

## 혈소판이 소 폐동맥 내피세포의 Endothelin 생산에 미치는 효과

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실, 임상병리학과\*, 핵의학과\*\*, 생화학교실\*\*\*

이상도, 심태선, 권석운\*, 류진숙\*\*, 이재담\*\*\*,  
임채만, 고윤석, 김우성, 김동순, 김원동

= Abstract =

### The Effect of Platelets on Endothelin Production in Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cells

Sang Do Lee, M.D., Tae Sun Shim, M.D., Seog-Woon Kwon, M.D.,\*  
Jin Sook Ryu, M.D.,\*\* Jae Dam Lee, M.D.,\*\*\* Chae-Man Lim, M.D.,  
Younsuck Koh, M.D., Woo Sung Kim, M.D., Dong Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D.

*Department of Internal Medicine, Department of Clinical Pathology\*, Department of Nuclear Medicine\*\*,  
Department of Biochemistry\*\*\*, Asan Medical Center, Asan Institute for Life Science,  
College of Medicine, University of Ulsan, Seoul, Korea*

**Background :** Endothelin(ET) is a very potent vasoconstrictive peptide produced by endothelial cells of pulmonary artery. The endothelin level was increased in plasma of primary pulmonary hypertension and acute pulmonary thromboembolism and it was suggested that the endothelin might do a critical role in the cardiopulmonary dysfunction in these two conditions. But the exact mechanism of increase of ET has not been known. In these two conditions, platelet activation and thrombosis are the main pathophysiologic findings. So there is a possibility that the platelet might stimulate endothelin secretion from endothelial cells. Therefore, we performed this study to evaluate the role of platelet and its mediators on endothelin production in bovine pulmonary artery endothelial(BPAE) cells.

**Method :** Bovine pulmonary artery endothelial cells, ATCC certified cell line 209, were cultured and treated with human platelets( $10^6 \sim 10^8/ml$ ), thrombin ( $0.1 \sim 10u/ml$ ), TGF- $\beta 1$ ( $1 \sim 1000pM$ ), serotonin( $1 \sim 100uM$ ), and endotoxin( $1ug/ml$ ) in a final volume of 500ul for 18 hours. Levels of ir(immunoreactive)-ET in each conditioned medium were measured by a radioimmunoassay specific for ET.

**Result :** The increase of ir-ET levels was platelet number and time dependent over 18 hours. When washed human platelets were added( $10^8/ml$ ), the ir-ET levels were significantly higher than that of control( $p <$

\*본 연구는 1995년 아산생명과학연구소 연구비의 일부 보조로 이루어 졌음.

0.05) at 8 and 18 hours after culture.

Subthreshold concentration of platelets( $10^7$ /ml) coincubated with endotoxin(1ug/ml) or subthreshold dose of thrombin(0.1u/ml) stimulated ir-ET secretion from BPAE cells significantly( $p < 0.05$ ) compared with control.

Thrombin(1ug/ml, 10ug/ml) and TGF- $\beta$ 1(100pM, 1000pM) significantly increased ir-ET secretion from BPAE cells( $p < 0.05$ ) compared with control, but serotonin(1~100uM) and endotoxin(1ug/ml) did not stimulate the ir-ET secretion.

**Conclusions :** Platelets stimulate endothelin secretion from bovine pulmonary artery endothelial cells. The mechanism of increase of endothelin secretion seems to be a stimulation by platelet itself or by mediators, such as TGF- $\beta$ 1, secreted from activated platelets. And, in this study, the priming effect of platelets on endothelin secretion from BPAE cells could be another possibility.

**Key words :** Endothelin, Platelet, TGF- $\beta$ 1, Serotonin, Thrombin, Pulmonary artery endothelial cell

## 서 론

Endothelin(이하 ET로 약함)은 1988년 Yanagisawa 등에 의해 돼지 대동맥 내피세포의 배양액에서 추출되었으며<sup>1)</sup> 현재까지 알려진 혈관수축 peptide 중 가장 강력한 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. ET은 사람 폐에서는 폐혈관내피세포, 기도상피세포, 제 2형 폐포세포 등 여러 세포에서 만들어지며 또한 ET의 수용체가 폐혈관 근세포, 섬유아세포, 기도 및 기도신경 등에서 발견되어 ET이 폐에서 여러 생리, 및 병리학적 기전에 작용하리라고 추측되고 있다<sup>3)</sup>.

급성 폐동맥색전증에서의 심폐기능장애 기전으로는 색전에 의한 혈관의 물리적 폐쇄외에 혈전에 의해 이차적으로 유발되는 신경체액성 반응을 들 수 있으며 대표적인 매개체로는 활성화된 혈소판으로부터 유리되는 세로토닌 등이 있다<sup>4)</sup>. 급성 폐동맥색전증 환자의 혈장내 ET이 증가하며 이는 주로 폐혈관내피세포로부터 유리되고<sup>5)</sup> ET이 강력한 혈관 및 기관지수축작용을 가진 점에 비추어 급성 폐동맥색전증의 심폐기능장애에 ET이 중요한 역할을 할 가능성을 추측케 한다. 한편 일차성 폐동맥고혈압에서도 환자의 혈장 ET 농도가 증가되어 있고<sup>6)</sup> 폐조직내의 ET m-RNA 발현이 증가되어 있으며 혈장 ET농도와 폐혈관저항 사이

에 유의한 상관관계가 있음이 알려져<sup>7)</sup> ET이 일차성 폐동맥고혈압의 병태생리에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. 일차성 폐동맥 고혈압에서 ET의 증가는 주로 폐혈관내피세포에서 기원하는 것으로 추측되나<sup>6)</sup>, 내피세포에서 ET의 생산을 자극하는 인자는 확실히 알려진 바 없다. 일차성 폐동맥고혈압 환자의 폐 병리소견에서 혈관내 혈전증(thrombosis)이 유의하게 관찰되며<sup>8)</sup>, 이 환자들에게 항응고제를 투여할 경우 생존율이 유의하게 증가함이 알려져<sup>9)</sup> 혈전이 일차성 폐동맥고혈압의 병태생리에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. 이상의 두 질환 모두 혈장 ET이 증가하고 그 기원은 폐혈관내피세포이며 병태생리에 혈소판이 활성화가 중요한 역할을 하고 있어 이들 질환에서 폐혈관내피세포에서 ET생산의 증가는 혈소판의 자극에 의한 가능성을 추측할 수 있다. 또한 혈소판 알파과립에 다량 존재하는 TGF- $\beta$ 1과<sup>10)</sup> 혈소판 표면에서 활성화되는 thrombin이<sup>11)</sup> 혈관내피세포에서의 ET 생산을 증가시킨다는 보고들은<sup>12,13)</sup> 이런 가정을 뒷받침 해준다. 저자들은 혈소판과 활성화된 혈소판에서 유리된 매개체들이 폐혈관내피세포에서 ET 생산을 증가시킬 것이라는 가정하에 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 소 폐동맥내피세포의 배양

American Type Culture Collection(ATCC) certified cell line 209를 80%의 minimum essential medium(이하 MEM이라 함)과 56°C에서 30분간 열처리로 불활성한 20%의 fetal calf serum(이하 FCS라 함) 및 penicillin 100 unit/ml와 streptomycin 100ug/ml의 합성배지에서 배양하였다. 배양 중 배지는 3일에 한번씩 교체하였으며 실험에 사용된 폐동맥내피세포는 passage 18~22이었다.

### 2. 배양 상청액의 제조

Falcon사의 배양병에 계대배양된 폐동맥내피세포를 0.25% trypsin와 0.02% EDTA 용액을 사용하여 박리한 후 MEM으로 두번 세척하여 얻은 세포 침전물에 다시 20% FCS를 포함하는 MEM을 넣어 섞어서 세포부유액을 조제하였다. 폐동맥내피세포의 세포부유액 일부에서 현미경을 사용하여 폐동맥내피세포수를 계산하고 trypan blue염색을 시행하여 세포의 생활력을 검정하였다. 폐동맥내피세포의 부유액을 Libro사의 24 well 조직배양 플레이트에 한 well당 세포수  $1.0 \times 10^5$ 개가 되게 분주하였다. 분주후 약 3~5일간 배양하여 위상차현미경으로 폐동맥내피세포층의 단층형성을 확인한 다음 배지용액을 흡인하고 MEM 2ml로 2회에 걸쳐 세척하였다. 여기에 MEM과 실험용액을 넣어 최종 용량이 500ul가 되게한 후 폐동맥내피세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>상태에서 18시간 항온 배양하였다. 배양후 폐동맥내피세포의 생활력을 보기위하여 trypan blue염색을 시행하였다. 배양후 conditioned medium을 원심분리관에 옮기고 4°C에서 600g로 10분간 원심분리 상청액을 폴리프로필렌 튜브에 담아 영하 70°C에 보관하였다가 ET정량분석하였다.

실험용액으로는 사람 혈소판( $10^6 \sim 10^8$ /ml), thro-

mbin(0.1~10u/ml), TGF- $\beta$ 1(1~1000pM), serotonin(1~100uM) 및 내독소(1ug/ml)를 사용하였다. 실험에 사용한 thrombin, TGF- $\beta$ 1, serotonin, prostacyclin, 내독소(Escherichia coli serotype 026 : B6) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, USA)제품이었다. 각각의 실험군은 2배수의 실험 측정치의 평균을 구하여 1회의 실험치로 간주하였고 이를 3~4회 반복 하였다.

### 3. 건강성인 혈소판의 분리

건강한 성인의 정맥혈을 23°C에서 20분간 150g로 원심분리하여 platelet rich plasma를 얻었다. platelet rich plasma를 다른 원심분리관에 옮기고 prostacyclin(최종농도 0.8uM)을 첨가한 후 800g로 10분간 원심분리하여 얻어진 pellet을 15ml calcium free Tyrode's buffer(NaCl 137, KCl 2.7 MgCl<sub>2</sub> 1.0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.35, NaHCO<sub>3</sub> 11.9, glucose 5.5(이상 mM, pH 7.35)와 prostacyclin(0.8uM)으로 녹였다. 이것을 다시 600g로 10분간 원심분리하고 얻어진 pellet은 15ml calcium free Tyrode's buffer에 녹이고 prostacyclin(0.8uM)을 첨가하여 800g로 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 pellet을 2ml calcium free Tyrode's buffer에 녹이고 CaCl<sub>2</sub>를 첨가해 최종 농도가 1.8mM이 되게 하였다. 혈소판수는 Coulter counter(Coulter Corp., Hialeah, Fla.)로  $10^6$ cells/ml가 되게 하였다.

### 4. Endothelin 정량분석

배양 상청액내의 ET측정은 방사선면역측정법(Amersham International Co. Buckinghamshire, England)을 이용하였다. ET추출을 위해 methanol과 water로 처리한 Amprep 500mg C2 Column(Amersham International Co.)을 사용하였다. 0.25ml의 2M HCl로 1ml의 상청액을 산성화하여 Column에 가한 후 5ml water와 0.15 trifluoroacetic

acid(TFA)를 통과시켜 세척하고, 다시 80% methanol과 0.1% TFA가 첨가된 2ml water를 통과시켜 튜브에 용출액을 모았다. 이를 건조시킨 후 0.02M borate buffer(pH 7.4)를 250ul가하여 재조성하였다. 추출효율은  $^{125}\text{I}$ -ET-1을 이용하여 측정했을 때 82~94% (n=7)이었다.

방사선면역측정은 재조성한 추출액 100ul에 ET-1 특이 토끼항혈청(rabbit antiserum specific for ET-1)을 100ul넣고 4°C에서 24시간 배양시킨 후 다시  $^{125}\text{T}$ -ET-1을 100ul가하여 4°C에서 24시간 배양하였다. Amerlex-M 2차 항체(anti-rabbit IgG serum coated onto magnetized polymer particles)를 첨가하여 혼합후 상온에서 10분간 반응시키고 magnetic separator로 항체분획을 분리하였다. 1분간 감마카운터에서 방사능치를 측정하고 표준곡선으로부터 ET-1의 농도를 구하였으며, ET-1의 농도는 세포  $10^5$ 개에 대한 양(femtomoles)으로 표시하였다. 모든 시료는 반복검사를 하여 측정하였고, 배지내 변이계수는 15.2 fmol/tube에서 9.5% (n=10)이었다.

## 6. 통계 처리

본 연구에서 모든 자료는 평균과 표준오차로 표기하였으며 통계처리는 SPSS PCplus통계 package를 이용하였다. 각 군간의 비교는 비모수 검정법을 사용하되, 두 군간의 비교는 Mann-Whitney rank sum test, 세군 이상의 비교는 Kruskal-Wallis analysis of variance(ANOVA) test를 이용하였으며 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1. 소 폐동맥내피세포에서 혈소판이 ir-ET(immunoreactive endothelin)생산에 미치는 효과

#### 1) 활성화 시키지 않은 혈소판

소 폐동맥내피세포 배양 18시간 후 상청액의 ir-ET은 대조배지군(n=4)에서  $109 \pm 21$  fmol/ $10^5$  cells, 혈소판  $10^6$ /ml군(n=4)에서  $91 \pm 12$  fmol/ $10^5$  cells, 혈소판  $10^7$ /ml군(n=4)에서  $126 \pm 19$  fmol/ $10^5$  cells, 혈소판  $10^8$ /ml군(n=4)에서  $203 \pm 24$  fmol/ $10^5$  cells, 로 혈소판  $10^8$ /ml군에서 대조배지군에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). 소 폐동맥내피세포 없이 혈소판만( $10^8$ /ml) 18시간 배양한 경우(n=4) 상청액 내 ir-ET은  $4 \pm 4$  fmol/ml로 거의 측정되지 않았다. 대조배지군(n=3)과 혈소판  $10^6$ /ml군(n=3)에서 상청액 내 ir-ET은 배양시간에 비례하여 증가하였으며 배양 8시간 및 18시간에는 혈소판군이 대조 배지군에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ) (Table 1) (Fig. 2).

#### 2) Thrombin에 의해 활성화된 혈소판

소 폐동맥내피세포 배양 18시간 후 상청액 내 ir-ET은 대조배지군(n=4)에서  $109 \pm 21$  fmol/ $10^5$  cells,

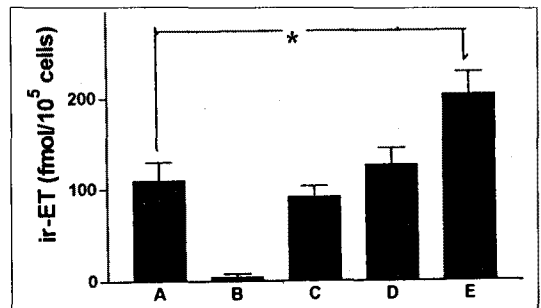


Fig. 1. Effect of platelets on endothelin secretion in bovine pulmonary artery endothelial cells. The increase of ir-ET was dependent on platelet number. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. A : Control, B : Platelet  $10^8$ /ml(without endothelial cells). C : Platelet  $10^6$ /ml, D : Platelet  $10^7$ /ml, E : Platelet  $10^8$ /ml. \* $p < 0.05$  compared with control(A).

Table 1. Platelet-induced stimulation of ir-ET according to time courses.

Time(hours)	Control**	Platelet 10 <sup>8</sup> /ml**
0	5 ± 2	7 ± 4
2	26 ± 19	27 ± 5
4	46 ± 17	61 ± 9
8	74 ± 11	128 ± 18*
18	129 ± 15	225 ± 27*

Data are shown as mean ± SEM.

\*p < 0.05 compared with control group.

\*\*fmol/10<sup>5</sup> cells

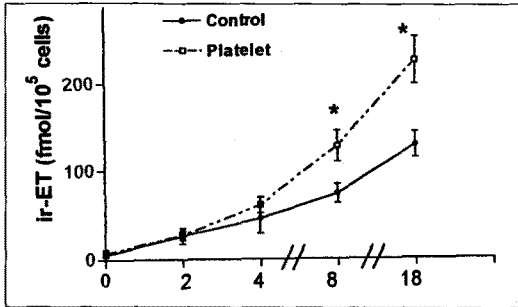


Fig. 2. Time course of the platelet-induced stimulation of endothelin secretion. The increase of platelet-stimulated ir-ET level was dependent on time. At 8 and 18 hours of platelet(10<sup>8</sup>/ml) stimulation, ir-ET levels were significantly higher than that of control group. The X axis is in log scale. \*p < 0.05 compared with control.

혈소판 10<sup>7</sup>/ml군(n=4)에서 126 ± 19 fmol/10<sup>5</sup> cells, thrombin 0.1u/ml군(n=4)에서 101 ± 43 fmol/10<sup>5</sup> cells, 혈소판 10<sup>7</sup>/ml과 thrombin 0.1u/ml 혼합군(n=4)에서 224 ± 48 fmol/10<sup>5</sup> cells로 혈소판군과 thrombin군은 대조배지군과 유의한 차이가 없었고, 혈소판과 thrombin혼합군은 대조배지군에 비해 유의하게 높았다(p < 0.05) (Fig. 3).

### 3) 혈소판과 내독소의 상호작용

소 폐동맥내피세포 배양 18시간 후 상청액내 ir-ET

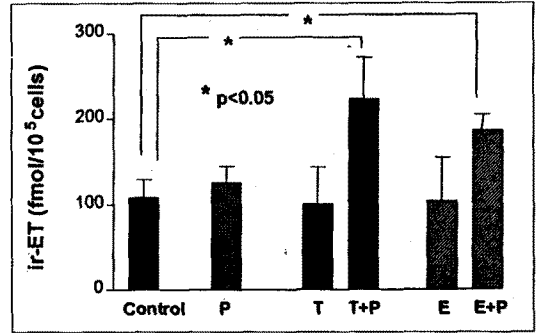
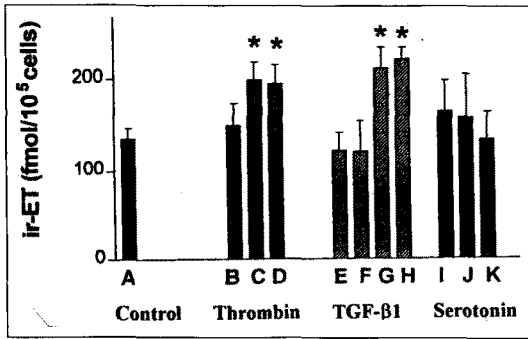


Fig. 3. Effects of thrombin(0.1u/ml) or endotoxin(1ug/ml) on platelet(P)-induced stimulation of ir-ET in cultured BPAE cells. Thrombin(T) and endotoxin(E) did not increase the ir-ET levels. But coincubation with subthreshold concentrations of platelets(T+P and E+P) showed significantly increased ir-ET levels. Data are presented as mean ± SEM. P : Platelet 10<sup>7</sup>/ml, T : Thrombin 0.1u/ml, T+P : Platelet 10<sup>7</sup>/ml+Thrombin 0.1u/ml, E : Endotoxin 1ug/ml, E+P : Platelet 10<sup>7</sup>/ml+Endotoxin 1ug/ml. \*p < 0.05 compared with control.

은 대조배지군(n=4)에서 109 ± 21 fmol/10<sup>5</sup> cells, 혈소판 10<sup>7</sup>/ml군(n=4)에서 126 ± 19 fmol/10<sup>5</sup> cells, 내독소 1ug/ml군(n=4)에서 104 ± 50 fmol/10<sup>5</sup> cells, 혈소판 10<sup>7</sup>/ml과 내독소 1ug/ml 혼합군(n=4)에서 224 ± 48 fmol/10<sup>5</sup> cells로 혈소판군과 내독소군은 대조배지군과 유의한 차이 없었고, 혈소판과 내독소 혼합군은 대조배지군에 비해 유의하게 높았다(p < 0.05) (Fig. 3).

### 2. 소 폐동맥내피세포에서 thrombin이 ir-ET생산에 미치는 효과

소 폐동맥내피세포 배양 18시간 후 상청액내 ir-ET 은 대조배지군(n=3)에서 136 ± 12 fmol/10<sup>5</sup> cells, thrombin 0.1u/ml군(n=3)에서 150 ± 24 fmol/10<sup>5</sup> cells, thrombin 1u/ml군(n=3)에서 199 ± 19



**Fig. 4.** Effect of thrombin, TGF- $\beta$ 1, and serotonin on endothelin secretion in BPAAE cells. Stimulation by thrombin(1 and 10u/ml) TGF- $\beta$ 1(100 and 1000pM) has increased significantly the level of ir-ET compared with that of control(A). But serotonin did not show any effect. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. B : Thrombin 0.1u/ml, C : Thrombin 1u/ml, D : Thrombin 10u/ml, E : TGF- $\beta$ 1 1pM, F : TGF- $\beta$ 1 10pM, G : TGF- $\beta$ 1 100pM, H : TGF- $\beta$ 1 1000pM, I : Serotonin 1uM, J : Serotonin 10uM, K : Serotonin 100uM. \*P<0.05 compared with control (A)

fmol/10<sup>5</sup> cells, thrombin 10u/ml군(n=3)에서 195  $\pm$  20 fmol/10<sup>5</sup> cells로 thrombin 1u/ml군과 10u/ml군에서 각각 대조군에 비해 유의하게 높았다 (p<0.05) (Fig. 4).

### 3. 소 폐동맥내피세포에서 TGF- $\beta$ 1이 ir-ET생산에 미치는 효과

소 폐동맥내피세포 배양 18시간 후 상청액과 ir-ET은 대조배지군(n=3)에서 107  $\pm$  21 fmol/10<sup>5</sup> cells, TGF- $\beta$ 1 1pM군(n=3)에서 122  $\pm$  20 fmol/10<sup>5</sup> cells, TGF- $\beta$ 1 10pM군(n=3)에서 121  $\pm$  34 fmol/10<sup>5</sup> cells, TGF- $\beta$ 1 100pM군(n=3)에서 210  $\pm$  23 fmol/10<sup>5</sup> cells, TGF- $\beta$ 1 1000pM군(n=3)에서 220  $\pm$  13 fmol/10<sup>5</sup> cells로 TGF- $\beta$ 1 100pM군과

1000pM군에서 각각 대조군에 비해 유의하게 높았다 (p<0.05) (Fig. 4).

### 4. 소 폐동맥내피세포에서 serotonin이 ir-ET생산에 미치는 효과

Serotonin 1uM군(n=3)에서 164  $\pm$  33 fmol/10<sup>5</sup> cells, serotonin 10uM군(n=3)에서 157  $\pm$  47 fmol/10<sup>5</sup> cells, serotonin 100uM군(n=3)에서 164  $\pm$  33 fmol/10<sup>5</sup> cells로 네 군간에 유의한 차이가 없었다 (Fig. 4).

## 고 찰

ET은 1988년 돼지 대동맥내피세포 배양액에서 추출되었으며 현재까지 알려진 혈관수축 peptide중 가장 강력한 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. ET은 여러 장기에서 만들어지나 사람 폐에서는 폐혈관 내피세포, 기도상피세포, 2형 폐포세포 등에서 만들어지며 또한 ET의 수용체가 기도 및 폐혈관 근세포와 섬유아세포 및 기도 신경 등에서 발견되어 ET이 폐의 여러가지 생리, 병리학적 기전에 작용하리라고 추측되고 있다<sup>3)</sup>. ET은 ET-1, ET-2, ET-3의 세가지 형태로 존재하여 ET-1 유전자는 사람의 6번 염색체에 존재하고 203개의 아미노산으로 구성된 preproendothelin에서 38개의 아미노산으로 구성된 proendothelin(big endothelin)을 거쳐 endothelin converting enzyme의 작용을 받아 ET으로 만들어 진다. ET의 반감기는 2분이 채 안되며 주로 폐, 신장 및 간에서 대사되는 것으로 알려져 있다<sup>4-6)</sup>. ET의 수용체는 A형(ET<sub>A</sub>), B형(ET<sub>B</sub>), C형(ET<sub>C</sub>)이 있고 이중 ET<sub>A</sub>수용체는 주로 혈관근세포에 분포하고 ET<sub>B</sub>수용체는 혈관 내피세포 및 기타 장기에 주로 분포하며 ET<sub>C</sub>수용체는 사람에서의 역할이 아직 밝혀지지 않은 상태이다<sup>7)</sup>. ET<sub>A</sub>수용체는 ET-1에 가장 친화력이 있으며 ET<sub>B</sub>수용체는 세종류의 ET에 같은 친화력을 갖는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. ET-1은 ET<sub>A</sub>수용체를 통해 사람 폐혈관을 수

측시키고 역시 ET<sub>A</sub>수용체를 통해 폐혈관의 섬유아세포와 근세포의 화학주성 및 분열을 유도한다는 것이 알려져<sup>18)</sup> 폐동맥고혈압의 유발과 폐혈관구조의 재형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다. 반면 ET-3는 긴장도가 증가된 혈관에서 혈관이완을 유도하며 여기에는 nitric oxide가 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>.

ET 생산을 조절하는 인자로는 여러 종류의 호르몬, 혈관작용물질 및 혈관긴장정도 등이 있으며 대표적으로 angiotensin II, arginine vasopressin, thrombin, lipoprotein, insulin, growth factors, 혈관 전단력(shearing force) 및 저산소증 등을 들 수 있다<sup>20)</sup>. 사람 ET-1 유전자는 6번 염색체에 위치하고 촉진자(promoter) 부위는 특징적인 CAAT와 TATA배열을 가지고 있으며 이와 함께 외부자극에 반응하여 ET 전사를 조절하는 몇개의 cis요소를 가지고 있다. 대표적으로 GATA-2 단백질과 결합하는 부위<sup>21)</sup>, FOS/JUN 복합단백과 결합하는 AP-1 부위<sup>22)</sup>, NF-1 부위 및 acute phase response element 등이 있다<sup>23)</sup>. FOS/JUN 복합단백은 protein kinase C의 신호전달 체계의 일부이며<sup>24)</sup> thrombin의 신호전달에 protein kinase C가 관여하는 것으로 알려져 있어 본 연구에서 관찰된 thrombin에 의한 ET 생산의 자극에 AP-1 부위가 관여했을 가능성을 추측할 수 있다. 한편 NF-1 부위는 TGF- $\beta$ 1 자극에 반응하는 것으로 알려져 있어<sup>25)</sup> TGF- $\beta$ 1 자극에 의한 ET유전자 전사의 활성화에 관여할 것으로 추측할 수 있다.

ET이 사람 폐혈관질환에서 어떤 역할을 하는가에 관해서는 주로 일차성 폐동맥고혈압과 저산소증에 의한 폐혈관수축을 중심으로 연구가 이루어져 왔다. 사람 혈관내피세포를 저산소에 노출시킬 경우 배양액내의 ET이 증가하고 내피세포내의 ET m-RNA가 증가함이 보고되었고<sup>27)</sup> 쥐에서 저산소증이 혈액내 ET 농도를 증가시키는 것이 알려지는 등<sup>28)</sup> 저산소증에 의해 유발되는 폐동맥고혈압에 ET이 중요한 역할을 하리라고 추측된다. 그러나 ET이 세포내에 미리 형성되어 저장되어 있지 않고 외부의 자극에 의해 천천히

생산되는 것과 ET에 의한 혈관 수축이 비교적 서서히 일어나는 점 등으로 ET은 급성 폐동맥고혈압 유발보다는 만성폐쇄성폐질환에서 폐동맥고혈압과 같은 만성질환에 주 역할을 할 것으로 추측되어 왔다<sup>3)</sup>. 그러나 최근 급성심근경색 환자에서 혈중 ET이 상승하며 이는 경색 당일부터 증가하여 약 2주간 지속한다는 보고와<sup>29)</sup> 쥐를 이용한 실험적 급성심근경색 모델에서 혈중 ET이 급격하게 상승하며 ET에 대한 항체를 투여할 경우 심근경색의 크기가 감소한다는 보고로 미루어<sup>30)</sup> ET이 만성질환 뿐아니라 급성 심혈관질환에도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

일차성 폐동맥고혈압에서 환자의 혈장 ET-1농도가 증가되어 있고<sup>6)</sup> 폐조직내의 ET-1 m-RNA가 증가되어 있으며 ET-1의 양과 폐혈관저항간에 유의한 상관관계가 있음이 밝혀졌고<sup>7)</sup> 또한 monocrotaline에 의해 유발된 폐동맥고혈압의 진행을 ET<sub>A</sub>수용체 길항제가 억제하는 것으로 알려져<sup>26)</sup> 폐동맥고혈압의 유발과 폐혈관구조의 재형성에 ET이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 일차성 폐동맥고혈압에서 혈장내 ET-1의 증가는 주로 폐동맥내피세포에서 기원하며<sup>6)</sup>, 내피세포에서 ET-1의 생산을 자극하는 인자에 대해서는 아직 확실히 알려진 바 없다. 일차성 폐동맥고혈압 환자의 폐병리소견에서 혈전증(thrombosis)이 유의하게 관찰되며 이는 색전보다는 폐혈관내에서 형성된 혈전으로 생각되고 이 혈전이 일차성 폐동맥고혈압의 병태생리에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다<sup>8)</sup>. 또한 일차성 폐동맥고혈압 환자에서 항응고제를 투여할 경우 생존율이 유의하게 증가함은<sup>9)</sup> 이같은 가정을 뒷받침 해주고 있다.

급성 폐동맥색전증에서 관찰되는 폐동맥고혈압이나 저산소증과 같은 심폐기능장애의 기전으로는 색전에 의한 물리적 폐쇄 효과 외에<sup>33)</sup> 이차적인 혈관 및 기관지의 수축이 알려져 있다. 이러한 이차적인 변화의 원인으로서는 저산소혈증, 산혈증, 과탄산혈증 외에 교감신경과 폐동맥의 기계적 자극에 의한 신경반사와 체액성 매개체에 의한 변화 등이 알려져 있다<sup>34, 35)</sup>. 따라서 급성 폐동맥색전증의 치료는 색전용해술이나 수술을

통한 색전제거술과 같은 색전자체에 의한 물리적 폐쇄를 없애는 방법과 신경체액성 반응에 의한 이차적인 변화를 없애주는 방법을 생각할 수 있다. 급성 폐동맥색전증에서 체액성 매개체의 역할에 관한 연구는 논란이 많으나<sup>36)</sup> Smith의 보고 이후 혈소판의 활성화가 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있고 특히 혈소판에서 유리되는 세로토닌이 주 역할을 하는 것으로 알려져 왔다<sup>37)</sup>. 개에서 자가혈병으로 급성 폐동맥색전증을 일으킨 경우 혈중 혈소판수가 4시간 후에 유의하게 감소하며, 혈소판으로부터 유리된 세로토닌이 급성 폐동맥색전증의 심폐기능장애에 중요한 매개체이고 세로토닌 수용체 길항제인 ketanserin에 의해 급성 폐동맥색전증의 심폐기능이 호전되는 등<sup>4)</sup> 급성 폐동맥색전증에서의 심폐기능장애에 혈소판의 활성화가 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. Sofia 등은 급성 폐동맥색전증 환자의 혈장내 ET이 증가하고 이는 주로 폐혈관내피세포로부터 유리된다고 보고하여<sup>5)</sup> ET이 급성 폐동맥색전증에서 이차적 심폐기능장애의 매개체로서 중요한 역할을 할 것으로 추측하게 된다. 또한 저농도의 ET이 세로토닌에 의한 혈관수축 반응을 선택적으로 증폭시키는 점과 세로토닌이 급성 폐동맥색전증의 심폐기능장애의 중요한 매개체인 점 등 역시<sup>31)</sup> ET이 급성 폐동맥색전증에서의 심폐기능장애에 중요한 역할을 하리라는 추측을 보완하는 소견이다. 한편 세로토닌의 혈관수축작용 기전중 혈관 내피세포로부터 혈관수축물질의 분비를 촉진하는 작용이 알려져 있어<sup>32)</sup> 이에 ET이 관여할 가능성도 생각할 수 있겠다. 그러므로 급성 폐동맥색전증에서 신경체액성 반응에 의한 이차적 폐쇄를 풀어주는 치료방법 즉 ET converting enzyme억제제와 ET 수용체 길항제 등을 이용하는 방법 등의 가능성을 생각할 수 있으며 이에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 혈소판에서 유리된 세로토닌은 소 폐혈관내피세포로부터 ET의 생산을 자극하지 않는 것으로 관찰되었다.

본 연구의 결과 혈소판은 소 폐동맥내피세포에서 ET의 생산을 증가시키며 혈소판 알파과립에 다량 존

재하는 TGF- $\beta$ 1과 혈소판 표면에서 활성화되는 thrombin도 ET의 생산을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 또한 본 연구에서 단독으로 ET 생산을 증가시키지 않는 낮은 농도의 thrombin과 낮은 수의 혈소판을 함께 사용한 경우 소 폐동맥내피세포에서 유의한 ET 생산의 증가를 관찰할 수 있었다. 이 결과의 기전으로는 다음 두가지를 추측할 수 있다. 하나는 thrombin의 자극에 의해 혈소판에서 유리된 여러 매개체들이 ET의 생산을 증가시키는 것으로 본 연구에서도 혈소판에 다량 존재하는 TGF- $\beta$ 1이 ET의 생산을 증가시키는 것이 관찰되어 이 가능성을 뒷받침한다. 또한 thrombin에 의해 활성화된 혈소판에서 유리되는 TGF- $\beta$ 1의 양은 본 연구에서 이용한 것과 비슷한 10~1,000pM로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 두번째 기전은 혈소판이 소 폐동맥내피세포에서 외부자극에 대한 ET의 생산반응을 조절(priming)하는 것이다. 본 연구에서는 이 가정을 검증하기 위하여 외부자극으로 내독소를 사용하였다. 저자는 내독소 단독으로는 소 폐동맥내피세포에서 ET의 생산을 증가시키지 않으나 혈청과 함께 작용시킬 경우 ET생산을 유의하게 증가시키는 것을 관찰한 바 있다(본 논문에서는 결과 보고하지 않음). 본 연구에서는 혈청 대신에 ET 생산을 증가시키지 않는 적은 수의 혈소판을 내독소와 함께 작용시켜 역시 유의한 ET 생산의 증가를 관찰할 수 있었다. 내독소가 혈소판을 활성화시키지 않는 것을 고려하면 이같은 ET 생산의 유의한 증가는 혈소판이 폐동맥내피세포에서 내독소에 의한 ET 생산 자극효과를 priming한 것으로 추측해 볼 수 있겠다.

이상의 결과를 종합하면 혈소판은 소 폐동맥내피세포에서 ET 생산을 자극하며 그 기전으로는 혈소판 자체에 의한 내피세포의 자극과 활성화된 혈소판에서 유리되는 TGF- $\beta$ 1 등의 매개물에 의한 자극을 들 수 있으며 또한 혈소판에 의한 내피세포의 priming효과도 생각할 수 있다. ET이 폐혈관근을 수축시키고 섬유아세포와 근세포의 화학주성 및 분열을 유도하는 기능을 고려하면 이같은 혈소판과 폐혈관내피세포의 상호작용이 폐순환의 국소조절과 여러 폐질환의 병태생



리에 중요한 역할을 할 것으로 추측할 수 있고 이에 대해서는 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

### 연구배경 :

Endothelin(이하 ET로 약함)은 폐혈관 내피세포에서 생산되며 강한 혈관 수축작용이 있는 peptide이다. 일차성 폐동맥고혈압과 급성 폐동맥색전증 환자의 혈장내 ET이 증가하고 이들 질환에서의 심폐기능장애에 ET이 중요한 역할을 하리라고 추측되나 ET증가의 기전에 대해서는 알려진 바 없다. 이들 두 질환은 모두 혈전증이 중요한 병태생리 소견이므로 저자들은 혈소판과 활성화된 혈소판에서 유리된 매개체들이 폐혈관 내피세포에서 ET 생산을 증가시킬 것이라고 가정하고 이를 확인하기 위하여 연구를 시행하였다.

### 방 법 :

소 폐동맥내피세포 배양배지에 혈소판, thrombin(0.1~10u/ml), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1, 1-1000pM), serotonin(1-100uM), 및 내독소(1ug/ml)를 첨가한 후 18시간 배양하여 배지내로 유리된 immunoreactive ET(이하 ir-ET로 약함)을 방사선면역측정법으로 정량분석 하였다.

### 결 과 :

소 폐동맥내피세포 배양 상청액내 ir-ET은 배양 시간에 비례하여 증가하였으며 혈소판  $10^8$ /ml을 첨가한 군에서는 배양 8시간 및 18시간 후에 대조배지군에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 혈소판 첨가군에서 배양 상청액내 ir-ET은 혈소판의 수가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였고  $10^8$ /ml에서는 대조배지군에 비해 유의하게 높았다( $0 < 0.05$ ).

Ir-ET를 증가시키지 않는 혈소판( $10^7$ /ml)에 ir-ET을 유의하게 증가시키지 않는 농도의 thrombin(0.1u/ml) 또는 내독소(1ug/ml)를 각각 첨가한 군에서 배양 상청액내 ir-ET은 배지 대조군과 단독 첨가군(thrombin 0.1u/ml, 내독소 1ug/ml)에 비해

각각 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ).

소 폐동맥내피세포 배양 상청액내 ir-ET은 thrombin(1-10ug/ml), TGF- $\beta$ 1(100-1000pM) 첨가군에서 각각 대조배지군에 비해 유의하게 높았으며( $p < 0.05$ ), serotonin(1-100uM)첨가군은 대조배지군과 유의한 차이가 없었다.

### 결 론 :

혈소판은 소 폐동맥 내피세포에서 ET 생산을 자극하며 그 기전은 혈소판과 활성화된 혈소판에서 유리되는 TGF- $\beta$ 1 등의 매개체에 의한 내피세포의 자극으로 생각되며 이외에 혈소판에 의한 내피세포의 ET 생산 반응 조절(priming)가능성도 추측할 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 : 411, 1988
2. Yanagisawa M, Masakin T : Molecular biology and biochemistry of endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10 : 374, 1989
3. Barnes PJ : Endothelins and pulmonary diseases. *J Appl Physiol* 77(3) : 1051, 1994
4. 이상도, 이영현, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철 : 실험적 급성 폐동맥색전증에서 Ketanserin과 Positive End-Expiratory Pressure Ventilation이 혈류역할 및 환기에 미치는 영향. *결핵 및 호흡기 질환* 40(2) : 135, 1993
5. Sofia M, Mormile M, Faraone S, Carratu P, Micco A, Alifano M, Maniscalco M : Abnormalities of endothelin-1 metabolism in pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 153(4) : A93, 1996
6. Steward DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D : Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension ; marker or mediator of disease?

- Ann Intern Med 114 : 464, 1991
7. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R : Expression of endothelin in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med 328 : 1732, 1991
  8. Chaouat A, Weitzenblum E, Higenbottam T : The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. Eur Respir J 9 : 356-363, 1996
  9. Rich S, Kaufmann E, Levy PS : The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. N Engl J Med 327(2) : 76, 1992
  10. Assoian RK, Sporn MB : Type beta transforming growth factor in human platelets ; release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. J Cell Biol 102 : 1271, 1986
  11. Jackson CM : Mechanisms of prothrombin activation. In : Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. Hemostasis and thrombosis ; Basic principles and clinical practice, 2nd ed. p135, Philadelphia, JB Lippincott Co, 1987
  12. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M : Transforming growth factor beta stimulates expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 159 : 1435, 1989
  13. Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett JC, Vanhoutte PM : Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. Eur J Pharmacol 165 : 333, 1989
  14. Shiba R, Yanagisawa M, Miyauchi T, Ishii Y, Kimura S : Elimination of intravenously injected endothelin-1 from the circulation of the rat. J Cardiovasc Pharmacol 13(suppl5) : S98, 1989
  15. Anggard E, Galton S, Rae G, Thomas R, McLoughlin L : The fate of radiolabeled endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. J Cardiovasc Pharmacol 13(suppl5) : s46, 1989
  16. Rernow J, Hemsén A, Lundberg JM : Tissue specific distribution, clearance and vascular effects of endothelin in the pig. Biochem Biophys Res Commun 161 : 647, 1989
  17. Gandhi CR, Berkowitz DE, Watkuns WD : Endothelins ; Biochemistry and pathophysiologic actions. Anesthesiology 80 : 892, 1994
  18. Minkes RK, Bellan JA, Saroyan RM, Kerstein MD, Coy DH : Analysis of cardiovascular pulmonary responses to endothelin-1 and endothelin-3 in the anesthetized cat. J Pharmacol Exp Ther 253 : 1118, 1990
  19. Crawley DE, Liu SF, Barnes PJ, Ewans TW : Endothelin-3 is a potent pulmonary vasodilator in the rat. J Appl Physiol 72 : 1425, 1992
  20. Levin ER : Mechanisms of disease ; Endothelins. N Engl J Med 333(6) : 356, 1995
  21. Wilson DB, Dorfman DM, Orkin SH : A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. Mol Cell Biol 10 : 4854, 1990
  22. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T : The human preproendothelin-1 gene. J Biol Chem 264 : 14954, 1989
  23. Bloch KD, Friedrich, SP, Lee ME, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T : Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. J Biol Chem 264 : 10851, 1989
  24. Curran T, Franza BR Jr : Fos and Jun ; The AP-1 Connection. Cell 55 : 395-397, 1988
  25. Rossi P, Karsenty G, Roberts AB, Roche NS, Sporn MB, de Crombrughe : A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional acti-

- vation of type I collagen promoter by transforming growth factor-beta. *Cell* 52 : 405, 1988
26. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Oxada M : Contribution of Endothelin-1 to the expression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 73 : 887, 1993
  27. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV : Hypoxia induced endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 88 : 1054, 1991
  28. Elton TS, Oparil S, Taylor GR, Hicks PH, Yang RH : Normobaric hypoxia stimulates endothelin-1 gene expression in the rat. *Am J Physiol* 263 : R1260, 1992
  29. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomozawa T, Sugishita Y, Suzuki N : Increased plasma concentrations of Endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 53, 1989
  30. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A : Endothelin in Myocardial infarction. *Nature* 344(8) : 114, 1990
  31. He GW, Mack MJ, Acuff TE, Ryan WH, Starr A : Interaction between endothelin and vasodilators in the human internal mammary artery. *British J Clin Pharmacol* 38(6) : 505, 1994
  32. Vanhoutte PM, Amery A, Birkenhager W : Serotonergic mechanisms in hypertension ; focus on the effects of ketanserin. *Hypertension* 11 : 111, 1988
  33. Elkins RC, Lane M, Greenfield LJ : Pulmonary vascular response to experimental embolism and reversal by embolectomy. *J Surg Res* 25 : 135, 1978
  34. Gurewith V, Cohen ML, Thomas DP : Humoral factors in massive pulmonary embolism ; An experimental study. *Am Heart J* 76(6) : 784, 1968
  35. Priebe HJ : Efficacy of vasodilator therapy in canine model of acute pulmonary hypertension. *Am J Physiol* H1232, 1988
  36. Puckett CL, Gervin AS, Rhodes GR : Role platelets and serotonin in acute massive pulmonary embolism. *Surg Gynecol Obstet* 137 : 618, 1973
  37. Smith GT, Dexter L, Dammin GJ : Postmortem quantitative studies in pulmonary embolism. In Sasahara(Ed) ; *Pulmonary embolic disease*. New York, Grune and Stratton 120, 1965