

혈관평활근세포에서 고농도 포도당이 유도한 TSP-1 발현과 MMP-2 활성화에 미치는 Epicatechin의 효과

가톨릭대학교 의과대학 생리학교실, 생화학교실¹, 한림대학교 의과대학 내과학교실²

류경렬 · 강정훈 · 홍경자¹ · 정인경² · 장화인 · 이덕주 · 윤신희 · 한상준 · 김명석 · 조양혁 · 김명준

The Effect of Epicatechin on the High Glucose-induced TSP-1 Expression and MMP-2 Activity in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Gyeong Ryul Ryu, Jung-Hoon Kang, Kyong-Ja Hong¹, In-Kyung Jeong², Hwa-In Jang,
Duck-Joo Rhie, Shin Hee Yoon, Sang June Hahn, Myung-Suk Kim, Yang-Hyeok Jo, Myung-Jun Kim

*Department of Physiology and Biochemistry¹, College of Medicine, The Catholic University of Korea;
Department of Internal Medicine², College of Medicine, Hallym University*

ABSTRACT

Background: The incidence of atherosclerosis is well correlated with the progression of type 2 diabetes mellitus. High plasma glucose in uncontrolled diabetic patients evokes many vascular complications such as atherosclerosis. Specifically, high glucose was reported to induce thrombospondin-1 (TSP-1), which activates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and leads to the invasion of vascular smooth muscle cells (VSMCs) into the intima. Catechins with antioxidant effects are known to inhibit MMP-2 activity. Therefore, this study was aimed at revealing the effect of epicatechin, one of catechins, on high glucose-induced TSP-1 and the invasiveness of VSMCs.

Methods: VSMCs were primarily isolated from Sprague-Dawley rat aorta. The VSMCs were incubated with different doses (30, 100 and 300 μ M) of epicatechin under high glucose concentration (30 mM). The TSP-1 protein and mRNA expressions were analyzed by performing Western blotting and Northern blot analyses, respectively. RT-PCR was performed to observe the MMP-2 mRNA expression. Gelatin zymography was performed for the measurement of MMP-2 activity. Invasion assays were performed to evaluate the invasiveness of VSMCs.

Results: Epicatechin inhibited the high glucose-induced TSP-1 expression and the MMP-2 activity in a dose-dependent manner. Also, epicatechin inhibited the high glucose-induced invasiveness of VSMCs across the matrix barrier in a dose-dependent fashion.

Conclusion: Collectively, epicatechin may prevent the high glucose-induced proliferation and invasion of VSMCs by inhibiting the TSP-1 expression and the MMP-2 activity. Therefore, epicatechin appears to play a protective role in the development of atherosclerosis. (J Kor Soc Endocrinol 21:302~310, 2006)

Key Words: Epicatechin, High glucose, Matrix metalloproteinase-2, Thrombospondin-1, Vascular smooth muscle cell

접수일자: 2005년 7월 29일

통과일자: 2005년 10월 21일

책임저자: 김명준, 가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

* 본 연구는 대한내분비학회(녹십자)와 한국과학재단 특정기초연구사업(R01-2004-000-10127-0) 지원으로 수행되었음.

서 론

제2형 당뇨병의 유병률 증가로 인하여 동맥경화증의 발생 빈도는 증가하고 있으며, 당뇨병 환자에서 혈당을 철저히 조절하더라도 미세혈관 합병증의 발생은 억제할 수 있지만 대혈관에서 발생하는 동맥경화증은 유의하게 억제할 수 없음이 보고되었다[1,2]. 당뇨병 환자에서 발생하는 고혈당은 산화스트레스를 증가시켜 혈관평활근세포의 과도한 증식과 혈관 내중막으로의 이주를 매개하여 동맥경화증의 발생과 진행을 유발한다[3]. 동맥경화증의 발생 단계에서 비정상적인 혈관 기저막의 분해와 재형성은 혈관평활근세포의 증식과 이주에 관여한다[4-6].

동맥경화증의 유발 인자로 최근 thrombospondin-1 (TSP-1)이 제시되고 있다. TSP-1은 thrombin을 처리한 혈소판에서 최초로 규명된 물질로서[7], 혈관평활근세포 및 사구체간질세포(renal mesangial cell)를 비롯한 다양한 세포에서 합성되어 세포 바깥으로 분비되며, 세포의 부착, 이주 및 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다[8,9]. 고농도 포도당에 노출된 혈관평활근세포에서 발현과 분비가 증가된 TSP-1은 세포외기질(extracellular matrix)의 생성을 증가시키고 세포의 부착과 이주에 관여하는 각종 인자와 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)를 활성화시켜 동맥경화증을 유발하는 것으로 알려져 있다[10-12]. 특히, TSP-1 단백질은 다른 세포외기질보다 MMP-2에 대한 친화력이 매우 높으며, 전사와 전사후조절(posttranscriptional mechanism)을 통하여 MMP-2를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[6,13].

MMP는 발달[14], 혈관염[15] 및 혈관 손상 후 기질의 재형성과 관련[16]에서 중요한 역할을 한다. MMP-2 (gelatinase A)는 혈관평활근세포에서 분비되는 대표적인 MMP로서 type IV collagen과 heparin sulfate proteoglycan으로 구성된 기저막을 파괴한다. MMP-2는 비활성형인 pro-MMP-2로 분비되어 세포막에 위치한 membrane type-1 MMP (MT1-MMP)에 의해 분해되어 활성을 가진 MMP-2로 전환된다[17]. MMP-2는 실험실 조건에서 혈관평활근세포의 이주와 증식을 매개하여 혈관의 재형성(vascular remodeling)을 담당하는 것으로 보고되고 있다[18].

Catechin 계열은 신체에서 다양한 생리적 및 약리적 효과를 나타낸다. 특히, catechin 계열의 항산화작용은 다른 항산화 물질인 vitamin C나 vitamin E보다 더 강력한 것으로 알려져 있다[19]. Catechin의 항산화작용으로 인하여 저밀도지단백(low density lipoprotein) 산화 억제와 같은 심혈관계 보호 효과는 알려져 있지만[20], catechin의 혈관평활근세포의 증식 및 이주에 관여하는 보고는 많지 않다. 최근 catechin이 혈관평활근세포에서 MMP-2 활성을 감소시켜 세포의 이주를 감소시킨다는 보고가 있으며[13], p53 단백질을 활성화시켜 증식 상태의 혈관평활근세포의 자연사

(apoptosis)를 유도한다는 보고가 있다[21]. 그러나 고농도 포도당이 유도한 TSP-1 발현에 대한 catechin의 효과는 아직 보고된 바가 없다.

따라서 혈관평활근세포에서 고농도 포도당이 유발한 TSP-1 발현과 MMP-2 활성을 catechin이 억제하는지를 단백질 및 분자적 수준에서 관찰함으로써 catechin의 보호 효과를 규명하는 제2형 당뇨병에서 나타나는 대혈관 합병증의 발생과 진행을 억제할 수 있는 치료적 기반을 제시하리라 생각된다. 그러므로 동맥경화증의 발생인자로 제시되는 혈관평활근세포에서의 TSP-1 발현과 MMP-2 활성도를 중심으로 catechin 계열에 속하는 epicatechin의 작용을 조사하고자 한다.

대상 및 방법

1. 시약

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)과 Hank's balanced salt solution (HBSS)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), 100 mm culture dish, 6-well plate와 12-well plate는 Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ, USA), cell lifter는 Corning (Corning, NY, USA), (-)-epicatechin (EC), Gelatin Type A, Elastase Type III와 alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody는 Sigma (St. Louis, MO, USA), Collagenase Type I은 Worthington Biochemical Co. (Lakewood, NJ, USA), BCA protein assay kit는 Perbio Science (Erembodegem, Belgium), Top-Pfu™ DNA polymerase는 Bio-online (Seoul, Korea), Western Blotting Luminol Reagent는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), RNA STAT-60은 TEL-TEST (Friendswood, TX, USA), anti-mouse thrombospondin-1 antibody는 NeoMarkers (Fremount, CA, USA), First Strand cDNA Synthesis Kit, alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin (DIG) antibody와 CDP-Star는 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)로부터 구입하였다. Epicatechin은 DMSO에 녹여 배지에 첨가하였고, DMSO의 최종 농도는 0.2%를 초과하지 않았다.

2. 대동맥에서 혈관평활근세포의 분리와 배양

대동맥 혈관평활근세포는 Sprague-Dawley (250~300 g) 계로부터 복강과 흉부의 대동맥을 절개하여 Hao 및 Yu[6]의 방법에 따라 collagenase와 elastase를 이용하여 분리하였다. 동물 실험은 가톨릭대학교의 윤리위원회와 미국의 The National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications no. 80-23,

reversed 1996)를 준수하였다. 마취 후 개복하여 복강과 가슴부위의 대동맥을 분리한 후 차가운 HBSS로 수세하여 혈액을 제거한 후, 용액 I [collagenase type I (315 U/mL), elastase type III (0.3 U/mL)]을 첨가하여 37°C 배양기에서 30분간 배양하였다. 해부 현미경하에서 대동맥의 외막을 제거하고 나머지 중간층은 HBSS로 수세하였다. 분리한 중간층을 1~2 mm 길이로 자르고 용액 II [collagenase type I (315 U/mL), elastase type III (0.9 U/mL)]를 첨가하여 37°C 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 10% FBS와 항생제 [penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL)]가 포함된 DMEM 배지로 수세 후 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온항습기에서 배양하였다. 모든 실험은 3~8회 계대 배양한 세포를 사용하였다. 6-well plate에 1×10⁵ cells/mL로 세포를 배양한 후 100% confluency에 도달하면 혈청이 없는 배지로 24시간 배양하였다. 이후 포도당(5.6, 11.1, 30 mM)과 epicatechin (30, 100, 300 µM)을 처리하였다.

3. TSP-1 단백질 발현 조사를 위한 Western blot

TSP-1 단백질 발현을 관찰하기 위하여 Ryu 등[22]의 방법에 준하여 Western blot을 시행하였다. 혈관평활근세포에 포도당(30 mM) 및 epicatechin (30, 100, 300 µM)을 48시간 처리한 후, LIPA 용액(25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 µg/mL aprotinin, 5 µg/mL leupeptin)으로 세포를 용해시켰다. 단백질(30 µg)을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 통하여 크기 별로 분리하였다. 이후 단백질을 nitrocellulose 막(NC 막)으로 이동시킨 후, 항체와 단백질 간의 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 5% 탈지분유가 포함된 TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 125 mM, 0.1% Tween 20) 용액에서 1시간 반응시켰다. 이후 3% 탈지분유가 포함된 TTBS에 TSP-1 항체(0.5 µg/mL)를 첨가하여 4°C에서 16시간 반응시켰다. 이후 peroxidase가 표지된 이차 항체(0.5 µg/mL)를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TTBS로 수세 후 luminol 용액으로 X-ray 필름에 감광시켜 immunoreactive band를 확인하였다. 또한 각 실험군에서 동량의 단백질로 Western blot을 시행한 것을 확인하기 위하여 NC 막을 Ponceau S 염색 또는 β-tubulin (52 kDa) 항체로 blotting하였다.

4. TSP-1 mRNA 발현 조사를 위한 Northern blot analysis

평활근세포에서 TSP-1 mRNA의 발현을 관찰하기 위하여 Kim 등[23]의 방법에 준하여 Northern blot을 시행하였다. 혈관평활근세포에 포도당(30 mM) 및 epicatechin (30,

100, 300 µM)을 24시간 처리 후 STAT-60 용액을 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA (10 µg)를 2% formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에서 전기영동을 시행하였다. 이후 Turbo Blotter를 이용하여 nylon 막에 RNA를 이동시킨 후 UV crosslinker (Stratlinker UV Crosslinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA)로 RNA를 막에 고착시켰다. 막을 탐침자가 없는 prehybridization 용액(7% SDS, 50% formamide, 5×SSC, 2% blocking solution, 50 mM NaH₂PO₄•2H₂O, pH 7.0, 50 mM Na₂HPO₄•12H₂O, pH 7.0, 0.1% N-lauroylsarcosine)으로 55°C에서 1시간 반응시켜 비특이적 결합을 차단한 후, digoxigenin-11-dUTP (DIG, Roche Applied Science, Mannheim)가 표지된 TSP-1 탐침자를 첨가하여 55°C에서 16시간 hybridization을 수행하였다. Nylon 막을 0.1% SDS가 포함된 2×SSC로 상온에서 15분, 이어서 0.1% SDS가 포함된 0.2×SSC로 55°C에서 15분 수세하였다. 이후 alkaline phosphatase가 표지된 DIG 항체를 처리하여 검출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl)에서 CDP-Star 용액(검출 완충액에 1:100으로 희석)을 이용하여 X-ray 필름에 감광시켰다. 동량의 RNA로 Northern blot을 시행했는지를 18S와 28S의 ribosomal band로 확인하였다. DIG가 표지된 TSP-1 탐침자(1,285 bp, accession number: NM_003246)는 Dr. W. A. Frazier (Washington University, School of Medicine)가 제공한 human TSP-1 plasmid cDNA (pBlueScript-TSP-1)을 주형으로 두 개의 시발체(forward, 5'-CAATGGCAAGGCGGGCACCTGG-3'; reverse, 5'-GCAAAGCAGGGATTGGACAGGCATCC-3')를 이용하여 합성하였다.

5. MMP-2 mRNA 발현을 위한 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

혈관평활근세포에서 MMP-2 발현을 관찰하기 위하여 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 혈관평활근세포에 30 mM 포도당과 epicatechin (30, 100, 300 µM)을 24시간 처리한 후 RNA를 추출하였다. RNA 1 µg을 주형으로 First Strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 단일가닥 cDNA를 합성하였다. 시발체는 흰쥐의 MMP-2 유전자(GenBank accession number: U65656, 851 bp)를 바탕으로 제작하였다(forward, 5'-AAGGACGGACTCCTGGCACATGCCTT-3'; reverse, 5'-CCAGTACCAGTGTCACTATCAGC-3'). 대조군으로 GAPDH (451 bp)를 합성하였다(forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; reverse, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'). 역전사 반응 후, 반응액의 1/10을 thermal cycler (GeneAmp PCR cycler 9700, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 증폭하였다. 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 크기에 따라 분리하고 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 band의 염

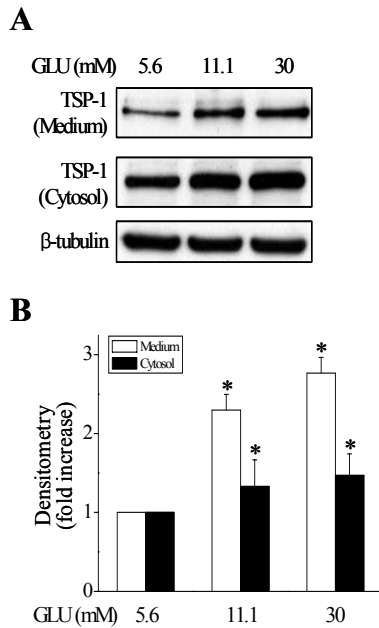


Fig. 1. The effects of high glucose on the expression of thrombospondin-1 (TSP-1) protein in rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs). VSMCs were incubated with glucose (GLU, 5.6, 11.1, and 30 mM) for 48 h. (A) Total proteins (30 µg) of cellular lysate (cytosol) and medium were separated and analyzed on a 8% SDS-PAGE, and Western blot analysis was performed as described in Methods. Equal loading of cellular lysate was verified by probing the same blot for β-tubulin. (B) TSP-1 levels of cytosol and medium were determined by scanning densitometry of immunoblots. TSP-1 levels of cytosol and media under 5.6 mM glucose were set to 1. Data are expressed as mean ± SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ vs. 5.6 mM GLU.

색 정도를 관찰하였다.

6. MMP-2 활성 측정을 위한 Gelatin zymography

혈관평활근세포에서 MMP-2 활성을 관찰하기 위하여 Lee 등[18]의 방법에 따라 gelatin zymography를 시행하였다. 30 mM 포도당과 epicatechin (30, 100, 300 µM)를 48 시간 처리 후 배양액을 1 g/L gelatin이 포함된 8% polyacrylamide gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 2.5% Triton X-100 용액에서 15분간 수세하고 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM CaCl₂를 지닌 완충액으로 37°C에서 24시간 반응시켰다. 이후 Coomassie blue R-250으로 염색하고 MMP-2 활성화에 의하여 분해된 gelatin band를 관찰하였다. 전기영동을 시행한 시료의 양은 전체 단백질의 양으로 보정 후 사용하였다.

7. 혈관평활근세포의 이주 조사를 위한 fibroblast conditioned medium (FCM)의 준비

FCM은 NIH 3T3 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를 혈청이 없는 DMEM 배지에서 배양하여 얻었다. NIH 3T3 세포가 70~80% confluency에 도달하면, ascorbic acid (50 mg/mL)가 포함된 혈청이 없는 DMEM 배지로 교체하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 10,000 g에서 10 분간 원심분리하여 배양액 내의 잔유물을 제거하고 사용하기 전까지 -80°C에 저장하였다.

8. 혈관평활근세포의 이주 조사를 위한 invasion assay

혈관평활근세포의 Matrigel 침습능을 알기 위하여 Albini 등[24]의 방법에 따라 8 µm의 구경을 지닌 polyvinylpyrrolidone-free polycarbon filter가 장착된 Transwell cell culture chamber (Costar, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 invasion assay를 시행하였다. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbon filter 위에 40 µL의 Matrigel (0.5 µg/mL)을 coating한 후 상온에서 1시간 건조시켰다. 이후 100 µL의 DMEM 정상 배지를 Matrigel 위에 첨가하여 30분간 상온에서 방치하여 Matrigel을 완충시켰다. 완충시킨 100 µL의 DMEM 정상 배지를 제거한 후 포도당(5.6 mM, 30 mM)과 epicatechin (30, 100, 300 µM)이 포함된 100 µL DMEM 배지를 첨가하고 여기에 혈관평활근세포를 2×10^5 cells/mL로 plating하였다. 또한 Matrigel 하층부에는 700 µL의 FCM을 첨가하였다. 37°C 항온상습기(5% CO₂/95% O₂)에서 24시간 배양 후 filter 위쪽에 있는 Matrigel과 이주하지 않은 혈관평활근세포를 면봉으로 제거하고, 이주하여 filter 아래에 위치한 혈관평활근세포를 2% paraformaldehyde 용액으로 세포를 고정하였다. 이후 hematoxylin 용액으로 염색하여 광학현미경하에서 200 배율로 관찰하였다. 침습 정도는 임의로 지정된 다섯 곳에서 관찰된 세포 수를 평균하여 나타냈다.

9. 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 실험군들 사이의 비교는 Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 사후 검정은 Bonferroni multiple range t-test를 이용하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 정하였다.

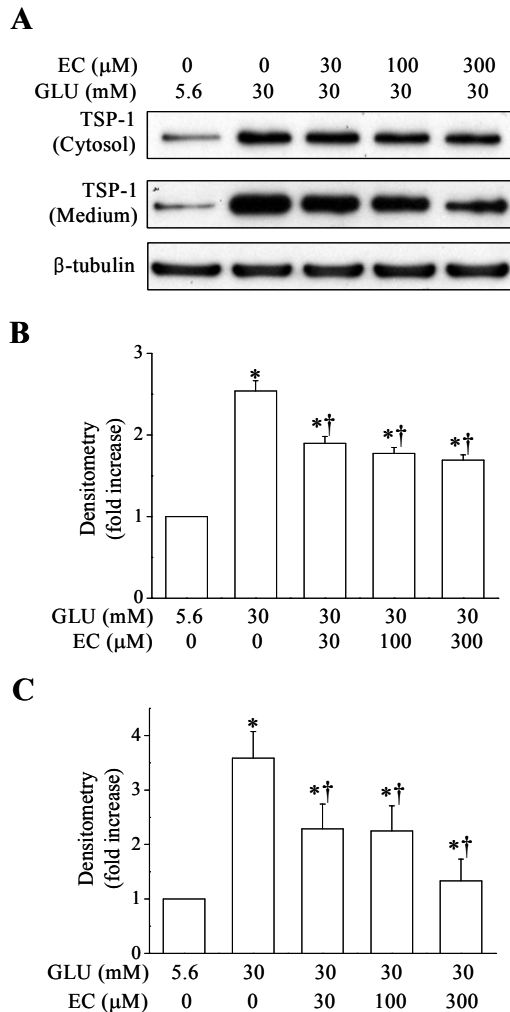


Fig. 2. The effects of epicatechin (EC) on high glucose-induced thrombospondin-1 (TSP-1) protein in rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs). VSMCs were incubated with glucose (GLU, 5.6 and 30 mM) and EC (30, 100, and 300 μM) for 48 h. (A) Total proteins (30 μg) of cellular lysate (cytosol) and medium were separated and analyzed on a 8% SDS-PAGE, and Western blot analysis was performed as described in Methods. Equal loading of cellular lysate was verified by probing the same blot for β-tubulin. (B) and (C) TSP-1 levels in cytosol (B) and medium (C) were determined by scanning densitometry of immunoblots. TSP-1 levels of cytosol and medium under 5.6 mM glucose without EC were set to 1. Data are expressed as mean ± SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ vs. 5.6 mM GLU without EC.

† $P < 0.05$ for 30 mM GLU with EC vs. 30 mM GLU.

결 과

1. 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 발현에 미치는 epicatechin의 작용

혈관평활근세포에서 포도당이 유도한 TSP-1 단백질은

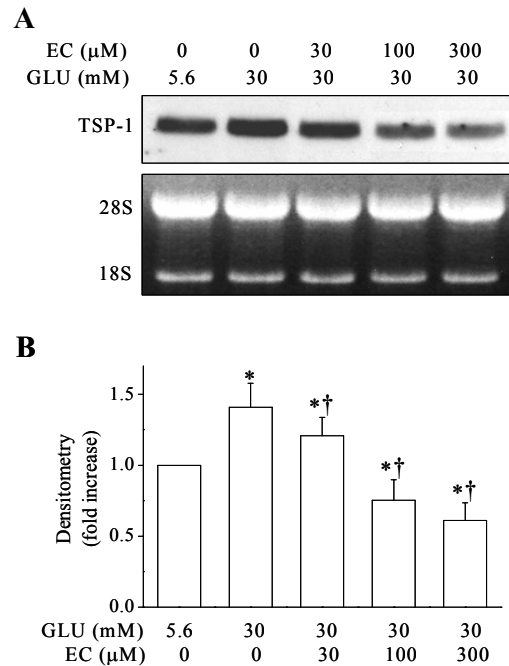


Fig. 3. The effects of epicatechin (EC) on high glucose-induced thrombospondin-1 (TSP-1) mRNA expression in rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs). (A) VSMCs were incubated with glucose (GLU, 5.6 and 30 mM) or EC (30, 100, and 300 μM) for 24 h. The levels of TSP-1 mRNAs were measured by Northern blot analysis. Equal loading of sample (10 μg) was verified by the ribosomal 18S and 28S bands. (B) The levels of TSP-1 mRNAs expressed under 5.6 mM glucose without EC were set to 1. Data are expressed as mean ± SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ vs. 5.6 mM GLU without EC.

† $P < 0.05$ for 30 mM GLU with EC vs. 30 mM GLU.

농도의존적으로 증가하였으며, 혈관평활근세포에서 배지로 분리된 TSP-1 단백질도 포도당의 농도에 따라 증가하였다 (Fig. 1). 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 단백질 발현에 대한 epicatechin의 작용을 보기 위하여, epicatechin (30, 100, 300 μM)과 30 mM 포도당을 혈관평활근세포에 처리하여 TSP-1 단백질 발현을 관찰하였다. 30 mM 포도당이 유도한 TSP-1 단백질 발현을 epicatechin이 농도의존적으로 감소시켰다 (Fig. 2A, 2B). 또한 혈관평활근세포외로 분리된 TSP-1도 epicatechin의 농도에 따라 감소하였다 (Fig. 2A, 2C). 혈관평활근세포에서 epicatechin에 의한 TSP-1 단백질 발현의 감소가 TSP-1 전사에 기인하는지를 간접적으로 확인하기 위하여 TSP-1 mRNA 발현을 조사하였다. 고농도의 포도당은 TSP-1 단백질 발현과 유사한 양상으로 TSP-1 mRNA 발현을 증가시켰으며, epicatechin은 TSP-1 mRNA 발현을 감소시켰다 (Fig. 3). 비록 TSP-1 promoter 활성을 조사하지 않았지만, 이러한 결과는 epicatechin이

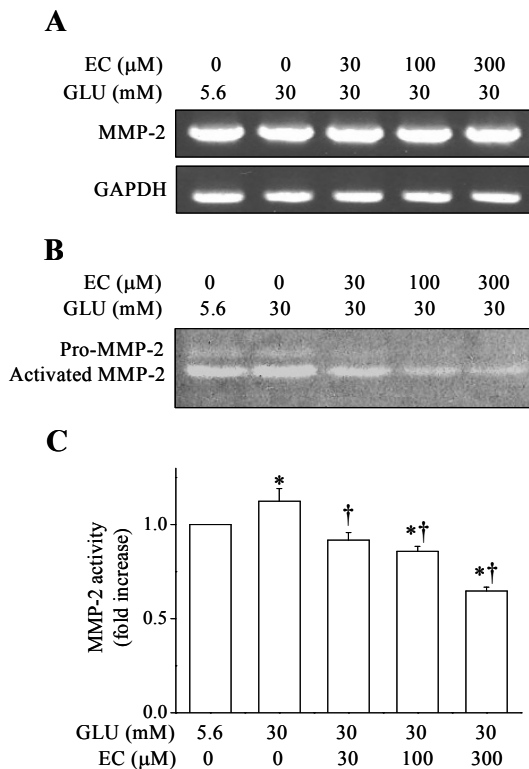


Fig. 4. The effects of epicatechin (EC) on the expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs). (A) VSMCs were incubated with glucose (GLU, 5.6 and 30 mM) with EC (30, 100, and 300 μM) for 24 h. The expressions of MMP-2 and GAPDH (as an internal control) mRNAs were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR products were resolved on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. (B) The activity of MMP-2 was measured by gelatin zymography. Medium (25 μg) were separated and analyzed on an 8% polyacrylamide gel including gelatin (1 g/L) as described in Methods. (C) By scanning densitometry, level of MMP-2 activity under 5.6 mM GLU without EC was set to 1. Data are expressed as mean ± SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ vs. 5.6 mM GLU without EC.

† $P < 0.05$ for 30 mM GLU with EC vs. 30 mM GLU.

아마도 전사 단계에서 TSP-1 발현을 억제하리라 생각된다.

2. 고농도의 포도당이 유도한 MMP-2 활성화에 미치는 epicatechin의 효과

고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 발현이 MMP-2 발현과 활성을 유도하는 지를 간접적으로 확인하기 위하여 혈관평활근세포에 고농도의 포도당을 처리한 후 MMP-2 발현과

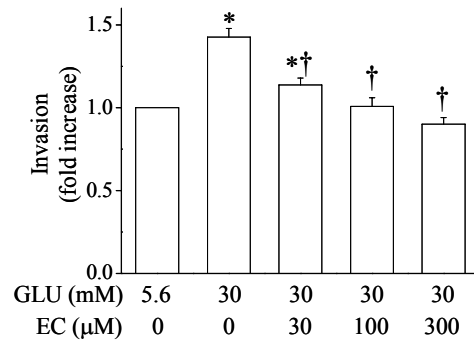


Fig. 5. The effects of epicatechin (EC) on the invasiveness of rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) using Matrigel-coated filters of Boyden chamber. VSMCs (2×10^5 cells/mL) were placed into the upper chamber of a Boyden chamber and were incubated with glucose (GLU, 5.6 and 30 mM) and EC (30, 100, and 300 μM) for 24 h. VSMCs migrated through Matrigel-coated filters to the lower surface were fixed with 2% paraformaldehyde and were stained with hematoxylin, and were counted for 5 high-power fields per well. The migrated VSMCs under 5.6 mM GLU without EC were set to 1. Data are expressed as mean ± SD from three independent experiments.

* $P < 0.05$ vs. 5.6 mM GLU without EC.

† $P < 0.05$ for 30 mM GLU with EC vs. 30 mM GLU.

활성을 역전사 중합효소연쇄반응과 gelatin zymography로 각각 관찰하였으며, 이에 대한 epicatechin의 효과도 조사하였다. 고농도의 포도당 처리는 MMP-2 mRNA 발현에 변화를 주지 않았으며, epicatechin을 함께 처리하였을 때 MMP-2 mRNA 발현에 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). MMP-2 mRNA 발현과는 달리 고농도의 포도당은 MMP-2 활성을 증가시켰으며, epicatechin은 농도의존적으로 MMP-2 활성을 유의하게 억제하였다(Fig. 4B, 4C).

3. 고농도의 포도당이 유도한 혈관평활근세포의 이주에 미치는 epicatechin의 효과

고농도의 포도당이 혈관평활근세포의 이주에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Matrigel을 이용하여 invasion assay를 시행하였다(Fig. 5). 고농도의 포도당에 의하여 혈관평활근세포의 약 40%가 이주하였으며, epicatechin은 농도의존적으로 포도당이 유도한 혈관평활근세포의 이주를 감소시켰다. 이 결과는 고농도의 포도당에 의하여 분비가 증가된 TSP-1이 MMP-2 활성을 증가시켜 Matrigel 분해를 유발하여 혈관평활근세포의 이주를 촉진한 것으로 생각된다. 따라서 epicatechin의 이주 억제 효과는 TSP-1 발현 억제와 관련이 있을 것으로 생각된다.

고 찰

Epicatechin과 같은 catechin 계열은 항염증, 항혈전, 항산화, 그리고 항암 효과를 나타내며[25], 이러한 catechin 계열 약물로는 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, 그리고 (-)-epicatechin 등이 있다[26]. 특히 EGCG의 항암, 항산화, 항혈관신생, 그리고 항바이러스에 대한 연구는 많이 수행되었지만, 구조가 유사한 epicatechin에 대한 연구는 부족하다. 따라서 본 연구진은 당뇨병으로 인한 고혈당이 동맥경화증을 유발하는 기전을 TSP-1 발현과 연관시켜 epicatechin의 TSP-1 발현 억제 효과를 관찰하였다. TSP-1은 혈관손상 후 혈관의 재형성, 혈관평활근세포의 혈관 내중막으로의 증식 및 이주 등을 매개한다[4,24]. 최근 혈관평활근세포나 사구체간질세포에서 고농도의 포도당이 TSP-1 발현을 전사단계에서 증가시킨다는 현상이 보고되었다[11,12]. 따라서 TSP-1은 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자에서 동맥경화증의 발생 및 진행에 관여하리라 생각된다. Western blot과 Northern blot을 통하여 혈관평활근세포에서 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 단백질과 mRNA 발현을 증가시킴을 관찰하였다. 이 결과는 제2형 당뇨병 모델 쥐인 Zucker diabetic rat의 혈관세포에서 TSP-1 발현이 증가하는 현상과 일치한다[12]. 한편 Western blot과 Northern blot을 통하여 epicatechin이 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 발현을 농도의존적으로 억제함을 관찰하였다. 이 결과는 epicatechin이 고농도의 포도당에 의해 유도된 동맥경화증의 한 과정인 혈관평활근세포의 내중막으로의 증식 및 이주를 억제할 수 있다는 가능성을 제시한다.

TSP-1은 혈관평활근세포에서 MMP-2 활성을 증가시키며 활성화된 MMP-2는 세포외기질의 재형성에 관여한다. 또한 MMP-2는 손상된 혈관부위에서 활성화되며 동맥경화증의 원인이 되는 혈관평활근세포의 이주에 결정적 역할을 한다[27]. 본 연구진은 고농도의 포도당을 혈관평활근세포에 처리하여 MMP-2 활성을 gelatin zymography로 확인하였다. MMP-2 활성은 고농도의 포도당을 처리한 혈관평활근세포에서 증가하였고, 이는 TSP-1 발현 증가와 일치하였으며 epicatechin은 농도의존적으로 MMP-2 활성을 억제하였다. 한편 고농도의 포도당에 의한 MMP-2 활성의 증가가 MMP-2 발현 증가에 의한 것인지를 확인하고자 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 MMP-2 mRNA 발현을 관찰하였다. 흥미롭게도 고농도의 포도당은 MMP-2 mRNA 발현을 유도하지 않았으며 epicatechin도 MMP-2 mRNA 발현에는 영향을 주지 않았다. 따라서 MMP-2 활성의 증가는 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1이 MMP-2에 결합하여 활성을 증가시킨 것으로 생각되며[28], epicatechin의 MMP-2 활성 억제 효과는 아마도 epicatechin의 TSP-1 발현 억제 작용

에 기인한다고 생각된다.

본 연구진은 동맥경화증 발생의 결정적 단계인 혈관평활근세포의 혈관 내중막으로의 이주와 관련하여 Matrigel을 이용하여 invasion assay를 시행하였다. 고농도의 포도당이 유발한 혈관평활근세포의 이주는 epicatechin의 농도에 따라 억제되는 것을 관찰하였다. MMP-2 활성이 혈관평활근세포의 이주를 매개한다는 사실[28]에 근거하여 epicatechin의 MMP-2 활성 억제가 혈관평활근세포의 이주를 차단한 것으로 생각된다.

결론적으로 catechin 계열의 epicatechin이 고농도의 포도당에 노출된 혈관평활근세포에서 발현과 분비가 증가된 TSP-1을 감소시킴으로써 TSP-1이 매개하는 MMP-2 활성을 억제하여 부분적으로 혈관평활근세포의 이주를 차단한다고 생각된다. 이는 epicatechin이 동맥경화증 발생에 중요한 병리 현상인 혈관평활근세포의 혈관 내중막으로의 이주를 감소시킴으로써 동맥경화증 발생을 억제할 수 있는 가능성을 제시한다.

요 약

연구배경: 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자에서 혈장내의 고혈당은 동맥경화증과 같은 혈관계 합병증을 유발한다. 특히, 고혈당은 혈관평활근세포에서 thrombospondin-1 (TSP-1)의 분비를 촉진하며, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)를 활성화시켜 혈관평활근세포의 이주를 촉진한다. 한편 항산화 및 항암효과가 보고된 catechin 계열이 MMP-2 활성을 억제한다는 연구 결과가 최근 보고되었다. 따라서 본 연구는 catechin 계열에 속하는 epicatechin이 고농도의 포도당에 노출된 혈관평활근세포에서 TSP-1 발현과 이주에 미치는 영향을 조사하였다.

방법: 혈관평활근세포는 Sprague-Dawley계 흰쥐 대동맥에서 분리하였다. 혈관평활근세포를 고농도의 포도당(30 mM)과 epicatechin (30, 100, 300 μ M)에 노출시킨 후 TSP-1 단백질과 mRNA 발현을 Western blot과 Northern blot으로 관찰하였다. 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 MMP-2 mRNA 발현을 관찰하였으며, MMP-2 활성과 혈관평활근세포의 이주능을 gelatin zymography와 Matrigel을 이용한 invasion assay로 각각 조사하였다.

결과: Epicatechin은 혈관평활근세포에서 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 발현과 MMP-2 활성을 농도의존적으로 감소시켰다. 또한 epicatechin은 고농도의 포도당에 의해 유도된 혈관평활근세포의 이주를 유의하게 감소시켰다.

결론: 이상으로 epicatechin은 고농도의 포도당이 유도한 TSP-1 발현과 MMP-2 활성을 억제하여 혈관평활근세포의 증식 및 이주를 차단하는 것으로 생각된다. 그러므로 epicatechin은 동맥경화증의 발생과 진행을 억제하는 역할을

하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853, 1998
2. Ruderman N, Haudenschild C: Diabetes as an atherogenic factor. *Prog Cardiovasc Dis* 329:977-986, 1984
3. 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* 294:221-229, 1995
4. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, Crow MT: Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res* 75:41-54, 1994
5. Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen-Pope DF, Seifert RA, Coats S, Hawkins SM, Clowes AW: Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 85:1179-1185, 1999
6. Hao F, Yu JD: High glucose enhance expression of matrix metalloproteinase-2 in smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 24:534-538, 2003
7. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW: A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:240-243, 1971
8. Lawler J: The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* 67:1197-1209, 1986
9. Clezardin P, Lawler J, Amiral J, Quentin G, Delmas P: Identification of cell adhesive sites in the N-terminal domain of thrombospondin-1. *Biochem J* 321:819-827, 1997
10. Poczatek MH, Hugo C, Darley-Usmar V, Murphy-Ullrich JE: Glucose stimulation of transforming growth factor-beta bioactivity in mesangial cells is mediated by thrombospondin-1. *Am J Pathol* 157:1353-1363, 2000
11. Wang S, Skorczewski J, Feng X, Mei L, Murphy-Ullrich JE: Glucose up-regulates thrombospondin 1 gene transcription and transforming growth factor-beta activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression via upstream stimulatory factor 2. *J Biol Chem* 279:34311-34322, 2004
12. Stenina OI, Krukovets I, Wang K, Zhou Z, Forudi F, Penn MS, Topol EJ, Plow EF: Increased expression of thrombospondin-1 in vessel wall of diabetic Zucker rat. *Circulation* 107:3209-3215, 2003
13. Hofmann CS, Sonenshein GE: Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate induces apoptosis of proliferating vascular smooth muscle cells via activation of p53. *FASEB J* 17:702-704, 2003
14. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P: Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 75:181-189, 1994
15. Esparza J, Vilardell C, Calvo J, Juan M, Vives J, Urbano-Marquez A, Yague J, Cid MC: Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. *Blood* 94:2754-2766, 1999
16. Zempo N, Kenagy RD, Au YP, Bendeck M, Clowes MM, Reidy MA, Clowes AW: Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Surg* 20:209-217, 1994
17. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994
18. Lee T, Esemuede N, Sumpio BE, Gahtan V: Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 38:147-154, 2003
19. da Silva EL, Abdalla DS, Terao J: Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. *IUBMB Life* 49:289-295, 2000
20. Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D: Catechin intake might explain the

- inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 74:227-232, 2001
21. Maeda K, Kuzuya M, Cheng XW, Asai T, Kanda S, Tamaya-Mori N, Sasaki T, Shibata T, Iguchi A: Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* 166:23-30, 2003
 22. Ryu GR, Kang JH, Jang HI, Ko SH, Jeong IK, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Jo YH, Kim MS, Kim MJ: The role of cAMP/PKA activation on exendin-4-induced cyclin D1 expression in INS-1 cell. *J Kor Diabetes Assoc* 29:295-303, 2005
 23. Kim MJ, Ryu GR, Kang JH, Sim SS, Min do S, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Jeong IK, Hong KJ, Kim MS, Jo YH: Inhibitory effects of epicatechin on interleukin-1 β -induced inducible nitric oxide synthase expression in RINm5F cells and rat pancreatic islets by down-regulation of NF- κ B activation. *Biochem Pharmacol* 68:1775-1785, 2004
 24. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47:3239-3245, 1987
 25. Craig WJ: Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 70(suppl 3):S491-S499, 1999
 26. Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W: ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta* 1427:13-23, 1999
 27. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM: Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 160:1089-1095, 2002
 28. Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M: The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J* 14: 1674-1676, 2000