

# Cilostazol이 혈관 평활근세포의 증식 및 iNOS와 p21의 발현에 미치는 효과

중앙대학교 의과대학 내과학교실,<sup>1</sup> 소아과학교실<sup>2</sup>

이광제<sup>1</sup> · 윤신원<sup>2</sup> · 김상욱<sup>1</sup> · 김태호<sup>1</sup> · 김치정<sup>1</sup> · 류왕성<sup>1</sup>

## The Effects of Cilostazol on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Expression of iNOS and p21

Kwang-Je Lee, MD<sup>1</sup>, Sin-Weon Yun, MD<sup>2</sup>, Sang-Wook Kim, MD<sup>1</sup>,  
Tae-Ho Kim, MD<sup>1</sup>, Chee-Jeong Kim, MD<sup>1</sup> and Wang-Seong Ryu, MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine and <sup>2</sup>Pediatrics, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives :** Cilostazol is an anti-platelet and arterial vasodilating drug that inhibits phosphodiesterase type III, an enzyme that breaks down cyclic AMP in platelets, vascular smooth muscle cells, cardiac myocytes and adipocytes. Several animal and human studies have shown that cilostazol has the potential to reduce restenosis after coronary angioplasty, but the precise mechanism by which the inhibition of vascular smooth muscle cell growth occurs from an increase in cyclic AMP is not yet clear. **Materials and Methods :** We investigated the effects of cilostazol on cell proliferation and expression of iNOS and p21 by western blotting with the cultured aortic vascular smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor BB. **Results :** In comparison to the control, treatment with cilostazol significantly inhibited ( $p<0.05$ ) the increase in cell number. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and p21 expression increased with cilostazol treatment, and these effects of cilostazol were eliminated by simultaneous incubation with the NOS inhibitor, L-NAME. These results indicate that cilostazol increases p21 expression at least partially through an iNOS-dependent pathway in cultured vascular smooth muscle cells stimulated with PDGF-BB. **Conclusion :** These findings suggest that cilostazol has a direct inhibitory effect on abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells accompanied by the induction of iNOS-dependent p21 expression, and cilostazol may have potential to prevent restenosis after percutaneous coronary intervention by this mechanism. (Korean Circulation J 2004;34(5):500-506)

**KEY WORDS :** Cilostazol ; Nitric-oxide synthase ; Protein p21 ; Vascular smooth muscle.

### 서론

혈관 내피세포 손상 후 중막 평활근세포의 과도한 증

식은 죽상 동맥경화증의 진행<sup>1)</sup> 및 경피적 풍선 확장성  
형술이나 스텐트 삽입술 후 관상동맥 재협착의 주요 기  
전이다.<sup>2-4)</sup> 항 혈소판 제제이면서 혈관 확장 기능을 가

논문접수일 : 2004년 1월 14일

심사완료일 : 2004년 2월 12일

교신저자 : 이광제, 100-272 서울 중구 필동 2가 82-1 중앙대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (02) 2260-2129 · 전송 : (02) 2264-7578 · E-mail : heartlee@freechal.com

지고 있는 cilostazol은 쥐의 경동맥 풍선손상 모델<sup>5)</sup> 및 개의 외 회장동맥(external iliac artery) 스텐트 모델에서<sup>6,7)</sup> 신생내막의 증식을 억제하였고, 사람을 대상으로 한 여러 임상 연구에서도 스텐트 내 재협착을 위약 또는 ticlopidine 투여군에 비해 유의하게 감소시켰다.<sup>8-10)</sup> 하지만 cilostazol의 신생내막 증식 억제 기전은 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않다. 이 제제는 phosphodiesterase III를 선택적으로 길항하여 혈소판내 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 분해를 억제하고, cAMP-dependent protein kinase를 증가시킴으로써 세포내 칼슘 농도를 감소시킨다. 이로 인해 혈소판의 활성화를 저해하고 혈소판 응집을 차단하면서 platelet-derived growth factor(PDGF-BB) 등 혈관 평활근 증식 촉진 인자의 생성을 억제한다.<sup>11)</sup> 또한 혈관 평활근세포 내 cAMP-dependent protein kinase의 증가로 mitogen-activated protein kinase cascade가 억제되어 <sup>3</sup>H-thymidine uptake를 감소시키는 DNA 수준에서의 직접적 혈관 평활근세포 증식 억제 작용이 보고된 바 있고,<sup>12)</sup> 혈관 평활근세포 내 cAMP 증가와 관련된 혈관 평활근 이완 작용<sup>13)</sup>도 이에 기여할 것으로 추정되고 있다. Nakamura 등<sup>14)</sup>의 연구에서 cilostazol은 흰쥐의 흉부 대동맥 절편에서 용량에 비례하여 내피세포 의존성 혈관확장 작용을 유발하였고, 이러한 혈관확장 효과는 nitric oxide synthase(NOS)의 경쟁적 길항제인 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)에 의해 억제되었다. 또한 요 검사상 산화질소의 대사 산물인 nitrite가 cilostazol 치료군에서 유의하게 증가함을 보고하였다. 이 결과는 cilostazol이 내피세포 의존적으로 산화질소의 생성을 증가시키는 작용이 있음을 시사하였다. 관상동맥 스텐트 삽입술 후 재협착 예방을 위한 Adenovirus를 매개로 한 eNOS 유전자 전이치료나<sup>15,16)</sup> 산화질소 공여약제 투여 연구<sup>17)</sup>의 결과들은 이러한 산화질소가 세포주기 억제 단백질인 p21, p27의 발현 증가와 일부 관련이 있음을 보고하였다. 그러나 cilostazol이 경피적 관상동맥 중재시술로 인한 내피세포 손상 후 중막 평활근세포의 증식 과정 또는 PDGF-BB 등 cytokine으로 증식 촉진된 혈관 평활근 세포에서 iNOS 및 p21의 발현에 미치는 효과는 아직 정립되어 있지 않다.

본 연구에서는 PDGF-BB로 증식을 촉진시킨 배양된 쥐의 대동맥 평활근세포에서 cilostazol이 혈관 평활근

세포의 증식과 iNOS 및 p21 단백질의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 cilostazol의 혈관 평활근세포 증식 억제작용이 기존에 알려진 cAMP 증가와 관련된 기전들 외에 iNOS 및 p21의 발현과 어떤 관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 성장

Sprague Dawley rat의 대동맥 혈관 평활근세포주(ATCC CRL2018)를 ATCC(American type culture collection)에서 분주받아 75 cm<sup>2</sup> 조직배양 용기를 사용하여 DMEM(Dulbecco's minimum essential medium, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B)를 첨가하여 만든 배지에 단층으로 자랄 때까지 배양하였다. 배양용기 안에서 80% 이상 자라면 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 다른 용기로 계대 배양해주었다.

2일 동안 배양한 혈관 평활근세포를 6 well plates에 well 당 2×10<sup>5</sup>개 씩 분주한 후 새 배지로 교체하여 배양하였다. 2일 후 2.5 ng/mL 농도의 platelet-derived growth factor(PDGF-BB, Sigma)와 insulin-transferrin-selenium(ITS, Gibco)을 추가로 첨가하고, 여기에 Takahashi 등의 연구에서<sup>18)</sup> 혈관 평활근세포의 증식을 억제시키는 적정 농도로 제시한, DMSO로 용해시킨 cilostazol 10<sup>-5</sup> M(Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)을 처리한 군과 처리하지 않은 두 군으로 분류하여 각각 배양하면서 이를 간격으로 새 배지로 교체하여 주었다. 세포의 성장은 2일 간격으로 8일간 조사하였다. 세포 성장의 정도는 세포수의 변화를 3회 반복 측정하여 paired t-test로 비교 분석하였으며, 세포 수 확인은 세포가 담긴 배지를 trypan blue 염색액에 1 : 1로 희석하여 위상차 현미경 및 hemocytometer를 이용하여 생존하는 세포들의 수를 확인하였다.

### iNOS 및 p21 단백질 발현 검출(Western blotting)

혈관 평활근세포를 100 mm dish를 이용하여 FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 단층으로 80% 까지 배양한 다음 serum free DMEM 배지로 교체하고, 교체 배

지에 2.5 ng/mL 농도의 PDGF-BB와 ITS를 첨가한 다음, cilostazol을 처리한 군과 처리하지 않은 두 군으로 분류하여 24시간 동안 배양하였다. Cilostazol을 처리한 군과 처리하지 않은 대조군 혈관 평활근세포를 각각 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 수거한 후 cell lysis buffer(50 mM HCl, 150 mM NaCl, 1% triton X-100, protease inhibitor cocktail, Sigma)를 첨가하였다. 그 후 얼음 안에 30분 동안 방치한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 상층액은 Bradford 시약을 이용하여 단백질 정량을 한 후, 그 중 50 ug를 취하여 5X sample buffer<sup>19)</sup>와 혼합하고 100°C에서 5분간 증탕하여 Western blotting 시료로 사용하였다. SDS-PAGE는 12% separating gel과 5% stacking gel로 구성된 불연속 전기영동 시스템(minigel system, Bio-Rad, USA)을 이용하여 100 volt로 전기영동하였다. Monton 등이 제시한 방법<sup>20)</sup>을 기본으로 하여, Western blot kit(Bio-Rad, USA)으로 전기영동한 gel을 nitrocellulose membrane(Hybond<sup>TM</sup>-ECL, Amersham, USA)으로 80 volt에서 1시간 동안 transfer buffer(Tris base 1.83 g, Glycine 90 g, 1 L D.W.)로 단백질 분자를 이동시켰고 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk 용액이 들어있는 용기에 넣어 상온에서 1시간 동안 흡착시켰다. TBS 완충액(Tris-Buffered Saline, 2 M Tris-HCl 5 mL, 4 M NaCl 37.5 mL, D.W. 957.5 mL, Tween20 0.05%)으로 3회 세척하고, 쥐의 iNOS에 대한 단 클론 항체(Transduction Laboratory, Japan)를 0.5% skim milk에 1 : 500으로 희석하여 4°C에서 10~12시간 반응 시켰다. 이를 TBS로 3회 세척 후 0.5% skim milk로 1 : 2,000으로 희석한 HRP conjugated anti-goat mouse IgG를 함유한 2차 항체(Transduction Laboratory, Japan)와 상온에서 한시간 동안 교반하면서 반응시키고, 다시 TBS로 3회 세척한 후 western blot luminol reagent(Santacruz, USA)로 1분간 처리하고 필름(Kodak, Min-R L, 18×24 cm, USA)에 10분간 감광하여 반응을 확인하였다. p21 단백질 발현은 쥐의 p21에 대한 단 클론 항체(Transduction Laboratory, Japan)를 이용하여 같은 방법으로 확인하였다.

#### NOS inhibitor(L-NAME) 첨가 후 p21 단백질 발현 검출

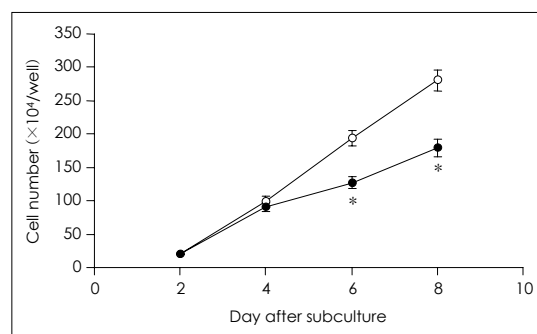
PDGF-BB로 자극된 배양된 혈관 평활근세포에 cilostazol

10<sup>-5</sup> M을 단독 처리한 군과, cilostazol 10<sup>-5</sup> M 및 NOS inhibitor인 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, Sigma) 4×10<sup>-3</sup> M을 동시에 처리한 군, 아무것도 첨가하지 않은 대조군 등 세 군으로 분류하여 각각 배양하였다. 24시간 후 0.05% trypsin-EDTA 처리 과정을 거쳐 cell lysis buffer를 첨가한 세포를 0°C에서 30분 동안 처리한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 사용하였다. Bradford 시약을 이용하여 단백질 정량을 하고 그 중 100 ug씩을 각각 취하여 5X sample buffer와 혼합한 후 100°C에서 5분간 증탕하여 시료로 사용하였다. SDS-PAGE 및 p21의 western blotting은 전술한 방법에 따라 실시 하였다.

## 결 과

#### Cilostazol이 혈관 평활근세포의 증식에 미치는 효과

Cilostazol이 배양된 쥐의 대동맥 평활근세포의 증식에 미치는 효과를 확인하기 위하여 PDGF-BB로 증식을 촉진시킨 혈관 평활근세포에 계대배양 제 2일부터 cilostazol 10<sup>-5</sup> M을 처리하여 제 8일까지 매 2일간격으로 trypan blue로 염색한 후 위상차 현미경으로 관찰하였다. 대조군에 비해 cilostazol 처리 군에서 제 6일째부터 trypan blue에 염색되지 않는 살아있는 세포의 증식이 유의하게 억제되었다(p<0.05, Fig. 1). 위상차 현미경 검사상 cilostazol의 첨가로 인한 혈관 평활근세포의 크기, 모양, 핵/세포 크기 비율 등의 형태학적

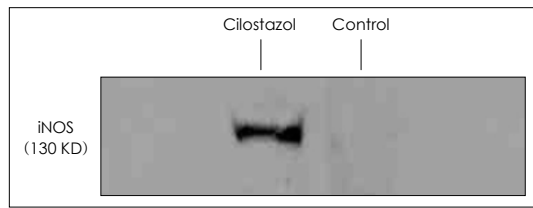


**Fig. 1.** Effect of cilostazol on the number of trypan blue negative vascular smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor (PDGF-BB). Two days after subculture, 10<sup>-5</sup> M cilostazol (●) or placebo (○) was added to Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) supplemented with PDGF-BB, which was changed every other day. \*: p<0.05.

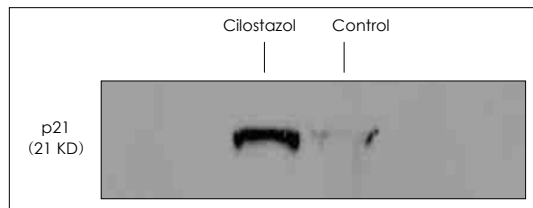
변화는 관찰되지 않았다.

#### Cilostazol이 iNOS 및 p21 단백질 발현에 미치는 효과

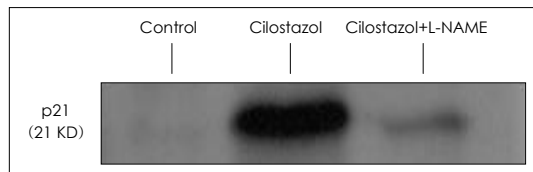
Cilostazol이 PDGF-BB로 증식 촉진된 혈관 평활근 세포에서 iNOS 및 p21 단백질의 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과 cilostazol을 처리한 군에서는 iNOS 및 p21의 발현이 모두 증가한 반면 대조군에서는 이들이 거의 발현되지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, 3).



**Fig. 2.** Effect of cilostazol on iNOS expression in vascular smooth muscle cells (VSMCs). Cell lysates from VSMCs with or without cilostazol were subjected to western blot analysis. iNOS expression was confirmed in cilostazol added cells (lane 1) but control did not express iNOS (lane 2). iNOS: inducible nitric oxide synthase.



**Fig. 3.** Effect of cilostazol on p21 expression in vascular smooth muscle cells. After subculture,  $10^{-5}$  M cilostazol or nothing material was added to DMEM with PDGF-BB. By western blot analysis, p21 expression was increased in cilostazol added cells (lane 1), but p21 expression was very weak in control cells (lane 2). DMEM: Dulbecco's minimum essential medium, PDGF-BB: platelet-derived growth factor.



**Fig. 4.** Effect of cilostazol and L-NAME on expression of p21 in vascular smooth muscle cells. After subculture, cilostazol only, cilostazol with L-NAME ( $4 \times 10^{-3}$  M) or nothing material (control) was added to DMEM with PDGF-BB. By western blot analysis, p21 expression was increased in cilostazol added cells (lane 2), but p21 expression was very weak in cilostazol with L-NAME added cells (lane 3) as well as control cells (lane 1). L-NAME: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, DMEM: Dulbecco's minimum essential medium, PDGF-BB: platelet-derived growth factor.

#### NOS inhibitor(L-NAME) 처리 후 iNOS 및 p21 단백질 발현의 변화

Cilostazol이 p21의 발현을 증가시키는 과정이 iNOS와 독립적인 과정인지 iNOS 의존적인 과정인지를 감별하기 위해 cilostazol 단독 처리군, 아무것도 처리하지 않은 대조군, cilostazol과 NOS inhibitor인 N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)를 동시에 처리한 군 등 세 군으로 분류하여 관찰한 결과, cilostazol만 처리한 군에서는 p21 단백질의 발현이 증가되었고 대조군에서는 p21이 거의 발현되지 않았으며 cilostazol과 L-NAME을 동시에 처리한 군에서는 p21 단백질의 발현이 매우 미약하게 나타나, cilostazol이 p21 단백질의 발현을 증가시키는 과정이 iNOS 단백질의 발현과 밀접한 관련이 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

## 고찰

Cilostazol {6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)-butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)-quinolinone, MW 369.47}은 항 혈소판 작용 및 혈관 확장 작용을 가진 약제로서 주요 작용 기전은 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심근세포 및 지질세포에 존재하는 phosphodiesterase type III를 선택적으로 억제하여 이들 세포 내의 cyclic AMP를 증가시킴으로써 발현된다.<sup>21)</sup> 이 제제는 말초 혈관 동맥경화성 질환 치료제로 미국 FDA의 공인을 받았으며 동물에서 뿐 아니라 사람을 대상으로 한 여러 연구에서도 관상동맥 성형술 후 재협착을 줄여 줄 수 있는 약제로 보고되어 왔지만, 경피적 관상동맥 중재시술 후 재협착 과정에서 혈관 평활근세포의 증식을 억제하는 기전은 아직 명확히 정립되어 있지 않다.

초기 연구에서는 cilostazol이 PDGF로 자극한 쥐의 대동맥 평활근세포의 증식을 억제하는 효과가 있으며, 이는 cAMP의 증가에 따른 이차적인 과정일 것이라고 추정하였다.<sup>18)</sup> 배양된 사람의 대동맥 평활근세포를 이용한 Hayashi 등<sup>19)</sup>의 연구에서는 cyclic AMP가 혈관 평활근세포의 PDGF 자극에 의한 증식을 억제하면서 p53 및 p21 단백질의 발현을 동시에 증가시켰다고 보고하였다. 흰쥐의 흉부 대동맥 절편을 이용한 연구에서는<sup>14)</sup> cilostazol이 혈소판이나 혈관 평활근세포 내에서 cAMP를 증가시킬 뿐 아니라 내피세포 의존적으로 산화질소의 생성을 증가시키는 작용을 통해 혈관확장을

유발한다고 보고 하여 cilostazol과 산화질소의 관계 및 이를 통한 혈관 평활근세포 성장의 억제 기전이 주목을 받게 되었다. 산화질소(nitric oxide)는 내피세포 손상 후 발생하는 혈소판 및 백혈구의 활성화, 혈관 평활근세포의 증식 및 기질 단백질의 합성 등 일련의 과정을 모두 억제하면서 혈관확장을 유발하는 물질이다.<sup>22)</sup> 이는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 생성되며, 혈관계에서 NOS는 정상 내피세포에서 합성하는 constitutive eNOS와 내피세포 손상 후 대식세포 또는 혈관 평활근세포 등에서 합성되는 inducible NOS(iNOS)의 두 가지 형태로 발현된다.<sup>23)</sup> 상기한 산화질소의 작용을 고려할 때 cilostazol의 혈관 평활근세포 증식억제 작용은 이 약제의 산화질소 증가 작용과 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다. 쥐의 경동맥 풍선 손상 모형을 이용한 iNOS의 시간에 따른 발현 양상에 관한 연구에서는<sup>24)</sup> 경동맥 풍선 손상 후 최초 48시간까지는 혈소판 응집 및 PDGF의 분비 증가 등에 의해 iNOS의 발현이 억제되어 증가가 미약하다가 이후 7일부터 30일까지는 iNOS의 발현이 현저히 증가되고, 이 중 최초 48시간 동안의 iNOS 발현 억제는 혈소판 glycoprotein IIb/IIIa 수용체 길항제 투여에 의해 소실됨을 보고하였다.

본 연구 결과, 대조군에서는 iNOS의 발현이 미미하나 cilostazol을 처리한 군에서는 iNOS의 발현이 증가되어 cilostazol이 PDGF-BB로 자극된 쥐의 대동맥 혈관 평활근세포의 증식과정에서 iNOS 단백질 발현을 증가시킴으로써 산화질소의 생성을 증가시킴을 관찰할 수 있었다.

관상동맥 스텐트 삽입술 후 재협착 예방을 위한 Adenovirus를 매개로 한 eNOS 유전자 전이치료나<sup>15)16)</sup> 산화질소 공여약제 투여 연구<sup>17)</sup>의 결과들은 이러한 산화질소의 재협착 억제 기전의 하나로서 세포주기 억제 단백질인 p21, p27 등의 발현증가가 관련되어 있음을 시사한다. p21 및 p27은 혈관벽 평활근세포의 세포주기 중 G1 상에서 S 상으로 이행하는 과정을 차단함으로써 혈관벽 평활근세포의 증식을 억제하게 되며,<sup>25)</sup> 내피세포 손상 후 중막 평활근세포 증식의 억제에 p21이 중요한 역할을 담당하고 있음이 보고된 바 있다.<sup>26)</sup> 이 중 p21은 p27과는 달리 정상 혈관에서는 거의 발견되지 않고 동맥 손상 후 회복기에 주로 발현된다.<sup>27)</sup> 산화질소가 p21 발현과 관련되어 혈관 평활근세포의

증식을 억제하는 기전에 관하여는 몇 가지 연구가 있었으나, 그 결과는 연구마다 다소간 차이를 보이고 있다. Ishida 등<sup>28)</sup>은 산화질소를 생성하는 혈관 확장제인 S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)을 이용, SNAP이 10% FBS와 bFGF로 자극한 사람의 체대 동맥 혈관 평활근세포에서 DNA합성을 억제하면서 cyclin-dependent kinase2(Cdk2)의 활성 및 retinoblastoma(Rb) protein의 phosphorylation을 억제함을 보고하였다. 또한 이 실험에서는 SNAP이 cyclin A 및 E의 messenger RNA 발현을 감소시켰으나 cdk2-associated p21 단백질의 발현은 증가시켰다고 보고하였다. Cdk2-associated cyclin A와 E 및 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)은 내피세포 손상 후 중막 혈관 평활근세포의 증식과정 중, 세포주기 G1 상에서 S 상으로 진행되는 과정을 촉진시키는 조절인자로 알려져 있다.<sup>29)</sup> 또한 세포주기 G1 상에서 S 상으로 진행되는 이 과정은 retinoblastoma 유전자의 산물인 활성화된 phosphorylated Rb(pRb) 및 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p21 등에 의해 억제되고, 결국 혈관 평활근세포의 증식을 억제하게 된다.<sup>26)</sup>

Sharma 등<sup>15)</sup>은 adenovirus를 매개로 한 eNOS 유전자 전이 연구에서, PDGF-BB로 자극된 guinea pig 관상동맥 평활근세포에서 eNOS 전이에 의해 PCNA 및 cyclin A의 발현이 억제되었고, cyclin E의 발현은 지연되었으나, p21 및 p27의 발현은 eNOS 유전자 전이에 의해 별다른 영향을 받지 않았음을 보고하였다. 전술한 Ishida 등의 연구 결과와는 달리 이들은 산화질소에 의한 혈관 평활근세포 증식억제 기전이 p21이나 p27 발현의 증가보다, PDGF 자극에 의한 cyclin A, cyclin E 및 PCNA 발현의 억제와 관련이 있을 것으로 보고하였다.

Sato 등<sup>16)</sup>은 10% FCS로 증식 촉진된 돼지 관상동맥 평활근세포에 Adenovirus를 매개로 한 eNOS 유전자 전이시, p21 및 p27의 발현이 증가되었으나 세포자멸사의 증가는 관찰되지 않아, eNOS 유전자 전이치료를 혈관 평활근세포 증식억제 기전이 p21 및 p27의 발현 증가에 의한 것이라고 보고하였으며, 이 결과는 전술한 Sharma 등<sup>15)</sup>의 연구 결과와 상반된 결과를 보이고 있다. 한편 Tanner 등<sup>17)</sup>은 FCS 또는 PDGF-BB로 자극한 사람의 대동맥 혈관 평활근세포에 Adenovirus를 매개로 eNOS 유전자 전이시, cyclin A의 발현

은 감소하고 p21의 발현은 증가하며, cyclin E와 p27의 발현은 대조군에 비해 차이가 없었음을 보고하였다.

이와 같이 여러 연구의 결과들이 다소간 차이를 보이면서 산화질소가 혈관 평활근세포의 증식을 억제하는 명확한 기전은 아직 정립되지 않았고, cilostazol이 iNOS 및 p21의 발현에 미치는 효과와 두 단백질 발현의 상관관계에 대하여는 거의 보고가 없었다.

본 연구에서는 PDGF-BB로 증식 촉진된 쥐의 대동맥 평활근세포를 이용하여 cilostazol 처리시, 혈관 평활근세포의 증식이 억제되면서 대조군에 비해 iNOS 단백질 및 p21 단백질의 발현이 모두 현저하게 증가하였고, 이 효과는 NOS inhibitor인 L-NAME 첨가에 의해 소실됨을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과를 종합해 볼 때 cilostazol의 혈관 평활근세포 증식억제 기전은 기존에 알려진 cAMP 증가에 의한 항 혈소판 및 cyclin-dependent kinase와 관련된 기전 외에 iNOS 단백질 발현 증가에 따른 산화질소 생성 및 p21 단백질 발현의 증가에 의한 직접적인 세포주기 억제와 밀접한 관련이 있으며, 세포주기 억제 단백질인 p21의 발현은 cilostazol 처리에 의한 iNOS 단백질 발현 증가에 의존적임을 관찰할 수 있었다.

결론적으로 경피적 관상동맥 중재시술 후 cilostazol의 재협착 억제 효과는 iNOS 단백질 발현 증가에 따른 p21 단백질 발현의 증가와 관련된 직접적인 혈관 평활근 세포주기 억제 작용이 그 주요한 기전이 될 수 있을 것으로 사료되었다. 그러나 향후 p21 단백질의 발현에 영향을 미칠 수 있는 다른 인자들과의 상호작용을 고려한 보다 명확한 기전 규명 및 증가된 p21이 실제로 혈관 평활근세포의 증식 및 세포주기 억제에 미치는 영향을 평가할 수 있는 동물실험 등의 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

Cilostazol은 항 혈소판 작용 및 혈관 확장 작용을 가진 제제로서 주요 작용 기전은 혈소판, 혈관 평활근세포, 심근세포 및 지질세포에 존재하는 phosphodiesterase type III를 선택적으로 억제하여 이들 세포 내의 cyclic AMP를 증가시킴으로써 발현된다. 이 약제는 동물 뿐 아니라 사람을 대상으로 한 여러 연구에서 경피적 관상

동맥 성형술 후 재협착을 줄여줄 수 있는 것으로 보고되어 왔으며, 이는 cAMP 증가에 의한 항혈소판 작용, 산화질소의 생성 증가 및 세포주기 억제 단백질의 발현 등과 관련이 있을 것으로 추정되고 있으나 아직까지 명확한 기전은 정립되어 있지 않다.

### 방 법 :

Platelet-derived growth factor(PDGF-BB)로 증식을 촉진시킨 Sprague Dawley rat의 배양된 대동맥 혈관 평활근세포에서 cilostazol이 세포의 증식과 iNOS 및 p21 단백질의 발현에 미치는 효과를 세포수 측정 및 Western blotting으로 관찰하고, NOS 억제제인 L-NAME을 첨가한 후 p21 단백질 발현의 변화를 관찰하였다.

### 결 과 :

Cilostazol은 PDGF-BB로 증식 촉진된 배양된 쥐의 혈관 평활근세포의 증식을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다( $p < 0.05$ ). Western blot 결과 cilostazol은 PDGF-BB로 증식 촉진된 배양된 쥐의 혈관 평활근세포에서 iNOS 및 p21 단백질의 발현을 모두 증가시켰고 이러한 효과는 NOS inhibitor인 L-NAME 처리에 의해 소실되었으며 이는 cilostazol에 의한 p21 단백질 발현의 증가가 iNOS 단백질 발현에 의존적인 과정임을 시사하였다.

### 결 론 :

Cilostazol은 PDGF-BB로 증식 촉진된 배양된 혈관 평활근세포에서 iNOS 단백질 발현 증가에 의존적으로 p21 단백질의 발현을 증가시키면서 세포 증식을 억제하였다. 이러한 iNOS 의존적인 p21 발현 증가에 의한 직접적인 혈관 평활근세포주기 억제 작용이 경피적 관상동맥 중재시술 후 cilostazol의 재협착 억제 효과를 설명하는 주요한 기전이 될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 이 기전의 보다 명확한 규명을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**중심 단어 :** Cilostazol ; Nitric oxide synthase ; Protein p21 ; 혈관 평활근세포.

## REFERENCES

- 1) Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature 1993;362:801-9.
- 2) Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, Tabei S, Phillips DF. *Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous*

- transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6:369-75.
- 3) Waller BF, Pinkerton CA, Orr CM, Slack JD, van Tassel JW, Peters T. Morphological observations late (greater than 30 days) after clinically successful coronary balloon angioplasty. *Circulation* 1991;83 (Suppl):128-41.
  - 4) Glagov S. Intimal hyperplasia, vascular remodeling, and the restenosis problem. *Circulation* 1994;89:2888-91.
  - 5) Matsumoto Y, Tani T, Watanabe K, Kimura Y. Effects of cilostazol, an antiplatelet drug, on smooth muscle cell proliferation after endothelial denudation in rats. *Jpn J Pharmacol* 1992;58:284. Abstract
  - 6) Kubota Y, Kichikawa K, Uchida H, Maeda M, Nishimine K, Makitani S, Sakaguchi S, Yoshioka T, Ohishi H, Kimura Y. Pharmacologic treatment of intimal hyperplasia after metallic stent placement in the peripheral arteries. *Invest Radiol* 1995;30:532-7.
  - 7) Ishizaka N, Taguchi J, Kimura Y, Ikari Y, Aizawa T, Togo M, Miki K, Kurokawa K, Ohno M. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* 1999; 142:41-6.
  - 8) Tanabe Y, Ito E, Nakagawa I, Suzuki K. Effect of cilostazol on restenosis after coronary angioplasty and stenting in comparison to conventional coronary artery stenting with ticlopidine. *Int J Cardiol* 2001;78:285-91.
  - 9) Kozuma K, Hara K, Yamasaki M, Morino Y, Ayabe S, Kuroda Y, Tanabe K, Ikari Y, Tamura T. Effects of cilostazol on late lumen loss and repeat revascularization after Palmaz-Schatz coronary stent implantation. *Am Heart J* 2001;141: 124-30.
  - 10) Kamishirado H, Inoue T, Mizoguchi K, Uchida T, Nakata T, Sakuma M, Takayanagi K, Morooka S. Randomized comparison of cilostazol versus ticlopidine hydrochloride for antiplatelet therapy after coronary stent implantation for prevention of late stenosis. *Am Heart J* 2002;144:303-8.
  - 11) Mizutani M, Okuda Y, Yamashita K. Effect of cilostazol on the production of platelet-derived growth factor in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Mol Med* 1996; 57:156-8.
  - 12) Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3'5'-monophosphate. *Science* 1993;262: 1065-9.
  - 13) Tanaka T, Ishikawa T, Hagiwara M, Onoda K, Itoh H, Hidaka H. Effect of cilostazol, a selective camp phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology* 1988;36:313-20.
  - 14) Nakamura T, Houchi H, Minami A, Sakamoto S, Tsuchiya K, Niwa Y, Minakuchi K, Nakaya Y. Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor; on rat thoracic aorta. *Life Sci* 2001;69:1709-15.
  - 15) Sharma RV, Tan E, Fang S, Gurjar MV, Bhalla RC. NOS gene transfer inhibits expression of cell cycle regulatory molecules in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 276:H1450-9.
  - 16) Sato J, Nair K, Hiddinga J, Eberhardt NL, Fitzpatrick LA, Katusic ZS, O'Brien T. eNOS gene transfer to vascular smooth muscle cells inhibits cell proliferation via upregulation of p27 and p21 and not apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;47:697-706.
  - 17) Tanner FC, Meier P, Greutert H, Champion C, Nabel EG, Luscher TF. Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins. *Circulation* 2000;101:1982-9.
  - 18) Takahashi S, Oida K, Fujiwara R, Maeda H, Hayashi S, Takai H, Tamai T, Nakai T, Miyabo S. Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:900-6.
  - 19) Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Taniyama Y, Nakamura T, Aoki M, Yamamoto K, Higaki J, Ogihara T. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension* 2000;35:237-43.
  - 20) Monton M, Lopez-Farre A, Mosquera JR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Sierra MP, Bellver T, Rico L, Casado S. Endogenous angiotensin II produced by endothelium regulates interleukin-1beta-stimulated nitric oxide generation in rat isolated vessels. *Hypertension* 1997;30:1191-7.
  - 21) Beavo JA, Conti M, Heasley RJ. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 1994;46:399-405.
  - 22) Trachtman H, Futterweit S, Singhal P. Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207: 120-5.
  - 23) Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994;31:131-43.
  - 24) Gonzalez-Fernandez F, Lopez-Farre A, Rodriguez-Feo JA, Farre J, Guerra J, Fortes J, Millas I, Garcia-Duran M, Rico L, Mata P, de Miguel LS, Casado S. Expression of inducible nitric oxide synthase after endothelial denudation of the rat carotid artery. *Circ Res* 1998;83:1080-7.
  - 25) Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 1993;366:701-4.
  - 26) Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96: 2260-8.
  - 27) Tanner FC, Yang ZY, Duckers E, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ Res* 1998;82:396-403.
  - 28) Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojima H, Ogata J. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>Sdi1/Cip1/Waf1</sup> by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997;272:10050-7.
  - 29) Wei GL, Krasinski K, Kearney M, Isner JM, Walsh K, Andres V. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res* 1997;80:418-26.