

혈관평활근세포에서 산화에너지대사 억제에 의한 아밀로이드전구단백질 대사의 변화

한문구 · 최웅* · 김현식* · 안희열*
한설희†

울지외과대학 신경과학교실
충북대학교 의과대학 약리학교실*,
신경과학교실†

Inhibition of Oxidative Energy Metabolism Alters Amyloid Precursor Protein Metabolism in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

Moon-Ku Han, M.D., Wong Choi, M.D.*, Hun-Sik Kim, M.D.*, Hee-Yul Ahn, M.D.*, Seol-Heui Han, M.D.†

Department of Neurology, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Department of Pharmacology*, and Neurology†, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Background : A reduction in the activity of cytochrome c oxidase (COX) has been recently identified in mitochondria from platelets and postmortem brain tissue of AD patients. Sodium azide (NaN_3), a COX inhibitor, is an effective chemical agent producing energy shortage and oxidative stress both *in vitro* and *in vivo* system. Furthermore, it has been suggested that vascular compromise could be either directly involved in AD pathogenesis or indirectly associated with triggering pathogenetic events leading to AD. This study was performed to investigate amyloid precursor protein (APP) metabolism by inhibition of mitochondrial energy metabolism in cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Materials and Methods :** VSMCs isolated from the aorta of seven weeks old Sprague-Dawley rat were treated with NaN_3 in a low concentration (100-500 μM) or in a high concentration (1-100 mM). Cellular proliferation and viability were determined by MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay. Cellular APP was detected with N-terminal specific antibody 22C11. Cell death was determined by observation of morphology and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling stain (TUNEL). We used ginkgo biloba extract (EGb761) and melatonin as anti-oxidants to investigate the mechanism of altered APP metabolism. **Results :** The viability of VSMCs was increased after treatment with 1 mM and 10 mM NaN_3 ($p < 0.05$) until 3 hr and then diminished. Many TUNEL positive cells were found in 10 mM and 100 mM treatment group, but were not apoptotic in nature. 22C11 immunoreactivity was not changed at 3 hr, 6 hr, 12 hr. Anti-oxidants reduced cellular proliferation ($p < 0.05$), but did not block TUNEL positivities and did not influence the 22C11 immunoreactivity. In a low concentration NaN_3 treatment group, the viability of VSMCs was increased concentration dependently ($p < 0.05$). Immunoblot with 22C11 showed the concentration dependent decrease at 145 kDa, 125 kDa, and high molecular weight range (>160 kDa). TUNEL staining showed DNA fragmentations and condensations of nuclear chromatin suggesting apoptosis. After treatment with anti-oxidants, the cellular proliferation was more decreased ($p < 0.05$), and TUNEL positive cell deaths were blocked. Immunoreactivities of 125 kDa (immature APP), 145 kDa (mature APP), and higher molecular weight bands were recovered below 400 μM of NaN_3 . Immunoreactivity of 145 kDa was recovered in only 100 μM NaN_3 treated group. **Conclusions :** The presumed mechanism of low concentration COX inhibitor is the overproduction of reactive oxygen species resulting from a depression of the mitochondrial electron transport chain, whereas potential consequence of high concentration COX inhibitor might be related to depression of ATP synthesis and bioenergetic impairment. Reactive oxygen radicals in response to low concentration COX inhibitor alters the processing of APP in VSMCs. This investigation demonstrated an altered APP metabolism as a peripheral marker of AD. Therefore VSMCs treated with low concentration COX inhibitor could be considered as a novel *in vitro* model of AD.

Key Words: Vascular smooth muscle cells, Sodium azide, Reactive oxygen species, Amyloid precursor protein, Alzheimer's disease

Address for correspondence

Seol-Heui, Han, M.D.
Department of Neurology, Chungbuk National
Hospital, 62 Gaeshin-dong, Heungduk-gu,
Cheongju 361-711, Korea
Tel: +82-43-269-6372
Fax: +82-43-276-8929
E-mail: shhan@med.chungbuk.ac.kr

서 론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 서서히 진행되는 기억장애, 인지기능의 저하, 행동이상 등의 임상적 특징을 갖고 있으며, 신경병리학적으로는 신경세포 소실 외에 노인반(senile plaque), 신경세포 내의 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangle), 그리고 아밀로이드혈관병증(amyloid angiopathy) 등의 특징적인 소견을 나타낸다[1]. 특히, 노인반과 혈관병증의 주요 구성 성분인 불용성의 베타아밀로이드(β amyloid, $A\beta$) 단백질은 AD 발병 기전과 매우 밀접하게 관련되어 있어, 최근까지 AD 발병 기전을 설명해주는 가장 중요한 학설로 인정되어 왔다(amyloid hypothesis). 그러나 $A\beta$ 가 어떻게 생성되어 어떤 기전으로 신경독성과 혈관병증을 유발하며 또 어떻게 치매의 임상증상과 연관되는지에 대하여는 아직 확실한 결론이 나오지 않고 있다[2]. 또한 AD는 신경계만을 침범하는 질환일 뿐만이 아니라 전신질환으로서, 신경계조직이외의 많은 말초조직에서 아밀로이드전구단백질(amyloid precursor protein, APP)과 $A\beta$ 의 변화가 발생한다. 이러한 APP와 $A\beta$ 의 변화들은 AD의 말초지표로서 인정되고 있고, AD에서 이러한 말초조직의 변화는 중추신경계의 변화나 병 자체의 진행과 연관성을 갖고 있음이 증명되고 있다[3].

최근에 AD환자에서 미토콘드리아 에너지대사의 결여와 산화적 자극(oxidative stress)에 의해 정상적인 APP의 단백질 분해과정이 변형되어 많은 $A\beta$ 염기서열을 포함한 비 가용성 아밀로이드전구단백질(insoluble APP) 등의 대사물(metabolite) 또는 중간체(intermediate)들이 생성되는 것이 밝혀졌다. 이러한 미토콘드리아 에너지대사 이상의 생화학적 변화가 AD의 발생에 있어서 기본적인 발병기전일 것이라는 가설에 대한 증거들이 발표되고 있는데, 대표적인 것이 cytochrome c oxidase (COX)의 이상이다. AD환자의 혈소판에서 Parker 등이 1990년 처음으로 COX 활동성 결손을 발견하였고, 1992년 Kish 등이 AD환자 뇌 조직에서 COX 활동성 결손을 발견하였다[4, 5]. AD환자들의 뇌 조직 중, 특히 전두엽, 두정엽 그리고 해마 부위에서 미토콘드리아 전자전달계의 기능이 전체적으로 저하되어 있고, 많은 전자전달계의 효소 중 특히 COX 활동성이 50% 이상 뚜렷하게 감소되었음이 밝혀졌다[4]. 이후 여러 연구자들에 의해 COX 활동성 결손과 AD 발병기전과의 관계를 규명하기 위한 연구가 시행되어 왔다[6-8]. 3 mM 이상의 고농도 NaN_3 을 짧은 시간(2시간) 투여하는 방법으로 COX의 기능을 차단한 연구가 있었으나, 이 방법으로는 세포가 사망 상태에서 세포내의 급격한 변화를 보여주게 되므로, 장기간에 걸친 세포 손상으로 발생하는 AD의 인체 병인론에 적용할 수 있는 모델을 만들 수 없었다.

본 연구에서는 미토콘드리아의 효소 중 산화에너지대사(oxidative energy metabolism)에 관여하는 중요한 효소이면서, AD환자에서 기능 이상이 밝혀져 있는 COX의 기능 억제제

인 sodium azide (NaN_3)를 다양한 농도로 사용하여 AD의 인체 병인론에 가장 근접한 미토콘드리아 기능이상 모델을 만들고, 산화 에너지대사 이상 등에 의한 세포 내 APP 대사의 변화, 세포사, 세포증식 정도를 관찰하였다[9, 10]. 그리고 항산화제를 투여한 후 나타나는 NaN_3 효과의 차단 또는 변화를 관찰함으로써 세포 내 APP 대사의 변화와 세포사의 기전을 알아보고자 하였다. 또한 기존의 AD 연구에서 주로 사용되어 오던 신경세포 대신에 아직까지 AD의 미토콘드리아 기능이상 연구에서는 시도된적이 없는 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)를 이용하였다.

방 법

1. 실험재료

실험에 사용한 혈관평활근세포는, 7주된 Sprague-Dawley Rat의 대동맥에서 분리한 VSMCs를 이용하였다. 사용된 배양액은 DMEM 배양액에, 50 mL의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 5 mL의 항생제(penicillin과 streptomycin, PS), 2 mL의 1 M HEPES, 5 mL의 200 mM glutamine을 섞었다. 세포 배양은 5% CO_2 , 95% 공기가 공급되는 37°C 배양기를 사용하였다. COX 활성 억제를 위하여 NaN_3 을 사용하였다. 실험시는 100 μM 에서 100 mM 까지의 농도로 3차 증류수에 희석하여 투여하였다. 항산화제로서 EGB761과 melatonin을 사용하였다. EGB761을 0.5 mg/mL의 농도로 투여하였고 Melatonin은 100 μM 로 투여하였다. APP 대사의 변화를 관찰하기 위해서 일차항체로서 Anti Alzheimer Precursor Protein A4 (22C11)를 사용하였고 이차항체로는 anti-mouse IgG, horseradish peroxidase를 사용하였다. 세포사를 관찰하기 위한 TUNEL 염색은 In Situ Cell Death Detection Kit, POD을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포의 생존력(viability) 및 증식(proliferation) 관찰

세포의 생존력과 증식 분석을 위하여 96 well plate에 세포수를 5×10^4 cells/mL로 2일간 배양하고 24시간동안 0.2% FBS DMEM 배양액에서 starvation을 시행하였다. 이후 다양한 농도의 NaN_3 을 투여 농도별로 각각 8개의 well들에 단독 또는 항산화제를 전처치후 투여하였고 시간 변화에 따라 MTS 방법으로 세포증식 정도를 측정하였다. 세포증식(cell proliferation) 또는 화학적민감성(chemosensitivity) 평가시에 살아있는 세포의 숫자를 결정해주는 비색분석법(colorimetric method)인 MTS방법은, 비 가용성인 MTS가 대사가 활발한 세포의 dehydrogenase에 의해서 수용성의 formazan이라는 물질로 전

환되고, 전환된 formazan은 490 nm의 흡광도에서 측정되며, 측정된 흡광도는 세포 배양액 속에 살아있는 세포의 숫자와 직접적으로 비례하여 표시된다. 100 μ M에서 500 μ M까지 저농도 투여시는 NaN_3 투여 후 7일간을 배양하면서 매일 세포증식 정도를 측정해서 시간경과에 따른 변화를 관찰하였다. 1 mM 이상 고농도로 처리한 경우에는 NaN_3 투여 후 24시간동안 관찰하면서 세포 생존력과 증식을 관찰하였다. 위와같은 방법으로 배양하면서 시간경과에 따른 세포증식 변화를 관찰한 후, 각각의 NaN_3 농도군에서 세포증식이 감소하기 시작하는 시기를 관찰하여 APP의 변화와 세포사의 변화를 관찰하는 기준 시점으로 정하였다.

2) 세포내 APP의 변화

VSMCs가 60-70% 정도 포화되었을 때 24시간동안 0.2% FBS DMEM 배양액에서 starvation시킨후 100 μ M에서 500 μ M의 저농도 NaN_3 을, 1 mM 이상 고농도 NaN_3 을 단독 또는 EGb761를 전처리한 후 위의 세포증식 관찰 실험에 따른 정해진 기간동안 배양하였다. 1 mM 이상 고농도 투여군에서는 0.2% FBS DMEM 배양액을 유지하면서 배양하였다. 정해진 기간 배양후 정량한 단백질 50 μ g에 해당하는 시료를 취하여, 10% SDS gel에서 전기영동을 실시하였다. 22C11 항체를 일차 항체로서 이용하여 overnight 반응을 시킨 후, 이차항체 anti-mouse IgG, horseradish peroxidase을 사용하여 1시간 동안 실온에서 반응을 시켰다. 다시 40분간 TBST로 세척한 후 ECL 반응을 시킨 후 변화를 관찰하였다.

3) 세포사 관찰

대조군을 기준으로 더 강하고 진하게 갈색으로 염색되는 세포를 세포의 형태에 관계없이 TUNEL 염색 양성으로 판단하였다. 세포가 강하게 염색되면서 핵축축(pyknosis) 소견을 보이거나, 핵이 작은 포도송이들처럼 여러 개로 분절(fragmentation)되어 보이는 것은 세포고사(apoptosis)를 시사하는 소견으로 정의하였다[11]. 강하고 진하게 염색된 핵이, 정상 핵보다 크게 나타나고 핵 모양이 삼각형(triangular shape), 타원형, 또는 분산상(dispersed shape)이거나, 정상 염색강도를 보이는 것과 섞여서 망상형(reticular shape)의 형태로 보일 때 세포괴사(necrosis)의 소견으로 정의하였다[12-14].

세포핵 TUNEL 염색과 관찰을 위해서 세포를 24 well plate에 세포수를 2×10^4 cells/mL로 하루 정도 배양하고, 24시간동안 0.2% FBS DMEM에서 starvation을 시행한 후 NaN_3 을 단독 또는 EGb761를 전처리한 후 투여하였다. 그리고 투여하는 NaN_3 의 농도에 따라서 위의 세포증식 관찰 실험에 따른 정해진 기간동안 배양후 각각 염색을 시행하였다. 염색시 금속촉진기질(metal enhanced substrate)로서 DAB substrate를 첨가하였다. 세포 관찰을 위해서 위상차현미경인 Olympus IV50-11을 사용하였고, 이 현미경에 JVC TK1380U (768 \times 494) 카메라를

연결하고 Image-Pro Plus V3.0 프로그램을 이용하여 세포사를 관찰하고 촬영하였다. DNA 분절화(fragmentation)를 검사하기 위하여 고식적인 Southern blot를 시행하였다.

5) 자료 통계분석

NaN_3 투여군과 대조군 비교와 EGb761의 투여전후 효과를 비교하기 위해서 ANOVA, Mann-Whitney U, Wilcoxon signed rank 검정을 시행하였다.

결 과

1. 세포 생존력(viability)과 증식(proliferation) 분석

1) 저농도 NaN_3 투여 후 변화

NaN_3 을 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M의 저농도로 투여한 후 시간별로 세포증식 정도를 MTS assay로 측정하였다. 2일째부터 대조군과 비교하여 모든 농도에서 세포증식이 증가하기 시작하였고, 3일째의 세포증식 정도는 500 μ M ($p > 0.05$) 투여군을 제외한 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M 투여군에서 대조군에 비해 각각 12%, 47%, 43%, 41%씩 증가하였다($p < 0.05$). 5일째와 6일째에는 300 μ M 농도 이상에서 대조군에 비해서 세포증식 정도가 감소하는 양상을 보이기 시작했다. 7일째는 200 μ M 농도 이상 모든 농도군에서 대조군에 비해서 세포증식 정도가 감소하는 양상을 보였다.

항산화제인 EGb761을 0.5 mg/mL로 전처리하고 3일째에 관찰했을 때, 대조군보다 세포증식이 40-50% 억제되는 양상을 보였다($p < 0.01$). Melatonin을 전처리한 경우에는 300 μ M 이상의 투여군에서는 EGb761 투여군과 같은 정도의 세포증식 억제효과를 보였다($p < 0.05$).

활성산소(reactive oxygen species)와 같은 산화적 자극에 의해서 VSMCs의 성장과 증식여부를 관찰하기 위해 H_2O_2 를 투여하였다. H_2O_2 를 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M의 농도로 직접 투여하고 세포증식 정도를 관찰하였다. 300 μ M 농도까지 대조군에 비해서 세포증식 정도가 증가하였다. 30 μ M에서 100 μ M까지는 농도에 비례해서 증가하였고, 100 μ M을 정점으로 세포증식 정도의 증가폭이 감소하는 분포를 보였다. 항산화제를 투여하였을 때, H_2O_2 투여 후에 나타나는 세포증식의 증가폭이 감소하는 형태를 보였으며, 이러한 소견은 NaN_3 을 투여했을 때와 같은 양상의 세포증식의 변화를 보였다.

2) 고농도 NaN_3 투여 후 효과

NaN_3 을 1 mM, 10 mM, 100 mM의 고농도로 투여한 후 시간별로 세포증식 정도를 관찰하였다. 3시간 노출에서 1 mM과 10 mM 투여군에서 세포증식이 대조군과 비교하여 각각 23%,

39%씩 증가하였고($p<0.05$), 100 mM 투여군에서는 세포증식의 감소가 관찰되었다. 12시간 이후부터 24시간 경과 사이에 세포증식 정도는 모든 농도에서 대조군에 비하여 세포증식 감소가 관찰되었다.

항산화제 EGb761과 melatonin을 전처리하였을 경우, 3시간 경과시점에서 1 mM, 10 mM에서 세포증식 증가 정도가 NaN_3 를 단독 투여했을 때보다 억제되었다. 그러나 100 mM에서 세포증식 정도는 오히려 대조군이나 다른 농도군들보다 20%이상 증가하였다($p<0.05$).

2. 세포내 APP의 변화

1) 저농도 NaN_3 투여 후 효과

저농도로 투여한 후 3일째 항체 22C11의 면역반응성을 관찰하였다. 160 kDa 이상 고분자량 단백질들의 면역반응성만이 관찰되었고, 농도가 높을수록 반비례해서 점차적으로 감소하였다. 대조군에서 면역반응성이 뚜렷한 band로 보이던 125 kDa과

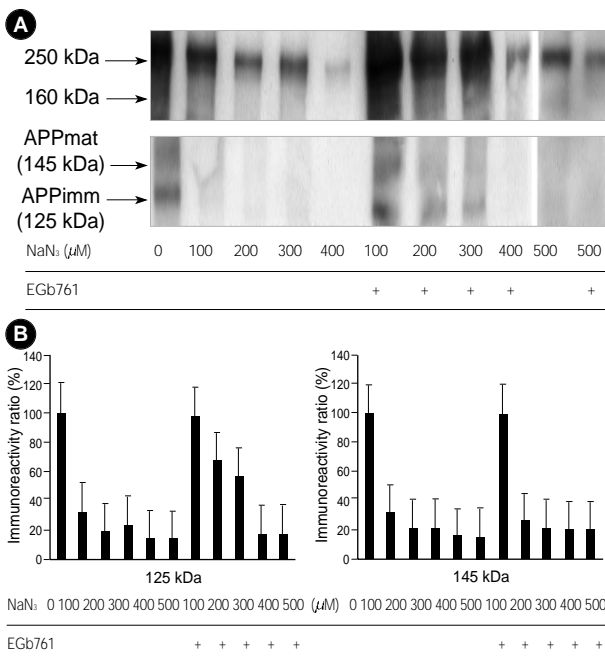


Fig. 1. The alteration of cellular APP metabolism in cultures of vascular smooth muscle cells treated with different low concentration NaN_3 for 3 days. (A) Immunoblot analysis of altered cellular APP metabolism in presence of increasing NaN_3 concentrations. Immunoprecipitations were performed with N-terminal APP specific antibody 22C11. After treatment with NaN_3 , immunoreactivities of high molecular weight were decreased in the presence of increasing NaN_3 concentration. Immunoreactivities of 145 kDa and 125 kDa N-terminal derivatives were disappeared. After treatment of NaN_3 and EGb761, immunoreactivity of 145 kDa N-terminal was not detected and 125 kDa N-terminal derivative was precipitated in presence of 100 μM to 300 μM NaN_3 . (B) Results of densitometrical quantitative analysis are mean \pm S.D. Cellular APP was expressed as % of control.

145 kDa 단백질의 면역반응성은 모든 농도에서 소실되었다.

EGb761을 투여한 후 100 μM 에서 300 μM 까지의 농도에서 125 kDa의 단백질 band, 160 kDa과 250 kDa 이상 고분자량 단백질들의 면역반응성 강도들이 대조군과 차이가 없을 정도로 회복되었다. 그렇지만 회복의 정도에서 차이를 보였는데, 125 kDa과 145 kDa의 단백질 band의 면역반응성 강도는 100 μM 의 농도에서는 대조군과 같은 정도로 회복되었고, 200 μM 과 300 μM 에서는 125 kDa이 약하게 회복되었으며, 145 kDa은 200 μM 이상에서는 면역반응성의 회복이 뚜렷하지 않았다(Fig. 1).

2) 고농도 NaN_3 투여 후 효과

NaN_3 을 1 mM, 10 mM의 고농도로 투여한 후 3, 6, 12시간 경과시 항체 22C11의 면역반응성을 관찰하였다. 시간별로 면역반응성 강도의 차이는 없었다. 1 mM, 10 mM, 100 mM을 투여하고 3시간 후 모든 농도에서 대조군과 차이가 없는 면역반응성 강도를 나타냈고, 항산화제인 EGb761을 같이 투여한 후에도 투여전과 차이가 없었다(Fig. 2).

3. 세포사 관찰

1) 저농도 NaN_3 투여 후 효과

NaN_3 투여 후 3일째에 각 투여 농도군을 200 \times 배율에서 관찰했을 때 평균 3%, 3%, 4%, 6%, 10%의 TUNEL 양성 세포들을 보였다. 500 μM 투여군을 제외한 다른 군에서는 TUNEL 양성 세포들은 핵농축과 핵분절 등의 세포고사를 시사하는 소견을 관찰할 수 있었고, 세포괴사를 시사하는 소견은 관찰되지 않았다. 500 μM 투여군의 10% TUNEL 양성 세포들 중에서 핵분절 등의 세포고사가 의심되는 경우가 절반정도였

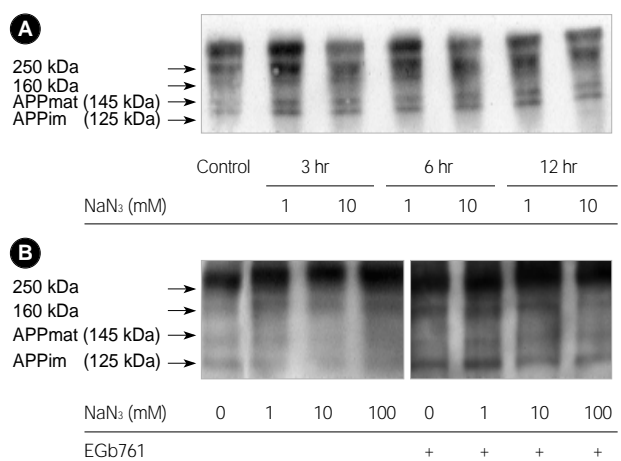


Fig. 2. The alteration of cellular APP metabolism in cultures of vascular smooth muscle cells treated with different high concentration NaN_3 for 3 hr. 22C11 immunoreactivity was not changed in the presence of 1 mM and 10 mM NaN_3 at 3 hr, 6 hr, 12 hr (A) and in the presence of increasing NaN_3 concentrations pre- and post-treatment with EGB761 (B).

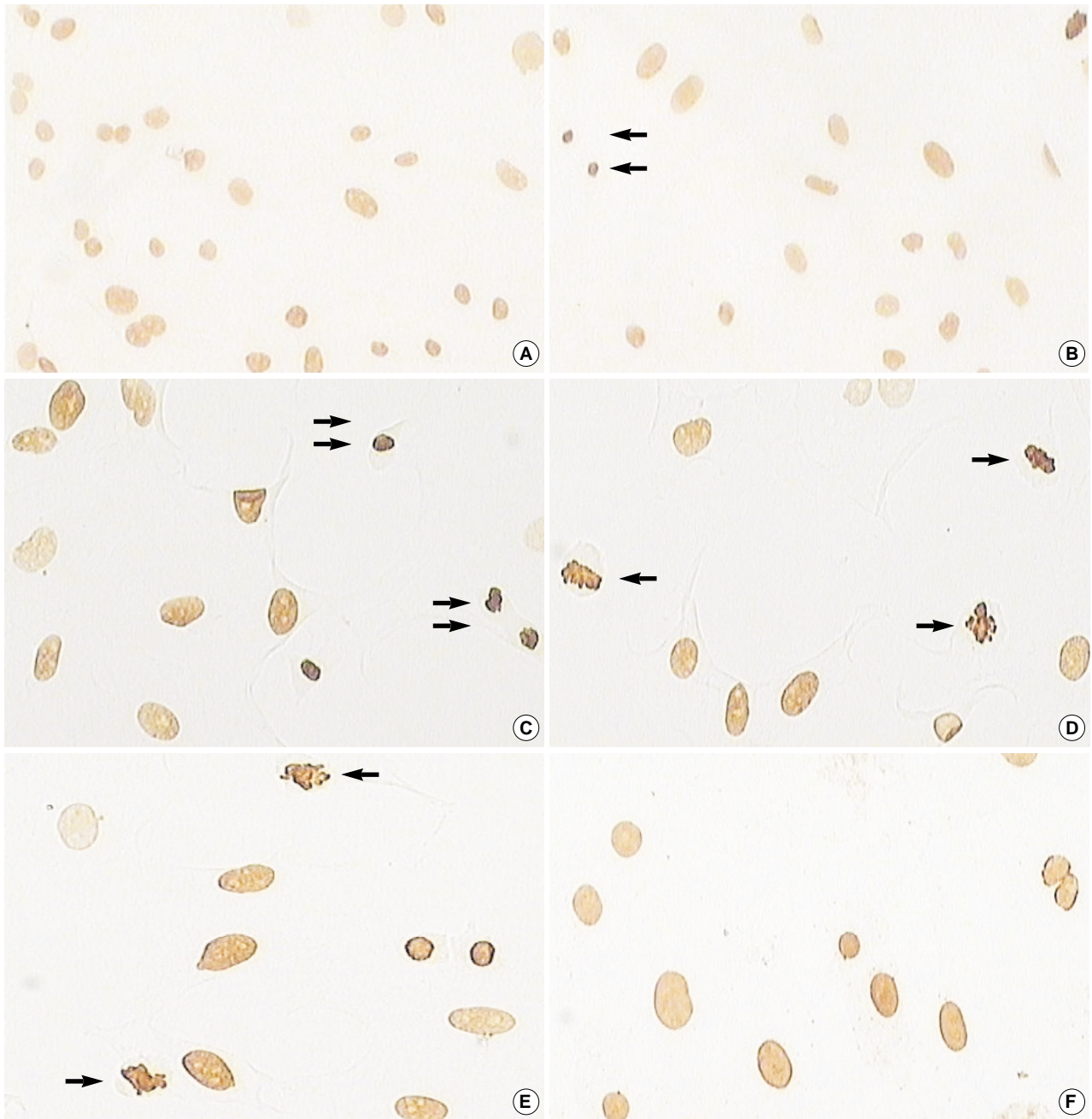


Fig. 3. TUNEL staining of vascular smooth muscle cells after treatment with low concentration NaN_3 and EGb761 (0.5 mg/mL). Control (A), 100 μM (B), 200 μM (C), 200 μM (D), 400 μM (E), 400 μM +EGb761 (F). TUNEL-positive cells were disappeared after treatment with EGb761. Single arrow: nuclear fragmentation. Double arrows: nuclear condensation. Magnification: A and B; 100 \times . C, D, E, F; 200 \times .

고, 나머지 50%에서는 세포고사나 세포괴사로 구별학 어려운 중간형태의 소견이 관찰되었다. 항산화제인 EGb761을 전처리 하였을 때 세포고사를 포함하는 모든 TUNEL 양성 세포들의 이상소견이 모두 차단되었다(Fig. 3).

2) 고농도 NaN_3 투여 후 효과

NaN_3 투여 후 3시간째에 관찰했을 때, 1 mM 투여군에서는

세포핵이 진한 갈색으로 넓게 염색되면서 크게 보이는 세포사를 시사하는 TUNEL 양성 세포들이 4% 관찰되었다. 10 mM, 100 mM 투여군에서는 세포사를 시사하는 TUNEL 양성 세포들이 각각 10%, 40%가 관찰되었고, 뚜렷한 세포괴사 또는 고사의 소견이나 정상군과는 다르게 중간정도의 색으로 염색되는 10%정도의 세포들이 있었다. 항산화제인 EGb761을 전처리하였을 때, 저농도 투여군과는 달리 NaN_3 을 단독 투여하였을 때

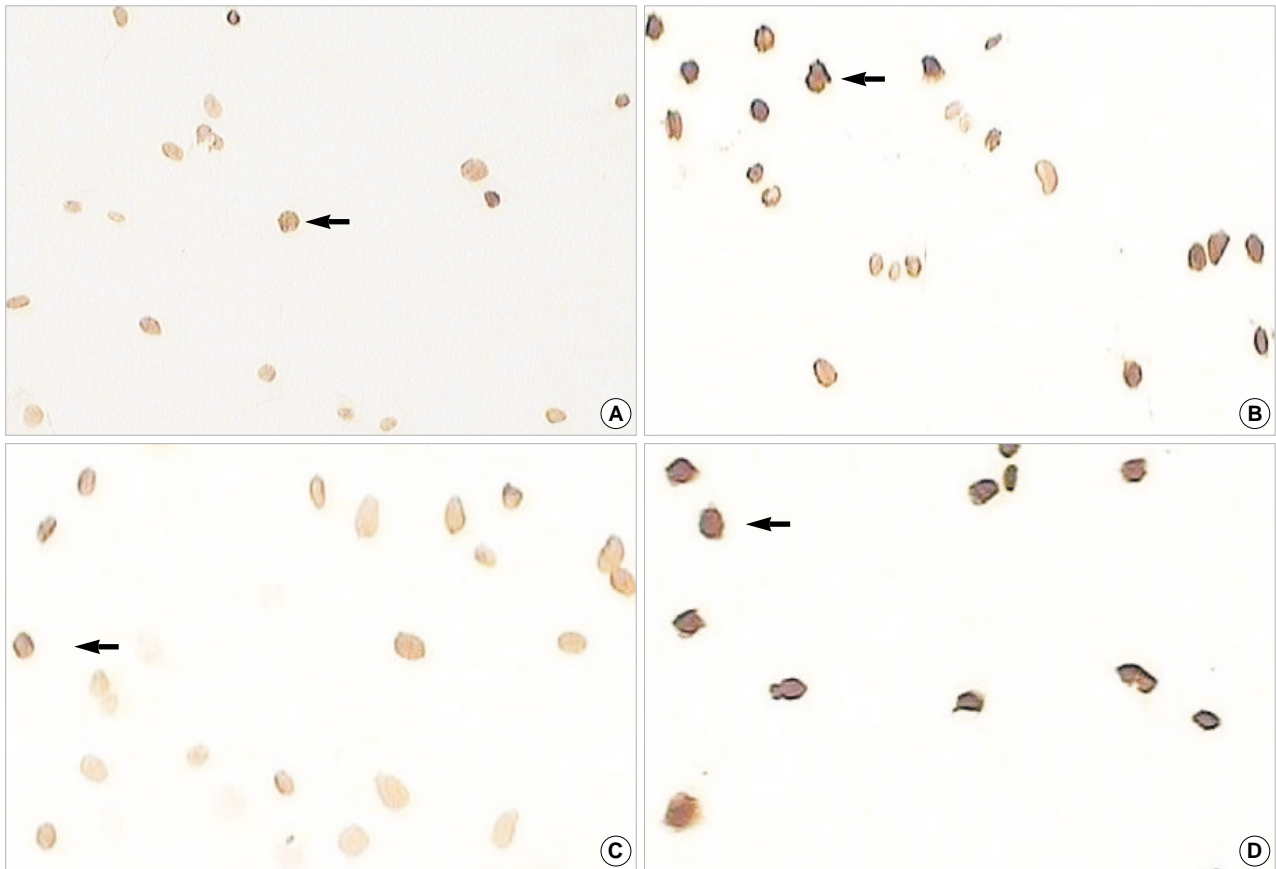


Fig. 4. TUNEL staining of vascular smooth muscle cells after treatment with high concentration NaN_3 and EGb761. 10 mM (A), 100 mM (B), A+EGb761 (C), B+EGb761 (D). Necrotic cells showed a large, dispersed, dark brown TUNEL positivity. TUNEL positive cells can be seen after treatment with EGb761. Arrow: large, dark brown nucleus. Magnification: $\times 100$.

나타나는 TUNEL 양성 세포의 병리학적인 이상 소견들이 항산화제에 의해서 차단되는 소견은 없었다(Fig. 4).

4. DNA 분절화(fragmentation)

NaN_3 을 저농도로 각각 투여한 후 3일째 되는 날에 실시한 DNA 분석에서 세포고사를 시사하는 특징인 DNA 분절 소견인 DNA ladder의 경향은 보이지 않았고, 대조군과 동일하게 DNA가 gel plate의 상단에 머물러 있는 DNA상태를 보였다. 고농도 NaN_3 을 투여하고 3시간 경과 후에도 역시 대조군과 같은 DNA상태를 보였다.

고 찰

최근연구에서 AD 환자의 뇌 조직과 말초 조직에서 미토콘드리아 효소 중, COX의 촉매 활성(catalytic activity)이 감소되어 있는 것이 밝혀지고 있다. 특히 뇌에서는 해마와 측두엽에서 선택적으로 많이 감소되어 있다[5]. COX의 정상적인 기능은

전자전달체계(electron transport chain, ETC)의 전자 전달의 마지막 단계에서 역할을 하며, 전자 전달 중에 발생하는 수소가 온돌이 미토콘드리아의 안쪽 벽을 통과하여 두 개의 막사이의 matrix로 이동한 후, 미토콘드리아 내부로 특정한 막 통로를 통해서 들어올 때 ATP가 발생하게 된다[4]. 결국은 COX의 활동성 저하는 ATP의 생산 저하를 가져오게 된다. AD에서 이와 같은 에너지의 감소는 protein kinase를 활성화시키게 되어, 비정상적인 단백질의 인산화를 일으켜서 신경원섬유농축체(neurofibrillary tangle)를 만드는 것으로 여겨지며, 또한 ETC의 이상으로 인해 정상적인 전달체계로부터 발생된 전자는 분자산소와 반응하여 활성산소(reactive oxygen radical)를 발생시킨다. 특히 강력한 자유유리기(free radical)인 수산화유리기(OH^\cdot -radical)와, 지질과산화(lipid peroxidation)가 발생함으로써 APP 분열과정의 이상을 유발하며, 결국에는 세포 안에서 분자단위의 A β 축적 등의 변화를 일으킨다[15]. 이러한 변화의 원인에 대하여, 현재까지의 연구에서는 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 돌연변이 등의 DNA수준에서의 이상이 기본적인 원인으로 여겨지고 있다[16].

최근에 인위적으로 COX의 기능을 억제하는 약물을 투여함

로서 COX 활동성의 억제를 이용한 AD의 시험관내 새로운 모델을 제시하고, AD의 원인과 발병기전 그리고 세포 내 변화를 COX 기능과 연관지어서 밝히려는 연구들이 시도되고 있다. Gabuzda 등은 3 mM의 NaN_3 을 COS 세포에 2시간동안 투여하고 APP로부터 11.5 kDa의 C-종말유도체(C-terminal derivative)가 생성됨을 관찰하였다[9]. Gadparini 등은 NaN_3 을 500 μM 이상 투여 시 sAPP의 생성이 증가함을 보고하였다[10]. 이와 같은 결과들에서 COX의 기능을 NaN_3 로 차단할 때 APP 분열과정에 변화가 발생하며, 세포 밖으로의 sAPP 배출을 일으키고 세포내에 $\text{A}\beta$ 의 축적 등이 발생한다는 것을 관찰할 수 있었다.

그러나 이전의 연구들에서는 500 μM 에서 3 mM 이상의 고농도 NaN_3 을 짧은 시간동안 투여하여 세포가 사망에 이르는 정도로 과도한 에너지부전 상태를 만든 후, 이때 발생하는 세포내 대사의 변화를 관찰하였고, APP가 세포내 분비경로(secretory pathway)를 지나면서, 특히 소포체(endoplasmic reticulum)나 골지복합체를 통과할 때 많은 양의 $\text{A}\beta$ 가 발생하는 것으로 주장하였다[9]. 위와 같은 고농도의 NaN_3 을 투여하여 COX의 기능을 차단하는 방법은 에너지부전 상태를 유발함으로써, 일시에 세포내 대사의 이상을 일으키고 세포내의 변화를 관찰하기는 용이하지만, 여기서 얻어진 결과를 인체질환 병인론에 직접 적용하기에는 많은 문제점이 있다. 일반적으로 대부분의 $\text{A}\beta$ 발생은 막단백질 상태의 APP로부터 발생하며, 분비경로로부터의 $\text{A}\beta$ 발생은 실제 생체 내에서는 소량에 불과하다. 실제 AD에서처럼 오랜 기간동안 미토콘드리아 기능의 억제된 상태에서 세포의 손상, 세포사, 대사의 이상이 발생하는 것과는 상당한 차이가 있을 것으로 생각된다. 그러므로 고농도 NaN_3 투여 모델은 AD의 병인론에 접근하기 위한 방법으로는 부족하므로 COX 기능 억제를 이용한 새로운 AD 모델이 요구된다. Cassarino 등은 신경모세포종(neuroblastoma)인 SY5Y 세포에 NaN_3 을 50 μM 에서 300 μM 까지의 저농도로 3일간 투여했을 때 COX 활동성이 20% 이하로 의미 있게 감소됨을 보고하였다[17]. 본 연구에서는 직접적인 세포사를 일으키지 않는 저농도의 NaN_3 투여를 시도하여 심한 세포손상이나 에너지부전상태가 일어나지 않을 정도로 COX 억제 상태를 만든 후, 장시간동안 노출시킴으로써 병태생리학적으로 실제 AD에 근접한 병인 모델을 만들어 관찰하려고 하였다. MTS 방법을 이용하여 세포증식 정도와 세포의 생존력을 관찰한 결과, 세포가 NaN_3 투여에 의한 직접적인 세포사와 세포손상 없이 견딜 수 있는 농도와 시간은 각각 400 μM 이하, 3일이었다. 고농도의 NaN_3 투여시에서는 3시간이내의 초기에는 세포증식의 소견을 보였으나 100 mM 농도에서는 투여 3시간이내의 초기상태부터 세포증식이 억제되었고, 12시간이후에는 모든 농도에서 세포증식이 감소하는 양상이었다.

위의 결과들로부터 저농도군에서 관찰되는 VSMCs의 증식은, NaN_3 투여시 ETC에서 발생한 전자가 분자산소와 반응해서 만들어진 활성산소에 의해서 장기간 저농도로 자극되어서 발

생됨을 알 수 있었다. 저농도 NaN_3 투여시 나타나는 활발한 VSMCs의 증식은 실제로 생체내 혈관에서는 혈관들 내경의 감소 또는 미세혈관들의 폐쇄를 일으킬 수 있다. 이는 AD에서 전통적인 뇌영상기술로는 찾아낼 수 없는 미세한 뇌혈관들의 병리학적인 이상 소견들이 실제로는 많이 존재하고 있다는 임상적인 연구 결과들을 뒷받침해주는 소견이라 할 수 있겠다.

저농도 NaN_3 투여군에서 항산화제 투여 후에 미성숙 APP (immature APP, imAPP)로 생각되는 125 kDa 단백질은 NaN_3 의 농도에 반비례하여 면역반응성 강도의 회복이 잘 되었다. 그러나 성숙 APP (mature APP, mAPP)로 생각되는 145 kDa의 면역반응성은 100 μM 에서는 대조군과 같은 정도로 회복되었으나, 200 μM 이상 투여군에서는 면역반응성은 회복이 뚜렷하지 않았다. 그리고 400 μM 과 500 μM 농도에서는 항산화제를 전처치한 후에도 소실되었던 모든 단백질의 면역반응성이 회복되지 않았다. 이러한 결과는 22C11에 반응하는 세포내 단백질들의 대사 이상이 저농도 NaN_3 투여 후에 발생하는 활성산소에 의한 것이며, APP 대사가 NaN_3 투여 농도에 따라, 즉 COX의 억제정도에 따라 매우 예민하게 변화한다는 것을 의미한다.

특히 APP가 골지복합체를 통해 전달되면서 imAPP로부터 완전히 당화(glycosylation)가 이루어진(fully glycosylated) mAPP로 형성되는 과정에서 활성산소에 의하여 보다 강력하게 차단된다는 것을 시사한다. 그 차단 정도는 단순히 활성산소 생성의 차이에 의해서만 이루어진다고 보기는, 생성된 활성산소의 당화 차단과 동반되어, 당화에 영향을 미치는 다른 세포내의 단백질이나 효소의 이상도 기여한 것으로 여겨진다[18, 19]. 그러나 고농도 투여시 시간 경과에 따른 세포내 APP 대사의 변화가 나타나지 않았고, 대조군과 차이가 없었던 것을 고려할 때, 세포내 APP 대사 이상의 소견은 에너지부전 보다는 활성산소에 의한 것일 가능성이 높은 것이다. 이와같은 결과들은 저농도 NaN_3 투여에 의한 모델이 AD의 지표인 APP 대사의 이상을 잘 나타내는 *in vitro* 모델로서 적절하다는 주장을 뒷받침해주는 또 다른 소견이다.

Gabuzd 등과 Hedin 등의 연구에서 관찰되는 APP와 $\text{A}\beta$ 의 변화에 대한 소견은, 결국 NaN_3 투여에 의해 COX 기능 억제시 세포 밖으로의 sAPP의 배출은 증가하며, APP의 대사 이상은 확실히 나타난다는 것이다. 그렇지만 APP의 변화에 수반되는 세포내 $\text{A}\beta$ 의 변화는 증가 또는 감소로 다양하게 나타날 수 있다는 것이다[9, 20]. 이러한 관찰은 APP 대사의 변화가 직접적인 세포사나 세포내 $\text{A}\beta$ 의 축적 등에 미치는 영향에 대해서는 아직까지는 확실하지 않지만, $\text{A}\beta$ 보다 AD의 발생과 진행의 지표로서 의미가 크다는 것을 의미한다. 본 연구에서 VSMCs의 세포증식은 증가하지만 세포내의 APP의 면역반응성은 감소하였다. AD에서 신경외조직(extraneuronal tissues)에서 일어나는 APP와 mAPP 대사의 이상은 신경계 조직의 변화와 아주 밀접하게 연관되어 있다. 최근에는 혈소판내의 APP의 대사

이상, 특히 APP의 감소가 신경계 이외에서 AD의 말초조직 지표로서 의미가 있고, AD 초기에 나타나며 AD의 병의 진행과도 깊게 연관되어 있다고 보고 있다. 신경계 이외의 조직에서 APP과 A β 의 역할은 확실히 알려져 있지는 않지만, 말초에서 이 단백질들의 정상적인 세포내의 기능을 고려할 때 그 역할의 중요성을 알 수 있다. APP는 막간신호전달, 칼슘대사, 신경세포에서의 축색 생성, 세포성장, 금속이온결합, 세포유착 등에 관여한다. 특히 비 신경세포들에서 APP의 기능으로서 혈소판을 포함한 혈액응고경로에 영향을 줄 수 있다. 특히 APP의 KPI (Kunitz protease inhibitor) domain은 혈액응고 factor IXa, Xa, XIa의 활성을 방해하는 역할을 하고 있다[15, 21]. 이러한 기능을 하는 APP가 세포표면에 정상적으로 존재하지 않는다면 혈관내의 응고체계의 이상이 쉽게 발생할 수 있는 조건을 만들게 될 것이다. 이것은 A β 의 세포내 축적 같은 세포독성 효과에 못지 않게 혈관세포에 정상적인 기능의 손실이라는 측면에서 문제가 된다. 그러므로 이러한 소견들은 AD가 신경계에 국한된 질환이 아니라 전신질환이라는 것을 시사하고 있다.

본 연구의 결과 저농도 투여군에서는 대부분의 TUNEL 염색 양성 세포들의 세포사가 세포고사를 시사하는 소견이었고, 고농도 투여군에서는 세포고사의 소견은 관찰할 수 없었고, 세포고사가 의심되는 소견 또는 확실하게 구별이 불가능한 소견들을 보였다. 그리고 항산화제를 사용했을 때, 저농도군의 세포고사 형태를 포함하는 TUNEL 양성 세포들은 관찰되지 않았으나, 고농도군에서는 TUNEL 염색 양성률에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 이전 연구에서 EGb761은 직접적으로 A β 에 의해 발생하는 세포사망을 차단한다는 보고가 있었지만, 본 연구에서는 항산화작용이 주로 작용했음을 알 수 있다[22]. 저농도군에서는 ETC에서 발생한 활성산소의 세포에 대한 직접적인 독성작용과 활성산소에 의해 간접적으로 유발된 활발한 세포증식에 따른 생리적인 세포사 자체가 저농도군에서 관찰되는 세포고사의 사망원인으로 작용하였음을 알 수 있었다. 고농도군에서는 항산화효과를 얻을 수 없는 에너지부전 등이 원인으로 작용하여 세포고사와는 다른 세포사를 유발하였을 것이다. 이러한 실험의 결과는 결국 많은 연구에서도 밝혔듯이 AD의 세포사가 대부분 세포고사로 인한 것이라는 주장과 일치되며, 앞선 연구들의 결과들처럼 활성산소의 작용이 AD의 발병기전에 있어서 더 중요한 작용을 하는 것으로 생각된다[23-25].

그러나 본 연구에서 사용한 VSMCs이 뇌혈관에서 추출한 것이 아니므로 COX 기능 억제로 인한 전반적인 혈관계의 이상을 관찰할 수는 있지만, 반드시 CAA와 같은 AD의 뇌혈관계의 이상을 대변하고 있다고는 할 수 없다. 그리고 APP 대사 이상이 중요한 소견이지만 동반되는 세포내 A β 의 변화를 관찰하지 못한 것이 본 연구의 한계점이며 따라서 향후 뇌혈관에서 분리된 VSMCs를 이용한 연구 등 AD의 병태생리에 근접한 모델의 개발이 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

1. Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmuter LS, Wong SK. *Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. Brain Res.* 1996 Nov 4; 738(2): 196-204.
2. Selkoe DJ. *The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol.* 1998; 8(11): 447-53. Review.
3. Di Luca M, Colciaghi F, Pastorino L, Borroni B, Padovani A, Cattabeni F. *Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 29; 405(1-3): 277-83.
4. Parker WD Jr, Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK. *Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. Neurology.* 1994; 44(6): 1090-6.
5. Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, et al. *Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. J Neurochem.* 1992; 59(2): 776-9.
6. Parker WD Jr, Parks JK. *Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization. Neurology.* 1995; 45(3 Pt 1): 482-6.
7. Blass JP, Gibson GE. *The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Rev Neurol (Paris)* 1991; 147: 513-25.
8. Parker WD Jr, Mahr NJ, Filley CM, Parks JK, Hughes D, Young DA, Cullum CM. *Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. Neurology.* 1994; 44(6): 1086-90.
9. Dana Gabuzda, Jorge Busciglio, Lan Bo Chen, Paul Matsudaira, Bruce A. Yankner. *Inhibition of Energy Metabolism Alters The Processing of Amyloid Precursor Protein and Induces a Potentially Amyloidogenic Derivative. J Biol Chem.* 1994 May 6; 269(18): 13623-8.
10. Gasparini L, Racchi M, Benussi L, Curti D, Binetti G, Bianchetti A, et al. *Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells. Neurosci Lett.* 1997 Aug 8; 231(2): 113-7.
11. Seamus J. Martin. *Apoptosis: suicide, execution or murder?. Trends In Cell Biology.* 1993; 3: 141-4.
12. Yasuda M, Okabe T, Itoh J, Takekoshi S, Hasegawa H, Nagata H, et al. *Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation: application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCL4) and dimethylnitrosamine (DMN). J Histochem Cytochem.* 2000; 48(10): 1331-9.
13. Berciano MT, Fernandez R, Pena E, Calle E, Villagra NT, Lafarga M. *Necrosis of schwann cells during tellurium-induced primary demyelination: DNA fragmentation, reorganization of splicing machinery, and formation of intranuclear rods of actin. J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58(12): 1234-43.
14. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. *Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. Epilepsia.* 2000; 41 Suppl 6: S9-13.

15. Mark P. Mattson. *Central role of oxyradicals in the mechanism of amyloid β peptide cytotoxicity.* *Alzheimer's Disease Review* 1997; 1-14.
16. Parker WD. *Cytochrome oxidase deficiency and Alzheimer's disease.* *Ann NY Acad Sci* 1991; 640: 59-64.
17. Cassarino DS, Swerdlow RH, Parks JK, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. *Cyclosporin A increases resting mitochondrial membrane potential in SY5Y cells and reverses the depressed mitochondrial membrane potential of Alzheimer's disease cybrids.* *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jul 9; 248(1): 168-73.
18. Pahlsson P, Spitalnik SL. *The role of glycosylation in synthesis and secretion of beta-amyloid precursor protein by Chinese hamster ovary cells.* *Arch Biochem Biophys.* 1996 Jul 15; 331(2): 177-86.
19. Tomita S, Kirino Y, Suzuki T. *Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism.* *J Biol Chem.* 1998 Mar 13; 273(11): 6277-84.
20. Hedin HL, Fowler CJ. *Effects of sodium azide on the secretion of soluble amyloid-beta precursor protein and the accumulation of beta-amyloid (1-40) in cultured chick neurons.* *Neurosci Lett.* 2000 Jul 21; 288(3): 203-6.
21. Greenfield JP, Gross RS, Gouras GK, Xu H. *Cellular and molecular basis of beta-amyloid precursor protein metabolism.* *Front Biosci.* 2000 Jan 1; 5: D72-83. Review.
22. Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. *The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid.* *Eur J Neurosci.* 2000; 12(6): 1882-90.
23. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Kaplan G. *Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease.* *Exp Neurol.* 1995; 133(2): 225-30.
24. Busciglio J, Yanker BA. *Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro.* *Nature.* 1995 Dec 21-28; 378(6559): 776-9.
25. Cotman CW, Whittemore ER, Watt JA, Anderson AJ, Loo DT. *Possible role of apoptosis in Alzheimer's disease.* *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Dec 15; 747: 36-49.