

ADP에 의해서 활성화된 혈관평활근 세포의 증식에 관여하는 Integrin의 종류와 신호 전달 경로

박찬복, 이지현, 류종철, 차태준, 주승재, 이재우

고신대학교 의과대학 내과학교실

Integrins Mediating ADP-stimulated Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Underlying Signal Transduction Pathway

Chan Bok Park, Jee Hyun Lee, Jong Cheol Ryu, Tae Joon Cha, Seung-Jae Joo, Jae Woo Lee

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

Abstract

Background : Adenosine diphosphate (ADP), which is usually secreted from activated platelets, activates integrin $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, and $\alpha 5\beta 1$ on human vascular smooth muscle cells. Integrins have an important role in the proliferation of vascular smooth muscle cells. ADP may stimulate the proliferation of vascular smooth muscle cells by the activation of integrins. Integrins mediating ADP-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells and signal transduction pathway of ADP stimulation were investigated in this study. **Methods :** MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to evaluate ADP or ATP-stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells (HASMC). In some experiments, HASMC were incubated with U73122, an inhibitor of phospholipase C, or monoclonal antibodies (mAb) to integrins after ADP or ATP stimulation. **Results :** ADP and ATP increased the proliferation of HASMC in a dose-dependent manner. U73122 inhibited ADP- or ATP- stimulated proliferation of HASMC. ADP-stimulated proliferation of HASMC was inhibited either by c7E3, a blocking mAb to integrin $\beta 3$ or by LM609, a blocking mAb to integrin $\alpha v\beta 3$ (37% and 26% inhibition, respectively; $p < 0.05$), but neither by P1F5, a blocking mAb to integrin $\alpha v\beta 5$ nor by JBS5, a blocking mAb to integrin $\alpha 5\beta 1$. **Conclusion :** These results indicate that ADP increases the proliferation of human vascular smooth muscle cells through phospholipase C pathway, and only integrin $\alpha v\beta 3$ mediates ADP-stimulated proliferation of human vascular smooth muscle cells.

Key words : Integrin, ADP, Vascular smooth muscle cells, Proliferation

서론

경피적관동맥중재술은 관동맥 협착의 치료에 널리 사용되고 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 관여하는데, 그 중 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 Willebrand factor 등과 같은 내피하기질(subendothelial

교신저자 Corresponding author : 주 승 재
FAX : 051-248-5686
E-mail : sejjoo@ns.kosinmed.or.kr

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 $\alpha_v\beta_3$, integrin $\alpha_v\beta_5$, integrin $\alpha_5\beta_1$ 를 활성화시킨다는 것이 보고되었다.⁵⁻⁷⁾

Integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 맥관형성(angiogenesis), 혈관내피세포와 평활근세포의 부착, 증식, 이동과 동맥 손상 후 내피 증식 등에 관여한다.⁸⁾ Integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 관동맥 재협착에 관여한다는 간접적인 증거는 Evaluation of c7E3 for the Prevention of Ischemic Complications (EPIC) 연구⁹⁾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) 연구¹⁰⁾에서도 관동맥 재협착에 관한 c7E3의 효과가 일부 확인되었다. 그러나 이러한 효과는 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 에 선택적으로 결합하는 길항제를 사용한 연구에서는 관찰할 수 없었으므로^{11,12)} integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 관동맥 재협착에 관여할 것으로 추측되었다. 그러나 이에 상반되는 결과가 보고되기도 하여¹³⁾ integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 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,¹⁴⁾ 혈관평활근세포가 수축성 표현형에서 합성 표현형으로 변환되는데 관여한다.¹⁵⁾ Integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 혈관평활근세포뿐만 아니라 죽상경화반에서도 관찰되나¹⁶⁾ 혈관평활근세포에서의 역할은 아직 알려져 있지 않다.

Integrin의 중요한 특징 중 하나는 그것이 활성화 혹은 휴지 상태로 존재한다는 것이다.¹⁷⁾ Integrin은 촉진제에 의해서 활성화된 후에 리간드(ligand)와 결합하고 여러

기능이 급격히 증가한다. 대부분의 연구에서 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)나 고농도 Mn^{2+} 와 같은 촉진제를 사용하여 integrin을 활성화시켰으나,¹⁸⁾ 이러한 촉진제는 정상 인체에서 관찰할 수 없다. ADP는 혈소판의 dense granule에 저장되어 있다가 혈소판이 활성화되면 분비되므로, 생리적으로 적합한 integrin의 촉진제이다.

ADP가 integrin $\alpha_v\beta_3$, integrin $\alpha_v\beta_5$, integrin $\alpha_5\beta_1$ 등을 활성화시킬 수 있으므로, 이러한 integrin을 매개로 하여 ADP가 혈관평활근세포의 증식을 촉진시킬 수 있을 것이다. 이 연구에서는 첫째로 ADP가 혈관평활근세포의 증식을 증가시킬 수 있는지, 만약 증가시킨다면 그 신호 전달 경로가 무엇인지 알아보았다. 둘째로 각각의 integrin에 결합하는 단세포균항체를 사용하여 ADP에 의해서 활성화된 혈관평활근세포의 증식을 매개하는 integrin의 종류를 구명하고자 하였다.

연구대상(재료)과 방법

1. 시약

Humanized monoclonal antibody (mAb) c7E3는 Centocor사(Malvern, PA, USA), $\alpha_v\beta_3$ -specific mAb인 LM609, $\alpha_v\beta_5$ -specific mAb인 P1F5, $\alpha_5\beta_1$ -specific mAb인 JBS5는 Chemicon사(Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. ADP, adenosine triphosphate (ATP), U73122, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 4-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), bovine serum albumin (BSA), thapsigargin 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, fura-2/AM은 Molecular Probe사(Eugenes, OR, USA)에서 각각 구입하였다.

2. 세포 배양

사람 대동맥평활근세포(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

(FBS; 제일생명공학서비스, 대구)이 첨가된 DMEM/F12 (제일생명공학서비스)를 사용하여, CoStar사(Cambridge, MA, USA)의 75 cm² 크기의 플라스틱 플라스크 바닥을 90% 정도 덮을 때까지 HASMC를 배양하였다.

3. MTT assay

MTT assay를 사용하여 생존세포의 양을 측정하였다.¹⁹⁾ HASMC를 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 후 0.01%의 EDTA를 함유한 0.25 mg/mL의 trypsin (Clonetics사, San Diego, CA, USA)으로 처리하여 세포를 수집하고, trypsin neutralizing solution (Clonetics 사)을 첨가하였다. 세포 부유액을 즉시 500 x g에서 10 분간 원심 분리한 후, 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 5 x 10⁴ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 96-well plate (CoStar사)의 각각의 well에 세포 부유액 200 µL(10⁴ cells)씩 넣고 1일간 배양하였다. 이후 0.1%의 FBS만 함유된 DMEM/F12로 1일간 배양하여 세포 증식을 정지시킨 후 ADP 혹은 ATP와 0.1% FBS가 포함된 DMEM/F12로 배양하였다. ADP와 ATP는 20 mM의 농도로 -20°C에서 냉동 보관하다가 필요할 때마다 1000 µM, 100 µM, 10 µM, 1 µM의 농도로 희석하였다. 각각의 농도별로 최소 8개의 well을 배정하였다. 2일간 배양한 후 MTT assay를 시행하였다. 각각의 well에 2.5 mg/mL MTT 용액을 10 µL씩 첨가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 세포 없이 배양액만 있는 well을 음성 대조군으로 하였다. 4시간 경과 후 각 well에서 150 µL의 상층액을 조심스럽게 제거하고 0.04 M HCl 100 µL를 각 well에 첨가하여, 형성된 formazan 생성물을 균질 용액으로 용해시켰다. 모든 결정이 녹은 것을 확인한 후 microplate reader (EMax, Molecular Devices사, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 595 nm에서 광학도(optical density)를 측정하였다. 10% FBS가 함유된 배양액을 첨가한 well의 세포 증식을 양성 대조치로 하였다. 각각의 well의 측정치에서 ADP나 ATP로 자극하지 않은 세포의 측정치를 빼고 10% FBS로 배양시킨 well의 측정치로 나누어서 세포 증식 정도를 계산하였다. U73122 혹은 mAb의 효과를 측정할 때는 ADP나 ATP 100 µM로 자극된 세포의 측정치를 100%로 하여 대조치로 삼았다.

4. 증식 세포수의 측정

MTT assay에서 기술한 방법으로 세포를 수집하였다. 세포 부유액을 즉시 500 x g에서 10분간 원심 분리한 후, 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 4 x 10⁴ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 24-well plate (CoStar사)의 각각의 well에 세포 부유액 500 µL(2 x 10⁴ cells)씩 넣고 1일간 배양하였다. 이후 0.1%의 FBS만 함유된 DMEM/F12로 1일간 배양하여 세포 증식을 정지시킨 후 ADP 혹은 ATP가 포함된 DMEM/F12 (0.1% FBS)로 배양하였다. Trypsin으로 처리하여 각각의 well의 세포를 수집한 후 0.4% trypan blue solution으로 염색하고 생존 세포수를 hemocytometer로 측정하였다.

5. 세포내 칼슘 이온 농도 변화의 측정

MTT assay에서 기술한 방법으로 세포를 수집하였다. 세포 부유액을 즉시 500 x g에서 10분간 원심분리한 후, 0.5% BSA와 2 µM fura-2/AM을 함유한 DMEM/F12에 5 x 10⁶ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 실온에서 30분간 배양한 후 500 x g에서 10분간 원심분리하고 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 11 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM HEPES, pH 7.40)에 2 x 10⁵ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 사면이 투명한 cuvet (Fisher Scientific사, Pittsburgh, PA, USA)에 세포부유액을 넣고 dual-wavelength spectrofluorometry (Deltascan RFK6002, Photon Technology사, Lawrenceville, NJ, USA)로 형광치를 측정하였다. Excitation wavelength는 340와 380 nm, emission wavelength는 510 nm로 고정시켰다. ADP나 ATP 100 µM을 넣고 형광치의 변화를 기록하였으며, U73122의 효과를 측정할 때는 ADP나 ATP를 넣기 5분전부터 U73122를 첨가하였다. 형광치의 변화는 Felix (Photon Technology사) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

6. 유세포분석(Flow cytometry)

MTT assay에서 기술한 방법으로 세포를 수집하였다. 세포 부유액을 즉시 500 x g에서 10분간 원심분리한 후, 0.5% BSA를 함유한 DMEM/F12에 10⁷ cells/mL의 농도로 재부유시킨 후, 500 µL의 세포 부유액을 LM609 (10 µg/mL), P1F5 (10 µg/mL), JBS5 (10 µg/mL)와 4°C에서 1

시간 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 μ L에 세포를 재부유시켰다. 유세포분석에는 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 형광 강도(mean fluorescent intensity)를 사용하였다.

7. 통계 분석

모든 통계 값은 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 다양한 농도의 ADP와 ATP에 의한 HASMC의 증식 효과와 U73122나 mAb의 증식 억제 효과를 비교하기 위해서 ANOVA와 Scheffe's test를 시행하였다. P값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. ADP 자극 후 HASMC의 증식 증가

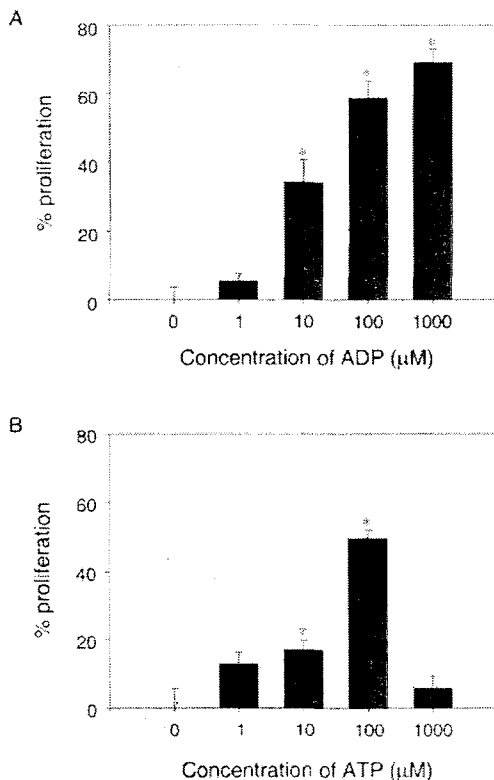


Fig. 1. MTT assay of ADP-stimulated proliferation of

HASMC. ADP (A) and ATP (B) increased the proliferation of HASMC in a dose-dependent manner. The value of no stimulated cells was subtracted and the proliferation by 10% FBS was assigned a value of 100%. The data shown are means and SEM of octaplicates in one experiment and are representative of three separate experiments. * $p < 0.05$ vs no stimulated cells.

ADP의 농도가 증가할수록 MTT assay로 측정한 생존 세포가 점차 증가하여 1000 μ M에서 최대치에 도달하였다(Fig. 1A). ATP로 자극했을 때는 농도가 증가할수록 생존세포수가 점차 증가하였으나 100 μ M에서 최대치에 도달한 후 1000 μ M에서는 감소하여 ATP로 자극하지 않은 세포와 차이가 없었다(Fig. 1B). Trypan blue로 염색한 증식 세포수의 측정에서 ADP 100 μ M을 첨가했을 때 약 3배, ATP 100 μ M을 첨가했을 때 약 2.4배의 세포 증식 효과가 있었다(Fig. 2).

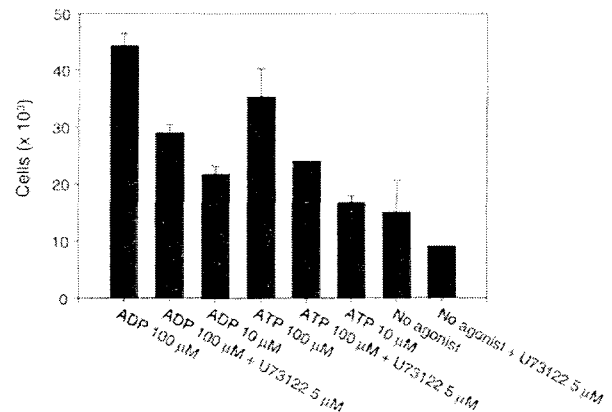


Fig. 2. Cell proliferation assay by trypan blue staining. ADP or ATP 100 μ M increased HASMC proliferation by 3 and 2.4 times, respectively. U73122 inhibited ADP- or ATP-stimulated proliferation. The data shown are means and SEM of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

2. ADP가 HASMC의 증식을 증가시키는 신호 전달 경로

ADP가 HASMC의 증식을 증가시키는 신호 전달 경로를 조사하기 위해서 phospholipase C의 억제제인 U73122를 사용하였다. Fura-2를 이용한 세포내 칼슘 이온 농도 변화의 측정에서 U73122는 농도에 비례해서 ADP와 ATP에 의한 세포내 칼슘 이온의 증가를 억제하여(Fig. 3), ADP와 ATP가 phospholipase C 신호 전달 경로를 이

ADP에 의해서 활성화된 혈관평활근 세포의 증식에 관여하는 Integrin의 종류와 신호 전달 경로

용하여 세포내 칼슘 이온 농도를 증가시켰다. Phospholipase C가 ADP와 ATP의 HASMC 증식 효과에 관여하는가를 알아보기 위해서 ADP와 ATP로 자극한 HASMC에 U73122를 첨가하여 배양하였다. Trypan blue 로 염색한 증식 세포수의 측정에서 5 μ M의 U73122는 ADP와 ATP 100 μ M의 증식 효과를 약 33% 감소시켰다 (Fig. 2). MTT assay에서는 5 μ M의 U73122가 ADP 100 μ M의 증식 효과를 28%, ATP 100 μ M의 증식 효과를 22% 감소시켰다($p<0.05$)(Table 1, Fig. 4A). 그러나 5 μ M의 U73122가 10% FBS로 배양한 세포의 증식을 12% 감소시켰으며($p<0.05$), U73122의 농도가 25 μ M로 증가하면 세포 증식을 비특이적으로 억제하는 효과가 있었다. U73122가 ADP에 의한 세포 증식을 더 많이 억제하는가를 알아보기 위해서 억제된 정도를 서로 비교하였는데, 5 μ M의 U73122는 10% FBS에 의한 증식 효과에 비해서 ADP와 ATP 100 μ M에 의한 HASMC의 증식을 더 많이 억제하였다($p<0.05$) (Table 1, Fig. 4B).

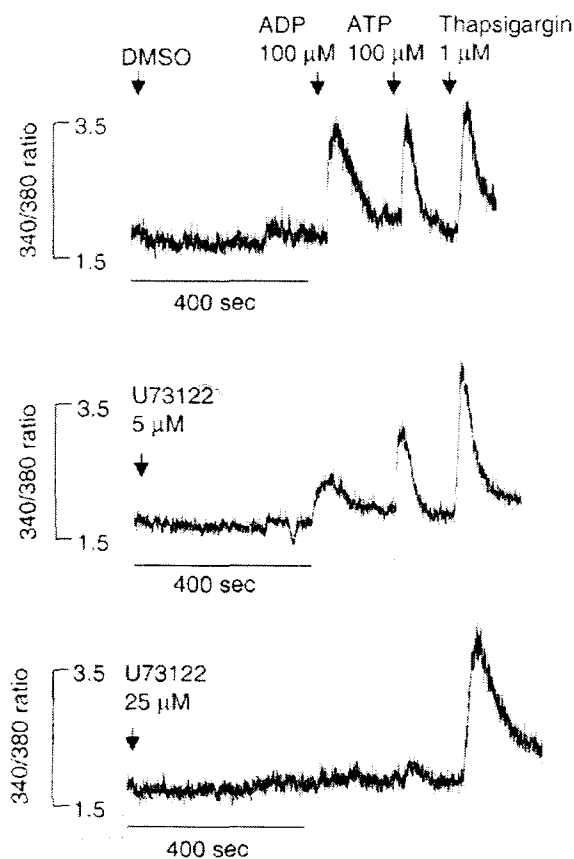


Fig. 3. ADP-induced intracellular Ca^{++} mobilization in

HASMC. U73122 inhibited ADP- and ATP-induced intracellular Ca^{++} mobilization in a dose-dependent manner. Thapsigargin, an irreversible sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{++} ATPase inhibitor, was used to deplete SR Ca^{++} pools in HASMC.

Table 1. Inhibition of stimulated proliferation of HASMC by U73122, an inhibitor to phospholipase C

	10% FBS	ADP 100 μ M	ATP 100 μ M	No agonist
No antagonist	100.0 $\pm$ 3.2%	100.0 $\pm$ 2.6%	100.0 $\pm$ 1.3%	100.0 $\pm$ 7.2%
U73122 5 μ M	88.4 $\pm$ 3.0%*	72.3 $\pm$ 3.8%*	78.3 $\pm$ 2.2%*	94.9 $\pm$ 8.5%
U73122 25 μ M	17.1 $\pm$ 0.8%*	3.0 $\pm$ 0.5%*	10.4 $\pm$ 1.3%	3.2 $\pm$ 0.6%*
Δ (No antagonist- U73122 5 μ M)	11.6 $\pm$ 3.0%	27.7 $\pm$ 3.8%†	21.7 $\pm$ 2.2%‡	5.1 $\pm$ 8.5%

The data shown are means and SEM of hexaplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

* : $p<0.05$ vs no antagonist

† : $p<0.05$ vs 10% FBS, no agonist

‡ : $p<0.05$ vs 10% FBS

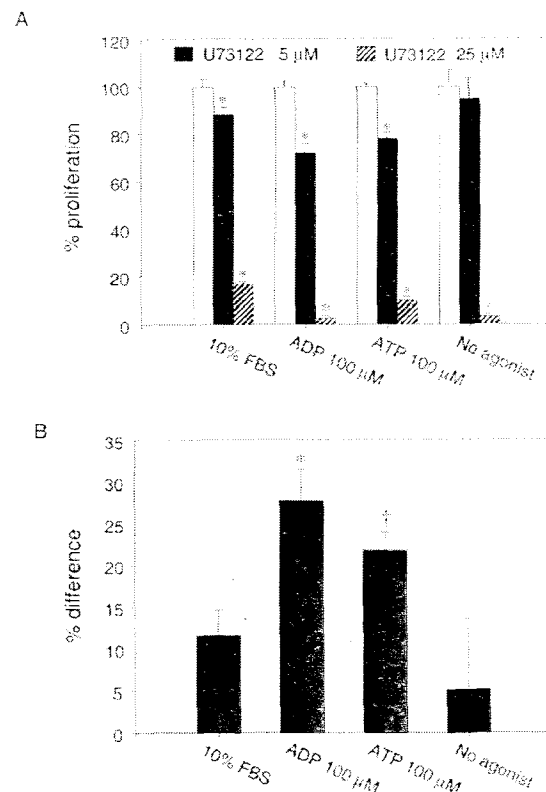


Fig. 4. Inhibition of ADP-stimulated proliferation of HASMC by U73122. (A) Each proliferation in the absence of U73122 (open bars) was assigned a value of 100%. U73122 decreased ADP- or ATP-stimulated HASMC proliferation (* $p<0.05$ vs no U73122). It also decreased HASMC proliferation by 10% FBS. (B) Inhibition by 5 μ M of U73122 was greater after ADP- or ATP- stimulation (* $p<0.05$ vs 10% FBS and no

agonist; † $p < 0.05$ vs 10% FBS). The data shown are means and SEM of hexaplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

3. HASMC에 분포하는 integrin의 종류

HASMC의 유세포분석에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ (평균 형광 강도 149)이 가장 많이 존재하였고, integrin $\alpha_v\beta_3$ (평균 형광 강도 27)가 가장 적었다. Integrin $\alpha_v\beta_5$ (평균 형광 강도 57)도 상당수 분포되어 있었다(Fig. 5).

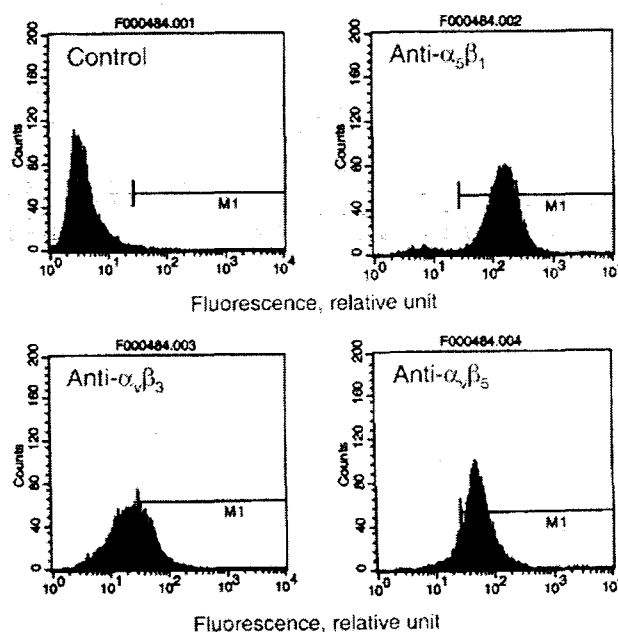


Fig. 5. Expression of integrins on HASMC. HASMC contained much more integrin $\alpha_5\beta_1$ (mean fluorescence intensity 149) than $\alpha_v\beta_3$ (mean fluorescence intensity 27) or $\alpha_v\beta_5$ (mean fluorescence intensity 57).

4. ADP에 의한 HASMC의 증식에 관여하는 integrin

ADP에 의한 HASMC의 증식에 관여하는 integrin을 알아보기 위해서 ADP와 ATP로 자극한 HASMC에 각각의 integrin에 대한 차단항체를 첨가하여 배양하고 MTT assay로 생존세포를 정량하였다. ADP와 ATP 100 μ M을 첨가한 HASMC의 증식은 integrin β_3 에 대한 차단항체인 c7E3 (40 μ g/mL)에 의해서 각각 39%와 33% 감소하였고 ($p < 0.05$), integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대해서 c7E3보다 더 특이적인 차단항체인 LM609 (20 μ g/mL)에 의해서는 각각 26%와 20% 억제되었다($p < 0.05$)(Table 2, Fig. 6A). 10% FBS에

의한 HASMC의 증식은 c7E3와 LM609에 의해서 각각 9%와 12% 억제되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P1F5 (20 μ g/mL)나 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단항체인 JBS5 (15 μ g/mL)에 의해서는 ADP와 ATP에 의한 HASMC의 증식이 억제되지 않았고 오히려 JBS5에 의해서 ADP 100 μ M에 의한 HASMC의 증식이 48% 증가하였다($p < 0.05$)(Table 2). c7E3와 LM609가 ADP와 10% FBS에 의한 HASMC의 증식을 억제하는 효과를 비교하였는데 10% FBS에 비해서 ADP와 ATP 100 μ M에 의한 HASMC 증식을 더 많이 억제하였다($p < 0.05$)(Table 2, Fig. 6B).

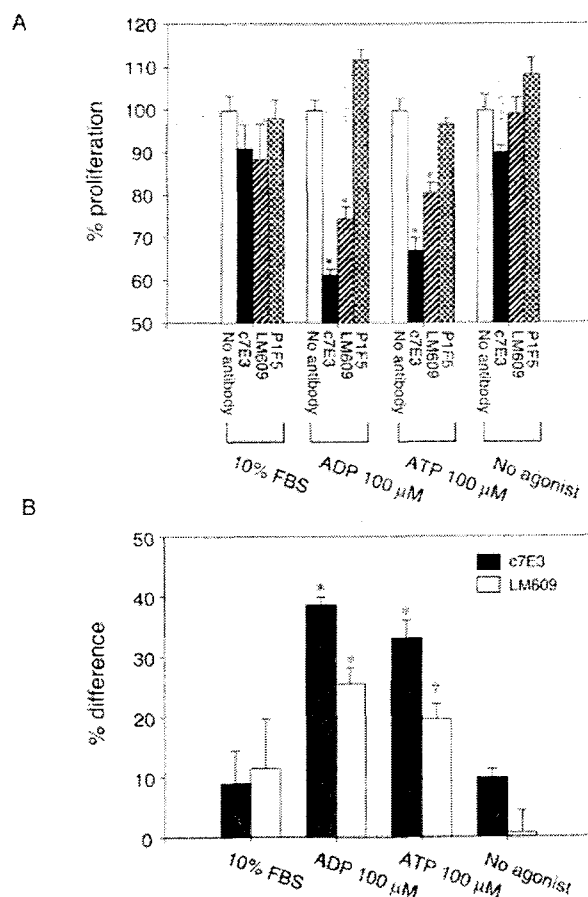


Fig. 6. Inhibition of ADP-stimulated proliferation of HASMC by monoclonal antibodies (mAb) to integrins. Each proliferation in the absence of mAb (open bars) was assigned a value of 100%. (A) ADP- and ATP-stimulated proliferation of HASMC was inhibited either by c7E3 (black bars) or LM609 (striped bars) (* $p < 0.05$ vs no antibody), but, not by P1F5 (cross-hatched bar). (B) Inhibitions by c7Es and

ADP에 의해서 활성화된 혈관평활근 세포의 증식에 관여하는 Integrin의 종류와 신호 전달 경로

LM609 were greater after ADP- or ATP- stimulation (*p<0.05 vs 10% FBS and no agonist; † p<0.05 vs 10% FBS). The data shown are means and SEM of quadruplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

Table 2. Inhibition of stimulated proliferation of HASMC by monoclonal antibodies to integrins

	10% FBS	ADP 100 μ M	ATP 100 μ M	No agonist
No antagonist	100.0 $\pm$ 3.3%	100.0 $\pm$ 2.3%	100.0 $\pm$ 2.8%	100.0 $\pm$ 3.6%
c7E3 40 μ g/mL	91.1 $\pm$ 5.5%	61.4 $\pm$ 1.3%*	67.0 $\pm$ 3.0%*	90.2 $\pm$ 1.5%
LM609 20 μ g/mL	88.5 $\pm$ 4.1%	74.6 $\pm$ 2.7%*	80.5 $\pm$ 2.4%*	99.3 $\pm$ 3.6%
PIF5 20 μ g/mL	98.1 $\pm$ 2.5%	111.9 $\pm$ 2.3%	96.8 $\pm$ 1.3%	108.4 $\pm$ 3.8%
JBS5 15 μ g/mL	108.9 $\pm$ 4.7%	147.8 $\pm$ 7.4%*	108.9 $\pm$ 6.2%	205.9 $\pm$ 7.9%
Δ (No antagonist-c7E3)	8.9 $\pm$ 5.5%	38.6 $\pm$ 1.3%†	33.0 $\pm$ 3.0%†	9.8 $\pm$ 1.5%
Δ (No antagonist - LM609)	11.5 $\pm$ 4.1%	25.5 $\pm$ 2.7%†	19.5 $\pm$ 2.4%‡	0.7 $\pm$ 3.6%

The data shown are means and SEM of quadruplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

* : p<0.05 vs no antagonist

† : p<0.05 vs 10% FBS, no agonist

‡ : p<0.05 vs no agonist

고찰

이 연구에서 ADP가 phospholipase C 신호 전달 경로를 통해서 사람 혈관 평활근 세포의 증식을 증가시켰으며, ADP에 의해서 활성화될 수 있는 사람 혈관 평활근 세포의 integrin 중에서 integrin $\alpha_5\beta_3$ 만이 이러한 경로에 의한 혈관 평활근 세포의 증식에 관여하였다.

Integrin은 세포부착분자(cell adhesion molecule)의 일종으로, 1987년 세포의 이동과 부착을 매개하기 위해서 세포내 골격과 세포외기질을 통합하는(integrate) 구조적, 면역화학적, 기능적으로 연관된 세포표면의 이형이중체(heterodimer)를 기술하기 위해서 integrin이란 용어가 처음 사용되었다.²⁰⁾ 현재까지 17개의 α 소단위와 8개의 β 소단위가 밝혀졌으며, 이 두 개의 소단위가 비공유 결합하여 20여개의 integrin을 형성한다.^{17,21-24)} Integrin이 인식하는 리간드의 아미노산 연쇄 중 대표적인 것이 L-arginyl-L-glycyl-L-aspartate (RGD) 연쇄이다. Integrin $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_3$, $\alpha_5\beta_5$, $\alpha_5\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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.²⁵⁾

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.²⁶⁾ 혈관내피세포에 있는 integrin $\alpha_5\beta_3$ 도 활성화된 후에 세포의 세포외기질의 이동과 부착이 증가하며,^{5,18)} 암세포의 혈관전이 기전으로 설명되기도 한다.¹⁸⁾ 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 $\alpha_5\beta_3$ 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 $\alpha_5\beta_3$ 의 활성화 비의존 리간드이다.^{5,27)} 이와같이 각각의 integrin은 그것에 결합하는 고유의 리간드를 갖고 있을 뿐 아니라,²⁵⁾ integrin의 활성화 상태에 따라서 친화력이 다른 활성화 의존 리간드도 갖고 있다.

이 연구에서 우선 ADP와 ATP가 HASMC의 증식을 증가시킬 수 있는가를 알아보았다. ADP와 ATP는 세포 표면에 있는 P2 수용체와 결합하여 작용한다.²⁸⁾ ADP와 ATP는 투여한 농도에 비례하여 HASMC의 증식을 증가시켜서 기존의 보고와 유사하였다.^{29,30)} 그러나 ADP는 1 mM의 농도에 도달할 때까지 HASMC의 증식을 증가시켰지만 ATP는 100 μ M의 농도에서 최고치에 도달한 후 1 mM의 농도에서는 오히려 세포 증식이 감소하여 ATP를 투여하지 않은 대조치와 차이가 없었고 용량에 비례한 세포 증식의 증가 양상이 ADP 보다 뚜렷하지 않았다. 이것은 우선 ADP와 ATP가 작용하는 P2 수용체의 종류가 다르기 때문에 생긴 결과로 생각된다. ATP는 P2Y2 수용체와 결합하나 ADP는 P2Y1, P2Y6, 혹은 이외의 아직 알려지지 않은 다른 P2Y 수용체와 결합할 수

있다.^{6,28)} 즉 각각의 수용체의 종류에 따라서 촉진제의 포화 농도에 차이가 있기 때문에 이러한 결과가 생길 수 있는데, ADP와 ATP에 의한 HASMC의 prothrombin에 대한 부착 실험에서도 유사한 결과를 얻었다.⁶⁾ 이외도 ADP 보다 1 mM의 ATP에 의한 배양액의 pH 변화가 더 큰 것이 원인이 될 수 있다.

다음 단계로 ADP와 ATP가 사람 혈관 평활근 세포의 증식을 증가시키는 기전을 조사하였다. P2Y 수용체는 G-단백과 결합된 수용체로 phospholipase C를 주된 신호 전달 경로로 이용한다.³¹⁾ Phospholipase C에 특이적인 억제제인 U73122는 ADP의 신호 전달 경로를 파악하기 위해서 흔히 사용된다.³²⁻³⁴⁾ U73122는 농도에 비례해서 ADP와 ATP에 의해 유발된 세포내 칼슘 이온 농도의 증가를 차단하여 phospholipase C 신호 전달 경로가 관여한다는 것을 알 수 있었다. 또한 U73122는 ADP와 ATP에 의한 HASMC의 증식을 억제하여 ADP와 ATP가 phospholipase C 신호 전달 경로를 통해서 사람 혈관 평활근 세포의 증식을 증가시켰다. U73122의 농도를 증가시키면 10% FBS로 배양한 HASMC의 증식 또한 거의 다 억제되었고, EDTA를 첨가했을 때도 촉진제의 종류에 관계없이 HASMC의 증식이 거의 완전히 억제되어(자료 제시 안함) 세포내외의 칼슘 이온이 HASMC의 증식에 필수적이었다. 그러나 저농도(5 μ M)의 U73122에 의한 HASMC의 증식 억제 효과는 10% FBS 보다 ADP나 ATP를 사용한 경우 더 커서 ADP와 ATP가 phospholipase C를 주된 신호 전달 경로로 이용하여 HASMC의 증식을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이외에도 ADP와 ATP에 의한 혈관평활근세포의 증식에 phospholipase C pathway뿐만 아니라 protein C kinase pathway, arachidonic acid pathway 등도 관여한다고 한다.^{29,30)}

ADP는 HASMC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$, integrin $\alpha_v\beta_5$, integrin $\alpha_5\beta_1$ 를 활성화시켜서 prothrombin이나 골타액단백에 대한 부착을 증가시킨다.⁷⁾ 각각의 integrin에 대한 차단 항체를 사용하여 ADP와 ATP에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 증식에 관여하는 integrin을 조사하였다. 혈관손상 후 증식하는 신내막(neointima)에 있는 평활근세포에서 integrin β_3 의 발현이 증가하며, integrin β_3 가 혈관 평활근세포의 증식에 중요한 역할을 한다.³⁵⁾ c7E3 (ReoPro)는 integrin β_3 에 대한 차단 항체로 현재 임상

서 사용되고 있으며, integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 c7E3로 차단하면 혈관평활근세포의 이동과 부착을 차단할 수 있다고 보고되었다.³⁶⁻³⁸⁾ 이 연구에서 c7E3는 ADP에 의한 HASMC의 증식을 약 40% 감소시켰다. 촉진제로 자극하지 않은 HASMC의 증식을 빼면 ADP에 의해서 증가된 HASMC의 증식을 거의 다 억제하였다. ATP에 의해서 증가된 HASMC의 증식도 거의 다 차단하였으며, 10% FBS에 의한 HASMC의 증식은 c7E3에 의해서 통계적으로 유의하게 감소하지 않았다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 더 특이적인 차단 항체인 LM609으로 처리했을 때도 유사한 결과를 얻었다.

이 연구에서 사용된 HASMC의 유세포 분석에서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다는 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 이 더 많이 분포하였고, prothrombin과 골타액단백에 대한 HASMC의 부착 연구에서는 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 이 integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다 HASMC의 부착에 더 중요한 역할을 하였다.⁷⁾ Integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 α_v 소단위를 공유하고 있으며, 혈관평활근세포와 죽상경화반에서 발견된다.¹⁶⁾ Integrin $\alpha_5\beta_1$ 은 혈관손상 후 신내막에 있는 평활근세포에 발견되며,¹⁴⁾ 수축성 혈관 재구도(constrictive vascular remodelling)에 관여하고,³⁹⁾ integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 의해서 매개된 fibronectin matrix assembly가 혈관평활근세포의 증식에 중요하다.⁴⁰⁾ 또한 혈관평활근세포가 섬유소로 이동하는 것을 억제하기 위해서는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 뿐만 아니라 integrin $\alpha_5\beta_1$ 도 동시에 차단해야 한다.⁴¹⁾ 이러한 결과들에 근거하여 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 이 ADP에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 증식에 관여할 것으로 기대하였으나 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P1F5와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단 항체인 JBS5는 HASMC의 증식을 억제하지 못하였다. 즉 integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 ADP와 ATP에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 증식을 매개하는 주된 integrin이었으며 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 는 여기에 관여하지 않았다. 이상의 결과는 사람 혈관 평활근 세포에 있는 각각의 integrin이 담당하는 역할이 다르다는 것을 시사한다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 혈관 평활근 세포의 증식을, integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 는 혈관 평활근 세포의 부착을 담당하는 것으로 생각된다.

이 연구의 결과를 임상에 적용한다면 관동맥풍선성형술 후 발생하는 재협착의 문제를 c7E3가 해결할 것으로 기대할 수 있으나 대규모 환자를 대상으로 한 연구의 결

과는 그렇지 못 하였다.¹³⁾ 이것은 혈관내피손상 후 발생하는 혈관 평활근 세포의 이동과 증식에 integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외에 다양한 인자들이 관여하고 있기 때문이다. 관동맥 풍선성형술에 의한 혈관 내피 손상 후 혈관 평활근 세포에 존재하는 여러 integrin이 담당하는 역할이 각각 다를 수 있기 때문에 동물 생체 실험에서 각각의 integrin 역할이 더 명확히 밝혀져야 하며 이러한 integrin을 모두 차단할 수 있는 약제의 개발이 필요하다.

결 론

Integrin의 중요한 특징 중 하나는 그것이 활성화 혹은 휴지 상태로 존재한다는 것인데 활성화된 혈소판에서 분비되는 ADP는 HASMC에 존재하는 integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 등을 활성화시킬 수 있으며, 이중 integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 HASMC의 증식에 관여한다고 알려져 있다. 이 연구에서는 MTT assay를 이용하여 ADP가 HASMC의 증식을 증가시키는 기전과 ADP에 의해서 활성화된 HASMC의 증식을 매개하는 integrin의 종류를 구명하였다.

ADP의 농도에 비례하여 HASMC의 증식이 증가하였으며 ADP에 의한 HASMC의 증식은 phospholipase C의 억제제인 U73122의 농도에 비례하여 억제되었다. ADP에 의한 HASMC의 증식은 integrin β_3 에 대한 단세포군항체인 c7E3와 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 단세포군항체인 LM609에 의해서 각각 37%와 26% 억제되었으나, Integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 각각의 단세포군항체인 P1F5와 JBS5에 의해서는 억제되지 않았다.

이상의 결과에서 ADP는 phospholipase C 신호전달경로를 통해서 혈관평활근 세포의 증식을 증가시켰다. ADP에 의해서 활성화되는 혈관평활근 세포의 integrin 중에서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 만이 혈관 평활근 세포의 증식에 관여하였다.

참고문헌

1. Lincoff AM, Topol EJ, Ellis SG: Local drug delivery for the prevention of restenosis: fact, fancy, and future. *Circulation* 90:2070-2084, 1994

2. Minz G, Kent KM, Pichard AD, Pomma JJ, Salter LF, Leon MB: Intravascular ultrasound insights into mechanism of stenosis formation and restenosis. *Cardiol Clin* 15:17-29, 1997
3. Topol EJ, Byzova T, Plow EF: Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 353:227-231, 1999
4. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *New Engl J Med* 332:1553-1559, 1995
5. Byzova T, Plow EF: Activation of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol* 143:2081-2092, 1998
6. Joo SJ, Plow EF: Subtypes of P2 receptors that activate integrin $\alpha_v\beta_3$ and integrin $\alpha_v\beta_5$ on human vascular cells. *Korean Circulation J* 30(suppl):II-211, 2000
7. Joo SJ, Plow EF: Human vascular endothelial cells and smooth muscle cells use different integrins for adhesion to prothrombin or bone sialoprotein after ADP stimulation. *Korean Circulation J* 31(suppl):II-252, 2001
8. Byzova T, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF: Role of integrin in vascular biology. *Thromb Haemost* 80:726-734, 1998
9. 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 month. *Lancet* 343:881-886, 1994
10. 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
11. 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
12. 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
13. Sabatine MS, Jang IK: The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 109:224-237, 2000
14. 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
15. Hedin U, Thyberg J: Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation* 33:239-246, 1987
16. 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
17. Frenette PS, Wagner DD: Adhesion molecules-part I. *New Engl J Med* 334:1526-1529, 1996
18. 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
19. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 65:55-63, 1983
20. Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554, 1987
21. Etzioni A: Integrins-the glue of life. *Lancet* 353:341-343, 1999
22. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD: Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 106:467-476, 1999
23. Price DT, Loscalzo J: Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107:85-97, 1999
24. Hynes RO, Bader BL: Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. *Thromb Haemost* 78:83-87, 1997
25. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW: Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785-21788, 2000
26. 주승재, 이재우, 박양생: 고콜레스테롤혈증 환자에서 활성화된 혈소판 Glycoprotein IIb/IIIa의 증가. *순환기* 28:2030-2041, 1998
27. Byzova TV, Plow EF: Networking in the hemostatic system: integrin binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem* 272:27183-27188, 1997
28. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492, 1998
29. Wang DJ, Huang NN, Heppel LA: Extracellular ATP and ADP stimulate proliferation of porcine aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 153:221-233, 1992
30. Erlinge D: Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 31:1-8, 1998
31. Burnstock G: Development and perspectives of the purinoceptor concept. *J Auton Pharmacol* 16:295-302, 1996
32. Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA: U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* 642:237-243, 1994
33. Strobaek D, Olesen SP, Christophersen P, Dissing S: P2-purinoceptor-mediated formation of inositol phosphates and intracellular Ca^{2+} transients in human coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 118:1645-1652, 1996
34. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492, 1998
35. Stouffer GA, Hu Z, Sajid M, Li H, Jin G, Nakada MT, Hanson SR, Runge MS: $\beta 3$ integrins are upregulated after vascular injury and modulate thrombospondin- and thrombin-induced proliferation of cultured smooth muscle cells. *Circulation* 97:907-915, 1998
36. Baron JH, Moiseeva EP, de Bono DP, Abrams KR, Gershlick AH: Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by $\alpha 7E3$ Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis. *Cardiovasc Res* 48:464-472, 2000
37. 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
38. Lele M, Sajid M, Wajih N, Stouffer GA: Eptifibatide and $\alpha 7E3$, but not tirofiban, inhibit integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin. *Circulation* 104:582-587, 2001
39. Yee KO, Schwartz SM: Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 82:762-771, 1999
40. Mercurius KO, Morla AO: Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res* 82:548-556, 1998
41. Ikari Y, Yee KO, Schwartz 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