

Statin이 ADP에 의해서 활성화된 대동맥평활근 세포의 증식과 부착에 미치는 영향

제주대학교 의과대학 내과학교실,¹ 고신대학교 의과대학 내과학교실²
주승재¹ · 이수창² · 이재우²

Statins Inhibited the ADP-Stimulated Activation of Integrins $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_v\beta_3$ of Vascular Smooth Muscle Cells

Seung-Jae Joo, MD¹, Soo Chang Lee, MD² and Jae Woo Lee, MD²

¹Department of Internal Medicine, Cheju National University Hospital, Jeju, Korea

²Department of Internal Medicine, Kosin University Gospel Hospital, Busan, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Integrins mediate the migration, adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells. Adenosine diphosphate (ADP) can activate vascular integrins. We assessed the hypothesis that 'statins inhibit the ADP-stimulated activation of integrins $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_v\beta_3$ in human aortic smooth muscle cells (HASMC)'. **Materials and Methods :** The expressions of integrins were analyzed using flow cytometry. The activations of integrins were evaluated using the adhesion assay, with prothrombin as an activation-dependent ligand. The MTT assay was used to evaluate the proliferation. **Results :** Statins did not suppress the expressions of the integrins, $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_v\beta_3$. The ADP-stimulated adhesion was partially prevented by LM609, which blocked integrin $\alpha_v\beta_3$ (13% inhibition), and markedly prevented by P1F5, which blocked integrin $\alpha_v\beta_5$ (76% inhibition; n=5, p<0.05). However, the proliferation was inhibited by c7E3 and LM609, but not by P1F5. Statins inhibited the ADP-stimulated adhesions in a dose-dependent manner after 15 min of pretreatment. After incubating HASMC with statins for 1 day, simvastatin and fluvastatin inhibited the adhesion by 70 and 66%, respectively (n=5, p<0.05 vs. no statin). Statins also inhibited the ADP-stimulated proliferation of HASMC. **Conclusion :** Statins did not suppress the expressions of the integrins, $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_v\beta_3$, but did inhibit the ADP-stimulated activation of the integrins of HASMC. (Korean Circulation J 2006; 36:809-816)

KEY WORDS : Adenosine diphosphate ; Integrins ; Myocytes, smooth muscle.

서 론

고콜레스테롤혈증은 동맥경화의 주된 위험 인자로 작용하며 혈중 콜레스테롤치를 낮추면 심혈관계 질환의 발생 위험이 감소한다.¹⁾ 고콜레스테롤 혈증 환자의 치료를 위해서 임상에서 널리 사용되고 있는 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme

A(HMG-CoA) reductase 억제제인 statin은 대규모의 임상 연구에서 심혈관계 질환의 발생과 사망을 감소시켰으며,^{2,3)} 혈중 콜레스테롤치가 그리 높지 않은 환자에게 statin을 투여해도 심혈관계 합병증의 감소 효과가 있고⁴⁾ statin이 관동맥에 형성되어 있는 죽종의 크기를 줄이지는 못해도 statin의 심혈관계 질환에 대한 좋은 임상 효과는 여전히 관찰된다는 연구들이 발표되면서⁵⁾ statin의 다양한 효과에 대한 관심이 고조되고 있다.⁶⁾

활성화된 혈소판의 dense granule이나 손상된 세포에서 분비되는 adenosine diphosphate(ADP)는 혈소판 표면에 있는 휴지 상태의 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 를 활성화시켜서 혈소판을 응집시킨다.⁷⁾ 최근에 ADP는 혈관 평활근세포의 증식을 증가시

논문접수일 : 2006년 8월 16일

수정논문접수일 : 2006년 11월 15일

심사완료일 : 2006년 12월 20일

교신저자 : 주승재, 690-716 제주도 제주시 삼도2동 154

제주대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (064) 750-1214 · 전송 : (064) 756-7181

E-mail : sejjoo@cheju.ac.kr

키는 유사분열물질(mitogen)로 작용하며 세포외기질에 대한 혈관 평활근세포의 부착과 이동을 증가시킨다고 보고되었는데, 이러한 과정에 혈관평활근 세포의 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 중요한 역할을 한다.⁸⁾

Statin은 콜레스테롤 합성과정의 중간 산물인 mevalonic acid와 isoprenoid인 farnesyl pyrophosphate와 geranylgeranyl pyrophosphate의 합성을 억제하고 세포 주기의 G₁기에서 S기로 전환되는 것을 차단하여 혈관 평활근세포의 증식을 억제한다.⁶⁾ Farnesyl pyrophosphate와 geranylgeranyl pyrophosphate는 GTP 결합 단백질 Ras와 Ras양 단백질(Rho, Rab, Rac, Ral, Rap 등)의 유전암호해독후 변화(posttranslational modification)를 위한 중요한 지질 부착물로 작용하는데,⁹⁾ statin은 Ras와 Rho의 isoprenylation을 억제하여 세포질에 불활성 Ras와 Rho를 축적시켜서 심혈관계 보호 효과를 나타내는 것으로 생각되고 있다. 또한 활성화된 integrin의 신호 전달 과정에 Rho-family GTPase가 중요한 역할을 담당한다. 활성화된 Rho GTPase는 integrin에 의한 세포 증식, 유전자 발현과 actin의 전환과 중합 반응을 조절한다.¹⁰⁾ Rac은 내피 세포의 이동과 혈관신생에 필수적인 역할을 한다.¹¹⁾ 따라서 statin이 Rho와 Rac의 기능을 조절할 수 있으므로 integrin의 기능에도 영향을 미칠 수 있을 것이다. Statin이 integrin에 미치는 영향에 대한 최근 연구에서 statin이 단핵구의 integrin β_2 의 발현을 감소시켰지만¹²⁾ 사람 혈관평활근 세포에서는 integrin α_2 와 β_1 의 발현을 증가시켰다는 보고가 있다.¹³⁾ 그러나 statin이 혈관 평활근세포에 있는 다른 integrin의 발현과 기능에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된바 없다. 만약 statin이 혈관 평활근세포의 integrin에 영향을 미친다면 ADP에 의해서 활성화되는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 기능을 조절하여 ADP에 의한 혈관평활근 세포의 증식과 부착에 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 이 연구에서는 HMG-CoA reductase 억제제인 simvastatin과 fluvastatin이 혈관 평활근세포에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현과 ADP에 의한 혈관 평활근세포의 증식과 부착에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시 약

Adenosine diphosphate(ADP), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), sodium dodecyl sulfate(SDS) 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)에서, integrin β_3 에 대한 humanized monoclonal antibody(mAb)인 c7E3는 Centocor사(Malvern, PA, USA)에서, 그리고 $\alpha_v\beta_3$ -specific mAb인 LM609, $\alpha_v\beta_5$ -specific mAb인 P1F5 및 FITC-conjugated

goat anti-mouse IgG는 Chemicon사(Temecula, CA, USA)에서 각각 구입하였다. Simvastatin과 fluvastatin은 각각 CJ 제약사업본부(서울)와 한국노바티스(서울)에서 무상으로 제공해 주었다.

세포 배양

Dr. Paul DiCorleto(Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA)가 일차배양하여 제공한 사람 대동맥평활근 세포(human aortic smooth muscle cell: HASMC)를 사용하였다. 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.

유세포분석(Flow cytometry)

HASMC가 75 cm² 플라스틱 바닥을 60~70% 정도 덮었을 때 simvastatin 혹은 fluvastatin 5 μ M을 첨가하여 24시간 배양한 후에 세포를 수집하여 HASMC의 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현을 유세포분석기로 측정하였다. HASMC를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 0.01% 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. 100 μ L의 세포 부유액을 20 μ g/mL 농도의 LM609과 P1F5와 각각 4°C에서 1시간 반응시켰다. 차가운 PBS로 세포를 3회 세척한 후 20 μ g/mL 농도의 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG와 4°C에서 45분간 배양하였다. 다시 차가운 PBS로 세포를 3회 세척한 후 PBS 500 μ L에 세포를 재부유시킨 후 동량의 2% paraformaldehyde를 첨가하여 고정시켰다. 유세포분석에는 Becton Dickinson 사의 FACStar 유세포 분석기와 Hewlett-Packard Consort 30 H-P 217 computer(Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 단세포군 항체와 반응시키지 않은 세포를 음성 대조군으로 하였다.

MTT assay

MTT assay를 사용하여 생존세포의 양을 측정하였다. 유세포분석에서 기술한 방법으로 세포를 수집한 후 세포 부유액을 즉시 500×g에서 10분간 원심 분리하고 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 5×10⁴ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 96-well plate(CoStar사)의 각 well에 세포 부유액을 200 μ L(10⁴ cells)씩 넣고 37°C에서 1일간 배양하였다. 이후 0.1% FBS를 함유한 DMEM/F12로 1일간 배양하여 세포 증식을 정지시킨 후 다양한 농도의 simvastatin 혹은 fluvastatin을 첨가하고 100 μ M의 ADP와 1% FBS가 포함된 DMEM/F12 혹은

10% FBS가 포함된 DMEM/F12로 배양하였다. 각각의 농도별로 최소 6개의 well을 배정하였다. 2일간 배양한 후 MTT assay를 시행하였다. 각각의 well에 2.5 mg/mL의 MTT 용액을 10 μ L씩 첨가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 4시간 경과 후 각 well에서 150 μ L의 상층액을 조심스럽게 제거하고 0.04 M HCl를 함유한 isopropanol 100 μ L을 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. ADP 100 μ M 혹은 10% FBS가 함유된 배양액을 첨가한 well의 세포 증식을 양성 대조치로 하였다.

증식 세포수의 측정

유세포분석에서 기술한 방법으로 세포를 수집한 후 세포 부유액을 500 \times g에서 10분간 원심 분리하고 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 5 \times 10⁴ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 12-well plate(CoStar사)의 각 well에 세포 부유액 1 mL씩 넣고 37°C에서 1일간 배양하였다. 이후 FBS를 함유하지 않은 DMEM/F12로 1일간 배양하여 세포 증식을 정지시킨 후 다양한 농도의 simvastatin 혹은 fluvastatin를 첨가하고 100 μ M의 ADP와 1% FBS가 포함된 DMEM/F12 혹은 10% FBS가 포함된 DMEM/F12로 48시간 배양하였다. Trypsin으로 처리하여 각 well의 세포를 수집한 후 0.4% trypan blue solution으로 염색하고 생존 세포수를 hemocytometer로 측정하였다.

부착 정량(Adhesion assay)

96-well plate의 각 well에 완충용액(50 mM NaHCO₃, 150 mM NaCl, pH 8.0)에 녹아 있는 prothrombin을 5 μ g씩 넣고, 4°C에서 밤새 처리하였다. 이후 PBS로 3회 세척한 후 각 well에 2% BSA를 넣고 37°C에서 1시간 처리하였다. 유세포분석에서 기술한 방법으로 세포를 수집한 후 세포 부유액을 즉시 500 \times g에서 10분간 원심 분리하고 10% FBS를 함유한 DMEM/F12에 2 \times 10⁵ cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 세포 부유액에 CaCl₂ 1 mM을 첨가한 후 100 μ M의 ADP로 HASMC를 자극하였으며 준비된 96-well plate의 각 well에 세포 부유액 100 μ L(2 \times 10⁴ cells)씩 넣고 37°C에서 배양하였다. 단세포균 항체의 효과를 측정할 때는 ADP로 세포를 자극하기 전에 15분간 적정 농도로 세포와 반응시켰다. Statin의 효과를 측정할 때는 ADP로 세포를 자극하기 전에 15분간 다양한 농도로 세포와 반응시키거나 statin을 첨가하여 1일간 배양한 후 부착 정량을 하였다. 30~50분 후에 부착된 세포를 도립현미경으로 관찰한 후 PBS로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 4% paraformaldehyde로 실온에서 5분간 고정시키고 4% formaldehyde에 있는 0.5% toluidine blue로 5분간 염색하였다. 이후 1% SDS 100 μ L을 각 well에 넣어서 세포를 용해시켰으며 모든 세포가 녹은 것을 확인한

후 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 광학도를 측정하였다. 각 well의 측정치에서 ADP로 자극하지 않은 세포의 측정치와 BSA에 부착된 세포의 측정치를 빼서 ADP에 의한 부착 증가를 계산하였다. 단세포균항체와 statin의 효과를 측정할 때는 100 μ M의 ADP로 자극된 세포의 측정치를 대조치 100%로 삼았다.

통계 분석

모든 통계 값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 단세포균항체와 statin의 증식과 부착 억제 효과를 비교하기 위해서 Student's t-test를 시행하였다. P값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

Statin이 사람 대동맥평활근세포의 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현에 미치는 영향

HASMC에는 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다 더 많이 분포되어 있었는데, 5 μ M의 simvastatin이나 fluvastatin와 1일간 배양하여도 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현은 증가되거나 감소되지 않았다(Table 1).

ADP가 사람 대동맥평활근세포의 증식과 부착에 미치는 영향과 integrin의 연관성

저자들의 이전 연구에서 ADP의 농도에 비례해서 HASMC의 증식과 prothrombin에 대한 부착이 점차 증가하여 100 μ M에서 최대치에 도달하였다.⁸⁾

ADP에 의해서 활성화되는 integrin을 찾기 위해서 각각의 integrin과 결합하는 mAb를 사용하였다. Prothrombin을 활성화 의존 리간드로 사용한 부착 정량에서 integrin β_3 차단 항체인 c7E3(40 μ g/mL)는 ADP에 의한 HASMC의 부착에 영

Table 1. Flow cytometric analysis of the expression of integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$

	MFI	% positive cells
Day 0		
Control	7	
LM609	27	26%
P1F5	100	91%
Day 1		
Simvastatin		
Control	8	
LM609	27	22%
P1F5	104	90%
Fluvastatin		
Control	14	
LM609	27	23%
P1F5	110	92%

MFI: mean fluorescence intensity

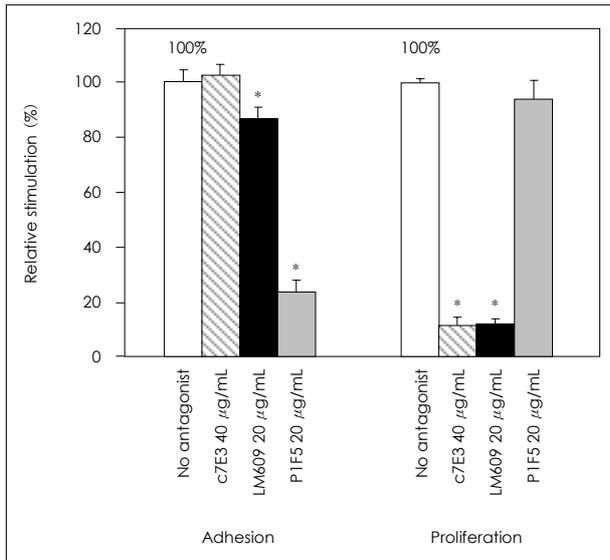


Fig. 1. Effect of integrin antagonists on ADP-stimulated proliferation and adhesion of human aortic smooth muscle cells. The proliferation and adhesion in the presence of 100 μM ADP without blocking monoclonal antibodies (mAb) (open bars) was assigned a value of 100%. The adhesion was prevented partially by LM609 (black bars), which blocks integrin α_vβ₃ (13% inhibition) and markedly by P1F5 (gray bars), which blocks integrin α_vβ₅ (76% inhibition; n=5, p<0.05). However, the proliferation was inhibited by c7E3 (striped bars), which blocks integrin β₃, and LM609 (88%; n=4, p<0.05), but not by P1F5. The data shown are means and 1 SEM of pentaplicates (adhesion) or quadruplicates (proliferation) in one experiment and are representative of three separate experiments. *: p<0.05 vs. no antagonist, ADP: adenosine diphosphate, SEM: standard error of mean.

향을 미치지 않았다. Integrin α_vβ₃에 대해서 c7E3보다 더 특이적인 차단항체인 LM609(20 μg/mL)에 의해서는 HASMC 부착이 13% 억제되었다(n=5, p<0.05). 그러나 integrin α_vβ₅ 차단 항체인 P1F5(20 μg/mL)에 의해서는 HASMC 부착이 76% 억제되었다(n=5, p<0.01)(Fig. 1). ADP에 의한 혈관 평활근 세포의 증식은 다른 양상을 보였는데 P1F5(20 μg/mL)에 의해서는 억제되지 않았지만 c7E3(40 μg/mL)와 LM609(20 μg/mL)에 의해서는 각각 88% 억제되었다(n=4, p<0.05)(Fig. 1).

Simvastatin과 Fluvastatin이 사람 대동맥평활근세포의 증식에 미치는 영향

Simvastatin과 fluvastatin은 용량에 비례하여 MTT assay로 측정된 ADP에 의한 HASMC의 증식을 억제하였다. Simvastatin은 10 μM과 100 μM에서 각각 18%와 53% 억제하였으며(n=6, p<0.05), fluvastatin은 10 μM과 100 μM에서 각각 10%와 23% 억제하였다(n=6, p<0.05)(Fig. 2). 10% FBS를 첨가한 배지로 배양한 HASMC의 증식도 simvastatin과 fluvastatin에 의해서 용량에 비례하여 억제되었다.

Trypan blue 염색에 의한 생존 세포수 측정에서도 simvastatin과 fluvastatin 10 μM이 ADP에 의한 HASMC의 증식을 각각 35%와 34% 억제하였다(n=3, p<0.05)(Fig. 3).

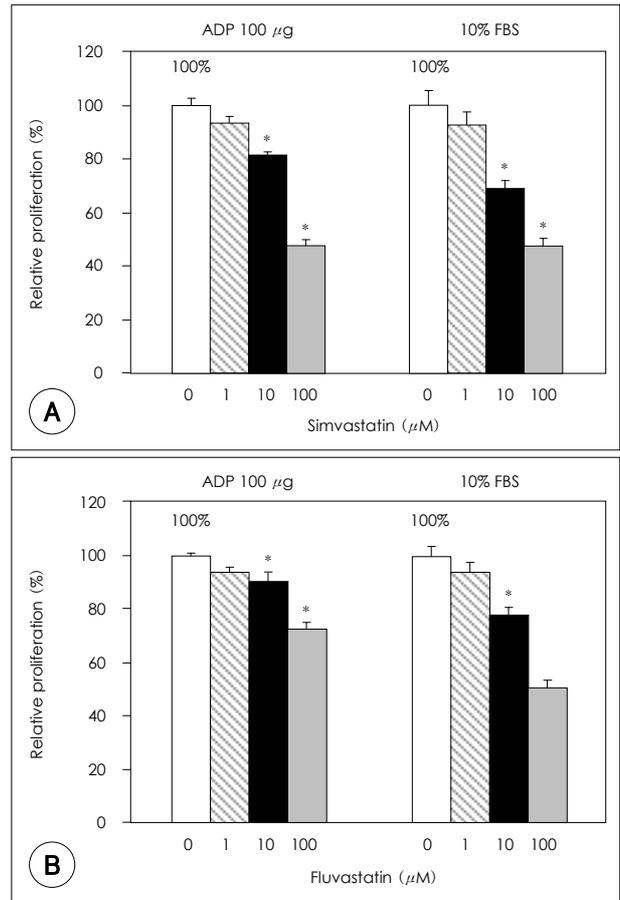


Fig. 2. Effect of statins on the proliferation of human aortic smooth muscle cells evaluated by MTT assay. The proliferation in the presence of 100 μM ADP without statins (open bars) was assigned a value of 100%. Simvastatin (A) and Fluvastatin (B) inhibited the ADP-stimulated proliferation of HASMC in a dose-dependent manner (at 10 μM, 18% and 10% inhibition; at 100 μM, 53% and 23% inhibition, respectively; n=6, p<0.05). The data shown are means and 1 SEM of hexaplicates in one experiment and are representative of three separate experiments. *: p<0.05 vs. no statin, MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, ADP: adenosine diphosphate, HASMC: human aortic smooth muscle cell, SEM: standard error of mean.

Simvastatin과 Fluvastatin이 사람 대동맥평활근세포의 부착에 미치는 영향

Simvastatin과 fluvastatin이 ADP에 의해서 활성화된 HASMC의 prothrombin 부착에 미치는 영향을 평가하기 위해서 우선 HASMC를 ADP로 자극하기 15분전에 각각의 statin으로 처리하였다. Simvastatin은 용량에 비례하여 HASMC의 부착을 감소시켰지만 100 μM에서만 통계적인 유의성이 있었다(n=5, p<0.05)(Fig. 4). Fluvastatin은 10 μM과 100 μM에서 용량에 비례하여 HASMC의 부착을 감소시켰다(n=5, p<0.05). 부착 정량 1일전에 simvastatin과 fluvastatin을 배지에 첨가하여 배양한 후 시행한 부착 정량에서는 5 μM의 농도에서 HASMC의 부착을 각각 70%와 66% 억제하였다(n=5, p<0.05)(Fig. 5).

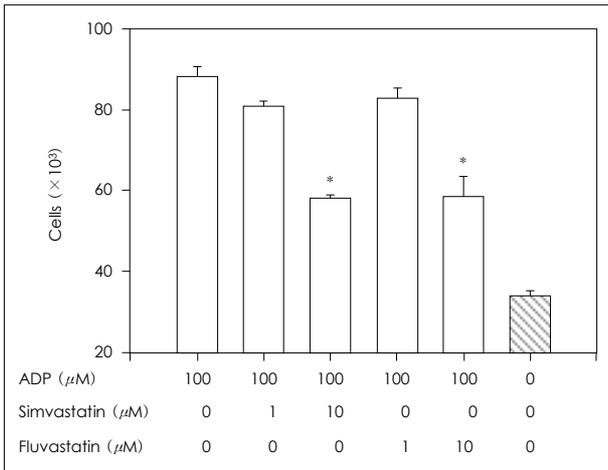


Fig. 3. Effect of statins on the proliferation of human aortic smooth muscle cells evaluated by trypan blue staining. Simvastatin and fluvastatin inhibited ADP-stimulated proliferation in a dose-dependent manner. The data shown are means and 1 SEM of triplicates in one experiment and are representative of three separate experiments. *: p<0.05 vs. no statin, ADP: adenosine diphosphate.

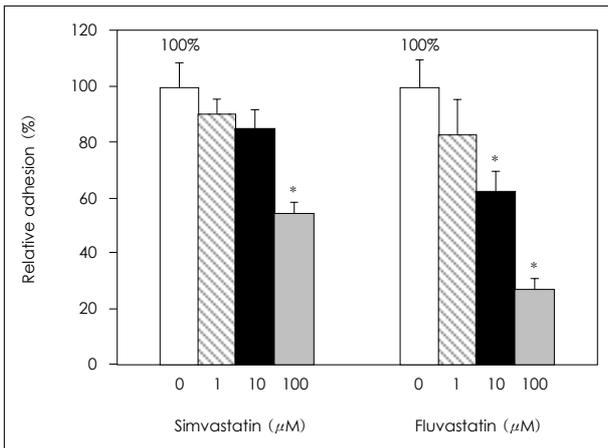


Fig. 4. Effect of statins on ADP-stimulated adhesion of human aortic smooth muscle cells (HASMC) to prothrombin after 15 min pretreatment. The adhesion in the presence of 100 μM ADP without statins (open bars) was assigned a value of 100%. Simvastatin and fluvastatin inhibited the adhesions in a dose-dependent manner (at 10 μM, 15% and 27% inhibition; at 100 μM, 45% and 72% inhibition, respectively; n=5, p<0.05). The data shown are means and 1 SEM of pentaplicates in one experiment and are representative of three separate experiments. *: p<0.05 vs. no statin, ADP: adenosine diphosphate.

고 찰

이 연구에서 statin이 HASMC의 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현을 증가시키거나 감소시키지 않았지만 그 기능에 영향을 미쳐서 ADP에 의한 HASMC의 증식과 부착을 감소시켰다. Integrin의 중요한 특징 중 하나는 그것이 활성화 혹은 휴지 상태로 존재한다는 점인데,¹⁴⁾¹⁵⁾ ADP는 활성화된 혈소판의 dense granule이나 손상된 세포에서 분비되어 혈소판 표면에 있는 휴지 상태의 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 를 활성화시켜서 혈소판을 응집시킨다.⁷⁾ ADP는 또한 사람 혈관 평활근세포에 존

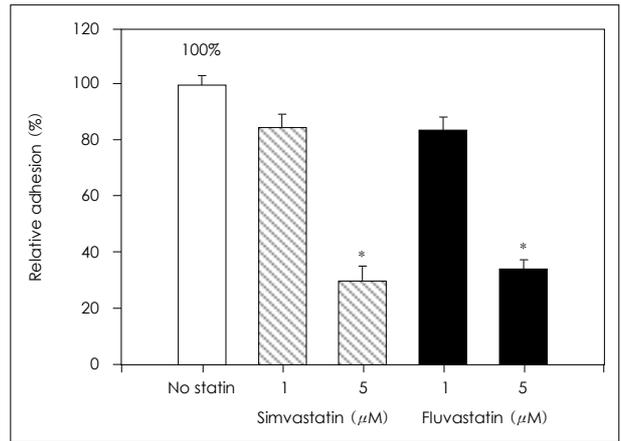


Fig. 5. Effect of statins on ADP-stimulated adhesion of human aortic smooth muscle cells (HASMC) to prothrombin after 1 day incubation. The adhesion in the presence of 100 μM ADP without statins (open bars) was assigned a value of 100%. Simvastatin and fluvastatin of 5 μM inhibited the adhesions by 70% and 66%, respectively (n=5, p<0.05 vs. no statin). The data shown are means and 1 SEM of pentaplicates in one experiment and are representative of three separate experiments. *: p<0.05 vs. no statin, ADP: adenosine diphosphate.

재하는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 를 활성화시킬 수 있으며 prothrombin은 휴지 상태보다 활성화된 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 결합력이 월등히 큰 소위 “활성화 의존 리간드”로 알려져 있다.⁸⁾¹⁶⁾

혈관 평활근세포는 동맥경화의 진행에 필수적으로 관여하는 요소인데, integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 는 혈관 평활근세포에 분포하여 혈관 평활근세포의 이동과 증식에 중요한 역할을 담당한다. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 맥관형성(angiogenesis), 혈관내피세포와 평활근세포의 부착, 증식, 이동과 동맥 손상 후 내피 증식 등에 관여한다.¹⁷⁾ 혈관손상 후 증식된 신내막(neointima)에 있는 평활근세포에서 integrin β_3 의 발현이 증가하며, integrin β_3 가 혈관 평활근세포의 증식에 관여한다고 보고되었는데,¹⁸⁾ 현재 임상에서 사용되고 있는 integrin β_3 차단항체인 c7E3 (ReoPro®)는 혈관평활근세포의 이동과 부착을 억제한다.¹⁹⁾ Integrin $\alpha_v\beta_5$ 는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 α_v 소단위를 공유하고 있으며 혈관평활근세포와 죽상경화반에서 발견되고,²⁰⁾ 혈관 평활근세포의 이동과 부착에 관여한다.²¹⁾ 동맥경화의 진행 과정에서 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 어떤 역할을 하는지는 아직 불분명하지만 혈관 평활근세포와 죽상경화반에서 발견되고 혈관 평활근세포의 이동을 매개하므로 그 기능에 대한 관심이 고조되고 있다.

Statin이 세포부착분자(cell adhesion molecule)에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 미비하다. Fluvastatin이 사람 제대 정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cell)의 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)의 발현에는 영향을 미치지 않았지만 사람 단핵구의 lymphocyte function associated antigen-1과 ICAM-1의 발현을 감소시켜서 사람 제대정맥내피세포에 대한 단핵구의 부착을 감소시켰다는 보

고가 있다.²²⁾ Lovastatin도 단핵구의 integrin β_2 의 발현을 감소시켜서 내피 세포에 대한 단핵구의 부착을 억제하였고 이러한 작용이 혈중 콜레스테롤치 저하와 관련 없는 statin의 심혈관계 보호 효과 기전이 될 수 있다.¹²⁾ 그러나 atorvastatin은 사람 혈관평활근 세포에 있는 integrin α_2 와 β_1 의 발현을 증가시켜서 collagen I에 대한 혈관평활근 세포의 부착을 증가시켰지만 collagen I에 대한 혈관 평활근세포의 이동은 감소시켰다는 보고도 있다.¹³⁾ 이 연구에서 5 μ M의 simvastatin과 fluvastatin을 HASMC와 24시간 배양한 후 유세포 분석기로 측정된 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현에는 변화가 없었다.

ADP는 혈관 평활근세포의 증식을 증가시킬 수 있는 유사 분열 물질로 작용할 수 있고,⁸⁾ HASMC에 있는 integrin을 활성화 시켜서 prothrombin에 대한 HASMC의 부착을 증가시킨다.⁸⁾¹⁶⁾ ADP가 HASMC의 증식과 부착을 증가시키는 과정에 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 가 관여하는가를 알아보기 위해서 각각의 integrin에 대한 차단항체를 사용하였다. ADP에 의한 혈관 평활근세포의 prothrombin 부착은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 차단항체에 의해서 부분적으로 억제되었지만 integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단항체에 의해서는 거의 다 차단되어 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 주된 역할을 하고 있었다. 그러나 ADP에 의한 HASMC의 증식에서는 다른 양상을 보였는데, integrin $\alpha_v\beta_5$ 에 대한 차단항체에 의해서는 억제되지 않은 반면에 integrin β_3 나 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 차단항체에 의해서는 거의 다 억제되어 integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 ADP에 의한 HASMC의 증식에 더 밀접한 관련을 갖고 있음을 알 수 있었다.

Statin이 혈관 평활근세포의 증식과 혈관내피 손상 후 신내막의 형성을 억제하며, 그 과정에 콜레스테롤 합성의 중간 생성물인 isoprenoid가 관여한다는 것은 이미 여러 연구에서 입증되었다.²³⁾ 작은 GTP 결합 단백질인 Ras와 Rho는 유전암해독후 변화를 거쳐서 세포질에서 세포막으로 자리 옮김을 하고 활성화되어 세포 주기의 조절에 관여하기 때문에 statin의 항증식 효과의 표적이 될 수 있다. Ras는 mitogen-activated protein kinase pathway를 통해서 세포 주기의 진행을 촉진시키고²⁴⁾ Rho는 cyclin-dependent kinase(cdk) 억제제인 p27^{Kip1} 단백을 불안정화 시켜서 세포 증식을 유발한다.²⁵⁾ 그런데 statin의 혈관 평활근세포 증식 억제 효과가 geranylgeranyl pyrophosphate에 의해서 없어지지만 farnesyl pyrophosphate에 의해서는 차단되지 않는 것으로 미루어 Rho가 혈관 평활근세포의 증식에 관여하고 statin은 Rho의 작용을 억제하여 항증식 효과를 갖는다고 추정되고 있다.²⁶⁾

이 연구에서 simvastatin과 fluvastatin은 용량에 비례하여 HASMC의 증식을 억제하였는데 ADP의 증식 효과는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 의해서 매개되므로 simvastatin과 fluvastatin이 integrin $\alpha_v\beta_3$ 의 기능을 억제하여 HASMC의 증식이 억제되었을 가능성이 크다. 그러나 10% FBS를 함유한 배지로 배양한 HASMC의 증식도 simvastatin과 fluvastatin에 의해서 같은 정도로 억제되는 것으로 미루어보아 integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 관

여하지 않는 경로를 통해서 statin이 Rho의 작용을 직접적으로 억제하여 ADP에 의한 HASMC의 증식을 억제하였을 가능성도 있다. 그래서 다음 단계로 statin이 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 활성화 과정에 미치는 영향을 조사하였다.

Integrin의 활성화 상태를 조사하는데는 휴지 상태의 integrin 보다 활성화된 integrin에 친화력이 큰 리간드를 사용한다. 이 연구에서 prothrombin을 활성화 의존 리간드로 사용하여 부착 정량을 시행하였다. 그 결과 ADP는 HASMC의 prothrombin 부착을 급격히 증가시켰는데, 각각의 integrin에 대한 차단항체를 사용한 부착 정량에서 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 주된 역할을 하고 있었지만 이 연구에 사용된 HASMC에 integrin $\alpha_v\beta_5$ 가 integrin $\alpha_v\beta_3$ 보다 더 많이 분포되어 있었기 때문에 생긴 결과이며 integrin $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 차단항체도 부분적으로 HASMC의 부착을 억제하는 것으로 보아 ADP가 integrin $\alpha_v\beta_5$ 뿐만 아니라 integrin $\alpha_v\beta_3$ 도 활성화시키는 것으로 생각되었다. ADP로 HASMC를 자극하기 15분전에 simvastatin과 fluvastatin을 첨가하여 시행한 부착정량에서는 비교적 고농도(100 μ M)에서만 HASMC의 부착이 억제되었으나 HASMC와 statin을 미리 24시간 배양한 후 시행한 부착정량에서는 비교적 저농도(5 μ M)에서도 HASMC의 부착이 거의 다 억제되었다. 이러한 결과에서 statin이 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 활성화 과정을 직접적으로 억제하였으며 그 억제 효과가 발생되기 위해서는 콜레스테롤 합성의 중간 산물의 생성을 감소시킬 수 있는 충분한 시간 동안 statin이 HASMC과 작용해야 함을 알 수 있다.

이 연구의 제한점으로 statin이 ADP에 의한 HASMC의 증식과 부착을 억제하는 과정에 기존의 연구 결과와 같이 geranylgeranyl pyrophosphate와 Rho 혹은 Rac이 직접적으로 관여하였는지 조사하지 않았는데 향후 isoprenoid가 statin의 항증식효과와 부착 억제 효과를 상쇄시킬 수 있는지를 알아보기 위한 실험과 Rho와 Rac의 활성화에 미치는 영향에 대한 실험이 필요하다. 또한 statin은 HASMC에 대한 항증식효과가 있을 뿐만 아니라 세포자멸사(apoptosis)를 항진시켜서 생존 세포 수를 감소시킬 수 있으므로²⁷⁾²⁸⁾ 이에 대한 연구도 필요하다. 이러한 제한점에도 불구하고 statin은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현을 증가시키지 않았지만 그 기능을 조절할 수 있음을 알 수 있었으며 이것이 statin의 심혈관계 보호 효과의 기전 중 하나가 될 것이다.

요 약

배경 및 목적 :

Integrin은 혈관 평활근세포의 이동, 부착, 증식 등을 매개하며 adenosine diphosphate(ADP)는 혈관 integrin을 활성화시킬 수 있다. 이 연구에서는 statin이 사람 대동맥평활근 세포(human aortic smooth muscle cell: HASMC)에 있는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현과 ADP에 의한 HASMC의 증

식과 부착에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

방 법 :

유세포분석기를 이용하여 statin이 HASMC의 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현에 미치는 영향을 측정하였다. MTT assay를 이용하여 세포 증식 정도를 측정하였고, prothrombin 부착 정량을 이용하여 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 활성화 상태를 분석하였다.

결 과 :

Statin은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현에 영향을 미치지 않았다. ADP에 의한 HASMC의 부착은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 차단항체인 LM609에 의해서 13% 억제되었지만 integrin $\alpha_v\beta_5$ 차단항체인 PIF5에 의해서는 76% 억제되었다(n=5, p<0.05). 그러나 HASMC의 증식은 c7E3와 LM609에 의해서만 억제되었다(88%; n=4, p<0.05). HASMC의 부착은 simvastatin과 fluvastatin을 15분간 전처리 한 후에 10 μ M의 농도에서는 각각 15%와 27%, 100 μ M에서는 각각 45%와 72% 억제되었으며(n=5, p<0.05), 5 μ M의 농도로 24시간 배양한 후에는 각각 70%와 66% 억제되었다(n=5, p<0.05). ADP에 의한 HASMC의 증식은 statin에 의해서 농도에 비례하여 억제되었다.

결 론 :

Simvastatin과 fluvastatin은 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_v\beta_5$ 의 발현에는 영향을 미치지 않았지만 ADP에 의한 활성화에 영향을 미쳐서 HASMC의 증식과 부착을 억제하였다.

중심 단어 : Adenosine diphosphate ; Integrin ; 혈관평활근 세포.

이 연구는 2003년도 대한순환기학회 산학협동연구비의 보조로 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Gould AL, Rossouw JE, Santanello NC, Heyse JF, Furberg CD. Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation* 1998;97:946-52.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease. *Lancet* 1994;344:1383-9.
- Jun JE. Cholesterol lowering therapy in coronary artery disease: with particular reference to statins. *Korean Circ J* 2001;31:849-56.
- Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian cardiac outcomes trial-lipid lowering arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:1149-58.
- Pitt B, Mancini GB, Ellis SG, Rosman HS, Park JS, McGovern ME. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I): reduction in atherosclerosis progression and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1133-9.
- Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-9.
- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995;332:1553-9.
- Joo SJ, Cha TJ, Lee JW. Integrins mediating adhesion and proliferation of ADP-stimulated vascular smooth muscle cells. *Korean Circ J* 2003;33:409-19.
- van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-322.
- Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000;348:241-55.
- Dormond O, Foletti A, Paroz C, Ruegg C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* 2001;7:1041-7.
- Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1212-7.
- Graf K, Kappert K, Stawowy P, et al. Statins regulate alpha2 beta1-integrin expression and collagen I-dependent functions in human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:89-96.
- Joo SJ, Lee JW, Park YS. Increased activation of platelet glycoprotein IIb/IIIa in hypercholesterolemic patients. *Korean Circ J* 1998;28:2030-41.
- 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.
- Byzova TV, Plow EF. Activation of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol* 1998;143:2081-92.
- Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin in vascular biology. *Thromb Haemost* 1998;80:726-34.
- Stouffer GA, Hu Z, Sajid M, et al. 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.
- 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.
- Dufourcq P, Louis H, Moreau C, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:168-76.
- Kappert K, Blaschke F, Meehan WP, et al. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res Cardiol* 2001;96:42-9.
- Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 1996;18:669-75.
- Bellosta S, Bernini F, Ferri N, et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998;137 (Suppl): S101-9.
- Hughes DA. Control of signal transduction and morphogenesis by Ras. *Semin Cell Biol* 1995;6:89-94.
- Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996;271:1861-4.
- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of

p27 (*Kip1*). *J Biol Chem* 1999;274:21926-31.

- 27) Knapp AC, Huang J, Starling G, Kiener PA. Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis* 2000;152:217-27.
- 28) Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002;161:17-26.