

# 주령에 따른 쥐 경동맥 손상 모델에서의 신생내막 형성율의 차이

충북대학교 의과대학 내과학교실

권진숙 · 박노관 · 정일하 · 김유경 · 배장환 · 황경국 · 김동운 · 조명찬

## A Slight Variation in the Age of Rats Commonly used as a Carotid Artery Injury Model Results in a Large Difference in Neointima Formation

Jin-Sook Kwon, DVM, No-Kwan Park, MS, Il Ha Jeong, MS, Yu-Kyung Kim, MS,

Jang-Han Bae, MD, Kyung-Kuk Hwang, MD, Dong-Woon Kim, MD and Myeong-Chan Cho, MD

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives :** The degree of neointima formation after infliction of a carotid artery balloon injury in rats varies greatly depending on the sex, age, species and operational method. Strong variation is common, even within only a single control. This study attempted to find if there was any significant difference in neointima formation following a carotid artery balloon injury in 6 to 12 week old rats; the age commonly used in these types of experiments. **Materials and Methods :** A balloon injury was inflicted on the carotid arteries of male Sprague-Dawley rats at 6 (n=9, 250-270 g), 8 (n=8, 280-300 g) and 11 weeks (n=10, 320-340 g) of age. Two weeks post-operation, a histomorphometric analysis was carried out. The vascular smooth muscle cell proliferation was measured in situ via BrdU incorporation 2 days after injury infliction. **Results :** The neointima areas of the 6 week ( $0.22 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ ) and 8 week old groups ( $0.17 \pm 0.08 \text{ mm}^2$ ) were 3.1 and 2.4 times larger than that of the 11 week old group ( $0.07 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ ). The mitotic index was significantly reduced in 11 week old group (n=4,  $9.22 \pm 1.51\%$ ) compared to those of the 6 (n=4,  $25.03 \pm 3.92\%$ ) and 8 week old (n=4,  $21.66 \pm 3.66\%$ ) groups. **Conclusion :** Special care should be taken when interpreting neointima formation, as even a slight variation in the age and weight in 6 to 12 week old (250-340 g) rats; the age commonly used in these types of experiments, results in an unexpectedly large difference. (Korean Circulation J 2007;37:78-83)

**KEY WORDS :** Neointimal formation ; Carotid artery injuries ; Aging.

## 서론

혈관 손상 후 재협착의 기전을 연구하고, 새로운 치료 방법의 임상 활용 이전에 안전성 및 효용성을 검증하기 위하여 동물 모델들이 사용되어 왔다. 이상적인 동물 모델은 쉽게 활용이 가능하고, 비용이 저렴하며, 지속적인 공급과 취급의

용이성 등의 조건을 충족해야 한다. 쥐 경동맥 손상모델은 재협착을 연구하는 동물모델 중 가장 흔히 사용되며, 혈관손상이 국소적이고 일정할 뿐만 아니라, 내피세포를 제거된 부위의 혈관 전장에 걸쳐 혈관평활근세포의 이동과 증식이 재현성 높게 나타나기 때문에 매우 좋은 동물 모델이며, 특히 혈관평활근세포의 증식에 대한 신호전달, 성장인자의 역할 등의 분자생물학적 정보가 많이 알려져 있다.<sup>1-6)</sup> 쥐 경동맥 손상 모델에서 재협착 방지 연구에 있어서 신생내막의 형성 정도가 가장 중요한데, 각 실험실에서 보고되는 대조군의 신생내막의 형성 정도는 실험실에 따라 차이가 있고, 같은 실험실의 연구도 연구마다 상당한 차이가 있는 경우가 있다. 이런 현상은 실험에 사용된 동물의 종,<sup>7)</sup> 성별, 크기, 연령의 차이<sup>8-12)</sup> 등에 기인할 수 있다. 같은 동물을 사용하더라도 실험

논문접수일 : 2006년 12월 22일

수정논문접수일 : 2007년 2월 5일

심사완료일 : 2007년 2월 9일

교신저자 : 김동운, 361-711 충북 청주시 흥덕구 개신동 62

충북대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (043) 269-6386 · 전송 : (043) 273-3252

E-mail : kdwoon@chungbuk.ac.kr

목적이나 시술자에 따라 풍선 손상의 정도가 다를 수 있다는 점도 중요한 원인일 것이다. 이러한 차이를 배제하기 위하여 같은 종이고 번식 주기에 따른 다양한 체내 호르몬 변화의 가능성이 있는 암컷보다는 수컷을 사용하고 있다. 체중과 주령도 비슷한 쥐를 대상으로 함으로써 이러한 차이를 줄이고 있다.

주령의 차이에 의해서도 신생내막의 형성의 차이가 있을 수 있는데, 이런 현상에 대한 연구는 주로 노화에 관한 것으로 어린 쥐와 늙은 쥐를 비교한 것들이 대부분이다.<sup>8-12)</sup> 본 연구실은 쥐 경동맥 손상 모델을 이용한 많은 실험을 하고 있는데, 주로 많이 사용되는 주령은 6~12 주령의 쥐를 사용하여 왔다.<sup>13-17)</sup> 이 연령대에서 동일한 실험자가 동일한 방법으로 시술하였음에도 불구하고 약간의 주령과 체중 차이에도 신생 내막의 차이가 나는 실험 결과들이 있었다.

만약 실험에 많이 사용되는 주령대에서 약간의 주령 차이에도 신생내막의 차이가 크게 난다면 실험 동물의 주령 선택에 매우 신중하여야 할 것이고 결과 분석에도 주의를 요할 것이다.

본 연구는 쥐 경동맥 손상 모델에서 빈번하게 사용되는 6주령(250~270 g), 8주령(280~300 g), 11주령(320~340 g)의 수컷 Sprague-Dawley Rat을 대상으로, 동일한 시술자가 최대한 동일한 풍선 손상 정도를 가하려고 노력하는 상태에서 쥐 경동맥 손상 2 주후 신생내막 형성 정도를 측정하였다. 이 연구의 결과는 쥐 경동맥 손상 모델을 이용하여 신생내막형성 연구에 있어 실험 동물의 연령이나 체중 선택과 결과 분석에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 대 상

본 실험의 연구대상은 6주령 이상이고 7주령 미만인 6주령군(250~270 g, n=9), 8주령 이상이고 9주령 미만인 8주령군(280~300 g, n=8)과 11주령 이상이고 12주령 미만인 11주령군(320~340 g, n=10)의 Sprague-Dawley Rat(중앙실험동물(주), 서울, 대한민국)을 대상으로 하였다.

### 방 법

#### 쥐 경동맥 풍선 손상 모델

실험백서에 ketamine(50 mg/kg)과 xylazine(6.7 mg/kg)을 복강에 투여하여 마취시킨 후, 우측 경부를 절개하여 총경동맥, 외경동맥 및 내경동맥을 분리한다. Microvascular clamp(S & T, Acland, Switzerland)를 총경동맥의 기시부와 내경동맥의 원위부에 착용시켜 혈류를 일시적으로 중단시킨 상태에서 외경동맥을 절개한다. 절개부위에 2F Fogarty 풍선도자(Baxter Healthcare Corporation, USA)를 우측 총경

동맥으로 삽입하고, 총경동맥의 직경보다 크게 풍선을 부풀린 상태에서 3회를 왕복시켜 인위적으로 내피세포를 제거한 후 microvascular clamp를 제거하여 혈류를 재관류 시켰다.<sup>13-17)</sup> 경동맥의 외부에 분비물 및 혈액을 깨끗이 제거한 후 절개부위를 봉합하였다. 이러한 일련의 시술과정에서 시술자는 실험의 목적 및 시술군에 대한 사전 지식 없이 시술하는 맹검법을 이용하여 연구가 이루어졌다.

#### 쥐 경동맥 혈관 조영술

6주령, 8주령, 11주령의 쥐의 풍선 손상 전 경동맥의 직경을 알기 위하여 경동맥 손상을 가하지 않은 쥐를 대상으로 ketamine(50 mg/kg)과 xylazine(6.7 mg/kg)을 복강에 투여하여 전신마취를 시키고 복부 정중선을 절개하였다. 복부 대동맥에 4F vascular cannula(Cook, USA)를 삽입한 후 catheter를 두부 방향으로 전진시켜 황행 대동맥에서 총경동맥이 분지되는 시점에 최대한 가깝도록 진행시켰다. 조영제(Visipaque<sup>TM</sup>, Amershan Health, Cork, Ireland)를 주입하여 경동맥의 혈관 조영술을 실시하였고, 5F coronary catheter를 같이 촬영하여 그것을 기준으로 computerized coronary angiography(DCI Videodensitometry, Phillips, The Netherlands)를 이용하여 평균 혈관 직경(mean luminal diameter, MLD)를 측정하였다.<sup>14)</sup>

#### 쥐 경동맥 병리조직 검사 및 분석

혈관조영을 끝낸 직 후 복부 대동맥에 위치하고 있는 catheter 내부로 10% formalin 용액을 100 mmHg의 압력으로 흘려보낸다. 그 후 즉시 jugular vein을 절단하여 방혈하고, 실험동물을 5분 간 관류고정 시킨다. 이후 경동맥 손상을 유발한 우측 경동맥을 적출하여 10% formalin 용액에 고정시켜 wax embedding sample로 제작한 후, 샘플 절편의 두께가 4  $\mu$ m 이하가 되도록 표본을 만든다. 이 표본을 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하여 광학 현미경으로 관찰하여 분석하고 Image acquisition & processing system(FOCUS) 이용하여 quantitative morphometry 분석을 시행하는 방법으로 실험을 진행하였다. 분석에 사용된 변수들은 신생내막의 면적, 중막의 면적, 신생내막과 중막의 면적비였다.

#### 쥐 경동맥의 생체 내 혈관평활근세포 증식의 측정

세포증식을 알아보는 검사법으로 경동맥 손상 후 30시간, 38시간, 46시간에 bromodeoxyuridine(BrdU)(Sigma, USA)를 각각 30 mg/kg의 용량으로 6주령, 8주령, 11주령군에 피하 주사하였다. 경동맥 손상 48시간째에 경동맥 표본을 채취하여 wax embedding sample로 제작한 후 각 군의 경동맥 조직절편을 얻고 표본을 만들어 mouse anti-BrdU monoclonal Antibody(Boehringer Mannheim)를 이용하여 면역화학적 염색을 시행한다. 이후 400배의 고배율에서 각 군의 단

위 면적당 BrdU 양성인 중막의 혈관평활근 세포핵의 분율을 구하여 mitotic index로 세 군의 생체내 혈관평활근세포의 증식을 비교하였다.<sup>19)</sup>

#### 혈중 Testosterone 측정

쥐 연령대가 청년기에 해당하기 때문에 성호르몬의 분비에 따른 차이를 알아보기 위해 혈중 testosterone 농도를 측정하였다.

쥐를 ethyl-ether를 흡입 마취시킨 후 70% alcohol로 꼬리 정맥을 노장시킨다. 22G 바늘을 이용해 꼬리 정맥을 투관시킨 후 약 1 mL의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 3000 pm에서 5분간 원심분리 한 후 혈청을 분리한 후 녹십자 임상 연구소에 의뢰하여 radioimmunoassay(RIA) 법을 이용하여 혈중 testosterone 수치를 측정하였다.

#### 통계처리

모든 자료의 값은 평균±표준편차로 표시했다. 실험군 간의 측정값의 차이 및 유의성은 ANOVA 혹은 unpaired student t-test를 통해 검증하고, p 값이 0.05 미만인 경우에 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결 과

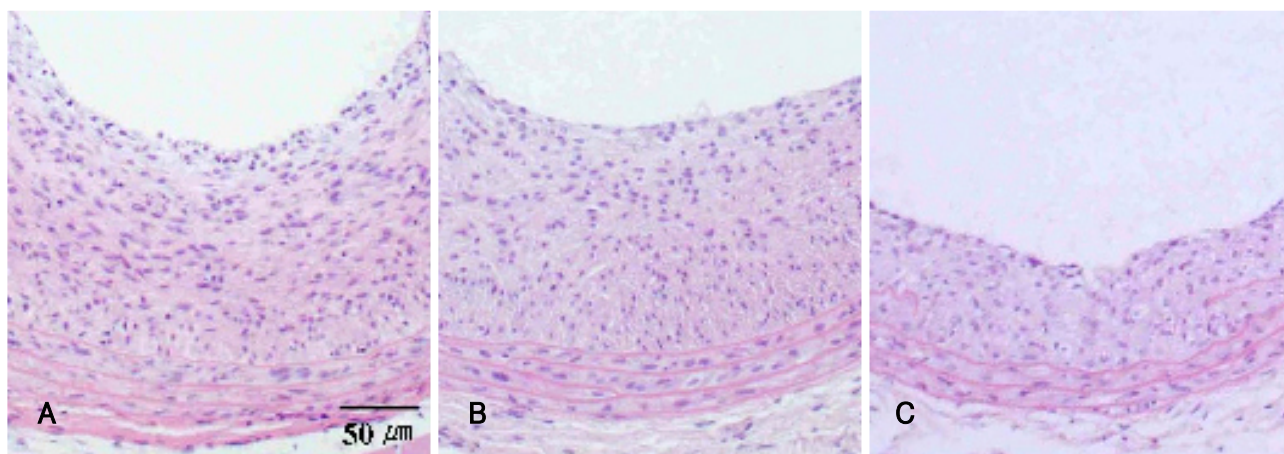
#### 각 주령에 따른 신생내막 형성정도에 따른 형태조직학적 분석

형태조직학적 분석 결과 6주령군(n=9)의 신생내막의 면적은  $0.22 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ , 8주령군(n=8)은  $0.17 \pm 0.08 \text{ mm}^2$ , 11주령군(n=10)은  $0.07 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ 으로 6주령군과 8주령군은 11주령에 비해 신생내막의 형성이 각각 3.1배와 2.4배나 증가하였고( $p < 0.01$ ), 6주령과 8주령 양군 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 신생내막/중막의 면적비도 6주령군과 8

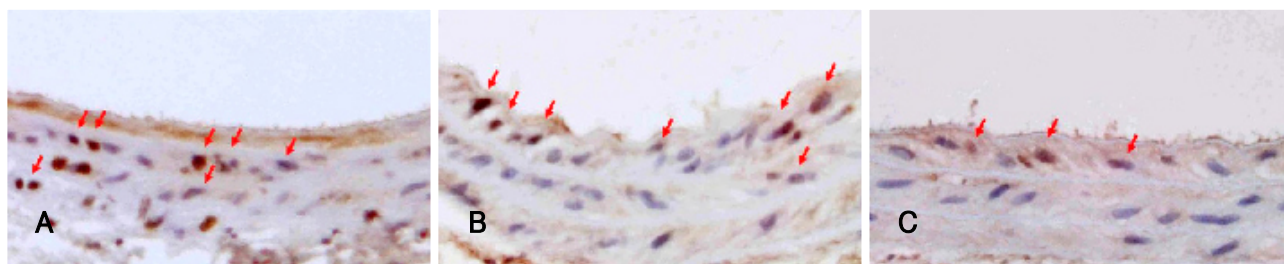
**Table 1.** Quantitative histomorphological analysis of the rat carotid artery obtained 14 days after the infliction of a carotid artery injury

	Age		
	6 weeks (n=9, 250-270 g)	8 weeks (n=8, 280-300 g)	11 weeks (n=10, 320-340 g)
Neointimal area ( $\text{mm}^2$ )	$0.22 \pm 0.04^*$	$0.17 \pm 0.08^*$	$0.07 \pm 0.03$
Neointima/media area ratio	$1.78 \pm 0.72^*$	$1.51 \pm 0.72^*$	$0.73 \pm 0.21$
Media area ( $\text{mm}^2$ )	$0.12 \pm 0.01$	$0.11 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.01$

Results are reported as the mean  $\pm$  S.D. \*:  $p < 0.05$  vs. 11 weeks



**Fig. 1.** Photomicrographs of cross-sections of the rat carotid artery taken 14 days after infliction of a balloon injury demonstrating a significant difference in the vessels of the 11 week old group compared to those of the 6 and 8 week old groups. A: 6 week old group. B: 8 week old group. C: 11 week old group.



**Fig. 2.** The mitotic index (assessed by *in situ* BrdU labeling) 2 days after the infliction of a balloon injury was significantly reduced in the 11 week old group ( $n=4$ ,  $9.22 \pm 1.51\%$ ) compared to the 6 week ( $n=4$ ,  $25.03 \pm 3.92\%$ ) and 8 week old ( $n=4$ ,  $21.66 \pm 3.66\%$ ) groups. A: 6 week old group. B: 8 week old group. C: 11 week old group. BrdU: bromodeoxyuridine.



**Fig. 3.** Representative carotid angiograms of 6, 8 and 11 week old rats. The mean luminal diameter (MLD) of the right carotid artery was measured by comparison with a 5F coronary catheter. The MLDs of 6, 8 and 11 week old rats were  $1.20 \pm 0.03$  (n=3),  $1.18 \pm 0.06$  (n=3) and  $1.29 \pm 0.02$  mm (n=3), respectively. A: 6 week old group. B: 8 week old group. C: 11 week old group.

주령군은 각각  $1.78 \pm 0.72$ 과  $1.51 \pm 0.72$ 였고 양군 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나, 11주령군은  $0.73 \pm 0.21$ 으로 6주령군과 8주령군과는 현저한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ) (Table 1)(Fig. 1).

#### 쥐 경동맥의 생체내 혈관평활근세포의 증식측정을 통한 두 군 간의 Mitotic index의 비교

BrdU 면역화학염색 양성인 세포의 분율인 mitotic index (%)는 6주령군(n=4)  $25.03 \pm 3.92\%$ , 8주령군(n=4)  $21.66 \pm 3.66\%$ , 11주령군(n=4)  $9.22 \pm 1.51\%$ 으로 11주령군이 6주령과 8주령에 비해 혈관평활근세포의 증식이 유의하게 감소되어 있었고, 6주령과 8주령 양군 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p < 0.05$ )(Fig. 2).

#### 혈관조영술을 이용한 경동맥 평균 내경

혈관 조영술을 이용한 경동맥 평균 내경은 6주령군(n=3)  $1.20 \pm 0.03$  mm, 8주령군(n=3)  $1.18 \pm 0.06$  mm, 11주령군(n=3)  $1.29 \pm 0.02$  mm으로 6주령과 8주령간에는 유의한 차이가 없고 11주령군은 두 군에 비해 약 0.1 mm 내경이 컸다( $p < 0.05$ )(Fig. 3).

#### 혈중 Testosterone 농도 측정

혈중 testosterone 농도는 8주령군(n=4)  $0.76 \pm 0.39$  ng/mL, 11주령군(n=5)  $1.18 \pm 0.49$  ng/mL이었으나 두 군 간에 통계적 차이는 없었고, 6주령군은 측정하지 않았다.

## 고 찰

쥐 경동맥 손상 모델은 1970년대부터 현재까지 동맥경화 및

혈관 재협착의 기전과 치료를 위한 연구에서 동물 모델로 광범위하게 사용되어 왔다.<sup>1-5)</sup> 빠른 시간 내에 결과를 확인 할 수 있으며, 시술 전 후 관리가 용이하고 관리 비용 또한 돼지, 고양이, 개 등을 이용한 중대동물에 비하여 저렴한 장점을 갖고 있다.<sup>1-6)</sup> 사람에게 직접 적용하기 전에 중대동물의 실험이 필요한 경우에도 비용이나 관리가 쉬워 전 실험으로 활용되고 있으며, 다양한 치료 방법의 개발을 위한 스크린 단계의 연구에서도 많이 사용되고 있다.

신생내막의 억제 효과 등을 보는 연구에서 대조군에서의 신생내막 형성이 비교적 일정하여야 효과 판정을 정확히 할 수 있다. 만약 대조군의 신생 내막의 형성 정도의 편차가 심하다면 실험 결과의 분석도 어렵고 결과의 신빙성도 떨어질 것이다. 본 연구진이 동일한 시술 조건과 시술자가 실시한 연구들을 살펴 본 결과 실험 간에 대조군에 상당한 차이가 있는 경우가 있었다. 본 연구진에 의해 행해진 일련의 실험들의 대조군을 시술시 체중을 20 g 단위로 나누어 전체를 분석하여 보았더니, 체중이 280 g 정도인 쥐와 320 g 정도의 쥐에서는 상당한 차이가 있음을 발견하였다.<sup>13-17)</sup> 본 연구진은 주령이 8~12주이고 체중이 280~340 g 정도의 쥐를 많이 사용하고, 6~8주령의 쥐들도 사용하고 있다. 타 실험실도 이 정도의 쥐를 사용하고 있는 곳이 많다. 약간의 주령이나 체중의 차이가 신생 내막의 형성 정도에 미치는 영향이 예상외로 크다면 대조군을 선택시 중요한 변수가 될 수 있다. 이에, 본 연구진은 실험에 많이 사용되는 연령대와 체중의 쥐들에 대해 신생내막 형성 정도에 차이가 있는 지 검증하기 위한 실험을 실시하였다.

시술자에 의한 간섭현상을 배제하기 위해 본 연구에서는 한 명의 숙달된 시술자가 본 연구에 관한 사전 지식이 전혀 없는 상태에서 시술하였다. 6주령, 8주령, 11주령의 쥐는 체중의

차이가 있으므로 혈관의 크기도 주령이나 연령이 증가할수록 커질 것으로 기대할 수 있다. 손상을 가하기 전의 정상 혈관은 연약하여 조직절편 제작 시 혈관 단면을 동심원으로 얻기는 힘들어 조직검사로는 혈관 크기를 정확히 비교하기가 어려워 경동맥 조영술을 실시하였다. 경동맥 조영술로 측정된 경동맥 내경이 6주령군은  $1.20 \pm 0.03$  mm이고 8주령군은  $1.18 \pm 0.06$  mm으로 유의한 차이가 없었으나 11주령군은  $1.29 \pm 0.02$  mm으로 6주령과 8주령군에 비해 약 0.1 mm 정도가 컸다. 6주령과 8주령군이 내경이 약간 작으므로 혈관 손상이 좀 더 가해졌을 가능성이 있다. 돼지의 관상동맥의 경우에는 혈관의 손상 정도를 조직학적 방법으로 어느 정도 정량화할 수 있으나,<sup>20)</sup> 통상적인 풍선 손상에서 중막 파괴가 일어나지 않는 경동맥의 경우에는 조직학적으로는 정량화할 수 있는 좋은 방법이 없다. 그러나 일반적인 실험 환경에서 취할 수 있는 동일한 풍선 손상을 위한 모든 노력을 기울였기 때문에, 비록 풍선 손상의 정도가 달라서 6주령과 8주령의 쥐에서 신생내막의 형성이 더 많아졌다 하더라도 일반적 실험실 상황에서는 피할 수 없는 형편이다. 신생내막의 형성 정도의 차이가 별로 크지 않다면 통상적인 실험에서는 큰 문제가 되지 않을 것이다. 그러나, 형태조직학적 분석 결과 6주령군(n=9)과 8주령군(n=8)의 신생내막의 면적은 각각  $0.22 \pm 0.04$  mm<sup>2</sup>,  $0.17 \pm 0.08$  mm<sup>2</sup>으로 양군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으나, 11주령군(n=10)의 신생내막의 면적은  $0.07 \pm 0.03$  mm<sup>2</sup>으로 6주령에 비해서는 3.1배, 8주령의 차이인 8주령군보다도 신생내막의 형성이 2.4배나 작았고( $p < 0.05$ ), 이러한 결과는 신생내막의 억제 등의 연구를 시행할 시 효과 판정 등에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 특히 이 연령대가 쥐 경동맥 손상 모델에서 재협착 연구에 많이 사용되는 연령군이기에 때문에 심각한 문제가 될 수 있다.

연령 차이에 따른 혈관 손상 후 신생내막의 형성 정도에 관한 연구는 서론에서 언급한 바와 같이 주로 노화에 관한 연구들인데,<sup>8-12)</sup> 연령에 의한 혈관평활근세포의 증식 효과는 논란이 있다. 일부 연구는 노화에 따라 혈관평활근세포의 증식이 감소했다고 보고하고 있고,<sup>8,9)</sup> 다른 연구들은 반대의 결과를 보여 주고 있다.<sup>10-12)</sup> 본 연구의 결과는 비슷한 연령대의 젊은 쥐를 사용한 연구인데, 적어도 이 연령대에서는 연령이 낮을수록 혈관평활근의 증식이 더 많은 것으로 생각된다.

혈중 남성 호르몬의 감소는 동맥경화의 유발 및 진행에 있어서 연관성을 갖고 있고, 특히 70세 이상 남성과 같은 젊은 성인 남성에게 비해 free testosterone의 체내 농도가 낮고 심혈관 질환의 위험인자를 갖고 있는 환자의 경우 지속적인 testosterone의 치료가 심혈관계 질환의 진행을 방지하고 또한 치료에 있어서 효과를 나타내고 있다는 보고가 있다.<sup>21-23)</sup> 이 연령대의 쥐들은 아직 성장 단계에 있어 남성 호르몬의 수치가 다를 가능성이 있고 이것에 의한 영향을 알기 위하여 혈중 testosterone 농도를 측정하였다. 본 연구에 사용된 8주령

군과 11주령군 두 군 간의 혈중 testosterone 농도는 유의한 차이가 없어, 이것에 의한 영향은 크지 않은 것으로 보인다. 다만 쥐의 혈중 testosterone 측정을 쥐 전용 시약을 사용하지 않고 사람용 시약을 사용했기 때문에 실지 수치와는 차이가 있을 수 있으나 상호 비교에는 큰 문제가 없을 것으로 생각된다.

결론적으로, 쥐 경동맥 손상 모델에서 생성되는 신생내막의 양을 이용하는 연구에서 연구 목적에 맞는 적절한 주령 선택에 유의하여야 하고, 주령과 체중의 밀집도를 높이는 것이 중요하다. 실험에 많이 사용되는 6~12주령(250~340 g)내에서 약간의 주령이나 체중 차이에도 예상보다 심한 신생내막의 차이가 있으므로 특히 유의하여야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

쥐 경동맥 풍선 손상 후 신생내막의 형성 정도는 쥐의 성별, 연령, 종(species) 및 시술 방법 등에 따라 큰 차이를 보이고 있다. 심지어 동일 실험의 대조군(control) 내에서도 심한 편차를 보이는 경우가 많다. 연령에 관한 연구는 주로 노화에 관한 연구로 젊은 쥐와 아주 늙은 쥐를 비교하였다. 본 연구는 실험에 많이 사용되는 주령인 6~12 주령의 쥐를 대상으로 풍선 손상 후 신생 내막의 형성에 있어 유의한 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

### 방 법 :

6주령(n=9), 8주령(n=8), 11주령(n=10)의 수컷 Sprague-Dawley rat의 경동맥을 통상적인 방법에 의해 풍선 손상을 가하였다. 시술 2주째 관류고정 후 경동맥을 적출하여 형태조직학적 분석을 시행하였다. 혈관 손상 2일 후 BrdU 면역화학염색을 이용하여 생체내 혈관평활근세포 증식을 측정하였다.

### 결 과 :

형태조직학적 분석 결과 6주령군(n=9)의 신생내막의 면적(neointima area)은  $0.22 \pm 0.04$  mm<sup>2</sup>, 8주령군(n=8)은  $0.17 \pm 0.08$  mm<sup>2</sup>, 11주령군(n=10)은  $0.07 \pm 0.03$  mm<sup>2</sup>으로 6주령군과 8주령군은 11주령에 비해 신생내막의 형성이 각각 3.1배와 2.4배나 증가하였고( $p < 0.05$ ), 6주령과 8주령 양군 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다. BrdU를 이용하여 측정한 mitotic index도 6주령군(n=4)  $25.03 \pm 3.92\%$ , 8주령군(n=4)  $21.66 \pm 3.66\%$ , 11주령군(n=4)  $9.22 \pm 1.51\%$ 으로 11주령군이 6주령과 8주령에 비해 혈관평활근세포의 증식이 유의하게 감소되어 있었고, 6주령과 8주령 양군 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p < 0.05$ ).

### 결 론 :

쥐 경동맥 손상 모델에서 생성되는 신생내막의 양을 이용하는 연구에서 연구 목적에 맞는 적절한 주령 선택에 유의하여야 하고, 주령과 체중의 밀집도를 높이는 것이 중요하다. 실험에 많이 사용되는 6~12주령(250~340 g)내에서 약간의

주령이나 체중 차이에도 예상보다 심한 신생내막의 차이가 있으므로 특히 유의하여야 할 것으로 사료된다.

**중심 단어** : 신생내막 형성 ; 경동맥 손상 ; 노화.

이 논문은 한국과학재단 2006년도 특정기초연구사업(과제번호 R01-2006-000-10020-0), 산업자원부 지방기술혁신사업(과제번호 RTI04-03-06) 및 2005학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

- 1) Kantor B, Ashai K, Holmes DR Jr, Schwartz RS. *The experimental animal models for assessing treatment of restenosis. Cardiovasc Radiat Med* 1999;1:48-54.
- 2) Schwartz RS. *Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs and more. Lab Invest* 1994;71:789-91.
- 3) Touchard AG, Schwartz RS. *Preclinical restenosis models: challenges and successes. Toxicol Pathol* 2006;34:11-8.
- 4) Ferns GA, Avades TY. *The mechanism of coronary restenosis: insights from experimental models. Int J Exp Pathol* 2000;81:63-88.
- 5) Fuster V, Ip JH, Badimon L, Badimon JJ, Stein B, Chesebro JH. *Importance of experimental models for the development of clinical trials on thromboatherosclerosis. Circulation* 1991;83 (Suppl): IV15-25.
- 6) Folts J. *An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage and periodic thrombosis. Circulation* 1991;83 (Suppl): IV3-14.
- 7) Assandnia S, Rapp JP, Nestor AL, et al. *Strain difference in neointimal hyperplasia in the rat. Circ Res* 1999;84:1252-7.
- 8) Spagnoli LG, Sambuy Y, Palmieri G, Mauriello A. *Age related modulation of vascular smooth muscle cells proliferation following arterial wall damage. Artery* 1985;13:187-98.
- 9) Chajara A, Delpech B, Courel MN, Leroy M, Basuyau JP, Levesque H. *Effect of aging on neointima formation and hyaluronan, hyaluronidase and hyaluronectin production in injured rat aorta. Atherosclerosis* 1998;138:53-64.
- 10) McCaffrey TA, Nicholson AC, Szabo PE, Weksler ME, Weksler BB. *Aging and arteriosclerosis: the increased proliferation of arterial smooth muscle cells isolated from old rats is associated with increased platelet-derived growth factor-like activity. J Exp Med* 1988;167:163-74.
- 11) Stemerman MB, Weinstein R, Rowe JW, Maciag T, Fuhro R, Gardner R. *Vascular smooth muscle cells growth kinetics in vivo in aged rats. Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:3863-6.
- 12) Hariri RJ, Alonso DR, Hajjar DP, Coletti D, Weksler ME. *Aging and arteriosclerosis: I. development of myointimal hyperplasia after endothelial injury. J Exp Med* 1986;164:1171-8.
- 13) Kwon JS, Park SS, Kim YG, et al. *Perivascular delivery of paclitaxel with F-127 pluronic gel inhibits neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. Korean Circ J* 2005;35:221-7.
- 14) Kim DW, Kwon JS, Kim YG, et al. *Novel oral formulation of paclitaxel inhibits neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. Circulation* 2004;109:1558-63.
- 15) Cho MC, Kwak NJ, Piao HN, et al. *Effect of paclitaxel local delivery on neointimal formation after endothelial denudation of the rat carotid artery. Korean Circ J* 2000;30:198-207.
- 16) Kim DW, Kim YG, Oh TG, Cho MC, Kim ST. *Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy for the prevention of stenosis in rat carotid artery injury model. Korean Circ J* 1998;28:977-89.
- 17) Kim ST, Kim DW, Oh TG, Ahn HY, Kim YG. *Gene therapy using retroviral vector containing rat erythropoietin. Korean J Hematol* 1997;32:22-31.
- 18) Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab Invest* 1983;49:327-33.
- 19) Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, et al. *Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. J Clin Invest* 1995;95:1869-76.
- 20) Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al. *Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-74.
- 21) Harman SM. *Testosterone in older men after the Institute of Medicine Report: where do we go from here? Climacteric* 2005;8:124-35.
- 22) Khaw KT, Barrett-Connor E. *Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fractions in men. Arterioscler Thromb* 1991;11:489-94.
- 23) Heller RF, Wheeler MJ, Micallef J, Miller NE, Lewis B. *Relationship of high density lipoprotein cholesterol with total and free testosterone and sex hormone binding globulin. Acta Endocrinol* 1983;104:253-6.