 첨가하여 30분간 배양하였다. 488 nm 파장(wavelength)에서 자극되고 515 nm 파장(wavelength)에서 발산되는 AxioCam MRc5 Carl Zeiss fluorescence microscopy (Thornwood, NY)을 이용하여 H_2O_2 생성을 정량하였다.

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.

결 과

1. 알파-리포산이 백서의 혈관평활근세포의 성장에 미치는 효과

알파-리포산이 혈관평활근세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 백서의 혈관평활근세포에 알파-리포산을 2 mM의 농도로 24시간 동안 처리한 후 세포의 성

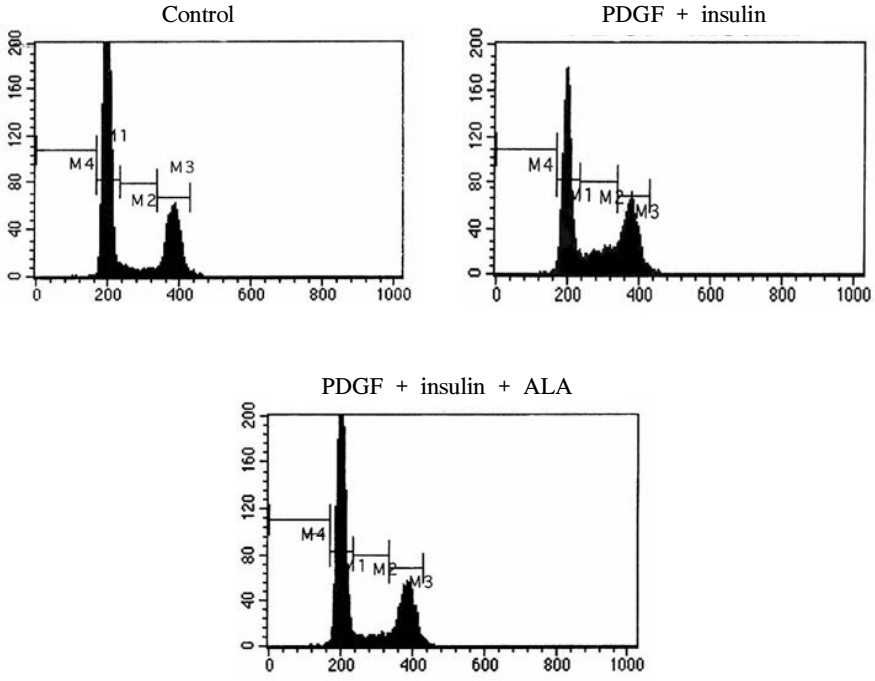

Fig. 1. Effect of inhibiting cell proliferation on ALA treatment. Cells were treated with PDGF and insulin with or without 2 mM ALA for 24 h. Then cells were fixed, permeabilized and stained with propidium iodide. The percentage of hypodiploid cells was calculated based on a total of 10,000 cells analyzed per sample.

장 정도를 유세포분석법을 통하여 확인하였다. PDGF (50 ng/ml)와 insulin (1 μM)으로 증가한 S phase가 알파-리포산 처리에 의해 18.55%에서 6.67%까지 감소됨을 확인하였다($P < 0.02$) (Fig. 1).

2. 알파-리포산이 세포주기관련 유전자의 발현에 미치는 효과

알파-리포산이 세포성장의 저해에 미치는 영향을 확인하고자, 관련 단백질의 발현을 확인해 보았다. 혈관평활근세포에 2 mM의 알파-리포산을 처리하여 시간별로 확인해 보았을 때 세포의 성장을 유도하는 단백질인 cyclin D, A, B, E의 발현이 감소하였고, CDK2의 발현은 변화없었다. 또한 Proliferating cell number antigen (PCNA)의 발현도 감소하였다(Fig. 2A). Cyclin 계열의 세포성장을 촉진하는 단백질의 발현이 감소하는 반면, 세포성장을 저해하는 단백질인 p21, p27, p53 등의 발현은 증가하였다(Fig. 2B).

3. 알파-리포산이 PTEN, pAMPK에 미치는 효과

p53과 함께 tumor suppressor 유전자로 잘 알려진 Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome (PTEN)의 발현을 확인해 보았을 때 알파-리포산을 처리한 후 시간이 지남에 따라 그 발현양이 늘어남을 확인하였다. 또한 알파-리포산에 의한 AMPK의 phosphorylation이 혈관평활근세포에서도 증가함을 확인하였다(Fig. 3A).

활성화된 pAMPK의 조절을 받는다고 알려진 Erk의 인산화를 확인해 보았을 때 그 인산화 정도가 AMPK가 인산화됨에 따라 감소함을 확인하였으며, c-fos의 발현이 증가함을 확인하였다(Fig 3B).

4. 알파-리포산의 세포사멸에 미치는 효과

앞선 결과에서 tumor suppressor 유전자로 알려진 p53과 PTEN의 발현양이 증가하였으며 이들의 증가는 세포사멸과 중대한 관계가 있다고 잘 알려져 있다. 따라서 알파-리포산

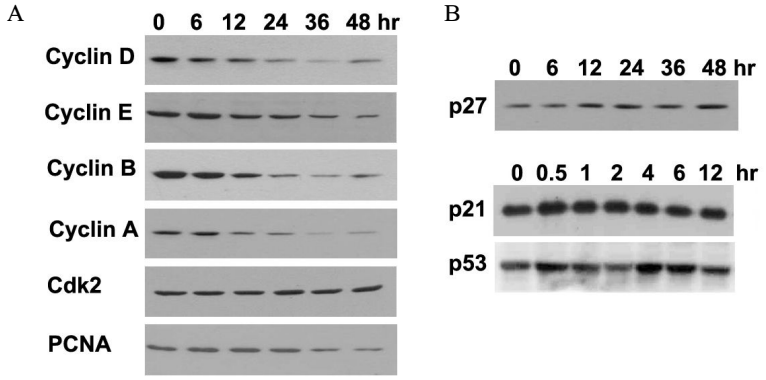

Fig. 2. Effects of expression of cell cycle regulate molecules on ALA treatment. Cells were seed in 60 mm dish and incubated with 2 mM of ALA for indicated time. Total protein was extracted and western blot analysis was performed with 20 μg of protein using cyclins (A), p21, p27 and p53 (B) antibodies.

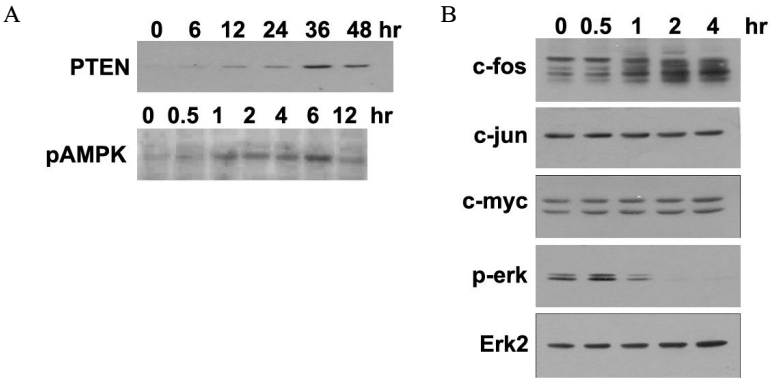

Fig. 3. Effects of expression of PTEN, pAMPK and signaling pathway molecule expression on ALA treatment. Cells were seed in 60 mm dish and incubated with 2 mM of ALA for indicated time. Total protein was extracted and western blot analysis was performed with 20 μg of protein using PTEN, pAMPK (A) and c-fos, c-jun, c-myc, p-erk and Erk2 antibodies (B).

에 의한 이들의 증가가 세포사멸에 관계할 것이라고 예상하고 세포사멸의 정도를 유세포분석법과 전기영동을 통해 확인하였다. 알파-리포산 처리 후 48시간째에 G0 phase의 세포가 5.15%에서 39.83%로 증가함을 확인하였고($P < 0.05$) (Fig. 4A), 동일한 결과를 전기영동을 통해 DNA 분절을 확인하였다(Fig. 4B). 따라서 혈관평활근세포에 대한 알파-리포산의 처리는 세포증식의 억제뿐만 아니라 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

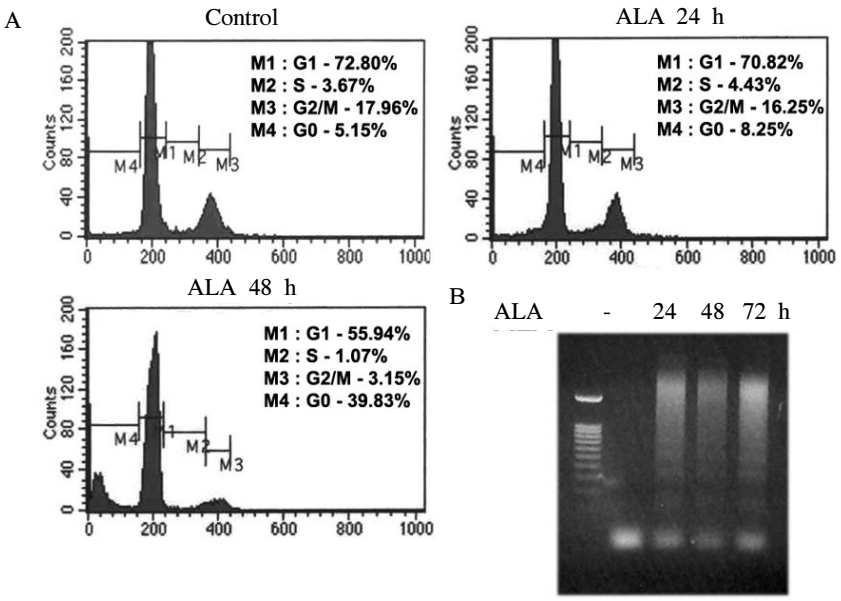

Fig. 4. Apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) after treatment with alpha-lipoic acid (ALA). A. Cells were treated with 2 mM ALA for 24 and 48 h and then fixed, permeabilized and stained with propidium iodide. The percentage of hypodiploid cells was calculated based on a total of 10,000 cells analyzed per sample. B. Cells were treated with 2 mM ALA for 24, 48 and 72 h. Cells were harvested and chromosmal DNA was extracted. DNA ladders reflecting the presence of DNA fragments were viewed on ethidium-bromide-stained gel.

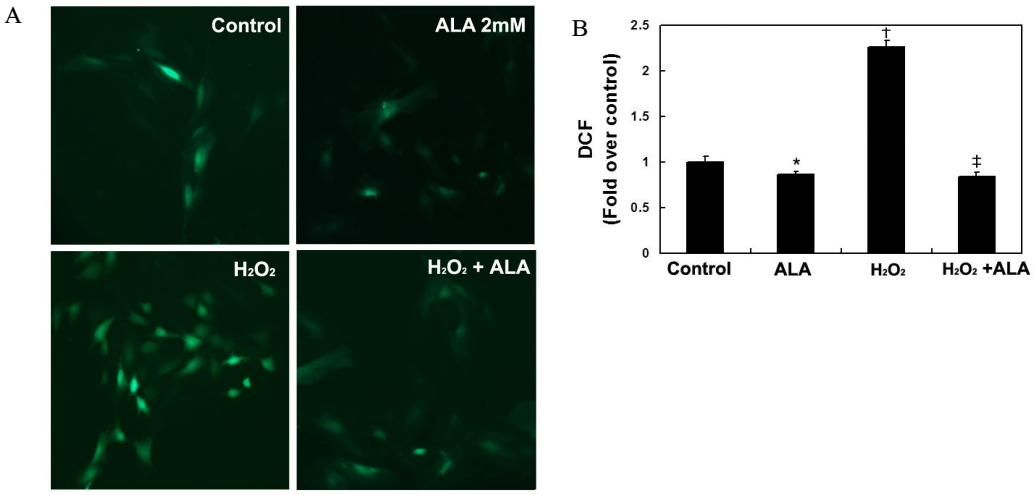

Fig. 5. Effect of ALA on ROS production in response to H_2O_2. A. VSMCs were treated with ALA with or without H_2O_2 for 1 h. Then cells were processed for fluorescence microscopic examination using the oxidant-sensitive probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. VSMCs were randomly chosen and fluorescence was quantified using the NIH Image program. The magnification was × 100. B. Data are expressed as mean ± SEM of three separate measurements. Statistical significance was determined as * P, † $P < 0.001$ compared with basal condition and ‡ $P < 0.001$ compared with H_2O_2.

5. 알파-리포산의 항산화 효과

알파-리포산의 항산화 효과를 확인하기 위해 DCF-DA 염색을 통해 세포 내의 ROS 발현을 측정하였다. 알파-리포산의 처리는 대조군에 비해 ROS 생성을 감소시켰고, H_2O_2에 의해 증가한 ROS의 생성 또한 저해시켰다(Fig. 5).

고 찰

당뇨병환자의 말초신경병증 치료제로 사용되고 있는 알파-리포산은 미토콘드리아에서 탈수소 효소반응을 매개하여 에너지를 생성하는데 조효소로서 필수적인 역할을 한다[12,21]. 저자들은 이전 연구에서 알파-리포산의 항산화작용은 혈관평활근세포에서 NF-κB의 활성도를 억제하고 염증반응을 매개하는 VCAM-1, MCP-1 및 fractalkine의 발현을 억제함으로서 혈관성형술 후 신생내막의 과증식(neointimal hyperplasia)을 방지할 수 있음을 보고한 바 있다[17,22,23]. 이에 더하여, 본 연구를 통해 알파-리포산이 기존에 알려진 항산화효과뿐만 아니라 혈관평활근세포에서 세포증식을 억제하고 혈관평활근세포의 세포사멸을 유발함을 확인하였기에 죽상동맥경화증의 치료뿐만 아니라 혈관성형술 후에 발생하는 혈관재협착의 예방에 유용하게 사용될 가능성이 있음을 보고하는 바이다.

혈관평활근세포에서의 알파-리포산은 혈관평활근세포의 성장을 저해하였고, 이에 따른 세포주기 조절 단백질인 Cyclin D, B, A, E의 발현이 감소함을 확인하였으며, 반면, p21, p27, p53의 발현들은 증가함을 확인하여 이들을 통한 세포주기 조절이 이루어짐을 확인하였다. 이미 알파-리포산 처리에 의한 AMPK의 인산화는 베타세포나 지방세포에서 확인된 바 있었으나[24,25], 아직 혈관평활근세포에서의 그 활성은 알려져 있지 않았다. 본 연구를 통해 혈관평활근세포에서 AMPK의 인산화를 확인하였으며 그 조절을 받는 Erk-2의 인산화가 저해됨에 따라서 알파-리포산에 의한 세포주기 조절이 AMPK를 통함을 시사하고 있다. 또한 여러 암세포주에서 알파-리포산에 의한 세포사멸이 보고되고 있는데[18,19], 혈관평활근세포에서의 알파-리포산에 의한 세포사멸을 확인하여 암세포주에서와 동일한 효과를 보임을 확인하였다.

본 연구진은 최근에 AMPK를 활성화 시키는 metformin이나 rosiglitazone 등이 PGC-1 발현을 통해 ROS의 생성을 억제하고[22], 결국 죽상동맥경화증의 원인이 되는 chemokine들의 발현을 억제함을 보고하였다. 또한 PDTC (Pyrrolidine-dithiocarbamate)[26]나 EUK-134[27] 같은 항산화물질이 혈관평활근세포의 세포자살을 유도함이 보고되었다. PDTC의 경우 pro-apoptotic factor로 알려진 Nur77을 활성화 시킨다고 보고되었으나 아직 어떠한 기전이 관여하는지는 밝혀지지 않았다. 다만 EUK-134의 경우 세포 내의 산화적인 스트레스를 감소시킴으로서 세포주기를 억제한다고 보고되었다. 이러한 결과들은 본 연구에서 AMPK를 활성화 시키며, ROS의 생성을 저해하는 알파-리포산에 의한 세포주기의 억제 또는 세포자살 유도는 이전의 연구 결과와 일맥상통 하며 그 기전에 대한 실마리를 제공하고 있다.

알려진 바에 의하면 알파-리포산은 c-fos의 발현의 저해를 통해 AP-1 조절을 함으로써 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다[28]. 하지만 본 연구에서는 알파-리포산의 처리에 의해 이미 알려진 바와는 달리 c-fos의 발현이 증가하였다. 이는 혈관평활근세포에서의 알파-리포산에 의한 c-fos의 발현이 다른 영향을 의미한다고 볼 수 있으며 이에 대한 앞으로의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 세포성장의 저해나 세포사멸을 유도를 위해서 암세포주에서 보다 높은 농도의 알파-리포산을 투여하였다. 이는 현재까지 ALADIN I, II 연구에서[29] 사람에게 안전성이 입증된 농도, 즉 경구로 하루 1,800 mg을 사용한 경우보다 본 연구에서 사용된 용량은 높은 용량으로 사료된다. 하지만 최근 관상동맥의 재협착을 방지하기 위해 sirolimus나 paclitaxel과 같은 약물 용출 스탠트(drug-eluting stent)가 국소적으로 필요한 부위에만 고농의 약물을 전달하여 좋은 성적을 보이고 있는 점을 감안한다면 이러한 방법으로 알파-리포산을 투여하면, 실험에서 사용한 정도의 용량을 비교적 안전하게 인체에서도 사용할 수 있을 것이다.

이상의 결과를 요약하면, 알파-리포산은 혈관평활근세포에서 세포의 증식을 저해하며, 이는 cyclin 단백질과 p21, p27, p53의 발현을 통함을 확인하였다. 또한 알파-리포산은 혈관평활근세포에서 AMPK의 인산화를 유도하였으며, Erk의 인산화를 저해하였다. 또한 지속적인 알파-리포산의 처리는 혈관평활근세포의 자살을 유도함을 확인하였다. 본 연구는 이미 당뇨병성 신경병증의 약제로 사용되고 있는 알파-리포산의 죽상동맥경화 및 혈관재협착의 치료제로서의 가능성을 제시하고 있다.

요 약

연구배경: 혈관평활근세포의 과도한 증식은 동맥경화증의 치료의 방법으로 쓰이는 경피적관상동맥혈관성형술 후의 혈관재협착의 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 본 연구진은 강력한 항산화제인 알파-리포산이 풍선확장술 모델에서 혈관재협착을 억제함으로써 죽상동맥경화증의 치료제로서의 가능성을 제시한 바 있다. 이에 세포단위에서의 알파-리포산에 의한 세포증식의 억제를 관찰함으로써 그 기전을 규명하고자 하였다.

방법: 알파-리포산을 2 mM의 농도에서 24시간 처리 하였을 때 PDGF와 insulin 에 의해 증가되었던 세포주기증식

이 감소됨을 백서의 혈관평활근세포에서 유세포분석법을 통해서 확인하였다. 그 기전을 밝히기 위해서 세포주기조절에 관여하는 cyclins과 p21, p27, p53의 발현은 웨스턴블롯을 통해 확인하였다. PTEN의 발현과 AMPK의 인산화도 역시 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 알파-리포산에 의한 세포사멸은 유세포분석과 DNA 분절 분석법으로 확인하였다. 알파-리포산에 의한 ROS생성의 저해는 DCF-DA 염색을 통해 확인하였다.

결과: 백서의 혈관평활근세포에 알파-리포산을 2 mM의 농도에서 24시간 처리하였을 경우 세포의 성장이 저해됨을 확인하였으며, cyclin계열의 단백질들의 발현이 줄어들며, p21, p27, p53과 같은 세포성장을 저해하는 단백질들의 발현은 증가하였다. AMPK의 인산화가 증가함을 확인하였으며, 이에 따른 Erk의 인산화도 감소함을 확인하였으며 48시간 이상을 처리하였을 경우 혈관평활근세포의 세포사멸이 유도됨도 확인하였다. 알파-리포산에 의한 ROS의 생성도 감소함을 보였다.

결론: 본 연구결과는 강력한 항산화제로 알려진 알파-리포산이 백서의 혈관평활근세포에서 세포성장의 저해와 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다. 알파-리포산에 의한 세포성장의 저해를 세포단위에서 확인할 수 있었으며, 이는 알파-리포산이 풍선확장술 이후의 혈관재협착을 예방할 가능성 있는 치료제로 사료되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 경북대학교 학술진흥연구비에 의하여 연구되었음.

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. Liu MW, Roubin GS, King III SB: *Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. Circulation 79:1374-87, 1989*
3. Ardissino D, Di Somma S, Kubica J, Barberis P, Merlini PA, Eleuteri E, De Servi S, Bramucci E, Specchia G, Montemartini C: *Influence of elastic recoil on restenosis after successful coronary angioplasty in unstable angina pectoris. Am J Cardiol 71:659-63, 1993*
4. Kunsch C, Medford RM: *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. Circ Res 85:753-66, 1999*
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. Ross R: *The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s. Nature 362:801-9, 1993*
7. 이수훈, 김두일, 김진우, 차광수, 이성윤, 김상곤, 조길현, 오주현, 김원, 김무현, 김영대, 안태운, 정명호, 김동수, 강정채 식익균, 김종석: 관상동맥 스텐트 재협착 치료를 위한 "커팅 벌룬" 혈관성형술 후 혈관조영술상 성적 및 재발성 재협착의 예측인자. 순환기학회지 *33:196-204, 2003,*
8. Bhoday J, De Silva S, Xu Q: *The molecular mechanism of vascular restenosis: Which genes are crucial?. Curr Vasc Pharmacol 4:269-75, 2006*
9. Durand E, Mallat Z, Addad F, Vilde F, Desnos M, Guent C, Tedqui A, Lafont A: *Time course of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. J Am Coll Cardiol 39:1680-5 2002*
10. O'Sullivana M, Scotta SD, McCarthya N, Figga N, Shapirob LM, Kirkpatrickc P, Bennetta MR: *Differential cyclin E expression in human in-stent stenosis smooth muscle cells identifies targets for selective anti-restenosis therapy. Cardiovascular Res 60:673-83, 2003*
11. Marc-AndreR, Anik D, Patrick L, Normand V, Janos GF, Karine L, Alexey VP, Marie-Josee H: *Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells. FASEB J 18:705-7, 2004*
12. Biewnga GP, Haenen GR, Bast A: *The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen Pharmacy 3:315-31, 1997*
13. Lester Pr, Eric H, Hans JT: *Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic Biol Med 19:227-50, 1995*
14. Kim MS. Park JY, Namkoomg C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha JH, Park IS, Lee IK, Benoit V, Youn JH, Lee HK, Lee KU: *Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by*

suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nature medicine 10:727-33, 2004

15. Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim MS, Jo IH, Oh GT, Par IS, Youn JH, Park SW, Lee KU, Park JY: *Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:2488-94, 2005*
16. Yi X, Maeda N: *Alpha lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low cholesterol diet. Diabetes 55:2238-44, 2006*
17. Lee KM, Park KG, Kim YD, Lee HJ, Kim HT, Cho WH, Kim HS, Han SW, Koh GY, Park JY, Lee KU, Kim JG, Lee IK: *Alpha-lipoic acid inhibits fractalkine expression and prevents neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery. Atherosclerosis 189:106-13, 2006*
18. Karyn M, James C, Kosta S, Susan P, Douglas F: *Alpha-lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. J Cell Physiol 194:325-40, 2003*
19. Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, Pibiri M: *Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. Apoptosis 12:113-23, 2007*
20. Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Lee SJ, Kwon KY, Choi SY, Lee KU, Park JY, Moon IJ, Park JG, Yoshizumi M, Ouchi Y, Lee IK. *Inhibitory effects of novel AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo. Circ Res 90:1325-32, 2002*
21. 조호찬, 이상준, 김미정, 김혜순, 윤태승, 김성재, 김상현, 허승호, 문교철, 배재훈, 이인규: 폐경 후 여성 제2형 당뇨병 환자에서 *α-lipoic Acid* 투여가 혈관내피세포 기능에 미치는 영향. 당뇨병 *26:242-52, 2002*
22. Kim HJ, Park KG, Yoo EK, Kim YH, Kim HS, Kim HT, Park JY, Lee KU, Jang WG, Kim BW, Lee IK: *Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-Induced MCP-1 and VCAM-1 Expression and NF-kappaB Activation in Human Aortic Smooth Muscle and Endothelial Cells. Antioxid Redox Signal. 2007 in press*
23. 신동우, 이동욱, 이상준, 김혜순, 강효경, 안종덕, 이인규: 백서 혈관평활근세포에서 *alpha lipoic acid*가 *PAI-1* 발현, 세포의 증식, 주유능 및 신생내막 형성억제에 미치는 효과. *J Kor Diabetes Asso 25:446-59, 2001*
24. ED Targonsky, F Dai, V Koshkin, GT Karaman, AV Gyulkhandanyan, Y Zhang, CB Chan, MB Wheeler: *Alpha-lipoic acid regulates AMP-activated protein kinase and inhibits insulin secretion from beta cells. Diabetologia 49:1587-98, 2006*
25. Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M: *Expanding role of AMPK in endocrionology. TRENDS Endocrionl Metab 17:205-15, 2006*
26. Tokumitsu W, Masao Y, Masahiro A, Masato E, Kenji T, Masayoshi H, Koichiro N, Yi-Qiang L, Yumiko O, Katsuya I, Noriko S, Kim SB, Takashi N, Naohide Y, Junya A, Yasuyoshi O: *Induction of nuclear orphan receptor NGFI-B gene and apoptosis in rat vascular smooth muscle cells treated with pyrrolidinedithiocarbamate. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:1738-44, 2001*
27. Stephen W, Stephen B: *Induction of apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells by a combined superoxide dismutase/catalase mimetic. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285:L305-12, 2003*
28. Mizuno M. and Packer L: *Effects of α-Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid on Expression of Proto-oncogene c-fos. Biochem Biophys Res Commun. 200:1136-42, 1994*
29. 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*