

## Carvedilol 단독 또는 Cyclosporine과의 병합투여가 배양된 백서 동맥 혈관 평활근세포의 이동에 미치는 영향

<sup>1</sup>연세대학교 대학원 의학과, <sup>2</sup>연세대학교 원주의과대학 외과학교실 및 <sup>3</sup>연세대학교 의과대학 외과학교실

김명수<sup>1,2</sup> · 하현주<sup>1,\*</sup> · 김유선<sup>1,3</sup> · 김혜진<sup>3</sup> · 박제현<sup>1</sup> · 조장환<sup>3</sup> · 박기일<sup>1,3</sup>

### Effect of Carvedilol Alone or with Cyclosporine on the Migration of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cell

Myoung Soo Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Hunjoo Ha, Ph.D.<sup>1,\*</sup>, Yu Seun Kim, M.D.<sup>1,3</sup>, Haejin Kim, B.S.<sup>3</sup>, Jehyun Park, B.S.<sup>1</sup>, Chang Hwan Cho, M.D.<sup>3</sup> and Kiil Park, M.D.<sup>1,3</sup>

**Purpose:** Excessive proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs), which are triggered by endothelium-derived cytokines or growth factors, play a major role in the chronic transplant vasculopathy or vascular remodeling process after vascular injury. We have reported that carvedilol, a new anti-hypertensive agent, inhibits cytokine-triggered proliferation of cultured rat VSMCs. In this study, we investigate the effect of carvedilol on the migration of rat VSMCs.

**Methods:** Growth-arrested cultured VSMCs (passage 8~11) from the aorta of rat (Sprague-Dawley) were used. Migration was measured using a microchemotaxis chamber with a polycarbonate membrane. Platelet derived growth factor (PDGF) or angiotensin-II (ANG-II) was used as a stimulator and was added into the lower well of the chamber. A density of  $1 \times 10^4$  cells per well with carvedilol and/or cyclosporine A (CsA) was seeded into the upper well of chamber. Degree of migration was assessed by using the number of migrated cells per high power field of light microscopy.

**Results:** PDGF and ANG-II stimulated VSMC chemotaxis effectively. Carvedilol decreased PDGF-induced migration to 88.9 ( $\pm 16.0$ )% and 37.4 ( $\pm 10.5$ )% at 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, respectively. Carvedilol inhibited both PDGF and ANG-II

induced chemotaxis in a concentration-dependent manner. The IC<sub>50</sub> of carvedilol in PDGF and ANG-II-induced VSMC migration was around 10  $\mu$ M. CsA (100 nM) neither significantly inhibited the migration of VSMC, regardless of the kinds of cytokines, nor affected the inhibitory activities of carvedilol. The pattern of inhibition in the group with a combined addition of carvedilol and CsA was very similar to that of carvedilol alone group, regardless of the kinds of cytokines. **Conclusion:** We demonstrated that carvedilol alone or in the presence of CsA significantly inhibited the cytokine-induced migration of VSMC. These data indicate that carvedilol has a unique potential to reduce the development of chronic transplant vasculopathy when used with CsA in hypertensive renal transplant recipients. (J Korean Surg Soc 2001; 60:8-15)

**Key Words:** Carvedilol, Vascular smooth muscle cell, Migration, Cyclosporine

**중심 단어:** Carvedilol, 혈관 평활근세포 이동, Cyclosporine

<sup>1</sup>Graduate School of Medicine and <sup>3</sup>Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine and <sup>2</sup>Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Korea

### 서 론

만성 이식장기 혈관병증(chronic transplant vasculopathy)이나 동맥 풍선확장술 후의 동맥재협착의 형성과정에서 혈관 평활근세포의 증식(proliferation)과 이동(migration)은 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉 물리적인 손상은 물론 면역학적인 자극 혹은 비면역학적인 원인들에 의하여 혈관 내피세포(endothelial cell)에서 여러 종류의 cytokine이 과다 분비되어 그 결과 혈관중막(media)내에 위치한 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cell)의 증식과 내피세포층으로의 이동현상이 항진되며 동시에 세포 외 기질(extracellular matrix)이 침착하여 내막증식증(intimal hyperplasia), 혈관경화증(transplant vascular sclerosis)과

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

접수일 : 2000년 11월 21일, 게재승인일 : 2000년 12월 2일

\*현주소: 순천향대학교 현암신장연구소

본 논문은 2000년 4월 22일 제31차 대한혈관외과학회 춘계학술대회에서 구연되었음.

본 연구는 1999년도 연세대학교 의과대학 위탁연구비(주식회사 종근당)와 연세대학교 BK 21 의과학사업단의 지원으로 이루어졌음.

섬유화(fibrosis)를 초래하여 혈관내강의 폐색(proliferative obstructive angiopathy)을 초래하는 것으로 알려져 있다. (1,2) 이러한 과정은 혈관 내피세포, 혈관 평활근세포, 대식세포(macrophage) 그리고 림프구 등의 세포가 여러 단계에서 interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), platelet derived growth factor (PDGF), basic-fibroblast growth factor (b-FGF), endothelin 등의 다양한 cytokine을 분비하므로써 그 작용이 촉진되는 것으로 알려져 있다.(1) 따라서 이러한 혈관 경화증을 방지하기 위하여서는 각 단계에서 분비되는 cytokine의 분비를 억제하여야 하나 이에 대한 효과적인 억제방법은 아직 확인된 바가 없는 반면 혈관 평활근의 증식이나 이동을 억제하는 방법에 대한 연구는 최근 들어 활발히 진행되고 있다.

현재까지 이식 후 주변억제제로 사용하고 있는 cyclosporine A (CsA)에 의한 혈관 평활근세포의 증식억제효과는 미미한 것으로 보고된 반면(3,4) mycophenolic acid (3,5)나 rapamycin(3,5-7) 등의 새로운 면역억제제를 비롯하여 HMG-CoA reductase inhibitor,(8) angiotensin converting enzyme inhibitor인 enalapril,(9) 혈관 확장제인 doxazocin (10) 그리고 새로운  $\beta$ -blocker인 carvedilol(11-13) 등의 약제가 세포실험과 동물실험에서 혈관 평활근세포의 증식을 억제할 수 있음이 알려졌으며 저자들도 carvedilol의 혈관 평활근 증식억제효과를 세포실험을 통하여 이미 보고한 바가 있다.(14) 그러나 혈관경화증의 억제를 위하여서는 혈관 평활근세포의 증식뿐만 아니라 이동과정에 대한 충분한 억제작용이 입증되어야 하는데, 평활근세포에 대한 증식억제작용이 입증된 기존의 약제중 평활근세포의 이동억제효과가 입증된 약제는 rapamycin(15)이나 doxazocin(10)에 불과하다. 저자들은 기왕의 연구(14)에서 carvedilol의 단독 혹은 CsA와 병합투여가 평활근세포의 증식억제효과를 보고하였던 바, 본 연구에서는 carvedilol의 단독 혹은 CsA와의 병합투여가 평활근세포 이동에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 백서 대동맥 혈관 평활근세포의 분리 및 배양

기존의 세포분리방법(4,8)을 기본으로 약간 변형하여 혈관 평활근세포를 배양하였다. 200~250 gm의 웅성 Sprague-Dawley계 백서를 단두하여 희생시킨 다음, 복부와 흉부에 정중절개창을 만들고 척추로부터 대동맥을 박리 하였다. 적출된 대동맥을 penicillin (100 U/ml)과 streptomycin (100  $\mu$ g/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, USA)가 함유된 Eagle's minimum essential medium (EMEM; Sigma Chemical Co., St.

Fig. 1. Identification of cultured rat aortic smooth muscle cell by anti- $\alpha$ -actin antibody immunohistochemistry stain ( $\times 40$ ).

Louis, MO, USA)배양액 7.5 ml와 같이 15 ml 시험관 (Corning, Corning, NY, USA)에 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 대동맥의 외막(adventitia) 및 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 1~1.5시간 동안 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<sub>2</sub> humidified incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 anti- $\alpha$ -actin antibody (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역 조직 화학염색을 시행하여 혈관 평활근세포임을 확인하였으며(Fig. 1), Passage 8부터 passage 11 사이의 세포를 실험에 사용하였다.

### 2) 세포 이동의 평가

세포의 이동능력은 pore size가 8  $\mu$ m인 polycarbonate membrane (Osmonics Inc., Minnetonka, MN, USA)과 48 well의 microchemotaxis chamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 이용한 modified Boyden's method로 측정하였다.(16) 배양기에서 충분히 자란 세포를 trypsin/EDTA (0.25%/0.05%)로 처리하여 hemocytometry (Cambri-dge Instrument Inc., NY, USA)을 이용하여 평활근세포를  $2.5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 설정하였다. Membrane의 하부에는 유발인자를 실험농도대로 28  $\mu$ l씩 분주하였으며, membrane의 상부에  $1 \times 10^4$ 개의 평활근세포를 계획된 실험약제와 함께 투여하였다. 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에서 wet box에 넣어 37°C 배양기에서 16시간 동안 chamber내에서의

평활근세포의 이동을 유도한 후 membrane의 상부에 부착되어 있는 이동하지 않은 평활근세포를 제거하고 membrane의 하부에 있는 이동된 평활근세포를 methanol에 2분 동안 고정한 후 Diff-Quik 염색하였다. 이동능력은 고배율( $\times 400$ 배)의 광학현미경구역당 이동된 평활근세포의 개수 (cell numbers per high power field)로 표시하였는데 well당 4군데의 고배율구역(high power field; HPF)을 조사하여 평균치를 각 실험의 대표값으로 하였다. 상기실험의 유발인자로 PDGF (1 ng/ml; Sigma Chemical Co.)(4)와 angiotensin-II (AGN-II) (100 nM; Sigma Chemical Co.)(17)를 사용하여 같은 방법으로 시행하였다.

### 3) 약제투여와 실험군의 설정

CsA는 50 mg/ml의 정주용 약제(0.042 M)를 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 녹인 후, EMEM으로 희석하여 사용하였다. Carvedilol은 DMSO에 녹여 1 mM로 만든 다음 후 20  $\mu$ L씩 분주하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. Carvedilol의 농도는 1  $\mu\text{M}$ 과 10  $\mu\text{M}$ 으로 고정하였고, CsA의 농도는 임상적으로 사용 가능한 농도인 100 nM로 고정하였다.(18) CsA와 carvedilol 등의 약제는 세포를 membrane의 상층부에 분주함과 동시에 투여하였다. 대조군은 유발인자나 약제를 투여하지 않은 군으로 설정하였으며, 실험군의 설정은 유발인자와 더불어 투여되는 CsA 및 carvedilol의 병합여부와 농도에 따라서 ① 유발인자 단독투여군, ② CsA 투여군, ③ carvedilol 1  $\mu\text{M}$  투여군, ④ carvedilol 10  $\mu\text{M}$  투여군, ⑤ CsA와 carvedilol 1  $\mu\text{M}$  병합투여군, ⑥ CsA와 carvedilol 10  $\mu\text{M}$  병합투여군으로 설정하였다.

상기실험은 quadruplicate 방법으로 각각 3회 이상 시행하였다.

### 4) 세포용해분석(cytolysis assay)-lactate dehydrogenase (LDH) 유리정도

손상을 입은 세포로부터 배양액내로 유리되는 LDH를 측정함으로써 세포용해정도를 정량적으로 측정하였다. 세포용해정도는 유발인자 및 약제 처치 후 24시간이 경과된 시점에서 세포외 배양액으로 유리되는 LDH양과 Triton X-100으로 처리하여 혈관 평활근세포를 모두 파괴시켰을 때 배양액내의 총 LDH 양과의 비율(%)로 표시하였다. 배양액내의 LDH는 pyruvic acid (Sigma Chemical Co.),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form ( $\beta$ -NADH; Sigma Chemical Co.) 등과 반응시켜 multiplate reader (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 340 nm에서 측정하였다.

### 5) 통계방법

1회의 측정치는 quadruplicate로 측정된 고배율구역당 이

동 세포수(cells/HPF)의 평균값으로 대표하였으며, 각 실험 측정치는 3회 이상의 측정치에 대한 평균 $\pm$ 표준편차(Standard deviation)로 표시하였다. 아울러 이동정도의 비교를 위하여 측정치 이외의 유발인자 단독투여군에 대한 상대 이동률(percentage migration; cells per HPF in stimulator plus drug-treated sample/cells per HPF in only stimulator-treated sample  $\times 100$ )로 상대적 이동정도를 표시하였다. 두 군간의 통계학적인 비교는 비모수적 통계방법인 Mann-Whitney U-test를 이용하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1) 유발인자에 의한 혈관 평활근세포의 이동효과

PDGF 1 ng/ml 사용군의 평균 고배율구역당 이동세포수는  $35.8 \pm 9.1$ 개로 대조군의  $4.8 \pm 3.2$ 개보다 통계학적으로 유의한 이동유발효과를 보였다. 마찬가지로 유발인자로

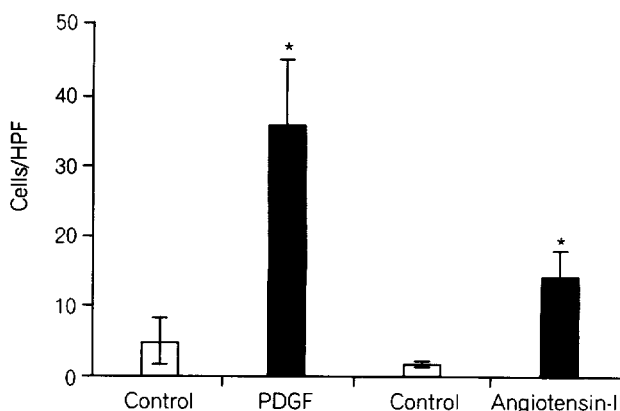


Fig. 2. Effects of PDGF (1 ng/ml) and angiotensin-II (100 nM) on vascular smooth muscle cell migration. \*Means  $p < 0.05$  vs. control

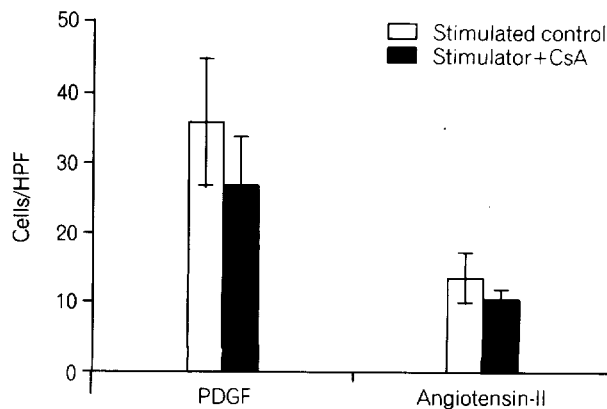
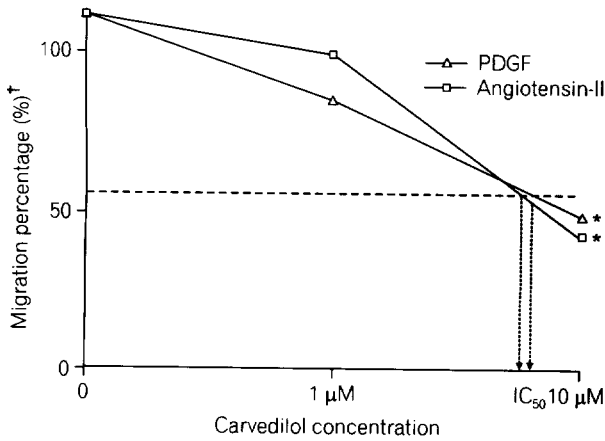


Fig. 3. Effects of cyclosporine on PDGF and angiotensin-II induced vascular smooth muscle cell migration.



**Fig. 4.** Inhibitory effect of carvedilol on the smooth muscle cell migration. \*Means  $p < 0.05$  vs. stimulated control and stimulator + carvedilol  $1 \mu\text{M}$  group. †Migration percentage (%) = (migrated cell numbers per HPF in stimulator + drug treated group) / (migrated cell numbers per HPF in stimulated control)  $\times 100$ .

ANG-II  $100 \text{ nM}$  사용군에서도 평균 이동세포수는  $13.7 \pm 3.4$ 개로 대조군의  $1.3 \pm 0.2$ 개보다 유의한 이동유발효과를 보였다(Fig. 2).

### 2) CsA의 이동억제효과

CsA  $100 \text{ nM}$ 와 PDGF 병합투여군의 고배율구역당 이동세포수는  $26.6 \pm 7.2$ 개로 PDGF 단독투여군( $35.8 \pm 9.1$ )의  $74.1 \pm 2.8\%$ 로 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. CsA와 ANG-II 병합투여군에서의 이동세포수는  $10.3 \pm 1.6$ 개로 ANG-II 단독투여군( $13.7 \pm 3.4$ )의  $76.5 \pm 8.1\%$ 로 역시 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 3). 즉 CsA  $100 \text{ nM}$ 로는 PDGF나 ANG-II로 유발된 평활근세포의 이동을 효과적으로 억제할 수가 없었다.

### 3) Carvedilol의 이동억제효과-carvedilol 단독투여군

PDGF와 carvedilol의 병합투여군의 고배율구역당 이동세포수는 carvedilol이  $1 \mu\text{M}$  농도인 경우에는  $27.3 \pm 9.9$ 개,  $10 \mu\text{M}$  농도에서는  $15.0 \pm 4.5$ 개로 carvedilol의 농도가 증가할수록 이동억제를 보였다(Fig. 4). 즉  $1 \mu\text{M}$ 의 carvedilol

**Fig. 5.** Effects of carvedilol on vascular smooth muscle cell migration. (a) control, (b) PDGF induced migration, (c) combined PDGF and carvedilol  $1 \mu\text{M}$  induced migration. (d) combined PDGF and carvedilol  $10 \mu\text{M}$  induced migration. Diff-Quik stain,  $\times 100$ . \*Mark indicates the migrated smooth muscle cell.

투여군에서는 75.2±14.2%의 상대이동률을, 10 μM의 carvedilol 투여군에서는 42.9±11.0%의 상대이동률을 보여 carvedilol 1 μM 농도에서는 PDGF 단독투여군과 비교하여 유의한 이동억제효과를 보이지 않았으나 10 μM 농도에서는 PDGF 단독투여군은 물론 carvedilol 1 μM 병합투여군과도 비교하여 뚜렷한 이동억제효과를 보였다(Fig. 4).

PDGF로 유도된 평활근세포에 대한 carvedilol의 이동억제효과는 유발인자로 ANG-II를 사용한 경우에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. ANG-II와 carvedilol 1 μM 병합투여군의 이동세포수는 12.1±3.5개, carvedilol 10 μM 병합투여군은 4.8±0.4개로 각각의 상대이동률은 88.9±16.0%와 37.4±10.5%로 유발인자로 PDGF 사용군과 마찬가지로 carvedilol 1 μM에서는 유의한 이동억제효과를 보이지 않았던 반면 carvedilol 10 μM에서는 유의한 이동억제효과를 보였다(Fig. 4).

본 연구결과에 의하면 carvedilol은 PDGF나 ANG-II로 유발된 평활근세포의 이동을 억제하며 carvedilol의 IC<sub>50</sub> (Inhibitory concentration 50%)은 10 μM 내로 추정할 수 있었다(Fig. 4).

4) Carvedilol과 CsA 병합투여의 이동억제효과

유발인자로 PDGF 사용군에서 CsA와 carvedilol 1 μM을 병합투여한 경우, 고배율구역당 이동세포수는 26.9±8.4개로 PDGF 단독투여군에 비하여 상대이동률이 74.4±8.3%로 통계학적으로 유의한 이동억제효과를 보이지 않았던 반면, CsA와 carvedilol 10 μM을 병합투여한 경우에는 10.0±1.3개로 상대이동률이 28.7±4.1%로 PDGF 단독투여군은 물론 CsA와 carvedilol 1 μM 병합투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 이동억제효과를 보였다(Fig. 6). 그러나 CsA와 carvedilol 병합투여군의 상대이동률은 같은 농

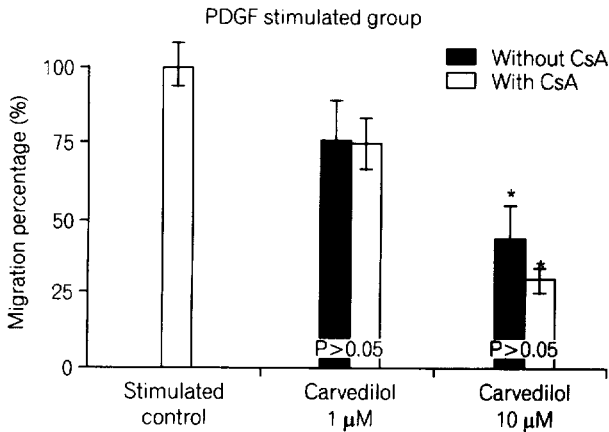


Fig. 6. Effect of carvedilol in the presence and absence of cyclosporine A (CsA) on PDGF-induced smooth muscle cell migration. \*Means p<0.05, vs. stimulated control and carvedilol 1 μM group.

도의 carvedilol 단독투여군의 상대이동률과 비교하면 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수가 없었다(Fig. 6). 즉 carvedilol의 증식억제효과는 CsA의 유무에 관계없이 carvedilol의 농도에 따라서 결정됨을 알 수 있었다.

이러한 PDGF로 유도된 평활근세포에 대한 CsA와 carvedilol의 병합투여의 이동억제효과는 ANG-II로 유도된 평활근세포에서도 같은 결과를 얻어, CsA와 carvedilol의 병합투여군의 이동억제효과는 carvedilol의 단독투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 7).

결론적으로 임상적으로 사용이 가능한 농도인 100 nM의 CsA는 carvedilol에 의한 혈관 평활근세포 이동억제

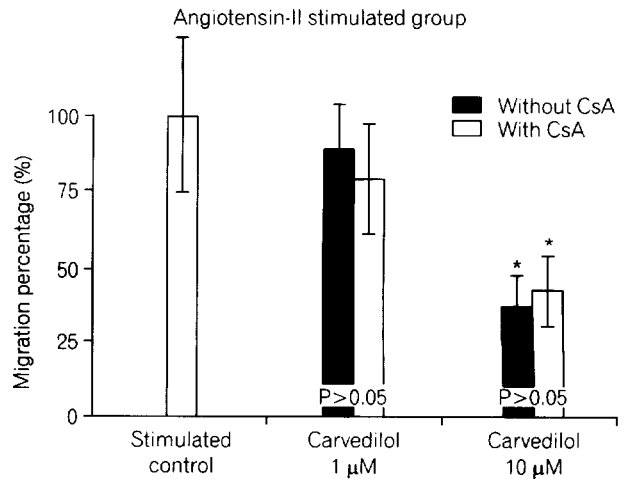


Fig. 7. Effect of carvedilol in the presence and absence of cyclosporine A (CsA) on angiotensin-II-induced smooth muscle cell migration. \*Means p<0.05, vs. stimulated control and carvedilol 1 μM group.

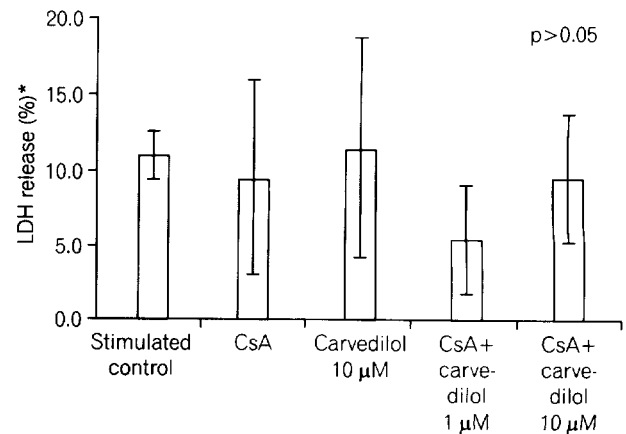


Fig. 8. Effect of test drugs on the cellular lysis: LDH assay. \*LDH release (%) = LDH release in the medium × 100/total LDH release after cytolysis. CsA = cyclosporine A.

과에 아무런 영향을 미치지 않았다.

### 5) 세포용해검사(cytolysis assay)결과

PDGF로 증식유도된 실험군의 LDH 유리정도는  $10.9 \pm 1.5\%$ 로 약제투여군들의 LDH 유리와 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 8). 즉 CsA 100 nM 단독투여군에서의 LDH 유리는  $9.3 \pm 6.6\%$ , carvedilol 10  $\mu\text{M}$  투여군은  $11.3 \pm 7.4\%$ , CsA 100 nM과 carvedilol 10  $\mu\text{M}$  병합투여군은  $9.3 \pm 4.3\%$ 로 PDGF 단독투여군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이는 CsA나 carvedilol에 의한 세포용해가 없었음을 의미한다. 이러한 세포용해검사는 유발인자로 ANG-II를 사용한 경우에도 같은 결과를 얻었다.

## 고 찰

이미 널리 알려진 대로 만성 이식장기 혈관병증이나 풍선 확장술 후 발생하는 혈관 재협착의 기전은 서로 유사하여 혈관중막내에 위치한 혈관 평활근세포의 증식과 더불어 내막으로의 이동이 중요한 병인으로 설명되고 있다.(1,2) 혈관 평활근세포의 증식과정과 이를 억제하는 약제에 대한 연구는 광범위하게 보고되었으나, 혈관 평활근세포의 이동에 관한 구체적인 연구는 상대적으로 아직은 미흡하다. 특히 평활근세포의 증식을 초래하는 유발인자 혹은 cytokines중의 일부만이 평활근세포의 이동을 초래할 수 있음(1)은 평활근세포의 이동과 증식기전이 서로 다르고 증식억제제가 평활근세포 이동억제에 미치는 영향이 다를 수 있음을 제시한다. 따라서 본 연구는 증식억제제인 carvedilol이 평활근세포에 대하여 이동억제효과가 있는지 검색하고자 하였다.

혈관 평활근세포의 이동에 관한 대부분의 세포실험은 polycarbonate membrane을 가진 modified Boyden chamber를 이용하여 시행되었다.(10,11,15,19,20) 이러한 평활근세포의 이동에 관한 실험 방법론에서 중요한 것은 평활근세포의 이동을 유발시키는 시간(즉, incubation 시간)과 이동억제제의 투여시기이다. 대부분의 세포실험에서는 유발인자나 약제투여 후 24시간 동안의 incubation을 시행하였으나, 노출시간에 차이를 두고 평활근세포의 이동을 확인한 실험에서는 6시간 이상 incubation을 하는 경우 충분한 평활근 이동을 보고하기도 하였다.(17) 저자들은 평활근세포에 유발인자나 약제투여 후 16시간의 incubation을 시행하던 바, 16시간만으로도 충분한 평활근세포의 이동을 확인할 수 있었다. 유발인자와 억제제의 투여순서도 실험방법론에서 제기되는 중요한 문제로 유발인자의 투여 후 일정한 간격을 두고 억제제를 투여하여 평활근세포의 증식과 이동정도를 확인한 1997년도 보고(19)에 의하면 유발인자 투여 후 일정시기가 경과되면 평활근세포의 증식이나 이

동을 억제할 수 없었다. 이는 평활근세포의 증식이나 이동을 유발시키는 과정이 일정단계를 지나면 억제제를 투여하여도 차단될 수 없음을 의미하는 것으로 본 연구에서는 평활근세포에 투여되는 유발인자와 억제제간의 차이가 없도록 하여 약제 투여순서에 의한 평활근세포에 대한 이동억제능의 소실을 방지하였다. 혈관 평활근세포의 이동을 초래하는 유발인자중 PDGF는 가장 강력한 이동유발효과를 보이는 것으로 알려져 있으며,(21) 그밖에 ANG-II, thrombin, insulin-like growth factor 1 및 endothelin-1 등이 유의한 이동유발효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.(22) 저자들은 이를 근거로 본 실험에서는 PDGF (1 ng/ml)와 ANG-II (100 nM)를 이동유발인자로 사용하였으며 동일한 이동유발효과를 얻을 수가 있었다.

혈관 평활근세포의 증식을 억제하는 것으로 알려진 약제 중 평활근세포에 대한 이동억제효과가 별도로 또는 동시에 시행된 실험을 통하여 보고된 것은 rapamycin,(15) doxazocin(10) 및 carvedilol(11)에 불과하다. 특히 1990년대 초반부터 소개된 carvedilol의 혈관 평활근세포에 대한 증식억제효과는 저자의 실험(14)이나 외국의 보고(11-13,23) 등을 통하여 보고된 바가 많으나, 이동억제효과에 대하여서는 상대적으로 보고가 적은 편이었다. 본 연구를 살펴보면 PDGF를 유발인자로 사용한 경우, 유의한 증식억제효과가 있었던 carvedilol 1  $\mu\text{M}$ 에서는 통계학적으로 유의한 이동억제효과를 보이지를 않아 저자들의 평활근 증식에 관한 실험(14)과는 다소 차이를 보였다. 하지만 carvedilol 1  $\mu\text{M}$ 에서의 상대이동률은 75%로 통계학적으로 유의하지는 않으나 평활근세포의 이동을 어느 정도 억제하고 있으며, carvedilol 10  $\mu\text{M}$ 에서는 유의한 이동억제효과를 보여 전반적으로 carvedilol의 농도에 비례하는 이동억제효과를 보이고 있다(Fig. 4). 이러한 이동억제효과는 유발인자로 ANG-II를 사용한 경우에서도 같았으며, carvedilol의 이동억제효과를 보고한 기존의 결과(11)와 일치하였다.

Carvedilol의 증식억제효과는 평활근세포의 증식을 유도한 증식유발인자의 종류에 관계없이 일정하고,(4) 이는 carvedilol이 평활근세포 증식의 공통과정인 세포내의 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화를 억제함으로써 혈관 평활근세포의 성장을  $G_0$  상태에 머물게 함으로써 가능하다고 보고되고 있다.(24) 마찬가지로 평활근세포의 이동에도 MAPK 활성화가 관여하며,(25) 평활근세포에 대한 carvedilol의 이동억제효과가 유발인자와 상관없이 일정하게 유지됨(21)은 carvedilol의 이동억제효과도 MAPK 활성화 억제에 기인함을 시사하고 있다. 그러나 평활근세포의 증식과정에 관여하는 세포내 MAPK의 활성화시기는 이동과정에 관여하는 MAPK의 활성화 시기와 다르며,(19) carvedilol의 증식억제를 위한  $IC_{50}$ 과 이동억제를 위한  $IC_{50}$  간에 차이 난다는 점(11)에서 평활근세포의 이동기전은

평활근세포의 증식기전과는 다소 차이가 있을 것으로 추정되며 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 혈관 평활근세포에 대한 약제의 독성여부를 확인하고자 LDH 유리정도를 측정하였던 바, CsA는 물론 carvedilol의 실험농도내에서는 혈관 평활근세포의 세포 용해를 발견할 수가 없어 혈관 평활근세포에 대한 carvedilol의 이동억제능력이 세포독성을 일으키는 농도이전에 발현함을 알 수 있었다. 결론적으로 carvedilol은 농도에 따라서 비례적인 이동억제효과가 있음을 분명히 보여주고 있어, 만성 이식장기 혈관병증이나 풍선확장술 후 발생하는 혈관 재협착의 예방에 carvedilol이 효과적일 수 있다는 실험적인 근거를 제공해 주었다.

가장 많이 쓰이는 면역억제제인 CsA의 혈관 평활근세포에 대한 증식억제효과는 부정적이었으며,(3,5,14) 본 연구에서도 CsA 100 nM에서는 평활근세포에 대한 이동억제효과가 통계학적으로 유의한 수준이 아니었다. 비록 CsA의 실험농도를 100 nM 하나로 고정하였지만, 이 농도가 임상적으로 사용되는 치료농도(18)라는 점을 감안한다면 일반적인 치료수준의 CsA에 의한 평활근세포의 이동억제효과는 기대할 수가 없다. 그러나 실험농도하의 CsA는 carvedilol의 이동억제효과에는 어떠한 영향을 미치지 않아 CsA와 carvedilol의 병합투여군의 평활근세포에 대한 이동억제효과는 carvedilol 단독투여군의 이동억제효과와 일치하였다(Fig. 6, 7). 본 연구에서 carvedilol과 CsA의 병합투여조건을 설정한 것은 신장이식 환자중 50~80%의 환자에서 항고혈압치료가 필요하다는 임상적인 상황을 감안한 것으로 본 연구결과는 CsA를 주면역억제제로 복용중인 신장이식 환자에서 항고혈압제제를 선택함에 있어서 의미 있는 기준을 제시해 주었다.

**결 론**

Carvedilol의 단독투여 또는 면역억제제인 CsA와의 병합투여가 PDGF나 ANG-II로 유도된 혈관 평활근세포의 이동에 미치는 영향을 관찰한 결과, carvedilol은 유발인자로 유도되는 백서 혈관 평활근세포의 이동을 용량 비례적으로 억제하며 이러한 이동억제효과는 CsA의 병합투여와는 관계없이 일정하였다. 본 연구에서 확인된 carvedilol에 의한 혈관 평활근세포 이동억제효과는 고혈압을 동반하는 이식환자에서 고혈압의 조절은 물론 만성거부반응의 예방책으로 carvedilol의 사용 가능성을 시사하여 주고 있다.

**REFERENCES**

1) Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.  
 2) 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; 62:1526-9.  
 3) 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;16:484-92.  
 4) 문장일, 김유선, 김은희, 권민수, 박기일. 면역억제제가 백서 대동맥 혈관 평활근배양세포의 증식에 미치는 영향(1): cyclosporine, mycophenolic acid 및 rapamycin의 단독투여 효과. *대한이식학회지* 1998;12:183-90.  
 5) Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, et al. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplant Proc* 1993;25:770-1.  
 6) Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:412-7.  
 7) Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. *Transplantation* 1995;59:390-5.  
 8) 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;36:251-61.  
 9) 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;12:216-20.  
 10) Hu ZW, Shi XY, Hoffman BB. Doxazocin inhibits proliferation and migration of human vascular smooth-muscle cells independent of alpha-adrenergic receptor antagonism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:833-9.  
 11) Ohlstein EH, Douglas SA, Sung CP, Yue T, Loudon 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;90:6189-93.  
 12) Sung CP, Arleth AJ, Ohlstein EH. Carvedilol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:221-7.  
 13) 김인섭, 박수재, 임성훈, 허영선, 김상욱, 김태호 등. 카베디롤이 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향. *순환기* 1998;28:1583-9.  
 14) 김명수, 김유선, 하헌주, 박제현, 김혜진, 박기일. Carvedilol 단독 또는 cyclosporine과의 혼합투여가 백서 대동맥 평활근배양세포의 증식에 미치는 영향. *대한이식학회지* 2000;14:1-8.  
 15) Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration *J Clin Invest* 1996;98:2277-83.

- 16) Hidaka Y, Eda T, Yonemoto M, Kamei T. inhibition of cultured vascular smooth muscle cell migration by simvastatin (MK-733). *Atherosclerosis* 1992;95:87-94.
  - 17) Kohno M, Yokokawa K, Kano H, Yasunari K, Minami M, Hanehira T, et al. Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;29:1309-13.
  - 18) 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;31:46-9.
  - 19) 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;27:117-25.
  - 20) Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;75:1-7.
  - 21) Goetze S, Xi XP, Kawano H, Gotlibowski T, Fleck E, Hsueh WA, et al. PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:798-806.
  - 22) Clowes AW. Regulation of smooth muscle cell proliferation and migration. *Transplant Proc* 1999;31: 810-1.
  - 23) 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):B19-24.
  - 24) 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.
  - 25) Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, et al. A role for p38 (MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274: 24211-9.
-