# Carvedilol 단독 또는 cyclosporine과의 혼합투여가 백서 대동맥 혈관 평활근 배양세포의 증식에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 명 수

# Carvedilol 단독 또는 cyclosporine과의 혼합투여가 백서 대동맥 혈관 평활근 배양세포의 증식에 미치는 영향

지도 박 기 일 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 명 수

김명수의 석사 학위논문으로 인준함

심사위원 _____ ㊞

심사위원 _____ ㊞

심사위원 _____ ㊞

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

# 감사의 말씀

임상영역에 저의 많은 시간을 할애하여야 했던 시간속에서도 배움의 기회를 얻을 수 있음은 저에게는 참으로 소중한 것이었습니다. 비록 남보다 늦었지만 뒤지지 않을 학문적인 성과를 얻기 위하여 노력하였으며 나름대로 최선을 다한 날들이었습니다. 비록 앞으로 하여야 할 과제가 많고 그 만큼의 노력이 더욱 필요하겠지만 이번의 노력과 성과는 저에게는 큰 자산이 되리라 믿습니다.

저에게 남보다 늦게 시작한 이 길을 열어주시고 끝까지 큰 관심을 가지고 살펴 봐 주신 박 기일 교수님에게 무엇보다 큰 감사를 드리고 싶습니다. 그리고 본 논문을 기획단계부터 다양한 의견을 주시고 사려 깊은 조언을 아끼지 않은 김 유선 교수님과 하 헌주 교수님에게도 감사를 드립니다. 교수님들의 한마디 한마디는 저의 연구에서 큰 힘을 주었고 흔들리지 않는 방향을 제시하여 주었습니다. 어려움속에서도 실험의 세세한 부분까지도 챙겨주신 면역학 검사실의 김 혜진 선생에게도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

새 둥지을 마련 해 주시고 저에게 자신감과 도전의 기회를 주신 노 병선 교수님과 강 성준 교수님에게 감사드립니다. 그리고 부족한 저에게 많은 기대와 격려를 아끼지 않으신 연세대학교 원주의과대학 외과학 교실원 여러분들에게도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

오늘의 제가 있음은 30년을 넘게 저에게 사랑과 은혜만을 베풀어 주신 어머니가 있음으로 가능하였습니다. 그리고 변함없는 누님들과 묵묵히 저에게 큰 힘이 되어 준 아내에게도 감사의 한자리를 채우고 싶습니다. 아울러 저를 기억해 주시는 모든 분들에게 작지만 저의 감사의 마음을 전하고자 합니다.

감사합니다.

2000년 12월

저 자 씀

# 목 차


국문요약 ---------- 1

I. 서론 ---------- 3

II. 대상 및 방법 ---------- 5

III. 결과 ---------- 9

IV. 고찰 ---------- 17

V. 결론 ---------- 20

참고문헌 ---------- 21

영문요약 ---------- 25

# 그림 목차

그림 1. 배양된 백서 대동맥 혈관 평활근세포.
(anti-$\alpha_1$-actin antibody 면역조직화학염색, x 40) ---------- 6

그림 2. PDGF, endothelin-1, angiotensin-II 가 혈관 평활근세포
증식에 미치는 영향. ---------- 9

그림 3. Cyclosporine이 PDGF, endothelin-1 및 angiotensin-II 로
유도된 혈관 평활근세포 증식에 미치는 영향. ---------- 10

그림 4. PDGF, endothelin-I 및 angiotensin-II 로 유도된
혈관 평활근세포 증식에 대한 carvedilol의 억제효과. ---------- 12

그림 5. Carvedilol 단독 혹은 cyclosporine 과의 병합투여가 PDGF로
유도된 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향. ---------- 13

그림 6. Carvedilol 단독 혹은 cyclosporine 과의 병합투여가 endothelin-1
으로 유도된 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향. ---------- 14

그림 7. Carvedilol 단독 혹은 cyclosporine 과의 병합투여가 angiotension-II
로 유도된 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향. ---------- 15

그림 8. PDGF로 증식유도된 혈관 평활근세포에서 약제에 의한
세포융해정도. ---------- 16

# 국문요약

## Carvedilol 단독 또는 cyclosporine과의 혼합투여가 백서 대동맥 평활근 배양세포의 증식에 미치는 영향

신장이식후 발생하는 만성거부반응이나 동맥재건술 또는 동맥풍선 확장술이후에 발생하는 동맥의 경화성병변은 비록 원인에는 차이가 있으나 손상에 의한 내막증식과 섬유화가 특징적이며, 기본병태생리로서 각종 cytokine에 의한 혈관 평활근세포의 증식과 세포내막으로의 유주/이동에 의한 것으로 알려져 있다. 현재까지 이러한 현상을 의의 있게 억제한다고 알려진 약제는 매우 제한적이다. 최근 들어 면역억제제인 rapamycin과 mycophenolic acid 뿐만 아니라 α- 및 β-수용체 blocker인 carvedilol이 혈관 평활근세포의 증식과 유주/이동억제작용을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 이에 저자들은 carvedilol의 단독투여 또는 면역억제제인 cyclosporine과의 혼합투여가 각종 혈관 평활근세포의 증식유발인자의 존재 하에서 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하고자 본 연구를 기획하였다. 백서의 대동맥에서 혈관 평활근세포를 분리 및 배양하여 (1) PDGF(10 ng/ml) 단독, (2) PDGF+cyclosporine(100 nM), (3) PDGF+carvedilol(1μM, 10μM), (4) PDGF+cyclosporine(100 nM)+carvedilol(1μM, 10 μM) 등으로 증식유발인자와 약제를 투여한 후 혈관 평활근세포의 증식정도를 측정하였다. 혈관 평활근세포의 증식유발인자로서는 PDGF이외도 endothelin-1(10 nM)과 angiotension-II(100 nM)를 같은 요령으로 사용하였으며 혈관 평활근세포의 증식정도는 $H^3$-thymidine incorporation을 이용한 DNA 합성능 측정으로 시행하였다. 혈관 평활근세포의 증식유발인자로 PDGF(10 ng/ml)를 사용한 경우 carvedilol 1μM에서는 PDGF 단독투여군의 65.2 ± 5.9%의 증식정도를 보였으며 carvedilol 10 μM에서는 18.3 ±

7.8%의 증식정도를 보여 통계학적으로 유의한 증식억제효과를 보였다($p < 0.05$). 이러한 carvedilol의 혈관 평활근세포 증식억제효과은 다른 증식유발인자인 endothelin-1과 angiotensin-II를 사용한 경우에서도 비슷한 결과를 보였다. Cyclosporine의 병합투여는 carvedilol의 혈관 평활근세포 증식억제효과에 영향을 미치지 않아, cyclosporine과 carvedilol의 병합투여군의 증식정도는 carvedilol 단독투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$).

결론적으로 carvedilol은 혈압강하효과이외도 혈관 평활근세포에 대하여 증식억제효과가 뚜렷하며 cyclosporine을 동시에 사용하는 경우에도 증식억제효과가 그대로 잘 유지되었다. 이는 향후 인체를 대상으로 한 carvedilol의 전향적인 임상연구를 시행할 수 있는 이론적인 근거를 제시해 주고 있다.

---

핵심되는 말 : 만성거부반응, 혈관 평활근세포 증식, cyclosporine, carvedilol

# I. 서 론

신장이식후 장기생존자에게 발생하는 이식장기의 만성거부반응은 이식신 소실의 주요 원인으로 이로 인하여 매년 3-5%의 이식 신소실이 발생하고 있다. 강력한 면역억제제인 cyclosporine의 투여에도 불구하고 이러한 만성거부반응의 빈도는 전혀 감소하지 않고 있어 향후 신장이식후 장기생존을 위하여서는 만성거부반응의 해결이 가장 시급한 현안으로 대두되고 있다.[1]

만성거부반응의 병리생태는 아직까지 명확하게 알려져 있지 않으나 급성거부반응의 기왕력, 조직적합 항원의 불일치, 충분치 않은 면역억제(suboptimal immunosuppression) 등의 면역학적인 원인은 물론 고혈압, 고지혈증, 공여신의 기능적인 신원용량 부족(reduced functional nephron mass) 등의 비면역학적인 원인과 바이러스 감염증 등의 모두가 함께 작용하여 혈관 내피세포(endothelial cell)에서 여러 종류의 cytokine이 과다 분비되어[2] 그 결과 혈관중막(media)내에 위치한 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cell)의 증식(proliferation)과 내피세포층으로의 혈관 평활근세포의 이동/유주현상(migration)이 항진되며 동시에 세포외기질(extracellular matrix)이 침착하여 내막증식증(intimal hyperplasia), 혈관경화증(transplant vascular sclerosis)과 섬유화(fibrosis)를 초래하여 혈관내강의 폐색(proliferative obstructive angiopathy)을 야기하고 사구체경화증(glomerulosclerosis)을 초래하여 궁극적으로는 장기의 허혈성 기능손상(ischemic injury)을 일으키는 것으로 설명되고 있다.[3-5] 즉 혈관 내피세포, 혈관 평활근세포, 대식세포(macrophage) 그리고 림프구 등의 세포가 여러 단계에서 각종 cytokine [Interleukin-1(IL-1), Interleukin-6(IL-6), Platelet derived growth factor(PDGF), basic-Fibroblast growth factor(b-FGF), Endothelin 등]을 분비하고 분비된 cytokine들은 autocrine 또는 paracrine으로 작용하여 이 과정에 관여한다. 따라서 이러한 혈관경화증을 방지하기 위하여서는 각 단계에서 분비되는 cytokine의 분비를 억제하거나 혈관 평활근세포의 증식이나 이동 내지는 유주현상을 억제하여야 하여야 한다. 그러나 각 단계에서의 cytokine는 분비되는 cytokine이 다양하고 그

기전과 작용이 복잡하면서 상호관련되어 있어 이를 억제시켜 혈관병변의 억제시키는 효과적인 방법은 아직 확인된 바가 없다.[1,6]

현재까지 이식후 주면역억제제로 사용하고 있는 cyclosporine에 의한 혈관 평활근세포의 증식억제효과는 미미한 것으로 보고된 반면[7,8] mycophenolic acid[9-11]나 rapamycin[10-13] 등의 새로운 면역억제제를 비롯하여 HMG-CoA reductase inhibitor,[14,15] angiotensin converting enzyme inhibitor인 enalapril,[16,17] 혈관 확장제인 doxazocin[18] 그리고 새로운 β-blocker인 carvedilol[19-23] 등의 제제가 세포실험과 동물실험에서 혈관 평활근세포의 증식을 억제할 수 있음이 최근에 알려지고 여기에 더하여 rapamycin,[24] doxazocin[18] 그리고 carvedilol[19] 등의 제제는 혈관 평활근세포에 대한 증식억제이외도 혈관 평활근세포에 대한 뚜렷한 이동/유주억제효과도 가지고 있는 것으로 보고되어 임상적으로는 만성거부반응의 억제제로서의 유용성을 제시해 주고 있다.

그러나 새로운 면역억제제인 mycophenolic acid나 rapamycin의 사용은 그에 상응하는 부작용과 제한점으로 모든 이식환자에게 적용하기에는 어려움이 있다. 반면 신장이식후에는 25-60%정도의 환자가 여러 원인에 의한 고혈압 치료제를 복용하여야 하는 현황을 고려해 보건대 신장이식후 carvedilol의 투여는 혈압 강하효과는 물론 혈관 평활근세포의 증식억제효과로 만성이식신 혈관병변의 발생을 현저하게 감소시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 따라서 본 연구는 현재 사용중인 주면역억제제인 cyclosporine과 함께 고혈압 치료제인 carvedilol을 혼합 투여하여 혈관 평활근세포의 증식억제효과를 in vitro 실험으로 규명하기 위하여 기획되었다.

# II. 대상 및 방법

## 1. 백서 대동맥 혈관 평활근세포의 분리 및 배양

기존의 세포분리방법[8,14]을 기본으로 약간 변형하였다. 백서(male, Sprague-Dawley rat, 200-250 gm)를 단두하여 희생시킨 다음, 복부와 흉부에 정중절개창을 만들고 척추로부터 대동맥을 박리 하였다. 적출된 대동맥을 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin (100 μg/ml)이 함유된 4▪C phosphate buffered saline(PBS)에 담아 대동맥으로부터 지방조직과 혈액 등을 제거한 다음, 준비한 collagenase(activity 253 U/mg; Worthington Biochemical Co., Greehold, NJ, U.S.A.)가 함유된 Eagle's minimum essential medium(EMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)배양액 7.5 ml와 같이 15 ml 시험관(Corning, Corning, NY, U.S.A.)에 넣고 37▪C에서 30분동안 반응시켰다. 이후 대동맥의 외막(adventitia)과 내막(endothelium)을 dissecting microscope (Olympus SZ 40, Olympus Optical Co.,Tokyo, Japan)하에서 forcep을 이용하여 박리한 후 razor blade로 잘게 자랐다. 이 절편들을 다시 collagenase가 함유된 EMEM 배양액 7.5 ml에 넣고 37▪C에서 1-1.5시간동안 반응시킨 다음, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 남은 세포는 collagenase가 포함되어 있지 않은 EMEM에 재부유시켰다. 이러한 과정을 2회 반복한 다음, 원심분리하여 상층액은 버리고 남은 세포를 10% 우태아혈청(fetal calf serum)이 함유된 EMEM과 함께 35 mm 배양용기에 분주하여 37▪C, 5% $CO_2$ humidified incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 anti-$\alpha_1$-actin antibody(DAKO Japan Co.,Kyoto, Japan)를 이용한 면역 조직 화학염색을 시행하여 혈관 평활근세포임을 확인하였으며(그림 1), passage 5부터 9 사이의 세포를 실험에 사용하였다.

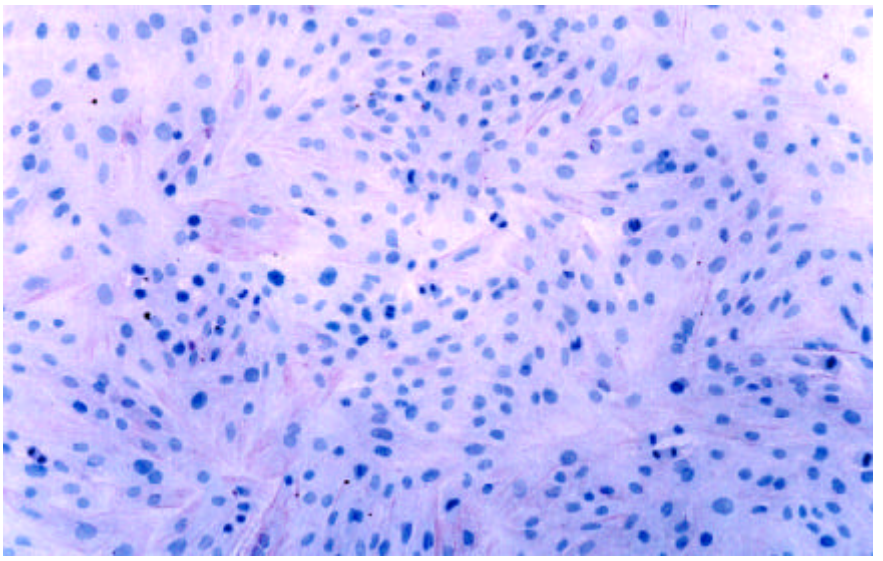

그림 1. 배양된 백서 대동맥 혈관 평활근세포(anti-$\alpha_1$-actin antibody 면역조직화학염색, x 40)

2. 세포 증식의 평가 : [$^3$H]thymidine incorporation을 이용한 DNA 합성능 측정

배양기에서 충분히 자란 세포를 trypsin/EDTA(0.25% / 0.05%)로 처리한 후 96 well 배양용기(Corning)에 각 well당 1x$10^4$ 개의 세포가 되도록 분주하여 confluence를 이루게 하였다. 이 세포들을 insulin(5 μg/ml; Sigma Chemical Co.)과 transferrin( 5 μg/ml; Sigma Chemical Co.)이 첨가된 10% 우태아혈청이 함유된 EMEM 배양액으로 72시간 배양한 후, EMEM으로 2차례 세척한 다음 혈청배제 EMEM으로 48시간동안 배양하여 증식을 억제한 후 PDGF-BB(Sigma Chemical Co.)를 well내의 농도가 10 ng/ml으로 되도록 첨가하여 24시간동안 증식을 유발시킨 후 [$^3$H]thymidine(Du Pont Co., Wilmington, DE, U.S.A.)을 각 well에 1 μCi/ml의 농도로 첨가하고, 6시간후 배양세포를 cell harvester(Titertek Cell Harvester 550, Flow Laboratories, Irvine, Scotland, U.K.)를 이용하여 cell

harvester filter(Flow Laboratories)에 흡착시켜 실온에서 6시간동안 건조시킨 다음, 3ml scintillation cocktail에 넣고 beta-counter(TL 5000s, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, U.S.A.)로 총 방사능을 측정하였다.

상기실험을 증식유발인자로 PDGF(10 ng/ml)[8]를 사용하는 이외에 기존의 cyclosporine에 의한 신독성 및 혈관변증의 유발인자로 알려진 endothelin-1(10 nM; Sigma Chemical Co.)[21,25]과 angiotensin-II(100 nM; Sigma Chemical Co.)[26]를 각각 같은 방법으로 하여 사용하였다.

3. 약제투여와 실험군의 설정

Cyclosporine은 50 mg/ml의 정주용 약제를 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 0.042 M로 희석하여 사용하였다. Carvedilol은 DMSO에 녹여 1 mM로 만든 다음 후 20 μL씩 분주하여 -70▪ C에 보관하였다. Carvedilol의 주요실험농도는 1 μM과 10 μM으로 고정하였고, cyclosporine의 농도는 100 nM로 고정하였다. Cyclosporine과 carvedilol등의 약제는 증식유발인자 투여 15분 전에 투여하였다.

대조군은 증식유발인자나 약제를 투여하지 않은 군으로 설정하였으며, 실험군의 설정은 증식유발인자와 더불어 투여되는 cyclosporine 및 carvedilol의 병합여부와 농도에 따라서 ① 유발인자 단독 투여군, ② cyclosporine 투여군, ③ carvedilol 1 μM 투여군, ④ carvedilol 10 μM 투여군, ⑤ cyclosporine과 carvedilol 1 μM 병합투여군, ⑥ cyclosporine과 carvedilol 10 μM 병합투여군 으로 설정하였다.

상기실험은 triplicate 방법으로 각각 5회 시행하였다.

4. 세포융해분석(cytolysis assay)- lactate dehydrogenase(LDH) 분비정도

손상을 입은 세포로부터 배양액내로 유리되는 LDH를 측정함으로서 세포융해정도를 정량적으로 측정하였다. 세포융해정도는 증식유발 및 약제처치후 세포증식정도를 측정한 시점에 세포외 배양액으로 유리되는 LDH양과 Triton X-100으로

처리하여 혈관 평활근세포를 모두 파괴시켰을 때 배양액내의 총 LDH양과의 비율로 표시하였다. 배양액내의 LDH는 pyruvic acid(Sigma Chemical Co.), β-nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form(β-NADH; Sigma Chemical Co.)등과 반응시켜 multiplate reader(ELISA leader, Molecular Devices Co., U.S.A.)로 340 nm에서 측정하였다.

5. 통계방법

1회의 측정치는 triplicate로 측정된 [$^3$H]thymidine incorporation의 측정치의 평균값으로 대표하였으며, 각 실험 측정치는 5회의 측정치에 대한 평균 ± 표준편차(standard deviation)로 표시하였다. 아울러 증식정도의 비교를 위하여 측정치이외의 증식유발인자 단독투여군에 대한 증식백분률(percentage proliferation; cpm in stimulator plus drug-treated sample x 100 / cpm in stimulator-treated sample)로 상대적인 증식정도(relative proliferation)를 표시하였다. 두 군간의 통계학적인 비교는 비모수적 통계방법인 Mann-Whitney U-test를, 3군 이상의 통계학적인 비교는 Kruscal-Wallis test를 이용하여 P값이 0.05미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

# III. 결　과

## 1. 증식유발인자에 의한 혈관 평활근세포의 증식효과

대조군의 [$^3$H]thymidine incorporation 측정치는 4,809.4±1,763.0 cpm이었으며 증식후의 측정치는 PDGF 10 ng/ml 사용군은 17,237.6±7,600.8 cpm, endothelin-1 10nM 사용군은 7903.6±2,371.4 cpm, angiotensin-II 100 nM 사용군은 9,330.2±3,170.0 cpm이었다. 유발인자의 증식효과는 PDGF 사용군은 대조군의 3.58배(±0.72), endothelin-1 사용군은 1.69배(±0.25), angiotensin-II 사용군은 2.01배(±0.47)로 통계학적으로 유의한 증식유발효과를 보였다($p<0.05$). PDGF 사용군에서의 증식효과는 endothelin-1 사용군과 angiotensin-II 사용군과 비하여 통계학적으로 유의한 차이를 보여 PDGF 10 ng/ml에서의 증식유발효과가 가장 강력하였다(그림 2).

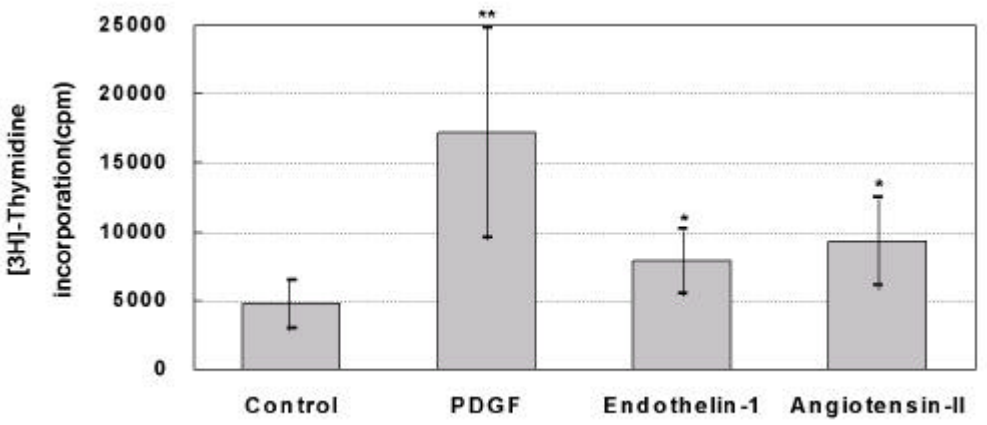


그림 2. PDGF, endothelin-1 및 angiotensin-II 이 혈관 평활근세포 증식에 미치는 영향.

* $p<0.05$ vs. control

** $p<0.05$ vs. control and endothelin-1/angiotensin-II group

2. Cyclosporine의 증식억제효과

임상에서 사용 가능한 cyclosporine 100 nM의 농도하에서의 [$^3$H]thymidine incorporation 측정치는 PDGF 사용군은 11,049.0±3,311.9 cpm (67.4±10.2%), endothelin-1 사용군은 5,512.2±1,729.0 cpm (71.6±16.9%), angiotensin-II 사용군은 7,085.2±1,633.0 cpm (78.7±11.2%)으로 증식을 유도한 cytokine의 종류에 따라서 cyclosporine의 증식억제효과에 차이가 있었다. 즉 PDGF를 증식유발인자로 사용한 경우에는 평균 67.4%의 증식이 이루어져 통계학적으로 유의한 증식억제효과를 보인 반면(그림 3. $p<0.05$), endothelin-1과 angiotension-II를 증식유발인자로 사용한 경우에는 통계학적으로 유의한 증식억제효과를 발견할 수가 없었다(그림 3. $p>0.05$).

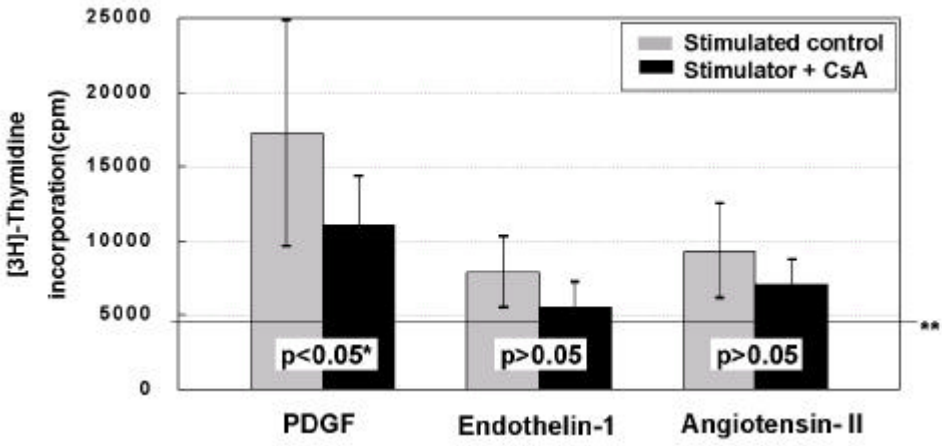


그림 3. Cyclosporine이 PDGF, endothelin-1 및 angiotensin-II 로 유도된 혈관평활근세포 증식에 미치는 영향.

* p-value calculated by Mann-Whitney U-test

** indicate the control level

CsA: cyclosporine A

3. Carvedilol의 증식억제효과 - carvedilol 단독투여군

PDGF 사용군에서 carvedilol 투여군의 [$^3$H]thymidine incorporation 측정치는 1 μM 농도에서는 9,807.8±2,649.6 cpm, 10 μM 농도에서는 3,032.4±1,155.0 cpm으로 carvedilol의 농도가 증가할수록 증식억제효과가 뚜렷하였다. 즉 1 μM의 carvedilol 투여군에서는 증식유발인자 단독투여군에 비하여 60.3±10.4%의 증식이, 10 μM의 carvedilol 투여군에서는 18.3±5.9%의 증식만이 관찰되어 각군마다 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(그림 4).

이러한 carvedilol의 PDGF로 유도된 혈관 평활근세포의 증식억제효과는 다른 증식유발인자 사용군에서도 동일한 결과를 얻어 endothelin-1과 angiotensin-II 사용군에서 1 μM의 carvedilol 투여군의 상대적인 증식정도은 각각 54.8±15.3%와 68.7±16.6%이었으며, 10 μM의 carvedilol 투여군의 상대적 증식률은 각각 11.6±3.2%와 15.3±4.2%로 증식유발인자 단독투여군은 물론 1 μM의 carvedilol 투여군과도 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(그림 4). 아울러 endothelin-1과 angiotensin-II 사용군의 carvedilol의 농도에 따른 상대적인 증식정도는 PDGF 사용군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 없어 carvedilol은 증식유발인자의 종류에 관계없이 일정한 증식억제효과를 가짐을 알 수 있었다.

본 연구결과에 의하면 carvedilol의 $IC_{50}$(Inhibitory concentration 50%)은 1 μM과 10 μM사이임을 추정할 수 있었다.

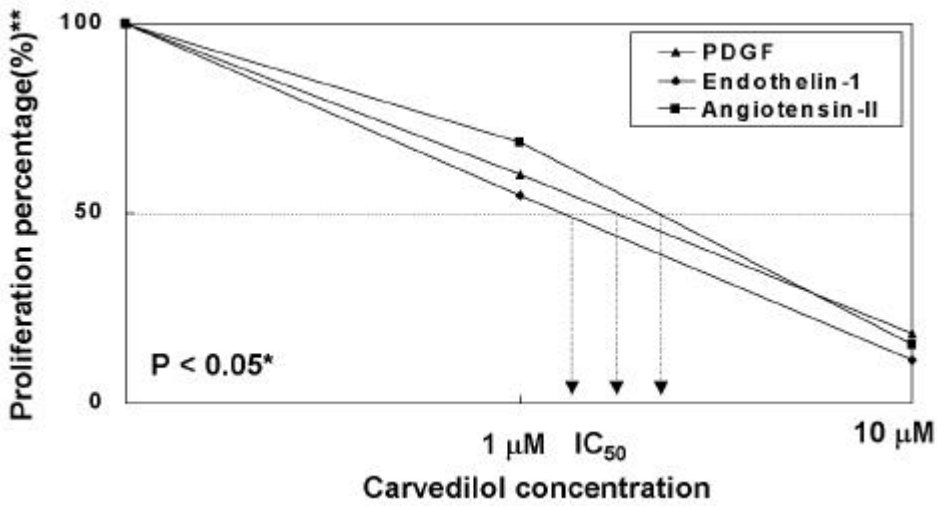


그림 4. PDGF, endothelin-1 및 angiotensin-II로 유도된 혈관 평활근세포에 대한 carvedilol의 증식억제효과.

* p-value calculated by Kruscal-Wallis test

** proliferation percentage(%) = (cpm in stimulator+drug treated sample / cpm in stimulator treated sample) x 100

4. Carvedilol과 cyclosporine 병합투여의 증식억제효과

PDGF 사용군에서 cyclosporine과 carvedilol 1μM을 병합투여한 경우, [$^3$H]thymidine incorporation 측정치는 9,807.8±2,649.6 cpm (51.7±6.4%)으로 증식유발인자 단독투여군에 비하여 통계학적으로 유의한 증식억제효과를 보였으며, cyclosporine과 carvedilol 10μM을 병합투여한 경우에도 3,025.6±1,347.4 cpm (17.8±5.9%)의 증식을 보여 증식유발인자 단독투여군은 물론 cyclosporine과 carvedilol 1 μM의 병합투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증식억제효과를 보였다($p<0.05$)(그림 5). 그러나 cyclosporine과 carvedilol 병합투여군의 증식정도를 같은 농도의 carvedilol 단독투여군의 증식정도와 비교하면 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수가 없었다($p>0.05$)(그림 5). 즉 carvedilol의 증식억제효과는 cyclosporine의 유무에 관계없이 carvedilol의 농도에 따라서 결정됨을 알 수 있었

다.

이러한 PDGF 사용군에서의 cyclosporine과 carvedilol의 병합투여의 증식억제 효과는 다른 증식유발인자인 endothelin-1 과 angiotensin-II 사용군에서도 같은 결과를 얻어, cyclosporine과 carvedilol의 병합투여군의 증식억제효과는 carvedilol의 단독투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다 ($p>0.05$)(그림 6,7). 결론적으로 임상적으로 사용이 가능한 농도의 cyclosporine은 carvedilol의 혈관 평활근세포 증식억제효과에 어떠한 영향도 미치지 않았다.

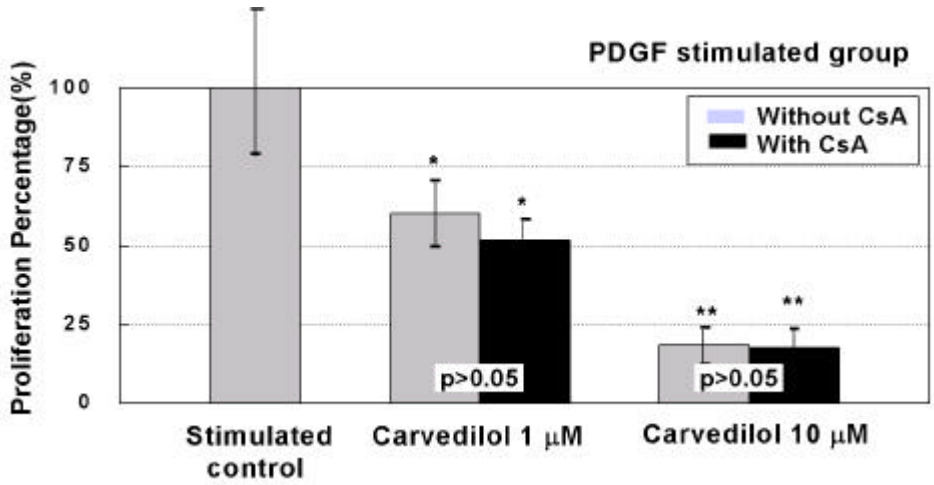


그림 5. Carvedilol 단독 혹은 cyclosporine 과의 병합투여가 PDGF로 유도된 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향.

* means $p<0.05$, vs. stimulated control

** means $p<0.05$, vs. stimulated control and carvedilol 1 μM group

CsA: Cyclosporine A

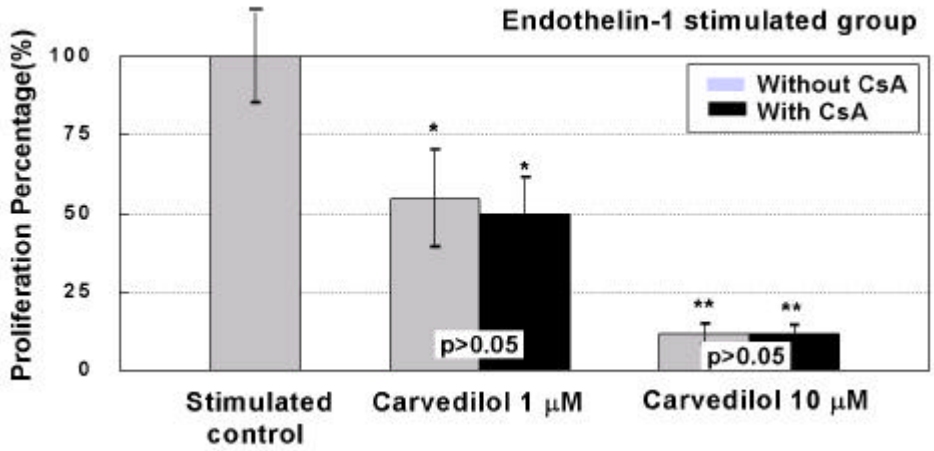


그림 6. Carvedilol 단독 혹은 cyclosporine 과의 병합투여가 endothelin-1 으로 유도된 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향.

* means $p<0.05$, vs. stimulated control

** means $p<0.05$, vs. stimulated control and carvedilol 1 μM group

CsA : Cyclosporine A

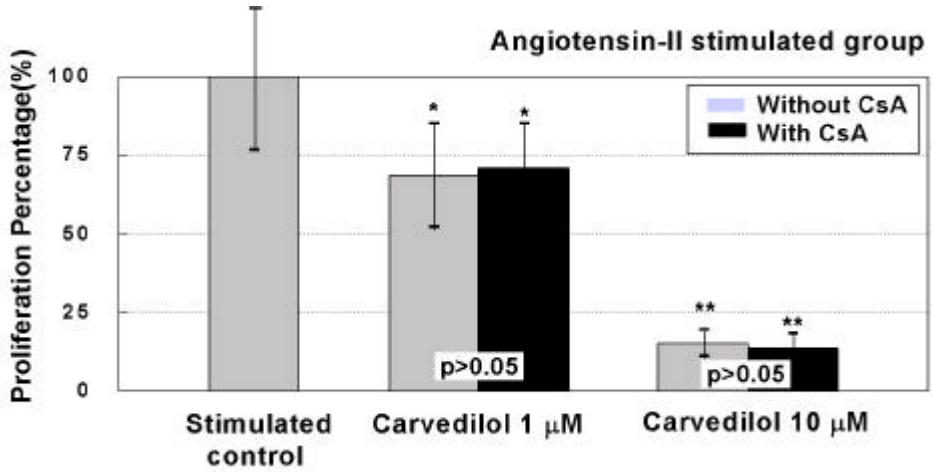


그림 7. Carvedilol 단독 혹은 cyclosporine 과의 병합투여가 angiotension-II 로 유도된 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향.

* means p=0.047, vs. stimulated control

** means p<0.05, vs. stimulated control and carvedilol 1 μM group

CsA : Cyclosporine A

5. 세포융해검사(cytolysis assay)결과

PDGF로 증식유도된 실험군의 LDH 분비정도는 10.9±1.5%로 약제투여군들의 LDH 분비와 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다(그림 8). 즉 cyclosporine 100 nM 단독투여군에서의 LDH 분비는 9.3±6.6%, carvedilol 10 μM 투여군은 11.3±7.4%, cyclosporine 100 nM과 carvedilol 10 μM 병합투여군은 9.3±4.3%로 PDGF 단독투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이는 cyclosporine 이나 carvedilol에 의한 세포융해가 없었음을 의미한다. 이러한 세포융해검사는 증식유발인자로 endothelin-1이나 angiotensin-II를 사용한 경우에도 같은 결과를 얻을 수 있었다(자료 제시하지 않음).

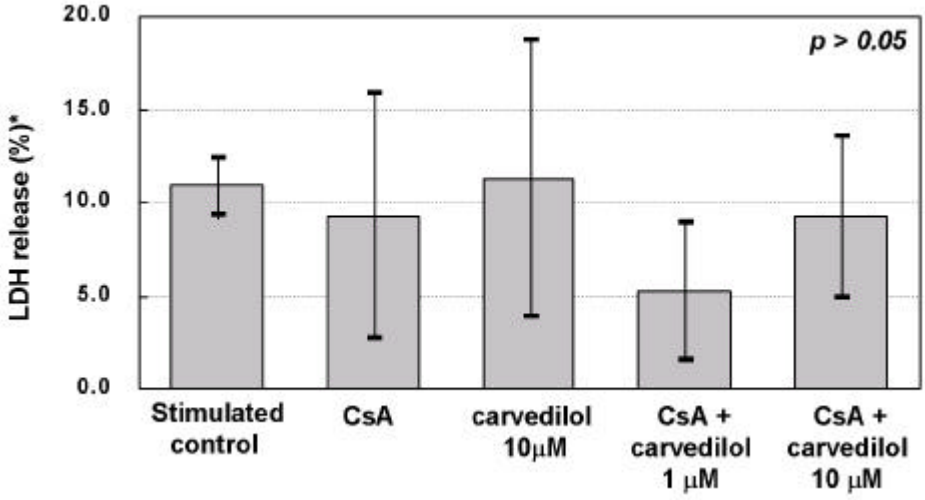


그림 8. PDGF로 증식유도된 대동맥 혈관 평활근 세포에서 약제에 의한 세포융해정도.

* LDH release (%)

= 배양액내의 LDH농도 x 100 / 전체 LDH농도

CsA : cyclosporine A

# IV. 고 찰

만성거부반응이 발생한 이식 장기의 가장 특징적인 조직 병리 소견은 혈관 내벽의 증식에 의한 동맥협착이다. 이러한 조직 소견은 풍선 확장술 치료 후 재협착이 발생한 혈관의 조직 소견과 비슷한데[1,3,9] 이는 비록 그 유발 인자는 다를지라도 양군 모두의 진행 기전은 유사함을 시사한다. 따라서 이식신에 발생하는 만성거부반응의 기전을 밝히려는 많은 학자들이 풍선 확장술 후 발생하는 혈관 재협착의 기전으로 만성거부반응의 기전을 설명하려고 하는 시도가 있어 왔다. 여러 실험에서 밝혀진 바에 따르면 풍선 확장술 후 발생하는 혈관 재협착은 혈관 확장에 따른 혈관벽의 손상이 발생한 후  수시간 이내에 혈관 중막내 평활근세포의 증식이 시작되고, 증식된 혈관 평활근세포가 혈관 내막으로 이동하여 세포외 기질의 침착과 함께 혈관 내막에서 평활근세포가 더욱 증식하게 되어 결국 혈관 내강이 폐쇄되어 나타난다. 이 과정에서 발생하는 혈관 평활근세포의 증식 및 형태 변형에 대한 연구에 따르면 PDGF를 비롯하여 b-FGF, epidermal growth factor(EGF), endothelin-1, angiotensin-II 등이 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다.[2,6,7] 따라서 본 연구에서도 혈관 평활근의 증식을 유발하는 인자로 PDGF, endothelin-1 및 angiotensin-II를 각각 사용하였고 각 유발인자의 처치농도는 기존의 보고[8,21,26]를 참조하여 결정하였다. 본 in vitro 실험과정중 확인된 증식정도는 증식유발인자의 종류에 따라 차이가 있어 PDGF 10 ng/ml 사용군의 증식유발효과가 endothelin-1 10 nM 사용군이나 angiotensin-II 100 nM 사용군에 비하여 강하였으나 모든 증식유발인자에서 분명한 증식유발효과를 확인할 수 있었다. 본 연구에서 이용한 [$^3$H]thymidine incorporation은 DNA 합성능으로 증식유발인자에 의한 혈관 평활근세포수와는 유의한 상관관계가 있음이 이미 여러 연구결과에서 보고된 바가 있어[21,27] 본 연구에서는 이를 증식의 지표로 사용하였다.

기존의 면역억제제중 가장 광범위하게 사용되는 cyclosporine의 혈관 평활근세포 증식효과에 관한 기존의 보고는 부정적이다.[7,8] 즉 고농도의 cyclosporine하에서는 유의한 증식억제효과가 입증되었으나 $IC_{50}$가 cyclosporine에 의한 세포독성이

나타날 수 있는 수준으로 임상적으로는 적용하기에는 어려움이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서도 임상적으로 사용 가능하며 세포독성을 보이지 않는 혈중농도에 해당하는 cyclosporine 100 nM로 실험농도를 고정하였던 바,[28] 이는 본 실험에서 LDH 농도측정을 통하여 cyclosporine에 의한 세포융해현상이 없음이 분명히 확인되었다(그림 8). 본 연구에서는 PDGF로 증식이 유도된 경우에서만 cyclosporine에 의한 혈관 평활근세포의 증식억제를 통계학적으로 확인할 수 있었으나 이 역시 증식억제정도가 50%미만으로 임상적으로 그 효과를 기대할 수 있는 수준은 아니었으며, 다른 증식유발인자에서는 cyclosporine의 유의한 증식억제효과를 발견할 수 없었다.

본 연구에서 확인된 carvedilol의 혈관 평활근세포의 증식억제효과는 1993년 이후 보고된 기존의 보고[19-22]와 비슷하여, carvedilol 1 μM과 10 μM 모두에서 cytokine의 종류에 관계없이 유의한 증식억제효과를 보였다. 즉 이는 carvedilol의 증식억제효과를 나타내는 기전이 각각의 증식유발인자의 수용체에 길항제에 작용한다기보다는 유발인자로 시작되는 세포증식의 공통과정을 억제한다는 것을 시사한다. 실제로 백서 혈관 평활근세포를 이용한 세포실험에서 carvedilol은 세포증식의 필수효소인 mitogen-activated protein(MAP) kinase을 억제하고 세포주기의 진행을 억제한다고 보고된 바가 있다.[29] 본 연구를 포함한 대부분의 세포실험에서 carvedilol의 증식억제효과는 carvedilol의 농도에 따라서 비례적으로 증가함을 보고하고 있다.[19-21] 비슷한 실험모델로 시행된 보고[19,30]들에서 carvedilol의 $IC_{50}$ 은 1 μM보다 약간 높은 것으로 보고되고 있으며 본 연구에서도 1 μM과 10 μM사이에 있음을 알 수 있었다. 더구나 본 연구에서는 carvedilol에 의한 세포독성여부를 확인하고자 PDGF로 유도된 실험군에 대하여 LDH 분비정도를 측정하였던 바 carvedilol의 실험농도안에서는 유의한 세포융해현상을 발견할 수 없었다. 따라서 본 실험은 혈관 평활근세포 증식억제을 위한 carvedilol의 임상적 시도를 위한 적절한 실험적인 근거를 제공해 주고 있다. 특히 본 in vitro 실험에서는 신장이식환자에게서 임상적으로 많이 사용할 수 있는 상황인 cyclosporine과의 병합투여의 경우를 가정하였는데 carvedilol의 증식억제효과는 cyclosporine의 병합투여와는 관계없이 carvedilol의 농도에 따라 비례적으로 나타남을 확인하였다.

그러나 이러한 carvedilol의 혈관 평활근세포에 대한 증식억제효과에도 불구하고 carvedilol의 만성거부반응이나 풍선 확장술후 혈관 재협착을 억제할 지에 대하여서는 논란의 여지는 있다. 이미 널리 알려진 대로 만성적으로 발생하는 혈관경화증은 혈관 평활근세포의 증식은 물론 혈관 평활근세포의 내막층으로의 이동현상에 기인하는 것으로 보고되고 있으나[3-5] 현재까지의 in vitro 실험중 carvedilol의 이동억제효과에 대한 보고는 증식억제효과에 대한 보고에 비하여 매우 제한적이다.[19] 더구나 carvedilol이 억제하는 것으로 알려진 MAP kinase가 세포증식에 관여하는 기간과 세포이동에 관여하는 기간에는 차이가 있다는 최근보고[27]와 carvedilol의 증식억제를 위한 $IC_{50}$와 이동억제를 위한 $IC_{50}$간의 차이를 보인다는 보고[19]를 감안하면 혈관 평활근세포의 증식과정과 이동과정간에는 분명히 차이가 있을 것으로 추정할 수가 있다. 따라서 carvedilol의 혈관 평활근세포 이동억제효과에 대한 in vitro 내지는 in vivo 실험은 물론 혈관 평활근세포의 증식이나 이동의 기전에 관한 연구가 향후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

# V. 결 론

Carvedilol의 단독투여 또는 면역억제제인 cyclosporine과의 병합투여가 각종 혈관 평활근세포의 증식유발인자의 존재하에서 혈관 평활근세포의 in vitro 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, carvedilol은 증식유발인자로 유도되는 백서 혈관 평활근세포의 증식을 용량 비례적으로 억제하며 이러한 증식억제효과는 cyclosporine의 병합투여와는 관계없이 일정하였다. 본 연구에서 확인된 carvedilol의 혈관 평활근세포 증식억제효과는 고혈압을 동반하는 이식환자에서 만성거부반응의 예방책으로 carvedilol의 사용 가능성을 시사하여 주고 있다.

# 참고문헌


1. Häyry P, Isoniemi, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom K, Raisanen-Sokolowski A et al. Chronic allogarft rejection. Immunol Rev 1993; 134: 33-81.
2. Orosz CG. Endothelial activation and chronic allograft rejection. Clin Transplant 1994; 8: 299-303.
3. Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993; 362: 801-809.
4. Geraghty JG, Stoltenberg RL, Sollinger HW, Hullett DA. Vascular smooth muscle cells and neointimal hyperplasia in chronic transplant rejection. Transplantation 1996; 62: 502-509.
5. Akyurek LM, Paul LC, Funa K, Larsson E, Fellström BC. Smooth muscle cell migration into intima and adventitia during development of transplant vasculopathy. Transplantation 1996; 62: 1526-1529.
6. Häyry P. Chronic allograft vasculopathy: new strategies for drug development. Transplant Proc 1998; 30: 3989-3990.
7. Mohacsi PJ, Tüller D, Hulliger B, wijngaard PLJ. Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. J Heart Lung Transplant 1997; 16: 484-492.
8. 문장일, 김 유선, 김 은희, 권 민수, 박 기일. 면역억제제가 백서 대동맥 혈관 평활근배양세포의 증식에 미치는 영향(1): cyclosporine, mycophenolic acid 및 rapamycin의 단독투여효과. 대한이식학회지 1998; 12: 183-190.
9. Allison AC, Eugui EM, Sollinger HW. Mycophenolate mofetil (RS-61443): mechanisms of action and effects in transplantation.

Transplant Rev 1993; 7: 129-139.

10. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. Transplant Proc 1993; 25: 770-771.
11. Gregory CR, Hung X, Pratt RE, Dzau VJ, Shorthouse R, Billingham ME, Morris RE. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. Transplantation 1995; 59: 655-661.
12. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1995; 76: 412-417.
13. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Prattt R, Morris RE. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Transplantation 1995; 59: 390-395.
14. Choi KH, Kang SW, Lee SW, Lee HY, Han DS, Kang BS. The effect of lovastatin on proliferation of cultured mesangial and aortic smooth muscle cells. Yonsei Med J 1995; 36: 251-261.
15. Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, van Thiel CF, van Leeuwen REW, Cohen LH. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. Biochem Biophys Acta 1997; 1345: 259-268.
16. Powel J, Clozel J, Muller R, Kuhn H, Hefti F. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. Science 1989; 245:186-188.
17. Petrik PV, Law MM, Moore WS, Colburn MD, Quinones-Baldrich W, Gelabert HA. Dexamethasone and enalapril suppress intimal hyperplasia individually but have no synergistic effect. Ann Vasc Surg 1998; 12:

216-220.

18. Hu ZW, Shi XY, Hoffman BB. Doxazosin inhibits proliferation and migration of human vascular smooth-muscle cells independent of alpha-adrenergic receptor antagonism. J Cardiovasc Pharmacol 1998; 31: 833-839.
19. Ohlstein EH, Douglas SA, Sung CP, Yue T, Louden C, Arleth AJ, et al. Carvedilol, a cardiovascular drug, prevents vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and neointimal formation following vascular injury. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 6189-6193.
20. Patel MK, Chan P, Betteridge LJ, Schachter M, Sever PS. Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by the novel multiple-action antihypertensive agent carvedilol. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 25: 652-657.
21. Sung CP, Arleth AJ, Ohlstein EH. Carvedilol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 21: 221-227
22. Ruffolo RR, Jr, Feuerstein GZ. Carvedilol: preclinical profile and mechanism of action in preventing the progression of congestive heart failure. Euro Heart J 1998; 19(Suppl B): B19-B24.
23. 김 인섭, 박 수제, 임 성훈, 허 영선, 김 상욱, 김 태호, 김 치정, 류 왕성, 유 언호. 카베디롤이 혈관평활근세포의 증식에 미치는 영향. 순환기 1998; 28: 1583-1589.
24. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration J Clin Invest 1996; 98: 2277-2283.
25. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. Kidney Int 1990; 37: 1487-1491.
26. Daemen M, Lombardi D, Bosman F, Schwartz S. Angiotensin-II

induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall, Circ Res 1991; 68: 450-456.

27. 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.
28. Tavares P, Martinez-Salgado C, Eleno N, Teixeira F, Novoa JML. Effect of cyclosporine A on rat smooth muscle cell proliferation. J Cardiovasc Pharmacol 1998; 31: 46-49.
29. Sung CP, Arleth AJ, Eichman C, Truneh A, Ohlstein EH. Carvedilol, a multiple-action neurohumoral antagonist, inhibits mitogen-activated protein kinase and cell cycle progression in vascular smooth muscle cells. J Pharmacol Exp Ther 1997; 283: 910-917.
30. Ohlstein EH, Arleth AJ, Storer B, Romanic AM. Carvedilol inhibits endothelin-biosynthesis in cultured human coronary artery endothelial cells. J Mol Cell Cardiol 1998; 30: 167-173.

# ABSTRACT

## Effect of carvedilol alone or with cyclosporine on the proliferation of rat vascular smooth muscle cell

Myoung Soo Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kiil Park )

**Background**: Typical pathologic lesions of chronic allograft rejection or transplant vascular sclerosis are similar to arteriosclerotic vascular lesion of non-transplant patients or vascular remodeling process after vascular injury. Abnormal and excess proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) which are triggered by endothelium-derived cytokines or growth factors, plays a major role during these process. Effective prophylactic or therapeutic strategies against chronic rejection or transplant vasculopathy are not yet clearly established. Recent *in vitro* cell culture study showed that carvedilol, a novel antihypertensive agent, has the significant inhibitory activities against the proliferation of VSMC.

**Materials and methods**: Using *in vitro* cultured VSMC, we measured the anti-proliferative activity of carvedilol alone, or in combination with cyclosporine. Growth-arrested cultured VSMC (5-9 passage) from the aorta of

rat (Sprague-Dawley) were exposed to platelet derived growth factor (PDGF), endothelin-l, or angiotensin-II. Carvedilol and/or cyclosporine were added as inhibitors. Proliferation was assessed by incorporated [$^3$H]-thymidine activity.

**Results**: PDGF stimulated mitogenesis most effectively. Carvedilol inhibited mitogenesis in a dose-dependent manner in the presence of PDGF (10 ng/ml). Compared to control, proliferation was significantly decreased to 60.3(±10.4)% and 18.3(±5.9)% in the presence of 1μM and 10μM of carvedilol, respectively ($p<0.05$, each). Carvedilol also produced significant concentration-dependent inhibitory activities against VSMC proliferation induced by endothelin-1 (10 nM) and angiotensin-II (100 nM). The $IC_{50}$ of carvedilol in PDGF-, endothelin-l and angiotensin-ll-stimulated VSMC were 1 ~ 10μM. Cyclosporine (100 nM) did not show significant inhibition of VSMC proliferation regardless of the kinds of cytokines. However, combined addition of carvedilol and cyclosporine inhibited significantly VSMC proliferation. The pattern of inhibition in combined group was very similar with that of carvedilol alone group regardless of the kind of cytokines.

**Conclusions**: The present study demonstrated that carvedilol significantly inhibited the proliferation of VSMCs regardless of the kind of cytokines, and even under the presence of cyclosporine in cultured VSMC. These indicate that carvedilol has the unique potential to reduce the development of transplant vasculopathy in hypertensive renal transplant recipients under cyclosporine-based immunosuppression.

---

**Key Words**: chronic rejection, vascular smooth muscle cells proliferation, cyclosporine, carvedilol