

TNF- α 에 의해 유도된 세포부착분자의 발현에 대한 Delphinidin Chloride의 억제 효과

고은경 · 채수철* · 서은선 · 나명석¹ · 이종빈

전남대학교 생물학과, ¹광주여자대학교 미용과학과

Delphinidin Chloride Effects on the Expression of TNF- α Induced Cell Adhesion Molecules

Eun Gyeong Koh, Soo Chul Chae*, Eun Sun Seo, Myung Suk Na¹
and Jong Bin Lee

Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹Department of Beauty & Science, Kwangju Women's University, Gwangju 506-713, Korea

Abstract – The process of atherosclerosis begins through secretion of inflammatory cytokine or adhesion of leukocyte from damage in blood vessels and transmigration. This study was conducted to investigate the effects of delphinidin chloride (DC) in the initial process of atherosclerosis on the expression of ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1) and VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) related to adhesion of leukocyte at the HUVEC (human umbilical vein endothelial cell line). As a result, cell growth inhibition rate at 50 μ M was respectively 4, 3 and 5% without cell toxicity. As a result of morphological observation monocyte-endothelial cell adhesion assay and optical microscope carried out to measure attachment of mononuclear cells to endothelial cells induced by Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) at concentrations without cell toxicity, DC concentration-dependently suppressed attachment. When effects on the expression of VCAM-1 and ICAM-1, cell adhesion molecules induced from endothelial cells by TNF- α , were comparatively analyzed using western blot analysis and RT-PCR methods, protein of VCAM-1 and ICAM-1 and expression at the level of mRNA were concentration-dependently reduced. Taken together, the results of this studies provide evidence that DC possess an anti-metastatic activity.

Key words : VCAM-1, ICAM-1, Delphinidin Chloride

서 론

혈관 내피세포는 면역기전의 활성화가 이루어진 조직과 혈액 사이에 존재하면서 혈액 내 여러 가지 물질과

면역세포들의 이동에 관여하는 중요한 조직으로 인식되고 있다. 특히 혈중의 백혈구가 조직 내로 이동하는 데 있어 먼저 혈관 내피세포와 결합하는 과정이 필요한 것으로 알려져 있다 (Bereta *et al.* 1992; Barnes and Liew 1995). 동맥경화증은 동맥벽의 비후, 경화, 기능저하를 나타내는 병변이다. 죽종 형성의 초기 진행 중 하나는 단핵구의 내피세포로의 부착이다. 이로 인해 투과성이 증가할

* Corresponding author: Soo Chul Chae, Tel. 062-530-3395, Fax. 062-530-0405, E-mail. soochul@jnu.ac.kr

뿐만 아니라 백혈구, 혈소판의 내피세포로의 유착이 증가한다. 이 중요한 과정이 단핵구와 세포부착분자 간 상호작용에 의해 일어난다. 세포부착분자(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1 : intracellular adhesion molecule, ICAM-1)는 단핵구의 부착을 증대하는데 이것은 특히 혈관이 많은 내피에서 죽종동맥경화 손상에서 잘 발견되며, 손상된 내피세포에 강력한 세포부착인자인 VCAM-1과 ICAM-1 등이 발현되어 다량의 단핵구와 T림프구가 내피하조직으로 침투해 들어간다(Frostegard *et al.* 1993). 이러한 과정 중에서 PDGF (plate derived growth factor), bFGF (basicblast growth factor), TGF β (transform growth factor β), TNF- α (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin-1), IL-2 등의 많은 종류의 성장인자와 사이토카인이 분비되어 세포간의 chemotaxis와 증식의 신호에 관여한다는 것이 증명되면서 동맥경화에 대한 분자생물학적 연구는 성장인자와 사이토카인들에 대한 연구가 가속화되고 있다.

혈관 내피세포에서 세포부착분자의 발현은 죽상동맥경화증, 류머티스 관절염 및 천식 등과 같은 질환의 병태생리에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Barnes and Liew 1995).

VCAM-1은 편역글로불린 superfamily에 속하는 단백질로 중성구를 제외한 단핵구, 림프구, 과립구의 very late antigen-4 (VLA-4)와 결합한다고 알려져 있다(Osborn *et al.* 1989; Elicies and Arrmara 1990). 또한 이 분자의 발현은 사이토카인의 종류와 세포종류에 따라 다양한 반응소견을 보이는 것으로 알려져 있다(Swerlick *et al.* 1992; Haraldsen *et al.* 1996). ICAM-1은 편역반응과 활성화에 중요한 조기발현물질로서 여러 가지 질환에서 발현되고 있다(Adams 1994). 세포표면에서 ICAM-1이 발견되는 질환으로는 자가면역성 갑상선염, 천식, 쇼그렌 증후군, 악성흑색종, 전립선암, 난소암, 대장암 등이 있으며 편역조직화학적 염색방법으로 자궁경부 상피내종양에서도 ICAM-1단백의 발현을 증명하여 인유두종 바이러스와의 연관성을 보고한 바 있다(Coleman *et al.* 2003). 인간혈관 내피세포는 VCAM-1이나 ICAM-1과 같은 세포에서 선택적으로 발현하는 다양한 세포표면 부착분자를 통해서 단핵구와 결합한다(Iiyama *et al.* 1999). 초기 염증반응과 연관된 사이토카인 TNF- α 는 죽상동맥경화의 손상에서 일반적으로 나타나는데, 화학 주성인자, 여러 사이토카인, 그리고 세포부착분자를 유도하며 염증반응 과정에 관여한다(DiDonato *et al.* 1997; Ross 1999).

안토시아닌은 크게 6종류로 분류되는데 자홍색을 나타내는 cyanidin이 가장 흔히 있는 물질이며, 주황색은 cyanidin보다 hydroxyl 기가 하나 작은 pelargonidin에 의

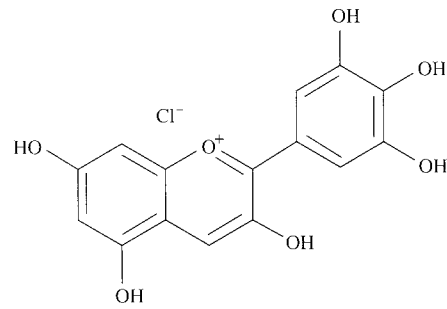


Fig. 1. Chemical structure of the Delphinidin Chloride (DC).

한 것이고 담자색, 적자색 및 청색은 일반적으로 cyanidin보다 hydroxyl 기가 하나 더 많은 delphinidin에 의한 것이다. 그 효능으로는 항산화 작용을 비롯해 콜레스테롤 저하와 항암 및 항염증, DNA 손상의 보호 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 시력과 기억력이 좋아지고 비만 억제로 심장 및 뇌혈관질환 및 당뇨병, 관절염에 효과가 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 안토시아닌의 종류 중에서 delphinidin chloride (DC)가 인간혈관 내피세포주를 이용하여 세포부착분자의 발현과 내피세포에 단핵구의 부착에 대한 효과 비교를 통해 항동맥경화에 미치는 영향에 대해 연구하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

본 실험에 사용된 인간혈관 내피세포주 (HUVEC : human umbilical vein endothelial cell line)는 Lonza Walkersville, Inc. (Bethesda, USA)에서, human monocytic leukemia cell로부터 수립된 U937 세포주는 American Type Culture Collection (Bethesda, USA)로부터 분양 받아 이 실험에 사용하였다. HUVEC 세포주의 배양용 배지는 EGM-2 Bullet Kit (CC-3162, Lonza Walkersville, USA)를 구입해서 사용하였고, U937 세포주 배양용 배지는 DMEM (Gibco, USA) 배양액에 10%의 fetal bovine serum (FBS : Gibco, USA), 100 U mL⁻¹ penicillin과 100 μ g mL⁻¹ streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포 배양은 75 cm²의 배양용 플라스크에 일정량의 배양액을 넣어 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 항온기 (Forma Scientific, USA)에서 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid : Gibco, USA)로 부유 시킨 후 0.4% trypan-blue로 염색하여 혈구계산기로 세포수를 산정하였다. 세포생존율시험은 배양된 세포를 96 well

plate (Nunc, USA)에 1×10^4 cells well⁻¹이 되도록 세포 부유액을 200 μ L씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. 세포생존율 측정 (MTT assay)

MTT assay는 Mosmann 방법(1983)에 따라 시행하였다. HUVEC 세포주를 5×10^3 cells mL⁻¹ 세포 수로 계수한 다음 96 well plate에 200 μ L씩 분주하여 24시간 동안 배양하고 여러 농도의 검색시약이 포함된 배양액으로 교환하고 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양액을 MTT 시약 200 μ g mL⁻¹가 포함된 배양액으로 교환하고 3시간 동안 반응시켰다. 3시간 후 배양액을 버리고 DMSO를 200 μ L well⁻¹씩을 넣어 5분간 실온 방치하여 푸른색 결정인 formazan을 용해시킨 후 microplate spectrophotometer (Bio-Tech, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

3. Monocyte-endothelial cell adhesion assay

HUVEC 세포를 배양하여 48 well plate에 심은 후 DC를 1시간 동안 전처리하고 TNF- α 를 6시간 동안 처리하였다. 그 후 HUVEC 세포를 PBS로 2회 세척하고, U937 세포에 fluorescence dye인 2',7'-bis-(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein (BCECF, Molecular Probe, USA)를 10 μ M의 농도로 1시간 동안 37°C에서 배양하여 염색한다. BCECF dye로 표지한 후 DMEM 배지로 2회 세척하였다. 이렇게 표지된 2.5×10^5 개의 U937 세포를 HUVEC 세포에 첨가한 후 1시간 동안 배양하였다. 그리고 부착되지 않은 세포는 PBS로 제거하였다. 내피세포에 부착된 U937세포를 pH 8.0, 0.1% SDS를 함유한 50 mM의 Tris-HCl 등으로 용해시키고 이들의 형광정도를 excitation 485 nm와 emission 535 nm 파장에서 spectrofluorometer (Thermo Electron, Finland)로 측정하였다.

4. RNA 분리 및 역전사중합연쇄반응 (RT-PCR)

VCAM-1, ICAM-1의 mRNA 변화를 관찰하기 위해 역전사 중합효소반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 사용하였다. 배양한 HUVEC 세포를 PBS로 2회 세척하고 혈청이 함유되지 않은 DMEM과 DC를 처리하여 1시간 동안 전처리 후 TNF- α 로 3시간 동안 처리하여 배양한 후 세포 내의 RNA를 분리하였다. 역전사 반응은 avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사효소 및 oligo dT primer를 이용하여 42°C에서 60분 동안 반응 후 99°C에서 5분간 가열하고 즉시 얼음에 넣어 역전사 효소를 불활성화 시키고 생성된 cDNA를 linear strand 상태로 존재하도록 하였다. 생

성된 cDNA를 이용하여 target gene에 선택적인 primer 및 Taq polymerase를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 primer들의 염기서열은 ICAM-1 (5'-CATGTGACCCATCTACAGCTTCCGG-3', 5'-GCTGCTACCACAGTGATGATGACAA-3'); VCAM-1 (5'-GCTGCTACCACAGTGATGATGACAA-3', 5'-CGCATCCTTCACTGGCCTT-3'), GAPDH (5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3', 3'-CCAGTAGGTAAGTTGAAAC-5')를 합성하였다. PCR 반응 조건은 cycle 시작 전 94°C에서 5분간 가열한 뒤 매 cycle마다 94°C에서 30초간 denaturation시키고 55°C에서 30초 동안 annealing한 뒤 72°C에서 30초 동안 elongation하는 과정을 25회 반복하였고 cycle 종료 후 72°C에서 7분 동안 생성된 가닥을 extension하는 과정을 거쳤다. PCR 반응이 끝난 후에는 증폭된 DNA를 1.2% agarose gel을 이용하여 90 V에서 45분 동안 전기영동 후 염색하여 DNA를 확인하였다.

5. Western blotting analysis

DC가 처리된 배지에서 배양된 세포를 모아 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad, USA)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담근 후 상온에서 1시간 정도 배양하여 비특이적 단백질에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 항체 (PBS-T로 1:1,500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

6. 통계학적 분석

실험 결과의 유의성 검증은 ANOVA Student's *t* test 방

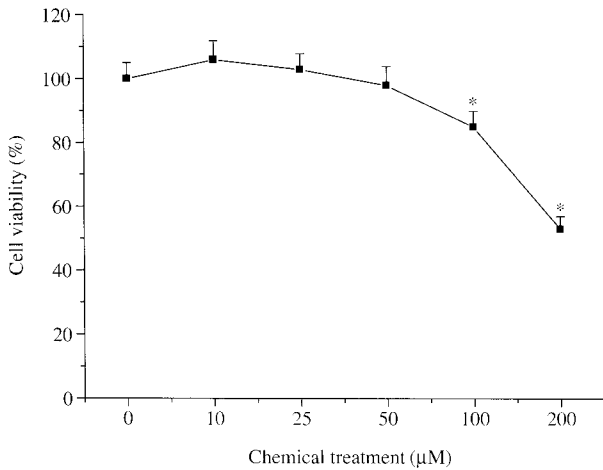


Fig. 2. Effects of delphinidin chloride (DC) compounds on cell viability in human endothelial cells (HUVEC) for 24 h. Cell viability was determined by measuring optical density at 570 nm in MTT assay. The values are expressed as a mean \pm S.D. from three individual experiments.

법에 따라 실시하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 3회 이상 실시한 실험 결과들을 평균에 대한 표준편차로 분석하였다.

결 과

1. 세포생존율 측정

세포의 부착에 대한 안토시아닌의 효과를 알아보기 전에 내피세포에 세포독성으로 인한 영향을 미치지 않는 실험조건을 정하기 위해 DC를 농도별 0, 25, 50, 100, 200 μM 로 96 well plate에 배양한 HUVEC 세포주에 24 시간 동안 처리한 다음 대조군과 처리군을 MTT assay로 세포 증식율을 조사하였다.

그 결과 50 μM 이하의 DC의 경우 세포독성이 나타나지 않았다. 100, 200 μM 에서 각각 DC는 16, 48%의 세포 증식 저해가 처리 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다. 따라서 이 후 실험에서는 세포의 독성이 나타나지 않는 10, 25, 50 μM 농도에서 24시간 동안 처리하여 실험하였다.

2. DC의 TNF- α 에 의해 유도된 내피세포에 단핵구 부착에 대한 억제 효과

인간의 내피세포에서 세포부착분자 ICAM-1의 발현의 증가는 단핵구의 부착을 촉진하고 이는 항고지혈증 등 다양한 질병을 유발한다. 따라서 본 연구에서는 DC의

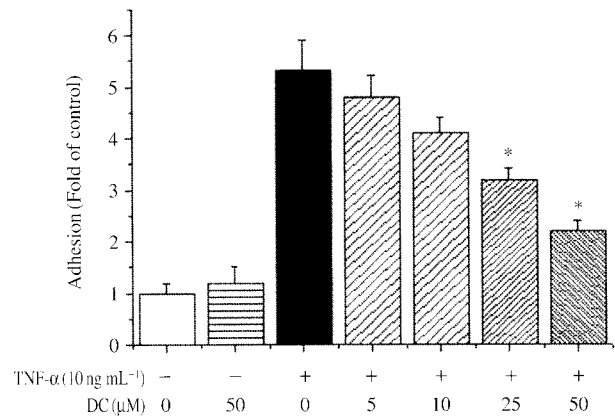


Fig. 3. Effects of delphinidin chloride (DC) on the BCECF (fluorescence dye) labelled monocyte adhesion to endothelial cells by Monocyte-endothelial cell adhesion assay. The endothelial cells were pretreated with DC for 3 h, and then stimulated with TNF- α (10 ng mL⁻¹) for 6 h. The values are expressed as a mean \pm S.D. of three individual experiments, performed in triplicate.

내피세포에 대한 단핵구의 부착 억제효과를 비교 측정하였다. 내피세포에 DC를 각각 3시간 동안 전처리한 후 TNF- α (10 ng mL⁻¹)를 6시간 동안 처리하였다. Monocyte-endothelial cell adhesion assay를 이용하여 내피세포에 대한 단핵구의 부착과정에 대한 형태학적 관찰을 하였다. TNF- α 처리는 대조군과 비교하여 단핵구와 내피세포 부착을 현저하게 증가시켰다 (Fig. 3).

3. TNF- α 의 ICAM-1, VCAM-1 단백질 발현 증가 효과에 대한 DC의 영향

혈관에 염증 생성 시 다양한 성장인자와 사이토카인 등은 염증관련 세포들이 세포 표면에 부착되어 혈관 내에서 조직 속으로 이동할 수 있도록 VCAM-1이나 ICAM-1과 같은 세포부착분자를 발현시키기도 한다. 이에 내피세포의 세포부착분자 VCAM-1과 ICAM-1의 발현에 미치는 DC의 효과를 단백질 수준에서 정량하기 위하여 western blot analysis 방법으로 단백질 양을 측정 비교하였다.

그 결과 내피세포에 TNF- α (10 ng mL⁻¹)에 의해 유도된 VCAM-1, ICAM-1의 발현이 대조군에 비해 DC의 처리농도 10, 25, 50 μM 에서 각각 37, 48, 74%와 20, 40, 47%로 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 결과로 볼 때, 내피세포에서 DC가 처리농도 별로 VCAM-1, ICAM-1 단백질의 발현을 감소시키고, 이러한 현상에 의해 단핵구 부착을 감소시킨다는 것을 알 수 있다.

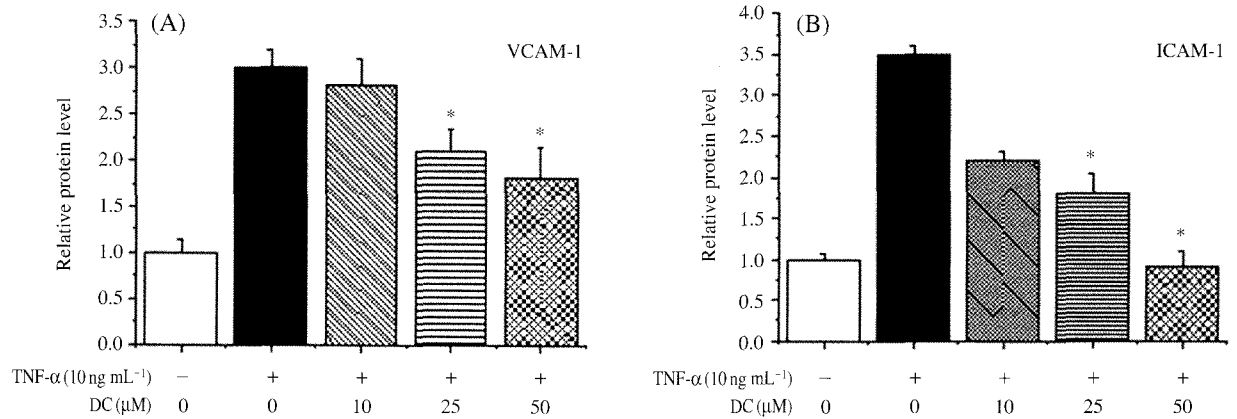


Fig. 4. Effects of delphinidin chloride (DC) on TNF- α induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 protein by western blot analysis. The endothelial cells were pretreated with DC for 3 h and stimulated with TNF- α (10 ng mL⁻¹) for 6 h. After 6 h of incubation, the cell lysates were blotted with the anti-ICAM-1 or anti-VCAM-1 with β -actin antibody.

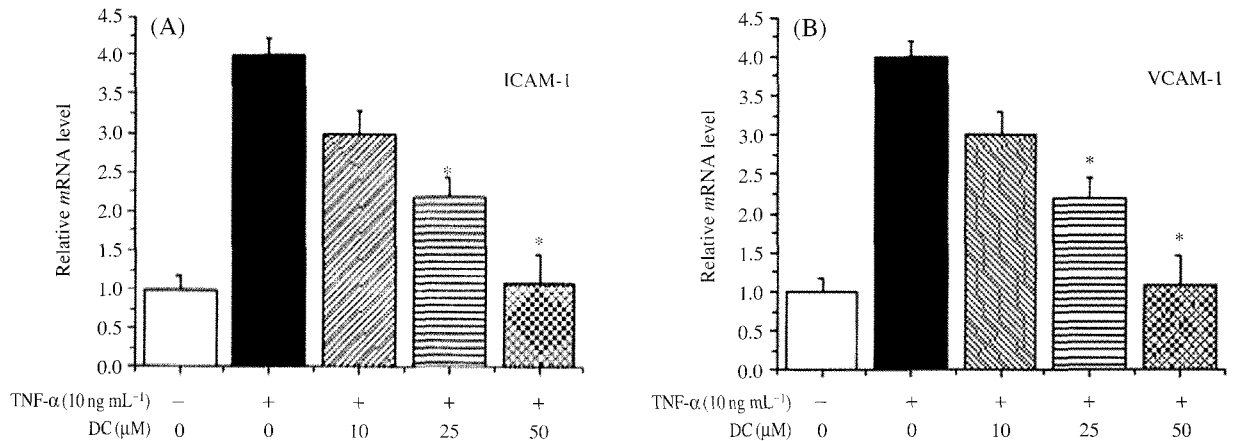


Fig. 5. Effects of DC on TNF- α induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 mRNA by RT-PCR analysis. The endothelial cells were pretreated with DC for 1 h and stimulated with TNF- α . After 3 h of incubation, the total RNA was prepared and RT-PCR was performed.

4. TNF- α 의 VCAM-1, ICAM-1의 mRNA 발현 증가 효과에 대한 DC의 영향

DC가 TNF- α 의 VCAM-1, ICAM-1 단백질의 수준 증가 효과를 감소시켰다. 이러한 VCAM-1, ICAM-1의 단백질 수준의 감소가 DC에 의한 VCAM-1, ICAM-1의 mRNA 발현 억제 때문인지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 대조군에 비해 DC를 3시간 동안 농도별로 10, 25, 50 μ M을 처리한 결과, VCAM-1, ICAM-1의 발현이 각각 32, 62, 70%와 25, 45, 57% 처리농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 5).

이 결과는 DC가 전사수준에서 VCAM-1, ICAM-1의 발현을 현저하게 억제한다는 것을 알 수 있다.

고찰

동맥경화증은 동맥의 내막에 콜레스테롤이 축적되는 죽종형성 (atherogenesis)으로 인해 일어나는 가장 일반적인 퇴행성 질환으로 이러한 내피손상에 따른 염증세포와 혈관세포 간의 염증반응은 중요한 초기병태생리이다 (Russel 1993; Steinberg 2002). 내막으로 이동한 혈관 내피세포는 염증부위의 중성구, 림프구 등의 염증 관련세포들의 이동을 촉진하기 위하여 여러 가지 화학물질을 분비하기도 하고 세포표면에 염증관련 세포들이 부착되어 혈관 내에서 조직 속으로 이동할 수 있도록 VCAM-1이나 ICAM-1과 같은 세포부착분자를 발현하기도 한다 (Osborn *et al.* 1990; Bereta *et al.* 1992).

TNF- α 등의 사이토카인에 의해 혈관 내피세포가 활성화 되면 혈관 내피세포는 여러 가지 화학물질을 분비하여, 염증 부위로의 염증 관련 세포들의 이동을 촉진하고 염증관련 세포들이 세포 표면에 부착되어 혈관 내에서 조직 속으로 이동할 수 있도록 세포부착분자를 발현한다(Malden *et al.* 1991).

플라보노이드계 색소인 안토시아닌은 관상동맥의 염증과 산화된 저밀도지단백(OX-LDL)을 감소시키고 혈관 내피세포에서 산화질소(NO)를 발생시켜 혈관을 유연하게 함으로써 고지혈증 동맥경화 등에 의한 심장병 위험을 낮출 수 있는 유용한 물질로 알려져 있다.

본 연구에서는 안토시아닌 분획 중에서 DC가 혈관 내피세포의 염증관련 부착물에 미치는 영향을 조사한 결과 안토시아닌 분획 중 DC가 TNF- α 에 의해 유도된 염증관련 세포의 내피세포로의 부착율을 감소시켰다.

세포 수준에서의 단백질 양 및 mRNA의 양을 측정하기 위해 western blot 및 RT-PCR을 시행한 결과 DC를 전처리한 군이 TNF- α 단독처리한 군에 비해 농도 의존적으로 VCAM-1, ICAM-1 단백질 및 mRNA 발현율이 감소하였다.

이러한 결과로 볼 때, DC에 의한 부착 억제는 VCAM-1, ICAM-1 발현 억제에 의한 것이라 생각된다. 인간혈관 내피세포주에서도 ICAM-1, VCAM-1이 발현되는 것이 보고되었다. 이러한 부착 단백질들은 세포막 표면에 위치하며 발현 정도 및 활성도 변화에 의해 그 기능을 수행한다(Shimizu *et al.* 1992; Zimernan and Murphy 1992; Gearing and Newman 1993).

단일 분획 중 DC가 세포 부착 단백질의 양 및 활성도를 억제시킴으로서 혈관 내피세포에 염증관련 세포의 부착을 억제하는 것으로 사료된다.

TNF- α 에 의해 유도된 단핵구의 부착 그리고 혈관벽으로의 이동은 발병과 죽종형성에 있어서 중요한 단계이다. 본 실험은 안토시아닌 단일분획에 대한 DC의 억제 효과에 의한 최초의 보고로 이러한 연구는 항염증반응과 죽종동맥경화에 있어서 DC 효용성에 새로운 조망을 제시할 것이다.

적 요

안토시아닌(Anthocyanin)은 플라보노이드계 화합물의 한 부류로 항산화, 항암 및 항괴양, 항당뇨, 중금속해독, 시력보호, 콜레스테롤 저하 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되어 있다. 죽상경화과정은 염증성 사이토카인의 분비 또는 혈관손상으로 인한 백혈구의 부착

과 이동을 통해 시작된다. 본 연구는 이러한 죽상경화의 초기과정에서 안토시아닌 혼합물 중 single compound인 delphinidin chloride (DC) 인간혈관 내피세포주(HUVEC, human umbilical vein endothelial cell line)에서 백혈구 부착과 관련이 있는 ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1)과 VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) 발현에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 세포독성이 없는 농도에서 TNF- α 에 의해 유도된 혈관 내피세포에 대한 단핵구의 부착정도를 측정하기 위해 monocyte-endothelial cell adhesion assay와 광학현미경을 이용한 형태학적 관찰을 한 결과 DC가 처리농도 의존적으로 부착을 억제하였다. 내피세포로부터 TNF- α 에 의해 유도된 세포부착분자인 VCAM-1과 ICAM-1의 발현에 대한 영향을 western blot analysis 및 RT-PCR 방법으로 비교 분석한 결과 VCAM-1과 ICAM-1의 단백질과 mRNA 수준에서의 발현이 농도 의존적으로 감소되었다.

이러한 결과들을 종합해 볼 때 안토시아닌 중에서 DC를 실험한 결과 DC는 TNF- α 에 의해 유도된 내피세포의 ICAM-1과 VCAM-1 발현 억제효과를 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 중소기업청의 실험실 창업사업으로 수행된 연구결과임.

참 고 문 헌

- Adams ML. 1994. The public health impact and economic cost of smoking in Connecticut. *Conn. Med.* 58:195-198.
- Barnes PJ and FY Liew. 1995. Nitric oxide and asthma inflammation. *Immunol. Today* 16:128-130.
- Bereta M, J Bereta, S Cohen and MC Cohen. 1992. Low density lipoprotein inhibits accumulation of nitrites in murine brain endothelial cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:315-320.
- Coleman JE, MJ Huentelman, S Kasparov, BL Metcalfe, JF Paton, MJ Katovich, SL Semple-Rowland and MK Raizada. 2003. Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiol. Genomics* 12:221-228.
- DiDonato JA, M Hayakawa, DM Rothwarf, E Zandi and M Karin. 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappa B. *Nature.* 388: 548-554.

- Elicies A and H Arimura. 1990. Correlation between molecular size and interferon-inducing activity of poly I:C. *Acta Virol.* 19:457-466.
- Frostegard J, R Wu, A Haegerstrand, M Patarroyo and AK Lefvert. 1993. Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. *Atherosclerosis* 103:213-219.
- Gearing AH and W Newman. 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today* 14:506-512.
- Haraldsen G, D Kvale, B Lien, IN Farstad and P Brandtzaeg. 1996. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 156:2558-2565.
- Iiyama K, L Hajra, M Iiyama, M DiChiara, BD Medoff and MI Cybulsky. 1999. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res.* 85:199-207.
- Malden LT, A Chait, EW Raines and R Ross. 1991. The influence of oxidatively modified low density lipoproteins on expression of platelet-derived growth factor by human monocyte-derived macrophages. *Chem.* 266:13901-13907.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 16:55-63.
- Osborn L, C Hession, R Tizard, C Vassallo, S Luhowskyj, G Chi-Rosso and R Lobb. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211.
- Osborn LM, D Harris, JC Reading and MB Prather. 1990. Outcome of pregnancies experienced during residency. *J. Fam. Pract.* 31:618-622.
- Ross R. 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126.
- Russel R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990. *Nature* 362:801-809.
- Shimizu Y, W Newman and S Shaw. 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today* 13:93-100.
- Steinberg DS. 2002. Atherogenesis in perspective. Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* 8:1211-1217.
- Swerlick RA, EJ Brown, Y Xu, KH Lee, S Manos and TJ Lawley. 1992. Expression and modulation of the vitronectin receptor on human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 99:715-722.
- Zimmerman SB and LD Murphy. 1992. Excluded volume effects on the partition of single- and double-stranded oligodeoxynucleotides between two liquid phases. *Biopolymers* 32:1365-1373.

Manuscript Received: February 2, 2009
Revision Accepted: February 20, 2009
Responsible Editor: Kyung Jin Lee