

## 7-Ketocholesterol Induces Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis via Akt Degradation

Kyo Won Seo, Chi Dae Kim and Won Suk Lee\*

Department of Pharmacology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Gyeongsangnam-do 50612, Korea

Received January 5, 2016 / Revised February 4, 2016 / Accepted February 4, 2016

Vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis has been identified in various vascular diseases, including atherosclerosis and restenosis after angioplasty, and has been known to precipitate atherosclerotic plaque instability and rupture. Oxysterols are known as inducers of apoptosis in VSMC, and 7-ketocholesterol (7KC) is the major nonenzymically formed oxysterol in atherosclerotic lesions. The precise mechanism underlying VSMC apoptosis is still poorly understood. In this study, we investigated whether 7KC causes apoptosis, and characterized its apoptotic mechanisms in primary cultured rat aortic VSMC. Cell viability was assessed by MTT assay and trypan blue assay. Apoptosis was assessed by flow cytometry, immunofluorescence, immunoprecipitation, and Western blot analyses. 7KC markedly decreased the VSMC viability in a time- and concentration-dependent manner, and increased the production of 4-hydroxynonenal (HNE), a major end-product of lipid peroxidation, which also decreased the VSMC viability. Pretreatment with 2,4-dinitrophenylhydrazine, a well-known reagent of lipid peroxidation-derived aldehydes, significantly restored the 7KC-decreased viability of VSMC. Furthermore, HNE, as well as 7KC, reduced the level of total Akt, a major mediator of cell survival. The 7KC-decreased level of total Akt was significantly restored by pretreatments with 2,4-dinitrophenylhydrazine and N-acetylcysteine. Lactacystin, a proteasome inhibitor, protected VSMC against apoptosis and Akt degradation, but did not inhibit HNE production. In the immunoprecipitation assay, 7KC increased HNE-modified Akt. From the results, it seems that, in atherosclerotic lesions, 7KC induces HNE production in VSMC, and this HNE binds to Akt, proceeding to proteasomal degradation of Akt, through which mechanism the atherosclerotic plaque instability may be facilitated.

**Key words :** 4-Hydroxynonenal, 7-ketocholesterol, Akt, apoptosis, vascular smooth muscle cell

### 서 론

혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells)의 세포자멸사(apoptosis)는 초기 죽상경화의 진행을 촉진시키고 사이질 아교섬유(interstitial collagen fiber)의 합성을 감소시켜 섬유 피막의 두께를 얇게 함으로써 죽상판(atheromatous plaque)의 불안정과 파열에 관여하며, 죽상동맥경화증, 동맥류, 또는 혈관성형술 후의 재협착증 등의 죽상경화성 혈관질환의 발생에 매우 중요한 요인이라고 인지되고 있다[1-3]. 또한, 죽상경화 병변 내에는 혈관평활근세포 외에도 다양한 세포자멸성 세포들이 많이 존재한다고 알려져 있다[8, 19, 23, 24, 28].

산화콜레스테롤 유도체인 oxysterol은 혈관평활근세포의 세포자멸사를 야기할 수 있는 여러 친세포자멸사성(proapoptotic) 자극들 중에서 매우 중요한 물질로서[4, 8], 특히 대표적

인 oxysterol인 7-ketocholesterol (7KC)은 죽상경화 병변에 대량 존재한다[4]. 죽상경화 병변내의 고농도 7KC는 죽상판의 파열[12, 27], 평활근 세포의 부착, actin 조직의 변화, 미토콘드리아 막전위의 감소 및 핵의 압축 또는 단편화 등을 통한 평활근 세포의 사멸에 관여하며[20, 22], 특정 단백질의 유비퀴틴화를 증가시켜 단백질 분해를 돕는 것으로도 알려져 있다[20]. 이와 같이 여러 질병의 병인론에 있어서 oxysterol의 세포독작용 및 친세포자멸사성 특성이 관여한다고는 하지만 아직 자세한 역할은 잘 모르고 있다.

한편, 죽상경화증을 비롯한 여러 질병에 있어서 단백질과 알데히드 반응중간물질의 산성화로 인한 변화가 중요한 원인이 되는데[3, 16, 18], 그 중에서 특히 4-hydroxynonenal (HNE)은 지질과산화의 주된 최종산물로서 세포막 지방산으로부터 산화스트레스에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있다[8, 15, 26]. HNE는 동맥경화 병변에 대량으로 존재한다고 알려져 있으며 최근에는 죽상경화를 측정하는 지표로 사용되기도 한다[15, 16]. 그러나 HNE가 죽상경화증의 발병기전에 있어 중대한 역할을 한다고는 하지만 혈관평활근세포에 미치는 자세한 영향과 그 기전은 잘 모르고 있다.

따라서 본 연구에서는 죽상경화성 질환에 있어서 산화콜레스테롤 유도체 중 대표적인 oxysterol인 7KC가 혈관평활근세

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8062, Fax : +82-51-510-8068

E-mail : wonslee@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

포의 세포자멸사에 미치는 영향과 그 기전을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 7~8주령의 Sprague-Dawley 계 숫쥐로서 코아텍(평택, 경기도, 한국)으로부터 분양 받은 후 일주일간 순화시킨 다음 본연구에 사용하였다. 본 실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인(PNU-2013-0424)을 얻은 후 실험동물 관리 및 이용에 관한 지침에 따라 수행되었다.

### 시약 및 항체

7KC와 HNE는 Cayman Chemical Inc. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며, Akt 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 1:1,000 비율로 희석하여 사용하였다. Horseradish peroxidase-conjugated IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, MA, USA)는 이차항체로서 1:3,000의 비율로 희석하여 사용하였다. Lactacystin, N-acetylcysteine (NAC), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 및 나머지 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 혈관평활근세포 배양

실험동물을 CO<sub>2</sub>를 사용하여 질식사시킨 후 가슴대동맥을 적출하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 담근 채 주변 지방조직과 결합조직을 제거하고 혈관내막을 면도날로 긁어낸 다음 약 1 mm<sup>2</sup>의 크기로 자른 조각을 10% fetal bovine serum 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 들어있는 세포배양판에 넣고 37°C에서 배양하였다. 이후 자라난 일차배양 혈관평활근세포는 mouse monoclonal  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody (Sigma)를 결합시켜 재확인하였다.

### 세포 생존력 측정

7KC 또는 HNE가 혈관평활근세포의 생존력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석 및 trypan blue 분석을 시행하였다. 24 well plate의 각 well에 혈관평활근세포( $2 \times 10^5$  개)를 접종하여 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. MTT 분석은 MTT (5 mg/ml in PBS) 10  $\mu$ l를 각 well에 첨가한 후 3~4시간 동안 추가 배양하였다가 Power Wave X340 (Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Trypan blue 분석은 0.4% trypan blue 용액을 각 well의 세포현탁액과 1:1로 혼합하여 잘 섞어준 다음 약 3-5분 기다렸다가 혈구계를 사용하여 사망

한 세포 수와 전체 세포 수를 측정하였다.

### Hoechst 염색

세포자멸사 유발 여부를 확인하기 위하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 혈관평활근세포를 4% paraformaldehyde에 30분 동안 고정된 다음 PBS로 세척하고 0.2% Triton X-100을 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 Hoechst 33258로 핵을 염색하였다. 그 후 PBS로 세척하고 봉입 용액을 처리하여 형광현미경(Zeiss 510 CSLM, Carl Zeiss, Göttingen, Germany; x200 배율)으로 핵의 형태를 관찰하였다.

### 유세포 분석

세포자멸사의 분석은 FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I (Becton, Dickinson and Company, San Diego, CA, USA)을 사용하여 제조사의 실험방법에 따라 시행하였다. 먼저, 각 실험 목적에 맞게 준비한 혈관평활근세포를 PBS로 세척한 후 binding buffer 처리를 하고, 여기에 FITC Annexin V와 propidium iodide를 각각 5  $\mu$ l씩 첨가하였다. 그 후 binding buffer 400  $\mu$ l를 첨가하여 유세포분석기(FACSCalibur; Becton, Dickinson and Company)를 사용하여 형광 신호를 관찰 분석하였다.

### 면역 형광 측정

세포내 HNE 발현 증가를 관찰하기 위하여 면역반응을 이용한 면역 형광 측정 실험을 진행하였다. 각 실험 목적에 따라 처리된 혈관평활근세포를 4% paraformaldehyde에 30분간 처리하여 고정시켰다가 50 mM NH<sub>4</sub>Cl로 중화시키고 0.2% Triton X-100에 처리한 후 10% normal donkey serum을 함유한 차단완충액과 1~2시간 동안 반응시켰다. 그 후 4°C에서 anti-HNE antibody (1:100)와 하룻밤 동안 반응시키고, PBS를 이용하여 15분씩 4번 세척 후, FITC-conjugated IgG antibody (Zymed Lab, Carlsbad, CA, USA)와 1시간 동안 반응시켰다. 이후 세척과정을 거쳐 DAPI 염색 및 세척하여 봉입하였다. 염색된 혈관평활근세포는 동일초점현미경(LSM 510, Carl Zeiss Inc., Jena, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

### 면역침전 실험

면역침전(immunoprecipitation) 실험은 Zhao 등[32]이 사용한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 혈관평활근세포에서 차가운 RIPA buffer (50 mM Tris - HCl, pH 7.9, 1% NP-40, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail; Calbiochem, Billerica, MA, USA)를 사용하여 세포추출물을 구하였다. HNE 항체와 protein G conjugated agarose beads (GE Healthcare, Cincinnati, OH, USA)를 반응시킨 후 세포에서 추출한 단백질과 반응시켜 HNE-변형 단백질을 추출하였으며, Western blot으로 목표 단백질의 양을 확인하였다.

**Western blot**

RIPA buffer를 사용하여 추출한 세포추출물을 정량과정을 거친 후 8~10% polyacrylamide separating gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질을 nitrocellulose membranes (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 전이한 후 각 membrane을 5% 탈지유를 포함한 TBST (Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20)에 1시간 동안 상온에서 반응시켜 비특이 단백질에 대한 차단을 실시하였다. 차단 과정이 끝난 후 일차항체와 반응시킬 때에는 3% BSA가 들어있는 TBST에 1:1,000 비율로 일차항체를 희석하여 하룻밤 동안 냉장기 위에서 반응시켰다. 이후 membranes은 TBST로 1시간 동안 4번의 1차 세척과정을 거친 후, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3,000)와 반응시켰다. 이후 TBST로 2차 세척과정을 거치고 ECL Western blot detection reagents (Thermo Fisher Scientific Inc. IL, USA)로 발색반응을 유도한 후 암실에서 X-선 필름에 감광시킨 후 결과를 분석하였다. 그 후 감광한 membranes은 stripping하여 항β-actin 항체(MP Biomedicals, Aurora, OH, USA)와 다시 반응시켜 각 시료에 대한 대조기준으로 활용하였다.

**통계학적 분석**

본 실험의 결과는 평균 ± 평균의 표준오차로 표시하였고, 각 군별 유의성 검증을 위하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA) 및 이원배치분산분석(two-way ANOVA)을 시행한 후 각 군간의 차이는 각각 Dunnett 다중비교법 및 Bonferroni 다중비교법으로 사후 검정하였으며, *p* 값이 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

**결과 및 고찰**

**혈관평활근세포의 세포자멸사에 미치는 7KC의 영향**

동맥경화증에 있어서 혈관평활근세포의 세포자멸사는 cytokines, 호르몬, 산화스트레스 등 여러 요인들에 의해서 발생한다고 알려져 있다[13]. 본 연구에서는 이러한 여러 요인들 중에서 대표적인 oxysterol인 7KC가 혈관평활근세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 관찰하였다. 혈관평활근세포에 25 μM 7KC를 0~48시간 동안 처리하였을 때 혈관평활근세포의 생존력은 24시간째부터 유의하게 감소하였으며(*p*<0.001), 48시간 동안 0~250 μM의 농도로 처리하였을 때 25 μM에서부터 생존력이 유의하게 감소하였다(*p*<0.001, Fig. 1A). 이 결과를 재확인하기 위하여 유세포 분석 실험을 한 결과 세포자멸사가 진행되는 세포수가 농도-의존적으로 증가하여 25 μM에서는 22%, 75 μM에서는 52%의 혈관평활근세포에서 세포자멸이 일어났다(Fig. 1B). 또한, 사망하였거나 손상 받은 세포를 trypan blue 분석을 통하여 확인하였을 때에도 25 μM 7KC에서부터

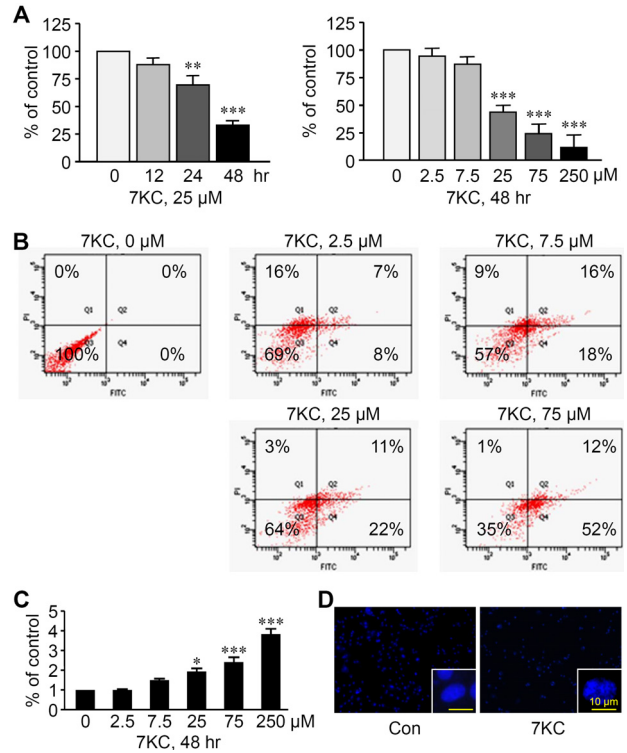


Fig. 1. Effect of 7KC on vascular smooth muscle cell apoptosis. Vascular smooth muscle cells (VSMC) were exposed to 7KC for the indicated durations and at the indicated concentrations, and then the viability of VSMC was analyzed by MTT assay (A). VSMC were exposed to 7KC (0~250 μM), and then VSMC apoptosis was determined by flow cytometric analysis (B). 7KC-induced death of VSMC was determined by trypan blue assay and Hoechst staining (C and D, respectively). Data are expressed as means ± SEM of 4 experiments. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. control (0 or Con).

유의하게 세포자멸이 일어났다(*p*<0.05, Fig. 1C). 이러한 7KC에 의한 혈관평활근세포의 생존력 감소가 세포자멸사 유도과 연관된 것인지 여부를 조사하기 위하여 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 세포자멸사가 유발된 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축[30]이 7KC에 의하여 혈관평활근세포의 세포핵 내에 일어났다(Fig. 1D). 이상의 결과로 7KC는 시간 및 농도에 의존적으로 혈관평활근세포의 세포자멸사를 유도하는 것으로 여겨진다.

**7KC에 의한 HNE의 증가와 혈관평활근세포 세포자멸사**

산화스트레스에 의해 세포 내에 증가하는 HNE는 지질과산화의 주된 최종산물로서 동맥경화 또는 당뇨병에서 많이 나타내며[5, 20], 고농도 7KC에 의해 생성이 증가한다고도 알려져 있다[3]. 이에 면역 형광 측정 실험으로 HNE 부가물 생성을 관찰하였다. 7KC (25 μM)를 혈관평활근세포에 처리하였을 때 세포 내에 HNE 부가물 생성이 증가하였으며, 이러한 증가는

HNE 억제제인 DNPH와 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 제거제인 NAC 모두에 의하여 현저히 억제되었다(Fig. 2A). 이 결과를 Western blot으로 재확인하였을 때에도 7KC의 농도(0~75  $\mu\text{M}$ )에 의존적으로 HNE 부가물의 생성이 증가되었다(Fig. 2B). 반면, 7KC에 의해 증가한 HNE가 혈관평활근세포의 세포자멸사에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 HNE를 단독으로 처리하고 MTT 분석을 시행한 결과 혈관평활근세포의 생존력은 HNE 농도(0~10  $\mu\text{M}$ )에 의존적으로 감소하였으며( $p < 0.001$ ) 특히 3  $\mu\text{M}$ 에서부터 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ , Fig. 2C). 이러한 HNE에 의한 혈관평활근세포 수의 감소는 100  $\mu\text{M}$  DNPH 전처치에 의하여 현저히 억제되었는데( $p < 0.01$ ), 7KC (0~250  $\mu\text{M}$ )에 의한 혈관평활근세포의 생존력 감소도 DNPH 전처치에 의하여 유의하게 억제되었다( $p < 0.05$ , Fig. 2D). 이러한 결과들은 이전에 본 연구진이 HNE에 의한 혈관평활근세포의 세포자멸사는 미토콘드리아의 기능장애로 인하여 미토콘드리아에서 대량 생성된 ROS에 의한다고 보고한 바와 일맥상통한다[15]. 그러나 HNE에 의한 ROS 생성에

있어 세포내 호흡사슬복합체들의 역할과 이 복합체들을 억제하였을 때의 효과에 대하여는 향후 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 위의 결과를 종합해 볼 때 7KC에 의해 혈관평활근세포 내에 생성된 ROS를 통하여 HNE 생성이 유도되는 것으로 보이며, 이로 인해 증가된 HNE는 7KC에 의한 혈관평활근세포의 세포자멸사에 있어 중요한 중간인자로서의 역할을 하는 것으로 판단된다.

### 7KC와 HNE에 의한 Akt의 감소

혈관평활근세포의 생존력 감소는 죽상경화판(atherosclerotic plaque)의 불안정 및 파열, 혈관재형성, 동맥중간막 위축 및 석회화에 영향을 준다고 알려져 있으므로[7, 9, 21] 혈관평활근세포의 생존력 감소와 연관된 신호체계를 살펴볼 필요가 있다. 세포내의 다양한 신호전달물질 중 Akt는 혈관평활근세포의 증식, 이동 및 생존에 많은 관여를 하며[14], forkhead class O transcription factor 3a와 같은 친세포자멸사성 단백질의 인산화를 억제함으로써 혈관평활근세포의 세포자멸사를 방지한다고 알려져 있다[1, 31]. 본 연구에서는 7KC에 의한 혈관평활근세포의 생존력 감소와 Akt 간의 연관성을 검토하기 위하여 Akt의 양을 Western blot 실험으로 측정하였다. 그 결과 Akt의 양은 7KC의 농도(0~250  $\mu\text{M}$ )에 의존적으로(Fig. 3A) 그리고 HNE (10  $\mu\text{M}$ ) 처리시간에 의존적으로 감소하였다(Fig. 3B). 또한, 앞선 실험에서와 같이 DNPH (1~100  $\mu\text{M}$ ) 전처치 후 7KC를 처리하였을 때 7KC에 의하여 확연하게 감소하였던 Akt 양은 DNPH의 농도에 의존적으로 보존되었으며, NAC 전처치에 의하여도 현저히 억제되었다(Fig. 3C). 이러한 결과들은 7KC에 의한 혈관평활근세포내 ROS와 HNE의 생성을 막을수록 Akt 양이 보존됨을 시사하는 것으로 여겨진다.

### 단백질분해효소복합체에 의한 Akt 분해

세포내 신호전달체계 중 protein kinase B (Akt) 신호경로는 세포의 증식, 변환, 생존, 사멸 등의 세포 기능에 필수적인 세포생존 매개인자로 역할을 하는 바 특히 PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-Akt 신호체계는 유비퀴틴-단백질분해효소복합체(proteasome) 체계에 중요한 역할을 하며, 세포의 사멸을 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[11, 29]. 한편, Akt는 단백질분해효소복합체와 연관되어 분해되기도 하는데, 몇몇 화합물들이 caspase 또는 유비퀴틴화에 의존적으로 Akt의 단백질분해효소복합체에 의한 분해를 촉진하면서 Akt level을 조절하기도 하며[2, 10], oxysterol에 의한 단핵구-대식세포 세포주에서의 Akt의 감소가 단백질분해효소복합체 억제제에 의하여 현저히 억제되었다고 보고된 바 있다[25].

이를 토대로 본 연구에서는 oxysterol의 하나인 7KC에 의하여 Akt가 감소되는 것은 단백질분해효소복합체에 의한 분해에 기인되었을 것으로 추측하였다. 이를 증명하기 위하여 단백질분해효소복합체 억제제인 lactacystin (1  $\mu\text{M}$ )을 전처치하

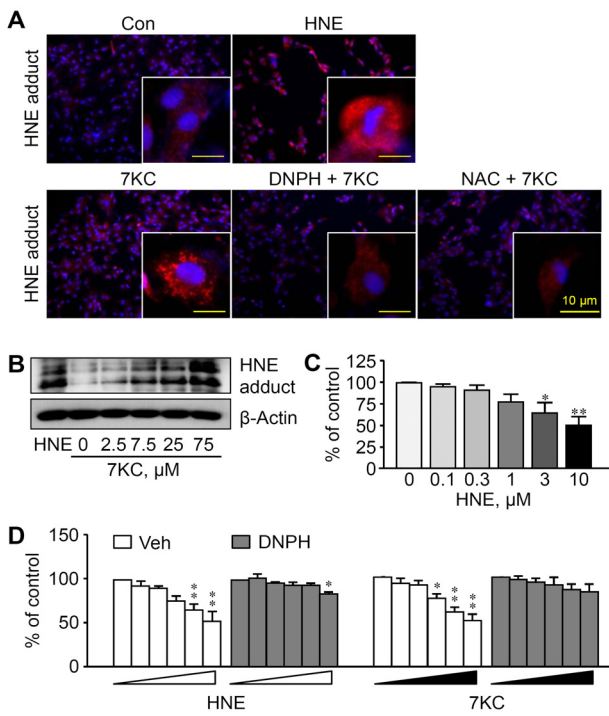


Fig. 2. Effect of 7KC on 4-hydroxynonenal induction. 4-Hydroxynonenal (HNE) adduct formation was determined with 25  $\mu\text{M}$  7KC by immunohistochemistry and Western blot analysis (A and B, respectively). VSMC viability was determined by MTT assay with indicated doses of HNE (C). Changes in VSMC viability in response to HNE (0~10  $\mu\text{M}$ ) or 7KC (0~250  $\mu\text{M}$ ) were determined in the presence or absence of 100  $\mu\text{M}$  2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (D). Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 4 experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control (0  $\mu\text{M}$ ).

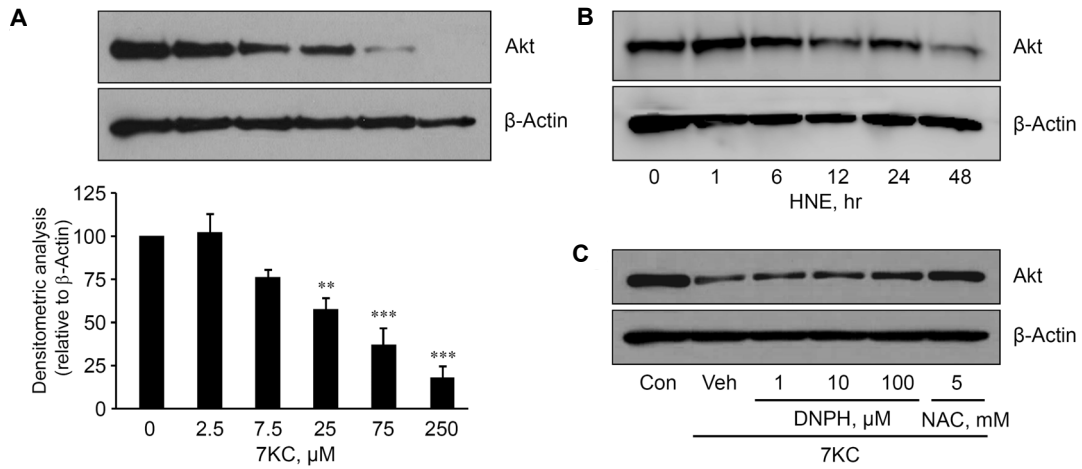


Fig. 3. Degradation of Akt by 7KC. VSMC were treated with the indicated concentrations of 7KC, and the total Akt level was determined by Western blotting. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 4 experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control (0  $\mu$ M) (A). The Akt level was determined by Western blotting at indicated times (0~48 hr) of exposure to HNE (10  $\mu$ M) (B). 7KC (25  $\mu$ M)-induced changes in Akt level were observed using Western blot with or without 1 hr pretreatment with DNPH (1~100  $\mu$ M) or N-acetylcysteine (NAC, 5 mM) (C).

여 앞에서 관찰된 7KC에 의한 혈관평활근세포의 세포자멸사와 Akt 감소가 억제되는지를 유세포 분석 및 MTT 분석을 시행하였다. Annexin V-양성 사멸세포는 7KC 처리군(37.9%)에서 증가하였으나 lactacystin 전처치에 의하여 감소(15.1%)하였고 이는 대조군(12%)과 유사하였다(Fig. 4A). 이러한 결과는 MTT 분석에서도 유사하게 나타났는데(Fig. 4B), 앞의 실험결과(Fig. 1)에서 처럼 혈관평활근세포의 생존력은 7KC의 농도가 증가할수록 감소하였지만 lactacystin 전처치에 의하여

7KC에 의한 생존력 감소가 나타나지 아니하였다. 더욱이, lactacystin을 농도별(0.01~10  $\mu$ M)로 1시간 전처치하였을 때 7KC에 의해 현저히 감소되었던 Akt의 양이 lactacystin의 농도에 의존적으로 보존되었다(Fig. 4C).

위의 결과들을 종합해 보면, 7KC에 의한 혈관평활근세포의 세포자멸사는 Akt 감소가 주원인이고, 7KC에 의한 Akt의 감소는 단백질분해효소복합체에 의한 Akt 분해를 경유하여 결과적으로 혈관평활근세포의 세포자멸사를 유도하는 것으로

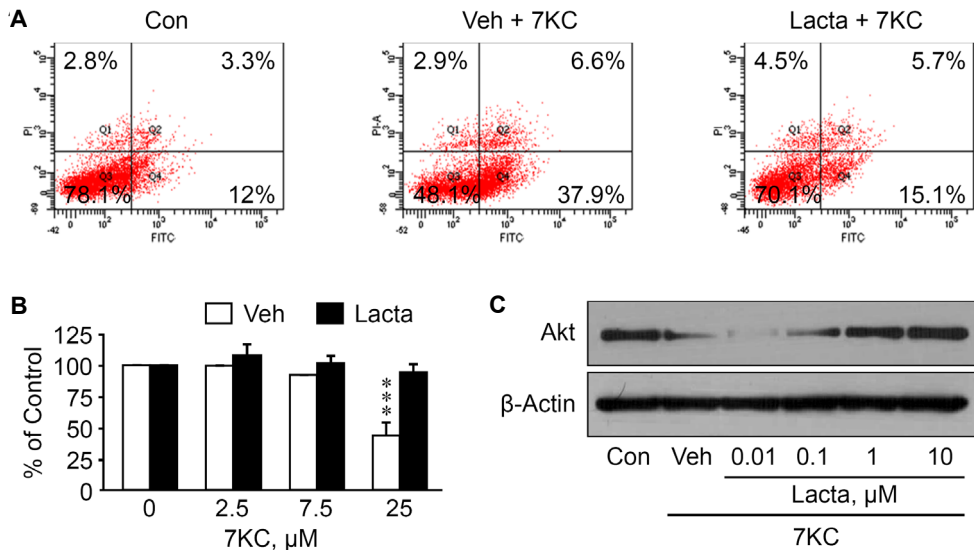


Fig. 4. Effect of proteasome inhibitor on 7KC-induced VSMC apoptosis and Akt degradation. 7KC-induced apoptosis of VSMC was analyzed by flow cytometry with or without 1 hr pretreatment with 1  $\mu$ M lactacystin (Lacta) (A), and VSMC survival was detected using MTT assay with or without pretreatment with Lacta. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs. control (0  $\mu$ M) (B). 7KC (25  $\mu$ M)-induced changes in total Akt level were determined using Western blot with or without pretreatment with Lacta (C).



보인다.

**7KC에 의한 HNE 증가와 Akt 감소의 관계**

지금까지의 결과들로 보아 7KC에 의한 혈관평활근세포의 세포자멸사에 있어서 세포내 HNE의 증가와 단백질분해효소 복합체에 의한 Akt의 감소가 주요 원인인 것으로 여겨진다. 7KC에 의한 초래되는 이 두 가지 현상이 가지는 상호연관성을 살펴보기 위하여 lactacystin 또는 NAC 전처리 후 7KC에 의한 HNE 부가물 생성의 변화를 면역침전 실험을 시행하였다(Fig. 5A). 그 결과 7KC에 의한 혈관평활근세포내 HNE 부가물 생성이 대조군에서보다 현저히 많이 생성되었고, NAC 전처리에 의하여 ROS가 제거되었을 때에는 생성되지 아니하였다. 반면, lactacystin 전처리군에서는 7KC 또는 HNE 단독 처치 때와 유사하게 혈관평활근세포내 HNE 부가물 생성이 증가하였다.

나아가, 면역침전 실험을 통하여 각 군에서 HNE 항체를 이용하여 면역복합체를 만들어 추출한 후 Akt를 확인하고, HNE에 결합된 Akt의 양을 측정하였다(Fig. 5B). Western blot

결과 Akt의 양은 앞에서의 결과와 마찬가지로 7KC와 HNE에 의하여 현저히 감소하였지만, DNPH 혹은 NAC 전처리에 의하여 대조군과 유사한 양으로 존재하였다. 한편, HNE에 결합된 Akt의 양은 7KC와 HNE에 의하여 월등히 증가하였을 뿐만 아니라 lactacystin을 전처리하여 단백질분해효소복합체에 의한 Akt 분해를 억제하였을 때에도 증가하였다.

이상의 결과들로부터 7KC는 혈관평활근세포 내에 ROS의 존적으로 HNE의 양을 증가시키고, 7KC에 의하여 증가된 HNE는 세포내의 중요한 생존매개인자인 Akt에 결합하며, HNE에 결합된 Akt는 단백질분해효소복합체에 의한 분해 과정을 통해 감소하는 것으로 보인다. 이에 따라 혈관평활근세포의 세포자멸사가 증가하는 것으로 생각된다.

**감사의 글**

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

**References**

- Allard, D., Figg, N., Bennett, M. R. and Littlewood, T. D. 2008. Akt regulates the survival of vascular smooth muscle cells via inhibition of FoxO3a and GSK3. *J. Biol. Chem.* **283**, 19739-19747.
- Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P. and Rosen, N. 2002. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* **277**, 39858-39866.
- Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R. and Rezzani, R. 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol. Histopathol.* **23**, 381-390.
- Brown, A. J. and Jessup, W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **142**, 1-28.
- Chapple, S. J., Cheng, X. and Mann, G. E. 2013. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* **23**, 319-331.
- Clarke, M. and Bennett, M. 2006. Defining the role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Cell Cycle* **5**, 2329-2331.
- Clarke, M. C., Littlewood, T. D., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M. and Bennett, M. R. 2008. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ. Res.* **102**, 1529-1538.
- Clarke, M. C., Littlewood, T. D., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M. and Bennett, M. R. 2008. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ. Res.* **20**, 1529-1538.
- Dickson, B. C. and Gotlieb, A. I. 2003. Towards under-

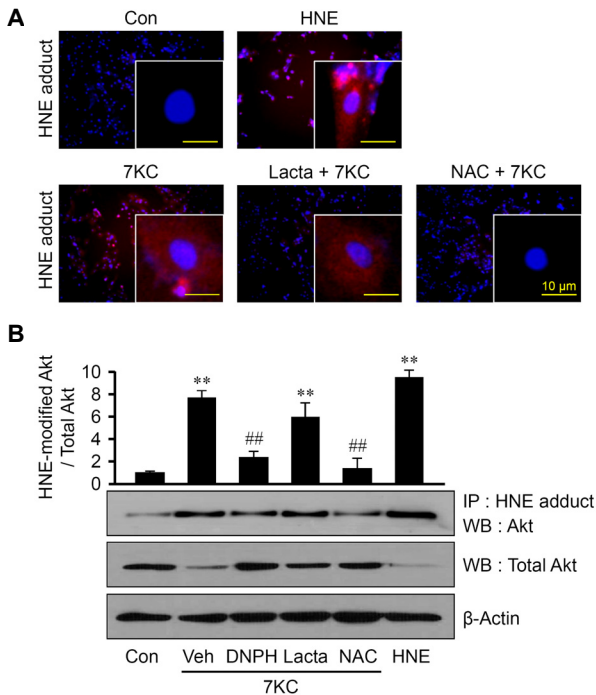


Fig. 5. Relationship between 7KC-induced HNE adduct and Akt. 7KC-induced HNE adduct was determined by immunohistochemistry with or without 1 hr pretreatment with 1 μM Lacta or 5 mM NAC (A). VSMC were exposed to 25 μM 7KC with or without pretreatment with DNPH (100 μM), Lacta or NAC. The level of HNE-modified Akt was determined by Western blotting with anti-Akt antibody after immunoprecipitation. Data are expressed as means ± SEM of 4 experiments. \*\**p*<0.01 vs. control (Con), ## *p*<0.01 vs. vehicle (Veh) (B).

- standing acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Cardiovasc. Pathol.* **12**, 237-248.
10. Doong, H., Rizzo, K., Fang, S., Kulpa, V., Weissman, A. M. and Kohn, E. C. 2003. CAIR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated Hsp90 client proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 28490-28500.
  11. Fan, Y., Xie, P., Zhang, H., Guo, S., Gu, D., She, M. and Li, H. 2008. Proteasome-dependent inactivation of Akt is essential for 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Apoptosis* **13**, 1401-1409.
  12. Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M. and Boatella, J. 1996. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.* **34**, 193-211.
  13. Korshunov, V. A. and Berk, B. C. 2008. Smooth muscle apoptosis and vascular remodeling. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 250-254.
  14. Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* **114**, 2903-2910.
  15. Lee, J. Y., Jung, G. Y., Heo, H. J., Yun, M. R., Park, J. Y., Bae, S. S., Hong, K. W., Lee, W. S. and Kim, C. D. 2006. 4-Hydroxynonenal induces vascular smooth muscle cell apoptosis through mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* **166**, 212-221.
  16. Leonarduzzi, G., Chiarpotto, E., Biasi, F. and Poli, G. 2005. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 1044-1049.
  17. Littlewood, T. D. and Bennett, M. R. 2003. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 469-475.
  18. Madamanchi, N. R., Hakim, Z. S. and Runge, M. S. 2005. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 254-267.
  19. Martinet, W. and Kockx, M. M. 2001. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 535-541.
  20. Martinet, W., De Bie, M., Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R., Herman, A. G. and Kockx, M. M. 2004. 7-Ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2296-2301.
  21. Martínez-Hervás, S., Vinué, Á., Núñez, L., Andrés-Blasco, I., Piqueras, L., Real, J. T., Ascaso, J. F., Burks, D. J., Sanz, M. J. and González-Navarro, H. 2014. Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc. Res.* **103**, 324-336.
  22. Ozaki, H., Miyashita, Y., Watanabe, H. and Shirai, K. 2005. Enhancement of MMP-9 activity in THP-1 cells by 7-ketocholesterol and its suppression by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin. *J. Atheroscler. Thromb.* **12**, 308-314.
  23. Perales, S., Alejandre, M. J., Palomino-Morales, R., Torres, C. and Linares, A. 2010. Influence of cholesterol and fish oil dietary intake on nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Nitric Oxide* **22**, 205-212.
  24. Perales, S., Alejandre, M. J., Palomino-Morales, R., Torres, C., Iglesias, J. and Linares, A. 2009. Effect of oxysterol-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells on experimental hypercholesterolemia. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 456208.
  25. Rusiñol, A. E., Thewke, D., Liu, J., Freeman, N., Panini, S. R. and Sinensky, M. S. 2004. AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 1392-1399.
  26. Sampey, B. P., Carbone, D. L., Doorn, J. A., Drechsel, D. A. and Petersen, D. R. 2007. 4-Hydroxy-2-nonenal adduction of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and the inhibition of hepatocyte Erk-Est-like protein-1-activating protein-1 signal transduction. *Mol. Pharmacol.* **71**, 871-883.
  27. Schroepfer, G. J. Jr. 2005. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361-554.
  28. Spiliopoulos, S., Diamantopoulos, A., Katsanos, K., Ravazoula, P., Karnabatidis, D. and Siablis, D. 2014. PolarCath cryoplasty enhances smooth muscle cell apoptosis in a rabbit iliac artery model: an experimental in vivo controlled study. *Cryobiology* **63**, 267-272.
  29. Suizu, F., Hiramuki, Y., Okumura, F., Matsuda, M., Okumura, A. J., Hirata, N., Narita, M., Kohno, T., Yokota, J., Bohgaki, M., Obuse, C., Hatakeyama, S., Obata, T. and Noguchi, M. 2009. The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev. Cell* **17**, 800-810.
  30. Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y. and Earnshaw, W. C. 2007. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp. Cell Res.* **313**, 3635-3644.
  31. Tucka, J., Yu, H., Gray, K., Figg, N., Maguire, J., Lam, B., Bennett, M. and Littlewood, T. 2014. Akt1 regulates vascular smooth muscle cell apoptosis through FoxO3a and Apaf1 and protects against arterial remodeling and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 2421-2428.
  32. Zhao, Y., Miriyala, S., Miao, L., Mitov, M., Schnell, D., Dhar, S. K., Cai, J., Klein, J. B., Sultana, R., Butterfield, D. A., Vore, M., Batinić-Haberle, I., Bondada, S. and St. Clair, D. K. 2014. Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 55-65.

## 초록 : 7-Ketocholesterol에 의한 Akt 감소와 혈관평활근세포의 세포자멸사

서교원 · 김치대 · 이원석\*

(부산대학교 의학전문대학원 약리학교실)

혈관평활근세포의 세포자멸사는 죽상경화증을 비롯한 여러 혈관질환에서 일어나며, 죽상판의 불안정화에 중요한 역할을 한다. Oxysterol은 혈관평활근세포의 세포자멸사를 야기하는데, 죽상경화 병변에는 비효소적으로 생성되는 주된 oxysterol인 7-ketocholesterol (7KC)이 대량 존재한다고 알려져 있다. 그러나 7KC에 의한 혈관평활근세포의 세포자멸사에 관하여 밝혀진 자세한 기전은 아직 미흡하다. 본 연구는 7KC가 혈관평활근세포의 세포자멸사를 일으키는 기전을 구명하고자 하였다. Sprague-Dawley계 숫쥐의 대동맥 절편으로부터 배양한 혈관평활근세포에 7KC를 처리하여 혈관평활근세포의 생존력의 변동과 세포자멸사를 각각 methylthiazole tetrazolium bromide 분석법 및 trypan blue 분석법 그리고 유세포 분석법, 면역 형광 측정법, 면역침전법 및 웨스턴블롯 등으로 측정하였다. 7KC는 혈관평활근세포의 생존력을 시간- 및 농도-의존적으로 감소시켰고, 혈관평활근세포내에 지질과산화 최종산물인 4-hydroxynonenal (HNE) 생성을 증가시켰으며, HNE 단독 처리 또한 혈관평활근세포의 생존력을 농도-의존적으로 감소시켰다. 7KC 또는 HNE에 의하여 감소되었던 혈관평활근세포의 생존력은 HNE 생성 억제제인 2,4-dinitrophenyl hydrazine 전처치에 의하여 회복되었다. 더욱이 세포생존 매개인자로 잘 알려져 있는 Akt의 발현이 7KC와 HNE에 의하여 농도-의존적으로 감소되었고, 2,4-dinitrophenyl hydrazine 또는 N-acetylcysteine 전처치에 의하여 회복되었다. 단백질분해효소복합체 억제제인 lactacystin은 7KC에 의한 세포자멸사와 Akt 감소는 억제하였지만 7KC에 의한 HNE 생성은 억제하지 못하였다. HNE에 결합된 Akt의 양은 7KC와 HNE에 의하여 현저히 증가하였으며 단백질분해효소복합체 억제제인 lactacystin 전처치 시에도 유의하게 증가하였다. 이상의 결과로 보아 죽상경화 병변에서 7KC는 혈관평활근세포내 HNE 생성을 증가시키고, 이 HNE에 결합된 Akt는 단백질분해효소복합체에 의하여 분해되는 것으로 보이며, 이와 같은 기전에 의하여 죽상판의 불안정화가 촉진되는 것으로 생각된다.