

Mycophenolic Acid가 배양된 사람 혈관 평활근 세포의 증식과 그에 관여하는 세포 내 신호전달계에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 외과학교실 및 장기이식연구소, ¹순천향대학교 현암신장연구소, ²연세대학교 원주의과대학 외과학교실

박제현 · 하현주¹ · 김명수² · 서지연 · 김혜진 · 박기일 · 김유선

Effect of Mycophenolic Acid on Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Intracellular Signal Transduction

Jehyun Park, B.S., Hunjoo Ha, Ph.D.¹, Myoung Soo Kim M.D.², Jiyeon Seo, B.S., Hae Jin Kim, B.S., Kiil Park, M.I. and Yu Seun Kim, M.D.

Purpose: Vascular smooth muscle cells (VSMCs) migration and proliferation play important roles in chronic allograft rejection. Mycophenolic acid (MPA) inhibits the proliferation of VSMCs, glomerular mesangial cells and fibroblasts as well as lymphocytes. Since reactive oxygen species (ROS) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) play important roles in the proliferation of VSMCs, the present study examined the effects of MPA on intracellular ROS generation, activation of ERK and p38 MAPK, and the 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. MPA 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/ERK2 and p38 MAPK were measured by Western blot analysis. Proliferation of VSMC was assessed by [³H]-thymidine incorporation.

Results: PDGF administered at 10 ng/ml, which induced human VSMCs proliferation, rapidly increased intracellular ROS by 1.6-fold ($P < 0.05$), ERK1/ERK2 activation by 2.1-fold, ($P < 0.05$) and p38 MAPK activation by 1.9-fold ($P < 0.05$), respectively, as compared to the control. MPA 1 and 10 μ M effectively inhibited PDGF-induced human VSMCs proliferation. MPA also effectively inhibited PDGF-induced intracellular ROS generation as well as ERK1/ERK2 and p38 MAPK activation.

Conclusion: The present study suggests that MPA inhibits PDGF-induced human VSMCs proliferation, possibly by inhibiting intracellular ROS generation and the phosphorylation of ERK1/ERK2 and p38 MAPK. (*J Korean Surg Soc* 2002;62:1-7)

Key Words: Mycophenolic acid, Human vascular smooth muscle cell, Reactive oxygen species, Mitogen-activated protein kinase

중심 단어: 마이코페놀산, 사람 혈관 평활근 세포, 활성산소족, Mitogen-activated protein kinase

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

서 론

신장이식 후 장기생존자에게 발생하는 만성거부반응은 이식신 소실의 주요원인으로, 강력한 면역억제제의 개발로 1년 이식신 생존율이 꾸준히 개선되고 있음에도 불구하고 그 빈도는 전혀 감소하지 않고 있어 향후 신장이식 후 장기 생존을 위하여 만성거부반응의 예방과 해결이 가장 시급한 현안으로 대두되고 있다. 만성거부반응은 다양한 면역학적 또는 비면역학적 원인에 의해서 발생하여 중국에는 혈관 평활근 세포의 이동 및 증식, 세포외기질의

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 : 2001년 11월 20일, 게재승인일 : 2001년 12월 5일
본 논문의 요지는 2001년 5월 대한외과학회 춘계학술대회(경주)와 2001년 8월 세계이식학회 제7차 기초과학 심포지움(스위스 베른)에서 발표되었음.

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

과다생산으로 인한 섬유화와 장기의 허혈성 기능 손실을 초래한다.(1)

현재까지 만성거부반응을 효과적으로 억제하는 수단은 제한적으로 약제를 통하여 여러 단계의 세포에서 분비되는 cytokine을 억제함으로써 혈관 병변을 억제하고자 하는 시도가(2-5) 있어 왔으나 효과가 확연하게 밝혀진 바는 아직까지 없다. 면역억제제로 개발된 mycophenolic acid (MPA)는 면역 반응의 주요 표적 세포인 림프구의 증식을 억제할 뿐 아니라 혈관 평활근 세포의 증식과 유주를 억제하여 내막증식의 발생을 효과적으로 억제하고,(6) 사구체 혈관간 세포(7) 및 근섬유아세포의(8) 증식도 효과적으로 억제하여, MPA가 만성거부반응 및 만성 사구체 병변의 발생과 진행을 억제할 수 있을 것으로 관심을 모으고 있다. 그러나, MPA에 의한 혈관 평활근 세포, 사구체 혈관간 세포 및 근섬유아세포의 증식 억제에 관여하는 기전은 아직 확실하지 않다.

세포의 성장과 증식은 이를 촉진하거나 억제하는 유전자 발현과 단백질 합성에 의해 이루어지며, 정상 생리 상태에서는 유기적으로 잘 조절되는 신호변환기전에 의해서 이들이 조절된다. 성장인자는 세포막에 있는 수용체와 결합하여 그 수용체를 활성화시킨 후 신호변환기전을 경유하여 핵내 유전자 발현을 조절한다. 특히, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로는 세포질에 존재하는 단백질의 인산화 효소로서 extracellular-regulatory protein kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK의 세 가지 형태가 있으며, 각각 세포외부의 각종 자극 인자들에 의해 연속적으로 활성화되어 전사조절인자를 활성화한다.(9-13) 최근의 보고에 따르면 MAPK나 전사조절인자의 활성 조절에는 활성산소족(reactive oxygen species)과 이들에 의해 유도되는 세포 내 산화-환원 상태의 변화가 상당부분 관여하는 것으로 알려져 있다.(9,14,15)

따라서, 본 연구자는 MPA가 활성산소족과 MAPK의 활성화에 영향을 미침으로써 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는지 여부를 in vitro 실험을 통하여 검색하였다.

방 법

1) 시약 및 기구

실험에 사용한 재료는 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 평활근 세포(CRL-1999, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 구입하여 10% 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS), 26 mM NaHCO₃ 및 25 mM HEPES를 함유한 RPMI-1640 배지

(Lifetechnologies, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 5% CO₂와 95% 공기가 공급되는 37°C 세포배양기(Vision 과학, 서울, 한국)에서 배양하였다.

3) 약물 투여

세포들로 배양용기가 찻을 때 혈청배제 RPMI-1640 배양액으로 교환하여 48시간 배양함으로써 세포 성장을 동일화하였다. 그 후 새로운 혈청배제 배양액으로 교환하면서 기초 실험에서 얻어진 농도인 10 ng/ml의 PDGF-BB를 투여하여 5분부터 48시간까지 배양하였다. MPA (1 nM~10 μM)는 PDGF-BB를 처리하기 한 시간 전에 투여하였다.

4) [³H]thymidine incorporation을 이용한 세포 증식의 평가

24 well 세포 배양용기에 각 well당 5×10⁴개의 세포가 되도록 분주하여 3회 실험하였다. 실험이 종료되기 12시간 전에 [³H]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 세포 내 활성산소족 측정

6 well 세포 배양용기에 각 well당 1×10⁵개의 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 세포 내로 염료를 유입시켰다. 유입되지 않은 염료를 세척하여 제거한 후 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry system, Mountain View, CA, USA)로 형광을 측정하여 세포 내 생성된 활성산소족을 정량하였다.(16)

6) Western blot을 이용한 MAPK 활성화 측정

60 mm 배양용기에 5×10⁵개의 세포가 되도록 분주하여 4회 실험하였다. 실험이 완료된 후 세포 단백질을 추출하여 immunoblot 분석을 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 Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate)를

넣고 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 세포를 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 취하여 Bio-Rad protein assay kit을 사용하여 단백질을 정량하였다. 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, MA01915, USA)에서 구입하였다. Peroxidase가 conjugation 된 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 측정 후 인산화된 MAPK를 정량하고 대조군을 1로 하여 비교하였다.

7) 통계처리

모든 실험 결과의 측정치는 “평균(mean)±표준 오차(standard error)”로 나타내었으며 각 군 간의 통계학적인 비교는 분산분석(analysis of variance: ANOVA)과 Fisher’s least significance difference test를 시행하여 P값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) MPA는 PDGF-BB에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하였다(Fig. 1)

PDGF-BB 10 ng/ml은 사람 혈관 평활근 세포의 유의한 증식 효과를 보여 24시간과 48시간 노출 시 대조군에 비

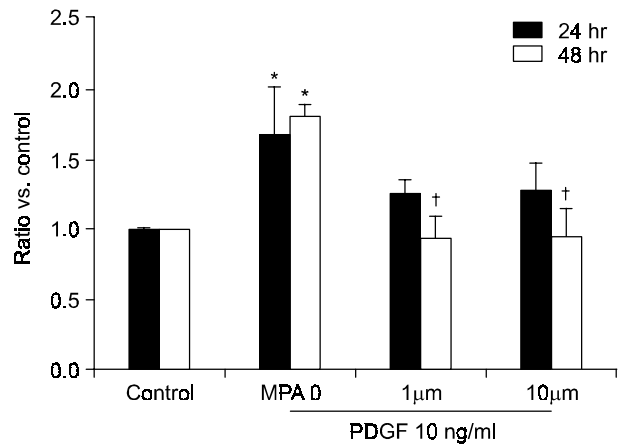


Fig. 1. Effects of MPA on PDGF-induced human VSMC proliferation at 24 hr and 48 hr. Human VSMC proliferation was measured after exposure of quiescent human VSMC to serum free RPMI-1640 containing different concentrations of MPA for 1 hr before administering PDGF 10 ng/ml. Data are presented as the mean±SE of three experiments. *P<0.05 vs. control, †P<0.05 vs. MPA 0 group.

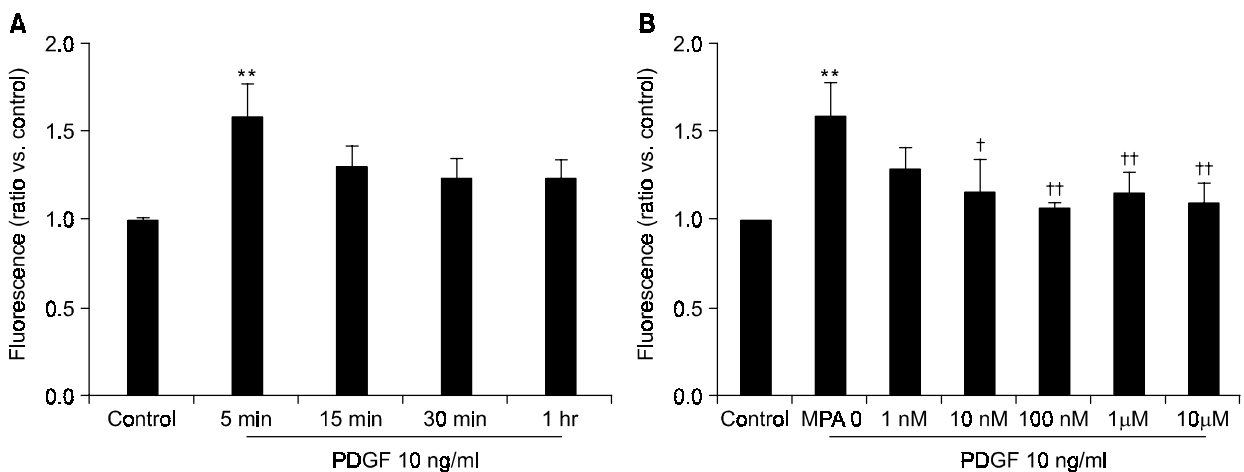


Fig. 2. PDGF-induced intracellular ROS generation by human VSMC. Intracellular ROS generation by human VSMC was measured after exposure of quiescent human VSMC to serum free RPMI-1640 containing different concentrations of MPA for 1 hr before administering PDGF 10 ng/ml. In the end of experiments, cells were washed with PBS of two times and exposed by DCFH-DA for 20 min. The fluorescence activity of cells was quantified by FACS. (A) PDGF-treatment (time-course), (B) effect of MPA at 5 min after PDGF-treatment. Data are presented as the mean±SE of five experiments. **P<0.01 vs. control, †P<0.05 vs. MPA 0 group, ††P<0.01 vs. MPA 0 group.

하여 각각 1.7배와 1.8배의 세포 증식을 유도하였다($P < 0.05$). MPA는 PDGF-BB에 의한 세포 증식을 억제하여 1과 10 μM 에서 48시간에 통계적으로 유의한 증식 억제를 하였다($P < 0.05$).

2) MPA는 PDGF-BB에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 세포 내 활성산소종 증가를 억제하였다

PDGF-BB 10 ng/ml은 사람 혈관 평활근 세포 내 활성산소종을 5분에 대조군과 비교하여 1.6배 증가시켰다($P <$

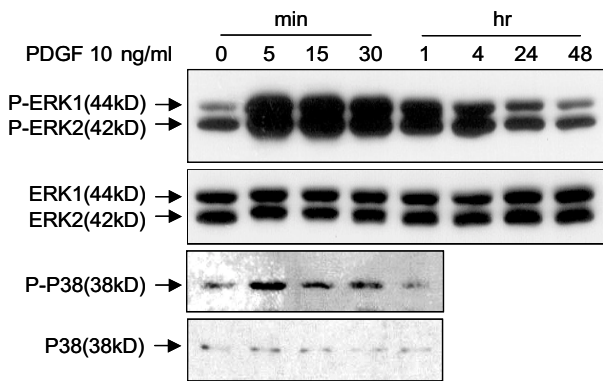


Fig. 3. PDGF-induced ERK1/2 and p38 MAPK activation of human VSMC. ERK1/2 and p38 MAPK activation of human VSMC was measured after exposure of quiescent human VSMC to serum free RPMI-1640 containing different concentrations of MPA for 1hr before administering PDGF 10 ng/ml. In the end of experiments, 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 nonphospho-specific antibody.

0.01)(Fig. 2A). MPA는 농도의존적으로 PDGF에 의한 활성산소종 증가를 억제하여 10 nM 이상에서 통계적으로 유의하게 생성을 억제하였다($P < 0.05$)(Fig. 2B).

3) MPA는 PDGF-BB에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 ERK 인산화를 감소시켰다

PDGF-BB 10 ng/ml은 사람 혈관 평활근 세포의 ERK 인산화를 15분에 대조군과 비교하여 2.1배 증가시켜 최대치를 보였으며($P < 0.01$), 이는 시간이 경과함에 따라 감소하였다(Fig. 3, 4A). MPA는 농도의존적으로 PDGF에 의한 ERK 인산화를 억제하여 1 μM 이상에서 15분에 증가되었던 ERK의 인산화를 통계적으로 유의하게 감소시켰다($P < 0.05$)(Fig. 4B).

4) MPA는 PDGF-BB에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 p38 MAPK 인산화를 감소시켰다

PDGF-BB 10 ng/ml은 사람 혈관 평활근 세포의 p38 MAPK 인산화를 5분에 대조군과 비교하여 1.9배 증가시켜 최대치를 보였으며($P < 0.01$), 이는 시간이 경과함에 따라 감소하였다(Fig. 3, 5B). MPA는 농도의존적으로 PDGF에 의한 p38 MAPK 인산화를 억제하여 1 μM 이상에서 5분에 증가하였던 p38 MAPK의 인산화를 통계적으로 유의하게 감소시켰다($P < 0.01$)(Fig. 5B).

고찰

배양한 사람의 혈관 평활근 세포를 이용한 본 연구 결과, PDGF에 의한 세포 증식을 억제하는 농도의 MPA가 세포 내 활성산소종 증가 및 ERK와 p38 MAPK 활성화를 억제함을 알 수 있었다.

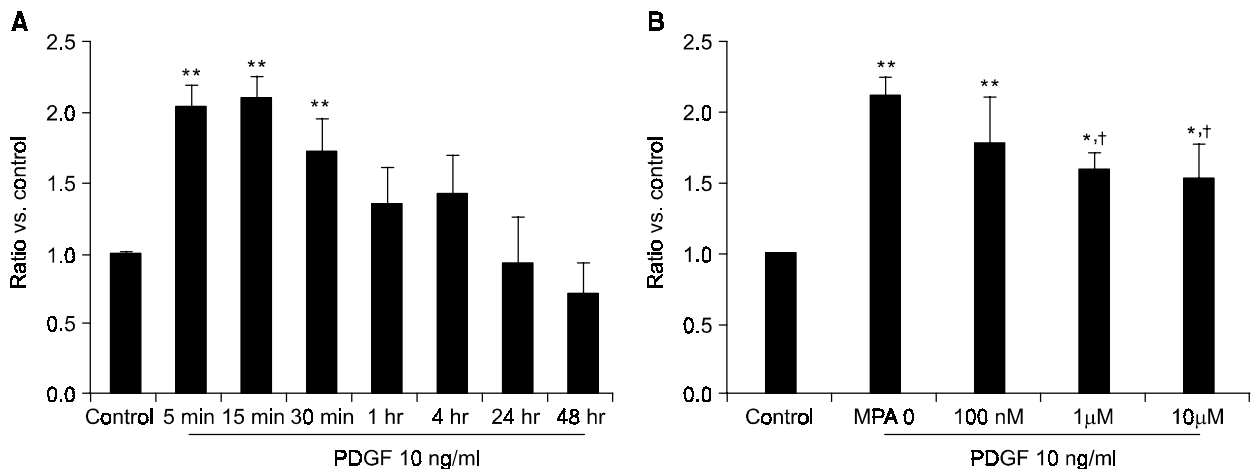


Fig. 4. ERK 1/2 activation of human VSMC. In the Western blot analysis, each band was quantified by densitometer. (A) PDGF-treatment (time-course), (B) effect of MPA at 15 min after PDGF-treatment. Data are presented as the mean \pm SE of four experiments, * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control, $^\dagger P < 0.05$ vs. MPA 0 group.

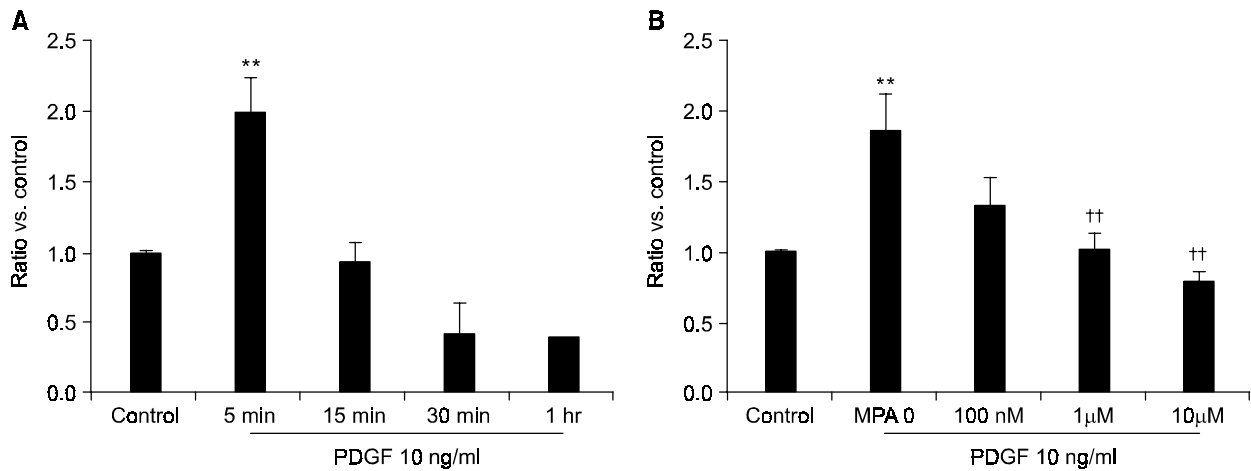


Fig. 5. p38 MAPK activation of human VSMC. In the Western blot analysis, each band was quantified by densitometer. (A) PDGF-treatment (time-course), (B) effect of MPA at 5 min after PDGF-treatment, Data are presented as the mean \pm SE of four experiments, **P<0.01 vs. control, ††P<0.01 vs. MPA 0 group.

혈관 내피 세포의 손상과 그에 따른 cytokines와 성장 인자의 상향 조절이 만성거부 반응의 한 원인으로 알려져 있으나 혈관 내피 세포의 손상은 다양한 면역학적 또는 비면역학적 원인에 의하여 발생하고, 이로 인하여 여러 cytokines 및 성장 인자가 상향 조절되기 때문에 한 가지 cytokine이나 성장 인자를 표적으로 하여 이를 제거 또는 억제하는 것은 큰 치료 효과가 없다. 반면에, 혈관 평활근 세포의 이동과 증식 및 세포 외 기질의 축적은 만성거부 반응의 최종 단계로서 이 마지막 과정을 효과적으로 억제한다면 만성 거부반응의 진행을 지연 혹은 억제할 수 있을 것으로 생각한다.

강력한 면역억제제인 MPA는 이미 in vitro, in vivo 실험 및 임상에서 다양한 효과들이 보고되었다. 특히, 림프구의 증식을 억제할뿐 아니라 배양한 사구체 혈관관 세포,(7) 혈관 평활근 세포(6) 및 근섬유아 세포(8)의 증식을 효과적으로 억제하며 나아가 MPA는 remnant kidney 신손상 모델에서 사구체, 세뇨관 및 간질조직의 증식을 효과적으로 억제한다.(8) 본 연구진(17) 역시 MPA가 혈관 평활근 세포의 증식을 억제함을 이미 보고한 바 있으나 MPA에 의한 혈관 평활근 세포의 증식 억제 작용에 관여하는 기전은 아직 확실하지 않다.

강력하게 혈관 평활근 세포의 증식을 유발하는 PDGF는 세포 내 신호전달계(18,19)가 비교적 잘 밝혀져 있는 성장 인자이다. PDGF에 의한 혈관 평활근 세포의 세포 내 활성 산소족과 MAPK 활성화가 세포 증식에 중요한 역할(20)을 하기 때문에, 본 연구에서는 활성 산소족과 MAPK에 대한 MPA의 효과를 살펴보고자 하였다.

본 연구에서는 PDGF의 세 가지 종류 중 가장 강력한 증식 유발 효과가 있는 것으로 알려져 있는 PDGF-BB(21)를 사용하였다. PDGF-BB 10 ng/ml은 사람의 혈관 평활근

세포의 증식을 1.8배 증가시켰고, MPA는 1 μM 이상에서 이를 억제하였다. Mohacsi 등(6)은 PDGF-BB에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 증식에 대한 MPA의 IC₅₀가 10 μM이라고 보고하였다.

활성산소족은 과거에 대사과정에서 발생하여 지질, 단백질 및 DNA에 손상을 주는 독성 물질로 세포 사멸을 유도하는 것으로 생각되었으나, 최근의 연구에서 각종 세포 내 신호전달에서 필수적인 조절물질로서 관여하는 것으로 알려지고 있다.(15) PDGF-BB 10 ng/ml은 사람의 혈관 평활근 세포의 세포 내 활성산소족 생성을 일찍(5분 이내) 증가시켰으며, 이는 Sundaresan 등(22)의 보고와도 일치한다. 실제 항산화제인 catalase와 N-acetylcystein은 PDGF에 의한 혈관 평활근 세포의 증식을 억제한다.(22) MPA가 세포 내 활성산소족 증가를 억제하는 기전에 대해서는 추후 연구가 필요하다고 하겠다.

PDGF-BB 10 ng/ml은 사람의 혈관 평활근 세포의 ERK1/2와 p38 MAPK를 일찍 활성화시켰다. Nelson 등(23)은 사람의 복재정맥 평활근 세포를 이용하여, PDGF에 의한 초기 15분 이내의 ERK 활성화는 세포의 이동에 관여하고, 1시간에서 4시간 사이의 ERK 활성화가 세포의 증식에 관여한다고 보고하였다. 본 실험 조건에서는 PDGF 투여 후 30분까지만 ERK 활성화가 유의있게 증가하였다. ERK의 억제제인 PD98059는 사람(17) 및 흰쥐(24)의 혈관 평활근 세포 증식을 억제한다.

한편, p38 MAPK는 stress나 기타 세포사멸의 신호전달에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 그러나, 최근 Yamaguchi 등(25)은 p38 MAPK가 흰쥐 혈관 평활근 세포의 cyclooxygenase-2 활성을 조절하여 염증 반응에 관여한다고 보고하였고, Kanda 등(26)은 thrombin에 의한 사람 혈관 평활근 세포의 증식에 p38 MAPK의 활성화가 관여

한다고 보고하였다. 현재까지 PDGF에 의한 p38 MAPK 활성화가 혈관 평활근 세포의 증식에 관여한다는 정교보고는 없으나 본 연구진(24)은 최근에 흰쥐의 혈관 평활근 세포를 이용한 실험에서 p38 MAPK 억제제가 PDGF에 의한 세포 증식을 의의 있게 억제함을 관찰하여 보고한 바 있다. 추후 PDGF에 의한 사람의 혈관 평활근 세포 증식에 p38 MAPK가 관여하는 정확한 기전을 검색하여야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구자들은 PDGF-BB에 의하여 증식유도된 사람 혈관 평활근 세포에서 MPA가 세포 내 활성산소종의 증가 및 ERK와 p38 MAPK의 인산화를 억제함으로써 세포의 증식을 억제할 수 있음을 규명할 수 있었다.

REFERENCES

- Häyry P, Savolainen H, Luoto NM, Petrov L, Loubtchvhenkov M, Aavik E. Emerging therapeutic strategies for the prevention and treatment of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 2000;32:519.
- Orosz CG. Endothelial activation and chronic allograft rejection. *Clin Transplant* 1994;8:299-303.
- Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- Häyry P. Chronic allograft vasculopathy: new strategies for drug development. *Transplant Proc* 1998;30:3989.
- Kim MS, Ha H, Kim YS, Kim H, Park J, Cho CH, et al. Effect of carvedilol alone or with cyclosporine on the migration of cultured rat vascular smooth muscle cell. *J Korean Surg Soc* 2001;60:8-15.
- 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.
- Hauser IA, Renders L, Radeke HH, Sterzel B, Struebe MG. Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:58-63.
- Badid C, Vincent M, Mcgregor B, Melin M, Aissa AH, Veyseyre C, et al. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int* 2000;58:51-61.
- 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;10:675-83.
- Cospedal R, Abedi H, Zchary 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;41:708-21.
- Hu Y, Zou Y, Dietrich H, Wick G, Xu Q. Inhibition of neointima hyperplasia of mouse vein grafts by locally applied suramin. *Circulation* 1999;100:861-8.
- 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;264:915-20.
- 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;274:6003-10.
- 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;50:164-73.
- Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999;31:53-9.
- Ha H, Yu MR, Choi YJ, 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* (in press).
- 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.
- 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:H142-50.
- 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;128:192-7.
- 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.
- Jiang B, Yamamura S, Nelson PR, Mureebe L, Kent KC. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery* 1996;120:427-32.
- 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.
- 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.
- 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. p.89.

- 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;31:672-80.

- 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.
-