J Korean Soc Transplant
2003:17:1-6

□ 원 저 □

Mycophenolic Acid와 Rapamycin 투여가 흰쥐 혈관평활근세포의 증식과 Collagen 생성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 [1]장기이식연구소 및 [2]외과학교실, [3]연세대학교 원주의과대학 외과학교실, [4]순천향대학교 현암신장연구소

박제현[1,2] · 김명수[1,3] · 하헌주[4] · 허규하[1,2] · 강상욱[2] · 김혜진[2] · 서지연[1] · 문장일[1] · 김유선[1,2] · 박기일[1,2]

Effect of Mycophenolic Acid and Rapamycin on the Proliferation and Collagen Synthesis of the Vascular Smooth Muscle Cell of Rat

Jehyun Park, B.S.[1,2], **Myoung Soo Kim,** M.D.[1,3], **Hunjoo Ha,** Ph.D.[4], **Kyu Ha Huh,** M.D.[1,2], **Sang Wook Kang,** M.D.[2], **Hae Jin Kim,** B.S.[2], **Jiyeon Seo,** B.S.[1], **Jang Il Moon,** M.D.[1], **Yu Seun Kim,** M.D., Ph.D.[1,2] and **Kill Park,** M.D., Ph.D.[1,2]

[1]The Research Institute for Transplantation and [2]Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, [3]Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, and [4]Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea

Purpose: Vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and extracellular matrix protein accumulation play important roles in chronic allograft vasculopathy. Mycophenolic acid (MPA) or rapamycin (RPM) was reported to inhibit VSMC proliferation in vitro and in vivo. However, effects of MPA or RPM on collagen synthesis of VSMCs, and the combined effects of MPA and RPM treatment on VSMC proliferation are not yet reported. **Methods:** VSMCs isolated from the aorta of Sprague-Dawley rats were cultured with EMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and insulin/ transferrin. Growth arrested and synchronized cells were pretreated with test drugs (alone or combination of various concentrations of MPA and RPM) 1 hour before the addition of 10 ng/ml PDGF. Cell proliferation was assessed by [H^3]-thymidine incorporation, and collagen synthesis by [H^3]-proline incorporation. **Results:** PDGF increased cell proliferation and collagen synthesis by 3.4- and 2.1-fold, respectively, compared to control. MPA at above 100 nM or RPM at above 1 nM effectively inhibited PDGF-induced cell proliferation and collagen synthesis. The IC_{50} of MPA or RPM against PDGF-stimulated cell proliferation was between 100 nM and 1 μM or between 1 nM and 10 nM, respectively. The combination of MPA and RPM showed additive effects on PDGF-induced VSMC proliferation in a multiple regression analysis (R^2=0.508, $P<0.05$). **Conclusion:** The present study demonstrated that MPA or RPM significantly inhibited PDGF-induced VSMC proliferation. These independent phenomena were well maintained as suggested by additive effects after combination treatment. PDGF-induced collagen synthesis was also effectively suppressed by the treatment of MPA or RPM. **(J Korean Soc Transplant 2003; 17:1-6)**

Key Words: Mycophenolic acid, Rapamycin, Vascular smooth muscle cell, Proliferation, Collagen
중심 단어: 마이코페놀산, 라파마이신, 혈관평활근세포, 증식, 콜라겐

서 론

신장이식 후 발생하는 이식혈관경화증이나 혈관 내 stent 삽입 후 발생하는 재협착 및 동맥경화증의 공통된 병태생리는 각종 성장인자의 자극으로 유도되는 혈관평활근세포의 증식과 유주 및 세포외기질 단백의 축적으로, 결국 이로 인하여 폐쇄성 혈관병변 및 허혈성손상이 발생한다.(*1-4*) 그러나 현재까지 혈관병변을 효과적으로 제어하는 수단은 제한적으로 약제투여를 통하여 일부 예방과 치료가 시도되고 있으나 아직 많은 어려움이 있다.

Mycophenolic acid (MPA)는 purine DNA의 생성경로인 de novo 과정을 억제하여 세포 증식을 억제하는 강력한 면역억제제로서 주요 표적세포인 림프구뿐만 아니라 혈관평활근세포 및 사구체 혈관간세포의 증식 억제효과도 지니기

책임저자 : 김유선, 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752
Tel: 02-361-5563, Fax: 02-313-8289
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 연세대학교 의과대학 일반 교수연구비 (1999-11)의 지원과 장기이식연구소 연구보조금의 일부지원으로 이루어졌음.

때문에 이식 후 발생하는 이식혈관경화증에 대한 치료제로서 주목받고 있다.(5-7)

Rapamycin (RPM)은 tacrolimus (FK506)와 유사한 구조를 가진 제제로서 세포 내 수용체인 FK506 binding protein (FKBP12)과 결합하여 표적 단백인 mammalian target of rapamycin (mTOR)을 억제하여 세포주기를 조절함으로써 세포증식을 억제한다. 최근 들어 이 제제는 면역억제제 이외에도 혈관 내 거치용 stent에 코팅되어 혈관 재협착의 예방과 치료에 사용될 뿐만 아니라 사구체 혈관간세포 증식억제제 및 항암제로서의 가능성도 제시되고 있다.(8-12)

서로 다른 기전으로 작용하는 MPA와 RPM이 혈관평활근세포의 증식을 억제하는 것은 이 두 약물이 기존의 약리작용 이외에도 세포의 증식에 관여하는 세포내 공통신호전달계에 대해 작용할 수 있음을 시사한다. 그러나, 두 약제는 혈관평활근세포에서 세포 내 신호전달자인 활성산소족, extracellular signal-regulatory protein kianse 그리고 p38 mitogen-acitvated protein kinase 경로 활성화에 대한 영향이 서로 다를 뿐만 아니라 세포외기질 단백의 일종인 fibronectin의 생성도 서로 다른 효과를 보여주고 있다.(13,14)

Collagen은 각종 혈관경화증에서 축적되는 세포외기질 단백의 주요 구성성분으로 세포의 이동과 증식에도 관여한다.(15) Dubus 등(16)과 Badid 등(17)은 5/6 신절제 흰쥐 및 사구체 혈관간세포를 이용한 in vivo와 in vitro 실험에서 MPA가 collagen 합성을 억제함을 보고하였고, Svelgliati-Baroni 등(18)은 RPM이 간세포(hepatocyte)에서 collagen mRNA 표현을 감소시킴을 보고하였다. 그러나, 아직까지 두 약물이 혈관평활근세포의 collagen 합성에 미치는 효과는 보고된 바 없다.

따라서, 본 연구는 1) MPA와 RPM제제의 병합투여가 혈관평활근세포의 증식에 미치는 영향 및 2) 각 제제의 단독투여가 세포외기질 단백인 collagen에 미치는 효과를 관찰하고자 하였다.

방 법

1) 시약 및 기구

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

2) 세포 배양

Kim 등(19)의 방법을 변형하여 혈관평활근세포를 배양하였다. 간략하면, 몸무게 200~250 gm의 Sprague-Dawley계 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., Greehold, 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 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% CO_2 humidified incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 anti-α1-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 세포성장을 동일화하였다. 이후 새로운 혈청배제 배양액으로 교환하면서 PDGF-BB 10 ng/ml을 투여하여 배양하였다. MPA와 RPM은 PDGF 투여 1시간 전에 투여하였다. 약제농도에 따른 MPA 와 RPM의 단독 및 병합투여 증식실험군은 아래와 같다.

(1) PDGF (10 ng/ml) 투여군(증식대조군)
(2) MPA 단독투여 실험군: MPA (100 nM), MPA (1 μM), MPA (10 μM)
(3) RPM 단독투여 실험군: RPM (0.1 nM), RPM (1 nM), RPM (10 nM), RPM (100 nM)
(4) MPA와 RPM 병합투여 실험군
MPA (100 nM)+RPM (1, 10 또는 100 nM)
MPA (1 μM)+RPM (1, 10 또는 100 nM)
MPA (10 μM)+RPM (1, 10 또는 100 nM)

4) [^{3}H]-thymidine incorporation을 이용한 세포 증식의 평가

96 well 세포 배양용기에 각 well당 2×10^4개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. 실험이 종료되기 12시간 전에 [^{3}H]-thymidine (Du Pont Co., Wilmington, DE, U.S.A.)을 각 well에 1 μCi/mL의 농도로 첨가하였다. 실험이 종료되면, 배지를 제거하고 냉장 보관한 PBS로 2회 세척하였다. Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 부유시킨 후 3 mL scintillation cocktail에 넣고 beta-counter (TL 5000S, Beckman Instruments

Inc., Fullerton, CA, U.S.A.)로 총 방사능을 측정하였다.

5) [^{3}H]-proline incorporation을 이용한 collagen합성능 평가

24 well 세포 배양용기에 각 well당 1×10^5개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. 실험이 종료되기 12시간 전에 [^{3}H]proline (Du Pont)을 각 well에 1 μCi/mL의 농도로 첨가하였다. 실험이 종료되면, 배지를 제거하고 냉장 보관한 PBS로 2회 세척하였다. Methanol을 사용하여 고정시키고 PBS로 1회 세척하였다. 10% Trichloroacetiac 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 beta-counter (Beckman Instruments)로 총 방사능을 측정하였다.

6) 통계처리

모든 실험결과의 측정치는 '평균(mean)±표준오차(standard error)'로 나타내었으며 각 군 간의 통계학적인 비교는 분산분석(ANOVA)과 t-test를 시행하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) PDGF에 의한 혈관평활근세포의 증식(Fig. 1)

PDGF 10 ng/ml은 흰쥐 혈관평활근세포의 증식을 유발하였다. PDGF 투여 후 48시간에 [^{3}H]-thymidine incorporation은 1367.3±327.2 cpm으로 대조군의 397±51.7 cpm에 비해 3.4배($P<0.05$) 증가하였다.

2) MPA와 RPM의 단독투여에 따른 평활근세포의 증식억제(Fig. 2)

본 실험에서 사용한 농도인 MPA 100 nM~1 uM이나 RPM 0.1 nM~100 nM은 대조군의 [^{3}H]-thymidine incorporation에 변화를 주지 않아 두 제제 모두 본 실험에서 사용한 농도에서 세포 독성이 없음을 시사하였다(Fig. 2).

MPA와 RPM은 농도의존적으로 PDGF에 의한 세포증식을 억제하였다. MPA의 세포증식 억제에 대한 IC_{50}은 100 nM과 1 μM 사이였고,(Fig. 2A) RPM의 IC_{50}은 1 nM과 10 nM 사이였다($P<0.05$) (Fig. 2B).

3) MPA와 RPM의 병합투여에 따른 평활근세포의 증식억제(Fig. 3)

MPA와 RPM의 세포증식에 대한 병합투여 효과를 검색하기 위하여 100 nM~10 μM MPA와 1 nM~100 nM RPM을

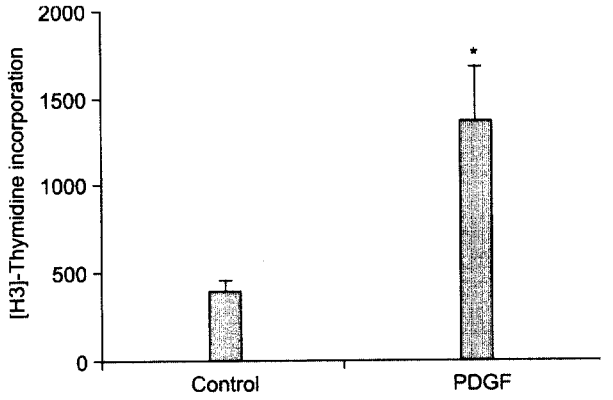

Fig. 1. PDGF increased rat VSMC proliferation. Data are presented as the mean±SE of five experiments. *$P<0.05$ *vs.* control.

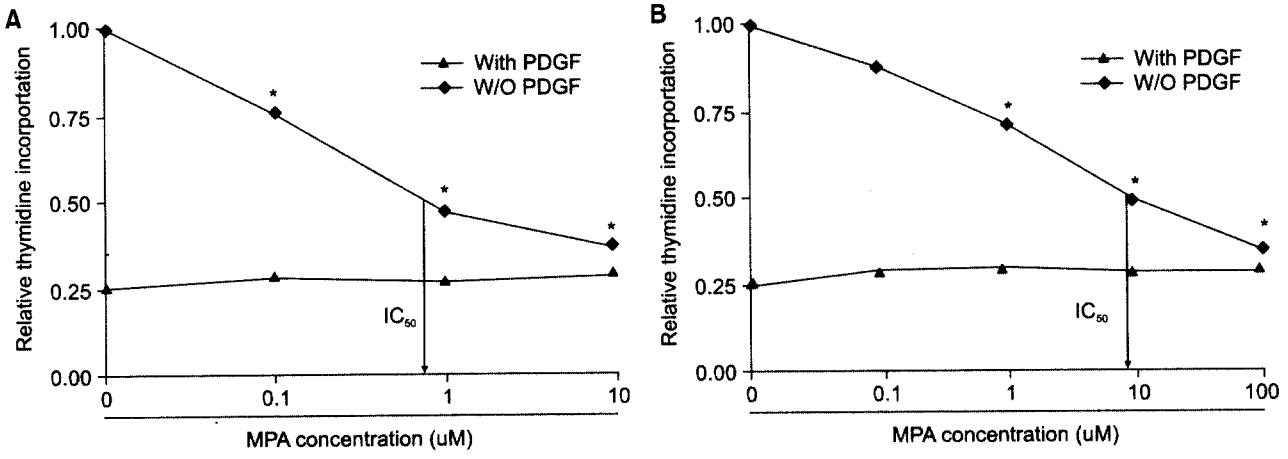

Fig. 2. MPA and RPM inhibited PDGF-induced rat VSMC proliferation. (A) Effects of MPA on PDGF-inudced rat VSMC proliferation. (B) Effects of RPM on PDGF-induced rat VSMC proliferation. Data are presented as the mean±SE of five experiments. *$P<0.05$ *vs.* MPA- or RPM-free group.

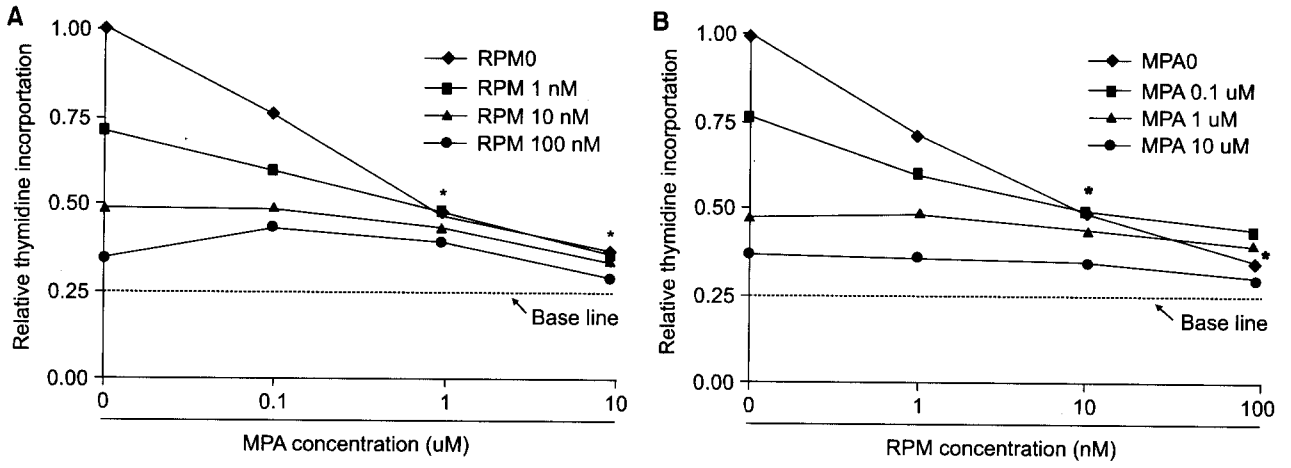

Fig. 3. Combination of MPA and RPM showed additive effects on rat VSMC proliferation. Effects of MPA (A) and RPM (B) on PDGF-induced rat VSMC proliferation. Data are presented as the mean±SE of five experiments. *P<0.05 *vs.* MPA- or RPM-free group.

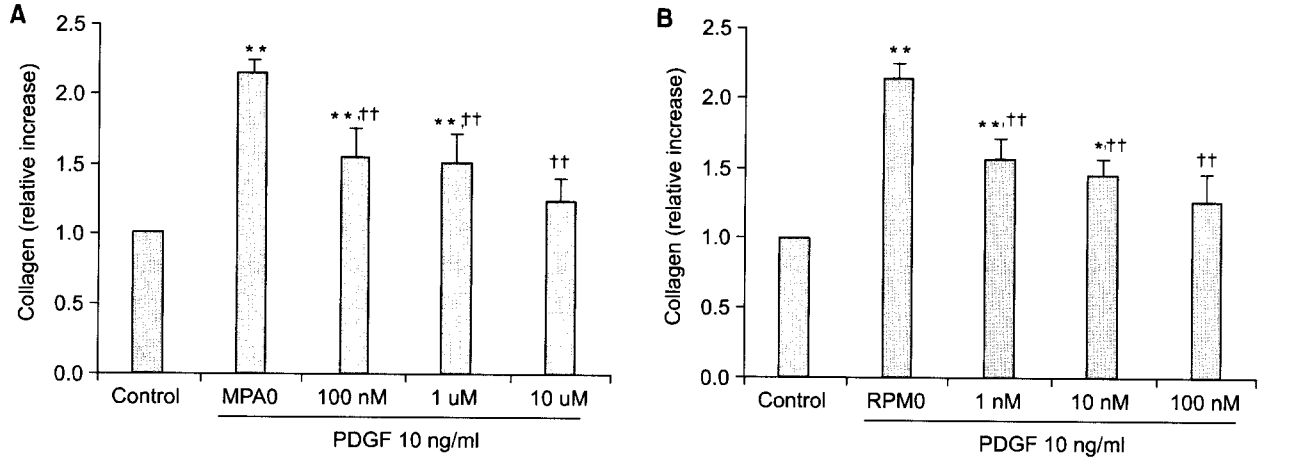

Fig. 4. Effects of MPA and RPM on PDGF-induced collagen synthesis in rat VSMC. (A) Effects of MPA on PDGF-induced collagen synthesis. (B) Effects of RPM on PDGF-induced collagen synthesis. Data are presented as the mean±SE of five experiments. *P<0.05 or **P<0.01 *vs.* control, ††P<0.01 *vs.* MPA- or RPM-free group.

사용하였다. RPM 0.1 nM은 예비실험에서 PDGF에 의한 증식유발에 대하여 통계적으로 유의한 억제효과를 보이지 않았기 때문에 제외하였다. RPM을 각각 1, 10 그리고 100 nM로 고정한 상태에서 MPA의 농도에 따른 증식억제를 살펴보면, MPA의 단독투여와 마찬가지로 PDGF에 의한 증식군에 비하여 모든 군에서 유의하게 증식이 감소하였다. 또한, MPA를 각각 100 nM, 1 μM 그리고 10 μM로 고정한 상태에서도 RPM 농도에 따른 증식억제는 PDGF에 의한 증식군에 비하여 모든 군에서 유의한 감소를 보였다.

다중회귀분석을 하였을 때, MPA와 RPM의 병합투여에 의한 혈관평활근세포의 증식억제에는 각 약물이 독립적으로 작용함을 알 수 있었다(P<0.05, R^2=0.508).

증식정도(cpm)=1,163.572 − 136.73×MPA농도(μM)
− 1,080.167×RPM농도(nM)

4) MPA와 RPM에 의한 collagen합성억제(Fig. 4)

PDGF 10 ng/mL은 48시간 노출 시 혈관평활근세포에서의 collagen 합성을 대조군에 비하여 2.1배 증가시켰다. 세포증식억제와 같은 농도인 100 nM 이상의 MPA와 1 nM 이상의 RPM은 각각 농도의존적으로 PDGF에 의해 유도된 collagen 합성을 억제하였다(P<0.05).

고 찰

본 연구 결과 PDGF는 혈관평활근세포의 증식과 collagen

합성을 유의하게 증가시켰고, MPA와 RPM 단독투여는 각각 PDGF에 의한 세포증식 및 collagen 합성을 유의하게 억제하였으며 약제를 병합투여 하였을 때 세포증식이 독립적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다.

임상적으로 사용가능(*20*)하고 세포독성이 없는 100 nM~10 μM의 MPA와 1 nM 이상의 RPM은 각각 PDGF에 의한 세포증식을 용량의존적이고 통계적으로 유의하게 억제하였다. 세포증식 억제에 대한 MPA와 RPM의 IC_{50}은 각각 100 nM~1 μM과 1~10 nM 사이였으며 이는 Mohacsi 등(*21*)과 본 연구진(*22*)의 기존 결과와 일치한다.

MPA와 RPM의 병합투여가 각각 독립적으로 증식억제 효과를 나타내었고, 다중회귀분석 결과 두 가지 약물은 각각 독립적으로 증식을 억제하였다. 이는 MPA와 RPM이 서로 다른 기전을 경유하여 혈관평활근세포의 증식을 억제함을 시사한다. 최근에 Jolicoeur 등(*23*)은 흰쥐 만성거부반응 모델을 사용한 실험에서 MPA와 RPM의 병합투여가 이식상태의 지표인 Banff sum score를 통계적으로 유의하게 억제함을 보고하였고, 본 연구진(*24*)은 MPA와 RPM의 병합투여가 흰쥐 사구체 혈관간세포의 증식을 일정하고 독립적으로 억제함을 보고하였다.

한편 세포외기질 단백의 한 종류인 collagen에 대한 두 약물의 효과는 MPA가 100 nM 이상에서, RPM이 1 nM 이상에서 그 생성을 농도의존적으로 억제하였다. MPA는 사구체 혈관간세포의 collagen 합성을 억제하고,(*16*) RPM은 간세포에서의 collagen mRNA 합성을 억제한다고 보고된 바 있다.(*18*) Collagen 합성에 대한 MPA의 억제효과는 본 연구진의 기존 연구 결과(*13,14*)인 세포 내 활성산소족과 ERK 및 p38 MAPK에 대한 억제효과와 관련이 있을 것으로 생각되고, 실제로 항산화제인 N-acetylcystein, ERK 억제제인 PD98059 및 p38 MAPK 억제제를 사용하였을 때 PDGF에 의한 collagen 합성 증가가 감소함을 확인하였다(data not shown). RPM이 세포외기질 단백의 다른 종류인 fibronectin과는 달리 collagen에 대한 억제효과를 보이는 것은 이들 두 가지 세포외기질 단백의 합성이 다른 기전을 통해 이루어짐을 의미하며, 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로, MPA와 RPM은 각각 혈관평활근세포에 대한 증식억제 효과를 가지고 있으며, 병합투여는 독립적인 증식억제 효과를 보였다. 나아가 각 제제에 의한 collagen 생성 억제효과는 이들 약제가 이식 후 혈관병변의 발생을 예방하고 치료하는 약제로서 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 높였다.

REFERENCES

1) Häyry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtcvhenkov M, Aavik E. Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection. Transplant Proc 2000;32:519.
2) Ritz E, Schwenger V, Wiesel M, Zeier M. Atherosclerotic complications after renal transplantation. Transplant Int 2000; 13:S14-9.
3) Massy ZA. Cardiovascular risk factors in kidney transplantation. Curr Opin Urol 2001;11:139-42.
4) Häyry P. Chronic allograft vasculopathy: new strategies for drug development. Transplant Proc 1998;30:3989.
5) Pohanka E. New immunosuppressive drugs: an update. Curr Opin Urol 2001;11:143-51.
6) Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 2000;47:63-83.
7) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology 2000;47:85-118.
8) Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. Cell 2000;103:253-62.
9) Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: A review of the evidence. Kidney Int 2001; 59:3-16.
10) Marx SO, Marks AR. Bench to bedside; The development of rapamycin and its application to stent restenosis. Circulation 2001;104:852-5.
11) Schwarz C, Oberbauer R. The future role of target of rapamycin inhibitors in renal transplantation. Curr Opin Urol 2002; 12:109-13.
12) Huang S, Houghton PJ. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. Curr Opin Investig Drugs 2002;3:295-304.
13) 박제현, 하헌주, 김명수, 서지연, 김혜진, 박기일 등. Mycophenolic acid가 배양된 사람 혈관 평활근세포의 증식과 그에 관여하는 세포 내 신호전달계에 미치는 영향. 대한외과학회지 2002;62:1-7.
14) 박제현, 하헌주, 권기환, 김명수, 윤찬석, 서지연 등. Mycophenolic acid, rapamycin, carvedilol이 혈관 평활근 세포에서 fibronectin 생성에 미치는 영향과 MAP kinase의 역할. 대한이식학회지 2002;16:1-8.
15) Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. Exp Gerontol 1999;34:513-25.
16) Dubus I, Vendrely B, Christophe I, Labouyrie JP, Delmas Y, Bonnet J. Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. Kidney Int 2002;62:857-867.
17) Badid C, Vincent M, Mcgregor B, Melin M, Hadj-Aissa A, Veysseyre C. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. Kidney Int 2000;58:51-61.
18) Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Sario AD, Saccomando S, Bendia E, Benedetti A. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expressionin human hepatic stellate cells. Hepatology 2001;33: 1130-40.
19) 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.

20) Allison AC, Eugui EM. Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. Transplant Proc 1993;25:8-18.

21) Mohacsi 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.

22) Moon JI, Kim YS, Kim MS, Kim EH, Kim HJ, Kim SI, et al. Effect of cyclosporine, mycophenolic acid, and rapamycin on the proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells: in vitro study. Transplant Proc 2000;32:2026-7.

23) Jolicoeur EM, Qi S, Xu D, Dumont L, Daloze P, Chen H. Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat. Transplantation 2003;75:54-9.

24) 김명수, 박제현, 김진수, 하헌주, 김혜진, 허규하 등. Mycophenolic acid와 Rapamycin의 병합투여가 사구체 혈관간세포의 증식에 미치는 영향. 대한외과학회지 2003;64:372-6.