

Inosine Monophosphate Dehydrogenase 억제가 배양된 생쥐 사구체 혈관간 세포에서 PDGF에 의한 Fibronectin 분비와 세포내 활성산소족에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 ¹장기이식연구소, ²외과학교실

박제현¹ · 송재숙¹ · 허규하¹ · 주만기² · 장혜경² · 안형준¹ · 김명수^{1,2} · 김유선^{1,2}

Effects of Inosine Monophosphate Dehydrogenase Inhibition on Platelet-derived Growth Factor-Induced Fibronectin Secretion and Cellular Reactive Oxygen Species in Mouse Mesangial Cells

Jehyun Park, Ph.D.¹, Jae Sook Song, M.S.¹, Kyu Ha Huh, M.D.¹, Man Ki Ju, M.D.², Hye Kyung Chang, M.D.², Hyung Joon Ahn, M.D.¹, Myoung Soo Kim, M.D.^{1,2} and Yu Seun Kim, M.D., Ph.D.^{1,2}

¹The Research Institute for Transplantation and ²Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Mesangial cell extracellular matrix (ECM) synthesis plays an important role in various renal diseases. Mycophenolic acid (MPA), which is an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), inhibits mesangial cell proliferation and ECM synthesis. However, the exact mechanism of MPA has not been clearly elucidated in mesangial cells. To examine the relative importance of IMPDH on the inhibitory action of MPA, we compared the effects of MPA or IMPDH2 siRNA on platelet-derived growth factor (PDGF)-induced fibronectin secretion and cellular reactive oxygen species (ROS) in mouse mesangial cells (MMC). **Methods:** MMC were stimulated with PDGF 10 ng/ml with or without MPA 0.1 ~ 10 μ M, IMPDH2 siRNA 10 ~ 50 nM, or N-acetylcystein (NAC). IMPDH2 siRNA was transiently transfected by lipofectamine for 24 hours. MPA 0.1 ~ 10 μ M, ribavirin 10 ~ 100 μ M, and NAC 5 mM were administered 1 hour before the stimulation. Cell viability was measured by methylthiazolotetrazolium (MTT) assay, fibronectin secretion by Western blot analysis, and dichlorofluorescein

(DCF)-sensitive cellular ROS by flow cytometry. **Results:** PDGF 10 ng/ml effectively increased fibronectin secretion and cellular ROS in MMC. MPA and NAC at concentration without affecting basal level of fibronectin and cellular ROS ameliorated PDGF-induced fibronectin secretion and cellular ROS. However, IMPDH2 siRNA only partially reduced PDGF-induced fibronectin secretion and cellular ROS in MMC. **Conclusion:** These results suggest that MPA may inhibit PDGF-induced fibronectin secretion partly through IMPDH2 or cellular ROS in MMC, and there may be other mechanisms on the inhibitory action of MPA in mesenchymal cells. (J Korean Soc Transplant 2007;21:210-215)

Key Words: Mycophenolic acid, Inosine monophosphate dehydrogenase, Mesangial cells, Reactive oxygen species

중심 단어: 마이코페놀산, Inosine monophosphate dehydrogenase, 사구체 혈관간 세포, 활성산소족

서 론

신장이식 후 급성거부반응의 발생빈도가 감소하고 1년 이식신 생존율이 향상되고 있음에도 불구하고 이식후 1년 이상 경과되어 발생하는 만성 이식신 기능부전증의 발생빈도는 감소하지 않고 있다.

신장이식 후 발생하는 만성 이식신 기능부전증은 이식신 소실의 주요 원인으로, 특징적인 병리 소견은 내막증식증이나 혈관경화증 등과 같은 혈관병변, 세뇨관의 위축 및 사구체 병변으로 구분될 수 있다. 이러한 병리소견은 혈관중막 내에 위치한 혈관 평활근세포의 증식은 물론 사구체 혈관간세포의 증식으로 초래되는 것으로 알려져 있다. 사구체 혈관간세포와 세포외기질은 신사구체 총액의 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하는 구조로서, 사구체경화증을 일으키는 질환에서 사구체 혈관간세포의 증식과 세포외 기질의 침착은 공통적인 병리소견이다.(1,2) 현재 임상에서 사

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

본 연구는 2006년도 대한이식학회 젊은 연구자 연구비의 지원으로 수행되었음(수혜자: 박제현).

용중인 mycophenolic acid (MPA)는 혈관 평활근세포 및 사구체 혈관간세포의 증식 및 세포외기질 합성을 억제함이 보고되어 있다.(3-6)

MPA는 세포내 guanosine 합성에 중요한 효소인 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)에 대한 선택적이고 비경쟁적인 억제제(7)로서 면역세포의 사멸을 유도할 뿐 아니라 각종 중배엽성 기원 세포의 증식 및 세포외기질 합성을 억제한다. 본 연구진은 흰쥐 혈관 평활근세포와 사구체 혈관간세포에서 MPA가 platelet-derived growth factor (PDGF) 또는 oleic acid에 의한 세포증식 및 ECM 합성을 억제하고 IMPDH 의존적 또는 비의존적인 경로를 통하여 세포내 신호전달계가 억제됨을 이미 보고한 바 있다.(3-6) 특히, 세포내 guanosine 합성은 세포나 조직에 따라 salvage와 de novo 경로의 이용을 달리하기 때문에, 주로 de novo 경로를 억제하는 MPA의 기전을 고려해 볼 때, 상대적으로 de novo 경로의 이용이 적은 사구체 혈관간세포에서 IMPDH와 MPA의 억제 기전에 대한 분자생물학적 수준에서의 이해는 필수적이다.

세포내 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)은 PDGF에 의한 혈관 평활근세포의 증식에 있어서 중요한 역할을 함이 인식된 이후 중요한 세포내 신호전달자로 알려져 왔다.(8,9) 다양한 질환에서 ROS의 역할이 발견되고 있고, 본 연구진 또한 이식후 1년 이상 경과한 환자의 혈액내 단핵구의 세포내 ROS와 혈청내 지질과산화물이 증가함을 보고한 바 있다.(10,11) 또한 MPA가 혈관 평활근세포 및 내피세포에서 ROS 억제능을 보인 바 있으므로,(3,12) 약물의 부작용이나 새로운 억제기전 존재의 가능성을 고려한다면 MPA의 표적분자인 IMPDH의 유전적 억제방법을 이용하여, 세포활성화 및 ROS를 억제하는 MPA의 효과와의 비교를 통해, IMPDH의 중요성에 대한 좀 더 자세한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 MPA와 IMPDH의 small interference RNA (siRNA)가 PDGF-BB에 의한 사구체 혈관간세포의 fibronectin 분비와 세포내 활성산소종 생산에 미치는 영향을 비교 검색하였다.

방 법

1) 생쥐 사구체 혈관간세포(mouse mesangial cell) 배양

생쥐 사구체 혈관간세포는 SV-40로 변형시킨 immortalized cell line을 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 5% 우태아혈청(fetal bovine serum, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA), 100 U/ml penicillin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 및 100 µg/ml streptomycin (Sigma Chemical Co.)을 함유한 Duplecco's modified Eagles medium (DMEM, Invitrogen)에서 배양하였다.

2) Methylthiazolotetraolium (MTT)

실험이 종료된 후 phenol-red와 혈청이 배제된 DMEM 배지에 1 mg/ml이 되도록 MTT를 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. Extraction buffer (20% SDS, 50% N, N-dimethylformamide, pH 4.7)를 첨가한 후 24시간 경과 후 microplate reader (SpectraMax 340, Molecular Devices Co., CA, USA)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Flow cytometry

실험이 종료된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 산화에 민감한 형광소식자인 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA, Molecular Probe, Eugene, OR, USA) 5 µM을 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.

4) IMPDH siRNA 제작 및 세포내 유입

생쥐에 특이적인 2형 IMPDH의 siRNA는 Ambion사에서 제공하는 pre-designed siRNA를 주문하여 사용하였다. 기초 실험에서 정해진 농도의 siRNA를 lipofectamine과 plus reagent를 혼합한 용액에서 각각 15분간 반응시킨 후 24시간 동안 세포내 유입을 유발하였다. Cy3가 부착된 siRNA를 사용하여 세포내 유입 정도를 형광현미경으로 관찰하였고, IMPDH2의 mRNA 표현을 realtime PCR로 측정하여 siRNA의 효과를 측정하였다.

5) Realtime RT-PCR

총 RNA는 TRIzol (Invitrogen)로 분리하였고, 정량한 5 µg의 RNA는 reverse transcription premix (Maxime RT premix, 인트론, 서울, 한국)으로 42°C에서 50분간 반응시킨 후 95°C에서 10분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. IMPDH2의 mRNA 수준은 SYBR green이 포함된 realtime PCR premix (Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 7500 Realtime PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)로 분석하였다. PCR 산물의 특이성을 확인하기 위하여 melting curve와 agrose gel 전기영동을 시행하였다.

6) Western blot 분석

실험이 종료된 세포는 배양액을 수거하여 fibronectin 분석에 사용하였다. 수거한 배양액은 5,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포의 잔해물을 제거하였다. 배양액을 제거한 세포는 냉장보관 PBS로 1회 세척한 후 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 20 µM leupeptin)를 넣고

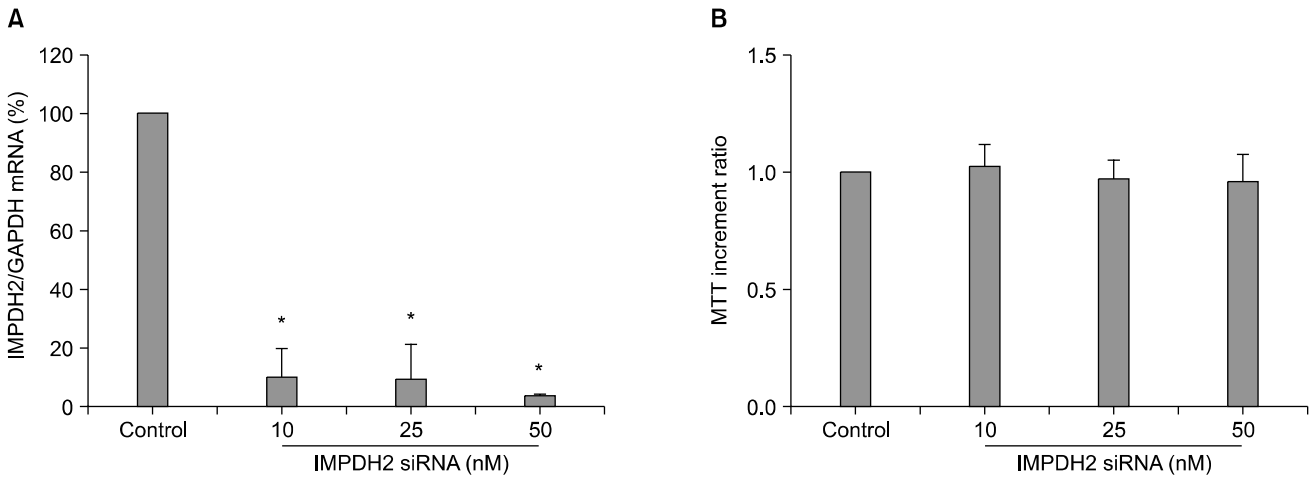


Fig. 1. IMPDH2 mRNA expression (A) and cell viability (B) transfected with IMPDH2 siRNA in mouse mesangial cells. Data are presented as the mean±SE of five experiments. *P<0.05 vs. control.

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. 세포내 단백으로 보정된 배양액은 sample buffer (12 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.5% glycerol, 0.4% SDS, 2.88 mM 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)와 혼합하여 95°C에서 5분 동안 가열하였다. 6% 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 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 fibronectin 항체(DAKO Japan Co., Tokyo, Japan)로 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 항체를 검출하였다.

7) 통계처리

모든 실험결과와 측정치는 “평균±표준 오차”로 나타내었고, 각 군간의 통계학적인 비교는 분산분석(ANOVA)과 Fisher의 최소유의차 검정법을 시행하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) IMPDH2 siRNA 투여가 생쥐 사구체 혈관간세포의 IMPDH2 mRNA 표현과 세포활성에 미치는 영향

생쥐 사구체 혈관간세포에서 IMPDH2 mRNA 표현을 측정하여 IMPDH2 siRNA의 세포내 유입효과를 측정하였다.

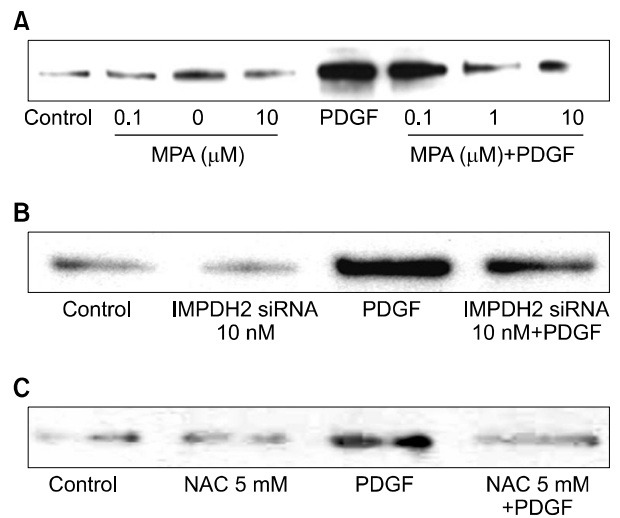


Fig. 2. Fibronectin secretion exposed to PDGF with or without MPA (A), IMPDH2 siRNA (B), or NAC (C). Data are presented as a representative Western blot of five experiments.

IMPDH2 mRNA 표현은 IMPDH2 siRNA를 10 nM 이상 투여하였을 때 90% 이상 감소되어 통계적으로 유의하였다(Fig. 1A, P<0.05). 실험에 사용한 농도의 IMPDH2 siRNA는 기저 수준의 세포활성에 영향이 없었다(Fig. 1B, P>0.05).

2) MPA, IMPDH2 siRNA 및 NAC가 PDGF에 의한 fibronectin 분비에 미치는 영향

PDGF 10ng/ml 투여 후 24시간에 생쥐 사구체 혈관간세포의 fibronectin 분비는 효과적으로 증가되었고, MPA는 1 μM 이상의 농도에서 PDGF에 의하여 증가된 fibronectin 분비를 현저히 감소시켰다(Fig. 2A). 반면에 IMPDH2 siRNA는

PDGF에 의하여 증가된 fibronectin 분비를 기저수준까지 감소시키지 못하여 부분적인 효과만을 나타내었다.(Fig. 2B)

기존 연구에서 MPA의 효과가 주요 표적단백인 IMPDH2와 함께 활성산소종의 억제를 통하여 나타났으므로, 항산화제인 NAC를 투여하여 실험하였다. NAC 5 mM은 PDGF에 의하여 증가된 fibronectin 분비를 효과적으로 감소시켰다(Fig. 2C).

3) MPA와 IMPDH2 siRNA가 PDGF에 의한 세포내 활성산소종에 미치는 영향

PDGF 10ng/ml은 생쥐 사구체 혈관간세포의 세포내 활성산소종을 5분에, 대조군과 비교하여 1.9배 증가시켰다.(Fig. 3A, $P < 0.05$) MPA는 농도의존적으로 PDGF에 의한 활성산소종 증가를 억제하여 100 nM 이상에서 통계적으로 유의하게 억제하였다(Fig. 3B, $P < 0.05$). IMPDH2 siRNA 투여는 PDGF에 의하여 증가된 세포내 활성산소종을 기저 수준의 1.3배로 감소시켰다(Fig. 3C, $P < 0.05$).

고 찰

신장이식 후 발생하는 만성 이식신 부전증이 이식신 손실의 중요 원인임에도 불구하고 아직까지 임상적으로 만족할 만한 치료법이 없는 실정이다. 현재 신장이식 후 장기생존율의 향상을 위해 만성 이식신 부전증을 예방하고 진행을 억제할 수 있는 기전과 약제의 개발이 연구 중에 있다.(1,2) MPA는 사구체 혈관간세포의 증식뿐만 아니라 세포외기질 단백질의 생산 및 축적을 억제할 수 있는 약제로서, 임상적으로도 이식신의 생존율을 증가시키고 만성 이식신 부전증으로의 진행을 억제한다는 보고가 있다.(13,14) 현재까지 MPA는 다양한 자극에 의한 세포외기질 단백질 합성을 억제함이 보고되어 있고, 본 연구에서도 MPA는 생쥐의 사구체 혈관간세포에서 PDGF에 의하여 증가된 fibronectin의 생산을 농도의존적으로 억제하였다. MPA의 fibronectin 생산 억제 효과는 본 연구진에서 일차 배양한 흰쥐의 사구체 혈관간세포 및 혈관 평활근세포에서 얻어진 결과뿐만 아니라,(5,6) 다른 연구진의 사람 사구체 혈관간세포에서 TGF- β 1에 의하여 증가된 세포외기질 단백질 합성을 억제하는 결

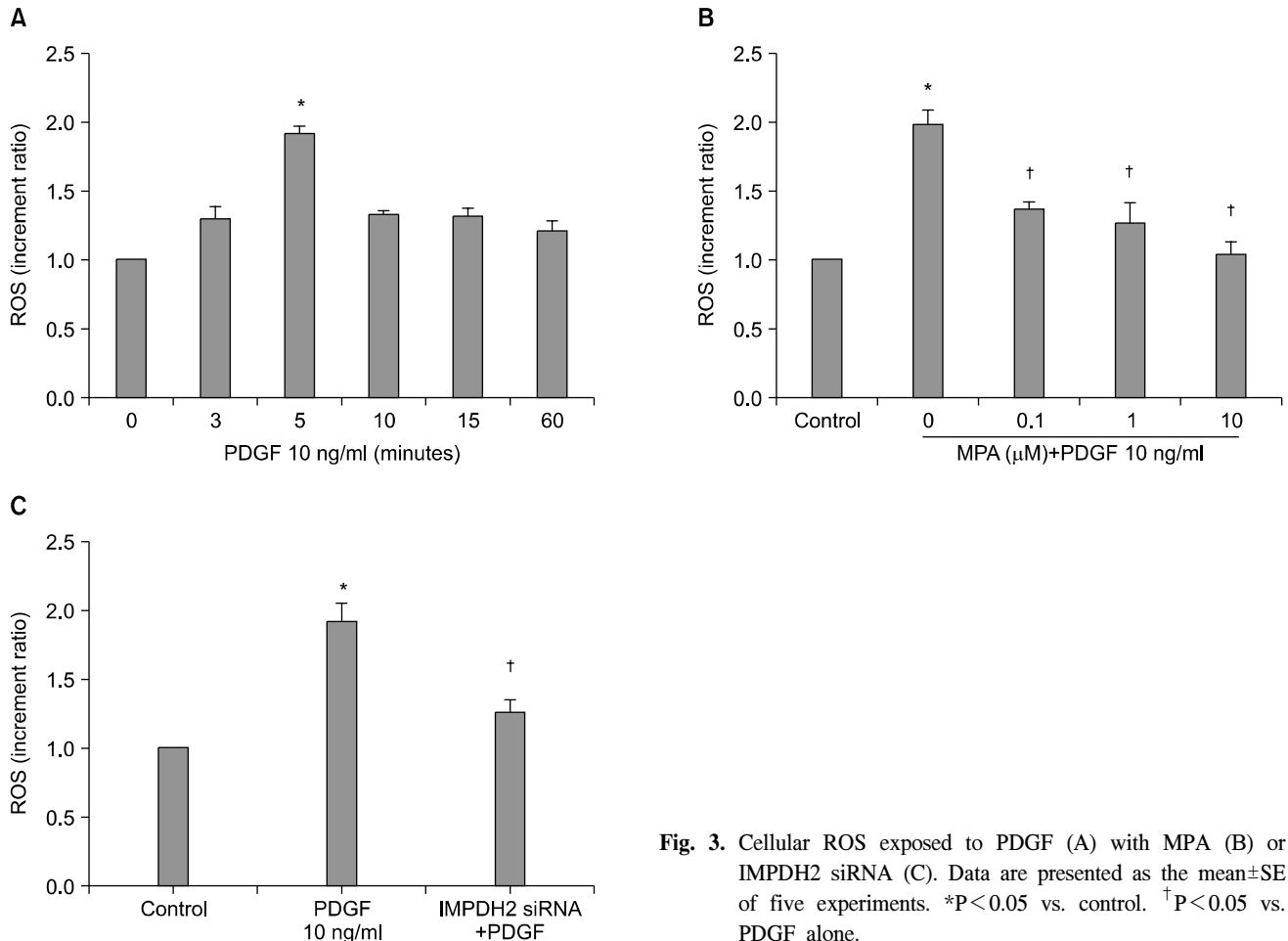


Fig. 3. Cellular ROS exposed to PDGF (A) with MPA (B) or IMPDH2 siRNA (C). Data are presented as the mean±SE of five experiments. * $P < 0.05$ vs. control. † $P < 0.05$ vs. PDGF alone.

과와 일치한다.(15)

MPA가 사구체 혈관간세포에서 증식 및 세포외기질 단백질 합성을 억제하는 기전으로서 기존의 주요 표적 분자인 IMPDH2가 제시되고 있고, 이미 외부에서 투여한 guanosine 이 이를 회복시키는 결과가 있다.(16) 하지만, 외부에서 투여한 guanosine은 MPA의 혈관 평활근세포의 증식 억제를 부분적으로 회복시켰다.(3) 이는 중배엽성 기원의 세포에서 IMPDH2의 역할이 제한적인 기존의 보고(6)와 함께 MPA가 다른 약리학적 기전을 통하여 세포의 증식 및 세포외기질 단백질의 생산을 억제할 수 있음을 시사한다. 실제로 IMPDH2의 siRNA는 효과적으로 PDGF에 의하여 증가된 fibronectin 생산을 억제하였지만, 그 효과가 제한적이었다. 이는 외부에서 투여한 guanosine이 MPA의 억제효과를 부분적으로 회복시킨 결과와 함께 MPA의 세포 증식 및 세포외기질 단백질 합성에 대한 억제 효과가 IMPDH2를 경유하지만 부분적임을 시사하는 것이다. 또한, NAC가 PDGF에 의한 사구체 혈관간세포의 fibronectin 분비를 억제한 결과는 혈관 평활근세포나 내피세포뿐만 아니라 사구체 혈관간 세포에서도 세포내 활성산소족이 PDGF에 의한 fibronectin 분비에서 중요한 역할을 하며, MPA의 fibronectin 분비 억제가 세포내 활성산소족에 대한 억제 기전을 경유하여 발생할 수 있음을 시사하고 있다.

세포내 활성산소족은 다양한 세포내 신호전달계의 활성화뿐만 아니라 세포의 증식과 세포외기질 단백질의 합성에도 중요한 역할을 하는 세포내 공통신호전달계로서 기존 연구에서 MPA의 대체 표적으로 제시되고 있다.(3,12) 본 연구에서도 PDGF에 의하여 세포내 활성산소족은 5분에 최대로 증가하고 다른 시간대에서는 변화가 없었다. MPA는 PDGF 투여 후 5분에 증가된 세포내 활성산소족에 대하여 농도의존적인 감소효과를 보였다. 하지만, IMPDH2 siRNA는 fibronectin 생산억제와 유사하게 PDGF에 의한 세포내 활성산소족을 부분적으로 억제하였다. MPA는 일차배양한 흰쥐 사구체 혈관간세포에서 세포내 신호전달계 중 p38 mitogen-activated protein kinase를 억제하며, 외부에서 투여한 guanosine 이 부분적인 회복효과를 보인다.(5) MPA가 사구체 혈관간 세포에서 세포내 활성산소족을 억제한 것은 혈관 평활근세포와 내피세포에서 제시된 기존의 항산화 효과와 함께 새로운 MPA의 표적으로서 세포내 활성산소족의 중요성을 입증한 것이다.

결 론

본 연구의 결과는 MPA가 PDGF에 의하여 유도된 생쥐 사구체 혈관간세포의 fibronectin 분비를 억제하며, MPA에 의한 활성산소족 억제가 생쥐 사구체 혈관간세포의 활성화를 억제하는 기전이 될 수 있음을 제시하였을 뿐만 아니라, MPA가 기존에 알려져 있던 주요 작용기전인 IMPDH2를 통

한 효과뿐만 아니라 다른 기전을 통하여 작용할 수 있음을 시사하고 있다.

REFERENCES

- 1) Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *N Eng J Med* 2003;349:2288-90.
- 2) Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81:643-54.
- 3) Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, Park K, Kim YS. 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.
- 4) 박제현, 하현주, 김명수, 허규하, 김유선. Mycophenolic acid 가 PDGF에 의해 증식 유도된 흰쥐 혈관평활근 세포에서 NAD(P)H oxidase, 세포내 활성산소족 및 Mitogen-activated protein kinases에 미치는 영향. *대한신장학회지* 2004;23: 567-76.
- 5) Ha H, Kim MS, Park J, Huh JY, Huh KH, Ahn HJ, Kim YS. Mycophenolic acid inhibits mesangial cell activation through p38 MAPK inhibition. *Life Sci* 2006;79:1561-7.
- 6) Ahn HJ, Park J, Song JS, Ju MK, Kim MS, Ha H, Song KH, Kim YS. Mycophenolic acid inhibits oleic acid-induced vascular smooth muscle cell activation by inhibiting cellular reactive oxygen species. *Transplantation* 2007;84:634-8.
- 7) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000;47:85-118.
- 8) Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270:296-9.
- 9) Ha H, Park J, Kim YS, Endou H. Oxidative stress and chronic allograft nephropathy. *Yonsei Med J* 2004;45:1049-52.
- 10) 김지혜, 박제현, 하현주, 이희발, 허규하, 김명수, 김순일, 김유선, 박기일. 신장이식 후 1년 이상 경과한 환자의 말초 혈액 단백질에서 측정된 활성산소족 농도와 혈청크레아티닌의 상관관계분석. *대한이식학회지* 2003;17:131-6.
- 11) 김지혜, 박제현, 김명수, 하현주, 김유선. 생체 신 이식 후 이식신 기능과 산화성 스트레스, 혈청 IL-6, 수용성 IL-6R, TGF-β1, HSP 70 및 CRP 농도와의 상관관계 연구. *대한외과학회지* 2005;68:414-21.
- 12) Krotz F, Keller M, Derflinger S, Schmid H, Gloe T, Bassermann F, Duyster J, Cohen CD, Schuhmann C, Klaus V, Pohl U, Stempfle HU, Sohn HY. Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension* 2007;49:201-8.
- 13) Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
- 14) Meier-Kriesche HU, Steffen BJ, Hochberg AM, Gordon RD,

- Liebman MN, Morris JA, Kaplan B. 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.
- 15) Dubus I, Vendrely B, Christophe I, Labouyrie JP, Delmas Y, Bonnet J, Combe C. Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 2002;62:857-67.
- 16) 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.
-