

적혈구의 산화과정과 이들이 대식세포에 결합하는데 관여하는 물질

중앙대학교 의과대학 내과학교실,¹ 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단방사선과²
고홍숙¹ · 김철우¹ · 최상희² · 이광제¹ · 김상욱¹ · 김태호¹ · 김치정¹ · 류왕성¹

The Oxidation Process of Red Blood Cells and the Molecules Involved in their Binding to Macrophage

Hong Sook Ko, PhD¹, Cheol Woo Kim, MD¹, Sang Hee Choi, MD², Kwang Je Lee, MD¹,
Sang Wook Kim, MD¹, Tae Ho Kim, MD¹, Chee Jeong Kim, MD¹ and Wang Seong Ryu, MD¹

¹Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul.

²Department of Radiology and Center for Imagin Science, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Controversy exists about the characteristics of the lipid-oxidizing process, and the molecules in oxidized lipids that are involved in the binding and uptake to macrophages, in atherosclerosis. The aim of this study was to find answers to these questions using oxidized red blood cells (ox-RBCs). **Materials and Methods** : The RBCs were oxidized in the presence of various concentrations of CuSO₄, and the degree of oxidation evaluated by the semiquantitative measurement of the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The ox-RBC was characterized using annexin-V and flow cytometry. The relationships between the CuSO₄ concentration, the degree of oxidation, characteristics of the ox-RBC and its binding to macrophages transformed from THP-1 cells, were evaluated. **Results** : The RBCs were oxidized, not by their gradual changes, but by the sudden transformation of a proportion of the RBCs in relation to the CuSO₄ concentration. There were few RBCs between oxidized and non-oxidized groups. The annexin-V bound only to the ox-RBC, with a similar degree of binding in all ox-RBCs. The binding of ox-RBC to macrophages was completely inhibited by oxidized low density lipoprotein, which was directly related to the CuSO₄ concentration, the TBARS and the proportion of ox-RBC. **Conclusion** : These results suggest that the oxidation of lipids might be an on-off phenomenon process. Molecules that have the ability to bind annexin-V, presumptively phosphatidyl serine, may be involved in the process of binding the ox-lipids to macrophages. Further study will be needed to clarify these molecules. (Korean Circulation J 2003;33(12):1174-1181)

KEY WORDS : Erythrocytes ; Lipid peroxidation ; Macrophages ; Binding, competitive.

서 론

죽상경화(atherosclerosis)가 발생하는 초기기전에 대

하여 최근에는 죽상경화유발 지단백(atherogenic lipoprotein) 가설이 일반적으로 받아들여지고 있다.¹⁻³⁾ 내
피하 조직에서 산화된 지단백이 대식세포에 의해 섭취

논문접수일 : 2003년 4월 10일

수정논문접수일 : 2003년 6월 4일

심사완료일 : 2003년 7월 8일

교신저자 : 김치정, 100-272 서울 중구 필동 2가 82-1 중앙대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (02) 2260-2382 · 전송 : (02) 2279-2769 · E-mail : cjkim@cau.ac.kr

되어 거품세포가 만들어지고 이들이 모여 지방흔(fatty streak)이 형성되는 것이 죽상동맥경화의 병리학적 초기 소견이다.⁴⁾

일반적으로 세포의 지질 섭취에 관여하는 저밀도지단백 수용체는 세포 내의 콜레스테롤 농도가 증가하면 하향 조절되므로 다량의 지질 섭취가 필요한 거품세포의 형성에는 관여하지 못한다. 청소(scavenger) 수용체는 세포내의 콜레스테롤의 농도가 증가하더라도 하향 조절되지 않으므로 산화지질의 섭취 이전에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.⁵⁾ 변형된 저밀도지단백(LDL)과 결합하는 특성을 가진 청소 수용체는 그 종류가 다양하고 각각의 수용체에 결합하는 물질도 지방산과 같은 단순한 화합물부터 손상된 세포까지 매우 다양하다.^{6,7)}

하지만 저밀도지단백과 저밀도지단백 수용체의 반응과는 달리, 청소 수용체를 통한 산화지질의 반응은 섭취되는 양이 결합하는 양에 비교하여 상대적으로 매우 낮다.⁸⁾ 따라서 비록 대식세포에 산화지질이 결합하고 섭취되기는 하나 오직 이 수용체만을 통하여 거품세포가 생성되는가에 대해서는 의문이 있다. 최근 수용체를 통한 세포내이입(endocytosis) 외에 식작용(phagocytosis)이나 음세포작용(pinocytosis)에 의해 산화지질이 섭취된다는 보고들이 있다.^{9,10)}

산화 지질이 청소 수용체와 결합하는대는 산화 아포 지단백이 작용하는 것으로 생각하였으나 최근 산화 인지질이 청소 수용체의 리간드(ligand)로서 작용한다는 보고가 있었다.¹¹⁾ 인지질은 세포막의 주성분으로 이것에 연결되어 있는 펩타이드나 다당류와 함께 세포들 간의 결합과 섭취 조절에 작용한다는 것은 다른 분야에서는 이미 잘 알려진 사실이다.^{12,13)} 또한 세포막의 이중층(bilayer) 중에 안쪽 층에 주로 존재하는 인지질인 phosphatidyl serine(PS)이 바깥층으로 이동하며, 이들이 청소 수용체의 리간드로 작용한다는 주장도 있어 아직 논란이 있다.¹⁴⁾

청소 수용체는 산화 지질의 결합과 섭취 외에 산화되거나,¹⁴⁾ 당화되거나¹⁵⁾ 혹은 고령인 적혈구¹⁶⁾ 또는 아포 토시스가 일어난 세포를^{14,17)} 대식세포와 같은 전문 포식자가 제거되는 과정에서도 작용하는 것으로 보고되었다. 이 과정에도 역시 세포막의 산화인지질이나 PS가 관여할 가능성이 높다. 따라서 산화 적혈구는 산화지질이 대식세포와 결합되고 섭취되는 과정의 연구에 사용

될 수 있을 것으로 생각된다. 산화적혈구의 사용은 결합과 포식되는 과정을 현미경하에서 확인할 수 있으므로, 온도에 따른 결합과 섭취양의 차이로 섭취양을 구하는 산화 저밀도지단백의 실험과는 달리 두 과정을 분리하여 직접적으로 관찰할 수 있는 장점이 있을 수 있다. 저자들은 산화 적혈구와 대식세포의 결합 및 식작용 실험에서, 여러 가지 경쟁 물질을 이용하여 산화적혈구가 산화 저밀도지단백과 같은 경로를 통하여 결합하지만, 그 과정에 주로 관여하는 수용체는 흔히 알려진 A군이나 B군의 청소 수용체가 아닐 가능성을 제시하였다.¹⁸⁾

본 연구에서는 적혈구가 산화되는 과정에서 발생하는 현상을 관찰하고, 이들이 대식세포에 의해 결합되는 과정에서 산화적혈구 표면의 PS의 역할을 재확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

Phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA), ascorbic acid, 황산구리, disodium-EDTA, trichloroacetic acid(TCA), thiobarbituric acid(TBA), NaOH, N-acetyl galactosamine, N-acetyl glucosamine, fucoidan 등은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS), trypsin 등은 Gibco사(Tulsa, USA)에서 구입하였다. Alexa Fluoro 488 annexin-V는 Molecular Probes사(Eugene, USA)에서 구입하였다. 산화 LDL은 울산의대 김영미 박사가 제공하였다.

세포배양

인간 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1 세포를 10% FBS이 포함된 RPMI-1640 배양액을 이용하여 5% 이산화탄소 존재 하에 섭씨 37도에서 T75 플라스크에 배양하였다. 결합이나 섭취 실험에서는 THP-1 세포를 12 well 플레이트의 각 well에 5×10^5 개의 세포를 넣고, 100 μ g/mL의 농도의 PMA를 투여한 후에 72시간 동안 배양하여 대식세포로 변환시켜 사용하였다.¹⁹⁾

적혈구의 산화 및 산화정도의 측정

혈액을 EDTA 항응고제를 사용하여 채취한 후에 3000

rpm으로 원심분리하여 혈장을 제거하고 30배 용적의 PBS로 3회 씻었다. PBS를 이용하여 적혈구용적률(hematocrit)이 20%가 되게 희석한 후에 ascorbic acid를 5 mM의 농도로 투여하고 황산구리를 최고 1600 μ M 까지 다양한 농도를 투여하여 섭씨 37도에서 90분간 산화시켰다. 원심분리하여 황산구리액을 제거하고, 5 mM의 EDTA를 포함한 PBS로 산화 반응을 중지시킨 후에, PBS로 2회 씻고 적혈구용적률이 10%가 되게 PBS로 희석하였다.²⁰⁾

산화정도를 측정하기 위해서는 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)를 반정량적으로 측정하였다. 적혈구용적률이 2.5%인 적혈구 용액 1 mL에 50% TCA를 0.6 mL 투여하고 원심분리한 후에 0.8 mL의 상층액을 취하였다. 여기에 1 mL의 TBA를 넣고 30분간 끓이고 식힌 후에 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화정도는 10⁶개의 적혈구당 흡광도로 표시하였다.²¹⁾ 산화되는 황산구리의 농도는 개인에 따라 차이가 있어 매 실험마다 다른 농도에 의해 산화된 적혈구를 사용하였다.

적혈구의 산화과정과 결합에 관여하는 표면 물질 동정

산화 과정에서 적혈구의 변화를 관찰하고, 청소 수용체의 리간드 하나로 알려진 PS가 산화 적혈구의 결합에 관여하는가를 확인하기 위해 annexin V와의 결합을 형광 흐름 세포측정법(flow cytometry)을 이용하여 측정하였다. Annexin-V의 결합 실험은 kit를 이용하여 생산자가 제공한 방법을 사용하였다. 산화 적혈구를 PBS로 씻은 후에, 산화 적혈구 수가 100 μ L에 10⁵개가 되게 완충액으로 희석하였다. 여기에 5 μ L의 Alexa Fluoro 488 annexin-V를 투여하고, 실온에서 15분간 방치한 후에 400 μ L의 완충액을 투여하였다. 이를 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 530 nm에서 방출을 측정하였다.

산화적혈구의 결합 및 포식 정도의 측정

PMA에 의해 THP-1 세포로부터 변형된 대식세포를 RPM-I1640 배양액으로 씻고, 10% 적혈구용적률의 산화 적혈구 1 mL을 투여하였다. 결합을 측정하기 위해서는 섭씨 4도에서, 식작용을 관찰하기 위해서는 섭씨 37도에서 90분간 배양하였다. 부착되지 않은 적

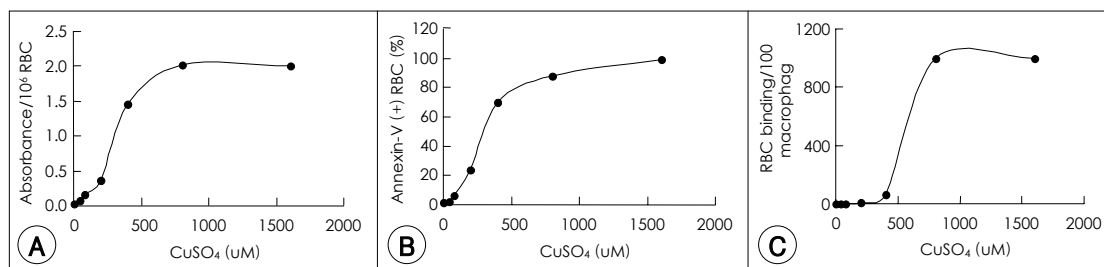


Fig. 1. Representative example of (A) the degree of oxidation expressed by absorbance/10⁶ RBCs. B : the percentage of oxidized RBCs and (C) the number of oxidized RBCs bound to 100 macrophages according to the concentration of CuSO₄. RBC : red blood cell.

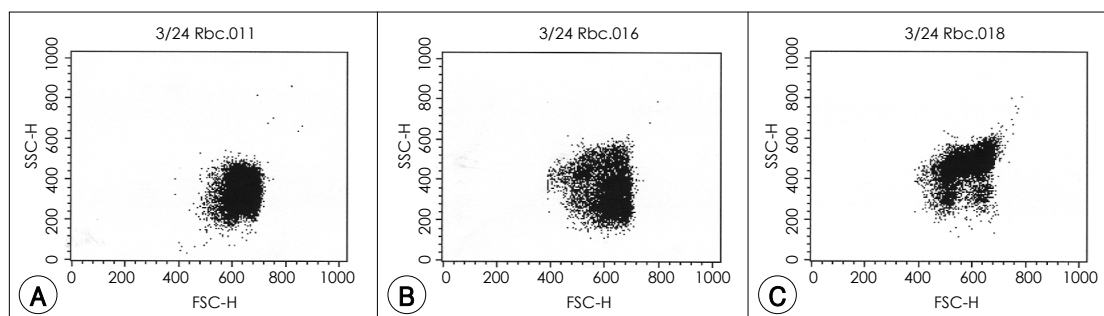


Fig. 2. Dot graph of flow cytometry. A : non-oxidized RBCs. B : RBCs oxidized in the presence of 400 μ M CuSO₄ and (C) fully oxidized RBCs in the presence of high concentration of CuSO₄. After oxidation, cell size decreased and granularity increased. RBC : red blood cell.

혈구를 PBS로 3회 씻어내고, 현미경하에서 대식세포가 묻쳐있지 않는 부위를 선택하여 100개의 대식세포에 결합 혹은 phagocytosis된 적혈구의 개수를 측정하였다.¹⁸⁾ 결합된 산화적혈구 수가 세기에 너무 많은 경우에는 1,000개로 하였으며, 길항제에 의한 억제에는 대식세포 100개에 50~500개가 부착되는 산화 정도에서 실험하였다. 산화 LDL, LDL, fucoidan 등의 길항제를 투여하

여 이들이 산화적혈구의 결합과 식작용에 미치는 영향을 평가하였다.

결 과

TBARS로 측정된 적혈구의 산화 정도는 투여한 황산 구리의 농도와 직접적인 상관관계가 있었다(Fig. 1A).

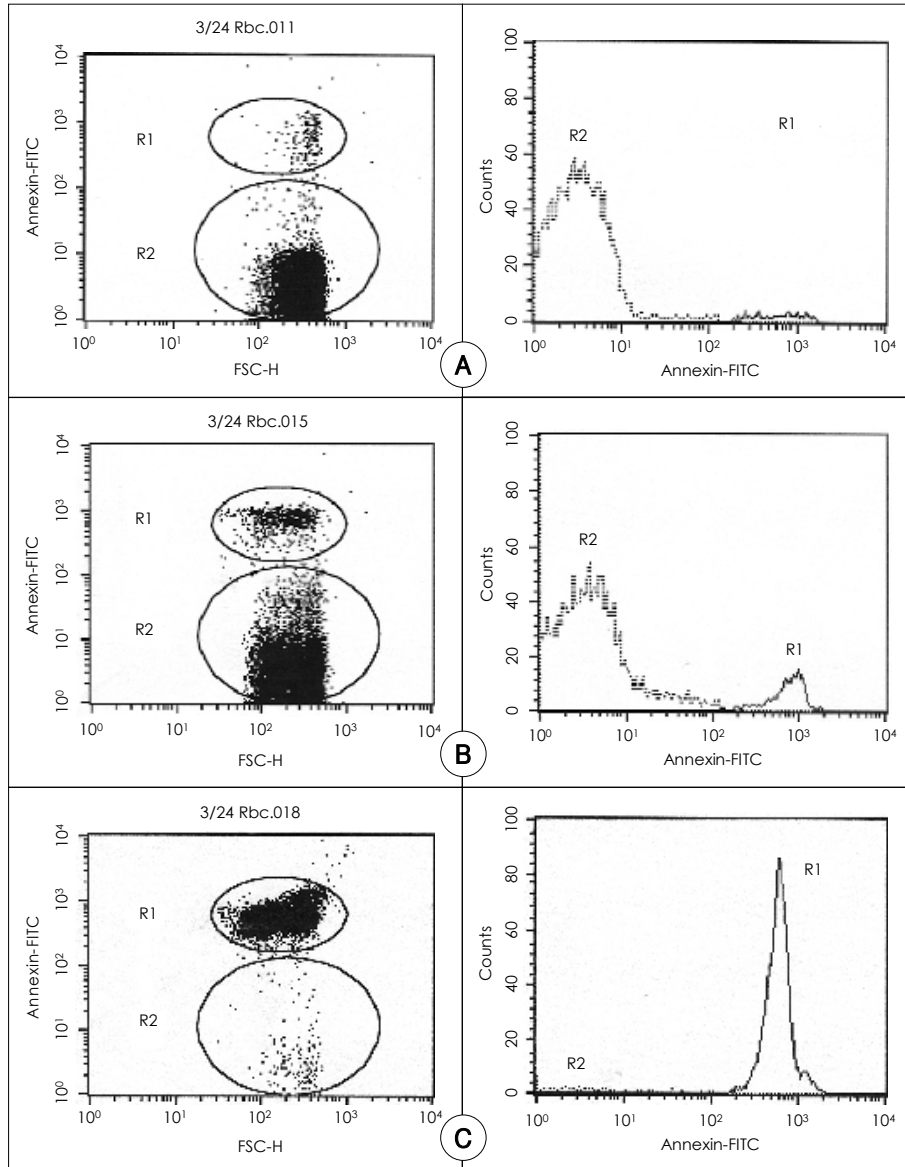


Fig. 3. Binding of annexin-V to RBCs. A : annexin-V did not bind to non-oxidized RBC (region R2 in left figure and dot line in right figure). B : after incubation in the presence of 200 μ M CuSO_4 , small portion of RBCs were oxidized and bound with annexin-V (region R1 in left figure and solid line in right figure). C : all RBCs were oxidized at high concentration of CuSO_4 . Few RBCs were observed between non-oxidized and fully oxidized RBCs and the degree of annexin-V binding was similar between oxidized RBCs at high and low concentrations of CuSO_4 . RBC : red blood cell.

낮은 농도에서는 거의 산화가 일어나지 않는 반면에, 중간농도에서 급속히 산화되었으며, 곧 고평부(plateau)에 도달하였다.

흐름 세포측정의 forward scattering과 side scattering 그림에서 적혈구는 산화되면서 그 크기가 작아지고 과립성이 증가하였으며, 산화되지 않은 적혈구(Fig. 2A)는 산화 적혈구(Fig. 2C)와 어느 정도 구분할 수 있었다(Fig. 2B). Annexin-V는 산화되지 않은 적혈구에는 결합하지 않았고(Fig. 3A), 고농도의 황산구리 농도로 완전히 산화된 적혈구에는 비교적 일정하게 결합되었다(Fig. 3C). 중간 농도의 황산구리에 의해서는 일정 부분의 적혈구가 산화되었으며(Fig. 3B), 이들이 annexin-V와 결합하는 정도는 완전히 산화된 Fig. 3C의 산화적혈구와 같은 정도였다. 나머지 적혈구의 대부분은 annexin-V와 전혀 결합하지 않았고, 그 중간단계에 속하는 적혈구는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3B). 따라서 적혈구가 산화되는 과정은 전체의 적혈구가 점진적으로 산화되는 것이 아니라 일부 적혈구가 황산구리의 산화작용에 의해 순간적으로 변환됨을 관찰할 수 있었다.

산화가 된 적혈구의 비율은 역시 투여된 황산구리의 농도와 이에 따른 산화정도와 연관되어 있었다(Fig. 1B). 낮은 농도에서는 산화된 적혈구의 비율이 아주 낮았으며, 중간 농도에서 비율이 급속히 증가하여, 높은 농도에서 모든 적혈구가 산화되었다. 황산구리 농도의 증가에 따라 측정된 산화정도가 증가하는 것은 역시 전체 적혈구의 점진적인 산화에 의한 것이 아니라 완전히 산화된 적혈구의 비율에 따라 나타나는 현상이었다.

THP-1 세포에서 변형된 대식세포에 결합하는 산화적혈구의 숫자도 황산구리의 농도와 이에 따른 산화 정도 및 산화 적혈구의 비율과 직접적인 관련이 있었다(Fig. 1C). 낮은 황산구리 농도에서는 적혈구가 대식세포와 거의 결합하지 않았고, 중간 농도에서 결합이 급격히 증가하였다. 고평부에서는 산화적혈구가 대식세포를 완전히 둘러싸고 있어 대식세포 1개당 10개 이상의 산화적혈구가 결합하였으며, 이때에는 숫자를 셀 수 없어 100개의 대식세포에 1,000개의 산화 적혈구가 결합한 것으로 간주하였다.

100 ug/mL 농도의 산화 LDL은 산화적혈구의 결합을 완전히 억제하였으며, LDL은 억제 효과가 전혀 없었다. A군 청소 수용체의 길항제로 알려진 fucoidan은 100

ug/mL 농도에서 산화적혈구의 결합을 90% 정도 억제하였으며, galactose가 결합에 관여하는가를 관찰하기 위해 사용하였던 N-acetyl galactosamine은 대조화합물로 사용하였던 N-acetyl glucosamine과 함께 결합을 전혀 억제하지 못하였다.

고 찰

본 연구에서는 적혈구를 이용하여 산화가 진행되는 과정을 관찰하였고, 산화지질이 대식세포와 결합하여 섭취되는 과정에서 산화지질의 어떤 표면 물질이 관여하는가를 알아보고자 산화 적혈구를 이용하여 실험하였다. 이 과정에서 전체 적혈구가 점진적으로 산화되는 것이 아니라 개개의 적혈구가 on-off 현상으로 산화됨을 관찰하였다. 또한 황산구리를 이용한 산화과정에서 annexin-V와 결합하는 물질의 양이 TBARS로 측정된 산화정도나 대식세포에 결합하는 적혈구의 수와 직접적인 연관이 있어 이물질이 산화적혈구가 대식세포에 결합하는데 관여하는 물질로 생각되었다. 이 결과와 이전의 보고를 바탕으로 이 물질이 PS일 수 있다는 잠정적인 결론을 얻었다.

혈액의 단핵구가 혈관벽의 내피하조직으로 이동하여 대식세포로 변형되며, 이들이 산화지질을 섭취하여 거품세포가 만들어지는 것은 죽상경화 발생의 초기 과정이다. 여기에는 대식세포의 청소 수용체와 산화지질의 아직 명확히 밝혀지지 않은 리간드가 작용할 것이라는 것이 가장 유력한 가설이다.¹⁻⁸⁾

적혈구는 손상되거나 고령이거나 당화된 적혈구가 신체에서 대사되는 과정뿐만 아니라, 여러 가지 방법으로 산화시켜 산화지질이 대식세포에 의해 처리되는 과정의 연구에 이용되었다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이 과정에도 청소 수용체가 관여하는 것으로 보고되었으며, 산화 LDL에 의해 결합과 섭취가 억제되므로 산화 지질과 같은 경로를 통하는 것으로 생각된다. 본 연구에서도 이전의 보고들과 마찬가지로 산화 LDL에 의해 산화 적혈구의 결합이 완전히 억제되어 이전의 보고를 재확인하였다.

지질의 산화와 마찬가지로 적혈구의 산화도 황산구리의 농도가 증가하거나 일정한 농도의 황산구리에 노출된 시간이 길어지면 산화정도가 증가한다.²²⁾²³⁾ 이러한 과정에 대해 지금까지는 막연히 개개의 LDL이나 적혈

구가 점진적으로 산화과정을 거치는 것으로 생각하였으며 어떤 의문도 제기된 적이 없다. 하지만 본 연구에서는 적혈구가 산화되는 과정이 점진적이 아니라 황산구리의 농도에 따라 이에 비례하는 일정 비율의 적혈구가 산화되며 나머지는 전혀 산화되지 않는 on-off 현상임을 관찰하였다. 따라서 TBARS로 측정되는 산화정도는 모든 적혈구가 일정한 정도 산화된 것을 나타내는 것이 아니라 산화 적혈구의 비율을 나타내는 것이며, 대식세포에 부착되는 적혈구의 수도 역시 산화 적혈구의 비율과 비례함을 관찰할 수 있었다.

LDL이 산화되는 과정에서 측정된 TBARS의 변화를 나타낸 그림의 모양은 본 연구에서 제시한 RBC의 산화과정의 모양과 거의 유사하다.²²⁾ 황산구리에 노출되면 일정시간 잠복기(lag period)가 있다가 급속히 TBARS가 증가하며 곧 고평원에 이른다. 이런 모양에 근거할 때 LDL의 산화과정도 적혈구와 마찬가지로 on-off 현상이 있을 가능성이 있으며, 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 적혈구가 산화되는 과정에서 크기가 작아지고 과립성이 증가하였는데 이 기전을 설명할 수 있는 보고는 아직 없으며 이에 대한 추가 연구도 필요할 것이다.

청소 수용체는 SR-A1, SR-A11의 A군과 CD36, SR-B1 등의 B군, CD68 등의 기타 군으로 나눌 수 있으며 이들은 모두 산화지질과 결합하는 것으로 보고되었다.⁶⁾⁷⁾ 하지만 각각의 수용체에 결합함으로써 산화 LDL의 결합을 억제하는 리간드에는 수용체마다 차이가 있어, 어느 청소 수용체를 통하여 대사작용이 일어나는가를 알기 위한 연구에 이용되고 있다.

산화 적혈구의 제거에 관여하는 청소 수용체의 종류에 대해서는 논란이 있다. A군 청소 수용체가 없는 쥐에서 채취한 대식세포를 이용한 실험에서 정상인 쥐에서 채취한 대식세포와 비교하여 산화 적혈구의 결합이 감소하지 않았다.²³⁾ 또한 B군 청소 수용체에 결합하며, 산화지질의 결합을 억제하는 PS 지방체가 산화 적혈구의 결합을 억제하므로 A군 수용체는 산화 적혈구의 결합에 관여하지 않고, B군 청소 수용체가 산화 적혈구 결합과 섭취에 관여한다고 주장하였다.¹⁴⁾ 하지만 이전의 연구와 본 연구에서 산화지질이 A군 수용체에 결합하는 것을 억제하는 것으로 알려진 fucoidan이 산화 적혈구의 결합을 억제하였으며, 이는 위의 가설을 부정하는 것이다. 따라서 저자들은 이전의 연구에서 A군과 B군

외의 다른 수용체가 주요한 역할을 할 가능성이 있음을 제시하였고¹⁸⁾ 본 연구에서 이를 재확인하였다.

기타 가능성이 있는 청소 수용체는 CD68이 있으며, 이는 PS와 결합하면서 fucoidan에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다.⁶⁾⁷⁾ 하지만 이 수용체는 주로 세포 내에 존재하는 것으로 알려져 있어 그 역할이 의문시되나 이들이 자극시 세포 표면으로 이동하여 작용할 가능성은 있겠다. 이전의 보고에서 pH에 따라 산화 적혈구 결합의 변화가 관찰되었고,¹⁸⁾ 산화지질이 A군 수용체와 결합하는데 정전기적 힘이 작용한다는 보고가 있어²⁴⁾²⁵⁾ 전혀 다른 기전이 결합에 관여할 가능성도 있을 것으로 생각된다.

산화 적혈구가 대식세포에 결합하는데 작용하는 산화 적혈구 표면의 물질에 대해서도 많은 논란이 있다. 산화 적혈구의 표면에 있는 sialosaccharide가 작용한다는 보고가 있는가 하면,¹³⁾ 앞에 제시한 바와 같이 적혈구가 산화되면서 세포막의 이중층 중에 안쪽층에 주로 존재하는 PS가 바깥층으로 이동하며 이들이 대식세포에 결합하는데 작용한다는 보고가 있었다.¹⁴⁾ 그 증거로는 PS와 결합하는 것으로 알려져 있어 아포토시스 유무를 판정하기 위해 광범위하게 사용되는 annexin-V가 산화 적혈구와 결합하며, 산화 적혈구가 대식세포에 결합하는 것을 PS 지방체가 억제한다는 것이다. 본 연구에서는 산화 적혈구의 표면에 annexin-V와 결합하는 물질이 존재함을 재확인하였고, 이물질의 양이 노출된 황산구리의 농도, TBARS로 측정된 산화정도 및 대식세포에 결합하는 적혈구 수와 직접적인 연관성이 있음을 관찰함으로써 이 물질을 통하여 산화 적혈구가 대식세포에 결합됨을 간접적으로 증명하였다.

하지만 최근에는 산화지질이 대식세포에 결합하는데 표면의 산화된 phosphatidyl choline(PtC)이 작용한다는 보고가 있으며, 이 증거로는 산화된 지방산이나 이에 대한 항체가 산화 LDL이 대식세포에 의해 결합하는 것을 억제하는 것이다.¹¹⁾ 이들은 아포토시스된 세포가 대식세포에 결합하는 것도 억제하므로 아포토시스 과정에서도 세포 표면에 산화 지질이 형성될 가능성이 제시되었다.¹⁷⁾

본 연구에서는 산화 적혈구의 표면에 PS가 존재함을 증명하고, 이를 통하여 산화 적혈구가 대식세포에 결합됨을 재확인하고자 하였다. 하지만 최근 산화 PtC의 역할이 강조되고 있어 단지 잠정적인 결론만을 내릴 수

있었다. 우선 annexin-V가 단지 PS에 결합할 뿐만 아니라 산화지질과 결합한다면 annexin-V와 결합하였다고 PS가 관여한다고 결론을 내릴 수 없으며, PS 지방체가 산화 적혈구의 결합을 억제한 것으로 보고하였으나 PS가 산화지질과 결합할 가능성도 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. 특히 산화지질의 결합에 정전기적 힘이 작용한다는 이전의 보고를 감안할 때에 이들과 대식세포의 결합에 복잡한 상호관계가 있을 가능성이 있다. 따라서 향후 이들 간의 상호관계를 알기 위한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적:

산화지질이 대식세포에 의해 부착되고 섭취되는 과정에서 산화지질의 특성이나 부착에 관여하는 산화지질의 물질에 대해서는 많은 연구가 발표되었으나 논란이 있다. 본 연구에서는 적혈구를 황산구리로 산화시켜 산화가 진행되는 과정을 관찰하였고, 산화 적혈구를 이용하여 산화지질이 대식세포와 결합하여 섭취되는 과정에서 산화지질의 어떤 표면 물질이 관여하는가를 알아보고자 하였다.

방 법:

적혈구에 다양한 농도의 황산구리를 투여하여 산화시켰으며, TBARS를 반정량적으로 측정하여 산화정도를 평가하였고, 산화된 적혈구의 특성을 annexin V와 형광 흐름 세포측정법을 이용하여 분석하였다. 이를 바탕으로 황산구리의 농도, TBARS로 측정된 산화정도 및 Annexin-V와 결합하는 산화 적혈구의 특징 사이의 상관관계를 관찰하였다. 인간 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1 세포에 PMA를 투여한 후에 72시간 동안 배양하여 대식세포로 변환시켜 사용하였으며, 여기에 산화 적혈구를 투여하고 90분간 배양하여 산화정도에 따른 적혈구의 결합 정도를 측정하였다. 또한 산화 LDL과 기왕에 청소 수용체의 길항제로 알려진 물질이 산화 적혈구가 대식세포에 결합하는데 어떤 영향을 미치는지 평가하였다.

결 과:

TBARS로 측정된 적혈구의 산화 정도는 투여한 황산구리의 농도와 직접적인 상관성이 있었다. 낮은 농도에서는 거의 산화가 일어나지 않는 반면에 중간농도에서

급속히 산화되었으며, 곧 고평부(plateau)에 도달하였다. 적혈구의 산화 과정은 전체 적혈구가 점진적으로 산화되는 것이 아니라 개개의 적혈구가 on-off 현상으로 산화됨을 관찰하였으며, 산화되면서 그 크기가 작아지고 과립성이 증가하였다.

또한 황산구리를 이용한 산화과정에서 annexin-V와 결합하는 물질의 양이 TBARS로 측정된 산화정도나 대식세포에 결합하는 적혈구의 수와 직접적인 연관이 있어, 이물질이 산화적혈구가 대식세포에 결합하는 물질로 생각되었다.

산화 LDL은 산화적혈구의 결합을 완전히 억제하여 산화 적혈구의 결합은 산화지질과 같은 기전을 통하여 결합하는 것을 확인하였으며, fucoidan은 산화적혈구의 결합을 90% 정도 억제하였다.

결 론:

지질의 산화 과정은 이전의 예측과는 달리 일부 지질이 순간적으로 산화되며 이들의 비율에 따라 산화도가 결정될 가능성이 있을 것으로 생각된다. 대식세포와 산화지질이 결합하는 과정에 관여하는 산화지질의 물질은 annexin-V와 결합하는 특징이 있으며, 이 물질이 무엇인가에 대해서는 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

중심 단어: 적혈구; 지질 산화; 대식세포; 경쟁적 결합.

이 연구는 대한 순환기학회 학술연구비(2000-5)의 지원으로 시행되었음.

REFERENCES

- 1) Getz S. *The involvement of lipoproteins in atherogenesis evolving concepts.* Ann NY Acad Sci 1990;598:17-28.
- 2) Steinberg D, Witztum JL. *Lipoproteins and atherogenesis: current concepts.* JAMA 1990;264:3047-52.
- 3) Chisolm GM, Steinberg D. *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.* Free Radic Biol Med 2000;28:1815-26.
- 4) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis.* Circulation 1994;89:2462-78.
- 5) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.* Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:333-7.
- 6) Steinbrecher UP. *Receptors for oxidized low density lipoprotein.* Biochim Biophys Acta 1999;1436:279-98.
- 7) Pearson AM. *Scavenger receptors in innate immunity.* Curr Opin Immunol 1996;8:20-8.
- 8) Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. *A macrophage*

- receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264:2599-604.
- 9) Jones NL, Willingham MC. Modified LDLs are internalized by macrophages in part via macropinocytosis. *Anat Rec* 1999; 255:57-68.
 - 10) Jones NL, Allen NS, Willingham MC, Lewis JC. Modified LDLs induce and bind to membrane ruffles on macrophages. *Anat Rec* 1999; 255:44-56.
 - 11) Gillotte KL, Horkko S, Witztum JL, Steinberg D. Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 2000; 41:824-33.
 - 12) Munday J, Floyd H, Crocker PR. Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* 1999; 66:705-11.
 - 13) Beppu M, Hayashi T, Hasegawa T, Kikugawa K. Recognition of sialosaccharide chains of glycophorin on damaged erythrocytes by macrophage scavenger receptors. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268:9-19.
 - 14) Sambrano GR, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1396-400.
 - 15) Vlassara H, Valinsky J, Brownlee M, Cerami C, Nishimoto S, Cerami A. Advanced glycosylation endproducts on erythrocyte cell surface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophages: a model for turnover of aging cells. *J Exp Med* 1987; 166:539-49.
 - 16) Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages: a review. *Biochimie* 1998; 80:173-95.
 - 17) Chang MK, Bergmark C, Laurila A, Horkko S, Han KH, Friedman P, Dennis EA, Witztum JL. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6353-8.
 - 18) Ko HS, Kim IS, Lee KJ, Kim SW, Kim CJ, Ryu WS. Characterization of binding and phagocytosis of oxidatively damaged erythrocyte to macrophage. *Korean J Intern Med* 2002; 17:220-6.
 - 19) Gianturco SH, Ramprasad MP, Lin AH, Song R, Bradley WA. Cellular binding site and membrane binding proteins for triglyceride-rich lipoproteins in human monocyte-macrophages and THP-1 monocytic cells. *J Lipid Res* 1994; 35:1674-87.
 - 20) Sambrano GR, Parthasarathy S, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3265-9.
 - 21) Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971; 20:95-111.
 - 22) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8.
 - 23) Terpstra V, Kondratenko N, Steinberg D. Macrophages lacking scavenger receptor A show a decrease in binding and uptake of acetylated low-density lipoprotein and of apoptotic thymocytes, but not of oxidatively damaged red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8127-31.
 - 24) Pearson AM, Rich A, Krieger M. Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices. *J Biol Chem* 1993; 268:3546-54.
 - 25) Doi T, Higashino K, Kurihara Y, Wada Y, Miyazaki T, Nakamura H, Uesugi S, Imanishi T, Kawabe Y, Itakura H, Yazaki Y, Matsumoto A, Kodama T. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993; 268:2126-33.