

## 쥐의 폐동맥 평활근 세포에서 저산소에 의한 Vascular Endothelial Growth Factor의 발현

대구가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 경북대학교 의과대학 소아과학교실\*

노은석 · 김여향\* · 현명철\* · 이상범\*

### Hypoxia Induced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells

Un Seok Nho, M.D., Yeo Hyang Kim, M.D.\*  
Myung Chul Hyun, M.D.\* and Sang Bum Lee, M.D.\*

Department of Pediatrics, School of Medicine, The Catholic University of Korea, Daegu,  
Department of Pediatrics, College of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

**Purpose :** Pulmonary vascular hypertension is a common problem in congenital heart disease, the most common cardiac condition in childhood. However, the mechanisms responsible for this pathologic change, treatment, and prevention are poorly understood. Therefore, we studied the gene expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) by using a hypoxic model of the pulmonary artery smooth muscle cells.

**Methods :** The main pulmonary artery and its proximal branches of a 6 wk old Fischer rat were excised. They were cut into multiple small pieces and suspended in DMEM medium supplemented with 20% fetal bovine serum and incubated in 5% CO<sub>2</sub>-95% air atmosphere. The smooth muscle cells were confirmed by immunostaining with smooth muscle myosin and  $\alpha$ -smooth muscle actin antibodies. The VEGF gene expression in the hypoxic group was compared with the one in control the group as well as the one in the starved group by RT-PCR and Northern blot hybridization.

**Results :** There was no statistically significant difference among the control, hypoxic and starved groups.

**Conclusion :** There are few studies of pulmonary vascular hypertension at the molecular level in Korea. Therefore, we studied the expression of VEGF gene in hypoxic pulmonary vascular smooth muscle cells. Further studies will be needed to find the difference between newly born and adult rats, or human and rat pulmonary vascular smooth muscle cells in gene expression. We hope that the study will lead to a better understanding of pulmonary vascular hypertension. (*J Korean Pediatr Soc* 2003;46:167-172)

**Key Words :** Hypoxia, Vascular endothelial growth factor, Pulmonary artery smooth muscle cells, RT-PCR, Northern blot hybridization

### 서 론

소아 심장병의 주종을 이루고 있는 선천성 심장병 환아들에서 폐동맥 고혈압은 비교적 흔히 발생하지만 매우 치료하기 어려운 합병증이다. 폐동맥 고혈압은 아직 확실히 알려지지 않은 어떤 기전들에 의해서 초래되는 폐동맥혈관 평활근의 비대와 비후를

특징으로 한다<sup>1)</sup>. 또한 산소결핍(hypoxia)은 폐동맥 고혈압에서 볼 수 있는 것과 같은 혈관 평활근 세포의 증식을 일으키는 강력한 자극으로 작용하므로 폐동맥 고혈압의 전형(model)으로 많이 이용되고 있다<sup>2)</sup>. 산소결핍에 대한 혈관의 반응은 주로 내피 세포(endothelial cell)와 평활근 세포(smooth muscle cell)에서 나타난다<sup>3)</sup>. 내피세포는 저산소의 반응으로 platelet-derived growth factor-B(PDGF-B), endothelin(ET-1) 및 vascular endothelial growth factor(VEGF) 등과 같은 vasoconstrictor 및 growth promoter의 생성을 증가시키며<sup>4-7)</sup>, 일산화질소(NO)와 같은 vasodilator 및 smooth muscle cell growth inhibitor

접수 : 2002년 9월 9일, 승인 : 2002년 10월 30일  
책임저자 : 이상범, 경북대학교병원 소아과  
Tel : 053)420-5704 Fax : 053)425-6683  
E-mail : leesb@knu.ac.kr

의 생성은 억제시킨다<sup>8-11</sup>). 한편 평활근 세포는 저산소의 반응으로 포타슘 이온통로를 억제시키고<sup>1</sup>), VEGF<sup>6, 11, 12</sup>)와 heme oxygenase-1(HO-1)<sup>13</sup>)의 생성을 증가시킨다.

폐동맥 고혈압의 원인과 치료 및 예방에 대해서는 아직 많이 알려지지 않은 실정이다. 특히 국내에서는 폐동맥 고혈압에 대한 연구가 전무한 상태라고 할 수 있다. 그러므로 이의 원인을 산소결핍이라는 전형을 이용하여 VEGF이란 유전인자의 차원에서 규명하고, 나아가서는 폐동맥 고혈압의 치료 및 예방책을 마련하기 위하여 이 연구를 시행하려 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 폐동맥 평활근세포(pulmonary artery smooth muscle cell, PASM) 배양

생후 6주된 Fischer rat의 주폐동맥에서 첫 번째 분지되는 곳까지를 박리하여 작은 조각으로 잘라 0.125 mg/mL의 elastase, 1.0 mg/mL collagenase, 0.25 mg/mL soybean trypsin inhibitor, 2.0 mg/mL crystallized bovine serum albumin이 포함된 37°C oscillating bath에서 90분간 배양하였다. 이후 배양된 것을 원심분리하여 pellet을 얻고 이것을 다시 20% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에 넣어 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였으며, 배양액은 이틀에 한번 교체해 주었다. 이렇게 배양한 세포를 평활근 세포에만 선택적으로 염색되는 평활근 myosin과  $\alpha$ -actin 항체를 이용하여 염색함으로써 순수 폐동맥 평활근 세포임을 확인하였다. 저산소 자극을 주기 위해서 PASM을 24시간 동안 starvation 시킨 후 배양접시를 oxygen-regulated incubator(Forma Scientific/Labotect, Model 3187)에서 배양하였고, 이때 질소(N<sub>2</sub>)와 함께 1% 또는 3% 산소(O<sub>2</sub>)를 주입하였다. 배양기 내의 산소 농도는 Fyrite gas analyzers(Bacharach Inc, Pittsburgh, PA)로 측정하였다.

### 2. 유전자 발현의 차이 조사

20% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 5% 이산화탄소 배양기에서 배양한 PASM을 대조군으로 하고, 1% O<sub>2</sub> 압에서 5일, 3% O<sub>2</sub> 압에서 3일 동안 배양한 PASM을 실험군으로 하였다. 3% O<sub>2</sub> 압에서 배양한 PASM은 다시 두 실험군으로 나누어 한 군은 24시간 동안 기아상태를 시켰고 다른 한 군은 계속 20% FBS를 첨가하였다. 5% 이산화탄소 배양기에서 배양한 대조군 세포와 1% 또는 3% O<sub>2</sub> 압에서 배양한 실험군 세포에서의 VEGF 발현 차이를 비교하였고, 또한 기아상태를 시킨 군과 하지 않은 군에서의 VEGF 발현 차이를 비교하였다.

### 3. 총 RNA 추출

총 RNA는 Tri-reagent(MRC, Cincinnati, OH, USA) RNA 추출 kit를 사용하여 추출하였다. 10 cm<sup>2</sup>의 배양접시에 있는 평

활근 세포당 Tri-reagent 1 mL을 넣고 완전하게 세포를 깨기 위해 실온에 5분 정도 두었다. 세포용액에 chloroform을 0.2 mL을 넣어 섞고, 실온에서 15분간 방치 후 4°C에서 12,000×g 속도로 15분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 0.5 mL+의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 다시 실온에 10분간 방치한 후 4°C에서 12,000×g 속도로 8분간 원심분리를 하였다. 이 때 흰색 침전물의 RNA를 75% 에탄올로 한번 씻고 공기 중에 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate (DEPC)가 처리된 증류수에 녹여서 260 nm 및 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 순수도와 농도를 확인 후 실험에 사용하였다.

### 4. RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

PASM의 저산소 자극에서의 VEGF 발현 정도를 비교하기 위하여 SuperScript Preamplification System kit를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 대조군과 실험군에서 각각 분리한 1  $\mu$ g의 총 RNA에 50 ng/ $\mu$ g의 random hexamers를 넣고 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 1분간 꽂아두었다. 여기에 1×PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dNTP, 10 mM DTT를 더 넣어 섞은 후 25°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 10 units의 reverse transcriptase를 넣고 25°C에서 10분간 더 반응시켰다. 반응 tube를 다시 42°C에서 50분간 둔 후 모든 반응이 끝날 수 있도록 70°C에서 15분간 둔 후 얼음에 보관하였다. 이렇게 합성된 first-strand complementary DNA(cDNA)은 PCR로 증폭하였다. 합성된 cDNA 10%에 1×PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.05 units TaqDNA polymerase, 준비된 VEGF primer를 넣고 GeneAmp PCR System 9600(Perkin elmer)를 이용하여 PCR을 하였다. 반응은 94°C에서 2분간 변성 시킨 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 74°C에서 1분의 3단계를 30번 반복하고 74°C에서 10분간 완전하게 반응시켰다. 증폭시킨 cDNA는 2% agarose gel에서 전기영동 시키고 standard size marker를 이용하여 그 크기가 예측된 것과 동일함을 확인하였다.

### 5. Northern blot hybridization

세포에서 추출한 총 RNA 10  $\mu$ g을 2.2 M의 formaldehyde와 섞어서 1% agarose gel(40 mM MOPS, 18% formaldehyde) 상에서 전기영동 하였고, ethidium bromide로 염색하여 UV로 확인하였다. 확인된 gel은 0.05 M NaOH/1.5 M NaCl 용액으로 30분간 알칼리 처리하고 0.5 M Tris-HCl/0.5 M NaCl 용액에 20분간 둔 후, 20×SSC에 45분간 담가 두었다가 나일론 막(Hybond-N, Amersham)으로 RNA를 이전시켰다. RNA가 이전된 나일론 막은 2×SSC에서 잠시 행군 다음 상온에서 말린 뒤 UV하에서 cross-linking하고 hybridization을 위해 준비하였다. Hybridization probe로는 VEGF의 PCR 산물인 VEGF164를 사용하였고 이 probe에  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 동위원소로 labeling하였다. Internal control로는 beta actin을 사용하였다.

나일론 막을 1시간 동안 prehybridization 시킨 후 Rapid-hyb buffer(hybridization solution)와 준비된 probe를 섞은 용액을 넣고 65℃에서 3시간 동안 hybridization 하였다. 비특이적으로 결합된 probe는 2×SSC/0.05% SDS 용액, 0.1×SSC/0.1% SDS 용액에 차례대로 씻어내고 blots는 -80℃에서 autoradiography에 노출시켰다.

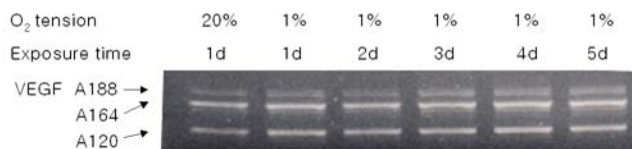
**결 과**

**1. RT-PCR을 이용한 폐동맥 평활근 세포에서의 저산소 기간에 따른 VEGF 생성 정도의 비교**

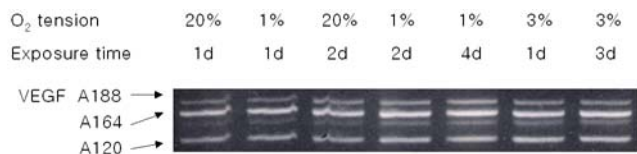
폐동맥 평활근 세포는 산소 결핍에 대한 반응으로 VEGF 생성을 증가시키는데 저산소 기간에 따른 VEGF 생성 정도를 비교해 보고자 하였다. O<sub>2</sub> 압 20%에 노출시킨 대조군 PASM에 비해 실험군 PASM은 O<sub>2</sub> 압 1%에 1, 2, 3, 4, 5일 동안 노출시켰다. 이후 RT-PCR을 이용하여 VEGF subtype을 추출하였고 전기영동하여 저산소 시간에 따른 생성 정도를 비교하였다. 그 결과 대조군과 저산소 기간을 달리한 실험군 간에는 차이가 보이지 않았다(Fig. 1).

**2. RT-PCR을 이용한 폐동맥 평활근 세포에서의 서로 다른 O<sub>2</sub> tension 노출에 따른 VEGF 생성 정도 비교**

폐동맥 평활근 세포를 같은 기간동안 서로 다른 O<sub>2</sub> 압에 노출시켰을 때, VEGF 생성정도를 보고자 하였다. O<sub>2</sub> 압 20%에 1, 2일 노출시킨 군과 1% O<sub>2</sub> 압에 1, 2, 4일 노출시킨 군, 3% O<sub>2</sub> 압에 1, 3일 노출시킨 군을 대상으로 하였다. 이후 RT-PCR을 이용하여 VEGF subtype을 추출하였고 전기영동하여 저산소 정도에 따른 차이를 비교하였다. 그 결과 산소 결핍 정도에 따른 VEGF 생성의 차이가 보이지 않았다(Fig. 2).



**Fig. 1.** Expression analysis of VEGF in cultured Rat PASM by RT-PCR. Abbreviations : VEGF, vascular endothelial growth factor; PASM, pulmonary artery smooth muscle cell; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.



**Fig. 2.** Expression analysis of VEGF in cultured Rat PASM by RT-PCR. Abbreviations : VEGF, vascular endothelial growth factor; PASM, pulmonary artery smooth muscle cell; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

**3. RT-PCR을 이용한 폐동맥 평활근 세포에서 starvation 유무에 따른 VEGF 생성 정도 비교**

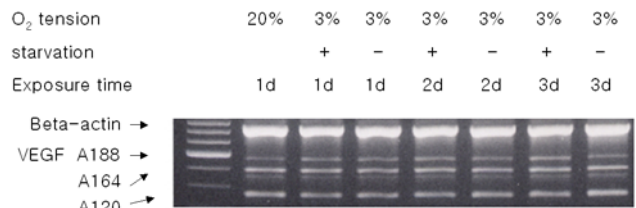
폐동맥 평활근 세포를 같은 O<sub>2</sub> 압에서 기아 유무에 따라 VEGF 생성 정도를 보고자 하였다. 실험군은 모두 3% O<sub>2</sub> 압을 주면서 기아상태를 시킨 군과 하지 않은 군으로 구분하여 1, 2, 3일 배양하였다. 이후 RT-PCR을 이용하여 VEGF를 추출하였고 전기영동하여 두 군간의 차이를 비교하였다. 그 결과 두 군간의 VEGF 생성의 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

**4. Northern blot hybridization을 이용한 폐동맥 평활근 세포에서의 저산소 기간에 따른 VEGF 생성 정도의 비교**

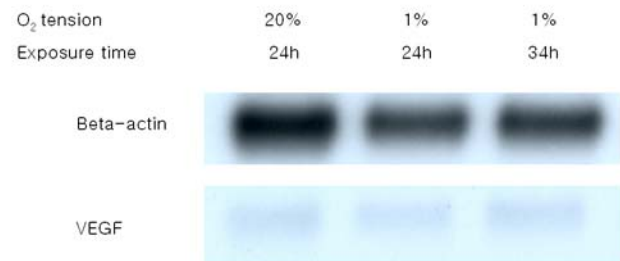
폐동맥 평활근 세포를 산소 결핍 상태인 1% O<sub>2</sub> 압 하에서 24, 34시간으로 시간을 달리하여 배양 후 VEGF subtype 중 RT-PCR에 가장 강한 반응을 보였다고 생각되는 VEGF 164 RNA를 추출하여 Northern blot analysis를 시행하였다. 그 결과 두 군간의 VEGF 생성의 차이가 보이지 않았다(Fig. 4).

**5. Northern blot hybridization을 이용한 폐동맥 평활근 세포에서의 서로 다른 O<sub>2</sub> tension 노출에 따른 VEGF 생성 정도 비교**

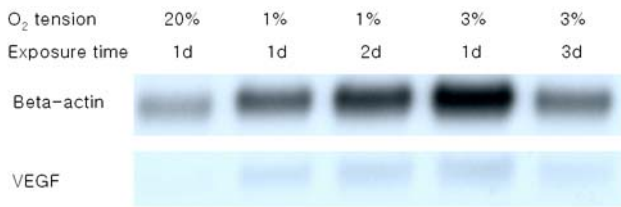
폐동맥 평활근 세포를 산소 결핍 정도를 달리하여 1%와 3% O<sub>2</sub> tension 하에서 각각 1, 2일 배양하여 생성되는 VEGF 164 RNA를 추출하여 Northern blot analysis를 시행하였다. 그 결과 산소 결핍의 정도와 VEGF 생성간에는 차이가 보이지 않았다(Fig. 5).



**Fig. 3.** Expression analysis of VEGF in cultured Rat PASM by RT-PCR. Abbreviations : VEGF, vascular endothelial growth factor; PASM, pulmonary artery smooth muscle cell; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.



**Fig. 4.** Northern analysis of Rat PASM exposed to normoxia or hypoxia. Abbreviations : VEGF, vascular endothelial growth factor; PASM, pulmonary artery smooth muscle cell.



**Fig. 5.** Northern analysis of Rat PASMCs exposed to normoxia or hypoxia. Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; PASMC, pulmonary artery smooth muscle cell.

## 고찰

포유동물은 산소결핍에 대하여 전신적, 국소적, 세포 또는 분자의 차원에서 여러 가지 다른 방향으로 반응한다. 폐순환 내에서도 산소결핍에 대하여 같은 종류의 세포라 하더라도 어떤 세포는 증식을 나타내고, 어떤 세포는 별다른 변화를 나타내지 않는다. 왜 이런 차이가 일어나는지, 또 어떻게 산소 결핍의 신호가 서로 다르게 감응되는지를 규명할 수 있다면 만성 산소결핍 하에서 일어나는 폐순환계의 변화를 더욱 잘 이해할 수 있을 것이다<sup>20)</sup>.

정상적인 폐동맥은 한층의 내피세포로 구성된 혈관내막층, 평활근 세포로 구성된 혈관중막층, 콜라겐으로 구성된 혈관외막층의 3층으로 이루어져 있다. 또한 정상적으로는 낮은 관류 혈압에 적응하여 폐혈류 순환이 이루어지도록 되어 있다. 그러나 폐 실질을 침범하고 저산소에 의해 야기된 폐질환 및 선천성 심질환을 가진 경우, 근위부의 근육성동맥의 혈관중막비대, 원위부의 비근육성동맥 쪽으로 비정상적인 근육층의 침범, 폐포와 연관된 폐동맥혈관의 감소와 같은 변화가 일어난다.

폐동맥 고혈압은 폐동맥 평활근 세포의 비후와 증식을 특징으로 하나, 그 기전은 아직 잘 모르고 있다<sup>1)</sup>. 이에 대해 많은 연구가 진행중이며 그 접근 방법의 하나로 주로 배양된 폐동맥 평활근 세포를 사용하고 있다. 배양시킨 폐동맥 평활근 세포를 사용하는데 있어 첫번째 단점은 반복적인 배양시 분화된 특성을 잃는다는 것이다. 따라서 많은 연구에서는 이 단점을 극복하기 위해 1차 배양 또는 초기 배양만을 거친 폐동맥 평활근 세포를 사용한다<sup>21-23)</sup>. 두번째 단점은 실험쥐의 하나의 동맥에서 얻은 세포 배양에서는 매우 적은 수의 평활근 세포만을 얻을 수 있다는 것이다. 1차 세포 배양에서는 성질이 서로 다른 많은 세포가 동시에 배양되므로 더 단일화되고 많은 수의 폐동맥 평활근 세포를 얻어야 한다.

폐동맥 평활근 배양 방법은 대부분 1982년 Gunther 등<sup>24)</sup>이 사용한 방법을 개량한 것이고 본 연구에서는 1992년 Abraham 등<sup>21)</sup>이 사용한 방법으로 폐동맥 평활근 세포를 배양, 분리하였다. 배양된 폐동맥 평활근 세포는 저산소, 고압력, 영양결핍 등 다양한 조건 하에서의 실험에 사용하였다.

저산소 상태는 폐동맥 혈관벽의 여러 가지 세포에 따라서 다

양한 특징적 유전 인자를 발현하는 것으로 보고되고 있으며<sup>17, 20, 25, 26)</sup>, 저산소의 기간에 비례한다고 한다<sup>2)</sup>. 산소 결핍에 대한 혈관의 반응은 주로 내피세포와 평활근 세포에 나타난다. 내피세포는 저산소의 반응으로 PDGF-B, ET-1 및 VEGF 등과 같은 혈관 수축 인자 및 growth promotor의 생성을 증가시키며<sup>4-7)</sup>, NO와 같은 혈관 확장 인자 및 평활근 세포 성장 억제 인자의 생성은 억제시킨다<sup>8-11)</sup>. 한편 평활근 세포는 저산소의 반응으로 포타슘 이온통로를 억제시키고<sup>1)</sup>, VEGF<sup>6, 11, 12)</sup>와 HO-1<sup>13)</sup>의 생성을 증가시키며, 후에는 일산화탄소(CO) 생성을 증가시킨다. 따라서 저산소 상태에서는 일산화질소 생성이 감소한 반면 일산화탄소 생성이 증가하여 혈관의 긴장성을 조절하는 주요 인자로서의 역할을 한다.

VEGF는 혈관 투과성 조절 인자 혹은 vasculotropin이라고도 불리우며, 평활근세포, 대식세포, 신경교세포, 각질세포에서 생성되어 주로 내피세포에 조절 작용(혈관생성)을 나타내기 때문에 절대적으로 paracrine 경로를 통하여 작용한다<sup>7)</sup>. 그러나 최근 보고<sup>14-16)</sup>에 의하면 일부 동물의 내피세포도 VEGF mRNA를 생성하여 예외적으로 autocrine 경로를 통하여 작용하기도 한다.

ET-1은 장기간 작용하는 혈관 수축 인자로서 폐동맥압을 증가시킨다. 역시 저산소에 노출된 쥐의 폐동맥 평활근 세포와 기도 상피 세포에서 ET-1이 증가하여, 폐동맥 고혈압 발생시 autocrine 또는 paracrine role을 할 수 있을 것으로 생각되어진다<sup>17)</sup>.

일산화질소와 마찬가지로 일산화탄소도 내재성으로 생성되는 가스분자로서, guanylyl cyclase를 활성화시켜 cyclic guanylyl monophosphate(cGMP)를 생성한다. 일산화탄소의 기능은 신경원의 신호 감응 작용, 혈관의 긴장을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 일산화수소의 작용에 의하여 heme이 biliverdine으로 분해하는 과정에서 생성된다<sup>18, 19)</sup>. 정상적인 상태에서는 일산화질소가 혈관의 긴장성을 유지하는데 주역할을 하고 일산화탄소 생성은 낮은 반면, 저산소 상태에서는 내피세포의 손상으로 일산화질소 생성이 줄고 평활근 세포에서 일산화탄소 생성이 증가하여 혈관의 긴장성을 유지하게 된다.

폐동맥 고혈압의 기전과 관련된 유전인자들에 관해 많은 보고가 있으면서 치료에 따른 유전인자들의 발현에 관해서도 많은 보고들이 나오고 있다<sup>27-34)</sup>.

일산화질소는 자유기 가스(free radical gas)로서 폐혈관에서 중요한 신호분자(signaling molecule)이다. 내피세포에서 산소로부터 생성되는 내재성 일산화질소와 L-arginine은 혈관벽에서 평활근 세포로 확산하여 혈관확장 작용을 일으키나, 반면에 혈관 내로 확산된 일산화질소는 혈액소와 단단히 결합하여 전신 혈관 확장 작용을 일으키지 않는다. 그러므로 일산화질소를 소량 흡입시키면 폐동맥 고혈압에서 전신 혈압에 영향없이 폐동맥압을 빠르고 안전하게 감소시킬 수 있다. 최근 보고에 의하면 일산화질소 흡입이 폐손상으로 인한 폐동맥 증식 반응을 선택적으로 조절할 수 있음을 시사하고 있다<sup>27)</sup>. 또한 CMV enhancer/promo-

tor의 영향 아래서, 혹은 비 바이러스 control vector(pcDNA3.1)와 함께 endothelial nitric oxide로 transfection시킨 폐동맥 평활근 세포를 내피세포 독소인 monocrotaline과 함께 정맥 주사하여, 이 독소에 의한 폐혈관 질환을 예방 혹은 치료할 수 있음을 보여주기도 한다<sup>28)</sup>.

본 연구에서는 폐동맥 평활근 세포의 저산소 정도에 따른 유전인자 발현에서 차이가 보이지 않음으로써 저산소 정도에 따라 큰 차이를 보였던 다른 보고들과는 그 결론이 상이하나 아직 국내에서는 유전인자 차원에서의 폐동맥고혈압의 원인규명이나 이에 따른 치료에 대한 연구가 전혀 없는 상태여서 폐동맥 평활근 세포를 분리 배양하고 연구를 시작했다는 것만으로도 충분한 가치가 있을 것으로 생각된다. 저자들은 이 연구에 이어 신생쥐와 성숙쥐와의 차이점 및 나아가서 사람과 쥐의 폐동맥 평활근 세포의 차이점 등을 규명할 예정이며, 이 결과로서 폐동맥 고혈압의 원인기전 규명, 치료 및 예방방법 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

**요 약**

**목적 :** 소아 심장병의 주종을 이루고 있는 선천성 심장병 환아들에서 폐동맥 고혈압은 비교적 흔히 발생하지만 매우 치료하기 어려운 합병증이다. 폐동맥 고혈압의 원인과 치료 및 예방에 대해서는 아직 많이 알려지지 않은 실정이므로 이의 원인을 산소결핍이라는 전형을 이용하여 VEGF란 유전인자의 차원에서 규명하고, 나아가서는 폐동맥 고혈압의 치료 및 예방책을 마련하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

**방법 :** 폐동맥 평활근 세포는 생후 6주 Fischer rat의 주 폐동맥을 적출하여 작은 조각으로 잘라 20% fetal bovine serum을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 평활근 세포에만 선택적으로 염색되는 평활근 myosin과  $\alpha$ -actin 항체를 이용하여 염색함으로써 순수 평활근 세포임을 확인하였다. 5% 이산화탄소 배양기에서 배양한 대조군 세포와 1 또는 3% O<sub>2</sub> tension에서 배양한 실험군 세포에서의 VEGF 발현 차이와 starvation한 군과 하지 않은 군에서의 VEGF 발현 차이를 RT-PCR과 northern blotting을 이용하여 비교하였다.

**결과 :** 대조군과 저산소 조건에서 배양한 실험군에서 VEGF 발현 정도는 차이가 없었다.

**결론 :** 아직 국내에서는 유전인자 차원에서의 폐동맥고혈압의 원인규명이나 이에 따른 치료에 대한 연구가 전혀 없는 상태이며, 이 연구에 이어 신생쥐와 성숙쥐와의 차이점 및 나아가서 사람과 쥐의 폐동맥 평활근 세포의 차이점 등을 규명할 예정이며, 이번 연구 결과를 바탕으로 폐동맥 고혈압의 원인기전 규명, 치료 및 예방방법 개발에 기여하고자 한다.

**참 고 문 헌**

- 1) Jourdan KB, Evans TW, Lamb NJ, Goldstraw P, Mitchell JA. Autocrine function of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in proliferation of human and rat pulmonary artery smooth-muscle cells: species variation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:105-10.
- 2) Cooper AL, Beasley D. Hypoxia stimulates proliferation and interleukin-1 alpha production in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999;277:326-37.
- 3) Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 1995;9:183-89.
- 4) Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1990;86:670-74.
- 5) Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991;88:1054-57.
- 6) Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates VEGF gene expression in endothelial cell: identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995;77:638-43.
- 7) Namiki A, Borgi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinal T, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:31189-95.
- 8) McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol* 1994;267:1921-27.
- 9) Shaul PW, Farrar MA, Magness RR. Pulmonary endothelial nitric oxide production is developmentally regulated in the fetus and newborn. *Am J Physiol* 1993;265:1065-63.
- 10) Liao JK, Zulueta JJ, Yu FS, Peng HB, Cote CG, Hassoun PM. Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *J Clin Invest* 1995;96:2661-66.
- 11) Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995;270:19761-6.
- 12) Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscles cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;90:649-52.
- 13) Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscles cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1473-9.
- 14) Ladoux A, Frelin C. Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:799-803.
- 15) Uchida K, Uchida S, Nitta K, Marumo F, Nihei H, Yumura W. Glomerular endothelial cells in culture express and secrete vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol* 1994;266:F81-8.
- 16) Simorre-Pinatel V, Guerrin M, Chollet P, Penary M, Cla-

- mens S, Malecaze F, et al. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3393-400.
- 17) Nakanishi K, Tajima F, Nakata Y, Osada H, Tachibana S, Kawai T, et al. Expression of endothelin-1 in rats developing hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Lab Invest* 1999; 79:1347-57.
- 18) Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993;259:381-84.
- 19) Cook MN, Nakatsu K, Marks GS, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, et al. Heme oxygenase activity in the adult rat aorta and liver as measured by carbon monoxide formalation. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:515-8.
- 20) Stenmark KR, Frid M, Nemenoff R, Dempsey EC, Das M. Hypoxia induces cell-specific changes in gene expression in vascular wall cells: implications for pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol* 1999;474:231-58.
- 21) Rothman A, Kulik TJ, Taubman MB, Berk BC, Smith CW, Nadal-Ginard B. Development and characterization of a cloned rat pulmonary arterial smooth muscle cell line that maintains differentiated properties through multiple subcultures. *Circulation* 1992;86:1977-86.
- 22) Kawamoto S, Adelstein RS. Characterization of myosin heavy chains in cultured aorta smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987;262:7282-8.
- 23) Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM. Expression of smooth muscle-specific  $\alpha$ -isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cyto-differentiation. *J Cell Biol* 1986;102:343-52.
- 24) Gunther S, Alexander RW, Atkinson WJ, Gimbrone MA Jr. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1982;92:289-98.
- 25) Shehata SM, Mooi WJ, Okazaki T, El-Banna I, Sharma HS, Tibboel D. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension. *Thorax* 1999;54:427-31.
- 26) Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 1998;275:L818-26.
- 27) Roberts JD Jr, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. *Semin Perinatol* 2000;24:55-8.
- 28) Campbell AI, Kuliszewski MA, Stewart DJ. Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:567-75.
- 29) Ambalavanan N, Mariani G, Bulger A, Philips III JB. Role of nitric oxide in regulating neonatal porcine pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Biol Neonate* 1999; 76:291-300.
- 30) Tulloh RM, Hislop AA, Haworth SG. Role of NO in recovery from neonatal hypoxic pulmonary hypertension. *Thorax* 1999;54:796-804.
- 31) Kmiec M, Ochmanski W. Molsidomine: importance in treatment of circulation disorders. *Przegl Lek* 1998;55:532-6.
- 32) Scott WS, Nakayama DK. Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. *J Surg Res* 1998;80:309-14.
- 33) Scott WS, Nakayama DK. Sustained nitric oxide exposure decreases soluble guanylate cyclase mRNA and enzyme activity in pulmonary artery smooth muscle. *J Surg Res* 1998;79:66-70.
- 34) Ivy DD, Kinsella JP, Ziegler JW, Abman SH. Dipyridamole attenuates rebound pulmonary hypertension after inhaled nitric oxide withdrawal in postoperative congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:875-82.