

# 

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

문건웅 · 이종민 · 장기욱 · 유기동 · 전두수 · 윤호중  
정옥성 · 이만영 · 김종진 · 승기배 · 김철민 · 홍순조

## 

Keon-Woong Moon, MD, Jong-Min Lee, MD, Kiyuk Chang, MD, Ki-Dong Yoo, MD,  
Doo-Soo Jeon, MD, Ho-Joong Youn, MD, Wook-Sung Chung, MD, Man-Young Lee, MD,  
Jong-Jin Kim, MD, Ki-Bae Seung, MD, Chul-Min Kim, MD and Soon-Jo Hong, MD

Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives** : Previous studies suggest that phenotypic conversion, proliferation and migration of adventitial fibroblasts after balloon injury have an important role in neointimal formation and vascular remodeling. The present study evaluated whether orally administered everolimus (a macrolide of the same family as sirolimus) reduces adventitial cell activation and neointimal formation in balloon-injured rat carotid arteries. **Materials and Methods** : Oral everolimus (1.25 mg/kg/day), or a matching placebo, was administered daily to 30 rats by gavage, starting 3 days before balloon injury. The treatment effects were assessed 3, 7 and 14 days after injury. **Results** : The oral everolimus group showed a significant reduction in adventitial cell proliferation at 3 days after injury and significant neointimal formation reduction compared to the control group at 7 and 14 days after injury (control group  $0.06 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ , everolimus group  $0.01 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$  and control group  $0.28 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ , everolimus group  $0.08 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$ ). **Conclusion** : Oral everolimus reduces adventitial cell activation and neointima formation in balloon injured rat carotid arteries. (Korean Circulation J 2004;34(10):983-991)

**KEY WORDS** : Everolimus ; Restenosis ; Angioplasty.

## 서론

관동맥 질환에서 풍선도자 또는 스텐트를 이용한 관동

논문접수일 : 2004년 6월 3일  
심사완료일 : 2004년 7월 6일  
교신저자 : 유기동, 442-723 경기도 수원시 팔달구 지동 93  
가톨릭대학교 의과대학 내과학교실  
전화 : (031) 249-7139 · 전송 : (031) 247-7139  
E-mail : yookd@dreamwiz.com

맥 중재시술은 외과적 치료법인 관동맥 우회로술과 비교될 정도로 효과가 좋은 것으로 인정되고 있다. 풍선확장술 후 30~40%에 달하던 재협착률은 관동맥 내 스텐트의 광범위한 사용으로 15~20%로 감소하였으나<sup>1)</sup> 아직 재협착은 관동맥 중재시술의 주요 한계이며 재협착의 주된 기전은 신내막형성(neointima formation)과 혈관 재형성(vascular remodeling)으로 알려져 있다.

혈관의 외막은 중막의 근육층에 적절한 영양을 공급하

는 것이 주된 기능으로 알려져 왔으나 최근 외막이 신 내막형성 및 혈관재형성에 영향을 미친다는 사실이 알려지면서 외막의 역할이 주목받고 있다.<sup>2)</sup> 혈관 손상 후 신내막 형성은 중막에 있는 혈관평활근세포의 활성화 및 보다 미숙한 세포로의 형질전환과 증식, 유주가 주된 기전으로 생각되고 있으나<sup>3-5)</sup> 외막의 섬유모세포 또한 혈관 손상 후 평활근세포와 비슷한 근섬유모세포(myofibroblast)로 형질전환을 일으키고 증식하는데<sup>6-8)</sup> 증식은 손상 후 약 3일 쯤 최고조에 달하며<sup>9)10)</sup> 약 28일 후에는 손상 전 수준으로 회복된다고 한다.<sup>11)</sup> 외막의 증식된 근섬유모세포는 혈관재형성과 관련이 있으며 그 중 일부는 내막으로 유주하여 신내막형성에 참여하는 것으로 알려져 있다.<sup>6-8)</sup>

Rapamycin(silormycin)은 mTOR(mammalian target of rapamycin)를 억제하는 마크로라이드 계열의 면역억제제로 late G1 phase에서 세포주기를 멈춤으로써 조혈 세포 및 혈관내 평활근세포의 증식을 억제한다. Rapamycin은 실험실에서 혈관 내 평활근 세포의 증식 및 유주를 억제할 뿐만 아니라<sup>12)</sup> 풍선도자를 이용한 쥐와 돼지의 생체실험에서도 신내막의 증식을 억제하는 것으로 보고되고 있으며<sup>13)14)</sup> 돼지의 관동맥에 삽입된 silormycin-coated stent는 스텐트내 신내막 증식을 억제하는 것으로 알려졌다.<sup>15)</sup> 30명의 환자를 대상으로 최초로 사람의 관동맥에 시술된 silormycin 용출 스텐트(silormycin-eluting stent)의 초기 성적은 210일 재협착률 0%로 발표된 바 있고<sup>16)</sup> 2년 후 추적 관동맥 조영술에서도 1명을 제외하고 스텐트 내 직경 협착은 35%이하로 발표되었으며<sup>17)</sup> 최근 발표된 1,058명의 환자를 대상으로 한 이중맹검 무작위 임상연구인 SIRIUS 연구에서도 1년 후 재협착률은 대조군 16.6%, silormycin 용출 스텐트 4.1%로 재협착률을 약 70~80% 감소시키는 것으로 나타났다.<sup>18)</sup>

약물을 용출하는 스텐트는 전신적 부작용 없이 국소약물 농도를 높임으로써 원하는 효과를 얻을 수 있다는 장점은 있지만 동물실험 결과에서 신내막 치유과정을 지연시킨다는 사실이 밝혀져 있으며<sup>15)19)</sup> 스텐트 내 함유된 약물의 용출이 끝난 후 신내막의 증식이 가속화되는 후기 신내막 만회현상은 약물용출 스텐트의 잠재된 부작용으로 남아있다.<sup>19)20)</sup> 또한 약물용출 스텐트를 사용하는 경우 전통적인 스텐트보다 비용이 많이 들며 한 환자에서 2~3개 이상의 스텐트를 삽입하는 등 다혈관 질환에

대한 중재시술이 많이 시행되면서 약물용출스텐트의 보조적인 수단 또는 대체 방법으로써 전신적 약물투여에 관한 연구가 진행되고 있다.<sup>1)</sup> Sirolimus는 경구로 투여할 경우 약역학적인 개인차가 매우 큰 것으로 알려져 있으나<sup>21-23)</sup> sirolimus의 유도체인 everolimus [40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin]는 경구로 투여하여도 활성을 나타내는 면역억제제로 신이식 및 심장이식 후 거부반응을 예방하기 위해 사용되고 있으며 최근 토끼의 장골동맥을 이용한 동물실험에서 경구로 투여하였을 때 스텐트 내 신내막 증식을 억제한다는 논문이 발표된 바 있다.<sup>24)</sup> 하지만 풍선 도자를 이용한 혈관 손상 모델에서 everolimus의 효과를 연구한 논문은 아직 없다. 본 연구에서는 풍선도자를 이용한 흰쥐의 혈관 손상 모델에서 everolimus를 경구로 투여하였을 경우 외막세포의 활성화와 신내막 형성을 감소시키는 효과가 있는지 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 대상동물

14~15주령의 체중 350~450 g의 Sprague-Dawley 계의 수컷 흰쥐 30마리를 대상으로 everolimus군(N=15)과 대조군(N=15)으로 나누어 실험을 진행하였다. Everolimus군은 풍선도자로 경동맥에 손상을 주기 3일 전부터 회생시키기 전까지 매일 gastric lavage를 통해 everolimus 1.25 mg/kg를 투여하였으며 대조군은 위약을 투여하였다.

### Everolimus의 준비

Everolimus 및 위약은 제조회사(Novartis pharma AG, Basle, Switzerland)로부터 냉동된 2% microemulsion 상태로 제공받았으며 4℃에서 냉장보관하다가 gastric lavage로 투여 직전 0.125 g의 microemulsion(everolimus 2.5 mg)을 증류수를 사용하여 10 mL로 희석하여 5 mL/kg의 용량을 투여하였다.

### 경동맥의 내막박리

Xylazine(4.6 mg/kg)과 ketamine(70 mg/kg)을 복막내 주사하여 마취하고 경부의 정중앙을 절개한 후 좌측 총경동맥 및 외경동맥을 노출시켰다. 좌측 외경동맥을 통하여 2F Fogarty 풍선 도자를 대동맥궁까지 삽

입한 후 0.3~0.4 mL의 공기를 넣어 풍선을 확장시키고 확장된 풍선도자를 회전시키면서 총경동맥까지 잡아당겨 경동맥의 내막을 박리하였다. 이와 같은 술기를 3회 반복하고 풍선도자를 제거한 후 외경동맥을 절찰하고 절개부위를 봉합하였다.

### 조직검사

대조군과 everolimus군을 각각 1/3씩 나누어 경동맥의 내막박리 후 3일, 7일 및 14일째 마취 후 우측 대퇴동맥을 박리하여 노출한 뒤 도관을 삽입하여 상행대동맥까지 전진시킨 후 4% 포르말린 용액을 사용하여 90~100 mmHg의 압력으로 5분간 관류고정하였다. 관류 고정 후 시작된 후 꼬리정맥을 통하여 과량의 thiopental sodium을 주사하여 안락사시켰다. 관류-고정 후 좌측 경동맥을 채취하여 4% 포르말린 용액에 24시간 더 고정 후 파라핀에 포매한 후 5  $\mu$ m 두께의 조직절편을 만들어 histomorphometric study 및 면역조직화학적 검사를 시행하였다.

### Histomorphometric study

중막의 손상 부위와 정도를 평가하기 위해 Hematoxylin-Eosin 염색 및 Verhoeff 탄력조직 염색을 실시하였다. 내탄력층의 국소적인 파열이 있고 외막이 혈관내강으로 노출되지 않은 경우 정도의 손상으로 정의하였으며 중막이 파열되어 외막이 혈관내강으로 노출된 경우 심한 손상으로 정의하였다(Fig. 1A).<sup>10)</sup>

100배 확대 시야에서 현미경에 장착된 디지털카메라로 촬영후 AxioVision LE v 4.1.1(Carl Zeiss Vision GmbH, Germany)을 사용하여 histomorphometric analysis를 시행하였다. 신내막과 중막의 경계 즉 내탄력

층이 이루는 면적에서 혈관내강의 면적을 빼서 신내막의 면적을 구하였으며 중막과 외막의 경계 즉 외탄력층이 이루는 면적에서 내탄력층이 이루는 면적을 빼서 중막의 면적을 구하였다(Fig. 1B).

### 면역조직화학적 검사

1) 세포의 증식을 평가하기 위해 안락사시키기 2시간 전에 100 mg/kg의 bromodeoxyuridine(BrdU) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)를 근육내주사하였다. 면역조직화학 검사는 BrdU에 대한 단일클론항체(DakoCytomation California Inc., Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 400배 확대 시야에서 외막 또는 내막에 있는 BrdU로 표지된 세포의 수를 세고 BrdU-labeling index(BrdU-labeled nuclei의 비율 $\times$ 100)를 계산하였다.

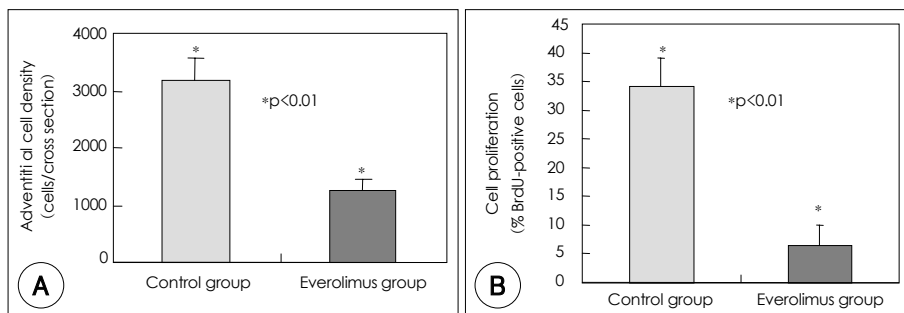
2) 외막에 있는 근섬유모세포를 확인하기 위해 mouse monoclonal anti-human  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody(Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 면역조직화학검사를 실시하였다.

### 통계분석

통계분석은 SPSS for Windows 10.0를 사용하였으며 두 군간의 정량적인 비교는 Student t test를 사용하여 분석하였고  $p<0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

모든 실험동물은 연구 종료시까지 생존하였다. Everolimus 투여군은 초기 약제 투여 및 수술 후 약 10% 정도의 체중감소를 보였으나 이후 연구 종료시까지 체중



**Fig. 2.** A: bar graph showing that the adventitia was relatively hypocellular in everolimus group compared to control group 3 days after balloon injury. B: adventitia cell proliferation (the ratio of BrdU-positive adventitial cells to the total adventitial cell number) was decreased in everolimus group compared to control group 3 days after balloon injury.

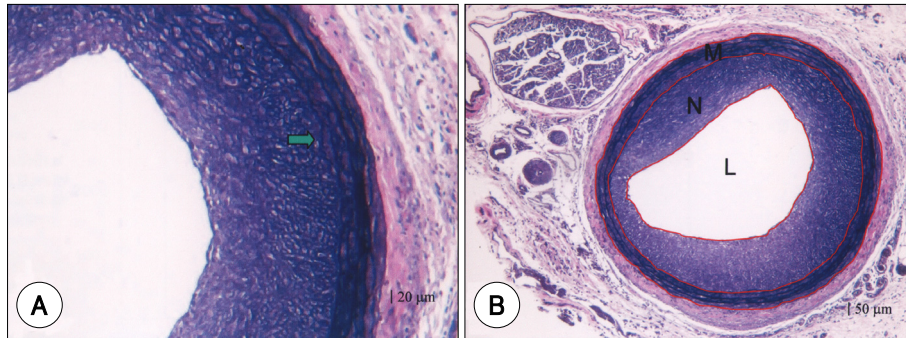
의 변동은 없었다. 모든 실험동물 조직에서 경도의 혈관 손상이 관찰되었으며 중막이 파열되어 외막이 혈관 내강으로 노출되는 심한 손상을 입은 경우는 없었다.

#### 경동맥 손상 3일후의 변화

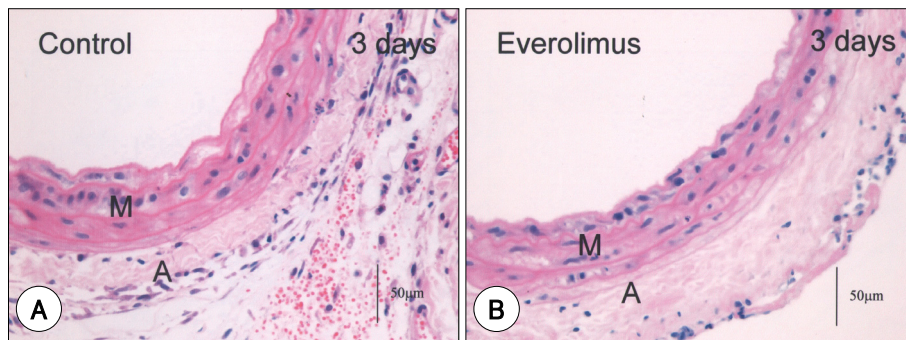
경동맥의 내막 박리후 3일째 대조군과 everolimus군

모두에서 신내막의 형성은 관찰되지 않았다. 대조군은 경동맥의 외막에서 세포가 많이 관찰된 반면 everolimus 투여군은 외막에서 발견되는 세포가 적었다(대조군  $3195 \pm 363$ , everolimus군  $1260 \pm 197$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 2A, Fig. 3).

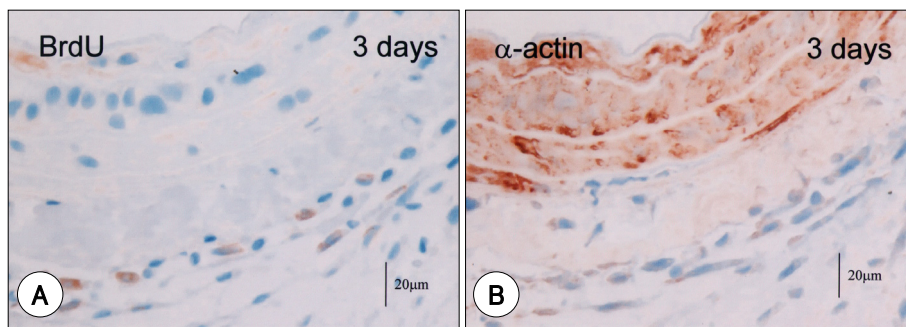
외막에서 발견되는 세포들 중 BrdU에 염색되는 세포



**Fig. 1.** A: example of mild injury 14 days after balloon overstretch in rat carotid artery. Break in the internal elastic lamina (arrow) without medial dissection noted. B: histomorphometric analysis. L indicates lumen area, N: neointima, M: media. Verhoeff's stain. Magnification  $\times 400$  (A),  $\times 100$  (B).

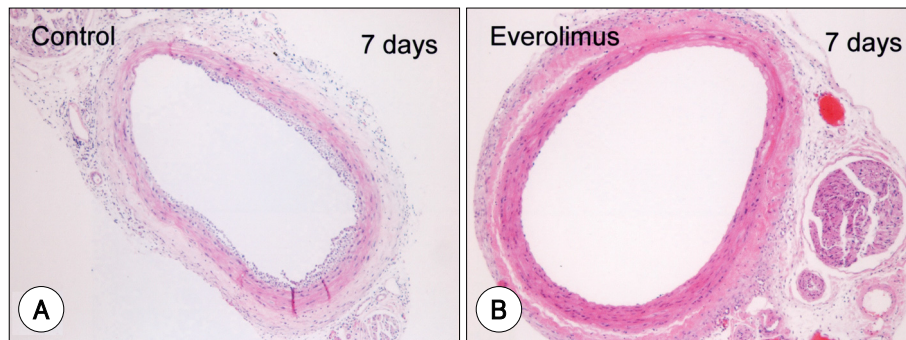


**Fig. 3.** Hematoxylin and eosin staining of balloon-injured rat carotid arteries 3 days after angioplasty. A large number of adventitial cells was noted in a control artery (A) whereas everolimus-treated artery showed few adventitial cells (B). M: indicates media, A: adventitia. Magnification  $\times 100$ .

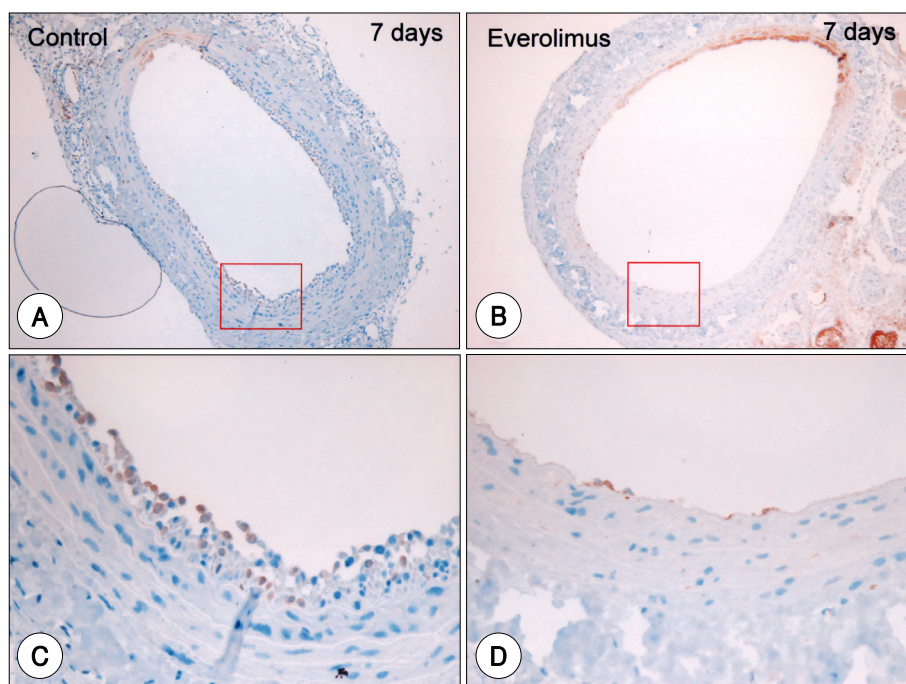


**Fig. 4.** Immunohistochemical staining using antibodies against bromodeoxyuridine (BrdU) (A) and  $\alpha$ -smooth muscle actin (B). Balloon-injured rat carotid arteries of control group 3 days after angioplasty. A large number of adventitial cells was rapidly proliferating (A). Most neo-adventitial cells of control artery showed positive  $\alpha$ -actin staining (B) suggesting differentiation into the myofibroblast phenotype. Magnification  $\times 400$ .





**Fig. 5.** Carotid artery morphology of control group (A) and everolimus group (B) 7 days after balloon injury. Everolimus inhibits neointima formation 7 days after balloon injury. Hematoxylin and eosin staining. Magnification  $\times 100$ .



**Fig. 6.** Carotid artery morphology of control group (A, C) and everolimus group (B, D) 7 days after balloon injury. C and D are higher magnification of the area indicated by rectangle in A and B, respectively. Everolimus reduces neointima cell proliferation 7 days after balloon injury. BrdU immunostaining. Magnification  $\times 100$  (A, B),  $\times 400$  (C, D).

들은 대조군에 비해 everolimus군에서 유의하게 감소하였으며(대조군  $34.2 \pm 4.9\%$ , everolimus군  $6.5 \pm 3.5\%$ ,  $p < 0.01$ ) BrdU에 염색되는 세포들 중 대부분은  $\alpha$ -smooth muscle actin에도 염색되었다(Fig. 2B, Fig. 4).

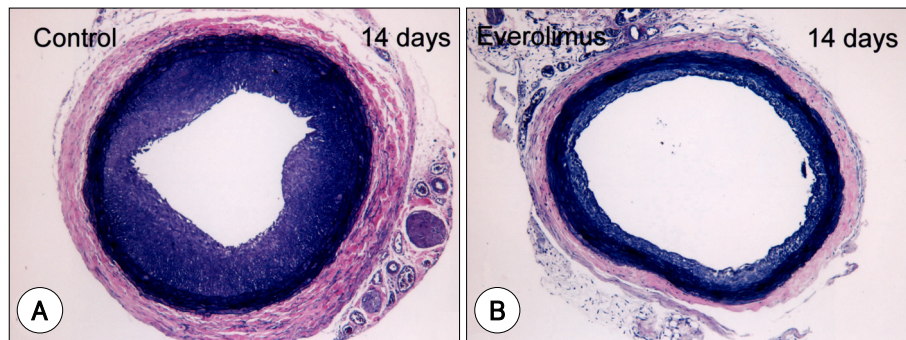
#### 경동맥 손상 7일 후의 변화

경동맥 손상 7일 후 대조군에서는 신내막의 형성이 관찰되었으나 everolimus 군에서는 신내막의 형성이 현저히 감소되었다(대조군  $0.06 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ , everolimus군

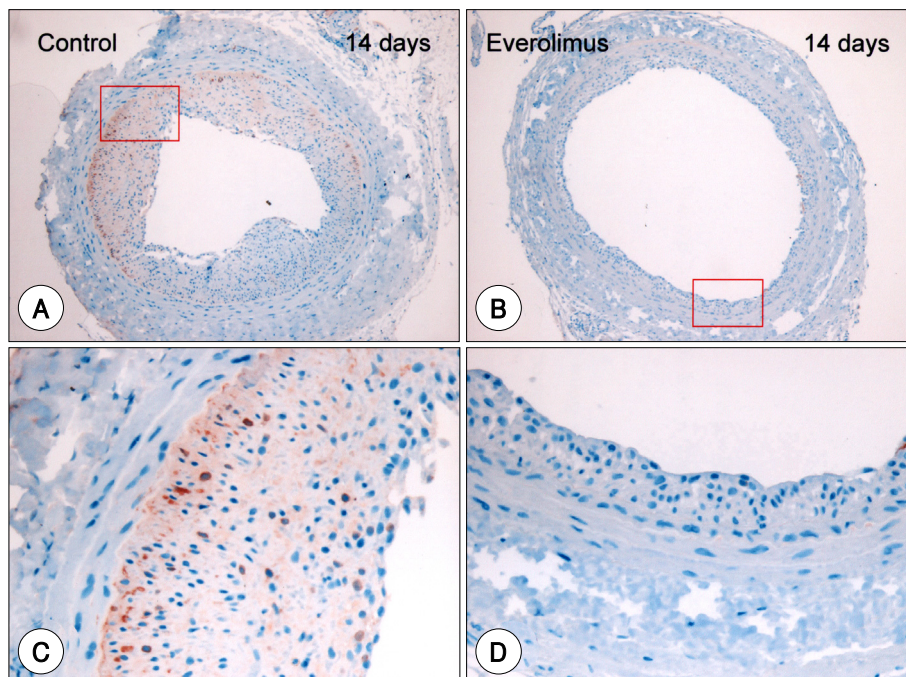
$0.01 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 5, 6) (Table 1). 신내막 내의 세포 수도 everolimus군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소되었으며 everolimus군에서 BrdU에 염색되는 세포의 수가 대조군의 6.9%로 현저히 감소하였다(Table 1).

#### 경동맥 손상 14일 후의 변화

경동맥 손상 14일 후 대조군과 everolimus군 모두에서 신내막의 형성이 관찰되었다(Fig. 7, 8) (Table 2).



**Fig. 7.** Carotid artery morphology of control group (A) and everolimus group (B) 14 days after balloon injury. Everolimus markedly reduces neointima formation 14 days after balloon injury. Verhoeff's stain for elastic tissue. Magnification  $\times 100$ .



**Fig. 8.** Carotid artery morphology of control group (A, C) and everolimus group (B, D) 14 days after balloon injury. C and D are higher magnification of the area indicated by rectangle in A and B, respectively. Everolimus reduces neointima cell proliferation 14 days after balloon injury. BrdU staining. Magnification  $\times 100$  (A, B),  $\times 400$  (C, D).

Histomorphometric analysis에서 신내막 형성은 everolimus 군에서 유의하게 감소하였으며(대조군  $0.28 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ , everolimus군  $0.08 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$ ) 면적협착의 정도도 유의하게 감소하였다(대조군  $62.6 \pm 4.4\%$ , everolimus군  $20.0 \pm 11.1\%$ ,  $p < 0.01$ ).

신내막의 세포들 중 BrdU에 염색되는 세포 수는 everolimus군에서 유의하게 감소하였으며(대조군  $184 \pm 26$ , everolimus군  $18 \pm 4$ ,  $p < 0.01$ ) 신내막의 세포 중 BrdU-labelling index 또한 everolimus군에서 유의하게

감소하였다(대조군  $4.8 \pm 0.6\%$ , everolimus군  $3.7 \pm 0.8\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Table 2).

## 고 찰

혈관 손상 후 외막의 섬유모세포는 평활근세포와 비슷한 근섬유모세포(myofibroblast)로 형질전환을 일으키고 증식한다.<sup>6-8)</sup> 증식된 근섬유모세포 중 일부는 내막으로 유주하여 신내막형성에 참여하는 것으로 알려져

**Table 1.** Histomorphometric indices 7 days after balloon injury

	Control group	Everolimus group	p
Neointima area (mm <sup>2</sup> )	0.06±0.02	0.01±0.01	<0.01
Lumen area (mm <sup>2</sup> )	0.35±0.06	0.42±0.06	NS
Area stenosis (%)	14.6±5.8	3.3±1.4	<0.01
Media area (mm <sup>2</sup> )	0.14±0.01	0.14±0.02	NS
Neointimal cell count	828±120	35±7	<0.01
BrdU (+) cell count	333±61	23±4	<0.01
BrdU (+) cells (%)	40.3±5.4	68.7±15.4	<0.01

Values are mean±SD or percentage

**Table 2.** Histomorphometric indices 14 days after balloon injury

	Control group	Everolimus group	p
Neointima area (mm <sup>2</sup> )	0.28±0.06	0.08±0.03	<0.01
Lumen area (mm <sup>2</sup> )	0.16±0.01	0.33±0.09	<0.01
Area stenosis (%)	62.6±4.4	20.0±11.1	<0.01
Media area (mm <sup>2</sup> )	0.14±0.01	0.14±0.01	NS
Neointimal cell count	3872±312	503±101	<0.01
BrdU (+) cell count	184±26	18±4	<0.01
BrdU (+) cells (%)	4.8±0.6	3.7±0.8	<0.05

Values are mean±SD or percentage

있다.<sup>6-8)</sup> Li 등<sup>8)</sup>은 흰쥐의 경동맥 손상모델에서 리트로 바이러스로 형질을 도입한 섬유모세포를 외막에 직접 이식하여 손상 후 7일, 10일, 14일째 중막과 내막에서 형질이 발현되는 것을 증명하였고 Shi 등<sup>10)</sup>은 돼지의 관동맥에서 외막의 섬유모세포가 근섬유모세포로 형질 전환을 일으켜 혈관손상으로 생긴 중막의 틈(medial gap)을 통하여 신내막으로 유주한다고 보고하였다. 하지만 외막의 섬유모세포가 신내막으로 이동하지 않는다는 연구 결과도 있는데 Faggin 등<sup>7)</sup>은 토끼의 경동맥 손상모델에서 SM22를 외막의 근섬유모세포의 추적자로 사용하여 외막세포가 내막으로 이동하지 않는다고 보고한 바 있고 de Leon 등<sup>25)</sup>은 흰쥐의 경동맥 손상모델에서 형광염색시약인 PKH26을 사용하여 외막세포가 중막 또는 신내막으로 유주하지는 않는다고 보고한 바 있다. 본 연구는 경구 everolimus를 투여하는 경우 외막세포의 활성화가 억제되는지 관찰하고자 연구를 시행하였는데 경동맥 손상 3일째 대조군의 외막에서 BrdU에 염색되고  $\alpha$ -smooth muscle actin에 염색되는 근섬유모세포의 증식이 관찰되었는데 BrdU labelling index는  $34.2 \pm 4.9\%$ 로써 de Leon 등<sup>25)</sup>이 보고한  $27.5 \pm 3.8\%$ 와

유사하였다. Everolimus 군에서는 이러한 근섬유모세포의 증식이 유의하게 감소하여 경구 everolimus는 외막세포의 활성화를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

1977년 Andreas Gruntzig<sup>26)</sup>가 처음으로 사람에서 관동맥 풍선 확장술을 실시한 이래 현재 전 세계적으로 연간 백만건 이상의 관동맥 중재시술이 시행되고 있는데 재협착은 관동맥 중재시술의 주요 한계이다. 재협착을 줄이기 위해 체외 및 혈관 내 방사선치료, 국소 및 전신 약물투여 등이 활발히 연구되고 있으며 국내에서도 동물실험을 통하여 김 등<sup>27)</sup>이 체외방사선치료를, 조 등<sup>28)</sup>이 국소 약물요법을 연구한 바 있다. 최근에는 혈관내 방사선 치료의 도입과 약물용출 스텐트의 사용으로 재협착률은 더욱 더 감소될 것으로 예상된다.<sup>1)</sup> 혈관내 방사선 치료는 방사선 치료 자체가 갖는 안전성 문제 이외에도 가장자리효과(edge effect), 후기 스텐트내 혈전 등의 제한점이 있으며 약물용출 스텐트는 전신적 부작용 없이 국소약물 농도를 높임으로써 원하는 효과를 얻을 수 있다는 장점은 있지만 동물실험 결과에서 신내막 치유과정을 지연시킨다는 사실이 밝혀져 있다.<sup>15)19)</sup> 최근 미국의 FDA는 sirolimus 용출 스텐트 후 290예 이상의 아급성 혈전증 및 50예 이상의 과민반응을 보고한 바 있고<sup>29)</sup> 스텐트 내 함유된 약물의 용출이 끝난 후 신내막의 증식이 가속화되는 후기 신내막 만회현상은 약물용출 스텐트의 잠재된 부작용으로 남아있다.<sup>19)20)</sup> 또한 약물용출 스텐트를 사용하는 경우 전통적인 스텐트보다 비용이 많이 들며 혈관의 직경이 너무 작거나 구불구불하여 스텐트 삽입의 적응이 되지 않거나, 한 환자에서 2~3개 이상의 스텐트를 삽입하는 등 다혈관 질환에 대한 중재시술이 많이 시행되면서 약물용출 스텐트의 보조적인 수단 또는 대체 방법으로써 전신적 약물투여에 관한 연구가 진행되고 있다.<sup>1)</sup>

최근 전신적 약물투여에 관한 연구에 사용되는 약물은 taxol(paclitaxel)과 sirolimus(rapamycin), everolimus 등이 있다. 김 등<sup>30)</sup>은 흰쥐의 풍선손상모델에서 새로운 경구용 paclitaxel 제제를 투여하여 신내막 형성이 억제되었다고 보고한 바 있다. Sirolimus는 경구로 투여할 경우 약역학적인 개인차가 매우 큰 것으로 알려져 있으며<sup>21-23)</sup> Brara 등<sup>31)</sup>은 22명의 난치성 재협착 환자들을 대상으로 관동맥 중재술 시행 후 경구 rapamycin을 투여한 결과 재협착률 59.1%로 만족스럽지 못한 결과를 얻었다고 보고한 바 있다. Sirolimus의 유도



체인 everolimus [40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin]는 경구로 투여하여도 활성을 나타내는 면역억제제로 신이식 및 심장이식 후 거부반응을 예방하기 위해 사용되고 있으며 everolimus 용출 stent의 초기 임상 성적은 6개월 재협착률 0%, 12개월 임상추적 결과 사망, 심근경색, 및 재관류치료 등의 주요임상사건은 발생하지 않은 것으로 발표되었다.<sup>32)</sup> 토끼의 장골동맥을 이용한 동물실험에서 스텐트 시술후 경구로 everolimus를 투여할 경우 스텐트 내 신내막 증식을 억제한다는 결과가 발표된 바 있으며<sup>24)</sup> 본 연구에서는 풍선손상을 이용한 흰쥐의 혈관 손상모델에서 경구 everolimus를 투여한 결과 외막세포의 활성화가 감소되고 신내막 형성이 억제되는 것을 관찰하였다. 경동맥 손상 14일째 everolimus를 투여한 군에서 대조군에 비하여 신내막 면적이 71% 감소하였고 면적협착 비율은 67% 감소하였다. 본 연구에 사용한 everolimus의 용량은 1.25 mg/kg/day로써 Cole 등<sup>33)</sup>이 대동맥 이식모델에서 사용한 2.5 mg/kg/day에 비해 절반에 해당되는데 이 용량의 everolimus의 투여는 체중감소 등의 부작용 없이 효과적으로 신내막 형성을 억제하는 것으로 나타났다.

본 연구의 제한점은 약물투여 후 관찰기간이 짧았다는 점을 들 수 있다. 특히 후기 신내막 만회현상이 발생하는지 여부를 보기 위해서는 일정기간의 everolimus 투여 후 약물투여 없이 일정기간이 지난 후 조직 검사를 실시하는 추가 연구가 필요하다. 향후 본 연구의 결과를 토대로 다발성 병변이 있는 경우 스텐트 시술 여부에 관계없이 경구 everolimus 투여를 고려하거나 약물용출 스텐트 시술 후 후기 신내막 만회현상을 예방하기 위한 보조적인 수단으로서 경구 everolimus 투여가 시도될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

혈관 외막의 섬유모세포는 혈관 손상 후 근섬유모세포로 형질전환을 일으키고 증식하여 혈관 재형성 및 신내막형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 흰쥐의 경동맥 풍선 손상 모델에서 rapamycin의 유도체인 everolimus를 경구로 투여하였을 경우 외막세포의 활성화와 신내막 형성의 억제 효과가 있는지 알아보려고 하였다.

### 방 법 :

30마리의 흰쥐를 대상으로 경동맥 풍선 손상 3일 전부터 everolimus(everolimus군, N=15) 또는 위약(대조군, N=15)을 1.25 mg/kg 용량으로 매일 경구 투여하였다. Everolimus군과 대조군 동물들을 각각 1/3씩 나누어 혈관 손상 후 3일, 7일, 14일째 조직을 채취하여 치료효과를 판정하였다.

### 결 과 :

혈관 손상 3일 후 everolimus군에서 외막세포 증식이 유의하게 감소하였으며 신내막 형성은 everolimus군에서 혈관 손상 7일 후(대조군  $0.06 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ , everolimus군  $0.01 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$ ) 및 14일 후(대조군  $0.28 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ , everolimus군  $0.08 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.01$ ) 유의하게 감소하였다.

### 결 론 :

흰쥐의 경동맥 풍선 손상 모델에서 everolimus 경구 투여는 외막세포의 활성화와 신내막 형성을 감소시킨다.

**중심 단어 :** Everolimus ; 재협착 ; 혈관성형술.

본 논문은 가톨릭대학교 의과대학 부속 성모자애병원의 연구비 보조로 이루어졌음.

## REFERENCES

- 1) Faxon DP. Systemic drug therapy for restenosis: "deja vu all over again". *Circulation* 2002;106:2296-8.
- 2) Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblast to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 2001;89:1111-21.
- 3) Owens GK. Regulation and differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995;75:487-517.
- 4) Sartore S, Franch R, Roelofs M, Chiavegato A. Molecular and cellular phenotypes and their regulation in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;134:235-320.
- 5) Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001;104:503-16.
- 6) Zalewski A, Shi Y. Vascular myofibroblasts: lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:417-22.
- 7) Faggin E, Puato M, Zardo L, Franch R, Millino C, Sarinella F, Pauletto P, Sartore S, Chiavegato A. Smooth muscle-specific SM22 protein is expressed in the adventitial cells of the balloon-injured rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1393-404.
- 8) Li G, Chen SJ, Oparil S, Chen YF, Thompson JA. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation* 2000;101:1362-5.
- 9) Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Si-



- monet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1996; 93:2178-87.
- 10) Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996; 94: 1655-64.
  - 11) Shi Y, Pieniek M, Fard A, O'Brien J, Mannion JD, Zalewski A. Adventitial remodeling after coronary arterial injury. *Circulation* 1996; 93:340-8.
  - 12) Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996; 98:2277-83.
  - 13) Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury: its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* 1993; 55:1409-18.
  - 14) Burke SE, Lubbers NL, Chen YW, Hsieh GC, Mollison KW, Luly JR, Wegner CD. Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:829-35.
  - 15) Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001; 104:1188-93.
  - 16) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 103:192-5.
  - 17) Sousa JE, Costa MA, Sousa AG, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, Feres F, Mattos LA, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation* 2003; 107:381-3.
  - 18) Holmes DR Jr, Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, Brown C, Fischell T, Wong SC, Midei M, Snead D, Kuntz RE. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation* 2004; 109:634-40.
  - 19) Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, Scott DS, Froehlich J, Virmani R. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation* 2001; 104:473-9.
  - 20) Liistro F, Stankovic G, di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Mo-shiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta P, Albiero R, Corvaja N, Colombo A. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymerstent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation* 2002; 105: 1883-6.
  - 21) Ferron GM, Mishina EV, Zimmerman JJ, Jusko WJ. Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 61:416-28.
  - 22) Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joergensen J, Meerloo T, Sedrani R, Tanner M, Zenke G, Schuler W. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64:32-5.
  - 23) Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M. Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. *Drug Metab Dispos* 1999; 27:627-32.
  - 24) Farb A, John M, Acampado E, Kolodgie FD, Prescott MF, Virmani R. Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation* 2002; 106:2379-84.
  - 25) de Leon H, Ollerenshaw JD, Griendling KK, Wilcox JN. Adventitial cells do not contribute to neointimal mass after balloon angioplasty of the rat common carotid artery. *Circulation* 2001; 104:1591-3.
  - 26) Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1978; 1:263.
  - 27) Kim HS, Yoon MH, Oh YT, Chun MS, Park CH, Kim JS, Tahk SJ, Choi BI, Kim YM, Park KG. The effect of external beam radiation on neointimal formation in the rat carotid injury model. *Korean Circ J* 1998; 28:173-82.
  - 28) Cho MC, Kwak NJ, Piao H, Youn TJ, Kim DW, Ahn HY, Kim YG, Kim ST. Effect of paclitaxel local delivery on neointimal formation after endothelial denudation of the rat carotid artery. *Korean Circ J* 2000; 30:198-207.
  - 29) Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalcsik L, Tsepili M, Valsecchi O, Kolodgie FD. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* 2004; 109:701-5.
  - 30) Kim DW, Kwon JS, Kim YG, Kim MS, Lee GS, Youn TJ, Cho MC. Novel oral formulation of paclitaxel inhibits neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *Circulation* 2004; 109:1558-63.
  - 31) Brara PS, Moussavian M, Grise MA, Reilly JP, Fernandez M, Schatz RA, Teirstein PS. Pilot trial of oral rapamycin for recalcitrant restenosis. *Circulation* 2003; 107:1722-4.
  - 32) Grube E, Sonoda S, Ikeno F, Honda Y, Kar S, Chan C, Gerckens U, Lansky AJ, Fitzgerald PJ. Six- and twelve-month results from first human experience using everolimus-eluting stents with bioabsorbable polymer. *Circulation* 2004; 109: 2168-71.
  - 33) Cole OJ, Shehata M, Rigg KM. Effect of SDZ RAD on transplant arteriosclerosis in the rat aortic model. *Transplant Proc* 1998; 30:2200-3.