

고농도 포도당조건에서 활성산소족에 의한 혈관평활근세포의 이동

부산대학교 의과대학 내과학교실

안용성 · 권지혜 · 강양호 · 김인주 · 김용기 · 손석만

Migration of Vascular Smooth Muscle Cells by High Glucose is Reactive Oxygen Dependent

Yong Seong An, Ji Hae Kwon, Yang Ho Kang, In Ju Kim, Yong Ki Kim, Seok Man Son

Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine

Abstract

Background: Oxidative stress contributes to vascular diseases in patients with diabetes. As the mechanism of development and progression of diabetic vascular complications is poorly understood, this study was aimed to assess the potential role of hyperglycemia-induced oxidative stress and to determine whether the oxidative stress is a major factor in hyperglycemia-induced migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Methods: We treated primary cultured rat aortic smooth muscle cells for 72 hours with medium containing 5.5 mM D-glucose (normal glucose), 30 mM D-glucose (high glucose) or 5.5 mM D-glucose plus 24.5 mM mannitol (osmotic control). We measured the migration of VSMCs and superoxide production. Immunoblotting of PKC isozymes using phosphospecific antibodies was performed, and PKC activity was also measured.

Results: Migration of VSMCs incubated under high glucose condition were markedly increased compared to normal glucose condition. Treatment with diphenyleneiodonium (DPI, 10 µmol/L) and superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL) significantly suppressed high glucose-induced migration of VSMCs. Superoxide production was significantly increased in high glucose condition and was markedly decreased after treatment with DPI and SOD. High glucose also markedly increased activity of PKC-δ isozyme. When VSMCs were treated with rottlerin or transfected with PKC-δ siRNA, nitro blue tetrazolium (NBT) staining and NAD(P)H oxidase activity were significantly attenuated in the high glucose-treated VSMCs. Furthermore, inhibition of PKC-δ markedly decreased VSMC migration by high glucose.

Conclusion: These results suggest that high glucose-induced VSMC migration is dependent upon activation of PKC-δ, which may responsible for elevated intracellular ROS production in VSMCs, and this is mediated by NAD(P)H oxidase. (KOREAN DIABETES J 32:185-195, 2008)

Key Words: Diabetes, Migration, Oxidative stress, Protein kinase C, Vascular smooth muscle

서 론

당뇨병환자에서 대혈관합병증의 발생빈도는 정상인에 비해 2~4배 이상 높을 뿐만 아니라, 당뇨병에 의한 사망원인

의 가장 많은 부분을 차지한다¹⁾. 최근 많은 연구에서 당뇨병성 대혈관합병증의 발생이 일차적으로 죽상경화증에서 기인되며, 이와 관련된 위험인자로 고혈당 이외에 나이, 고혈압, 가족력, 지질대사 이상과 흡연 등이 알려져 있다²⁾. 혈관

* 접수일자: 2008년 1월 31일, 통과일자: 2008년 5월 13일, 책임저자: 손석만, 부산대학교 의과대학 내과학교실

* 본 연구는 2007년도 부산대학교 자유과제 학술연구비에 의해 이루어짐.

평활근세포의 이동은 이러한 혈관질환의 발생, 특히 혈관성형술 후의 재협착이나 죽상동맥경화의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며²⁾, 고농도 포도당 조건에서 혈관평활근세포의 증식과 이동이 증가한다는 여러 연구결과들이 있다³⁻⁵⁾. 이러한 당뇨병성 혈관합병증의 발생에 산화스트레스가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{6,7)}. 고혈당은 여러 생화학적 신호전달 경로를 통해 활성산소족의 생성을 야기시키고, 이로 인해 여러 조직에서 산화스트레스가 증가된다는 보고들이 많다⁶⁻⁹⁾. 생체 내에서 적절한 항산화방어기전이 없게 되면 증가된 산화스트레스에 의해 산화스트레스 민감성 세포 내 신호 전달계가 활성화되고, 세포손상을 일으키는 유전자 산물들을 생성하게 되어 당뇨병성 혈관합병증이 발생된다^{6,8)}. 혈관평활근세포의 증식과 이동은 동맥경화 진행의 병인에 중요한 역할을 하나 당뇨병환자에서 고혈당에 의하여 혈관평활근세포의 증식과 이동이 일어나는 정확한 기전은 잘 밝혀져 있지 않지만 활성 산소족이 당뇨병환자의 죽상경화증, 재협착과 같은 증식성 혈관질환의 발생과 진행에 깊이 관여되어 있으며 혈관평활근세포의 증식을 매개한다고 알려져 있다⁹⁻¹¹⁾. 최근의 보고들에 의하면 고혈당은 산화 스트레스를 증가시켜 혈관합병증을 일으키는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{3,4)}. 또한, superoxide 음이온 ($\cdot\text{O}_2$)과 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 같은 활성 산소족에 의해 혈관평활근세포의 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⁾. 고농도 포도당이 혈관평활근의 이동을 증가시키는 데에는 활성 산소족이 관여한다는 여러 연구결과가 있다^{12,13)}. 저자들은 고농도의 포도당에 의해 혈관평활근세포의 증식이 의미 있게 증가하였고, 이는 PKC의 활성도 증가와 연관이 있다고 보고한 바 있다¹⁴⁾. 따라서 본 연구에서 저자들은 혈관평활근세포의 이동에 활성 산소족이 관여하는 지와 어떤 PKC isozymes 중 protein kinase C delta (PKC- δ)가 고농도 포도당에 의해 유도된 혈관평활근세포의 이동에서 중요한 중간 신호 단계에서의 역할을 확인하고자 하였다.

실험 방법

1. 약물

본 연구에 사용된 약물은 다음과 같다: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), D-glucose, nitroblue tetrazolium,

diphenyleniodonium, dihydroethidium, superoxide dismutase, allopurinol, rotenone, indomethacin, L-NAME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); fetal calf serum, penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY); rottlerin (Calbiochem, San Diego, CA); antibodies against PKC- δ , actin and PKC- δ siRNA kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

2. 대동맥 혈관평활근세포 분리와 배양

Sprague-Dawley 쥐(200~250 g) 수컷을 이산화탄소 chamber에 넣어 희생시킨 다음 대동맥을 적출하여 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 항하도록 놓고 중앙에 작은 구슬을 놓아 조직을 지지시켰다. 여기에 10% 우태혈청 (fetal calf serum, FCS), 페니실린 (100 U/mL)과 스트렙토마이신 (100 µg/mL)이 들어있는 DMEM을 첨가하여 5% 이산화탄소와 95% 공기가 공급되는 37°C 세포 배양기에서 7일간 배양하였다. 이후 현미경으로 혈관평활근세포가 자라는 것을 확인한 후 겹자 (forceps)로 대동맥조직을 들어내고 세포들의 융합이 이루어지면 계대배양 (subculture)을 하였다. 제5~8회 계대 배양한 혈관평활근세포를 실험에 이용하였고 혈관평활근세포의 확인은 미오신 (myosin) 면역염색으로 하였다.

혈관평활근세포를 60-mm 배양접시에 10% 우태혈청과 5.5 mmol/L D-glucose가 함유된 DMEM 배지로 배양한 후 70%의 세포 합류 (confluent)가 되면 0.1% 우태혈청과 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 mannitol 이 각각 포함된 DMEM 배지로 바꾸어 72시간 동안 처리하였다. 일부 실험에서는 protein kinase C delta 억제제인 rottlerin (3 µmol/L)를 1시간 동안 전처리한 후 30 mmol/L D-glucose 가 포함된 배지로 72시간 배양하였다.

3. 혈관평활근세포의 이동 측정

세포이동의 측정은 transwell chamber법을 사용하였다. 혈관평활근세포를 0.1%의 우태혈청을 함유한 배지에서 24시간동안 휴면상태로 만들고 트립신처리, 수량 측정을 한 후 콜라겐 처리가 된 transwell migration chamber (Corning Life Science, Acton, MA)의 insert 내부에 1×10^5 cells/100 µL의 세포 부유액을 첨가하였다. Chamber의 외부용기

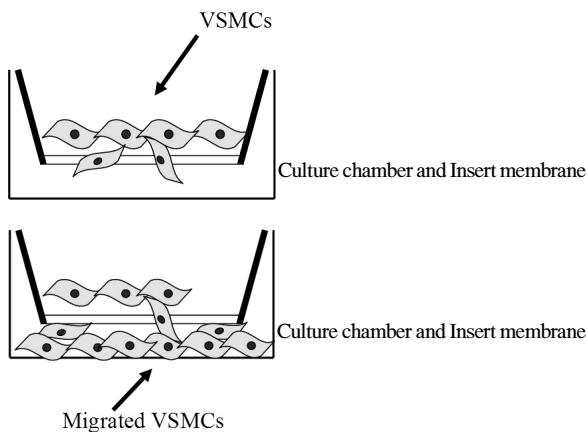


Fig. 1. Schematic figure of VSMC migration assay.

에는 무혈청 DMEM 배지를 첨가하였으며 배양기에서 37°C로 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 insert의 내면을 면봉으로 닦아 이동하지 않은 혈관평활근세포를 제거하였으며 아래쪽으로 이동한 세포는 5% 포름알데히드로 고정시켰다. 고정된 혈관평활근세포를 4',6-diamidino- 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)로 염색하고 Zeiss 형광현미경을 이용하여 관찰하였으며 well 당 4개의 현미경 시야에 관찰된 세포 수를 정량화 하였다 (Fig. 1).

4. 세포 내 Superoxide 음이온 생성 측정

세포 내에서 생성되는 superoxide 음이온을 측정하기 위해 superoxide 음이온에 의해 ethidium이 되면 형광을 내는 물질로 전환되는 dihydroethidium (DHE)를 이용하였다. 혈관평활근세포에 10 μmol/L DHE를 가하고 차광장소에서 37°C로 30분간 배양한 후 Zeiss 형광현미경을 이용하여 관찰하였다 (Ex: 488 nm, Em: 574 to 595 nm).

5. Superoxide 음이온 생성의 측정(NBT assay)

혈관평활근세포에서 superoxide 음이온의 생성량은 혈관평활근세포를 nitro blue tetrazolium (NBT)과 같이 배양하여 654 nm에서 blue formazan의 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. Formazan에 대한 NBT 환원(reduction)의 양은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

NBT 환원

$$= A \times V / (T \times Wt \times E \times L)$$

(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), 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD, 500 U/mL), xanthine oxidase 억제제인 allopurinol (100 μmol/L), N-acetylcysteine (NAC, 10 μmol/L), 미토콘드리아 전자전달계의 억제제인 rotenone (100 μmol/L), NOS억제제인 NG-monomethyl-L-arginine (NMA), L-arginine-methyl ester (L-NAME), indomethacin 등에 의한 superoxide 음이온 생성량의 변화를 측정하였다. 일부 실험은 NADPH (100 μmol/L)을 첨가하여 배양한 후 superoxide 음이온 생성량을 측정하였다.

6. PKC 활성화 측정

PKC 활성도는 PKC 측정 kit (Upstate Biotech, Charlottesville, VA)을 사용하여 측정하였다. 혈관평활근세포를 5.5 mmol/L 과 30 mmol/L D-glucose가 포함된 배지로 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후 배지를 제거하고 여기에 완충염 용액 (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 부분표본 (aliquot)을 2 cm 인셀룰로스 필터 (phosphocellulose filter, Whatman P81)에 옮긴 다음 0.75% 인산 (phosphoric acid)으로 세번 세척하였다. 필터에 결합된 펩티드 기질의 인산화 정도를 설팽계수기를 사용하여 측정하고 PKC 활성도를 계산하였다.

7. 단백 추출 및 Western Blot 분석

각 군의 혈관평활근세포를 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 얼음 위에 놓고서 찰과기 (scraper)로 세포를 수집하고 Triton lysis 완충액 [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)]을 이용하여 용해시킨 후 세포 용해액을 4°C에서 14,000 g로 15분간 원심 분리하여 상층액을 -70°C에 보관하였다. 추출된 단백은 Bradford assay법으로 농도를 결정하였고 각각의 검체를 40 µg씩 sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리하였다. 전기영동 후 겔 내의 단백은 100 볼트에서 1시간 동안 Hybond-ECL 니트로셀룰로스막에 이동시켰다. 막을 하룻밤 동안 4°C에서 5% 탈지분유와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 처리하였다. PKC- δ , phospho-PKC- δ 와 액틴에 대한 1차 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 막을 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 10분간 3회 세척하였고, 1% 탈지분유와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 흥당무과산화효소 (horseradish peroxidase) 2차 항체를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ECL 용액 kit (Amersham Life Science Inc)을 이용하여 발현 정도를 NIH Image 1.62 software을 사용하여 측정하였다.

8. 혈관평활근세포에서 PKC- δ 의 RNA Interference Ablation

혈관평활근세포를 6-well plates에 분주한 후 70%의 세포 핵류가 되면 우태혈청이 없는 신선한 DMEM으로 바꾸

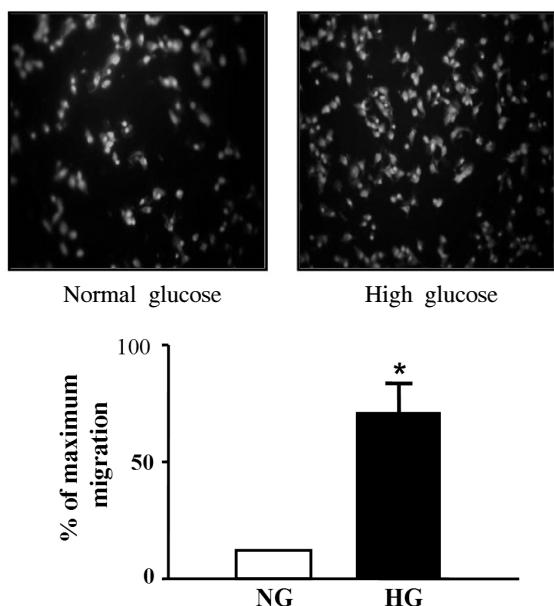


Fig. 2. Effect of high glucose on the migration of VSMCs. Data are shown as the mean \pm SE from 4 experiments in each group. * $P < 0.01$ vs. normal glucose. NG, normal glucose; HG, high glucose.

고 혈관평활근세포를 Santa Cruz Biotechnology에서 제공된 매뉴얼에 기술된 방법으로 80 pmols siRNA의 최종 농도가 되도록 PKC- δ siRNA 혹은 control siRNA와 100 µL siRNA 혼합주입 시약 (transfecton reagent)를 혼합한 후 배양하였다. 37°C에서 5시간 동안 배양한 후 배지는 10% 우태혈청을 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 실험결과의 통계는 경우에 따라 Student's t-test와 ANOVA test를 적용하여 분석하였다. $P < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈관평활근세포 이동에 미치는 고농도 포도당의 효과

30 mM D-glucose에 노출된 혈관평활근세포의 이동은 5.5 mM D-glucose에서 배양된 혈관평활근세포에 비하여 현저히 증가하였다 ($P < 0.01$, Fig. 2). 삼투성 대조군으로 30 mM L-glucose의 배양조건에서는 5.5 mM D-glucose의 배양상태와 비교하여 혈관평활근세포의 이동에는 차이가 없었다 ($P = \text{NS}$).

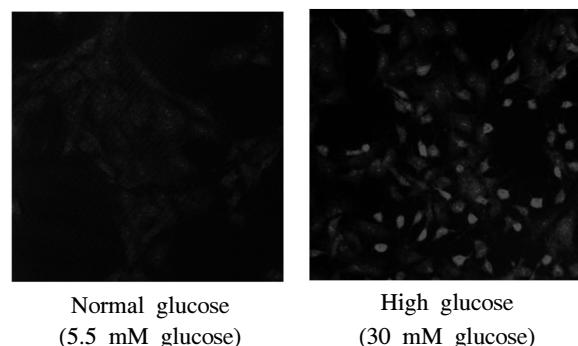


Fig. 3. Effect of high glucose on the ROS production in vascular smooth muscle cell. Dihydroethidium (DHE) staining for superoxide anion ($\times 100$).

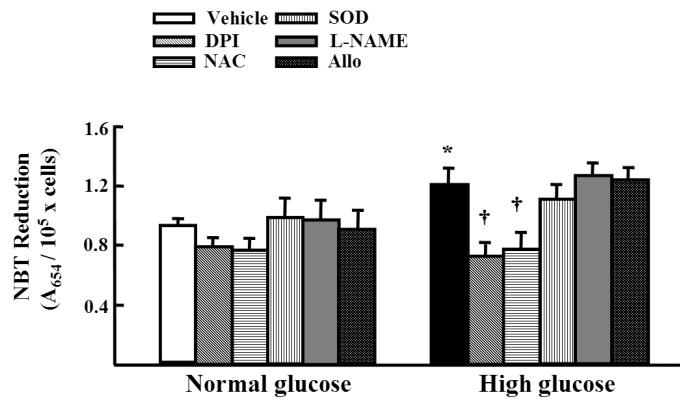


Fig. 4. Effect of various inhibitors such as DPI, NAC, SOD, L-NAME, and allopurinol on the superoxide generation in normal and high glucose-treated vascular smooth muscle cells (VSMCs). Data are shown as mean \pm SE from 4 experiments in each group. * $P < 0.05$ vs. normal glucose. † $P < 0.01$ compared with corresponding values in each vehicle.

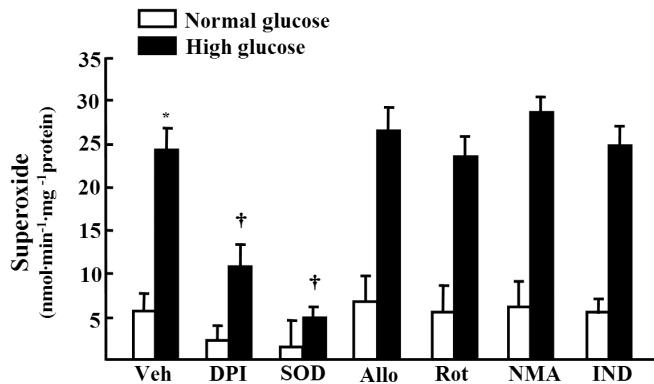


Fig. 5. Effects of various inhibitors, such as such as DPI (10 μ mol/L), SOD (500 U/mL), allopurinol (Allo, 100 μ mol/L), rotenone (Rot, 100 μ mol/L), L-NAME (NMA, 10 μ mol/L), and indomethacin (IND, 10 μ mol/L), NADH-stimulated superoxide production in normal and high glucose-treated VSMCs. Data are shown as mean \pm SE from 4 experiments in each group. * $P < 0.01$ vs. normal glucose. † $P < 0.01$ vs. vehicle (veh).

2. Superoxide 음이온 생성의 측정

30 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 혈관평활근세포의 측정한 세포 내 superoxide 음이온의 양은 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 의미있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 3, 4). 또한, 30 mmol/L D-glucose 배양조건에서 NAD(P)H oxidase 억제제인 DPI (10 μ mol/L)와 NAC (10 μ mol/L)으로 전처리 하였을 때 각 매개체 (vehicle)에서 상응하는 값과 비교하여 NBT 환원이 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$, Fig. 4). 그러나 SOD (500 U/mL), L-NAME (10 μ mol/L)와 allopurinol (10 μ mol/L)으로 전처리 하였을 때는 NBT 환원의 의미있는 감소는 보이지 않았다. NADH-자극

superoxide 음이온 생성의 측정에서도 5.5 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 혈관평활근세포와 비교하여 30 mmol/L D-glucose 조건에서 배양한 세포 내 superoxide 음이온의 양은 의미있게 증가하였다 ($P < 0.01$, Fig. 5). DPI (10 μ mol/L)와 SOD (500 U/mL)로 전처리하였을 때 각 매개체와 비교하여 증가되었던 superoxide 음이온 생성량이 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$, Fig. 5). 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 의미있게 감소하지 않았다.

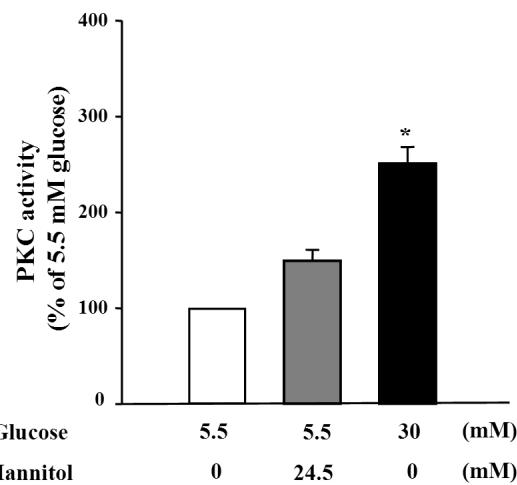


Fig. 6. Effects of high glucose on in vitro PKC activity in VSMCs. Results were expressed as a mean percentage of 5.5 mmol/L D-glucose \pm SE from 4 independent experiments.
* $P < 0.01$ vs. normal glucose (5.5 mM).

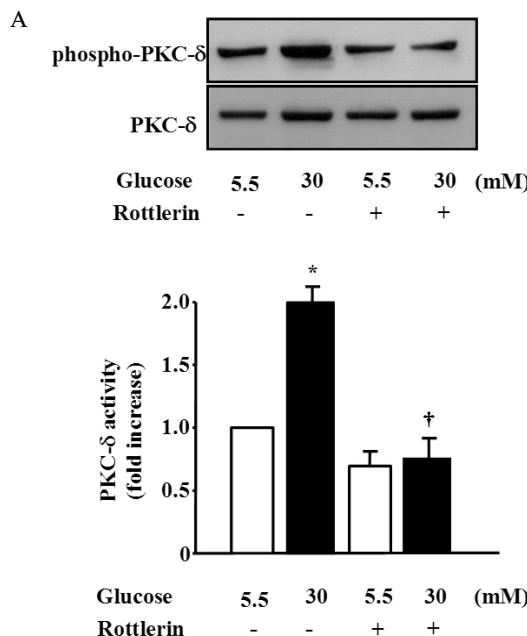


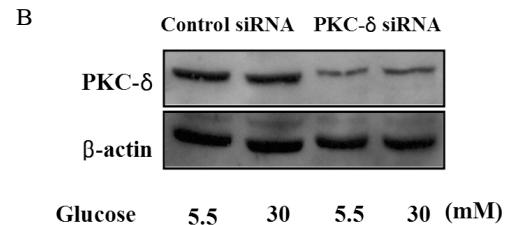
Fig. 7. Effects of high glucose on in vitro PKC activity and isozyme selective inhibition of PKC- δ in VSMCs. A. Confluent cultured VSMCs were treated with high glucose condition for 72 h. To verify the efficacy and selectivity of isozyme specific PKC inhibitor, VSMCs were treated with rottlerin (3 μ mol/L) 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- δ . B. Quiescent VSMCs were transfected with PKC- δ siRNA prior to stimulation with high glucose for 72 h. 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. * $P < 0.01$ compared with normal glucose. † $P < 0.01$ compared with high glucose without pretreatment with rottlerin.

3. PKC 활성도의 변화

혈관평활근세포의 PKC 활성도를 측정하였을 때 30 mmol/L D-glucose 배양조건에서 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건보다 의미있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 6). 삼투성 대조군으로 24.5 mmol/L mannitol 배양조건에서는 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 의미있는 차이는 없었다. PKC- δ 활성화에 대한 고농도 포도당의 효과를 검사하기 위해 혈관평활근세포를 특히 PKC- δ 억제제인 rottlerin을 1시간 동안 전처리하거나 전처리없이 각 조건에서 72시간 동안 배양하였다. PKC- δ 의 인산화는 5.5 mmol/L glucose 배양조건과 비교하여 의미있는 증가를 보였다 ($P < 0.01$, Fig. 7). 선택적 PKC- δ 억제제인 rottlerin (3 μ mol/L)으로 전처리하면 증가되었던 PKC- δ 의 인산화는 의미있게 감소하였다 ($P < 0.01$, Fig. 7).

4. Superoxide 음이온 생성에 대한 PKC- δ RNA Interference Ablation의 효과

혈관평활근세포에서 superoxide 음이온 생성에 대한



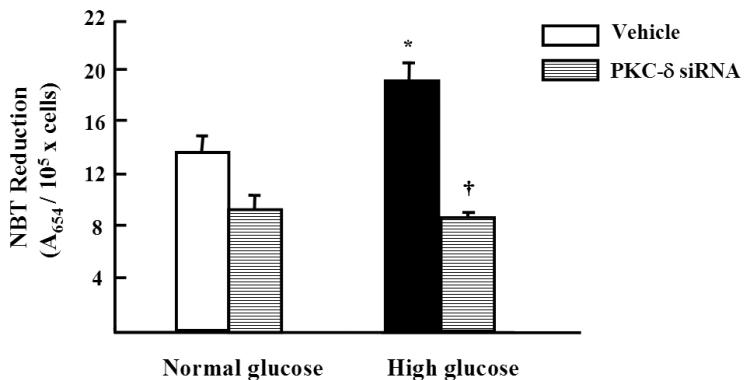


Fig. 8. Effect of transient transfections of PKC- δ siRNA on cellular superoxide production in normal and high glucose-treated VSMCs. Superoxide production was measured by NBT reduction. Results are presented as means \pm SE for three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. normal glucose. † $P < 0.01$ vs. vehicle.

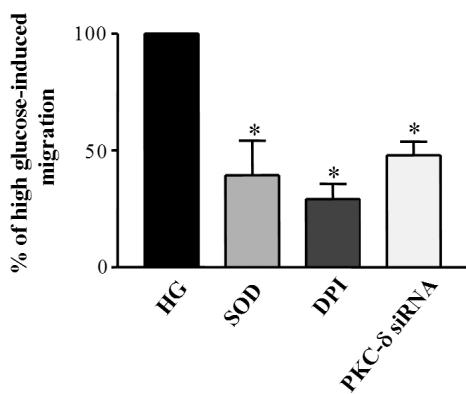


Fig. 9. Effect of DPI, selective PKC inhibitor or PKC- δ siRNA on VSMC migration. Quiescent VSMCs were pretreated with DPI (10 $\mu\text{mol/L}$), rottlerin (3 $\mu\text{mol/L}$) for 1 h or transfected with PKC- δ siRNA prior to stimulation with high glucose. Results are obtained from three separate experiments and are expressed in the mean \pm SE. * $P < 0.05$ compared with high glucose without treatment.

PKC- δ siRNA의 효과를 NBT 환원법에 의해 측정하였을 때 5.5 mmol/L D-glucose 배양조건과 비교하여 30 mmol/L D-glucose 배양조건에서 의미있게 증가된 superoxide 음이온 생성량은 PKC- δ siRNA으로 핵내주입(transfection)한 후 의미있게 감소하였다($P < 0.01$, Fig. 8).

5. 혈관평활근세포의 이동에 대한 PKC- δ RNA Interference Ablation의 효과

PKC- δ 활성화가 다른 포도당 농도의 배양조건에서 혈관평활근세포의 이동과 연관이 있는지 연구하기 위해 혈관평활근세포의 이동을 측정하기 전에 PKC- δ siRNA로 핵내주

입 시켰다. PKC- δ 의 발현제거는 고농도 포도당에서 증가된 혈관평활근세포의 이동정도를 의미있게 감소시켰다($P < 0.05$, Fig. 9). 그리고 DPI (10 $\mu\text{mol/L}$)와 SOD로 전처리한 경우 30 mM D-glucose에서 증가된 이동 정도가 의미 있게 감소하였다($P < 0.05$, Fig. 9). 이는 고농도 포도당에 노출된 혈관평활근세포의 이동증가는 활성산소족과 관계있음을 보여준다.

고찰

당뇨병환자들은 고혈당으로 인하여 발생하는 대혈관합병증으로 인한 사망률이 높다. Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)의 결과에 의하면 혈관합병증의 중요한 원인으로는 고혈당 그 자체가 중요하다고 인식되고 있다¹¹⁾.

혈관평활근세포의 이상 증식과 혈관 내막층의 비후는 죽상경화증 발생의 중요한 요소로 알려져 있으며 혈관 손상이나 동맥경화의 별생과정에서 일어나는 혈관평활근세포의 이동은 재협착과 죽상경화의 과정에 중요한 역할을 하게 된다¹⁵⁾. 고농도 포도당 조건에서 혈관평활근세포의 이동이 증가한다는 것은 여러 연구에서 관찰된 현상이나 그 기전은 정확하게 알 수는 없다.

생체 내에서 혈관평활근세포의 이동이 일어나는 기전이 모두 밝혀지지는 않았지만 그 과정에서 여러 가지 유발원인과 서로 다른 많은 경로를 거친다고 알려져 있다. 그 중 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)가 강력한 인자로 알려져 있으며 혈관 발달 단계에서 PDGF는 혈관주위세포 이동과 다른 평활근 전구의 이동을 자극한다¹⁶⁾. 혈관평활근세포 이동의 신호전달 체계에서 초기 단계

에 PDGF가 강력한 이동 자극물질로 작용한다는 연구 결과가 있으며¹⁷⁾ PDGF, angiotensin-II¹⁸⁾, IGF-1¹⁹⁾ 등의 사이토카인 또는 성장인자와 세포외기질성분²⁰⁾, 노르에피네프린, 세로토닌 등의 물질이²¹⁾ 혈관평활근세포의 이동을 촉진한다. 또한 많은 연구에서 고농도 포도당이 혈관평활근세포의 이동을 증가시킨다는 보고가 있었다³⁻⁵⁾. 혈관평활근세포의 이동의 하부 신호전달 단계에서는 다양한 경로가 관여하는데 phosphatidylinositol 3-kinases, calcium-dependent protein kinases, Rho-activated protein kinase, p21-activated protein kinases, LIM kinase (LIMK), mitogen-activated protein kinase 등이 주된 경로로 알려져 있다²²⁾.

고농도 포도당 조건에서 혈관평활근세포에서 활성 산소족 형성이 증가하며, 활성 산소족이 당뇨병환자와 당뇨병 동물모델의 혈관에 다량 축적이 되고, 당뇨병성 혈관질환에서 혈관평활근세포의 증식이 증가함이 보고되었다. 산화 스트레스는 당뇨병에서 혈관내피세포의 기능장애와 혈관평활근세포의 증식, 혈소판응집 증가 등에 관여하여 당뇨병성 혈관합병증을 유발하며 활성 산소족이 혈관평활근세포의 증식과 DNA 합성에 관여하는 신호전달계에 직접적으로 작용함이 보고되고 있다²³⁻²⁵⁾.

저자들은 활성 산소족이 혈관평활근세포의 이동의 조절에 있어서도 중요한 역할을 할 것이라 가정하고 혈관평활근세포의 이동에 활성 산소족이 관여하는지와 그 분자생물학적 기전을 알아보기 위해 연구를 시행하였다. 본 연구에서는 고농도 포도당 배양 조건에서 혈관평활근세포의 이동이 의미있게 증가하였고, NADPH oxidase 억제제인 DPI나 내재성 항산화 효소인 SOD로 전처리하였을 때 고농도 포도당에 의해 증가되었던 혈관평활근세포의 이동이 유의하게 감소하였으며 PKC- δ siRNA를 사용하여 PKC- δ 발현을 억제시켰을 때에도 고농도 포도당 배양 조건에서 증가되었던 혈관평활근세포의 이동이 유의하게 감소하였다. 한편 혈관평활근세포의 PKC 활성도는 고농도 포도당 배양 조건에서 의미있게 증가하였고 PKC- δ siRNA를 이용하여 PKC- δ 발현을 억제시켰을 때 고농도 포도당에 의한 superoxide 음이온 생성을 의미있게 감소시켰다. 이러한 결과는 고농도 포도당에 의해 유발된 혈관평활근세포의 이동은 NADPH oxidase에 의해 생성된 활성 산소족에 의해 조절된다는 사실을 나타내며 NADPH oxidase의 활성에 PKC- δ 가 관여함을 보여준다.

활성 산소족이 혈관평활근세포의 기능에 주는 영향에 대하여 많은 연구가 있어 왔으며 활성 산소족은 여러 가지 작용제로 자극된 세포 이동의 증가에 관련되어 있었다.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)로 유발된 이동은 catalase 또는 N-acetylcysteine과 pyrrolidine dithiocarbamate에 의해^{26,27)}, 트롬빈 자극으로 유발된 이동은 NADPH oxidase 억제제인 apocynin과 DPI에 의해²⁸⁾ 억제되었다. 그러나 혈관평활근세포의 이동에 있어 활성 산소족의 조절작용에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 현재 제시되고 있는 기전 중의 하나는 NADPH oxidase에 의해 형성된 superoxide 음이온이 c-Src을 활성화시켜 c-Src, PDK1, PAK 복합체를 형성하여 액틴 중합을 일으키고^{29,30)} 또한 superoxide 음이온이 c-Src, PDK1을 활성화시키고 c-Src는 FAK, Pyk2를 인산화시켜 p130cas, paxillin 복합체를 이루게 하여 국소 복합체를 국소 유착이 일어나게 한다는 것이다³¹⁻³⁴⁾. 그러나 위의 내용은 주로 angiotension II에 의해 유발된 활성 산소족에 대한 연구결과이므로 고혈당에 의해 유발된 활성 산소족도 같은 신호전달 경로를 거치는지는 불분명하다.

한편, 포도당에 의해 영향을 받는 핵심적인 신호 결과 중에 하나가 protein kinase C (PKC)의 활성화이다. King 등³⁵⁾은 고농도 포도당이 혈관세포의 protein kinase C를 활성화 시킨다고 보고하였으며, Inoguchi 등³⁶⁾은 혈관평활근세포를 고농도 포도당 조건에서 배양했을 때 PKC를 매개로 하는 NAD(P)H oxidase가 활성화되어 superoxide 음이온의 생성이 증가함을 보고하였다. PKC는 classic PKCs (α , β_1 , β_2 , γ), novel PKCs (δ , ϵ , $\eta(L)$, θ), atypical PKCs (ζ and λ/t)로 분류된다. 이들 중 PKC- δ 는 주로 혈관 세포골격에 존재하며 기계적 스트레스로 인한 PKC- δ 발현 증가 시 혈관평활근세포의 이동이 증가되었다는 보고가 있다³⁷⁾. 본 연구에서는 고농도 포도당으로 혈관평활근세포를 처리하였을 때 PKC 활성도가 증가하였고 선택적 PKC- δ 억제제인 rottlerin이나 PKC- δ siRNA로 PKC- δ 발현을 억제하였을 때 고농도 포도당 조건에서 증가된 superoxide 음이온 생성이 유의하게 감소되었다. 따라서, NAD(P)H oxidase의 활성에 PKC- δ 가 필요함을 보여준다.

이상의 결과를 종합하면 고농도 포도당에 의해 증가된 혈관평활근세포의 이동에 활성 산소족이 중요하게 관여되어 있으며 고농도 포도당에 의해 유발된 NAD(P)H oxidase의 활성화가 PKC- δ 의 존성 경로에 의해 매개됨을 알 수 있으며 고농도 포도당과 당뇨병에 의해 활성화될 수 있는 PKC- δ 가 혈관세포에서 가능성 있는 표적임을 확인하였다. 또한 활성 산소족의 공급원과 조절되는 신호전달체계 및 혈관평활근세포의 이동과 수축에 대한 활성 산소족의 역할을 밝혀내기 위한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

연구배경: 산화스트레스는 당뇨병환자의 혈관 합병증 발생에 중요한 역할을 한다. 그러나 당뇨병성 혈관 합병증의 발생과 진행에 대한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 저자들은 산화스트레스가 고혈당 유발성 혈관평활근세포의 이동에 중요한 역할을 하는지 알아보기로 하였다.

방법: Sprague-Dawley 쥐의 대동맥평활근세포를 5.5 mM D-glucose (정상 농도 포도당), 30 mM D-glucose (고농도 포도당), 5.5 mM D-glucose + 24.5 mM mannitol (삼투압 대조군) 을 포함하는 배지에 72시간 동안 배양하였다. 혈관 평활근세포의 이동과 superoxide 음이온 생성, PKC 활성을 측정하였다.

결과: 고농도 포도당 조건에서 배양된 군에서 정상 포도당 조건보다 혈관평활근세포 이동이 유의하게 증가하였다. DPI (10 $\mu\text{mol/L}$)와 SOD (500 U/mL)로 처리하였을 때 고혈당 유발성 혈관평활근세포 이동이 의미있게 감소하였다. 고농도 포도당 조건에서 유의하게 증가된 superoxide 음이온 생성은 DPI 와 SOD 처리 후 현저히 감소하였다. 고농도 포도당은 PKC- δ 활성을 유의하게 증가시켰다. PKC- δ siRNA 핵내 주입 또는 선택적 PKC- δ 억제제인 rottlerin으로 처리된 혈관평활근세포는 고농도 포도당 조건에서의 NBT 염색과 NAD(P)H oxidase 활성을 유의하게 감소하였다. 또한 PKC- δ 억제는 고농도 포도당 조건에서 증가되었던 혈관평활근세포 이동을 현저히 감소시켰다.

결론: 고농도 포도당에 의해 증가된 혈관평활근세포의 이동에 활성산소족이 중요하게 관여되어 있으며 고농도 포도당에 의해 유발된 NAD(P)H oxidase의 활성화가 PKC- δ 의 존성 경로에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB: *Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study.* Diabetes 23:105-11, 1974
2. Ross R: *The pathogenesis of atherosclerosis an update.* N. Engl. J. Med. 314:488-500, 1986
3. Natarajan R, Gonzales N, Xu L, Nadler J: *Vascular smooth muscle cells exhibit increased growth response to elevated glucose.* Biochem Biophys Res Commun 87:552-60, 1992
4. Hayashi JN, Ito H, Kanayasu T, Asuwa N, Morita I, Ishii T, Murota S: *Effects of glucose on migration, proliferation and tube formation by vascular endothelial cells.* Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 60:245-52, 1991
5. Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J: *Mechanisms of action of troglitazone in the prevention of high glucose induced migration and proliferation of cultured coronary smooth muscle cells.* Circ Res 81:953-62, 1997
6. Griendling KK, FitzGerald GA: *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies.* Circulation 108:2034-40, 2003
7. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Mattheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T: *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus.* Circ Res 88:E14-22, 2001
8. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM: *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes.* Endocr Rev 23:599-622, 2002
9. Ardanaz N, Pagano PJ: *Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction.* Exp Biol Med (Maywood) 231: 237-51, 2006
10. Chisolm GM, Steinberg D: *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.* Free Radic Biol Med 28:1815-26, 2000
11. 김보현, 손석민: 산화스트레스에 의한 당뇨병성 혈관병증의 발생기전. 대한내분비학회지 21:448-59, 2006
12. Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J: *Antioxidants improve impaired insulin-mediated glucose uptake and prevent migration and proliferation of cultured rabbit coronary smooth muscle cells induced by high glucose.* Circulation. 99:1370-8, 1999
13. Park JY, Park KG, Kim HJ, Kang HG, Ahn JD, Kim HS, Kim YM, Son SM, Kim IJ, Kim YK, Kim CD, Lee KU, Lee IK: *The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation,*

- migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells.* *Diabetologia* 48:1022-8, 2005
14. 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
 15. Schwartz SM: *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis.* *J Clin Invest* 99: 2814-16, 1997
 16. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW: *Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty.* *J Clin Invest* 89:507-11, 1992
 17. Jackson CL, Raines EW, Ross R, Reidy MA: *Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury.* *Arterioscler Thromb* 13:1218-26, 1993
 18. Bell L, Madri JA: *Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration.* *Am J Pathol* 137:7-12, 1990
 19. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R: *Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation.* *J Clin Invest* 93:1266-74, 1994
 20. Nelson PR, Yamamura S, Kent KC: *Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration.* *J Vasc Surg* 24:25-32, 1996
 21. Bell L, Madri JA: *Effect of platelet factors on migration of cultured bovine aortic endothelial and smooth muscle cells.* *Circ Res* 65:1057-65, 1989
 22. Gerthoffer WT: *Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration.* *Circ Res* 100:607-21, 2007
 23. 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* 49:1939-45, 2000
 24. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: *NAD(P)H oxidase; role in cardiovascular biology and disease.* *Circ Res* 86:494-501, 2000
 25. 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
 26. Nishio E, Watanabe Y: *The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration.* *Br J Pharmacol* 121:665-70, 1997
 27. Wang Z, Castresana MR, Newman WH: *Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells.* *Biochem Biophys Res Commun* 285:669-74, 2001
 28. Wang Z, Castresana MR, Newman WH: *Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells.* *J Mol Cell Cardiol* 36:49-56, 2004
 29. Taniyama Y, Weber DS, Rocic P, Hilenski L, Akers ML, Park J, Hemmings BA, Alexander RW, Griendling KK: *Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions.* *Mol Cell Biol* 23:8019-29, 2003
 30. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halloran S, Alexander RW: *Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:489-95, 2001
 31. Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y: *Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells.* *Hypertension* 33:201-6, 1999
 32. Leduc I, Meloche S: *Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells.* *J Biol Chem* 270:4401-4, 1995
 33. Okuda M, Kawahara Y, Nakayama I, Hoshijima M,

- Yokoyama M: *Angiotensin II transduces its signal to focal adhesions via angiotensin II type 1 receptors in vascular smooth muscle cells.* FEBS Lett 368:343-47, 1995
34. Lyle AN, Griendling KK: *Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species.* Physiology (Bethesda) 21:269-80, 2006
35. 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
36. 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
37. Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q: *Mechanical stress-activated PKC delta regulates smooth muscle cell migration.* FASEB J 17:2106-8, 2003