

포도당, 인슐린 및 Angiotensin II가 흰쥐 대동맥평활근세포의 Plasminogen Activator Inhibitor-1 발현 및 성장에 미치는 영향

최 세 영* · 이 인 규** · 한 승 세*** · 김 재 현* · 박 창 권*
이 광 숙* · 유 영 선* · 김 기 식** · 김 윤 년** · 김 권 배**

=Abstract=

The Effects of Glucose, Insulin and Angiotensin II on Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression and Growth of Aortic Vascular Smooth Muscle Cell in Rats

Sae Young Choi, M.D. *, In Kyu Lee, M.D. **, Sung Sae Han, M.D. ***, Jae Hyun Kim, M.D. *,
Chang Kwon Park, M.D. *, Kwang Sook Lee, M.D. *, Young Sun Yoo, M.D. *,
Kee Sik Kim, M.D. **, Yoon Nyun Kim, M.D. **, Kwon Bae Kim, M.D. **

Background: Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) is known as the primary physiological inhibitor of tissue-type plasminogen activator(t-PA) in the plasma, and is present within the atherosclerotic vessels. Increased plasma levels of PAI-1 are one of the major disturbances of the hemostatic system in patients with diabetes and/or hypertension, and may have multiple interrelations with the important risk factors in the development of atherosclerosis. This study was performed to determine whether altered gene expression of PAI-1 occurs within the arterial wall, and thereby potentially contributing to the increase of cardiovascular risks associated with diabetes and/or hypertension. **Material and Method:** The aortic vascular smooth muscle cells of the rat were exposed to 22 mM glucose, angiotensin II, and insulin increased PAI-1 mRNA expression with the use of Northern blotting were examined. Also examined were the effects of 22 mM glucose, angiotensin II and insulin on the growth of the rat's aortic smooth muscle cells by using MTT assay. **Result:** Twenty-two mM glucose treatment increased the PAI-1 mRNA expression in a time- and dose-dependent manner. Angiotensin II treatment synergistically increased the glucose-induced PAI-1 mRNA expression. In contrast, addition of insulin attenuated the increase of 22 mM glucose and angiotensin II induced PAI-1 mRNA expression. Furthermore, treatment of 22 mM glucose, angiotensin II and insulin resulted in a significant increase in cell numbers.

*계명대학교 의과대학 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea

**계명대학교 의과대학 내과

Department of Internal Medicine, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea

***영남대학교 의과대학 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Yeungnam University, College of Medicine, Taegu, Korea

† 이 논문은 1997년도 동산의료원 특수과제 연구비로 이루어졌음.

논문접수일 : 98년 6월 30일 심사통과일 : 98년 9월 4일

책임저자 : 최세영, (700-712) 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대 흉부외과. (Tel) 053-250-7344, (Fax) 053-250-7370

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

This study demonstrated that 22 mM glucose and angiotensin II have a synergistic effect in stimulating the PAI-1 mRNA expression and in the cell growth of the rat's aortic smooth muscle cells. **Conclusion:** Elevation of glucose and angiotensin II may be important risk factors in impairing fibrinolysis and developing atherosclerosis in diabetic patients.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1999;32:333-40)

Key word : 1. Glucose
2. Insulin
3. plasminogen activator
4. Smooth muscle relaxation

서 론

당뇨병은 심혈관계 질환이나 신장질환, 망막질환 및 신경계질환 등의 많은 합병증을 유발한다. 이들 중 심혈관계 합병증은 주로 동맥경화증(atherosclerosis)에 의한 관상동맥질환이나 미세혈관질환 등이며 이들은 당뇨병의 유병률 및 사망율과 관련되는 중요한 합병증들이다.

고혈당, 고인슐린혈증 및 고혈압 등도 동맥경화증의 위험인자들인데 이들에게 있어서는 angiotensin II의 상승이 동맥경화증 발생 기전에 가장 중요한 것으로 설명되고 있다. Angiotensin II는 혈관활성 펩티드(vasoactive peptide)로 혈관평활근세포에 직접 작용하거나 혈관 내피세포에서 분비되는 endothelin-1¹⁾ 혹은 prostaglandin²⁾ 등의 혈관활성물질의 분비를 조절하여 혈관 긴장성을 조절한다. 또한 angiotensin II는 혈관 평활근세포의 세포분열과 단백질합성을 증가시키거나³⁾ 혈관이 비후되어^{4,5)} 혈관질환을 유발한다고 한다. Angiotensin II와 관련된 renin-angiotensin system의 중요성은 본태성 고혈압 뿐만 아니라^{6,7)} 좌심실의 비대⁸⁾, 심근병증⁹⁾, 심근경색¹⁰⁾ 및 당뇨병성 신증^{11,12)} 등과의 연관성에서 잘 알려지고 있다.

당뇨병에서는 혈액응고용해나 섬유소용해의 부전이 초래되는데 섬유소용해부전은 특히 plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)의 활성도 증가와 관련이 있다고 한다¹³⁾. PAI-1은 plasminogen이 plasmin으로 활성화되는 과정에 필요한 tissue plasminogen activator(t-PA)를 억제하는 물질로써 혈관내피세포와 간세포에서 주로 생성되는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 또한 혈관 평활근세포에서도 PAI-1이 생성되는 것이 증명되었다¹⁵⁾. 혈중 PAI-1의 농도가 증가되면 혈액응고와 혈전용해 과정에 불균형을 가져와 혈액응고의 과형성을 초래할 수 있으며^{16,17)} 실제로 PAI-1은 심부 정맥혈전증¹⁸⁾과 급성 심근경색¹⁹⁾에서 증가되어 나타나고 심근경색의 재발에 대한 중요한 예측인자로 확립될 수 있다²⁰⁾. 급성 심근경색 환자에서 안지오텐진전환효소(angiotensin converting enzyme:ACE) 억제제를 사용하는 경우에 심근경색의 재발이 감소하였고

이는 PAI-1 생산의 감소를 초래하는데 기인한다고 하였다²¹⁾. 본 연구는 고혈당, 인슐린 및 angiotensin II가 PAI-1의 생성 및 대동맥평활근세포 증식에 미치는 영향을 규명하기 위하여 흰쥐 대동맥평활근세포를 이용한 시험관 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

실험 동물은 무게 100 gm 정도의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 사용하였다. 약제는 D-glucose, angiotensin II(Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), Dulbecco's minimum essential medium(Gibco, Grand Island, USA; 이하 DMEM이라 함), fetal bovine serum(Gibco, Grand Island, USA; 이하 FBS라 함) 및 human insulin(Lilly Co, Detroit, USA) 등을 실험에 사용하였다.

실험 방법은 우선 흰쥐의 대동맥평활근세포(aortic smooth muscle cell)의 배양을 위해 흰쥐의 흉곽을 절개하고 흉부대동맥을 취하여 4°C phosphate buffered saline(PBS, Sigma, St. Louis, USA) 용액에 넣었다. PBS 용액에서 흉부대동맥 주변의 결체조직 및 혈관 내벽의 세포를 제거하고 길이로 절개하여 대동맥을 편후 2 mm² 크기로 잘게 나누어서 10 cm² 배양 접시에 붙였다. 그리고 100 mg/dL의 포도당이 포함된 DMEM에 10%의 FBS를 넣은 배양액을 넣은 후 배양하였다. 실험에는 4~8차의 계대배양 세포를 사용하였으며 세포를 밀생상태까지 배양한 후 2%의 FBS가 든 DMEM 배양액에서 각 군의 조건을 주어 실험하였다.

실험군별 조건은 포도당과 angiotensin II에 의한 PAI-1 mRNA의 발현을 보기 위하여 5.5 mM과 22 mM의 포도당이 첨가된 배양액에서 angiotensin II 100 nM을 투여하고 1시간, 4시간, 6시간 동안 배양하였다. Angiotensin II 농도에 따른 PAI-1 mRNA 발현을 보기 위하여 5.5 mM과 22 mM의 포도당이 든 배양액에서 첨가한 angiotensin II의 농도를 0, 10, 100, 200 nM로 하여 6시간 배양하였다. 또한 insulin과 angio-

tensin II 투여 후 PAI-1 mRNA의 발현을 보기 위하여 5.5 mM과 22 mM의 포도당이 든 배양액에 angiotensin II 100 nM을 단독으로 투여하거나 insulin 100 nM을 첨가하여 12시간 배양한 뒤 PAI-1 mRNA 발현을 관찰하였다. PAI-1 mRNA 발현을 관찰한 방법은 다음과 같다.

흰쥐의 PAI-1 cDNA 탐침은 배양된 대동맥평활근세포에서 충분한 양의 RNA를 분리하고 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법을 이용하여 제작하였다. 흰쥐 PAI-1 coding sequence에 따라 두 개의 oligonucleotide primers를 사용하였으며 그 primer의 염기 서열은 각각

5'-ATAGAATTCAACGAGTACGACATCCTGGAAGTGC-3'와
5'-ATAGGATCCCCCTCTGAGGTCACCTCAGTCTCC-3'였다.

RT-PCR 방법은 0.2 µg RNA에 1.0 mM의 primer를 넣고 20 mM dNTP(deoxynucleotide triphosphate)와 10 mM dithiothreitol, 50 mM Tris(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂와 reverse transcriptase(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)를 넣고 37°C에서 1시간 배양하였다. 1.0 mM의 각 primer와 10%의 RT혼합물, 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 2.0 mM dNTP와 0.05 µg/µl의 Amplitaq(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)를 넣고 94°C 30초, 59°C 2분, 72°C 30초의 조건으로 40회 PCR을 시행하였다. Agarose gel로 PCR 산물을 회수하여 Bluescript KS(Stratagene Inc, La Jolla, USA)를 이용하여 Eco RI 혹은 Bam HI restriction site에 cloning하여 사용하였다.

RNA 분리 및 Northern blot 분석은 RNAzol B 용액(Biotech, Houston, USA)으로 세포에서 total RNA를 분리하고 20 µg의 total RNA를 20 mM 3-[N-morpholino]propane sulfonic acid(MOPS)와 PH 7.0, 5 mM NaOAc가 든 1%(wt/vol) agarose gel에서 전기영동하여 모세혈관전이방법으로 Biotransmembrane(ICN pharmaceuticals, Irvine, USA)에 전이시킨 후 UV cross linking을 실시하였다. Agarose gel에서 분리한 위에서 만든 PAI-1 cDNA probe를 multiprime kit(Amersham Co, Arlington Heights, USA)를 이용하여 labelling한 뒤 NAP-5 column(Pharmacia, Piscataway, USA)으로 정제하여 hybridization에 사용하였다. Blot은 50 mM Pipes, 100 mM NaCl, 50 mM NaPO₄, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 0.1% Salmon Sperm DNA(Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) 및 5% sodium dodesyl sulfate(SDS)용액에 probe를 넣고 65°C에서 12시간 정도 hybridization을 실시하였다. 65°C에서 0.5× standard saline citrate(SSC)와 5% SDS로 세척한 후 X-ray 필름(Kodak Co, USA)에 48시간 이상 노출시킨 뒤 18s band와 함께 비교 분석하였다.

세포증식에 대한 영향을 보기 위하여 각각 5.5 mM과 22 mM의 포도당에 인슐린을 0, 1, 10 및 100 nM 씩 각각 첨가한 군과 angiotensin II를 1, 10, 100 nM씩 첨가한 군으로 나누어 관찰하였고, 5.5 mM 포도당에 인슐린이나 angiotensin II가 첨가되지 않은 상태에서의 세포성장을 대조값으로 하였다. 세포증식의 방법은 대동맥평활근세포를 96 well plate에 2×10⁶ cells/well이 되게 한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 subconfluent state까지 배양하고 다시 2% FBS가 든 DMEM 배양액에 넣어 실험군별로 조건을 주어 3일간 배양하였다. 여기에 10µl 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) labelling 용액을 넣고 4시간 배양한 후 solubilization 용액을 넣어 용해시킨 뒤(37°C, 12시간) enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader로 흡광도를 측정하여 세포성장을 비교하였다.

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 세 군 이상의 비교는 One-way ANOVA test(Scheffe test로 검증)로 실험군간의 차이를 비교하였으며 유의성 검정은 P<0.05인 경우로 하였다.

결 과

PAI-1 cDNA 탐침 제작은 흰쥐 대동맥평활근세포에서 분리한 RNA를 사용하여 reverse transcription(RT)을 시행한 후 유전자은행(Gene Bank)에 보고된 백서 PAI-1 염기서열에 해당하는 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 PAI-1 cDNA에 해당하는 198 bp의 동일한 염기서열을 지닌 PCR 산물을 얻었으며, 이를 TA vector에 cloning하여 255 bp 정도의 산물을 얻었다(Fig. 1).

포도당과 angiotensin II에 의한 PAI-1 mRNA 발현은 5.5 mM과 22 mM의 포도당이 각각 첨가된 배양액에서 angiotensin II 100 nM을 투여하고 1시간, 4시간, 6시간동안 배양하였을 때 포도당 농도와 angiotensin II 투여시간에 따른 PAI-1 mRNA 발현 정도를 비교하였다. 22 mM의 고농도 포도당 배양액에 배양하였을 때 PAI-1 mRNA 발현이 5.5 mM에서 보다 증가하였으며 angiotensin II 첨가 시에는 투여 후 4시간에 PAI-1 mRNA 발현이 최고치에 달하였으며 6시간까지 지속되었다(Fig. 2).

Angiotensin II 농도에 따른 PAI-1 mRNA 발현은 5.5 mM과 22 mM의 포도당이 든 각각의 배양액에서 0, 10, 100, 200 nM농도의 angiotensin II를 첨가한 후 6시간 배양하였을 때, PAI-1 mRNA의 발현은 angiotensin II의 농도에 따라 증가하였으며 22 mM 포도당 배양액에서 발현의 증가가 더욱 뚜렷하였다(Fig. 3).

5.5 mM과 22 mM의 포도당이 든 배양액에서 insulin 100

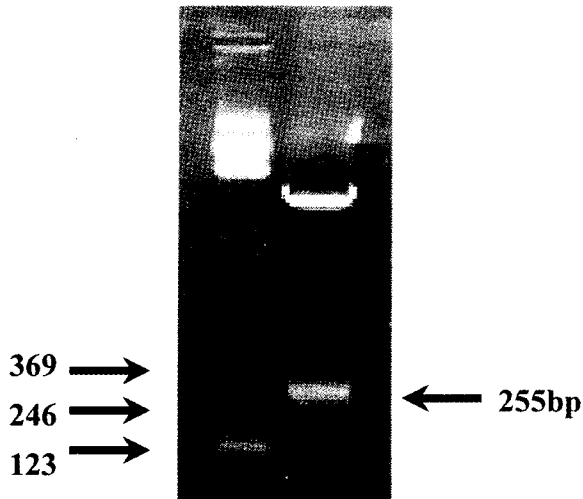


Fig. 1. Cloned plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) polymerase chain reaction (PCR) insert(255bp) was isolated from TA vector by digestion with Bam HI and Hind III, and was separated in a 1.5% agarose gel. PCR products were positioned above 246 molecular weight markers.

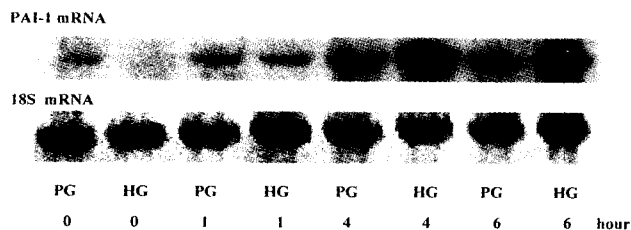


Fig. 2. Time course of angiotensin II-stimulated plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) mRNA expression in rat aortic smooth muscle cell. An increase in PAI-1 mRNA expression was observed after 1 hour of angiotensin II stimulation, and reached a maximum density after 4 hour which persisted for 6 hour in 22 mM glucose concentration. The 18S mRNA expression was shown as an internal standard. (PG; physiologic glucose, 5.5 mM glucose; HG; high glucose, 22 mM glucose).

nM과 angiotensin II 100 nM을 각각 투여한 후 12시간 동안 배양하여 PAI-1 mRNA의 발현을 관찰한 결과 angiotensin II 단독으로 투여한 경우 증가되었으나 insulin을 첨가한 경우 감소하였다(Fig. 4).

포도당 농도와 insulin 및 angiotensin II 농도에 따른 대동맥 평활근세포의 성장속도는 MTT assay(Beringer ManHeim, Germany)를 이용하여 비교하였으며, insulin(1, 10, 100 nM)과 angiotensin II(1, 10, 100 nM)를 각각 첨가한 후 대동맥평활근 세포의 성장속도를 관찰하였다. 5.5 mM의 포도당이 든 배양

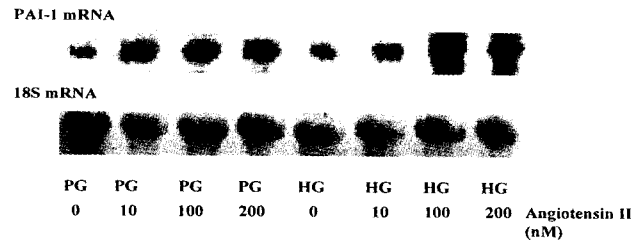


Fig. 3. Change of PAI-1 mRNA expression depending on angiotensin II concentrations in rat aortic smooth muscle cell. Angiotensin II-stimulated PAI-1 mRNA expression increased significantly in 22 mM glucose(HG) concentration compared to in 5.5 mM glucose(PG) concentration in a dose dependent manner.

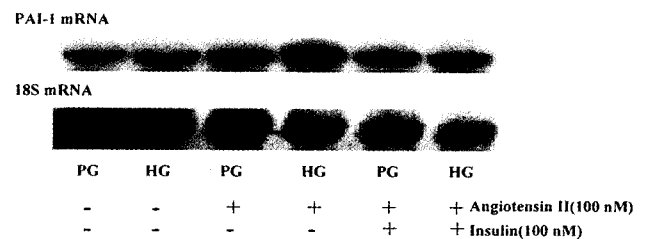


Fig. 4. Effect of insulin on angiotensin II-stimulated plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) mRNA expression in rat aortic smooth muscle cell. Angiotensin II stimulated PAI-1 mRNA expression increased in 22 mM glucose(HG) concentration, but addition of insulin attenuated the increase of PAI-1 mRNA expression. (PG, 5.5 mM glucose)

액에서 보다 22 mM의 포도당이 든 배양액에서 대동맥평활근세포의 성장이 증가되었고($P < 0.05$), insulin 혹은 angiotensin II를 첨가한 경우에 첨가하지 않은 경우에 비해서 성장이 증가되었으며($P < 0.05$), insulin과 angiotensin II의 농도가 높을수록 세포성장이 뚜렷이 증가되었다($P < 0.01$)(Fig. 5).

고찰

PAI-1은 혈장내 주요 plasminogen 활성화물질인 tissue plasminogen activator(t-PA)의 억제제로서 섬유소용해의 조절에 중요한 역할을 하고 있다¹⁴⁾. 혈중 PAI-1의 농도가 증가되면 혈액응고와 혈전용해 과정의 불균형으로 혈액응고를 초래할 수 있다. 실제로 급성 심근경색에서 PAI-1의 증가가 재발의 중요한 위험인자로 밝혀졌으며²⁰⁾ 혈전 관련 질환과 동맥경화증에서도 증가되는 것으로 알려지고 있다. Transgenic mice에서 PAI-1의 증가는 정맥폐색을 초래하여 허혈성 괴사를 일으킨다고 하였으며²²⁾ 근래에는 유전자 재조합에 의해 PAI-1 유전자를 삭제하면 혈전용해 작용이 증가된다는 보고

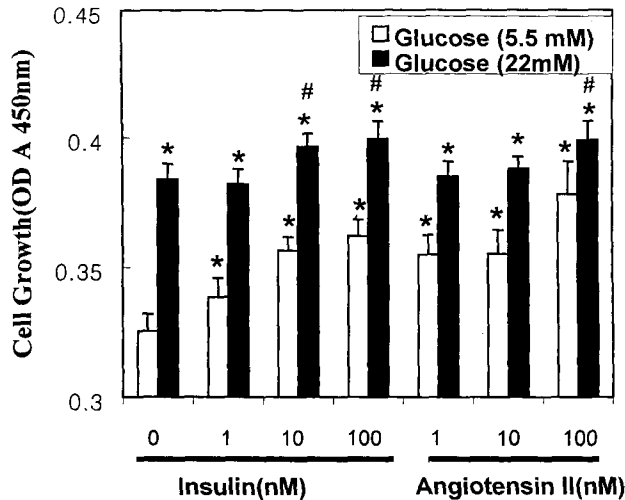


Fig. 5. Effects of glucose, insulin, and angiotensin II on growth of rat aortic smooth muscle cells. Cells were treated with 1% FBS, glucose(5.5 mM and 22 mM), insulin(0, 1, 10 and 100 nM) and angiotensin II(1, 10 and 100 nM). Treatment with 22 mM glucose concentration, insulin and angiotensin II resulted in a significant increase in cell numbers.

* P < 0.001 vs. control(glucose 5.5 mM, insulin 0 nM)
P < 0.05 vs. control(glucose 22mM, insulin 0 nM)

도 있다²³⁾.

Maiello 등은 당뇨병에서 동반되는 섬유소용해 부전의 기전을 규명하기 위하여, 5 mM, 30 mM 농도의 포도당이 각각 함유된 배양액에서 사람의 제대정맥 내피세포를 배양하여 관찰한 결과 30 mM농도에서 t-PA와 PAI-1 유전자 발현이 각각 142%, 183%씩 증가되어 고혈당은 t-PA와 PAI-1의 유전자 발현을 다 같이 증가시킨다고 하였다. 본 연구에서도 흰쥐의 대동맥평활근세포를 이용한 3일간의 배양에서 5.5 mM보다 22 mM 포도당 용액에서 PAI-1 유전자 발현이 뚜렷하게 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 고농도의 포도당이 PAI-1 유전자 발현을 증가시키므로 당뇨병에서 PAI-1의 증가와 함께 섬유소용해 부전이 초래될 수 있을 것으로 생각된다.

인슐린이 PAI-1에 미치는 영향에 대해 본 연구에서는 인슐린의 투여가 22 mM 포도당과 angiotensin II에 의해 증가된 PAI-1 mRNA 발현을 억제시켰다. 그러나 Kooistra 등²⁴⁾은 간세포 배양에서 인슐린이 PAI-1 mRNA의 발현을 증가시켰다고 하였으며 인슐린비의존형 당뇨병환자에서 PAI-1의 혈중 농도가 증가되었다는 보고 등은 본 연구의 결과와 상반된다. 그러나 이러한 결과들은 인슐린을 단독으로 사용하였고 본 연구에서는 22 mM 농도의 포도당과 angiotensin II로 자극하여 PAI-1 유전자 발현을 증가시킨 상태에서 인슐린을 추가

하여 시행하였으므로 상이한 결과를 나타낼 수 있다고 생각된다. 인슐린의 PAI-1에 대한 영향은 임상적으로 당뇨병 치료에 사용되는 인슐린이 섬유소용해 부전에 영향을 미치는 중요한 자료일 수 있으므로 향후 여러 농도의 인슐린에 대한 추가연구가 필요하다고 사료된다.

5.5 mM과 22 mM의 포도당 배양액에 0, 10, 100, 200 nM의 angiotensin II를 첨가하여 배양한 경우와 100 nM angiotensin II를 첨가한 후 1시간, 4시간, 6시간 동안 배양하였을 때 PAI-1 유전자 발현은 22 mM 농도의 포도당 상태에서 현저히 상승되었다. 시험관 실험에서 angiotensin II와 고농도 포도당의 영향을 함께 비교한 연구는 없으나 본 연구의 결과로 볼 때 angiotensin II와 고농도 포도당은 PAI-1 유전자 발현에 상승작용이 있는 것으로 사료된다. 실제로 당뇨병에서는 혈중 포도당 농도가 상승되어 있고 angiotensin II의 농도도 상승된 경우가 많으므로 본 연구의 결과는 당뇨병에서 PAI-1 mRNA의 상승을 설명할 수 있는 근거가 된다.

Renin-angiotensin system과 PAI-1의 관계에 대한 연구가 최근 활발해지고 있으며 angiotensin II가 PAI-1의 자극제로 작용하여 섬유소용해에 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 angiotensin II가 PAI-1 유전자 발현을 증가시킨 것과 같이 Vaughan 등도 소의 내피세포 배양에서 angiotensin II가 PAI-1 유전자 발현을 증가시킨다고 하여 renin-angiotensin system과 혈전과의 관련성을 시사했다. 한편 Hamdan 등은 풍선으로 흰쥐 대동맥을 손상시킨 후 angiotensin converting enzyme(ACE) 억제제인 captopril을 사용하여 PAI-1 유전자 발현 감소를 확인하여 renin-angiotensin system이 PAI-1 유전자 발현을 조절하므로 ACE 억제제가 PAI-1 상승을 억제할 수 있다고 하였다. Vaughan 등은 ACE 억제제인 ramipril을 급성 심근경색 환자에게 사용하는 경우 심근경색 재발이나 불안정형 협심증(unstable angina)이 적었는데 이를 규명하기 위해 시행된 임상 연구에서 14일간 ramipril을 복용한 환자들이 위약군에 비하여 PAI-1 항체가 44% 감소되고 PAI-1 활성성이 22% 감소되었으나 혈청 t-PA값은 차이가 없었다고 하였다. 그러므로 ramipril치료는 급성 심근경색 회복기에 혈청 섬유소용해에 영향을 주어 심근경색 재발을 줄인다고 하여 ACE 억제제가 임상적으로 유용하며 아울러 renin-angiotensin system이 섬유소 용해에 매우 중요한 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서도 이들의 상관관계를 볼 수 있었는데 angiotensin II 첨가가 PAI-1 유전자 발현을 증가시켜 angiotensin II가 PAI-1의 자극제임을 증명했다. 이러한 결과는 Feener 등이나 van Leeuwen 등의 결과와도 일치된다. Ridker 등도 임상 연구에서 angiotensin II를 점적 주사한 경우 PAI-1 값이 즉각적으로 상승되어 renin-angiotensin system과 혈전 형성과의 관련성을 주장했다. 이러한 결과들은 angiotensin II가 PAI-1을

자극하여 혈관의 긴장성과 비후뿐만 아니라 혈전 형성에도 영향을 미치는 것으로 해석되는 결과들이다. 간접적으로 ACE 억제제 사용으로 심근경색 재발이 감소되었으며 이때 ACE 차단제가 PAI-1을 저하시켰다는 보고²¹⁾도 이를 뒷바침 해준다.

항후 angiotensin II의 길항제나 angiotensin II를 억제하는 유전자 치료 등으로 당뇨병 환자들에게 발생하는 심혈관계 합병증을 예방하고 또한 섬유소용해 부전 등의 합병증은 angiotensin II의 억제와 더불어 PAI-1 유전자 억제요법 등을 개발하여 사용한다면 당뇨병의 합병증으로 초래되는 동맥경화증 및 기타 심혈관질환이나 섬유소용해 부전 등의 합병증을 예방할 수 있어 당뇨병의 유병율과 사망율을 줄일 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서 22 mM의 고농도 포도당 용액이 세포성장을 촉진시켰고 인슐린 및 angiotensin II도 성장을 촉진하였다. Natarajan 등은 돼지의 대동맥평활근세포를 이용한 실험에서 고농도 포도당 상태에서 10% FBS하에 세포를 10일간 배양하였을 때 고농도 포도당이 평활근세포의 성장을 증가시키며 이는 protein kinase C(PKC) 경로를 통하여 일어난다고 하였다. Maiello 등도 고농도 포도당에서 혈관내피세포가 잘 자란다고 하여 고혈당증이 평활근세포의 성장을 촉진함은 명확한 사실인 것 같다. 인슐린이 세포성장에 미치는 영향은 본 연구에서 세포성장이 촉진되었는데 이는 인슐린 투여가 혈관내피세포의 성장 촉진으로 동맥경화증에 유해한 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

세포성장에 미치는 angiotensin II의 영향은 혈관평활근세포에서 c-myc²⁵⁾, c-fos²⁶⁾, platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor²⁷⁾, insulin-like growth factor-I²⁸⁾ 등을 자극하여 세포성장을 촉진한다고 하였고 본 연구에서도 세포성장이 증가되었다.

Angiotensin I에서 angiotensin II로의 전환을 억제하는 ACE 억제제는 고혈압 및 울혈성 심부전 치료제로 사용되고²⁹⁾ 또한 혈관손상, 심근경색이나 당뇨병성신증의 진행에 따른 혈관내막의 비후를 억제시키는데 효과가 있는 것으로 알려지고 있다³⁰⁾. 일부 보고에서는 renin-angiotensin system이 고혈압 조절뿐만 아니라 plasminogen 활성화와 혈전용해를 억제하는 작용이 있다고 한다. Bell 등은 배양된 대동맥 내피세포에서 ACE억제제가 urokinase plasminogen activator의 발현을 증가시킨다고 보고하였고, Yusuf 등은 ACE억제제가 좌심실기능부전 환자의 심근경색 재발을 줄인다고 보고하였다.

또한 Kubo 등은 angiotensin II 길항제가 혈관 평활근세포의 성장을 억제한다고 보고하면서 angiotensin II가 세포성장을 촉진하여 혈관 긴장성 조절 뿐아니라 혈관비후를 유발하여 혈관 질환을 유발한다고 하였다. 본 연구에서도 흰쥐의 대동

맥평활근세포에서 angiotensin II의 농도에 따라 세포성장이 증가된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 혈관 평활근세포의 세포성장을 촉진하는 고혈당과 고인슐린증 및 angiotensin II의 증가를 가져오는 당뇨병에서는 동맥경화증이 유발될 가능성이 많음을 알 수 있고 또한 평활근세포 성장을 촉진하여 동맥경화증 발생에 관여하는 것으로 볼 수 있다.

이상의 결과를 보면 고혈당과 angiotensin II의 상승은 PAI-1 mRNA의 발현을 증가시켜 섬유소용해 부전을 초래하게 된다. 또한 고혈당, 고인슐린증 및 angiotensin II의 상승은 혈관 평활근세포 성장을 촉진하여 앞에서 언급한 PAI-1치의 상승과 더불어 동맥경화증의 발생 및 진행에 관여하는 것으로 사료된다.

결 론

이상의 결과로 볼 때 흰쥐 대동맥평활근세포에서 PAI-1 mRNA의 발현은 포도당 농도가 높을수록 증가되며 angiotensin II의 농도 및 배양시간에 따라 증가되고 insulin 투여로 감소하였다. 또한 angiotensin II의 투여는 22 mM의 고농도 포도당 투여 후 증가된 PAI-1 mRNA 발현 증가를 더욱 증가시켜 PAI-1 mRNA 발현 증가에 상승작용이 있음을 알 수 있다. 그리고 22 mM의 고농도 포도당, 인슐린 및 angiotensin II는 흰쥐 대동맥평활근세포의 성장을 촉진시켰다.

참고문헌

1. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992; 19(6 Pt 2):753-7.
2. Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension* 1992;19(2 Suppl):II49-55.
3. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cell. *Hypertension* 1989;13(4):305-14.
4. Morishita R, Higaki J, Miyazaki M, Ogihara T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1992;19(2 Suppl):II62-7.
5. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993;91(5):2268-74.
6. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsew YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71(1):169-80.

7. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJL. *Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension*. N Engl J Med 1994;330(23): 1629-33.
8. Schunkert H, Hense HS, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, et al. *Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy*. N Engl J Med 1994;330(23):1634-8.
9. Raynolds MV, Brestow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, et al. *Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy*. Lancet 1993;342(8879): 1073-5.
10. Cambien F, Poirier O, Lecert L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, et al. *Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction*. Nature 1992;359(6393): 641-4.
11. Doria A, Warram JH, Krolewski AS. *Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of the angiotensin I-converting enzyme gene*. Diabetes 1994; 43(5):690-5.
12. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, Cambien F, et al. *Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels and diabetic retinal and renal complications*. Diabetes 1994;43(3):384-8.
13. Maiello M, Boeri D, Podesta F, Cagliero E, Vichi M, Odetti P, Adezati L, et al. *Increased expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor and reduced fibrinolytic potential of human endothelial cells cultured in elevated glucose*. Diabetes 1992;41(8):1009-15.
14. Bruzdinski CJ, Riordan-Johnson M, Nordby BC, Suter SM, Gelehrter TD. *Isolation and characterization of the rat plasminogen activator inhibitor-1 gene*. J Biol Chem 1990;265(4):2078-85.
15. Reidy MA, Irvin C, Lindner V. *Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries*. Circ Res 1996;78(3):405-14.
16. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. *The plasminogen activator/plasmin system*. J Clin Invest 1991;88(4):1067-72.
17. Krishnamurti C, Alving BM. *Plasminogen activator inhibitor type 1: biochemistry and evidence for modulation of fibrinolysis in vivo*. Semin Thromb Hemost 1992;18(1):67-80.
18. Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Phillip-Joet C, Holvoet P, et al. *Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep vein thrombosis*. Thromb Haemost 1987;57(1):62-72.
19. Paramo JA, Colucci M, Collen D, van de Werf F. *Plasminogen activator inhibitor in the blood of patients with coronary artery disease*. Br J Med 1985;291(6495): 573-4.
20. Hamsten A, Wiman B, De Faire U, Blomback M. *Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction*. N Engl J Med 1985;313(25):1557-63.
21. Vaughan DE, Rouleau JL, Ridker PM, Arnold JM, Menapace FJ, Pfeffer MA. *Effects of ramipril on plasma fibrinolytic balance in patients with acute anterior myocardial infarction*. HEART study investigators. Circulation 1997;96(2):442-7.
22. Erickson LA, Fici GA, Lund JE, Boyle TP, Polites HG, Marotti KR. *Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene*. Nature(Lond) 1990;346(1):74-6.
23. Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, et al. *Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on Hemostasis, thrombosis, and thrombolysis*. J Clin Invest 1993;92(6):2756-60.
24. Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, Vague P. *Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients: relationship with plasma insulin*. Thromb Haemost 1989;61(3):370-3.
25. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. *Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest 1989;83(4):1419-24.
26. Taubman MB, Berk BC, Izumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. *Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle*. J Biol Chem 1989;164(1):526-30.
27. Ko Y, Stiebler H, Nickenig G, Wiczorek AJ, Vetter H, Sachinidis A. *Synergic action of angiotensin II, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta on platelet-derived growth factor-BB, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*. Am J Hypertens 1993;6(6 Pt 1):496-9.
28. Delafontaine P, Low H. *Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem 1993;268(22):16866-70.
29. Laragh JH. *New angiotensin converting enzyme inhibitors. Their role in the management of hypertension*. Am J Hypertens 1990;3(11):257S-65S.
30. Powell JS, Clozel JP, Muller RK, et al. *Inhibitors of angiotensin converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury*. Science 1989;245(4919): 186-8.

=국문초록=

배경: PAI-1은 t-PA의 억제인자로서 섬유소용해계에 작용을 하여 혈전형성을 유발한다. PAI-1은 동맥경화된 혈관벽에서 분비가 된다. PAI-1의 증가는 동맥경화증의 위험인자가 되는 당뇨병과 고혈압이 동반된 환자에서 보이며 혈전증유발에 위험인자가 될 수 있다. 본 연구는 고혈당과 인슐린 및 angiotensin II가 PAI-1의 생성 및 평활근세포의 증식에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. **대상 및 방법:** 흰쥐 대동맥평활근세포를 5.5 mM과 22 mM의 포도당 배양액을 사용하여 배양하였다. 배양액에 angiotensin II 및 인슐린을 농도 및 배양시간에 따라 첨가하여 Northern blotting 방법으로 PAI-1 유전자발현을 나타내었다. 또한 세포 증식에 대한 포도당, 인슐린 및 angiotensin II의 영향을 규명하기 위하여 MTT assay를 사용하였다. **결과:** 5.5 mM과 22 mM의 포도당 배양액에서 angiotensin II(100 nM)를 첨가하여 배양한 결과, 22 mM 포도당 배양액에서 PAI-1 mRNA 발현이 증가되었으며 angiotensin II 투여 4시간에 최고치에 도달하였고 6시간까지 지속되었다. 5.5 mM, 22 mM의 포도당 배양액에 angiotensin II의 농도를 0, 10, 100, 200 nM 투여하여 배양한 결과, PAI-1 mRNA의 발현은 angiotensin II 농도에 따른 증가를 보였으며 22 mM 포도당 배양액시 더욱 뚜렷하게 증가되었다. 배양액에 angiotensin II(100 nM)과 인슐린(100 nM)을 투여하여 배양한 결과, PAI-1 mRNA의 발현은 angiotensin II 단독으로 투여시 증가하였으나 인슐린을 첨가하였을 때는 감소하였다. 5.5 mM과 22 mM의 포도당 배양액에 1, 10, 100 nM의 인슐린과 1, 10, 100 nM의 angiotensin II를 첨가한 후 대동맥평활근세포의 성장속도를 비교한 결과, 5.5 mM보다 22 mM의 포도당이 든 배양액에서 대동맥평활근세포의 성장이 촉진되었으며, 인슐린 및 angiotensin II를 첨가한 경우도 대동맥평활근세포의 성장이 증가되었다. **결론:** 흰쥐 대동맥평활근세포에서 PAI-1 mRNA의 발현은 포도당 농도가 높을수록 증가되며 angiotensin II의 농도 및 배양시간에 따라 증가되고 인슐린 투여로 감소하였다. 또한 angiotensin II의 투여는 22 mM의 고농도 포도당 투여 후 증가된 PAI-1 mRNA 발현 증가를 더욱 증가시켜 PAI-1 mRNA 발현 증가에 상승작용이 있음을 알 수 있다. 그리고 22 mM의 고농도 포도당, 인슐린 및 angiotensin II는 흰쥐의 대동맥평활근세포의 성장을 촉진시켰다.

- 중심단어:**
1. 포도당
 2. 인슐린
 3. 안지오텐신 II
 4. Plasminogen Activator Inhibitor-1