

Mycophenolic Acid와 Rapamycin이 흰쥐 사구체 혈관간세포증식과 세포외기질 생성에 미치는 영향

¹연세대학교 장기이식연구소, ²연세대학교 의과대학 외과학교실, ³연세대학교 원주의과대학 외과학교실,
⁴이화여자대학교 약학대학

김명수^{1,3} · 박제현^{1,2} · 하현주⁴ · 허규하² · 서지연^{1,2} · 김유선^{1,2} · 김혜진² · 박기일¹

Effects of Mycophenolic Acid and Rapamycin on PDGF-induced Mesangial Cell Proliferation and Extracellular Matrix Production

Myoung Soo Kim, M.D.^{1,3}, Jehyun Park, B.S.^{1,2}, Hunjoo Ha, Ph.D.⁴, Kyu Ha Huh, M.D., Jiyeon Seo, B.S.^{1,2}, Yu Seun Kim, M.D.^{1,2}, Hae Jin Kim, B.S.² and Kiil Park, M.D.¹

¹The Research Institute for Transplantation and ²Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul,
³Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, and ⁴College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Background: Excess proliferation and extracellular matrix (ECM) accumulation of mesenchymal cells such as vascular smooth muscle cells (VSMC) and glomerular mesangial cells cause chronic allograft nephropathy showing transplant vascular sclerosis and glomerulosclerosis. Mycophenolic acid (MPA) and rapamycin (RPM) are well known as strong inhibitors of VSMC proliferation, but their effects on the glomerular mesangial cells are not yet clearly understood. This study examined the effects of MPA or RPM on PDGF-induced proliferation and ECM accumulation in rat glomerular mesangial cells. **Methods:** Mesangial cells isolated from the glomeruli of Sprague-Dawley rats were cultured with DMEM containing 20% fetal bovine serum. Growth arrested and synchronized cells were administered with test drugs (MPA 10 nM~10 μM, RPM 0.1 nM~1 μM)

before the addition of PDGF 10 ng/mL. Cell proliferation was assessed by [³H]thymidine incorporation, collagen by [³H]proline incorporation, and fibronectin, ERK, and p38 MAPK by Western blot analysis. **Results:** PDGF increased mesangial cell proliferation by 4.64-fold. Compared to stimulated control, MPA above 500 nM and RPM above 10 nM showed a significant inhibitory effect in a dose-dependent manner. The IC₅₀ of MPA and RPM against PDGF-induced mesangial cell proliferation were around 500 nM and 100 nM, respectively. The collagen synthesis was also inhibited by MPA and RPM, but the fibronectin secretion was inhibited by MPA alone. The proliferation of mesangial cell correlated with activation of ERK and p38 MAPK. MPA, but not RPM, inhibited ERK and p38 MAPK activation. **Conclusion:** This study demonstrated that MPA and RPM significantly inhibited PDGF-induced proliferation and ECM production in rat glomerular mesangial cells. The inhibitory effects of MPA, but not RPM, are correlated with ERK and p38 MAPK. (J Korean Soc Transplant 2004; 18:13-22)

Key Words: Mesangial cell, Mycophenolic acid, Rapamycin, Proliferation, Fibronectin, Collagen, Mitogen-activated protein kinases

중심 단어: 혈관간세포, 마이코페놀산, 라파마이신, 증식, 파이브로넥틴, 콜라겐, ERK, p38 MAPK

서 론

신장이식 후 발생하는 만성거부반응의 주요병리소견은 내막증식증(intimal hyperplasia)이나 혈관경화증(transplant vascular sclerosis) 등과 같은 혈관병변, 사구체경화증 등의 사구체병변 및 세뇨관 간질의 섬유화와 같은 신실질 병변으로 구분될 수 있다. 이러한 병리소견은 혈관중막 내에 위치한 혈관 평활근세포의 증식은 물론 사구체 혈관간세포 (glomerular mesangial cell)의 증식으로 초래되는 것으로 알

책임저자 : 김유선, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752

Tel: 02-361-5563, Fax: 02-313-8289

E-mail: yukim@yunc.yonsei.ac.kr

본 연구는 2002년도 대한이식학회-로슈 연구 장학금(김유선) 지원과 연세대학교 장기이식연구소 연구비 일부 지원으로 이루어졌음.
박기일의 현 소속: 관동대학교 의과대학 명지병원 장기이식센터

려져 있다.(1) 사구체 혈관간세포와 세포외기질(extracellular matrix)은 신사구체 총맥(glomerular capillary tuft)의 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하는 구조로서, 사구체 혈관간세포의 증식과 세포외기질의 침착은 사구체 경화증의 공통적인 병리소견이다.(2)

현재까지 만성거부반응에 관련된 혈관경화증을 효과적으로 제어하는 방법은 매우 제한적으로 여러 약제를 사용하여 다양한 cytokine과 성장인자의 생성과 발현을 억제하려는 시도가 있어 왔으나 임상에서 사용할 정도로 그 효과가 확연하게 밝혀진 제제는 아직까지는 없다.(3-5) 최근에는 mycophenolic acid (MPA)와 rapamycin (RPM)이 혈관 평활근세포의 증식을 억제함이 보고되고 있다.(6-8) 일반적으로 진행성인 신질환인 경우 혈관이나 신실질의 변화는 사구체의 변화와 동시에 발생하며 각 부분의 변화과정들은 어느 정도 공유된다고 할 수 있다.(9) 따라서 혈관 평활근세포의 증식억제효과를 보이는 MPA와 RPM은 사구체 혈관간세포 증식에도 영향을 미칠 수 있다고 추론할 수 있으며, 실제로 MPA와 RPM은 사구체 혈관간세포를 이용한 세포실험에서 증식억제효과가 보고된 바가 있다.(10,11)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로는 세포질에 존재하는 단백질의 인산화 효소로서 extracellular-regulatory protein kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) 그리고 p38 MAPK의 세 가지 형태가 있으며, 각 MAPK는 세포 외부의 각종 자극 인자들에 의해 활성화되어 전사조절인자를 활성화한다.(12) 실제로 ERK, JNK, p38 MAPK는 각각 platelet-derived growth factor (PDGF)나 angiotensin II에 의한 혈관평활근세포(13,14)와 혈관간세포(15,16)의 증식과 연관이 있다. 증식억제효과를 보이는 많은 약제들은 이러한 신호전달자의 활성화를 억제하는 것으로 보고된 바가 있는데, 새로운 항고혈압제제인 carvedilol은 ERK의 활성화를 억제하고,(17) MPA는 활성산소족 생성 그리고 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 억제하여(18) 혈관 평활근세포의 증식을 억제함이 보고된 바가 있다. 본 연구에서는 MPA와 RPM이 만성거부반응의 특징적인 병리현상인 사구체경화증에 영향을 미칠 수 있을 것이라는 가정하에, MPA와 RPM이 흰쥐 사구체 혈관간세포의 증식과 세포외기질단백의 일종인 fibronectin과 collagen의 생성에 미치는 영향과 이에 관여하는 세포내 신호전달계 중 ERK와 p38 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 검색하였다.

방 법

1) 흰쥐 사구체 분리 및 혈관간세포의 일차 배양

체중 100~150 gram의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 마취 후 단두하고 양측 신장을 적출한 후 피질부를 가위로 잘게 썰고 표준화된 체거름법(19)을 변형하여 사구체를 분

리하고 혈관간 세포를 배양하였다. 75 μ m 소공의 체에 걸린 사구체를 취하고 2 mg/mL collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 0.25%/1 mM trypsin/EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 처리한 후 2,000 rpm에서 원심 분리하여 얻은 사구체를 20% 우태아 혈청(fetal bovine serum; GIBCO BRL), 100 U/mL penicillin (GIBCO BRL)과 100 μ g/mL streptomycin (GIBCO BRL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; GIBCO BRL)에서 배양하였다. 2~3일마다 배양액을 교환하였고 7~10일마다 trypsin/EDTA를 이용하여 계대 배양하였으며, 6~10회 계대 배양한 혈관간세포를 본 연구에 이용하였다. 역상 현미경으로 혈관간세포의 형태를 확인하고, 항 vimentin 항체(DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)와 항 cytokeratin 항체(DAKO Japan Co.)를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 사구체 혈관간세포임을 확인하였다.

2) 약제의 투여

MPA는 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M 그리고 10 μ M 농도로, RPM은 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM 그리고 1 μ M 농도로 단독 투여하였다. MEK 억제제인 PD98059는 20과 50 μ M 농도로, p38 MAPK 억제제인 2-(4-chlorophenyl)-4-(4-fluorophenyl)-5-pyridin-4-yl-1,2-dihydropyrazol-3-one은 1과 10 μ M 농도로 PDGF-BB를 처리하기 1시간 전에 투여하였다.

3) 세포 증식의 평가: [3 H]thymidine incorporation을 이용한 DNA 합성능 측정

배양기에서 충분히 자란 세포를 trypsin/EDTA로 처리한 후 96 well 배양용기(Corning, Corning, NY, USA)에 각 well 당 1×10^4 개의 세포를 분주하였다. 이 세포들을 20% 우태아 혈청이 함유된 DMEM 배양액으로 72시간 배양한 후, 혈청 배제 DMEM으로 24시간동안 배양하여 세포주기를 동일화하였다. 이후 MPA, RPM 및 MAPK 억제제를 실험농도로 투여한 후에 10 ng/mL PDGF-BB (Sigma Chemical Co.)를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. [3 H]thymidine (Du Pont Co., Wilmington, DE, USA)을 각 well에 2 μ Ci/mL의 농도로 첨가하고, 6시간 후 배양세포를 cell harvester (Titertek Cell Harvester 550, Flow Laboratories, Irvine, Scotland, UK)를 이용하여 glass filter (Flow Laboratories, Irvine, Scotland, U.K.)에 흡착시켜 실온에서 약 6시간 동안 건조시킨 다음, 3 mL scintillation cocktail에 넣고 β -counter (TL 5000 s, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)로 총 방사능을 측정하였다.

4) Collagen 생성의 평가: [3 H] proline incorporation을 이용한 collagen 합성능 평가

실험이 종료되기 12시간 전에 [3 H]proline (Du Pont)을 각 well에 1 μ Ci/mL의 농도로 첨가하였다. 실험이 종료되면, 배

양액을 제거하고 인산완충액(phosphate buffered saline; PBS)으로 2회 세척하였다. Methanol로 고정하고 PBS로 1회 세척하였다. 10% Trichloroacetic acid (TCA)로 10분간 실온에서 방치한 후 0.2 N NaOH와 0.5% SDS가 함유된 용액에 30분간 반응시킨 후 1 N HCl로 반응을 종료시켜 3 mL scintillation cocktail에 넣고 β -counter (Beckman Instruments Inc.)로 총 방사능을 측정하였다.

5) Western blot을 이용한 fibronectin, ERK 1/2, p38 MAPK 측정

Fibronectin의 측정을 위하여 세포 배양액을 취하여 원심 분리한 후 cell debris 등을 제거한 상층액을 분주하여 -70°C 에 보관하였다. ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화를 측정하기 위하여 Western blot을 시행하는데 시료의 채취시간은 ERK 1/2와 p38 MAPK의 시간에 따른 활성도를 검사한 후에 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 20 μM leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate)을 사용하여 4°C 에서 10분간 방치하여 세포용해를 초래한 뒤, 원심분리를 시행하여 상층액을 세포내 단백질로 취하였다.(18)

실험이 종료된 후 Bio-Rad 단백 분석 kit를 사용하여 세포 용해액 내 단백질을 정량하였다. 세포내 단백질로 보정된 세포 배양액 또는 세포내 단백질을 함유한 세포질 용해액을 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°C 에서 5분간 가열하였다. 5% (fibronectin 검사용) 또는 10% (ERK, p38 MAPK 검사용) SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개 분리한 후 nitrocellulose 흡착지에 전이시켰다. 단백에 대한 molecular marker를 사용하여 전개와 전이 정도를 확인하였다. ERK 항체(Cell signaling Co., Beverly, MA01915, USA)와 p38 MAPK 항체(Cell signaling Co.)로 반응시킨 후 peroxidase가 conjugation된 이차 항체(HRP-conjugated anti-mouse or rabbit IgG; Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 동안 반응시켰다. Fibronectin 항체(DAKO Japan Co.)는 일차와 이차항체가 결합되어 있는 항체를 사용하였다. ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham, Buckinghamshire, UK) kit를 이용하여 이차 항체를 검출하였다. 각각의 밀도를 Tina 2.1 프로그램을 사용하여 측정하여 대조군을 1.0으로 하여 비교하였다.

6) 통계처리

혈관간세포의 증식정도나 collagen의 합성정도는 [³H]thymidine이나 [³H]proline incorporation되는 총 방사능(cpm)으로 표시하였으며, 약제에 의한 증식정도는 상대적인 증식정도 (relative proliferation=cpm of drug-treated group/cpm of PDGF-stimulated control)로 비교하였다. 각 실험에 대하여 triplicate방법으로 4~5회를 시행하였다. 1회 측정치는 triplicate방법으로 측정된 수치의 평균값을 대표값으로 간주하였다. Western blot에 의한 측정치는 대조군 또는 PDGF로 유발된 대조군과의 비율로 표시하였다. 모든 실험결과의 측정치는 평균(mean) \pm 표준 편차(standard deviation)로 나타냈으며, 두 군 간의 통계학적인 비교는 Student's t-test로, 여러 군 간의 통계학적인 비교는 ANOVA를 시행한 후에 각 개별 군의 다중비교(multiple comparison)는 Tukey방법으로 검증하였다.

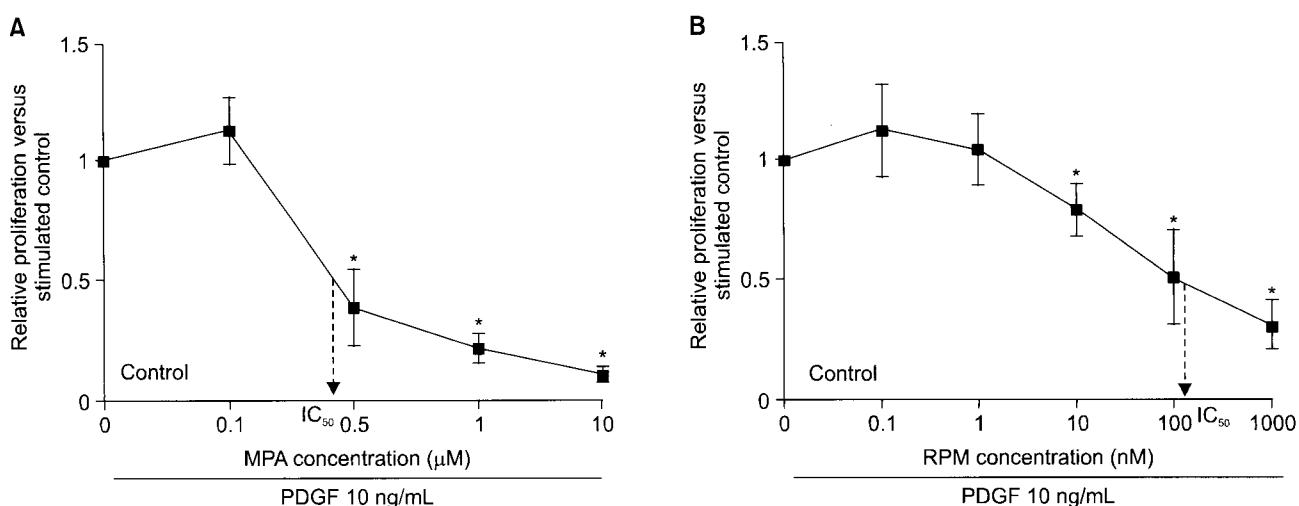


Fig. 1. Effects of MPA (A) and RPM (B) on PDGF-induced rat mesangial cell proliferation. *means $P < 0.05$ versus stimulated control.

결 과

1) 혈관간세포의 증식에 미치는 영향

(1) PDGF에 의한 혈관간세포의 증식유발효과: 대조군의 [³H]thymidine incorporation 정도는 평균 57.61 ± 13.25 cpm인 반면, PDGF로 유도된 혈관간세포는 평균 270.72 ± 90.10 cpm으로 PDGF 10 ng/mL은 평균 4.64배의 증식유발 효과가 있었다.

(2) MPA와 RPMO| PDGF로 증식 유도된 혈관간세포에 미치는 영향: MPA는 농도가 증가할수록 PDGF로 유도된 혈관간세포의 증식을 억제하여 500 nM 이상에서 50% 이상 충분히 증식을 억제하였다(Fig. 1A). RPM은 농도가 증가할수록 PDGF로 유도된 혈관간세포의 증식을 억제하여 10 nM 이상인 경우 유도된 대조군과의 유의한 차이를 보였으며, 100 nM 이상에서는 50% 이상의 증식억제효과를 보였다(Fig. 1B). 세포증식에 대한 MPA의 IC₅₀ (inhibitory concentration 50%)은 100~500 nM, RPM의 IC₅₀은 100 nM 내외였다.

2) 혈관간세포에서 세포외기질의 생성에 미치는 영향

(1) PDGF로 유도된 혈관간세포에서 세포외기질의 생성: PDGF로 유도된 혈관간세포의 fibronectin과 collagen의 생성은 대조군에 비하여 각각 2.81 ± 0.46 배와 1.81 ± 0.41 배 증가하였다.

(2) MPA와 RPMO| PDGF로 유도된 혈관간세포의 세포외기질의 생성에 미치는 영향: MPA는 100 nM 이상에서 fibronectin (Fig. 2A)과 collagen (Fig. 2B)의 생성을 억제하였는데 이는 혈관간세포의 증식억제를 보이는 농도와 비슷한 수준이었다. 반면에 RPM은 혈관간세포의 증식억제효과가 있음에도 불구하고 같은 농도에서 fibronectin의 생성을 억제하지는 못한 반면(Fig. 3A), collagen의 생성은 증식억제농도와 비슷한 RPM 10 nM 이상에서 유의한 억제효과를, RPM 1 μM에서는 50% 이상의 억제효과를 보였다(Fig. 3B).

3) 세포내 전달체계에 미치는 영향

(1) PDGF로 유도된 혈관간세포의 증식과 ERK와 p38 MAPK의 활성화: PDGF는 혈관간세포내의 ERK와 p38 MAPK를 활성화시켰다. ERK의 경우는 10분에서 최고도를 보이면서 평균 5.58 ± 2.90 배 활성화되었다. 마찬가지로 p38 MAPK도 5분 만에 최고도를 보이면서 평균 3.01 ± 0.14 배 활성화되었다(Fig. 4).

PDGF를 투여하지 않은 혈관간세포의 배양에서는 MEK 억제제나 p38 MAPK 억제제에 의한 증식억제효과는 없었으나(Fig. 5A), PDGF로 유도된 혈관간세포의 증식은 MEK 억제제나 p38 MAPK 억제제를 투여하는 경우에 유의하게 억제되었다(Fig. 5B).

(2) PDGF로 유도된 혈관간세포의 세포외기질 생성과 ERK 및 p38 MAPK의 활성화: MEK 억제제와 p38 MAPK

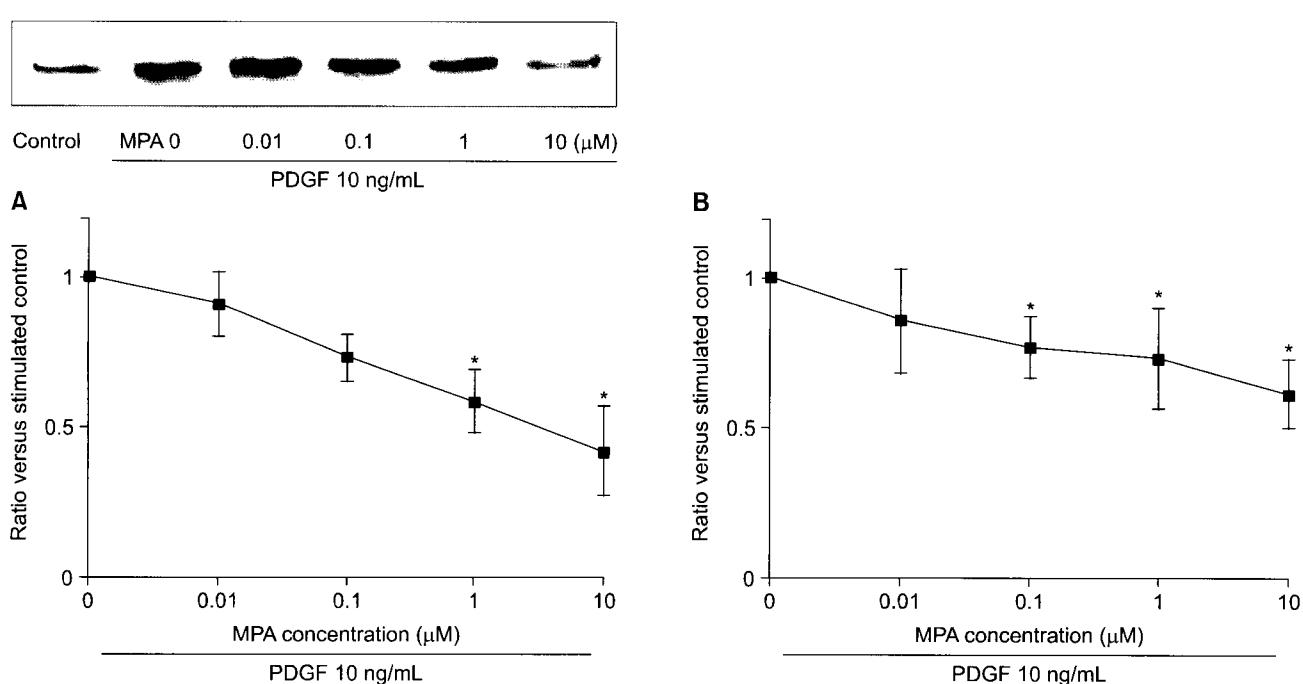


Fig. 2. Effects of MPA on PDGF-induced fibronectin secretion (A) and collagen synthesis (B) in rat mesangial cells. *means $P < 0.05$ versus stimulated control.

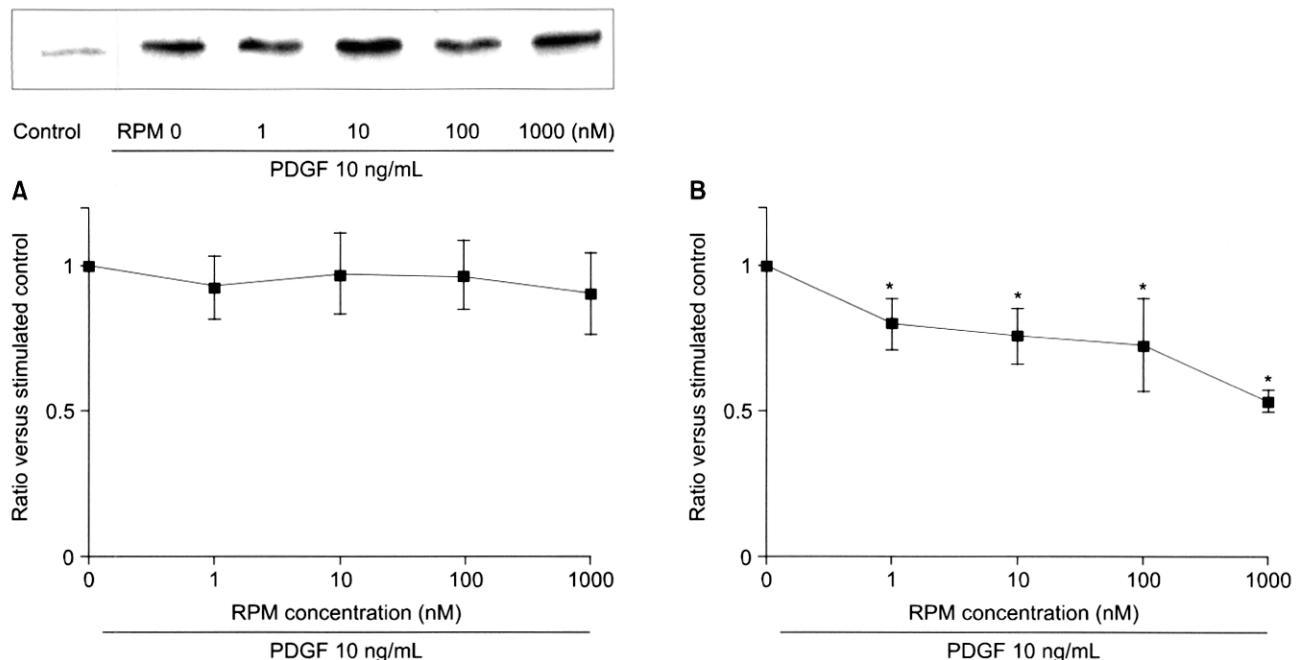


Fig. 3. Effects of RPM on PDGF-induced fibronectin secretion (A) and collagen synthesis (B) in rat mesangial cells. *means $P < 0.05$ versus stimulated control.

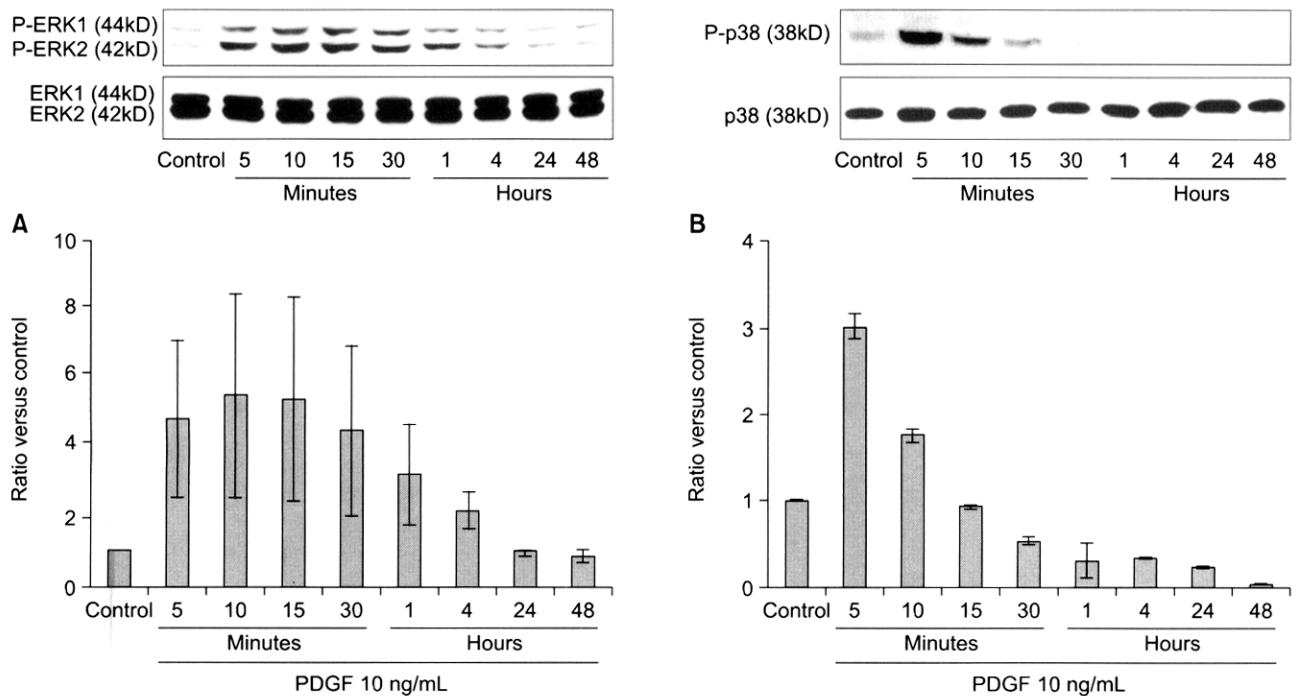


Fig. 4. PDGF-induced ERK (A) and p38 MAPK (B) activation in rat mesangial cells.

억제제는 PDGF로 유도된 혈관간세포의 fibronectin 생성을 실험동물 모두에서 유의하게 억제하였다(Fig. 6A). 그러나 혈관간세포의 collagen 생성은 저농도의 MEK 억제제($20\mu\text{M}$)와 p38 MAPK 억제제($1\mu\text{M}$)에서는 유의하게 억제되

지 못하였으며, 고농도($50\mu\text{M}$ MEK 억제제와 $10\mu\text{M}$ p38 MAPK 억제제)에서만 유의한 억제효과를 보였다(Fig. 6B).

(3) MPA와 RPM이 혈관간세포내의 ERK와 p38 MAPK의 활성화에 미치는 영향: MPA는 증식억제효과를 보이는

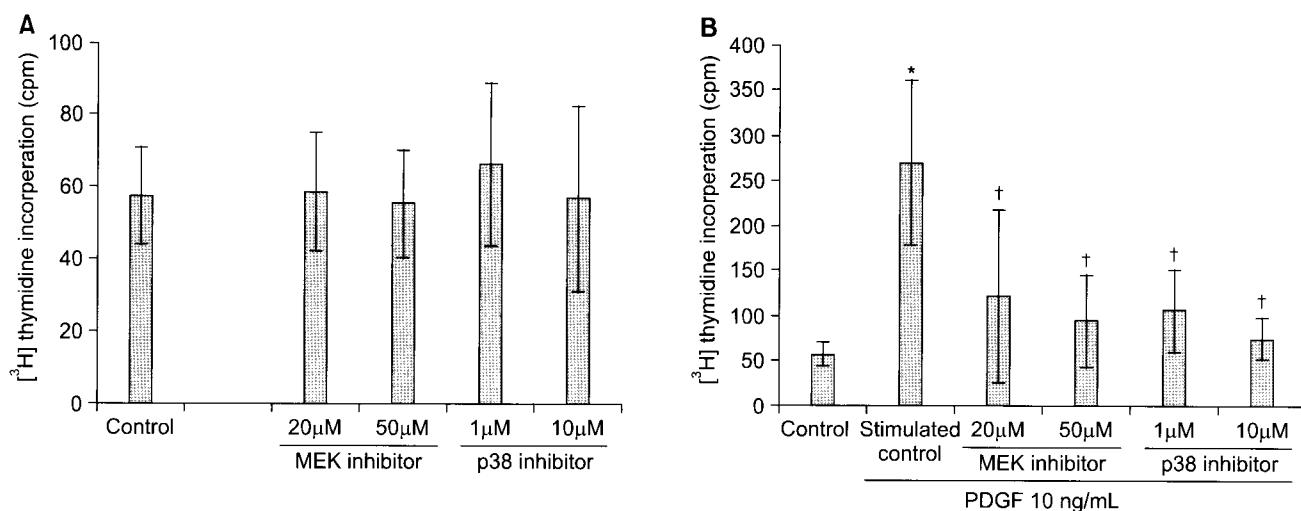


Fig. 5. Effects of PD98059 and p38 MAPK inhibitor on rat mesangial cell proliferation without PDGF 10 ng/mL (A) and with PDGF 10 ng/mL (B). *means P-value <0.05 versus control group; † means P-value <0.05 versus stimulated control group.

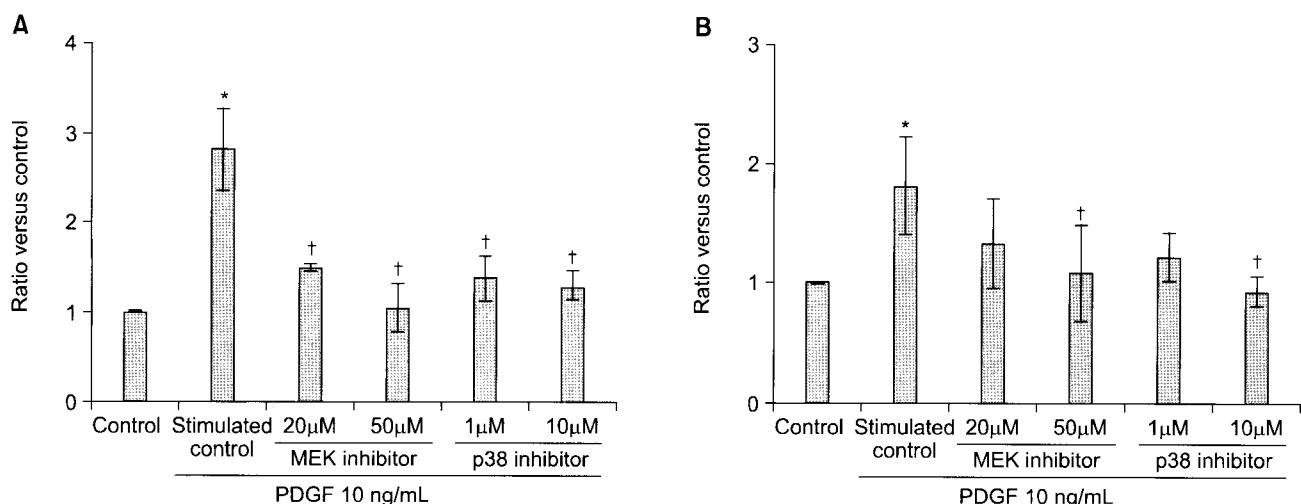


Fig. 6. Effects of PD98059 and p38 inhibitor on PDGF-induced fibronectin secretion (A) and collagen synthesis (B) in rat mesangial cells. *means P-value <0.05 versus control group; † means P-value <0.05 versus stimulated control group.

농도보다 높은 농도에서 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 억제하였으며 농도의존적인 억제효과를 보였다(Fig. 7). 반면에 혈관간세포의 증식억제효과를 보였던 10 nM 이상의 RPM은 ERK나 p38 MAPK의 활성화를 억제하지 못하였다(Fig. 8).

고 찰

혈관 평활근세포나 혈관간세포의 증식과 세포외기질의 분비는 활성화 또는 변형된(activated or dedifferentiated) 세포의 전형된 특징이다.(20) 이러한 변화에는 PDGF, basic fibroblast growth factor (bFGF) 및 transforming growth factor- β (TGF- β)가 작용하는 것으로 알려져 있는데, (21) 본 연구

에서는 PDGF를 유발인자로 사용하였다. PDGF는 혈관 평활근세포는 물론 혈관간세포의 증식과 세포외기질의 분비를 유발하는 주요 유발인자임이 여러 실험을 통하여 인정되고 있었다.(22-24) 따라서 PDGF에 대한 항체나 PDGF 수용체에 대한 항체로 처리하는 경우 혈관간세포의 증식이나 세포외기질의 분비가 억제됨이 보고되고 있다.(25,26) 본 연구에서도 혈관간세포의 증식과 세포외기질의 유발인자로 PDGF를 사용한 결과, 모든 경우에서 대조군에 비하여 유의한 증식유발효과 및 세포외기질 생성유발효과를 관찰하였다. 이러한 PDGF로 유도된 세포증식의 경우, 여러 세포내 단백질 인산화효소의 활성화가 촉진됨은 보고된 바가 있는데 혈관 평활근세포에서는 ERK나 p38 MAPK가 활성화되었으며,(13,18) PDGF(27)는 물론 다른 유발인자(즉 endothelin-

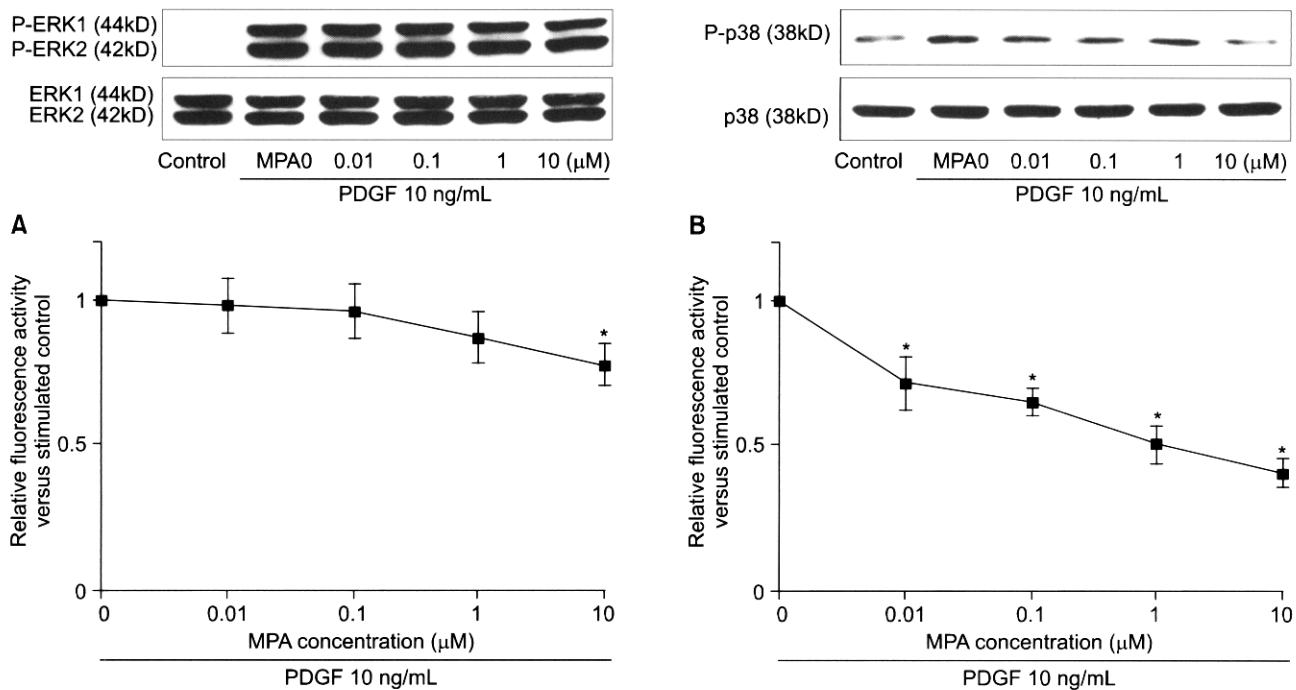


Fig. 7. Effect of MPA on PDGF-induced ERK (A) and p38 MAPK (B) activation in rat mesangial cells. *means $P < 0.05$ versus stimulated control.

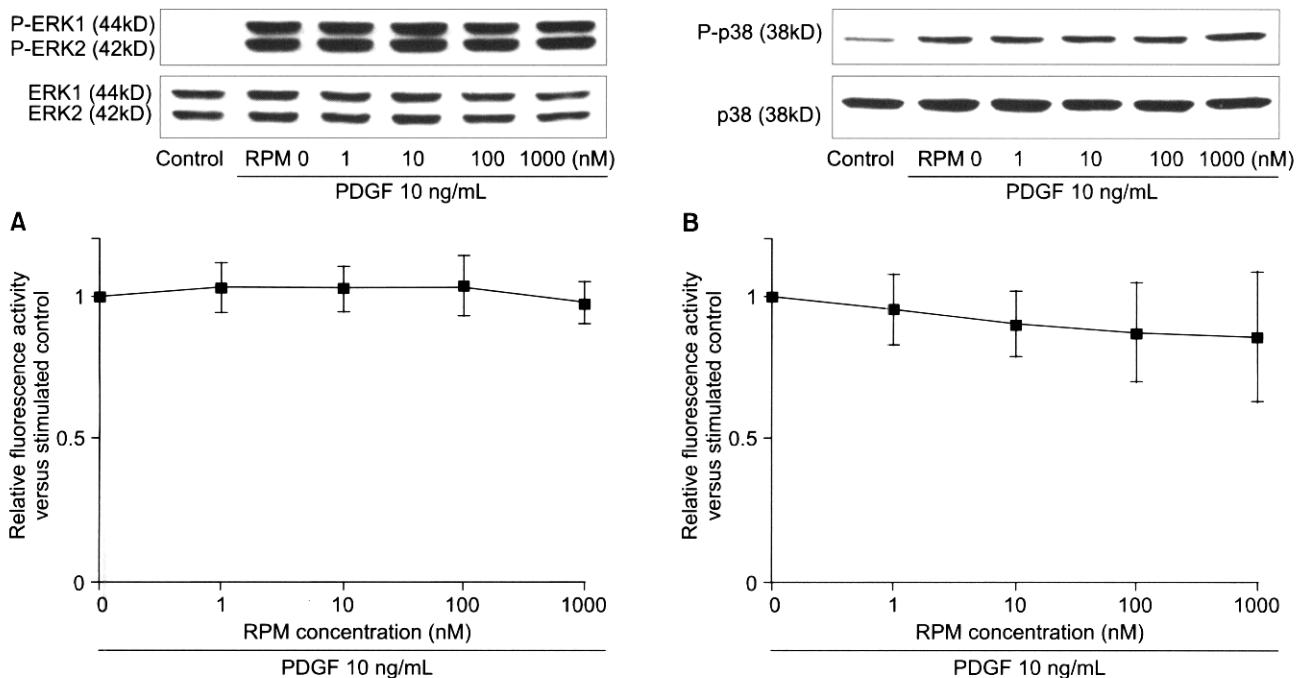


Fig. 8. Effect of RPM on PDGF-induced ERK (A) and p38 MAPK (B) activation in rat mesangial cells. *means $P < 0.05$ versus stimulated control.

1이나 angiotensin-II(28)나 당뇨병성신증(16)에서도 사구체 혈관간세포내의 단백질 인산화효소가 활성화됨이 보고되고 있다. 본 연구에서는 세포내 단백질 인산화효소 중 ERK

와 p38 MAPK가 혈관간세포 증식과정 중 어떠한 변화를 보이는지를 확인하였던 바, ERK와 p38 MAPK가 각각 PDGF 노출 10분과 5분 후에 최고도로 활성화됨을 확인할 수 있었

다. 또한 ERK의 선택적인 억제제인 MEK 억제제나 p38 MAPK의 선택적 억제제로 전처치를 하는 경우 PDGF에 의한 혈관간세포의 증식이 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 이상의 연구결과들은 PDGF에 의한 혈관간세포의 증식과정에 ERK나 p38 MAPK의 활성화가 관여함을 시사한다.

MPA가 혈관 평활근세포의 증식을 억제함은 많은 보고에서 확인된 바가 있으며,(7,18,29) 연구자도 이미 이에 관한 실험결과를 보고한 바 있다.(30,31) 또한 MPA는 급성거부반응과 무관하게 만성 이식신증의 빈도를 낮출 수 있다는 임상결과가 보고된 바 있다.(32) 연구자는 MPA를 100 nM부터 10 μM까지의 농도를 본 실험에 적용하였는데 이는 효과적인 면역억제능력을 보이는 사람에서의 MPA의 사용농도를 감안하여 설정한 것이다.(33) 본 연구결과에 의하면 500 nM 이상의 MPA는 사구체 혈관간세포의 증식을 효과적으로 억제하였는데, 이는 다른 연구의 결과와도 일치되었다.(10,34) 이는 임상적으로 사용 가능한 MPA의 적정농도 내에서 사구체 혈관간세포의 증식이 충분히 억제될 수 있음을 의미하며, 이러한 농도는 MPA가 혈관 평활근세포의 증식을 억제하는 농도(18,30)와도 비슷한 수준이었다. 따라서 이를 근거로 MPA를 임상에서는 증식성 사구체 신증의 치료에 사용하기도 한다.(35)

혈관간세포를 이용한 연구자의 초기 증식억제실험에서는 RPM의 실험 최고농도를 10 nM으로 유지하였다. 이는 혈관 평활근세포에 대한 증식억제실험에서 1 nM 이상의 RPM에서 충분한 세포증식이 억제되었으며(30) RPM의 농도가 15 ng/mL (16.4 nM) 이상인 경우 골수독성과 지질장애가 심해진다는 임상 보고(36)를 근거로 실험농도를 설정한 결과이었다. 그러나 RPM 10 nM에서는 PDGF 유발대조군과 유의한 차이는 보였으나, 50% 이상의 충분한 혈관간세포의 증식억제효과를 확인할 수는 없었다. 이러한 결과는 사구체 혈관간세포의 증식억제효과는 혈관 평활근세포보다, 고농도의 RPM이 필요함을 의미한다. 그러나 DiJoseph 등(37)은 27 ng/mL (29.5 nM) 농도의 RPM에서도 흰쥐 신장의 병적소견이 없다고 보고하였으며, 일반적으로 인정하는 RPM의 유효농도가 10~60 ng/mL (10.9~65.6 nM)라는 사실(38)을 고려한다면 10 nM 이상 농도의 RPM도 임상적으로 충분히 사용이 가능한 농도라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 RPM의 농도를 100 nM은 물론 1 μM까지 높여서 시행하였으며, 상기 농도에서 혈관간세포의 증식이 농도의 존적으로 억제되어 50% 이상의 충분한 증식억제효과도 확인할 수 있었다. 100 nM 이상의 RPM이 50% 이상의 충분한 증식억제효과가 있음은 다른 연구에서 최근에 보고되기도 하였다.(11)

혈관 평활근세포를 이용한 연구자 등의 과거실험에서도 MPA는 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 억제함으로써 혈관 평활근세포의 증식을 억제함을 보고한 적이 있는데,(18) 사

구체 혈관간세포를 이용한 본 연구의 결과도 이와 비슷하였다. 본 연구결과에서 MPA에 의한 ERK와 p38 MAPK 활성화의 억제 정도는 같은 농도의 MPA에 의한 세포증식억제효과와 약간의 차이는 있었으나, 농도의존적인 억제효과는 일치하였다. 이와 같은 결과는 MPA의 증식억제작용이 혈관간세포내의 ERK와 p38 MAPK의 활성화와 연관이 있다는 것을 의미하고 있다. 반면 RPM과 MAPK와의 상관관계에 관하여서는 실험세포의 종류에 따라서 그 연관성을 보고하기도 하나,(39) 다수의 보고에서 MAPK와는 관계없는 것으로 보고되고 있다.(30,40) 본 연구에서도 사구체 혈관간세포의 증식억제가 가능하였던 RPM의 실험농도에서도 혈관간세포내의 ERK나 p38 MAPK의 활성화를 억제할 수가 없었다. 이는 RPM의 작용부위인 mTOR (mammalian target of rapamycin)이 세포내 신호전달체계 중 MAPK보다 하위체계이거나(41) MAPK와는 별도의 신호체계이기 때문이다.(42)

PDGF와 같은 cytokine은 혈관간세포에서 세포외기질 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다.(21) 본 연구결과에서도 fibronectin과 collagen은 PDGF에 의하여 각각 2.8배 및 1.8배 정도의 생성이 촉진되었다. 이러한 세포외기질 중 fibronectin의 생성과정에 ERK나 p38 MAPK가 관여함은 기존의 연구결과에서도 보고된 바가 있다.(30,40) 반면 혈관간세포내의 collagen의 유도과정에 p38 MAPK가 관여한다는 보고는 있었으나,(43) collagen의 생성과정에 세포 내 신호전달체계가 구체적으로 어떠한 역할을 하는지에 대하여서는 알려진 바가 적다. 본 연구결과에서 MPA가 fibronectin의 분비를 억제하는 반면 RPM은 분비를 억제하지 못하였는데 이는 MPA의 경우 세포내 전달체계 중 ERK나 p38 MAPK를 유의하게 억제하는 반면 RPM은 ERK나 p38 MAPK를 억제하지 못하기 때문인 것으로 추정된다. MEK 억제제나 p38 MAPK 억제제에 대한 혈관간세포의 반응도 각 세포외기질의 생성과정이 다르다는 점을 입증하고 있다. 즉 fibronectin과 collagen은 모두 PDGF에 의하여 생성이 증가되었으나, fibronectin의 경우에는 MEK 억제제나 p38 MAPK 억제제에 대하여 모든 실험농도에서 분비억제효과를 보였던 반면 collagen의 생성은 억제제의 고농도에서만 유의한 차이를 보였다. 이는 세포외기질 중 fibronectin과 collagen의 생성기전이 서로 다를 수 있다는 점을 시사하고 있다.

본 연구에서는 collagen의 생성정도를 [³H]proline incorporation에 의한 전체량으로 측정하였다. 이는 collagen의 아형에 따른 측정을 하는 기존의 보고와는 차이가 있다.(44) 특히 활성화된(혹은 변형된) 혈관간세포의 지표로 많이 이용되는 collagen type I이나 type III와 정상적인 조건에서 존재하는 type IV를 구분하지 않은 상태로 총량을 측정한 것이 혈관간세포의 병태생리학적인 변화를 어느 정도 반영하는지에 대하여서는 논란의 여지가 있다. 그러나 물리적 스트레스에 의하여 유발된 혈관간세포의 세포외기질의 성분분

석에 의하면 collagen type IV, fibronectin 및 laminin은 물론 collagen type I과 type III도 동시에 생성이 촉진되는 것으로 보아,(45) 전체량의 증가는 어느 정도 병적인 상태의 측정치로 의미는 있을 수 있다고 하겠다. 본 연구에서는 MPA는 물론 RPM이 혈관간세포의 collagen 생성을 농도의존적으로 억제함을 확인하였다. MPA에 의한 혈관간세포의 collagen 생성억제효과는 TGF- β 를 유발인자로 사용한 인간 혈관간세포에서 같은 결과가 보고되고 있다.(44) 그러나 RPM에 의한 혈관간세포에 대한 반응과 관련해서는 아직 보고된 바는 없으나, 간내성상세포(hepatic stellate cell)를 이용한 실험결과에서는 본 연구와 마찬가지로 collagen mRNA에 의한 생성을 억제하는 것으로 보고되었다.(40)

본 연구결과는 MPA와 RPM이 사구체 혈관간세포의 증식 및 collagen의 생성을 효과적으로 억제하며 따라서 이들 약제들이 만성이식인 기능부전의 대표적인 병리소견인 사구체경화증을 억제할 수 있다는 실험적 증거를 제시하고 있다.

결 론

MPA와 RPM은 모두 농도의존적으로 PDGF에 의해 유도된 사구체 혈관간세포의 증식과 collagen 생성을 억제하였다. Fibronectin의 생성은 MPA에 의해서 억제되었으나, RPM에 의한 억제효과는 확인할 수 없었다. 이는 MPA와 RPM의 작용기전이 서로 상이하기 때문으로, MPA는 ERK나 p38 MAPK의 활성화를 억제하는 반면 RPM은 ERK나 p38 MAPK의 활성화와 연관성이 없었다. 결론적으로 MPA와 RPM은 PDGF로 유도된 사구체 혈관간세포의 증식을 억제함은 물론 collagen의 생성을 억제하므로, 이 약제들이 만성 이식인 기능부전의 치료제로 사용될 수 있다는 실험적인 근거를 제시하여 주고 있다.

REFERENCES

- 1) Häyry P, Isoniemi H, Yilmaz S. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev* 1993;134:33-46.
- 2) Kashgarian M, Sterzel RB. The pathology of the mesangium. *Kidney Int* 1992;41:524-9.
- 3) McDonald PC, Wong D, Granville DJ, McManus BM. Emerging roles of endothelial cells and smooth muscle cells in transplant vascular disease. *Transplant Rev* 1999;13:109-27.
- 4) Park JS. Inhibition of intimal hyperplasia. *J Korean Vasc Surg* 1999;15:365-74.
- 5) Häyry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtchenkov M, Aavik E. Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 2000;32:519.
- 6) Gregory CR, Huang X, Pratt RE, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995;59:655-61.
- 7) Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995;59:460-6.
- 8) Mohacs PJ, Tueller 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;16:484-92.
- 9) Becker GJ, Perkovic V, Hewitson TD. Pharmacological intervention in renal fibrosis and vascular sclerosis. *J Nephrol* 2001;14:332-9.
- 10) Hauser IA, Renders L, Radeke HH, Sterzel RB, Goppelt-Strube M. Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:58-63.
- 11) Wang W, Chan YH, Lee W, Chan L. Effect of rapamycin and FK506 on mesangial cell proliferation. *Transplant Proc* 2001; 33:1036-7.
- 12) Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:479-500.
- 13) Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, et al. Characterization of platelet-derived growth factor-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Eur J Clin Invest* 2001;31:672-80.
- 14) Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the Redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. *J Biol Chem* 1998;273:15022-9.
- 15) Tsiani E, Lekas P, Fantus IG, Dlugosz J, Whiteside C. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG II, and platelet-derived growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E161-9.
- 16) Haneda M, Arachi S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 1997;46: 847-53.
- 17) 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; 283:910-7.
- 18) Park J, Ha H, Kim MS, et al. Effect of mycophenolic acid on human vascular smooth muscle cell proliferation and its signal transduction. *J Korean Surg Soc* 2002;62:1-7.
- 19) Radeke HH, Christians U, Bleck JS, Sewing KF, Resch K. Additive and synergistic effects of cyclosporine metabolites on glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 1991;39:1255-66.

- 20) Hohnson RJ, Floege J, Yoshimura A, Iida H, Couser WG, Alpers CE. The activated mesangial cell: a glomerular 'myofibroblast'? *J Am Soc Nephrol* 1992;2:S190-7.
- 21) Floege J, Eng E, Young BA, Johnson RJ. Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney Int* 1993;39:S47-54.
- 22) Iida H, Seifert R, Alpers CE, 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;88:6560-4.
- 23) Floege J, Burns MW, Alpers CE, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 1992;41:297-309.
- 24) Johnson RJ, Iida H, Yoshimura A, Floege J, Bowen-Pope DF. Platelet-derived growth factor: A potentially important cytokine in glomerular disease. *Kidney Int* 1992;41:590-4.
- 25) Johnson RJ, Raines EW, Floege J, 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;175:1413-6.
- 26) Ludewig D, Kosmehl H, Sommer M, Bohmer FD, Stein G. PDGF receptor kinase blocker AG1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney after unilateral obstruction. *Cell Tissue Res* 2000;299:970-93.
- 27) Huwilwe A, Stabel S, Fabbro D, Pfeilschiffer J. Platelet-derived growth factor and angiotensin II stimulate the mitogen-activated protein kinase cascade in renal mesangial cell: comparison of hypertrophic and hyperplastic agonists. *Biochem J* 1995;305:777-84.
- 28) Tsiani E, Lekas P, Fantus IG, Dlugosz J, Whiteside C. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG II, and platelet-derived growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E161-9.
- 29) Gregory CR, Huang X, Pratt RE, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995;59:655-61.
- 30) Park J, Ha H, Kwon KH, et al. Effects of mycophenolic acid, rapamycin, and carvedilol on the PDGF-induced fibronectin secretion by rat vascular smooth muscle cells: Implication of MAP kinase. *J Korean Soc Transplant* 2002;16:1-8.
- 31) Kim YS, Kim MS, Ha H, Park J, Kim HJ, Park K. Effects of carvedilol alone and in the presence of cyclosporine A on the DNA synthesis of cultured vascular smooth muscle cells. *Surg Today* 2002;32:230-5.
- 32) Ojo AO, Meier-Kriesche H-U, Hanson JA, et al. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000;69:2405-9.
- 33) Allison AC, Eugui EM. Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 1993;25(Suppl 2):8-18.
- 34) Ziswiler R, Steinmann-Niggli K, Kappeler A, Daniel C, Marti H-P. Mycophenolic acid: A new approach to the therapy of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2055-66.
- 35) Briggs WA, Choi MJ, Scheel PJ. Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 1998;31:213-7.
- 36) Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Meier-Kriesche H-U, Van Buren CT. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:1040-6.
- 37) DiJoseph JF, Mihatsch MJ, Sehgal SN. Renal effects of rapamycin in the spontaneously hypertensive rat. *Transplant Int* 1994;7:83-8.
- 38) DiJoseph JF, Fluhler E, Armstrong J, Sharr M, Sehgal SN. Therapeutic blood levels of sirolimus (rapamycin) in the allografted rat. *Transplantation* 1996;62:1109-12.
- 39) Oh CD, Kim SJ, Ju JW, et al. Immunosuppressant rapamycin inhibits protein kinase C alpha and p38 mitogen-activated protein kinase leading to the inhibition of chondrogenesis. *Eur J Pharmacol* 2001;427:175-85.
- 40) Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, et al. Intracellular signalling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130-40.
- 41) Davies SP, Reddy Helen, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000;351:95-105.
- 42) Penuel E, Martin GS. Transforming by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. *Mol Bio Cell* 1999; 10:1693-703.
- 43) Chin BY, Mohsenin A, Li SX, Choi AM. Stimulation of pro-alpha(I) collagen by TGF-beta in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F495-504.
- 44) Dubus I, Vendrely B, Christophe I, et al. Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 2002;62:857-67.
- 45) Yasuda T, Kondo S, Homma T, Harris RC. Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1996;98:1991-2000.