

ADP에 의해서 활성화된 혈관평활근세포의 부착과 증식에 관여하는 Integrins

고신대학교 의과대학 내과학교실
주승재 · 차태준 · 이재우

Integrins Mediating Adhesion and Proliferation of ADP-stimulated Vascular Smooth Muscle Cells

Seung-Jae Joo, MD, Tae Joon Cha, MD and Jae Woo Lee, MD

Department of Medicine, Kosin University Gospel Hospital, Busan, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Adenosine diphosphate (ADP), which is usually secreted from activated platelets, may activate integrins on vascular smooth muscle cells, resulting in adhesion and proliferation. Integrins, mediating the ADP-stimulated adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells, was investigated in this study. **Materials and Methods** : Prothrombin (PT) and bone sialoprotein (BSP) were used as activation-dependent ligands in an adhesion assay. The adhesion of human aortic smooth muscle cells (HASMC) were measured after ADP stimulation, using ligand-coated 24-well plates. The 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to evaluate the ADP-stimulated proliferation of the HASMC. **Results** : ADP activated the HASMC to increase their adhesion to the PT or BSP, and their proliferation in a dose-dependent manner. The adhesion of the ADP-stimulated HASMC to the PT was completely blocked by P5H9, a blocking monoclonal Ab (mAb) to integrin $\alpha_v\beta_5$ (92% inhibition), but was only slightly inhibited by LM609, a blocking mAb to integrin $\alpha_v\beta_3$ (30% inhibition). The adhesion of the ADP-stimulated HASMC to the BSP was partially inhibited by both P5H9 (46% inhibition) and JBS5, a blocking mAb to integrin $\alpha_5\beta_1$ (75% inhibition), but was not affected by c7E3, a blocking mAb to integrin β_3 . The ADP-stimulated proliferation of the HASMC was inhibited by both c7E3 and LM609 (98% and 93% inhibition, respectively), but not by either P1F5, a blocking mAb to integrin $\alpha_v\beta_5$ or JBS5. **Conclusion** : These results indicate the different roles of integrins on vascular smooth muscle cells after ADP stimulation ; the integrins $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_5\beta_1$ for adhesion, and the integrin $\alpha_v\beta_3$ for proliferation. (Korean Circulation J 2003;33(5):409-419)

KEY WORDS : Integrins ; Adenosine diphosphate ; Muscle, smooth, vascular ; Adhesions.

서 론

지혈과 혈전 형성에 중요한 역할을 하는 adenosine

diphosphate(ADP)는 혈소판의 부착성을 증가시키고
혈소판 응집을 유발시킬 수 있는 촉진제 중에서 처음 알
려진 물질로서,¹⁾²⁾ 활성화된 혈소판의 dense granule

논문접수일 : 2003년 2월 7일

심사완료일 : 2003년 3월 4일

교신저자 : 주승재, 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34 고신대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (051) 990-6206 · 전송 : (051) 248-5686 · E-mail : sejoo@ns.kosinmed.or.kr

이나 손상된 세포에서 분비되어 혈소판 표면에 있는 휴지 상태의 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 를 활성화시켜서 혈소판을 응집시킨다.³⁾ 최근에 ADP는 사람 혈관세포에 존재하는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시킬 수 있으며 prothombin은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 활성화 의존 리간드(ligand)라고 보고되었다.⁴⁾

경피적 관동맥중재술은 관동맥 협착의 치료에 널리 사용되고 있으나 시술 후 20~50%에서 발생하는 재협착이 관동맥 중재술의 효과를 감소시키는 주요 요인이다. 관동맥 재협착의 기전은 복잡하며 여러 인자들이 관여하는데, 그 중 혈관 내피 손상 후 혈관평활근세포의 이동과 증식이 섬유성 내피증식을 보이는 재협착 병변의 발생에 중요한 역할을 한다.⁵⁾⁶⁾ Integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 맥관형성(angiotogenesis), 혈관내피세포와 평활근세포의 부착, 증식, 이동과 동맥 손상 후 내피 증식 등에 중요한 역할을 하며,⁷⁾ integrin $\alpha_5\beta_1$, integrin $\alpha_v\beta_5$ 등도 혈관평활근세포에 분포하여⁸⁻¹⁰⁾ 관동맥중재술 후 재협착의 발생에 관여할 가능성이 있다.

ADP는 혈관 평활근세포의 증식을 증가시키는 유사분열물질(mitogen)로 작용할 수 있는데,¹¹⁾¹²⁾ 혈소판이 활성화되면 ADP가 분비되어 혈관평활근세포에 존재하는 integrin을 활성화시켜서 혈관평활근세포의 부착과 증식에 관여할 수 있다. 이 연구에서는 혈관평활근세포에서 ADP에 의해서 활성화될 수 있는 integrin의 종류와 ADP에 의한 혈관평활근세포의 증식을 매개하는 integrin을 조사하였다.

재료 및 방법

시 약

ADP, adenosine triphosphate(ATP), DMSO, PMA, MTT((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, bovine serum albumin(BSA)은 Calbiochem사(La Jolla, CA, USA)에서 각각 구입하였다. Human prothrombin은 Enzyme Research사(South Bend, IN, USA), humanized monoclonal antibody(mAb)인 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), 형광소식자인 Calcein AM은 Molecular Probes사(Eugene, OR, USA)에서 각각 구입하였다. 골타액단백(bone sialoprotein : BSP)과 $\alpha_v\beta_5$ -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 제공받았다.

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% FBS(fetal bovine serum ; 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.

부착 정량(Adhesion assay)

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(Clonetics사)을 첨가하였다. 세포 부유액을 즉시 500 ×g에서 10분간 원심 분리한 후, 0.5% BSA를 함유한 DMEM/F12에 10⁷ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 24-well plate(Costar사)의 각각의 well에 완충용액(50 mM NaHCO₃, 150 mM NaCl, pH 8.0)에 녹아 있는 prothrombin 10 µg 혹은 골타액단백 0.5 µg씩 넣고, 4℃에서 밤새 처리하였다. 이후 PBS로 1회 세척한 후 각각의 well에 2% BSA를 넣고 37℃에서 1시간 처리하였다. Calcein AM 50 µg을 10 µL의 DMSO에 녹인 후 PBS 500 µL를 첨가하여 희석시켰다. 이 Calcein AM 용액 중 200 µL를 10⁷/mL의 농도의 세포 부유액 1 mL와 혼합한 후 37℃에서 20분간 배양하고, 0.5% BSA가 있는 DMEM/F12를 사용하여 5 × 10⁵ cells/mL의 농도로 희석시켰다. 세포 부유액에 CaCl₂ 1 mM을 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 μ L씩 분주하고 37°C의 incubator에 넣었다. 30~50분 후에 부착된 세포를 도립현미경으로 관찰한 후, 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 μ M로 자극된 세포의 형광치를 100%로 하여 대조치로 삼았다. 길항제 혹은 단세포균항체의 효과를 측정할 때는 ADP 100 μ M로 자극된 세포의 형광치를 100%로 하여 대조치로 삼았다.

MTT assay

MTT assay를 사용하여 생존세포의 양을 측정하였다.¹³⁾ 부착 정량에서 기술한 방법으로 세포를 수집한 후 세포 부유액을 즉시 500×g에서 10분간 원심 분리하고 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 5×10^4 cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 96-well plate(CoStar사)의 각각의 well에 세포 부유액 200 μ L(10^4 cells)씩 넣고 37°C에서 1일간 배양하였다. 이후 0.1%의 FBS만 함유된 DMEM/F12로 1일간 배양하여 세포 증식을 정지시킨 후 다양한 농도의 ADP 혹은 ATP와 0.1% FBS가 포함된 DMEM/F12로 배양하였다. 각각의 농도별로 최소 8개의 well을 배정하였다. 2일간 배양한 후 MTT assay를 시행하였다. 각각의 well에 2.5 mg/mL의 MTT 용액을 10 μ L씩 첨가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 세포 없이 배양액만 있는 well을 음성 대조군으로 하였다. 4시간 경과 후 각 well에서 150 μ L의 상층액을 조심스럽게 제거하고 0.04 M HCl 100 μ L를 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. 단세포균 항체의 효과를 측정할 때는 ADP나 ATP 100 μ M로 자극된 세포의 측정치를 100%로 하여 대조치로 삼았다.

증식 세포수의 측정

부착 정량에서 기술한 방법으로 세포를 수집한 후 세포 부유액을 500×g에서 10분간 원심 분리하고 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 4×10^4 cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 24-well plate의 각각의 well에 세포 부유액 500 μ L(2×10^4 cells)씩 넣고 37°C에서 1일간 배양하였다. 이후 0.1%의 FBS만 함유된 DMEM/F12로 1일간 배양하여 세포 증식을 정지시킨 후 ADP 혹은 ATP가 포함된 DMEM/F12로 배양하였다. Trypsin으로 처리하여 각각의 well의 세포를 수집한 후 0.4% trypan blue solution으로 염색하고 생존 세포수를 hemocytometer로 측정하였다.

유세포분석(Flow cytometry)

부착 정량에서 기술한 방법으로 세포를 수집한 후 세포 부유액을 500×g에서 10분간 원심 분리하고 0.5% BSA를 함유한 DMEM/F12에 10^7 cells/mL의 농도로 재부유시킨 후 500 μ L의 세포 부유액을 LM609(10 μ g/mL), P1F5(10 μ g/mL), JBS5(10 μ g/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 μ L에 세포를 재부유시켰다. 유세포분석에는 FACScan instrument(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 CellQuest software program(ver 1.2)을 사용하였다. 단세포균 항체와 반응시키지 않은 세포를 음성 대조군으로 하였다. 세포 표면에 존재하는 integrin의 수를 비교하기 위해 평균 형광량(mean fluorescent intensity)을 사용하였다.

통계 분석

모든 통계 값은 평균±표준오차로 표시하였다. 다양한 농도의 ADP와 ATP에 의해서 자극된 HASMC의

prothrombin 부착을 휴지 상태의 부착과 비교하고 ADP와 ATP의 HASMC 증식 효과와 단세포군 항체의 증식 억제 효과를 비교하기 위해서 ANOVA와 Scheffe's test를 시행하였다. p값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

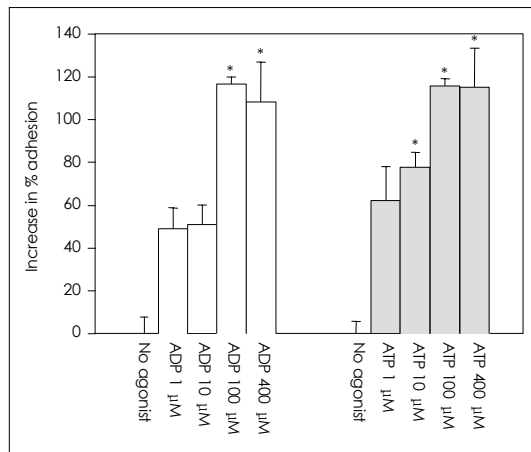


Fig. 1. ADP and ATP increased adhesion of human aortic smooth muscle cells to prothrombin in a dose-dependent manner. PMA-induced adhesion to prothrombin at the concentration of 200 nM was assigned a value of 100% and increases in %adhesion were calculated. The data shown are means and SEM. *: $p < 0.05$ vs no stimulated cells, ADP : adenosine diphosphate, ATP : adenosine triphosphate.

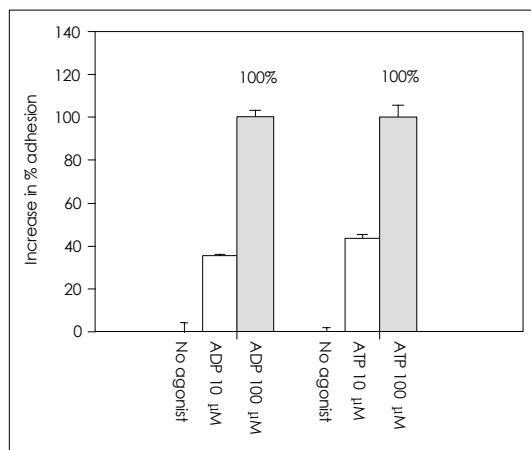


Fig. 2. ADP and ATP increased adhesion of human aortic smooth muscle cells to bone sialoprotein in a dose-dependent manner. ADP- or ATP-induced adhesion to bone sialoprotein at the concentration of 100 μM was assigned a value of 100% and increases in %adhesion were calculated. The data shown are means and SEM of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

결 과

ADP 자극 후 prothrombin 혹은 골타액단백에 부착된 혈관 평활근세포

ADP나 ATP 농도가 증가할수록 prothrombin에 부착되는 HASMC이 점차 증가하여 100 μM에서 최대치에 도달하였다(Fig. 1). 또한 골타액단백에 부착되는 HASMC도 ADP와 ATP의 농도에 비례하여 증가하였다(Fig. 2).

ADP 자극 후 HASMC의 증식 증가

ADP의 농도에 비례해서 MTT assay로 측정된 생존 세포가 점차 증가하여 1000 μM에서 최대치에 도달하였다(Fig. 3A). ATP로 자극했을 때도 농도가 증가할수록

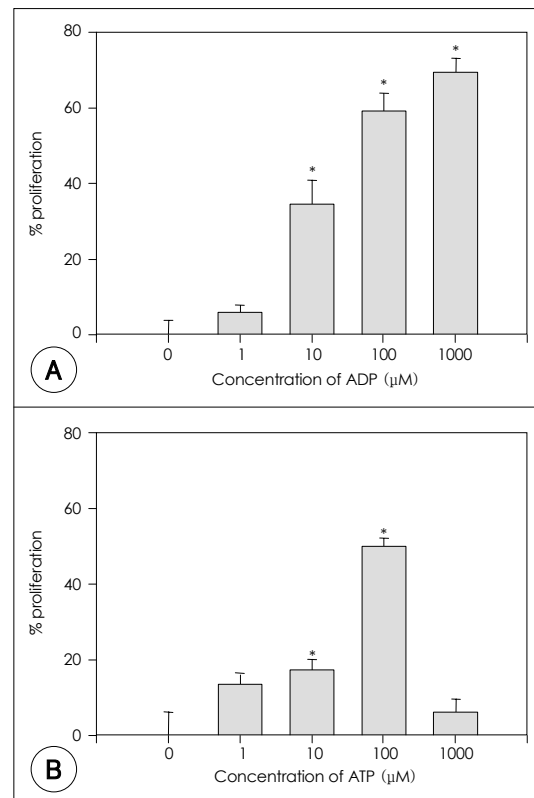


Fig. 3. MTT assay of ADP-stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells. ADP (A) and ATP (B) increased the proliferation in a dose-dependent manner. The value of no stimulated cells was subtracted and the proliferation by 10% FBS was assigned a value of 100%. The data shown are means and SEM in one experiment and are representative of three separate experiments. *: $p < 0.05$ vs no stimulated cells.

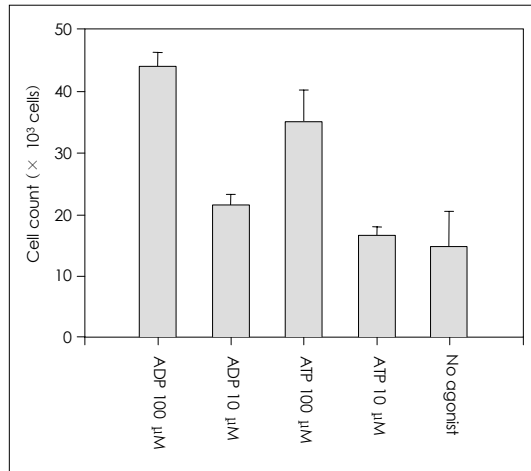


Fig. 4. Cell proliferation assay by trypan blue staining. ADP and ATP 100 μ M increased the proliferations of human aortic smooth muscle cells by 3 and 2.4 times, respectively. The data shown are means and SEM of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments, ADP : adenosine diphosphate, ATP : adeno-sine triphosphate.

록 생존세포수가 점차 증가하였으나 100 μ M에서 최대 치에 도달한 후 1000 μ M에서는 감소하여 ATP로 자극하지 않은 세포와 차이가 없었다(Fig. 3B). 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. 4).

HASMC에 분포하는 integrin의 종류

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

ADP에 의해서 활성화되는 integrin

HASMC에서 ADP에 의해서 활성화되는 integrin을 알아보기 위해서 세포를 integrin에 대한 차단항체로 처리한 후 prothrombin과 글타액단백에 대한 부착을 정량

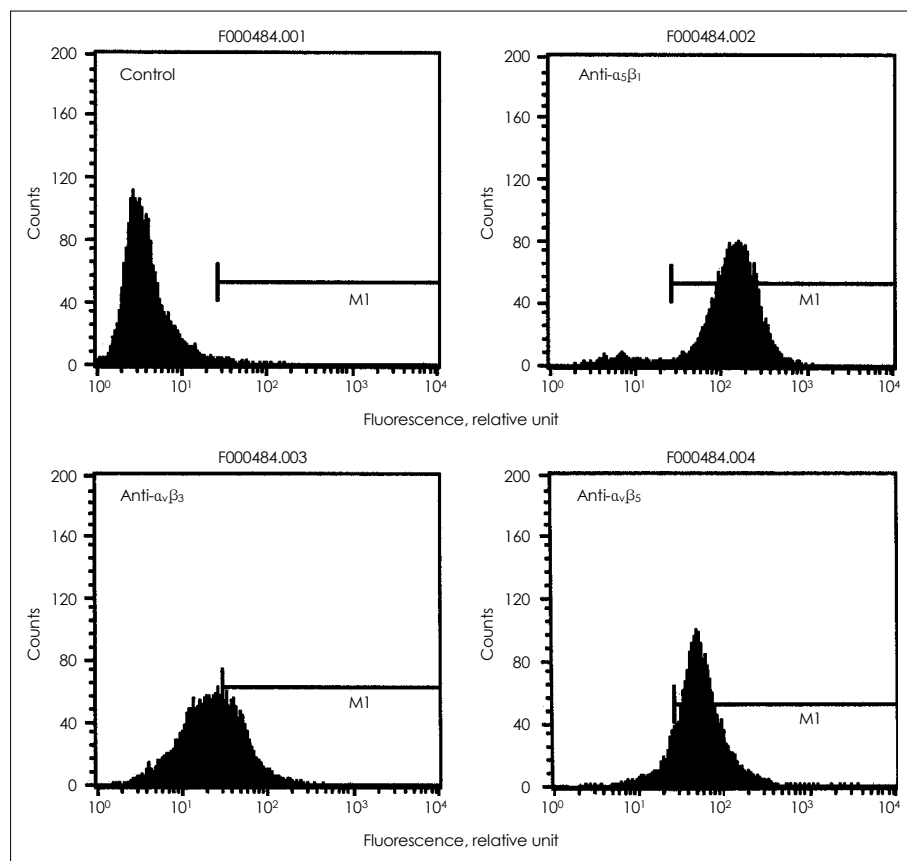


Fig. 5. Expression of integrins on human aortic smooth muscle cells. They contained much more integrin $\alpha_5\beta_1$ (mean fluorescence intensity 149) than $\alpha_v\beta_3$ (mean fluorescence intensity 27) or $\alpha_v\beta_5$ (mean fluorescence intensity 57).

하였다. ADP 100 μ M로 자극된 HASMC의 prothrombin에 대한 부착은 integrin β_3 에 대한 차단항체인 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). 그러나 리간드의 RGD 연쇄를 인식하는 integrin을 비특이적으로 차단하

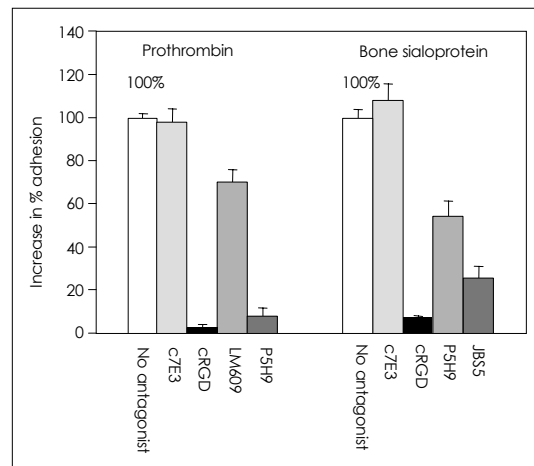


Fig. 6. Integrins that mediated ADP-stimulated adhesion of human aortic smooth muscle cells (HASMC) to prothrombin or bone sialoprotein. Adhesion in the presence of 100 μ M ADP without inhibitors (open bars) was assigned a value of 100%. A blocking monoclonal antibody (mAb) against integrin β_3 , c7E3, did not inhibit ADP-stimulated adhesion of HASMC to prothrombin nor bone sialoprotein. cRGD inhibited ADP-stimulated adhesion of HASMC to both ligands nearly completely. Although LM609, a blocking mAb against integrin $\alpha_v\beta_3$, decreased ADP-stimulated adhesion of HASMC to prothrombin by 30%, P5H9, a blocking mAb against integrin $\alpha_v\beta_5$, blocked the adhesion by 92%. Adhesion of HASMC to bone sialoprotein was partially inhibited by P5H9 or JBS5, a blocking mAb against integrin $\alpha_5\beta_1$. The data shown are means and SEM of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments.

는 cRGD(10 μ M)에 의해서 97% 억제되어서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외의 다른 integrin이 HASMC의 prothrombin 부착에 관여한다는 것을 시사하였다. Integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P5H9으로 처리한 후에는 92% 억제되어(Fig. 6, 7), 자극된 HASMC의 pro-thrombin 부착에 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 주된 역할을 하였다. HASMC의 골타액단백에 대한 부착은 prothrombin에 대한 부착과 다른 양상을 보였다. ADP 100 μ M로 자극된 HASMC의 골타액단백에 대한 부착은 c7E3에 의해서 억제되지 않았으며, P5H9에 의해서 46% 억제되었다(Fig. 6). 그러나 cRGD(10 μ M)에 의해서 93% 억제되어, integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 이외의 또 다른 integrin이 HASMC의 골타액단백 부착에 관여함을 암시하였다. 실험에 사용된 혈관평활근세포에 있는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 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(Fig. 6, 8).

ADP에 의한 HASMC의 증식에 관여하는 integrin

ADP에 의한 HASMC의 증식에 관여하는 integrin을 연구하기 위해서 ADP와 ATP로 자극한 HASMC에 각각의 integrin에 대한 차단항체를 첨가하여 배양하고 MTT assay로 생존세포를 정량하였다. ADP와 ATP 100 μ M을 첨가하여 배양한 HASMC의 증식은 c7E3 (40 μ g/mL)에 의해서 각각 39%와 33% 감소되었고($p < 0.05$), LM609(20 μ g/mL)에 의해서는 각각 26%와 20% 감소되었다($p < 0.05$) (Fig. 9A). 10% FBS에 의한 HASMC의 증식은 c7E3와 LM609에 의해서 각각 9%와 12% 감소되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P1F5(20 μ g/mL)나 integ-

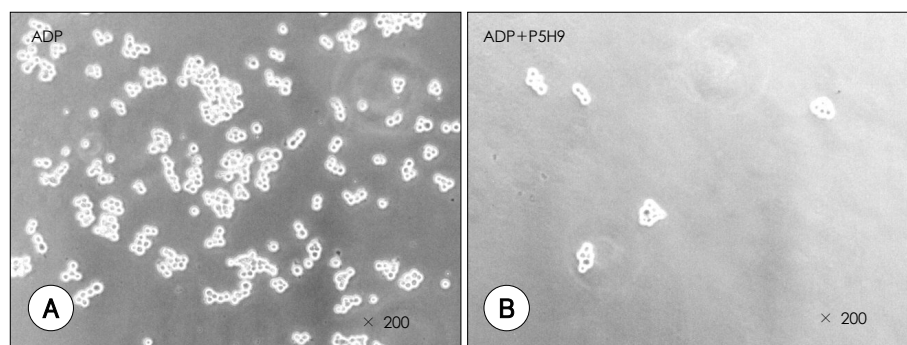


Fig. 7. ADP-stimulated adhesion of human aortic smooth muscle cells to prothrombin. ADP (adenosine diphosphate) activated integrin $\alpha_v\beta_5$ to increase the adhesion (A), and it was prevented by P5H9 (B). Original magnification $\times 200$.

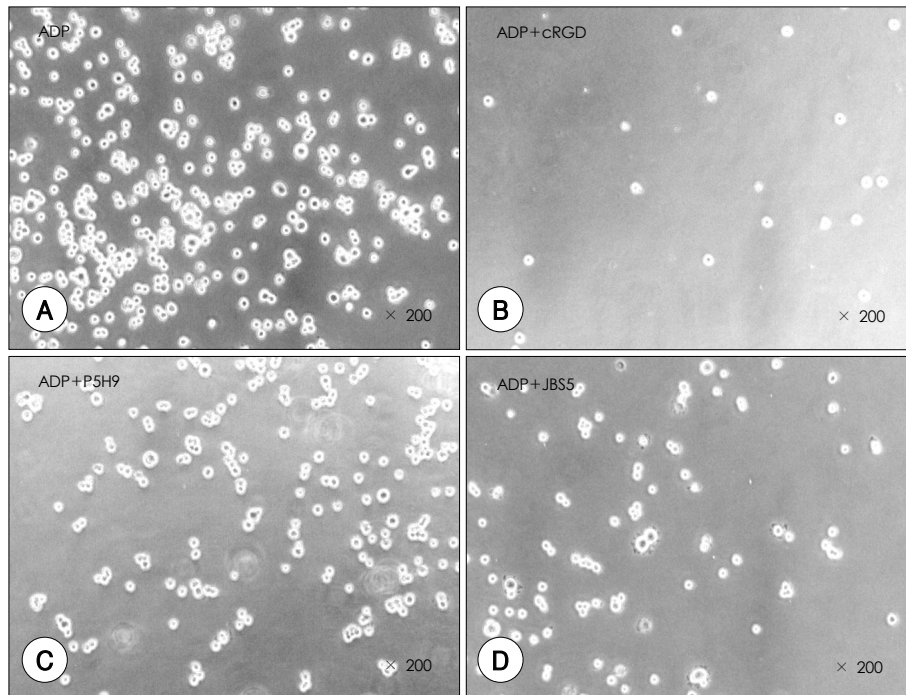


Fig. 8. ADP-stimulated adhesion of human aortic smooth muscle cells (HASMC) to bone sialoprotein. It was partially inhibited by P5H9 or JBS5. ADP(adenosine diphosphate) activated HASMC to increase the adhesion (A), which was nearly completely inhibited by cRGD (B). Integrin $\alpha_v\beta_5$ (C) and $\alpha_5\beta_1$ (D) were responsible for that adhesion. Original magnification $\times 200$.

rin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단항체인 JBS5(15 $\mu\text{g/mL}$)에 의해서 ADP와 ATP에 의한 HAS-MC의 증식이 억제되지 않았고 오히려 JBS5에 의해서 ADP 100 μM 에 의한 HASMC의 증식이 증가하였다($p < 0.05$) (Table 1). ADP나 ATP 100 μM 을 첨가하여 배양한 세포의 MTT assay 측정치에서 0.1% FBS만 첨가된 배지로 배양한 세포의 측정치를 빼고 계산하였을 때 c7E3는 ADP와 ATP에 의한 증식을 각각 98%와 94% 억제하였고 LM 609는 각각 93%와 64% 억제하였다(Table 1) (Fig. 9B).

고 찰

이 연구에서 ADP가 사람 혈관평활근세포에 분포하는 integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 등을 활성화시켰으며 혈관평활근세포의 prothrombin과 골타액단백 부착을 매개하였다. 그러나 혈관평활근세포의 증식에는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 만이 관여하였다.

Integrin은 세포부착분자(cell adhesion molecule)의 일종으로, 1987년 세포의 이동과 부착을 매개하기 위해

서 세포내 골격과 세포외기질을 통합하는(integrate) 구조적, 면역화학적, 기능적으로 연관된 세포표면의 이형이중체(heterodimer)를 기술하기 위해서 integrin이란 용어가 처음 사용되었다.¹⁴⁾ 현재까지 17개의 α 소단위와 8개의 β 소단위가 밝혀졌으며, 이 두 개의 소단위가 비공유 결합하여 20여개의 integrin을 형성한다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 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.¹⁸⁾

Integrin의 중요한 특징 중 하나는 그것이 활성화 혹은 휴지 상태로 존재한다는 것이다.¹⁵⁾ Integrin의 활성화 상태를 판단하기 위해서는 휴지 상태의 integrin보다 활성화된 integrin에 대한 친화력이 훨씬 큰 활성화 의존 리간드를 사용한다. Prothrombin과 골타액단백은 휴지

상태보다 활성화된 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 결합이 급격히 증가하는 활성화 의존 리간드로 알려져 있다.⁴⁾¹⁹⁾ Prothrombin은 혈액의 응고 인자로 작용할 뿐만 아니라 손상

을 받은 혈관벽에서 관찰되고 혈관평활근세포에 의해서도 합성된다.²⁰⁾²¹⁾ 따라서 prothrombin이 혈관내피손상 후 혈관평활근세포의 이동과 증식에 관여하는 integrin의 리간드로 작용할 수 있기 때문에 이 연구에서 리간드로 선택하였다. 또한 골타액단백은 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)에서 합성되는 산성 당단백으로서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 뿐만 아니라 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와도 결합하므로 이러한 integrin의 특성을 연구하기 위한 리간드로 선택하였다.

이 연구에서 우선 ADP와 ATP가 HASMC에 있는 integrin을 활성화시킬 수 있는가를 알아보았는데, ADP와 ATP는 투여한 농도에 비례하여 HASMC의 표면에 있는 integrin의 활성을 증가시켰고 prothrombin과 골타액단백에 대한 HASMC의 부착을 증가시켰다. 다음 단계로 ADP와 ATP가 HASMC의 증식을 증가시킬 수 있는가를 조사하였는데 ADP와 ATP는 투여한 농도에 비례하여 HASMC의 증식을 증가시켜서 기존의 보고와 일치하였다.¹¹⁾¹²⁾

ADP는 혈관평활근세포에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 활성화시킬 수 있다고 알려져 있는데 integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외의 다른 integrin도 ADP에 의해서 활성화도가 증가할 수 있다. 이 연구에 사용한 HASMC에는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다 integrin $\alpha_5\beta_1$ 과 $\alpha_v\beta_5$ 가 더 많이 존재하였다. HASMC과 prothrombin, 혹은 HASMC과 골타액단백의 결합을 매개하는 integrin을 알아보기 위해서 각각의 integrin에 결합하는 단세포군 차단항체를 사용하였다.

c7E3(ReoPro)는 integrin β_3 에 대한 차단항체로 현재 임상에서 사용되고 있으며 사람 혈관세포에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 기능을 연구하기 위해서 흔히 사용된다.⁴⁾¹⁹⁾²²⁻²⁴⁾ 혈관손상 후 증식된 신내막(neointima)에 있는 평활근세포에서 integrin β_3 의 발현이 증가하며 integrin β_3 가 혈관평활근세포의 증식에 중요한 역할을 하고,²⁵⁾ c7E3로 integrin $\alpha_v\beta_3$ 를 차단하면 혈관평활근세포의 이동과 부착을 차단할 수 있다고 보고되었다.²²⁻²⁴⁾ 그러나 이 연구에서 c7E3는 HASMC의 부착에 영향을 미치지 못하였다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대해서 더 특이적인 차단항체인 LM609으로 처리하였을 때는 prothrombin에 대한 부착을 30% 억제하였다. 그러나 cRGD에 의해서는 HASMC의 부착이 거의 다 차단되었으므로 리간드의 RGD 연쇄를 인식하는 다른 integrin이 HASMC 부착을 매개하였을 가능성에 대해서 연구하였다.

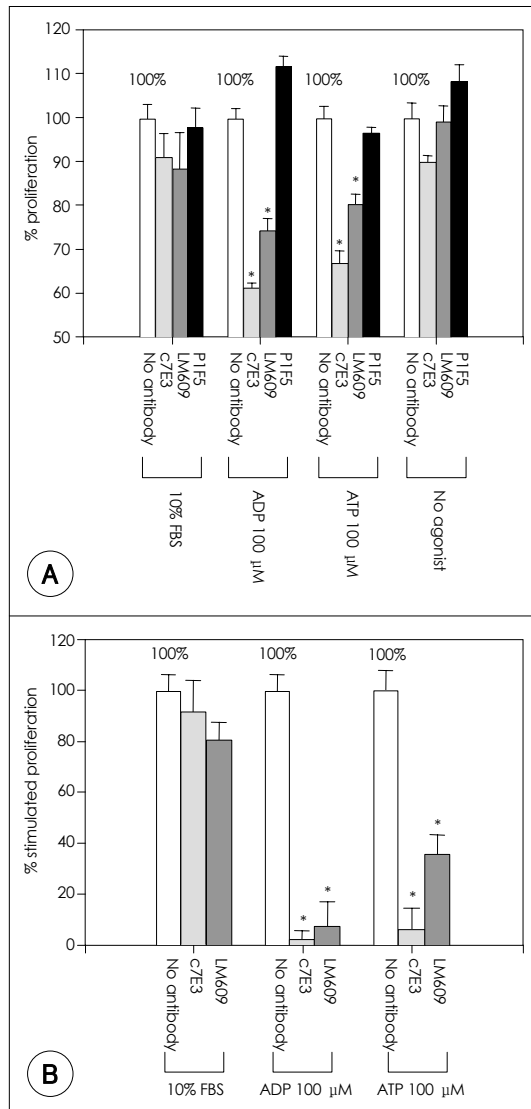


Fig. 9. Inhibition of ADP-stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells (HASMC) by blocking monoclonal antibodies (mAb) to integrins. A : each proliferation in the absence of mAb (open bars) was assigned a value of 100%. B : proliferation in the absence of agonist was subtracted and each stimulated proliferation in the absence of mAb (open bars) was assigned a value of 100%. ADP- and ATP-stimulated proliferation of HASMC was inhibited either by c7E3 or LM609 (* : $p < 0.05$ vs no antibody), but, not by P1F5, a blocking mAb to integrin $\alpha_v\beta_5$. The data shown are means and SEM in one experiment and are representative of three separate experiments.

Table 1. Inhibition of stimulated proliferation of human aortic smooth muscle cells by blocking monoclonal antibodies to integrins

	10% FBS	ADP 100 μ M	ATP 100 μ M
No antagonist	100 \pm 6%	100 \pm 6%	100 \pm 8%
c7E3 (40 μ g/mL)	91 \pm 13%	2 \pm 3%*	6 \pm 9%*
LM609 (20 μ g/mL)	81 \pm 14%	7 \pm 10%*	36 \pm 8%*
P1F5 (20 μ g/mL)	90 \pm 8%	112 \pm 19%	81 \pm 8%
JBS5 (15 μ g/mL)	115 \pm 8%	398 \pm 8%*	152 \pm 59%

The data shown are means and SEM in one experiment and are representative of three separate experiments. * : $p < 0.05$ vs no antagonist, FBS : fetal bovine serum, ADP : adenosine diphosphate, ATP : adenosine triphosphate, c7E3 : a blocking monoclonal antibody to integrin β_3 , LM609 : a blocking monoclonal antibody to integrin $\alpha_v\beta_5$, P1F5 : a blocking monoclonal antibody to integrin $\alpha_v\beta_5$, JBS5 : a blocking monoclonal antibody to integrin $\alpha_5\beta_1$

Integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 α_v -소단위를 공유하고 있으며, 혈관평활근세포와 죽상경화반에서 발견된다.¹⁰⁾ Integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단항체인 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 리간드였다. 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 $\alpha_5\beta_1$ 는 혈관손상 후 신내막에 있는 평활근세포에 발견되며,⁸⁾ 수축성 혈관재구도(constrictive vascular remodeling)에 관여하고,²⁶⁾ integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 의해서 매개된 fibronectin matrix assembly가 혈관평활근세포의 증식에 중요하다고 보고되었다.²⁷⁾ 또한 혈관평활근세포가 섬유소로 이동하는 것을 억제하기 위해서는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 뿐만 아니라 integrin $\alpha_5\beta_1$ 도 동시에 차단해야 한다.²⁸⁾ 이 연구에서 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단 항체인 JBS5는 HASMC의 prothrombin에 대한 부착을 억제하지 않았지만(자료 제시 안함), 골타액단백에 대한 부착을 75% 억제하였다. 즉 ADP는 integrin $\alpha_5\beta_1$ 을 활성화시켰으며, 골타액단백은 integrin $\alpha_5\beta_1$ 의 활성화 의존 리간드로 작용하였다. 그러나 P5H9과 JBS5 중 어느 것도 HASMC의 골타액부착을 완전히 차단하지 못하였으므로 또 다른 integrin의 관련 가능성은 남아있다.

ADP와 ATP가 HASMC에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ 을 활성화시킬 수 있지만 이 중 integrin $\alpha_v\beta_3$ 만이 혈관평활근세포의 증식을 매개하였다. c7E3는 ADP에

의한 HASMC의 증식을 약 40% 감소시켰다. 촉진제로 자극하지 않은 HASMC의 증식을 빼면 ADP에 의해서 증가된 HASMC의 증식을 c7E3로 거의 다 억제할 수 있었다. ATP에 의해서 증가된 HASMC의 증식도 c7E3에 의해서 거의 다 차단되었으나 10% FBS에 의한 HASMC의 증식에는 영향을 주지 않았다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대해서 더 특이적인 차단 항체인 LM609으로 처리했을 때도 유사한 결과를 얻었다. 기대와는 달리 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 혈관평활근 세포의 증식을 매개하는 주된 integrin이었으며 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 은 여기에 관여하지 않았다. 이상의 결과는 사람 혈관평활근세포에 있는 각각의 integrin이 담당하는 역할이 다르다는 것을 시사한다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 혈관 평활근 세포의 증식을, integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 은 혈관평활근세포의 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 결과는 그렇지 못하였다.²⁹⁾ 이것은 혈관내피손상 후 발생하는 혈관평활근세포의 이동과 증식에 integrin $\alpha_v\beta_3$ 이외에 다양한 인자들이 관여하고 있기 때문이다. 또한 관동맥풍선성형술에 의한 혈관 내피 손상 후 혈관평활근 세포에 존재하는 여러 integrin이 담당하는 역할이 각각 다를 수 있기 때문에 동물 생체 실험에서 각각의 integrin의 역할이 더 명확히 밝혀져야 하며 이러한 integrin을 모두 차단할 수 있는 약제의 개발이 필요하다.

요 약

배경 및 목적 :

혈소판에서 분비되는 adenosine diphosphate(ADP)는 혈관평활근세포에 있는 integrin을 활성화시켜서 혈관평활근세포의 부착과 증식을 유발할 수 있다. 이 연구에서는 ADP에 의해서 자극된 혈관평활근세포의 부착과 증식을 매개하는 integrin의 종류를 구명하고자 하였다.

방 법 :

Prothrombin과 골타액단백(bone sialoprotein)을 활성화 의존 리간드로 사용하였다. ADP로 자극된 사람 대동맥평활근세포(human aortic smooth muscle cell : HASMC)의 부착을 리간드가 덮혀져 있는 24-well plate를 사용하여 정량하였다. HASMC의 증식은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 사용하여 측정하였다.

결 과 :

ADP는 농도에 비례해서 HASMC의 prothrombin 혹은 골타액단백 부착과 HASMC의 증식을 증가시켰다. ADP로 자극된 HASMC의 prothrombin에 대한 부착은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 차단항체인 LM609에 의해서 30% 억제되었으나 Integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P5H9으로 처리한 후에는 92% 억제되어서 HASMC의 prothrombin 부착에 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 주된 역할을 하였다. ADP로 자극된 HASMC의 골타액단백에 대한 부착은 integrin β_3 에 대한 차단항체인 c7E3에 의해서 영향을 받지 않았으나 P5H9에 의해서 46% 억제되었고 integrin $\alpha_5\beta_1$ 에 대한 차단항체인 JBS5로 처리 후 HASMC의 골타액단백 부착이 75% 억제되어서 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 이 HASMC의 골타액단백 부착을 매개하였다. ADP를 첨가하여 배양한 HASMC의 증식은 c7E3와 LM609에 의해서 각각 98%와 93% 억제되었으나 JBS5와 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단 항체인 P1F5는 ADP에 의한 HASMC의 증식에 영향을 주지 않아서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 만이 ADP에 의한 HASMC의 증식에 관여하였다.

결 론 :

ADP에 의해서 활성화될 수 있는 혈관평활근세포의 integrin 중에서 integrin $\alpha_v\beta_5$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 은 주로 혈관평활근세포의 부착을, integrin $\alpha_v\beta_3$ 은 혈관평활근세포의 증식을 담당하였다.

중심 단어 : Integrins ; Adenosine diphosphate ; 혈관평활근세포 ; 부착.

■ 감사문

이 연구는 2000년도 고신대학교 의학부 의과학 연구비의 일부 보조로 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- 1) Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 1961;192:531-2.
- 2) Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-9.
- 3) Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995;332:1553-9.
- 4) Byzova TV, Plow EF. Activation of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol* 1998;143:2081-92.
- 5) Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin in vascular biology. *Thromb Haemost* 1998;80:726-34.
- 6) Lincoff AM, Topol EJ, Ellis SG. Local drug delivery for the prevention of restenosis: fact, fancy, and future. *Circulation* 1994;90:2070-84.
- 7) Minz G, Kent KM, Pichard AD, Pomma JJ, Salter LF, Leon MB. Intravascular ultrasound insights into mechanism of stenosis formation and restenosis. *Cardiol Clin* 1997;15:17-29.
- 8) 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* 2000;156:453-65.
- 9) Hedin U, Thyberg J. Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation* 1987;33:239-46.
- 10) Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamaziere JM, Bonnet J. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:168-76.
- 11) Wang DJ, Huang NN, Heppel LA. Extracellular ATP and ADP stimulate proliferation of porcine aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1992;153:221-33.
- 12) Erlinge D. Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 1998;31:1-8.
- 13) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983;65:55-63.
- 14) Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549-54.
- 15) Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules: part I. *N Engl J Med* 1996;334:1526-9.
- 16) Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 1999;106:467-76.
- 17) Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999;107:85-97.
- 18) Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-8.

- 19) Byzova TV, Kim W, Midura RJ, Plow EF. *Activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein.* *Exp Cell Res* 2000;254:299-308.
- 20) Hatton MW, Southward SM, Serebrin SD, Kulczycky M, 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* 1995;126:521-9.
- 21) McBane RD 2nd, Miller RS, Hassinger NL, Chesebro JH, Nemerson Y, Owen WG. *Tissue prothrombin: universal distribution in smooth muscle.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2430-6.
- 22) 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* 2000;48:464-72.
- 23) 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* 2000;32:2195-206.
- 24) Lele M, Sajid M, Wajih N, Stouffer GA. *Eptifibatide and 7E3, but not tirofiban, inhibit $\alpha_v\beta_3$ integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin.* *Circulation* 2001;104:582-7.
- 25) 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* 1998;97:907-15.
- 26) Yee KO, Schwartz SM. *Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis.* *Thromb Haemost* 1999;82:762-71.
- 27) Mercurius KO, Morla AO. *Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly.* *Circ Res* 1998;82:548-56.
- 28) 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* 2000;84:701-5.
- 29) Sabatine MS, Jang IK. *The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease.* *Am J Med* 2000;109:224-37.