

Tautomycetin이 혈관 평활근세포와
사구체 혈관간세포의 증식과
세포외기질 단백 생산에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김지혜

Tautomycetin이 혈관 평활근세포와
사구체 혈관간세포의 증식과
세포외기질 단백질 생산에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김지혜

Tautomycetin이 혈관 평활근세포와
사구체 혈관간세포의 증식과
세포외기질 단백질 생산에 미치는 영향

지도 김 유 선 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 지 혜

김지혜의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 김 유 선 _____ 인

심사위원 _____ 하 현 주 _____ 인

심사위원 _____ 강 신 욱 _____ 인

연세대학교 대학원

2005 년 6 월 일

감사의 글

입학할 때부터 하던 실험에서 새로운 약물로 졸업 실험을 바꾸고 논문 걱정으로 하루하루를 맞았었는데 시작이 반이라고 어느새 졸업을 하게 되었습니다. 한편의 논문을 마무리하면서 연구자로서 걸음에 도움을 주신 여러분들께 감사의 마음을 전합니다.

어리고 철없는 저를 제자로 받아주신 뒤 항상 딸처럼 따뜻하게 감싸주시고 챙겨주시며 믿고 지켜봐주신 김유선 교수님, 여러 해 동안 논문을 지도해 주시고 연구자의 자세를 가르쳐 주신 이희발 교수님, 늘 실험이 막히거나 난관에 부딪칠 때마다 그 해결책을 제시해 주시며 실험자의 길을 가르쳐주신 하헌주 교수님께 감사드리며, 논문이 나오기까지 교정 및 심사를 하시느라 고생하신 강신욱 교수님께도 고마움을 금할 길이 없습니다.

그리고 실험에 대해 아무것도 모르고 모든 것이 처음인 저에게 실험 방법을 전수해주고 논문실험에 대해 많은 조언을 아끼지 않으며, 저의 모든 실험을 도와주고 논문을 다듬어 주신 박제현 선배님과 서지연 선배님께도 감사드리며, 실험에 대해 많은 도움과 조언을 아끼지 않고, 항상 인생 상담자의 역할을 해주신 유미라 선생님과 면역학 검사실의 김혜진, 손승숙, 최상미, 최운정 선생님께도 감사드립니다. 또한 항상 곁에서 함께 실험하며 마음의 위로가 되어준 송재숙 언니, 이태영 언니에게도 고마운 마음을 전합니다. 여러분의 관심과 도움 속에 논문을 무사히 마칠 수 있었습니다. 다시 한번 감사드립니다.

특히 너무나 사랑하는 우리 가족.. 실험에 지칠 때마다 항상 저를 위로하고 도와주신 어머니와 믿고 지켜봐주시며 무언의 격려를 보내주신 아버지, 늘 내게 웃음을 주는 세상에 하나뿐인 동생과, 그리고 언제나 곁에서 힘이 되어준 서정필에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씬

차 례

그림 차례	ii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 시약 및 기구	5
2. 세포배양	5
3. 약물투여	6
4. 세포증식의 평가	6
5. 단백질 분리	6
6. Western blot 분석	7
7. 통계처리	7
III. 결과	8
1. 세포증식	8
2. Apoptosis	10
3. Fibronectin	12
4. Akt, ERK 1/2 및 p38 MAPK	14
IV. 고찰	17
V. 결론	19
참고문헌	20
영문요약	23

그림 차례

그림 1. TMC의 화학적 구조	4
그림 2. TMC가 PDGF로 유도된 세포의 증식에 미치는 영향	9
그림 3. TMC가 유도한 apoptosis	11
그림 4. TMC가 PDGF로 유도된 fibronectin 분비에 미치는 영향	13
그림 5. PDGF에 의한 Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화	15
그림 6. TMC가 PDGF로 유도된 Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향	16

국문요약

Tautomycetin이 혈관 평활근세포와 사구체 혈관간세포의 증식과 세포외기질 단백 생산에 미치는 영향

혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포의 증식과 세포외기질 침착은 장기이식 후 발생하는 사구체경화증이나 만성이식신 기능부전의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다. Tautomycetin (TMC)는 국내에서 새로 개발된 면역억제제로서 tyrosine kinase와 protein phosphatase 1의 활성화를 억제함으로써 T-세포의 apoptosis를 유도한다. 본 연구에서는 흰쥐 혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포를 이용하여 platelet-derived growth factor (PDGF)-BB로 유도한 증식과 세포외기질 단백 생산에 미치는 TMC의 영향을 연구하였다.

일차배양한 흰쥐 혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포는 PDGF-BB 10 ng/ml로 자극하였고, TMC는 PDGF-BB를 투여하기 1시간 전에 투여하였다. 세포의 증식은 MTT로, caspase-3 분절, fibronectin 분비, Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화는 Western blot 분석 방법을 사용하였다.

PDGF 투여후 흰쥐 혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포의 증식, fibronectin 분비, Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화는 현저히 증가되었다. TMC 1 μ g/ml 이상은 기저수준의 MTT를 감소시켰고, caspase-3 분절은 용량의존적으로 증가하였다. TMC 100 ng/ml은 PDGF에 의한 세포의 증식은 억제했으나 fibronectin 분비, Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화를 감소시키지 못하였다.

결론적으로, 본 연구 결과 혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포에서 독성이 없는 농도의 TMC는 PDGF에 의한 세포 증식을 억제하였다. T-세포에서 수행된 기존의 연구결과와 더불어 본 연구의 결과는 TMC의 효과가 T-세포에 특이적임을 입증하였으며, 임상에서 약물의 적용을 위하여 보다 다양한 연구를 통한 적절한 치료 농도의 설정이 필수적임을 제시하였다.

핵심되는 말 : 토토마이세틴, 혈관평활근세포, 사구체 혈관간세포, 증식, 세포외기질 단백질

Tautomycetin이 혈관 평활근세포와 사구체 혈관간세포의
증식과 세포외기질 단백 생산에 미치는 영향

<지도교수 김 유 선>

연세대학교 대학원 의과학과

김 지 혜

I. 서론

만성 이식신 기능부전증의 주요병리소견은 혈관경화증과 사구체경화증이며 이러한 병리소견은 면역학적원인 또는 비면역학적 원인에 의하여 야기되는 혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포의 증식과 세포외기질 침착이다^{1,2}. 특히, fibronectin은 병변부위에 가장 많이 침착되는 세포외기질 단백질이며 integrin 수용체와 결합하여 세포내 신호전달계를 유도한다³.

아직까지 이러한 만성병변을 효과적으로 제어하는 방법은 매우 제한적으로 여러 약제를 사용하여 다양한 cytokine과 성장인자의 생성과 발현을 억제하려는 시도가 있어왔으나 임상에서 사용할 정도로 그 효과가 확연하게 밝혀진 제제는 없다^{4,5}.

최근 국내에서 새로이 개발된 tautomycetin (TMC, 그림 1)은 제주도 지역에서 채집된 토양방선균의 한 균주(*streptomyces griseochromogenes*)에서 분리된 면역억제제로써 serine/ threonine protein phosphatase의 일종인 protein phosphatase 1 (PP1)의 특이적 억제제로^{6,7} cyclosporine이나 tacrolimus에 비하여 100배 낮은 농도에서 T-세포의 apoptosis를 유도함으로써 강력한 면역억제 효과를 보인다. TMC의 apoptosis 유발효과는 B-세포와는 무관하고 T-세포 특이적인 방식으로 나타나며 tyrosine kinase 활성화와 T-세포 수용체의 adapter 단백질의 인산화뿐만 아니라 calcium signaling과 Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) 등의 세포내 공통신호전달계를 억제하는 것으로 알려져 있다^{8,9}.

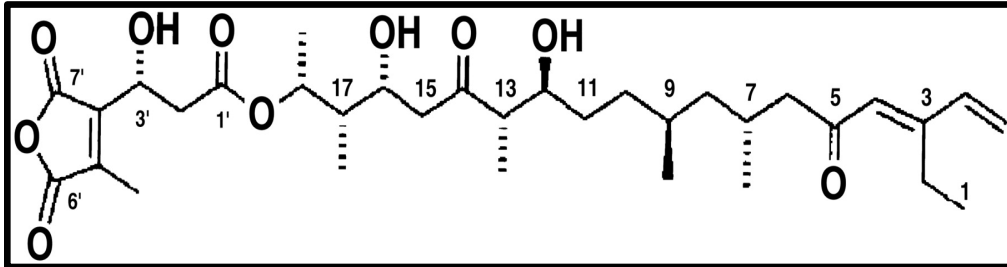


그림 1. TMC의 화학적 구조.

Platelet-derived growth factor (PDGF)는 혈관평활근세포는 물론 혈관간세포의 증식과 세포외기질의 분비를 유발하는 주요 유발 인자이다¹⁰⁻¹². PDGF와 PDGF 수용체는 심장이식 모델에서 조직의 remodeling에 관여하며¹³ 신혈관 거부반응으로 증식이 증가하는 부위에서 PDGF의 단백질과 mRNA 수준이 과 표현되며¹⁴ 만성 이식신 기능부전 모델에서도 역시 증가되는 것으로 알려지고 있다^{10,11}. 또한 PDGF나 PDGF 수용체에 대한 항체는 세포증식이나 세포외기질 분비를 억제하는바¹⁵, 특히, 흰쥐의 심장이식 모델에서 PDGF는 관상동맥의 근 내막증식에 관여하며¹⁶, PDGF 수용체 억제제인 AG-1295는 만성 이식혈관병증을 억제한다고 알려져 있다¹⁷.

본 연구에서는 TMC가 PDGF로 유도한 혈관평활근세포와 혈관간세포의 증식에 미치는 억제효과를 검색하며 거기에 관여하는 작용기전, 그리고 fibronectin 분비에 미치는 영향과 관여하는 신호 전달계중 Akt, ERK, 그리고 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향을 검색하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약 및 기구는 따로 제시되지 않은 한 각각 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)와 Nalge Nunc International (Naper Ville, IL, USA)에서 구입하였다. TMC는 연세대학교 공과대학 생명공학과 이 상규 교수로부터 제공받아 사용하였다.

2. 세포 배양

가. 백서 대동맥 혈관평활근세포의 분리 및 배양

체중 200-250 gm의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 단두하여 희생시킨 후 복부와 흉부에 정중 절개창을 만들고 척추로부터 대동맥을 박리하였다. 적출된 대동맥을 penicillin (100U/ml)과 streptomycin (100mg/ml)이 함유된 4°C 인산완충액(phosphate buffered saline: PBS)에 담아 대동맥으로부터 지방 조직과 혈액 등을 제거한 다음, 준비한 collagenase (Worthington Biochemical Co., Greehold, NJ, USA)가 함유된 Eagle's minimum essential medium (EMEM) 배양액에 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 대동맥의 외막과 내막을 dissecting microscope (Olympus SZ 40, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)하에서 박리한 후 잘게 잘랐다. 절편들은 collagenase가 함유된 EMEM과 함께 37°C에서 1-1.5시간 동안 반응시킨 다음 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 남은 세포를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 EMEM에서 배양하였다. 배양된 세포는 anti- α 1-actin antibody (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역 조직 화학 염색을 시행하여 혈관평활근세포임을 확인하였다. 5-10회 계대 배양한 혈관평활근세포를 본 연구에 이용하였다.

나. 흰쥐 사구체 혈관간세포의 분리 및 배양

체중 100 gm 정도의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 마취 후 단두하고 양측 신장을 적출한 후 피질부를 가위로 잘게 썰고 표준화된 체 거름망을 변형하여 사구체를 분리하고 혈관간 세포를 배양하였다. 75 μ m 소공의 체에 걸린 사구체를 취하고 collagenase와 trypsin으로 처리한 후

2,000 rpm에서 원심 분리하여 얻은 사구체를 20% FBS, penicillin (100 U/ml)과 streptomycin (100 μ g/ml)을 함유한 Duplecco's modified Eagles medium (DMEM: GIBCO BRL)에서 배양하였다. 역상 현미경으로 혈관간 세포의 형태를 확인하고, 항 vimentin 항체(DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)와 항 cytokeratin 항체(DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 사구체 혈관간세포임을 확인하였다. 5-10회 계대 배양한 혈관간세포를 본 연구에 이용하였다.

3. 약물 투여

세포들로 배양용기가 찼을 때 혈청배제 배양액으로 교환하여 48시간 배양하여 세포 성장을 동일화하였다. 그 후 새로운 혈청배제 배양액으로 교환하면서 10 ng/ml의 PDGF-BB를 투여하였다. TMC는 PDGF-BB를 투여하기 1시간 전에 투여하였다.

4. 세포 증식의 평가

세포의 증식은 MTT로 평가하였다. MTT 분석은 실험 종료 후 각 well에 1 mg/ml의 농도로 첨가하여 세포 배양기에서 2 시간 동안 반응시킨 후 extraction buffer (20 % SDS, 50 % N,N-dimethylformamide, pH 4.7)를 첨가한다. 24 시간 경과 후 microplate reader (SpectraMax 340, Molecular Devices Co., CA, USA)를 이용하여 562 nm에서 MTT 양을 측정하였다.

5. 단백질 분리

Fibronectin의 측정을 위하여 실험이 종료된 세포 배양액을 취하여 원심 분리한 후 cell debris 등을 제거한 상층액을 -70°C 에 보관하였다. Akt, ERK 1/2, p38 MAPK, cleaved caspase-3 활성화 측정을 위한 시료의 채취시간은 Akt, ERK 1/2, p38 MAPK, 그리고 caspase-3 분질의 시간에 따른 활성도를 검사하여 결정하였다. 실험이 종료된 후 세포는 PBS로 2회 세척한 후 세포 용해 완충액(20 mM Tris, pH 7.0, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 20 μ M leupeptin, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 mM EGTA,

pH 8.0, 1 mM pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate)을 사용하여 얼음위에서 10분간 반응시킨 후 13,000 rpm으로 15분간 4°C에서 원심분리한 후 세포내 단백질을 추출하였다. 세포내 단백질은 Bio-Rad 단백질 분석 kit로 정량하였다.

6. Western blot 분석

세포내 단백질로 보정된 세포 배양액 또는 세포내 단백질은 sample buffer (12 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% glycerol, 0.4% SDS, 2.88 mM 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개 분리한 후 nitrocellulose 흡착지에 전이시켰다. 단백질에 대한 molecular marker를 사용하여 전개와 전이 정도를 확인하였다. 흡착지를 5% non fat dry milk blocking 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20을 포함한 Tris 완충액으로 2회 세척한 후 Akt, ERK 1/2, p38 MAPK, 그리고 caspase-3 분절 항체로 각각 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. Akt, ERK, 그리고 p38 MAPK 는 인산화된 항체 및 인산화되지 않은 항체를 사용하여 인산화 정도를 보정하였다. Akt, ERK 1/2, p38 MAPK, 그리고 caspase-3 분절에 관련된 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Fibronectin 항체(DAKO)는 일차와 이차가 결합되어 있는 항체를 사용하였다. Peroxidase가 conjugation된 이차 항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG; Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 이차 항체를 검출하였다. 각각의 밀도는 Tina 2.1 프로그램을 사용하여 측정된 후 정량하여 대조군을 1.0으로하여 비교하였다.

7. 통계처리

모든 실험결과의 측정치는 “평균(mean) \pm 표준오차(standard error)”로 나타내었으며 각 군 간의 통계학적인 비교는 분산분석(ANOVA)과 t-test를 시행하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. TMC가 PDGF로 유도된 세포의 증식에 미치는 영향.

PDGF 10 ng/ml는 48 시간에 혈관평활근세포에서 2.2배, 혈관간세포에서 2.0배 증식을 유발 하였다. TMC 100 ng/ml 이하는 기저 수준의 MTT에 영향을 미치지 않았고, TMC 100 ng/ml는 PDGF로 유도된 혈관평활근세포와 혈관간세포의 증식을 유의하게 억제하였다. 그러나 TMC 1 mg/ml 이상은 세포증식을 억제하였으나 기저 수준의 MTT가 감소하여 세포 독성이 있는 것으로 판정하였다(그림 2).

A ■

그림 2. TMC가 PDGF에 의한 흰쥐 혈관평활근 세포의 증식에 미치는 영향. A: Vascular smooth muscle cells. B: Mesangial cells. 실험방법은 재료 및 방법에 서술하였다. 결과는 평균±표준오차로 표현하였다. n=5, *P<0.05 versus TMC 0 of vehicle, † P<0.05 versus TMC 0 with PDGF 10 ng/ml.

2. TMC가 유도한 apoptosis.

MTT 실험에서 세포독성이 있는 것으로 판정된 TMC 1 mg/ml 이상은 투여 후 15시간이 경과하였을 때 caspase-3 분절을 증가시킴으로써 고농도의 TMC에 의한 혈관평활근세포와 혈관간세포의 독성이 apoptosis를 통하여 발생함을 관찰하였다(그림 3).

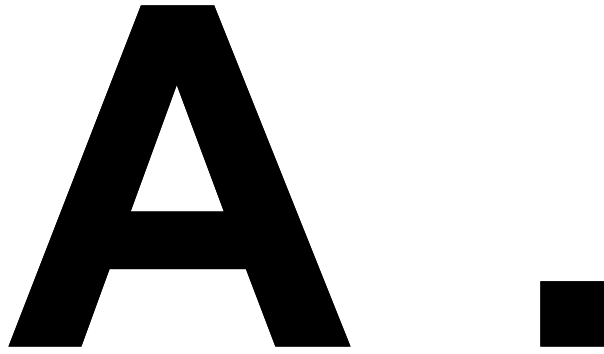


그림 3. TMC가 유도한 apoptosis. A: Vascular smooth muscle cells. B: Mesangial cells. 실험방법은 재료 및 방법에 서술하였다. 결과는 대표적인 Western blot 그림으로 표현하였다. n=5.

3. TMC가 PDGF로 유도된 fibronectin 분비에 미치는 영향.

PDGF 10 ng/ml 투여 후 48시간에 혈관평활근세포와 혈관간세포의 fibronectin 분비는 대조군에 비하여 증가하였고, TMC는 PDGF에 의한 fibronectin 분비를 1 µg/ml 이상에서 억제하였으나 독성이 없는 농도인 100 ng/ml 이하에서는 혈관평활근세포와 혈관간세포 모두 억제 효과를 보이지 않았다(그림 4).

A

그림 4. TMC가 PDGF로 유도된 fibronectin 분비에 미치는 영향. A: Vascular smooth muscle cells. B: Mesangial cells. 실험방법은 재료 및 방법에 서술하였다. 결과는 대표적인 Western blot 그림으로 표현하였다. n=5.

4. TMC가 PDGF로 유도된 Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향.

PDGF 10 ng/ml 투여 후 15분에 Akt와 ERK의 활성화가 5분에 p38 MAPK의 활성화가 최대로 증가되었다(그림 5). 기저수준의 MTT를 감소시키지 않는 농도의 TMC는 PDGF에 의한 Akt, ERK 및 p38 MAPK의 활성화를 혈관평활근세포와 혈관간세포에서 모두 억제하지 못하였다(그림 6).



그림 5. PDGF에 의한 Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화. A: Vascular smooth muscle cells. B: Mesangial cells. 실험방법은 재료 및 방법에 서술하였다. 결과는 대표적인 Western blot 그림으로 표현하였다. n=5.

A

그림 6. TMC가 PDGF로 유도된 Akt, ERK 및 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향. A: Vascular smooth muscle cells. B: Mesangial cells. 실험 방법은 재료 및 방법에 서술하였다. 결과는 대표적인 Western blot 그림으로 표현하였다. n=5.

IV. 고찰

본 연구결과 1. TMC 100 ng/ml 이상의 농도에서 PDGF가 유도한 혈관 평활근세포와 사구체 혈관간세포의 증식은 유의하게 감소되었다. 2. TMC 1 μ g/ml 이상의 농도에서는 두 세포 모두에서 세포독성이 나타났다. 3. TMC 100 ng/ml 이하의 낮은 농도에서는 세포독성은 없었지만 PDGF가 유도한 세포의 fibronectin 분비와 세포내 신호전달계의 활성이 두 세포 모두에서 억제되지 않았다.

TMC 100 ng/ml은 PDGF에 의한 증식을 세포독성 없이 억제하였다. 이 농도는 이전 연구에서 밝혀진 TMC의 T-세포 apoptosis 유발 농도인 10 ng/ml 보다는 높지만 IL-2의 생산을 억제하는 것과 같은 농도이다⁹. TMC 1 μ g/ml 이상은 기저 수준의 MTT를 감소시켜 세포 사멸을 유도하였다. 이때 발생하는 세포 사멸의 형태를 알아보기 위하여 caspase-3 분절을 측정된 결과, 혈관평활근세포와 혈관간세포 모두에서 나타나는 세포 사멸이 apoptosis임을 알 수 있었다. 혈관평활근세포와 혈관간세포의 병태생리에서 과도한 세포증식으로 인한 질환의 발생과 진행에 대한 연구가 진행되어 왔으나, 최근의 연구에서는 세포의 증식과 apoptosis의 비율이 혈관과 신장병변의 발생과 진행에 중요하게 인식되고 있다¹⁸. Redondo등¹⁹은 혈관 평활근세포를 이용하여 PDGF에 의한 증식이 apoptosis에 의해 억제된다고 보고하였다.

PDGF에 의한 세포 증식을 억제하는 농도인 TMC 100 ng/ml은 fibronectin 분비를 감소시키지 못하였고, TMC 1 μ g/ml 이상의 농도에서만 감소 효과를 보였다. 그러나 TMC 1 μ g/ml 이상은 혈관평활근세포와 혈관간세포의 apoptosis를 유발하는 농도이기 때문에 fibronectin 자체의 감소가 아니라 세포 수 감소 또는 apoptosis 과정 중에 발생할 수 있는 단백질 생산 자체의 감소로 해석될 수 있다. 본 연구에서 fibronectin 분비에 대한 결과는 T-세포에서 apoptosis를 유발하고 혈관평활근세포와 혈관간세포에서 PDGF에 의한 세포증식을 억제하는 TMC의 효과와는 상반되는 결과이다⁸. 이는 TMC의 작용이 세포 증식이나 apoptosis에는 관여하지만 fibronectin 합성 및 분비와는 다른 경로의 관련성을 시사하는 것이다.

TMC의 세포내 신호전달계에 대한 효과를 알아보기 위하여 PDGF

에 의하여 활성화되는 Akt, ERK 및 p-38 MAPK에 대한 효과를 검색하였다. PDGF는 Akt와 ERK를 15분에, p38 MAPK를 5분에 최대로 활성화시켰다. Nelson등²⁰은 사람의 복재정맥평활근 세포를 이용하여, PDGF에 의한 초기 15분 이내의 ERK 활성화는 세포의 이동에 관여하고, 1시간에서 4시간 사이의 ERK 활성화가 세포의 증식에 관여한다고 보고하였다. 본 실험 조건에서는 PDGF 투여 후 30분까지만 ERK 활성화가 유의있게 증가하였다. TMC 100 ng/ml은 PDGF에 의한 Akt, ERK 및 p-38 MAPK 활성화를 억제하지 못하였다. T-세포에서 tyrosine kinase 인산화, PP1 및 각종 신호전달계를 억제하는 TMC의 효과는 B-세포와는 무관한 결과였다⁸. Tyrosine kinase 인산화와 PP1의 하위 신호 전달계이고, 세포증식과 fibronectin 분비에 관여하는 Akt, ERK 및 p38 MAPK에 대하여 세포 증식을 억제하는 농도의 TMC가 효과가 없는 것은 TMC가 T-세포와는 다른 기전을 통하여 혈관평활근 세포와 혈관간세포의 증식을 억제하거나 TMC의 신호 전달계 억제 효과가 T-세포에 특이적일 가능성이 있다.

V. 결론

본 연구의 결과 혈관평활근세포와 사구체 혈관간세포에서 독성이 없는 농도의 TMC는 PDGF에 의한 세포 증식을 억제하였다. T-세포에서 수행된 기존의 연구결과와 더불어 본 연구의 결과는 TMC의 효과가 T-세포에 특이적임을 입증하였으며, 임상에서 약물의 적용을 위하여 보다 다양한 연구를 통한 적절한 치료 농도의 설정이 필수적임을 제시하였다.

참고문헌

1. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-2333.
2. Merville P. Combating Chronic Renal Allograft Dysfunction: Optimal Immuno suppressive Regimens. *Drugs* 2005;65:615-631.
3. Danen EH, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* 2001;189:1-13.
4. McDonald PC, Wong D, Granville DJ, McManus BM. Emerging roles of endothelial cells and smooth muscle cells in transplant vascular disease. *Transplant Rev* 1999;13:109-127.
5. Hayry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtchevhenkov M, Aavik E. Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 2000;32:519.
6. Mitsuhashi S, Matsuura N, Ubukata M, Oikawa H, Shima H. Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;287:328-331.
7. Mitsuhashi S, Shima H, Tanuma N, Matsuura N, Takekawa M, Urano T, et al. Usage of tautomycetin, a novel inhibitor of protein phosphatase (PPI), reveals that PPI is a positive regulator of Raf-1 in vivo. *J Biol Chem* 2003;278:82-88.
8. Shim JH, Lee HK, Chang EJ, Chae WJ, Han JH, Han DJ, et al. Immunosuppressive effects of tautomycetin in vivo and in vitro via T cell-specific apoptosis induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10617-10622.
9. Chae WJ, Choi JM, Yang JJ, Lee SK. T cell-specific immunosuppression using tautomycetin or PTD-conjugated protein drugs. *Yonsei Med J* 2004;45:978-990.
10. Iida H, Seifert R, Alpers CE, Gronwald RGK, Phillips PE, Pritzl P,

- et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor are induced in mesangial proliferation nephritis in the rat. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:6560-6564.
11. Kim MS, Park J, Ha H, Kim YS, Kang SW, Jeong HJ, et al. Rapamycin inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen, but not fibronectin, synthesis in rat mesangial cells. *Yonsei Med J* 2004;45:1121-1126.
 12. Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, et al. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant* 2004;4:1982-1990.
 13. Higgy NA, Davidoff AW, Grothman GT, Holenberg MD, Benediktsson H, Paul LC. Expression of platelet-derived growth factor receptor in rat heart allografts. *J Heart Lung Transplant* 1991;10:1012-1022.
 14. Alpers CE, Davis CL, Barr D, Marsh CL, Hudkins KL. Identification of platelet-derived growth factor A and B chains in human renal vascular rejection. *Am J Pathol* 1996;148:439-451.
 15. Johnson RJ, Raines EW, Floege J, Yoshimura A, Pritzl P, Alpers C. et al. Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet-derived growth factor. *J Exp Med* 1992;175:1413-1416.
 16. Mancini MC, Evans JT. Role of platelet-derived growth factor in allograft vasculopathy. *Ann Surg* 2000;231:682-688.
 17. Karcik M, Meliss R, Hestermann M, Mengel M, Pethig K, Levitzki A, et al. Inhibition of aortic allograft vasculopathy by local delivery of platelet-derived growth factor receptor tyrosine-kinase blocker AG-1295. *Transplantation* 2002;74:1335-1341.
 18. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1370-

1380.

19. Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, Padilla E, Tejerina T. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor- γ , transforming growth factor- β 1, and a smad2-dependent mechanism. *Diabetes* 2005;54:811-817.
20. Nelson PR, Yamamura S, Mureebe L, Itoh H, Kent KC. Smooth muscle cell migration and proliferation are mediated by distinct phases of activation of the intracellular messenger mitogen-activated protein kinase. *J Vasc Surg* 1998;27:117-125.

Abstract

Effects of tautomycetin
on the proliferation and fibronectin secretion
by vascular smooth muscle cells and glomerular mesangial cells

Ji Hye Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Yu Seun Kim)

Proliferation and extracellular matrix (ECM) accumulation in the vascular smooth muscle cell (VSMC) and glomerular mesangial cell (MC) play key roles in the development and the progression of transplant glomerulosclerosis and chronic allograft nephropathy. Tautomycetin (TMC), a newly developed immunosuppressive agent, induces T-lymphocyte apoptosis through the inhibition of tyrosine kinase and protein phosphatase 1. We examined the effects of TMC on platelet-derived growth factor (PDGF)-induced proliferation and ECM synthesis in cultured VSMCs and MCs of Sprague-Dawley rats, and investigated the molecular mechanisms that are involved.

Different concentrations of TMC were administered 1 hour before the addition of PDGF 10 ng/ml into the growth-arrested and synchronized cells. Cell proliferation was assessed by methylthiazolotetrazolium (MTT) assay and caspase-3 cleavage, fibronectin secretion, and the activation of Akt, ERK, and p38 MAPK by Western blot analysis.

PDGF 10 ng/ml increased cell proliferation, fibronectin secretion, and the activation of Akt, ERK, and p38 MAPK in both VSMCs and

MCs. In both cultured cells, TMC at above 1 $\mu\text{g/ml}$ significantly reduced basal MTT and increased cleavage caspase-3 in dose dependently. TMC at 100 ng/ml only decreased the PDGF-induced VSMC and MC proliferation, but not fibronectin secretion and the activation of Akt, ERK, and p38 MAPK.

In conclusion, the present data demonstrated that low-dose TMC reduced PDGF-induced VSMC and MC proliferation without affecting fibronectin secretion and cellular kinase activation.

Key Words : tautomycetin, vascular smooth muscle cell, mesangial cell, proliferation, extracellular matrix