

고농도 포도당에 의한 PKC- δ 의존성 NAD(P)H oxidase 활성화를 통한 혈관 평활근 세포 증식

부산대학교 의과대학 내과학교실, 부산성모병원 내과¹

김보현 · 이창원¹ · 박정래 · 강양호 · 김인주 · 김용기 · 손석만

High Glucose Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Through Activation of PKC- δ -dependent NAD(P)H oxidase

Bo Hyun Kim, Chang Won Lee¹, Jung Lae Park, Yang Ho Kang, In Ju Kim, Yong Ki Kim, Seok Man Son

*Department of Internal Medicine, School of Medicine, Pusan National University and
Department of Internal Medicine¹, Busan St.Mary's Medical Center*

- Abstract -

Background: Oxidative stress is thought to be one of the causative factors contributing to macrovascular complications in diabetes. However, the mechanisms of development and progression of diabetic vascular complications are poorly understood. We hypothesized that PKC- δ isozyme contributes to ROS generation and determined their roles in the critical intermediary signaling events in high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle (VSM) cells.

Methods: We treated primary cultured rat aortic smooth muscle cells for 72 hours with medium containing 5.5 mmol/L D-glucose (normal glucose), 30 mmol/L D-glucose (high glucose) or 5.5 mmol/L D-glucose plus 24.5 mmol/L mannitol (osmotic control). We then measured cell number, BrdU incorporation, cell cycle and superoxide production in VSM cells. Immunoblotting of PKC isozymes using phosphospecific antibodies was performed, and PKC activity was also measured.

Results: High glucose increased VSM cell number and BrdU incorporation and displayed significantly greater percentages of S and G2/M phases than compared to 5.5 mmol/L glucose and osmotic control. The nitroblue tetrazolium (NBT) staining in high glucose-treated VSM cell was more prominent compared with normal glucose-treated VSM cell, which was significantly inhibited by DPI (10 μ M), but not by inhibitors for other oxidases. High glucose also markedly increased activity of PKC- δ isozyme. When VSM cells were treated with rottlerin, a specific inhibitor of PKC- δ or transfected with PKC- δ siRNA, NBT staining and NAD(P)H oxidase activity were significantly attenuated in the high glucose-treated VSM cells. Furthermore, inhibition of PKC- δ markedly decreased VSM cell number by high glucose.

Conclusion: These results suggest that high glucose-induced VSM cell proliferation is dependent upon activation of PKC- δ , which may responsible for elevated intracellular ROS production in VSM cells, and this is mediated by NAD(P)H oxidase. (**J Kor Diabetes Assoc 30:416-427, 2006**)

Key Words: Diabetic vascular complication, High glucose, NAD(P)H oxidase, PKC- δ , Vascular smooth muscle cell

서 론

당뇨병은 죽상경화증과 같은 대혈관합병증과 밀접한 관련이 있으며 대혈관합병증은 당뇨병환자의 사망률 증가에 중요한 원인 중에 하나이다¹⁾. 최근 많은 연구에서 당뇨병성 대혈관합병증의 발생이 일차적으로 죽상경화증에서 기인되며, 이와 관련된 위험 인자로 고혈당 이외에 나이, 고혈압, 가족력, 지질대사이상과 흡연 등이 알려져 있다¹⁾. 혈관 평활근 세포는 혈관의 긴장을 유지하는 역할을 하는 혈관 벽의 주요 구성요소이다²⁾. 가속화된 혈관 평활근 세포의 성장, 혈관 내막층의 비후와 비정상적인 혈관 긴장은 죽상경화증 발생에 중요한 인자로 알려져 있으며 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 혈관 평활근 세포의 증식과 DNA 합성에 관여한다³⁾. 최근의 보고들에 의하면 고혈당은 산화 스트레스를 증가시켜 혈관합병증을 일으키는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{3,4)}. 또한 superoxide 음이온 (O_2^-)과 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 같은 활성 산소종에 의해 혈관 평활근 세포의 증식이 일어난다고 하였다⁵⁾. Superoxide 음이온의 생성은 NAD(P)H oxidase, xanthine oxidase, NO synthase 및 미토콘드리아 전자 전달계를 통해 이루어지는 것으로 알려져 있고 혈관 조직에서는 주로 NAD(P)H oxidase에 의해 산소 유리기가 생성된다³⁻⁵⁾.

혈관 구조의 변화에 고농도의 혈당이 관여한다고 제안되고 있지만 혈관 평활근 세포에서 유해한 고혈당의 영향을 증대하는 세포 신호전달경로에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 성인 동맥의 중막 내에 있는 혈관 평활근 세포는 정상적으로 활동이 없으며 낮은 빈도로 증식하고 세포 주기의 G_0 기에 정지되어 있다. 혈관 평활근 세포의 세포주기 내로 재진입과 진행은 죽상경화증, 재협착과 같은 증식성 혈관질환의 병인에 핵심적인 역할을 한다^{2,3)}.

당뇨병성 혈관합병증 발생의 병태생리학적 가설로 폴리올 경로의 활성 증가, 당화 종산물 생성의 증가, diacylglycerol-protein kinase C (DAG-PKC) 활성의 증가, 핵소사민 경로의 활성 증가 등이 알려져 있으나^{5,6)} 현재까지의 많은 연구에도 불구하고 당뇨병성 혈관 평활근 세포에서 혈관평활근 세포 증식 이상과 관련된 세포 내 신호전달계에 관하여서는 잘 알려져 있지 않다. 저자들은 고농도의 포도당에 의해 혈관 평활근 세포의 증식이 의미있게 증가하였고, 이는 PKC의 활성화 증가와 연관이 있다고 보고한 바 있다⁷⁾. 따라서 본 연구에서 저자들은 혈관 평활근 세포의 증식에 활성 산소종이 관여하는 지와 고농도 포도당에 의해 유도된 혈관 평활근 세포의 증식에서 어떤 PKC isozymes이 중요한 중간 신호 단계에서의 역할을 하는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약물

본 연구에 사용된 약물은 다음과 같다: Dulbecco's modified Eagle's medium, D-glucose, nitroblue tetrazolium, diphenyleneiodonium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); fetal calf serum, penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY); GF 109203X, G6976, rottlerin (Calbiochem, San Diego, CA); antibodies against p38 MAPK, phospho-p38 MAPK (Cell Signaling, Beverly, MA); antibodies against PKC- α , PKC- β , PKC- δ , PKC- ζ , actin and PKC- δ , siRNA kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

2. 대동맥 혈관 평활근 세포 배양

Sprague-Dawley 쥐 (200~250 g) 수컷을 CO_2 chamber에 넣어 희생시킨 다음 대동맥을 적출하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 외막층과 내피세포층을 제거한 후 6-well plate에 각각 중앙에 구멍이 있는 작은 철망을 넣고 구멍에 맞게 조직을 적절하게 잘라 혈관의 안쪽 면이 아래쪽으로 향하도록 놓고 중앙에 작은 구슬을 놓아 조직을 지지시켰다. 여기에 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 μ g/mL)이 들어있는 DMEM을 첨가하여 5% CO_2 와 95% 공기가 공급되는 37°C 세포배양기에서 7일간 배양하였다. 이후 현미경으로 혈관 평활근 세포가 자라는 것을 확인한 후 집자 (forceps)로 대동맥조직을 들어내고 세포들의 융합이 이루어지면 계대배양 (subculture)을 하였다. 제 5~8회 계대배양한 혈관 평활근 세포를 실험에 이용하였고 혈관 평활근 세포의 확인은 myosin 면역염색으로 하였다.

3. 혈관 평활근 세포의 증식 측정

혈관 평활근 세포를 60-mm culture dish에 10% FCS와 5.5 mmol/L D-glucose가 함유된 DMEM 배지로 배양한 후 70%의 세포 합류 (confluent)가 되면 0.1% FCS와 5.5 mmol/L D-glucose가 함유된 DMEM 배지로 바꾸어 48시간 동안 배양하여 세포를 휴면상태 (quiescence)로 만들었다. 그런 다음 5.5 mmol/L D-glucose, 30 mmol/L D-glucose, 5.5 mmol/L D-glucose + 24.5 mmol/L mannitol이 각각 포함된 DMEM 배지로 바꾸어 72시간 동안 배양하였다. 일부 실험에서는 PKC 억제제인 GF109203X (10 μ mol/L)를 1시간 동안 전처리한 후 30 mmol/L D-glucose가 포함된 배지로 72시간 배양하였다. 세포 수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였고 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)를 사

용하여 혈관 평활근 세포의 DNA 합성 정도를 같이 측정하였다.

4. 세포주기 분석

혈관 평활근 세포들은 5×10^5 cells/well의 밀도로 24시간 동안 배양하였다. 48시간 동안 serum starvation 후에 세포들을 72시간 동안 앞에서 기술한 농도의 포도당으로 처리하였다. 72시간 후 세포들은 트립신으로 처리하고 인산 완충 용액 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 한 번 씻어 낸 후 4시간 동안 4℃에서 ice-cold 70% ethanol로 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 세척하고 PBS에서 RNase로 실온에서 30분간 배양 후 propidium iodide solution (50 µg/mL)을 추가하였다. DNA fluorescence은 FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson Immunocytometer Systems, San Jose, CA)을 사용하여 측정하였다.

5. Superoxide 음이온 생성의 측정 (NBT assay)

혈관 평활근 세포에서 superoxide 음이온의 생성량은 혈관 평활근 세포를 nitro blue tetrazolium (NBT)과 같이 배양하여 654 nm에서 blue formazan의 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. Formazan에 대한 NBT reduction의 양은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

NBT reduction

$$= A \times V / (T \times Wt \times E \times L) \text{ (picomoles per minute per milligram wet weight of VSM cells)}$$

A : absorbance

V : volume of solubilizing solution

T : time of incubation with NBT (min)

Wt : blotted wet weight of the VSM cells

E : extinction coefficient = 0.72 mmol/mm

L : length of light path

Superoxide 음이온의 생성에 관여하는 주된 효소를 알아보기 위해 NAD(P)H oxidase 억제제인 diphenyleneiodonium (DPI, 10 µmol/L), NOS억제제인 superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL), xanthine oxidase 억제제인 allopurinol (100 µmol/L), N-acetylcystein (NAC, 10 µmol/L), 미토콘드리아 전자전달계의 억제제인 rotenone (100 µmol/L), NOS 억제제인 N^G-monomethyl-L-arginine (NMA), L-arginine-methyl ester (L-NAME), indomethacin 등에 의한 superoxide 음이온 생성량의 변화를 측정하였다.

6. PKC 활성화 측정

PKC 활성도는 PKC assay kit (Upstate Biotech, Charlottesville, VA)를 사용하여 측정하였다. 혈관 평활근 세포를 5.5 mmol/L과 30 mmol/L D-glucose가 포함된 배지로 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후 배지를 제거하고 여기에 buffered salt solution [137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 0.3 mmol/L sodium phosphate, 0.4 mmol/L potassium phosphate, 25 mmol/L β-glycerophosphate, 5.5 mmol/L D-glucose, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L CaCl₂, 100 µmol/L γ32P-ATP, 50 µg/mL digitonin, 20 mmol/L HEPES (pH 7.2)]을 첨가하였다. 그리고 100 µL의 25% TCA를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 25 µL의 aliquot를 2 cm phosphocellulose filter (Whatman P81)에 옮긴 다음 0.75% phosphoric acid로 세 번 세척하였다. Filter에 결합된 peptide substrate의 인산화 정도를 scintillation counter를 사용하여 측정하고 PKC 활성도를 계산하였다.

7. 단백질 추출 및 Western blot 분석

각 군의 혈관 평활근 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 얼음 위에 놓고서 scraper로 세포를 수집하고 Triton lysis buffer [pH 7.4, 50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitors (10 µg/mL aprotinin, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL leupeptin), phosphatase inhibitors (50 mmol/L sodium fluoride, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L sodium pyrophosphate)]를 이용하여 용해시킨 후 세포 용해액을 4℃에서 14,000 g로 15분간 원심 분리하여 상층액을 -70℃에 보관하였다. 추출된 단백질은 Bradford assay법으로 농도를 결정하였고 각각의 검체를 40 µg씩 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기 영동하여 분리하였다. 전기영동 후 겔 내의 단백질은 100 볼트에서 1시간 동안 Hybond-ECL nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane을 하룻밤 동안 4℃에서 5% non-fat dry milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 처리하였다. PKC-α, phospho-PKC-α, PKC-β, phospho-PKC-β, PKC-δ, phospho-PKC-δ, PKC-ζ, phospho-PKC-ζ, p38 MAPK, phospho-p38 MAPK와 actin에 대한 1차 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 10분간 3회 세척하였고, 1% non-fat dry milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 horseradish peroxidase 2차 항체를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ECL solution kit (Amersham Life Science Inc)을 이용하여 발현 정도를 NIH Image 1.62 software를 사용하여 측정하였다.

8. 혈관 평활근 세포에서 PKC- δ 의 RNA interference ablation

혈관 평활근 세포를 6-well plates에 분주한 후 60~70%의 세포 합류가 되면 FCS가 없는 신선한 DMEM으로 바꾸고 혈관 평활근 세포를 Santa Cruz Biotechnology에서 제공된 매뉴얼에 기술된 방법으로 80 μ mol siRNA의 최종 농도가 되도록 PKC- δ siRNA 혹은 control siRNA와 100 μ L siRNA transfection reagent를 혼합한 후 배양하였다. 37°C에서 5시간 동안 배양한 후 배지는 10% FCS를 함유한 DMEM으로 바꾸었다. 세포는 humidified CO₂ incubator에서 37°C로 24시간 동안 더 배양하였다. PKC- δ 발현의 변화는 항 PKC- δ 항체를 사용하여 Western blotting으로 PKC- δ 단백질의 발현 정도를 측정하여 결정하였다.

9. 통계 분석

실험결과는 SPSS version 12 (Statistical Package for the

Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 통계 처리하였다. 모든 실험치는 평균치 \pm 평균의 표준오차로 표시하였고 실험결과와 통계는 경우에 따라 Student's t-test와 ANOVA test를 적용하여 분석하였다. $P < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈관 평활근 세포 성장에 미치는 고농도 포도당의 효과

30 mmol/L D-glucose 조건에 노출된 혈관평활근 세포의 성장은 전형적인 증식 반응을 보였다 (Fig. 1A). 24시간 동안 30 mmol/L D-glucose 조건에 노출된 초기 효과는 5.5 mmol/L D-glucose 조건과 비교하여 세포수가 의미있게 증가하였다 ($P < 0.05$). 그리고, 72시간 동안 고농도 포도당 조건에 지속적으로 노출시킬 때 세포 수와 DNA 합성이 대

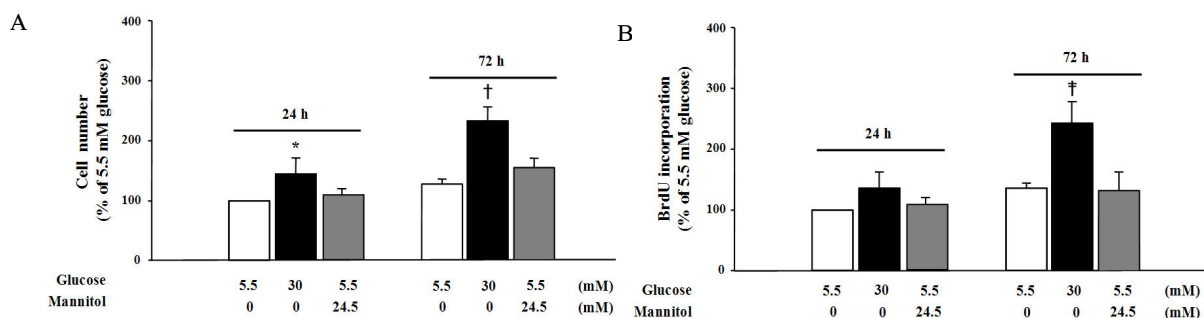


Fig. 1. Effect of high glucose on vascular smooth muscle cell proliferation (cell count) (A) and DNA synthesis (BrdU incorporation) of rat VSM cells (B).

Each VSM cells were incubated with media containing normal glucose (5.5 mmol/L D-glucose) or high glucose (30 mmol/L D-glucose) up to 72 h. At the end of incubation, cell number was measured by counting trypsinized cells with a hemacytometer and the incorporation of BrdU into VSM cells was examined using a microplate reader.

Data are obtained from three separate experiments and are expressed in the mean \pm SE.

* $P < 0.05$ compared with normal glucose for 24 h.

† $P < 0.01$ compared with normal glucose for 72 h.

‡ $P < 0.01$ compared with normal glucose for 72 h.

Table 1. Effect of High Glucose on the Cell Cycle Analysis Using Flow Cytometry

		Percent Distribution of Cell Cycle (%)		
		G0/G1	S	G2/M
Norma glucose	0 h	89.2 \pm 2.4	6.8 \pm 1.2	4.0 \pm 1.7
	72 h	71.2 \pm 2.9	11.8 \pm 2.3	8.0 \pm 1.2
High glucose	0 h	86.3 \pm 1.9	8.5 \pm 1.3	5.9 \pm 2.1
	72 h	54.0 \pm 2.9	32.4 \pm 2.4*	14.6 \pm 1.6*

Cells were grown in 25-mm² flasks and synchronized, and then the cell cycle was initiated by incubation with DMEM containing normal or high glucose for 72 h. The distribution of the cell cycle was examined as described in METHODS. Data are expressed as the percent distribution of cell cycle phases G0/G1, S, and G2/M in normal and high glucose. Similar results were obtained in three separate experiments.

* $P < 0.01$ compared with normal glucose.

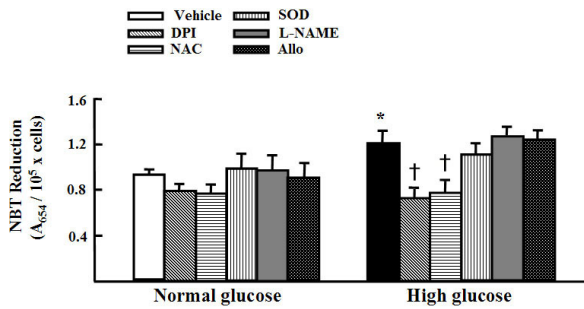


Fig. 2. Effect of various inhibitors such as DPI (10 μ mol/L), NAC (10 μ mol/L), SOD (500 U/mL), L-NAME (10 μ mol/L), and allopurinol (10 μ mol/L) on superoxide generation in normal and high glucose-treated VSM cells.

Data are shown as mean \pm SE from 4 experiments in each group.

* $P < 0.05$ vs. normal glucose.

† $P < 0.01$ compared with corresponding values in each vehicle.

조군과 비교하였을 때 의미있게 증가하였다 ($P < 0.01$). 그러나, 삼투성 대조군 (5.5 mmol/L D-glucose + 24.5 mmol/L mannitol)에서는 72시간 동안 일정하게 느린 증식 반응을 보였다. 72시간 동안 30 mmol/L D-glucose 조건에 노출하였을 때 BrdU incorporation으로 나타난 DNA합성은 72시간 동안 5.5 mmol/L D-glucose에 배양된 혈관 평활근 세포와 비교하여 의미있게 증가하였지만 (Fig 1B, $P < 0.01$), 삼투성 대조군에서는 의미있는 BrdU incorporation의 증가는 보이지 않았다 (Fig. 1B).

2. Flow cytometry를 이용한 세포주기 변화에 대한 고농도 포도당의 효과

세포주기에 대한 포도당의 영향을 보기 위해 flow cytometry 측정을 시행하였다. 72시간 동안 30 mmol/L D-glucose 배양조건에서 자극하였을 때 혈관 평활근 세포는 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건에 노출된 세포와 비교하여 S기와 G2/M기의 세포가 의미있게 많은 비율을 나타냈다 (Table 1).

3. Superoxide 음이온 생성의 측정

NBT reduction방법으로 30 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 혈관 평활근 세포의 측정된 세포 내 superoxide 음이온의 양은 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 NBT reduction이 의미있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 2). 또한, 30 mmol/L D-glucose 배양조건에서 NAD(P)H oxidase 억제제인 DPI (10 μ mol/L)와 N-acetylcystein (10 μ mol/L)으로 전처리 하였을 때 각 vehicle에서 상응하는 값과 비교하여 NBT reduction이 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$). 이는 혈관 평활근 세포에서 superoxide 음이온의 생

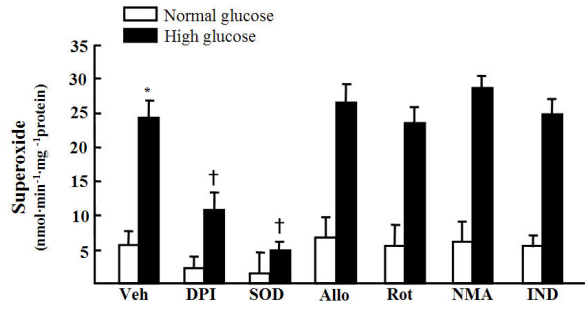


Fig. 3. Effects of various inhibitors, such as DPI (10 μ mol/L), SOD (500 U/mL), allopurinol (Allo, 100 μ mol/L), rotenone (Rot, 100 μ mol/L), L-NAME (NMA, 10 μ mol/L), and indomethacin (IND, 10 μ mol/L), NADH-stimulated superoxide production in normal and high glucose-treated VSM cells.

Data are shown as mean \pm SE from 4 experiments in each group.

* $P < 0.01$ vs. normal glucose.

† $P < 0.01$ vs. vehicle.

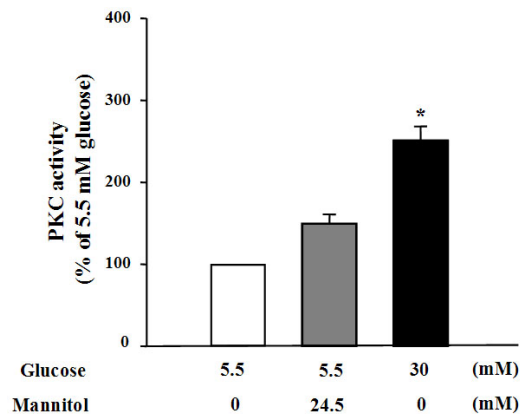


Fig. 4. Effects of high glucose on in vitro PKC activity in VSM cells.

Results were expressed as a mean percentage of 5.5 mmol/L D-glucose \pm SE from 4 independent experiments.

* $P < 0.01$ vs. normal glucose.

성은 NAD(P)H oxidase에 의해 주로 이루어짐을 보여준다. 그러나, superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL), L-NAME (10 μ mol/L)와 allopurinol (10 μ mol/L)으로 전처리 하였을 때는 NBT reduction의 의미있는 감소는 보이지 않았다. NADH-stimulated superoxide 음이온 생성의 측정에서도 5.5 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 혈관 평활근 세포와 비교하여 30 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 세포 내 superoxide 음이온의 양은 의미있게 증가하였다 ($P < 0.01$, Fig. 3) 그리고, DPI (10 μ M)와 SOD (500 U/mL)로 전처리하였을 때 각 vehicle과 비교하여 증가되었던 superoxide 음이온 생성량이 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$). 그러나, allopurinol (100 μ mol/L), rotenone (100 μ mol/L), L-NAME (10 μ mol/L)과 indomethacin (10 μ mol/L)

으로 전처리하였을 때는 superoxide 음이온 생성량은 의미 있게 감소하지 않았다.

4. PKC 활성도의 변화

혈관 평활근 세포의 PKC 활성도를 측정하였을 때 30 mmol/L D-glucose 배양조건에서 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건보다 의미있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 4). 삼투성 대조군으로 24.5 mmol/L mannitol 배양조건에서는

5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 의미있는 차이는 없었다.

PKC 활성화에 대한 고농도 포도당의 효과를 검사하기 위해 혈관 평활근 세포를 특이 PKC 억제제 (GF109203X, G6976, 혹은 rottlerin)를 1시간 동안 전처리하거나 전처리 없이 각 조건에서 72시간 동안 배양 하였다. PKC isozymes (PKC- α , PKC- β , PKC- δ , PKC- ζ) 활성화에 대한 고농도 포도당의 효과를 추가적으로 검사하였다. Fig. 5에서 PKC 동

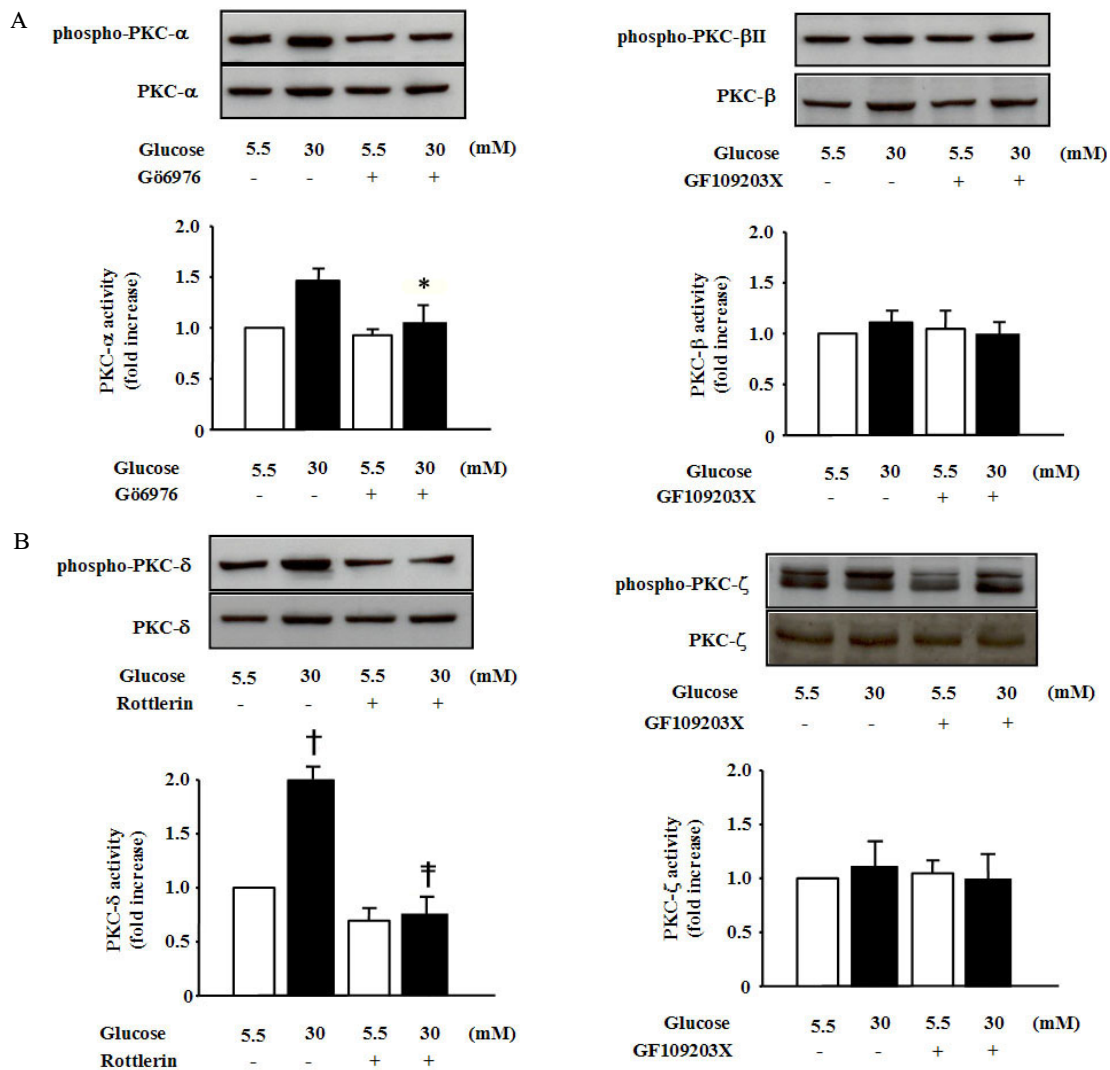


Fig. 5. Effects of high glucose on in vitro PKC activity and isozyme selective inhibition of PKC in VSM cells. Confluent cultured VSM cells were treated with high glucose condition for 72 h. To verify the efficacy and selectivity of isozyme specific PKC inhibitors, VSM cells were treated with G6976 (1 μ mol/L) and GF109203X (10 μ mol/L) (A), rottlerin (3 μ mol/L) and GF109203X (10 μ mol/L) (B) for 1 h before incubation with high glucose for 72 h, lysed and immunoblotted by using PKC isozyme-specific antibodies recognizing phosphorylated forms of PKC- α and PKC- β (A), PKC- δ and PKC- ζ (B). Total PKC isozymes in the immunoprecipitates were verified by immunoblotting with selective antibodies. The bar graph represents the mean \pm SE of three separate experiments.

* $P < 0.05$ compared with high glucose without pretreatment with G6976.

† $P < 0.01$ compared with normal glucose.

‡ $P < 0.01$ compared with high glucose without pretreatment with rottlerin.

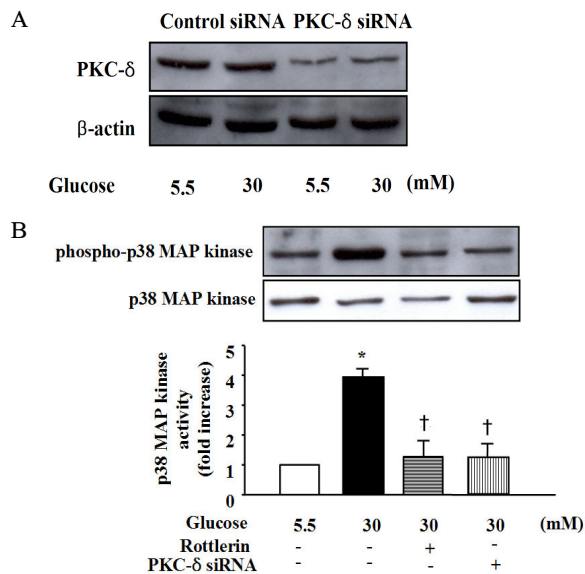


Fig. 6. Effect of selective PKC- δ inhibitor or PKC- δ siRNA on p38 MAP kinase. Quiescent VSM cells were pretreated with rottlerin (3 μ mol/L) for 1 h or transfected with PKC- δ siRNA prior to stimulation with high glucose for 72 h. p38 MAP kinase activity was assessed by immunoblotting with antibodies specific for phosphorylated p38 MAP kinase. The bar graph represents the mean fold increases in three separate experiments.

Results are expressed as the mean \pm SE.

* $P < 0.01$ compared with normal glucose.

† $P < 0.01$ compared with high glucose without treatment.

종효소의 인산화는 고농도 포도당에 노출에 대해 다양한 영향을 보였다. 30 mmol/L glucose 배양조건에서 72시간 동안 배양하여도 PKC 억제제인 GF109203X의 유무와 관계없이 PKC- β 1과 PKC- ζ 의 인산화는 의미 있는 변화를 보이지 않았지만 PKC- δ 의 인산화는 5.5 mmol/L glucose 배양조건과 비교하여 의미 있는 증가를 보였다 ($P < 0.01$). 선택적 PKC- δ 억제제인 rottlerin (3 μ mol/L)으로 전처리하면 증가되었던 PKC- δ 의 인산화는 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$). PKC- α 의 인산화는 30 mmol/L glucose 배양조건에 의해 의미 있는 증가는 보이지 않았지만 약간의 증가를 보였고, 이를 선택적 PKC- α 억제제인 G6976 (1 μ M)로 전처리한 경우 전처리를 하지 않았을 때와 비교하면 PKC- α 인산화의 의미 있는 감소는 보이지 않았다.

5. p38 MAP kinase의 활성화에 대한 PKC- δ RNA interference ablation의 효과

5.5 mmol/L glucose 조건에서 72시간 배양한 혈관 평활근 세포와 비교하여 30 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 혈관 평활근 세포의 p38 MAP kinase 활성화도가 3.8배 증가하였다 ($P < 0.01$, Fig. 6). 72시간 동안 고농도 포도당으로 자극하기 전 PKC- δ siRNA로 24시간 동안 혈관 평활근

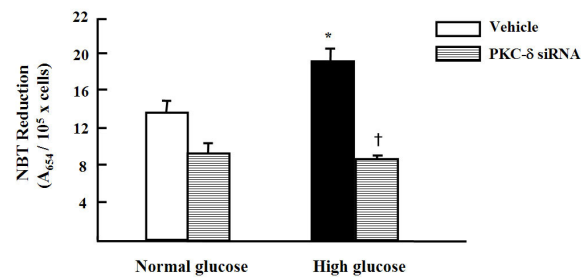


Fig. 7. Effect of transient transfections of PKC- δ siRNA on cellular superoxide production in normal and high glucose-treated VSM cells. Superoxide production was measured by NBT reduction.

Results are presented as means \pm SEM for three independent experiments.

* $P < 0.05$ vs. normal glucose.

† $P < 0.01$ vs. vehicle.

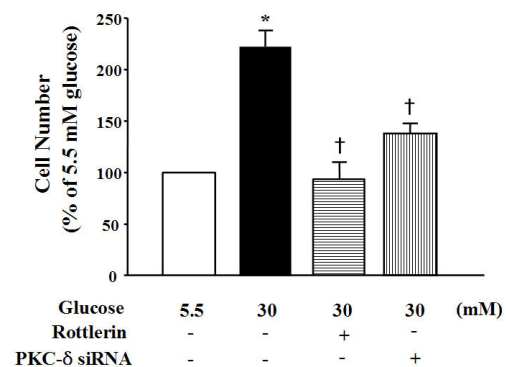


Fig. 8. Effect of selective PKC inhibitor or PKC- δ siRNA on VSM cell proliferation (cell count). Quiescent VSM cells were pretreated with rottlerin (3 μ mol/L) for 1 h or transfected with PKC- δ siRNA prior to stimulation with high glucose for 72 h. At the end of incubation, cell number was measured by counting trypsinized cells with a hemacytometer.

Results are obtained from three separate experiments and are expressed in the mean \pm SE.

* $P < 0.01$ compared with normal glucose.

† $P < 0.05$ compared with high glucose without treatment.

세포를 transfection시켰을 때 PKC- δ 단백질 발현은 현저히 감소되었다 (Fig. 6). 또한, PKC- δ 의 발현의 제거는 고농도 포도당에 의해 활성화된 p38 MAP kinase의 인산화를 의미 있게 억제하였다 ($P < 0.01$, Fig. 6). 그리고, PKC- δ 억제제인 rottlerin으로 전처리하였을 경우에도 p38 MAP kinase의 활성화가 의미있게 억제되었다 ($P < 0.01$, Fig. 6).

6. Superoxide 음이온 생성에 대한 PKC- δ RNA interference ablation의 효과

혈관 평활근 세포에서 superoxide 음이온 생성에 대한 PKC- δ siRNA의 효과를 NBT reduction에 의해 측정하였을 때 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 30 mmol/L

D-glucose 배양조건에서 의미있게 증가된 superoxide 음이온 생성량은 PKC- δ siRNA로 transfection한 후 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$, Fig. 7).

7. 혈관 평활근 세포의 증식에 대한 PKC- δ RNA interference ablation의 효과

PKC- δ 활성화가 다른 포도당 농도의 배양조건에서 혈관 평활근 세포의 증식과 연관이 있는지 연구하기 위해 혈관평활근 세포를 72시간 30 mmol/L D-glucose 조건에서 배양하기 전에 PKC- δ siRNA로 transfection시키거나 혹은 rottlerin으로 전처리를 하였다. PKC- δ 의 발현제거와 rottlerin 전처리는 고농도 포도당에 의한 혈관 평활근 세포의 증식 반응을 의미있게 감소시켰다 ($P < 0.01$, Fig. 8).

고 찰

혈관 합병증은 당뇨병과 관련된 이환율과 사망의 주요 원인이다^{1,2,8)}. Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)의 결과에 의하면 혈관 합병증의 중요한 원인으로 는 고혈당 그 자체가 중요하다고 인식되고 있다^{1,8)}. 당뇨병 은 죽상경화증 병변 형성을 촉진하고 경피적 관상동맥 성형술의 재협착의 중요한 원인이다⁸⁻¹⁰⁾. 고삼투압, 당화 종산물, sorbitol과 myoinositol 대사의 이상, diacylglycerol-protein kinase C 활성화와 같은 많은 기전이 고혈당에 의해 유발되는 혈관의 다양한 병적 변화를 설명하는데 기전으로 제시되고 있다¹¹⁾. 그럼에도 불구하고 고혈당이 어떤 경로를 통해 죽상경화증 병변 형성에 영향을 미치고 손상된 혈관의 재협착을 촉진하는지는 간단히 설명하기는 힘들다.

본 연구에서는 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 30 mmol/L D-glucose 배양조건에 노출된 혈관 평활근세포의 증식 반응을 관찰하였고 증식반응에는 PKC- δ 의존적인 NAD(P)H oxidase가 관여함을 확인하였다. BrdU의 섭취는 특정 시간에 활성화된 DNA 합성을 반영한다. G1/S 기의 flow cytometry 측정 결과는 DNA 함량에 비례한 세포의 전체 백분율을 의미하며 microscope을 이용한 세포 계산은 세포 수를 나타낸다. 이러한 방법들을 같이 검사할 때 혈관 평활근 세포에서 포도당의 영향에 대한 의미 있는 설명이 가능하다. 본 연구에서 쥐의 혈관 평활근 세포의 증식은 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 30 mmol/L D-glucose 배양조건으로 처리했을 때 증가하였고 세포의 증식은 포도당농도에 의존적임을 보였다. 이러한 혈관 평활근 세포의 증식은 고농도 포도당에 의한 효과이며 삼투압의 변화에 의한 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 또한, 세포수의 증가에 대한 고농도 포도당의 효과는 DNA합성을 증가시켜 세포 주기의 진행을 촉진한다. 이는 고농도 포도당이 DNA합성을 촉진시키고 세포주기를 S기와 G1/M기로 진입을 촉진

시킴을 보여 준다 (Table 1).

한편, Lee 등의 연구에서 혈관내피세포에서는 주로 NAD(P)H를 기질로 사용하여 superoxide 음이온을 생성하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 본 연구에서 NBT reduction assay로 측정한 superoxide 음이온 생성량을 측정하였을 때 고농도 포도당 조건에서 의미있게 증가하였고 NAD(P)H 억제제인 DPI로 처리하면 증가되었던 superoxide 음이온 생성량이 의미있게 감소하였다 (Fig. 2). 혈관조직에서 superoxide 음이온의 생성은 flavoprotein 함유 효소인 NAD(P)H oxidase, xanthine oxidase, NO synthetase 및 미토콘드리아 전자 전달계를 통해 이루어지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 혈관 조직에서 superoxide 음이온의 생성에 관여하는 주된 효소를 알아보기 위해 DPI (10 μ M), 내재성 항산화 효소인 SOD (500 U/mL)으로 처리하였을 때 superoxide 음이온의 생성량이 의미있게 감소하였지만 allopurinol (100 μ mol/L), rotenone (100 μ mol/L), L-NAME (10 μ mol/L)과 indomethacin (10 μ mol/L)으로 처리하였을 때 의미 있는 superoxide 음이온의 생성량에 변화는 없었다 (Fig. 3). 또한, Inoguchi 등의 연구 결과에서 22 mmol/L의 포도당 농도에서 혈관 평활근 세포를 72시간 동안 배양하였을 때 의미있게 superoxide 음이온의 생성량이 증가하였고 DPI로 처리하면 superoxide 음이온의 생성량이 감소함을 보고하였다¹³⁾. 이런 결과들은 혈관 조직에서 superoxide 음이온의 생성에 주로 NAD(P)H oxidase가 관여함을 보여준다.

토끼의 혈관 평활근 세포를 사용한 연구에서 고농도 포도당이 혈관 평활근 세포의 성장을 증가시키고 비정상적인 세포 내 신호를 자극시켰다¹⁴⁻¹⁶⁾. 포도당에 의해 영향을 받는 핵심적인 신호 결과 중에 하나가 protein kinase C (PKC)의 활성화이다⁵⁾. King 등¹¹⁾은 고농도 포도당이 혈관 세포의 protein kinase C를 활성화시킨다고 보고하였으며 Inoguchi 등¹³⁾은 혈관 평활근 세포를 고농도 포도당 조건에서 배양했을 때 PKC를 매개로 하는 NAD(P)H oxidase가 활성화되어 superoxide 음이온의 생성이 증가함을 보고하였다. 본 연구에서는 혈관 평활근 세포의 PKC의 isozyme 중에 PKC- δ 활성도가 고농도 포도당 배양 조건에서 대조군보다 의미있게 증가하였고 특히 PKC- δ siRNA를 사용하여 PKC- δ 발현을 의미있게 억제시켰을 때 고농도 포도당에 의한 superoxide 음이온의 생성을 의미있게 감소시켰으며 이는 NAD(P)H oxidase의 활성화에 PKC- δ 가 필요함을 보여준다. 당뇨병 상태에서 선택적으로 PKC isozyme의 조직 특이적 활성화가 야기되고 활성화된 PKC를 억제하면 당뇨병 쥐 모델에서 다양한 혈관 병변의 발생을 억제시킬 수 있는데 특히 *db/db* mice에서 사구체 간질의 팽창과 사구체 기능장애를 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다^{11,17)}. 이는 PKC가 당뇨병이 있는 혈관에서 생화학적, 기능적 변화의 중요한

매개체임을 암시한다. 본 연구에서도 고농도 포도당으로 혈관 평활근 세포를 처리하였을 때 몇 가지 PKC isozyme의 활성화를 야기시켰다. 이는 고농도 포도당이 혈관 평활근 세포에서 PKC- δ 를 활성화시킨다는 이전 연구 결과와 일치한다^{18,19)}. 하지만, 본 연구에서는 고농도 포도당이 PKC- α , PKC- β I와 PKC- ζ 는 의미있게 활성화시키지 못했다. 이런 결과들은 이전의 연구들과는 다른 실험 방법과 다른 포도당 농도를 사용했기 때문일 것으로 사료된다. 따라서, 고농도 포도당에 의한 PKC isozyme의 활성화에 대해서는 다른 조직과 세포를 사용한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

고농도 포도당에 의한 PKC isozyme의 활성화는 DAG 합성의 증가와 연관이 있다. 고농도 포도당에서 배양한 세포나 당뇨병 동물모델에서 분리한 조직에서 DAG의 만성적인 활성화가 이전에 증명되었지만⁵⁾, 당뇨병성 병변의 형성에 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 밝혀져 있지 않다. 증가된 DAG형성은 전형적인 형과 새로운 형의 PKC를 자극하지만 산화 스트레스 환경에서 이러한 kinase는 DAG에 독립적인 방법으로 tyrosine의 인산화와 활성화를 야기시킬 수 있다²⁰⁾. 고농도 포도당이 ROS 생성을 증가시키기 때문에^{12,13)}, 고혈당이 PKC를 활성화시킨다는 가전은 직접적인 tyrosine 인산화를 야기함으로써 가능할 수 있다. 하지만, 이러한 가능성을 구별하는 추가적인 연구들이 필요하다. 이전의 연구들에서 혈관 조직에서 PKC- β II의 활성화가 endothelin과 prostanoids 같은 혈관 수축성 매개체의 생성과 투과성 증가와 연관이 있다는 것을 보였다^{21,22)}. 그리고 PKC- β II는 vascular endothelial growth factor에 의한 내피 세포 증식과 혈관 생성과 연관이 있다²³⁾. PKC- β II의 선택적 억제제 고혈당에 의한 평활근 세포의 증식¹⁹⁾과 NAD(P)H oxidase-의존성 ROS 형성을 억제한다²¹⁾. 또한, PKC- β II의 억제는 당뇨병 동물모델에서 망막 혈액순환을 개선시키고 사구체 간질의 증식을 억제하는 것이 증명되어 있다¹⁷⁾. 한편, 고농도 포도당이 PKC isozyme을 활성화시킬 수 있다는 가능성은 당뇨병 쥐모델에서 PKC- α , PKC- β I와 PKC- δ 모두가 발현이 증가되고 활성화됨을 보여준 이전의 연구에 의해 지지될 수 있다. Haller 등¹⁹⁾은 20 mmol/L 농도의 포도당이 쥐의 혈관 평활근 세포에서 6시간 후에 세포막 분획에서 PKC- δ 면역 반응력 (immunoreactivity)이 증가되었지만 세포질 분획은 변하지 않았다고 보고하였다. 고농도 포도당에 의한 PKC- δ 의 활성화는 다양한 생물학적 효과를 가질 수 있다. Fukumoto 등²⁴⁾은 쥐의 혈관 평활근 세포와 A7r5 세포에서 PKC- δ 의 과발현시켰을 때 cyclin D₁과 E의 억제를 통해 G₁에서 세포주기를 정지시킴으로써 세포의 증식 감소됨을 보고 하였다. 반대로 PKC- δ 는 COS1 세포에서 Ras와는 관계없이 c-Raf에 의존하여 p38 MAP kinase와 p42/44 MAP kinase 경로를 활성화시킨다고 보고 하였고²⁵⁾,

이는 일부에서 세포 증식을 촉진시킬 수 있다는 것을 암시한다. 본 연구에서는 고농도 포도당에 의한 PKC- δ 의 활성화가 혈관 평활근 세포의 증식을 촉진함을 보였다.

포도당과 그 대사 산물은 혈관 세포의 기능을 수행하고 세포통합성을 유지하기 위해 세포에 의해 이용된 다양한 신호 전달 경로를 변화시켜 유해 효과를 매개할 수 있다. 혈관 세포에서의 수축력, 세포 증식 및 이주, 세포외기질의 형성 증가를 포함하는 일부 변화는 당뇨병에서 비정상적이다²⁶⁾. 최근 보고들에서는 p38 MAP kinase의 활성화가 당뇨병 상태에서 혈관의 기능 이상과 연관이 있음을 증명하였다^{27,28)}. 그러나 고농도 포도당과 그 대사 산물이 다른 신호 전달 경로와 p38 MAP kinase 활성화의 세포 표적에 영향을 주는지는 확실하지 않다. 하지만 본 연구에서 PKC- δ 선택적 억제제인 rottlerin과 PKC- δ siRNA에 의해 p38 MAP kinase의 발현이 억제되는 것으로 보아 혈관 평활근 세포에서 고농도 포도당에 의해 유발된 p38 MAP kinase의 활성화는 PKC- δ 의 활성을 필요로 한다는 것을 보여준다.

최근 MacFarlane 등²⁹⁾은 포도당 농도의 증가는 췌장 β -세포에서 생합성에 의한 DAG의 증가와 평행하게 p38 MAP kinase를 증가시켰다고 보고 하였다. 따라서 혈관 세포와 췌장 β -세포는 생합성에 의한 DAG를 증가시키는 능력과 PKC와 p38 MAP kinase를 활성화시키는 공통적인 능력을 공유함을 보인다. 이전의 연구에서는 전구 염증성 사이토카인과 환경적 스트레스가 활성화 인자일 때 PKC와 p38 MAP kinase 활성 사이에는 강한 연관성이 있음을 보여주지 못했다²⁹⁾. 그러나 또 다른 두 연구 결과들에서 백혈구의 분화는 PKC-의존성 p38 MAP kinase의 활성을 필요로 한다는 것을 제안하였다^{30,31)}. 본 연구와 이전의 다른 연구를 종합하면 혈관 세포에서 PKC의 활성화는 p38 MAP kinase 연쇄반응을 자극시킬 수 있다는 것을 보여준다. 또한 Igarashi 등¹⁸⁾은 PKC- β II의 발현이 PKC- δ 가 과발현된 세포와 16.5 mmol/L 포도당에 노출된 대조군 세포의 세포막분획에서 의미 있는 증가함을 보여주었다. 그러나 p38 MAP kinase 활성화는 PKC- β 선택적 억제제인 LY333351 (20 nmol/L)에 의해 억제되지 않았으나 GF109203X에 의해 전적으로 억제되었다. 이는 PKC- β 가 p38 MAP kinase를 활성화시키는 고농도 포도당에 의해 사용된 신호 전달 경로에 관여하지 않는다는 것을 나타낸다. 이러한 소견들은 쥐의 혈관 평활근 세포에서 고혈당이 동종효소 선택적 방법에서 PKC- δ 를 증가시켜서 p38 MAP kinase를 활성화시킴을 강력히 암시한다.

이상의 결과를 종합해 보면 고농도 포도당과 당뇨병에 의해 활성화 될 수 있는 PKC- δ 가 혈관 세포에서 가능성 있는 표적임을 확인하였다. 고농도 포도당 혹은 당뇨병에 의해 p38 MAP kinase와 NAD(P)H oxidase의 활성화가 PKC- δ 의존성 경로에 의해 매개되고 PKC- δ 의 약물학적 억

제 혹은 RNA interference ablation은 고농도 포도당으로 처리한 혈관 평활근 세포의 증식을 억제시킬 수 있다. 하지만, 당뇨병에서 혈관질환은 좀 더 복잡한 기전들이 관여하고 이러한 복잡한 과정을 이해하기 위해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 산화 스트레스가 당뇨병에서 혈관 내피세포의 기능장애와 혈관 평활근 세포의 증식, 혈소판 응집 증가 등에 관여하여 당뇨병성 혈관 합병증이 발생하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 고혈당이 당뇨병성 혈관 합병증의 발생에 미치는 영향에 대해서는 여러 가설들이 제시되고 있다. 고혈당에 의해 혈관 평활근 세포에서 ROS 생성이 의미있게 증가한다는 사실을 이전 연구에서 확인되었다. ROS 생성은 PKC- δ 활성화의 증가와 연관이 있다. 따라서 본 연구에서는 PKC- δ 가 ROS 생성을 야기하고 고혈당 유발성 혈관 평활근 세포의 증식에서의 신호 전달체계에서의 역할을 알아보고자 하였다.

방법: 쥐 대동맥 혈관 평활근 세포를 5.5 mmol/L 및 30 mmol/L D-glucose와 삼투성 대조군으로 48시간 동안 처리한 후 혈관 평활근 세포의 증식 (세포수 및 BrdU incorporation과 세포주기)과 superoxide생성 및 다양한 억제제의 영향, PKC- δ 와 p38 MAP kinase의 활성화 정도를 측정하였다.

결과: 1) 30 mmol/L D-glucose 배양 조건에서 혈관 평활근 세포의 수와 BrdU incorporation이 의미있게 증가하였고 NAD(P)H oxidase억제제인 DPI로 전처리 한 경우 증가되었던 혈관 평활근 세포의 증식이 의미있게 감소하였다.

2) 혈관 평활근 세포 내 superoxide 음이온의 생성량은 30 mmol/L D-glucose 배양 조건에서 의미있게 증가하였으며 DPI, SOD로 전처리 한 경우 의미있게 감소하였다.

3) 혈관 평활근 세포에서 p38 MAP kinase 활성화에 대한 고농도 포도당의 영향은 대조군과 비교하여 의미있게 활성도가 증가하였고 rottlerin과 PKC- δ siRNA로 전처리 하였을 때 증가된 p38 MAP kinase 활성이 의미있게 감소하였다.

4) 고혈당으로 처리된 혈관 평활근 세포에서 PKC- δ siRNA의 transfection은 증가된 superoxide 음이온 생성을 의미있게 감소시켰고 rottlerin과 PKC- δ siRNA로 전처리 하였을 때 고혈당에 의해 증가된 세포 증식을 의미있게 감소시켰다.

결론: 이상의 결과를 종합하면 고농도 포도당 조건에서 혈관 평활근 세포의 증식은 고농도 포도당에 의해 PKC- δ 를 매개로 하는 NAD(P)H oxidase가 활성화되어 superoxide 음이온의 생성이 증가하였기 때문인 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- DeFranzo RA, Ferrannini E: *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care* 14:173-94, 1991
- Ross R: *Cell biology of atherosclerosis. Annu Rev Physiol* 57:791-804, 1995
- Tanner FC, Boehm M, Akyurek LM, San H, Yang ZY, Tashiro J, Nabel GJ, Nabel EG: *Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(KIP1), p21(CIP1), and 16(Ink4) on vascular smooth muscle cell proliferation. Circulation* 10:2022-25, 2000
- Bruemmer D, Berger JP, Liu J, Kintscher U, Wakino S, Fleck E, Moller DE, Law RE: *A non-thiazolidinedione partial peroxisome proliferator-activated receptor ligand inhibits vascular smooth muscle cell growth. Eur J Pharm* 466:225-34, 2003
- Brownlee M: *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature* 414:813-20, 2001
- Griendling KK, Taubman MB, Akers M, Mendlowitz M, Alexander RW: *Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from cultured vascular smooth muscle cells. J Biol Chem* 266:15498-504, 1991
- 강양호, 김인주, 김용기, 손석만: 고농도 포도당상태에서 p38 MAPK와 GSK-3의 활성 조절에 의한 혈관평활근 세포의 세포주기 진행. *당뇨병학회지* 29:418-31, 2005
- Beckman JA, Creager MA, Libby P: *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. JAMA* 87:2570-81, 2002
- Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA: *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy. Part I. Circulation* 108:1527-32, 2003
- Barsness GW, Peterson ED, Ohman EM, Nelson CL, DeLong ER, Reves JG, Smith PK, Anderson RD, Jones RH, Mark DB, Califf RM: *Relationship between diabetes mellitus and long-term survival after coronary bypass and angioplasty. Circulation* 96:2551-56, 1997
- King GL, Kunisaki M, Nishi N, Inoguchi T, Shiba T, Xia P: *Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications.*

- Diabetes* 45(Suppl 3):S105-8, 1996
12. Lee HS, Son SM, Kim YK, Hong KW, Kim CD: *NAD(P)H oxidase participates in the signaling events in high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells.* *Life Sci* 72:2719-30, 2003
13. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells.* *Diabetes* 49:1939-44, 2000
14. Graier WF, Grubenthal I, Dittrich P, Wascher TC, Kostner GM: *Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation.* *Eur J Pharmacol* 294:221-9, 1995
15. Nakamura J, Kasuya Y, Hamada Y, Nakashima E, Naruse K, Yasuda Y, Kato K, Hotta N: *Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity.* *Diabetologia* 44:480-7, 2001
16. Natarajan R, Gonzales N, Xu L, Nadler JL: *Vascular smooth muscle cells exhibit increased growth in response to elevated glucose.* *Biochem Biophys Res Commun* 187:552-60, 1992
17. Sheetz MJ, King GL: *Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetes complications.* *JAMA* 288:2579-88, 2002
18. Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, Ishii H, Jiang ZY, Yamauchi T, Kuboki K, Meier M, Rhodes CJ, King GL: *Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways.* *J Clin Invest* 103:185-95, 1999
19. Haller H, Baur E, Quass P, Behrend M, Lindschau C, Distler A, Luft FC: *High glucose concentrations and protein kinase C isoforms in vascular smooth muscle cells.* *Kidney Int* 47:1057-67, 1995
20. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y: *Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂.* *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11233-7, 1997
21. Lagaud GJ, Masih-Khan E, Kai S, van Breemen C, Dube GP: *Influence of type II diabetes on arterial tone and endothelial function in murine mesenteric resistance arteries.* *J Vasc Res* 38:578-89, 2001
22. Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, King GL: *Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation.* *Diabetes* 49:1239-48, 2000
23. Suzuma K, Takahara N, Suzuma I, Isshiki K, Ueki K, Leitges M, Aiello LP, King GL: *Characterization of protein kinase C isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization.* *Proc Natl Acad Sci USA* 99:721-6, 2002
24. Fukumoto S, Nishizawa Y, Hosoi M, Koyama H, Yamakawa K, Ohno S, Morii H: *Protein kinase C inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression.* *J Biol Chem* 272:13816-22, 1997
25. Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S: *Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf.* *J Biol Chem* 271:23512-9, 1996
26. Guo JH, Wang H, Malbon CC: *Conditional, tissue-specific expression of Q205L Gi2 in vivo mimics insulin activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase.* *J Biol Chem* 273:16487-93, 1998
27. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A: *An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3L1 adipocytes and L6 myotubes.* *J Biol Chem* 274:10071-8, 1999
28. Igarashi M, Yamaguchi H, Hirata A, Tsuchiya H, Susa S, Tominaga M, Daimon M, Kato T: *Insulin activates p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase via a MAP kinase kinase (MKK) 3/MKK 6 pathway in vascular smooth muscle cells.* *Eur J Clin Invest* 30 668-77, 2000
29. MacFarlane WM, Smith SB, James RFL, Clifton AD, Doza YN, Cohen P, Docherty K: *The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic β -cells.* *J Biol Chem* 272:20936-44, 1997
30. Stein B, Brady H, Yang MX, Young DB, Barbosa MS: *Cloning and characterization of MEK6, a novel*

- member of the mitogen-activated protein kinase cascade. J Biol Chem 271:11427-33, 1996*
31. Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W, Grinstein S: *Chemotactic peptide N-formyl-met-leu*
- phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. J Biol Chem 272:937-44, 1997*