

# Lysophosphatidylcholine의 혈관평활근세포에 대한 세포 독성

이동윤<sup>1</sup> · 강영희<sup>2</sup> · 최두석<sup>1,2</sup> · 이영주<sup>3</sup> · 류미라<sup>4</sup> · 윤병구<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 산부인과, <sup>2</sup>삼성생명과학연구소, <sup>3</sup>세종대학교 생명공학과, <sup>4</sup>한국식품연구원 대사기능연구본부

## Cytotoxic Effects of Lysophosphatidylcholine on Vascular Smooth Muscle Cells

Dong-Yun Lee, M.D.<sup>1</sup>, Young-Hee Kang, M.S.<sup>2</sup>, Doo Seok Choi, M.D.<sup>1,2</sup>, Young Joo Lee, Ph.D.<sup>3</sup>,  
Mee-Ra Rhyu, Ph.D.<sup>4</sup>, Byung-Koo Yoon, M.D., Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine; <sup>2</sup>Samsung Biomedical Research Institute; <sup>3</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul; <sup>4</sup>Divisions of Metabolism and Functionality Research, Korea Food Research Institute, Seongnam, Korea

**Objectives:** To investigate the cytotoxic effects of lysophosphatidylcholine (lysoPC), an active component of oxidized low-density lipoproteins (LDL), on vascular smooth muscle cells (VSMCs).

**Methods:** VSMCs were derived from rat aorta. Cell death was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, lactic dehydrogenase (LDH) assay, and DNA fragmentation assay. Apoptosis was quantified by propidium iodide staining and fluorescent activated cell sorting (FACS) analysis, and intracellular free radical production was determined using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). In addition, the changes in caspases, bcl-2 and bax proteins were evaluated by western blot analysis.

**Results:** LysoPC over 25  $\mu$ M induced more than 50% of the cell death at 10 hours on MTT assay with no change in the level of LDH. The DNA ladder pattern showed that cell death induced by lysoPC was caused by apoptosis, which was associated with increased free radical production. Vitamin E, a potent antioxidant and caffeic acid phenylethyl ester (CAPE), an inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B), blocked apoptosis. The caspase-3 precursor decreased and the active form of caspase-8 increased. Total bcl-2 and bax proteins did not change with lysoPC treatment, but translocation of bax from cytosol to the mitochondrial membrane was observed.

**Conclusion:** LysoPC induces apoptosis in VSMCs via an oxidant mechanism, dependent on NF- $\kappa$ B. (*J Korean Soc Menopause* 2012;18:139-146)

**Key Words:** Apoptosis, Atherosclerosis, Lysophosphatidylcholines, Vascular smooth muscle cell

심혈관질환은 폐경 여성의 주요 사망 원인으로, 죽상동맥경화증 (atherosclerosis)은 대표적인 심혈관질환 중 하나이다. 혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cell)는 죽상동맥경

화증 발생에 있어 중요한 역할을 담당하는데, 이 세포는 파열된 죽상경화반 (atherosclerotic plaque)에서 가장 흔하게 발견되는 세포이며, 죽상동맥경화증의 진행 과정 중에 혈관

Received: June 29, 2012 Revised: September 4, 2012 Accepted: September 19, 2012

Address for Correspondence: Byung-Koo Yoon, Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea  
Tel: +82-2-3410-3519, Fax: +82-2-3410-0630, E-mail: bkyoon@skku.edu

Copyright © 2012 by The Korean Society of Menopause

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

평활근세포의 세포사가 일어난다.<sup>1</sup>

산화 스트레스가 죽상동맥경화증 발생에 기여하는데, 이 중 저밀도지단백 (low-density lipoprotein, LDL)이 산화 저밀도지단백 (oxidized LDL)으로 변화되는 것이 중요하다. 산화 저밀도지단백은 심혈관질환의 병태 생리에 있어 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 특히 혈관평활근세포에 대한 세포 독성 (cytotoxicity)을 유도한다.<sup>2</sup> 한편, lysophosphatidylcholine (lysoPC)은 죽상화된 지단백 (atherogenic lipoprotein)의 주요한 인지질 (phospholipid) 성분으로,<sup>3</sup> 내인성 포스포리파아제 (phospholipase) A2에 의한 저밀도지단백의 산화 과정에서 생성되며,<sup>4</sup> 죽상경화 병변에서 높은 농도로 발견된다.<sup>5</sup> 혈관평활근세포의 세포자멸사 (apoptosis)는 고혈압과<sup>6</sup> 혈관 협착<sup>7</sup>에 관여하고, 초기 동맥경화병변 (fatty streak)의 죽상경화반으로의 진행에 영향을 주며,<sup>8</sup> 죽상동맥경화반의 파열 및 이후의 혈전 (thrombosis) 형성에도 기여한다. 기존 연구에서 lysoPC의 혈관평활근세포에 대한 독성 효과가 보고된 바 있으나,<sup>2</sup> 정확한 기전에 대한 연구는 아직 부족한 상황이다.

본 연구의 목적은 lysoPC에 의한 혈관평활근세포의 세포사 기전을 밝히는 것이다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 혈관 평활근세포의 분리와 배양

3개월 된 Sprague-Dawley rat (Charles River Japan, Hino, Japan)에서 흉부대동맥을 떼어 내어 혈관 평활근세포를 분리하였다.<sup>9</sup> 세포는 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입한 세포배양액 (Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM]/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum [FBS], 100 mg/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)에서 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air 환경에서 배양하였으며, 5-10번 계대 배양된 세포를 실험에 사용하였다. 세포들이 almost confluence 상태에 도달하면 defined serum-free medium (DMEM/F12 medium containing insulin  $5 \times 10^{-7}$  M, transferrin 5 mg/mL, ascorbic acid 0.2 mM)에서 48시간 배양하여 quiescent 상태의 세포를 사용하였다.

본 연구는 성균관대학교 의과대학의 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다 (승인 번호 H-A9-003).

### 2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay

세포를 96 well plate에서 배양 후 MTT (Sigma Chemical

Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 0.25 mg/mL의 농도로 처리한 다음 37°C에서 4시간 동안 반응 시킨 후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. Lactate dehydrogenase (LDH) assay

세포독성 측정을 위한 실험으로 세포가 괴사 (necrosis)를 일으키면 LDH의 분비가 증가되는 것을 이용하였다. 세포를 96 well plate에서 배양한 후 well에서 배지 (media)를 얻었다. 2M Hepes buffer (pH 7.4)를 미리 넣은 둔 다른 96 well plate에 모아둔 시료와 substrate solution (10 mg/mL lactate, 6.7 mg/mL iodonitrotetrazolium violet, 1 mg/mL new antigenic determinant [NAD]<sup>+</sup>, 0.01% bovine serum albumin [BSA], 0.4% sucrose, 0.2 unit/mL diaphorase)을 넣고 60분간 배양하고 17 mg/mL oxamate로 반응을 끝낸 후 ELISA reader 492 nm로 측정했다.

### 4. DNA fragmentation assay

세포 용해물 (cell lysate)에 digestion buffer (10 mM TrisCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 0.5% sodium dodecyl sulphate [SDS], 0.2 mg/mL Proteinase K)를 넣고 50°C에서 14-18시간 정도 반응시켰다. 그 후 phenol 및 phenol/chloroform extraction 방법을 통하여 핵산만을 추출하고 추출된 물질은 다시 에탄올 침전 후, 원심분리에 의해 pellet 상태로 모았다. 모아진 pellet을 다시 Tris-EDTA (TE) buffer로 녹이고, DNase-free RNase (0.2 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 37°C에서 약 2시간 반응시켜 DNA만을 얻었다. 반응이 끝난 후 10 µg 정도의 DNA sample을 1.5% agarose gel 상에서 분리시켰고, ethidium bromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 이용하여 염색한 다음, 자외선 하에서 fragmentation 정도를 확인했다.

### 5. Fluorescent activated cell sorting (FACS) analysis: propidium iodide (PI) staining

12 well plate에서 배양된 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 cell pellet을 얻었다. Pellet을 1 mM EDTA가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)로 현탁 시킨 후 70% 에탄올로 고정시켰다. 일정 시간 4°C에서 보관 후 3500 rpm에서 5분간 원심 분리 하고 100 µg/mL RNase A, 100 µg/mL PI가 포함된 용액에 30분간 상온에서 반응 시킨 후 FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용

하여 세포의 수와 DNA 양의 상관관계를 분석하였다.

## 6. 세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

세포내 free radical 생성은 Molecular Probes 사 (Eugene, OR, USA)에서 구입한 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하여 측정하였다. DCF-DA는 세포막을 통과할 수 있는 oxidation-sensitive probe로서 세포내 ROS와 반응하여 세포막을 통과 할 수 없는 형광 물질인 DCF로 전환된다. 혈관평활근세포를 chamber slide에서 배양하고 quiescent 상태의 세포에 lysoPC와 함께 50  $\mu$ M DCF-DA를 1시간 처리하였다. PBS로 세척한 후 confocal-laser scanning microscope (DIAPHOT 300, Nikon, Japan)로 관찰하였다. ROS의 생성을 정량화 하기 위해서 배양한 혈관평활근세포에 lysoPC와 함께 10  $\mu$ M DCF-DA를 1시간 처리한 후, PBS로 세척하고 Trypsin/EDTA를 이용하여 얻은 pellet을 1 mM EDTA를 함유한 PBS에 현탁시켜 FACS analysis와 CellQuest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 형광의 정도를 측정하였다.

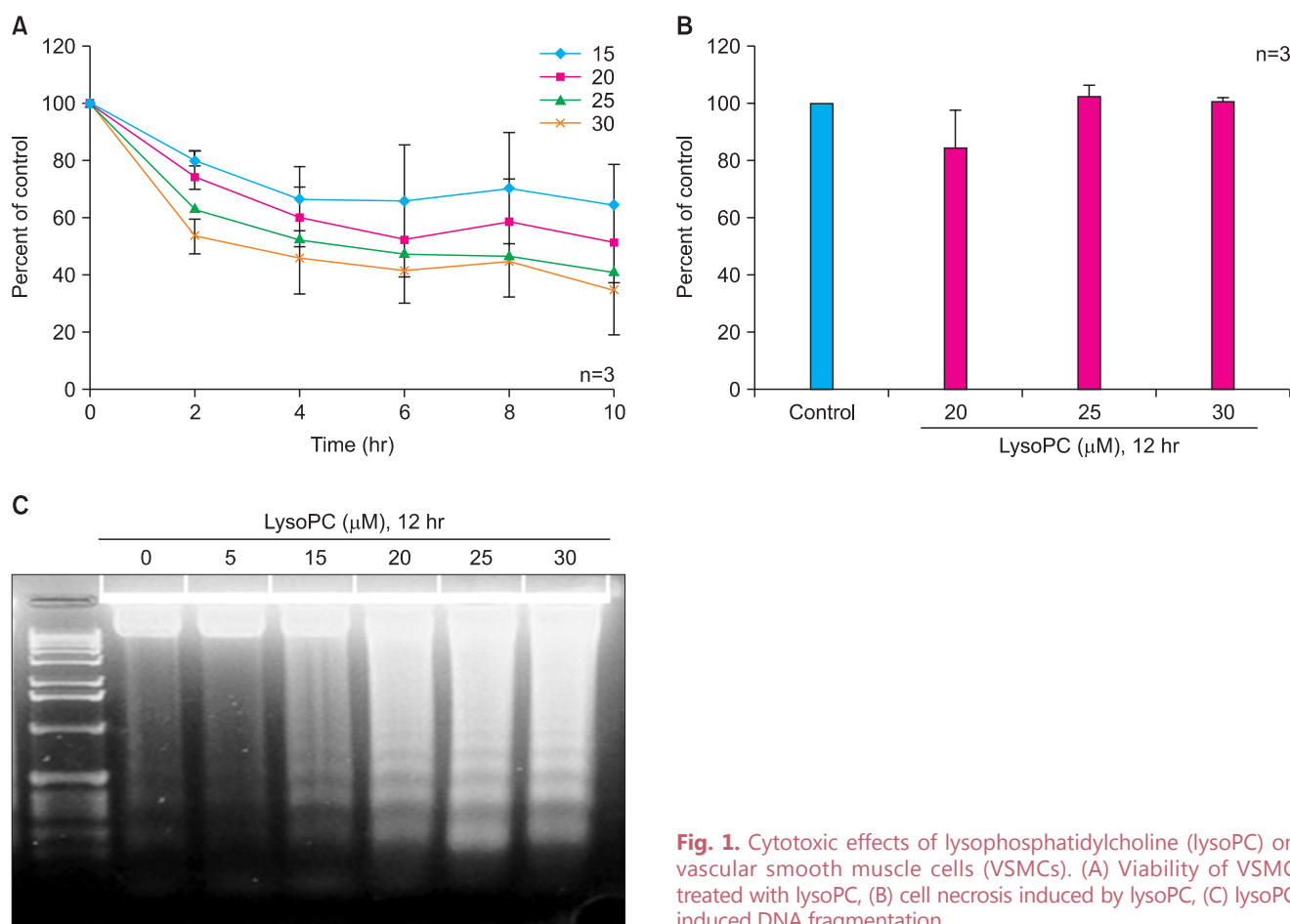
## 7. Western blotting

세포 용해물을 protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)이 포함된 lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 0.1% SDS)에 용해 (lysis)시켰다. 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 1차 항체를 반응 시킨 후 horseradish peroxidase conjugated 2차 항체를 반응시켰다. ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 단백질의 발현 정도를 X-ray상에서 확인하였다.

Western blot은 caspase와 bcl-2 및 bax 발현 분석에 사용하였으며, vitamin E 및 caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) 투여 효과 분석에는 사용하지 않았다.

## 8. Preparation of subcellular fractionations

세포 내 단백질의 이동을 확인하기 위하여 subcellular fractionation을 시행하였다. 일정 시간 100 mm 접시에



**Fig. 1.** Cytotoxic effects of lysophosphatidylcholine (lysoPC) on vascular smooth muscle cells (VSMCs). (A) Viability of VSMC treated with lysoPC, (B) cell necrosis induced by lysoPC, (C) lysoPC induced DNA fragmentation.

서 배양 된 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 cell pellet 을 얻었다. Lysis buffer (20 mM 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], pH 7.5 10mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ethylene glycol-bis[2-aminoethyl]-N,N,N',N'-tetraacetic acid [EGTA], 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol [DTT], protease inhibitors)를 넣고 homogenizer 에서 5번 이상 homogenize하였다. 4°C에서 750 g로 5분간 원심 분리 한 후 상층액을 다시 4°C에서 10,000 g로 15분간 원심 분리하여 침전물인 mitochondrial membrane fraction이 얻어 지고 상층액은 cytosol fraction이 된다. 각각을 western blotting하였다.

## 결 과

결과 분석을 위해 동일 실험을 3회 반복하여 얻은 값의 평균을 이용하였다.

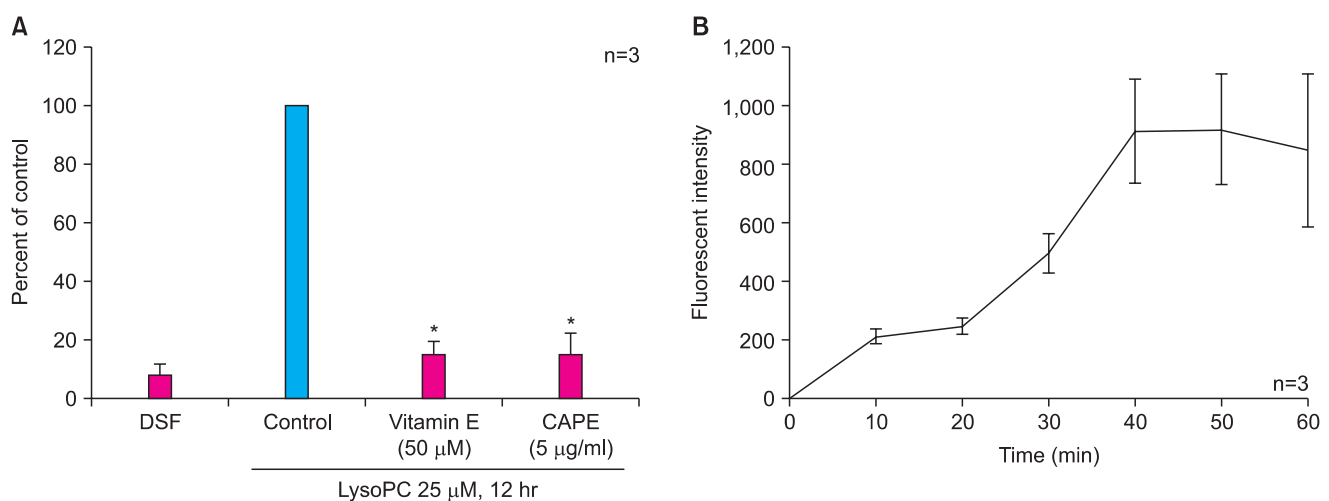
Figure 1A는 배양된 혈관평활근세포에 lysoPC를 처리하였을 때 처리 시간 및 농도에 따른 세포의 생존율을 MTT assay로 분석한 결과로, lysoPC를 처리 후 2시간이 경과하면 서부터 세포의 생존율이 급격하게 감소하여 25 및 30  $\mu$ M 농도의 경우에는 10시간 경과 후 50% 미만의 세포들만이 생존하였다.

Figure 1B는 lysoPC를 처리하였을 때 농도에 따른 LDH 분비의 변화로, 실험 결과 negative control인 defined serum-free medium (DSF) 사용과 비교하여 차이가 없었으며 이러

한 결과는 세포가 죽은 원인이 괴사와는 다른 기전임을 의미한다. 반면, lysoPC의 농도가 20  $\mu$ M 이상인 경우 세포자멸사에 특징적인 DNA ladder 양상의 발현을 확인할 수 있었으며 (Fig. 1C), 이를 종합하면 lysoPC에 의한 혈관평활근세포의 세포사는 세포자멸사를 통하여 유도되었음을 확인할 수 있었다.

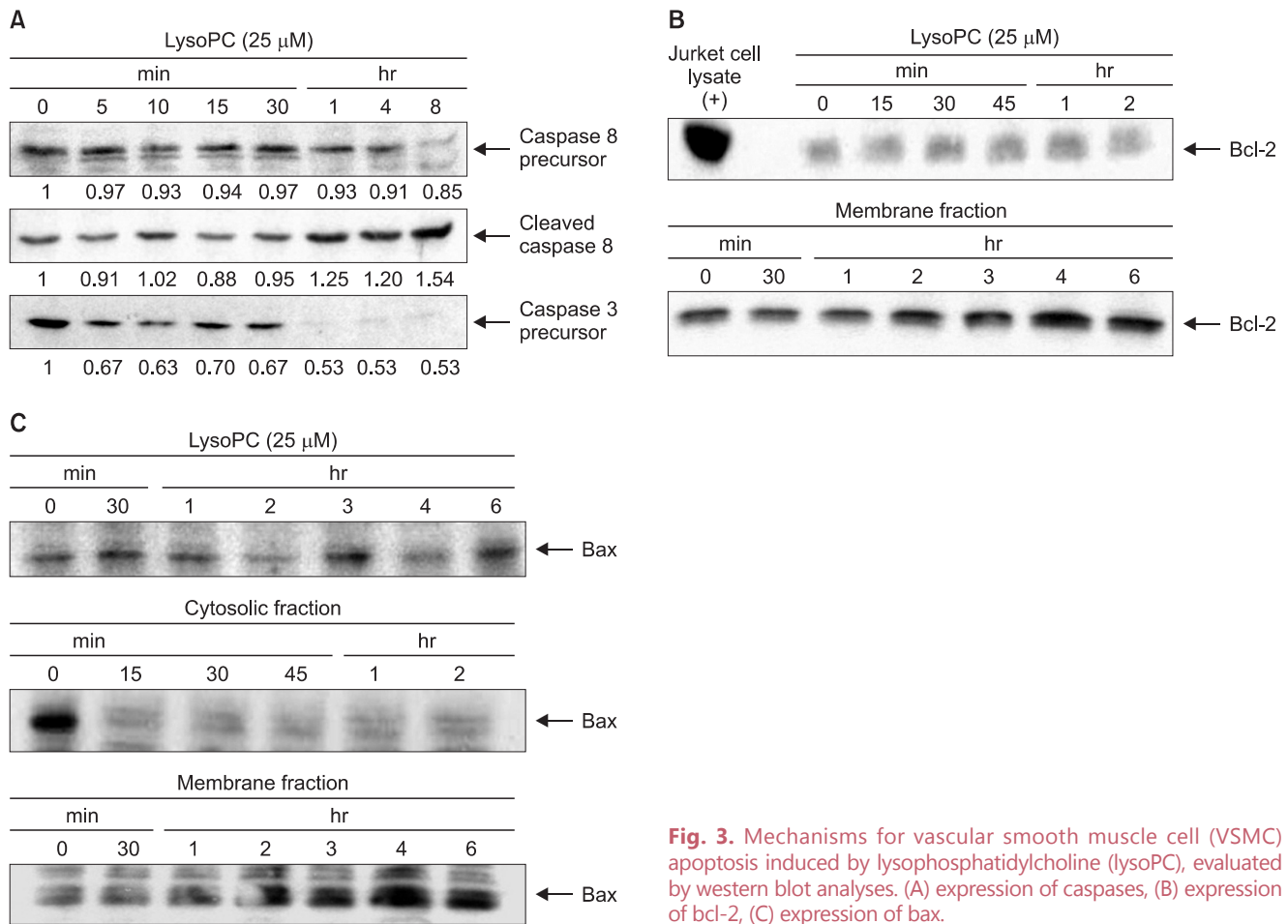
Figure 2A는 lysoPC와 함께 reactive oxygen species (ROS)를 억제하는 작용을 하는 vitamin E 또는 nuclear factor-kappaB (NF-kB) 억제제인 CAPE를 함께 처리하였을 때 혈관평활근세포의 세포자멸사를 FACS를 이용한 PI 염색으로 분석한 결과이다. Figure 1의 결과에 따라 25  $\mu$ M 농도의 lysoPC를 이용하여 실험한 결과 vitamin E와 CAPE 모두 lysoPC에 의해 유도된 혈관평활근세포의 세포자멸사를 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다. 한편, figure 2B는 lysoPC 처리 후 혈관평활근세포의 ROS 생성이 시간이 지남에 따라 증가하는 양상을 보여준다.

LysoPC 처리 후 세포자멸사의 표지자인 caspase의 변화를 관찰하였다. Caspase-3 전구체의 발현은 5분 이후부터 감소하기 시작하여 1시간 이후에는 거의 발견 되지 않았는데, 이는 활성화된 caspase-3가 증가되었음을 의미한다 (Fig. 3A). 또한 caspase-8 전구체의 발현이 4시간 이후에 감소하였으며, 이와 동시에 caspase-8의 활성형 (active form)이 증가하였다. 한편, lysoPC 처리는 총 bcl-2 단백질의 발현 및 미토콘드리아 세포막에 존재하는 bcl-2 단백질의 영향을 미치지 않았으며 (Fig. 3B), 총 bax의 발현 역시 변화가 없었다 (Fig. 3C). 하지만, subcellular fraction을 이용한 실험 결과에서는



**Fig. 2.** Mechanisms for vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis induced by lysophosphatidylcholine (lysoPC). (A) Involvement of reactive oxygen species and nuclear factor-kappaB (NF-kB), as assessed by propidium iodide (PI) staining, (B) kinetics of reactive oxygen species (ROS) production determined by 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) staining. DSF: defined serum-free medium, CAPE: caffeic acid phenylethyl ester. \* $P < 0.001$  vs. control.





**Fig. 3.** Mechanisms for vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis induced by lysophosphatidylcholine (lysoPC), evaluated by western blot analyses. (A) expression of caspases, (B) expression of bcl-2, (C) expression of bax.

세포질 분획 (cytosolic fraction)의 bax의 발현은 감소한 반면, 미토콘드리아 세포막 분획에서의 bax 발현이 증가한 것으로 나타났는데, 이는 lysoPC 처리 후 세포질에서 미토콘드리아 세포막으로 bax가 이동한다는 증거이다 (Fig. 3C).

## 고 찰

본 연구 결과 lysoPC를 배양된 혈관평활근세포에 처리하였을 때 세포자멸사 발생이 관찰되었다. 세포자멸사는 강력한 항산화제인 vitamin E에 의하여 억제되었는데 이는 산화 기전이 중요한 역할을 함을 시사하며, CAPE에 의한 세포자멸사 억제는 NF- $\kappa$ B가 downstream mechanism으로 작용하는 것을 의미한다.

아직까지 lysoPC에 의한 세포 독성 기전은 명확하게 밝혀지지 않았지만, Kume 등<sup>10</sup>은 lysoPC가 극성이 있는 인지질로 마치 세제와 같이 작용할 수 있음을 보고하였다. 즉, 특

정 농도 이상에서는 세포막의 구조에 영향을 주고, 세포막 내 고분자 (macromolecule)의 기능을 저해할 수 있다는 것이다.<sup>11</sup> 또한 Ohara 등<sup>12</sup>은 lysoPC가 혈관내 단백 키나아제 (protein kinase) C를 활성화시켜 산화 라디칼 생성 증가를 초래하여 세포막이 손상을 받을 수 있다는 기전을 제시하였으며, 이는 산화 기전의 관련성을 제시한 본 연구의 결과와 유사한 소견이다. 이와 함께 칼슘 통로의 활성화를 통한 세포내 칼슘 농도의 증가가 연관되었을 가능성도 제시되었으며,<sup>13</sup> 최근 extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, Jun N-terminal kinase (JNK), 그리고 p38와 같은 mitogen-activated protein kinase의 인산화 역시 lysoPC에 의한 혈관평활근세포의 자멸사에 영향을 주는 것이 관찰되었다.<sup>14</sup> 결과적으로 lysoPC가 혈관평활근세포를 손상시켜 세포자멸사를 초래하는 과정에는 다양한 기전들이 관여하고 있는 것으로 생각된다.

본 연구 결과 lysoPC에 의한 세포사는 괴사보다는 세포자멸사에 의해 발생하였는데, 이는 기존 연구에서 죽상경화

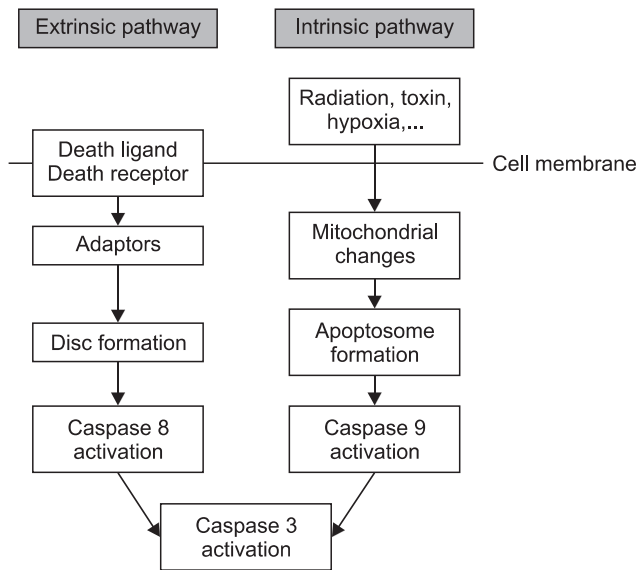


Fig. 4. Pathway of apoptosis.

반내의 손상된 혈관평활근세포의 대부분이 괴사에 의해 죽는다고 보고한 것과 상이한 결과이다.<sup>1</sup> 하지만, 기존 연구가 파열 병력이 있는 사람으로부터 채취한 죽상경화반 조직 내 손상된 세포를 이용하여 진행된 반면, 본 연구는 쥐로부터 얻은 세포를 배양한 후 lysoPC를 처리하여 실험을 진행하였다는 차이점이 있다. 하지만, 마찬가지로 쥐의 혈관평활근 세포에 대한 lysoPC의 독성을 측정할 다른 연구에서도 세포 괴사에 의한 세포사가 관찰된 바 있다.<sup>2</sup> 본 연구에서 사용된 쥐 (12주)와 기존 연구 (20주)에서 사용된 쥐의 월령이 다르다는 점에서 결과의 차이가 기인하였을 가능성이 있으며, 향후 월령에 따른 혈관의 상태를 고려한 비교 연구가 이를 해석하는데 있어서 도움이 될 것으로 사료된다.

기존 연구 결과 배양된 혈관평활근세포에서 산화 저밀도 지단백에 의해 유도되는 세포자멸사는 bcl-2 단백질의 조절을 통해서 일어난다고 보고된 바 있으나,<sup>15</sup> 본 연구에서는 bcl-2 단백질의 변화가 관찰되지 않아 이와는 다른 결과를 나타내었다. 하지만, bcl-2 단백질 변화뿐만 아니라, 본 연구 결과와 같이 bax의 translocation이 세포자멸사를 유도한다는 연구 결과들도 있으므로,<sup>16,17</sup> 정확한 조절 기전에 대해서는 향후 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

아직까지 lysoPC에 의해 유도되는 세포자멸사의 발생 기전은 정확하게 알려지지 않았으나 본 연구에서 intrinsic pathway와 함께 extrinsic pathway의 활성화를 시사하는 caspase-8 증가가 관찰된 점은 다양한 조절 경로가 존재함을 시사한다 (Fig. 4).

요약하면, 심혈관질환 발생 과정에서 중요한 역할을 할

것으로 생각되는 lysoPC는 혈관평활근세포의 세포자멸사를 유도하며, 산화 기전 및 NF- $\kappa$ B 경로가 관련되어 있다. 에스트로겐이 강력한 항산화 효과가 있으며 NF- $\kappa$ B 경로를 조절하는 작용을 하는 것을 고려할 때, 본 연구는 향후 에스트로겐에 의한 심혈관질환 보호 효과의 기전 규명을 위한 의미 있는 기초 연구 결과로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 삼성생명과학연구소 (#SBRI C-A0-021), 성균관대학교 산학협력단 (S-2008-0021-000), 그리고 농림수산식품부 농림기술개발사업 (109127-03-3-SB010)의 지원으로 시행되었음.

## 참고문헌

1. Crisby M, Kallin B, Thyberg J, Zhivotovsky B, Orrenius S, Kostulas V, et al. Cell death in human atherosclerotic plaques involves both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis* 1997; 130: 17-27.
2. Hsieh CC, Yen MH, Liu HW, Lau YT. Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL. *Atherosclerosis* 2000; 151: 481-91.
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-24.
4. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 3883-7.
5. Keaney JF Jr, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2520-9.
6. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995; 26: 642-8.
7. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703-11.
8. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H,

- Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 2307-15.
9. Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM. Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol* 1986; 102: 343-52.
  10. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138-44.
  11. Bergmann SR, Ferguson TB Jr, Sobel BE. Effects of amphiphiles on erythrocytes, coronary arteries, and perfused hearts. *Am J Physiol* 1981; 240: H229-37.
  12. Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1007-13.
  13. Massaeli H, Pierce GN. Involvement of lipoproteins, free radicals, and calcium in cardiovascular disease processes. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 597-603.
  14. Hsu JH, Wu JR, Liou SF, Chen HM, Dai ZK, Chen IJ, et al. Labeledipinedilol-a prevents lysophosphatidylcholine-induced vascular smooth muscle cell death through reducing reactive oxygen species production and anti-apoptosis. *Atherosclerosis* 2011; 217: 379-86.
  15. Nishio E, Watanabe Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 928-34.
  16. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* 2002; 16: 607-9.
  17. Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, et al. Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2001; 265: 145-51.

## 국문초록

**연구목적:** 혈관평활근세포에 대한 lysophosphatidylcholine (lysoPC)의 세포 독성 효과를 조사하였다.

**연구재료 및 방법:** 쥐의 대동맥으로부터 혈관평활근세포를 얻어 배양한 후 lysoPC에 의해 세포사가 유도되는지의 여부를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 lactic dehydrogenase (LDH) 측정 및 DNA 사다리 발현 양상 비교를 이용하여 관찰하였다. 세포자멸사의 변화를 propidium iodide (PI) 염색 및 FACS를 이용하여 조사하였고, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하여 세포내 reactive oxygen species (ROS) 생성을 측정하였다. 또한 caspase, bcl-2 및 bax의 발현을 western blot 분석으로 측정하였다.

**결과:** MTT 측정 결과 25  $\mu$ M 이상 농도의 lysoPC 처리 후 10시간이 경과하였을 때 50% 이상의 혈관평활근세포가 죽는 것이 관찰되었으며, LDH 수치는 변화가 없었다. 반면, DNA 사다리 양상 관찰 결과 세포자멸사에 특징적인 양상이 확인되었다. 항산화제인 비타민 E와 NF- $\kappa$ B 억제제인 caffeic acid phenylethyl ester (CAPE) 투여는 모두 lysoPC에 의한 세포자멸사를 억제하였다. Western blot 분석 결과 lysoPC 처리시 caspase-3 및 -8의 증가가 관찰되었다. 총 bcl-2 및 bax 단백질 발현에는 변화가 없었으나, bax의 세포질에서 미토콘드리아 세포막으로의 위치 변화가 관찰되었다.

**결론:** LysoPC는 혈관평활근세포의 세포자멸사를 유도하며, 산화 기전 및 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 경로가 관련되어 있다.

**중심단어:** 세포자멸사, 죽상동맥경화증, Lysophosphatidylcholine, 혈관평활근세포