

Mycophenolic Acid가 PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포에서 NAD(P)H Oxidase, 세포내 활성산소족 및 Mitogen-activated Protein Kinases에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 장기이식연구소*, 의과학교실†, 이화여자대학교 약학대학†

박제현*·† · 하헌주† · 김명수*·§ · 허규하*·† · 김유선*·†

〈요 약〉

배 경 : 혈관평활근 세포의 증식은 장기이식 후 발생하는 혈관경화증이나 동맥경화증의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다. Mycophenolic acid (MPA)는 강력한 면역억제제로서 혈관평활근 세포의 증식도 억제한다. 본 연구는 사람의 혈관평활근 세포에서 MPA가 세포증식에 관여하는 신호전달계인 활성산소족과 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 활성화를 억제하는 기존의 연구결과를 바탕으로, PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포에서 MPA가 세포의 증식을 억제하는 기전을 검색하였다.

방 법 : 일차 배양한 흰쥐 혈관평활근 세포를 PDGF-BB 10 ng/mL로 자극하였고, MPA를 비롯한 여러 종류의 신호전달 억제제는 PDGF를 투여하기 1시간 전에 투여하였다. 세포증식은 [H^3]-thymidine incorporation으로, NAD(P)H oxidase subunit의 mRNA 표현은 RT-PCR로, dichlorofluorescein에 민감한 세포내 활성산소족은 FACS 방법으로, 그리고 PDGF 수용체- β (Tyr 751), rac1 및 MAPK 활성화는 Western blot으로 각각 분석하였다.

결 과 : PDGF는 PDGF 수용체- β (Tyr 751)의 활성화 및 NAD(P)H oxidase subunit 중 rac1의 활성화와 p22phox와 MOX1의 mRNA 표현을 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰다. MPA는 PDGF 수용체의 활성화에는 영향을 주지 않았으나, rac1의 활성화, p22phox와 MOX1의 mRNA 표현의 상향 조절, 세포내 활성산소족, 그리고 ERK 1/2와 p38 MAPK의 활성화를 억제하였다. Wortmannin, diphenyleniodonium (DPI) 및 NAC와 trolox는 PDGF에 의한 ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화와 세포 증식을 억제하였다. PD98059와 p38 MAPK 억제제는 PDGF에 의한 혈관평활근 세포의 증식을 억제하였다.

결 론 : 본 연구결과는 MPA가 NAD(P)H oxidase를 억제함으로써 세포내 활성산소족 생산과, MAPK 활성화를 억제함으로써 PDGF에 의하여 유도되는 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 시사하였다.

서 론

신장이식 후 공여장기의 단기생존율은 면역억제제의 발달로 인하여 지속적으로 상승하고 있는 반면, 장기생존율은 다양한 면역학적 또는 비면역학적 요인으로 야기되는 만성 이식신 기능부전증 (chronic allo-

*현주소: 연세대학교 원주의과대학 의과학교실
본 연구는 2002년도 대한신장학회 중근당 연구비로 수행되었음.
접수: 2004년 3월 9일, 승인: 2004년 7월 7일
책임저자: 김유선 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 의과학교실
Tel: 02)361-5563, Fax: 02)313-8289
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

graft nephropathy, CAN)으로 인해 크게 향상되지 않고 있다¹⁾. CAN의 병태생리 중 혈관에서 발생하는 이식혈관 경화증은 각종 성장인자의 자극으로 유도되는 혈관평활근 세포의 유주, 증식, 그리고 세포외기질 단백질의 축적에 의하여 야기되고 결국에는 폐쇄성 혈관병변 및 이식 신의 허혈성손상을 유발한다²⁻⁴⁾. 현재까지 이러한 혈관병변을 효과적으로 억제하는 수단이 제한적으로 시도되고 있으나 효과적인 대처방안은 제시되지 않고 있다.

Mycophenolic acid (MPA)는 선택적이고, 비경쟁적인 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) 억제제로서 림프구의 증식을 억제⁵⁻⁷⁾할 뿐 아니라, 혈관평활근 세포⁸⁾ 및 사구체 혈관간세포⁹⁾ 등의 비림프구 세포에서도 증식 억제효과를 보이기 때문에 CAN에 대한 예방 및 치료제로서 주목받고 있다. 임상적으로, MPA는 단독 혹은 병합투여에서 이식신의 장기 생존율을 증가¹⁰⁾시킬 뿐 아니라 CAN의 발생빈도 감소¹¹⁾에 대한 가능성이 제시되고 있다. 림프구에서 MPA는 IMPDH를 통한 guanosine 생성경로를 차단함으로써 증식을 억제하지만, 비림프구에서는 IMPDH에 대한 의존도가 상대적으로 낮기 때문에¹²⁾, MPA가 혈관평활근 세포의 증식을 억제하는 것은 IMPDH 억제뿐만 아니라 다른 기전을 통하여 작용할 가능성이 있으나 구체적으로 밝혀진 바 없다. 본 연구진¹³⁾은 사람의 혈관평활근 세포에서 MPA가 세포증식에 관여하는 신호전달체인 세포내 활성산소종 (reactive oxygen species)과 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 활성화에 억제함으로써 세포 증식을 억제함을 이미 보고한 바 있다.

세포의 성장과 증식은 이를 촉진하거나 억제하는 유전자 발현을 통한 단백질의 합성에 의해 이루어지며 정상 생리 상태에서는 유기적으로 잘 조절되는 신호변환기전에 의해서 조절된다. 성장인자는 세포막에 있는 수용체에 결합하여 그 수용체를 활성화시킨 후 신호변환기전을 경유하여 핵 내 유전자 발현을 조절하는 신호를 전달한다. MPA가 basic fibroblast growth factor (bFGF)나 PDGF 등의 서로 다른 성장인자에 의한 혈관평활근 세포의 증식을 억제하는 것^{14, 15)}은 세포 증식에 관여하는 세포내 공통신호전달체를 억제함을 시사한다.

세포내 신호전달기전 가운데 과거에 세포손상이나 독성물질로 여겨져 오던 활성산소종이 최근 들어 세

포내 공통 신호전달계에 관여하는 것으로 인식되어 관심이 집중되고 있다¹⁶⁾. 세포내 활성산소종은 xanthine oxidase, NAD(P)H oxidase, 아라키돈산 대사 효소와 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생산되기도 하고, 세포내 신호변환계를 구성하는 phospholipase D와 protein kinase C 같은 효소에 의해서도 생산된다. 이 중 NAD(P)H oxidase는 혈관평활근 세포의 세포내 활성산소종의 90% 이상을 생산하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

NAD(P)H oxidase¹⁸⁾는 활성산소종 생성의 주된 경로로 대식세포에서 그 구조와 기능이 처음 밝혀졌다. NAD(P)H oxidase는 혈관평활근 세포에도 존재하며 대식세포와 같이 gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, 그리고 rac 단백질로 구성되어 있다^{19, 20)}. NAD(P)H oxidase의 subunit 가운데 gp91phox는 NAD(P)H가 NAD(P)⁺로 환원되는 과정을 조절하는 부위로 혈관평활근 세포에서도 존재하지만 이와 homology가 있는 MOX1의 존재도 밝혀져 있다. 특히, PDGF에 의한 혈관평활근 세포의 NAD(P)H oxidase의 활성화에서 p22phox와 MOX1의 mRNA의 표현 증가가 중요한 것^{21, 22)}으로 알려져 있다.

Phosphatidylinositol₃-kinase (PI₃-kinase, PI3K)는 세포막에 존재하면서 성장 및 유주 등을 조절하는 신호전달계로 알려져 있다²³⁾. 특히 PDGF가 그 수용체를 활성화하면 PDGF 수용체-β의 tyrosine 740번이나 751번 아미노산에 결합하고, 세포내 활성산소종 생산에 주된 역할을 함이 보고되어 있다^{24, 25)}.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) 경로는 세포질에 존재하는 단백질의 인산화 효소로서 extracellular-regulatory protein kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) 그리고 p38 MAPK의 세가지 형태가 있으며, 각 MAPK는 세포외부의 각종 자극 인자들에 의해 활성화되어 전사조절인자를 활성화한다^{26, 27)}.

본 연구는 사람 혈관평활근 세포에서 MPA가 세포내 활성산소종과 MAPK를 억제하는 기존의 결과를 바탕으로, 흰쥐 혈관평활근 세포를 이용하여 PDGF 투여 후 활성화되는 PDGF 수용체-β (Tyr 751)와 NAD(P)H oxidase의 subunits에 대한 MPA의 효과를 검색함으로써, MPA가 혈관평활근 세포의 증식억제에 관여하는 분자생물학적인 기전을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 시약 및 기구

실험에 사용한 시약 및 기구는 따로 제시되지 않은 각각 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)와 Nalge Nunc International (Naper Ville, IL, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

Kim 등²⁸⁾의 방법을 변형하여 혈관평활근 세포를 배양하였다. 간략하면, 몸무게 200-250 gm의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 단두하여 희생시킨 후 복부와 흉부에 정중 절개창을 만들고 대동맥을 적출하였다. 적출된 대동맥을 penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 mg/mL)이 함유된 4°C 인산완충액 (phosphate buffered saline, PBS)에 담아 대동맥으로부터 지방 조직과 혈액 등을 제거한 다음, 준비한 collagenase (activity 253 U/mg; Worthington Biochemical Co., Greerhold, NJ, USA)가 함유된 Eagle's minimum essential medium (EMEM) 배양액 7.5 mL와 같이 15 mL 시험관 (Corning, Corning, NY, USA)에 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 대동맥의 외막과 내막을 dissecting microscope (Olympus SZ 40, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)하에서 forceps를 이용하여 박리한 후 razor blade로 잘게 잘랐다. 이 절편들을 다시 collagenase가 함유된 EMEM 배양액 7.5 mL에 넣고 37°C에서 1-1.5시간 동안 반응시킨 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 남은 세포는 collagenase가 포함되어 있지 않은 EMEM에 재부유시켰다. 이러한 과정을 2회 반복한 다음, 원심 분리하여 상층액은 버리고, 남은 세포를 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum)이 함유된 EMEM과 함께 35 mm 배양 용기에 분주하여 37°C, 5% CO₂ humidified incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 anti- α_1 -actin antibody (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역 조직 화학 염색을 시행하여 혈관평활근 세포임을 확인하였다.

3. 약물 투여

세포들로 배양용기가 찼을 때 혈청배제 EMEM 배

양액으로 교환하여 48시간 배양하여 세포성장을 동일화하였다. 이후 새로운 혈청배제 배양액으로 교환하면서 PDGF-BB 10 ng/mL을 투여하여 배양하였다. MPA, wortmannin (PI3K 억제제), diphenyliodonium (DPI, NAD(P)H oxidase 억제제), trolox (vitamin E, 항산화제, Aldrich, Milwaukee, WI, USA), N-acetylcystein (NAC, 항산화제), PD98059 (MEK 억제제, Calbiochem, San Diego, CA, USA), 그리고 p38 MAPK 억제제 [2-(4-Chlorophenyl)-4-(4-fluorophenyl)-5-pyridin-4-yl-1,2-dihydropyrazol-3-one, Calbiochem]는 PDGF 투여 1시간 전에 투여하였다. 이 중 p38 MAPK 억제제는 최근에 개발된 약제로서 기존의 SB203580보다 약 8배 강력하게 p38 MAPK를 억제한다²⁹⁾. 각 억제제의 유효 농도는 예비 실험으로 결정하였다.

4. [³H]-thymidine incorporation을 이용한 세포 증식의 평가

약물투여가 종료되기 12시간 전에 [³H]-thymidine (Du Pont Co., Wilmington, DE, U.S.A.)을 각 well에 1 μ Ci/mL의 농도로 첨가하였다. 실험이 종료되면, 배지를 제거하고 냉장 보관한 PBS로 2회 세척하였다. Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 부유시킨 후 3 mL scintillation cocktail에 넣고 β -counter (TL 5000S, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)로 총 방사능을 측정하였다.

5. RT-PCR을 이용한 NAD(P)H oxidase subunits의 mRNA 표현 분석

총 RNA는 Tri-reagent kit (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 분리하였다. RNA의 농도는 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 측정하였고 RNA 순도는 260 nm와 280 nm에서 측정한 흡광도의 비율을 이용하여 평가하였다. 역전사 반응은 3 μ g RNA를 5 U reverse transcriptase (Superscript, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA), 2.5 mM dNTPs, 10 pM oligo (dT), 20 U RNasin, 10 mM DTT를 함유한 역전사 반응 완충액 (50 mM KCL, 10 mM MgCl₂)에서 수행하였다. 증폭을 위해서는 NAD(P)H oxidase subunit 각각에 대한 특이적인 primer를 사용하였다. p22phox는 sense primer 5'-TGCGGGACGCTTCACGCAGTGG-3'와 antisense primer 5'-GGTTGGTAGTGTG

GCTGCTTGATGG-3' (GenBank accession No. U18729), MOX1은 sense primer 5'-CACCTGCTCATTTTG CAACCACAC-3'와 antisense primer 5'-CAACTCCTTTTCATACTTATCCCACTC-3' (GenBank accession No. AF152963), 그리고 GAPDH는 5'-ACCACAGTCCATGTTATCAC-3'와 antisense primer 5'-TCCACCACCTTGTTGCTGTA-3'를 합성하여 (바이오니아, 대전, 한국) 사용하였다. PCR 반응은 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq polymerase (Invitrogen), 그리고 10 pmol sense와 antisense primer를 각각 첨가하여 95°C에서 10분간 초기 변성을 시킨 후 95°C에서 30초간, 58°C에서 30초간 그리고 72°C에서 10분간 30회 반복하여 PCR 반응을 수행하였다. RT-PCR 산물은 ethidium bromide를 사용하여 1% agarose gel에서 표현을 분석하였다.

6. FACS를 이용한 세포내 활성산소측 측정

약물투여가 종료되면, 세포를 PBS로 2회 세척한 후 산화에 민감한 형광소식자인 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Molecular probe, Eugene, Oregon, USA) 5 μ M을 첨가하여 20분 동안 세포 배양기에 방치하여 세포내로 염료를 유입시켰다. 유입되지 않은 염료를 세척하여 제거한 후 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry system, Mountain View, CA, USA)로 형광 (excitation; 485 nm, emission; 530 nm)을 측정하여 세포내 활성산소측 상태를 측정하였다.

7. Western blot을 이용한 PDGF 수용체- β (Tyr 751), *rac1* 및 MAPK 활성화 측정

실험이 완료된 후 세포 단백질을 추출하여 Western blot을 시행하였다. 요약하면, 세포를 냉장보관 PBS로 1회 세척한 후 lysis buffer (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)를 넣고 4°C에서 10분간 반응시켰다. 세포를 13,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 Bio-Rad pro-

tein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질을 정량하였다. 시료는 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 흡착지 (Bio-Rad)에 전이시켰다. 흡착지는 5% non fat dry milk blocking 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 인산화 또는 인산화 되지 않은 PDGF 수용체- β (Tyr 751), *rac1*, ERK 및 p38 MAPK 항체는 각각 1:1,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후 0.1% Tris-buffered saline (TBS)로 15분씩 4회 세척하였다. 인산화 되지 않은 PDGF 수용체- β (Santa Cruz, Santacruz, CA, USA)를 제외한 일차 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Peroxidase가 conjugation된 이차 항체 (Santa Cruz)는 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 이차 항체를 검출하였다.

8. 통계처리

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

결 과

1. MPA, wortmannin, 그리고 DPI가 PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포의 세포내 활성산소측에 미치는 영향

PDGF 10 ng/mL 투여 후 5분에 증가된 흰쥐 혈관평활근 세포의 세포내 활성산소측은 MPA 10 nM 이상에서 유의하게 억제되었다 (Fig. 1A). Wortmannin 1 μ M과 DPI 1 μ M 또한 PDGF에 의한 세포내 활성산소측을 억제하였다 (Fig. 1B).

Fig. 1. Effects of MPA on PDGF-induced DCF-sensitive cellular ROS. The experimental protocol is detailed in Materials and Methods. (A) Effects of MPA on PDGF-induced DCF-sensitive cellular ROS 5 minutes after PDGF, (B) Effects of wortmannin or DPI on PDGF-induced DCF-sensitive cellular ROS 5 minutes after PDGF. Data are presented as means \pm SE of five experiments. * $p < 0.05$ vs. control without PDGF. † $p < 0.05$ vs. control with PDGF.

2. MPA가 PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포의 PDGF 수용체- β (Tyr 751) 활성화에 미치는 영향

PDGF 10 ng/mL은 혈관평활근 세포의 PDGF 수용체- β (Tyr751) 활성화를 1분부터 증가시켰다 (Fig. 2A). MPA는 10 μ M까지 투여하더라도 PDGF 투여 후 1분 (Fig. 2B)과 5분 (Fig. 2C)에 활성화된 PDGF 수용체- β (Tyr751) 활성화에 영향을 미치지 않았다.

3. MPA가 PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포의 NAD(P)H oxidase subunits에 미치는 영향

PDGF 10 ng/mL은 혈관평활근 세포에서 rac1의

Fig. 2. Effects of MPA on PDGF-induced PDGF receptor- β (Tyr 751) activation. The experimental protocol is detailed in Materials and Methods. (A) Effects of PDGF on PDGF receptor- β (Tyr 751) activation, (B) Effects of MPA on PDGF-induced PDGF receptor- β (Tyr 751) activation 1 minute after PDGF, (C) Effects of MPA on PDGF-induced PDGF receptor- β (Tyr 751) activation 5 minutes after PDGF. Data are presented as a representative Western blot or mean \pm SE of five experiments.

활성화를 1분부터 증가시켰다 (Fig. 3A). MPA 100 nM 이상은 PDGF 투여 후 3분에 활성화된 rac1을 억제하였다 (Fig. 3B).

또한, PDGF 10 ng/mL은 p22phox와 MOX1의 mRNA 표현을 증가시켜 24시간에 최대치로 증가시켰다 (Fig. 4A). PDGF 투여 후 24시간에 증가된 p22phox의 mRNA 표현은 MPA 100 nM 이상에서, MOX1의 mRNA 표현은 MPA 1 μ M 이상에서 억제되었다 (Fig. 4B).

Fig. 3. Effects of MPA on PDGF-induced *rac1* activation. The experimental protocol is detailed in Materials and Methods. (A) Effects of PDGF on *rac1* activation, (B) Effects of MPA on PDGF-induced *rac1* activation 3 minutes after PDGF. Data are presented as a representative Western blot of five experiments.

Fig. 4. Effects of MPA on PDGF-induced *p22phox* and *MOX1* mRNA expression. The experimental protocol is detailed in Materials and Methods. (A) Effects of PDGF on *p22phox* and *MOX1* mRNA expression, (B) Effects of MPA on PDGF-induced *p22phox* mRNA expression and *MOX1* mRNA expression 24 hours after stimulated by PDGF. Data are presented as a representative RT-PCR of five experiments.

4. MPA, wortmannin, DPI, trolox, 그리고 NAC가 PDGF에 의해 증식유도된 흰쥐 혈관평활근 세포의 ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향

PDGF 10 ng/mL 투여 후 15분과 5분에 활성화된 흰쥐 혈관평활근 세포의 ERK 1/2와 p38 MAPK 활

Fig. 5. Effects of MPA on PDGF-induced ERK 1/2 and p38 MAPK activation. The experimental protocol is detailed in Materials and Methods. (A) Effects of MPA on PDGF-induced ERK 1/2 (15 minutes) and p38 MAPK (5 minutes) activation, (B) Effects of wortmannin, DPI, trolox, and NAC on PDGF-induced ERK 1/2 (15 minutes) and p38 MAPK (5 minutes) activation. Data are presented as a representative Western blot of five experiments.

성하는 MPA 1 μ M 이상에서 억제되었다 (Fig. 5A). PI3K 억제제인 wortmannin 1 μ M과 항산화제인 DPI 1 μ M, trolox 500 μ M, 그리고 NAC 5 mM 또한 PDGF에 의한 ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화를 억제하였다 (Fig. 5B).

5. PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포에서 PI3K, NAD(P)H oxidase, 활성산소족, ERK, 그리고 p38 MAPK 억제제 투여가 증식 억제에 미치는 영향

PI3K, NAD(P)H oxidase, 세포내 활성산소족, ERK 및 p38 MAPK에 대한 각각의 억제제인 wortmannin (wort), DPI, trolox, NAC, PD98059, 그리고 p38 MAPK 억제제 (p38 I)는 대조군에 영향을 주지 않는 농도에서 PDGF에 의한 혈관평활근 세포의 증식을 유의하게 억제하였다 (Fig. 6).

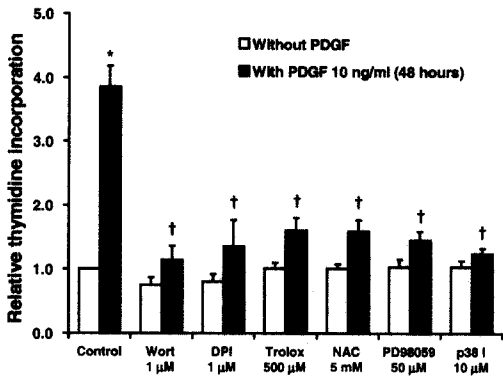


Fig. 6. Effects of inhibitors of PI3K, NAD(P)H oxidase, ROS, ERK, and p38 MAPK on PDGF-induced rat VSMC proliferation at 48 hours. The experimental protocol is detailed in Materials and Methods. Data are presented as means \pm SE of five experiments. * $p < 0.05$ vs. control without PDGF. † $p < 0.05$ vs. control with PDGF.

고 찰

본 연구결과는 PDGF에 의한 흰쥐 혈관평활근 세포의 증식에서 PI3K, NAD(P)H oxidase, 세포내 활성산소족, 그리고 ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화가 중요하게 작용함을 확인하였고, MPA가 PDGF에 의한 세포증식에서 PDGF 수용체를 통한 PI3K 활성화와는 무관하게 rac1 활성화 억제를 통한 NAD(P)H oxidase 의존적으로 세포내 활성산소족을 억제하며, 하위 신호전달체인 MAPK 활성화를 억제하여 PDGF에 의한 세포증식을 억제함을 시사하였다.

MPA가 세포 증식을 억제하는 경로는 림프구에서 IMPDH 억제를 통한 de novo purine DNA 합성 중 guanosine의 생성 경로를 차단하는 것으로 알려져 있다⁷⁾. Hauser 등³⁰⁾은 비림프구인 사구체혈관관 세포를 사용한 실험에서 MPA가 림프구에서처럼 guanosine 생성 억제를 통하여 세포 증식을 억제한다고 보고한 바 있고, Gu 등³¹⁾은 MPA에 의한 hematopoietic cell의 세포사멸 기전에서 guanine nucleotide 억제에 의한 ERK, Akt, 그리고 mammalian target of rapamycin (mTOR) 관련 세포내 신호전달계를 억제함을 보고하였다. 그러나 비림프구에서 IMPDH의 활성도는 제한적이다⁷⁾. 이와 더불어, MPA가 PDGF¹⁴⁾와 bFGF¹⁵⁾ 등의 다양한 cytokines나 성장인자에 의한 세포

증식을 억제함은 세포내 공통신호전달계에 대한 억제 가능성을 시사하는 것이다.

사람 혈관평활근 세포를 사용한 기존의 연구¹³⁾에서 MPA는 PDGF에 의한 세포증식에 관여하는 세포내 활성산소족과 MAPK에 대한 억제 효과를 보였으므로, 본 연구에서는 세포내 활성산소족에 대한 억제 기전을 밝힘으로써 보다 정확한 MPA의 작용기전을 이해할 수 있을 것으로 기대하였다. 흰쥐의 혈관평활근 세포를 사용한 본 연구에서도 기존의 결과와 같이 MPA 10 nM 이상은 유의하게 PDGF에 의하여 증가된 혈관평활근 세포의 세포내 활성산소족을 감소시켰다. 또한, wortmannin과 DPI는 PDGF에 의한 세포내 활성산소족에서 PI3K와 NAD(P)H oxidase가 중요함을 확인하였다.

PDGF에 의한 세포내 활성산소족 생산에는 PDGF 수용체- β 의 740, 751번 아미노산 부위인 tyrosine의 인산화에 따른 PI3K의 활성화가 중요하다³²⁾. PDGF 투여 후 1분과 5분에 증가한 PDGF 수용체- β (Tyr 751)의 활성화는 MPA를 10 μ M까지 투여하여도 변화가 없었다. 이 결과는 MPA가 PDGF 수용체 인산화를 통한 PDGF 수용체나 PI3K 활성화와는 다른 경로로 혈관평활근 세포의 세포내 활성산소족을 억제함을 시사한다.

NAD(P)H oxidase는 활성산소족을 생산하는 효소로 NAD(P)H oxidase의 구성성분인 rac1의 활성화는 PDGF에 의하여 증가되었고, MPA 100 nM 이상에서 억제되었다. 또한, NAD(P)H oxidase의 다른 subunit인 p22phox와 MOX1의 mRNA 표현에 대한 MPA의 효과는 각각 100 nM과 1 μ M 이상에서 관찰되었다. 이 결과는 PDGF가 유도하는 세포내 활성산소족에서 PI3K와 NAD(P)H oxidase가 중요하지만, MPA의 항산화 효과는 rac1의 활성화 억제에 따른 NAD(P)H oxidase 활성 억제에 기인한 것으로 추정할 수 있고, 장기적으로 NAD(P)H oxidase의 구성성분인 p22phox와 MOX1의 발현 억제를 통해 NAD(P)H oxidase를 억제할 수 있을 것으로 예상된다. 이를 통해 MPA가 PDGF에 의한 세포내 활성산소족을 억제하는 것이 NAD(P)H oxidase에 의존적인 세포내 활성산소족의 억제를 통해서 이루어짐을 시사하고 있다.

ERK 1/2와 p38 MAPK 활성화도 사람 혈관평활근 세포의 결과와 같이 MPA 1 μ M 이상에서 억제되었다. Wortmannin, DPI, trolox, 그리고 NAC가 모

두 PDGF에 의한 MAPK 활성화를 억제함으로써 PI3K, NAD(P)H oxidase 및 세포내 활성산소족이 MAPK 활성화에 중요함을 확인하였다. 사람 혈관평활근 세포의 결과와 더불어, 본 실험의 결과는 MPA가 PDGF에 의한 세포내 활성산소족과 MAPK의 활성화를 억제하는 것이 NAD(P)H oxidase에 의존적인 세포내 활성산소족의 억제를 통해서 이루어짐을 시사하였다.

MPA의 NAD(P)H oxidase, 세포내 활성산소족, 그리고 MAPK에 대한 억제효과는 다른 IMPDH 억제제인 tiazofurin과 ribavirin에서도 추정된다. Tiazofurin^{33, 34}은 small G 단백질의 활성화를 억제하고, ribavirin³⁵은 ras와 raf를 억제함으로써 세포주기를 억제한다. 한편, small G 단백질들은 NAD(P)H oxidase의 활성화, 활성산소족, 그리고 MAPK와 직접 혹은 간접적인 상호작용을 통하여 세포 대사를 조절하는 것으로 알려져 있다^{36, 37}.

결론적으로, 본 연구결과는 MPA가 NAD(P)H oxidase 억제에 기인한 MAPK 활성화 억제를 경유하여 PDGF에 의한 혈관평활근 세포의 증식을 억제함을 시사하고 있다.

= Abstract =

Mechanisms Involved in the Inhibitory Effects of Mycophenolic Acid on the PDGF-induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

Jehyun Park, B.S.^{*, †}, Hunjoo Ha, Ph.D.[†]
Myoung Soo Kim, M.D.^{*, §}
Kyu Ha Huh, M.D.^{*, †} and Yu Seun Kim, M.D.^{*, †}

The Research Institute for Transplantation* and Department of Surgery[†],
Yonsei University College of Medicine, Seoul,
College of Pharmacy[‡], Ewha Womans University,
Seoul, Korea

Background : Vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation plays an important role in the development and progression of chronic allograft vasculopathy as in atherosclerosis. We already reported that mycophenolic acid (MPA) inhibited VSMC proliferation, cellular reactive oxygen species (ROS) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) in human VSMCs. In this study, we examined further molecular mechanisms involved in the

anti-proliferative effect of MPA in rat VSMCs.

Methods : Primary rat VSMCs were stimulated with PDGF-BB 10 ng/mL in the presence or absence of MPA and various kinds of cell signaling inhibitors. Cell proliferation was assessed by [³H]-thymidine incorporation, NAD(P)H oxidase subunits mRNA expression by RT-PCR, dichlorofluorescein-sensitive cellular ROS by FACS, and the activation of PDGF receptor-β (Tyr 751), rac1, and MAPK by Western blot analysis.

Results : PDGF increased cell proliferation and cellular ROS, activation of PDGF receptor-β (Tyr 751), rac1, expression of p22phox and MOX1 mRNA, ERK 1/2, and p38 MAPK, compared to control. MPA inhibited up-regulation of rac1 phosphorylation, p22phox and MOX1 mRNA expression, cellular ROS, and phosphorylation of ERK 1/2 and p38 MAPK. However, MPA did not affect PDGF receptor-β (Tyr 751) activation. Wortmannin, diphenyliodonium (DPI), trolox, and NAC, each inhibited PDGF-induced ERK 1/2 and p38 MAPK activation. PD98059 and p38 MAPK inhibitor also inhibited PDGF-induced cell proliferation.

Conclusion : These results suggest that MPA inhibits PDGF-induced VSMC proliferation through inhibiting NAD(P)H oxidase-dependent cellular ROS leading to ERK 1/2 and p38 MAPK activation. (**Korean J Nephrol** 2004;23(4):567-576)

Key Words : Mycophenolic acid, Vascular smooth muscle cells, Platelet-derived growth factor (PDGF), Cell proliferation

참고 문헌

- 1) Colvin RB: Chronic allograft nephropathy. *N Eng J Med* 349:2288-2290, 2003
- 2) Häyry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtchvenkov M, Aavik E: Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 32: 519, 2000
- 3) Ritz E, Schwenger V, Wiesel M, Zeier M. Atherosclerotic complications after renal transplantation. *Transplant Int* 13:S14-S19, 2000
- 4) Massy ZA: Cardiovascular risk factors in kidney transplantation. *Curr Opin Urol* 11:139-142, 2001
- 5) Pohanka E: New immunosuppressive drugs: an update. *Curr Opin Urol* 11:143-151, 2001
- 6) Allison AC: Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 47:63-83, 2000

- 7) Allison AC, Eugui EM : Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47:85-118, 2000
- 8) 박제현, 김명수, 하헌주, 허규하, 강상욱, 김혜진, 서지연, 문장일, 김유선, 박기일 : Mycophenolic acid 와 rapamycin 투여가 흰쥐 혈관평활근 세포의 증식과 collagen 생성에 미치는 영향. *대한이식학회지* 17:1-6, 2003
- 9) 김명수, 박제현, 김진수, 하헌주, 김혜진, 허규하, 문장일, 서지연, 김유선, 박기일 : Mycophenolic acid 와 rapamycin의 병합투여가 흰쥐 사구체 혈관관세포의 증식에 미치는 영향. *대한외과학회지* 64:372-376, 2003
- 10) Keunecke C, Rothenpieler U, Zanker B, Schneeberger H, Illner WD, Theodorakis J, Stangl M, Land W : Mycophenolate mofetil monotherapy : An example of a safe nephrotoxicity/atherogenicity-free immunosuppressive maintenance regimen in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 32:6S-8S, 2001
- 11) Meier-Kriesche HU, Steffen BJ, Hochberg AM, Gordon RD, Liebman MN, Morris JA, Kaplan B : Long-term use of mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection. *Am J Transplant* 3:68-73, 2003
- 12) Allison AC, Eugui EM : Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 25:8-18, 1993
- 13) 박제현, 하헌주, 김명수, 서지연, 김혜진, 박기일, 김유선 : Mycophenolic acid 가 배양된 사람 혈관 평활근세포의 증식과 그에 관여하는 세포내 신호전달계에 미치는 영향. *대한외과학회지* 62:1-7, 2002
- 14) Mohacsí 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* 16:484-492, 1997
- 15) Dubus I, Vendrely B, Christophe I, Labouyrie JP, Delmas Y, Bonnet J, Combe C : Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 62:857-867, 2002
- 16) Rhee SG : Redox signaling : hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31:53-59, 1999
- 17) Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M : Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2175-2183, 2000
- 18) Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W : The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397:342-344, 2002
- 19) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M : NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501, 2000
- 20) Lassegue B, Clempus RE : Vascular NAD(P)H oxidases : specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol* 285:R277-R297, 2003
- 21) Gorchach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB : Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J* 14:1518-1528, 2000
- 22) Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD : Cell transformation by the superoxide-generating oxidase MOX1. *Nature* 401:79-82, 1999
- 23) Comer FI, Parent CA : PI3-kinase and PTEN : How opposite chemoattract. *Cell* 109:541-544, 2002
- 24) Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG : Platelet-derived growth factor-induced H2O2 production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:10527-10531, 2000
- 25) Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK : Angiotensin 2 stimulation of NAD(P)H oxidase activity : upstream mediators. *Circ Res* 91:406-413, 2002
- 26) Seger R, Krebs EG : The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735, 1995
- 27) Berk BC : Vascular smooth muscle growth : Autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81:999-1030, 2001
- 28) 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* 32:230-235, 2002
- 29) Laszlo SE, Visco D, Agarwal L, Chang L, Chin J, Croft G., Forsyth A, Fletcher D, Frantz B, Hacker C, Hanlon W, Harper C, Kostura M, Li B, Luell S, MacCoss M, Mantlo N, O'Neill EA, Orevillo C, Pang M, Parsons J, Rolando A, Sahly Y, Sidler K, Widmer WR, O'Keefe SJ : Pyrroles and other heterocycles as inhibitors of p38 kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 8:2689-2694, 1998
- 30) Hauser IA, Renders L, Radeke HH, Sterzel RB,

- Goppelt-Struebe M. Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* **14**: 58-63, 1999
- 31) Gu JJ, Gathy K, Santiago L, Chen E, Huang M, Graves LM, Mitchell BS: Induction of apoptosis in IL-3-dependent hematopoietic cell lines by guanine nucleotide depletion. *Blood* **101**:4958-4965, 2003
- 32) Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptor. *Biochim Biophys Acta* **1378**:F79-F113, 1998
- 33) Weber G, Prajda N, Abonyi M, Look KY, Tricot G: Tiazofurin: molecular and clinical action. *Anti-cancer Res* **16**:3313-3322, 1996
- 34) Kharbanda SM, Sherman ML, Kufe DW: Effects of tiazofurin on guanine nucleotide binding regulatory proteins in HL-60 cells. *Blood* **75**:583-588, 1990
- 35) Vallee S, Fouchier F, Braguer D, Marvaldi J, Champion S: Ribavirin-induced resistance to heat shock, inhibition of the Ras-Raf-1 pathway and arrest in G1. *Eur J Pharmacol* **404**:49-62, 2000
- 36) Bar-Sagi D, Hall A. Ras, Rho GTPases: A family of reunion. *Cell* **103**:227-238, 2000
- 37) Cuda G, Paterno R, Ceravolo R, Candigliota M, Perrotti N, Perticone F, Faniello MC, Schepis F, Ruocco A, Mele E, Cassano S, Bifulco M, Santillo M, Avvedimento EV: Protection of human endothelial cells from oxidative stress. *Circulation* **105**:968-997, 2002