

# 고콜레스테롤혈증 가토의 죽상경화성 병변에서 Interleukin-6와 Interleukin-18의 변화 및 Matrix Metalloproteinase-9과 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2의 발현

권 영 무\* · 김 성 숙\*\* · 장 봉 현\*\*\*

=Abstract=

## Expressions of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 with Changes of Interleukin-6 and Interleukin-18 in Atherosclerotic Lesions of Hypercholesterolemic Rabbits

Young Moo Kwon, M.D.\*, Sung Sook Kim, M.D.\*\*, Bong Hyun Chang, M.D.\*\*\*

**Background:** Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall characterized by progressive accumulation of lipids, cells, and extracellular matrix. Matrix metalloproteinases(MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs) contribute to vascular matrix remodeling in atherosclerosis, and some cytokines may play role in the synthesis or activation of MMPs or TIMPs. **Material and Method:** We produced experimental atherosclerotic plaques in 9 rabbits by atherogenic hypercholesterol diet for 12 weeks, and 10 other rabbits were used as control group with standard laboratory chow. At that time, 19 rabbits were sacrificed and aorta, coronary arteries and blood specimens were prepared. The expressions of MMP-9, TIMP-2 and interleukin(IL)-18, and the bioactivity of IL-6 were investigated with H&E stain, immunohistochemical stain, immunoblotting(Western blot analysis), and bioassay. **Result:** Serum cholesterol in the experimental group increased up to  $1258 \pm 262$  mg/dL(control group:  $41 \pm 7$  mg/dL). All experimental group showed well-developed atherosclerotic plaques in aorta and coronary artery. The expression of MMP-9 in aorta and coronary artery of the experimental group showed significant increase than that of the control group by immunohistochemistry. Among the experimental group, complicated lesions with intimal rupture or complete luminal occlusion, demonstrated stronger expression of MMP-9. Interestingly, there was no difference in expression of TIMP-2

---

\*동국대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Dongguk University

\*\*울산대학교 의과대학 병리학교실

Department of Pathology, School of Medicine, Ulsan University

\*\*\*경북대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Kyungpook National University

† 본 논문은 경북대학교 대학원 흉부외과학교실의 2002년도 2월 박사학위 논문임.

논문접수일 : 2002년 4월 23일 심사통과일 : 2002년 6월 3일

책임저자 : 권영무(790-052) 경북 포항시 북구 죽도2동 646-1번지, 동국대학 포항병원 흉부외과. (Tel) 054-288-2127, (Fax) 054-273-0049

E-mail : thora@medimail.co.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

between the experimental and the control group. These findings were confirmed by Western blot analysis. The bioassay revealed significant up-regulation of serum bioactivity of IL-6 in the experimental group( $4819.60 \pm 2021.25$  IU/ml) compared to that of IL-6 in the control group( $27.20 \pm 12.19$  IU/ml). IL-18 was expressed in all atherosclerotic plaques, whereas little or no expression was detected in the control group. **Conclusion:** The increased MMP-9 expression along with the unchanged TIMP-2 expression seem to be contributory factors in extracellular matrix degradation in atherosclerosis. Focal overexpression of MMP-9 may promote plaque destabilization and cause complications of atherosclerotic plaques such as thrombosis with/without acute coronary syndrome. Elevation of IL-6 and IL-18 may be more than just markers of atherosclerosis but actual participants in lesion development. Identification of critical regulatory pathway is important to improve the understanding of the cellular and molecular basis of atherosclerosis and may open the way for novel therapeutic strategies.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2002;35:407-19)

**Key words :** 1. Atherosclerosis  
2. Cholesterol  
3. Interleukin

## 서 론

대부분의 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)의 분해는 proteinases에 의하여 이루어진다. 그 중 matrix metalloproteinases(MMPs)는 주로 종양의 성장과 전이, 신생혈관생성, 조직 재생, 염증 등과 관련하여 연구되어 왔다<sup>1)</sup>. 최근에는 죽상경화증, 급성관상동맥증후군, 심부전 등의 심혈관 질환에서 MMPs 및 그 억제자(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)에 관한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다<sup>2,7)</sup>. 우리나라에서도 식생활을 비롯한 생활 습관들의 변화로 죽상경화증이나 이로 인한 허혈성 심질환은 발생빈도가 증가하고 있는 추세이지만, 이런 질환들에 대한 MMPs나 TIMPs에 의한 조직 손상과 재모델링, 그리고 MMPs나 TIMPs의 유도 물질에 대한 역할과 cascade 등이 확실하게 규명되지 않은 단계에 있다.

죽상경화반(atherosclerotic plaque)이 형성되는 과정에서 일어나는 최초의 현상은 혈액 내에서 순환하는 단핵세포(monocytes)가 혈관의 내피(endothelium)에 부착하는 것이다. 이 단핵세포들이 내막하(subintima)로 들어가게 되면, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), platelet-derived growth factor(PDRF), interleukins(ILs)과 같은 다양한 성장 인자(growth factors)와 cytokines의 분비 등을 포함한, 복잡한 세포-세포간의 상호작용이 오랜 기간에 걸쳐 일어나며, TNF- $\alpha$ , PDRF, ILs는 평활근세포나 대식세포(macrophages)가 MMPs를 합성하도록 자극하게 된다<sup>3)</sup>. 비활성 형태로 분비된 MMPs는 세포 밖에서 활

성화 과정을 거친 후 ECM을 분해하게 되며, 이러한 작용은 조직에서 자체적으로 분비되는 억제자, TIMPs에 의하여 조절된다.

MMPs에는 MMP-1(interstitial collagenase), MMP-2(72kDa type IV collagenase, gelatinase A), MMP-3(stromelysin 1), MMP-7, MMP-8, MMP-9(92kDa type IV collagenase, gelatinase B), MMP-10(stromelysin 2), MMP-11(stromelysin 3), MMP-12(metalloelastase, macrophage elastase), membrane type MMP(MT-MMP), MMP-13, MMP-14 등 약 20여 종의 효소가 발견되었으며, TIMPs에는 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4로 현재까지 네 종류가 알려져 있다<sup>2,11)</sup>. MMPs의 종류 중 gelatinases(MMP-2, MMP-9)는 기저막의 주요 구성성분인 type IV collagen을 분해한다. 그러므로 gelatinases는 죽상경화증의 병인론(pathogenesis)에서 경화반을 형성하는 과정인 평활근세포의 이동 및 증식에 첫 장벽인 기저막을 없애는 데 결정적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 또한 MMP-9은 type IV, V, XI collagen과 gelatin을 분해할 뿐만 아니라, 죽상경화성 병변에 존재하지만 MMP-1과 MMP-3에는 분해되지 않는 proteoglycan과 elastin까지 분해할 수 있다<sup>2)</sup>.

MMPs의 synthesis를 유도하는 물질 중 하나로 알려진 IL-6는 활성화된 대식세포, lymphocytes, 평활근세포 등에서 분비되며, cell의 증식(proliferation)과 분화(differentiation)에 관여하며, 죽상경화증에서도 여러 가지 metabolic, endothelial, coagulant mechanism을 통하여 핵심적인 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다<sup>13)</sup>. 또한 염증반응의 중요 매개체로 최근 보고된 IL-18은 죽상경화증의 발생은 물론 죽상경화반의 구성성분 중 평활근세포와 collagen content를 감소시킴으로써 죽상

경화반의 파열과 혈전증을 일으킬 수 있는 것으로 보고되었다<sup>14)</sup>.

현재까지의 연구 결과, 죽상경화성 병변에서 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12의 증가된 발현에 관한 보고들이 있으며, TIMP의 발현에 관한 보고는 보고자에 따라 그 결과가 엇갈리고 있다<sup>3,6,8,15,16)</sup>. 또한 cytokines나 성장 인자 등이 MMPs나 TIMPs의 분비에 관련된다는 보고가 있지만<sup>10)</sup> 정확한 작용기전이나 역할은 현재까지 연구 단계에 있다.

이에 저자들은 토끼에게 고콜레스테롤 식이를 투여하여 죽상경화성 병변을 실험적으로 유도하고, 대동맥과 관상동맥의 죽상경화반에서 MMP-9과 그 억제자인 TIMP-2의 발현을 면역조직화학 염색과 immunoblotting(Western blot analysis)의 방법으로 알아보고자 하였다. 또한 MMPs나 TIMPs를 유도하거나 활성화시키는 물질 중 현재까지 연구가 거의 없었던 IL-6와 IL-18에 대하여 각각 생물학적 활성도와 면역조직화학 염색으로 조사하였다. MMPs와 TIMPs 및 IL-6와 IL-18에 대한 연구는 죽상경화증의 세포, 분자 단계의 병리기전에 대한 이해와, 죽상경화반의 파열로 인해 발생하는 관상동맥의 혈전증 등을 이해하는데 중요한 단서가 될 수 있을 것이며, 또한 죽상경화증이나 그 합병증을 치료, 또는 최소화시키는 지침을 마련하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상 및 조직 채취

#### 1) 연구 동물

연구 동물은 체중 2.0~2.5kg의 뉴질랜드산 수토끼(male New Zealand white rabbits)를 사용하였다. 12주 동안 실험군(experimental group)에게는 1% 콜레스테롤 사료(Oriental Yeast Co, Ltd, Japan)를 투여하였고, 대조군(control group)에게는 일반 사료를 투여하였으며, 각각 10마리의 동물을 사용하였다. 사육 8주째에 실험군의 1마리가 사망하였다.

#### 2) 혈액 및 조직 채취

12주간 사육 후 귀정맥에서 혈액을 채취하였으며, 경추 탈구로 희생시킨 후 정중흉골절개를 시행하여 심장과 대동맥을 분리하였다. 분리 즉시 조직을 둘로 나누어, 반은 immunoblotting을 위하여 영하 80℃에서 얼리고, 나머지는 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)용액에 24시간 고정 후 에탄올로 탈수하여 파라핀으로 포매하였다. 파라핀에 포매된 조직은 5 $\mu$ m의 두께로 절편을 만들어 hematoxylin-eosin(H&E) 염색과 면역조직화학 염색에 사용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 측정

고콜레스테롤 사료를 먹인 실험군과 일반 사료를 먹인 대조군에서 혈액을 채취한 직후, 혈청을 분리하여 Hidachi 자동 생화학측정기를 이용하여 비색법으로 측정하였다.

#### 2) 광학현미경 검사 및 대동맥 내막의 두께 측정

파라핀에 포매된 조직을 조직절편기를 이용하여 5 $\mu$ m 두께로 절편을 만든 후, H&E 염색하여 광학현미경으로 동맥의 변화와 합병증의 발생을 관찰하였다. 대동맥 내막의 두께는 image analysis system(Olympus, Image-Pro plus system)을 이용하여 측정하였다.

#### 3) 면역조직화학 염색

죽상경화성 병변에서 MMP-9, TIMP-2, IL-18의 발현을 보기 위해 avidin-biotin complex 방법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다. 파라핀에 포매된 조직으로부터 얻은 5 $\mu$ m 절편을 대상으로, 탈파라핀과 합수(hydration) 과정을 거친 후, 비특이적인 단백질의 결합을 막기 위해 10% 산양 혈청으로 30분간 반응시켰다. 그리고 조직내 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3% 과산화수소를 처리한 다음 일차 항체를 도포하고, MMP-9과 TIMP-2의 검사를 위한 경우는 실온에서 2시간 처리하였고, IL-18의 검사를 위한 경우는 4℃에서 overnight시켰다. MMP-9에 대한 일차 항체는 Calbiochem(San Diego, CA, USA) 회사에서 제조한 anti MMP-9 mouse monoclonal antibody를 사용하였고, TIMP-2에 대한 일차 항체는 한효 생명과학 연구소(대전, 한국)에서 제조한 anti TIMP-2 mouse monoclonal antibody를 사용하였으며, IL-18에 대한 일차 항체는 생명공학 연구소(대전, 한국)에서 제조한 anti IL-18 mouse monoclonal antibody를 사용하였다. Phosphate buffered saline(PBS)으로 수세한 후, biotin이 결합된 이차 항체에 30분간 반응시키고 PBS로 수세하였으며, streptavidin-peroxidase complex에 30분간 반응시킨 후 다시 수세하였다. 발색 정도에 따라 2분에서 10분까지 기다린 후 증류수로 수세하고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색하였다. 이차 항체(biotinylated secondary anti-mouse IgG antibody), 스트렙타비딘-과산화효소 결합체(streptavidin-peroxidase complex), 기질(diaminobenzidine, DAB)은 Dako(Carpinteria, CA, USA) 회사의 kit를 사용하여 염색하였다. 면역조직화학 염색의 결과는 Olympus BH-2 현미경과 부착되어 있는 image analysis system (Olympus, Image-Proplus system)을 이용하여, 두 명의 숙달된 병리학 전문의의 일치된 소견으로 판독하였다. 발현 정도에 대한 구분은 발현되지 않거나 비특이적인 발현을 보인 경우를 grade 0, 미만성으로 약한 발현을 보이거나 국소적으로 강한 발현을 보인 경우를 grade 1, 미만성으로 강한 발현을 나타내는 경우를

grade 2로 하였다.

#### 4) Immunoblotting

MMP-9과 TIMP-2의 면역반응을 보기 위한 immunoblotting (Western blot analysis)은 조직 채취의 어려움으로 관상동맥에서는 시행하지 못하고 대동맥에서만 시행하였으며, 얼려놓은 각 군 조직의 단백질을 추출물의 상층액을 SDS-PAGE에 주입한 후 전기영동하였다. 냉동된 대조군과 실험군의 조직을 protease와 phosphatase를 포함한 4배의 sonication 완충용액 (20mmol Tris-HCl, pH 7.4, 2mmol EGTA, 6mmol beta-mercaptoethanol, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50mmol NaF, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 1mmol phenylmethylsulfonyl fluoride)에 각각 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 polytron homogenizer로 균일하게 분쇄한 다음, 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford 방법으로 정량하였다<sup>17)</sup>. 추출된 단백질을 50 $\mu$ g을 NuPAGE LDS sample buffer(NP0007, Novex, San Diego, CA, USA)와 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 가온하고, 25 $\mu$ l를 4~12% NuPAGE Bis-tris polyacrylamide gel(Novex, San Diego, CA, USA)에서 전압 100V로 2시간동안 전기영동시켰다. 전기영동된 NuPAGE transfer buffer(NP0006, Novex, San Diego, CA, USA)를 이용하여 전압 30V로 10 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 nitrocellulose membrane(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 옮겼다. 전기이동된 nitrocellulose membrane을 1% blocking buffer와 12시간 반응시킨 후 MMP-9과 TIMP-2에 대한 일차 항체로 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 수세 후 과산화효소와 결합된 이차 항체로 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence substrate(Amersham, Arlington Heights, USA)를 이용하여 발색하였다.

#### 5) 생물학적 활성도 측정(bioassay)

혈청의 IL-6의 생물학적 활성도를 측정하기 위해 IL-6 dependent murine hybridoma subclone B9.55 cell line을 사용하였으며, 이 세포 주는 다른 cytokines에는 반응하지 않는 특성을 갖는다. B9.55 세포(5 $\times$ 103/well)를 96-well flat bottom microfilter 배지 평판에 분주하고, RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, NY) 100 $\mu$ l와 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum) 100 $\mu$ l를 첨가하였고, 단계적으로 희석된( $\times$ 5) 표본 혈청 100 $\mu$ l씩 첨가하였다. 배지 평판은 습도가 잘 유지되는 37 $^{\circ}$ C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양한 후, 0.5  $\mu$ Ci, <sup>3</sup>H-thymidine(specific activity: 84.8Ci/mmol, New England Nuclear)을 첨가하여 최소 6시간 배양하였다. 자동 세포 분주기(automated cell harvester, Inotech)를 이용하여 B9.55 세포를 glass fiber paper에 옮긴 후, liquid scintillation counter

Table 1. Level of cholesterol and triglyceride

	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)
Control group(n=10)	41 $\pm$ 7	75 $\pm$ 49
Experimental group(n=9)	1258 $\pm$ 262*	180 $\pm$ 86*

\* p < 0.05 vs control

(Beckman, LS 6000A, Nyon, Swizerland)를 사용하여 DNA에 결합된 <sup>3</sup>H-thymidine의 정도를 측정하였다.

#### 6) 통계학적 분석

처리한 성적은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 유의성의 검정은 Fisher's exact test와 t-test를 이용하였으며, p값이 0.05보다 작을 때 유의하다고 인정하였다.

## 결 과

### 1. 혈청 콜레스테롤 및 중성지방 측정치

정상 식이를 투여한 대조군 10마리와 고콜레스테롤 식이를 투여한 실험군 10마리를 12주간 사육하는 동안 8주째에 실험군에서 한 마리가 사망하였다. 실험군의 혈청 콜레스테롤과 중성지방의 농도는 각각 1258 $\pm$ 262mg/dl, 180 $\pm$ 86mg/dl로서 대조군의 평균치 41 $\pm$ 7mg/dl, 75 $\pm$ 49mg/dl에 비해 유의하게 높았다(p<0.05, Table 1).

### 2. 광학현미경 관찰 소견

동맥의 내막에서는 많은 지방을 함유한 대식세포의 침윤과 평활근세포의 비대 및 증식이 관찰되었다(Fig. 1). 실험군의 대동맥 내막의 두께는 0.31 $\pm$ 0.1mm로 대조군의 0.01mm에 비해 유의하게 증가하였고(p<0.05), 최고 0.48mm로 대조군에 비해 약 50배까지 증가한 소견을 보였다(Table 2). 실험군 9마리 중 2마리에서는 내막 표면이 파열되어 퍼브린과 혈액 등의 응고체가 표면을 덮고 있는 소견이 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 출혈이나 파열 등의 소견을 보인 증례에서도 대동맥 내강의 감소(luminal narrowing)는 뚜렷하지 않았다. 실험군의 관상동맥에서도 죽상경화반의 형성이 미만성으로 관찰되었다(Fig. 2). 또한 대동맥에서는 뚜렷하지 않았던 내강의 감소가 관상동맥의 위치에 따라 차이가 있었지만 대부분의 경우에서 관찰되었다(Fig. 3). 혈관 주위의 심근에는 염증성 변화들이 관찰됨으로써 심근세포의 변성, 괴사 등을 시사하는 소견을 보였다.

Table 2. Intimal thickness of aorta

	Intimal thickness(mm)
Control group(n=10)	0.01 ± 0.00
Experimental group(n=9)	0.31 ± 0.10*

\* p < 0.05 vs control

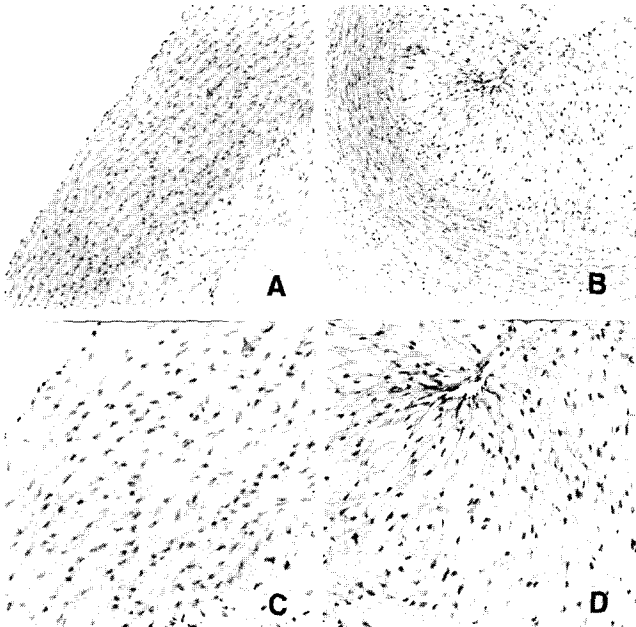


Fig. 1. Histopathology of the aorta. Atherosclerotic plaques with marked thickening of the intima in the experimental group (B, D), compared with the control group (A, C). Infiltration of abundant lipid-laden macrophages in high power view (D) (H&E A, B ×100; C, D ×200).

### 3. MMP-9의 발현

대동맥의 MMP-9은 실험군의 전에서 주로 두꺼워진 내막, 특히 섬유성 cap에서 강하게 발현되었으며, 지방을 함유하고 있는 대식세포의 세포질에서도 발현되었다(Fig. 4). 실험군에서의 발현 정도는 6예는 grade 1, 3예는 grade 2였다. 관상동맥에서 MMP-9의 발현은 대동맥에서의 발현과 유사한 소견으로 관찰되었으며(Fig. 5), 발현 정도는 grade 1이 7예, grade 2가 2예였다. 또한 내막의 일부가 파열되거나 내강의 폐쇄가 관찰되었던 예에서는 더욱 강한 MMP-9의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 대조군에서는 발현이 없거나 약하였으며, 대동맥에서의 발현은 grade 0이 7예, grade 1이 3예였으며, 관상동맥에서의 발현은 grade 0이 8예, grade 1이 2예였다. 대동맥과 관상동맥에서 MMP-9의 발현 정도는 실험군과 대조군 간에 유의한 차이를 보였다(P<0.05, Table 3).

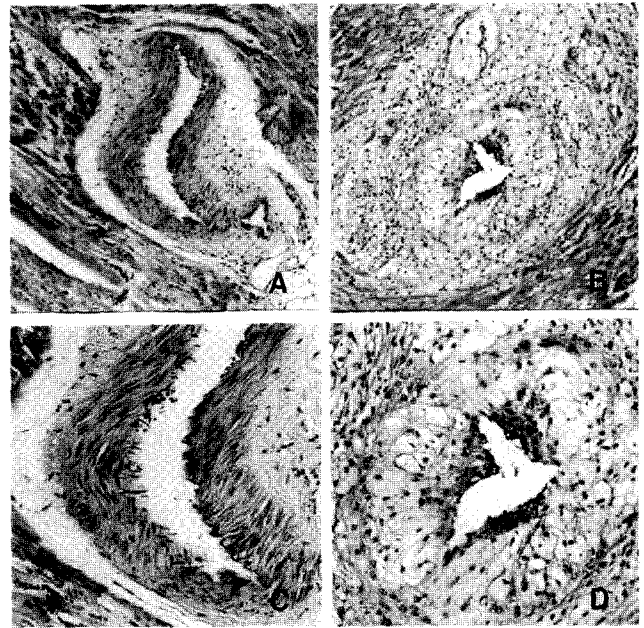


Fig. 2. Histopathology of the coronary artery. Intimal thickening and luminal narrowing in the experimental group (B, D), compared with the control group (A, C) (H&E A, B × 100; C, D ×200).

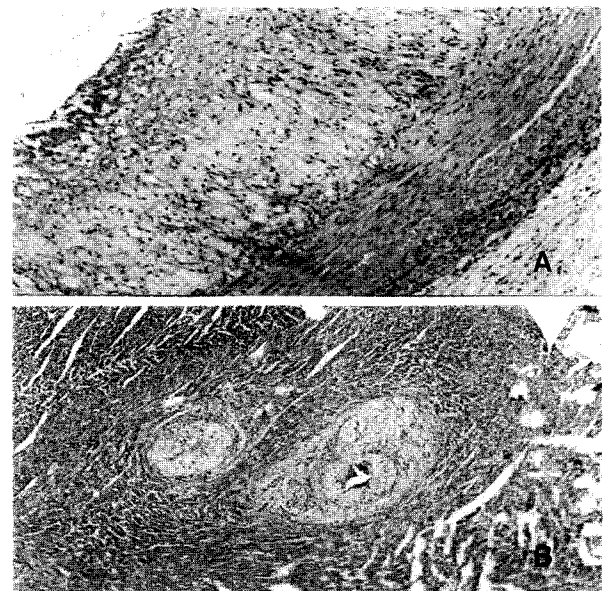


Fig. 3. Histopathology of complicated lesions. The intimal surface of the aorta covered with fibrin clots (black arrows) suggesting intimal rupture (A, H&E ×100) and luminal obstruction (white arrow) of the coronary artery (B, H&E ×40).

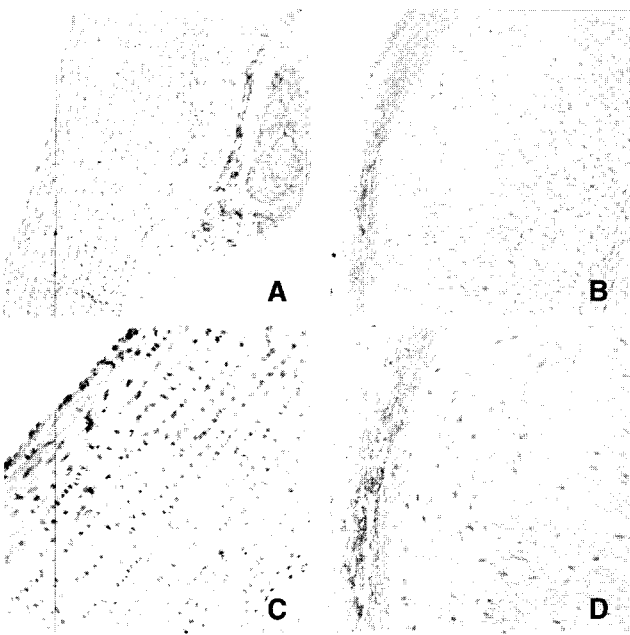


Fig. 4. Immunohistochemical staining of the aorta. Focal strong or diffuse weak expression (grade 1) of MMP-9 in the experimental group (B, D), and no expression of MMP-9 in the control group (A, C) (A, B  $\times 100$ ; C, D  $\times 200$ ).

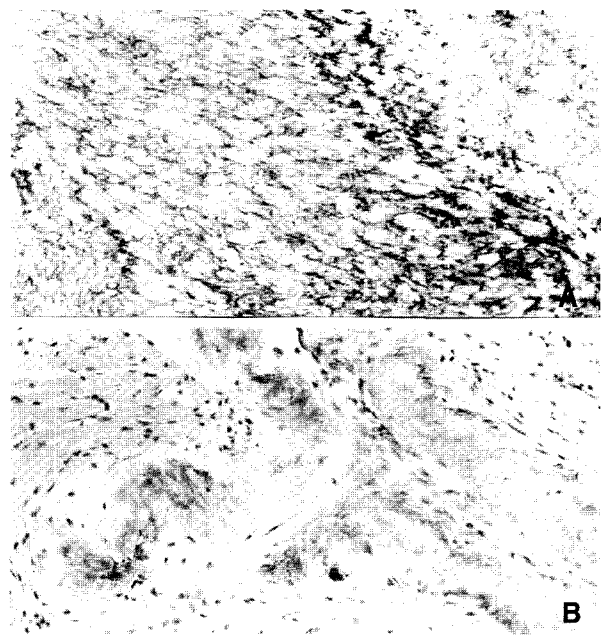


Fig. 6. Immunohistochemical staining of complicated lesions. Diffuse strong expression (grade 2) of MMP-9 in the aorta (A) and coronary artery (B) ( $\times 200$ ).

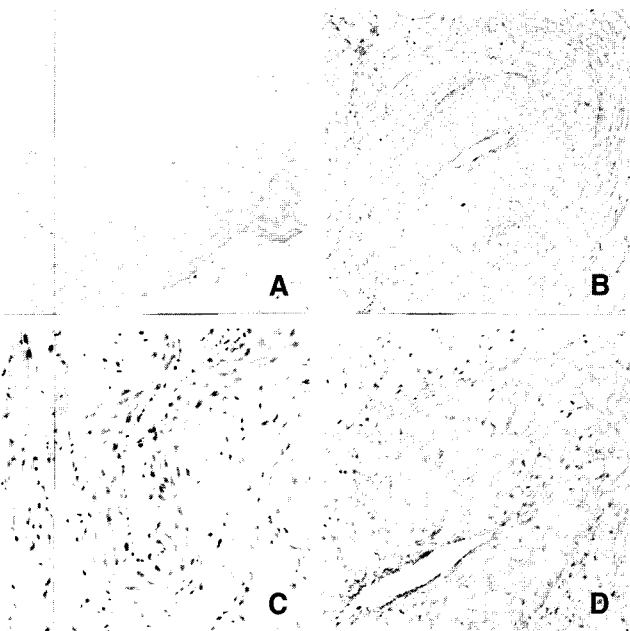


Fig. 5. Immunohistochemical staining of the coronary artery. Diffuse weak expression (grade 1) of MMP-9 in the experimental group (B, D), and no expression of MMP-9 in the control group (A, C) (A, B  $\times 100$ ; C, D  $\times 200$ ).

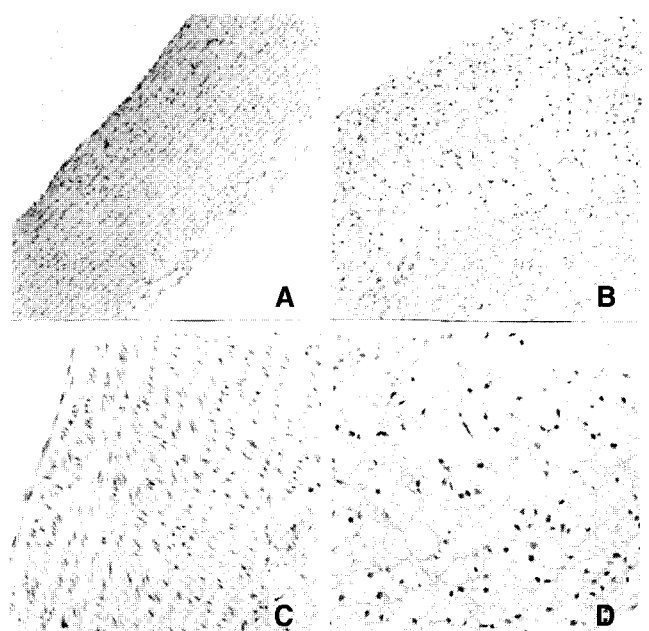


Fig. 7. Immunohistochemical staining of the aorta. No expression of TIMP-2 in the control group (A, C) and experimental group (B, D) (A, B  $\times 100$ ; C, D  $\times 200$ ).

**Table 3.** Expression of MMP-9 and TIMP-2

		MMP-9		TIMP-2	
		Aorta*	CA*	Aorta	CA
Control group(n=10)	Grade 0	7	8	7	8
	Grade 1	3	2	3	2
Experimental group(n=9)	Grade 0	0	0	7	8
	Grade 1	6	7	2	1
	Grade 2	3	2	0	0

MMP-9, matrix metalloproteinase-9; TIMP-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2; CA, coronary artery

Values are number of cases

\* p < 0.05; experimental vs control

4. TIMP-2의 발현

실험군에서 TIMP-2는 주로 결체조직에서 관찰되었으며 발현은 미약하였다. 실험군의 대동맥에서 2예, 관상동맥에서 1예가 grade 1으로 발현되었으며, 나머지는 grade 0였다. 대조군의 대동맥과 관상동맥에서 TIMP-2는 각각 1예에서 미약한 발현이 관찰되었고, 나머지는 모두 grade 0였다(Fig 7, 8). 합병증이 발생한 예에서 MMP-9은 강한 발현을 보였으나 TIMP-2는 강한 발현이 관찰되지 않았으며, 합병증 없이 MMP-9이 강하게 발현된 예에서도 TIMP-2의 발현은 없거나 미약하였다.

5. MMP-9과 TIMP-2의 immunoblotting

Western blot analysis에서 MMP-9이나 TIMP-2 모두 면역조직화학 염색 결과와 유사하게 관찰되었다. MMP-9은 실험군에서 대조군에 비해 보다 명확한 band를 확인할 수 있었고, TIMP-2는 실험군과 대조군 사이에 현저한 차이가 없이 미약한 발색을 보였다(Fig. 9).

6. IL-6의 생물학적 활성도

실험군과 대조군의 각 5예의 혈청에서 IL-6의 생물학적 활성도를 측정하였으며, 대조군은 27.20±12.19IU/ml, 실험군은 4819.60±2021.25IU/ml로서, 실험군에서 유의하게 증가하였다 (p<0.05, Table 4).

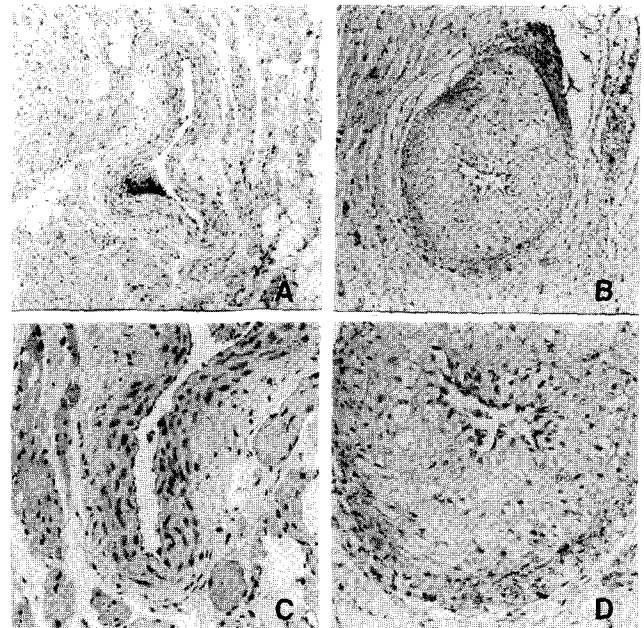
7. IL-18의 발현

IL-18의 면역조직화학 염색에서는 실험군에서는 전예에서 내막에서의 국소적인 강한 발현과, 지방을 함유한 대식세포의 세포막에서 미만성의 약한 발현을 관찰할 수 있었으며, 대조군에서는 발현을 보이지 않았다(Fig 10). 실험군 중에서

**Table 4.** Bioactivity of interleukin-6

	Bioactivity(IU/ml)
Control group(n=5)	27.20±12.19
Experimental group(n=5)	4819.60±2021.25*

\* p < 0.05 vs control



**Fig. 8.** Immunohistochemical staining of the coronary artery. Focal strong expression (grade 1) of TIMP-2 in connective tissue in the experimental group (B, D), and no expression of TIMP-2 in the control group (A, C) (A, B ×100; C, D ×200).

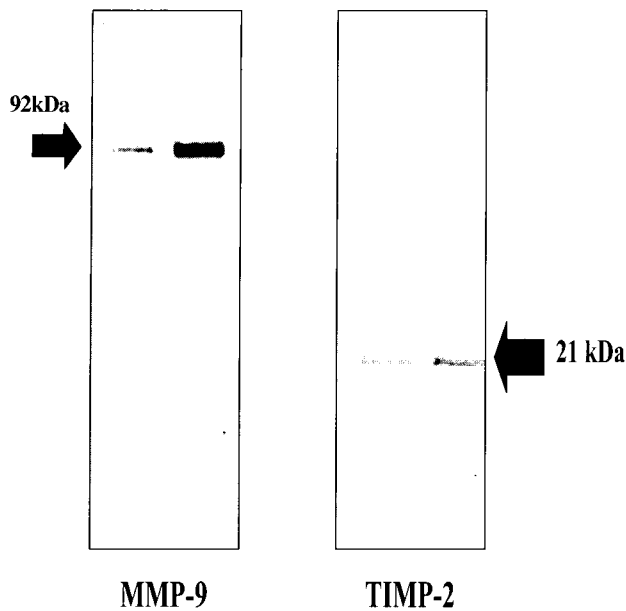


Fig. 9. Western blot analysis for MMP-9 and TIMP-2. Prominent band of MMP-9 in the experimental group compared with the control group (C), and no remarkable difference in the bands of TIMP-2 between two groups.

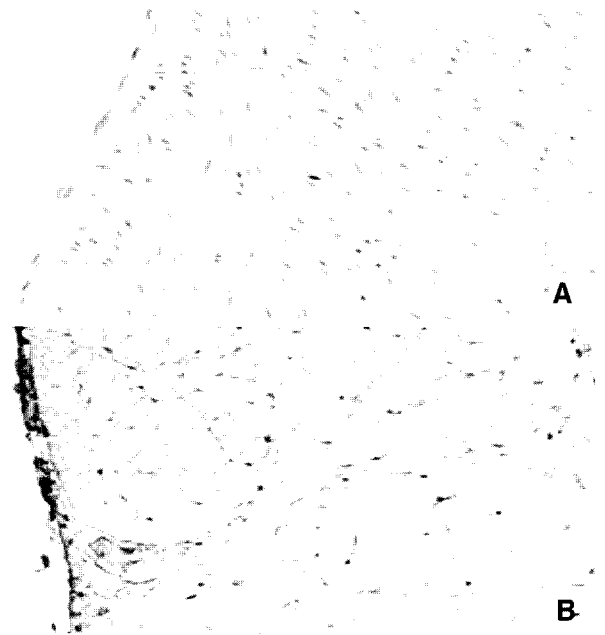


Fig. 10. Immunohistochemical staining of the aorta. Focal strong or diffuse weak expression (grade 1) of IL-18 in the experimental group (B), and no expression of IL-18 in the control group (A) (×200).

내막의 파열이나 내강의 폐쇄를 보였던 예에서도 발현 정도에는 차이가 없었으며, 대동맥과 관상동맥의 발현 역시 비슷한 소견을 보였다.

### 고찰

MMPs는 조직 내 collagen을 분해시키는 단백분해효소의 한 종류이며, organ morphogenesis, 창상의 치유, 염증, 종양의 전이 등과 같은 정상적인 또는 병리적인 상황에서 조직 재모델링에 중요한 역할을 담당한다.<sup>1,18~20</sup>. MMPs는 섬유모세포, 평활근세포, 대식세포, 혈관내피세포 등 여러 종류의 세포에서 분비되며, 심근세포에서도 합성되어 분비된다<sup>10,21,22</sup>. MMPs는 현재까지 약 20여 종이 알려져 있으며, MMP-1, -2, MMP-3와 같이 MMP에 숫자를 붙여 분류하는 것이 일반적이지만, 분해하는 기질의 특이성(substrate specificity)에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin, elastase 등으로 분류하거나, 분자량에 따라 55kDa(MMP-1), 57kDa(MMP-3), 72kDa(MMP-2), 92kDa(MMP-9) 등으로 분류하기도 한다<sup>8,21,23</sup>. MMPs는 proenzyme이나 zymogen과 같은 비활성 형태로 세포 밖으로 분비되며, MMPs의 활성화는 transcription, proenzyme의 활성화, TIMP에 의한 억제 또는 비활성화의 세 단계에서 엄격하게 조절된다<sup>3,20</sup>.

MMPs의 mRNA 단계의 조절에는 여러 가지 cytokines이나 성장 인자가 작용하며, ILs, TNF- $\alpha$ , PDGF 등은 MMPs의 합성을 유도 또는 자극하고, 반면에 heparin, corticosteroids, transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 등은 합성을 억제하는 작용을 한다<sup>3,24</sup>. 이러한 cytokines나 성장인자는 죽상경화증의 발생 과정에 관여하며 또한 죽상경화반의 파열 과정에도 중요한 매개체로서 역할을 한다<sup>3,12~14</sup>. 세포 내에서 MMP의 transcription을 유도하는 데에는 protein kinase C가 관여하는 것으로 보이며, 이러한 사실은 protein kinase C를 증가시키는 phorbol esters에 여러 세포체계들(several different cell systems)이 노출되었을 때 MMP mRNA의 발현이 증가되는 것으로 보아 알 수 있다<sup>18,25</sup>.

MMPs의 활성화 단계는 비활성 형태나 pro-MMP 형태로 세포에서 분비된 이후에 일어나게 된다. 그러므로 MMPs의 활성도를 조절하는 중요한 시기는 pro-MMPs의 단백분해 과정이다. MMP의 propeptide는 zinc 원자를 싸고있는 cysteine switch sequence를 가지고 있으며, MMP가 활성화되기 위해서는 propeptide sequence의 분리나, 화학적인 변태(perturbation)에 의한 cysteine switch 입체구조(conformation)의 변화를 통한 zinc-cysteine의 결합이 분리되어야 한다<sup>25</sup>. 일부 plasmin-independent pathways가 있지만, plasmin은 대부분의 MMPs의 활성화에 강력한 activator로 알려져 있다<sup>26</sup>.



세 번째 MMPs의 활성화도 조절의 단계는 활성화된 MMPs에 대한 억제이며, 이는 조직에서 자체적으로 분비되는 TIMPs에 의하여 이루어진다. 현재까지 네 종류가 밝혀진 TIMPs는 20~30kDa의 저분자량을 가진 단백질이며, 활성화된 MMPs와 complex를 형성함으로써, MMPs가 collagen substrate에 작용하지 못하게 한다<sup>11)</sup>.

MMPs가 활성화되면 죽상경화증의 두 가지 주된 병리적 특징을 일으키게 되는데, 그 첫째는 MMPs가 기저막을 분해 시킴으로써 평활근세포들이 혈관의 중막(tunica media)에서 내막(tunica intima)으로 이동하게 되며, 계속 증식하여 결국 진행된 경화반을 만들게 된다는 것이며, 둘째는 죽상경화반의 fibrous cap의 ECM을 분해함으로써 경화반의 불안정화(destabilization)를 유발하여 결국 경화반의 파열과 혈전증을 일으키게 된다는 것이다<sup>8)</sup>.

죽상경화성 병변이나 경화반의 파열에 의해 합병증이 발생한 병변에서 MMPs와 TIMPs의 발현이나 활성화도에 관한 연구들이 많이 보고되었다<sup>6,8,12,15,16,23)</sup>. Galis 등<sup>15)</sup>은 사람의 죽상경화성 병변에서 MMP-2, MMP-3, MMP-9의 세 종류의 MMP가 활성화된다고 보고하였다. Matsumoto 등<sup>8)</sup>은 가토의 죽상경화성 병변에서 MMP-12의 mRNA와 단백질 단계 모두 증가하였음을 보고하였다. 또한 MMP-12를 분비하는 주된 세포는 죽상경화성 병변이 있는 내막의 macrophage foam cell임을 관찰하였으며, MMP-12의 발현은 죽상경화증의 시작과 진행에 임계과정(critical step)일 수 있다고 하였다.

Rajavashisth 등<sup>23)</sup>은 사람의 죽상경화반에서 membrane type 1 MMP(MT1-MMP)의 발현과, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , oxidized LDL과 같은 proinflammatory mediators에 의해 MT1-MMP의 발현이 조절될 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서는, 면역조직화학 염색에서 MMP-9은 실험군의 전에서 grade 1 이상의 발현을 보여 대조군에 비해 유의하게 증가된 발현을 나타내었으며, immunoblotting으로 실험군에서 더욱 명확한 MMP-9의 band를 관찰함으로써 면역조직화학 염색의 결과를 확인할 수 있었다. Aikawa 등<sup>6)</sup>은 가토의 죽상경화반에서 MMP-1의 발현은 증가되었지만 TIMP-1은 과발현하지 않음(not overexpressed)을 관찰하였으며, 이러한 MMP와 TIMP의 불균형으로 인하여 collagen의 분해가 과도하게 일어난다고 하였다.

TIMPs는 현재까지 네 종류가 밝혀져 있지만 혈관조직에서는 TIMP-1, -2, TIMP-3의 세 종류가 분비되는 것으로 보고되었다<sup>11,15,27,28)</sup>. 죽상경화성 병변에서 TIMPs의 발현에 관한 보고는 MMPs에 비해 상대적으로 적으며, 서로 상반되는 결과를 보이기도 한다. Fabunmi 등<sup>28)</sup>은 가토의 대동맥의 평활근 세포에서 TIMP-1과 TIMP-2가 미약한 수준으로 발현한다고 하였고, Galis 등<sup>15)</sup>은 사람의 동맥을 대상으로 면역조직화학

염색을 시행한 연구에서 죽상경화성 조직이나 정상 조직에서 TIMP-1과 TIMP-2의 발현에 차이가 없다고 하였다. 그러나 Hasenstab 등<sup>29)</sup>은 경동맥에 풍선 손상(balloon injury)을 가한 쥐에서 TIMP-1은 변화가 없으나 TIMP-2는 증가한다고 하였고, Nikarri 등<sup>27)</sup>은 경동맥 내막절제술 후 재협착이 발생한 표본을 대상으로 연구하여, 재협착이 발생한 경동맥에서 면역활성화된 TIMP-1이 높은 수준으로 증가한다고 하였으며, Zaltsman 등<sup>16)</sup>은 가토의 대동맥의 죽상경화성 병변에서 TIMP-1과 TIMP-2의 분비가 증가한다고 하였다. 본 연구에서 TIMP-2는 실험군의 대동맥 병변 2예와 관상동맥 병변 1예에서 grade 1의 발현을 보였으나, 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다. 보고자에 따라 이렇게 TIMPs의 발현에 차이를 보이는 이유에 대해서 Nikkari 등<sup>27)</sup>은 TIMPs 항체의 감수성 차이를 제시하였고, Zaltsman 등<sup>16)</sup>은 병리 표본을 채취한 장소에 따르는 요인으로 설명하였다. 이러한 주장은, 재협착이 활발하게 일어나는 단계(active stage)에 있는 병변에서만 TIMPs의 증가를 관찰하였던 Nikkari 등<sup>27)</sup>의 보고와, 제일 병변이 심한 부위에서 채취한 조직에서 TIMP-1과 TIMP-2의 분비가 증가됨을 관찰한 Zaltsman 등<sup>16)</sup>의 보고로 보아 설득력을 가질 수 있을 것이다. 그러므로 TIMPs의 발현은 활발하게 진행하고 있는(actively evolving) 죽상경화반의 특징이라고 할 수 있을 것이다. 한편 Fabunmi 등<sup>12)</sup>은 사람의 죽상경화성 병변에 대한 연구에서 14예 중 12예에서 TIMP-1과 TIMP-2 뿐만 아니라 TIMP-3까지 발현이 증가됨을 관찰하였으며, 발현이 안된 2예는 사람의 죽상경화반의 이질성(heterogeneity of human atheroma)에 의한 것으로 설명하였다. 동물 모델이나 사람의 죽상경화반에서 TIMPs의 발현에 차이를 보이는 이유와 정확한 발현 양상에 대해서는 앞으로 더 많은 연구를 통하여 밝힐 필요가 있을 것으로 생각된다.

고콜레스테롤혈증에 의해 생긴 죽상경화성 병변은 대부분 불가피하게 발생하는 경화반의 파열에 의해 혈전을 형성하게 되며, 이로 인한 동맥 내강의 감소, 또는 폐쇄로 불안정성 협심증이나 심근경색과 같은 급성관상증후군을 유발하게 된다<sup>4,30)</sup>. 특히 fibrous cap이 얇고, collagen 함유량이 적으며, 큰 지방 중심부를 가지는(large lipid core) 병변들이 파열을 잘 일으키는 죽상경화반이며, 이렇게 지방을 많이 함유한 경화반에 대식세포의 침윤이 많을수록 치명적인 결과를 가져오게 된다<sup>3,4,31,32)</sup>. Shah 등<sup>33)</sup>은 대식세포가 죽상경화반의 fibrous cap에 존재하는 collagen의 파괴를 유도할 수 있음을 보여주었다. Loftus 등<sup>34)</sup>은 불안정성 경동맥 경화반에서 MMP-1, MMP-2, MMP-3와 달리 MMP-9이 유의하게 증가됨을 관찰하고, 경화반의 급성 파열은 다른 MMPs보다 MMP-9의 증가된 활성화도와 관계있다고 하였다. Aikawa 등<sup>6)</sup>은 가토를 모델로 한 실험을 통하여, MMPs의 과발현은 경화반의 fibrous cap의

collagen을 분해시킴으로써 경화반의 파열을 조장하며, lipid lowering diet로써 MMPs의 활성도를 감소시키는 것은 물론, 경화반에 collagen의 양을 증가시켜 경화반을 안정화시킬 수 있다고 하였다. 이와 같은 경화반 안정화의 분자적인 기전은 병변의 macrophage foam cells이나 T-lymphocytes를 활성화시키는 lipoprotein을 변형시켜 염증성 자극을 줄이는데 있다<sup>35</sup>. 경화반의 안정에는 MMPs와 TIMPs의 균형이 중요하며, 죽상경화반에서의 증가된 TIMPs는 MMPs의 활성도를 감소시켜 경화반의 안정에 기여할 수 있다<sup>4,6,12</sup>. 본 연구에서 MMP-9의 발현이 fibrous cap에서 강하게 발현된 점과, 내막의 일부에 파열이 발생한 증례에서 MMP-9이 미만성으로 더욱 강한 발현을 보인 점은 MMP-9의 발현이 fibrous cap에서의 ECM의 분해를 촉진함으로써 경화반의 파열을 유발할 수 있다는 Loftus 등<sup>34</sup>과 Aikawa<sup>6</sup> 등의 주장을 뒷받침하는 소견이라 할 것이다. 또한 MMP-9이 증가되었지만 TIMP-2가 보상적으로 증가하지 않은 점은 경화반의 파열에 상승효과를 나타내는 기여 인자로 작용하였을 것이다. 죽상경화반의 파열은 대부분이 fibrous cap의 가장자리인 어깨 부위(shoulder region)에서 일어나며, 이런 부위에는 대식세포, lymphocytes, 그리고 혈관의 평활근세포를 닮은 mast cells 등이 운집해 있다<sup>35-37</sup>.

죽상경화증은 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 같은 proinflammatory cytokines과, P-selectin 같은 soluble adhesion molecules와, C-reactive protein, plasminogen-activator inhibitor-1, fibrinogen과 같은 cytokines-responsive acute phase proteins의 증가로 특징 지워지는 만성 염증성 질환이다<sup>41</sup>. 염증세포들이 활성화되면 주변의 세포들을 자극하여, 그 세포들이 inflammatory cytokines를 분비하여 ECM을 분해하도록 한다<sup>32</sup>. IL-1, -6, -12, -18, TNF- $\alpha$  등 여러 종류의 cytokines이 ECM의 분해에 관여하는 MMPs나 TIMPs의 합성이나 활성화 과정에 관여하는 것으로 보고되어 있다<sup>3,4,12,14,36-39</sup>.

IL-6는 20kDa polypeptide cytokines 가계(family)에 속하며, B-lymphocytes와 T-lymphocytes의 증식과 분화에 관여하며, 대식세포, 단핵세포, T-cell, 내피세포, 섬유모세포, 평활근세포 등에서 분비된다<sup>39</sup>. Huber 등<sup>39</sup>은 쥐를 대상으로 IL-6의 자극으로 죽상경화증이 유발되는지를 연구하여 IL-6가 병변 발생의 초기 과정에 직접 관여하며, 혈중의 IL-6의 증가는 죽상경화증에 대한 표지자로 사용할 수 있다고 하였다. Schieffer 등<sup>36</sup>은 사람의 죽상경화반의 대식세포와 평활근세포를 대상으로 연구하여, angiotensin II가 IL-6의 transcription과 단백질 합성을 유도함을 보여주었고, 경화반의 파열이 잘 발생하는 어깨 부위에서 대식세포가 많이 모여있는 소견과 함께 angiotensin-II와 IL-6가 발현됨을 관찰하여, 이는 경화반의 불안정성과 관계가 있음을 시사한다고 하였다.

IL-18은 IL-1의 가계에 속하며, 처음에는 endotoxin-induced

serum factor로 기술되었으며, interferon- $\gamma$ 나 TNF- $\alpha$  등을 생산하도록 자극한다<sup>44</sup>. Mallat 등<sup>14</sup>은 Western blot analysis로 사람의 경동맥의 죽상경화반에서 IL-18이 높게 발현되며, 정상 혈관에서는 거의 발현되지 않음을 처음으로 밝혀 보고하였다. 그리고 뇌졸중 증상의 유무에 따라 불안정성 경화반과 안정성 경화반으로 구분하여 IL-18 mRNA의 transcription에 대한 발현을 조사하여, 불안정성 경화반에서 유의하게 높은 발현을 관찰하였으며, 또한 불안정성 경화반의 특징적인 소견인 궤양(ulceration)이 동반된 경화반에서 IL-18이 유의하게 증가된 소견을 관찰하여, IL-18의 발현은 경화반의 불안정성과 관련이 있다고 하였다. Galis 등<sup>38</sup>은 사람의 혈관의 평활근세포를 대상으로 한 시험관내실험(in vitro)을 통하여, IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 자극에 의해 MMP-1, -3, MMP-9이 발현됨과 MMPs를 분비하는 세포들이 활성화된 형태의 MMPs를 분비함을 보고하였다. 또한 IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 의 자극에 의해 TIMPs는 영향을 받지 않음으로 해서, 이러한 cytokines는 MMPs와 TIMPs의 균형을 변화시켜 결과적으로 혈관의 ECM의 분해를 촉진시킨다고 하였다. Fabunmi 등<sup>12</sup>은 cytokines이 TIMPs에 미치는 영향을 연구하여 PDGF와 TGF- $\beta$ 에 의해 TIMP-1과 TIMP-3는 증가되고 TIMP-2는 영향을 받지 않음을 관찰하였으며, 이러한 cytokines에 의한 TIMPs 발현의 조절은 경화반의 안정성에 영향을 미친다고 하였다.

본 연구에서는 현재까지 보고가 없었던 IL-6와 IL-18에 대하여 MMPs와 TIMPs에 미치는 영향을 조사하였다. IL-6에 대해서는 혈청에서의 생물학적 활성도를 조사하였으며, IL-18에 대해서는 면역조직화학 염색에 의한 발현을 조사하였다. 실험군과 대조군의 각 5예에서 시행한 IL-6의 생물학적 활성도 검사에서 실험군은  $4819.60 \pm 2021.25$  IU/ml, 대조군은  $27.20 \pm 12.19$  IU/ml로서 실험군에서 유의하게 증가하였다. 면역조직화학 염색에 의한 IL-18의 발현은 실험군의 전예에서 grade 1의 발현을 보였으며 대조군에서는 발현을 보이지 않았다. IL-6의 활성도 증가 및 IL-18의 증가된 발현의 결과는 IL-6나 IL-18이 죽상경화증에 활발히 관여함을 나타내는 것이며, 본 실험에서는 죽상경화성 병변에서 MMP-9의 합성이나 발현을 유도하였을 것으로 생각된다. 또한 죽상경화성 병변에서 TIMP-2의 발현은 변화가 없는 것으로 보아 IL-6와 IL-18이 TIMP-2의 발현과는 무관한 것으로 보인다.

MMP나 TIMP, 또는 IL-6와 IL-18은 혈청에서도 측정이 가능하므로, 죽상경화증 환자의 예후나 치료 경과 등을 추정할 수 있는 지표로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 죽상경화증과 관계된 여러 종류의 MMP나 TIMP, 그리고 cytokines의 역할과 작용에 대한 세포, 분자적인 기전을 밝힌다면, MMPs를 억제하거나 TIMPs를 활성화시키는 물질, 합성 TIMPs, 또는 IL-6와 IL-18에 대한 억제제 등의 치료제를

개발하는 데에도 응용할 수 있을 것이다. Galis 등<sup>42)</sup>은 N-acetyl-cysteine이 대식구의 세포외 기질을 분해시키는 능력을 저해하는 물질로서, 항산화제를 촉진시키는 치료제로 개발할 수 있을 것으로 보고한 바 있다.

저자는 본 연구를 통하여 고콜레스테롤혈증에 의해 야기된 가토의 죽상경화성 병변에서 IL-6와 IL-18의 증가, 그리고 MMP-9의 증가와 TIMP-2의 무변화 등을 확인하였고, 이러한 소견들이 죽상경화증과 죽상경화반의 파열에 병리적인 역할을 담당함을 알 수 있었으며, 본 연구를 토대로 새로운 치료의 개념과 방법들을 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

저자들은 고콜레스테롤 식이를 투여하여 죽상경화증을 유발시킨 가토의 대동맥과 관상동맥의 죽상경화반에서 IL-6와 IL-18의 변화 및 MMP-9, TIMP-2의 발현을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 죽상경화반에서 MMP-9의 발현은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며, TIMP-2는 대조군에 비하여 별 차이가 없었다. 이로 인한 MMP/TIMP의 불균형은 죽상경화성 병변에서 세포외 기질의 분해와 경화반의 불안정화를 촉진시킬 수 있는 것으로 보이며, 내막의 파열이 관찰된 병변에서의 더욱 증가된 MMP-9은 경화반의 파열과 관계 있는 것으로 생각된다.
2. 혈청에서의 IL-6의 생물학적 활성도의 증가 및 죽상경화성 병변에서의 IL-18의 증가된 발현은 IL-6와 IL-18이 MMP-9의 분비 또는 활성화에 관여하여 죽상경화증의 진행과 경화반의 불안정성 등에 활발히 참여하는 cytokines임을 시사하는 소견으로 보인다.
3. 이러한 연구는 죽상경화증의 세포, 분자 단계의 병리기전과 죽상경화반의 파열로 발생하는 관상동맥의 혈전증 등을 이해하는 데 중요한 단서가 될 수 있을 것이며, 더 많은 연구를 추가한다면 죽상경화증이나 그 합병증을 치료, 또는 최소화시키는 지침을 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. Khokha R, Denhardt DT. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion.* Invasion Metastasis 1989;9:391-405.
2. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. *Identification of 92-kDa gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions; association of active enzyme*

- synthesis with unstable angina.* Circulation 1995;91:2125-31.
3. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. *Matrix metalloproteinase and cardiovascular disease.* Circ Res 1995;77:863-8.
4. Falk E, Shah PK, Fuster V. *Coronary plaque disruption.* Circulation 1995;92:657-71.
5. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebban L. *Time dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function.* Circ Res 1998;82:482-95.
6. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, et al. *Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinases activity and increases collagen content of rabbit atheroma. a potential mechanism of lesion stabilization.* Circulation 1998;97:2433-44.
7. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. *Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart.* Circulation 1998;98:1728-34.
8. Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, et al. *Expression and Localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development.* Am J Pathol 1998;153:109-19.
9. Alexander CM, Werb Z. *Proteinases and extracellular matrix remodelling.* Curr Opin Cell Biol 1989;1:974-82.
10. Herron GS, Werb Z, Dwyer K, Banda MJ. *Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. 1. Production of procollagenases and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity.* J Biol Chem 1986;261:2810-3.
11. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. *Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4.* J Biol Chem 1996;271:30375-80.
12. Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P. *Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability.* Circ Res 1998;83:270-8.
13. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* Atherosclerosis 2000;148:209-14.
14. Mallat J, Corbaz A, Scoazec A, et al. *Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque stability.* Circulation 2001;104:1598-603.
15. Galis ZS, Sukhova GK, Lark M, Libby P. *Increased expression of matrix metalloproteinase and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.* J Clin Invest 1994;94:2493-503.
16. Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. *Increased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 from the aorta of cholesterol fed rabbits partially counterbalances increased metalloproteinase activity.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1700-7.

17. Kruger NJ. *The Bradford method for protein quantitation.* Methods Mol Biol 1994;32:9-15.
18. Rees RC, Cottam DW. *Regulation of the matrix metalloproteinases: their role in tumor invasion and metastasis.* Int J Oncol 1993;2:861-72.
19. Agren MS, Taplin CJ, Woessner Jr. JF, Earlstein WH, Mertz PM. *Collagenase in wound healing effect of wound age and type.* J Invest Dermatol 1992;8:709-14.
20. Mann DL, Spinale FG. *Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds.* Circulation 1998;98:1699-702.
21. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. *Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit.* Life Science 2001;68:799-814.
22. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, et al. *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure.* Circulation 2000;102:1944-9.
23. Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, et al. *Membrane type I matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators.* Circulation 1999;99:3103-9.
24. Ries C, Petrides PE. *Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and regulatory dysfunction in disease.* Biol Chem 1995;376:345-55.
25. Nagase H. *Activational mechanisms of matrix metalloproteinases.* Biol Chem 1997;378:151-60.
26. Sperti G, van Leeuwen RTJ, Quax PHA, Maseri A, Kluft C. *Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix: involvement of plasminogen-dependent and plasminogen-independent pathways.* Circ Res 1992;71:385-92.
27. Nikkari ST, Geary RL, Hatsugami T, et al. *Expression of collagen, interstitial collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in restenosis after carotid endarterectomy.* Am J Pathol 1996;148:777-83.
28. Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RFG, Newby AC. *Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells.* Biochem J 1996;315:335-42.
29. Hasenstab D, Forough R, Clowes AW. *Plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 increase after arterial injury in rats.* Circ Res 1997;80:490-6.
30. Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD. *Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased.* Atherosclerosis 1991;87:87-90.
31. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon V. *Macrophages infiltration in acute coronary syndrome; implications for plaque rupture.* Circulation 1994;90:775-8.
32. Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. *Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaque is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology.* Circulation 1994;89:36-44.
33. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, et al. *Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture.* Circulation 1995;92:1585-9.
34. Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, et al. *Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption.* Stroke 2000;31:40-7.
35. Libby P. *Molecular Bases of the acute coronary syndromes.* Circulation 1995;91:2844-50.
36. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. *Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability.* Circulation 2000;101:1372-8.
37. Shi Y, Patel S, Niculescu R, Chung W, Desrochers P, Zalewski A. *Role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the regulation of coronary cell migration.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1150-5.
38. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. *Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzyme required for extracellular matrix digestion.* Circ Res 1994;75:181-9.
39. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. *Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:2364-7.
40. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. *Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall.* Atherosclerosis 1996;127:263-71.
41. Tracy R. *Atherosclerosis, thrombosis and inflammation: a question of linkage.* Fibrinol Proteolysis 1997;11(suppl 1):137-42.
42. Galis ZS, Asanuma K, Godin D, Meng X. *N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells. New target for antioxidant therapy?* Circulation 1998;97:2445-53.

**=국문초록=**

**배경:** 죽상경화증은 지방, 대식세포나 평활근세포와 같은 세포, 그리고 extracellular matrix(ECM)의 점진적인 축적이 특징적인 만성 염증성 혈관 질환이다. Matrix metalloproteinases(MMPs)와 tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)는 죽상경화증에서 혈관의 ECM의 분해와 재모델링에 관여하며, cytokines는 MMPs와 TIMPs의 합성이나 활성화에 관여하는 것으로 보고된 바 있다. **대상 및 방법:** 연구 대상으로는 체중 2.0~2.5 kg의 생후 1개월 된 뉴질랜드산 수토끼를 선택하였으며, 10 마리는 12주 동안 1% 콜레스테롤 식이를 투여한 후 실험군으로 이용하였으며, 나머지 10 마리는 표준 실험실 식이를 먹여 대조군으로 이용하였다. 12주간 사육 후 토끼를 희생시켰으며, 생존한 실험군 9 마리와 대조군 10 마리의 대동맥과 관상동맥에서 H&E 염색, 면역조직화학 염색, immunoblotting, bioassay의 방법으로 MMP-9, TIMP-2, IL-18의 발현 및 IL-6의 생물학적 활성도를 조사하였다. **결과:** 실험군의 혈청 콜레스테롤은  $1258 \pm 262 \text{mg/dL}$ 로 대조군의  $41 \pm 7 \text{mg/dL}$ 에 비하여 유의하게 증가하였다. 실험군의 전예에서 대동맥과 관상동맥에 죽상경화반이 잘 형성되었으며, 실험군의 대동맥 내막의 두께는  $0.31 \pm 0.1 \text{mm}$ 로 대조군의  $0.01 \text{mm}$ 에 비해 유의하게 증가하였다. 죽상경화반에서 실험군의 MMP-9의 발현은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 내막의 파열이나 관상동맥의 내강 폐쇄가 있었던 증례에서는 더욱 강한 MMP-9의 발현을 관찰할 수 있었다. TIMP-2는 실험군의 일부에서 약한 발현을 보였으나 대조군과 유의한 차이가 없었다. 실험군과 대조군에서 측정된 IL-6의 생물학적 활성도는 각각  $4819.60 \pm 2021.25$ ,  $27.20 \pm 12.19 \text{IU/mL}$ 로서 실험군에서 유의한 증가를 보였으며, 면역조직화학 염색에 의한 IL-18의 발현은 대조군에서는 발현되지 않았으나, 실험군은 전예에서 발현을 보였다. **결론:** MMP-9의 증가된 발현과 TIMP-2의 무변화로 인한 MMPs/TIMPs의 불균형은 죽상경화성 병변에서 ECM의 분해와 경화반의 불안정화를 촉진시킬 수 있는 것으로 보인다. 또한 내막의 파열이 관찰된 증례에서의 더욱 증가된 MMP-9은 경화반의 파열과 관련있는 것으로 생각된다. IL-6의 생물학적 활성도의 증가 및 IL-18의 발현은, IL-6와 IL-18이 죽상경화증의 표지자일 뿐만 아니라 MMP-9의 분비 또는 활성화에 관여하여 죽상경화증의 진행과 경화반의 불안정성 등에 활발히 참여하는 cytokines임을 시사하는 소견으로 보인다. MMPs, TIMPs, cytokines 등의 조절 과정을 밝혀내는 것은 죽상경화증의 세포, 분자적인 병리기전을 이해하는 데에 도움을 줄 것이며, 죽상경화증의 치료 또는 합병증을 예방할 수 있는 기전을 확립하는 데에 도움이 될 것으로 생각된다.

중심 단어 : 1. 죽상경화증  
2. 콜레스테롤  
3. interleukin