

고혈압-고지혈증 백서 모델에서 Lectin Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1의 발현

김기석¹, 김송이¹, 박노관², 김동운², 주승재¹, 조명찬²

¹제주대학교 의학전문대학원 내과학교실, ²충북대학교 의과대학 내과학교실

Expression of Lectin like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 in the Spontaneous Hypertensive Rat with High Cholesterol Diet

Ki-Seok Kim, MD¹, No Kwan Park, PhD², Song-Yi Kim, MD¹, Dong-Woon Kim, MD²,
Seung-Jae Joo, MD¹, Myeong-Chan Cho, MD²

¹Department of Internal Medicine, Jeju National University School of Medicine, Jeju;

²Department of Internal Medicine, Chungbuk National University School of Medicine, Cheongju, Korea

ABSTRACT

Background: Lectin-like, oxidized, low-density lipoprotein receptor receptors (LOX-1) recognizes recognize vascular oxidized low-density lipoprotein (LDL), which may play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. We investigated the expressions expression of LOX-1 and redox-regulating thyoredoxinthioredoxin systems in a hypertension and hypercholesterolemia rat model. **Methods:** Spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rat (WKY) rats were fed with a normal cholesterol diet (NC) and a high cholesterol diet (HC) for 4 weeks. Plasma LDL cholesterol levels and blood pressure were measured at 1 and 4 weeks. Histological changes of atherosclerosis in the vessel was evaluated by hematoxylin and eosin staining and immunocytochemistry. The expressions expression of LOX-1 and thyoredoxinthioredoxin were measured by Western western blot analysis. **Results:** In the SHR groupsgroup, blood pressure after 4 weeks was significantly higher than initial levels. LDL-cholesterol levels in the SHR-HC group were increased at 4 weeks (15.3 ± 2.6 mg/dL vs. 20.2 ± 2.6 mg/dL, $p < 0.01$) compared with the SHR-NC group. In oxyblot analysis, the degree of oxidative stress of in the SHR-HC group was significantly higher than in the SHR-NC group ($p < 0.05$). The expressions expression of LOX-1 and Trx were was significantly increased in the SHR-HC group compared with the SHR-NC group ($p < 0.05$) on western blot analysis. Focal overexpressions overexpression of LOX-1 were was observed at the intima layer of the thoracic aorta, and was which wereonly observed in the SHR-HC group. **Conclusions:** The expressions expression of LOX-1 and oxidative stress were was significantly increased in the “hypertension with hypercholesterol” rat model. These findings suggested suggest that LOX-1 and redox systems may play a certain role in development and progression of atherosclerosis.

(J Korean Soc Hypertens 2011;17(2):57-64)

Key words: Atherosclerosis; Hypertension; Oxidative stress

논문접수일: 2011. 3. 15, 심사완료일: 2011. 6. 20, 게재승인일: 2011. 6. 22

교신저자: 김기석

주소: 제주특별자치도 제주시 대학로 102

Tel: 064) 717-1481, Fax: 064) 757-8276

E-mail: kiseok@jejunu.ac.kr

본 연구는 2007년도 대한고혈압학회 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

This study was supported by the Research Fund of Korean Society of Hypertension (2007).

서론

고혈압과 고지혈증은 심혈관 질환의 주요한 위험인자 중 하나이며, 이들 질환과 연관된 표적 장기의 손상은 심

혈관 질환의 발생과 진행에 있어 중요한 역할을 한다. 표적장기 손상을 일으키는 주된 원인으로는 고혈압, 고지혈증, 당뇨 등이 알려져 있으며, 최근에는 산화스트레스(oxidative stress)의 불균형이 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.¹⁾

산화저밀도지단백질(oxidized-low density lipoprotein, ox-LDL)은 동맥경화 및 심혈관 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다.²⁾ Lectin like-oxidizes LDL receptor 1 (LOX-1)은 산화저밀도 지단백질 수용체로서 그 간 알려진 SR-AI/II, CD36, SERC 등의 ox-LDL 수용체와 전혀 다른 구조를 가지는 50 kDa의 type II membrane protein으로서 알려지지 않은 protease에 의해 분해되어 30 kDa의 soluble form으로 혈중에 존재하여 생물학적 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 또한, LOX-1의 발현은 세포 내의 산화-환원상태와 밀접하게 연관되어 있으며, 과다한 산화스트레스에 의하여 발현이 증가하는 것으로 알려지고 있다.²⁾ 하지만, 동물모델을 이용하여 산화스트레스와 LOX-1의 연관성에 관한 연구는 아직 국내에서 미미한 상태이다.

본 연구에서는, 고혈압-고지혈증 동물모델을 이용하여 혈압 및 혈중 저밀도 지단백질의 변화에 따른 혈관조직에서의 LOX-1과 산화스트레스의 발현을 알아보고, 동맥경화의 발생과 진행의 과정에서 이들 사이의 연관성을 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

고혈압 동물모델로 8주령의 자발성 고혈압쥐(spontaneous hypertensive rat, SHR; n=10)와 대조군인 Wistar Kyoto rat (WKY, n=10)을 이용하여 1주간의 환경 적응과 안정기간을 거친 후 실험을 진행하였다. 대조군과 고혈압군을 각각 정상식이군(normal cholesterol diet, NC)과 고지혈식이군(high cholesterol diet, HC)으로 나누어 4주간 실험을 진행하였고, 고지혈식이군은 2% cholesterol diet를 시행하였다. 각 군마다 각각 5 마리의 실험동물을 배정하였다. 좌심실벽의 비후 정도는 각 군의 실험동물을 실험시작 후

1주와 4주 후에 m-mode 초음파를 시행하여 측정하였다.

2. 혈압 및 생화학적 인자의 측정

실험동물의 혈압은 tail-cuff method를 이용하여 측정하여 측정하였다. 혈압의 측정은 실험동물을 마취하지 않고, 37°C가 유지되는 chamber 내 설치된 혈압 측정 장치를 이용하여 실험동물이 충분히 환경에 적응하도록 한 후 5회의 혈압을 측정하고 평균값을 취하여 실험시작 후 1주, 4주에 각각 혈압을 측정하였다. 혈액의 생화학적 인자의 분석은 실험동물의 꼬리정맥을 통하여 혈액을 채취한 후 혈중 LDL-cholesterol치를 실험시작 후 1주, 4주에 측정하여 비교하였다.

3. Western blot analysis

적출한 장기를 각각 homogenized 한 후 4 mL의 solubilizing solution (0.5% NP-40 10 mM, Tris HCl [pH 7.2] 150 mM, NaCl 1 mM, PMSF 0.111 unit/mL)으로 30분간 용해시킨다. 동일한 양의 단백질(100 ug)을 10% SDS-polyacrylamide gel에 올려놓고 poly vinylidene difluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용하여 전기영동과 western blot을 시행하였다. 5% non-fat milk로 blocking 한 후, 1차 항체로 thioredoxin (Lab Frontier, Seoul, Korea), LOX-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)을 반응시켰다. PBS containing 0.05% Tween-20 버퍼를 이용하여 세척한 후, 4°C에서 2차 항체인 peroxidase-linked rabbit antibody (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)를 반응 시킨 후, ECL Western blot detection kit (Amersham Pharmacia)로 LOX-1과 thioredoxin의 발현을 측정하였다.

4. Oxyblot analysis

동일한 양의 단백질(20 ug)을 1% SDS-polyacrylamide gel에 올려놓고 전기영동을 시행한다. Blocking과 dilution 버퍼(Oxyblot kit, Millipore)를 이용하여 1시간 동안 반응시킨다. 상온에서 1차 항체와 2차 항체(Oxyblot kit)와 1시간 동안 반응 시킨 후 발현을 측정하였다.

5. 조직학적 검사

실험동물에서 전신마취 후 대동맥을 분리하여 적출하였다. 분리한 장기는 생리 식염수를 혈관내부를 세척하여 혈액을 제거하고, 주위의 근육과 신경조직을 제거한 후 즉시 액체질소에 냉동시켰다. 샘플절편의 두께가 4 um 이하가 되도록 냉동절편(frozen section) 제작하여 acetone으로 고정한 후 영하 70°C로 보관한 후 염색에 사용하였다. 냉동절편은 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 시행하였다.

6. 면역조직화학검사

면역조직화학검사는 immunoperoxidase 기법을 이용하였다. 적출한 혈관을 파라핀 section을 시행한 후 10 mmol/L의 citrate buffer (PH 6.0)을 이용하여 10분간 가압 멸균을 시행 한 후 3% H₂O₂를 첨가하여 10분간 반응 시켰다. 1차 항체로 LOX-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)을 사용하여 반응하였다. 2차 항체로 goat-IgG를 30분간 반응 시킨 후, 0.1% 3, 3-di-aminobenzidin을 가하여 5분간 반응하였다. 그 후 LOX-1의 발현을 형광현미경으로 측정하였다.

7. 통계적 분석

통계적인 분석은 Prism ver. 5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, US A) 프로그램을 이용하여 분석하고,

모든 수치는 평균± 표준오차로 표시한다. 비교 가능한 변수는 연속변수인 경우 비모수 검증법인 Mann-Whitney U test를 시행하여 분석한다. 분산분석은 One way ANOVA 검증으로 시행하였으며 Newman-Keuls 방법으로 사후검정을 시행하였다. 모든 결과는 p-value < 0.05인 경우를 통계적으로 유의한 결과로 해석하였다.

결 과

1. 혈압 변화 및 심비우

실험시작 후 1주 후 측정된 대조군(WKY)과 고혈압군(SHR)에서 각 군 간의 몸무게의 차이는 없었으며, 4주 후의 몸무게도 각 군에서 유의한 차이는 없었다(Table 1). 수축기 혈압은 1주 후 고혈압군(SHR-NC 172.5 ± 16.1 mm Hg, SHR-HC 173.6 ± 8.1 mm Hg)에서 대조군(WKY-NC 112.7 ± 13.2 mm Hg, WKY-HC 107.1 ± 4.7 mm Hg; p < 0.01)에 비하여 유의하게 증가된 소견을 보였다. 4주 후 혈압측정 결과 역시 고혈압군에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가되어 있었다(p < 0.01) (Table 1). 심초음파에서 심실벽의 비후는 실험 1주 후에는 각 군에서 차이가 없었으나, 4주후 고혈압군(SHR-NC 2.2 ± 0.2 mm, SHR-HC 2.1 ± 0.1 mm)에서 대조군(WKY-NC 1.6 ± 0.3 mm, WKY-HC 1.7 ± 0.1 mm; p < 0.05)에 비하여 유의하게 증가된 심비후의 소견을 보였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Baseline characteristics of blood pressure and left ventricle wall thickness

| | Study period | WKY | | SHR | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------------------|
| | | NC | HC | NC | HC |
| Body Weight (g) | 1 wk | 134.2 ± 4.3 | 136.7 ± 3.8 | 134.6 ± 4.5 | 137.3 ± 6.2 |
| | 4 wk | 283.9 ± 7.2 | 276.9 ± 10.2 | 257.3 ± 9.8 | 281.2 ± 7.5 |
| SBP (mm Hg) | 1 wk | 112.7 ± 13.2 | 107.1 ± 4.7 | 172.5 ± 16.1 [†] | 173.6 ± 8.1 [†] |
| | 4 wk | 148.7 ± 8.1 | 136.6 ± 10.1 | 191.9 ± 16.6 [†] | 195.3 ± 6.2 [†] |
| Wall thickness (mm) | 1 wk | 1.2 ± 0.2 | 1.2 ± 0.1 | 1.3 ± 0.1 | 1.3 ± 0.1 |
| | 4 wk | 1.6 ± 0.3 | 1.7 ± 0.1 | 2.2 ± 0.2* | 2.1 ± 0.1* |
| LDL (mg/dL) | 1 wk | 6.8 ± 1.5 | 7.6 ± 0.6 | 7.5 ± 0.6 | 5.4 ± 0.9 |
| | 4 wk | 10.2 ± 2.8 | 15.3 ± 4.5* | 15.3 ± 2.6* | 20.2 ± 2.6* [†] |

n = 5 in each group.

WKY, Wistar Kyoto rat; SHR, spontaneous hypertensive rat; NC, normal cholesterol diet; HC, high cholesterol diet; LDL, low density lipoprotein; SBP, spontaneous hypertensive rat, WKY-NC, WKY-HC vs, SHR-NC, SHR-HC, p < 0.01; Wall thickness, WKY-NC, WKY-HC vs, SHR-NC, SHR-HC, p < 0.05; LDL, WKY-NC vs, WKY-HC, SHR-NC, p < 0.05, WKY-NC, WKY-HC, SHR-NC vs, SHR-HC.

*p < 0.05, [†]p < 0.01.

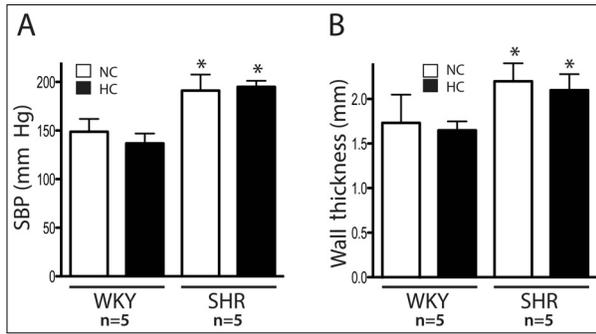


Fig. 1. Change of blood pressure and left ventricular wall thickness. (A) SBP change at 4 weeks experiment; WKY-NC, WKY-HC vs. SHR-NC, SHR-HC, $p < 0.05$. (B) Left ventricular wall thickness at 4 weeks experiment; WKY-NC, WKY-HC vs. SHR-NC, SHR-HC, $p < 0.05$. SBP, systolic blood pressure; WKY, Wistar Kyoto rat; SHR, spontaneous hypertensive rat; NC, normal cholesterol diet; HC, high cholesterol diet; LDL, low density lipoprotein. $n = 5$ in each group. * $p < 0.05$.

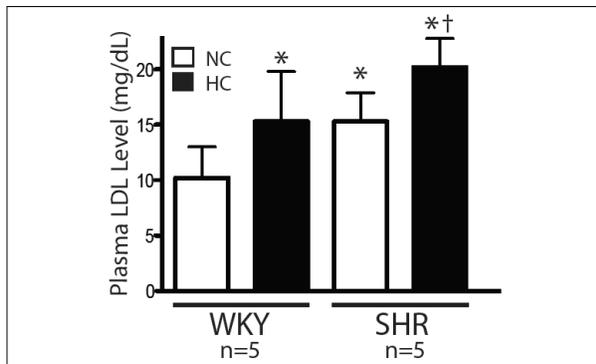


Fig. 2. Change of plasma low density lipoprotein levels. Plasma LDL level; WKY-NC vs. WKY-HC, SHR-NC, $p < 0.05$, WKY-NC, WKY-HC, SHR-NC vs. SHR-HC, $p < 0.01$, WKY: Wistar Kyoto rat, SHR: spontaneous hypertensive rat, NC: normal cholesterol diet, HC: high cholesterol diet, LDL: low density lipoprotein, $n = 5$ in each group. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$.

2. 혈중 LDL 농도 변화

실험 시작 1주후에 측정된 혈중 LDL의 농도는 각 군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 4주후 측정결과에서 정상식을 시행한 대조군에 비하여 고지혈 식이를 시행한 대조군에서 유의하게 높았다(WKY-NC 10.2 ± 2.8 vs. WKY-HC 15.3 ± 4.5 , $p < 0.05$). 고지혈 식이의 대조군(WKY-HC)과 정상식이의 고혈압군(SHR-NC)에서는 혈중 LDL 농도의 유의한 차이가 없었으나, 고지혈식을 시행한 고혈압군에서 각 군에 비하여 유의하게 높은 결과를

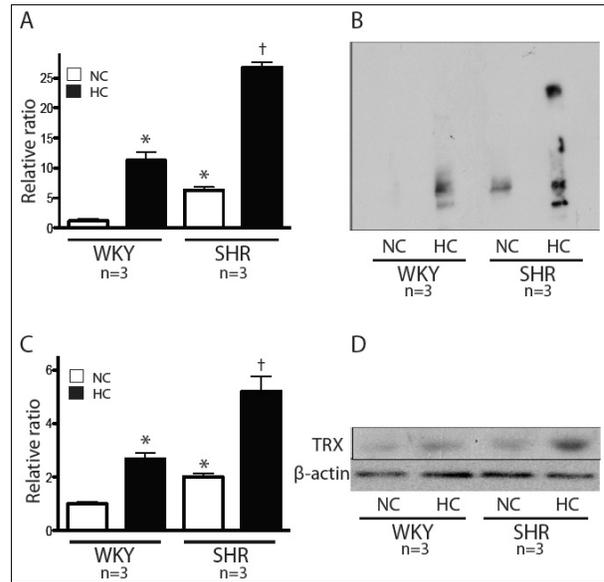


Fig. 3. Expression patterns of oxidative stress in thoracic aorta. (A) Oxyblot analysis of thoracic aorta, WKY-NC vs. WKY-HC, SHR-NC, $p < 0.05$, WKY-NC, WKY-HC, SHR-NC vs. SHR-HC, $p < 0.01$. (B) Representative figure of oxyblot analysis. (C) Expression patterns of TRX in thoracic aorta on western blot analysis, WKY-NC vs. WKY-HC, SHR-NC, $p < 0.05$, WKY-NC, WKY-HC, SHR-NC vs. SHR-HC, $p < 0.01$. (D) Representative figure of western blot analysis of TRX. WKY, Wistar Kyoto rat; SHR, spontaneous hypertensive rat; NC, normal cholesterol diet; HC, high cholesterol diet; TRX, thioredoxin. $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$.

보였다(WKY-NC 10.2 ± 2.8 , WKY-HC 15.3 ± 4.5 , SHR-NC 15.3 ± 2.6 vs. SHR-HC 20.2 ± 2.6 ; $p < 0.01$) (Table 1, Fig. 2).

3. 산화스트레스의 발현양상

실험 4주후 흉부대동맥을 적출하여 산화스트레스의 발현양상을 oxyblot 분석을 통하여 측정하였다. 정상식이 대조군(WKY-NC)에 비하여 고지혈식이 대조군(WKY-HC)과 정상식이 고혈압군(SHR-NC)에서 산화스트레스의 발현양상이 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Fig. 3A, 3B). 또한, 고지혈식이 고혈압군(SHR-HC)에서는 다른 군들과 비교하여 유의하게 높은 결과를 보였다($p < 0.01$) (Fig. 3A, 3B). 산화스트레스의 증가를 반영하는 thioredoxin의 발현양상 역시 고지혈식이 고혈압군(SHR-HC)에서 다른 군들에 비해 유의하게 높은 결과를 보였다($p < 0.01$) (Fig. 3C, 3D).

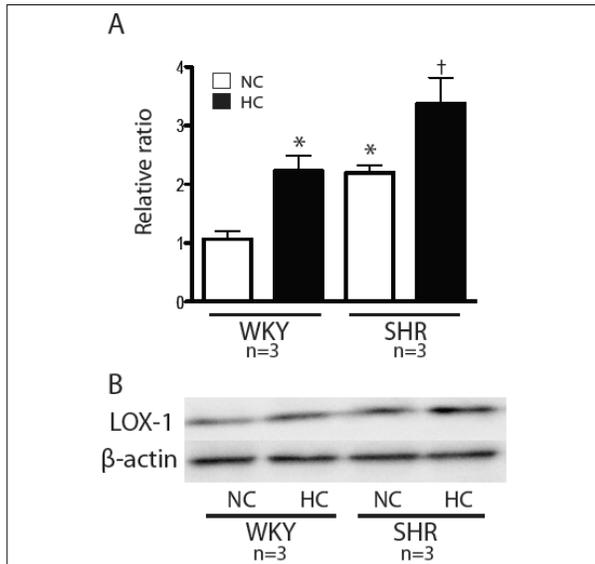


Fig. 4. Expression patterns of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in thoracic aorta. (A) Expression patterns of LOX-1 in thoracic aorta on western blot analysis, WKY-NC vs. WKY-HC, SHR-NC, $p < 0.05$, WKY-NC, WKY-HC, SHR-NC vs. SHR-HC, $p < 0.01$. (B) Representative figure of western blot analysis of LOX-1. WKY, Wistar Kyoto rat; SHR, Spontaneous hypertensive rat; NC, normal cholesterol diet; HC, high cholesterol diet. $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$.

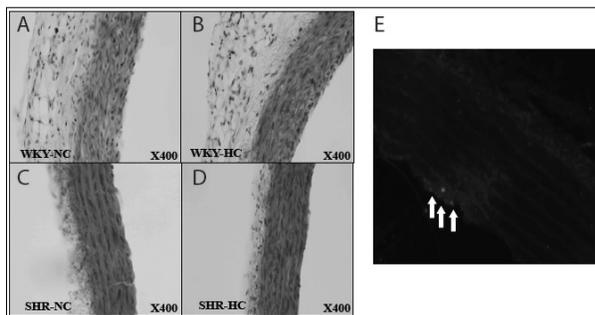


Fig. 5. Histological findings of thoracic aorta. (A–D) H&E stain findings of thoracic aorta. (E) Immunohistochemistry finding in SHR-HC group, white arrow tips indicated lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor expressions. WKY, Wistar Kyoto rat; SHR, spontaneous hypertensive rat; NC, normal cholesterol diet; HC, high cholesterol diet.

4. LOX-1의 발현양상

실험 4주 후 적출한 흉부 대동맥을 이용하여 시행한 western blot 분석에서 LOX-1의 발현 양상은 정상식이 대조군(WKY-NC)에 비하여 나머지 군에서 유의하게 높았으며($p < 0.05$) (Fig. 4), 고지혈식이 고혈압군(SHR-HC)에

서는 고지혈식이 대조군(WKY-HC)와 정상식이 고혈압군(SHR-NC)에 비하여 유의하게 높은 결과를 보였다($p < 0.01$) (Fig. 4).

5. 조직학적 변화

4주 후 흉부 대동맥을 이용하여 시행한 조직학적 검사에서 각 군에서 유의한 동맥경화의 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 5A). 하지만, 면역형광 염색에서 고지혈식이 고혈압군(SHR-HC)에서 혈관 내막(intima)에 국한된 LOX-1의 과잉발현이 관찰되었다(Fig. 5B).

고찰

본 연구는 고혈압과 고지혈증 백서모델에서 고혈압과 고지혈증이 혈관에서 산화스트레스와 LOX-1의 발현을 증가시키는 것을 확인하였지만, 동맥경화반의 형성을 확인하지는 못하였다.

동맥경화의 발생과 진행에는 다양한 인자가 관련되어 있지만, 고혈압과 고지혈증은 주요 위험인자 중 하나이다. 고혈압과 고지혈증은 각각의 인자 자체로 체내에서 과도한 산화스트레스(oxidative stress)를 유발하며, 복합적으로 작용할 때 과도한 활성산소(reactive oxygen species)의 발현이 일어나 산화-환원계의 심각한 불균형을 초래하게 된다.⁵⁾ 혈관에서의 LOX-1의 과잉발현은 산화스트레스의 증가와 연관되어 있다고 알려지고 있으며, 동맥경화의 발생과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ LOX-1은 ox-LDL에 대한 수용체로서의 역할을 할 뿐 아니라, 혈관 긴장도의 변화, 염증세포의 이동 등에 관여하여 혈관의 염증반응과 연관성이 알려져 있으며, 그 자체로 신호전달 물질로의 역할을 하여 각종 활성물질의 분비와 생산과 연관되어 있으며, 세포고사 과정에서 신호전달 물질의 역할을 한다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ LOX-1의 과잉발현을 유발하는 요인으로는, TNF- α , TGF- β , endothelin-1, angiotensin II 등의 과잉생산과²⁾ ox-LDL, homocystein, superoxide anion, advanced glycosylated end products 등의 산화환원계의 불균형을 초래하는 물질과 연관성이 알려져 있다.^{10,11)}

LOX-1은 처음에는 단순히 ox-LDL의 수용체로 알려졌

으나, 그 외에 혈관내피세포의 기능 장애를 일으키며, 백혈구, 단핵구 및 활성화된 혈소판과 반응하여 거품세포(foam cell) 형성과 연관성이 있는 것으로 알려지고 있다.⁶⁾ 혈관평활근세포의 증식과 이동에도 관여하는 것으로 알려져 있다. LOX-1은 수용체가 활성화된 후 그 자체가 신호전달체계의 역할도 수행하여 세포증식과 비후에 연관된 인자인 ERK1/2, NF- κ B 등의 발현을 증가시키며, 세포고사와 연관된 pro-apoptotic 신호인 Bax의 발현을 증가시키고, anti-apoptotic 신호계인 Bcl-2의 발현을 감소시켜 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다.^{4,7,12)} 이런 일련의 과정은 LOX-1의 과잉발현이 심장에서는 심실재형성(cardiac remodeling)을 일으키고,¹³⁾ 대동맥에서는 혈관의 수축과 동맥경화반의 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 이러한 결과는 세포실험(*in vitro*) 및 조직학적 실험을 통하여 보고되었으며, 생체 내 실험(*in vivo*)의 결과는 아직 제한적이다.

본 연구에서는 고지질식을 통한 고혈압-고지혈증 모델을 확립하였고, 고혈압에 의한 좌심실의 비대를 확인할 수 있었다(Table 1). 고지질식을 시행한 정상 혈압군(WKY-HC)에서 4주 후 혈중 저밀도지단백의 농도가 유의하게 증가하였다(Table 1, Fig. 1). 또한, 고지질식이 고혈압군(SHR-HC)에서 혈중 저밀도지단백의 농도가 가장 현저히 증가하였다(Table 1, Fig. 2). 그리고 흥부 대동맥에서의 LOX-1의 발현 증가를 western blot 분석을 통하여 확인하였으며 고혈압(SHR-NC) 및 고지혈증군(WKY-HC)에서 대조군(WKY-NC)에 비하여 발현이 현저하게 증가되었으며, 고혈압과 고지혈증(SHR-HC)을 동반한 군에서 가장 현저히 증가함을 확인하였다(Fig. 4).

고지혈증 및 고혈압에 의하여 산화스트레스의 증가가 발생하게 되면, 산화-환원계의 체내 방어기전 중 하나인 thiorodoxin (TRX) 체계의 활성화가 일어나며 조직에서 TRX의 발현이 증가하게 된다.⁵⁾ TRX는 심근세포는 물론 혈관 내피세포, 혈관 평활근 세포의 증식, 비후 및 고사(apoptosis) 등에 관여하며, NF- κ B, AKT, ERK 등의 다양한 신호전달체계의 발현에 관여하는 것으로 알려지고 있다.¹⁴⁾ 이러한 신호전달체계의 활성화는 초기에는 심비후

및 혈관비후의 증상을 보이게 되나, 결국 세포고사와 연관되어 심부전과 동맥경화의 형태로 발전하여 심혈관 질환의 진행과 관련이 있다¹⁵⁾. TRX의 과잉발현은 고혈압, 심부전, 심근경색증¹⁶⁾ 등의 심혈관 질환에서 발생한다고 보고되고 있으며,¹⁷⁾ 동맥경화의 발생과 진행에 관하여서는 아직 연구결과는 아직도 제한적인 상태이다.

일부 연구에서 동맥경화가 진행된 대동맥류 환자의 혈관조직에서 과잉발현을 보고하였고,¹⁸⁾ 혈관 내피세포의 허혈성 손상 모델에서 발현이 증가됨을 보고한 연구결과가 있다.¹⁹⁾

본 연구에서는 산화스트레스의 과잉발현을 oxyblot 분석을 통하여 확인하였고, 이는 각각의 위험인자가 증가할수록 발현양상이 증가함을 확인하였다. 특히, 고혈압과 고지혈증을 동반한 군(SHR-HC)에서 현저히 증가함을 확인하였다(Fig. 3). TRX의 발현 양상 역시 oxyblot 분석결과와 일치함을 확인하여 산화스트레스의 증가에 의하여 TRX의 발현의 증가가 일어남을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 하지만, 조직학적 검사에서 동맥경화반의 형성은 모든 군에서 확인할 수 없었으나, 고혈압과 고지혈증을 동반한 군에서 혈관내막(intima)에서 국소적으로 LOX-1의 발현 증가를 면역형광염색에서 확인하였다.

본 연구 결과를 요약하면, 고혈압과 고지혈증 동물모델에서 혈중 저밀도 지단백질의 증가와 혈관조직에서 산화스트레스 발현이 현저히 증가함을 확인하였고, LOX-1의 발현 또한 현저히 증가함을 확인할 수 있었으나, 동맥경화반의 형성은 확인하지 못하였다.

본 연구의 제한점으로는 혈관조직의 동맥경화반의 형성을 확인하기 위하여 충분한 기간 동안 고혈압 및 고지혈증 모델을 유지하지 못한 점이다. 백서에서 고지혈식을 통한 흥부대동맥에서 동맥경화반의 형성은 8-12주 후에 시작된다는 보고가 있어,²⁰⁾ 본 연구에서 이용한 고혈압 고지혈증 모델에서도 현미경적 동맥경화반의 확인을 위하여, 고지혈식이의 지속이 필요하였다고 생각된다. 또한, LOX-1과 TRX와 연관된 하위 신호 전달체계인 ERK 1/2, AKT 및 NF- κ B의 발현을 비교하지 못한 점이다. 이를 위한 추가적인 연구가 추후 필요하겠다.

요 약

연구배경: Lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1)은 동맥경화의 발생과 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 고혈압과 고지혈증 동물 모델에서 혈관 조직에서 LOX-1과 산화-환원계의 조절인자인 thioredoxin (TRX)의 발현양상을 비교하고자 한다.

방법: 정상식이(normal cholesterol diet, NC)와 고지혈증식이(high cholesterol diet, HC)를 시행한 정상혈압군(Wistar Kyoto rat, WKY)과 고혈압군(spontaneously hypertensive rats, SHR)에서 혈압과 심비후의 변화를 비교하고, 산화스트레스의 발현양상 및 혈중 저밀도지단백질의 증가양상과 대동맥 조직에서 LOX-1과 TRX의 발현양상을 비교하였다.

결과: 혈압 증가와 심비후의 발생은 실험 4주후 정상식이 및 고지질식이 고혈압군에서 현저히 증가하였고($p<0.05$), 혈중 저밀도 지단백질의 증가는 정상식이 대조군(WKY-NC)을 제외한 모든 군에서 현저히 증가되었다($p<0.05$). 산화스트레스의 발현 역시 정상식이 대조군(WKY-NC)을 제외한 모든 군에서 현저히 증가되었으며($p<0.05$), 대동맥 조직에서 LOX-1과 TRX의 발현 역시 정상식이 대조군(WKY-NC)을 제외한 모든 군에서 현저히 증가되었다($p<0.05$). 면역형광검사에서 고지질식이 고혈압군에서 혈관내막에서 LOX-1의 발현 증가를 확인할 수 있었다.

결론: 고혈압과 고지혈증 동물모델에서 혈중 저밀도 지단백질의 증가와 혈관조직에서 TRX와 LOX-1의 발현의 증가를 확인할 수 있었으나, 동맥경화반의 형성은 확인하지 못하였다.

References

1. Ogura S, Kakino A, Sato Y, Fujita Y, Iwamoto S, Otsui K, et al. Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction. *Circ J*. 2009;73:1993-9.
2. Kang BY, Hu C, Prayaga S, Khaidakov M, Sawamura T, Seung KB, et al. LOX-1 dependent overexpression of immunoglobulins in cardiomyocytes in response to angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379:395-9.
3. Navarra T, Del Turco S, Berti S, Basta G. The lectin-like

- oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and its soluble form: cardiovascular implications. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:317-31.
4. Kume N, Kita T. Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1 and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res*. 2004;94:269-70.
5. Koharyova M, Kolarova M. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys*. 2008;27:71-84.
6. Hofnagel O, Luechtenborg B, Stolle K, Lorkowski S, Eschert H, Plenz G, et al. Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1789-95.
7. Li DY, Chen HJ, Staples ED, Ozaki K, Annex B, Singh BK, et al. Oxidized low-density lipoprotein receptor LOX-1 and apoptosis in human atherosclerotic lesions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2002;7:147-53.
8. Nowicki M, Muller K, Serke H, Kosacka J, Vilser C, Ricken A, et al. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)-induced cell death in dorsal root ganglion cell cultures depends not on the lectin-like oxLDL receptor-1 but on the toll-like receptor-4. *J Neurosci Res*. 2010;88:403-12.
9. Tanigawa H, Miura S, Zhang B, Uehara Y, Matsuo Y, Fujino M, et al. Low-density lipoprotein oxidized to various degrees activates ERK1/2 through Lox-1. *Atherosclerosis*. 2006;188:245-50.
10. Kanata S, Akagi M, Nishimura S, Hayakawa S, Yoshida K, Sawamura T, et al. Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348:1003-10.
11. Fujita Y, Kakino A, Nishimichi N, Yamaguchi S, Sato Y, Machida S, et al. Oxidized LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects. *Clin Chem*. 2009;55:285-94.
12. Li D, Mehta JL. Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis. *Circ Res*. 2009;104:566-8.
13. Takaya T, Wada H, Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takanabe-Mori R, et al. Left ventricular expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in failing rat hearts. *Circ J*. 2010;74:723-9.
14. Chen J, Hui ST, Couto FM, Mungrue IN, Davis DB, Attie AD, et al. Thioredoxin-interacting protein deficiency in-

- duces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes. *FASEB J.* 2008;22:3581-94.
15. Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Akita Y, Samuel SM, Otani H, et al. Thioredoxin 1 enhances neovascularization and reduces ventricular remodeling during chronic myocardial infarction: a study using thioredoxin 1 transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:239-47.
 16. Soejima H, Suefuji H, Miyamoto S, Kajiwaram I, Kojima S, Hokamaki J, et al. Increased plasma thioredoxin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 2003; 26:583-7.
 17. Malik G, Gorbounov N, Das S, Gurusamy N, Otani H, Maulik N, et al. Ischemic preconditioning triggers nuclear translocation of thioredoxin and its interaction with Ref-1 potentiating a survival signal through the PI-3-kinase-Akt pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:2101-9.
 18. Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Blanco-Colio LM, Dejouvencel T, Madrigal-Matute J, Ramos-Mozo P, et al. Increased levels of thioredoxin in patients with abdominal aortic aneurysms (AAAs). A potential link of oxidative stress with AAA evolution. *Atherosclerosis.* 2010;212:333-8.
 19. Park KJ, Kim YJ, Choi EJ, Park NK, Kim GH, Kim SM, et al. Expression pattern of the thioredoxin system in human endothelial progenitor cells and endothelial cells under hypoxic injury. *Korean Circ J.* 2010;40:651-8.
 20. Chinellato A, Ragazzi E, Petrelli L, Paro M, Mironov A, Aliev G. Effect of cholesterol-supplemented diet in heritable hyperlipidemic Yoshida rats: functional and morphological characterization of thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1994;106:51-63.