

## 돼지의 대동맥평활근세포에서 Endothelin-1이 세포분열에 미치는 영향\*

중앙대학교 의과대학 임상병리과학교실, 서울대학교 의과대학 내과학교실\*\*

차 영 주 · 김 철 호\*\*

= Abstract =

### Influence of Endothelin-1 on Cultured Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

Young Joo Cha, M.D., Cheol Ho Kim, M.D.\*\*

*Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Chung-ang University, Seoul, Korea*

*Department of Internal Medicine,\*\* College of Medicine, Seoul National University,  
Seoul, Korea*

**Background** : Proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) is a critical event in the development of atherosclerosis. Endothelin-1 (ET-1), a vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells and VSMC, might play a role in vascular remodeling. To investigate the proposed 'mitogenic' potential of ET-1, we examined the effects of ET-1 on the proliferation of cultured porcine aortic VSMC and on the potential synergism with platelet-derived growth factor (PDGF).

**Materials and Methods** : VSMC were obtained from porcine aorta and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). VSMC grown subconfluently in 12-well plate were stimulated by ET-1, PDGF, and ET-1 & PDGF and DNA synthesis was determined as the uptake of <sup>3</sup>H-thymidine into cell cultures. We also examined the effects of BQ123, a selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist, and N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine (NMLA), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor.

**Results** : ET-1 elicited a 2.5-fold increase of cultured VSMC DNA synthesis, comparing with basal medium, and PDGF elicited a 4.8-fold increase, whereas ET-1 and PDGF elicited a 8.8-fold increase, showing synergistic effect. Proliferative activity of ET-1 on VSMC was blocked (39%) by BQ123, however, the synergistic effect of ET-1 and PDGF was not blocked by BQ123. The synergistic effect of ET-1 and PDGF was increased when co-stimulated with NMLA.

**Conclusion** : ET-1 is a co-mitogen for VSMC from porcine aorta, whose proliferative activity requires serum or other growth factors such as PDGF for its maximal activity. The proliferative activity of ET-1 is considered to be transduced partly by selective activation of the ET<sub>A</sub> receptor, however, the synergistic effect of ET-1 and PDGF is to be stimulated by non-ET<sub>A</sub> receptor.

**KEY WORDS** : VSMC · ET-1 · PDGF · BQ123.

---

\*본 논문의 요지는 1995년 대한순환기학회 추계 학술대회에서 발표되었음.

## 서 론

동맥경화증에서는 혈관벽의 중막에 존재하던 혈관평활근세포가 혈관벽의 내막 쪽으로 이동하면서 비정상적인 증식이 발생하고, 여기에 지질의 축적 및 산화가 일어나며, 혈관평활근세포의 표현형이 수축형에서 분비형으로 변화하여 콜라겐과 같은 여러 종류의 기질을 합성하게 된다<sup>1)</sup>. 이와같은 혈관평활근세포의 변화 중 혈관평활근세포의 비정상적인 증식은 동맥경화증의 발생에 있어서 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는 바<sup>1-4)</sup>, 이를 조절하는 인자를 규명하는 일은 동맥경화증의 발생 및 진행을 억제하는 데에 있어서 매우 중요한 일이라고 사료된다.

혈관내피세포는 혈관평활근세포와 바로 인접하여 있는 세포로서 여러 종류의 혈관활성물질을 분비함으로써 혈관평활근세포의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>5, 6)</sup>. 사실 상 혈관내피세포에서는 platelet-derived growth factor(PDGF), basic fibroblast growth factor 및 insulin-like growth factor-1 등과 같은 혈관평활근세포의 증식을 촉진시키는 인자 뿐 아니라<sup>7, 8)</sup> heparin/heparan sulfate 등과 같은 성장억제인자도 동시에 분비됨이 알려졌다<sup>9)</sup>. 따라서 혈관평활근세포의 증식에 결정적인 영향을 미치는 물질을 규명하는 데에 관심이 주목되고 있다.

Endothelin-1(ET-1)은 혈관내피세포의 배양상층액에서 처음 발견된 21개의 아미노산으로 구성된 강력한 혈관수축물질로서, 혈관내피세포에서 분비됨이 알려졌다<sup>10)</sup>. 최근 동맥경화증이 일어난 혈관벽의 중막에서 면역화학적 방법으로 ET-1을 염색한 결과 현저히 증가됨이 보고된 바 있어<sup>11)</sup>, ET-1이 동맥경화증의 발병기전에 있어서 어떠한 역할을 하는 지에 관심이 주목되고 있다. 이에 저자들은 ET-1이 동맥경화증의 발생에 있어서 중요한 혈관평활근세포에 대한 세포분열 촉진작용을 가지는 지를 확인하고, 이와같은 촉진작용이 ET수용체 중 ET<sub>A</sub>수용체를 통하여 일어나는 지를 확인하고자 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

혈관평활근세포를 배양하기 위한 세포배양배지인 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)(Cat # 12800-017), non-essential amino acid solution(MEM)

(Cat # 11140-050) 및 fetal bovine serum(FBS)(Cat # 26140-079)은 Gibco사의 제품을 사용하였고, Earle's balanced salt solution(EBSS)(E-6132), penicillin G sodium(PEN-NA), streptomycin sulfate(S-6501), 및 N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine(NMLA)(M-7033)는 Sigma사의 제품을 사용하였으며, ET-1(Cat. No. 1381 563)과 PDGF B/B(Cat. No. 1276 956)는 Boehringer Mannheim사의 제품을 사용하였다. BQ123는 일본의 반유제약으로부터 제공받았다.

배양용기는 35mm×10mm(Falcon 3001)와 60mm×15mm(Falcon 3002) tissue culture dish는 Becton Dickinson사의 제품을 사용하였고, 12-well tissue culture cluster(Cat. # 3512)는 Costar사의 제품을 사용하였다. <sup>3</sup>H-thymidine uptake에 사용된 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine은 Amersham사의 제품(specific activity : 185 GBq/mmol, 5 Ci/mmol)을 사용하였다.

### 2. 방 법

돼지의 대동맥을 분리한 후 collagenase를 처리하여 혈관내피세포를 먼저 떼어내고, scapel로 혈관벽의 혈관평활근세포가 포함된 층의 조직을 얇게 벗겨낸 다음 scapel로 조직을 잘게 자르고 잘게 떼어낸 조직을 35mm 세포배양용기에 3~4 조각씩 담고 10% FBS가 포함된 DMEM(10% FBS-DMEM) 배지를 조직이 살짝 잠길 정도로 부은 다음 35℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양을 실시하였다. 조직으로부터 혈관평활근세포가 빠져 나와 자라는 것이 확인되면 세포배양용기에서 조직을 제거하고, 2일 마다 한번씩 배지(10% FBS-DMEM)를 교체하면서 세포배양을 실시하였다. 세포배양용기에 혈관평활근세포가 약 80% 정도 자라면 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을 실시하고, 3~4회 계대배양 시기에 실험을 실시하였다.

혈관평활근세포의 세포분열 촉진실험은 다음과 같이 실시하였다. 3~4회 계대배양 시기에 있는 혈관평활근세포를 12-well plate에 각 well 당  $3.3 \times 10^4$ /mL의 세포를 접종하여 3일간 10% FBS-DMEM 배지에 배양한 후, 0.4% FBS-DMEM 배지로 3회 세척하고, 0.4% FBS-DMEM 배지 하에서 배지를 매일 교체하면서 3일 간 더 배양하여 세포분열을 완전히 정지시켰다. 이와같이 세포분열이 정지된 혈관평활근세포에 ET-1을  $10^{-7}$  M부터  $10^{-10}$  M까지 농도 별로 반응시켜 혈관평활근세포의 분열을 촉진하였고, 세포분열의 촉진 정도를 <sup>3</sup>H-thymidine이 결합되는 정도

를 가지고 측정하였다. 이와같이 하여 ET-1의 농도를 결정한 후,  $10^{-8}$  M의 ET-1을 단독으로 반응시키고, PDGF와 함께 반응시키는 실험을 실시하였는데, 이 때는 3~4회 계대배양 시기에 있는 혈관평활근세포를 12-well plate에 각 well 당  $6 \times 10^4$ /mL의 세포를 접종하여 같은 방법으로 실시하였다. 즉 세포분열이 정지된 혈관평활근세포에  $10^{-8}$  M의 ET-1과 20 ng/mL의 PDGF를 각각 단독으로 반응시키고,  $10^{-8}$  M의 ET-1과 20 ng/mL의 PDGF를 동시에 반응시켜 혈관평활근세포의 분열을 촉진하여 세포분열의 촉진 정도를 역시  $^3\text{H}$ -thymidine이 결합되는 정도를 가지고 측정하였다.

한편 ET-1과 PDGF의 작용기전을 확인하기 위하여  $\text{ET}_A$ 수용체 길항제인 BQ123을 1  $\mu\text{M}$  농도로 첨가하여 세포분열 촉진작용이 억제되는가를 확인하였고, nitric oxide synthase(NOS) 억제제인  $\text{N}^G$ -methyl-L-arginine(NMLA)을 10  $\mu\text{M}$  농도로 첨가하여 작용을 확인하였다.

## 결 과

### 1. ET-1의 농도에 따른 혈관평활근세포의 세포분열 촉진 효과

ET-1을  $10^{-7}$  M부터  $10^{-10}$  M까지 농도 별로 반응시켜 혈관평활근세포의 분열을 촉진하고, 세포분열의 촉진 정도를  $^3\text{H}$ -thymidine이 결합되는 정도를 가지고 측정된 결과 Fig. 1과 같았다. 혈관평활근세포의 분열촉진작용은  $10^{-8}$  M의 ET-1을 반응시켰을 때 최고치를 보였고,  $10^{-9}$  M과  $10^{-10}$  M로 ET-1의 농도가 낮아질 수록 세포분열 촉진 정도가 감소하였는데,  $10^{-7}$  M의 ET-1을 반응시킨 경우에도 세포분열 촉진 정도가 오히려 감소함을 관찰할 수 있었다. 따라서 ET-1은 적절한 농도에서만 혈관평활근세포 분열 촉진작용을 나타낸다고 사료되었고, 높은 농도의 ET-1은 오히려 혈관평활근세포의 분열을 저해하는 것으로 사료되었다.

### 2. 혈관평활근세포에 대한 ET-1과 PDGF의 세포분열 촉진 효과

혈관평활근세포에 대한 세포분열 촉진작용이 결과 1에서 본 바와 같이  $10^{-8}$  M에서 가장 현저하였으므로 PDGF와 함께 비교한 실험에서는  $10^{-8}$  M의 ET-1을 사용하였다. 세포분열을 억제하는데 사용하였던 0.4% FBS-DMEM 배지에서 배양한 혈관평활근세포의 배양에서 측정된 cpm을 기준으로 하여 ET-1과 PDGF의 세포분열

촉진 효과를 분석하였다(Table 1). 돼지의 대동맥 혈관평활근세포를 0.4% FBS-DMEM 배지에서 배양하여  $^3\text{H}$ -thymidine uptake를 측정된 결과 2,850 cpm이었는데,  $10^{-8}$  M의 ET-1을 반응시킨 경우에는 7,125 cpm으로 약 2.5배의 증가를 보였고, 20 ng/mL의 PDGF를 반응시킨 경우에는 13,680 cpm을 보여 약 4.8배의 증가를 보였는

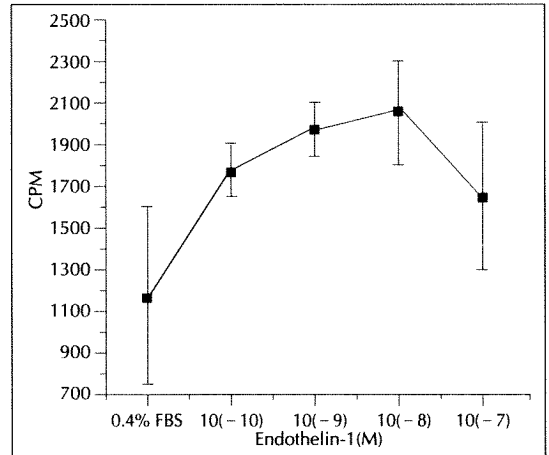


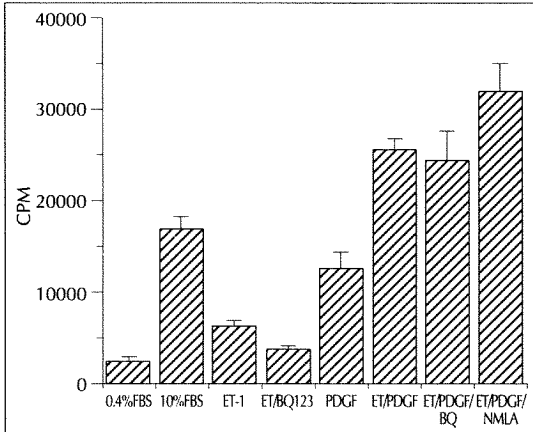
Fig. 1. Dose-response effect of ET-1 on DNA synthesis in cultured porcine aortic VSMC.

Quiescent VSMC( $3.3 \times 10^4$  cells) were incubated in the absence and presence of ET-1 under 0.4% FBS-DMEM and  $^3\text{H}$ -thymidine radioactivity incorporated into cells were determined as described in Methods.

Table 1. Effect of BQ123 and  $\text{N}^G$ -methyl-L-arginine on ET-1 and PDGF-induced VSMC proliferation

Drugs(concentration)	$^3\text{H}$ -thymidine Incorporation(cpm)
0.4% FBS	2,850 $\pm$ 493
10% FBS	16,958 $\pm$ 1,410
ET-1( $10^{-8}$ M)	7,125 $\pm$ 618
PDGF(20 ng/mL)	13,680 $\pm$ 1,520
ET-1( $10^{-8}$ M)+PDGF(20 ng/mL)	25,157 $\pm$ 1,154
ET-1( $10^{-8}$ M)+BQ123( $10^{-6}$ M)	4,367 $\pm$ 480
ET-1( $10^{-8}$ M)+PDGF(20 ng/mL)+BQ123( $10^{-6}$ M)	24,065 $\pm$ 3,183
ET-1( $10^{-8}$ M)+PDGF(20 ng/mL)+NMLA( $10^{-5}$ M)	31,033 $\pm$ 4,230

Quiescent VSMC( $6 \times 10^4$  cells) were incubated in the presence of ET-1, PDGF and ET-1 plus PDGF under 0.4% FBS-DMEM condition, and DNA synthesis was determined as the uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine into cell cultures. The effects of BQ123, a selective  $\text{ET}_A$  receptor antagonist, and  $\text{N}^G$ -methyl-L-arginine(NMLA), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor were also examined in the same condition. Each value is the mean  $\pm$  SE of triplicate dishes.



**Fig. 2.** Effect of BQ123 and  $N^G$ -methyl-L-arginine on ET-1 and PDGF-induced VSMC proliferation. Quiescent VSMC ( $6 \times 10^4$  cells) were incubated in the presence of ET-1, PDGF and ET-1 plus PDGF under 0.4% FBS-DMEM condition, and DNA synthesis was determined as the uptake of  $^3H$ -thymidine into cell cultures. The effects of BQ123, a selective  $ET_A$  receptor antagonist, and  $N^G$ -methyl-L-arginine (NMLA), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor were also examined in the same condition.

데,  $10^{-8}$  M의 ET-1과 20 ng/mL의 PDGF를 동시에 반응시킨 경우에는 25,157 cpm을 보여 약 8.8배의 현저한 증가를 보였다(Fig. 2) 한편 일반적인 세포배양 배지인 10% FBS-DMEM에서 혈관평활근세포를 배양한 경우에는 16,958 cpm으로 0.4% FBS-DMEM 배지에서 배양한 결과와 비교할 때 약 6.0배의 증가를 보였다.

### 3. ET-1과 PDGF의 혈관평활근세포 분열 촉진작용에 대한 BQ123의 영향

ET-1의 혈관평활근세포 분열 촉진작용이  $ET_A$  수용체를 통하여 일어나는 지를 확인하고자 ET-1과 함께  $ET_A$  수용체 길항제인 BQ123을 반응시킨 결과, ET-1만을 단독으로 반응시킨 경우의  $^3H$ -thymidine uptake는 7,125 cpm이었는데, ET-1과 BQ123을 동시에 반응시킨 경우에는 4,367 cpm으로 BQ123에 의하여 약 39%가 억제됨을 알 수 있었다. 한편 ET-1과 PDGF를 동시에 반응시킨 경우에는 25,157 cpm이었는데, 여기에 BQ123을 첨가한 경우 24,065 cpm으로 ET-1과 PDGF에 의한 혈관평활근세포 분열 촉진작용은 BQ123에 의하여 억제되지 않음을 알 수 있었고, ET-1과 PDGF를 동시에 반응시킨 경우에 NOS 억제제인 NMLA를 첨가하였더니 31,033 cpm으로 혈관평활근세포 분열 촉진작용이 오히려 증가됨을 알 수

있었다(Table 1, Fig. 2).

## 고찰

혈관내피세포는 혈관평활근세포의 성장을 조절하는 여러가지 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. ET-1은 혈관내피세포에서 분비되는 물질로서 매우 강력한 혈관수축물질이다<sup>10)</sup>. 일반적으로 혈관이완을 시키는 물질은 혈관평활근세포의 증식을 억제하는 반면에 혈관수축물질은 혈관평활근세포의 증식을 촉진시키므로, 매우 강력한 혈관수축물질인 ET-1도 혈관평활근세포의 증식을 촉진시킬 가능성이 있다고 생각되어 왔다. Hirata등<sup>12)</sup>은 백서의 혈관평활근세포 배양에서 ET-1이 세포질내칼슘의 농도를 증가시키는 것을 발견하였고, 세포질내칼슘이 세포의 증식에는 중추적인 역할을 수행하므로, ET-1이 세포분열을 촉진할 것이라고 생각하여, 역시 백서의 혈관평활근세포의 배양을 실시한 결과 ET-1이 매우 강력한 유사분열 물질(mitogen)로 작용한다고 주장하였다<sup>13)</sup>. 그러나 Weissberg등<sup>14)</sup>은 ET-1이 그 자체로는 혈관평활근세포에 대한 세포분열 촉진작용이 없고, fetal calf serum(FCS)이나 PDGF와 같은 다른 유사분열물질이 존재할 경우 단지 co-mitogen으로 작용한다고 Hirata등<sup>13)</sup>과는 정반대의 주장을 하였다. 이와같은 견해의 차이를 Weissberg등<sup>14)</sup>은 Hirata등<sup>13)</sup>이 10회 내지 20회 계대배양을 실시한 혈관평활근세포를 사용하여 ET-1의 세포분열 촉진작용을 평가하였으므로, 계대배양을 많이 실시하면 혈관평활근세포에서 PDGF와 유사한 물질이 분비되므로<sup>15)</sup>, Hirata등<sup>13)</sup>의 결과가 ET-1의 단독 효과가 아니라 세포배양 자체에서 분비된 PDGF 유사물질과 ET-1의 상승작용에 의한 결과라고 주장하였다.

이와같이 ET-1의 혈관평활근세포의 세포분열에 대한 작용에 관하여서는 상반되는 견해가 있어 왔지만, 일반적으로 ET-1이 혈관평활근세포의 증식을 유발하려면 PDGF, insulin-like growth factor, FCS 등 혈청에 있는 다른 성장인자를 필요로 하는 것으로 보고<sup>16-18)</sup>되고 있는 바, 본 연구에서도 이를 확인하고자 하였다. Alberts등<sup>18)</sup>은 백서의 대동맥 평활근세포를 혈청이 전혀 포함되지 않은 배지에서 배양하면서 ET-1을 반응시킨 결과 1주일 동안 전혀 증식이 일어나지 않음을 확인하였는데, 저자들의 실험에서도 돼지의 대동맥 평활근세포를 혈청이 전혀 포함되지 않은 배지로서 Bobik등<sup>19)</sup>이 사용한 transf-

errin과 insulin이 포함된 DMEM 배지에서 배양하면서 ET-1을 반응시켰더니 혈관평활근세포의 증식이 일어나지 않음은 물론 세포의 생활력(viability)도 매우 감소하고, 쉽게 culture dish에서 떨어지므로 세포배양을 유지하기가 어려웠다. 이는 Hassoun등<sup>16)</sup>이 돼지의 폐동맥 혈관평활근세포를 ET-1이 포함된 배지에서 배양시킨 결과, 소의 폐동맥 혈관평활근세포를 같은 조건에서 배양한 경우보다 세포가 약하고, 쉽게 culture dish에서 떨어지는 것을 확인하여 보고한 바와 일치되는 소견으로서, 저자들의 실험에서도 혈청이 포함되지 않은 배지에서 배양한 경우 아직 그 이유는 확인되지 않았지만 세포가 쉽게 culture dish에서 떨어지는 것을 경험할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 기초조건(basal condition)으로 0.4% FBS-DMEM 배지를 사용하였는데, 비록 낮은 농도이기는 하지만 혈청이 포함되어야만 ET-1을 반응시키면서 혈관평활근세포의 배양을 유지할 수 있었다.

기초배지로서 0.4% FBS-DMEM를 사용한 세포분열이 억제되고 있는 상태인 혈관평활근세포의 배양에서 이를 기준으로 하여 ET-1을 농도 별로 반응시킨 결과  $10^{-8}$  M의 ET-1에서 촉진작용이 최고치를 보였으며,  $10^{-9}$  M과  $10^{-10}$  M로 낮아짐에 따라 촉진작용이 농도와 비례하여 감소함을 알 수 있었으나,  $10^{-7}$  M의 ET-1에서는 오히려 세포분열 촉진작용이  $10^{-10}$  M의 ET-1을 반응시킨 경우보다 약한 것을 알 수 있었다. 따라서 ET-1의 세포분열 촉진작용은 농도가 높은 상태에서는 오히려 세포분열 촉진작용이 적음을 알 수 있었고, 혈청이 전혀 포함되지 않으면 ET-1은 오히려 세포에 독성을 나타내는 것이 아닌가 사료되었다. 따라서 ET-1은 그 단독으로는 돼지의 대동맥 혈관평활근세포의 세포분열 촉진작용이 뚜렷하지 않다고 사료되었고, 본 연구에서 사용한 것(0.4% FBS-DMEM)과 같은 낮은 농도의 혈청이라도 포함되어야 비로소 혈관평활근세포에 대한 분열 촉진작용을 나타낼 수 있었다.

ET-1과 다른 유사분열물질과의 상호작용을 확인하기 위하여  $10^{-8}$  M의 ET-1과 20 ng/ml의 PDGF를 각각 단독으로 반응시키고, 동시에 반응시킨 결과, ET-1에 의하여 약 2.5배, PDGF에 의하여 약 4.8배의 세포분열 촉진작용이 관찰되었는데, 이 두 가지를 동시에 반응시키면 약 8.8배의 증가를 보여, 단독으로 작용시킨 반응의 합보다 현저한 상승작용이 있음을 알 수 있었다. 즉 ET-1은 그 단독으로는 혈관평활근세포에 대한 분열 촉진작용이

미약하지만 PDGF와 같은 성장촉진인자가 함께 존재하면 그 작용이 매우 증가하여 높은 상승작용을 나타낸다고 사료되었다.

이와같은 ET-1의 작용이 ET<sub>A</sub>수용체를 통하여 일어나는 지는 Zamora등<sup>17)</sup>이 사람의 폐동맥 혈관평활근세포에서 ET-1의 작용을 보고한 바 있는데, 이들에 의하면 ET-1은 단지 co-mitogen으로 작용하며, 이 세포분열 촉진작용이 BQ123에 의하여 일부 억제되므로 ET-1이 ET<sub>A</sub>수용체를 통하여 작용한다고 보고하였다. 또한 이들은 PDGF나 5-hydroxytryptamine과 같은 물질의 작용은 ET<sub>A</sub>수용체를 통하여 일어나는 반응이 아니라고 주장하였고, BQ123에 의하여 억제되지 않음을 보고한 바 있다<sup>17)</sup>. 본 연구에서는 사람이 아닌 돼지의 대동맥 혈관평활근세포를 사용하여 이와 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, ET<sub>A</sub>수용체에 대한 특이적인 길항제인 BQ123에 의하여 ET-1의 분열 촉진작용이 약 40% 정도 억제되었으므로 ET-1의 작용이 일부 ET<sub>A</sub>수용체를 통하여 일어난다고는 사료되었으나, 전적으로 ET<sub>A</sub>수용체를 통하여 일어나지는 않는다고 사료되었고, ET<sub>B</sub>수용체나 다른 기전을 통한 작용도 일부 있을 것으로 사료되었다. 이는 ET<sub>B</sub>수용체에 특이적인 길항제를 사용하여 실험함으로써 밝힐 수 있으리라 사료된다. 한편 ET-1과 PDGF의 작용은 BQ123에 의하여 거의 억제되지 않았으므로, ET-1이 PDGF와 함께 작용하여 나타나는 상승작용은 ET<sub>A</sub>수용체를 통하지는 않는 것으로 사료되었고, 다른 기전을 통하는 것으로 사료되었다. 이 ET-1과 PDGF의 작용기전은 NOS억제제인 NMLA를 첨가하면 오히려 약 23%의 증가를 보이므로, NOS에 의하여 평소에 억제되고 있음을 알 수 있었다.

결론적으로 동맥경화증의 발생 및 진행에 있어서 중요한 혈관평활근세포의 증식에 있어서의 ET-1의 역할은 단독으로는 미약하지만, 다른 원인으로 혈관의 손상이 있거나 혈소판이 활성화된다는지 하여 PDGF와 같은 성장인자가 소량만 분비된다고 하더라도 세포분열 촉진작용이 상승되어 일어나므로 중요하다고 사료된다.

## 요 약

### 배 경 :

ET-1은 혈관내피세포에서 분비되는 강력한 혈관수축 물질로서, 동맥경화증이 일어난 혈관벽의 중막에서 현저히 증가됨이 보고된 바 있다. 따라서 ET-1이 동맥경화증

의 발병기전에 있어서 중요한 혈관평활근세포의 분열을 촉진시키는데 중추적인 작용을 담당하고 있는 가를 확인하고자 본 연구를 실시하였다.

#### 방 법 :

돼지의 대동맥으로부터 혈관평활근세포를 분리하여 3~4회 계대배양한 세포를 12-well plate에 각 well 당  $6 \times 10^4$ /mL씩 접종하여 3일간 10% FBS-DMEM에 배양한 후, 0.4% FBS-DMEM 배지로 매일 교체하면서 3일간 배양하여 세포분열을 정지시켰다. 이와같이 세포분열이 정지된 혈관평활근세포에 ET-1과 PDGF를 각각 단독으로 반응시키고, 동시에 반응시켜 세포분열의 촉진 정도를  $^3\text{H}$ -thymidine이 결합되는 정도를 가지고 측정하였다. 한편 BQ123와  $\text{N}^G$ -methyl-L-arginine을 함께 반응시켜 그 영향을 확인하였다.

#### 결 과 :

기본배지로서 사용한 0.4% FBS-DMEM에서 측정한 cpm을 기준으로, 돼지의 대동맥 혈관평활근세포를  $10^{-8}$  M의 ET-1을 반응시킨 경우 약 2.5배의 증가를 보였고, 20 ng/mL의 PDGF를 반응시킨 경우 약 4.8배의 증가를 보였는데,  $10^{-8}$  M의 ET-1과 20 ng/mL의 PDGF를 동시에 반응시킨 경우 약 8.8배의 현저한 증가를 보였다. ET-1의 세포분열 촉진작용은 BQ123에 의해 억제되었지만, ET-1과 PDGF의 작용은 BQ123에 의해 억제되지 않았고,  $\text{N}^G$ -methyl-L-arginine을 반응시키면 세포분열이 오히려 촉진되었다.

#### 결 론 :

ET-1의 돼지의 대동맥 혈관평활근세포에 대한 세포분열 촉진작용은 단독으로는 미약하였지만, 이를 PDGF와 함께 작용시키면 ET-1이나 PDGF를 단독으로 반응시킨 작용의 합보다 훨씬 강력한 세포분열 촉진작용을 보였다. 따라서 ET-1은 그 단독으로는 대동맥 혈관평활근세포의 분열 촉진작용을 나타내는데 중추적인 작용을 하지는 않는다고 사료되었고, PDGF와 같은 co-mitogen이 존재할 경우 강력한 세포분열 촉진작용을 나타낸다고 사료되었으며, ET-1의 혈관평활근세포 분열 촉진작용은 일부  $\text{ET}_A$  수용체를 통하여 일어난다고 사료되었다.

## References

- 1) Raines EW, Ross R : *Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis*. Br

- Heart J* 69(Suppl) : S30-S37, 1993
- 2) Ross R : *The pathogenesis of atherosclerosis-an update*. *N Engl J Med* 314 : 488-500, 1986
- 3) Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH : *Replication of smooth muscle cells in vascular disease*. *Cir Res* 58 : 427-444, 1986
- 4) Schwartz SM, Reidy M : *Common mechanisms of proliferation of smooth muscle in atherosclerosis and hypertension*. *Hum Pathol* 18 : 240-247, 1987
- 5) Rubanyi GM : *The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases*. *J Cardiovasc Pharmacol* 8 : 344-348, 1993
- 6) DiCorleto PE : *Cellular mechanisms of atherogenesis*. *Am J Hypert* 6 : 314S-318S, 1993
- 7) Dzau VJ, Gibbons GH : *Endothelium and growth factors in vascular remodeling in hypertension*. *Hypertension* 18(suppl III) : III-115-III-121, 1991
- 8) Bobik A, Campbell JH : *Vascular derived growth factors : cell biology, pathophysiology and pharmacology*. *Pharmacol Rev* 45 : 1-42, 1993
- 9) Castellot JJ, Addonizio ML, Rosenberg RD, Karnowsky MJ : *Cultured endothelial cells produce a heparin-like inhibitor of smooth muscle growth*. 90 : 372-379, 1981
- 10) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T : *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. *Nature* 322 : 411-415, 1988
- 11) Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr : *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis*. *N Engl J Med* 325 : 997-1001, 1991
- 12) Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K, Sakakibara S : *Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 154 : 868-872, 1988
- 13) Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F : *Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis* 78 : 225-228, 1989
- 14) Weissberg PL, Witchell C, Davenport AP, Hesketh TR, Metcalfe JC : *The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin S6b are co-mitogenic with platelet-derived growth factor for vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis* 85 : 257-

262, 1990

- 15) Nilson J, Sjolund M, Palmberg L, Thyberg J, Heldin DH : *Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein. Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 4418-4421, 1985
- 16) Hassoun PM, Thappa V, Landman MJ, Fanburg BL : *Endothelin 1 : mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells. Proc Soc Exp Biol Med* 199 : 165-170, 1992
- 17) Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, Stelzner TJ : *BQ123, and ET<sub>A</sub> receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Resp Cell Mol Biol* 9 : 429-433, 1993
- 18) Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA : *Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. J Biol Chem* 269 : 10112-10118, 1994
- 19) Bobik A, Grooms A, Miller JA, Mitchell A, Grinpukel S : *Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. Am J Physiol* 258(Cell Physiol 27) : C408-C415, 1990