

## Carvedilol이 배양된 사람 혈관 평활근 세포의 증식과 그에 관여하는 세포내 신호전달계에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 외과학교실 및 장기이식연구소, <sup>1</sup>순천향대학교 현암신장연구소  
<sup>2</sup>연세대학교 원주의과대학 외과학교실

박제현 · 하현주<sup>1</sup> · 오재원 · 김명수<sup>2</sup> · 서지연  
김혜진 · 박기일 · 김유선

= Abstract =

### Effect of Carvedilol on Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Its Signal Transduction

Jehyun Park, B.S., Hunjoo Ha, Ph.D.<sup>1</sup>, Jae Won Oh, M.D., Myoung Soo Kim, M.D.<sup>2</sup>, Jiyeon Seo, B.S.  
Hae Jin Kim, B.S., Kiil Park, M.D. and Yu Seun Kim, M.D.

Department of Surgery and The Research Institute for Transplantation, Yonsei University College of Medicine, Seoul, <sup>1</sup>Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University, Seoul, and <sup>2</sup>Department of Surgery, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

**Purpose:** Vascular smooth muscle cells (VSMCs) migration and proliferation play important roles in transplant vascular sclerosis and restenosis after balloon vascular injury. The anti-proliferative and anti-migratory effects of carvedilol (CA), a unique  $\alpha$ - and  $\beta$ -blocking anti-hypertensive drug, on the VSMCs were confirmed previously. Since reactive oxygen species (ROS) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) family play important roles in proliferation of VSMCs, the present study examined the effects of CA on intracellular ROS generation, activation of ERK1/2 and p38 MAPK, and proliferation of VSMCs cultured under platelet derived growth factor (PDGF). **Methods:** Human VSMCs obtained from ATCC were cultured with RPMI-1640 containing 10% fetal bovine serum. Near confluent VSMCs were incubated with serum-free media for 48 hours to arrest and synchronize the cell growth. CA was administered 1 hour before the addition of PDGF. 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)-sensitive intracellular ROS was detected by FACS. Activations of ERK1/2 and p38 MAPK were measured by Western blot analysis. Proliferation of VSMCs was assessed by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. **Results:** PDGF at 10 ng/ml, which induced human VSMCs proliferation, rapidly increased intracellular ROS by 1.6-fold ( $P < 0.01$ ), ERK1/2 activation by 2.1-fold ( $P < 0.01$ ), and p38 MAPK activation by 1.9-fold ( $P < 0.01$ ), respectively, as compared to the control. CA 1 and 10  $\mu$ M effectively inhibited PDGF-induced human VSMCs proliferation. CA also effectively inhibited PDGF-induced intracellular

책임저자 : 김유선, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지, ☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 02-361-5563, Fax: 02-313-8289, E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 2000년 연세대학교 의과대학 위탁연구비와 장기이식연구소 연구비 일부지원으로 이루어졌음.

본 논문의 요지는 대한혈관외과학회 제35차 춘계학술대회(2002년 4월 20일, 대구)에서 구연되었음.

ROS generation as well as ERK1/2 and P38 MAPK activation. Conclusion: The present study suggests that CA inhibits PDGF-induced human VSMCs proliferation, possibly by inhibiting intracellular ROS generation and activation of ERK1/2 and p38 MAPK.

**Key Words:** Carvedilol, Vascular, Smooth muscle cell, Reactive oxygen, Mitogen-activated protein kinases

**중심단어:** Carvedilol, 혈관, 평활근세포, 활성산소, MAPK

## 서 론

장기이식 후 만성거부반응이나 혈관손상 후 재협착 등의 복원과정(remodeling) 그리고 동맥경화증의 병태생리는 비슷하여 물리적 손상이나 면역학적 또는 비면역학적 원인에 의해서 혈관내피의 손상이 발생하면 혈관 평활근 세포의 증식과 이동이 항진되며 세포 외 기질이 과다 생산되어 혈관의 내막증식과 섬유화가 초래된다. 이러한 병태 생리과정을 효과적으로 제어하는 방법은 매우 제한적으로 여러 약제를 사용하여 다양한 cytokine과 성장인자의 생성과 발현을 억제함으로써 혈관 병변과 재협착을 억제하고자 하는 시도가 있어왔으나 임상에서 사용할 정도로 그 효과가 확연하게 밝혀진 제제는 아직까지 없다(1-3). 연구자들은 최근에 항고혈압제로 사용중인 carvedilol 제제가 백서의 혈관 평활근세포의 증식과 이동을 효과적으로 억제함을 관찰하여 보고한 바 있다(4,5). 아드레날린성  $\beta$ 억제제로 개발된 carvedilol은 아드레날린성  $\alpha$ 억제제 및 항산화제 등 다양한 기능을 가진 제제로서(6) 다양한 혈관 병변을 가진 환자나 신장이식환자에서 항고혈압제제의 복용이 필요한 상황을 고려해 보면 carvedilol의 투여는 혈압 강하효과 이외에도 혈관병변의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

세포의 성장과 증식은 이를 촉진하거나 억제하는 유전자 발현과 단백질 합성에 의해 이루어지며 정상 생리 상태에서는 유기적으로 잘 조절되는 신호변환 기전에 의해서 조절된다. 성장인자는 세포막에 있는 수용체와 결합하여 그 수용체를 활성화시킨 후 신호변환기전을 경유하여 핵내의 유전자 발현을 조절한다. 특히, mitogen-activated protein kinases (MAPK)는 세포질에 존재하는 단백질의 인산화 효소로서 extracellular-regulatory protein kinase (ERK), c-jun N-termi-

nal kinase (JNK), p38 MAPK의 세 가지 형태가 있으며, 각각 세포외부의 각종 자극 인자들에 의해 연속적으로 활성화되어 전사조절인자를 활성화한다(7-11). 최근의 보고에 따르면 MAPK나 전사조절인자의 활성조절에는 활성산소족(reactive oxygen species)과 이들에 의해 유도되는 세포내 산화-환원 상태의 변화가 상당부분 관여하는 것으로 알려져 있다(7,12,13).

따라서, 본 연구자들은 carvedilol 제제가 인체 유래 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 영향과 이에 관여하는 신호 전달계 중 활성산소족생성과 MAPK의 활성화에 미치는 영향을 규명하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

## 방 법

### 1) 시약 및 기구

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

### 2) 세포 배양

이미 특성이 확인된 사람 혈관 평활근세포(CRL-1999, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 구입하여 10% 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS), 26 mM NaHCO<sub>3</sub> 및 25 mM HEPES를 함유한 RPMI-1640 배지(Lifetechnologies, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기가 공급되는 37°C 세포배양기(Vision 과학, 서울, 한국)에서 배양하였다.

### 3) 약물 투여

세포들로 배양용기가 채울 때 혈청이 포함되지 않은 RPMI-1640 배양액으로 교환하여 48시간 배양하

므로써 세포 성장을 동일화하였다. 그 후 새로운 배양액으로 교환하면서 기초 실험에서 얻어진 농도인 10 ng/ml의 PDGF-BB를 투여하여 5분부터 48시간까지 배양하였다. Carvedilol (10 nM~10 μM)은 PDGF-BB를 처리하기 한시간 전에 처리하였다.

#### 4) $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation을 이용한 세포 증식의 평가

24 well 세포 배양용기에 각 well 당  $5 \times 10^4$ 개의 세포가 되도록 분주하여 3회 실험하였다. 실험이 종료되기 12시간 전에  $[^3\text{H}]$ thymidine (Du Pont Co., Wilmington, DE, USA)을 각 well에 1 μCi/ml의 농도로 첨가하였다. 실험이 종료되면, 배지를 제거하고 냉장 보관한 인산완충액으로 2회 세척하였다. 10% trichloro acetic acid (TCA)로 15분간 실온에서 방치한 후 0.1% NaOH와 1% SDS로 30분간 방치하여 세포를 용해한 후 3 ml scintillation cocktail에 넣고 beta-counter (TL 5000S, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)로 총 방사능을 측정하였다.

#### 5) FACS를 이용한 세포내 활성산소족 측정

6 well 세포 배양용기에 각 well 당  $1 \times 10^5$ 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, USA) 5 μM을 첨가하여 10분 동안 세포 배양기에 방치하여 세포내로 염료를 유입시켰다. 유입되지 않은 염료를 세척하여 제거한 후 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry system, Mountain View, CA, USA)로 형광을 측정하여 세포내 생성된 활성산소족을 정량하였다(14,15).

#### 6) Western blot을 이용한 MAPK 활성화 측정

60 mm 배양용기에  $5 \times 10^5$ 개의 세포가 되도록 분주하여 4회 실험하였다. 실험이 완료된 후 세포 단백질을 추출하여 immunoblot을 시행하였다. 요약하면, 세포를 냉장시킨 인산완충액으로 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 μg/ml aprotinin, 20 μM leupeptin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM

pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate)를 넣고 열음 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 μg, p38 MAPK를 위하여 50 μg의 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. 단백질에 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, MA, USA)에서 구입하였다. Peroxidase가 conjugation된 이차 항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG; Santa Cruz, CA, USA)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 대조군을 1.0으로하여 비교하였다(15).

#### 7) 통계처리

모든 실험결과의 측정치는 “평균(mean)±표준 오차(standard error)”로 나타내었으며 각 군간의 통계학적인 비교는 분산분석(ANOVA)과 Fisher's least significance difference test를 시행하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

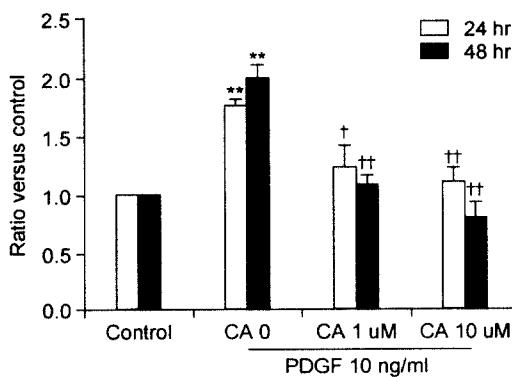
#### 1) Carvedilol은 PDGF에 의한 사람 혈관 평활근세포의 증식을 억제하였다(Fig. 1)

PDGF 10 ng/ml은 혈관 평활근 세포의 강력한 증식을 유도하여 24시간과 48시간 노출 시 대조군에 비하여 각각 1.8배와 2.0배씩 세포 증식을 증가시켰

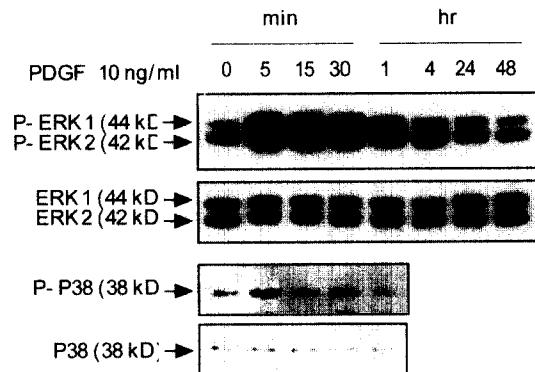
다( $P<0.01$ ). Carvedilol은 PDGF에 의한 세포 증식을 억제하여 1  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서 통계적으로 유의한 증식 억제를 하였다( $P<0.05$ ).

## 2) Carvedilol은 PDGF에 의한 혈관 평활근세포의 세포내 활성산소족 증가를 억제하였다

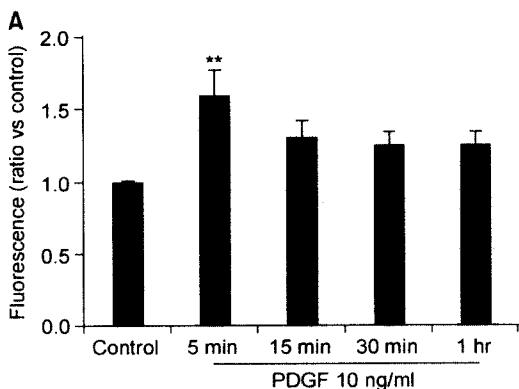
PDGF 10 ng/ml은 평활근세포내 활성산소족을 5분



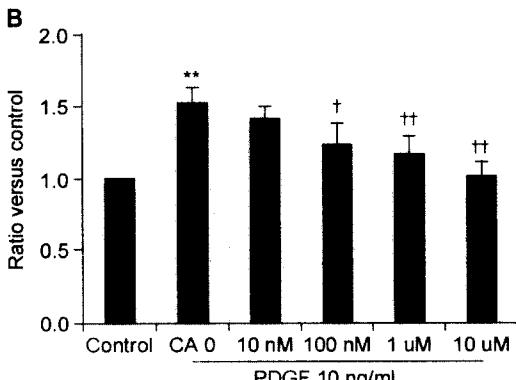
**Fig. 1.** Effects of carvedilol (CA) on PDGF-induced human VSMC proliferation at 24 hours and 48 hours. Human VSMC proliferation was measured after exposure of quiescent VSMC to serum free RPMI-1640 containing different concentrations of CA for 1 hour before the addition of PDGF 10 ng/ml. Data are presented as the means  $\pm$  SE of 3 experiments. \*\* $P<0.01$  vs. control,  $^{\dagger}P<0.05$  and  $^{††}P<0.01$  vs. CA 0 group.



**Fig. 3.** PDGF-induced ERK1/2 and p38 MAPK activation of human VSMC. ERK1/2 and p38 MAPK activation of human VSMC was measured after exposure of quiescent VSMC to serum free RPMI-1640 containing different concentrations of CA for 1 hour before the addition of PDGF 10 ng/ml. At the end of experiments, cells were washed with PBS and lysed by lysis buffer containing phosphatase inhibitors. ERK1/2 and p38 MAPK was detected by Western blot analysis using phospho- and total-specific antibody.



**Fig. 2.** PDGF-induced intracellular ROS generation by human VSMC. Intracellular ROS generation by human VSMC was measured after exposure of quiescent VSMC to serum free RPMI-1640 containing different concentrations of CA for 1 hour before the addition of PDGF 10 ng/ml. At the end of the incubation, cells were washed with PBS of two times and exposed to DCFH-DA for 20 minutes. The fluorescence activity of cells was quantified by FACS. A: PDGF-treatment (time-course), B: Effect of CA at 5 minutes after PDGF-treatment. Data are presented as the means  $\pm$  SE of 4 experiments. \*\* $P<0.01$  vs. control,  $^{\dagger}P<0.05$  and  $^{††}P<0.01$  vs. CA 0 group.



에 대조군과 비교하여 1.6배 증가시켰다( $P<0.01$ ) (Fig. 2A). Carvedilol은 농도의존적으로 PDGF에 의한 활성산소족 증가를 억제하여 100 nM 이상에서 통계적으로 유의하게 생성을 억제하였다( $P<0.05$ ) (Fig. 2B).

### 3) Carvedilol은 PDGF에 의한 혈관 평활근세포의 ERK 인산화를 감소시켰다.

PDGF 10 ng/ml은 혈관 평활근세포의 ERK 인산화를 5분과 15분에 대조군과 비교하여 1.9배와 2.1배

증가시켜 최대치를 보였으며( $P<0.01$ ), 이는 시간이 지남에 따라 감소하였다(Fig. 3, Fig. 4A). Carvedilol은 PDGF에 의한 ERK 인산화를 억제하여 1  $\mu$ M에서 5분과 15분에 증가되었던 ERK의 인산화를 통계적으로 유의하게 감소시켰다( $P<0.05$ ) (Fig. 4B).

### 4) Carvedilol은 PDGF에 의한 혈관 평활근세포의 p38 MAPK 인산화를 감소시켰다.

PDGF 10 ng/ml은 혈관 평활근세포의 p38 MAPK

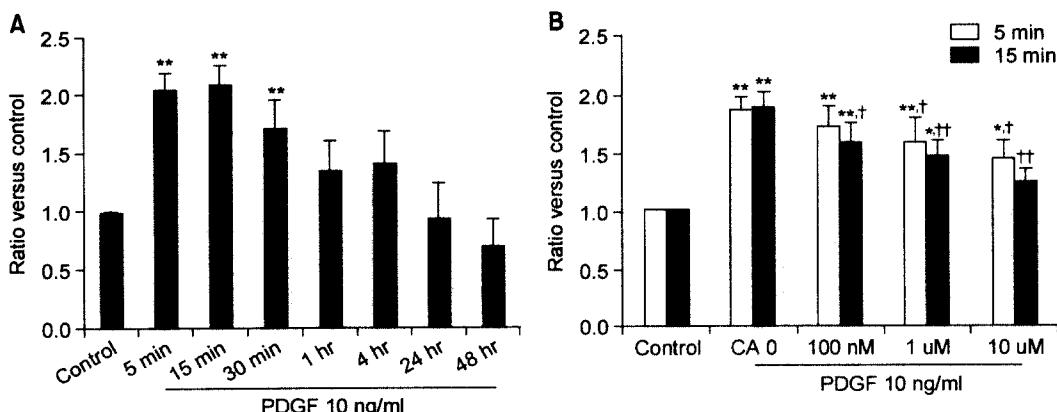


Fig. 4. ERK 1/2 activation of human VSMC. In the Western blot analysis, each band was quantified by densitometer. A: PDGF-treatment (time-course), B: effect of CA at 5 minutes and 15 minutes after PDGF-treatment. Data are presented as the means  $\pm$  SE of 3 experiments, \* $P<0.05$  and \*\* $P<0.01$  vs. control, † $P<0.05$  and †† $P<0.01$  vs. CA 0 group.

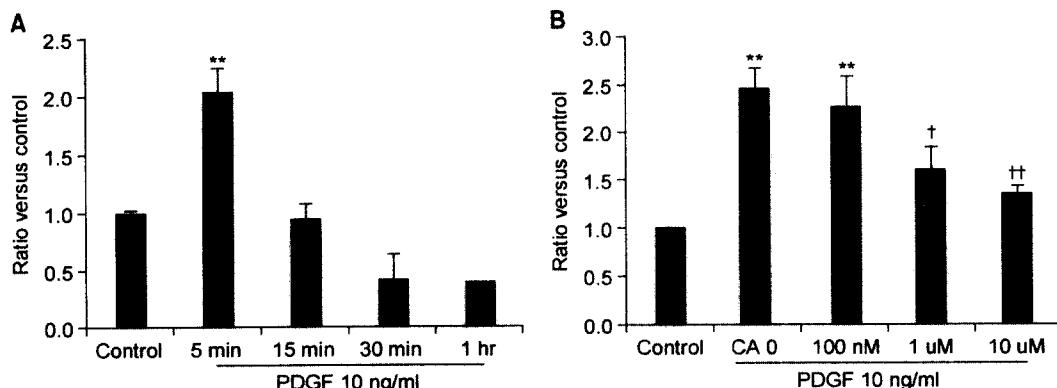


Fig. 5. p38 MAPK activation of human VSMC. In the Western blot analysis, each band was quantified by densitometer. A: PDGF-treatment (time-course), B: Effect of CA at 5 minutes after PDGF-treatment, Data are presented as the means  $\pm$  SE of 3 experiments, \*\* $P<0.01$  vs. control, †† $P<0.01$  vs. CA 0 group.

인산화를 5분에 대조군과 비교하여 2.2배 증가시켜 최대치를 보였으며( $P < 0.01$ ), 이는 시간과 함께 감소하였다(Fig. 3, Fig. 5A). Carvedilol은 PDGF에 의한 p38 MAPK 인산화를 억제하여 1  $\mu\text{M}$ 에서 5분에 증가하였던 p38 MAPK의 인산화를 통계적으로 유의하게 감소시켰다( $P < 0.05$ )(Fig. 5B).

## 고 찰

혈관 내피세포의 손상과 그에 따른 cytokines 과 성장인자의 생산과 분비는 혈관 내막 증식 및 만성 거부반응 시 나타나는 혈관병변의 주요원인으로 알려져 있으며 혈관 내피세포의 손상은 물리적인 손상은 물론 면역학적 또는 비면역학적 원인에 의하여 발생하고, 이로 인하여 여러 cytokines 및 성장 인자가 상향 조절되기 때문에 한가지 cytokine이나 성장 인자를 표적으로 하여 이를 제거 또는 억제하는 것은 큰 치료 효과가 없다. 반면에, 혈관 평활근 세포의 이동과 증식 및 세포의 기질의 축적은 병태생리의 최종 단계로서 이 마지막 과정을 효과적으로 억제한다면 병변의 발생과 진행을 자연 혹은 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 항고혈압 제제인 carvedilol은 이미 본 연구진(4,5)과 다른 연구진(16,17)에 의하여 혈관 평활근세포의 이동과 증식에 대한 억제 효과가 밝혀져 있는 약제로서 아드레날린성  $\alpha$ 와  $\beta$  억제제 및 항산화제 효과 등 다양한 효과를 지니고 있는 약제이다.

강력하게 혈관 평활근세포의 증식을 유발하는 PDGF는 세포내 신호전달계(18,19)가 비교적 잘 밝혀져 있는 성장 인자이며 PDGF에 의한 혈관 평활근세포의 세포내 활성산소족과 MAPK 활성화가 세포 증식에 중요한 역할(20)을 하기 때문에, 본 연구에서는 활성 산소족과 MAPK에 대한 carvedilol의 효과를 살펴보기로 하였다.

본 연구에서는 PDGF의 세가지 종류 중 가장 강력한 증식 유발 효과가 있는 것으로 알려져 있는 PDGF-BB(21)를 사용하였다. PDGF-BB 10 ng/ml은 사람의 혈관 평활근세포의 증식을 24시간과 48시간에 각각 증가시켰고, carvedilol은 1  $\mu\text{M}$  이상에서 이를 억제하였다.

활성산소족은 과거에 대사과정에서 발생하여 지질, 단백질 및 DNA에 손상을 주는 독성 물질로 세

포 사멸을 유도하는 것으로 생각되었으나, 최근의 연구에서 각종 세포내 신호전달에서 필수적인 조절 물질로서 관여하는 것으로 알려지고 있다(13). PDGF 10 ng/ml은 사람의 혈관 평활근세포의 세포내 활성 산소족 생성을 일찍(5분 이내) 증가시켰으며, 이는 Sundaresan등(22)의 보고와도 일치한다. 실제로 항산화제인 catalase와 N-acetylcysteine은 PDGF에 의한 혈관 평활근세포의 증식을 억제한다(22). Carvedilol은 5분에 증가되었던 세포내 활성산소족을 100 nM 이상의 농도에서 이를 억제하였다. Carvedilol이 세포내 활성산소족 증가를 억제하는 기전에 대해서 직접적인 제거효과와 항산화 작용 효소의 활성화를 통한 작용이 제시되고 있다(6).

PDGF-BB 10 ng/ml은 사람의 혈관 평활근세포의 ERK1/2와 p38 MAPK를 일찍 활성화 시켰다. Nelson등(23)은 사람의 복제정맥 평활근 세포를 이용하여, PDGF에 의한 초기 15분 이내의 ERK 활성화는 세포의 이동에 관여하고, 1시간에서 4시간 사이의 ERK 활성화가 세포의 증식에 관여한다고 보고하였으나, 본 실험 조건에서는 PDGF 투여 후 30분까지만 ERK 활성화가 의의있게 증가하였다. Carvedilol은 PDGF-BB에 의해 활성화되었던 ERK를 10  $\mu\text{M}$ 에서 의의있게 억제하여 Sung등(24)의 보고와 일치하나 carvedilol이 1  $\mu\text{M}$ 에서도 증식을 억제하므로 낮은 농도에서 ERK 활성화에 미치는 영향을 검색하는 추후 연구가 필요할것으로 사료된다.

한편, p38 MAPK는 스트레스나 기타 세포사멸의 신호전달에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 최근 Yamaguchi등(25)은 p38 MAPK가 흰쥐 혈관 평활근세포의 cyclooxygenase-2 활성을 조절하여 염증 반응에 관여한다고 보고하였고, Kanda등(26)은 thrombin에 의한 사람 혈관 평활근세포의 증식에 p38 MAPK의 활성화가 관여한다고 보고하였다. 현재까지 PDGF에 의한 p38 MAPK 활성화가 혈관 평활근세포의 증식에 관여한다는 정규보고는 없으나 본 연구진(27)은 최근에 흰쥐의 혈관 평활근세포를 이용한 실험에서 p38 MAPK 억제제가 PDGF에 의한 세포 증식을 의의있게 억제함을 관찰하여 보고한 바 있다. 추후 PDGF에 의한 사람의 혈관 평활근세포 증식에 p38 MAPK가 관여하는 정확한 기전을 검색하여야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구자들은 PDGF-BB에 의하여 증식유도된 사람 혈관 평활근세포에서 carvedilol이 세포내 활성산소족의 증가 및 ERK와 p38 MAPK의 인산화를 억제함으로써 세포의 증식을 억제할 수 있음을 규명할 수 있었다.

## REFERENCE

- 1) Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
- 2) 박장상. 혈관내막 증식의 억제. *대한혈관외과학회지* 1999;15:365-374.
- 3) 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.
- 4) 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: 230-235.
- 5) 김명수, 하현주, 김유선, 김혜진, 박재현, 조장환, 박기일. Carvedilol 단독 또는 cyclosporine과의 병합투여가 배양된 백서 대동맥 평활근세포의 이동에 미치는 영향. *대한외과학회지* 2001;60:8-15.
- 6) 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.
- 7) Chakraborti S, Charkaborti T. Oxidant-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear transcription factors in the cardiovascular system: A brief overview. *Cell Signal* 1998;10:675-683.
- 8) Cospedal R, Abedi H, Zcharay I. Platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells. roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *Cardiovasc Res* 1999;41:708-721.
- 9) Hu Y, Zou Y, Dietrich H, Wick G, Xu Q. Inhibition of neointima hyperplasia of mouse vein grafts by locally applied suramin. *Circulation* 1999;100:861-868.
- 10) Kouchi H, Nakamura K, Fushimi K, Sakaguchi M, Miyazaki M, Ohe T, et al. Manumycin A, inhibitor of ras farnesyltransferase, inhibits proliferation and migration of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:915-920.
- 11) Rao GN. Jun B forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosin kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999;274: 6003-6010.
- 12) Gonzalez-Rubio M, Voit S, Rodriguez PD, Weber M, Marx M. Oxidative stress induce tyrosine phosphorylation of PDGF alpha- and beta-receptors and pp60c-src in mesangial cells. *Kidney Int* 1996;50:164-173.
- 13) Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999;31:53-59.
- 14) Ha H, Yu MR, Choi YI, Kitamura M, Lee HB. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappa B activation in monocyte chemoattractive protein-1 mRNA expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:894-902.
- 15) 박재현, 하현주, 김명수, 서지연, 김혜진, 박기일, 김유선. Mycophenolic acid가 배양된 사람 평활근세포의 증식과 그에 관여하는 세포내 신호전달계에 미치는 영향. *대한외과학회지* 2002;62:1-7.
- 16) Sung CP, Arleth AJ, Ohlstein EH. Carvedilol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:221-227.
- 17) Ohlstein EH, Douglas SA, Sung CP, Yue TL, Louden C, Arleth A, et al. Carvedilol, a cardiovascular drug, prevents vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and neointimal formation following vascular injury. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:6189-6193.
- 18) Mii S, Khalil RA, Morgan KG, Ware JA, Kent KC. Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996;270:H142-150.
- 19) Okazaki J, Mawatari K, Liu B, Kent KC. The effects of protein kinase C and its alpha subtype on human vascular smooth muscle cell proliferation, migration and fibronectin production. *Surgery* 2000;128:192-197.
- 20) Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82.
- 21) Jiang B, Yamamura S, Nelson PR, Mureebe L, Kent KC. Differential effects of platelet-derived growth factor isotypes on human smooth muscle cell prolif-

- feration and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery* 1996;120:427-432.
- 22) Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270:296-299.
- 23) 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;27:117-125.
- 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;283:910-917.
- 25) Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Tsuchiya H, Susa S, Tominaga M, 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;31:672-680.
- 26) Kanda Y, Nishio E, Kuroki Y, Mizuno K, Watanabe Y. Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2001;68:1989-2000.
- 27) Kim MS, Park J, Kim H, Ha H, Kim YS. Effects of mycophenolic acid, carvedilol, and rapamycin on growth factor-induced fibronectin secretion by rat vascular smooth muscle cells. The 7th Basic Science Symposium of The Transplantation Society, Thun/Bern, 2001:P89.