

Carvedilol이 배양된 원쥐 혈관평활근 세포에서 PDGF에 의한 Collagen 합성과 그에 관여하는 세포 내 신호전달계에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 ¹장기이식연구소 및 ²BK21 의과학사업단, 연세대학교 ³원주의과대학 외과학교실
⁴순천향대학교 혈액신장연구소, ⁵이화여자대학교 의과대학 외과학교실

박제현^{1,2} · 허규하¹ · 하현주⁴ · 김명수^{1,3} · 김유선^{1,2} · 박기일¹ · 정구용⁵

Effects of Carvedilol on PDGF-induced Collagen Synthesis and Signal Transduction in Rat Vascular Smooth Muscle Cell

Jehyun Park, B.S.^{1,2}, Kyu Ha Huh, M.D.¹, Hunjoo Ha, Ph.D.⁴, Myoung Soo Kim, M.D.^{1,3}, Yu Seun Kim, M.D.^{1,2}, Kili Park, M.D.¹ and Ku-Yong Chung, M.D.⁵

¹The Research Institute for Transplantation and ²BK21 for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, ³Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea, ⁴Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University, Seoul, and ⁵Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Proliferation, migration, and the accumulation of extracellular matrix (ECM) protein of vascular smooth muscle cells (VSMC) play roles for transplant arteriosclerosis. We have previously reported that carvedilol (CA) inhibits the proliferation and the migration of VSMCs. The present study examined the effects of CA on platelet-derived growth factor (PDGF)-induced collagen synthesis in VSMC and the roles of reactive oxygen species (ROS), extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). **Methods:** Primary cultured rat VSMCs were obtained from aorta of Sprague-Dawley rats. Growth arrested and synchronized cells were pretreated with CA (10 nM ~ 10 μ M) at 1 hour before the addition of PDGF 10 ng/ml. Collagen synthesis was measured by ³[H]-proline incorporation, ROS by flow cytometry using ROS-sensitive dichlorofluorescein (DCF) dye, and the activation of ERK and

p38 MAPK by Western blot analysis. **Results:** PDGF significantly increased collagen synthesis by 2.0-fold, intracellular ROS by 1.6-fold, the activation of ERK 1/2 and p38 MAPK by 4.2-fold and 3.9-fold compared to control, respectively. CA above 1 μ M inhibited PDGF-induced collagen synthesis. CA also inhibited DCF-sensitive ROS and the activation of ERK and p38 MAPK. All pharmacological inhibitors of ROS, ERK, and p38 MAPK effectively inhibited PDGF-induced collagen synthesis. **Conclusion:** These data suggest that CA inhibit PDGF-induced collagen synthesis possibly through inhibiting intracellular ROS and ERK 1/2 and p38 MAPK activation. (J Korean Soc Transplant 2003;17:121-125)

Key Words: Carvedilol, Collagen, Vascular smooth muscle cell, Reactive oxygen species, Mitogen-activated protein kinase

중심 단어: 콜라겐, 혈관평활근 세포, 활성산소족, 미토겐-활성화된 단백질 카제

서 론

신장이식 후 장기 생존자에게 발생하는 만성거부반응은 장기 이식신 생존율 향상에 주된 장애요인으로, 이식 후 1년 이식신 생존율은 꾸준히 개선되고 있음에도 불구하고, 매년 3~5%의 이식신 소실이 발생한다. 이식신의 장기 생존을 위하여서는 이러한 만성이식신 기능부전의 예방과 해결이 가장 시급한 현안으로 제시되고 있지만, 현재까지 효과적인 방법이 제시되지 않고 있다. 만성거부반응 또는 만성 이식신 기능부전의 다양한 형태증의 하나인 혈관경화증은 면역학적 또는 비면역학적 원인에 의해서 발생하여 결국에는 혈관평활근 세포의 이동 및 증식, 세포외기질의 과다생산으로 인한 섬유화와 장기의 허혈성 기능 손실을 유발하기 때문에 혈관평활근 세포의 병태생리를 억제하는 약제의 개발을 통해 이식 장기의 만성거부반응을 억제하고자 하는 시도들이 많이 진행되고 있다.(1-3)

Carvedilol은 아드레날린성 β 억제제로 개발되어 아드레

책임저자 : 정구용, 서울특별시 종로구 종로6가 70번지
이화여자대학교 부속 동대문병원 외과, 110-126
Tel: 02-760-5064, Fax: 02-743-7297
E-mail: kuyong@ewha.ac.kr

본 논문의 내용은 World Congress of Nephrology 2003 (독일 베를린)와 제 13차 International Symposium on Atherosclerosis (일본 경도)에서 발표되었음.

날린성 α 억제제 및 항산화제 등 다양한 기능을 가진 제제(4)로서, 신장이식 환자에서 항고혈압제제의 복용이 필요한 상황을 고려해 보면 carvedilol의 투여는 혈압 강하효과 이외에도 혈관 병변의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.(5)

Collagen은 fibronectin과 함께 대표적인 세포외기질 단백으로서 세포의 부착, 이동 및 증식에 관여하며, 각종 integrin 수용체와의 결합을 통해 세포 내 신호 전달계를 조절하는 것으로 알려져 있다. 여기에는 다양한 subtype이 존재하며, 각자가 다양한 기전을 통해 발현 조절이 이루어진다.(6) 본 연구에서는 전체 collagen을 대상으로 한 일차적인 실험을 시행하여 carvedilol이 세포외기질 단백생산과 분비에 미치는 효과를 확인하고자 하였다.

연구자들은 이미 carvedilol이 흰쥐 혈관평활근 세포의 증식(7)과 이동(8)을 효과적으로 억제할 뿐 아니라 세포외기질 단백의 일종인 fibronectin에 대한 억제효과(9)가 있음을 보고하였고, 관련된 세포 내 신호 전달계로서 사람 혈관평활근 세포를 사용하여 platelet-derived growth factor (PDGF)에 의한 증식에서 carvedilol이 세포 내 활성산소족, ERK 및 p38 MAPK가 관여함을 보고한 바 있다.(10)

본 연구에서는 carvedilol이 PDGF에 의해 유도된 흰쥐 혈관 평활근세포의 collagen 합성에 미치는 영향과 세포 내 활성산소족과 MAPK의 활성화에 미치는 영향 및 관련성을 연구하였다.

방법

1) 시약 및 기구

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

2) 세포 배양

몸무게 200~250 gm의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 단두하여 희생시킨 후 복부와 흉부에 정중 절개창을 만들고 척추로부터 대동맥을 박리하였다. 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., Greenhold, NJ, U.S.A.)가 함유된 Eagle's minimum essential medium (EMEM) 배양액 7.5 mL와 같이 15 mL 시험관(Corning, Corning, NY, U.S.A.)에 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 대동맥의 외막과 내막을 dissecting microscope (Olympus SZ 40, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)하에서 forceps을 이용하여 박리한 후 razor blade로 잘게 잘랐다. 이 절편들을 다시 collagenase가 함유된 EMEM 배양액 7.5 mL

에 넣고 37°C에서 1~1.5시간 동안 반응시킨 다음 1000 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 -actin antibody (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역 조직 화학 염색을 시행하여 혈관평활근세포임을 확인하였다.

3) 약물 투여

세포들로 배양용기가 찼을 때 혈청배제 EMEM 배양액으로 교환하여 48시간 배양하여 세포 성장을 동일화하였다. 그 후 새로운 혈청배제 배양액으로 교환하면서 기초 실험에서 얻어진 농도인 10 ng/mL의 PDGF-BB를 투여하여 5분부터 48시간까지 배양하였다. Carvedilol (10 nM~10 μ M)은 PDGF-BB를 처리하기 한시간 전에 처리하였다.

4) [³H]-proline incorporation을 이용한 collagen 합성 능 평가

24 well 세포 배양용기에 각 well 당 1×10^5 개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. 실험이 종료되기 12시간 전에 [³H]proline (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. Methanol을 사용하여 고정시키고 PBS로 1회 세척하였다. 10% Trichloroacetic acid (TCA)로 10분간 실온에서 방치한 후 0.2N NaOH와 0.5% SDS가 함유된 용액에 30분간 반응시킨 후 1N HCl로 반응을 종료시켜 3ml scintillation cocktail에 넣고 beta-counter (TL 5000S, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, U.S.A.)로 총 방사능을 측정하였다.

5) Flow cytometry를 이용한 세포 내 활성산소족 측정

6 well 세포 배양용기에 각 well 당 1×10^5 개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. 실험이 완료되면, 세포를 인산완충액으로 2회 세척한 후 산화에 민감한 형광소식자인 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Molecular probe, Eugene, Oregon, U.S.A.) 5 μ M을 첨가하여 10분 동안 세포 배양기에 방치하여 세포 내로 염료를 유입시켰다. 유입되지 않은 염료를 세척하여 제거한 후 flow cytometry (Becton Dickinson Immunocytometry system, Mountain View, CA, U.S.A.)로 형광을 측정하여 세포 내 생성된 활성산소족을 측정하였다.

6) Western blot을 이용한 MAPK 활성화 측정

60 mm 배양용기에 5×10^5 개의 세포가 되도록 분주하여

4회 실험하였다. 실험이 완료된 후 세포 단백질을 추출하여 immunoblot을 시행하였다. 요약하면, 세포를 냉장시킨 인산 완충액으로 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 Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate)를 넣고 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 세포를 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 Bio-Rad protein assay kit을 사용하여 단백질을 정량하였다. ERK1/2를 위하여 20 μ g, p38 MAPK를 위하여 50 μ g의 단백질을 함유한 시료를 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. 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개 분리한 후 nitrocellulose 흡착지에 전이시켰다. 단백에 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 인산화된 ERK와 p38 MAPK 항체 및 인산화되지 않은 ERK와 p38 MAPK 항체로 각각 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. ERK와 p38 MAPK에 관련된 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA01915, U.S.A.)에서 구입하였다. Peroxidase가 conjugation 된 이차 항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG; Santa Cruz, CA, U.S.A.)로 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 이차 항체를 검출하였다. 각각의 밀도를 Tina 2.1 프로그램을 사용하여 측정한 후 인산화된 MAPK를 정량하여 대조 군을 1.0으로 하여 비교하였다.

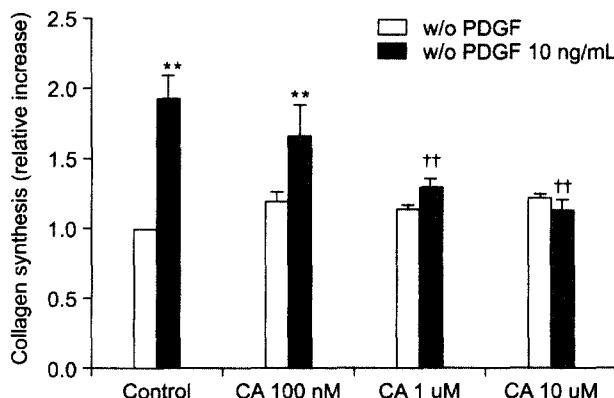


Fig. 1. Effects of carvedilol on PDGF-induced collagen synthesis in rat VSMCs. Data are presented as the mean \pm SE of five experiments. *P < 0.05 vs. control without PDGF. †P < 0.05 vs. control with PDGF.

7) 통계처리

모든 실험결과의 측정치는 “평균(mean) \pm 표준 오차 (standard error)”로 나타내었으며 각 군 간의 통계학적인 비교는 분산분석(ANOVA)과 Fisher's least significance difference (LSD)를 시행하여 P 값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

7. 통계학적 결과

1) Carvedilol은 PDGF에 의한 원쥐 혈관평활근 세포의 collagen 합성을 억제하였다(Fig 1).

PDGF 10 ng/mL은 원쥐 혈관 평활근 세포의 collagen 합성을 유도하여 48시간에 대조 군에 비하여 1.9배 증가하였다 (P < 0.05). Carvedilol은 기저치에 대한 영향없이 PDGF에 의한 collagen 합성을 억제하여 1 μ M 이상의 농도에서 통계적으로 유의한 증식 억제를 하였다(P < 0.05).

2) Carvedilol은 PDGF에 의한 원쥐 혈관평활근 세포의 세포 내 활성산소족 증가를 억제하였다.

PDGF 10 ng/mL은 원쥐 혈관평활근 세포의 세포내 활성산소족을 5분에 대조 군과 비교하여 1.6배 증가시켰다(P < 0.05). Carvedilol은 농도의존적으로 PDGF에 의한 활성산소족 증가를 억제하여 100 nM 이상에서 통계적으로 유의하게 생성을 억제하였다(P < 0.05) (Fig 2).

3) Carvedilol은 PDGF에 의한 원쥐 혈관평활근 세포의 ERK 인산화를 감소시켰다.

PDGF 10 ng/mL은 원쥐 혈관평활근 세포의 ERK 인산화

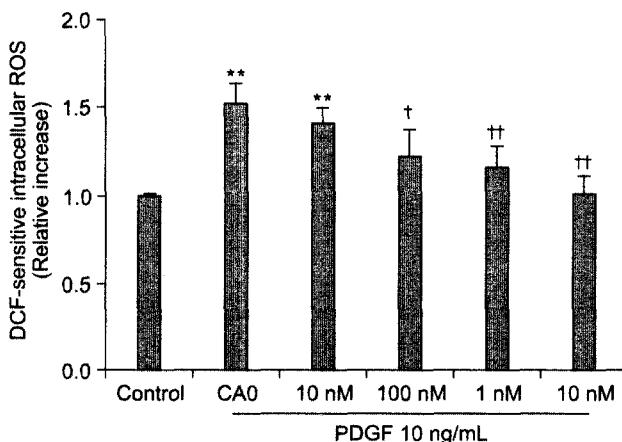


Fig. 2. Effects of carvedilol on PDGF-induced intracellular ROS in rat VSMCs. Data are presented as the mean \pm SE of five experiments. *P < 0.05 vs. control. †P < 0.05 vs. CA0 group.

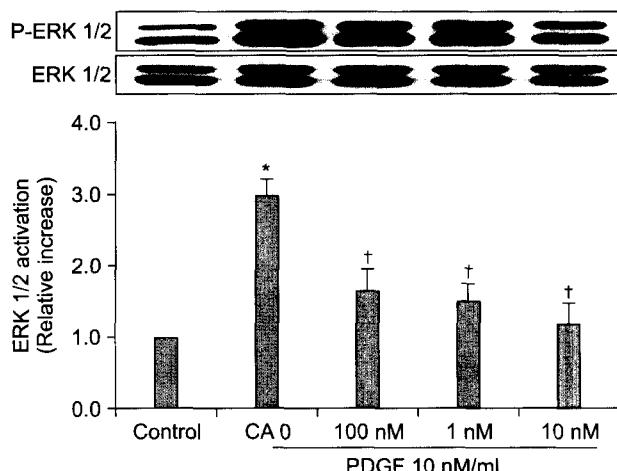


Fig. 3. Effects of carvedilol on PDGF-induced ERK 1/2 and p38 MAPK activation in rat VSMCs. Data are presented as the mean \pm SE of five experiments. *P<0.05 vs. control. †P<0.05 vs. CA0 group.

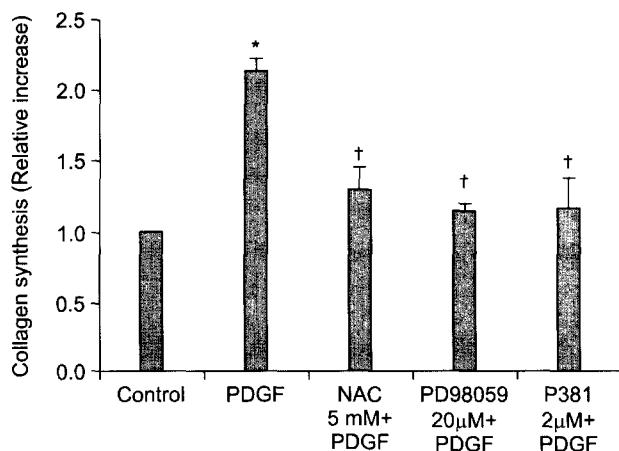
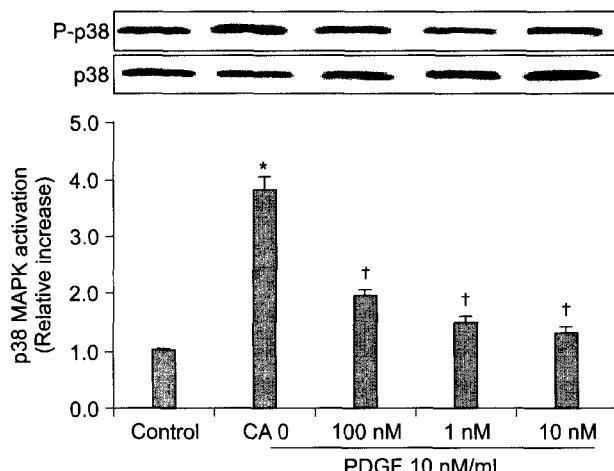


Fig. 4. Intracellular ROS and MAPK were required for PDGF-induced collagen synthesis in rat VSMCs. Data are presented as the mean \pm SE of five experiments. *P<0.05 vs. control. †P<0.05 vs. PDGF alone.

를 5분부터 활성화되어 15분에 대조군과 비교하여 3.0배로 증가하여 최대치를 보였다(P<0.05). Carvedilol은 PDGF에 의한 ERK 인산화를 억제하여 100 nM 이상에서 농도의존적으로 ERK 인산화를 감소시켰다(P<0.05) (Fig 3A).

4) Carvedilol은 PDGF에 의한 흰쥐 혈관평활근 세포의 p38 MAPK 인산화를 감소시켰다.

PDGF 10 ng/ml은 흰쥐 혈관평활근 세포의 p38 MAPK 인산화를 5분에 대조군과 비교하여 3.8배 증가시켜 최대치를 보았다(P<0.05). Carvedilol은 PDGF에 의한 p38 MAPK 인산화를 억제하여 100 nM 이상에서 5분에 증가하였던 p38 MAPK의 인산화를 통계적으로 유의하게 감소시켰다(P<0.05) (Fig 3B).

5) 세포 내 활성산소족, ERK 및 p38 MAPK는 PDGF에 의한 collagen 합성의 신호전달계이다.

세포 내 활성산소족, ERK 및 p38 MAPK나 PDGF에 의한 collagen 합성에 관여하는지 알아보기 위하여 약리학적 억제제인 NAC (N-acetylcysteine), PD98059 및 p38 MAPK 억제제를 사용하였다. 약제는 PDGF에 의한 collagen 합성을 유의하게 억제하였다(P<0.05) (Fig 4).

고찰

배양된 흰쥐 혈관평활근 세포를 이용한 본 연구 결과 PDGF에 의한 collagen 합성을 억제하는 농도의 carvedilol은 세포 내 활성산소족 증가 및 ERK와 p38 MAPK 활성화를 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

세포외기질 단백의 축적은 이식 후 발생하는 혈관경화증에서 주요 병태생리일 뿐만 아니라 말기신부전증을 비롯한 신장기능의 저하에도 관여하기 때문에 신장이식에서 이를 억제함으로써 만성이식신 기능부전증의 예방과 치료를 위한 시도들이 진행되고 있다. 현재까지 세포외기질 단백의 축적에 transforming growth factor-β와 angiotensin을 비롯한 각종 싸이토카인과 성장인자가 관여함이 알려져 왔지만, 이들을 억제함으로써 질환의 발생을 억제하는 데는 한계가 있다.(11-13)

Carvedilol은 아드레날린성 β 억제제로 개발되어 아드레날린성 α 억제효과 및 항산화효과를 통해 심혈관계 질환의 치료제로 널리 사용되고 있으며, 혈관평활근 세포의 증식과 유주를 억제에도 효과가 있다. 이에 더불어 세포외기질 단백의 주요 형태인 collagen 합성을 억제한다는 본 실험의 결과는 다른 형태의 세포외기질 단백인 fibronectin에 대한

억제효과와 더불어 혈관 평활근 세포의 활성화에 대한 carvedilol의 효능을 입증한 것이며, 이식환자가 고혈압약제를 복용하여야 한다는 현실을 고려한다면 적은 양의 약제를 통해 다양한 효과를 기대해 볼 수 있다.

세포 내 활성산소족과 MAPK 신호전달계에 대한 carvedilol의 억제효과는 본 연구진(9,10)에 의해 사람 혈관평활근 세포에서 보고되었고, 다른 연구진 다른 연구진(14,15)에 의해 보고된 바 있으나, 금번 연구를 통하여 collagen 합성에서도 두 신호 전달계가 관여할 뿐 아니라 흰쥐 혈관평활근 세포에서도 carvedilol의 효과가 세포 내 활성산소족과 MAPK 신호전달계를 통한 것임을 밝혔다.

Carvedilol의 항산화 효과는 화학적인 약물의 구조상 항산화 부위를 통한 직접적 또는 활성산소족의 생성효소 억제를 통한 간접적 항산화능이 있음이 보고되었다.(16) 최근에 carvedilol의 아드레날린성 α 억제제 작용부위인 heterotrimeric G 단백 중 $\alpha_{11,2}$ 가 PDGF 신호 전달계에서 PDGF 수용체와 결합하여 활성산소족의 주된 생성효소인 NAD(P)H oxidase를 활성화함이 보고(17)되어 carvedilol의 혈관 평활근 세포에 대한 작용기전에 대한 추가적인 연구를 통해 새로운 약제의 개발을 위한 기초자료가 확립될 것이다.

결 론

본 연구는 항 고혈압제제인 carvedilol이 세포 내 활성산소족의 증가 및 주요 신호 전달계인 ERK와 p38 MAPK의 인산화를 억제함으로써, PDGF-BB에 의하여 증식이 유도된 흰쥐 혈관 평활근 세포에서 주요 세포외기질인 collagen 합성을 억제할 수 있음을 규명하였다.

REFERENCES

- Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- 박장상. 혈관내막 증식의 억제. *대한혈관외과학회지* 1999;15: 365-74.
- Hayry 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.
- Feuerstein GZ, Ruffolo RR. Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. *Eur Heart J* 1995; 16:38-42.
- Fellstrom BC, Larsson E. Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection (CVR). *Immunol Rev* 1993; 134:83-98.
- Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 1999;34:513-525.
- 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.
- Kim MS, Ha H, Kim YS, Park J, Kim H, Seo J, Lee JH, Park K. Effects of carvedilol alone or in the presence of cyclosporine on the migration of vascular smooth muscle cell of rat. *Transplant Proc* 2003;35:189-90.
- 박재현, 하현주, 권기환, 김명수, 윤찬석, 서지연, 김유선, 김혜진, 박기일. Mycophenolic acid, rapamycin, carvedilol이 혈관 평활근 세포에서 fibronectin 생성에 미치는 영향과 MAP kinase의 역할. *대한이식학회지* 2002;16:1-8.
- 박재현, 하현주, 오재원, 김명수, 서지연, 김혜진, 박기일, 김유선. carvedilol이 배양된 사람 혈관 평활근 세포의 증식과 그에 관여하는 세포내 신호 전달계에 미치는 영향. *대한혈관외과학회지* 2002;18:15-22.
- Ritz E, Schwenger V, Wiesel M, Zeier M. Atherosclerotic complications after renal transplantation. *Transplant Int* 2000; 13:S14-S19.
- Massy ZA. Cardiovascular risk factors in kidney transplantation. *Curr Opin Urol* 2001;11:139-42.
- Häyry P. Chronic allograft vasculopathy: new strategies for drug development. *Transplant Proc* 1998;30:3989.
- Feuerstein GZ, Ruffolo RR Jr. Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. *Eur Heart J* 1995;15:38-42.
- 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.
- Oettl K, Greilberger J, Zanger K, Haslinger E, Reibnegger G, Jurgens G. Radical-scavenging and iron-chelating properties of carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidative activity. *Biochem Pharmacol* 2001;62:241-48.
- Kreuzer J, Viedt C, Brandes RP, Seeger F, Rosenkranz AS, Sauer H, Babich A, Nurnberg B, Kather H, Krieger-Brauer H. Platelet-derived growth factor activates production of reactive oxygen species by NAD(P)H oxidase in smooth muscle cell through Gi1, 2. *FASEB J* 2003;17:38-40.