ORIGINAL ARTICLE
Korean Circulation J 2005;35:801-811
ISSN 1738-5520
ⓒ 2005, The Korean Society of Circulation

고콜레스테롤혈증 토끼에서 경피적 동맥 성형술 또는 스텐트 삽입술 후 신생내막의 형성에서 대식세포의 영향

동국대학교 의과대학 내과학교실,[1] 단국대학교 의과대학 내과학교실,[2] 충북대학교 의과대학 내과학교실[3]
이무용[1] · 김영권[1] · 이명용[2] · 박병은[2] · 김동운[3] · 조명찬[3]

The Effects of Macrophage on Neointimal Formation after Balloon or Stent Injury in Hypercholesterolemic Rabbits

Moo-Yong Rhee, MD[1], Young-Kwon Kim, MD[1], Myoung-Yong Lee, MD[2],
Byoung-Eun Park, MD[2], Dong-Woon Kim, MD[3] and Myeong-Chan Cho, MD[3]
[1]Department of Internal Medicine, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju,
[2]Department of Internal Medicine, College of Medicine, Dankook University, Cheonan,
[3]Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The present study investigated differences in the effects of macrophages between neointimal formation after balloon (BI) and that after stent injury (SI) in hypercholesterolemic rabbits. We also studied the relationship between advanced glycation end products (AGE), the receptor for AGE (RAGE), and S100A8/A9 in the inflammatory reaction mediated by macrophages. **Materials and Methods :** Male New Zealand White rabbits fed with a 1% cholesterol diet for 2 weeks underwent balloon dilatation to one iliac artery, and stenting to the contralateral artery. Arteries were harvested at 7, 14, and 28 days after injury. **Results :** Sizes and cell numbers of neointima were higher in SI than in BI ($p<0.05$), but those from media showed no difference between SI and BI ($p>0.05$). Sizes and cell numbers of neointima in BI and SI increased significantly till 14 days ($p<0.05$). Macrophage numbers increased in neointima of BI at 14 days ($p=0.011$), but not at 28 days ($p>0.05$). Macrophage numbers increased until 28 days in the media of BI ($p=0.003$). Macrophage numbers increased at 14 days in the neointima of SI ($p=0.001$), but decreased at 28 days ($p=0.014$). Macrophage numbers were not changed in the media of SI. Cell numbers and area were significantly correlated with macrophage numbers in the neointima and media of BI, and in the neointima of SI ($p<0.05$). RAGE expression was strong in cells adjacent to lumen at 7 and 14 days, and in cells of neointima and media adjacent to internal elastic lamina at 28 days. Expression of RAGE was increased in both macrophage and smooth muscle cells. Macrophages were the predominant cells observed with AGE accumulation. S100A8/A9 was not found. **Conclusion :** There seems to be a difference in effect of macrophages on the formation of neointima after injury between BI and SI. The effects of macrophages appears to be more significant in the neointima of BI. Mechanical arterial injury induces the formation of AGE and overexpression of RAGE in macrophages. **(Korean Circulation J 2005;35:801-811)**

KEY WORDS : Coronary restenosis ; Macrophage ; Advanced glycation end products ; Receptor for advanced glycation end-products ; Hypercholesterolemia.

논문접수일 : 2005년 6월 22일
수정논문접수일 : 2005년 10월 5일
심사완료일 : 2005년 10월 17일
교신저자 : 이무용, 410-773 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (031) 961-7125 · 전송 : (031) 961-7785 · E-mail : mooyong_rhee@duih.org

서 론

대식세포는 손상된 동맥에서 동맥경화 및 재협착을 일으키는 과정에서 다양한 기전을 통하여 중요한 역할을 하고 있다.[1] 동맥경화병변이 발생하는 초기에 동맥의 내막에 침윤되어 축적된 지단백이 단핵세포의 이동을 촉진시켜 대식세포로 변화를 일으킨다. 대식세포는 다양한 수용체를 발현시키고 여러 씨토카인을 분비하여 혈관 평활근세포의 증식을 촉진하여 동맥경화를 일으킨다. 이와 같이 동맥경화가 발생하는 기전에 대식세포가 중요한 역할을 하고 있으며 동맥성형술 후 재협착의 발생에도 중요한 것으로 생각되고 있으나 서로 다른 형태의 기계적 손상인 풍선도관 손상과 스텐트 시술 후 재협착이 발생하는 과정에서 대식세포가 미치는 영향에 차이가 있는 지는 알려진 바가 없다.

비효소성 당화에 의하여 생성되는 advanced glycation end product(AGE)은 당뇨병에서 빠른 속도로 증가하며,[2] 연령이 증가함에 따라 체내에 축적이 증가된다.[3] 축적된 AGE는 혈관 내피세포의 기능이상을 일으키고 동맥경화로 발전시키는 역할을 하고 있는 것으로 알려지고 있다.[4] AGE의 작용은 주로 수용체를 통하여 이루어지고 있으나, 세포내 섭취에 의하여도 작용하는 것으로 생각되고 있다. 또한 동맥경화병변 조직의 대식세포에서 AGE가 관찰되고 있어 AGE가 대식세포의 작용에 중요한 역할을 하고 있을 것으로 생각되고 있다.[5][6] AGE가 작용하는 수용체는 여러 가지가 있으며, 그 중에서 receptor for advanced glycation end product(RAGE)가 동맥경화 및 재협착의 발생에 가장 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.[7] RAGE는 다중배위자가 작용하는 수용체로 AGE, En-RAGE, amphoterin 그리고 S100A8/A9 등이 자극하여 염증반응을 일으키고 다양한 혈관 활성화 물질의 분비를 촉진시킨다.[4] AGE-RAGE 시스템이 동맥경화의 발생에 중요한 역할을 하고 있으며 동물 실험에서 AGE-RAGE 반응 경로를 차단하는 방법에 의하여 동맥경화의 발생 및 진행이 억제된다.[8] 칼슘 부착 단백질(calcium binding protein)인 S100군에 속해 있는 S100A8/A9은 작용 기전 및 기능은 많이 알려져 있지 않고 있지만, RAGE에 작용하는 또 다른 배위자로 RAGE를 통한 염증 반응을 일으켜서 동맥경화의 발생 또는 진행에 관여하고 있는 것으로 생각되고 있다.[9] 그러나 대식세포가 작용하는 과정에 AGE와 RAGE, 그리고 S100A8/A9 단백질이 작용하는 지에 대한 연구가 없는 상태이다.

본 연구는 고콜레스테롤 혈증환경에서 서로 다른 형태의 손상인 풍선도관에 의한 동맥 손상과 스텐트 삽입에 의한 동맥 손상 후 신생내막의 형성 및 증식과정에 대식세포의 영향에 차이가 있는지, 그리고 대식세포의 작용과 AGE, RAGE, 그리고 S100A8/A9 단백질의 관계를 연구하였다.

재료 및 방법

체중이 3에서 3.5 kg인 수토끼에게 1% 콜레스테롤 사료(Oriental Yeast Co., Ltd, Japan)를 2주간 투여하였다. 2주간 1% 콜레스테롤 사료를 투여한 후 일측 회장동맥에는 혈관성형술용 풍선도관으로 혈관 손상을 일으키고, 반대측 회장대퇴동맥에는 Palmaz-Schatz 스텐트를 삽입하여 확장하였다. 토끼는 1% 콜레스테롤 사료를 투여하기 전에 혈중 콜레스테롤을 측정하고, 혈관 손상 직전에 혈중 콜레스테롤을 측정하였다. 혈관손상을 일으킨 이후에 1% 콜레스테롤 사료를 계속 투여하고 계획된 시간에 동맥 조직을 채취하였다.[10]

토끼를 ketamine(35 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)을 근육주사하여 마취하였다. 헤파린(100 IU/kg)을 정맥 주사하여 시술 중 혈전의 발생을 방지하였으며, 감염을 방지하기 위하여 항생제(gentamycin, 1 mg/kg)를 투여하였다. 목의 피부를 정중선 절개하여 우측 경동맥에 5F introducer(Check-flo, Cook, USA)를 삽입하였다. 일정한 손상을 일으키기 위하여 길이 20 mm, 직경 3.0 mm의 풍선도관(Maverick, Boston Scientific, USA)을 사용하여 일측 회장동맥에 15 mm 길이의 Palmaz-Schatz 스텐트를 6기압으로 확장, 삽입하여 스텐트 확장손상을 일으키고, 반대측 회장동맥을 같은 풍선도관으로 6기압, 30초간 3회 확장하여 손상을 일으켰다. 스텐트 및 풍선도관에 의한 동맥 손상 후 혈관조영을 하여 시술의 결과와 합병증 및 급성 폐색 유무를 확인하였다. Introducer를 제거하고 경동맥을 묶은 후 피부를 봉합하였다.

시술된 토끼는 7일째 5마리, 14일째 5마리, 그리고 28일째 7마리를 배정하여 7일, 14일, 그리고 28일 동안 1% 콜레스테롤 사료를 투여한 후, 회장동맥 조직을 채취하였다. 혈관의 기계적 손상과 고콜레스테롤 혈증의 영향을 비교하기 위하여 4주간 콜레스테롤 사료를 투여하고 시술하지 않는 토끼의 회장동맥 조직도 채취하였다. 토끼를 ketamine과 xylazine으로 마취하고 복부와 흉부를 열었다. 심첨부에 16G 주사바늘을 관통하여 헤파린이 첨가된 생리식염수를 주입하면서 과량의 ketamine(70 mg/kg)과 xylazine(10 mg/kg)를 정맥주사 하였고, 하대정맥을 절개하여 혈관 세척을 하였다. 10% 포르말린을 60 mmHg의 압력으로 주입하며 15분 동안 perfusion fixation하였다. 시술 중 촬영한 혈관조영 사진을 기준으로 하여 시술된 부위의 혈관을 절제하여 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 스텐트가 삽입된 부위는 스텐트를 현미경하에서 제거하고 3~4개의 분절로 나누었다. 풍선도관으로 확장 손상된 부위도 3~4개의 분절로 나누었다. 12~24시간 동안 10% 포르말린에 고정한 후 에탄올로 탈수하여 파라핀에 고정하였다. 파라핀에 고정된 각각의 분절에서 조직을 5 μm의 두께로 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색과 면역조직화학염색을 시행하였다. 고지혈증과 혈관에 대한 기계적인 자극이 대식세포의 침윤과 AGE와 RAGE의 발현에

영향을 주는지 분석하기 위하여 4주간 1%콜레스테롤 사료를 투여하고 시술하지 않은 토끼의 회장동맥도 채취하였다.

혈관 중막과 신생내막에서 대식세포를 염색하기 위하여 토끼의 대식세포에 특이성이 있는 anti-rabbit macrophage antibody(RAM-11, DakoCytomation, 1 : 100 dilution)를 사용하였다. RAGE의 분포 분석은 polyclonal anti-RAGE antibody(Chemicon, USA, 1 : 50 dilution)를 사용하여, AGE의 분포분석은 monoclonal anti-AGE antibody(TransGenic Inc. Japan, 1 : 50 dilution)로, S100A8/A9 단백질은 anti-S100A9 antibody(C-19, Santa Cruz, 1 : 100 dilution)를 사용하여 면역조직화학염색을 하였다. 이차항체로는 biotinylated link anti-mouse antibody를 사용한 후 streptavidine horseradish peroxidase 또는 streptavidine alkaline phosphatase를 반응 시켰다(LSAB kit, DakoCytomation). 발색반응은 peroxidase에 대하여는 DAB를 사용하였으며, alkaline phosphatase에 대하여는 Fast red(DakoCytomation)을 사용하였다. Hematoxyline(DakoCytomation)으로 대조염색을 하였다.

전체세포수와 대식세포수의 측정은 현미경의 200배의 시야에서 촬영된 사진에서 각각 신생내막과 중막의 핵 수를 세었다. 신생내막과 중막의 면적은 morphometry(ImageInside Ver 2.32, Focus Image Tech, Korea)로 측정하였다. 풍선도관 시술 또는 스텐트 시술에 의한 동맥의 손상정도는 혈관손상지수(vascular injury score)를 사용하였으며, 내탄력막의 손상이 없는 경우 0점, 내탄력막이 찢어진 경우 1점, 중막층이 찢어진 경우 2점, 외 탄력막이 찢어진 경우 3점으로 하였다.[11]

통계분석은 Microsoft Excel 2002과 SPSS version 12.0K를 이용하여 paired t-test와 unpaired t-test, Mann-Whitney test로 검증하였고, 대식세포의 침윤과 신생내, 중막 세포수 또는 면적 증가와의 관련성 분석은 단순회귀분석으로 하였다. 수치는 평균값±표준오차로 표시하였다. P 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 정의하였다.

결 과

1% 콜레스테롤 사료를 2주간 투여한 후 혈중 콜레스테롤은 30.8±1.9 mg/dL에서 975.0±60.7 mg/dL로 상승하였다. 고콜레스테롤 혈증을 유도하는 도중에 사망한 토끼는 없었다. 풍선도관 시술 후 또는 스텐트 시술 후 7일, 14일, 그리고 28일째 채취한 모든 조직에서 신생내막이 증식되었으며, 14일, 28일째의 조직에서 많은 포말세포가 형성되어 있었다. 혈관손상지수는 풍선도관 시술에서 0.41±0.12, 스텐트 시술에서는 0.50±0.12로 손상방법에 따른 손상정도의 차이는 없

Table 1. Total cell numbers and area of neointima and media of balloon injured and stented iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits

		Total cells			Area (mm^2)		
		Balloon injury	Stent injury	p	Balloon injury	Stent injury	p
Neointima							
7 days	n=5	753±71	1901±94	<0.001	0.07±0.02	0.17±0.02	0.003
14 days	n=5	1993±282	3349±303	0.008	0.30±0.06*	0.51±0.05†	0.016
28 days	n=7	2092±310	3728±365	0.002	0.26±0.05	0.56±0.05	<0.001
Media							
7 days	n=5	1614±176	1978±625	0.627	0.37±0.02	0.47±0.02	0.004
14 days	n=5	1837±197	1758±142	0.744	0.42±0.04	0.50±0.03	0.172
28 days	n=7	1895±197	1680±197	0.492	0.44±0.03	0.40±0.03	0.458

Data are expressed as mean±SEM. *: p=0.006 vs. 7 days, †: p<0.001 vs. 7 days

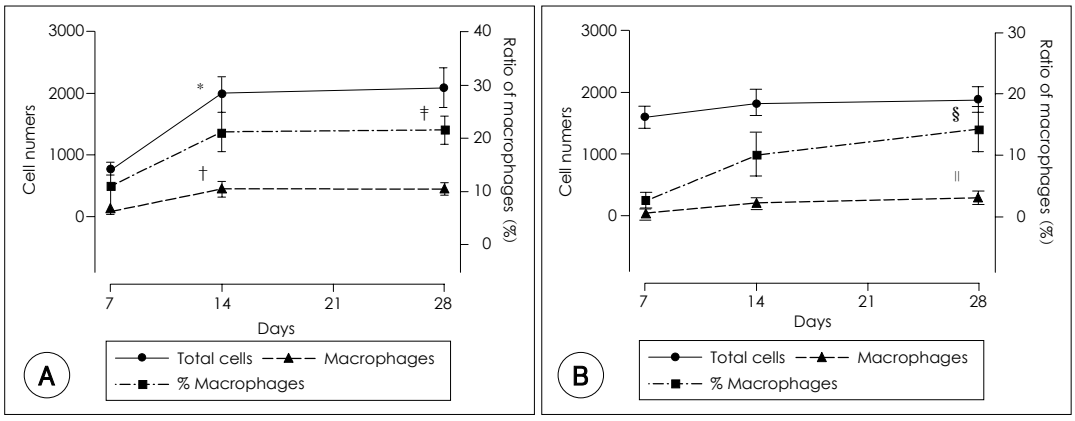

Fig. 1. Total cell numbers, macrophage numbers and ratio of macrophages of neointima (A) and media (B) of balloon injured iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits. *: p=0.001 vs. 7 days, †: p=0.006 vs. 7 days, ‡: p=0.039 vs. 7 days, §: p=0.016 vs. 7 days, ‖: p=0.003 vs. 7 days.

었으나(p>0.05), 풍선도관 시술에서 균일하지 않은 신생내막의 증식이 관찰되었다.

7일째, 14일째, 그리고 28일째 채취된 동맥에서 신생내막의 세포수는 풍선도관 시술에 비하여 스텐트 시술에서 유의하게 더 많았으나(p<0.05), 중막의 세포수는 차이가 없었다. 신생내막의 면적도 풍선도관 시술에 비하여 스텐트 시술에서 유의하게 더 넓었으나(p<0.05), 중막의 면적은 차이가 없었다(Table 1). 신생내막의 세포수 변화는 풍선도관 손상과 스텐트 시술 모두에서 14일까지 유의한 증가를 보이다가(p<0.05) 28일째는 14일째의 세포수와 비슷하였다(Fig. 1, 2). 신생내막 세포수의 변화와는 달리 중막에서 세포수의 증가는 풍선도관 시술에서는 통계적으로 유의하지는 않으나 28일째까지 지속적으로 증가하는 양상을 보였으나(Fig. 1), 스텐트 시술에서는 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2). 풍선도관 시술과 스텐트 시술 모두에서 신생내막과 중막의 면적도 세포수의 변화와 같은 양상으로 변화하였다(Table 1).

시술 후 7일, 14일, 그리고 28일째 조직에서 대식세포가 관찰되었다. 신생내막에서 대식세포의 분포는 7일째에는 신생내막 전층에 분포되어 있었으나, 14일째와 28일째에는 동맥내강에서 이동하여 내탄력막(internal elastic lamina) 가까이에 분포하고 있었다(Fig. 3). 중막의 대식세포는 풍선도관 시술과 스텐트 시술에서 서로 다르게 분포되어 있었다. 스텐트 시술에서는 주로 내탄력막이 손상되어 신생내막과 중막이 연결된 부위에 많은 대식세포가 있었으나, 풍선도관 시술에

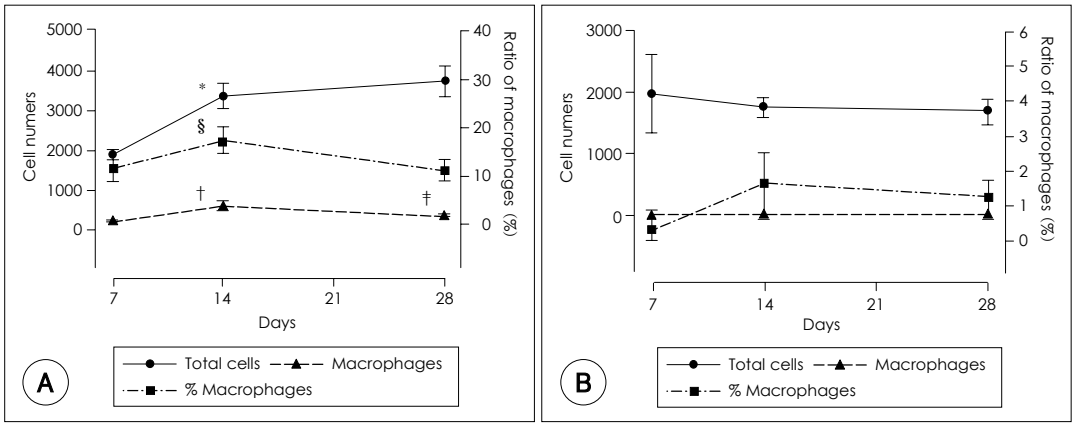

Fig. 2. Total cell numbers, macrophage numbers and ratio of macrophages of neointima (A) and media (B) of stent injured iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits. *: p<0.001 vs. 7 days, †: p=0.001 vs. 7 days, ‡: p=0.014 vs. 14 days, §: p=0.151 vs. 7 days.

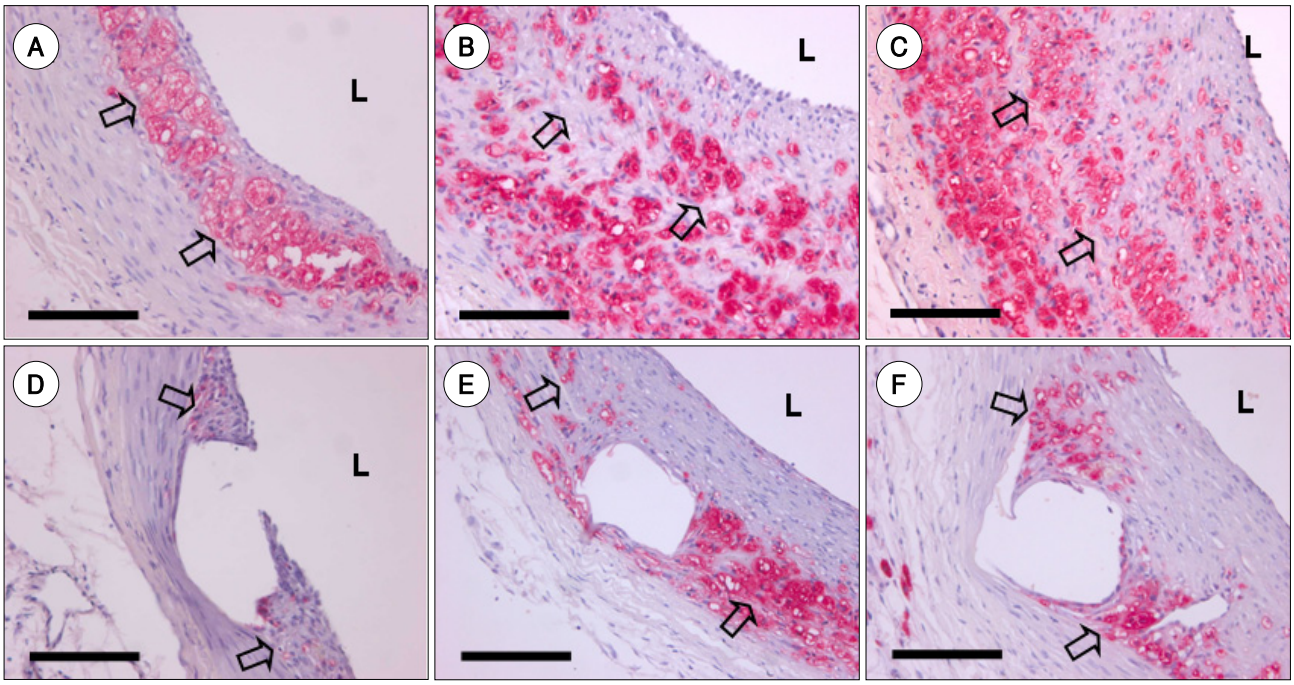

Fig. 3. Photomicrographs of sections of balloon injured iliac arteries at 7 days (A), 14 days (B), and 28 days (C) after injury, stented iliac arteries at 7 days (D), 14 days (E), and 28 days (F) after injury. Each sections are immunostained with RAM-11. At 7 days postinjury, most macrophages are infiltrated in neointima. At 14 and 28 days after injury, macrophages are abundant adjacent to the internal elastic lamina (open arrows). However, stenting induced rare macrophage infiltration in the media. L: lumen, Bar: 100 μm. ×400.

서는 내탄력막 손상이 없는 부위의 중막에도 많은 대식세포가 있었다(Fig. 4). 대식세포의 침윤은 풍선도관 시술과 스텐트 시술에서 차이가 있었다(Table 2)(Fig. 1, 2). 풍선도관 시술에서 신생내막의 대식세포수는 14일째 증가하고(p=0.006) 28일째에 더 이상의 증가는 없었으며(p>0.05), 중막에서 대식세포수는 28일까지 지속적으로 증가하였다(p=0.003). 그러나 스텐트 시술에서는 신생내막에 많은 대식세포가 있으나, 풍선도관 시술과 달리 중막에서 대식세포 침윤은 드물었다. 신생내막의 대식세포수는 14일째 증가하고(p=0.001) 28일째 감소하였다(p=0.014). 중막에서 대식세포는 드물게 관찰되었으며, 대식세포수는 7일째 비하여 14일, 28일째 유의한 증가는 없었다. 풍선도관 시술에서 전체세포수에 대한 대식세포의 비율도 비슷한 양상으로 변하였다. 풍선도관 시술에서 신생내막에서 대식세포의 비율은 7일째의 11.1%에서 28일째 21.6%로 증가되었으며(p=0.039), 중막에서도 7일째의 2.6%에서 28일째의 14.3%로 증가하였다(p=0.016). 스텐트 시술에서 신생내막에서 대식세포의 비율은 통계적으로 유의하지는 않지만 대식세포수의 변화와 같은 양상으로 7일째의 11.6%에서 14일째 17.4%로 증가하고(p=0.151), 28일째 11.1%로 감소하였다.

스텐트 시술에서 대식세포수가 중막 세포수와 면적의 증가에 미치는 영향은 없었으나(Fig. 5)(p>0.05), 신생내막에서는 대식세포수가 신생내막 세포수와 면적에 유의한 영향을 미치고 있었으며 중등도의 양의 상관관계를 보였다(Fig. 5)(세포수 p=0.012, r=0.374; 면적 p=0.004, r=0.434). 풍선도관 손상에서는 신생내막과 중막 모두에서 대식세포의 수가 전체 세포수와 면적의 증가에 유의한 영향을 미치는 요소였으며, 신생내막에서는 강한 양의 상관관계를 보였다(내막세포수 p<0.001, r=0.864; 내막면적 p<0.001, r=0.897; 중막세포수 p=0.001, r=0.604; 중막면적 p=0.049, r=0.353).

RAGE에 대한 면역조직화학염색에서 RAGE의 분포는 풍선도관 손상과 스텐트 시술 모두 같은 양상이었다(Fig. 6). 7일째와 14일째에 RAGE는 혈관내피세포가 주로 분포하는 혈관내강부분에 강한 염색을 보였으나, 28일째는 신생내막과 중막의 세포에서 발현되었다. RAGE와 대식세포에 대한 항체를 사용한 이중면역염색에서 RAGE는 대식세포와 혈관평활근세포 모두에서 발현되었다(Fig. 7). RAGE는 풍선도관 시술 토끼의 손상이 없는 부위 동맥의 내막과 중막에서도 많은 발현을 보여, 동맥의 국소적인 기계적 손상은 국소적인 RAGE 발현의 증가와 함께 손상이 없는 부위의 동맥에도 RAGE의 발현을 같이 증가시켰다(Fig. 9). 그러나 시술을 하지 않은 고콜레스테롤혈증 토끼의 동맥경화가 없는 부위의

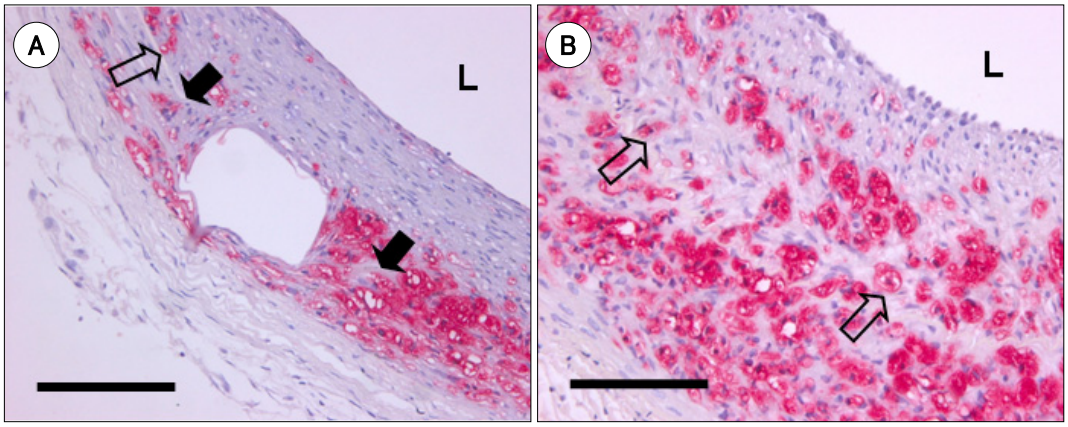

Fig. 4. Representative photomicrographs of fractured internal elastic lamina of stented iliac artery of hypercholesterolemic rabbit (A). Many macrophages are infiltrated in the media. Balloon injured artery showed many macrophage infiltration without fracture of internal elastic lamina (B). Sections are immunostained with RAM-11. Open arrows: the internal elastic lamina. Closed arrows: fractured internal elastic lamina. L: lumen, Bar: 100 μm. ×400.

Table 2. Total numbers of macrophage in the neointima and media of balloon injured and stented iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits

		Number of macrophage			Ratio of macrophage		
		Balloon injury	Stent injury	p	Balloon injury	Stent injury	p
Neointima							
7 days	n=5	87±36	224±52	0.049	11.1±4.2	11.6±2.7	0.923
14 days	n=5	447±103	609±123	0.329	21.2±3.9	17.4±2.7	0.427
28 days	n=7	439±76	347±43	0.314	21.6±2.4	11.1±2.1	0.004
Media							
7 days	n=5	35±15	5±4	0.047	2.6±1.2	0.3±0.3	0.055
14 days	n=5	201±80	26±14	0.013	10.1±3.5	1.7±0.9	0.009
28 days	n=7	296±91	18±7	0.001	14.3±3.6	1.3±0.5	<0.001

Data are expressed as mean±SEM

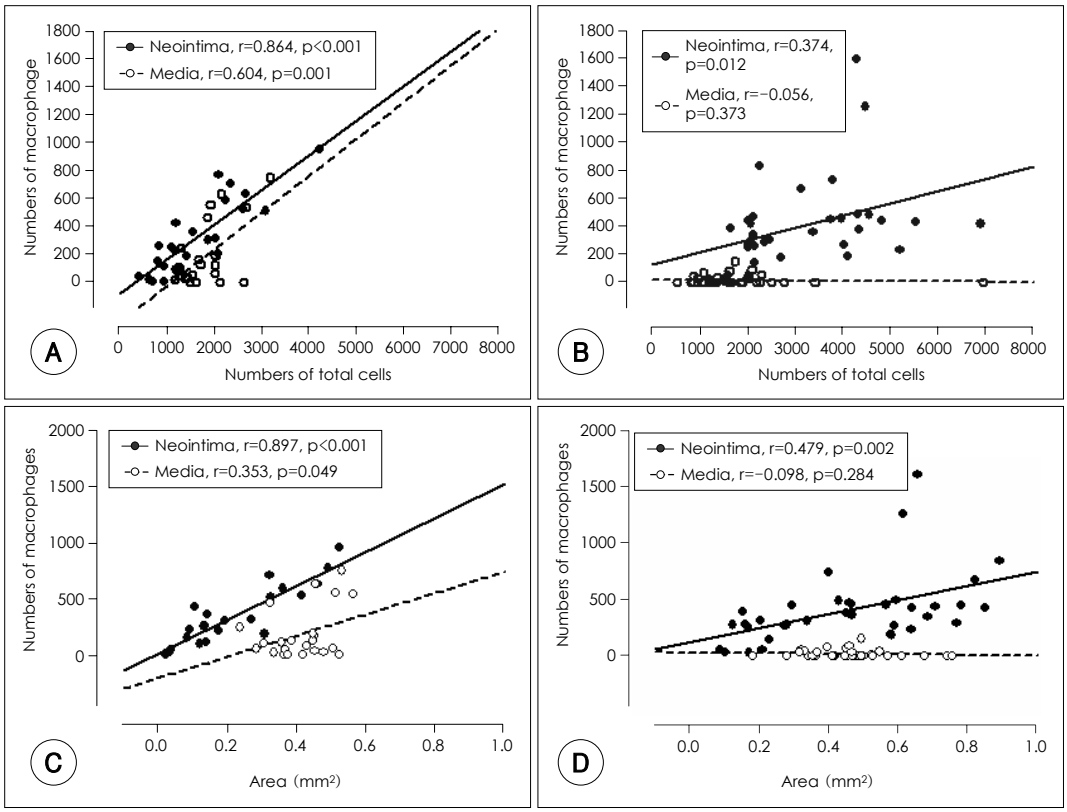

Fig. 5. Correlation between number of total cells and macrophages in balloon injured (A) and stented (B) iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits. Number of macrophages in the neointima and media of balloon injured, and in the neointima of stented shows significant correlation with numbers of total cells. Correlation between area and number of macrophages in balloon injured (C) and stented (D) iliac arteries of hypercholesterolemic rabbits. Number of macrophages in the neointima and media of balloon injured, and in the neointima of stented shows significant correlation with neointima and media area.

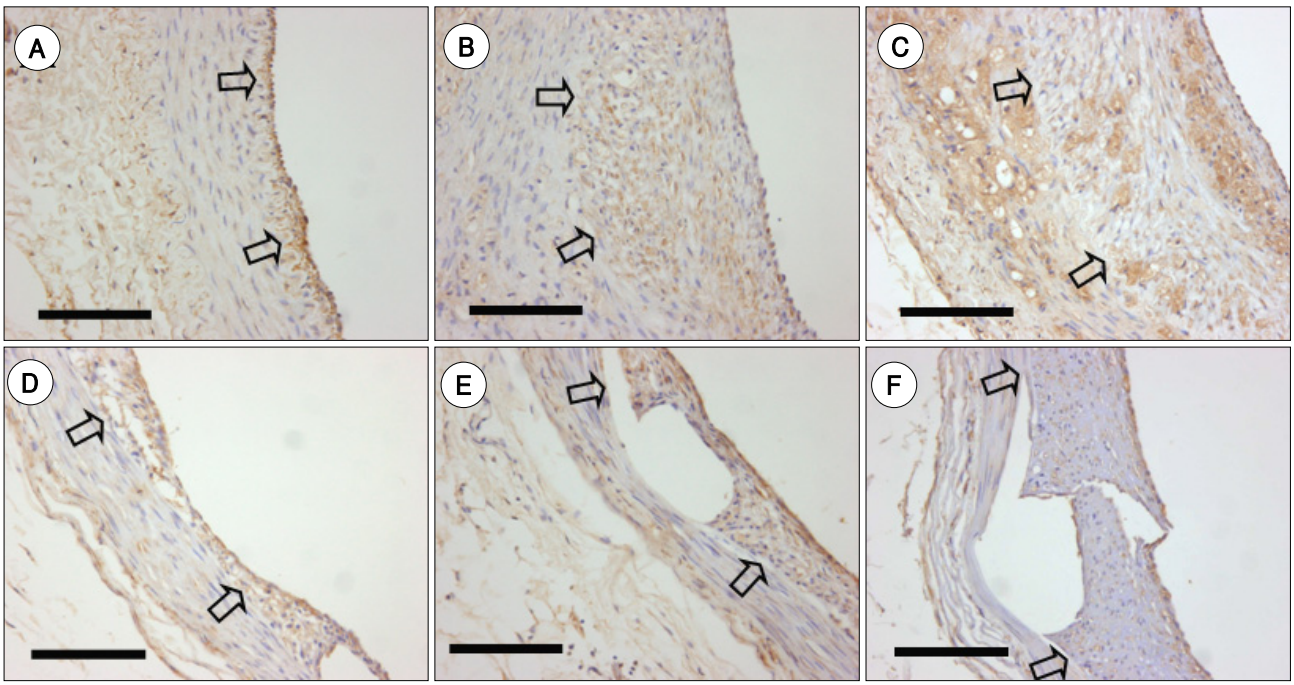

Fig. 6. Photomicrographs of sections of balloon injured iliac arteries at 7 days (A), 14 days (B), and 28 days (C) postinjury, stented iliac arteries at 7 days (D), 14 days (E), and 28 days (F) after injury. Sections are immunostained with polyclonal anti-RAGE antibody. At 7 and 14 days postinjury, upregulated RAGE is abundant in cells adjacent to the lumen. At 28 days, immunostained RAGE is abundant in foam cells. L: lumen, Open arrows: internal elastic lamina. Bar: 100 μm. ×400. RAGE: receptor for advanced glycation end product.

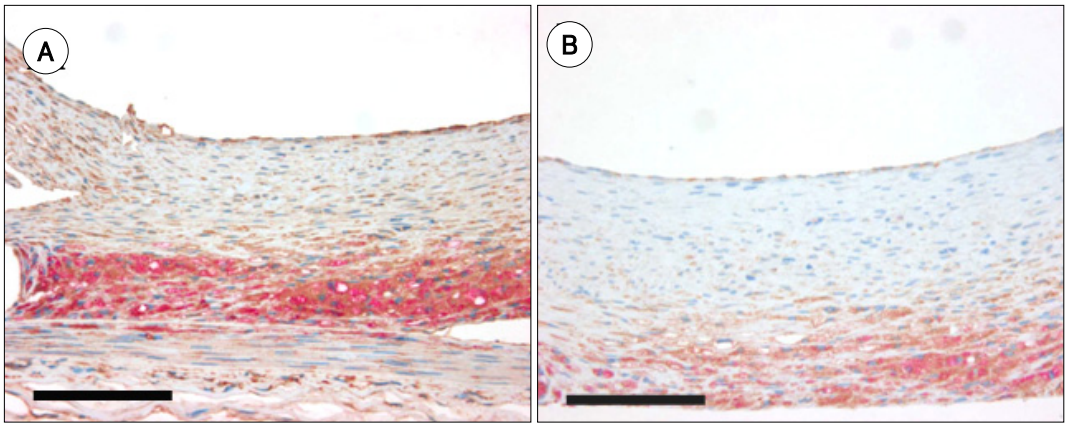

Fig. 7. Photomicrographs of double immunostained sections. A: double immunostaining with RAM-11 (red) and anti-RAGE antibody (brown). RAGE showed even distribution in macrophage and smooth muscle cells. B: double immunostaining with RAM-11 (red) and anti-AGE antibody (brown). Accumulated AGE is abundant in macrophage. Bar: 100 μm. ×400. AGE: advanced glycation end product.

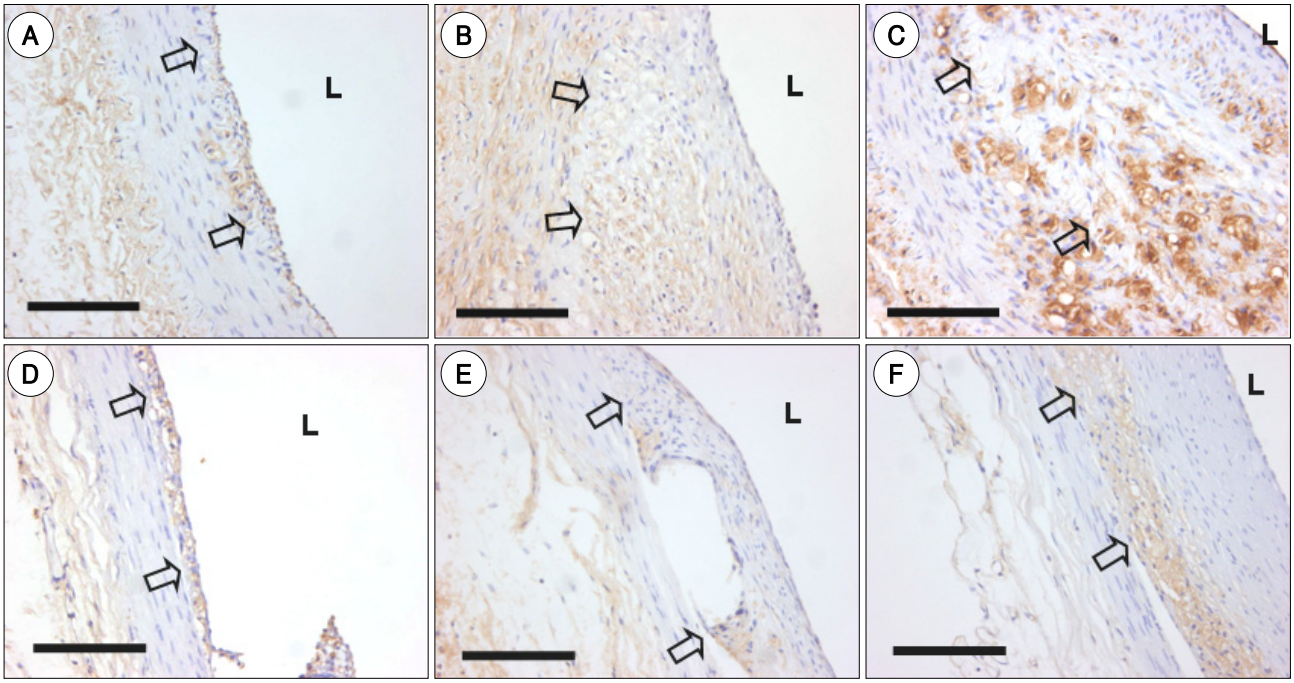

Fig. 8. Photomicrographs of sections of balloon injured iliac arteries at 7 days (A), 14 days (B), and 28 days (C) after injury, stented iliac arteries at 7 days (D), 14 days (E), and 28 days (F) after injury. Each sections are immunostained with monoclonal anti-AGE antibody. AGE is abundant in foam cells. L: lumen, Open arrows: internal elastic lamina, Bar: 100 μm. ×400.

동맥에서는 RAGE 발현의 증가는 없었다.

RAGE에 작용하는 배위자인 AGE는 RAGE에 작용할 수도 있지만 세포에 섭취되어 축적되기도 한다. 스텐트 시술에서 AGE는 7일째에는 신생내막의 포말세포에서 주로 관찰되었으며, 14일째와 28일째에도 주로 신생내막의 포말세포에 많이 분포되어 있었다(Fig. 8). 풍선도관 시술에서는 스텐트 시술과 달리 7일째 신생내막과 중막 모두에서 AGE가 관찰되었으며, 14일째와 28일째 신생내막과 중막의 포말세포에 많은 침착을 보였다(Fig. 8). AGE가 침착된 세포를 확인하기 위하여 대식세포와 AGE에 대한 이중 면역조직화학염색에서 AGE는 주로 대식세포에 침착되어 있었다(Fig. 7). 풍선도관 시술 토끼의 기계적 손상이 없는 부위의 동맥에서 AGE의 침착이 관찰이 되지 않았다(Fig. 9). 또 다른 배위자인 S100A8/A9 단백질에 대한 면역조직화학염색에서 S100A8/A9 단백질은 관찰되지 않았다.

고 찰

대식세포는 동맥경화의 발생과 관동맥 성형술 후 발생하는 재협착의 발생에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 인체 동맥경화 조직의 병리학적인 연구와 동물실험에서 보고되고 있다.[1] 동맥경화가 발생하는 초기에는 지단백이 동맥의 내막층에 침윤되어 내막두께를 증가시키고, 내막에 침윤된 지단백은 내막층으로 단핵세포의 이동을 일으키고, 이동된 단핵세

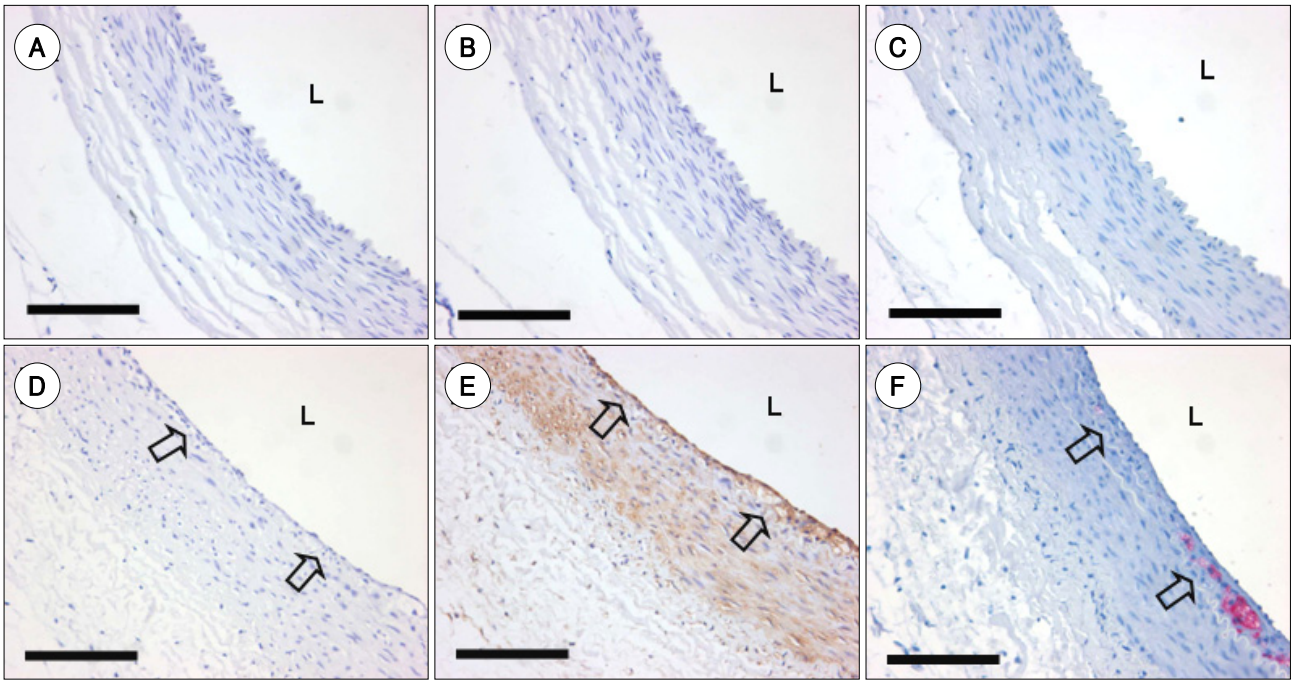

Fig. 9. Photomicrographs of control hypercholesterolemic rabbit fed for 4 weeks with 1% cholesterol diet (A, B, and C), and non-injured arteries of balooninjured rabbit at 7 days postinjury (D, E, and F). Immunostaining with anti-AGE antibody showed no AGE accumulation (A and D). Immunostained with anti-RAGE antibody showed abundant RAGE in the neointima and media of balloon injured rabbit, but not in control rabbit (B and E). Section C and F are immunostained with RAM-11. L: lumen, Open arrows: internal elastic lamina. Bar: 100 μm. ×400.

포는 대식세포로 변화된다. 대식세포는 세포질에 지질을 축적하여 포말세포로 형태가 변하고 여러 가지 염증반응을 일으키는 씨토카인을 분비하여 대식세포의 이동과 평활근 세포의 증식과 이동을 증가시켜서 동맥경화의 발생에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 동맥 경화와는 달리 관동맥스텐트 삽입술 후 발생한 재협착의 병변에서 대식세포가 드물게 발견되어 재협착 과정에 대식세포가 작용하는 지는 알려져 있지 않고 있다.[12] 관동맥 성형술은 크게 단순한 풍선도관에 의한 확장과 스텐트를 시술하는 두 가지 방법이 이용되고 있다. 이 두 가지 시술은 재협착의 발생율에 차이가 있으며, 재협착 발생의 기전을 연구한 돼지 관동맥 성형술 모델에서 세포증식과 염증반응에도 차이가 있었다.[13] 또한 관동맥의 동맥경화 병변의 발생에도 염증반응이 중요한 역할을 하고 있으며,[14] 이 과정에 대식세포가 작용하고 있을 것으로 생각되고 있어, 대식세포의 역할에 차이가 있을 것으로 예상되고 있다.

본 연구에서 동맥 손상후 발생하는 신생내막과 중막의 증식에 대식세포가 미치는 역할과 손상의 방법에 따른 차이가 있는지를 연구하기 위하여 동맥경화의 기전을 연구하는 데 많이 사용하는 고콜레스테롤혈증 토끼 모델을 사용하여[15] 일측 회장동맥에 풍선도관을 확장하여 손상을 일으키고 반대측 회장동맥에는 스텐트를 확장 시술하였다. 토끼에 1% 또는 2% 콜레스테롤 사료를 투여하면 2주에 최고치에 도달하며 대식세포의 침윤이 시작된다.[16] 대식세포는 씨토카인 등을 분비하여 동맥경화성 병변을 일으키고 진행시키게 된다. 본 연구에서 콜레스테롤 혈증이 최고치에 도달하고 대식세포의 침윤이 발생하지 않은 동맥에 시술을 하기 위하여, 1% 콜레스테롤 사료를 14일간 투여하고 시술을 하였다. 시술 후 고콜레스테롤혈증을 유지하기 위하여 콜레스테롤 사료를 계속 투여 하였다.

관동맥 성형술 후 대부분의 재협착은 6개월 이내에 발생하고 12개월 이후에는 거의 발생하지 않는다.[17] 또한 관동맥내 초음파를 이용한 재협착의 발생기전에 대한 연구에서 내막의 증식과 중막과 외막의 재형성이 풍선도관에 의한 관상동맥 확장술에서 재협착이 발생하는 중요한 기전이나,[18] 스텐트 시술의 재협착에는 신생내막의 증식이 중요한 역할을 하고 있었다.[19] 본 연구에서 신생내막의 면적과 세포수는 풍선도관 시술과 스텐트 시술 모두에서 14일째까지 급격히 증가하고 이후에는 더 이상의 증가는 없었다. 풍선도관 시술에서 중막 면적과 세포수의 증가는 유의하지는 않지만 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 동맥 손상 후 일정기간동안 재협착이 발생하고 이후에는 재협착 발생이 현저히 떨어지는 현상과, 풍선도관 시술에서 신생내막의 증식과 중막의 재형성이 재협착의 발생에 중요한 역할을 하고 있음을 설명하고 있다. 스텐트 시술에서는 재협착의 발생에 신생내막의 증식이 중요한 역할을 하고 있으나 중막의 면적과 세포의 양은 변화가 없어, 스텐트는 중막이 증식하는 것을 억제하는 효과가 있으며, 이러한 효과는 스텐트의 기계적인 효과에 의한 것으로 보인다. 경피적 관동맥 성형술에서 스텐트 시술이 풍선도관 성형술에 비하여 재협착의 발생을 많이 감소시켰으나 여전히

약 20~30%에서 재협착이 발생한다. 본 연구에서 중막의 면적과 세포수는 풍선도관 시술과 스텐트 시술에서 차이가 없었으나, 내막의 면적과 세포수는 스텐트 시술에서 유의하게 많았다. 스텐트가 중막의 증가를 감소시키는 효과를 가지고 있으나 재협착의 발생을 완전히 방지하지 못하고 있는 것은 풍선도관 시술에 비하여 과도한 신생내막의 증식에 기인하고 있는 것으로 보인다.

동맥경화의 발생이나 동맥성형술 후 재협착의 발생에 대식세포가 중요한 역할을 하고 있으며, 대식세포는 여러가지 씨토카인 등을 분비하여 신생내막과 중막에서 혈관평활근세포의 증식을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 대식세포의 증식이 혈관 손상후 신생내막의 증식과 중막의 증식에 영향을 미치고 있는 것으로 보이는 소견이 관찰되었다. 첫째, 풍선도관 시술에서 대식세포는 신생내막과 중막에 모두 침윤이 되고 중막에서 대식세포는 지속적으로 침윤이 증가하며 중막의 세포수와 면적도 유의하지는 않지만 증가하는 양상이었다. 둘째, 풍선도관 시술에서 신생내막과 중막의 세포수와 면적은 대식세포수와 유의한 상관관계 있었다. 셋째, 스텐트 시술의 신생내막에서 28일째 전체세포수의 증가에도 불구하고 대식세포는 감소하였으나, 신생내막의 면적과 세포수는 대식세포수와 유의한 상관관계가 있었다. 넷째, 스텐트 시술에서 대식세포의 침윤이 적은 중막은 면적과 세포수도 오히려 감소하는 경향을 보여주었다.

서로 다른 형태의 손상 방법인 풍선도관 시술과 스텐트 시술에서의 재협착 과정에 대식세포가 서로 다른 양상으로 작용하는지는 잘 알려져 있지 않고 있다. 본 연구에서 풍선도관 시술과 스텐트 시술에서 신생내막과 중막의 증식에 대식세포의 역할은 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 첫째, 본 연구에서 중막에서 대식세포의 분포는 풍선도관 시술에서는 내탄력층 주변에 이동하여 분포하고 있으나, 스텐트 시술에서는 내탄력층이 손상된 부위를 제외하고는 대식세포가 거의 관찰되지 않아서, 스텐트 시술은 대식세포가 중막으로 이동하는 것을 억제하는 것으로 보였다. 또한 스텐트 시술에서는 풍선도관 시술에 비하여 대식세포의 증식이 없이 중막의 증식이 발생하였으며, 손상 후 7일째 대식세포 수가 풍선도관 시술에 비하여 적음에도 불구하고 풍선도관 시술에 비하여 중막의 면적이 더 넓었으며 전체 세포수도 더 많았다. 둘째, 신생내막에서 대식세포는 다른 연구 결과와 같이 풍선도관 시술과 스텐트 시술 모두에서 시술초기인 7일째에는 신생내막 전층에 분포하고 있으며, 14일과 28일째에는 내탄력층 주변으로 이동하여 분포하고 있었다.[20] 그러나 풍선도관 시술에서 신생내막 대식세포수의 증가가 멈춘 14일째부터 신생내막의 전체 세포수도 변화가 없었으나, 스텐트 시술에서는 28일째 대식세포의 감소에도 불구하고 신생내막의 전체 세포수는 유의하지는 않지만 증가하는 양상을 보이고 있어, 풍선도관 시술에서 신생내막의 형성 및 증식에 대식세포가 중요한 역할을 하고 있으나, 스텐트 시술에서는 14일 이후에는 대식세포 이외의 기전에 의하여 신생내막의 증식이 이루어지고 있는 것으로 보였다. 셋째, 풍선도관 시술에서는 내탄력막의 손상이 없는 부위에도 많은 대식세포의 침윤이 관찰되었으나 스텐트 시술에서는 내탄력막의 손상이 없는 부위에서는 대식세포의 침윤이 드물게 관찰되어, 서로 다른 형태의 손상에 따라 내탄력막의 기능적 손상 또는 대식세포의 내탄력막 투과기능변화에 차이가 발생하여 대식세포가 작용하는데 영향을 미치고 있는 것으로 보이고 있었다. 넷째, 신생내막과 중막의 세포수와 면적의 증가가 대식세포수와 유의한 관련이 있는가에 대한 단순회귀분석에서, 풍선도관 시술은 신생내막과 중막에서 유의한 상관관계가 있었으나, 스텐트 시술에서는 신생내막에서만 중등도의 상관관계를 보여주어 대식세포의 역할이 손상의 종류에 따라 차이가 있음을 시사하는 결과를 보여주었다.

단백질의 당화에 의하여 발생하는 AGE는 당뇨환자에서 동맥경화의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하고 있으며,[2)21)] 당뇨가 없는 사람의 동맥경화 병변의 조직에서 AGE가 세포내와 세포외에 축적되어 있으며 연령이 증가함에 따라 AGE의 양도 증가되는 것이 밝혀져서, 당뇨가 없는 환자에서도 동맥경화의 발생에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있다.[3)22)] 또한 당뇨병 모델 동물실험에서 AGE는 다양한 AGE 수용체를 자극하여 염증연쇄반응을 일으켜서 동맥경화를 발생시키고 혈관 손상 후 재협착을 일으키는 것이 보고되었다. AGE가 작용하는 수용체는 RAGE, oligosaccharyl transferase-48(AGER-1), 80K-H phosphoprotein(AGER-2), galectin-3(AGER-3), CD36, class A type Ⅰ and type Ⅱ macrophage scavenger receptors 등이 있다.[7)] 이들 중에 동맥경화의 발생에 RAGE를 통한 염증연쇄반응이 가장 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있다.[7)23)] 따라서 동맥성형술 후 발생하는 신생내막과 중막의 증식에 AGE와 RGAE가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있으나,[24)] 대식세포의 작용에서 AGE-RAGE 시스템의 역할에 대하여는 연구된 바가 없다.

AGE는 대식세포에 주로 축적되어 있었으며, 동맥손상의 초기인 시술 후 7일째부터 조직에서 관찰되었다. 본 연구에서 관찰되는 AGE는 혈중에 있는 단백질의 당화에 의하여 발생되지 않고 기계적인 손상에 의하여 대식세포의 세포막이나 세포질에 있는 단백질의 당화에 의하여 발생된 것으로 보인다. AGE는 Maillard반응에 의하여 생성되는 여러 가지 산물들을 총칭하는 용어로 여기에 N^{ε}-(Carboxymethyl)lysine (CML)-protein adducts, Pyrraline adducts, Pentosidine, imidazolone 등이 있다.[7)] 이들 중 CML은 AGE의 주된 산물로[25)] 동맥경화 병변의 대식세포에서 발견되고 있으며,[26)] 산화스트레스에 의하여 대식세포에서 생성이 증가되는 것으로 생체외 실험에서 증명되었다.[27)] 본 연구에 사용된 anti-AGE 항체는 CML adducts에 대한 항체로,[28)] 면역조직화학염색에서 대식세포에 침착 되어있는 AGE는 CML-adducts임을 보여

주었다. 고콜레스테롤 혈증에서 풍선도관 시술 또는 스텐트 시술은 산화 스트레스를 증가시켜 대식세포에서 CML-adducts가 생성되며, 손상 초기부터 이러한 CML-adducts의 생성은 손상 후 짧은 시간에도 AGE가 생성되고 재협착의 신속한 진행에 영향을 미치고 있음을 시사하고 있다.[29] 또한 풍선도관 시술 토끼의 시술이 되지 않은 혈관에서 AGE가 관찰되지 않는 것도 혈관손상의 기계적인 자극에 의하여 대식세포에서 AGE의 생성이 촉진되는 것을 보여주고 있다. 대식세포에서 생성된 AGE는 대식세포나 평활근세포에서 RAGE의 활성도를 증가시켜 대식세포에서 IL-8, vascular endothelial growth factor, TNF, 그리고 tissue factor 등의 생산을 증가시켜 신생내막과 중막에서 염증연쇄반응을 활성화 시키고 신생내막과 중막 세포의 증식을 촉진시키는 것으로 보인다.

RAGE에 작용하는 또 다른 배위자인 S100A8/A9은 주로 탐식세포에서 생성되며 혈중에 방출되어 RAGE의 염증연쇄반응을 활성화 시켜서 동맥경화의 발생에 작용하는 것으로 생각되고 있다.[30] 본 연구에서 S100A8/A9 단백질이 조직에서 발견되지 않은 것은 동맥 손상 후 신생내막과 중막의 증식에 대식세포가 작용하는 기전에 S100A8/A9 단백질은 관련되지 않은 것으로 보인다.

본 연구에서 RAGE의 발현은 손상초기에 혈관내강주변에 강한 발현을 보이고, 28일째에는 내탄력막 주변의 중막과 내막에서 강한 활성을 보이는 것은, 손상초기에 동맥 내피세포의 재생과 신생내막의 증식이 활발히 이루어지는 혈관 내강의 내피세포 주위에서 RAGE 발현이 증폭되고, 이 증폭된 신호는 다른 RAGE의 발현과 신호를 증폭시켜서 지속적으로 내탄력막 주변에서의 세포 증식을 촉진 시키는 것으로 보인다.[24] 그리고 RAGE는 혈관 손상이 없이 4주간 콜레스테롤 사료를 투여한 고콜레스테롤 혈증 토끼에서 활성도가 증가하지 않았으나, 풍선도관 시술 토끼의 손상이 없는 부위의 동맥에서는 활성도가 증가되어 있었으며, 혈관 평활근 세포뿐만 아니라 대식세포에서도 활성도가 증가되어 있었다. 이러한 손상이 없는 부위에서 RAGE발현의 증가는 손상부위에 발현이 증가된 RAGE가 다른 부위의 RAGE 발현의 증가도 유도하는 것으로 보인다. 그러나 RAGE는 대식세포의 침윤이 많지 않은 손상 초기에서부터 발현이 증가되어 있으며, 이 중 면역화학염색에서 대식세포 이외의 부위에서도 발현이 증가되어 있는 것은 대식세포에 있는 AGE의 자극 이외에 기계적 손상에 의하여서도 발현이 증가되고 활성화 되어 세포증식을 일으키는 것을 보여주고 있다.

본 연구의 제한점으로 첫째, 소수의 동물에서 연구가 되었다는 점이다. 본 연구의 결과가 더 많은 개체에서 수행되었을 때 결과가 달라질 가능성도 있다. 따라서 본 연구의 결과를 확인하기 위한 추가적인 연구가 필요하다. 둘째로 본 연구의 결과는 대식세포가 신생내막의 형성 및 증식에 영향을 미치는 것을 제시하고 있으나, 이를 증명하기 위하여서는 대식세포의 작용을 억제하는 연구가 필요하다. 셋째로 시술시 6기압의 풍선도관 압력으로 손상을 일으켰으며, 조직분석에서 낮은 손상지수를 보여 주었다. 따라서 풍선도관 시술이 스텐트 시술보다 적은 손상이 발생하였을 가능성이 있다. 풍선도관의 압력이 증가할수록 혈관의 손상과 신생내막의 증식이 증가하므로,[11] 6기압 이상의 손상에서도 대식세포의 침윤양상이 본 연구의 결과와 같은지는 확인이 필요하다.

결론으로 본 연구는 대식세포가 스텐트 시술에 비하여 풍선도관 시술에서 신생내막의 형성과 증식에 중요한 역할을 하고 있음을 시사하는 결과를 보여주었다. 그리고 기계적인 동맥 손상은 대식세포에서 AGE의 생성을 유도하고 RAGE를 활성화시켜서 신생내막의 생성과 증식, 그리고 중막의 증식을 촉진 시키는 것으로 보이나, 이에 대한 추가의 연구가 필요하겠다.

요 약

배경 및 목적 :

동맥경화의 발생에 중요한 대식세포의 작용과정에 혈관 손상 후 염증반응의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하고 있는 receptor for advanced glycation end products(RAGE), advanced glycation end products(AGE), 그리고 S100A8/A9이 관계하고 있는지는 알려져 있지 않고 있다. 본 연구는 고콜레스테롤혈증 토끼에서 서로 다른 시술방법인 풍선도관 시술 또는 스텐트 시술 후 신생내막의 형성과정에서 대식세포가 미치는 영향의 차이와 대식세포에서 발생하는 염증반응에 RAGE, AGE, 그리고 S100A8/A9이 관계하는지를 연구하였다.

방 법 :

뉴질랜드 백토에 2주간 1% 콜레스테롤 사료를 투여하고 한쪽 회장동맥에 풍선도관으로 동맥 손상을 일으키고 반대쪽 회장동맥에는 스텐트를 시술하였다. 시술 후 7일, 14일, 그리고 28일째 시술된 회장동맥조직을 채취하여 분석하였다.

결 과 :

증식된 신생내막의 세포수는 풍선도관 시술에 비하여 스텐트 시술에서 더 많았으나($p<0.05$), 중막의 세포수는 차이가 없었다. 신생내막의 세포수와 면적은 풍선도관 시술과 스텐트 시술 모두에서 14일째까지 증가하였다($p<0.05$). 중막의 세포수는 유의한 증가가 차이가 없었다($p>0.05$). 신생내막과 중막의 면적도 세포수와 같은 양상으로 증식하였다. 풍선도관 시술에서 대식세포 침윤은 신생내막에서 14일째 증가하고($p=0.011$) 28일째는 증가가 없었으나, 중막에서는 28일까지 지속적으로 증가하였다. 스텐트 시술에서 14일째 내막에서 대식세포의 침윤이 증가하고($p=0.001$) 28일째 감소하였으나($p=0.014$), 중막에서는 변화가 없었다. 전체세포수와 면적은 풍선도관 손상에서 신생내막과 중막의 대식세포수와 유의한 상관관계가 있었으나($p<0.05$), 스텐트 시술에서는 신생내막에서만 유의한 상관관계가 있었다($p<0.05$). RAGE는 7일째, 14일째 혈관 내피세포 부분에 강한 발현을 보였으나,

28일째 내탄력막 주변의 신생내막과 중막의 세포들에서도 발현이 증가하였다. RAGE는 대식세포와 혈관 평활근 세포 모두에서 발현이 증가되었다. AGE는 풍선도관 손상에서는 신생내막과 중막 모두에서 축적되어 있었으나, 스텐트 시술에서는 주로 신생내막에 축적 되어있었다. AGE는 주로 대식세포에 축적되어있었다. S100A8/A9은 관찰되지 않았다.

결 론 :

서로 다른 시술방법인 풍선도관 시술과 스텐트 시술에서 신생내막의 형성에 대식세포의 영향은 서로 다르며, 풍선도관에 의한 손상 후 신생내막의 형성에 더 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보였다. 기계적인 동맥 손상은 대식세포에서 AGE의 생성을 유도하고 RAGE를 활성화시켰다.

중심 단어 : 재협착 ; 대식세포 ; Advanced glycation end products ; Receptor for advanced glycation end products ; 고지혈증.

본연구는 동국대학교 논문게재장려금 지원으로 이루어 졌음.

REFERENCES

1) Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. *Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. Med Electron Microsc 2002;35:179-203.*
2) Vlassara H, Bucala R, Striker L. *Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Lab Invest 1994;70:138-51.*
3) Wu JT. *Advanced glycosylation end products: a new disease marker for diabetes and aging. J Clin Lab Anal 1993;7:252-5.*
4) Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. *The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. Biochim Biophys Acta 2000;1498:99-111.*
5) Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K. *Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues. Lab Invest 1998;78:1591-606.*
6) Kume S, Takeya M, Mori T, et al. *Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. Am J Pathol 1995;147:654-67.*
7) Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus: I. the AGE concept. Cardiovasc Res 1998;37:586-600.*
8) Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, et al. *Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. J Clin Invest 2003;111:959-72.*
9) Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C. *Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. Trends Immunol 2003;24:155-8.*
10) Rhee MY, Kim HS, Chae IH, et al. *Effect of hypercholesterolemia on cell proliferation and apoptosis in rabbit iliac artery after balloon-injury. Korean Circ J 1998;28:781-94.*
11) Kimura T, Miyauchi K, Yamagami S, Daida H, Yamaguchi H. *Local delivery infusion pressure is a key determinant of vascular damage and intimal thickening. Jpn Circ J 1998;62:299-304.*
12) Chung IM, Cho SY. *Histopathological characteristics of human coronary stent restenosis. Korean Circ J 2000;30:5-15.*
13) Nakatani M, Takeyama Y, Shibata M, et al. *Mechanisms of restenosis after coronary intervention: difference between plain old balloon angioplasty and stenting. Cardiovasc Pathol 2003;12:40-8.*
14) Koo BK, Choi DH, Ryu SK, et al. *Role of inflammation on coronary artery disease in Koreans. Korean Circ J 2002;32:988-95.*
15) Ruan Y, Takahashi K, Naito M. *Immunohistochemical detection of macrophage-derived foam cells and macrophage colony-stimulating factor in pulmonary atherogenesis of cholesterol-fed rabbits. Pathol Int 1995;45:185-95.*
16) Guyton JR, Klemp KF. *Early extracellular and cellular lipid deposits in aorta of cholesterol-fed rabbits. Am J Pathol 1992;141:925-36.*
17) Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, et al. *Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. J Am Coll Cardiol 1988;12:616-23.*
18) Kimura T, Kaburagi S, Tamura T, et al. *Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. Circulation 1997;96:475-83.*
19) Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, et al. *Patterns and mechanisms of in-stent restenosis: a serial intravascular ultrasound study. Circulation 1996;94:1247-54.*
20) Stadius ML, Rowan R, Fleischhauer JF, Kernoff R, Billingham M, Gown AM. *Time course and cellular characteristics of the iliac artery response to acute balloon injury: an angiographic, morphometric, and immunocytochemical analysis in the cholesterol-fed New Zealand white rabbit. Arterioscler Thromb 1992;12:1267-73.*
21) Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. *Role of nonenzymatic glycosylation in atherogenesis. J Cell Biochem 1986;30:111-20.*
22) Sakata N, Imanaga Y, Meng J, et al. *Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 1998;141:61-75.*
23) Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. *RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. Microbes Infect 2004;6:1219-25.*
24) Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. *Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. Circ Res 1999;84:489-97.*
25) Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. *N^{ε}-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. Biochemistry 1995;34:10872-8.*
26) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. *Increased accumulation of the glycoxidation product N^{ε}-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. J Clin Invest 1997;99:457-68.*
27) Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. Biochem J 1999;344:109-16.*
28) Ikeda K, Higashi T, Sano H, et al. *N^{ε}-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. Biochemistry 1996;35:8075-83.*
29) Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. *Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: a model for intracellular glycosylation in diabetes. J Clin Invest 1994;94:110-7.*
30) Eue I, Konig S, Pior J, Sorg C. *S100A8, S100A9 and the S100A8/A9 heterodimer complex specifically bind to human endothelial cells: identification and characterization of ligands for the myeloid-related proteins S100A9 and S100A8/A9 on human dermal microvascular endothelial cell line-1 cells. Int Immunol 2002;14:287-97.*