

설치류 경동맥 손상 모델에서 탈리도마이드를 통한 혈관 신생내막 증식의 억제

서울대학교 의과대학 내과학교실,¹ 서울대학교 의과대학 서울대학교병원 심혈관센터,¹ 서울대학교 임상의학연구소 심혈관연구실,¹ 분당서울대학교병원 심장센터²

박승정¹ · 김대희¹ · 서재빈¹ · 서정원¹ · 윤창환¹ · 조상호¹ · 강현재¹
황경국¹ · 조영석² · 정우영² · 채인호² · 최동주² · 김효수¹

Thalidomide as a Potent Inhibitor of Neointimal Hyperplasia after Balloon Injury in Rat Carotid Artery

Seung-Jung Park, MD¹, Dae-Hee Kim, MD¹, Jae-Bin Seo, MD¹, Jung-Won Suh, MD¹,
Chang-Hwan Yoon, MD¹, Sang-Ho Jo, MD¹, Hyun-Jae Kang, MD¹,
Kyung-Kuk Hwang, MD¹, Young-Seok Cho, MD², Woo-Young Chung, MD²,
In-Ho Chae, MD², Dong-Ju Choi, MD² and Hyo-Soo Kim, MD¹

¹Cardiovascular Laboratory and ¹Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul,

¹Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul,

²Cardiovascular Center, Seoul National University Bundang Hospital, Bundang, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Inflammation plays a central role in the development of neointimal hyperplasia. Due to its potent anti-inflammatory property, thalidomide is being re-evaluated in several clinical fields. Thus, we examined whether thalidomide affects neointimal overgrowth. **Materials and Methods :** Male Sprague-Dawley rats, pretreated with thalidomide (100 mg/kg qd) for 3 days, underwent carotid artery angioplasty. Thalidomide administration was then continued for 2 weeks after injury. **Results :** Compared with the control rats, the systemic inflammatory marker (serum TNF- α) reduced significantly in the thalidomide-treated rats at 3 and 14 days after injury (856 \pm 213 vs 449 \pm 68 pg/mL, p=0.001, day 3 ; 129 \pm 34 vs 63 \pm 18 pg/mL, p=0.001, day 14). This effect was accompanied by marked decreases in the arterial macrophage infiltration and by attenuated expressions of TNF- α and bFGF in the arteries, which were measured as local tissue inflammatory indicators. The anti-proliferative effect of thalidomide was confirmed by a reduced number of PCNA-positive vascular smooth muscle cells in the arteries (43.1 \pm 2.9 vs 7.4 \pm 1.7 %, p<0.001, day14). Morphometric analysis 2 weeks after injury revealed that gains in the luminal area of the thalidomide-treated rats (0.17 \pm 0.04 vs 0.05 \pm 0.02 mm², p=0.001) were due to the suppression of neointimal hyperplasia (neointima-to-media [N/M] ratio, 0.35 \pm 0.13 vs 1.26 \pm 0.29, p<0.001). Moreover, a strong positive correlation was observed between the serum TNF- α and the N/M ratio. **Conclusion :** Through its anti-inflammatory and anti-proliferative effect, thalidomide significantly inhibits neointimal hyperplasia. Therefore, thalidomide can be applied in various ways, for instance, as a new drug-eluting stent or as a systemic oral drug against restenosis. (Korean Circulation J 2004;34(4):346-355)

KEY WORDS : Inflammation ; Coronary restenosis ; Thalidomide ; Cytokines.

논문접수일 : 2003년 10월 22일

심사완료일 : 2003년 11월 8일

교신저자 : 최동주, 463-707 경기도 성남시 분당구 구미동 분당서울대학교병원 심장센터

전화 : (031) 787-7007 · 전송 : (031) 787-4051 · E-mail : djchoi@snubh.org

서 론

관동맥 재협착 예방을 위한 최근의 눈부신 발전에도 불구하고 이는 여전히 경피적 관동맥 중재술의 주요한 한계로 남아 있다. 재협착의 병리기전이 아직 완전히 규명되지는 않았지만 염증반응이 중추적 역할을 하고 있다는 증거들이 계속 쌓여가고 있다.¹⁾ 게다가 염증반응이 강할수록 재협착도 심하게 발생한다.²⁾

혈관성형술로 인한 염증반응이 재협착을 유발한다는 증거들은 세포, 분자, 유전자 수준의 여러 단계에서 제시되고 있다. 풍선 성형술이나 스텐트로 혈관에 손상을 가하면 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)와 염증세포는 활성화되고³⁾ 이들로부터 다양한 종류의 사이토카인과 성장인자(growth factor, GF)들이 분비되어⁴⁾ VSMCs의 유주(migration)와 분열(proliferation)을 촉진하여 결국 혈관 신생내막 증식(neointimal hyperplasia)을 초래하게 된다.⁵⁾ 더군다나 CD 18, IL-1 receptor antagonist, matrix metalloproteinases 와⁶⁾⁷⁾ 같이 염증반응에서 주요한 역할을 담당하고 있는 분자들의 유전형질과 재협착과의 연관성이 유전자 다형성(polymorphism) 연구를 통해 밝혀지고 있다.

한편 처음에 진정제로 개발되었던 탈리도마이드는 이후 강력한 항염증, 면역 조절 효과가 있음이 알려지게 되어⁸⁾ 최근에는 루푸스, 크론씨 병, 류마티스 관절염, 다발성 골수염, 이식 편대 숙주 반응 등과 같은 다양한 범위의 질환들에서 다시 사용되고 있다.⁸⁾ 이러한 항염증 효과에 근거하여 만성 심부전 환자들에게 탈리도마이드를 6개월간 투여하여 중양 괴사 인자(tumor necrosis factor, TNF- α)가 감소하고 좌심실의 구혈률이 호전되었음을 보고하기도 하였다.⁹⁾

탈리도마이드는 또한 세포 수준에서 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)의 분비를 억제하는데⁸⁾ bFGF는 염증 반응을 매개하는 동시에 VSMCs의 활발한 분열을 조장한다.⁵⁾ 세포 부착 분자의 발현 또한 탈리도마이드로 감소되고⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾ 따라서 염증세포의 유주능도 저하된다. 게다가 탈리도마이드는 염증반응과 세포 분열의 핵심적 전사인자(transcription factor)인 NF- κ B의 활성화를 억제한다.¹²⁾

따라서 본 연구는 상기한 사실에 근거하여 탈리도마이드가 혈관성형술 후 혈관 신생내막 증식을 억제하

는지를 그리고 이 약제가 혈관 재협착 예방을 위한 치료제로서의 가능성을 갖고 있는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 전처치

모든 실험 절차는 서울대학교 병원, 임상의학 연구소, 전임상 실험실의 “동물 실험 가이드라인”을 준수하였다. 탈리도마이드(Alan Pharmaceutical, London, U.K.)를 corn oil(Sigma-Aldrich Korea)에 녹여 50 mg/mL 농도의 혼탁액을 만들었다. 혈관성형술 3일 전부터 17주령의 수컷 Sprague-Dawley 쥐(417 \pm 11 g, 대한 바이오링크사, 충북)에 100 mg/kg qd의 탈리도마이드를 경구 투여하였다.

혈관 손상 모델과 후처치

전처치에 대해 blind한 시술자가 쥐 경동맥에 풍선 손상을 가하였다. Xylazine(5 mg/kg, 유한 양행, Bayer Korea)과 ketamine hydrochloride(50 mg/kg, 유한 양행, Bayer Korea)를 복강 내로 주사하여 마취하였다. 우측 경동맥을 노출, 절개한 후 2 F 풍선 카테터(Baxter Healthcare Corp)를 삽입하였다. 카테터를 총경동맥 원위부까지 삽입한 후 풍선을 확장 시킨 상태로 잡아당기면서 좌측 총경동맥 전체에 일정한 손상을 가하였다. 이 과정을 5회 정도 반복하여 혈관 내피를 탈락 시키고 혈관벽에 압력손상을 가하였다. 혈관성형술 후 2주 동안 시술 전과 동량의 탈리도마이드 투여를 지속하였다(100 mg/kg qd).

경동맥 수집과 형태학적 분석

혈관성형술 후 3일과 14일째 형태학적 분석을 위해 시술 받은 쥐에게 과량의 pentobarbital 투여 후 희생시켰다(각 군과 각 시점당 8마리씩). 양측의 총경동맥을 약 1 cm 정도 절제한 후 10% formalin으로 관류 고정 한 다음 파라핀에 포매(embedding)하고 일정한 간격을 두고 네 곳에서 4 μ m 두께의 절편을 4~6개 얻었다. 절편을 hematoxylin-eosin이나 Verhoeff-van Gieson으로 염색하고 혈관 내강(lumen), 신생내막(neointima), 중막(media)의 면적을 Image-Pro Plus 4.5

를 이용하여 구하였다. 각각의 면적은 한 혈관의 다른 네 부위에서 측정하여 평균을 구하였다(각 군당, 각 시점당 8마리씩).

염증반응의 측정

탈리도마이드의 기전을 규명하기 위하여 성형술을 받은 혈관의 염증반응과 분열 정도를 검사하였다. 혈관성형술을 받은 경동맥 분절과 혈청을 시술 후 각각 3일과 14일째 취하여 다음의 검사들을 시행하였다.

ELISA를 이용한 혈청 TNF- α 측정

TNF- α 는 염증반응의 중추적 매개체로서 혈관성형술 후 활성화된 대식세포나 VSMCs에서 분비된다.³⁾⁴⁾

탈리도마이드가 TNF- α 발현을 억제하는지 확인하기 위해 시술 후 각각 3일과 14일째 혈청 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 경동맥 채취 시 18 G 정맥 카테터를 복부 대동맥에 삽입시켜 갈습 튜브에 동맥혈을 모으고 4°C에서 혈청을 원심분리한 후 -70°C에 보관하였다. 혈청을 녹인 후 효소 면역 측정법 키트(enzyme-linked immunosorbent assay kit, ELISA kit, BD PharMingen, CA, USA)를 사용하여 TNF- α 농도를 duplicate으로 측정하여 평균을 구하였다. TNF- α ELISA의 민감도는 13 pg/mL였다.

Western blot analysis를 통한 국소 조직의 염증반응 측정
탈리도마이드 투여가 전신 염증반응뿐만 아니라 국소

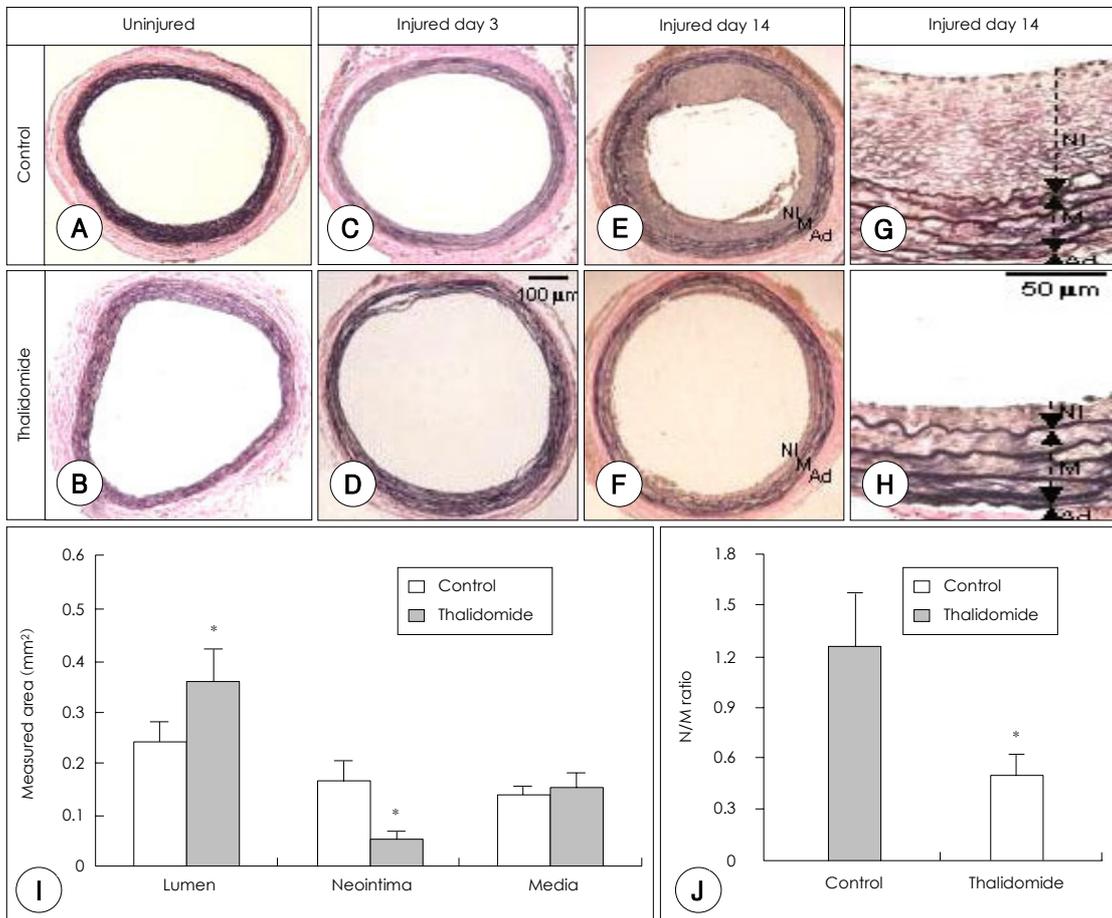


Fig. 1. Neointimal hyperplasia 14 days after balloon angioplasty. Low and high-magnification photomicrographs (Verhoeff-van Gieson staining) of arterial section from the control (E, G) and from thalidomide-treated (F, H) rats. Note that neointimal growth was significantly inhibited in the thalidomide-treated rats. Much larger luminal area in the thalidomide treat-group is due to the prevention of neointimal overgrowth (Fig. 1I, J). NI: indicates neointima, M: media, Ad: adventitia, N/M: neointimal area/media area. *: p<0.001.

염증반응도 감소시키는 지를 확인하기 위하여 Western blot으로 시술 받은 경동맥의 TNF- α 와 bFGF의 발현을 분석하였다. 혈관 조직을 lysis buffer에서 용해시킨 후 Micro BCA Protein Assay kit(Pierce)를 사용해 단백질을 정량화 하였다. 20 μ g씩의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 이들 단백질에 특이적으로 반응하는 항체를 사용하였다. 항 TNF- α 항체(N-

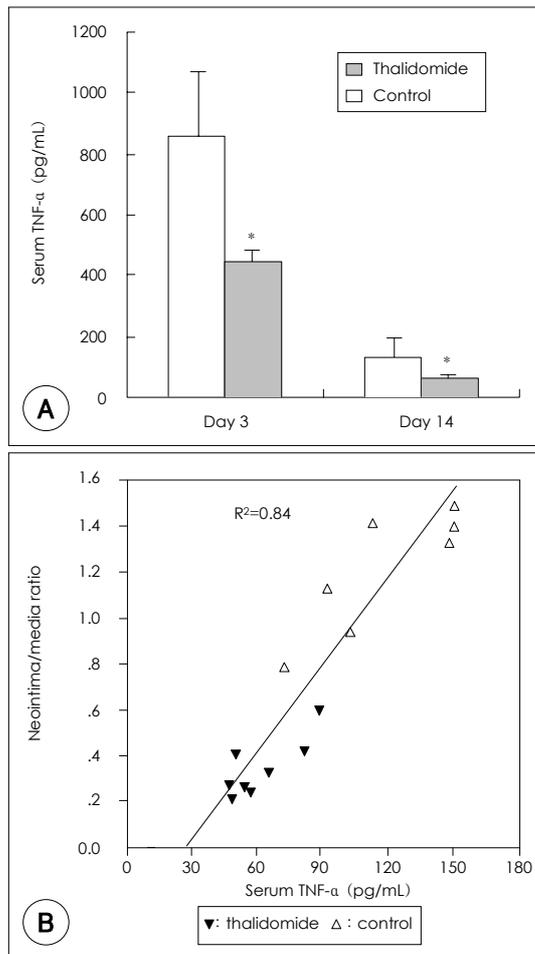


Fig. 2. Anti-TNF- α effect of thalidomide associated with reduced neointimal hyperplasia. A: production of serum TNF- α , as determined by ELISA, was significantly reduced in animals treated with thalidomide. B: moreover, a strong positive correlation was found between the serum TNF- α level and the N/M ratio on the 14th day. These results show that thalidomide treatment inhibits systemic inflammatory response, which is associated with neointimal formation (n=16, Pearson correlation coefficient= 0.908, p< 0.001). *: p=0.001. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, N/M: neointimal area/media area, TNF: tumor necrosis factor.

19; sc-1350)와 항 bFGF 항체(147; sc-79)는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다.

면역조직화학염색법을 통한 국소 조직의 염증반응 측정

여러 사이토카인과 성장인자의 원천인 대식세포는 손상된 혈관에 침윤하는 것으로 보고 된다.²⁾¹³⁾ 면역조직화학염색으로 대식세포의 혈관 침윤과 VSMCs에서 bFGF의 발현을 확인하기 위해 다음과 같은 특이 항체를 사용하였다. 대식세포 침윤(ED-1, Serotec), bFGF 발현(147; sc-79, Santa Cruz Biotechnology). 슬라이드에서 파라핀을 제거한 후 microwave로 항원을 노출시키고 표준화된 peroxidase-antiperoxidase 염색과정을 거쳤다. Mayer's hematoxylin으로 대조 염색을 한 후 절편의 네 부위에서 시술 후 14일 째 ED-1으로 염색된 세포 수를 내막과 중막의 전체 세포수로 나누었다 (각 그룹당 n=4).

세포분열의 측정

감소된 염증반응이 VSMCs 분열능의 억제와 연관되어 나타나는 지를 확인하기 위해 면역조직화학염색을 시행하였다. 분열하는 세포를 관찰하기 위하여 PCNA(PC10,

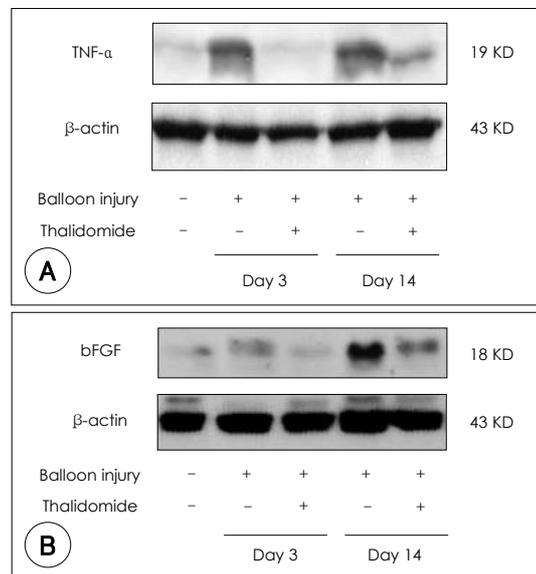


Fig. 3. Effect of thalidomide treatment on the local expressions of TNF- α (A) and bFGF (B) in an injured vessel. A striking reduction in the expressions of TNF- α and bFGF was observed in the balloon-injured arteries of thalidomide-treated rats compared to the controls at each time point. TNF: tumor necrosis factor, FGF: fibroblast growth factor.

DAKO) 염색을 하였다. VSMCs의 세포분열을 정량화하기 위해 혈관 절편당 네 부위에서 PCNA로 염색된 세포를 전체 세포수로 나누어 PCNA Labeling Index를 구하였다(각 시점과 각 그룹당 n=3).

통계 분석

모든 data는 평균±표준편차로 표시하였다. 탈리도마이드군과 컨트롤군을 unpaired, 2-tailed t test로 비교하였고 p<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 정의 하였다. 모든 통계적인 계산은 SPSS 11.0 프로그램을 사용하였다.

결 과

탈리도마이드를 통한 혈관 신생내막 증식의 억제

시술 3일째 혈관 내막과 중막은 두 그룹 사이에 의미 있는 형태학적 차이를 보이지 않았다. 아직 양쪽 그룹에서 신생내막은 관찰되지 않았다(Fig. 1C, D, n=16). 그러나 시술 2주 후 대조군에서는 현저한 신생내막의 증식이 관찰되었고(Fig. 1E, G) 이에 반해 탈리도마이드군에서는 신생내막의 면적이 71% 감소하였으며(0.17±

0.04 대 0.05±0.02 mm², n=16, p<0.001), 신생내막/중막 비(neointima/media ratio, N/M ratio)는 72% 감소하였다(1.26±0.29 대 0.35±0.13, p<0.001, Fig. 1F, H, I, J). 따라서 혈관 내경은 탈리도마이드 투여로 보다 넓게 유지가 되었다(0.24±0.04 대 0.36±0.06 mm², p<0.001). Fig. 1I, J에 결과를 요약하였다. 혈관 성형술을 받지 않은 경동맥은 대조군과 탈리도마이드군에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 1A, B).

탈리도마이드를 통한 전신 염증반응의 감소

탈리도마이드 투여로 인한 내막 형성의 억제는 염증반응의 감소와 밀접히 연관되어 있었다. 탈리도마이드는 전신 염증반응의 표지자인 혈청 TNF- α 를 시술 후 3일과 14일째 각각 48%와 51%씩 감소시켰다(856±213 대 449±68 pg/mL, n=16, p=0.001, 3일; 129±34 대 63±18 pg/mL, n=16, p=0.001, 14일, Fig. 2A). 더욱이 14일째 혈청 TNF- α 와 N/M ratio는 강한 양의 상관관계를 보여(Fig. 2B) 혈청 TNF- α 가 억제될수록 N/M ratio도 감소하였다(Pearson correlation coefficient 0.908, n=16, p<0.001, two-tailed).

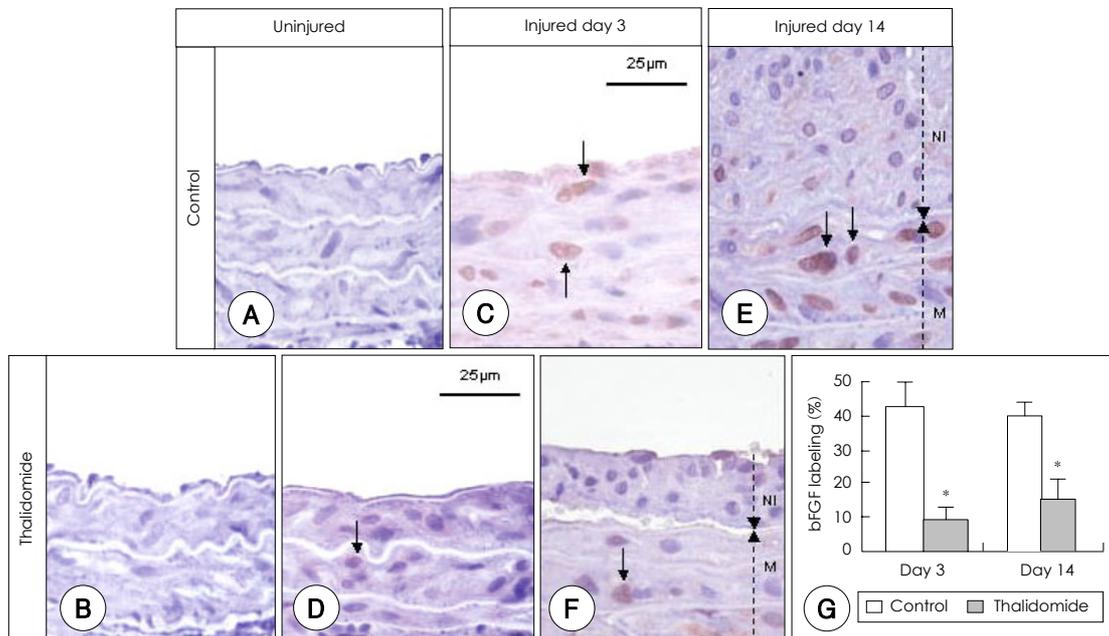


Fig. 4. Comparison of bFGF staining in the arterial wall. Immunohistochemical analysis showed decreased bFGF staining in nuclei and cytoplasm, identified as brown color, in the artery on 3 days (Fig. 4D) and 14 days (Fig. 4F) in the thalidomide-treated group versus the control. The percentages of bFGF-labeling index at the indicated time points were 43.3±6.9% and 39.8±4.2% in the control group and 9.0±2.8% and 15.0±5.8% in the thalidomide-treated group, respectively (n=3 per time point per group, p<0.001). The arrow indicates a bFGF-positive nucleus. ↓: bFGF staining positive. *: p<0.001. FGF: fibroblast growth factor.

손상 혈관에서 탈리도마이드를 통한 국소 염증반응의 감소

탈리도마이드 투여로 손상 받은 혈관에서 TNF- α 와 bFGF의 국소 발현이 억제됨을 Western blotting으로 확인하였다. 혈관 성형술을 시행하지 않은 혈관에서는 TNF- α 와 bFGF의 발현이 미미 하였으나 시술 후 3일과 14일 째 대조군에서는 이들의 발현이 뚜렷이 증가하였다. 하지만 탈리도마이드를 투여한 혈관에서는 두 시점에서 모두 그 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 3A, B).

탈리도마이드가 bFGF를 억제함은 면역조직화학염색에서도 확인되었다. 대조군에서는 bFGF염색이 강하게 되었으나(Fig. 4C, E) 탈리도마이드를 투여한 혈관의 핵과 세포질에서는 유의하게 약화되었다(Fig. 4D, F). 전체 혈관 세포의 핵 중 bFGF 양성 핵의 수를 bFGF 양성 지수로 정의하였을 때 탈리도마이드는 bFGF 양성 지수를 혈관성형술 후 3일과 14일 째 현저히 감소시켰다 (43.3 \pm 6.9 대 9.0 \pm 2.8%, n=3, p<0.001, 3일 ; 39.8 \pm

4.2 대 15.0 \pm 5.8%, n=3, p<0.001, 14일, Fig. 5G).

조직에 침투한 대식세포의 용해소체의 막(lysosomal membrane)에 주로 존재하는 110 kD의 glycoprotein ED-1을 면역조직화학법으로 염색한 결과 탈리도마이드는 혈관성형술 2주 후 대식세포의 혈관침윤을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다(19.2 \pm 3.5 대 4.0 \pm 2.1%, p=0.021, Fig. 5).

이러한 모든 결과는 탈리도마이드가 전신 염증 반응뿐만 아니라 국소 염증반응도 억제함을 보여주는 것이다.

탈리도마이드를 통한 혈관 평활근세포 분열능의 감소

억제된 염증반응은 VSMCs의 분열능 감소와 동반하여 나타났다. 혈관 성형술 후 3일째 대조군에 비해서 탈리도마이드를 투여한 혈관의 중막에서는 PCNA 양성 세포 수가 현저하게 감소하였다(Fig. 6C, D). 더군다나 이러한 탈리도마이드의 분열 억제 효과는 신생내막과 중

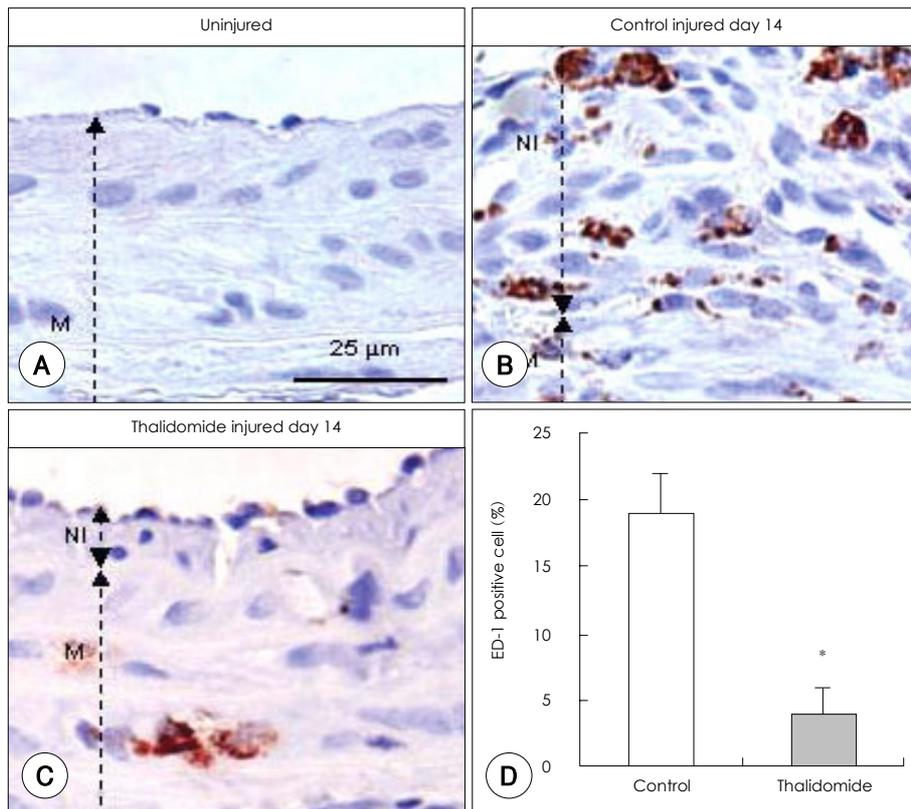


Fig. 5. Immunohistochemical analysis of infiltration of macrophages in rat carotid arteries two weeks after balloon injury. Number of tissue macrophages in media and neointima of thalidomide-treated rats (B, n=4) were significantly reduced versus the control animals (C, n=4). Brown cytoplasmic stain indicates ED-1 positive tissue macrophages, which are major sources of TNF- α and many other cytokines. NI: neointima, M: media, ED-1 indicates macrophage staining. *: p=0.021. TNF: tumor necrosis factor.

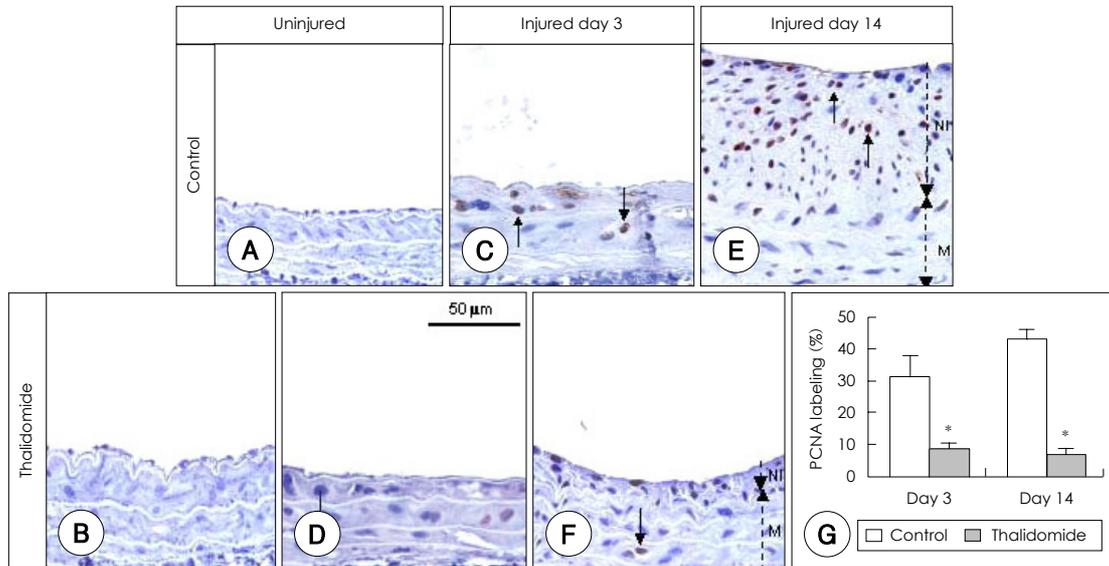


Fig. 6. Immunohistochemical analysis of the proliferation of VSMCs of rat carotid arteries in control and thalidomide-treated animals. The arrows indicate typical PCNA-positive cells. Note the reduction in the number of nuclei stained with PCNA in animals treated with thalidomide at 3rd (D) and 14th day (F) after balloon injury, respectively, compared with the controls (C, E). Few PCNA-labeled cells were found in the uninjured arteries of both groups (A, B). PCNA-positive cells in the media and neointima of treated (n=3) and control animals (n=3) were counted and are presented as mean±SD (G). The arrow indicates a PCNA-positive cell. ↓: PCNA staining positive. *: p<0.001. VSMCs: vascular smooth muscle cells, PCNA: proliferating cell nuclear antigen.

막에서 시술 후 14일까지 지속되었다(Fig. 6E, F). PCNA 양성 세포수는 대조군에서 3일과 14일 째 각각 31.0±7.3%와 43.1±2.9%였으나 탈리도마이드군에서는 9.4±1.9%와 7.4±1.7%로 줄어들었다(p<0.001 unpaired, 2-tailed t test).

고찰

탈리도마이드는 1950년대 진정제로 개발된 후 동물 실험결과 10 g/kg의 용량에서도 독성이 없어 오심과 구토의 조절을 위해 over-the-count drug으로 판매되기 시작하였다. 한때 독일에서는 연간 판매량이 15톤에 이르기도 하였으나 dysmelia syndrome과 같은 부작용이 알려지면서 사용이 중단되었다.⁸⁾

그러나 최근에는 이 약제의 강력한 항염증, 항혈관형성, 면역조절효과가 보고되면서 탈리도마이드에 관한 관심이 다시 일고 있다. 이제 탈리도마이드는 루푸스, 류마티스 관절염, 크론씨 병, 베체씨 병, 다발성 골수염과 같이 염증반응이 중요한 역할을 하고 있는 많은 임상 분야에서 사용이 확대되고 있다.⁸⁾⁹⁾

지난 40 여년 간의 연구에도 불구하고 탈리도마이드

의 작용기전은 아직 완전히 규명되지 않았다. 이 약제의 항염증 효과는 주로 사이토카인과 성장인자의 생산과 분비에 변화를 일으키기 때문으로 생각되고 있다. 이 중 최근까지 가장 잘 알려진 것이 TNF- α 억제 효과이다.⁸⁾¹⁴⁾ 일부 *in vitro* 연구들은 탈리도마이드가 단핵세포의 TNF- α mRNA의 반감기를 줄인다고 보고하였다.¹⁴⁾

TNF- α 는 염증반응의 주요한 매개체로서 혈관 성형술 후 활성화된 백혈구와 VSMCs에서 발현된다.³⁾⁴⁾ 더욱이 혈관 성형술 후 10일까지 대부분의 신생내막의 VSMCs은 TNF- α 와 그 mRNA를 발현하며 지속적으로 분열 하였으며,³⁾ TNF- α 항체 코팅 스텐트를 사용하여 TNF- α 의 효과를 억제 하였을 때 VSMCs의 증식을 억제할 수 있었다.¹⁵⁾ 또한 rabbit을 이용한 다른 동물 실험에서는 TNF- α 의 주요한 원천이 되는 대식세포의 혈관 침윤이 혈관성형술 후 시술 받은 혈관에서 2주에서 4주까지 지속됨을 보고하고 있다.²⁾¹³⁾ 이러한 기존의 사실들과 잘 부합하게 이번 실험에서도, 혈관 성형술 후 대조군 혈관조직의 TNF- α 의 발현은 2주까지 지속적으로 높아져 있음을 확인할 수 있었고(Fig. 3A) 이는 전신 염증 반응을 반영하는 혈청 TNF- α 의 변화와는 차이를 보였다(Fig. 2A). 한편 다른 실험에서 Zhou 등¹⁶⁾

은 TNF- α 항체로 혈관조직의 TNF- α 활성을 억제 하였음에도 불구하고 신생내막 증식 억제에 실패하였다고 보고하여 신생내막 형성에 있어 이 매개물의 중요성에 의문을 보이기도 하였다. 그러나 이전의 다른 결과들을 고려할 때²⁾¹³⁾ 전체 실험기간 3주 중 초기 1주간만 TNF- α 의 활성을 억제한 것은 불충분 하였을 것이다. 따라서 좀더 오랜 기간 충분히 TNF- α 의 효과를 중화시켰다면 보다 뚜렷하게 신생내막의 증식을 억제할 수 있었을 것이다.

본 연구에서는 ELISA와 Western blot으로 확증했듯이 탈리도마이드의 투여로 혈관 성형술 후 14일까지 TNF- α 의 생성과 대식세포의 혈관 침윤을 유의하게 억제할 수 있었다. 대식세포의 혈관 침윤은 약 80% (Fig. 5D), 혈청 TNF- α 는 약 50% 정도 (Fig. 2A) 감소하였고 이는 다른 연구들의 결과와도 견줄 만 하다.¹³⁾ 더군다나 본 실험 결과 혈청 TNF- α 와 혈관 신생내막 증식량 사이에는 강한 양의 상관관계가 존재하여 (Fig. 2B) 혈청 TNF- α 가 억제될수록 N/M ratio도 감소함을 알 수 있었다. 즉 염증반응이 억제될수록 신생내막의 증식도 약화됨을 관찰하였다. 게다가 탈리도마이드는 TNF- α 의 전신적인 분비를 억제하였을 뿐만 아니라 손상 혈관에서의 국소 발현 또한 감소시켰다 (Fig. 3A). 이러한 결과들은 탈리도마이드가 전신염증반응과 국소염증반응을 함께 줄임으로써 신생내막의 과증식을 억제함을 암시한다. 이러한 결과들은 rabbit을 이용한 stent나 balloon 손상 모델에서 LPS로 비특이적인 전신 염증반응을 유발하였을 때 신생내막의 발생이 더욱 현저히 증가한다는 다른 실험의 결과와도 잘 부합한다.²⁾ 따라서 Danenberg 등²⁾은 관동맥 중재술을 시행할 때 가능한 전신적 또는 국소적 염증을 최소화 해야 한다고 주장하고 있다.

bFGF와 그 mRNA는 혈관 성형술 후 분열하는 VSMC와 내피세포의 핵과 세포질에서 발현이 증가한다.⁵⁾ bFGF는 분비된 후 세포막의 수용체를 통해 세포질과 핵 내로 이동한 후 축적된다.¹⁷⁾¹⁸⁾ 이러한 세포 내 이동은 protein kinase CKII를 자극하여 세포 주기의 진행과 세포분열을 유도한다. 따라서 VSMCs이 bFGF의 자극을 받게 되면 신생내막이 매우 증가하게 되며⁵⁾ 반면에 bFGF 항체로 bFGF의 활성을 막게 되면 VSMCs의 분열이 억제된다.¹⁹⁾

탈리도마이드는 단독 치료만으로도 다발성 골수종, 골

수이형성증후군, 조직구증(histiocytosis) 환자에서 혈청 bFGF를 유의하게 줄였다.²⁰⁾ 탈리도마이드가 bFGF를 억제하는 기전으로 제시된 것 중 한가지는 이 약제가 DNA에 결합한다는 것으로¹⁰⁾ 많은 증거들이 이를 뒷받침하고 있다.²¹⁾ bFGF 유전자의 promoter region에는 전형적인 TATA box가 없고 그 대신 다수의 GGG-CGG sequence (GC boxes)가 존재하는 것으로 알려져 있다.¹²⁾²²⁾ 그런데 탈리도마이드는 구조적으로 adenine 보다는 guanine과 더욱 유사하여 GC promoter site에 보다 특이적으로 결합하는 것으로 보고되고 있다.²²⁾ 그러므로 탈리도마이드가 이 GC box에 결합하여 bFGF 유전자의 전사를 억제하게 되므로 bFGF는 그 발현이 억제되는 것이다. TATA box나 CCAAT box 대신에 GC box의 조절을 받는 단백질로는 bFGF 외에도 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 수용체, bFGF 수용체, $\alpha v \beta 3$ integrin 등이 있다. 이들 모두는 재협착의 병리기전과 매우 밀접하게 관련되어 있는 분자들이다.²³⁾

본 연구에서는 이러한 사실들과 잘 부합하게 탈리도마이드를 투여한 동맥에서 bFGF의 발현이 현저히 감소하였음을 Western blotting 결과 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 또한 면역조직화학염색 결과 대조군에 비하여 (Fig. 4C, E) 탈리도마이드군의 핵과 세포질에서 bFGF 염색이 3일과 (Fig. 4D) 14일째 (Fig. 4F) 모두 유의한 감소를 보였다. 아마도 탈리도마이드의 투여는 대식세포의 침윤을 줄이고 TNF- α 와 bFGF의 발현을 억제하였으며 이는 VSMCs의 분열의 저하로 이어지고 내막 증식의 감소를 초래했을 것이다.

위에서 이미 언급한 것들 뿐만 아니라 탈리도마이드는 IL-1, IL-6, IL-8과 같은 pro-inflammatory 사이토카인들은 억제하는 반면⁸⁾¹⁰⁾ IL-10과 같은 anti-inflammatory 사이토카인의 생성은 높인다.⁹⁾ 또한 integrin, ICAM, VCAM⁸⁾¹¹⁾ 과 같은 부착 분자들의 발현을 억제하여 결과적으로 혈관 내피세포와 백혈구의 접촉도 저해한다. 게다가 탈리도마이드는 I- κ B의 분해를 억제하여 염증반응, 세포분열, 재협착 과정에서 중요한 역할을 하는 NF- κ B의 활성을 막는다.¹²⁾²⁴⁾ 게다가 동맥 경화반이나 재협착 병변의 진행에 있어 vasa vasorum 같은 신생 혈관의 형성이 또한 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되고 있는데 탈리도마이드는 강력한 anti-

angiogenic 특성을 보이고 있어 이점도 역시 재협착 형성 억제에 도움이 될 것으로 생각된다.

이번 실험에서는 실제 임상 상황에 비해서 다소 많은 양의 탈리도마이드를 사용하여 연구의 제한점으로 거론될 수는 있겠으나 양 군간에 부작용이나 몸무게의 변화, 사망률의 차이는 뚜렷하지 않았다. 또한 탈리도마이드가 임신 중 기형을 유발하는 것은 사실이다. 하지만 다른 경우에는 매우 안전한 것으로 알려져 있다. 가장 흔한 부작용으로는 말초 신경염, 진정작용, 피로 등이다.⁸⁾ 하지만 이러한 부작용들은 대체로 경미하며 이로 인해 약제를 끊는 경우는 드물다. 최근 증상이 있는 심부전 환자들에게 매일 100~200 mg의 용량을 6개월간 투여 하면서 2주 간격으로 일반혈액검사, 일반화학검사, 간기능 검사등을 실시 하였으나 치료전과 큰 변화는 없었다.⁹⁾ 더군다나 관상동맥 질환은 대부분 고령의 환자들에서 발생하는 것으로 이들은 임신의 가능성이 매우 희박하므로 기형아 출산은 큰 문제가 되지 않을 것이 확실하다.

한편 몇몇 임상시험결과 sirolimus 코팅 스텐트가 이미 재협착을 뚜렷하게 감소시킨 것은 사실이다.²⁵⁾²⁶⁾ 하지만 이 임상시험들은 추적기간이 너무 짧고 등록된 환자의 수가 적다는 문제점을 안고 있어 지연된 부작용(delayed complication)의 가능성이 아직 배제되지 않았다.²⁷⁻²⁹⁾ 게다가 비용효과 문제 또한 주요한 제한점으로 남아 있다.³⁰⁾ 이러한 문제점들에 대해 Lemos 등³⁰⁾은 다른 많은 약물 코팅 스텐트들의 개발로 가격경쟁이 발생해야 이의 가격이 떨어질 것이라고 지적했다. 따라서 탈리도마이드와 같이 재협착을 억제하는 새로운 약물의 개발과 발견을 위한 지속적인 노력이 매우 필요한 실정이다.

본 연구에서 우리는 처음으로 탈리도마이드의 투여가 신생내막의 생성을 유의하게 억제하였음을 보고한다. 이는 TNF- α 와 bFGF의 발현저하, 대식세포의 침윤억제 그리고 그와 동반된 VSMCs의 분열감소를 통하여 이루어 졌다. 본 연구는 in-stent restenosis의 모델을 사용하지 않고 de-novo 신생내막 증식 모델을 사용하였으므로 앞으로 큰 동물을 이용한 in-stent restenosis 모델에서 약효의 확인과 혈관 평활근 세포를 사용한 in vitro 실험이 추후 필요한 상태이지만 탈리도마이드가 재협착의 주요 기전인 신생내막의 성장을 유의하게 억제함을 분명히 보여 주었다. 따라서 탈리도마이드는 재협착

방지를 위한 새로운 약물 코팅 스텐트의 개발이나 경구 투여 약물로 응용 가능성을 보인다고 하겠다.

요 약

배경 및 목적 :

염증반응은 혈관 신생내막 증식에 중추적 역할을 하고 있다. 한편 탈리도마이드는 강력한 항염증, 면역조절 효과로 인해 최근 여러 임상분야에서 다시 사용되고 있다. 이에 저자들은 탈리도마이드가 혈관 신생내막 증식을 억제할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

방 법 :

수컷 Sprague-Dawley 쥐를 경동맥 혈관성형술 3일전부터 100 mg/kg qd의 용량으로 전처치를 한다. 경동맥 손상 후 2주 간 동일한 용량으로 투여를 지속한다.

결 과 :

경동맥 성형술 후 3일과 14일 쯤 전신 염증반응을 나타내는 혈청 TNF- α 를 ELISA로 측정하였을 때 대조군에 비하여 탈리도마이드군에서 현저한 감소를 보였다 (856 \pm 213 대 449 \pm 68 pg/mL, p=0.001, 3일 쯤; 129 \pm 34 대 63 \pm 18 pg/mL, p=0.001, 14일 쯤). 그리고 혈관성형술을 받은 조직의 국소 염증반응 정도를 평가하기 위하여 면역조직화학염색법과 Western blotting으로 측정된 TNF- α 와 bFGF의 발현, 대식세포의 혈관침윤 정도는 탈리도마이드로 뚜렷이 약화되었다. 이는 또한 혈관 평활근 세포의 분열능 저하와 연관되어 나타났다(43.1 \pm 2.9 대 7.4 \pm 1.7%, p<0.001, 14일 쯤). 혈관 성형술 2주 후 형태학적 분석결과 탈리도마이드를 투여한 혈관은 신생내막의 성장이 현저히 억제되어 대조군에 비해 보다 넓은 내강을 확보할 수 있었으며(0.17 \pm 0.04 대 0.05 \pm 0.02 mm², p=0.001) 더욱이 혈청 TNF- α 와 신생내막/중막 비(Neointima/Media ratio)는 강한 양의 상관관계를 보여 TNF- α 가 감소할수록 신생내막의 증식도 억제되었다.

결 론 :

강력한 항염증, 항분열 효과를 통해 탈리도마이드는 혈관 신생내막의 증식을 유의하게 억제할 수 있었다. 이에 탈리도마이드는 재협착 방지를 위한 새로운 약물의 가능성이 보였다.

중심 단어 : 염증 ; 관동맥 재협착 ; 탈리도마이드 ; 사이토 카인.

REFERENCES

- 1) Welt FG, Rogers C. *Inflammation and restenosis in the stent era. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1769-76.
- 2) Danenberg HD, Welt FG, Walker M 3rd, Seifert P, Toegel GS, Edelman ER. *Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits. Circulation* 2002;105:2917-22.
- 3) Tanaka H, Sukhova G, Schwartz D, Libby P. *Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF- α but not interleukin-1 or basic fibroblastic growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:12-8.
- 4) Clausell N, de Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb AI, Adelman AG, Rabinovitch M. *Expression of tumor necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by arterectomy. Br Heart J* 1995;73:534-9.
- 5) Lindner V, Reidy MA. *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries. Circ Res* 1993;73:589-95.
- 6) Koch W, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Neumann FJ, Schomig A, Kastrati A. *Association of a CD 18 gene polymorphism with a reduced risk of restenosis after coronary stenting. Am J Cardiol* 2001;88:1120-4.
- 7) Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P. *The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. Eur Heart J* 2002;23:721-5.
- 8) Raje N, Anderson K. *Thalidomide: a revival story. N Engl J Med* 1999;341:1606-9.
- 9) Gullestad L, Semb AG, Holt E, Skardal R, Ueland T, Undestad A, Froland SS, Aukrust P. *Effect of thalidomide in patients with chronic heart failure. Am Heart J* 2002;144:847-50.
- 10) Finnell RH, Waes JG, Eudy JD, Rosenquist TH. *Molecular basis of environmentally induced birth defects. Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:181-208.
- 11) Settles B, Stevenson A, Wilson K, Mack C, Ezell T, Davis MF, Taylor LD. *Down-regulation of cell adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 after in vitro treatment with the anti-TNF- α agent thalidomide. Cell Mol Biol* 2001;47:1105-14.
- 12) Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. *Thalidomide suppresses NF- κ B activation induced by TNF- α and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharide, or phorbol ester. J Immunol* 2002;168:2644-51.
- 13) Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, Hesselbacher SE, Feldman MJ, McNamara CA, Gimple LW, Powers ER, Mousa SA, Sarembock IJ. *Selective α v β 3-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. Circulation* 2001;103:1906-11.
- 14) Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. *Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. J Exp Med* 1993;177:1675-80.
- 15) Javed Q, Swanson N, Vohra H, Thurston H, Gershlick AH. *Tumor necrosis factor-alpha antibody eluting stents reduce vascular smooth muscle cell proliferation in saphenous vein organ culture. Exp Mol Pathol* 2002;73:104-11.
- 16) Zhou Z, Lauer MA, Wang K, Forudi F, Zhou X, Song X, Solowski N, Kapadia SR, Nakada MT, Topol EJ, Lincoff AM. *Effect of anti-tumor necrosis factor- α polyclonal antibody on restenosis after balloon angioplasty in a rabbit atherosclerotic model. Atherosclerosis* 2002;161:153-9.
- 17) Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber JP, Teissie J, Amalric F. *Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulate the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0 G1 transition. Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6770-4.
- 18) Hawker JR Jr, Granger HJ. *Internalized basic fibroblast growth factor translocates to nuclei of venular endothelial cells. Am J Physiol* 1992;262:H1525-37.
- 19) Lindner V, Reidy MA. *Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3739-43.
- 20) Bertolini F, Mingrone W, Alietti A, Ferrucci PF, Coccorocchio E, Peccatori F, Cinieri S, Mancuso P, Corsini C, Burlini A, Zucca E, Martinelli G, Cineri S. *Thalidomide in multiple myeloma, myelodysplastic syndromes and histiocytosis: analysis of clinical results and of surrogate angiogenesis markers. Ann Oncol* 2001;12:987-90.
- 21) Huang PH, McBride WG. *Interaction of [glutarimide-2-14C]-thalidomide with rat embryonic DNA in vivo. Teratog Carcinog Mutagen* 1997;17:1-5.
- 22) Jonsson NA. *Chemical structure and teratogenic properties: IV. an outline of a chemical hypothesis for teratogenic action of thalidomide. Acta Pharm Suec* 1972;9:543-62.
- 23) Panda D, Kundu GC, Lee BI, Peri A, Fohl D, Chackalaparampil I, Mukherjee BB, Li XD, Mukherjee DC, Seides S, Rosenberg J, Stark K, Mukherjee AB. *Potential role of osteopontin and α v β 3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9308-13.
- 24) Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, Xu Z, Koshelnick Y, Lipp J, de Martin R, Losert U, Lammer J, Binder BR. *Activation of nuclear factor kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. Circulation* 2002;105:633-8.
- 25) Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. *A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. N Engl J Med* 2002;346:1773-80.
- 26) Degertekin M, Serruys PW, Foley DP, Tanabe K, Regar E, Vos J, Smits PC, van der Giessen WJ, van den Brand M, de Feyter P, Popma JJ. *Persistent inhibition of neointimal hyperplasia after sirolimus-eluting stent implantation: long-term (up to 2 years) clinical, angiographic, and intravascular ultrasound follow-up. Circulation* 2002;106:1610-3.
- 27) Babapulle MN, Eisenberg MJ. *Coated stents for the prevention of restenosis: part II. Circulation* 2002;106:2859-66.
- 28) Kereiakes DJ. *Hippocrates revisited: the evidence for drug-eluting stents. Circulation* 2003;107:3012-4.
- 29) Fattori R, Piva T. *Drug-eluting stents in vascular intervention. Lancet* 2003;361:247-9.
- 30) Lemos PA, Serruys PW, Sousa JE. *Drug-eluting stents: cost versus clinical benefit. Circulation* 2003;107:3003-7.