

# 培養腹膜中皮細胞の凝固線溶系因子、血管新生因子産生および細胞内シグナル伝達系に与える各種透析液の影響について

勝谷昌平\*1 頼岡徳在\*2 土谷晋一郎\*3 山下達博\*3 浜口直樹\*3

\*1 広島大学大学院病態制御医科学講座 \*2 広島大学大学院腎臓病制御学講座 \*3 広島県透析連絡協議会

key words : 培養腹膜中皮細胞, 透析液, PAI-1, t-PA, VEGF

## 要 旨

腹膜透析患者の腹膜線維化および血管新生に与える透析液の影響を検討するため、培養ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) の plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tissue type plasminogen activator (t-PA) および vascular endothelial growth factor (VEGF) の産生、さらに細胞内シグナル伝達系である extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) の活性化に対する透析液の影響について検討した。各種透析液にて HPMC を 48 時間刺激後、培養上清を採取して ELISA 法によって PAI-1, t-PA および VEGF を測定した。また ERK 1/2 の活性化については、HPMC を 30 分間刺激後の cell lysate を採取して Western blot 法にて検討した。PAI-1 についてはブドウ糖透析液では濃度依存性に産生が亢進していたが、イコデキストリン透析液ではいずれのブドウ糖透析液よりも有意に PAI の産生が少なかった。t-PA, VEGF についてもイコデキストリン透析液は高濃度ブドウ糖透析液に比して有意に産生が少なかった。ERK 1/2 はブドウ糖濃度依存性に活性化が亢進していたが、イコデキストリン透析液ではいずれのブドウ糖透析液よりも有意に活性化が少なく、コントロール

と同等であった。以上より、イコデキストリン透析液は有効な除水が得られるだけではなく、腹膜線維化、血管新生に、さらには細胞内シグナル伝達系に与える影響が少ない透析液であると考えられた。

## はじめに

腹膜透析は腎代替療法の一つとして広く普及し、末期腎不全患者の QOL 改善に貢献している。近年様々なデバイスの進歩によりアウトカムの改善がみられているが、長期腹膜透析患者にみられる腹膜の劣化による除水不全、その終末像である被嚢性腹膜硬化症は未だ重大な合併症の一つである。腹膜の劣化の原因として、高濃度ブドウ糖をはじめとした非生理的な透析液への暴露、腹膜炎などがあげられている<sup>1,2)</sup>。形態学的には中皮細胞の剥離脱落、中皮下組織の線維化、血管壁の肥厚、血管新生などが認められている。

ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) は、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) や tissue type plasminogen activator (t-PA) などの凝固線溶系因子の産生能を有することが示されており<sup>3)</sup>、高濃度ブドウ糖<sup>4,5)</sup>や炎症性メディエーター<sup>3,6,7)</sup>が HPMC の PAI-1 や t-PA の産生能に影響を及ぼすことが示されている。また、腹膜透析患者においては腹腔内の凝

Effect of peritoneal dialysis solution on the production of coagulation and fibrinolysis factors and angiogenesis factor and activation of cell signaling system in the cultured peritoneal mesothelial cells

Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Masahira Katsutani

Department of Advanced Nephrology, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University

Noriaki Yorioka

Hiroshima dialysis liaison committee

Shinichirou Tsuchiya

固線溶系の異常が認められており、細菌性腹膜炎の際にはこれら異常が顕著になることが示されている<sup>3, 8)</sup>。さらに、この凝固線溶系の異常が腹膜線維化を惹起し、進展させると言われている<sup>9)</sup>。

過去の様々な研究において、凝固線溶系がフィブリンや細胞外基質 (ECM) の沈着や分解を調節することによって、組織の線維化やリモデリングに関与することが示されている。plasmin はフィブリンや細胞外基質を分解するプロテアーゼであり、この作用は plasmin 自身によるものと matrix metalloproteinases (MMPs) を活性化することによるものがある。plasmin はその proenzyme である plasminogen から plasminogen activator の作用によってつくられ、PAI-1 はこの plasminogen activator の阻害物質である。よって、PAI-1 は線溶や組織のリモデリングにおける重要な調節因子であり、主要な線維化惹起因子と考えられている。過去の *in vivo* の研究では、PAI-1 は肝線維症<sup>10, 11)</sup>、肺線維症<sup>12, 13)</sup>、糸球体硬化<sup>14)</sup>、腎間質の線維化<sup>15, 16)</sup> など様々な臓器の線維化に関与することが示されている。

さらに、近年の研究では PAI-1 がラットの腹膜線維化に関与していることも示されている<sup>17)</sup>。PAI-1 の発現は様々な因子によって惹起されることが知られており、HPMC についてはブドウ糖<sup>4)</sup>、サイトカインや細菌の構成成分<sup>3, 7)</sup>が PAI-1 を発現することが示されている。さらに近年の研究において、PAI-1 は線維化に関与するだけでなく、血管新生に関与することが示されており<sup>18)</sup>、さらに Hjortland<sup>19)</sup>らは、ヒトグリオーマ細胞において PAI-1 が血管新生因子の一つである vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を増加させることを示している。

イコデキストリンは平均分子量 12,000~20,000 のグルコースポリマーであり、ブドウ糖に変わる浸透圧物質として用いられている。7.5% イコデキストリン透析液は長時間貯留によって 4.25% ブドウ糖透析液に匹敵する除水量を得ることができる<sup>20)</sup>。われわれは以前、イコデキストリン透析液はブドウ糖透析液に比して HPMC の細胞間結合装置の障害性が少ないこと、HPMC の viability に与える影響が少ないこと、さらに HPMC の TGF- $\beta$ 1 産生が少ないことなどを示した<sup>21)</sup>。このことから、イコデキストリン透析液は腹膜の凝固線溶系へも与える影響が少ないことが期待され

るが、このことに対する検討は未だされていない。

そこで今回われわれは、HPMC の PAI-1, t-PA 産生に対するブドウ糖透析液とイコデキストリン透析液の与える影響について比較検討を行い、あわせて VEGF 産生に与える影響についても検討を行った。さらに、細胞内シグナル伝達系の一つである ERK 1/2 経路の活性化に対するブドウ糖透析液とイコデキストリン透析液の影響についても比較検討した。以上の方法によって、イコデキストリン透析液が生体適合性、腹膜の劣化防止に優れているかを検討した。

## 1 対象と方法

### 1) HPMC の培養

HPMC は Stylianou ら<sup>22)</sup>の方法に従って、転移や腹膜炎のない胃癌の開腹手術を施行された患者より採取した大網より単離した。得られた HPMC はそれぞれサイトケラチン、ビメンチン、第 VIII 因子で免疫染色を行い、ほかの細胞の混入がないことを確認した。培養には 10% Fetal calf serum (FCS) 添加 Medium 199 を使用し、2~3 継代目の細胞を実験に使用した。なお、検体の採取にあたっては、広島大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得、事前に患者にインフォームドコンセントを行い、書面による承諾を得た。

### 2) テスト培養液の調整

コントロールは 0.1% FCS 添加 Medium 199 とした。各透析液 (エクストラニール, ダイアニール PD-2 1.5, 2.5, 4.25 (Baxter Healthcare Ltd.)) は 2 倍に調整した Medium 199 (0.2% FCS 添加) にて 50:50 に混合して実験に使用した。

### 3) 培養上清中 PAI-1, t-PA, VEGF 蛋白の測定

6-well plate に  $1 \times 10^5$  個/well の HPMC を培養し、sub-confluent になったところで培養液を 0.1% 添加 Medium 199 に替え、48 時間の培養にて growth arrest し、confluent であることを確認した後、各テスト培養液にて培養した。刺激開始 48 時間後に培養上清を採取した。また、蛋白含有量を測定するため、cell lysis buffer を用いて cell lysate も採取した。培養上清中の PAI-1, t-PA, VEGF 濃度を ELISA にて測定した。蛋白量は BCA protein assay kit を

用いて測定した。ELISA にて得られた結果は蛋白量によって補正を行った。

#### 4) ERK 1/2 の活性化の測定

growth arrest まで、上記と同様に培養を行い、各テスト培養液にて刺激開始 30 分後に cell lysis buffer を用いて cell lysate を回収した。BCA protein assay kit を用いた蛋白濃度の測定結果をもとに蛋白濃度を調節した後、SDS-PAGE にて電気泳動し (10% AA gel), NC 膜に転写した後、5% dry milk-TBST でブロッキングし、一次抗体に抗リン酸化 ERK 1/2 抗体および抗 total ERK 1/2, 二次抗体に HRP 標識抗 IgG 抗体を用い、ECL kit を用いてバンドを検出した。

#### 5) 統計解析

得られた結果は mean  $\pm$  SD にて示した。統計解析には ANOVA を用い、 $p < 0.05$  をもって統計的有意とした。

## 2 結果

培養上清中の PAI-1 濃度は、コントロールでは  $2.84 \pm 0.58$  ng/mg cell protein であったのに対し、

ブドウ糖透析液では、ダイアニール PD-2 1.5 (PD 1.5) で  $5.66 \pm 0.51$  ng/mg cell protein, PD-2 2.5 (PD 2.5) で  $6.72 \pm 0.88$  ng/mg cell protein, PD-2 4.25 (PD 4.25) で  $10.20 \pm 1.48$  ng/mg cell protein とブドウ糖濃度依存性に増加していた。一方、イコデキストリン透析液 (エクストラニール (Ex)) では、PAI-1 濃度は  $4.64 \pm 0.93$  ng/mg cell protein といずれのブドウ糖透析液と比べても有意に増加が少なかった (図 1)。

培養上清中の t-PA 濃度は、コントロールでは  $0.56 \pm 0.21$  ng/mg cell protein であったのに対し、ブドウ糖透析液では、PD 2.5 で  $7.51 \pm 2.20$  ng/mg cell protein, PD 4.25 で  $42.86 \pm 11.74$  ng/mg cell protein と有意に増加していた。一方、Ex では、t-PA 濃度は  $4.13 \pm 0.58$  ng/mg cell protein と PD 2.5, PD 4.25 に比べて有意に増加が少なかった (図 2)。

さらに、培養上清中の VEGF 濃度は、コントロールでは  $42.9 \pm 29.8$  ng/mg cell protein であったのに対し、ブドウ糖透析液では、PD 4.25 で  $338.5 \pm 109.5$  ng/mg cell protein と有意に増加していた。一方、Ex では、VEGF 濃度は  $89.8 \pm 26.9$  ng/mg cell protein と PD 4.25 に比べて有意に増加が少なかった (図 3)。

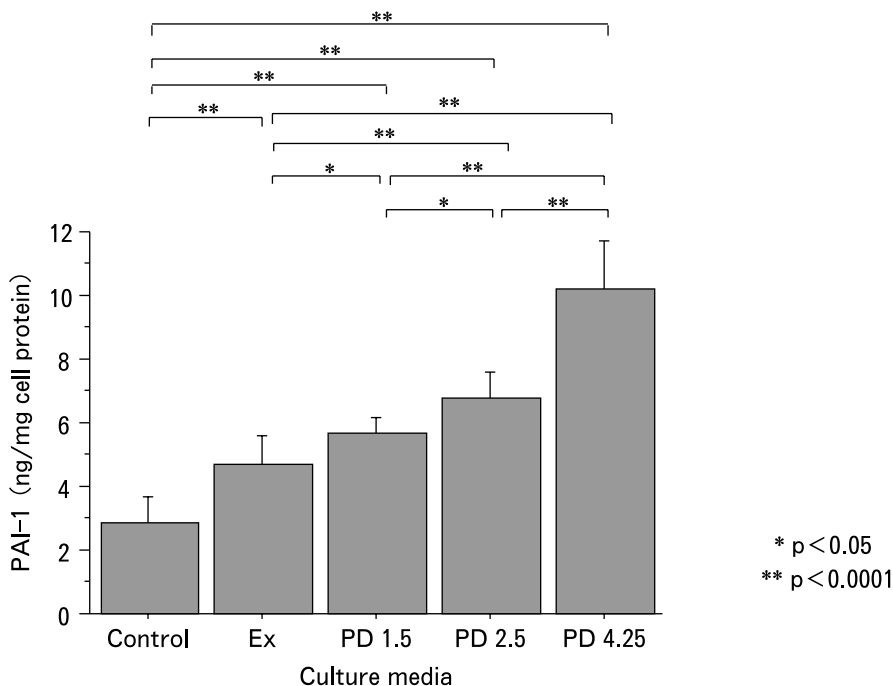


図 1 HPMC の PAI-1 産生に対する透析液の影響

ブドウ糖透析液 (PD 1.5, PD 2.5, PD 4.25) は刺激 48 時間後において、ブドウ糖濃度依存性に PAI-1 産生を亢進させた。一方、イコデキストリン透析液 (Ex) はいずれのブドウ糖透析液に比べても有意にこの影響が少なかった (n=11)。

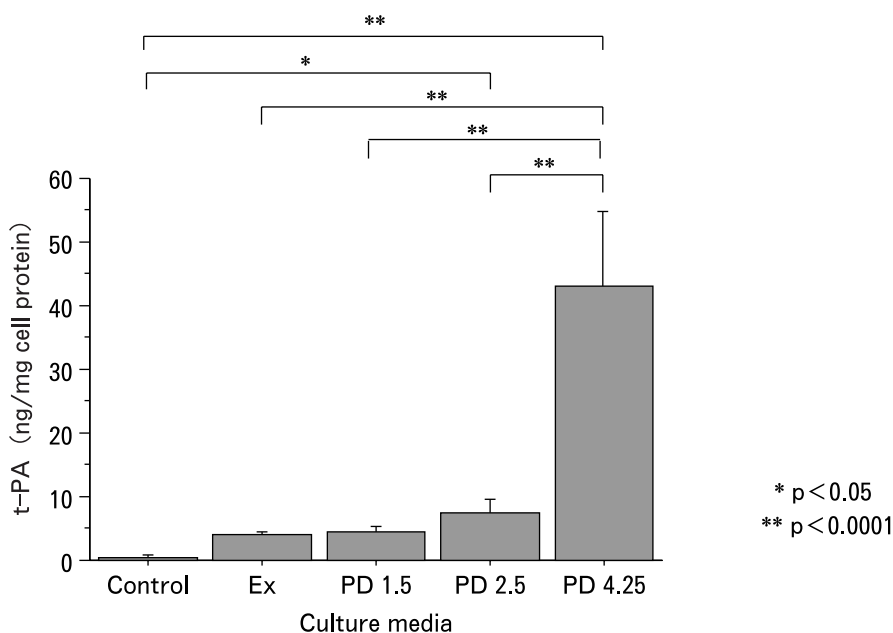


図2 HPMC の t-PA 産生に対する透析液の影響

高濃度ブドウ糖透析液 (PD 2.5, PD 4.25) は刺激 48 時間後において, t-PA 産生を亢進させた. 一方, イコデキストリン透析液 (Ex) は PD 4.25 と比べて有意にこの影響が少なかった (n=10).

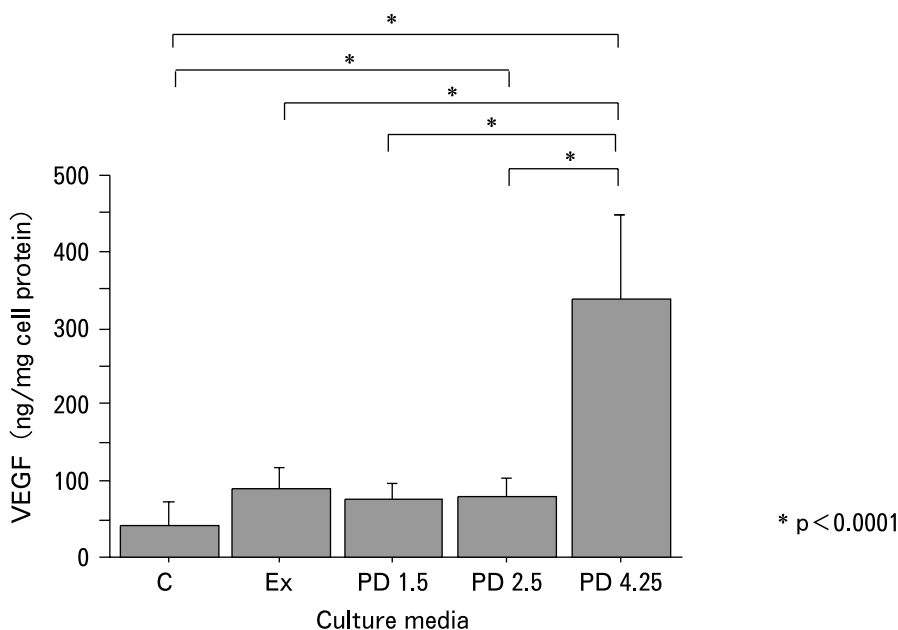


図3 HPMC の VEGF 産生に対する透析液の影響

高濃度ブドウ糖透析液 (PD 4.25) は刺激 48 時間後において, VEGF 産生を亢進させた. 一方, イコデキストリン透析液 (Ex) は PD 4.25 と比べて有意にこの影響が少なかった (n=5).

ERK 1/2 の活性化は, ブドウ糖透析液ではコントロールに比して PD 1.5 で 1.26 倍, PD 2.5 で 1.36 倍, PD 4.25 で 1.51 倍とブドウ糖濃度依存性に活性化の亢進が認められた. 一方, Ex ではいずれのブドウ糖透析液と比べても有意に活性化の亢進が少なく, コントロールと比して有意差がなかった (図 4).

### 3 考 察

腹膜の劣化による腹膜機能不全は長期腹膜透析患者の重大な合併症である. 腹膜の劣化は生体非適合性である透析液 (高濃度ブドウ糖, 高浸透圧, 低 pH, 乳酸, ブドウ糖分解産物など) や難治性, 反復性の腹膜

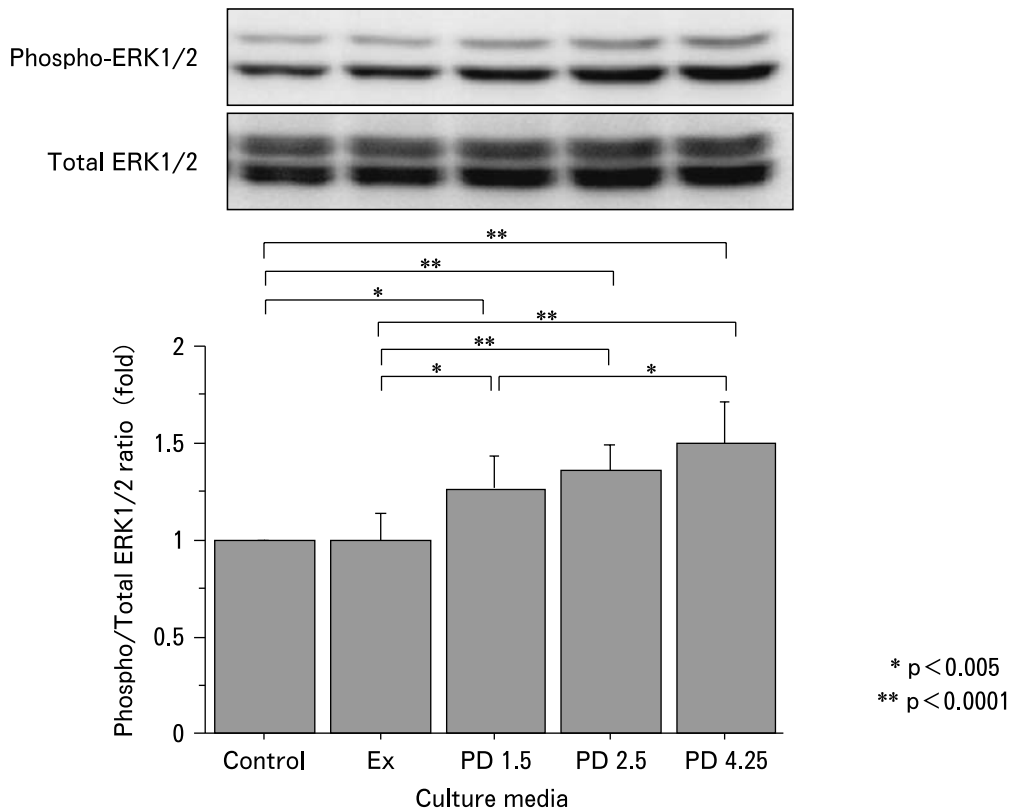


図4 HPMCにおけるERK1/2活性化に対する透析液の影響

ブドウ糖透析液 (PD 1.5, PD 2.5, PD 4.25) は刺激 30 分後において、ブドウ糖濃度依存性に ERK 1/2 活性化を亢進させた。一方、イコデキストリン透析液 (Ex) はいずれのブドウ糖透析液に比べても有意にこの影響が少なく、コントロールと比して有意差はなかった (n=7)。

炎などが原因として考えられており<sup>1, 2)</sup>、これらはサイトカイン<sup>23~25)</sup>、凝固線溶系因子<sup>2~9, 17)</sup>などのメディエーターの産生亢進、レニン-アンジオテンシン系の活性化<sup>26)</sup>などをもたらす。

今回の検討でわれわれはまず、ブドウ糖透析液は HPMC において PAI-1 の産生亢進をもたらす一方、イコデキストリン透析液はこの作用が有意に少ないことを示した。PAI-1 は plasmin の生成を抑制すること、さらに二次的に MMPs の活性化が抑制されることによって fibrin や ECM の分解が減少し、結果的に線維化が惹起される<sup>27)</sup>。さらに、PAI-1 は plasmin 非依存性の線維化惹起作用も有することが示されている。つまり、PAI-1 は炎症性マクロファージ、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性の myofibroblast を動員して線維化に関与していることが示されている<sup>16, 28, 29)</sup>。このことより、今回の成績からはイコデキストリン透析液は腹膜の線維化を惹起、進行させる作用が少ないことが考えられる。

また、今回われわれはブドウ糖透析液は HPMC に

おいて t-PA の産生亢進をもたらすことを示した。t-PA および plasmin は、fibrin や ECM を分解するという作用からみれば、線維化抑制性に働くと考えられるが、最近の研究では t-PA のノックアウトマウスのほうが腎間質の線維化が軽度であることが示されており、この研究では t-PA は MMP-9 を誘導して尿細管の基底膜を破壊したり、 $\alpha$ -SMA 陽性の myofibroblast への形質転換を促進したりして、線維化惹起性に働いていると考察されている<sup>30)</sup>。また、ラット肝線維症モデルでは PAI-1 とともに t-PA の過剰発現が認められることが示されている<sup>10, 11)</sup>。

このように、PAI-1 および t-PA の dysregulation が plasmin 依存性および plasmin 非依存性の経路にて異常な組織のリモデリングや病的な fibrin, ECM の蓄積を引き起こし、これが線維化の惹起、進展に関与すると考えられる。このことから、ブドウ糖透析液、とりわけ高濃度ブドウ糖透析液は PAI-1, t-PA の産生亢進を介して腹膜線維化に関与していると考えられる。

一方, イコデキストリン透析液はグルコース透析液に比べて PAI-1, t-PA 産生に与える影響が有意に少なく, 腹膜線維化惹起性の少ない透析液であると考えられた。さらに, 今回の検討で, 高濃度ブドウ糖透析液は HPMC において VEGF の産生を亢進させる一方, イコデキストリン透析液ではこの影響が少ないことも示した。このことから, イコデキストリン透析液は血管新生の面からみても高濃度ブドウ糖透析液に比べて惹起性が少ないことが考えられた。

MAP kinase は, serine/threonin kinase であり, 様々な細胞への刺激を細胞表面から核へとシグナルを伝達し, 様々な生体反応を起こす。MAP kinase は, HPMC においても様々な刺激を伝達することが示されており, われわれも以前 angiotensin II が MAP kinase のうち ERK 1/2, p38 の経路を介して fibronectin を発現させることを示した<sup>26)</sup>。また, ERK 1/2 経路は様々なタイプの細胞においてブドウ糖刺激によって活性化され, 様々な生体反応を引き起こしていることが知られており<sup>24, 31~33)</sup>, Suzuki らは, 血管平滑筋細胞においてブドウ糖が ERK 1/2 経路を介して PAI-1 の発現を亢進させることを示している<sup>33)</sup>。

そこで, 今回われわれは ERK 1/2 の活性化に与える透析液の影響について検討した。今回の検討では, ブドウ糖透析液では有意な ERK 1/2 の活性化亢進が認められたが, イコデキストリン透析液ではコントロールに比べても有意差はなく, ERK 1/2 の活性化に与える影響が少ないことが考えられた。このことはすなわち, 引き続いて起こる HPMC の生体反応もブドウ糖透析液に比べて少ないことが予想される。

従来, 有効な除水を得るためには, 2.5%, 4.25% の高濃度のブドウ糖透析液が使用されており, 腹膜劣化の危険性が高かったが, これに対してイコデキストリン透析液は十分な除水が得られるだけでなく, 腹膜線維化, 血管新生の両面に与える影響が少なく, 細胞のシグナル伝達系から見ても刺激性の少ない有用な透析液であると考えられる。

## 文 献

1) Mortier S, De Vriese AS, Van de Voorde J, et al.: Hemodynamic effects of peritoneal dialysis solutions on the rat peritoneal membrane: role of acidity, buffer choice, glucose concentration, and glucose degradation

products. *J Am Soc Nephrol*, 13; 480-489, 2002.

2) Wong TY, Szeto CC, Lai KB, et al.: Longitudinal study of peritoneal membrane function in continuous ambulatory peritoneal dialysis: relationship with peritonitis and fibrosing factors. *Perit Dial Int*, 20; 679-685, 2000.

3) Sitter T, Spannag M, Schiffl H, et al.: Imbalance between intraperitoneal coagulation and fibrinolysis during peritonitis of CAPD patients: the role of mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 10; 677-683, 1995.

4) Shao JC, Yorioka N, Nishida Y, et al.: Effect of pH and glucose on cultured human peritoneal mesothelial cells. *Scand J Urol Nephrol*, 33; 248-256, 1999.

5) Sitter T, Mandl-Weber S, Wormle M, et al.: D-glucose increases the synthesis of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in human peritoneal mesothelial cells. *Thromb Haemost*, 82; 1171-1176, 1999.

6) Sitter T, Toet K, Fricke H, et al.: Modulation of procoagulant and fibrinolytic system components of mesothelial cells by inflammatory mediators. *Am J Physiol*, 271; R 1256-1263, 1996.

7) Mandl-Weber S, Haslinger B, Lederer SR, et al.: Heat-killed microorganisms induce PAI-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: role of interleukin-1 $\alpha$ . *Am J Kidney Dis*, 37; 815-819, 2001.

8) Geodde M, Sitter T, Schiffl H, et al.: Coagulation- and fibrinolysis-related antigens in plasma and dialysate of CAPD patients. *Perit Dial Int*, 17; 121-124, 1997.

9) Dobbie JW, Jasani MK: Role of imbalance of intracavity fibrin formation and removal in the pathogenesis of peritoneal lesions in CAPD [editorial]. *Perit Dial Int*, 17; 121-122, 1997.

10) Seki T, Imai U, Uno S, et al.: Production of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in mildly cirrhotic rat liver. *Thromb Haemost*, 75; 801-807, 1996.

11) Zhang PL, Takahara T, Yata Y, et al.: Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of satellite cells. *J Hepatol*, 31; 703-711, 1999.

12) Olman MA, Mackman N, Gladson CL, et al.: Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *J Clin Invest*, 96; 1621-1630, 1995.

13) Hattori N, Degen JL, Sisson TH, et al.: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *J Clin Invest*, 106; 1341-1350, 2000.

14) Fogo AB: Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol*, 7; 147-159, 1999.

15) Duymelinck C, Dauwe SHE, De Greef KEJ, et al.:

- TIMP-1 gene expression and PAI-1 antigen after unilateral ureteral obstruction in the adult male rat. *Kidney Int*, 58; 1186-1201, 2000.
- 16) Oda T, Jung YO, Kim HS, et al.: PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int*, 30; 587-596, 2001.
- 17) Higuchi C, Tanihata Y, Nishimura H, et al.: Effects of glucose and Plasminogen activator inhibitor-1 on collagen metabolism in the peritoneum. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 9; 173-181, 2005.
- 18) Stefansson S, McMahon GA, Petittlerc E, et al.: Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling. *Curr Pharm Des*, 9; 1545-1564, 2003.
- 19) Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S, et al.: Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res*, 294; 130-139, 2004.
- 20) Mistry CD, Gokal R, Peers E, the MIDAS study group: A randomized multicenter clinical trial comparing isosmolar icodextrin with hyperosmolar glucose solutions in CAPD. *Kidney Int*, 46; 496-503, 1994.
- 21) Ito T, Yorioka N, Kyuden Y, et al.: Effect of glucose polymer on the intracellular junctions of cultured human peritoneal membrane. *Nephron Clin Pract*, 93; c97-105, 2003.
- 22) Stylianou E, Jenner LA, Davies M, et al.: Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 37; 1563-1570, 1990.
- 23) Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, et al.: Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 11; 1969-1979, 2000.
- 24) Fujita H, Omori S, Ishikura K, et al.: ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF- $\beta$  expression in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286; F 120-126, 2004.
- 25) Haslinger B, Mandl-Weber S, Sellmayer A, et al.: Effect of high glucose concentration on the synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 in human peritoneal mesothelial cells: Involvement of protein kinase C. *Nephron*, 87; 346-351, 2001.
- 26) Kiribayashi K, Masaki T, Naito T, et al.: Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK 1/2 and p38 MAPK. *Kidney Int*, 67; 1126-1135, 2005.
- 27) Baricos WH, Cortez SL, el-Dahr SS, et al.: ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int*, 47; 1039-1047, 1995.
- 28) Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, et al.: Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int*, 67; 2221-2238, 2005.
- 29) Hung Y, Noble N: An unexpected role of plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1) in renal fibrosis [editorial]. *Kidney Int*, 67; 2502-2503, 2005.
- 30) Yang J, Shultz RW, Mars WM, et al.: Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest*, 110; 1525-1538, 2002.
- 31) Sitter T, Haslinger B, Mandl S, et al.: High glucose increases prostaglandin E2 synthesis in human peritoneal mesothelial cells: role of hyperosmolarity. *J Am Soc Nephrol*, 9; 2005-2012, 1998.
- 32) Lee GT, Cho YD: Regulation of fibronectin levels by agmatine and spermine in mesangial cells under high-glucose conditions. *Diabetes Res Clin Pract*, 66; 119-128, 2004.
- 33) Suzuki M, Akimoto K, Hattori Y: Glucose upregulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Life Sciences*, 72; 59-66, 2002.