

산화 적혈구를 이용한 산화 지질의 특성 규명. Annexin V와의 결합

중앙대학교 의과대학 내과학교실

이경은 · 이경현 · 최여진 · 이광호 · 최수희 · 이성호
김학진 · 이광제 · 김태호 · 고흥숙 · 김치정 · 류왕성

Binding of Annexin V to Oxidized Lipid on Oxidatively Damaged Erythrocyte

Kyung Eun Lee, MD, Kyung Heon Lee, MD, Yeo Jin Choi, MD, Kwang Ho Lee, MD,
Soo Hee Choi, MD, Sung Ho Lee, MD, Hak Jin Kim, MD, Kwang Je Lee, MD,
Tae Ho Kim, MD, Hong Sook Ko, PhD, Chee Jeong Kim, MD and Wang Seong Ryu, MD
Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Annexin V is known to bind to the phosphatidylserine (PS) of damaged cell membranes. We recently demonstrated that annexin V binds to oxidized red blood cells (oxRBC). The aim of this study was to find whether annexin V binds to oxidized lipids or to the PS of oxRBC. **Materials and Methods :** Red blood cells (RBC) were oxidized by the addition of CuSO₄, and the degree of oxidation evaluated using the semiquantitative measurement of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The binding of annexin V to oxRBC was evaluated by flow cytometry. **Results :** Annexin V was found to bind to oxRBC, but not to native RBC. The percentage of RBC binding to annexin V was closely correlated with the degree of oxidation, as measured using TBARS ($r=0.99$, $p=0.000$) in relation to the concentration of CuSO₄. The binding of annexin V to oxRBC was attenuated in the presence of oxidized low density lipoprotein (oxLDL), with these phenomena also being dose-dependent. The binding was reduced by $71.0 \pm 3.0\%$ in the presence of $100 \mu\text{g/mL}$ oxLDL. LDL had no influence on the binding of annexin V to oxRBC. **Conclusion :** These findings suggest that annexin V may bind to the oxidized lipids of cell membranes. Further studies will be required to evaluate the relative importance between oxidized lipids and PS, and to find the characteristics of oxidized lipids in the binding of annexin V to damaged cell membranes. (Korean Circulation J 2006;36:285-291)

KEY WORDS : Erythrocytes ; Low density lipoprotein ; Lipid peroxidation ; Annexin V ; Binding.

서 론

산화 지질이 대식세포에 의해 섭취되는 과정은 죽상동맥경화(atherosclerosis) 발생에 중요한 단계이다. 이 과정을 통하여 대식세포는 거품세포로 변형되며, 이들이 모여 지방흔(fatty streak)이 형성되는 것이 죽상동맥경화의 병리학적 초

기 소견이다.¹⁾

대식세포가 산화 지질을 섭취하는 과정에 관여하는 수용체와 리간드(ligand)에 대해서는 많은 연구가 시행되었으나 아직 논란이 있다. 대식세포의 청소(scavenger) 수용체는 세포내 콜레스테롤의 농도가 증가하더라도 하향 조절되지 않으므로 산화 지질의 섭취 기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.^{2,3)}

죽상동맥경화의 발생에 관여하는 대표적인 산화 지질은 산화 저밀도지단백(low density lipoprotein, LDL)이다. 이것이 청소 수용체와 결합하는데 관여하는 리간드에 대해서 이전에는 산화 아포지단백이 작용하는 것으로 생각하였으나, 최근에는 산화 인지질(phospholipid)이 리간드로서 작용한다

논문접수일 : 2005년 12월 22일

심사완료일 : 2006년 1월 23일

교신저자 : 김치정, 156-070 서울 동작구 흑석동 224-1

중앙대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (02) 6299-1398 · 전송 : (02) 822-2769

E-mail : cjkim@cau.ac.kr

는 보고가 있다.⁴⁾ 인지질은 세포막이나 지단백의 주성분으로 이것에 연결되어 있는 펩타이드나 다당류와 함께 여러 가지 결합과 섭취 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾⁶⁾

손상된 세포가 제거되는 과정에도 청소 수용체가 참여하며, 수용체에 결합하는데 관여하는 세포의 리간드는 인지질의 일종인 phosphatidylserine(PS)으로 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 정상 세포에서 PS는 이중층(bilayer) 세포막의 안쪽 층에 주로 존재한다. 세포가 손상되는 과정에서 PS가 바깥층으로 이동하며, 이들이 청소 수용체와 결합하는데 중요한 역할을 한다는 보고들이 있다. 따라서 청소 수용체와 결합하는 리간드는 산화 인지질, PS 등 다양할 가능성이 있으며, 이들의 특성에 대해서는 좀더 연구가 필요한 상태이다.

Annexin V는 손상된 세포가 청소 수용체에 결합하는데 관여하는 PS와 결합하는 것으로 알려져 있으며,⁹⁻¹¹⁾ 세포의 아포토시스(apoptosis) 여부 판정에 흔히 사용되고 있다. 아포토시스된 세포는 위에서 설명한 바와 같이 PS가 세포 표면으로 노출되고 여기에 annexin V가 결합한다고 생각되고 있다. 하지만 아포토시스된 세포에 산화 지질이 있을 가능성이 제시되었고,¹²⁾¹³⁾ 최근 적혈구를 이용한 연구에서 annexin V가 산화 적혈구와 결합함이 관찰되었다.¹⁴⁾¹⁵⁾ 따라서 annexin V가 PS에만 결합하는가에 대해 의문을 가질 수 있다.

산화 적혈구는 산화 지질이 청소 수용체와 결합하는 과정의 연구에 이전부터 사용되고 있다. 이는 결합과 포식되는 과정을 현미경하에서 직접 확인할 수 있고, 흐름 세포 측정법(flow cytometry) 등을 이용하여 결합에 관여하는 리간드의 특성을 관찰하는데 유용할 수 있다.¹⁵⁾¹⁶⁾ 본 연구에서는 annexin V가 산화 적혈구에 결합하는데 어떤 물질들이 관여하는지를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

Ascorbic acid, 황산구리, disodium-EDTA, trichloroacetic acid(TCA), thiobarbituric acid(TBA), NaOH 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Alexa Fluro 488 annexin V는 Molecular Probes사(Eugene, USA)에서 구입하였다. LDL과 산화 LDL은 울산의대 김영미 박사가 제공하였다.

적혈구의 산화는 이전에 보고된 방법을 일부 변형하여 사용하였다.¹⁶⁾ 간단히 정리하면, 혈액을 EDTA 항응고제를 사용하여 채취한 후에 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈장을 제거하고 30배 용적의 PBS로 3회 씻었다. PBS를 이용하여 적혈구용적률(hematocrit)이 20%가 되게 희석한 후에 ascorbic acid를 5 mM의 농도로 투여하고 황산구리를 최고 1,600 μM 까지 다양한 농도를 투여하여 섭씨 37도에서 90분간 산화시켰다. 원심분리하여 황산구리액을 제거하고, 5 mM의 EDTA를 포함한 PBS로 산화 반응을 중지시킨 후에, PBS로 2회 씻고 적혈구용적률이 10%가 되게 PBS로 희석하였다.

산화정도를 측정하기 위해서는 thiobarbituric acid reactive

substance(TBARS)를 반정량적으로 측정하였다.¹⁷⁾ 적혈구용적률이 2.5%인 적혈구 용액 1 mL에 50% TCA를 0.6 mL 투여하고 원심분리한 후에 0.8 mL의 상층액을 취하였다. 여기에 1 mL의 TBA를 넣고 30분간 끓이고 식힌 후에 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산화정도는 106개의 적혈구당 흡광도로 표시하였다.

산화 적혈구와 annexin V와의 결합은 kit를 이용하여 흐름 세포 측정법으로 측정하였다. 산화 적혈구를 PBS로 씻은 후에, 산화 적혈구 수가 100 μL에 105개가 되게 완충

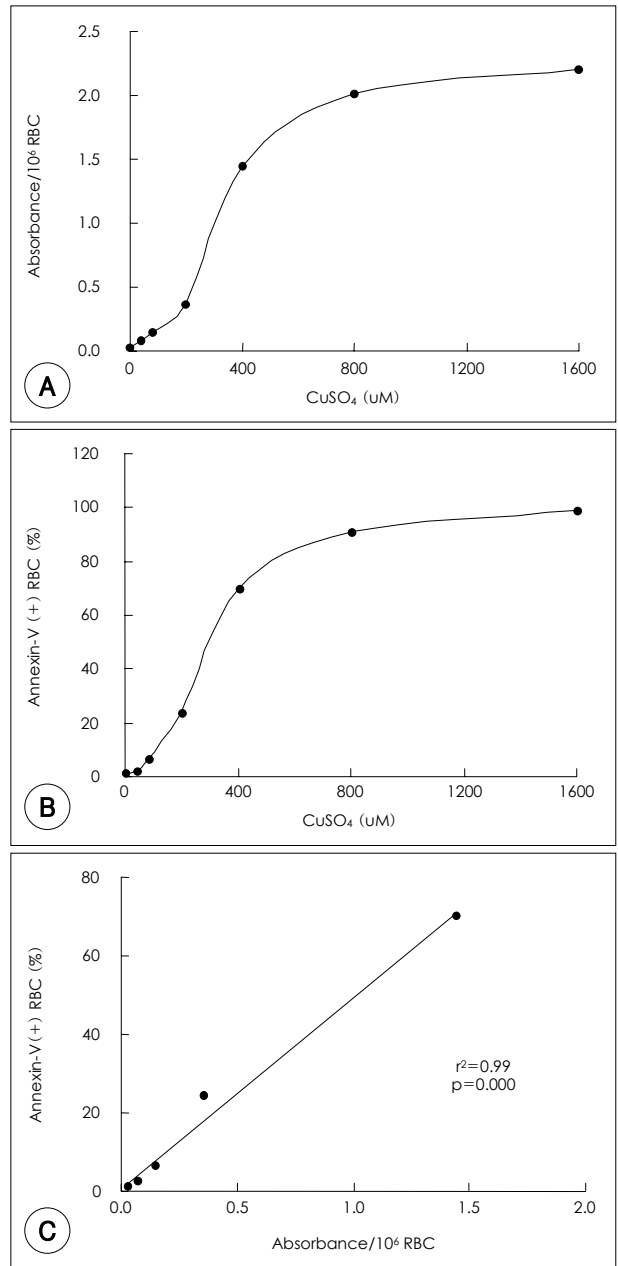


Fig. 1. Representative examples of (A) the degree of oxidation (thiobarbituric acid reactive substance) expressed by absorbance/10⁶ RBCs, (B) the percentage of RBCs binding with annexin V, and (C) the relationship between these two parameters according to the concentration of CuSO₄. RBCs: red blood cells.

액으로 희석하였다. 여기에 0~5 μL 의 Alexa Fluoro 488 annexin V를 투여하고, 실온에서 15분간 방치한 후에 400 μL 의 완충액을 투여하였다. 이를 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 530 nm에서 방출을 측정하였다.

산화 적혈구와 annexin V와의 결합에 미치는 산화 지질의 영향을 평가하기 위해 산화 LDL을 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도로 투여하여 결합 정도의 변화를 관찰하였다. 결합의 특성을 파악하기 위해 annexin V나 산화 LDL을 투여하고 15분간 방치한 후에 이들을 제거하고 다시 산화 LDL과 annexin V를 투여하여 15분간 반응시킨 다음에 산화 적혈구에 결합하는 annexin V의 양을 측정하였다.

수치는 평균과 표준오차로 표시하였고, 통계는 Student's t test와 선형회귀 분석을 사용하였으며, p값이 0.05 미만일 때에 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

다양한 농도의 황산구리를 사용하였을 때에 TBARS로 측정된 적혈구의 산화 정도는 투여한 황산구리의 농도와 정상관계가 있었으며 높은 농도에서는 고평부(plateau)에 도달하였다(Fig. 1A). 고평부에 도달하는 산화구리의 농도는 개인차가 있었다. Annexin V와 결합하는 적혈구의 백분율도 투

여한 황산구리의 농도와 정상관계가 있었고 역시 높은 농도에서는 고평부에 도달하였다(Fig. 1B). 고평부에 도달하기 이전의 황산구리 농도에서 산화 정도를 나타내는 TBARS와 annexin V와 결합하는 적혈구의 백분율 사이에는 아주 밀접한 정상관계가 있었다($r^2=0.99$, $p=0.000$, Fig. 1C).

흐름 세포측정의 forward scattering과 side scattering 그림에서 적혈구는 산화되면서 그 크기가 작아지고 과립성이 증가하였으며, 산화되지 않은 적혈구에는 annexin V가 결합하지 않은 반면에, 고농도의 황산구리 농도에 의해 완전히 산화된 적혈구에는 비교적 일정하게 결합하였다(Fig. 2). 산화 적혈구와 annexin V의 결합은 투여한 annexin V의 양이 증가함에 따라 증가하였다(Fig. 3).

산화 LDL을 투여하면 annexin V의 산화 적혈구에 대한 결합이 감소하였다. 이는 투여하는 산화 LDL의 양이 증가함에 따라 감소의 폭이 컸으며, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 산화 LDL 농도에서는 고평부를 이루었다(Fig. 4). 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 산화 LDL 농도에서 annexin V의 산화 적혈구에 대한 결합은 산화 LDL을 투여하지 않은 대조군에 비해 $71.0 \pm 3.0\%$ 감소하였다($p < 0.001$, Fig. 5). 산화되지 않은 LDL은 annexin V와 산화 적혈구의 결합에 영향을 미치지 않았다.

산화 적혈구에 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 산화 LDL을 투여하고 15분간 방치한 후에 원심분리하여 산화 LDL을 제거하고 annexin V를 투여하면, 산화 LDL과 annexin V를 동시에 투여한

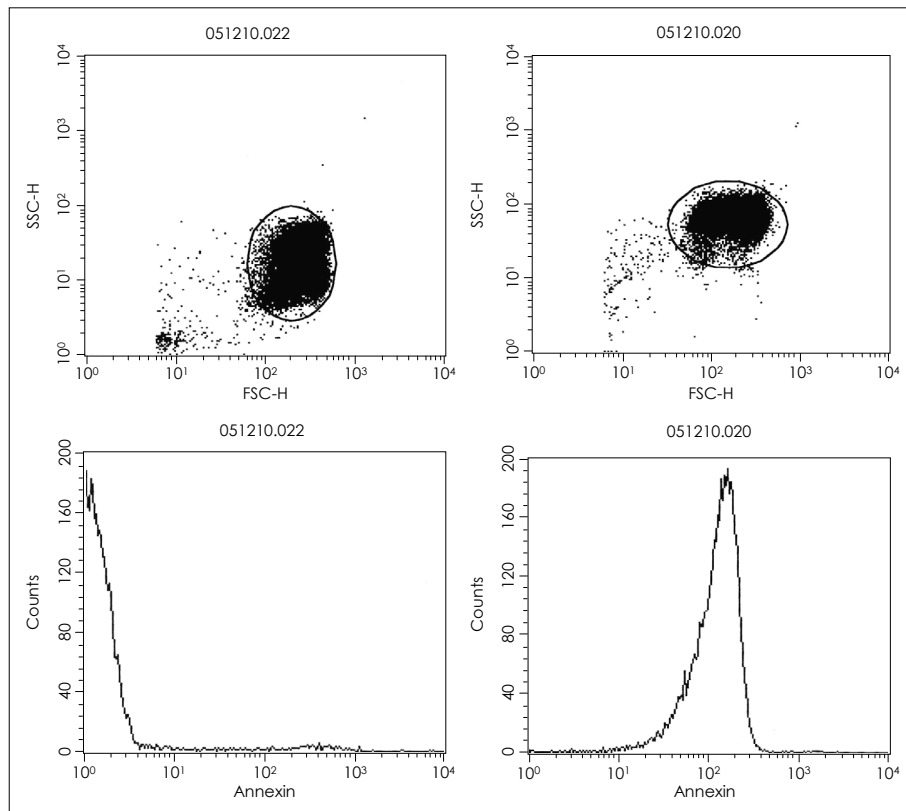


Fig. 2. Dot graph and histogram of non-oxidized RBCs and oxidized RBCs in flow cytometry. Compared with non-oxidized RBC (left upper), oxidized RBC (right upper) had smaller cell size and higher granularity. Annexin V bind to oxidized RBC (right lower), but not to non-oxidized RBC (left lower). RBCs: red blood cells, SSC-H: side scattering, FSC-H: forward scattering.

경우에 비해 결합이 월등히 많았으며($p < 0.001$), 산화 LDL을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 차이가 없었다(Fig. 6). 또한 충분한 양의 annexin V를 넣고 15분 간 방치한 후에, 원심분리하여 annexin V를 제거하고 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 산화 LDL

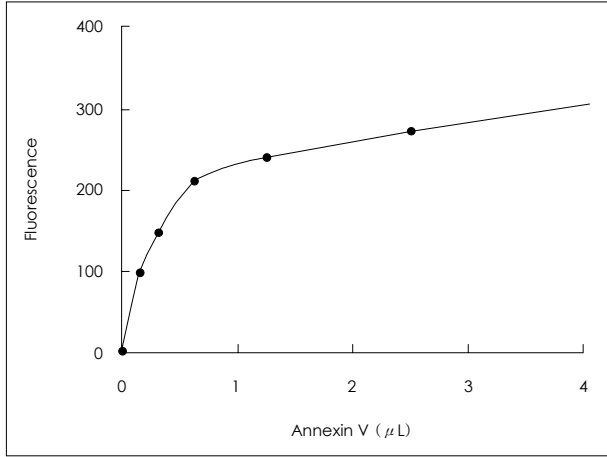


Fig. 3. Binding of annexin V to oxidized RBC according to the amount of annexin V. RBC: red blood cell.

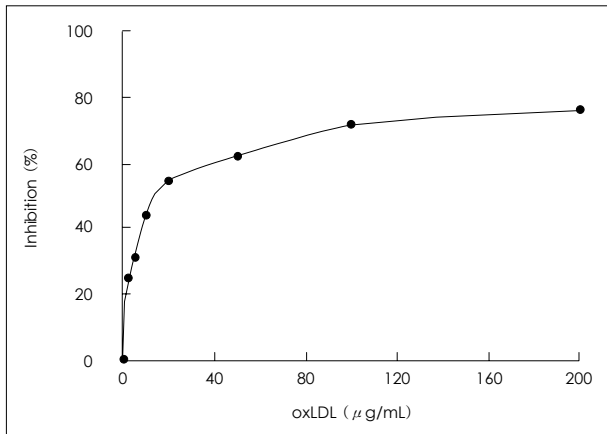


Fig. 4. Inhibition of the binding of annexin V to oxidized RBC according to the concentration of oxidized low density lipoprotein. RBC: red blood cell.

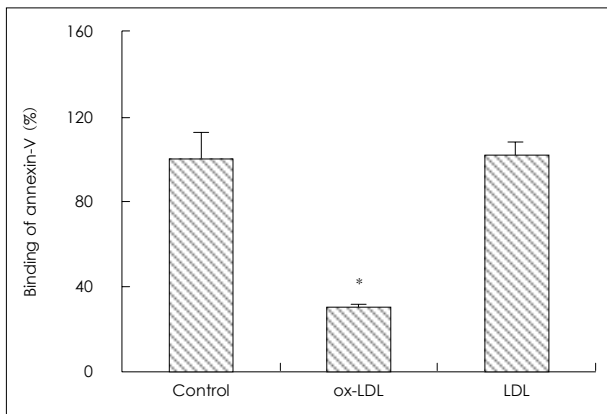


Fig. 5. The binding of annexin V to oxidized RBC was reduced by $71.0 \pm 3.0\%$ in the presence of 100 $\mu\text{g/mL}$ oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). Low density lipoprotein did not influence the binding. *: $p < 0.001$. RBC: red blood cell.

을 투여한 경우에도 산화 LDL과 annexin V를 동시에 투여한 경우에 비해 결합이 월등히 많았으며, 산화 LDL을 투여하지 않은 대조군에 비해 약간 낮은 경향을 보였다.

고찰

본 연구에서는 annexin V와 산화 적혈구의 결합 정도가 TBARS로 측정된 적혈구 산화 정도와 밀접한 정상관계가 있으며, 산화 LDL을 투여하면 annexin V와 산화 적혈구의 결합 정도가 농도 의존적으로 감소하는 것을 관찰하였고, 이들을 근거로 annexin V가 산화 지질과 결합할 가능성이 있음을 제시하였다.

산화 지질의 특성을 알아보기 위해 본 연구에서는 산화 적혈구를 이용하였다. 적혈구는 여러 가지 방법으로 산화시켜 산화 지질이 대식세포에 의해 처리되는 과정의 연구에 오래 전부터 이용되어 왔다.¹⁵⁾¹⁶⁾ 산화 적혈구 외에 여러 가지 자극에 의해 손상되거나, 고령이거나 혹은 당화된 적혈구가 신체에서 대사되는 과정을 연구하는 데에도 사용되고 있다.¹⁸⁾¹⁹⁾ 산화 적혈구를 이용하는 이유는 다른 세포에 비해 세포막에 수용체 등과 같이 실험에 변수로 작용할 수 있는 단백질이 적고, 세포 대사가 간단하여 자극이 가해졌을 때에 변화가 적다는 장점이 있기 때문이다. 또한 산화 LDL 등과는 차별되게 산화 지질에 결합하는 물질을 현미경이나 흐름 세포 측정법 등으로 직접 측정할 수 있으며, 본 연구에서도 이러한 특징을 이용하여 실험하였다. 이외에 포식세포에 결합되고 포식되는 과정을 현미경 하에서 확인할 수 있으므로, 온도에 따른 결합과 섭취량의 차이로 섭취량을 구하는 산화 저밀도지단백의 실험과는 달리 두 과정을 분리하여 직접적으로 관찰할 수 있는 장점도 있다.¹⁶⁾²⁰⁾

Annexin V는 이전에 PAP-1, VAC α , IBC, PP4, endonexin II 등으로 불리던 단백질로 태반에서 추출되었으며, 항

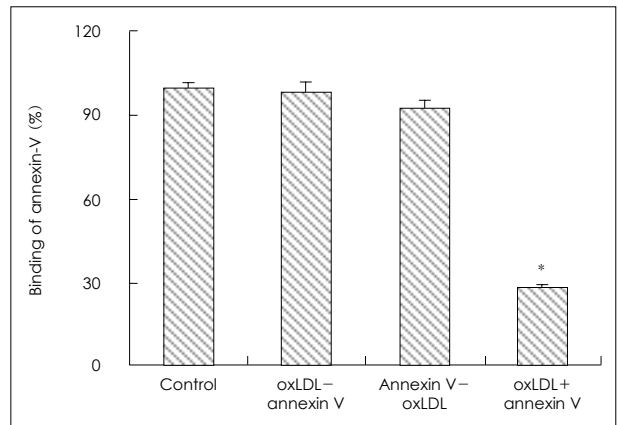


Fig. 6. Binding of annexin V to oxidized RBC with sequential administration of oxidized LDL and annexin V (oxLDL-annexin V or annexin V-oxLDL) compared with binding without oxidized LDL (Control) or with simultaneous administration of both materials (oxLDL+annexin V). *: $p < 0.001$. RBC: red blood cell, LDL: low density lipoprotein.

응고 작용이 있는 것으로 알려져 있다.²¹⁻²³⁾ 이 단백질의 생리학적 역할에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않으나 칼슘이온 의존적으로 세포막의 PS와 결합하는 것으로 알려져 있으며, 현재에는 세포의 아포토시스 여부 판정에 널리 사용되고 있다.⁸⁾²⁴⁾²⁵⁾

두 층의 인지질로 구성된 세포막에는 여러 종류의 인지질이 비대칭적으로 분포해 있으며, 특히 PS는 정상적인 세포에서는 거의 대부분이 세포 안쪽의 인지질 층에 존재한다. 이러한 분포는 aminophospholipid translocase에 의해 능동적으로 유지되고 있다.²⁶⁾ 세포가 손상을 받거나, 고령화되거나 혹은 아포토시스 되면 안쪽에 있던 PS가 바깥층으로 이동하게 되고, 여기에 annexin V가 결합하는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹¹⁾ 따라서 거의 모든 연구에서 annexin V는 당연히 PS에 결합하는 것으로 가정하고 논리를 전개시키고 있다.²⁴⁾

산화된 적혈구에 annexin V가 결합하는 것은 이전의 보고에서 제시되었으나, 이것이 과연 PS에 결합된 것인지 아니면 산화 지질에 결합한 것인지에 대해서는 알려진 바가 없다.¹⁴⁾¹⁵⁾ 본 연구에서 황산구리의 농도가 증가함에 따라 TBARS를 반정량적으로 측정된 산화 정도와 annexin V와 결합하는 산화 적혈구의 비율이 증가하였고, 고농도에서는 모두 고평부를 나타냈다. 특히 TBARS를 반정량적으로 측정된 산화 정도와 annexin V와 결합하는 산화 적혈구의 비율 사이에 아주 밀접한 상관관계가 있어($r=0.99$, $p=0.000$), annexin V가 산화 지질에 결합할 가능성을 제시하고 있다. 하지만 PS가 바깥층으로 이동하는 정도가 지질의 산화와 직접적인 연관관계가 있어 위와 같은 현상을 나타낼 가능성도 완전히 배제할 수는 없다. PS가 바깥층으로 이동하기 위해서는 산화가 선행되어야 한다는 보고도 있었다.¹³⁾

이를 보완하기 위해 본 연구에서는 산화 LDL을 이용하였다. 산화 LDL을 annexin V와 동시에 투여하면 산화 LDL의 농도에 비례하여 annexin V가 산화 적혈구에 결합하는 양이 감소하였다. 이는 산화 적혈구의 결합에 annexin V와 산화 LDL이 경쟁적으로 작용한 것이 아니라, annexin V가 산화 LDL에 결합함으로써 산화 적혈구에 결합하는 양이 감소하는 것으로 생각된다. 그 증거로서 산화 적혈구에 다량의 산화 LDL을 투여한 후에 산화 LDL을 제거하고 annexin V를 투여하면 산화 LDL을 투여하지 않았을 때와 같은 정도로 산화 적혈구와 결합하였다. 만약 annexin V와 산화 LDL이 경쟁적으로 산화 적혈구에 결합한다면 산화 LDL로 산화 적혈구의 결합 부위를 포화시키고 나서 annexin V를 투여할 때에 산화 적혈구와 결합이 안되거나 최소한 대폭 감소하여야 한다. 반대로 산화 적혈구에 annexin V를 투여하고 이를 제거한 후에 다량의 산화 LDL을 투여한 경우에도 비슷한 결과를 보였다. 이상의 결과로 볼 때에 annexin V는 산화 LDL과도 결합하므로 PS와 결합한다는 이전의 보고와 달리 산화 지질과도 결합할 가능성이 높다.

LDL은 세포막과는 달리 1층의 인지질에 의해 외부가 둘러

싸여 있어서 세포막과 같이 안쪽의 PS가 바깥쪽으로 이동하는 과정은 존재하지 않는다. 따라서 LDL에 PS가 존재한다면 이는 외부에 노출되어 있으므로 산화되지 않은 LDL에도 존재할 것이고, 그렇다면 산화되지 않은 LDL도 annexin V가 산화 적혈구에 결합하는 것을 억제해야 하는데, 본 연구에서 LDL은 annexin V가 산화 적혈구에 결합하는데 영향이 없었다. 반면에 같은 인지질 종류로 구성된 산화 LDL은 annexin V와 결합하였다. 따라서 annexin V가 산화 LDL과 결합하는 데에는 산화 지질이 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 하지만 annexin V가 산화 LDL과 결합하는데 산화된 PS만 관여하는지 아니면 모든 산화 인지질이 관여하는지에 대해서는 아직 결론을 내릴 수 없으며, 향후 이들의 상대적 중요성을 밝히기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

최근에 아포토시스 과정에서 세포막의 안쪽에 존재하는 PS가 바깥층으로 이동하기 위해서는 PS의 산화가 선행된다는 보고가 있었으며,¹³⁾ 지질 항산화제인 etoposide에 의해 PS의 이동이 억제된다는 보고가 있었다.²⁷⁾ 또한 아포-E 결핍 생쥐에서 만들어진 산화 지질에 대한 자가항체로 생각되는 항체가 아포토시스된 세포에 결합한다는 보고도 있었다.¹²⁾ 따라서 비록 PS가 안쪽에서 바깥쪽으로 이동하는 것이 아포토시스의 한 과정이고 이를 확인하는 방법이 annexin V와의 결합이라는 것이 널리 받아지고 있으나, 이 과정에 지질의 산화 과정이 어떤 형태로든 관여하고 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 annexin V가 산화 지질과 결합함을 증명하였으므로, 향후 아포토시스에서 annexin V가 PS에만 결합하는지 아니면 여기에 산화 지질이 관여하는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 고령의 세포와 같이 annexin V가 결합하는 것으로 알려진 모든 상황에서도 산화 지질의 역할에 대한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 높은 농도로 산화 LDL을 투여하여도 annexin V가 산화 적혈구에 결합이 완전히 억제되지 않고 고평부를 이루며 $71.0 \pm 3.0\%$ 만 억제되었다. 이는 적혈구가 산화되면서 세포막의 바깥쪽으로 이동한 PS가 annexin V와 결합하는 것을 산화 지질이 억제하지 못하였기 때문일 가능성이 있다. 하지만 산화 적혈구에 annexin V가 결합하는 데에는 산화 지질이 더 중요할 가능성이 있음을 시사하고 있다.

이외에 높은 농도의 산화 LDL을 투여하여도 annexin V가 산화 적혈구에 결합하는 것을 완전히 억제시키지 못하는 이유로는 산화 지질 사이에 서로 달라붙는 성질이 있기 때문일 가능성이 있다. 즉 다량의 산화 LDL을 투여하여 농도가 높아지면 상당량의 산화 LDL이 산화 적혈구에 달라붙게 되고, 이들 중에 일부는 annexin V와 결합된 상태일 수 있다. 실제 적혈구를 원심분리한 후 다시 섞을 때에 산화되지 않은 적혈구는 잘 섞이는 반면에 산화된 적혈구는 많은 시간이 필요하였다.

본 연구의 제한점으로는 annexin V가 이전의 대부분의 보

고와는 달리 산화 지질에 결합한다는 것은 증명하였으나, PS와의 상대적 중요성이나 결합에 관여하는 산화 지질의 특성에 대해서는 밝히지 못하였다는 것이다. 향후 annexin V가 PS와 산화 지질 모두에 결합하는지 여부, 만약 모두에 결합한다면 이들 간에 상대적 중요성, 결합에 관여하는 산화 지질이 모든 종류의 인지질인지 혹은 산화된 PS만이 관여하는지 등에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적 :

Annexin V는 phosphatidylserine(PS)과 결합하는 것으로 알려져 있으며, 세포의 아포토시스 여부 판정에 흔히 사용되고 있다. 최근 적혈구를 이용한 연구에서 annexin V가 산화 적혈구와 결합함이 관찰되었다. 하지만 이것이 PS에 결합한 것인지 아니면 산화 지질에 결합한 것인지에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 산화 적혈구를 이용하여 산화 지질의 특성을 규명함에 있어 annexin V가 결합하는데 어떤 물질들이 관여하는지를 관찰하고자 하였다.

방 법 :

적혈구에 다양한 농도의 황산구리를 투여하여 산화시켰으며, TBARS를 반정량적으로 측정하여 산화 정도를 평가하였고, 산화된 적혈구의 특성을 annexin V와 형광 흐름 세포측정법을 이용하여 분석하였다. 이를 바탕으로 황산구리의 농도, TBARS로 측정된 산화정도 및 Annexin V와 결합하는 산화 적혈구 사이의 상관관계를 관찰하였다.

산화 적혈구와 annexin V와의 결합에 미치는 산화 지질의 영향을 평가하기 위해 산화 LDL을 다양한 농도로 투여하여 결합 정도의 변화를 관찰하였다. 결합의 특성을 파악하기 위해 annexin V나 산화 LDL을 순차적으로 투여하고 산화 적혈구에 결합하는 annexin V의 양을 측정하였다.

결 과 :

TBARS로 측정된 적혈구의 산화 정도와 annexin V와 결합하는 적혈구의 백분율은 투여한 황산구리의 농도와 정상관계가 있었으며 높은 농도에서는 고평부(plateau)에 도달하였다. 황산구리 농도에 따라 TBARS와 annexin V와 결합하는 적혈구의 백분율 사이에도 아주 밀접한 정상관계가 관찰되었다($r^2=0.99$, $p=0.000$). 산화되지 않은 적혈구에는 annexin V가 결합하지 않은 반면에, 산화된 적혈구에는 비교적 일정하게 결합하였다. 산화 적혈구와 annexin V의 결합은 투여한 annexin V 양이 증가함에 따라 증가하였다.

산화 LDL을 투여하면 annexin V의 산화 적혈구에 대한 결합이 감소하였으며, 이는 투여하는 산화 LDL의 양이 증가함에 따라 감소의 폭이 컸다. 산화 LDL을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상 투여하면 고평부를 이루었으며, annexin V의 산화 적혈구에 대한 결합은 $71.0 \pm 3.0\%$ 감소하였다($p < 0.001$). 산화되지 않은 LDL은 annexin V와 산화 적혈구의 결합에 영향을 미치지

않았다.

산화 적혈구에 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 산화 LDL을 투여하고 15분간 방치한 후에 원심분리하여 산화 LDL을 제거하고 annexin V를 투여하면, 산화 LDL과 annexin V를 동시에 투여한 경우에 비해 결합이 월등히 많아서 산화 LDL을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 차이가 없었다.

결 론 :

Annexin V와 산화 적혈구의 결합 정도는 TBARS로 측정된 적혈구 산화 정도와 밀접한 정상관계가 있으며, 산화 LDL을 투여하면 annexin V와 산화 적혈구의 결합 정도가 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰하였다. 따라서 annexin V는 산화 지질과 결합할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 적혈구 ; 저밀도 지단백 ; 지질 산화 ; Annexin V ; 결합.

이 연구는 대한순환기학회 산학협동연구비(2001-05) 지원으로 시행되었음.

REFERENCES

- 1) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1994;89:2462-78.*
- 2) Steinbrecher UP. *Receptors for oxidized low density lipoprotein. Biochim Biophys Acta 1999;1436:279-98.*
- 3) Pearson AM. *Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin Immunol 1996;8:20-8.*
- 4) Gillotte KL, Horkko S, Witztum JL, Steinberg D. *Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptors. J Lipid Res 2000;41:824-33.*
- 5) Munday J, Floyd H, Crocker PR. *Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. J Leukoc Biol 1999;66:705-11.*
- 6) Beppu M, Hayashi T, Hasegawa T, Kikugawa K. *Recognition of sialosaccharide chains of glycophorin on damaged erythrocytes by macrophage scavenger receptors. Biochim Biophys Acta 1995;1268:9-19.*
- 7) Sambrano GR, Steinberg D. *Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:1396-400.*
- 8) Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, et al. *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med 1995;182:1545-56.*
- 9) Thiagarajan P, Tait JF. *Binding of annexin V/placental anticoagulant protein 1 to platelets: evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. J Biol Chem 1990;265:17420-3.*
- 10) Tait JF, Gibson D. *Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. Arch Biochem Biophys 1992;298:187-91.*
- 11) Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisson A. *Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. J Mol Biol 1994;236:*

- 199-208.
- 12) Chang MK, Bergmark C, Laurila A, et al. *Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6353-8.
 - 13) Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, et al. *Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis.* *FEBS Lett* 2000;477:1-7.
 - 14) Balasubramanian K, Bevers EM, Willems GM, Schroit AJ. *Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation.* *Biochemistry* 2001;40:8672-6.
 - 15) Ko HS, Kim CW, Choi SH, et al. *The oxidation process of red blood cells and the molecules involved in their binding to macrophage.* *Korean Circ J* 2003;33:1174-81.
 - 16) Sambrano GR, Parthasarathy S, Steinberg D. *Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3265-9.
 - 17) Stocks J, Dormandy TL. *The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide.* *Br J Haematol* 1971;20:95-111.
 - 18) Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, et al. *Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages: a review.* *Biochimie* 1998;80:173-95.
 - 19) Vlassara H, Valinsky J, Brownlee M, Cerami C, Nishimoto S, Cerami A. *Advanced glycosylation endproducts on erythrocyte cell surface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophages: a model for turnover of aging cells.* *J Exp Med* 1987;166:539-49.
 - 20) Ko HS, Kim IS, Lee KJ, Kim SW, Kim CJ, Ryu WS. *Characterization of binding and phagocytosis of oxidatively damaged erythrocyte to macrophage.* *Korean J Intern Med* 2002;17:220-6.
 - 21) Funakoshi T, Heimark RL, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. *Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization.* *Biochemistry* 1987;26:5572-8.
 - 22) Iwasaki A, Suda M, Nakao H, et al. *Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: a new lipocortin-like protein.* *J Biochem* 1987;102:1261-73.
 - 23) Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC. *Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord.* *Eur J Biochem* 1985;151:625-9.
 - 24) van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, et al. *Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V.* *Cardiovasc Res* 2000;45:549-59.
 - 25) Yang CH, Kim YD, Park EH, et al. *Modes of cell death and survival in cardiomyocytes under various type of ischemic injury.* *Korean Circ J* 2003;33:949-56.
 - 26) Dolis D, Moreau C, Zachowski A, Devaux PF. *Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic.* *Biophys Chem* 1997;68:221-31.
 - 27) Tyurina YY, Serinkan FB, Tyurin VA, et al. *Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation.* *J Biol Chem* 2004;279:6056-64.