

動脈硬化症의 脂肪蓄積 Mechanism

金 榮 中

서울대학교 藥學大學

Mechanism of Lipid Accumulation in Atherosclerosis

Young Choong KIM

College of Pharmacy, Seoul National University

Atherosclerosis is associated with the presence of extracellular lipid droplets and large fatty deposits, both of which are to be covered at the surface mainly by zwitterionic phospholipids. The development of atherosclerosis is often associated with the accumulation of calcium. Furthermore, the presence of glycosaminoglycans directly underlying fatty deposits in human aorta has been demonstrated. Also, the possible involvement of the interaction between sulfated polysaccharide and lipoprotein in the development of atherosclerosis has been suggested in view of the presence of both low density lipoproteins and glycosaminoglycans, as well as their complexes, in atherosclerotic aortas. Therefore interactions of sulfated polysaccharides with low density lipoproteins which serve as a vehicle for cholesterol and cholesterol ester and with zwitterionic phospholipids have been studied extensively by a number of workers to provide mechanisms. In this paper, the mechanism of the interaction of sulfated polysaccharides with low density lipoproteins and the mechanism of the interaction between sulfated polysaccharides and zwitterionic phospholipids are reviewed. The possibility of the occurrence of these interactions in the body are also considered.

근래 成人病으로 가장 문제시되고 있는 것은 動脈硬化症과 心臟循環系統의 질환 등이다.

그 중 本論文에서는 動脈硬化症의 특징이라고 할 수 있는 動脈組織 속의 脂肪質의 축적 mechanism에 대해서 다루려고 한다. 動脈의 硬化는 어떻게 해서 일어나며, 진전 되는지를 이해하자면 우선 動脈의 構造 및 構成成分, 榮養供給 등에 대하여 살펴보고, 그 후에 지금까지 밝혀진 脂肪質의 축적 mechanism에 대하여 검토해 보는 것이 순서이다.

1. 動脈의 構造

動脈은 Figure 1의 A에서 볼 수 있듯이 3층으

로 되어 있다. 즉 血液이 흐르고 있는 안쪽에서 부터 intima, media, adventitia로 구성되어 있다¹⁾. 이 중 intima층을 세분하면 제일 안쪽에 endothelial cell(內皮細胞)이 집합되어 있고, 그 밑에 connective tissue matrix(結合組織의 細胞間質)가 얇은 층을 이루고 있으며, 그 밑에 internal elastic membrane(內部彈力性膜)으로 media층과 구분되어 있다. Media층은 smooth muscle cell이 protein collagen, narrow elastic membrane sheets, 또 다른 connective tissue 물질들 속에 골고루 분산되어 이루어져 있으며, adventitia층은 제일 바깥에서 全體 動脈을 支持하고 있다. 이 중에서 動脈硬化에 직접 참여하는 것

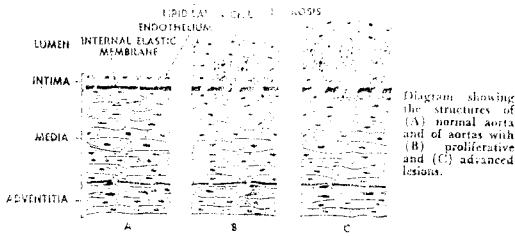


Fig.1. Structure of aorta.

은 단지 intima층과 media의 안쪽 층만이다²⁾. 가장 초기의 장애는 지방질의 축적으로 이루어지는 fatty streak인데 이러한 fatty streak은 3歲까지의 거의 모든 어린아이들의 動脈에서 볼 수가 있다³⁾. 이것으로 미루어 보아도 fatty streak자체가 動脈硬化症의 직접적인 發病과 관계가 있다고는 할 수가 없다.

2. Smooth muscle cells

動脈硬化症에 직접 一次的으로 관련되는 細胞들은 media층의 smooth muscle cell등이다⁴⁾. 이 細胞들은 다양한 기능을 하는데 즉 수축, 이동, 증식, 그리고 connective tissue의 構成成分인 elastin, collagen, mucopolysaccharides 등을 직접 合成하고분비하는 것이다⁵⁾. Smooth muscle cell을 둘러싸고 있는 彈力性의 膜은 주로 elastin으로 되어 있으며, 이로 인한 smooth muscle cell의 수축 및 탄력성은 결과적으로 血管의 맥박에 따라 動脈을 확장 또는 수축시킨다.

3. 動脈의 榮養供給

動脈組織 속의 細胞들은 모든 體細胞처럼 끊임없이 榮養分과 酸素의 供給을 필요로 한다.小動脈들은 이러한 물질들을 血液으로부터 직접적인 침투에 의해 공급 받는다⁶⁾. 그러나 大動脈에 있어서는 이러한 직접적인 침투만으로는 adventitia층은 물론, media층의 바깥 부분의 榮養 및 酸素의 공급이 충분하지 못하므로 이 목적을 위하여 adventitia 층은 毛細血管을 발달시켜서 榮養을 공급받고 있다⁴⁾. 代謝產物들은 물론, 미처 사용되지 않은 榮養分과 血漿成分 등은 adventitia에 발달되어 있는 毛細血管들로부터서히 流出된다. 만약 어떠한 理由에서든 血漿成

分の 流入이 그들의 利用이나, 流出보다 클 때는 動脈組織에 축적되는 경향이 있다⁶⁾.

4. 動脈硬化症의 進진

動脈硬化症의 가장 初期에 볼 수 있는 動脈의 極微的인 變化는 脂肪質의 축적으로 인한 intima층의 subendothelial층이 두꺼워지는 것이라 하겠다⁷⁻⁸⁾. 그 후 차차 脂肪質의 축적이 심해져서 media층 안쪽의 smooth muscle cell 속까지 脂肪質의 축적이 惹起된다. 이렇게 되면 intima층의 internal elastic membrane이 파괴되기 시작하면서 media층의 smooth muscle cell이 質換이 일어나고 있는 intima층으로 이동해서 증식하기 시작한다⁹⁾. 이 現象을 Figure 1의 B에서 볼 수 있다. 아직까지는 왜 elastic membrane이 파괴되는지, 또 어떻게 하여 smooth muscle cells이 이동해서 증식되는지에 대하여 정확하게 밝혀진 바 없다. 그러나, 이러한 現象들은 高血壓이나 血漿의 構成成分의 流入을 증가시키는 여러가지 因子들에 의하여 촉진되고¹⁰⁾, 또 血液內의 脂肪質의 濃도가 높으면¹⁰⁾, intima층의 脂肪質의 축적은 더욱 심해어진다는 것이 알려져 있다¹⁰⁾. 이렇게 動脈組織內의 脂肪質의 축적이 심하여지면 榮養分과 酸素가 충분히 적절하게 細胞에 골고루 공급되지 못함으로, 細胞는 점차 死滅하게 된다¹¹⁾.

다음에는 Figure 1의 C에서 볼 수 있듯이 intima층의 脂肪質이 축적된 곳에 死滅된 細胞의 조각들, 또 細胞가 脂肪質(extracellular lipids), 그리고 다른 血漿 構成成分 등이 모여 necrotic center를 만든다¹¹⁾. 또한 상처를 치유하려는 試圖으로 intima층은 더 많은 smooth muscle cell을 생산하여 그 結果로 connective tissue material등이 더욱 많이 造成된다⁵⁾. 결국에는 脂肪質이 축적된 곳에 纖維質 斑點(fibrous plaques)을 形成하여 subendothelial층은 더욱 더 두꺼워지게 된다⁵⁾. 이러한 일련의 現象은 血液中的의 脂肪質의 濃도가 계속 높고, endothelium의 상처가 高血壓이나 다른 因子들로 말미암아 치유되지 못하거나 또는 끊임없이 파괴되며는 계속 반복된다. 이렇게 영향을 받은 動脈이 좁아지거나 장

에를 받지 않는 한, 이때까지는 病的 自覚증상은 나타나지 않는다. 그러나 이러한 現象이 계속 반복되면서 더욱 심해지면 纖維質의 斑點에서 血栓이 일어나게 되고 高血壓으로 인해서 營養分과 酸素를 공급하던 動脈組織內的 毛細血管 등은 파괴되어 出血하게 된다^{12~14}). 이렇게 되면 necrotic tissue에 calcification이 일어나면서 動脈硬化症은 더욱 더 惡化되어 심각해진다^{15~17}).

5. 動脈에 축적되는 脂肪質

動脈組織內에 축적되는 脂肪質은 주로 cholesterol과 cholesterol ester이며^{18~19}), 脂肪質의 축적이 惹起되면, 動脈組織內에서의 磷脂質(phospholipids)의 合成이 크게 증가된다^{20~21}). 그 理由는 intima층에서 smooth muscle cell이 증식하는 데 細胞膜의 가장 중요 構成成分인 磷脂質을 必要로 하기 때문에 생기는 것이라고 생각된다. 다음으로 가장 중요한 構成成分인 cholesterol은 血液中の 血漿으로부터 유래된다¹⁸). Intima층의 smooth muscle cell속에서 cholesterol이 축적되는 것은 細胞속으로 cholesterol을 受容하는 것을 조절하는 mechanism이 없거나, 또는 cholesterol을 可溶性인 代謝產物로 전환시키는 mechanism이 존재하지 않는다는 것을 암시한다. 細胞속으로 받아들인 cholesterol은 細胞 表面의 膜과 intracellular organelles에 섞이며, cholesterol ester는 cholesterol로 전환된다²²). 그러나 단지 제한된 量만의 cholesterol이 細胞膜에 의해 利用되므로, 殘餘量의 cholesterol은 結晶化하려는 경향이 있다. 結晶화된 cholesterol은 매우 많은 毒性을 지니고 있다²³). 生體內에서 cholesterol이 급격하게 毒性을 나타내지 않고 적당하게 하는 唯一한 方法은 酵素에 의해 cholesterol을 cholesterol ester로 전환시켜서 脂肪球에 혼입되게 하는 것 뿐이다²³).

6. 動脈組織內的 脂肪質의 축적mechanism

a) Lipoproteins

血液中の 血漿속에는 식사에서 섭취된 脂肪質의 운반체인 chylemicrons, 生體에서 生成된 triglycerides의 운반체인 very low density lipopro-

teins, cholesterol과 cholesterol ester의 운반체인 low density lipoproteins, phospholipids의 운반체인 high density lipoproteins와 같이 대략 4種類의 lipoproteins가 存在한다. 이러한 lipoproteins사이에서 볼 수 있는 比重의 차이는 각 lipoproteins속에 함유되어 있는 비교적 무거운 蛋白質과 비교적 가벼운 脂肪質의 비가 다르기 때문이다.

各 lipoproteins를 血漿으로 부터 분리하는 方法으로는 比重의 차이에 의한 초원심분리法과²⁴) sulfated polysaccharides가 lipoproteins와 반응하여 沈澱을 형성하는 것을 利用하는 沈澱法이²⁵) 있다. 특히 sulfated polysaccharides는 쉽게 low density lipoproteins를 沈澱시키는 성질이 있어 low density lipoproteins의 분리, 평가 및 lipoproteins속의 脂肪質의 分布를 측정하는데 널리 쓰여왔다^{25~28}). 따라서 low density lipoproteins와 sulfated polysaccharides사이의 反應에 영향을 미치는 여러 가지 因子 즉, pH, ionic strength, metal ions, sulfated polysaccharides 자체의 構造 등에 대한 研究가 활발하게 進行되고 있다. 그 結果를 살펴보면, metal ions이 反應系에 存在하지 않을 경우에는 low density lipoproteins는 sulfated polysaccharides중의 하나인 heparin과 pH 5.7以下에서는 insoluble complex를 형성하지만, pH 8.6에서는 soluble complex를 형성한다²⁵). 一般的으로 反應系의 pH가 酸性쪽으로 기울어질 때, 이 두 物質사이에서 일어나는 insoluble complex의 형성이 촉진된다²⁵). 또 insoluble complex의 형성은 反應系의 ionic strength가 낮을수록 촉진된다²⁹). 이것은 낮은 ionic strength에서는 sulfated polysaccharides가 평창된 conformation을 가져, 쉽게 low density lipoproteins와 insoluble complex를 형성할 수 있지만, 높은 ionic strength에서는 밀집된 conformation을 가지므로, 쉽게 insoluble complex를 형성하지 못하는 까닭이다³⁰).

또한, 2價의 metal ions, 즉 Mg^{++} , Ca^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , 등은 일반적으로 두 物質 사이의 反應을 촉진시킨다²⁵).

Low density lipoproteins와 sulfated polysacch-

arides사이에서 일어나는 insoluble complex의 형성은 sulfated polysaccharide 자체의 sulfate 함량과 중합도에 크게 영향을 받는다³¹⁾. 즉 low density lipoproteins는 hexose unit당 0.85에서 2.18의 sulfate group을 갖는 sulfated polysaccharides와 反應하면 완전히 沈澱되지만, 0.22~0.57 sulfate group을 갖는 것과는 一部分이 沈澱된다.

또한, 중합도가 6000以上인 高分子량을 갖는 sulfated polysaccharides는 low density lipoproteins와 insoluble complex를 형성하며, 중합도가 440以下인 sulfated polysaccharides는 비록 sulfate 함량이 hexose unit당 1.59인 것이라도 soluble complex만을 형성한다. 한편 sulfated polysaccharide 構造中의 degree of branching, branching point, configuration of glycosidic linkages, hexose의 種類는 low density lipoproteins와 sulfated polysaccharide사이의 反應에 아무 영향을 미치지 않는다³¹⁾.

그리고, 相對的인 low density lipoproteins나 sulfated polysaccharides의 濃度가 이 두 物質사이에서 형성되는 insoluble complex의 量에 크게 영향을 미친다. 즉 反應系에 metal ions이 存在하지 않고, 만약 low density lipoproteins나 sulfated polysaccharides中 어느 한쪽이라도 多量으로 存在할 경우에는 insoluble complex는 형성되지 않고, 단지 soluble complex만이 형성된다³⁰⁾.

이와 같이 low density lipoproteins와 sulfated polysaccharides사이의 反應에 대하여 많은 研究가 進行되고 있다. 그러나, 이 두 物質사이의 反應 mechanism에 대한 研究는, 近年에 와서 組織學자들이 動脈硬化症 患者의 動脈組織 속에 acid mucopolysaccharides, low density lipoproteins는 물론, 이 두 物質의 complex가 다 함께 存在하고 있다는 事實을 밝히면서 더욱 본격적으로 始作되었다^{32~36)}.

Low density lipoproteins와 acid mucopolysaccharides사이의 反應 mechanism을 밝히기 위하여, 많은 研究者는 sulfate 함량이 約 17%인 dextran sulfate를 acid mucopolysaccharides의 model compound로 利用한 研究를 進行시키고 있다. 그 結果로 dextran sulfate와 low density lipoprotein

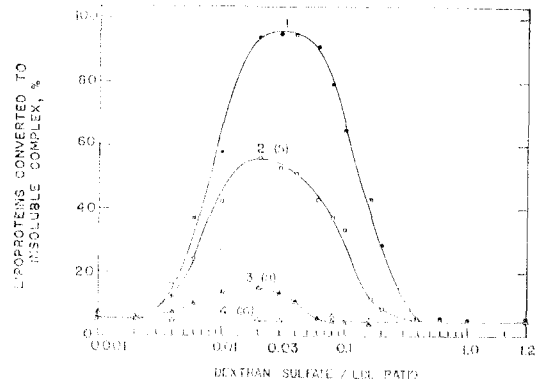


Fig.2. Effect of succinylation of LDL on the formation of insoluble dextran sulfate-LDL complex. Curve 1 shows the conversion of untreated LDL to insoluble complex as a function of the dextran sulfate to LDL weight ratio. Curves 2, 3, and 4 show the conversion when 5, 8, and 16%, respectively, of the LDL free amino groups were succinylated. Insoluble complex formation was assayed with mixtures containing 0.8mg of LDL and various amounts of dextran sulfate in 1.5ml of phosphate buffer (pH 7.4, ionic strength 0.1). The medium contained 0.01% EDTA.

사이에서 형성되는 complex가 soluble한 것인지, insoluble한 것인지는 metal ions이 存在하지 않을 경우에 反應系 속의 dextran sulfate 함량에 따라 決定된다는 것을 밝혔다³⁰⁾.

Figure 2에서 볼 수 있듯이 dextran sulfate와 low density lipoprotein의 weight ratio가 0.002까지는 complex를 형성하지 않는다. 그러나 점차 dextran sulfate의 量을 增加시켜 주면 insoluble complex의 量이 增加하다가 두 物質의 weight ratio가 0.03일때 最大量의 insoluble complex를 형성한다. 이와 같이 最大量의 insoluble complex를 형성하는 두 物質의 weight ratio를 equivalence weight ratio라고 한다. 그 후 더욱 dextran sulfate의 量을 增加시켜서 weight ratio가 0.1% 以上이 되면 insoluble complex의 量은 급격히 減少되는 반면 soluble complex가 형성된다³⁷⁾.

한편, phospholipase A가 이 두 物質사이에서 일어나는 反應에 미치는 영향에 대한 研究에서³⁸⁾ phospholipase A의 作用에 따라 low density lipoproteins로부터 유리된 fatty acid anions

는 lipoproteins에 부착되어 lipoproteins 表面의 negative group을 增加시켜 dextran sulfate와 insoluble complex를 형성하는 것을 저해시킨다고 밝혔다. 그러면 이렇게 low density lipoproteins가 dextran sulfate와 反應하여 complex를 형성하는데 lipoproteins 表面에 存在하는 proteins, 또는 phospholipids中 어느 成分이 직접적으로 關係하는지를 밝히기 위하여 많은 노력이 기울여졌다. Lipoproteins에 proteolytic enzyme를 作用시켜 表面에 存在하는 蛋白質中 20% 程度를 유리시킨 다음, 그 효과를 보았다. 이 경우에도 原來의 lipoproteins와 마찬가지로 dextran sulfate와 insoluble complex를 형성하였다. 이러한 結果는 low density lipoproteins 表面의 phospholipids가 주로 complex형성에 關係하는 것으로 보여진다³⁹⁻⁴⁰⁾. 그러나, 이 結果만으로 蛋白質의 役割을 무시하기에는 충분하지 않아 lipoproteins 表面의 蛋白質을 化學적으로 變化시켜서 蛋白質의 役割을 재검토하여 보았다³⁷⁾.

Low density lipoproteins 表面의 蛋白質 부분을 acetylation시켜 lysin amino positive group의 數를 줄이거나, 또는 succinylation시켜 amino group의 數를 줄이는 것은 물론, succinyl group을 導入시켜 negative group의 數를 늘렸을 때, lipoproteins와 dextran sulfate사이에서 일어나는 反應이 어떻게 영향을 받는지를 보았다. Table I에서 볼 수 있듯이 lipoproteins를 acetylation이나 succinylation나 하였을 때, 두 경우에서 다 같이 insoluble complex의 형성이 低下되는 것을 볼 수 있으며, succinylation의 低下 效果가 더욱 큰 것을 알 수 있다.

이 實驗으로 지금까지의 說, 즉 low density lipoproteins와 dextran sulfate가 反應하여 complex를 형성하는 데에 lipoproteins 表面의 phospholipids가 직접 關係한다는 說을³⁹⁻⁴⁰⁾ 뒤엎고, 蛋白質이 一次的으로 dextran sulfate와 反應한다는 것을 확증시켰다³⁷⁾.

지금까지의 反應 mechanism에 관한 研究結果를 要約 記述하면, low density lipoproteins와 acid mucopolysaccharides사이에서 일어나는 反應은 주로 polar forces에 의한 것이라고 하겠다

Table. I. Effect of Succinylation and Acetylation of LDL on Formation of Insoluble and Soluble Dextran Sulfate-LDL complexes.

Modification of LDL	Acylation of free amino groups	Distribution of LDL		
		Insoluble complex	Souble complex	Free LDL
	%	%	%	%
Control	0	96-99	<4	0
Succinylation	5	74	20-22	4-6
Succinylation	8	19	45	36
Succinylation	16	0	34	66
Succinylation	25	0	0	100
Acetylation	8	91	9	0
Acetylation	11	19	52	29
Acetylation	15	16	55	29
Acetylation	26	0	0	100

³⁷⁻³⁸⁾. Calcium ion과 같은 2價의 metal ions이 反應系에 存在하지 않을 경우에는 주로 low density lipoproteins의 positive group과 acid mucopolysaccharides의 negative group이 직접 electrostatic interaction에 의해 insoluble complex를 형성한다는 것을 밝혔다. 2價의 metal ions이 反應系에 存在할 경우에는 low density lipoproteins의 positive와 negative group이 모두 함께 反應에 참여한다는 것을 밝혔다. 특히 이러한 反應을 일으키는 데는 low density lipoprotein의 phospholipid 부분보다는 蛋白質 부분의 charged group이 一次的인 강한 反應성을 나타낸다고 強調하였다^{37,41)}.

b) Phospholipids

Low density lipoproteins의 蛋白質 부분이 動脈 組織의 acid mucopolysaccharides와의 반응에 1차적인 강한 反應성을 나타내지마는, 相當량이 위에서 記述한 바와 같이 lipoproteins 그 자체로서 그대로 축적된다는 事實은 고려되어야 하겠고, 아직까지 실제로 증명되지 않았다.

그러면, low density lipoprotein의 상당 부분(대략20%)을 차지하는 phospholipids는 acid mucopolysaccharide와의 反應으로 因하여 生成되는 insoluble complex를 형성하는데 어떠한 役

働을 하는지 밝혀져야 하겠다.

재미있는 것은 人間の aortic valve가 비록 動脈硬化症과는 직접적인 관계는 없지만, 가끔 large calcified body를 발달시키는데 그 속의 floccular outer substance가 주로 membranous phospholipids와 proteoglycan에 의한 反應에 의해 형성된다는 事實이다⁴²⁾. 또 一般적으로 extracellular vesicles의 membranous lipids는 주로 glycosamino glycans를 多量 함유하고 있는 여러 組織들의 calcification에 참여한다⁴³⁻⁴⁴⁾.

이와 같이 calcium이 부분적으로 축적되는 데는 phospholipids와 glycosaminoglycan사이의 反應이 매우 重要的 點 하다는 說이 제시되었다. 이 3物質 사이에서 일어나는 反應에 대한 研究는 生物學的으로 중요한 現象인 動脈硬化症의 發病 내지는 進展뿐만 아니라, epiphyseal cartilage, bone, dentin 등에서의 calcification의 mechanism을 밝히려면 꼭 필요하다는 것이 여러 學者들 간에 認定되었다⁴⁵⁾. 그러므로 phospholipids로써는 lecithin dispersion과 lysolecithin micells 및 acid mucopolysaccharide로써는 dextran sulfate(sulfate 함량 17%)를 model compound로 사용하여 이들 사이의 反應 mechanism을 밝히기 위한 研究가 始作되었다⁴⁵⁾. Lecithin dispersion은 calcium ion 存在下에서 dextran sulfate와 反應시키면 insoluble complex를 형성하는 것을 Figure 3에서 볼 수 있다. 一定한 濃度の calcium ion 存在下에서는 一定한 量의 lecithin에 dextran sulfate의 量을 增加시켜 dextran sulfate/lecithin의 weight ratio를 0.01에서 10까지 變化시키면, 初期에는 형성되는 insoluble complex의 量도 增加한다. 일단 最大量의 insoluble complex를 형성시키는 dextran sulfate/lecithin의 weight ratio를 초과하면 오히려 형성된 insoluble complex가 급격히 溶解되는 것을 볼 수 있다⁴⁵⁾. Insoluble complex를 最大로 형성시키는 dextran sulfate/lecithin의 weight ratio를 equivalence weight ratio라고 한다.

Equivalence ratio에서 형성되는 insoluble complex의 量은 calcium ion 濃度を 增加시키기에 따라서 점차 增加하는데 0.5mM의 CaCl₂에서는 대

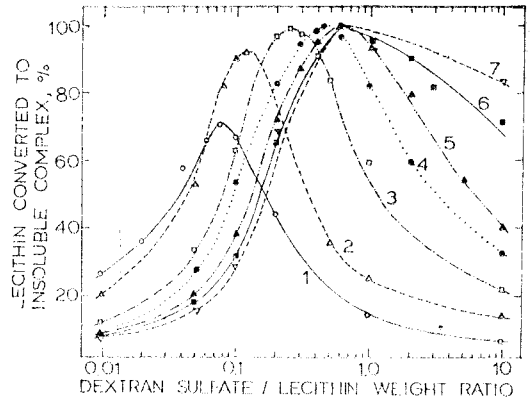


Fig. 3. The conversion of lecithin to insoluble dextran sulfate. lecithin complex in the presence of 0.5 (curve 1), 10.0 (curve 5), 1.0 (curve 2), 2.5 (curve 3), 5.0 (curve 4), 20.0 (curve 6), and 30.0 (curve 7) mM CaCl₂. Insoluble complex formation was assayed with mixtures containing 200µg of lecithin and various amounts of dextran sulfate and of CaCl₂ in 0.75ml of Tris buffer.

략 反應系에 存在하는 lecithin의 70% 가량이 insoluble complex로 전환되며, 2.5mM 以上에서는 100% 다 전환되는 것을 볼 수 있다. 또한 equivalence weight ratio 자체도 calcium ion 濃度の 增加에 따라 높은 dextran sulfate/lecithin weight ratio 쪽으로 이전하며, 10mM CaCl₂ 濃

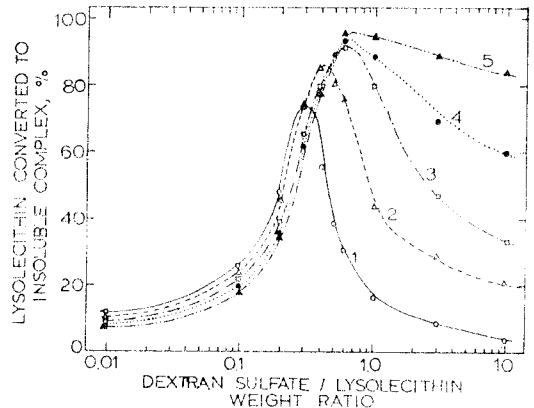


Fig. 4. The conversion of lysolecithin to insoluble dextran sulfate. lysolecithin complex in the presence of 2.5 (curve 1), 5.0 (curve 2), 10.0 (curve 3), 20.0 (curve 4), and 30.0 (curve 5) mM CaCl₂. Insoluble complex was formed from the mixtures of 133.3 µg of lysolecithin and various amounts of dextran sulfate and of CaCl₂ in 0.75ml of Tris buffer.

度에서 0.6이라는 最大值를 갖고, 그 以上の calcium ion 濃度の 增加에는 影響을 받지 않고 一定한 값을 유지한다.

Lysolecithin micelle도 calcium ion 存在下에서 dextran sulfate와 反應시킬때 insoluble complex를 形成하는 것을 Figure 4에서 볼 수 있다. 이 경우에도 lecithin dispersion에서와 마찬가지로 calcium ion 濃도를 增加시킬때 따라 equivalence ratio에서 形成되는 insoluble complex의 量도 增加하고 또 equivalence ratio자체도 높은 dextran sulfate/lysolecithin weight ratio쪽으로 이질하는 것을 觀察할 수 있었다⁴⁵⁾.

Lecithin과 lysolecithin의 경우를 比較해 보면 lecithin dispersion이 같은 calcium ion 濃度에서 훨씬 효율적으로 dextran sulfate와 反應하여 insoluble complex를 形成하는 것을 보여 주는데 이러한 차이는 calcium ion 濃도를 增加시킬때 따라 消滅된다. 또 lecithin의 경우 lysolecithin 보다 dextran sulfate와 훨씬 安定한 insoluble complex를 形成한다는 것은 미리 두 zwitterionic phospholipids와 dextran sulfate의 insoluble complex를 calcium ion 存在下에서 形成시킨 후에 ionic strength를 增加시켜 줄 때 어느 정도 安定한 가를 보는 實驗으로 밝혔다. Lecithin의 경우 ionic strength를 0.25까지 增加시켜 줄 때까지 安定하다가 그 以上에서는 급격히 溶解하는 반면 lysolecithin의 complex는 ionic strength 0.15까지만 安定했다. Lecithin vesicle이나 lysolecithin micelle이 calcium ion 存在下에서 비슷한 反應 mechanism에 의하여 dextran sulfate와 反應하여 insoluble complex를 形成하는 듯 할때도 불구하고 이러한 注目 할 만한 차이점을 볼 수 있는 것은 lecithin과 lysolecithin 分子의 solubility characteristic에 基因한다고 생각할 수 있다. Lecithin은 分子中에 2개의 fatty acyl chain을 갖는 반면 lysolecithin은 2번 炭素에 hydroxyl group을 가져 lecithin보다 훨씬 hydrophilic한 性質을 나타낸다. 따라서 dextran sulfate와의 사이에서 形成된 insoluble complex도 lecithin의 경우 보다 더 加溶性이고 不安定한 것으로 추측된다.

Lecithin dispersion이나 lysolecithin micelle도

calcium ion 存在下에서 low density lipoproteins과 마찬가지로 dextran sulfate와 反應하여 insoluble complex를 形成한다는 것을 지금까지 記述했다. 이 두 zwitterionic phospholipids 경우 low density lipoproteins와 다른점은, insoluble complex를 形成하는 데 꼭 calcium ion과 같은 2價의 metal ion을 要求한다는 事實이다. 또 큰 차이점은 low density lipoprotein은 反應系에 calcium ion이 存在하지 않을 경우에도 dextran sulfate와 反應하여 insoluble complex를 形成하며 또한 equivalence weight ratio로 0.03이라는 작은 값을 가지나 두 zwitterionic phospholipids 경우 10 mM 以上の calcium ion을 要求하여 그 때의 equivalence weight ratio도 0.6으로 높은 값을 갖는다.

그러면 이렇게 lecithin이나 lysolecithin이 dextran sulfate와 insoluble complex를 形成하는 데 calcium ion과 같은 2價의 metal ion을 절대적으로 必要로 하는데 calcium ion이 存在하지 않을 때는 전혀 complex를 形成하지 않는지 또는 눈에는 보이지 않지 않는 low density lipoproteins의 경우처럼 soluble complex를 形成하는지를 알아 볼 必要가 있겠다. 또 calcium ion 存在下에서도 insoluble complex만을 形成하는지 또는 insoluble complex는 물론 soluble complex도 形成하는지를 알아보아야 하겠다. Soluble complex 形成 有無를 밝히기 위해 lysolecithin과 dextran sulfate의 混合物를 analytical ultracentrifugal method를 써서 分析한 結果 calcium ion이 反應系에 存在하지 않을 때는 zwitterionic phospholipids는 dextran sulfate와 insoluble complex는 물론 soluble complex 어느 것도 形成하지 않는다는 것을 밝혔다. Calcium ion이 存在할 경우에는 equivalence ratio보다 낮은 dextran sulfate/zwitterionic phospholipid weight ratio에서는 反應系는 insoluble complex와 dextran sulfate, zwitterionic phospholipid 각각의 free form으로 構成되어 있고, equivalence ratio 보다 높은 dextran sulfate/zwitterionic phospholipid weight ratio에서는 soluble complex, insoluble complex, dextran sulfate와 zwitterionic phospholipid 각각

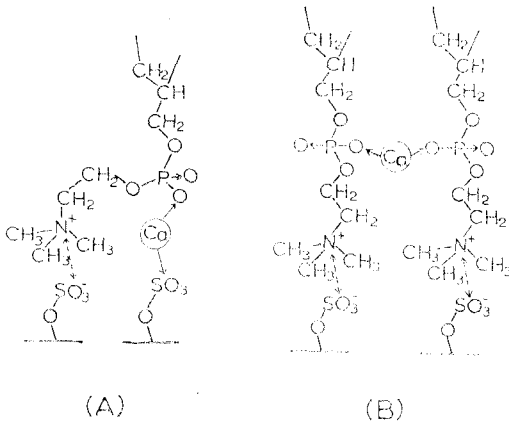


Fig. 5. Schematic illustration of the proposed mechanism of the interaction of dextran sulfate with lecithin or lysolecithin in the presence of Ca^{2+} . The electrostatic interaction between the positive charge of the phospholipid choline nitrogen and the sulfate negative charge of dextran sulfate is shown to be enhanced by the calcium cross-linking of the phospholipid phosphate groups to (A) the sulfate groups of dextran sulfate or to (B) the phosphate groups of neighboring phospholipids.

의 free form의 混合狀態로 反應系는 構成되어 있다는 것이 밝혀졌다.

지금까지 얻어진 知識으로 2價의 metal ion이 存在할 때 zwitterionic phospholipids와 dextran sulfate 사이의 反應 mechanism을 2가지로 假定할 수 있겠다⁵⁾. 첫째로 생각할 수 있는 것이 Figure 5의 a에서 볼 수 있듯이 calcium ion이 存在할 때 zwitterionic phospholipids의 polar head의 phosphate group은 calcium ion에 의해 dextran sulfate의 sulfate group과 crosslink되고 이에 따라 polar head의 choline positive group이 露出되어 근처의 또 다른 sulfate group과 直接 electrostatic interaction을 할 수 있게 된다. 즉 zwitterionic phospholipids polar head의 positive choline group과 negative phosphate group이 다 함께 dextran sulfate와의 反應에 참여함으로써 insoluble complex를 形成하는 것이다.

그리고 한 一定한 calcium ion濃度에서는 zwitterionic phospholipids의 polar head와 反應할 수 있는 dextran sulfate의 sulfate group의 數가 制限되므로 dextran sulfate/zwitterionic phosph-

olipids weight ratio가 equivalence ratio에 이르기까지는 dextran sulfate의 量의 增加에 따라 反應할 수 있는 sulfate group도 增加하게 되어, 形成되는 insoluble complex의 量도 계속 增加되어 equivalence ratio에서 最大量을 갖게 된다. 더 이상의 dextran sulfate의 첨가는 結果적으로 charged groups 사이에서 中和가 잘 이루어져 있는 反應系에 過量의 negative sulfate group의 數를 增加시켜 결국 反應系를 negative하게 만드므로 形成된 insoluble complex는 급격히 溶解된다. Equivalence ratio가 calcium ion의 濃度を 增加시키기에 따라 높은 dextran sulfate/zwitterionic phospholipid weight ratio쪽으로 이전하는 것은 calcium ion濃度を 增加시켜 주면 좀 더 많은 zwitterionic phospholipids의 polar head의 phosphate group이 dextran sulfate의 sulfate group과 crosslink 할 수 있고 이에 따라 더 많은 choline positive group이 露出되어 sulfate group과 反應할 수 있기 때문이다.

한가지 注目할 만한 것은 CaCl_2 10mM以上の 濃度에서 lecithin dispersion과 lysolecithin micelle의 structural organization이 다른데도 불구하고 lecithin과 lysolecithin이 다 같이 最大量의 insoluble complex를 形成시키는 equivalence ratio 값으로 0.6이라는 값을 갖는 것이다. 실제에 있어 lecithin vesicle은 bilayer organization을 갖고 中心에 물을 함유하고 있으며 lysolecithin micelle은 모든 polar head를 aqueous medium에 露出시키고 있다. 그러므로 만약 calcium ion을 仲介로 해서 일어나는 反應도중 이러한 structural organization에 變化가 없다면 lecithin의 경우 理論상으로 0.6보다 작은 값인 0.45을 equivalence ratio 값으로 가져야 한다. 그러나 lecithin의 경우도 0.6이라는 값을 갖고 또 특히 때면 lecithin vesicle을 製造할 때마다 vesicle weight가 3.2~4.2百萬의 범위내에서 變化함에도 불구하고 항상 같은 값인 0.6을 equivalence ratio로 갖는 것은 反應도중에 lecithin vesicle에 structural reorganization이 일어나는 것을 暗示해 준다. 즉 lecithin vesicle의 vesicular organization은 lecithin vesicle의 bilayer structure의 바깥층의

lecithin分子들의 phosphate group이 calcium ion에 의해 dextran sulfate의 sulfate group과 cross link되고 이에 따라 露出된 choline group이 또 다른 sulfate group과 electrostatic interaction하므로써 誘導되는 strain에 의해 더 이상 維持되지 못하는 듯 하다. 따라서 vesicle은 破壞되거나 열개되어 작은 조각들로 나뉘어 지어 lecithin vesicle의 안층의 lecithin分子들도 dextran sulfate와의 反應에 참여하게 된다. 비록 이렇게 lecithin vesicle이 dextran sulfate와의 反應도중 structural reorganization을 일으키지만 각각의 조각들은 계속 規則的인 bilayer의 配列을 갖는다.

지금까지 zwitterionic phospholipids는 calcium ion 存在下에서 dextran sulfate와 反應할 때 phospholipids의 polar head의 phosphate group이 calcium ion의 仲介로 dextran sulfate의 sulfate group과 crosslink되고 이에 따라 同一한 polar head의 choline group이 露出되어 또 다른 sulfate group과 직접 electrostatic interaction을 하여 insoluble complex를 形成한다는 反應 mechanism을 提示했는데 또 하나의 可能的 다른 反應 mechanism을 생각해 볼 수 있겠다. Figure 5의 b에서 볼 수 있듯이 이웃하고 있는 phospholipid의 polar head의 두 phosphate groups가 calcium ion의 仲介로 crosslink되고 이에 따라 露出되는 두개의 이웃하는 choline groups가 직접 두개의 다른 sulfate groups와 electrostatic interaction을 하여 insoluble complex를 形成하는 mechanism이다. 이 反應 mechanism은 lecithin dispersion대신 lecithin cholesterol混合 dispersion을 써서 한 實驗으로 妥當하지 못하다는 結論을 얻었다. Cholesterol이 lecithin dispersion에 存在하는 경우 비록 equivalence ratio에는 變化가 없지만 cholesterol의 量이 增加할수록 形成되는 insoluble complex의 量도 增加한다. 또 insoluble complex속에 存在하는 lecithin과 cholesterol의 量의 比는 本來의 lecithin-cholesterol의 混合 dispersion에서의 比와 같았다. 이는 使用한 dispersion이 하나의 단위로 作用한다는 것을 暗示해 주어 앞에서 說明하였듯이 비록 反應도중 vesicular structure가 파괴되어 작은 조각들로 나뉘어 지

지만 계속해서 規則的인 bilayer의 配列을 갖는다는 것을 確證시켜 준다. Lecithin-cholesterol 混合 dispersion에서는 cholesterol 分子들이 lecithin 分子 사이에 挿入되어 lecithin分子間的 intermolecular distance를 增加시켜 calcium ion이 lecithin의 polar head의 phosphate group과 dextran sulfate의 sulfate group을 crosslink시키는 것을 容易하게 만들어 주어 反應을 촉진시킨다. 만약 calcium ion이 이웃하고 있는 2개의 lecithin 分子를 crosslink시키는 反應 mechanism에 의하여 lecithin과 dextran sulfate 사이의 反應이 일어난다면 cholesterol分子的 挿入으로 增加된 lecithin分子間的 intermolecular distance는 calcium ion이 2개의 lecithin分子를 crosslink하는 것을 어렵게하여 insoluble complex의 形成을 低下시켜야 한다. 그러나 실제로 있어 形成된 insoluble complex의 量은 增加 되었으므로 이 反應 mechanism은 妥當한 것이 못 된다.

Zwitterionic phospholipids가 calcium ion 存在下에서 dextran sulfate와 反應하여 insoluble complex를 形成하는데, 그 속의 phospholipid의 polar head, calcium ion, dextran sulfate의 sulfate group이 어떠한 當量比로 이루어져 있는지 알 必要가 있겠다. 그래서 phospholipid로는 lysolecithin이 micelle 構造中에서 polar head를 모두 aqueous medium에 露出시키고 또 反應도중 structural reorganization을 일으키지 않으므로 몇몇의 다른 calcium ion 濃度에서의 equivalence ratio에서 dextran sulfate와 insoluble complex를 形成시켰다. 그 후 그 속의 dextran sulfate, calcium ion, lysolecithin을 각각 定量하여 그로부 로 sulfate group/polar head, polar head/calcium ion, sulfate group/calcium ion의 값을 계산했다. 이 값으로부터 각각의 insoluble complex속의 polar head : Ca : sulfate group의 比를 求했다. 2.5mM의 $CaCl_2$ 에서는 이 比는 3 : 1 : 3이었으며 calcium ion 濃度を 增加시키면 점차로 變化해서 20mM $CaCl_2$ 에서는 2 : 1 : 3이었으며 calcium ion 濃度を 계속 增加시켜도 더 이상의 變化가 없었다. insoluble complex속의 構成成分의 當量比로부터 추측할 수 있는 것은 calcium ion은 低

濃度인 2.5mM에서는 lysolecithin micelle 속의 매 3개 마다의 lysolecithin分子的 polar head의 phosphate group을 dextran sulfate의 sulfate group과 crosslink 시키고 20mM以上の calcium ion 濃度에서는 매 2개 마다의 lysolecithin 分子的 phosphate group을 dextran sulfate의 sulfate group과 crosslink시키는 것을 알 수 있었다. 1개의 polar head와 1개의 calcium ion은 insoluble complex를 形成하는데 2개의 sulfate group를 必要로 하므로 insoluble complex속의 dextran sulfate分子的 매 3개의 sulfate group중 1개는反應에 전혀 참여하지 않는듯 하다. 高濃度の calcium ion 存在下에서도 lysolecithin의 모든 polar head가 dextran sulfate의 sulfate group과 crosslink하지 않는 것은 아마도 dextran sulfate속의 反應할 수 있는 sulfate group의 分布와 位置가 問題인 듯 하다⁴⁵⁾.

Low density lipoproteins가 dextran sulfate와 또 zwitterionic phospholipids가 calcium ion 存在下에서 dextran sulfate와 insoluble complex를 形成하는 것으로 미루어보아 이 物質間의 反應은 動脈硬化症의 진전은 물론 다른 여러 組織에 있어서의 calcification에 깊이 관련 할 지도 모른다. 特히 動脈硬化症이 가끔 表面이 zwitterionic phospholipids로 둘러 싸인 extracellular lipid droplets²⁰⁾과 large fatty deposit, calcium 축적 등으로 특징지워 지는 것을 생각 할 때 calcium ion 存在下에서의 zwitterionic phospholipids와 dextran sulfate 사이의 反應이 生體內에서 일어날 수 있는 可能性은 더욱 커진다. 더우기 最近에 組織學者들에 의해 人間의 動脈의 fatty deposit의 바로 밑에는 glycosaminoglycan이 存在한다는 것이 밝혀졌는데⁴⁷⁾ 이러한 事實은 지금까지 說明한 zwitterionic phospholipids와 dextran sulfate 사이의 反應이 生體內에서 일어날 수 있는 可能性을 더욱 뒷받침 해준다. Calcium ion 濃도가 生體內에서 部分的으로 增加할 때 lipid droplet나 fatty deposit가 지금까지 說明한 反應 mechanism과 비슷한 mechanism에 의해 glycosaminoglycan과 反應해서 lipid droplet나 fatty deposit을 한군데 固定시켜 動

脈組織에 축적하게 하여 動脈硬化症을 더욱 심하게 할 수 있겠다. 또한 비슷한 反應이 적어도 epiphyseal cartilage, 뼈, dentin, aortic valve, aortic media와 같은 組織의 calcification의 初期에 관련 할 수도 있겠다.

(1978. 11.15 接受)

문 헌

1. Astrup, p.: *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 16A woef, s. ed., pp. 207, Plenum Press, New York (1971).
2. Scott, P. J.: *New Zealand Med. J.*, **77**, 1(1973).
3. Holman, R.L.: *Amer. J. Clin. Nutr.* **9**, 565(1961).
4. Ross, R. and Glomset, J.A.: *Science*, **180**, 1332 (1973).
5. Geer, J.C. and Haust, M.D.: *Smooth muscle Cells in Atherosclerosis* pp. 4, Springer-verlag, New York (1972).
6. Nishida, T.: *Illinois Research*, fall (1973).
7. Webster, W.S., Bishop, S.P. and Geer, J.C.: *Amer. J. Pathol.*, **76**, 245 (1974).
8. Webster, W.S., Bishop, S.P. and Geer, J.C.: *Amer. J. Pathol.*, **76**, 265 (1974).
9. Gendre, p.: *J. Submicr. Cytol.*, **6**, 179(1974).
10. Haust, M.D. and More, R.H.: *The Pathogenesis of Atherosclerosis*, Wissler, R.W. and Geer, J.C. ed., pp. 1, The Williams, and Wilkins, Baltimore (1972)
11. McGill, H.C.: *The Pathogenesis of Atherosclerosis*, Wissler, R.W. and Geer, J.C. ed., pp. 239, The Williams and Wilkins Baltimore, (1972).
12. Mustard, J.F. and Packham, M.A.: *The Pathogenesis of Atherosclerosis*, Wissler, R.W. and Geer, J.C. ed., pp. 214, The Williams and Wilkins, Baltimore, (1972).
13. Stemerman, M.B.: *Amer. J. Pathol.*, **73**, 7(1973).
14. McMillan, G.C.: *Amer. J. Cardiol.*, **31**, 542 (1973).
15. Moon, J.Y.: *Atherosclerosis*, **16**, 119(1972).
16. Keeley, F.W. and Partridge, S.M.: *Atherosclerosis*, **19**, 287 (1974).
17. Villamil, M.F., Rettori, V. and Yeyati, N.: *Amer. J. Physiol.*, **224**, 1314 (1973).

18. Papahadjopoulos, D.: *J. Theor. Biol.*, **43**, 329 (1974).
19. Lee, K. T., Nam, S.C., Florentin, R.A. and Thomas, W.A.: *Med. Clin. N. Amer.*, **58**, 281 (1974)
20. Small, D.M. and Shipley, G.G.: *Science*, **185**, 222 (1974).
21. Whereat, A.F. and Rabinowitz, J.L.: *Amer. J. Cardiol.*, **35**, 567 (1975).
22. Zilversmit, D.B.: *Atherosclerosis: Proceedings of the second International Symposium, Chicago, Ill.*, Jones, R.J. ed., pp.35, Springes-Verlag, New York. (1970).
23. Smith, E.B.: *Avvan. Lipid Res.*, **12**, 1 (1974).
24. Skipski, V.P.: *Blood Lipids and Lipoprotein: Quantitation, Composition, and Metabolism.* Nelson, G.J. ed., pp.476, John Wiley and Sons, New York (1972).
25. Cornwell, D.G. and Kruger, F.A.: *J. Lipid Res.*, **2**, 110 (1961).
26. Burstein, M. and Samaille, J.: *Clin. Chim. Acta*, **5**, 609 (1960).
27. Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Alaupovic P. and Furman, R.H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **112**, 259 (1963).
28. Hatch, F.T. and Lees, R.S.: *Avvan. Lipid Res.*, **6**, 1 (1968).
29. Burstein, M. and Scholnick, H.R.: *Avvan. Lipid Res.*, **11**, 67 (1973).
30. Janado, M. and Nishida, T.: *J. Lipid Res.*, **6**, 331 (1965).
31. Bernfeld, P., Nisselbaum, J.S., Berlekey, B.J. and Hanson, R.W.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2852 (1960).
32. Bihari-Verga, M., Simon, J. and Gero, S.: *Act. Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 375 (1968).
33. Chapman, D., Byrne, P., Shipley, G.G.: *Proc. Roy. Soc. Lon. Ser. A.*, **290**, 115 (1966).
34. Smith, E.G. and Slatter, R.S.: *Atherosclerosis*, **11**, 417 (1970).
35. Srinivasan, S.R., Dolan, P., Radhakrishnamurthy, B. and Berenson, G.S.: *Atherosclerosis*, **16**, 95 (1972). 36. Srinivasan, S.R., Dolan, p., Radhakrishnamurthy, B., Paraonkar, P.S. and Berenson, G.S.: *Biochim. Biophys. Acta.* **388**, 53 (1975).
37. Nishida, T. and Cogan, U.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 4689 (1970).
38. Nishida, T.: *J. Lipid Res.*, **9**, 627 (1968).
39. Bernfeld, P. and Kelley, T.F.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3341 (1964).
40. Girard, M. L. and Canal, J.: *C. R. Acad. Sci. Ser. D.*, **266**, 842 (1968).
41. Iverius, P.H.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 2607 (1972).
42. Kim, K.M.: *Fed. Proc.*, **35**, 156 (1976).
43. Irving, J.T.: *Fed. Proc.*, **35**, 109 (1976).
44. Wuthier, R.E.: *Fed. Proc.*, **35**, 117 (1976).
45. Anderson, H.C.: *Fed. Proc.*, **35**, 105 (1976).
46. Kim, Y. and Nishida, T.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1243 (1977).
47. Adams, C.W.M. and Bayliss, O.B.: *Atherosclerosis*, **18**, 191 (1973).