

지방과부하로 인한 혈관내피세포 사멸에서 peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1)의 예방 효과

울산대학교 의과대학 내과학교실, 아산생명과학 연구소¹

고은희* · 김윤미*¹ · 김하정¹ · 이우제 · 원종철 · 김민선 · 이기업 · 박종열

Protective Effect of PGC-1 on Lipid Overload-induced Apoptosis in Vascular Endothelial Cell

Eun Hee Koh*, Youn Mi Kim*¹, Ha Jung Kim¹, Woo Je Lee, Jong Chul Won, Min-Seon Kim, Ki-Up Lee, Joong-Yeol Park

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine and Asan Institute for Life Sciences, University of Ulsan College of Medicine¹

- Abstract -

Background: Fatty acids contribute to endothelial cell dysfunction and apoptosis by inducing accumulation of long chain fatty acyl CoA (LCAC), which increases oxidative stress in vascular endothelial cells. Forced expression of PGC-1 was shown to induce mitochondrial biogenesis and to control expression of mitochondrial enzymes involved in fatty acid oxidation. This study was undertaken to test the hypothesis that PGC-1 overexpression could prevent endothelial cell apoptosis by enhancing fatty acid oxidation and relieving oxidative stress in vascular endothelium.

Methods: Adenoviruses containing human PGC-1 (Ad-PGC-1) and β -galactosidase (Ad- β -gal) were transfected to confluent human aortic endothelial cells (HAECs). To investigate the effect of adenoviral PGC-1 gene transfer on apoptosis, combined treatment of linoleic acid (LA), an unsaturated fatty acid, was performed.

Results: PGC-1 overexpression inhibited the increase in ROS production and apoptosis of HAECs induced by LA. Also, PGC-1 led to a significant increase in fatty acid oxidation and decrease in triglyceride content in HAECs. LA caused the decrease of adenine nucleotide translocase (ANT) activity and transient mitochondrial hyperpolarization, which was followed by depolarization. PGC-1 overexpression prevented these processes.

Conclusion: In summary, PGC-1 overexpression inhibited mitochondrial dysfunction and apoptosis by facilitating fatty acid oxidation and protecting against the damage from oxidative stress in HAECs. The data collectively suggest that the regulation of intracellular PGC-1 expression might play a critical role in preventing atherosclerosis. (*J Kor Diabetes Assoc* 30:151~160, 2006)

Key Words: Apoptosis, Atherosclerosis, Human aortic endothelial cells, Mitochondria, Oxidative stress, PGC-1

서 론

생활습관의 서구화로 인해 과거에는 흔치 않았던 여러 가지 만성 질환이 급증하고 있으며, 그 대표적인 예가 비만,

당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등 동맥경화증의 위험인자가 한 개인에서 동반되어 나타나는 대사증후군이다¹⁾. 중심성 비만과 이에 동반된 인슐린 저항성이 대사증후군을 발생시키는 병태생리학적 원인들 중 가장 중요한 부분을 차지하고 있

접수일자: 2005년 12월 21일, 통과일자: 2006년 4월 20일, 책임저자: 박종열, 울산대학교 의과대학 내분비내과

* 본 연구에 동일하게 기여함

을 것으로 생각되고 있지만 아직까지 대사증후군에서 보이는 여러 대사 이상들의 근본 기전은 명확하지 않다. 최근 혈중 유리지방산뿐만 아니라 간, 근육, 혈관을 포함한 체내의 다양한 조직에 중성지방 및 산화되지 않은 지방산 대사산물인 long chain fatty acyl CoA (LCAC)가 축적되는 것이 대사증후군에서 보이는 여러 대사질환의 원인으로 작용할 것이라고 생각되고 있다²⁾. 세포 내 지방 과부하가 대사질환을 유발하는 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀진 것이 없으나 최근 연구발표에 따르면 LCAC가 세포 내 산소 유리기 (oxygen free radical) 생성을 촉진시키는 것으로 보고되었다³⁾. 대사증후군에서 가장 문제가 되는 동맥경화증 역시 혈관조직 내에 지방이 축적되고 그 결과로 산화스트레스가 증가하는 것과 관련이 있을 것으로 생각되고 있으며^{3,4)} 혈관세포에서 산화스트레스의 증가는 혈관세포에서 redox-sensitive signal pathway를 통하여 동맥경화증을 일으키는 중요한 기전으로 알려져 있다⁵⁻⁷⁾.

혈관내피세포는 혈관 운동성 및 투과성, 혈액 응고 및 분해, 염증세포나 혈관평활근세포의 이동 또는 증식을 조절함으로써 혈관의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다⁸⁾. 혈관내피세포의 사멸 (apoptosis)은 지질의 침착, 혈관평활근세포의 증식, 염증세포의 침윤 및 심각한 혈관확장기능 이상을 유발시켜⁹⁾ 동맥경화증의 초기 병변인 죽상반을 형성함으로써 동맥경화증의 발생초기에 중심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 한편, 혈관내피세포의 사멸에도 산화스트레스가 중요한 유발인자인 것으로 보고되고 있다^{4,10)}.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 (PGC-1)은 미토콘드리아의 생합성과 호흡에 관여하는 다양한 전사조절인자들의 전사활성을 촉진시키는 보조활성인자이며 지방산 대사에 있어서도 중요한 역할을 한다¹¹⁻¹³⁾. 또한 갈색지방조직의 열생산¹¹⁾, 근육에서 미토콘드리아의 산화 조절¹⁴⁾, 간의 당신생에서 PGC-1의 주된 역할¹⁵⁾과 관련하여 비만 및 당뇨병 등의 대사질환 분야에서 PGC-1에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 하지만, 아직까지 혈관세포에서 PGC-1 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 미토콘드리아 생합성 및 지방산 대사에 관한 PGC-1의 역할을 고려할 때, PGC-1 활성화가 세포 내 지방 과부하를 줄이고 세포 내 반응성 산소기의 생성을 감소시켜 혈관내피세포의 사멸을 줄임으로써 혈관내피세포 기능 이상의 발생을 억제할 가능성을 검증하기 위하여 시행되었다.

대상 및 방법

1. 혈관내피세포의 배양

인간대동맥 내피세포 (human aortic endothelial cells,

HAECs)는 Biowhittaker (Walkersville, Maryland, USA)로부터 구입하였다. 세포배양은 2% fetal bovine serum (FBS)와 2 mM L-glutamine 등을 함유한 endothelial cell basal medium-2 (EBM-2; BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD)에서 5% 이산화탄소 배양기로 37℃ 조건에서 배양하였다. 배양액은 3~4일 간격으로 갈아주었으며, 세포가 배양접시 면적의 80% 이상 자라게 되면 0.5% FBS가 포함된 modified Eagle's medium (MEM)으로 배양액을 바꾸었고 실험 조건에 따라 linoleic acid (LA, 60 μ M)를 첨가하였다.

2. 재조합 아데노 바이러스 감염전달

PGC-1 재조합 아데노바이러스는 경북대학교 의과대학 이인규 교수로부터 기증받아 사용하였다. PGC-1 아데노바이러스의 감염은 viral stock을 FBS를 첨가하지 않은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)으로 희석하여 50 multiplicity of infection (moi)으로 하였다. 희석된 viral 용액을 세포 단일층에 0.5 mL/ 60 mm로 부어 37℃에서 5분 간격으로 흔들어 가면서 adenoviruses containing human PGC-1 (Ad-PGC-1)와 대조군으로서 β -galactosidase (Ad- β -gal)을 각각 1시간 동안 배양한 후 2% 혈청이 포함된 EBM-2 배지로 바꿔 48시간 동안 배양하였다. 세포의 감염 정도를 확인하기 위하여 X-gal staining을 하였다. 세포를 Ad- β -gal에 감염시켜 48시간이 지난 다음 phosphate buffered saline (PBS)로 한 번 씻은 후, 5% glutaraldehyde 용액에 30분 동안 실온에서 고정시켰다. PBS로 2번 씻은 후 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM ferricyanide, 5 mM ferrocyanide을 함유한 X-gal 용액 1 mg/mL을 넣고 배양기에 3~4시간 염색시켰다.

3. 혈관내피세포의 생존율 평가

1) 지방과부하에 따른 혈관내피세포 생존율 측정

혈관내피세포를 96-well plate에 5×10^3 cells/well이 되도록 24시간 배양한 다음, 1% FBS를 포함한 EBM-2 배지에 60 μ M의 LA를 48시간 처리하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아 내에 존재하는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt WST가 formazan 반응 생성물로 바뀌는 양을 분석하는 4-[3-[4-iodophenyl]-2-[4-nitrophenyl]-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzenedisulfonate-1 (WST-1)을 각 well 마다 10 μ L을 가한 다음 37℃, 5% 이산화탄소 습식배양기에서 2시간 동안 더 배양하였다. Microtiter plate reader (SPECTRAmax 340 PC; Molecular Devices, Palo Alto, CA)를 이용하여 450 nm와 600 nm에서 흡광도를 측정한 뒤, 48시간 동안 시간별로 살아있는 세포의 생존 정도를 분석하였다.

2) Caspase 활성도 측정

각각의 아데노바이러스를 HAECs에 감염시킨 후 LA 60

μ M를 24시간 처리한 세포를 수집하여 파쇄 완충용액 (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 μ g/mL leupeptin)에서 용해하고 얼음에 10분간 넣어둔 후 14,000 rpm, 10분간 원심분리하였다. 상층액만을 모은 후 bovine serum albumin (BSA)를 표준시료로 사용하여 각각의 단백질을 Bradford법¹⁶⁾으로 정량한 50 g의 단백질을 분리해서 DEVD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) (caspase-3 substrate), IETD-AFC (caspase-8 substrate), 또는 LEHD-AMC (caspase-9/6 substrate) 50 μ M 을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

Caspase 활성도는 microplate spectrofluorometer (SPECTRAmax GEM-INI-XS; Molecular Devices, USA)를 이용해서 caspase에 의해 분해된 반응물의 fluorescence를 측정하였다. Caspase-3, 8은 400 nm excitation, 505 nm emission에서, caspase-9은 380 nm excitation, 460 nm emission에서 각각 측정하였다.

3) Western blotting

각각의 아테노바이러스를 감염시킨 후 16시간 동안 LA (60 μ M)를 처리한 세포를 수집하여 lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate, 1 mM sodium vanadate, 1 μ g/mL leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해시켜 단백을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford (Bio-Rad, USA)법으로 정량하여 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 전기영동하여 분리하였다. 전기영동 후 polyvinylidene difluoride membrane (Qbiogene, Montreal, Canada)에 전이시켰다. Membrane을 5% (w/v) skim milk로 처리하였고 1차 항체로 caspase-3 (Cell Signaling, MA, USA), β -actin (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), poly-ADP ribose polymerase (PARP; SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)을 이용하여 1:1000 비율로 희석해 4°C에서 반응시켰다. 1차 항체를 결합시킨 membrane을 TBST (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 세척 후 horseradish peroxidase에 anti rabbit IgG가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후 TBST로 충분히 세척하고 enhanced chemiluminescence system (PerkinElmer Life science, MA, USA)을 이용하여 발현 정도를 확인하였다.

4) DNA 분절 (fragmentation) 분석

각각의 아테노바이러스를 HAECs에 감염시킨 후 LA 60 μ M를 12시간 처리한 세포 (용기 바닥에 붙어있는 세포와 배지에 떠있는 세포 모두)를 수집해서 lysis buffer (10 mM

Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)에 현탁시키고 얼음에서 30분간 반응시킨 후 원심분리하였다. 상층액에 20 μ g/mL RNase A를 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 0.5 mg/mL proteinase K를 넣고 50°C에 1시간 동안 놓아두었다.

Phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1, Sigma, USA)을 넣고 원심 분리하여 상층액에 NaCl을 1 M이 되도록 넣은 후 동량의 isopropanol로 DNA를 침전시켰다. 다시 원심분리를 시행하고 pellet을 Tris/EDTA (10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA)에 녹여서 1.5% ethidium bromide-agarose gel에 전기영동 후 UV light에서 DNA를 확인하였다.

5) 혈관내피세포의 사멸 정량

각각의 아테노바이러스를 HAECs에 감염시킨 후 LA 60 μ M를 12시간 처리한 세포를 PBS로 1회 세척한 후 1 mL lysis buffer (10 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)에 현탁시키고 얼음에서 30분간 반응시킨 후 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 100 μ L 상층액을 동량의 anti-histone antibody가 포함되어 있는 cell death ELISA kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)에 넣고 상온에서 90분간 방치한 후 Emax precision microplate (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)을 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

3. PGC-1 과발현이 혈관내피세포에서 지방산 대사에 미치는 영향

1) 중성지방 측정

각각의 아테노바이러스를 HAECs에 감염시킨 후 LA 60 μ M를 12시간 처리한 세포를 PBS에 세척하고 lysis buffer (10 mM tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100)를 넣어 4°C에서 30분 동안 반응시킨 후 원심분리를 해서 상층액을 얻었다. 중성지방의 측정은 Triglyceride (GPO-Trinder) kit (Sigma, USA)를 사용하였으며 SPECTRAmax 340 PC를 이용해 540 nm에서 반응물의 흡광도를 측정하였다¹⁷⁾.

2) 지방산 산화 측정

각각의 아테노바이러스를 HAECs에 감염시킨 후 LA 60 μ M를 12시간 처리한 후 9, 10-³H]-palmitate를 첨가하고 배양 24시간 뒤 세포를 수집하였고, 배양액 내 과량의 [³H]-palmitate는 2% BSA를 포함하는 동량의 10% trichloroacetic acid를 이용해 두 번 침전시켜 제거하였다. 상층액을 1.5 mL 원심분리용 튜브에 옮기고 0.5 mL unlabeled water가 들어있는 scintillation 튜브에 넣은 후 50°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 평형계수를 결정하기 위해 10 μ L의 ³H₂O를 490 μ L의 unlabeled water에 첨가하였

다. 10 mL의 scintillation 용액을 vial에 넣고 scintillation counter (Becton Dickinson, USA)를 이용해 측정하였다.

4. 지방과부하에 의해 유도된 혈관내피세포에서 PGC-1 과발현이 미토콘드리아에 미치는 영향

1) Adenine nucleotide translocator (ANT) 의존적 ADP 유입량 (import) 측정

각각의 아테노바이러스를 HAEC에 감염시킨 후 LA 60 μ M를 12시간 처리한 세포를 수집하여 mitochondria isolation buffer (200 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA (pH 7.4))에 현탁시킨 후 23 G needle에 10번 통과 후 용해시켰다. 용해액을 750 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액만 10,000 rpm으로 다시 원심분리하였다. 원심분리 후 mitochondria pellet을 ADP import buffer (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 5 mM succinate, 3 mM KH_2PO_4 , 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 5 μ M rotenone (pH 7.2))에 현탁시켰다. 20 nmol ^{14}C -ADP (NEN, Boston, MA)를 넣고 4°C에서 10분간 반응시킨 후 50 μ M atractyloside를 넣어 반응을 종료시켰다. ADP import buffer로 두 번 세척한 후에 liquid scintillation cocktail을 넣고 ^{14}C -ADP를 β -counter (Becton Dickinson, USA)를 이용해 방사능 정도를 측정하였다¹⁸⁾.

2) 미토콘드리아 막전위 측정

혈관내피세포에 각각의 아테노바이러스를 24시간 동안

감염시키면서 각각의 시간마다 10 μ M 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1 Molecular Probes, Oregon, USA)을 plate에 넣고 37°C에서 15분간 반응시킨다. PBS로 세척 후 microplate spectrofluorometer를 이용해서 485 nm-excitation, 530, 590 nm-emission에서 형광을 측정하였다¹⁹⁾.

5. PGC-1 과발현이 혈관내피세포 산화스트레스에 미치는 영향

1) 세포 내 반응성 산소기 측정

아테노바이러스를 감염시킨 후 LA를 처리하고 두 시간 간격으로 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 세척한 후 10 μ M carboxydichloro-dihydrofluorescein diacetate ($\text{DCFH}_2\text{-DA}$)를 넣어 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 세척 후 buffer를 흡인하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣어 microplate spectrofluorometer를 이용해서 485 nm-excitation, 530 nm-emission에서 형광을 측정하였다²⁰⁾.

6. 통계분석

모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 통계 분석은 SPSS 11.0 프로그램 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 두 군 간의 비교는 Mann-Whitney test를 시행하였고 세 군 간의 비교는 one-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 사용하였고, $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

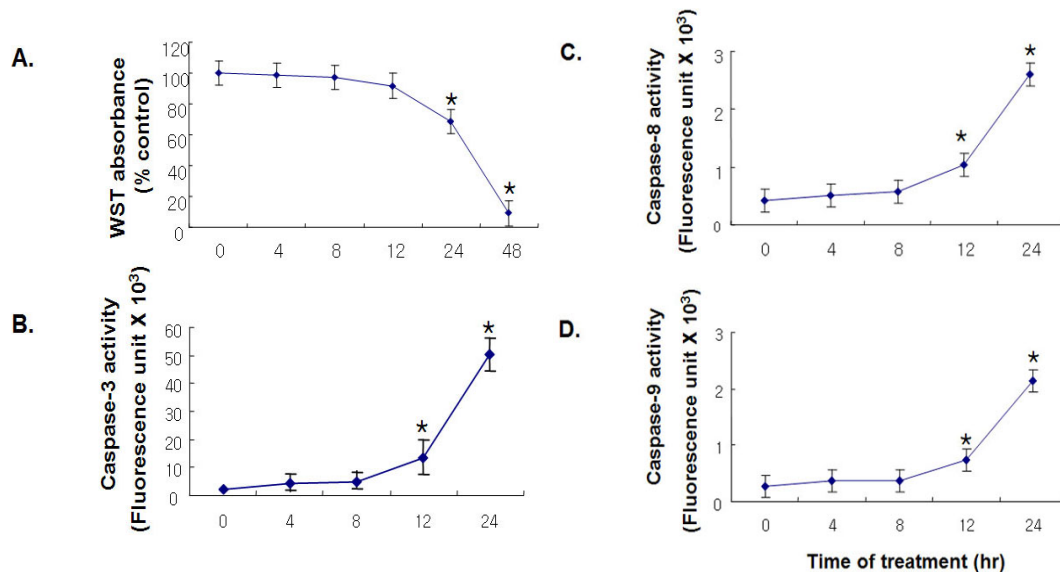


Fig. 1. Linoleic acid-induced apoptosis in HAECs. HAECs were maintained in media containing 0.5% FBS and exposed to 60 μ M LA for the indicated periods of time. Cell viability was analyzed by viable cells using WST assay (A). Caspase-3, -8 and 9 activity were determined by the fluorescence of the cleaved substrate (B-D) (n = 6 per group). * $P < 0.05$ vs 0 hr.

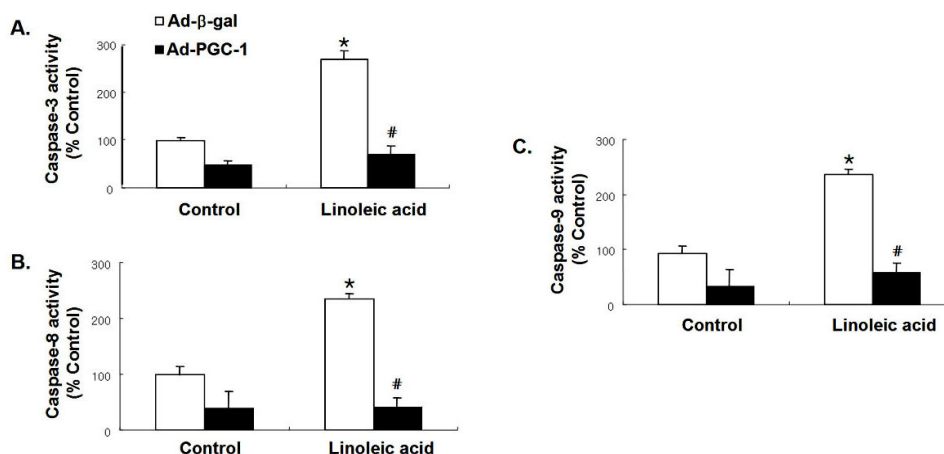


Fig. 2. Effect of adenoviral overexpression of PGC-1 on LA-induced apoptosis. HAECs were infected with Ad-PGC-1 or Ad-β-gal. Two days after infection, cells were maintained in media containing 0.5% FBS and exposed to 60 μM LA for 24 h. Following treatment, caspase-3(A), -8(B) and -9(C) activation was analyzed by measuring activities using a caspase fluorescence assay kit (n = 6 per group).

* $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs Ad-β-gal.

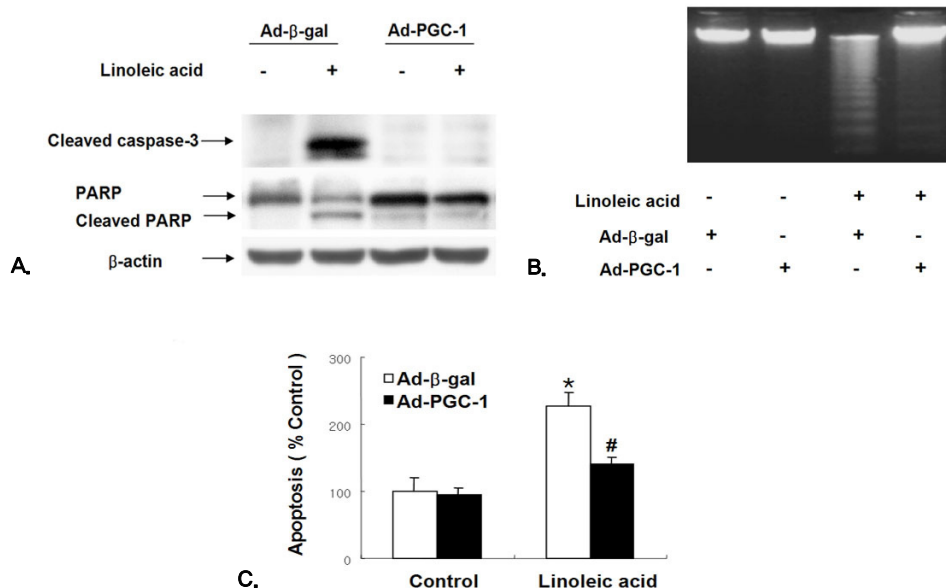


Fig. 3. Immunoblotting for active subunit of caspase-3 and PARP (A). Cells were exposed to 60 μM LA for 48 h. DNA fragmentation was decreased in PGC-1 overexpressing HAECs (B). Apoptosis was analyzed by measuring the levels of cytosolic histone-bound DNA fragments using a cell death ELISA assay kit (C). (n = 6 per group).

* $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs Ad-β-gal.

결 과

1. 지방과부하에 의한 혈관내피세포 사멸

HAECs에 60 μM의 LA를 첨가후 48시간 동안 배양했을 때 24시간이 경과하면서 시간 의존적으로 뚜렷한 세포생존율의 감소가 관찰되었다 (Fig. 1A). LA에 의한 세포생존율 감소가 실제로 세포사멸에 의한 것인지를 확인하기 위하여

세포사멸을 유도하는 효소로 알려진 caspase의 활성화 여부를 알아보았다. 혈관내피세포에서 LA를 처리 후 24시간 동안 배양시 caspase-3, -8 및 -9의 활성화도 역시 시간 의존적으로 계속해서 증가하였다 (Fig. 1B-D).

2. 혈관내피세포 사멸에 대한 adenovirus-PGC-1의 효과

HAECs에 LA를 처리시 유의하게 증가된 caspase-3, -8,

-9 활성도가 PGC-1 과발현을 유도시 의미있게 억제되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 2). 또한, PGC-1을 과발현시킨 혈관내피세포에서는 LA에 의해 증가되었던 procaspase-3의 활성화된 형태인 분절된 caspase-3의 발현이 유의하게 감소되었고, 활성화된 caspase-3가 기질로 이용하는 분절된 PARP 발현 역시 유의하게 감소되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 3A). 또한, LA를 처리시 세포 사멸의 지표인 DNA 분절의 현저한 발현증가가 관찰되었으나 Ad-PGC-1 과발현 군에서는 이에 비해 DNA 분절의 양이 유의하게 감소하였다 (Fig. 3B). 세포질 내 histone-bound DNA 분절을 측정하여 세포사멸을 측정시 PGC-1 과발현시 LA에 의해 증가된 세포사멸을 67.5% 감소시켰다 (Fig. 3C).

3. PGC-1이 세포 내 지방산 대사에 미치는 영향

Ad- β -gal과 Ad-PGC-1을 감염시킨 HAECs에 LA를 24 시간 처리하고 세포 내 중성지방의 농도를 측정하였다. PGC-1 과발현 혈관내피세포에서 LA를 처리시 β -gal 과발현 세포보다 중성지방의 농도가 유의하게 감소되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 4A). 한편, PGC-1이 지방산 산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈관내피세포를 같은 조건으로 처리한 후 지방산 산화를 측정하였을 때 PGC-1 과발현처리시 대조군에 비해 지방산 산화가 6.9배 증가되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 4B).

4. PGC-1 과발현이 미토콘드리아 기능에 미치는 영향

PGC-1이 지방산 부하에 의해 나타나는 ANT의 기능이

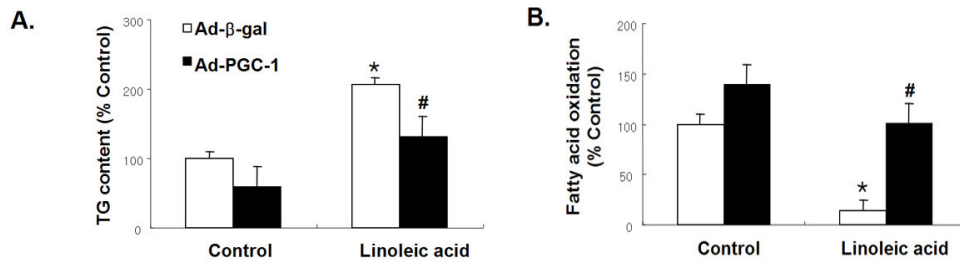


Fig. 4. Triglyceride content and fatty acid oxidation in PGC-1 overexpressing HAECs. Triglyceride content (A) and Fatty acid oxidation with ^3H -palmitate (B) (n=6 per group).

* $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs Ad- β -gal.

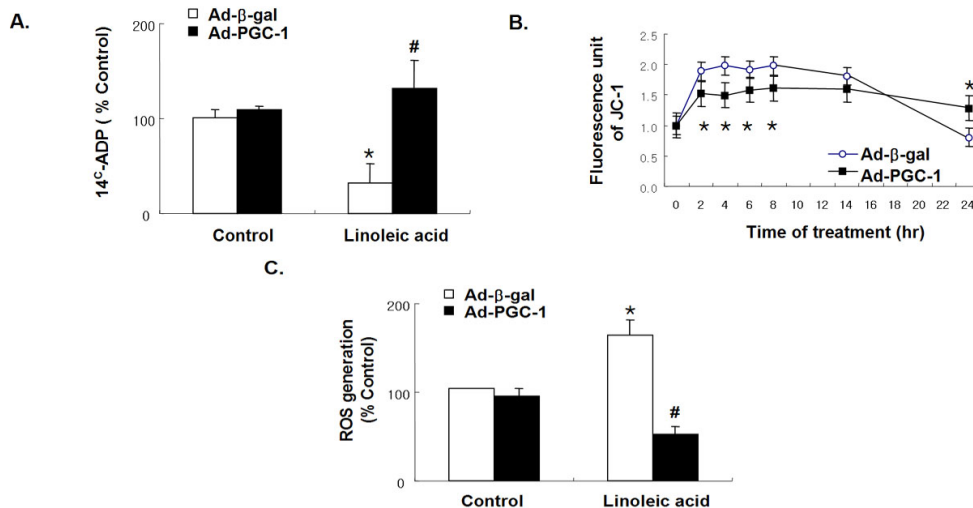


Fig. 5. Effect of adenoviral overexpression of PGC-1 on mitochondrial function and intracellular reactive oxygen species formation. Mitochondria were isolated from PGC-1- and β -gal-overexpressing cells cultured in presence or absence of LA. The ANT-dependent ADP uptake of the mitochondria was assessed by incubating them in the presence of ^{14}C -ADP (A). $\Delta\Psi\text{M}$ was assessed by loading cultured HAECs with JC-1 (10 $\mu\text{mol/L}$) for 15 min. JC-1 aggregation (red fluorescence) increases with increased $\Delta\Psi\text{M}$ (B). Cells were exposed to 60 μM LA for 6 h. ROS were measured with DCF-DA (10 $\mu\text{mol/L}$) for 15 min (C) (n=6 per group).

* $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs Ad- β -gal.

상을 회복시킬 수 있는지를 알아보기 위해 Ad-PGC-1을 감염시킨 세포에 LA를 처리하고 ADP 유입량을 측정하였다. 이 결과 LA를 처리시 ADP 유입량이 LA를 처리하지 않은 군에 비해 33% 감소한 것에 비해, Ad-PGC-1 과발현시 LA에 의해 감소된 ADP 유입량이 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 5A).

JC-1을 이용한 미토콘드리아 막전위의 탈분극화 (depolarization) 현상은 녹색 형광 (green fluorescence)에 대한 적색 형광 (red fluorescence)의 감소 비율로 관찰하였다. LA 처리시 일시적인 과분극 (hyperpolarization) 후 미토콘드리아 막전위가 점차 감소하였다. 하지만, PGC-1 과발현 혈관내피세포에서는 LA 처리시에 발생한 이런 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 5B).

5. PGC-1 과발현시 세포 내 반응산소기에 미치는 영향

형광물질인 DCFH₂-DA를 사용하여 세포 내의 반응산소기를 fluorescence microplate 상에서 직접 측정하였다. PGC-1 과발현시 LA에 의해 증가된 세포 내 반응산소기는 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$) (Fig. 5C)

고 찰

본 연구 결과 혈관내피세포에서 재조합 아데노바이러스를 이용하여 PGC-1을 과발현시킬 경우 지방산 과부하에 의해 유도된 세포사멸, caspase 활성화 및 세포 내 반응성 산소기 생산이 억제됨을 관찰하였다. 또한, PGC-1은 지방산 산화를 증가시켜 혈관내피세포에 축적된 중성지방을 감소시키고, 지방과부하로 인한 ANT 활성 억제 및 미토콘드리아 막전위의 일시적인 과분극을 정상화시켰다.

혈관내피세포는 혈액과 혈관의 방어벽이자 혈관의 기능을 조절하고 평활근세포의 증식을 조절하는 중요한 기능을 가지고 있다. 혈관에 가해지는 각종 자극에 의한 세포사멸로 인한 내피세포의 유실은 지질의 침착, 혈관평활근세포의 증식, 염증세포의 침윤 및 심각한 혈관확장기능 이상을 보이게 되어 동맥경화증의 발생에 기여한다³⁾.

대사증후군에서 골격근이나 혈관 조직에 지방산 대사산물이 축적되고 이로 인해 인슐린 저항성이나 동맥경화증이 발생할 것이라는 학설이 최근 많은 학자들의 지지를 받고 있으나⁴⁻⁶⁾ 이와 같은 현상이 나타나는 기전에 대한 연구는 매우 부족한 상태이다. 이전의 연구결과들에 따르면 지방과 부하가 있을 때 세포 내 산화, 환원 (redox) 변화에 따라 미토콘드리아에서 지방산 산화가 저하되게 되고, 이에 따라 LCAC가 축적되게 되는 것으로 알려져 있다²¹⁾. ANT는 미토콘드리아 외막에 존재하는 수송 단백질로 미토콘드리아에서 생성된 ATP를 미토콘드리아 밖으로 내보내고 세포질 내의 ADP를 들어오는 역할을 한다²²⁾. 세포 내 LCAC가 축

적되면 ANT가 억제되고, 미토콘드리아의 ATP/ADP 교환이 유지되지 않으면 ATP 생성에 소모되는 양전자가 미토콘드리아 막간질에 축적되어 막전위가 증가한다. 내막에 존재하는 voltage dependent anion channel (VDAC)과 ANT-VDAC complex를 형성하여 permeability transition pore (PTP)가 생성되어 외막의 integrity가 파괴되고 cytochrome c가 방출되어 세포사멸이 일어난다^{23,24)}. 미토콘드리아 막전위의 증가는 세포사멸의 초기 신호이며 미토콘드리아 ANT에 문제가 있을 경우 ADP 유입에 장애가 일어남이 알려져 있다²⁵⁾. 결과적으로 ATP의 새로운 생성을 억제함으로써 전자전달체계의 원활한 활동을 방해하고, 세포 내 반응성 산소기 생산을 증가시킬 가능성이 보고되었다²⁶⁾. 증가된 반응성 산소기는 미토콘드리아의 기능 이상을 유도하고, 손상된 미토콘드리아는 세포사멸 인자들을 방출시켜 caspase를 활성화시킨다. Caspase가 활성화되면 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 세포사멸을 유도하게 된다²⁷⁾. 본 연구에서도 혈관내피세포에 짧은 시간동안 LA를 첨가하여 배양했을 경우 이전의 연구결과에서처럼²⁸⁾ 세포 내 반응성 산소기가 증가되었으며, 세포가 사멸하기 전 일시적인 미토콘드리아 막전위의 과분극 및 ANT 기능을 반영하는 ATP 의존적 ADP 유입량이 억제됨을 관찰하였다. 또한 caspase-3, -8 및 -9의 활성도 또한 모두 증가되어 있는 것을 보임으로써, 혈관내피세포 사멸에 있어서 세포 내 지방 축적에 의해 미토콘드리아의 기능 이상 및 이에 따른 반응성 산소기의 증가가 관여함을 알 수 있었다.

PGC-1은 핵수용체의 cold inducible coactivator로 nuclear respiratory factor (NRF)-1,2 유전자의 발현을 유도하고, 미토콘드리아 DNA의 복제와 발현을 조절하는 mitochondrial transcription factor A (mtTFA)의 전사인자에 NRF와 결합해서 발현능을 조절한다. 또한, PGC-1은 근육세포에서 NRFs와 uncoupling protein 2 조절해서 호흡을 자극하며, 호흡 연쇄에 관련된 유전자를 증가시켜 total respiration capacity와 uncoupling 모두를 증가시킨다고 알려져 있다²⁹⁻³¹⁾. 최근 연구발표에 따르면 심근세포에서 PGC-1 발현이 증가하면 ATP 생산과 관련된 미토콘드리아 생합성과 호흡이 증가하는데 특히 전자 전달계, 미토콘드리아 생합성, 지방산 산화에 관여하는 특정 유전자들의 조절에 관여한다고 보고되었으나³⁰⁾, 혈관내피세포에서의 기능에 대해서는 지금까지 잘 알려져 있지 않았다. 본 연구에서 혈관내피세포에서 PGC-1 아데노바이러스를 과발현시켰을 경우 caspase 활성화 및 세포 내 반응성 산소기 생산이 억제되는 것을 밝혀냄으로써 혈관내피에서 PGC-1이 세포사멸을 이끄는 일련의 단계적 반응을 억제하는 가능성을 제시하였다.

PGC-1은 지방산 산화에 관련된 효소의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다. Carnitine palmitoyltransferase- I (CPT- I)은 미토콘드리아 외막에 존재하며, 내막에 존재하는 CPT- II와 함께 LCAC를 미토콘드리아 안으로 이동시키며, LCAC의 산화 속도를 조절한다. 특히, PGC-1을 간세포에 과발현시키면 CPT- I이 증가하고 지방세포에서는 CPT- I과 medium chain-acyl-coenzyme A (MCAD)의 발현을 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다³¹⁻³². 본 연구에서 PGC-1을 과발현시키면 지방산 산화가 증가되어 LA에 의한 세포 내 LCAC의 축적을 억제하여 ANT의 ADP/ATP exchange가 회복되어 미토콘드리아의 막전위를 유지시켜 세포 내 반응성 산소가 생성이 억제됨으로써 혈관내피세포사멸이 억제되었음을 제시할 수 있었다.

혈관 기능 이상은 혈관내피세포 사멸과 함께 동맥경화증의 초기과정으로 여겨지고 있다³³. 특히 혈관내피세포 의존성 혈관 확장 장애가 동맥경화증에서 중요한 원인으로 알려져 있어 실제로 PGC-1 과발현시 혈관내피세포사멸 억제 효과 뿐만 아니라 혈관 기능에 미치는 영향에 대한 향후 연구가 필요하겠다.

결론적으로 본 연구에서는 혈관내피세포에서 PGC-1 과발현은 지방산 산화를 증가시켜 LCAC 감소 및 미토콘드리아 기능 회복으로 세포 내 반응성 산소기의 생산 감소를 통해 세포사멸을 억제함을 보여주었다. 혈관세포에서 PGC-1 발현을 증가시키는 방법이 대사증후군에 동반되는 동맥경화증 예방과 치료에 있어서 도움이 될 것으로 생각되나 이에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 비만 및 당뇨병, 고혈압, 동맥경화증 등 대사증후군의 발생은 지방조직뿐만 아닌 체내 다양한 조직에 지방이 축적되는 세포 내 지방 과부하가 공통적인 기전으로 알려져 있다. 특히 혈관조직에 지방이 축적되면 산화되지 않은 지방산의 대사 산물인 LCAC가 세포 내 산화 스트레스를 증가시켜 혈관내피세포의 기능장애와 세포사멸을 유발한다고 알려져 있다.

PPAR γ 의 전사보조인자로 처음 발견된 PGC-1은 세포 내 미토콘드리아의 생합성과 지방산 산화와 관련된 효소의 발현을 증가시키는 세포 내 필수 인자이다.

본 연구에서는 PGC-1을 내재한 재조합 바이러스를 이용하여 혈관내피세포에 PGC-1을 과발현 시켰을 때 세포 내 지방부하를 감소시킴으로써 세포사멸을 예방할 수 있는지에 대한 새로운 가능성을 검증하기 위하여 시행되었다.

방법: HAECs에 PGC-1 재조합 아데노바이러스를 감염시킨 후 불포화 지방산인 LA를 처리한 후 혈관내피세포의 사멸 및 caspase 활성도를 측정하였다. 지방과부하에 의한

미토콘드리아의 기능 이상 및 PGC-1 과발현 후 미토콘드리아 막전위 및 ADP 유입량, 세포 내 반응성 산소기를 측정하였다.

결과: 혈관내피세포에 LA를 처리시 혈관내피세포에 caspase가 활성화되었으며, 세포사멸이 증가하였다. Ad-PGC-1을 감염시킨 세포에서는 LA에 의해 의한 세포사멸이 의미있게 감소하였으며, caspase-3, -8, -9 활성도가 또한 의미있게 감소하였다. PGC-1 과발현은 세포 내 지방산 산화를 증가시키고, 중성지방의 양을 감소시켰다. LA 처리시 미토콘드리아 ANT에 의한 ADP 유입 기능이 감소되었고 미토콘드리아 막전위 상승 및 세포 내 반응성 산소기 생성이 증가하였으나, PGC-1 과발현시 이들 변화들이 의미있게 감소되었다.

결론: LA 처리시 유도된 세포 내 지방과부하가 미토콘드리아의 기능을 손상시켜 혈관내피 세포를 사멸에 이르게 하며, PGC-1은 혈관내피세포의 지방산 산화를 증가시켜 세포 내 지방 축적을 방지함으로써 미토콘드리아의 기능을 호전시키고, 세포 내 반응성 산소기 생성을 감소시킴으로써 세포사멸을 방지할 수 있음을 확인하였다. 이상의 결과는 혈관세포 내 PGC-1의 발현을 조절함으로써 동맥경화증 발생 및 치료에 새로운 약제로서의 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 당뇨병 연구비 (설원연구비) 및 2004년 과학기술부 국가지정연구실사업 (과제번호M1040000000804J000000810)의 연구비로 지원된 과제임.

참 고 문 헌

1. Reaven GM: *Role of insulin resistance in human disease. Diabetes* 37:1595-607, 1988
2. Kopelman PG: *Obesity as a medical problem. Nature* 404:635-43, 2000
3. Bakker SJ, Ijzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ: *Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? Atherosclerosis* 148:17-21, 2000
4. Hart CM, Tolson JK, Block ER: *Supplemental fatty acids alter lipid peroxidation and oxidant injury in endothelial cells. Am J Physiol* 4:L481-8, 1991
5. Kunsch C, Medford RM: *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. Circ Res* 85:753-66, 1999

6. Henning B, Meerarani P, Ramadass P, Watkins BA, Toborek M: *Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. Metabolism* 49:1006-13, 2000
7. Irani K: *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the role of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. Circ Res* 87:179-83, 2000
8. Egan BM, Lu G, Greene EL: *Vascular effects of non-esterified fatty acids: implications for the cardiovascular risk factor cluster. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60:411-20, 1999
9. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B, Baron AD: *Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. J Clin Invest* 100:1230-9, 1997
10. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM: *Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. J Mol Cell Cardiol* 33:1673-90, 2001
11. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked adaptive thermogenesis. Cell* 92:829-39, 1998
12. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D: *Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. J Biol Chem* 278:33370-6, 2003
13. Butow RA, Bahassi EM: *Adaptive thermogenesis: orchestrating mitochondrial biogenesis. Curr Biol* 9:R767-9, 1999
14. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO: *Adaptation of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. FASEB J* 16:1879-86, 2002
15. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelman G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM: *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. Nature* 413:131-8, 2001
16. Bradford MM: *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem* 72:248-56, 1976
17. Herzig S, Hedrick S, Morante I, Koo SH, Galimi F, Montminy M: *CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. Nature* 426:190-3, 2000
18. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB: *Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. Mol Cell* 3:159-67, 1999
19. Chong ZZ, Lin SH, Maiese K: *Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. J Vasc Res* 39:131-47, 2002
20. Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM: *Essential role of the NADPH oxidase subunit p47 (phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. Circ Res* 90:143-50, 2002
21. Brownlee M: *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature* 414:813-20, 2001
22. Imai H, Koumura T, Nakajima R, Nomura K, Nakagawa Y: *Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochem J* 371:799-809, 2003
23. Green D, Kroemer G: *The central executioners of apoptosis: caspase or mitochondria? Trends Cell Biol* 8:267-71, 1998
24. Paradis E, Clavel S, Bouillaud F, Ricquier D, Richard D: *Uncoupling protein 2: a novel player in neuroprotection. Trends Mol Med* 9:522-5, 2003
25. Khaled AR, Reynolds DA, Young HA, Thompson CB, Muegge K, Durum SK: *Interleukin-3 withdrawal induces an early increase in mitochondrial membrane potential unrelated to the Bcl-2 family. J Biol Chem* 276:6453-62, 2001
26. Armstrong JS, Jones DP: *Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. FASEB J* 16:1263-5, 2002
27. Widmann C, Gibson S, Johnson GL: *Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem* 273:7141-7, 1998

28. Lee KU, Lee IK, Han J, Song DK, Kim YM, Song HS, Kim HS, Lee WJ, Koh EH, Song KH, Han SM, Kim MS, Park IS, Park JY: *Effects of recombinant adenovirus-mediated uncoupling protein 2 overexpression on endothelial function and apoptosis. Circ Res* 96:1200-7, 2005.
29. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM: *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell* 98:115-24, 1999
30. Lehman J, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelley DP: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest* 106:847-56, 2000
31. Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J: *The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HFN4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). J Biol Chem* 277:37991-8000, 2002
32. Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, Kulkarni R, Evans RM, Olefsky J, Montminy M: *PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. Nat Med* 10:530-4, 2004
33. Luscher TF, Barton M: *Biology of the endothelium. Clin Cardiol* 20:II-3-10, 1997