

## Effect of Vitamin E Against the Cytotoxicity of Reactive Oxygen Species on Vascular Endothelial Cells

O-Yu Kwon<sup>1</sup> and Seung-Taeck Park<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-747, Korea.

<sup>2</sup>School of Medicine, Wonkwang University, Jeonbuk 570-749, Korea

Reactive oxygen species (ROS) is one of the main pathological factors in endothelial disorder. For example, an atherosclerosis is induced by the dysfunction of vascular endothelial cells. The dysfunction of vascular endothelial cells cascades to secrete intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 substance by ROS. Therefore, The ROS is regraded as an important factor of the injury of vascular endothelial cells and inducement of atherosclerosis. Oxygen radical scavengers play a key role to prevention of many diseases mediated by oxidative stress of ROS. In this study, the toxic effect of ROS on vascular endothelial cells and the effect of antioxidant, vitamin E on bovine pulmonary vascular endothelial cell line (BPVEC) treated with hydrogen peroxide were examined by the colorimetric assay. ROS decreased remarkably cell viability according to the dose- and time-dependent manners. In protective effect of vitamin E on BPVEC treated with hydrogen peroxide, vitamin E increased remarkably cell viability compared with control after BPVEC were treated with 15  $\mu$ M hydrogen peroxide for 6 hours. From these results, it is suggested that ROS has cytotoxicity on cultured BPVEC and oxygen radical scavenger such as vitamin E is very effective in prevention of oxidative stress-induced cytotoxicity.

**Key Words:** Reactive oxygen species (ROS), Bovine pulmonary vascular endothelial cell line (BPVEC), Antioxidant, Cytotoxicity

### 서 론

활성산소의 산화적 손상은 혈관내피세포의 기능이상을 유발하는 하나의 요인으로 밝혀져 있으며 (Teschfamiar, 1994), 기능이상시 혈관에 나타나는 동맥경화증이나 혈전증의 원인으로 알려져 있다 (Sellke et al., 1990). 지금까지 밝혀진 활성산소의 산화적 손상이 동맥경화를 유발하는 기전을 살펴보면 산화적 손상에 의한 혈관내피세포의 벽손상은 면역체계에 관여하고 있는 대식세포 또는 T림프구나 혈관평활근세포들에 대한 세포분열과 증식에 관여하는 chemotaxis 및 염증반응에 관여하는 성장인자들의 활성화에 커다란 영향을 주기 때문이다 (Sawada et al., 1989). 따라서 혈관벽의 맨 안층을 구성하고 있는 내피세포의 손상은 혈관-뇌장벽 (blood-brain barrier; BBB)의 기능소실 뿐만 아니라 이 같은 현상이 장기간 지속될 경우 동맥경화와 같은 혈관질환을 유발한다고 알려져 있다 (Sellke et al., 1990; Gibbons and Dzau 1996).

혈관내피세포의 손상은 혈관내막의 기능이상을 초래하며

(Johnstone et al., 1993; Harrison, 1994), 이는 nitric oxide (NO)와 같은 혈관이완과 수축물질의 정상적인 분비를 저해함으로써 (Toda and Okamura, 1991), 동맥경화나 고혈압과 같은 질환을 유발한다. 특히, 혈관내피세포에 대한 활성산소의 산화적 손상은 혈관 벽에 대한 백혈구의 친화력을 증가시키는 방향으로 작용하여 (Takahara et al., 1997), 그 결과 vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, 또는 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1과 같은 물질분비를 비롯하여 (Bevilacqua, 1993), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )나 (Sawada et al., 1989), interleukin (IL)-1과 같은 cytokine을 분비케 함으로서 혈전이나 동맥경화를 유발한다고 알려져 있다 (Ganz et al., 1996). 그 밖에도 FGF (fibroblast growth factor)나 IGF (insulin-like growth factor)와 같은 cytokine은 여러 염증이나 자가면역질환의 촉진인자로 알려져 있다 (Goldstein et al., 1989; Nistico et al., 1992). 이중 내피세포와 혈관평활근세포에서 주로 분비되어 지는 FGF는 주로 세포질내에 위치하고 있다. 때로는 glycosaminoglycan과 결합하여 세포표면에 위치하기도 하는데 이는 내피세포의 증식과 혈관평활근세포의 증식에 관여하고 있다 (Nistico et al., 1992). IGF 역시 내피세포나 대식세포와 같은 세포들로부터 분비되며 이들은 동맥경화의 형성물 크기에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Goldstein et al., 1989). 따라서 동물을 이용한 동맥경화증의 모델 제작

\*논문 접수: 2006년 8월 11일

수정재접수: 2006년 8월 24일

†교신저자: 박승택, (우) 570-749 전북 익산시 신룡동 344-2, 원광대학교 의과대학 해부학교실

Tel: 063-850-6759, e-mail: stpark@wonkwang.ac.kr

시 혈관내벽의 손상은 물론이고 동시에 FGF나 IGF와 같은 성장인자를 처리해 줌으로써 성공적인 모델 제작에 매우 유용하게 이용될 수 있다 (Goldstein et al., 1989; Sellke et al., 1990). 위에서 언급한 바와 같이 내피세포의 기능부전에는 활성산소의 산화적 손상이 중요한 위치를 차지하고 있으며 (Tsfamariam, 1994; Yan et al., 1994), 그 밖에도 NO의 합성과 방출의 분비기능저해를 비롯하여 (Toda and Okamura, 1991), protanoid의 분비이상, inhibitory G-protein의 발현저하 및 protein kinase C (PKC)의 발현증가 등이 알려져 있다 (Lee et al., 1989; Kapor-Drezgic et al., 1997).

활성산소의 산화적 손상은 내피세포의 활성감소를 비롯하여 (Sellke et al., 1990; Tsfamariam, 1992), 세포막의 지질과산화반응의 유도 (Yamamoto et al., 1983), 세포내 칼슘이온의 유입 (Kaneko et al., 1989), 신호전달체계의 비활성화와 같은 세포의 퇴화과정을 촉진시키는 역할을 초래한다고 한다 (Kapor-Drezgic et al., 1997). 더욱이, 활성산소의 산화적 손상은 세포내 세포소기관의 효소활성을 저해하여 세포생존율을 감소시키며 (Mosmann, 1983; Borenfreund et al., 1988; Dario et al., 1996), 나아가서 세포의 사멸을 초래한다고 알려져 있다 (Mayer and Westbrook, 1987; Loft et al., 1994). 또한, 활성산소는 세포로 하여금 흥분성 아미노산을 분비케 함으로써 세포내 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 자극하여 그 결과 세포내 칼슘이온의 항상성을 깨뜨린다고 알려져 있다 (Mayer and Westbrook, 1987; Kaneko et al., 1989). 본 연구는 혈관내피세포에 미치는 활성산소의 산화적 스트레스의 영향을 세포생존율 측면에서 colorimetric assay에 의하여 조사하고 또한 활성산소의 산화적 스트레스에 대한 항산화제의 영향을 알아보기 위하여 배양한 혈관내피세포에 여러 농도의 과산화수소 및 vitamin E를 처리한 후 이의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

혈관내피세포의 배양은 변형된 Borenfreund 등 (1988)의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 소의 폐로부터 순수분리된 BPAEC를 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 후 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)에 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 미리 poly-L-lysine (Sigma)으로 전 처리한 96-multiwell plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 7일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, 분주후 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

### 2. 시약제조

본 실험에 사용된 과산화수소 ( $H_2O_2$ , Sigma)는 원액을 1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M 등의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관 후 실험당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 3. 활성산소의 처리

배양중인 BPVEC를 1~15  $\mu$ M 과산화수소가 포함된 배양액 내에서 각각 6시간 동안 배양한 후 과산화수소를 처리하지 않은 배양액을 대조군으로 하여 이의 영향을 상호 비교 조사하였다.

### 4. Vitamin E의 처리

활성산소에 대한 vitamin E의 영향을 조사하기 위하여 15  $\mu$ M의 과산화수소를 처리하기 2시간 전에 1~20  $\mu$ M의 vitamin E가 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 영향을 대조군과 비교 조사하였다.

### 5. 세포생존율 정량

배양용기에서 자라고 있는 BPVEC를 여러 농도의 활성산소나 vitamin E를 일정시간 동안 처리한 후 이의 영향을 XTT assay에 의하여 정량분석 하였다. XTT assay는 Mosmann (1983)의 변형된 비색분광분석법 (colorimetric assay)에 의하여 시행하였으며 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 6. 통계 처리

실험결과에 대한 통계처리는 Students' t-test에 준하였고 P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 세포생존율의 정량분석

#### 1) 농도에 따른 영향

과산화수소가 혈관내피세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1~15  $\mu$ M의 과산화수소가 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 처리한 후 과산화수소가 세포에 미치는 영향을 XTT 분석법에 의하여 분석하였다. 그 결과 1  $\mu$ M 과산화수소의 처리에서는 대조군인 100% ( $5.93 \pm 0.62$ )에 비하여 97.6% ( $5.79 \pm 0.34$ )로 나타났으며 5  $\mu$ M의 처리에서는 89.2% ( $5.29 \pm 0.46$ )로 나타났다. 또한 10  $\mu$ M의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 79.7% ( $4.73 \pm 0.36$ )로 나타나 대조군에 비하여 다소 감소하였으나 15  $\mu$ M의 처리에서는 57.5% ( $3.41 \pm 0.24$ )로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타

**Table 1.** The cell viability of dosage of hydrogen peroxide on bovine pulmonary vascular endothelial cells (BPVEC) by XTT assay

Concentration of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	Group	
	Mean ± SE	(% of control)
Control	5.93±0.62	100
1	5.79±0.34	97.6
5	5.29±0.46	89.2
10	4.73±0.36	79.7
15	3.41±0.24	57.5*

BPVECs were incubated with or without 1~15 μM hydrogen peroxide for 6 hours. The value represent the mean ± SE for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

**Table 2.** The time interval-dependent cell viability of hydrogen peroxide on BPVEC by XTT assay

Incubation time of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (hour)	Group	
	Mean ± SE	(% of control)
Control	2.65±0.32	100
1	1.91±0.14	72.1
3	1.45±0.17	54.7
6	1.25±0.28	47.2
9	1.18±0.10	44.5*

BPVECs were incubated with 15 μM hydrogen peroxide for 1~9 hours. The value represent the mean ± SE for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

났다 (P<0.05) (Table 1).

### 2) 시간에 따른 영향

과산화수소가 혈관내피세포에 미치는 영향을 시간에 따라 조사하기 위하여 15 μM의 과산화수소가 포함된 배양액에서 각각 1~9시간 동안 처리한 후 과산화수소가 세포에 미치는 영향을 XTT 분석법에 의하여 분석하였다. 그 결과 1시간 동안 과산화수소의 처리에서는 대조군인 100% (2.65±0.32)에 비하여 72.1% (1.91±0.14)로 나타났으며 3시간의 처리에서는 54.7% (1.45±0.17)로 나타났다. 또한 6시간 동안의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 47.2% (1.25±0.28)로 나타났으며 9 시간 동안의 처리에서는 44.5% (1.18±0.10)로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 2).

### 3) Vitamin E의 처리군

Vitamin E가 과산화수소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15 μM 과산화수소로 세포를 처리하기 2시간 전에 1~20 μM vitamin E가 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 영향을 세포생존율 측면에서 조사하였다. 그 결과 15 μM 과산화수소만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100% (2.71±0.14)에 비하여 57.2% (1.55±0.16)로 나타났는데 비하여 1 μM의 vitamin E 처리에서는 73.4% (1.99±0.12)로 나타났다. 또

**Table 3.** The cell viability of vitamin E on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in BPVEC by XTT assay

Concentration of vitamin E (μM)	Group	
	Mean ± SE	(% of control)
Control	2.71±0.14	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.55±0.16	57.2
1	1.99±0.12	73.4
10	2.09±0.17	77.1
20	2.30±0.24	84.7*

BPVECs were incubated vitamin E with hydrogen peroxide for 6 hours. The value represent the mean ± SE for triplicate experiments. \*P<0.05 (Student's t-test)

한 10 μM의 vitamin E 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 77.1% (2.09±0.17)로 나타나 hydrogen peroxide 처리군에 비하여 다소 증가하였으나 20 μM의 처리에서는 84.7% (2.30±0.24)로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 3).

## 고 찰

혈관내피는 실제로 혈관과 혈관벽간에 물질이동이 일어나는 곳이다 (Gibbons, 1996). 따라서 혈관내피세포의 손상은 혈관안충의 손상으로서는 뇌조직에서의 혈액-뇌장벽이나 생식 기관에서 혈액-고환관문에 치명적인 영향을 초래하게 된다 (Harrison, 1994; Gibbons, 1996). 특히, 혈관내피세포는 NO를 생산하여 혈관의 수축기전을 조절하고 있기 때문에 (Toda and Okamura, 1991), 혈관내피세포의 손상에 의한 혈관내피세포의 기능부전은 혈관수축기전의 균형파괴와 내피세포의 부착력 증가를 초래한다 (Johnstone et al., 1993; Bevilacqua, 1993). 더욱이, 염증세포간의 부착력 증가를 유도하여 활성산소로 하여금 VCAM-1과 같은 부착물질의 유전자 발현을 유도하도록 한다고 한다 (Sellke et al., 1990; Takahara et al., 1997). 따라서 활성산소의 산화적 손상은 혈관내피세포의 기능부전과 동맥경화증과 같은 혈관질환을 초래하는데 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다 (Teschfariam, 1994; Gibbons, 1996). 본 연구는 활성산소의 산화적 손상이 BPVEC에 미치는 세포독성효과를 조사하기 위하여 소에서 순수 분리된 BPVEC를 일정시간 동안 배양한 후 활성산소의 일종인 과산화수소를 농도별로 처리하여 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 활성산소의 산화적 손상은 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 감소하였다. 특히, 15 μM 과산화수소의 농도처리에서는 세포생존율이 57.5%로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05). 활성산소의 산화적 손상이 세포의 생존율을 감소시킨 이유는 세포의 핵산물질의 합성을 저해하거나 (Gawler

et al., 1987; Loft et al., 1994), 또는 세포내 단백질합성의 저해와 같은 요인에 의해 세포생존율에 영향을 주었을 가능성을 배제할 수는 없다 (Elion et al., 1996). 이러한 영향은 타 연구에서 활성산소의 산화적 손상에 의한 세포들이 대조군에 비하여 세포수의 감소나 세포돌기의 소실되었다고 보고된 바 있다 (Dario et al., 1996; Elion et al., 1996).

그러나 본 연구에 있어서 이 보다는 활성산소의 산화적 손상이 아마도 세포소기관 등에 많은 영향을 주어 그 결과 세포생존율의 감소를 유도하였을 가능성이 큰 것으로 생각된다 (Borenfreund et al., 1988). 이러한 이유의 하나로는 본 연구에서 XTT 정량분석이 세포소기관의 일종인 사립체의 효소활성과 밀접한 관련이 있다는 것을 고려해 볼 때 (Mosmann, 1983; Borenfreund et al., 1988), 과산화수소를 농도별과 시간별로 처리한 실험군에서는 처리농도와 시간에 비례하여 XTT의 흡광도가 대조군에 비하여 현저하게 감소된 것으로 보아 활성산소의 산화적 손상이 혈관내피세포의 효소활성을 저해함으로써 세포생존율을 유의하게 감소시켰음을 알 수 있었다. 한편, 활성산소제거제의 일종인 vitamin E가 활성산소의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 혈관내피세포에 처리하기 2시간 전에 1~20  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소가 농도별로 포함된 배양액에 처리한 후 이의 영향을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 vitamin E를 처리한 실험군은 과산화수소만을 처리한 실험군에 비하여 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 점차 증가시켰다. 특히, 20  $\mu\text{M}$  vitamin E의 처리에서는 세포생존율이 84.7%로 나타나 이는 과산화수소만을 처리한 경우인 57.2%에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). 위와 같은 본 실험결과는 vitamin E가 활성산소의 산화적 손상에 대하여 항산화능을 가지고 있음을 말해주고 있으며 이 같은 현상은 세포내로 들어간 vitamin E가 활성산소의 산화적 손상을 제거해줌으로써 산화적 손상에 의한 효소활성의 저해를 방어해준 결과일 것으로 생각된다 (Ganther, 1980). 활성산소에 의한 세포독성효과는 세포내 항산화계를 비롯하여 단백질합성계 또는 신호전달체계와 같이 다양한 부위에 영향을 미침으로서 이의 자세한 기전규명을 위해서는 관련된 여러 측면에서 동시에 체계적이고 종합적인 분석이 필요할 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

## REFERENCES

Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993. 11: 767-804.

- Borenfreund E, Babichi H, Matin-Alcuacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay. The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro.* 1988. 2: 1-8.
- Dario G, Antonio C, Giuseppe P. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996. 19: 257-267.
- Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol.* 1996. 863-880.
- Ganther HE. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Am NY Acad Sci.* 1980. 355: 212-225.
- Ganz MB, Saksa B, saxena R, Hawkins K, Sedor JR. PDGF and IL-1 induce and activate specific protein kinase C isoforms in mesangial cells. *Am J Physiol.* 1996. 217: F108-F113.
- Gawler D, Milligan G, Spiegel AM, et al. Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi activity in diabetes. *Nature* 1987. 327: 229-232.
- Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 1996. 272: 689-693.
- Goldstein RH, Poliks CF, Pilch PF, Smith BD, Fine A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology* 1989. 124: 964-970.
- Harrison DG. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol.* 1994. 89: 87-102.
- Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993. 88: 2510-2516.
- Kaneko M, Elmban V, Dhalla NS. Mechanism for depression of heart sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  pump by oxygen free radicals. *Am J Physiol.* 1989. 261: 4948-4955.
- Kapor-Drezgic J, Zhou X, Whiteside C. Mesangial cell PKC isoform accumulation and membrane association in high glucose (Abstract). *J Am Soc Nephrol.* 1997. 8: 640A.
- Lee TS, MacGregor LC, Fluharty SL, et al. Differential regulation of protein C and (Na, K)-adenosine triphosphate activities by elevated glucose levels of retinal capillary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1989. 83: 90-94.
- Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.* 1994. 8: 534-537.
- Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol.* 1987. 501-527.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J*

- Immunol Methods 1983. 65: 55-63.
- Nistico G, Ciriolo MR, Fiskin D, Lannone M, DeMartino A, Rotilio G. NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of age rat. *Free Rad Biol Med.* 1992. 12: 177-182.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 1989. 491: 394-397.
- Sellke FM, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circ Res.* 1990. 81: 1586-1593.
- Takahara N, Kashiwagi A, Nishio Y, Harada N, Kojima H, Maegawa H, Kikawa R. Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM stimulate radical-induced monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* 1997. 662-670.
- Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1994. 16: 383-391.
- Toda N, Okamura T. Role of nitric oxide in neurally induced cerebroarterial relaxation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991. 258: 1027-1032.
- Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke* 1983. 14: 977-982.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycosylation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994. 269: 9889-9897.
-