

## Mycophenolic Acid가 올레산으로 유도한 흰쥐 혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향

연세대학교 의과대학<sup>1</sup>외과학교실 및<sup>2</sup>장기이식연구소,<sup>3</sup>이화여자대학교 약학대학,<sup>4</sup>가톨릭대학교 의과대학 신장내과 안형준<sup>1</sup> · 박제현<sup>2</sup> · 송재숙<sup>2</sup> · 주만기<sup>1</sup> · 김명수<sup>1,2</sup> · 하헌주<sup>3</sup> · 송기호<sup>4</sup> · 김유선<sup>1,2</sup>

### Effects of Mycophenolic Acid on Oleic Acid-induced Rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

Hyung Joon Ahn, M.D.<sup>1</sup>, Jehyun Park, Ph.D.<sup>2</sup>, Jae Sook Song, M.S.<sup>2</sup>, Man Ki Ju, M.D.<sup>1</sup>, Myoung Soo Kim, M.D., Ph.D.<sup>1,2</sup>, Hunjoo Ha, Ph.D.<sup>3</sup>, Ki Ho Song, M.D. Ph.D.<sup>4</sup>, and Yu Seun Kim, M.D.<sup>1,2</sup>

**Purpose:** Vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation plays an important role in the development and progression of chronic allograft vasculopathy. Mycophenolic acid (MPA) inhibits various mesenchymal cell proliferation, and reactive oxygen species (ROS) are involved in the anti-pro-liferative effect of MPA. In this study, we investigated the effects of MPA on oleic acid (OA)-induced VSMC proliferation and also the role of ROS in these processes.

**Methods:** Primary cultured rat VSMCs from Sprague-Dawley were stimulated with OA 100  $\mu$ M. MPA 0.1~10  $\mu$ M and N-acetylcystein (NAC) 5 mM were administered 1 hour before adding the OA. Cell proliferation was measured by Methylthiazolotetrazolium (MTT) assay, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression by Western blot analysis, and dichlorofluorescein (DCF)-sensitive cellular ROS by flow cytometry.

**Results:** OA at 100  $\mu$ M significantly increased MTT level by 1.6-fold as well as PCNA expression at 48 hours in rat VSMCs. OA also induced DCF-sensitive cellular ROS by 1.6-fold at 5 minutes and the increment of cellular ROS remained for up to 1 hour. MPA at above 1  $\mu$ M inhibited OA-induced VSMC proliferation and cellular ROS in a dose-

dependent manner. NAC 5 mM also inhibited OA-induced rat VSMC activation.

**Conclusion:** These results suggest that MPA inhibits OA-induced VSMC proliferation partially through the inhibition of cellular ROS. (J Korean Surg Soc 2007;72:171-176)

**Key Words:** Mycophenolic acid, Oleic acid, Cell proliferation, Reactive oxygen species

**중심 단어:** Mycophenolic acid, 올레산, 세포증식, 활성 산소족

<sup>1</sup>Department of Surgery and <sup>2</sup>The Research Institute for Transplantation, Yonsei University College of Medicine, <sup>3</sup>Ewha Womans University College of Pharmacy, <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

만성 이식신 부전증은 환자의 사망을 제외하고는 이식신 실패의 가장 많은 원인으로 면역학적 요인과 비면역학적인 요인에 의해 발생한다.(1,2) 진단은 임상적으로 진행성 이식신 기능 저하와 비특이적 병리조직학적 소견인 세뇨관의 위축, 간질성 섬유화, 동맥 혈관 내벽의 섬유성 비후 등이 동반될 때 가능하다.(3) 조직적합 항원의 불일치나 적절하지 못한 면역억제에 기인한 면역학적 원인이나 고혈압, 고지혈증, 고포도당 및 허혈/재관류 등 비면역학적 원인에 의한 혈관내피세포의 손상은 각종 사이토카인과 키모카인 및 접착분자의 표현을 상향 조절하여 백혈구의 부착과 지질이나 단백질 등 혈액 내 거대분자에 대한 투과성을 증가시키고 혈관 평활근 세포의 이동과 증식 및 세포의 기질의 축적을 초래한다. 침윤된 대식세포와 T 세포의 활성화 역시 혈관내피세포의 활성화를 증폭시키고 혈관 평활근 세포가 혈관내막으로 이동하고 증식하게 하는 각종 사이토카인과 키모카인 생산의 증폭에 기여하여 결국 혈관내막의 증식과 경화로 이어지는 혈관 병변을 일으켜 장기에 필요한 산소와 영양공급을 제한하는 허혈성 기능 손상을 유발한다.(1,2)

책임저자 : 김유선, 서울시 서대문구 신촌동 134번지  
☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 02-2228-2115, Fax: 02-313-8289  
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2006년 11월 29일, 게재승인일 : 2006년 12월 26일  
안형준의 현주소: 관동대학교 의과대학 명지병원 외과  
본 연구는 한국과학재단 2006년 특정기초연구(R01-2006-000-108-29-0) 지원으로 이루어졌음.

1990년대 후반부터 사용되기 시작한 강력한 면역억제제인 mycophenolic acid (MPA)는 선택적이고, 비경쟁적인 2형 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) 억제제로서 림프구의 증식을 억제할 뿐 아니라, 혈관 평활근 세포 및 사구체 혈관간세포 등의 비림프구 세포에서도 증식 억제효과를 지니고 있고,(4-6) 또한 혈관 내막증식의 억제효과를 가지고 있어, 현재 만성 이식신 부전증의 진행을 억제할 수 있는 면역억제제로 관심의 대상이 되고 있다.

면역억제제의 근간을 이루고 있는 calcineurin 억제제 (calcineurin inhibitor, CNI)는 이식 후 급성거부반응의 빈도를 줄여서 이식 후 단기 생존율의 향상에 크게 기여하였다. 그러나 CNI의 장기간 사용은 만성 이식신 부전증을 유발하는 위험인자들 중 하나이며, 또한 동반되는 고지혈증 및 당뇨의 발생은 이식 후 혈관 합병증을 가속화시켜 이식신 실패를 초래한다. 따라서 이식 후 고지혈증의 엄격한 관리는 만성 이식신 부전증으로의 진행을 예방할 수 있는 하나의 치료 방침이다.(2)

혈관 평활근세포의 증식 및 혈관 내강의 축소는 동맥경화 형성에 중요 기전 중의 하나로 동맥 경화가 있는 병변의 혈관 평활근세포는 fatty streak의 형성에 중요한 역할을 한다. 최근에 nonesterified fatty acids (NEFA)는 동맥경화증에 중요한 위험인자로 인식되고 있다. 특히 올레산(oleic acid, OA, 18-carbon lipid with one double bond in the cis position (18:1 [cis]))은 혈장에서 가장 높은 농도로 존재하는 지방산으로 혈관 평활근세포에서 angiotensin II,(7) endothelin-1,(8) 및 insulin-like growth factor-I(9)의 growth promoting activity를 증가시킨다. OA는 쥐의 대동맥 혈관 평활근세포의 protein kinase C (PKC)-의존성 및 extracellular signal-regulated kinase (ERK)-의존성 mitogenic response를 유도한다는 사실이 알려져 있으며,(10) 최근에는 PKC의 활성화, 활성산소족(reactive oxygen species, ROS)의 생성 및 ERK의 활성화와 같은 일련의 신호과정을 통해 혈관 평활근세포의 이동을 촉진한다.(11)

ROS는 과거에 반응성이 높은 독성물질로 인식되어 왔으나, platelet-derived growth factor (PDGF)에 의한 혈관평활근 세포의 증식에서 중요한 역할을 함이 보고된 이후 세포 내 신호전달자로 관심이 집중되어 왔다.(12) 특히, superoxide anion과 hydrogen peroxide (과산화수소)는 세포증식과 세포 외기질 합성뿐만 아니라 다양한 생물학적 현상의 주된 기전으로 인식되고 있다. OA에 의한 혈관 평활근 세포의 증식과 이동에도 ROS가 관여한다.(10) MPA는 림프구에서 IMPDH에 의존적인 방식으로 세포 증식을 억제하지만(5) 상대적으로 IMPDH의 발현이 적은 혈관 평활근 세포에서는 IMPDH 의존적 또는 비의존적인 경로로 PDGF에 의하여 유도된 ROS 및 하위 신호전달자를 억제하여 세포 증식과 세포외기질 단백 합성을 억제한다.(13,14)

본 연구의 목적은 MPA가 지방산의 일종인 OA로 유도한

혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향 및 이에 관여하는 신호전달계로서 OA에 의하여 유발되는 세포 내 ROS 증가에 미치는 효과를 관찰하였다.

## 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

몸무게 200~250 g의 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 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 담아 대동맥으로부터 지방 조직과 혈액 등을 제거한 다음, collagenase (Worthington Biochemical Co., Greenhold, NJ, USA)가 함유된 Eagle's minimum essential medium (EMEM) 배양액에 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 대동맥의 외막과 내막을 dissecting microscope (Olympus SZ 40, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) 하에서 박리한 후 잘게 잘랐다. 절편들을 collagenase가 함유된 EMEM 배양액에 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, FBS)이 함유된 EMEM과 함께 배양 용기에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 anti- $\alpha$ 1-actin antibody (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)를 이용한 면역조직화학염색을 시행하여 혈관 평활근 세포임을 확인하였다.

### 3) 약물 투여

세포들로 배양용기가 찼을 때 혈청배제 EMEM 배양액으로 교환하여 48시간 배양하여 세포성장을 동일화하였다. 이후 새로운 혈청배제 배양액으로 교환하면서 vehicle로 에탄올을 사용한 OA를 투여하여 배양하였다. MPA, N-acetylcystein (NAC)은 OA 투여 1시간 전에 투여하였다. NAC의 유효 농도는 예비실험으로 결정하였다.

### 4) Methylthiazolotetrazolium (MTT)

실험 종료 후 MTT 1 mg/ml을 첨가하여 세포배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 extraction buffer (20% SDS, 50% N, N-dimethylformamide, pH 4.7)를 첨가한다. 24시간 경과 후 microplate reader (SpectraMax 340, Molecular Devices Co.,

CA, USA)를 이용하여 562 nm에서 MTT 양을 측정하였다.

### 5) Flow cytometry

세포를 PBS로 2회 세척한 후 산화에 민감한 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DC-FH-DA; Molecular probe, Eugene, Oregon, USA) 5  $\mu$ M을 첨가하여 20분 동안 세포 배양기에 방치하여 세포 내로 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 측정하였다.

### 6) Western blot 분석

실험이 종료된 세포는 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  $\mu$ g/ml aprotinin, 20  $\mu$ M 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 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 세포를 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백을 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 5분 동안 가열하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개 분리한 후 nitrocellulose 흡착지(Bio-Rad)에 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 일차 항체로 2시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) 항체는  $\beta$ -actin 항체로 보정하였다. 이차 항체 (HRP-conjugated anti-mouse IgG; Santacruz, Santacruz, CA, USA)는 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 이차 항체를 검출하였다.

### 7) 통계처리

모든 실험결과와 측정치는 “평균(mean)  $\pm$  표준오차(standard error)”로 나타내었으며, 여러 군 간의 통계학적인 비교는 ANOVA로, 두 군 간의 통계학적인 비교는 Student's T-test를 시행하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1) MPA가 OA에 의한 흰쥐 혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향

OA의 유효농도를 검색하기 위하여 OA 50, 100, 200  $\mu$ M을 투여하고 48시간 후에 세포증식을 MTT로 측정하였다. OA 50과 200  $\mu$ M은 유의한 혈관 평활근 세포의 증식을 유도하지 못하였지만, OA 100  $\mu$ M은 대조군에 비하여 혈관 평활근 세포증식을 1.6  $\pm$  0.1배 증가시켰다(Fig. 1A, P < 0.05) 또한 OA 100  $\mu$ M 투여 후 48시간에 세포증식의 다른 지표인 PCNA 표현이 유의하게 증가되었다(Fig. 1C). MPA는 0.1, 1, 10  $\mu$ M을 투여하여 OA가 있는 군과 없는 군으로 분류하여 실험하였다. MPA 10  $\mu$ M 이하는 기저수준의 MTT에 영향을 미치지 않으므로써 혈관 평활근 세포에 독성이 없었다. MPA 1  $\mu$ M 이상은 OA에 의하여 유도된 MTT(Fig. 1B, P < 0.05) 및 PCNA 표현(Fig. 1C) 증가를 농도 의존적으로 감소시켰다.

### 2) MPA가 OA에 의해 유도된 혈관 평활근 세포의 세포 내 ROS에 미치는 영향

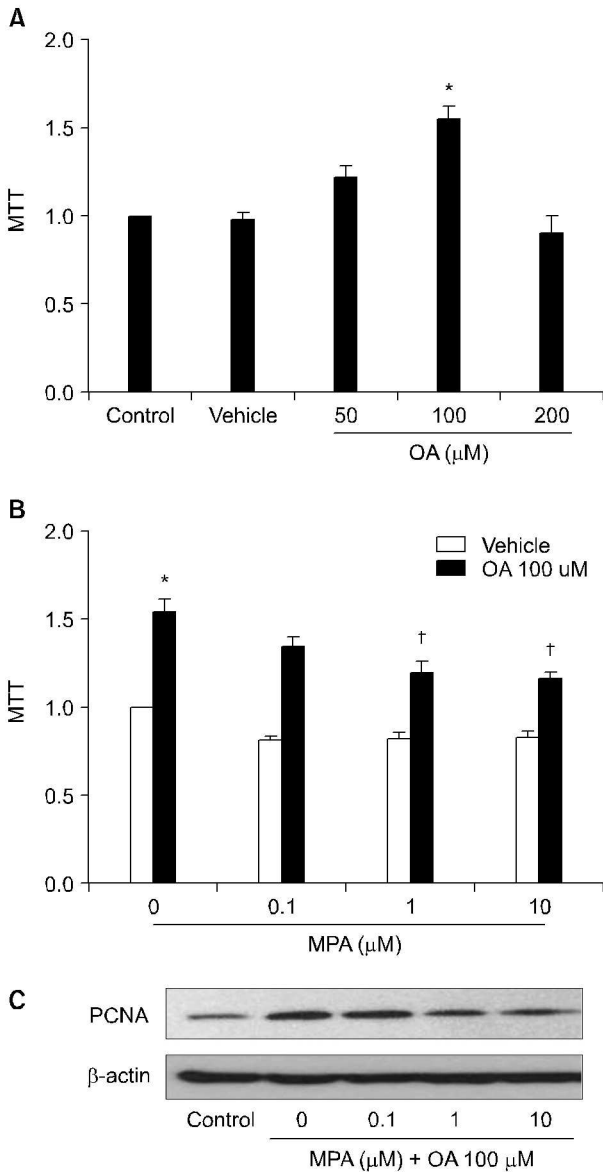
세포 내 ROS는 OA 100  $\mu$ M 투여 후 5분부터 대조군에 비하여 1.6  $\pm$  0.1배 증가하였고, 한 시간까지 대조군과 비교하여 유의하게 지속되었다(Fig. 2A, P < 0.05). MPA 1  $\mu$ M 이상은 OA 100  $\mu$ M 투여 후 5분에 증가한 세포 내 ROS를 농도 의존적으로 억제하였고, 항산화제인 NAC 5 mM 또한 유의한 억제효과를 보였다(Fig. 2B, P < 0.05).

### 3) NAC에 의한 혈관 평활근 세포의 세포 내 ROS에 미치는 영향

세포 내 ROS가 OA에 의하여 유도된 혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 항산화제인 NAC 5 mM을 OA 투여 한 시간 전에 투여하였다. NAC 5 mM은 OA 100  $\mu$ M에 의하여 유도된 혈관평활근 세포의 MTT와 PCNA 표현증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 3).

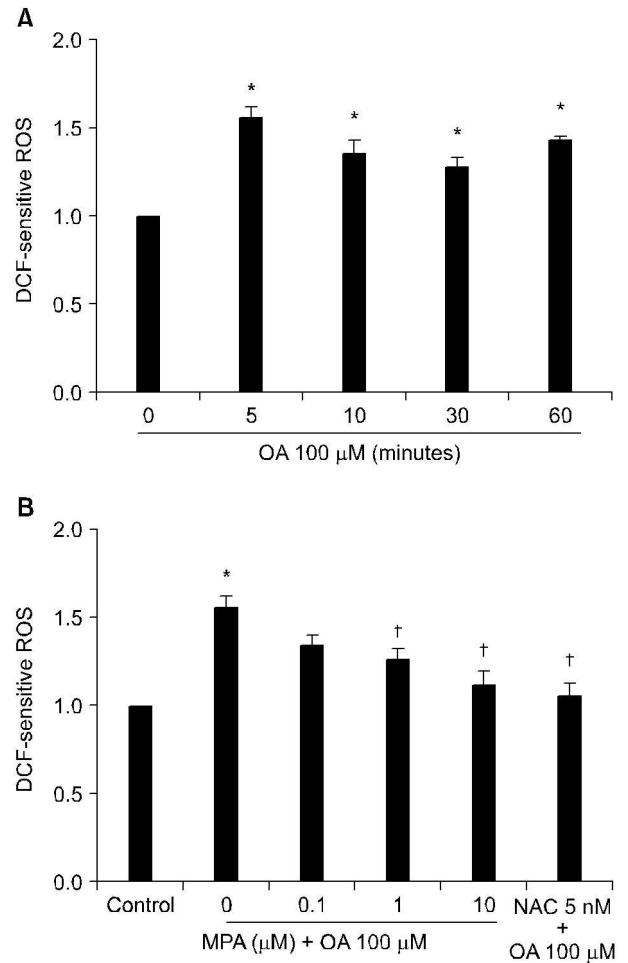
## 고 찰

신장이식 후 발생하는 만성 이식신 부전증은 이식신 실패의 주된 원인으로 현재까지 만성 이식신 부전증의 발생을 차단하고 만성병증을 회복시키는 약제의 개발성과는 제한적이다. Rapamycin과 mycophenolate mofetil (MMF)은 이식신 생존율을 증가시키고 만성 이식신 부전증으로의 진행을 억제한다는 보고가 있다.(15,16) 현재까지의 만성 이식신 부전증의 치료 방향은 회복을 시키는 쪽보다는, 만성 이식



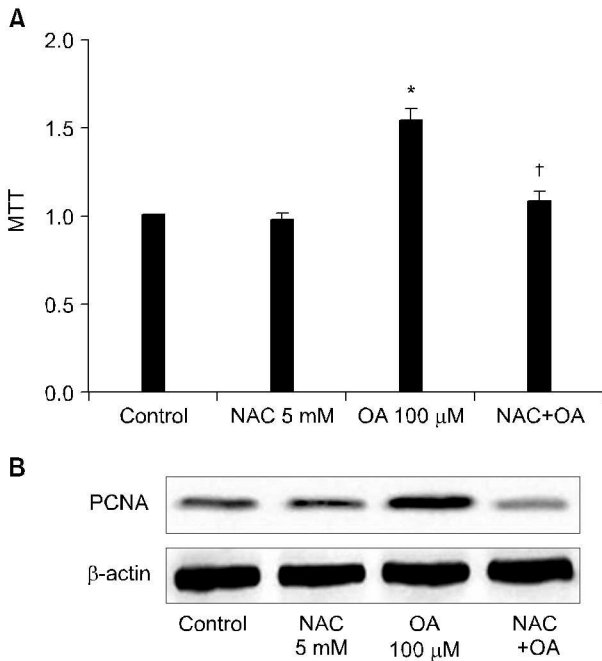
**Fig. 1.** Effects of MPA on OA-induced rat VSMC proliferation. (A) Dose response of OA on MTT level. (B) Effects of MPA on OA-induced MTT level. Data are presented as the mean  $\pm$ SE of five experiments. (C) Effects of MPA on OA-induced PCNA expression. Data are presented as representative Western blot. \*P<0.05 vs. control; †P<0.05 vs. OA alone.

신 부전증을 유발할 수 있는 위험요인을 제거하면서 신독성이 적은 면역 억제제를 병합 투여하는 것이다.(2) 면역억제제의 근간을 이루고 있는 CNI는 혈관 수축과 신장 혈류 감소를 일으켜 이식신 부전증의 원인이 된다.(15) 결국 장기기간 CNI에 노출될 때 이식 후 수개월 또는 수년에 걸쳐 만성 이식신 부전증을 유발할 수 있다. 이식신장의 반복적인 손상은 다양한 성장인자의 분비를 촉진시켜 간질과 혈



**Fig. 2.** Effects of MPA on OA-induced cellular ROS in rat VSMCs. (A) Time response of OA on cellular ROS. (B) Effects of MPA on OA-induced cellular ROS. Data are presented as the mean  $\pm$ SE of five experiments. \*P<0.05 vs. control; †P<0.05 vs. OA alone.

관 섬유화를 유발한다.(17-22) 즉 CNI는 우수한 면역억제제이나 만성 이식신병증의 관점에서 보면 가능한 한 적은 용량의 투여가 권장되며 신독성이 적은 다른 면역억제제로의 대체 투여가 필요하다.(23) 최근 임상에서 사용되기 시작한 rapamycin은 mTOR과 결합하여 면역억제 작용을 하는 약제로서 항증식 효과가 있어 만성거부반응의 병리소견인 평활근 세포와 혈관내피세포의 증식을 억제하는 효과가 있으며,(24) 임상에서 만성 이식신 부전증의 진행을 억제하는데 사용하고 있다. 또한 만성 이식신 부전증에 효과가 있는 것으로 알려진 MMF의 활성물질인 MPA는 IMPDH의 억제를 통한 de novo purine DNA 합성 중 guanosine의 생성 경로를 차단하는 것으로 알려져 있다.(5) 동물 실험에서 MMF가 평활근 세포의 성장을 억제하여 혈관내막의 증식을 억제한다는 보고가 있다.(25) 본 연구에서는 이식 후 흔히 발생하



**Fig. 3.** Effects of NAC on OA-induced rat VSMC proliferation. (A) Effects of NAC on OA-induced MTT level. Data are presented as the mean ± SE of five experiments. (B) Effects of NAC on OA-induced PCNA expression. Data are presented as representative Western blot. \*P < 0.05 vs. control; †P < 0.05 vs. OA alone.

는 고지혈증이 혈관 합병증 및 만성 이식신 부전증으로의 진행을 촉진시키는 인자라고 가정하고, 지방산으로 유도된 혈관 평활근 세포의 증식에 대한 MPA의 억제 기전에 대하여 조사하였다. 본 연구에서도 OA 100 μM로 혈관 평활근 세포를 자극한 결과로 이전의 보고(10)처럼 혈관 평활근 세포의 증식 및 세포 내 ROS가 증가하였다. 또한 MPA의 사용은 OA에 의한 세포증식을 용량의존적으로 통계적으로 유의하게 억제하였다. 본 실험에서 사용된 MPA의 농도는 임상적으로 사용이 가능하며 세포독성이 없는 범주 내에 있음을 기존 논문의 고찰을 통하여 확인하였으나,(26-28) 임상적 유용성에 대한 실험은 좀 더 필요할 것으로 생각한다. Hauser 등(29)은 비립프구인 사구체 혈관간 세포를 사용한 실험에서 MPA가 립프구에서처럼 guanosine 생성 억제를 통해 세포 증식을 억제한다고 보고한 바 있고, Gu 등(30)은 MPA에 의한 hematopoietic cell의 세포사멸 기전에서 guanine nucleotide 억제에 의한 ERK, Akt, 그리고 mammalian target of rapamycin (mTOR) 관련 세포 내 신호전달계를 억제함을 보고하였다. Lu 등은 최초로 OA에 의한 혈관 평활근 세포의 증식에서 ROS가 관여함을 제시하였다.(10) 본 연구에서도 OA는 5분에 세포 내 ROS를 최대로 증가시켰고, 60분까지 효과가 지속되었다. MPA 1과 10 μM에서 통계적으로 유의하게 OA에 의하여 증가된 혈관 평활근 세포의

ROS 생성을 감소시켰고, 항산화제인 NAC 또한 유사한 효과를 나타내었다. 세포 내 ROS에 대한 MPA의 유효 농도는 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 효과와 유사한 농도에서 관찰되었다. 이것은 MPA의 항산화 작용이 이식 후 만성 이식신 부전증의 병태 생리현상인 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 데 필요하다고 가정할 수 있다. OA에 의한 혈관 평활근 세포의 ROS 생성에 대한 MPA의 항산화 효과는 본 연구에서 최초로 입증된 것이며, 세포 내 ROS에 대한 억제 기전을 밝힘으로써 보다 정확한 MPA의 작용기전을 이해할 수 있을 것으로 기대된다. MPA가 OA에 의한 혈관 평활근 세포의 증식과 세포 내 ROS를 억제하는 기전은 다른 IMPDH 억제제인 tiazofurin(31)과 ribavirin(32)의 예와 함께 PDGF에 의한 혈관 평활근 세포의 ROS 증가를 억제할 수 있다는 기존 논문(13,14)에서 추론해 볼 수 있다. 기본적으로 IMPDH 억제를 통하여 발생된 세포 내 guanosine 양의 감소는 다양한 세포 내 신호전달계의 이상을 초래하고, 특히 small G 단백질의 일종인 rac, ras 및 rho의 활성화 감소는 필연적으로 연관되어 있다.(33)

## 결론

본 연구의 결과는 MPA가 OA에 의하여 유도된 흰쥐 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하며, MPA에 의한 ROS 억제가 혈관 평활근 세포의 억제과정의 기전이 될 수 있음을 시사하고 있다.

## REFERENCES

- 1) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-33.
- 2) Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81:643-54.
- 3) Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713-23.
- 4) Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 2000;47:63-83.
- 5) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000;47:85-118.
- 6) 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.
- 7) Lu G, Meier KE, Jaffa AA, Rosenzweig SA, Egan BM. Oleic acid and angiotensin II induce a synergistic mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998;31: 978-85.

- 8) Kwok CF, Shih KC, Hwu CM, Ho LT. Linoleic acid and oleic acid increase the endothelin-1 binding and action in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Metabolism* 2000;49:1386-9.
- 9) Askari B, Carroll MA, Capparelli M, Kramer F, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Oleate and linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277:36338-44.
- 10) Lu G, Greene EL, Nagai T, Egan BM. Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998;32:1003-10.
- 11) Greene EL, Lu G, Zhang D, Egan BM. Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension* 2001;37:308-12.
- 12) 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;270:296-9.
- 13) Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, et al. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant* 2004;4:1982-90.
- 14) Park J, Ha H, Kim MS, Huh KH, Kim YS. Mechanisms involved in the inhibitory effects of mycophenolic acid on the PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Korean J Nephrol* 2004;23:567-76.
- 15) Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
- 16) Meier-Kriesche HU, Steffen BJ, Hochberg AM, Gordon RD, Liebman MN, Morris JA, et al. Long-term use of mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection. *Am J Transplant* 2003;3:68-73.
- 17) Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1999;67:929-33.
- 18) Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1-12.
- 19) Benigni A, Bruzzi I, Mister M, Azzollini N, Gaspari F, Perico N, et al. Nature and mediators of renal lesions in kidney transplant patients given cyclosporine for more than one year. *Kidney Int* 1999;55:674-85.
- 20) Chareandee C, Herman WH, Hricik DE, Simonson MS. Elevated endothelin-1 in tubular epithelium is associated with renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis* 2000;36:541-9.
- 21) Alpers CE, Davis CL, Barr D, Marsh CL, Hudkins KL. Identification of platelet-derived growth factor A and B chains in human renal vascular rejection. *Am J Pathol* 1996;148:439-51.
- 22) Grandaliano G, Di Paolo S, Monno R, Stallone G, Ranieri E, Pontrelli P, et al. Protease-activated receptor 1 and plasminogen activator inhibitor 1 expression in chronic allograft nephropathy: the role of coagulation and fibrinolysis in renal graft fibrosis. *Transplantation* 2001;72:1437-43.
- 23) Morales JM, Wramner L, Kreis H, Durand D, Campistol JM, Andres A, et al. Sirolimus does not exhibit nephrotoxicity compared to cyclosporine in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2002;2:436-42.
- 24) Webster AC, Lee VW, Chapman JR, Craig JC. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* 2006;81:1234-48.
- 25) Shimizu H, Takahashi M, Takeda S, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y, et al. Mycophenolate mofetil prevents transplant arteriosclerosis by direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Transplantation* 2004;77:1661-7.
- 26) Allison AC, Eugui EM. Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 1993;25:8-18.
- 27) Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, James A, Lee J, Tromp JV, et al. Mycophenolic acid 12-h trough level monitoring in renal transplantation: association with acute rejection and toxicity. *Am J Transplant* 2006;6:121-8.
- 28) Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, Meiser B, van Gelder T. Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Ther Drug Monit* 2001;23:305-15.
- 29) 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* 1999;14:58-63.
- 30) Gu JJ, Gathy K, Santiago L, Chen E, Huang M, Graves LM, et al. Induction of apoptosis in IL-3-dependent hematopoietic cell lines by guanine nucleotide depletion. *Blood* 2003;101:4958-65.
- 31) Kharbanda SM, Sherman ML, Kufe DW. Effects of tiazofurin on guanine nucleotide binding regulatory proteins in HL-60 cells. *Blood* 1990;75:583-8.
- 32) 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* 2000;404:49-62.
- 33) Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases. A family of reunion. *Cell* 2000;103:227-38.