

# 대식세포에서 지단백 산화에 대한 수용성 Chitinous Compounds의 항산화 효과에 대한 연구

이세희 · 박성희 · 이용진 · 윤정환 · 최연정 · 최정숙 · 강영희<sup>§</sup>

한림대학교 자연과학대학 생명과학부

## Antioxidative Effects of Water-Soluble Chitinous Compounds on Oxidation of Low Density Lipoprotein in Macrophages

Lee, Se-Hee · Park, Sung-Hee · Lee, Yong-Jin · Park, Jung Han Yoon  
Choi, Yean Jung · Choi, Jung-Suk · Kang, Young-Hee<sup>§</sup>

Division of Life Sciences, Hallym University, Chuncheon, 200-702 Korea

### ABSTRACT

It has been proposed that oxidative modification of LDL (oxLDL) plays a significant role in the pathogenicity of atherogenesis. We tested the hypothesis that chitin and chitosan may function as antioxidants with respect to 0.1 mg cholesterol/ml LDL incubated with 5  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  alone or in the P338D1 mouse macrophage system using L-ascorbic acid as a standard classical antioxidant. The degree of oxLDL formation was ascertained by the relative electrophoretic mobility (rEM) in the combination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, and the cytotoxicity of oxLDL was detected by macrophage viability. The oxLDL uptake and foam cell formation of macrophages were measured by Oil Red O staining. Incubation with  $\text{Cu}^{2+}$  and macrophages increased rEM of LDL and stimulated TBARS formation. Culture of macrophages with LDL in the presence 5  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  induced macrophage death. In cell-free system 200  $\mu$ g/ml water-soluble chitosan and chitosan-oligosaccharide blocked oxLDL formation. Water-soluble chitosan and chitosan-oligosaccharide blocked oxLDL formation near-completely relative to L-ascorbic acid, whereas water-soluble chitin and chitin-oligosaccharide had no measurable antioxidant effect. In macrophage system water-soluble chitosan and chitosan-oligosaccharide blocked oxidation of LDL with a significant increase in cell viability, and decreased TBARS in medium. As for the inhibitory effect on macrophage foam cell formation, chitosan and its oligosaccharide, but not water-soluble chitin, revealed the effectiveness. The endothelial expression of lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX-1) was tested by Western blot analysis, and chitosan, chitosan-oligosaccharide and chitin-oligosaccharide blocked LOX-1 expression. These results indicate that water-soluble chitosan and its oligosaccharide showed the inhibitory effect on  $\text{Cu}^{2+}$ -induced LDL oxidation of macrophages, and chitosan, chitosan-oligosaccharide and chitin-oligosaccharide had blocking effect on oxLDL receptor expression in the human umbilical vein endothelial system. Thus, water-soluble chitosan and its oligosaccharides possess anti-atherogenic potentials possibly through the inhibition of macrophage LDL oxidation or endothelial oxLDL receptor expression depending on chemical types. (*Korean J Nutrition* 36(9): 908~917, 2003)

**KEY WORDS** : chitin, chitosan, oxidized LDL, macrophages, foam cells, atherosclerosis.

### 서 론

산화된 low density lipoprotein (oxLDL)은 초기 죽상 경화과정 (atherogenesis)의 중요한 작용요인으로 간주되

고 있다.<sup>1-4)</sup> 이미 보고된 연구논문<sup>3-6)</sup>에 의하면 *in vitro*에서 배양된 LDL은 혈관내피세포 (vascular endothelial cells), 혈관 평활근세포 (vascular smooth muscle cells) 및 대식세포 (macrophages)에 의하여 산화되어 대식세포를 cholesterol ester 등이 주성분인 지질로 침착된 포말 세포 (foam cells)로 변화시키고 죽상경화성 병변 (atherosclerotic lesions)을 초래한다. OxLDL은 단핵세포 (monocytes)에 대한 강한 화학주성인자로서 동맥벽에 대식세

접수일 : 2003년 7월 2일

채택일 : 2003년 11월 3일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

포의 축적을 일으킬 뿐 아니라 병변부위로 더 많은 단핵세포를 동원하게 된다. Oxysterols 등의 LDL 산화물은 세포독성을 나타내며, 이로 인해 혈관내피세포의 기능장애를 일으키고 죽상동맥경화의 초기 병변이라고 생각되는 지방선(fatty streak)을 더욱더 진행된 병변으로 발전시키며 섬유반(fibrous plaque)의 형성을 야기할 수 있다.<sup>7)</sup> OxLDL은 혈관에서 섬유소 용해를 억제하고 조직인자의 발현을 증가시켜 응혈원의 활성도를 촉진시킨다.<sup>8)</sup> 정상적인 LDL에 대해서 대식세포는 세포 내 콜레스테롤 농도에 따라 엄격하게 LDL을 조절하여 받아들임으로써 세포 내 콜레스테롤 농도를 항상 일정하게 유지시킬 수 있으나, oxLDL에 대해서는 조절능력이 없다. Cu<sup>2+</sup>와 같은 유리금속 이온(transition metal ion)은 LDL에 있는 apoprotein B와 공유결합을 형성하여 대식세포의 scavenger receptors에 인식되고 이들은 대식세포에 탐식되어진다.<sup>9)</sup>

키틴(chitin)과 키토산(chitosan)은 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육에, 그리고 버섯류 및 사상균의 세포벽 등에 함유되어 있는 동물성 식이섬유로서 최근에 주목을 받고 있는 신기능성 소재이다. 키틴은 화학적으로 N-acetyl-D-glucosamine 잔기가 β-1,4 결합을 하고 있는 다당류 구조로 되어있으며 키토산은 키틴에 존재하는 아세틸기가 제거된 구조식을 갖고 있다. 키틴과 키토산은 기능성 식품으로서 세포활성화, 면역력 강화, 항균작용, 중금속 체외배출 등의 다양한 생리작용을 발휘하는 것으로 보고되고,<sup>10-12)</sup> 혈압조절작용, 콜레스테롤 저하작용 등의 혈관성 조절기능도 하는 것으로 알려져 있다.<sup>13,14)</sup> 특히, 키토산과 그 유도체들이 항산화 활성을 가진다는 것이 밝혀지고 있다.<sup>15-17)</sup> 키틴과 키토산의 아미노기가 체내에서 강력한 양이온으로 작용하여 활성산소종이나 유리라디칼을 제거하여 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 이러한 동맥경화 초기 작용기작에 있어서 LDL의 산화가 주요인으로 작용하고 있다는 생화학적 근거에 바탕을 두어 vitamin C, vitamin E, β-carotene 등 여러 종류의 항산화제들이 동맥경화 예방 및 억제물질로 제안되어 왔다.<sup>18-20)</sup> 이들 항산화제들은 유리라디칼의 형성에 관여하는 유리금속 이온과 결합하여 유리라디칼의 생성을 억제시켜 지단백의 산화를 억제시키고, 산화 LDL의 생성속도를 저하시켜 동맥경화의 섬유반 증식을 억제시킨다고 한다.<sup>20)</sup> 이와 같이 지단백 산화가 억제되든지 oxLDL의 생성이 억제되어 이들 항산화제들의 항동맥경화작용이 발휘되는 것으로 보고되었다. 그러나, 혈관내피세포와 대식세포의 LDL 또는 oxLDL의 수용체에 의하여 LDL 또는 oxLDL을 세포 내로 들어오게 하는 것(internalization)을 이러한 항산화제

들이 억제할 수 있다는 가능성을 배제할 수는 없을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 항동맥경화성 항산화제로서 수용성 키틴, 키토산 및 키토 올리고당(chito-oligosaccharides)을 제안하며, 유리금속 이온으로 LDL을 산화시키는 경우에 수용성 키틴, 키토산 및 이들 올리고당이 LDL 산화를 억제시키는 지를 규명하여 이들의 LDL에 대한 항산화 생리활성을 조사하고자 하였다. 대식세포를 이용하여 LDL의 산화작용과 oxLDL 탐식에 대한 수용성 키틴, 키토산 및 이들 올리고당의 항동맥경화에 미치는 효과를 조사하였다. 또한, 염증성 cytokines이나 산화 지단백에 의하여 유도되어 동맥경화를 유발하는데 중요한 역할을 담당하는 혈관내피세포의 oxLDL 수용체인 lectin-like oxLDL receptor-1(LOX-1)에 대한 키틴 성분들의 효과도 함께 측정되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 사람 혈장 LDL의 분리 및 oxLDL의 조제

혈장 LDL은 냉동 보관된 사람의 혈장을 sequential discontinuous density gradient의 초원심분리 과정을 반복하여 분리되었다.<sup>21,22)</sup> 우선, NaCl로 사람의 혈장 밀도를 1.063 g/mL로 조정 한 후 원심분리하여 (150,000 × g, 10°C, 24시간) 혈장 chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL)과 LDL fraction으로 분리하였다. LDL fraction의 밀도를 1.019 g/ml로 다시 조정하여 원심분리(150,000 xg, 10°C, 24시간)한 후에 상층부분의 chylomicron과 VLDL fraction을 제거하고, 나머지 하층부분은 다시 NaCl로 밀도를 1.063 g/ml로 조정하고 같은 방법으로 원심분리하여 LDL fraction을 순수분리 하였다. 분리된 LDL은 4°C에서 0.01% EDTA가 함유된 0.154 M NaCl 완충액(pH 7.4)으로 16시간 투석하였다. 초원심분리하여 얻은 LDL은 Lowry 법을 이용하여 단백질 함량을 결정하였다.<sup>23)</sup> 중성지방, 총콜레스테롤 및 인지질의 함량은 진단 시약(아산제약, 한국)으로 분석하여 LDL의 구성비율로서 순수 분리정도를 확인하였다. 또한, electrophoretic mobility, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 및 conjugated dienes의 형성 등의 확인과정으로 LDL의 적합여부를 조사하였다. 분리된 LDL은 분리과정 거친 후 4주 이내에 사용하였다. EDTA가 포함되어 있는 LDL은 배양실험에 사용하기 전에 EDTA가 없는 0.154 M NaCl 완충액으로 12시간 투석하여 EDTA를 제거하였다.

OxLDL은 LDL (1 mg/ml)을 10 μM CuSO<sub>4</sub>가 함유한 F-10 배지에 (Sigma Co., St. Louis, MO : 6.1 mM glucose, 0.01 μM CuSO<sub>4</sub>, 3.38 μM FeSO<sub>4</sub>) 첨가하여

37°C에서 24시간 동안 배양하여 준비되었다. 배양이 끝난 후에 40  $\mu$ M EDTA를 첨가하여 산화를 중지시키고 4°C에 보관하였다.

## 2. 대식세포의 배양실험

생쥐의 단핵세포주 (mouse monocytic cell line)인 P388D1은 100 U/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 그리고 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양되었다. 대식세포를 이용한 배양실험은 5% FBS가 함유된 F-10 배지에서 이루어졌다. 대식세포는 수용성 키틴, 수용성 키토산, 키틴 올리고당 그리고 키토산 올리고당을 각각 200  $\mu$ g/ml로 전처리하여 4시간 동안 배양한 후, 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>와 0.1 mg/ml LDL을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후에 40  $\mu$ M EDTA를 첨가하여 더 이상의 LDL 산화를 중지시키고 배양 배지는 보관되었다. 사용된 키틴 샘플 모두는 제주도 건풍바이오 회사 (건풍바이오, 제주도 한국)에서 공급되었으며, 수용성 키토산 샘플은 비타민 C용액에 용해하여 제조되었고, 93% 이상 탈아세틸화가 되었으며 glucosamine 함량이 50%이다. 수용성 키틴 샘플은 N-acetylglucosamine 함량이 80%로 제조되었다. 키틴샘플 대신에 대조성분으로 L-ascorbic acid를 50  $\mu$ M과 300  $\mu$ M의 농도로 함께 전처리하여 배양실험에 이용되었다.

## 3. 세포생존율 조사

P388D1의 대식세포를 키틴샘플과 oxLDL과 함께 세포 배양실험을 실시하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 자동 microplate reader spectrophotometer를 이용한 분석이 이루어졌다. 이 분석법은 tetrazolium MTT salt (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co.)가 미토콘드리아 효소인 succinate dehydrogenase에 의하여 불용성의 formazan으로 변하는 과정을 이용하여 측정하였다. Formazan의 형성은 살아있는 세포 내에서만 일어나고 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포수와 비례하게 된다.<sup>24)</sup> MTT (1 mg/ml)가 첨가된 배지에서 대식세포를 3시간 배양시켰다. 그런 후에, 2-propanol을 가하여 조심스럽게 흔들러 주면서 형성된 formazan을 용해시키고 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 4. TBARS 측정

LDL의 산화정도는 TBARS로서 측정되며,<sup>25)</sup> TBARS의 생성은 지질 과산화작용의 지표로서 TBARS는 malondialdehyde와 thiobarbituric acid가 결합하여 형성되는 붉은

색의 흡광도를 측정함으로써 구한다. 세포배양실험에서 나온 보관된 배지 200  $\mu$ l에 2 ml의 TCA-TBA-HCl 시약 (15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.25 N HCl)을 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합물을 15분간 가열하여 식힌 후에 원심분리(1,000  $\times$  g, 10분)하여 부유물을 침전시킨 다음 상층액을 취하여 535 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. TBARS의 생성은 MDA 생성량에 대비하여  $\mu$ g MDA/ml로 표기되었다.

## 5. Electrophoretic mobility 분석

LDL과 oxLDL의 electrophoretic mobility를 측정하기 위하여 이미 발표된 논문<sup>26-28)</sup>에서 사용되어진 방법을 이용하였다. LDL은 산화됨에 따라 음전하가 증가하게 된다. 이러한 특성을 이용하여 산화정도를 측정할 수 있다. 보관된 배양 배지를 pH 8.6인 barbital 용액 (Sigma Co.)에 0.8% agarose 젤 상에서 전기영동 하였다. 전기영동을 거친 후 젤은 5% TCA 용액에서 고정시킨 후 70% ethanol 용액에서 침전시켰다. 전기영동한 젤 사진은 Polaroid Type 668 positive/negative 필름을 사용하여 현상하였다.

## 6. Oil Red O 염색실험

대식세포의 포말세포 형성을 확인하기 위하여 Oil Red O 염색실험을 실시하였다. Oil Red O 염색시약 (Sigma Co.)은 지질을 붉게 염색시키는 시약이다. 본 연구에서는 대식세포에 의해 탐식된 oxLDL을 염색하여 포말세포 형성을 관찰하였다. 세포배양실험에서 나온 P388D1 대식세포를 차가운 phosphate buffer saline (PBS) 용액으로 잘 세척하고 여기에 차가운 4% formaldehyde 용액을 가하여 실온에서 1시간 고정시켰다. 그런 후에, PBS로 세척하고 2-propanol에 녹인 0.5% Oil Red O로 실온에서 4시간 동안 염색하였다.<sup>29,30)</sup> 조심스럽게 다시 세척한 후, 현미경용 마운팅 용액을 가하고 대식세포의 염색형태를 광학현미경으로 관찰하였다.

## 7. 혈관내피세포의 배양

혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cells)는 collagenase 효소 (collagenase type II, Worthington Biochemicals Co., Lakewood, NJ)를 이용하여 분리되었고, 37°C에 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 배양조건에서 일차배양되었다.<sup>31)</sup> 혈관내피세포의 진위 판별은 DiI (1,1-dioctadecyl-3, 3, 3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes Co., Eugene, OR)의 형광물질로 표지된 아세틸화된 LDL의 탐식실험을 통하여 이루어졌다.<sup>32)</sup>

일차배양으로 준비된 혈관내피세포는 10% FBS와 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.9 mg/ml bovine brain extract, 0.75 mg/ml human epidermal growth factor, 그리고 0.075 mg/ml hydrocortisone이 첨가되어 있는 25 mM HEPES-M199 배지에서 (Sigma Co.) 배양되었다.

**8. LOX-1 단백질 분리와 Western blot 분석**

혈관내피세포의 LOX-1 단백질 발현을 측정하기 위하여 Western blot 분석을 시도하였다. Western blot 분석을 위하여 우선 혈관내피세포에서 100% glycerol, 10% SDS, 1% β-glycerophosphate, 0.1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 M NaF 그리고 protease inhibitor cocktail이 함유된 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) lysis 용액을 사용하여 세포 extracts를 준비하였다. 준비된 세포 extracts의 단백질은 10% SDS-PAGE 젤 상에서 전기영동을 수행하였다. 젤 상에 있는 단백질은 nitrocellulose membrane으로 전이시킨 다음, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% skim milk와 함께 배양하였다. Blot은 nitrocellulose membrane과 LOX-1 단백질의 일차항체 (monoclonal mouse anti-human LOX-1 antibody, 일본 National Cardiovascular Center Research Institute의 Sawamura 교수로부터 제공받았음)를 500배로 희석하여 교반하면서 배양한 후에, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (1 : 1,000, Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA)의 이차항체로 1시간 배양하였다. Nitrocellulose membrane에 있는 LOX-1 단백질은 X-ray 필름에 노출시켜 Supersignal West pico chemiluminescence로 (Pierce Biotech. Inc., Rockford, IL) 검출하여 Konica X-ray 필름으로 촬영하였다.

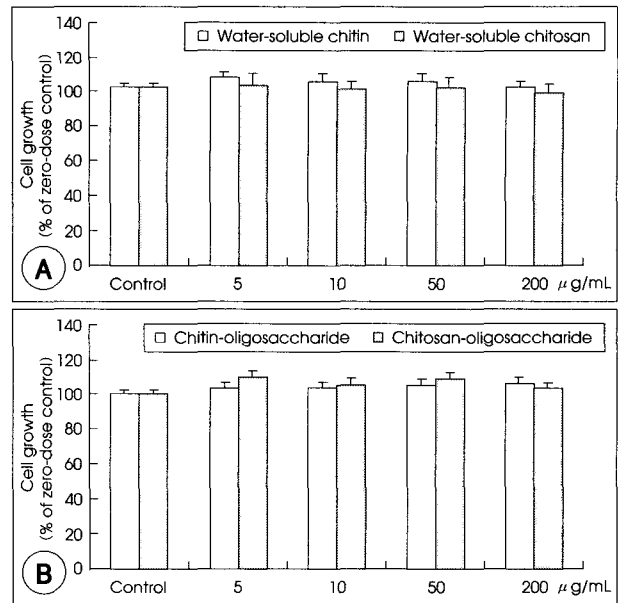
**9. 통계처리**

실험 data는 mean ± standard error로 표시되었으며, Statistical Analysis Systems statistical software package version 6.12 (sas Institute Inc., Cary, NC) PC 프로그램을 이용하여 그룹간의 차이를 비교하였다. 그룹간의 차이에 대해서는 one-way ANOVA로 검증하였고, 유의적이 차이를 보이는 그룹에 대해서는 Duncan's multiple range test가 수반되었다.

**결과 및 고찰**

**1. 세포독성에 대한 수용성 키틴, 키토산 및 이들 올리고당의 효과**

Fig. 1A와 1B는 수용성 키틴, 키토산과 이들 올리고당



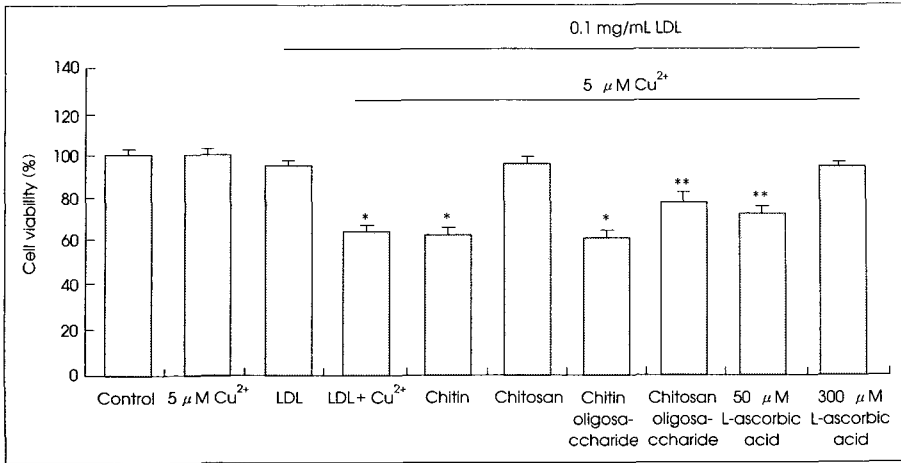
**Fig. 1.** Cytotoxicity of 5–200 µg/ml soluble chitinous compounds (panel A) and their oligosaccharides (panel B) within 24 h incubation, as assessed by MTT. Data are expressed as percent cell survival relative to the viability in chitinous compound-free incubation (viability = 100%).

의 세포독성에 대한 dose response에 대한 결과를 보여 주고 있다. 키틴, 키토산 및 각각의 올리고당들은 24시간의 배양실험에서 사용된 모든 농도에서 대식세포에 독성을 나타내지 않았다. 이 결과를 토대로 고농도이면서 세포독성을 나타내지 않는 200 µg/ml 농도를 키틴과 키토산 전처리 농도로서 LDL 산화억제작용을 규명하기 위한 세포 배양실험에 이용하였다.

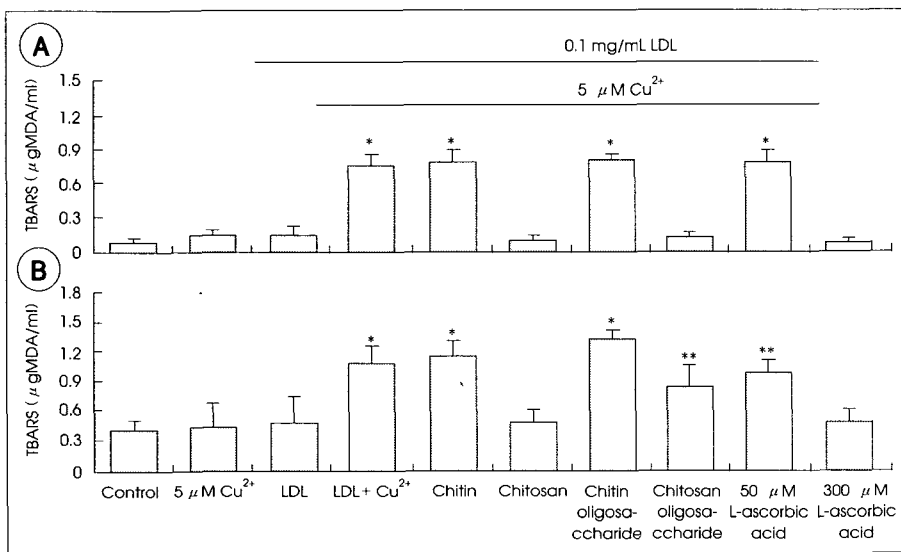
**2. Cu<sup>2+</sup> 이온에 의한 oxLDL의 세포독성에 대한 키틴성분의 효과**

LDL 산화는 세포막에서 발생한 과산화지질에 의하여 일어날 수 있으며, LDL의 자가산화는 세포의 지질이나 Cu<sup>2+</sup> 등의 transition 금속이온에 의하여 초래되며 상당히 진전된 동맥경화 병변에서 일어날 수 있다.<sup>33)</sup> 이러한 LDL 산화는 LDL의 고유 성질을 변화시켜서 대식세포의 scavenger receptor나 oxLDL을 인식하는 수용체인 LOX-1을 통한 대사경로를 겪게 된다.<sup>34)</sup> OxLDL은 세포에 대한 독성이 강한 aldehyde 등의 지질 과산화물을 함유하고 있고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타낼 뿐만 아니라 세포 내에 염증을 유발하기도 한다.<sup>35)</sup>

Fig. 2는 초기 동맥경화증에서 주요한 역할을 하는 P388D1 대식세포를 수용성 키틴과 키토산 및 이들 올리고당을 각각 4시간 전처리 한 후에, 여기에 5 µM Cu<sup>2+</sup>와 0.1 mg cholesterol/ml LDL과 함께 배양하여 24시간 이내의 대식세포의 세포생존율을 조사한 결과를 요약한 것이다. 본



**Fig. 2.** Effect of water-soluble chitinous compounds on 24 h cell viability induced by Cu<sup>2+</sup>-oxidized LDL. P388D1 macrophages were pre-treated with 200 μg/ml chitin and chitosan for 4 h and exposed to LDL at 0.1 mg cholesterol/ml in the presence of 5 μM CuSO<sub>4</sub>. After 24 h cell viability was assessed by MTT. The viability data were expressed as percent cell survival relative to controls without LDL and Cu<sup>2+</sup> (viability = 100%). \*: p < 0.05, relative to control. \*\*: p < 0.05, relative to both control and incubation with Cu<sup>2+</sup> and LDL.



**Fig. 3.** Bar showing effects of chitinous compounds on LDL lipid peroxidation in cell-free system (panel A) and in incubations with P388D1 macrophages induced by Cu<sup>2+</sup>-oxidized LDL (panel B). Chitin, chitosan and their oligosaccharides, or L-ascorbic acid was incubated in Hams F-10 medium and LDL at 0.1 mg cholesterol/ml was added in the presence of 5 μM CuSO<sub>4</sub>. Medium TBARS was measured and expressed as μg malondialdehyde (MDA/ml). \*: p < 0.05, relative to control. \*\*: p < 0.05, relative to both control and incubation with Cu<sup>2+</sup> and LDL.

연구에 사용된 키토산과 키토산 올리고당은 수용성화를 위하여 비타민 C 용액에 용해되어 제조되었다. 따라서, 대조 배양으로서 50 μM 또는 300 μM의 L-ascorbic acid를 처리하였다. 대식세포를 5 μM Cu<sup>2+</sup> 또는 0.1 mg cholesterol/ml LDL과 배양되었을 때는 그 자체 세포생존율에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 5 μM Cu<sup>2+</sup> 존재 하에 LDL과 함께 배양하여 LDL 산화를 유도한 경우에 대식세포의 세포생존율은 35% 정도 감소하였다. L-ascorbic acid를 50 μM로 처리한 경우 10%, 그리고 300 μM를 처리한 경우에는 세포생존율을 거의 완전히 회복시켰다. 한편, 수용성 키토산과 키토산 올리고당을 처리한 경우에는 Cu<sup>2+</sup> 이온에 의한 LDL의 산화과정에서 발생하는 세포독성을 경감시키지 못하였다. 그러나, 수용성 키토산이 함께 배양된 경우에 세포생존율은 거의 완전히 회복되었고, 키토산 올리고당이 첨가되었을 때도 세포생존율은 20% 정도 유의적으로

증가하였다. 이와 같이, 수용성 키토산과는 달리 수용성 키토산은 Cu<sup>2+</sup> 이온에 의한 초래된 oxLDL에 의한 세포독성을 경감시키는 항산화제로서의 활성을 강하게 나타낸다는 것을 알 수 있다. 특히, 200 μg/ml의 수용성 키토산은 기존에 뛰어난 항산화제로 알려져 있는 고농도의 L-ascorbic acid를 사용하였을 때와 같은 강력한 항산화 활성을 나타내어 oxLDL에 의한 세포독성을 경감시키는 것을 알 수 있다. 이러한 실험결과는 키토산을 수용성화 하는 과정에서 키토산이 비타민 C 용액에 용해되었기 때문인 것으로 보인다. 수용성 키토산의 배양농도를 50 μg/ml으로 낮추었을 때 여전히 세포독성은 20% 이상 경감시키므로 (data not shown), 키토산 자체는 LDL 산화를 억제시킬 수 있는 항산화능이 존재한다고 볼 수 있다. 그러나, 수용성 키토산과 키토산 올리고당의 항산화 효과에 대한 정확한 기전은 여전히 밝혀지지 않고 있다.

### 3. 수용성 키틴성분의 지질 과산화 억제작용

Fig. 3은 수용성 키틴, 키토산 및 이들 올리고당의 과산화 작용에 대한 항산화능을 조사한 결과이다. Fig. 3A에서는 LDL의 지질 과산화작용을 수용성 키틴성분들이 직접 억제시킬 수 있는지를 알아보려고 하였다. 대식세포가 없는 상태에서  $5 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  이온과 24시간 배양된 LDL 산화 과정에서의 TBARS의 생성을 측정하였다.  $\text{Cu}^{2+}$  이온 없이  $0.1 \text{ mg cholesterol/ml}$  LDL 만을 배양하였을 때, 생성된 TBARS는  $0.14 \mu\text{g/ml}$  정도 이었으나,  $5 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  이온으로 LDL 산화를 유도한 경우에 생성된 TBARS가  $0.74 \mu\text{g/ml}$ 로 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 수용성 키틴과 키틴 올리고당이 함께 배양되었을 때, 이들은 TBARS 생성을 감소시키지 못하였다. 그러나, 수용성 키토산과 키토산 올리고당은 LDL 과산화작용을 유의적으로 억제시켰다. 수용성 키토산과 키토산 올리고당의 과산화 억제작용은  $300 \mu\text{M}$ 에서 L-ascorbic acid의 과산화 억제효과와 비슷하였다. 이로서, 수용성 키토산과 올리고당은  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의한 직접적인 LDL의 지질 과산화작용을 차단시킨다는 것을 알 수 있다.

P388D1 대식세포가 함께 배양된 경우에, 전반적으로 대식세포 없이 LDL 배양하여 생성된 TBARS 보다 TBARS 수치가 높았다 (Fig. 3B).  $\text{Cu}^{2+}$  이온 없이  $0.1 \text{ mg/ml}$  LDL 만을 배양하였을 때, 생성된 TBARS는  $0.47 \mu\text{g/ml}$  이었고,  $5 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  이온으로 LDL 산화를 유도한 경우  $1.07 \mu\text{g/ml}$ 로 TBARS의 생성이 상당히 유의적으로 증가하였다. 이것은  $\text{Cu}^{2+}$  이온과 대식세포에 의하여 LDL 지질 과산화작용이 서로 부가된 것이라고 추정된다. 직접적으로 대식세포 그 자체에 의한 TBARS 생성은 측정되지 않았지만, 그 차이가 대식세포의 배양으로 생성된 TBARS 일 것이며 대식세포의 LDL 지질 과산화작용의 결과일 것이다. 수용성 키토산은  $300 \mu\text{M}$  L-ascorbic acid의 항산화제와 같이  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의한 LDL 과산화작용을 유의적으로 감소시켰다. 뿐만 아니라, 수용성 키토산 올리고당도 LDL 과산화작용을 억제시켰지만, 완전히 차단시키지는 못하였다. 수용성 키토산 올리고당의 억제능은  $50 \mu\text{M}$  L-ascorbic acid의 것과 비슷하였다. 이와 같이, 수용성 키토산은 대식세포에 의한 LDL 지질 과산화작용도 억제시킨다는 것이 확인되었다. 본 연구에서 polycation 성질을 가진 키토산은 여러 연구를 통해 *in vivo* 상태에서 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>17)</sup> 이러한 키토산의 항산화 효과는 아미노기에 의해 활성산소종이나 유리라디칼이 제거되어 나타나는 것으로 보고되고 있다. 또한, 이미 알려진 키토산의 금속흡착능에 의해 배양실험에 사용된  $\text{Cu}^{2+}$  이온

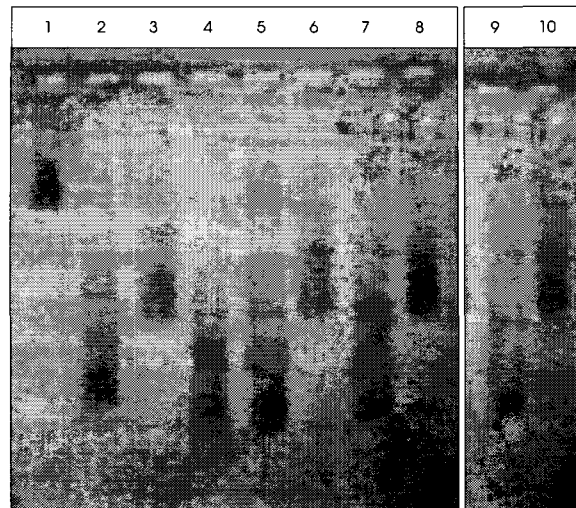
이 제거되어 나타나는 효과라고도 볼 수 있다.

### 4. 수용성 키틴 성분의 LDL 산화 억제작용

OxLDL은 정상 LDL과 비교하여 다양한 구조적 변화가 유발된다. LDL이 산화되는 동안에 콜레스테롤의 산화가 증가되고, apoprotein B의 단편화가 일어나며, 음전하 형성이 촉진될 뿐만 아니라 scavenger receptor에 의한 oxLDL의 탐식이 증가된다.<sup>36)</sup> 이들은 LDL의 지질 과산화 현상과 관련이 있다고 한다. 따라서, electrophoretic mobility 조사를 통하여 LDL 산화를 수용성 키틴 성분들이 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 산화되지 않은 정상적인 LDL의 mobility를 기준으로 하여  $5 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  이온과 대식세포와 함께 배양된 LDL mobility를 구하고, 여기에 수용성 키틴 성분과 처리된 LDL mobility를 조사하였다. Fig. 4에서 순수분리된 산화되지 않은 정상적인 LDL mobility를 1.0으로 하여 각각의 mobility는 이에 대한 상대적인 수치로 나타내었다. OxLDL은 전기영동 상에서 정상적인 LDL에 비교하여 2배 이상의 mobility를 나타내었다 (lane 2).  $\text{Cu}^{2+}$  이온 없이 24시간 LDL을 배양하였을 경우에도 mobility는 1.6으로 증가하였다 (lane 3).  $\text{Cu}^{2+}$  이온과 LDL을 동시에 배양한 경우에 LDL mobility가 상당히 증가하였는데, 이 때의 LDL mobility는 oxLDL의 mobility 이상으로  $5 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ 과 24시간 LDL을 배양함으로써 LDL이 완전히 산화되었다는 것이 확인되었다. 수용성 키틴과 키틴 올리고당은 LDL mobility를 감소시키지 못하였다 (lane 5와 lane 7). 반면에, 수용성 키토산과 키토산 올리고당을 첨가한 경우에 LDL mobility는 1.62과 1.66로서 유의적인 감소를 나타내었으므로 이들은 LDL 산화를 억제시킨다는 것이 확인되었다 (lane 6과 lane 8). 이러한 수치들은 L-ascorbic acid이  $300 \mu\text{M}$ 로 첨가된 경우의 LDL mobility와 유사하며  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의한 LDL 산화를 거의 완전히 억제시키는 것으로 판명되었다. 한편, LDL을 P388D1 대식세포 없이  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의한 LDL의 electrophoretic mobility도 조사되었는데 (data not shown), LDL mobility는 대식세포와 함께 배양된 경우에 전반적으로 mobility가 증가되었다. 수용성 키틴과 키틴 올리고당은  $\text{Cu}^{2+}$  자체에 의한 LDL 산화에 대한 항산화적인 효과가 없었지만, 수용성 키토산과 키토산 올리고당은 거의 완전한 항산화능을 나타내었다.

### 5. 대식세포의 포말세포 형성에 대한 수용성 키틴 성분의 억제효과

대식세포에는 산화 등으로 변형된 LDL 만을 인식할 수 있는 소위 scavenger receptor를 가지고 있어서 변형된



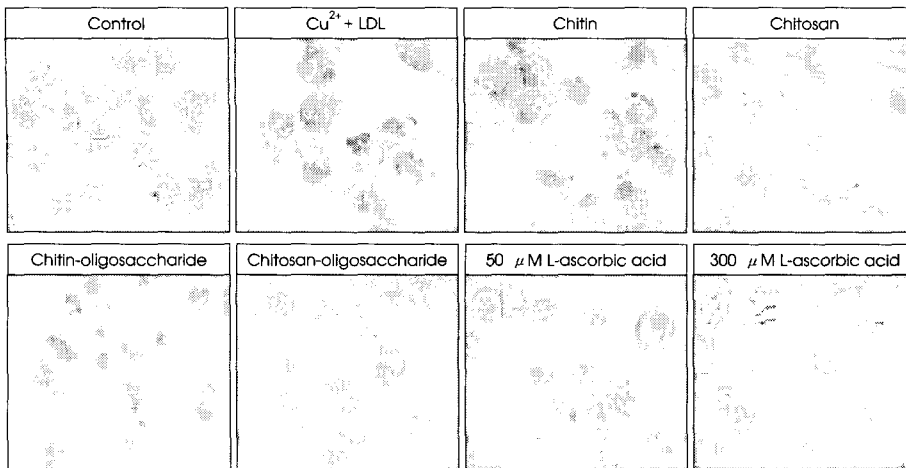
LDL culture protocols			
Lanes	Addition of Cu <sup>2+</sup>	LDL (0.1 mg/ml)	Conditions
1	-	LDL	-
2	-	oxLDL	-
3	-	+	-
4	5 μM	+	-
5	5 μM	+	200 μg chitin
6	5 μM	+	200 μg chitosan
7	5 μM	+	200 μg chitin-oligosaccharide
8	5 μM	+	200 μg chitosan-oligosaccharide
9	5 μM	+	50 μM L-ascorbic acid
10	5 μM	+	300 μM L-ascorbic acid

**Fig. 4.** Effect of chitinous compounds on relative electrophoretic mobility of Cu<sup>2+</sup>-oxidized LDL in P388D1 macrophages. Macrophages were incubated with LDL (0.1 mg cholesterol/ml) in F-10 medium containing chitinous compounds and L-ascorbic acid in the presence of Cu<sup>2+</sup>. The electrophoretic mobility of medium LDL was determined on agarose gels. The legends of each lane on the electrophoretic photo were described in the bottom table. Native LDL is one not treated with Cu<sup>2+</sup> or chitinous compounds. \* : p < 0.05, relative to control (mobility = 1.0). \*\*: p < 0.05, relative to both control and incubation with Cu<sup>2+</sup> and LDL (mobility = 2.33).

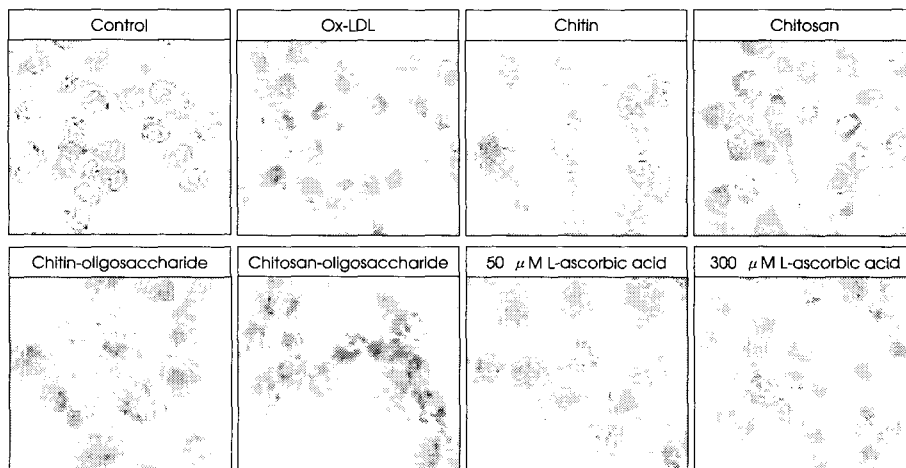
LDL을 대식세포가 탐식함으로써 포말세포로 전환된다. 동맥경화과정의 초기에는 혈관 내막에 포말세포로 변화된 대식세포는 T 세포와 평활근 세포와 더불어 지방선을 형성하며 나중에는 섬유반으로 발전된다.<sup>1-3)</sup> 본 연구에서는 대식세포의 oxLDL의 탐식으로 인한 포말세포 형성을 Oil Red O를 이용하여 관찰하였다. LDL을 처리하지 않은 대식세포는 전혀 염색되지 않았으나, 5 μM Cu<sup>2+</sup>와 0.1 mg cholesterol/ml LDL가 동시 처리된 대식세포는 뚜렷이 붉게 염색되었다 (Fig. 5). 여기에 수용성 키틴과 키틴 올리고당이 전처리 되었을 때는 대식세포는 붉게 염색되었는데, 결국 이 성분들은 포말세포 형성을 억제시키지 못한다는 것이 확인되었다. 또한, 50 μM L-ascorbic acid도 포말세포 형성에 대한 억제효과가 없었다. 그러나, 300 μM L-ascorbic acid와 수용성 키틴산 및 키틴산 올리고당은 Cu<sup>2+</sup>와 대식세포에 의한 LDL 산화를 억제하여 포말세포 형성

을 억제시키는 것으로 나타났다.

Fig. 6은 이미 완전히 산화된 LDL인 oxLDL 자체를 대식세포에 첨가하여 배양시켜 수용성 키틴 성분이 포말세포 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사한 것이다. 이러한 결과는 수용성 키틴산의 항산화능과는 별도로 대식세포의 receptor를 통한 탐식작용을 수용성 키틴산이 억제시킬 수 있는지를 말해준다. LDL 산화에 대한 강력한 항산화능을 보인 수용성 키틴산과 키틴산 올리고당 그리고 300 μM L-ascorbic acid을 전처리 한 모든 군에서도 대식세포는 붉게 염색되었다. 항산화능과는 별개로 수용성 키틴산과 올리고당은 세포막의 수용체 단계에서 이미 산화된 oxLDL의 탐식은 억제시키지 못한다는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 수용성 키틴산이 대식세포의 포말세포 형성을 위한 scavenger receptors에는 어떠한 영향은 미치지 않는 것으로 판단된다.



**Fig. 5.** Effects of chitinous compounds on foam cell formation of P388D1 macrophages induced by LDL in the presence of Cu<sup>2+</sup>. Macrophages were pre-treated with 200 μg/ml chitinous compounds and L-ascorbic acid, and then incubated with LDL at 0.1 mg cholesterol/ml in the presence of Cu<sup>2+</sup>. Cells were stained with Oil Red O and microphotographs were obtained. Magnification x 400-fold.

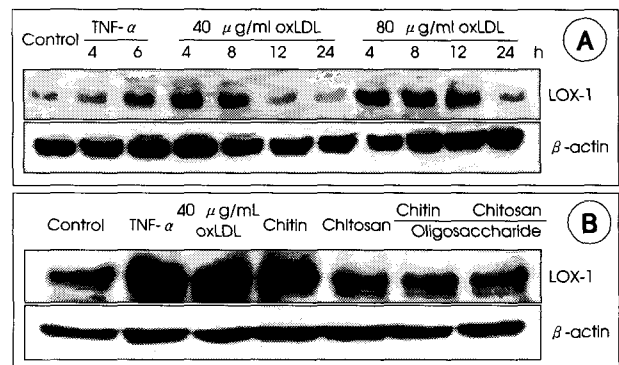


**Fig. 6.** Effects of chitinous compounds on pre-prepared oxLDL-induced foam cell formation of P388D1 macrophages. Macrophages were pre-treated with 200 μg/ml chitinous compounds and L-ascorbic acid, and then incubated with oxLDL at 0.1 mg cholesterol/ml. Cells were stained with Oil Red O and microphotographs were obtained. Magnification x 400-fold.

### 6. LOX-1 단백질 발현에 대한 수용성 키틴 성분의 억제효과

LOX-1은 혈관내피세포의 oxLDL의 수용체로 알려져 있다.<sup>34)</sup> LOX-1은 oxLDL에 결합하여 세포 내로 들어와서 분해된다.<sup>37)</sup> 이전의 여러 연구들에서 LOX-1 단백질 발현은 oxLDL, angiotensin II, TNF-α와 같은 감염성 cytokines 및 shear stress에 의하여 증가된다고 보고되었다.<sup>38-42)</sup> 또한, LOX-1은 활성화된 혈소판과 중성백혈구에 대한 adhesion molecule로 작용하고 중성백혈구의 혈관내피조직에서의 rolling과 transmigration을 도모하여 동맥경화 초기단계에 관여한다고 한다.<sup>38,39)</sup> 그래서, LOX-1은 혈관내피세포의 기능적인 변화를 도모하고, 병리적인 상태에서 혈관 항상성을 깨뜨리게 된다.

본 연구에서는 oxLDL로 인하여 유도된 LOX-1 단백질 발현을 수용성 키틴 성분이 억제시킬 수 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 LOX-1 단백질과 특이한 항체를 사용하여 Western blot 분석이 시도되었고, oxLDL로 인한 LOX-1의 발현정도를 비교하기 위하여 TNF-α가 대



**Fig. 7.** Induction of lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX-1) by TNF-α and oxLDL (panel A) and inhibition of the pro-inflammatory cytokine TNF-α- or oxLDL-induced LOX-1 expression by chitinous compounds (panel B). In panel A, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with 10 ng/ml TNF-α for 6 h, and with 40 μg protein/ml or 80 μg protein/ml oxLDL for various periods within 24 h. In panel B, HUVEC were pre-treated with chitinous compounds for 4 h and incubated with 40 μg protein/ml oxLDL for 6 h. Subsequently, Western blot analysis was performed using total cell extract proteins (100 μg) and primary antibody against LOX-1. β-Actin protein was used as an internal control.



조물질로 처리되었다. Fig. 7A는 LOX-1 단백질 발현에 있어서 oxLDL의 농도별 시간별 변화를 측정한 결과이다. LDL 또는 TNF- $\alpha$ 를 전혀 처리되지 않은 혈관내피세포 배양시에는 LOX-1 단백질 발현이 아주 미약하지만, 10 ng/ml TNF- $\alpha$ 를 처리하였을 때는 LOX-1 단백질의 발현이 크게 증가되었다. OxLDL을 40  $\mu$ g protein/ml과 80  $\mu$ g protein/ml 농도로 4, 8, 12, 24시간 처리하였을 때, LOX-1의 발현은 배양 후 4시간에서 8시간 사이에 발현이 최고에 도달하였으며 12시간 이후에는 점차 발현이 감소되었다. Fig. 7B에서는 40  $\mu$ g protein/ml oxLDL을 4시간 배양한 경우에 전처리 된 수용성 키틴 성분들이 LOX-1 발현을 억제시킬 수 있다는 것을 보여주고 있다. 수용성 키틴산과 키틴 올리고당 그리고 키틴산 올리고당은 oxLDL에 의한 LOX-1의 발현을 거의 완전히 차단시켰다. 또한, 수용성 키틴의 경우에서도 현저하게 LOX-1의 발현을 감소시켰다. 이로서, 수용성 키틴산, 키틴산 올리고당과 수용성 키틴 올리고당은 혈관내피세포의 oxLDL에 의한 유도되는 LOX-1의 발현을 억제시켜 활성화된 혈소판이나 백혈구의 응집 등의 혈관내피세포의 초기 동맥경화과정을 차단시킬 수 있는 소재로서 활용되리라 본다.

## 요약 및 결론

본 연구는 항동맥경화작용의 후보물질로 수용성 키틴과 키틴산을 제안하며, *in vitro* 상태에서의 LDL 배양실험을 통하여 이들 후보물질들의 LDL 산화억제작용을 규명하고자 하였다. 대식세포 배양실험을 위하여 키틴과 키틴산의 불용성 특성을 비타민 C 용액에 용해하여 수용성으로 제조하여 이용되었다. 수용성 키틴산과 키틴산 올리고당은  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의하여 산화된 LDL 독성으로부터 대식세포의 생존율을 증가시키고, LDL 산화와 지질 과산화작용을 억제하는 것으로 나타났다. 반면에, 수용성 키틴과 그것의 올리고당은  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의한 LDL 산화를 억제시키지 못하였다. 수용성 키틴산과 키틴산 올리고당은  $\text{Cu}^{2+}$  이온에 의한 LDL 산화를 억제함으로써 대식세포의 포말세포 형성을 억제시킨다는 것이 확인되었다. 그러나, 수용성 키틴산과 키틴산 올리고당의 항산화 효과에 대한 정확한 기전은 여전히 밝혀지지 않고 있다. 수용성 키틴산의 이러한 LDL 산화억제작용은 수용성 제조과정에서 용해제로 쓰인 비타민 C의 효과가 작용하였을 것으로 추정된다. 하나의 가능한 작용기전으로 아미노기에 의해 유리라디칼이 제거되어 나타나는 것이 아닌가 생각해 볼 수 있다. 또한 이미 알려진 키틴산의 금속흡착능에 의해 배양실험에 사용된 구리이온이 제거되어

나타나는 효과라고도 볼 수 있다.

한편, 완전히 산화된 LDL을 대식세포와 배양한 경우에 수용성 키틴산과 키틴산 올리고당은 대식세포의 oxLDL의 탐식작용은 억제시키지 못하였다. 이러한 결과는 수용성 키틴산이 대식세포의 포말세포 형성을 위한 scavenger receptors에는 어떠한 영향은 미치지 않는다는 것을 보여주었다. 그러나, 수용성 키틴 성분은 oxLDL에 의하여 유도된 혈관내피세포의 LOX-1의 발현을 억제시켜 활성화된 중성 백혈구의 혈관내피조직에서의 rolling과 transmigration의 동맥경화 초기단계를 차단시킬 수 있다는 것이 확인되었다.

## ■ 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지역협력센터 지원사업인 한림대학교 실버생물산업기술연구센터의 지원으로 수행되었다. 수용성 키틴 및 키틴산 제품샘플은 제주도 건풍바이오 주식회사에서 공급되었고, 단일클론 human LOX-1 항체는 일본 T. Sawamura 교수 (National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan)로부터 제공되었다.

## Literature cited

- 1) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993
- 2) Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 113: 578-582, 1987
- 3) Steinberg D, Parthasarathy S, Carew RE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase in atherogenesis. *J N Engl J Med* 320: 915-924, 1989
- 4) Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792, 1991
- 5) Lougheed M, Steinbrecher UP. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol Chem* 271: 11798-11805, 1996
- 6) Morel DW, Dicorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4: 357-364, 1984
- 7) Wulf P, Mochael ER, Weppo YH, Geoff CG, Steve SS. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1372-1376, 1989
- 8) Drake TA, Hanani K, Fei H, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low density lipoprotein induce tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 138: 601-607, 1991
- 9) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 333-337, 1979
- 10) Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon Y. Food applications of chitin and chitosan. *Trend Food Sci Technol* 10: 37-51, 1999
- 11) Shigemasa Y, Minami S. Applications of chitin and chitosan for

- biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 384-420, 1996
- 12) Hwang SM, Chen CY, Chen SS, Chen JC. Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 Macrophages. *Biochem Biophys Res Comm* 271: 229-233, 2000
  - 13) Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Nakashima K, Fukuda N, Hasegawa Y. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 33: 787-793, 1980
  - 14) Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T, Takekawa W, Terada A, Hara T, Mitsuoka T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1439-1444, 1993
  - 15) Xie W, Xu P, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 1699-1701, 2001
  - 16) Xue C, Cuangli Y, Takashi H, Junji T, Hong L. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 206-209, 1998
  - 17) Jung BO, Chung SJ, Lee YM, Kim JJ, Suh SB, Lee GW. Antimicrobial activity and antioxidative of water soluble chitosan. *J Chitin Chitosan* 6: 12-17, 2001
  - 18) Grundy SM, Jialal I, Vega GL. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 82: 185-191, 1990
  - 19) Davignon J, Naruszewicz M, Selinger E. Oxidative modification of lipoprotein and the effect of  $\beta$ -carotene. *Metabolism* 41: 1215-1224, 1992
  - 20) Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011, 1993
  - 21) Basu SK., Goldstein JL, Anderson RG.W, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3128-3182, 1976
  - 22) Fisher, WR. Heterogeneity of plasma low density lipoprotein: manifestation of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism* 32: 283-291, 1983
  - 23) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
  - 24) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immun Methods* 89: 271-277, 1986
  - 25) Burge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310, 1978
  - 26) Seidel D, Wieland H, Ruppert C. Improved techniques for assessment of plasma lipoprotein patterns. I. Precipitation in gels after electrophoresis with polyanionic compounds. *Clin Chem* 19: 737-739, 1973
  - 27) Demacker PNM, Vos-Janssen HE, Van't Laar A, Jansen AP. A descriptive study of the different electrophoretic patterns on agarose of human serum very low density lipoprotein. *Clin Chem* 24: 1439-1444, 1978
  - 28) Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentration of glucose promotes oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 94: 771-778, 1994.
  - 29) Basu SK, Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS. Metabolism of cationized lipoproteins by human fibroblasts. *J Cell Biol* 74: 119-135, 1977
  - 30) Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, Kanehara H, Sakai J, Tohda G, Okada E, Oida K, Iwasaki T, Hattori H, Kodama T, Yamamoto T, Miyamori T. Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor. *Circulation* 103: 1142-1147, 2001
  - 31) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756, 1973
  - 32) Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetyl-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99: 2034-2040, 1984
  - 33) Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* 286: 901-905, 1992
  - 34) Sawamura T, Kume N, Aoyama OI, Moriwaki H, Hoshikawa J, Aiba Y. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386: 73-77, 1997
  - 35) Bruckdorfer KR. Free radical, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1: 529-535, 1990
  - 36) NiKi E, Noguchi N, Gotoh N. Dynamics of the oxidation of low density lipoprotein induced by free radicals. *Biochim Biophys Acta* 1213: 176-182, 1994
  - 37) Moriwaki H, Kita T, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T, Kita R. Ligand specificity of LOX-a, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1541-1547, 1998
  - 38) Mehta JL, Li DY. Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 511-514, 1998
  - 39) Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res* 83: 322-327, 1998
  - 40) Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type I receptor activation. *Circ Res* 84: 1043-1049, 1999
  - 41) Chen H, Li DY, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of LOX-1 expression in aorta of hypercholesterolemic rabbits: Modulation by losartan. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 1100-1104, 2000
  - 42) Kataoka H, Kume N, Miyaoto S, Minami M, Moriwake H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99: 3110-3117, 1999