

ADP에 의해서 활성화된 인혈관세포의 Prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하는 Integrin $\alpha\text{v}\beta_3$, $\alpha\text{v}\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 의 특성

주승재, 최 휘, 김성만, 차태준, 이재우

고신대학교 의과대학 내과학교실

Roles of Integrin $\alpha\text{v}\beta_3$, $\alpha\text{v}\beta_5$ and $\alpha_5\beta_1$ in the Adhesion of ADP-stimulated Human Vascular Cells to Prothrombin and Bone Sialoprotein

Seung-Jae Joo, Hwee Choi, Seong Man Kim, Tae Joon Cha, Jae Woo Lee

Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : One of the most important features of integrins is that they exist in active and inactive states. Adenosine diphosphate (ADP), which is usually secreted from activated platelets, may activate integrins on vascular cells. Each integrin has its own activation-dependent ligands that have much higher affinity to active form than inactive one. Integrins that might mediate adhesion of human vascular cells to prothrombin (PT) and bone sialoprotein (BSP) after ADP stimulation were investigated.

Methods : PT and BSP were used as activation-dependent ligands in adhesion assay. Adhesions of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human aortic smooth muscle cells (HASMC) were measured after stimulating with 100 μM of ADP, using ligand-coated 24-well plate and Fluorescence Multi-Well Plate Reader

Results : ADP activated HUVEC and HASMC to increase adhesions to PT and BSP in a dose-dependent manner. Adhesions of ADP-stimulated HUVEC to PT and BSP were almost completely inhibited by c7E3, a blocking monoclonal Ab to integrin β_3 (96% and 92% inhibition, respectively), but not by P5H9, a blocking monoclonal Ab to integrin $\alpha_5\beta_5$. Adhesion of ADP-stimulated HASMC to PT was completely blocked by P5H9 (92% inhibition), but was not affected by c7E3. Adhesion of ADP-stimulated HASMC to BSP was partially inhibited either by P5H9 (46% inhibition) or by JBS5, a blocking monoclonal Ab to integrin $\alpha_5\beta_1$ (75% inhibition), but was not affected by c7E3. However, it was completely blocked by cRGD (93% inhibition).

Conclusion : These results indicate that the adhesion of ADP-stimulated HUVEC to PT or BSP was mediated by integrin $\alpha_5\beta_3$, and several integrins appeared to be involved in the adhesion of ADP-stimulated HASMC. While the adhesion of HASMC to PT was mediated by integrin $\alpha_5\beta_5$, the adhesion to BSP was associated with integrins $\alpha_5\beta_5$ and $\alpha_5\beta_1$.

Key words : Human vascular cells, Integrin, Activation, Adhesion

서론

경피적관동맥중재술은 관동맥 협착의 치료에 널리 사

용되고 있으나 시술 후 20~50%에서 발생하는 재협착이 관동맥중재술의 효과를 감소시키는 주요 요인이다. 따라서 관동맥 재협착을 예방하기 위한 다양한 시도가 있었으나 어느 것도 관동맥 재협착의 문제를 효과적으로 해결하지 못하였는데, 이것은 관동맥 재협착이 생기는 기전이 아직도 완전히 구명되지 않았다는 것을 의미한다. 관동맥 재협착의 기전은 복잡하며 여러 인자들이 관

여하는데, 그중 혈관 내피 손상 후 혈관 중막에서 혈관 내피로의 혈관평활근세포의 이동과 증식이 섬유성 내피 증식을 보이는 재협착 병변의 발생에 중요한 역할을 한다.^{1,2)}

경피적관동맥중재술시 내피세포가 박리되고, 죽상경화반이 파열되면 collagen, fibronectin, laminin, von Willibrand factor 등과 같은 내피하기질(subendothelial matrix)이 노출되어 혈소판 표면에 있는 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 를 활성화시켜, 혈소판이 부착되고 혈소판 응집이 일어나서 혈전이 형성된다.³⁾ 혈소판이 활성화되면 혈소판의 dense granule에 저장되어 있는 adenosine diphosphate (ADP)가 분비되어 휴지 상태에 있는 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 를 활성화시켜서 더 많은 혈소판이 응집된다.⁴⁾ 최근 ADP가 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 뿐만 아니라 혈관내피세포와 혈관평활근세포에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시킨다는 것이 보고되었다.⁵⁾

Integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 맥관형성(angiogenesis), 혈관내피세포와 평활근세포의 부착, 증식, 이동과 동맥 손상 후 내피 증식 등에 관여한다.⁶⁾ Integrin $\alpha_v\beta_3$ 이 관동맥 재협착에 관여한다는 간접적인 증거는 Evaluation of c7E3 for the Prevention of Ischemic Complications (EPIC) 연구⁷⁾에서 찾아볼 수 있는데, integrin β_3 에 대한 비특이적 길항제인 c7E3 투여가 경피적관동맥풍선성형술 6개월 후 재협착에 의한 혈관재통(revascularization)의 필요를 26% 감소시켰다. 이후 관동맥 스텐트를 삽입한 환자를 대상으로 한 Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting (EPISTENT) 연구⁸⁾에서도 관동맥 재협착에 관한 c7E3의 효과가 일부 확인되었다. 그러나 이 효과는 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 에 선택적으로 결합하는 길항제를 사용한 연구에서는 관찰할 수 없었으므로^{9,10)} integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 관동맥 재협착에 관여할 것으로 추측되었다. 그러나 이에 상반되는 결과가 보고되기도 하여¹¹⁾ integrin $\alpha_v\beta_3$ 이 관동맥 재협착의 발생에 어떤 역할을 하는지 아직 불분명하다.

Integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외에 integrin $\alpha_5\beta_1$, integrin $\alpha_v\beta_5$ 등도 혈관평활근세포에 분포하여 관동맥 재협착 발생에 관여할 가능성이 있다. 혈관 fibronectin 수용체인 integrin $\alpha_5\beta_1$ 은 풍선에 의한 내피 손상 후 역분화된(dedifferentiated) 혈관평활근세포에서 관찰되며,¹²⁾ 혈관평활근세포가 수축성 표현형에서 합성 표현형으로 변환되는데 관여한다.¹³⁾ Integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 혈관평활근세포뿐만 아니라 죽상경화반

에서도 관찰되나¹⁴⁾ 혈관평활근세포에서의 역할은 아직 알려져 있지 않다.

Integrin의 중요한 특징 중 하나는 그것이 활성화 혹은 휴지 상태로 존재한다는 것이다.¹⁵⁾ Integrin의 활성화 상태를 판단하기 위해서 휴지 상태의 integrin보다 활성화된 integrin에 대한 친화력이 훨씬 큰 리간드(ligand)를 사용한다. Prothrombin과 골타액단백(bone sialoprotein)은 휴지 상태보다 활성화된 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 결합이 급격히 증가하는 활성화 의존 리간드이다.^{5,16)}

대부분의 연구에서 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)나 고농도 Mn^{2+} 와 같은 촉진제를 사용하여 integrin을 활성화시켰다.¹⁶⁾ 그러나 PMA나 고농도 Mn^{2+} 는 정상 인체에서 관찰할 수 없기 때문에 이러한 촉진제를 사용하여 얻은 자료를 사람에게 일반화시킬 수 없다. ADP는 혈소판의 dense granule에 저장되어 있다가 혈소판이 활성화되면 분비되므로, 생리적으로 적합한 integrin의 촉진제이다.

이 연구에서는 첫째로 활성화 의존 리간드인 prothrombin과 골타액단백을 사용하여 ADP가 혈관내피세포와 혈관평활근세포에 존재하는 integrin을 활성화시킬 수 있는가를 알아보았다. 둘째로 각각의 integrin에 결합하는 단세포군항체(monoclonal antibody)를 사용하여 ADP에 의해서 활성화되는 integrin의 종류를 구명하였다.

재료 및 방법

1. 시약

ADP, adenosine triphosphate (ATP), PMA, heparin 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Human prothrombin은 Enzyme Research사(South Bend, IN, USA), humanized monoclonal antibody (mAb) c7E3는 Centocor사(Malvern, PA, USA), $\alpha_v\beta_3$ -specific mAb인 LM609, $\alpha_v\beta_5$ -specific mAb인 PIF5, $\alpha_5\beta_1$ -specific mAb인 JBS5는 Chemicon사(Temecula, CA, USA)에서 각각 구입하였다. 골타액단백과 $\alpha_v\beta_5$ -specific mAb인 P5H9은 각각 Dr. Tatiana Byzova (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA)와 Dr. Elizabeth Wayner (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA)로부터 제공

ADP에 의해서 활성화된 인혈관세포의 Prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하는 Integrin $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ 의 특성

받았다.

2. 세포 배양

인제정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)는 Clonetics사(San Diego, CA, USA)에서 일차배양되어 냉동 상태로 판매되는 것을 구입하였다. 세포 배양액으로 15% fetal bovine serum (BioWhittaker 사, Walkersville, MD, USA), 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ endothelial growth factor (Clonetics사), 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin이 첨가된 DMEM/F12 (BioWhittaker사)를 사용하여, Costar사(Cambridge, MA, USA)의 162 cm^2 크기의 플라스틱 플라스크 바닥을 90% 정도 덮을 때까지 HUVEC을 배양하였다. 2차에서 4차 계대배양된 HUVEC을 연구에 사용하였다. 인대동맥평활근세포(human aortic smooth muscle cell: HASMC)는 Dr. Paul DiCorleto (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA)가 일차배양하여 제공해 주었다. 세포 배양액으로 10% fetal bovine serum (BioWhittaker사)이 첨가된 DMEM/F12 (BioWhittaker사)를 사용하여, Costar사의 162 cm^2 크기의 플라스틱 플라스크 바닥을 90% 정도 덮을 때까지 HASMC을 배양하였다.

3. HUVEC과 HASMC의 부착 정량(Adhesion assay)

배양된 HUVEC이나 HASMC을 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 후 0.01%의 EDTA를 함유한 0.25 mg/mL 의 trypsin (Clonetics사)으로 처리하여 세포를 수집하고, trypsin neutralizing solution (Clonetics사)을 첨가하였다. 세포 부유액을 즉시 500 x g에서 10분간 원심 분리한 후, 0.5% bovine serum albumin (BSA)를 함유한 DMEM/F12에 10^7 cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 24-well plate (Costar사)의 각각의 well에 완충용액(50 mM NaHCO_3 , 150 mM NaCl, pH 8.0)에 녹아 있는 prothrombin 10 μg 혹은 골타액단백 0.5 μg 씩 넣고, 4°C에서 밤새 처리하였다. 이후 PBS로 1회 세척한 후 각각의 well에 2% BSA를 넣고 37°C에서 1시간 처리하였다. 형광소식자인 Calcein AM (50 μg ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 10 μL 의 DMSO (Sigma사)에 녹인 후 PBS 500 μL 를 첨가하여 희석시켰다. 이 Calcein AM 용액 중 200 μL 를 $10^7/\text{mL}$ 의 농도의 세포 부유액 1 mL와 혼합한 후 37°C에서 20분간 배양하고, 0.5% BSA가 있는

DMEM/F12를 사용하여 5×10^5 cells/mL의 농도로 희석시켰다. 세포 부유액에 CaCl_2 1mM을 첨가한 후 PMA 200 nM이나 다양한 농도의 ADP, 혹은 ATP로 세포를 자극시켰다. 길항제 혹은 단세포균 항체의 효과를 측정할 때는 촉진제로 세포를 자극하기 전 10분간 적정 농도로 세포와 반응시켰다. 준비된 24-well plate의 각각의 well에 세포 부유액을 300 μL 씩 넣고 37°C의 incubator에 넣었다. 30 - 50분 후에 부착된 세포를 도립현미경으로 관찰한 후(Fig. 1), Fluorescence Multi-Well Plate Reader (Perceptive Biosystems, Framingham, MA, USA)로 정량하였다. 각각의 well의 측정치에서 촉진제로 자극하지 않은 세포의 형광치와 BSA에 부착된 세포의 형광치를 빼서 자극 후 부착 증가를 계산하였다. 다양한 농도의 ADP나 ATP로 세포를 자극한 후 prothrombin에 부착된 세포의 형광치 비교를 위해서, PMA로 자극된 세포의 형광치를 100%로 하여 대조치로 삼았다. 골타액단백을 리간드로 사용한 경우에는 ADP나 ATP 100 μM 로 자극된 세포의 형광치를 100%로 하여 대조치로 삼았다. 길항제 혹은 단세포균항체의 효과를 측정할 때는 ADP 100 μM 로 자극된 세포의 형광치를 100%로 하여 대조치로 삼았다.

4. 유세포분석(Flow cytometry)

세포의 부착 정량시와 동일한 방법으로 세포를 수집하였다. 세포 부유액을 즉시 500 x g에서 10분간 원심 분리한 후, 0.5% BSA를 함유한 DMEM/F12에 10^7 cells/mL의 농도로 재부유시킨 후, 500 μL 의 세포 부유액을 LM609 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), P1F5 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), JBS5 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 4°C에서 1시간 반응시켰다. 차가운 PBS로 세포를 3회 세척한 후 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG와 4°C에서 30분간 배양하였다. 다시 차가운 PBS로 세포를 3회 세척한 후 PBS 500 μL 에 세포를 재부유시켰다. 유세포 분석에는 FACScan instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 CellQuest software program (ver 1.2)을 사용하였다. 세포 표면에 존재하는 integrin의 수를 비교하기 위해 평균 형광량(mean fluorescent intensity)를 사용하였다.

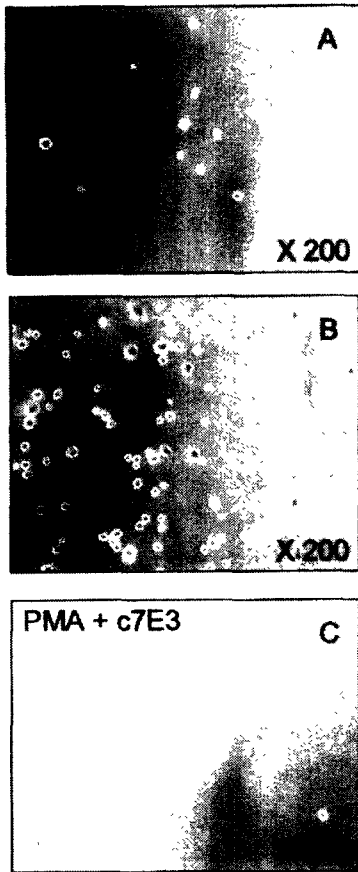


Fig. 1. An example of adhesion assay. These photomicrographs show adhesion of HUVEC to immobilized bone sialoprotein in the absence (A) and presence (B) of 200 nM PMA. c7E3 (40 µg/mL), a monoclonal antibody to integrin $\beta 3$, inhibited the adhesion of PMA-stimulated HUVEC (C). Original magnification X 200.

5. 통계 분석

다양한 농도의 ADP와 ATP에 의해서 자극된 HUVEC과 HASMC의 prothrombin 부착을 휴지 상태의 부착과 비교하기 위해서 ANOVA와 Scheffe's test를 시행하였다. P값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. ADP나 ATP 자극 후 prothrombin 혹은 골타액단백에 부착된 인혈관세포

ADP나 ATP 농도가 증가할수록 prothrombin에 부착되는 HUVEC 혹은 HASMC이 점차 증가하여 100 µM에서

최대치에 도달하였다(Fig. 2). HUVEC의 prothrombin에 대한 최대 부착은 ADP와 ATP 자극 후 각각 대조치(PMA 200 nM 존재시의 부착)의 36%와 31%로, HASMC의 최대 부착 117%와 116%에 비해서 작았지만, 촉진제로 자극하지 않은 세포의 부착에 비해서 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다. 골타액단백에 대한 HUVEC과 HASMC의 부착도 ADP와 ATP의 농도에 비례하여 증가하였고(Fig. 3), PMA로 자극된 세포의 부착을 대조치로 비교하였을 때, HASMC의 부착에 비해서 HUVEC의 부착이 작았다(자료 제시 안했음). 이 결과는 PMA 뿐만 아니라, 보다 생리적인 촉진제인 ADP나 ATP로 HUVEC과 HASMC 표면에 있는 integrin을 활성화시켜서 prothrombin과 골타액단백에 대한 세포 결합을 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

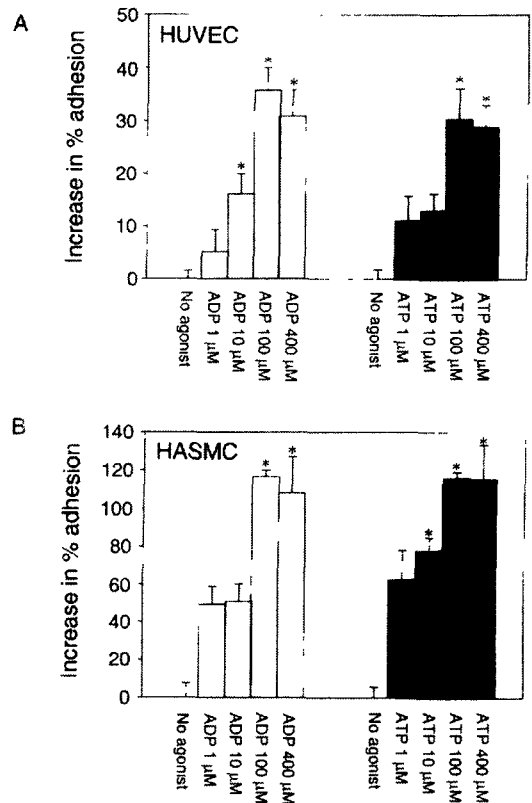


Fig. 2. ADP and ATP increased adhesion of HUVEC (A) and HASMC (B) to prothrombin in a dose-dependent manner. PMA-induced adhesion to prothrombin at the concentration of 200 nM was assigned a value of 100% and increases in %adhesion were calculated (See details in Method). The data shown are means and SEM. * P<0.05 vs nonstimulated cells.

ADP에 의해서 활성화된 인혈관세포의 Prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하는 Integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 의 특성

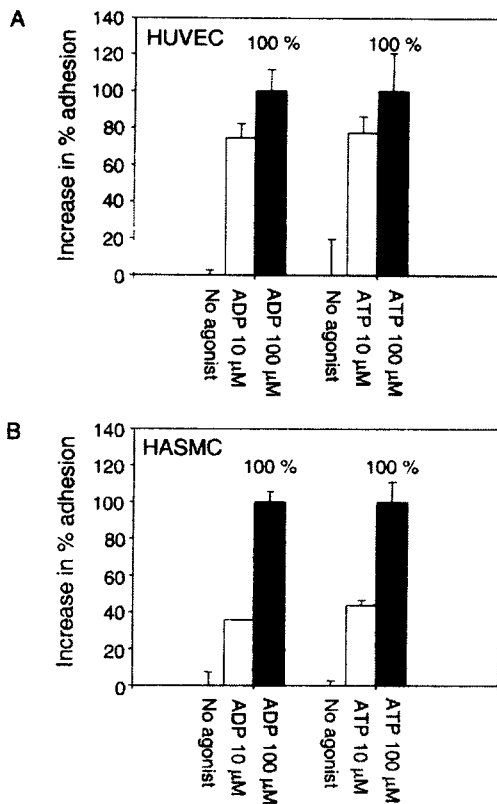


Fig. 3. ADP and ATP increased adhesion of HUVEC (A) and HASMC (B) to bone sialoprotein in a dose-dependent manner. ADP- or ATP-induced adhesion to bone sialoprotein at the concentration of 100 μ M was assigned a value of 100% and increases in %adhesion were calculated (See details in Method) The data shown are means and SD of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

2. HUVEC과 HASMC에 분포하는 integrin의 종류

HUVEC의 유세포분석에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ (평균 형광량 663)이 가장 많이 존재하였고, integrin $\alpha_v\beta_5$ (평균 형광량 22)가 가장 적었다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ (평균 형광량 153)도 상당수 분포되어 있었다(Fig. 4). HUVEC보다는 적었지만, HASMC에도 integrin $\alpha_5\beta_1$ (평균 형광량 149)이 가장 많이 존재하였다. HASMC에서는 HUVEC과는 달리 integrin $\alpha_v\beta_3$ (평균 형광량 27)보다는 integrin $\alpha_v\beta_5$ (평균 형광량 57)가 더 많이 분포되어 있었다(Fig. 5).

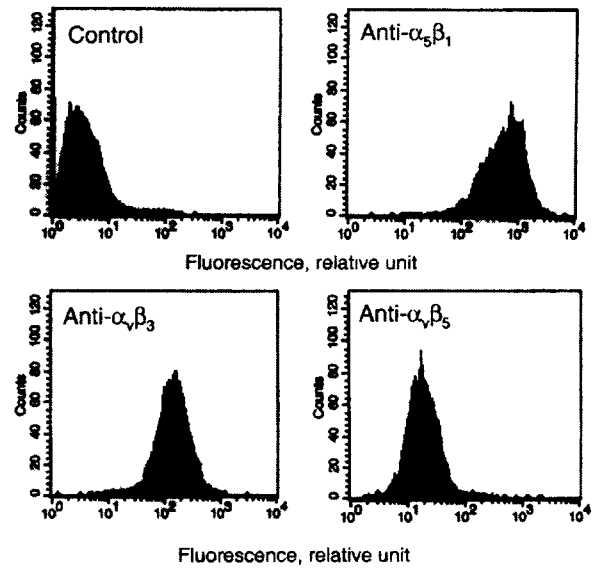


Fig. 4 Expression of integrins on HUVEC. HUVEC contained much more integrin $\alpha_5\beta_1$ (mean fluorescence intensity 663) than $\alpha_v\beta_3$ (mean fluorescence intensity 153) or $\alpha_v\beta_5$ (mean fluorescence intensity 22).

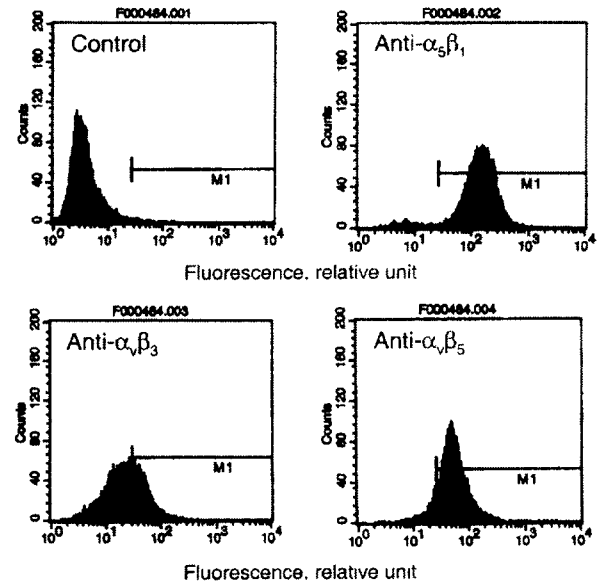


Fig. 5. Expression of integrins on HASMC. Like HUVEC, HASMC contained much more integrin $\alpha_5\beta_1$ (mean fluorescence intensity 149) than $\alpha_v\beta_3$ (mean fluorescence intensity 27) or $\alpha_v\beta_5$ (mean fluorescence intensity 57).

3. ADP에 의해서 활성화되는 integrin

HUVEC과 HASMC에서 ADP에 의해서 활성화되는 integrin을 알아보기 위해서 세포를 integrin에 대한 차단

항체로 처리한 후 prothrombin과 골타액단백에 대한 부착을 정량하였다.

ADP 100 μ M로 자극 후 prothrombin에 부착되는 HUVEC은 integrin β_3 에 대한 차단항체인 c7E3 (40 μ g/mL)에 의해서 96% 억제되었으나, integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 차단항체인 P5H9에 의해서는 영향을 받지 않았다(Fig. 6). ADP 100 μ M로 자극된 HASMC의 prothrombin에 대한 부착은 c7E3에 의해서 억제되지 않았으며, integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대해서 c7E3보다 더 특이적인 차단항체인 LM609 (20 μ g/mL)에 의해서 30% 억제되었다(Fig. 6).

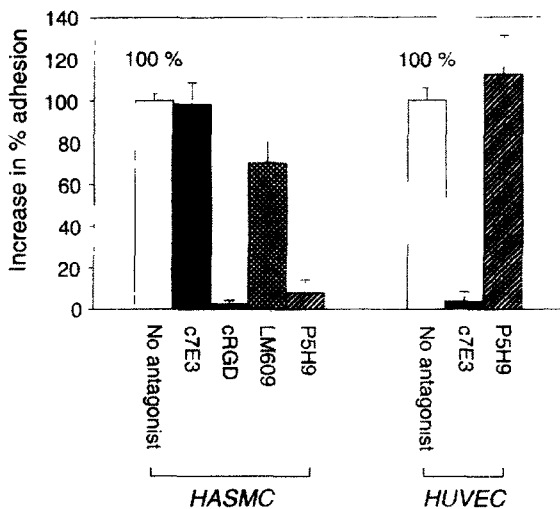


Fig. 6. ADP-stimulated adhesion of HASMC to prothrombin required integrin $\alpha_v\beta_3$. Adhesion in the presence of 100 μ M ADP without inhibitors (open bars) was assigned a value of 100%. A monoclonal antibody against integrin β_3 , c7E3 (black bars), inhibited ADP-stimulated adhesion of HUVEC, but not HASMC. cRGD (gray bar) inhibited ADP-stimulated adhesion of HASMC. LM609 (cross-hatched bar), a monoclonal antibody against integrin $\alpha_v\beta_3$, decreased ADP-stimulated adhesion of HASMC by 30%. P5H9 (striped bars), a monoclonal antibody against integrin $\alpha_v\beta_5$, blocked ADP-stimulated adhesion of HASMC, but not of HUVEC. The data shown are means and SD of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

그러나 리간드의 RGD 연쇄를 인식하는 integrin을 비특이적으로 차단하는 cRGD (10 μ M)에 의해서 97% 억제되었는데, 이것은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외의 다른 integrin이 HASMC의 prothrombin 부착에 관여한다는 것을 시사하였다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 차단 항체인 P5H9으로 처리한

후에는 92% 억제되어(Fig. 6, 7), 자극된 HASMC의 prothrombin 부착에는 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 주된 역할을 하였다. 이 결과는 ADP가 HUVEC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시켰으며, prothrombin은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 활성화 의존 리간드임을 의미한다. 그러나 HASMC에서는 ADP가 integrin $\alpha_v\beta_5$ 를 활성화시켰으며 prothrombin은 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대해서도 활성화 의존 리간드로 작용하였다.

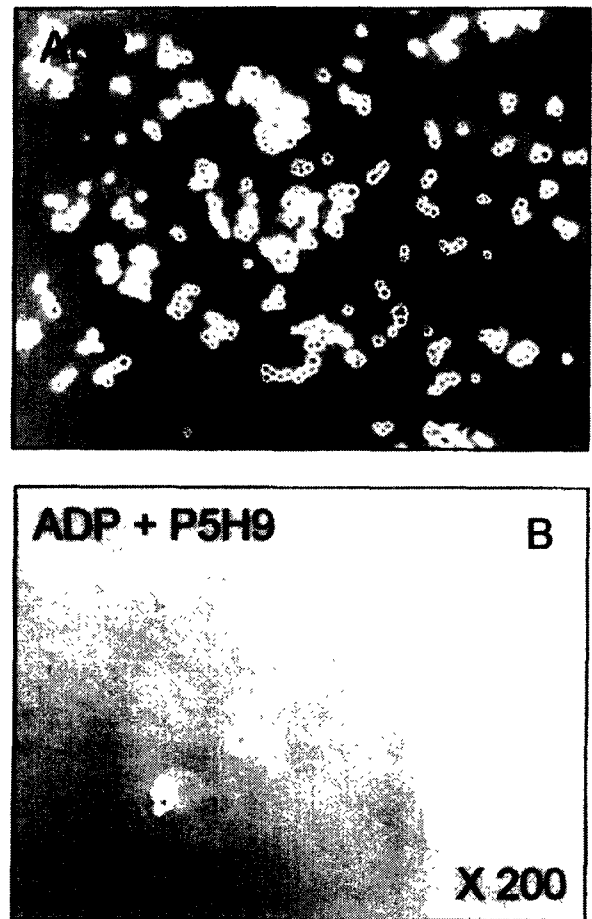


Fig. 7. ADP-stimulated adhesion of HASMC to prothrombin was inhibited by P5H9. ADP activated integrin $\alpha_v\beta_5$ to increase the adhesion (A), and this was prevented by P5H9 (B). Original magnification X 200.

골타액단백에 대한 HUVEC의 부착은 prothrombin의 경우와 같이 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 의해서 매개되었다. ADP 100 μ M로 자극 후 골타액단백에 대한 HUVEC의 부착은 integrin β_3 에 대한 차단항체인 c7E3 (40 μ g/mL)에 의해서 92% 억제되었으나, integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단항체인

ADP에 의해서 활성화된 인혈관세포의 Prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하는 Integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 의 특성

P5H9에 의해서는 영향을 받지 않았다(Fig. 8). HASMC의 골타액단백에 대한 부착은 prothrombin에 대한 부착과는 다른 양상을 보였다. ADP 100 μ M로 자극된 HASMC의 골타액단백에 대한 부착은 c7E3에 의해서 억제되지 않았으며, P5H9에 의해서 46% 억제되었다(Fig. 8).

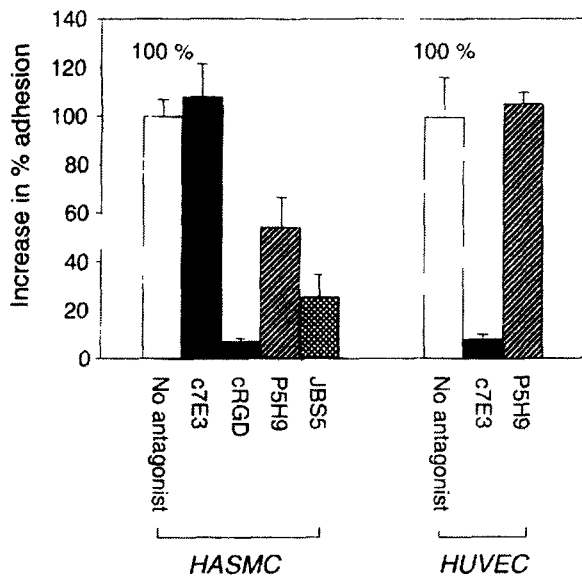


Fig. 8. ADP-stimulated adhesion of HASMC to bone sialoprotein required integrin $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_5$. Adhesion in the presence of 100 μ M ADP without inhibitors (open bars) was assigned a value of 100%. c7E3 (black bars), inhibited ADP-stimulated adhesion of HUVEC, but not HASMC. cRGD (gray bar) inhibited ADP-stimulated adhesion of HASMC. P5H9 (striped bars) decreased ADP-stimulated adhesion of HASMC by 46%, but not of HUVEC. JBS5 (cross-hatched bar), a monoclonal antibody against integrin $\alpha_5\beta_1$, decreased ADP-stimulated adhesion of HASMC by 75%. The data shown are means and SD of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

그러나, cRGD (10 μ M)에 의해서 93% 억제되어, integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 이외의 다른 integrin이 HASMC의 골타액단백 부착에 관여함을 암시하였다. 리간드의 RGD 분쇄를 인식하는 다른 integrin의 역할을 알아보기 위해서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단항체인 JBS5 사용하였다. JBS5 (15 μ g/mL)로 처리 후 HASMC의 골타액단백 부착이 75% 억제되었다. 즉 P5H9과 JBS5 모두 자극된 HASMC의 골타액단백을 부분적으로 차단하였다(Fig 9).

이러한 결과는 골타액단백이 HUVEC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 활성화 의존 리간드임을 의미한다. HASMC에서는 ADP가 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 활성화시켰으며, 골타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 활성화 의존 리간드였다.

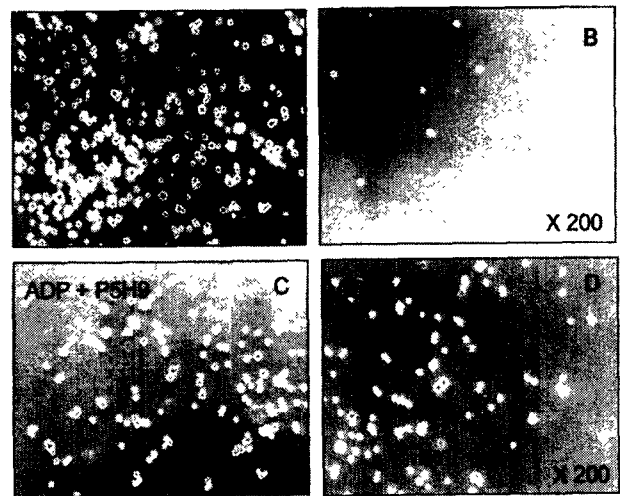


Fig. 9 ADP-stimulated adhesion of HASMC to bone sialoprotein was partially inhibited by P5H9 or JBS5. ADP activated HASMC to increase the adhesion (A), which was nearly completely inhibited by cRGD (B). Integrin $\alpha_v\beta_5$ (C) and $\alpha_5\beta_1$ (D) were responsible for the adhesion of HASMC. Original magnification X 200.

고찰

이 연구에서 활성화된 혈소판에서 분비되는 ADP가 인혈관세포에 분포하는 integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 등을 활성화시킬 수 있으며, prothrombin은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$, 골타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 의 활성화 의존 리간드라는 것이 밝혀졌다. HUVEC과 HASMC에 이 세 종류의 integrin이 모두 존재하였으나, 세포의 종류에 따라서 prothrombin과 골타액단백과 결합하는 integrin에 차이가 있었다.

Integrin은 세포부착분자(cell adhesion molecule)의 일종으로, 1987년 세포의 이동과 부착을 매개하기 위해서 세포내 골격과 세포외기질을 통합하는(integrate) 구조적, 면역화학적, 기능적으로 연관된 세포표면의 이형이 중체(heterodimer)를 기술하기 위해서 integrin이란 용어

가 처음 사용되었다.¹⁷⁾ 현재까지 17개의 α 소단위와 8개의 β 소단위가 밝혀졌으며, 이 두 개의 소단위가 비공유 결합하여 20여개의 integrin을 형성한다.^{15,18-21)} Integrin이 인식하는 리간드의 아미노산 연쇄 중 대표적인 것이 L-arginyl-L-glycyl-L-aspartate (RGD) 연쇄이다. Integrin $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ 등이 리간드의 RGD 연쇄를 인식하며, RGD 연쇄는 adenovirus penton base protein, collagen, decorin, disintegrins, fibronectin, prothrombin, tenascin, thrombospondin, vitronectin, von Willebrand factor, 골타액단백, 섬유소원 등에서 발견된다.²²⁾

Integrin이 활성화되어야 리간드와의 결합이 급격히 증가한다는 것은 혈관세포의 기능과 밀접한 관련이 있다. 예를 들어서 혈소판에 존재하는 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 는 휴지 상태에서는 섬유소원과 결합하지 않는다. 만약 휴지 상태의 혈소판이 섬유소원과 결합한다면 전신의 혈소판이 응집되어 생존하지 못할 것이다. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 는 ADP, thrombin, epinephrine 등과 같은 촉진제에 의해서 활성화되었을 때 섬유소원과 결합하여 혈소판이 응집된다.²³⁾ 혈관내피세포에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 도 활성화된 후에 세포의 세포외기질의 이동과 부착이 증가하며,^{5,16)} 암세포의 혈관전이 기전으로 설명되기도 한다.¹⁶⁾ Integrin의 활성화 상태를 판단하기 위해서는 활성화된 integrin에 대한 친화력이 높은 활성화 의존 리간드가 필요하다. Prothrombin은 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 에 대해서는 활성화 상태에 관계없이 결합하는 활성화 비의존 리간드이지만, integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대해서는 PMA, ADP 등에 의해서 활성화되었을 때 결합력이 급격히 증가하는 활성화 의존 리간드이다. 반면에 섬유소원은 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 활성화 의존 리간드이고, integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 활성화 비의존 리간드이다.^{5,24)} 이와같이 각각의 integrin은 그것에 결합하는 고유의 리간드를 갖고 있을 뿐 아니라,²²⁾ integrin의 활성화 상태에 따라서 친화력이 다른 활성화 의존 리간드도 갖고 있다.

Prothrombin은 혈액내에 응고 인자로 존재할 뿐만 아니라, 손상을 받은 혈관벽에서도 관찰되고, 혈관평활근 세포에 의해서도 합성된다.^{25,26)} 따라서 prothrombin이 혈관내피손상 후 혈관평활근세포의 이동과 증식에 관여하는 integrin의 리간드로 작용할 수 있기 때문에 이 연구에서 리간드로 선택하였다. 아직까지는 prothrombin은

integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_3$ 의 리간드로만 작용한다고 알려져 있었다. 골타액단백은 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)에서 합성되는 산성 당단백인데, RGD 연쇄를 가지고 있기 때문에, 골 발생과 무기질침착 과정에서 파골세포의 부착을 매개하고 맥관형성에 관여하는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 생리적인 활성화 의존 리간드이다.^{16,27)} 골타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ 와 결합하므로 이 integrin의 특성을 연구하기 위해서 리간드로 선택하였다.

지금까지 integrin을 활성화시키기 위해서 사용한 촉진제는 주로 PMA와 고농도의 Mn^{2+} 였다. 이것보다는 생리적으로 적합한 촉진제인 ADP를 사용하여도 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시킬 수 있음이 밝혀졌지만,⁵⁾ ADP로 HUVEC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 을 일관되게 활성화시킬 수 있는지는 불분명하였다(Dr. Byzova와 의견 교환). 이 연구에서 우선 ADP와 ATP가 HUVEC과 HASMC에 있는 integrin을 활성화시킬 수 있는가를 알아보았다. ADP와 ATP는 세포 표면에 있는 P2 수용체와 결합하여 작용한다.²⁸⁾ ADP와 ATP는 HUVEC과 HASMC를 활성화시켜서, 투여한 농도에 비례하여 prothrombin과 골타액단백에 대한 부착을 증가시켰다. PMA 자극에 의한 세포의 부착을 대조치로 하여 HUVEC과 HASMC의 부착을 비교하였을 때, HASMC의 부착력이 훨씬 강하였다. 혈관내피세포에 존재하는 ecto-ADPase에 의해서 ADP와 ATP가 분해되어, 투여한 농도보다 낮은 농도로 integrin을 자극했을 가능성이 있었다.^{29,30)} 인혈관세포의 부착 정량 시험 동안 ADP와 ATP의 분해 정도를 HPLC로 분석하였는데, 그 정도는 무시할 수 있었다(자료 제시 안함). 각각의 세포에 분포하는 integrin 종류와 발현 정도의 차이에 의해서 HUVEC의 부착력이 HASMC 보다 약한 것으로 생각되었다.

다음 단계로 prothrombin 혹은 골타액단백과 HUVEC과 HASMC의 결합을 매개하는 integrin을 조사하였다. c7E3 (ReoPro)는 integrin β_3 에 대한 차단 항체로 현재 임상에서 사용되고 있으며, 인혈관세포에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 기능을 연구하기 위해서 흔히 사용된다.^{5,16,31-33)} HUVEC의 prothrombin과 골타액단백에 대한 부착은 c7E3에 의해서 거의 완전히 차단되었으며, 이것은 기존의 보고와 동일하였다.^{5,16)} 즉 ADP와 ATP가 HUVEC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시켰으며, prothrombin과 골

ADP에 의해서 활성화된 인혈관세포의 Prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하는 Integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 의 특성

타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 활성화 의존 리간드였다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다 HUVEC에 적게 분포하는 integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 HUVEC의 prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하지 않았다. Integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P5H9은 HUVEC의 부착을 억제하지 않았다. Integrin $\alpha_5\beta_1$ 은 연구한 integrin 중 HUVEC에 가장 많이 분포하였으나, integrin $\alpha_5\beta_1$ 차단 항체가 HUVEC의 부착에 영향을 미치지 않는다고 보고되었다.¹⁶⁾

혈관손상 후 증식하는 신내막(neointima)에 있는 평활근세포에서 integrin β_3 의 발현이 증가하며, integrin β_3 가 혈관평활근세포의 증식에 중요한 역할을 하고,³⁴⁾ integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 c7E3로 차단하면 혈관평활근세포의 이동과 부착을 차단할 수 있다고 보고되었다.³¹⁻³³⁾ 그러나 이 연구에서 c7E3는 HASMC의 부착에 영향을 미치지 못하였다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대해서 더 특이적인 차단 항체인 LM609으로 처리하였을 때는 prothrombin 부착을 30% 억제하였다. c7E3의 효과는 혈관평활근세포에 존재하는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 수에 의해서 결정되어 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 발현이 적은 혈관평활근세포의 이동과 부착을 억제하지 못한다고 보고되었고,³¹⁾ cRGD에 의해서는 HASMC의 부착이 거의 다 차단되었으므로 리간드의 RGD 연쇄를 인식하는 다른 integrin이 HASMC 부착을 매개하였을 가능성에 대해서 연구하였다. Integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 은 이 역할을 담당할 가능성이 있는 integrin이었다. 이 연구에서 사용한 HASMC에는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 가 훨씬 많이 존재하였다.

Integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 α_v 소단위를 공유하고 있으며, 혈관평활근세포와 죽상경화반에서 발견된다.¹⁴⁾ Integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P5H9을 사용하였을 때 HASMC의 prothrombin 부착이 거의 다 억제되었고, 골타액단백 부착을 46% 억제하였다. 즉 ADP는 HASMC의 integrin $\alpha_v\beta_5$ 를 활성화시켰고, prothrombin과 골타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 활성화 의존 리간드였는데, 이것은 이 연구에 의해서 처음으로 밝혀진 것이다. 그러나 HASMC의 골타액단백 부착에 대해서 P5H9는 부분적인 억제 효과가 있는 반면에 cRGD는 거의 완전히 억제하여, 또 다른 종류의 integrin이 HASMC의 골타액단백 부착에 관여함을 알 수 있었다.

Integrin $\alpha_5\beta_1$ 은 혈관손상 후 신내막에 있는 평활근세

포에 발견되며,¹²⁾ 수축성 혈관 재구도(constrictive vascular remodelling)에 관여하고,³⁵⁾ integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 의해서 매개된 fibronectin matrix assembly가 혈관평활근세포의 증식에 중요하다.³⁶⁾ 또한 혈관평활근세포가 섬유소로 이동하는 것을 억제하기 위해서는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 뿐만 아니라 integrin $\alpha_5\beta_1$ 도 동시에 차단해야 한다.³⁷⁾ 이 연구에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단 항체인 JBS5는 HASMC의 prothrombin 부착을 억제하지 않았지만(자료 제시 안 함), 골타액단백 부착을 75% 억제하였다. 즉 ADP는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 활성화시켰으며, 골타액단백은 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 활성화 의존 리간드라는 사실이 이 연구에 의해서 처음 밝혀졌다. 그러나 P5H9과 JBS5 중 어느 것도 HASMC의 골타액단백을 완전히 차단하지 못하였으므로 또 다른 integrin의 관련 가능성이 있다.

Integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외도 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 이 HASMC의 부착을 매개한다는 것이 이 연구에서 밝혀졌지만, 이것이 생체내에 그대로 적용될 수 있는지는 불확실하기 때문에 일단은 동물 생체 실험에서 이 integrin의 역할을 연구하는 것이 필요하다. 또한 대동맥평활근세포와 관동맥평활근세포에서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 의 분포 양상에 차이가 있으므로,³⁸⁾ 이 연구의 결과를 관동맥평활근세포를 포함하는 다른 종류의 혈관평활근세포에서 확인하는 것이 필요하다.

관동맥풍선성형술 후 발생하는 재협착의 문제를 c7E3가 상당 부분 해결해 줄 것으로 생각했으나, 대규모 환자를 대상으로 한 연구의 결과는 기대에 미치지 못하였다.¹¹⁾ 이것은 혈관내피손상 후 발생하는 내피증식에 관여하는 integrin을 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 한정하여 생각하였기 때문인데, 이 연구에서와 같이 다양한 종류의 integrin이 관여할 수 있으므로 이러한 integrin을 모두 차단할 수 있는 약제의 개발이 필요하다.

결론

활성화된 혈소판에서 분비되는 ADP는 인혈관세포에 존재하는 integrin을 활성화시킬 수 있다. 각각의 integrin은 휴지 상태보다는 활성화되었을 때 결합이 급격히 증가하는 활성화 의존 리간드를 갖고 있는데, 이 연구에서

는 prothrombin과 골타액단백을 활성화 의존 리간드로 사용하여, 인혈관세포에서 ADP에 의해서 활성화되는 integrin을 구명하였다.

Prothrombin과 골타액단백에 대한 활성화된 HUVEC의 부착은 integrin β_3 에 대한 단세포균향체인 c7E3에 의해서 거의 완전히 억제되었으나, integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 단세포균향체인 P5H9에 의해서는 억제되지 않았다. 반대로 활성화된 HASMC의 prothrombin 부착은 P5H9에 의해서 거의 다 억제되었으나, c7E3에 의해서는 억제되지 않았다. 골타액단백에 대한 활성화된 HASMC의 부착은 P5H9와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 단세포균향체인 JBS5에 의해서 부분적으로 억제되었다.

이상의 결과에서 ADP는 HUVEC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시켰으며, prothrombin과 골타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 활성화 의존 리간드였다. HASMC에서 ADP는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 을 활성화시켰으며, prothrombin은 integrin $\alpha_v\beta_3$, 골타액단백은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 활성화 의존 리간드로 작용하였다.

참고 문헌

- Lincoff AM, Topol EJ, Ellis SG: Local drug delivery for the prevention of restenosis: fact, fancy, and future. *Circulation* 90:2070-2084, 1994
- Minz G, Kent KM, Pichard AD, Poma JJ, Salter LF, Leon MB: Intravascular ultrasound insights into mechanism of stenosis formation and restenosis. *Cardiol Clin* 15:17-29, 1997
- Topol EJ, Byzova T, Plow EF: Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 353:227-231, 1999
- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *New Engl J Med* 332:1553-1559, 1995
- Byzova T, Plow EF: Activation of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol* 143:2081-2092, 1998
- Byzova T, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF: Role of integrin in vascular biology. *Thromb Haemost* 80:726-734, 1998
- Topol EJ, Califf RM, Weisman HF, Ellis SG, Tchong JE, Worley S, Ivanhoe R, George BS, Fintel D, Weston M, Sigmon K, Anderson KM, Lee KL, Willerson JT: Randomized trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. *Lancet* 343:881-886, 1994
- Lincoff AM, Califf RM, Moliterno DJ, Ellis SG, Ducas J, Kramer JH, Kleiman NS, Cohen EA, Booth JE, Sapp SK, Cabot CF, Topol EJ, Tchong JE, Talley JD, Caramori PO, Burton JR, Kelly TA, Ivanc TB: Complementary clinical benefits of coronary artery stenting and blockade of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. *N Engl J Med* 341:319-327, 1999
- The IMPACT-II Investigators: Randomized placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. *Lancet* 349:1422-1428, 1997
- Gibson CM, Goel M, Cohen DJ, Piana RN, Deckelbaum LI, Harris KE, King III SB: Six-month angioplasty and clinical follow-up of patients prospectively randomized to receive either tirofiban or placebo during angioplasty in the RESTORE trial. *J Am Coll Cardiol* 32:28-34, 1998
- Sabatine MS, Jang IK: The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 109:224-237, 2000
- Pickering JG, Chow LH, Li S, Rogers KA, Rocnik EF, Zhong R, Chan BMC: $\alpha_5\beta_1$ integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after injury. *Am J Pathol* 156:453-465, 2000
- Hedin U, Thyberg J: Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation* 33:239-246, 1987
- Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamazière D, Bonnet J: Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:168-176, 1998
- Frenette PS, Wagner DD: Adhesion molecules-part I. *New Engl J Med* 334:1526-1529, 1996
- Byzova T, Kim W, Midura RJ, Plow EF: Activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein. *Exp Cell Res* 254:299-308, 2000
- Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-550, 1987
- Etzioni A: Integrins-the glue of life. *Lancet* 353:341-343, 1999
- Petruzzelli L, Takami M, Humes HD: Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 106:467-476, 1999
- Price DT, Loscalzo J: Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107:85-97, 1999
- Hynes RO, Bader BL: Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. *Thromb Haemost* 78:83-87, 1997
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW: Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785-21788, 2000
- 주승재, 이재우, 박양생: 고콜레스테롤혈증 환자에서 활성화된 혈소판 Glycoprotein IIb/IIIa의 증가 순환기. *28:2030-2041*, 1998
- Byzova TV, Plow EF: Networking in the hemostatic system. Integrin binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem* 272:27183-27188, 1997
- Hatton MW, Southward SM, Serebrin SD, Kulczycky M,

ADP에 의해서 활성화된 인혈관세포의 Prothrombin과 골타액단백 부착에 관여하는 Integrin $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ 의 특성

- Blajchman MA: Catabolism of rabbit prothrombin in rabbits: uptake of prothrombin by the aorta wall before and after a de-endothelializing injury in vivo. *J Lab Clin Med* 126:521-529, 1995
26. McBane RD II, Miller RS, Hassinger NL, Chesebro JH, Nemerson Y, Owen WG: Tissue prothrombin: universal distribution in smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2430-2436, 1997
27. Bellahcène A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, Fisher LW, Castronovo V: Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 86:885-891, 2000
28. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492, 1998
29. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle BB: The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 99:1351-1360, 1997
30. Leon C, Hechler B, Vial C, Leray C, Cazenave JP, Gachet C: The P2Y₁ receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett* 403:26-30, 1997
31. Baron JH, Moiseeva EP, de Bono DP, Abrams KR, Gershlick AH: Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by c7E3 Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis. *Cardiovasc Res* 48:464-472, 2000
32. Blindt R, Bosserhoff AK, Zeiffer U, Krott N, Hanrath P, vom Dahl J: Abciximab inhibits the migration and invasion potential of human coronary artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 32:2195-2206, 2000
33. Lele M, Sajid M, Wajih N, Stouffer GA: Eptifibatide and 7E3, but not tirofiban, inhibit integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin. *Circulation* 104:582-587, 2001
34. Stouffer GA, Hu Z, Sajid M, Li H, Jin G, Nakada MT, Hanson SR, Runge MS: β_3 integrins are upregulated after vascular injury and modulate thrombospondin- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. *Circulation* 97:907-915, 1998
35. Yee KO, Schwartz SM: Why atherosclerotic vessels narrow the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 82:762-771, 1999
36. Mercurius KO, Morla AO: Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res* 82:548-556, 1998
37. Ikari Y, Yee KO, Schwart SM: Role of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins on smooth muscle cell spreading and migration in fibrin gels. *Thromb Haemost* 84:701-705, 2000
38. Davenpeck KL, Marcinkiewicz C, Wang D, Niculescu R, Shu Y, Martin JL, Zalewski A: Regional differences in integrin expression: role of $\alpha_5\beta_1$ in regulating smooth muscle cell functions. *Circ Res* 88:352-358, 2001