Original Articles Korean Circulation J 2000;30(2):198-207

백서 경동맥의 내피세포 제거로 유발되는 신생내막 형성에 Paclitaxel 국소요법이 미치는 영향

충북대학교 의과대학 내과학교실,[1] 약리학교실,[2] 신경외과학교실[3]
조명찬[1] · 곽남주[1] · 박해남[1] · 연태진[1] · 김동운[1] · 안희열[2] · 김영규[3] · 김승택[1]

Effect of Paclitaxel Local Delivery on Neointimal Formation after Endothelial Denudation of the Rat Carotid Artery

Myeong-Chan Cho, MD[1], Nam Joo Kwak, MD[1], Hainan Piao, MD[1], Tae Jin Youn, MD[1], Dong-Woon Kim, MD[1], Hee Yul Ahn, PhD[2], Young-Gyu Kim, MD[3] and Seung Taik Kim, MD[1]
[1]Department of Internal Medicine, [2]Pharmacology, and [3]Neurosurgery, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Mechanisms of restenosis following successful coronary angioplasty (PTCA) are known as vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation and migration, elastic recoil or vascular wall remodeling. Paclitaxel whose effect on the stabilization of microtubles leads to cell death is highly lipophilic, permitting easy pass through cell membrane, and has a long-term antiproliferative effect. This study was performed to evaluate effect of paclitaxel on VSMCs proliferation and whether locally delivered paclitaxel can prevent stenosis and neointimal formation in rat carotid artery injury model. **Materials and Methods** : Cultured VSMCs were exposed to sequential concentrations of paclitaxel in vitro, and proliferation inhibition was analyzed with ^{3}H-thymidine incorporation. Paclitaxel of a suitable concentration was applied to the endothelium-denuded carotid artery of Fisher 344 inbred rats for 20 minutes. Angiogram and morphometric analysis of carotid artery was performed after 2 weeks. **Results** : ^{3}H-thymidine incorporation in cultured VSMCs was decreased dose-dependently from the concentration of 0.1 μmol/L (2,454±149 cpm/μg protein) to 100 μmol/L (1,323±69 cpm/μg protein) of paclitaxel by single and 20-minute exposure in the presence of platelet-derived growth factor ($p<0.005$). In the absence of platelet-derived growth factor, the decrement of ^{3}H-thymidine incorporation was evident above the concentration of 5 μmol/L of paclitaxel. To evaluate in vivo effect, paclitaxel (0.1 or 1 μmol/L) was administered into the endothelium-denuded carotid artery by balloon injury and incubated for 20 minutes. Percent stenoses (32.2±9.8%) of paclitaxel-treated group was less than those (46.3±7.5%) of control group on histologic analysis ($p<0.01$). Paclitaxel-treated group also had wider lumen on carotid angiogram and less neointimal thickening than control on histologic examination ($p<0.005$). **Conclusion** : Proliferation of VSMCs was effectively inhibited and neointimal formation and luminal stenosis was prevented in rat carotid artery injury model by single, brief and local

논문접수일 : 1999년 3월 18일
심사완료일 : 1999년 11월 8일
교신저자 : 김승택, 361 - 711 충북 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (0431) 269 - 6354 · 전송 : (0431) 273 - 3252
E - mail : stkim@med.chungbuk.ac.kr

delivery of low-dose paclitaxel. This strategy could be applied to clinical settings for the prevention of restenosis after PTCA. **(Korean Circulation J 2000;30(2):198-207)**

KEY WORDS : Carotid · Neointima · Stenosis · Paclitaxel · Local delivery.

서 론

관동맥성형술(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)후 재협착(restenosis)은 6개월 내에 30 50%에서 발생하며 이를 해결하기 위해 많은 노력들을 하고 있다.[1)2)] 재협착의 기전은 탄성반도(elastic recoil), 혈전형성과 결체조직의 구조화, 내막증식(intimal hyperplasia) 및 혈관벽 재형성(remodeling) 등이 기초적 및 임상적 연구결과로 제시되고 있다.[3-8)] 관동맥 스텐트삽입술로 탄성반도와 혈관벽 재형성을 효과적으로 방지하여 재협착율을 약 10% 정도 낮추었지만,[9)10)] 한편으로 혈관 손상으로 유리되는 국소인자(local factor)와 활성화 혈소판에서 생성되는 성장촉진물질들에 의한 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)의 증식과 이동 및 세포외 간질(extracellular matrix)의 형성으로 발생되는 내막 증식은 더 심한 정도로 유발되어 in-stent restenosis가 발생한다. 재협착 방지를 위해 atherectomy, laser, rotablator, cutting balloon 같은 새로운 PTCA 장비 도입과, 항혈소판제, 항혈전제, 혈관확장제, 세포증식억제제, 지질대사개선제, 항산화제 등의 약물요법[6)] 및 유전자요법(gene therapy)[11)] 같은 치료가 시도되고 있기는 하나, 재협착을 현저히 감소시킬 수 있는 방법은 아직 확립되지 않았다. 이론적으로 재협착은 PTCA가 시술된 관상동맥 즉 국소부위에서 일어나는 현상이므로 재협착의 방지를 위해서는 전신적인 치료법보다는 고농도의 약물투여가 가능한 국소약물요법(local drug therapy), 국소유전자요법 및 관동맥내 방사선 조사요법 같은 부위특이적(site-specific) 치료가 더 효과적일 것이다. 최근에 PTCA를 시행한 부위에 직접 약물이나 유전자 등을 투여하기 위해 이중풍선카테터, dispatch 혹은 microporous balloon 등이 개발되어 임상에 이용되고 있으며,[12-14)] slow-release microsphere 또는 스텐트에 약물이나 유전적물질 등을 입혀 장기간 국소부위에 전달하는 시도들이 늘고 있다. 백서 경동맥 손상모델은 재협착을 연구하는 동물모델 중 가장 흔히 사용되며, 혈관손상이 국소적이고 일정할 뿐만 아니라, 내피세포를 제거된 부위의 혈관 전장에 걸쳐 VSMCs의 이동과 증식이 재현성 높게 나타나기 때문에 매우 좋은 *in vivo* 모델이며, 특히 VSMCs의 증식에 대한 신호전달, 성장인자의 역할 등의 분자생물학적 정보가 많이 알려져있다.

미세소관(microtubule)은 α-와 β- subunit로 구성된 tubulin heterodimer가 동적 평형상태를 이루는 tubulin의 polymer로 세포골격(cytoskeleton)을 구성하며 세포분열시 mitotic spindle을 형성하는 주 기능 이외에도 세포이동, 세포형태의 유지, 신호전달, 세포내 물질전달과 tumor necrosis factor-α 같은 유전자의 활성화에도 중요한 역할을 한다. 미세소관에 작용하는 항암제중 vinca alkaloids는 미세소관의 해체(microtubule disassembly)를 일으키나, paclitaxel은 tubulin의 중합(polymerization)을 유도하여 미세소관을 비정상적으로 과안정화 시킨다.[15-19)] 따라서 세포분열 등에 필요한 정상 미세소관의 역동을 파괴시키므로 세포의 사망이 초래된다. Paclitaxel은 여러 가지 종양세포주, 상피세포, 섬유아세포 및 VSMCs 등의 증식과 이동을 억제한다고 보고되고 있다.[17)19)20)] 백서 경동맥 손상모델에서 paclitaxel을 정맥투여하여 신생내막의 증식이 억제되었다는 보고가 있으나,[20)] 이 연구는 사람에게 적용하기에 전신적인 부작용을 고려하지 않을 수 없다. Axel 등[21)]은 paclitaxel의 국소치료효과를 *in vivo*에서 재검증하기 위해 토끼 경동맥을 전기자극으로 손상시킨 협착모델에서 microporous infusion catheter로 20분간 주입시킨 결과 내막면적, 내막비후 및 협착정도는 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 신생내막 형성의 억제효과는 없었다. 다만 *in vitro* 실험에서는 paclitaxel이 VSMCs 증식을 현저하게 억제하였다.[22)] Paclitaxel은 다른 증식 억제제와는 달리 PTCA나 스텐트삽입술 후의 재협착에서 과도한 VSMCs의 증식에 대한 국소약물요법에 사용될 수 있는 특징을 가지고 있다. 즉 paclitaxel은 지용성 성격이

매우 높아 세포막의 비수용성 장벽을 쉽게 통과하여 세포내 흡수가 신속히 일어나며, 종양세포와 VSMCs를 이용한 *in vitro* 실험에서 paclitaxel을 단시간, 일회 처치만 함에도 장시간 지속되는 항증식효과가 있다. 이에 Heldman 등[23]은 paclitaxel을 Palmaz-Schatz stent에 입혀 돼지 관동맥 재협착모델에 장착시켰을 때 관동맥조영술 및 조직학적 검사상 in-stent restenosis를 줄일 수 있다고 하였으며, Farb 등[24]은 paclitaxel의 국소전달방법으로 biodegradable polymer를 도포한 stent를 토끼의 장골동맥에 위치시켰을 때 신생내막형성을 줄였다고 보고하였다.

본 연구의 목적은 백서 VSMCs를 배양하여 *in vitro*에서 paclitaxel의 농도와 처치시간에 따른 VSMCs의 증식억제 효과를 알아보고자 하며, 실제 임상에 적용하기 위해 일회, 단기간의 paclitaxel의 처치가 VSMCs 증식을 억제시킬 수 있는 지를 확인하고자 한다. 풍선으로 내피세포를 제거한 백서 경동맥 손상모델을 이용하여 *in vitro* 실험에서 구한 적정농도의 paclitaxel을 단기간, 일회처치하는 것이 신생내막의 형성과 혈관의 협착을 방지시킬 수 있는 지를 관찰함으로써 paclitaxel 국소요법의 유용성을 검증하는 것이다.

재료 및 방법

체중 300 g 정도의 순종 Fisher 344 숫쥐(연령, 12~14주)를 일본의 Charles River사로부터 구입하여 2주 정도의 안정기간을 거쳐 실험에 사용하였다.

백서 VSMCs의 분리와 배양

백서 VSMCs의 분리 및 배양은 본 연구진이 과거에 보고한 바 있다.[25][26] 약술하면, Fisher 344 쥐의 복부대동맥을 적출하여 collagenase type I(167.5 U/ml), elastase type III(15 U/ml), soybean trypsin inhibitor(364 μg/ml), bovine serum albumin(2 mg/ml) 하에서 소화시켜 VSMCs를 분리한 후 배양하여 혈관평활근 세포주를 확립하였다. 배양된 세포는 VSMCs에 특이적인 α-actin에 대한 단클론항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하여 VSMCs임을 확인하였다. 이런 방법으로 확립된 VSMCs는 Dulbecco's Modified Eagle Media(high glucose DME, Gibco-BRL, USA ; glutamine, 0.3 g/L, sodium pyruvate, 1 mmol/L)에 열처리로 불활성화된 우태혈청(fetal bovine serum, 10 Vol%, GibcoBRL, USA)과 penicillin-streptomycin(각 100units/ml, GibcoBRL, USA)을 첨가한 후 CO_2 incubator(5% CO_2, 37℃)에서 배양하였다.

Paclitaxel의 VSMCs 증식억제효과

Paclitaxel은 polyethoxylated caster oil(Cremophor EL)과 100% ethanol의 1 : 1 혼합용액(vol/vol)인 지용성용매(lipoid vehicle)에 7.0 mmol/L의 농도로 용해되어 있는 Taxol(Bristol-Myers Squibb, USA)을 구입하여 사용하였다.

배양된 VSMCs를 phosphate-buffered saline(PBS)로 씻고 trypsin(0.25%)으로 처리하여 petri dish에서 떼어 낸 후, cell counter를 이용해 세포 수를 측정하고 2.5×10^4개의 세포를 6-well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 우태혈청을 첨가하지 않은(serum free) 배양액에서 24시간 더 배양한 후, 대조군은 아무런 물질의 첨가없이, 용매군은 paclitaxel을 녹이는 용매인 lipoid vehicle(Cremophor EL과 100% ethanol의 1 : 1 혼합용액(vol/vol))만 첨가하고, paclitaxel 투여군은 0.1, 1, 5, 10 및 100 μmol/L의 paclitaxel을 세포배양액에 첨가하여 20분간 반응시켰다. 이후 PBS로 다시 씻고, 20시간 동안 배양한 후 3H-thymidine(1 μCi, Amersham, USA)을 넣고 4시간 더 배양한 후, well을 icecold PBS, 10% TCA, ethyl alcholol : diethyl ether(1 : 1) 혼합용액으로 차례로 세척하였다. 이후 0.5N NaOH로 세포를 용해한 후 단백질을 Bradford 법(Bio-Rad protein assay kit, UK)으로 정량하였으며, 3H-thymidine incorporation을 구하기 위해 100 μl씩을 반응용액에 넣어 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다. 이러한 실험은 platelet-derived growth factor-BB(PDGF-BB)를 첨가하지 않거나, PDGF-BB를 50 ng/ml의 농도로 첨가하여 배양하는 조건하에서 각각 4개씩의 plate를 사용하여 시행하였다.

백서 경동맥 손상모델과 Paclitaxel 국소요법

Fisher 344 쥐에 ketamine(50 mg/kg)과 xylazine(6.7 mg/kg)을 근주하여 마취시킨 후, 우측 경부를 절개하여 총경동맥(common carotid artery, CCA), 외경동맥 및 내경동맥을 분리하였다. Microvascular cl-

amp(Acland, S & T, Switzerland)를 CCA의 대동맥 기시부와 내경동맥 원위부에 착용시켜 혈류를 일시적으로 중단시킨 상태에서 외경동맥을 절개하였다. C-CA에 2F Fogarty 풍선도자(Baxter Healthcare Corporation, USA)를 삽입하고 풍선을 부풀려 5회 왕복시켜 내피세포를 제거한 후 생리적 식염수로 CCA 내부를 세척하였다. 이후 microvascular clamp를 제거하여 혈류를 재관류시키고 절개부위를 봉합하였다. 대조군(n=10)은 CCA에 손상만을 가한 후 혈류를 재관류시켰으며, paclitaxel 치료군(n=12)은 동일한 방법으로 내피세포를 제거하고 위의 in vitro 실험에서 VSMCs의 증식을 효과적으로 억제하며 세포독성이 없는 농도의 paclitaxel을 CCA에 주입하고 20분간 반응시켜 손상된 혈관벽에 paclitaxel을 작용시킨 후 microvascular clamp을 제거하여 혈류를 재개시켰다.

수술 2주 후에 다시 마취시킨 후 복부를 절개하여 4F vascular cannula(Cook, USA)를 복부대동맥을 통해 흉부 하행대동맥에 위치시켰다. 비이온성 조영제인 Hexabrix(Schering, Germany)를 주입하면서 혈관조영영화촬영술(cineangiography)을 시행한 후, 조영장치에 부착되어 있는 컴퓨터 분석시스템(DCI videodensitometry, Phillips, The Netherlands)을 이용하여 혈관손상을 가한 우측 CCA 중 협착이 가장 심한 부위의 직경(Dobs)과 손상을 가하지 않은 좌측 CCA의 직경(Dcon, 10 arbitrary unit)을 비교하여 협착 정도(% stenosis, Dobs/Dref×100)를 분석하였다.

경동맥조영술 후 경동맥을 10% formalin으로 120 mmHg의 압력하에 5분 이상 관류고정시킨 후 경동맥을 적출하여 10% formalin액에 고정시켰다. 고정된 경동맥의 중앙부위 3 mm를 취하여 파라핀에 포매한 후 연속적인 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하고 가장 협착이 심한 혈관 절편의 사진을 찍어 scanning하여 컴퓨터에 옮긴 후 Scion Image Analysis Software(version 1.1)을 이용하여 quantitative morphometry 분석을 시행하였다.분석에 사용한 인자들은 신생내막의 두께(*Tintima*)와 면적(*Aintima*), 중막의 두께(*Tmedia*)와 면적(*Amedia*), 신생내막과 중막의 면적비(*Aintima/media*), 협착정도(% stenosis)이다.

통계처리

모든 자료의 값은 평균±표준편차로 표시하였으며

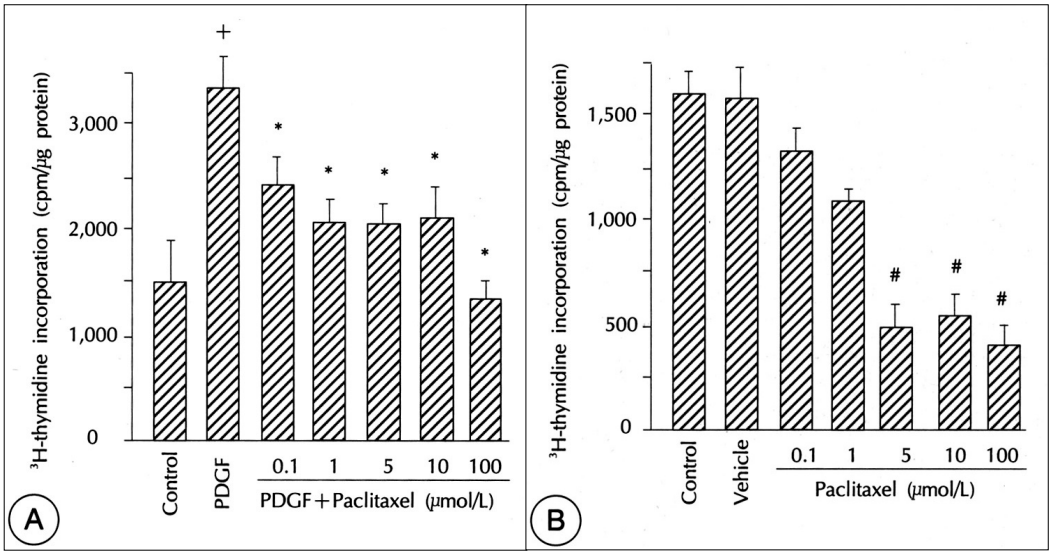

Fig. 1. Effects of paclitaxel on rat VSMCs growth with or without PDGF (50 ng/ml) stimulation. (A) The PDGF-induced growth-stimulatory effects on rat VSMCs were significantly blocked even after 20-minute single incubation of paclitaxel in all concentrations (0.1 to 100 μmol/L). +p<0.005 PDGF vs Control, *p<0.005 PDGF+paclitaxel vs PDGF. (B) Effects of paclitaxel in the absence of PDGF on rat VSMCs growth. ^{3}H-thymidine incorporation was not affected either by lipoid vehicle or by low dose of paclitaxel (0.1 and 1.0 μmol/L). In the higher concentration of paclitaxel (5 to 100 μmol/L), ^{3}H-thymidine incorporation was significantly reduced even after 20-minute single incubation compared with control groups (#p<0.0005)

통계분석은 SPSS를 사용하였고, 대조군과 paclitaxel 치료군간의 측정값의 차이 및 유의성은 Student *t*-test를 통해 검증하였고, p 값이 0.05 미만인 경우에 통계적인 의의를 두었다.

결 과

VSMCs의 *in vitro* 증식실험과 Paclitaxel의 증식억제효과

혈청을 제거하고 PDGF-BB가 없는 배양액에서 VSMCs를 배양한 후 측정한 ^{3}H-thymidine incrporation은 1,519±464.5 cpm/μg protein이나, PDGF-BB(50 ng/ml)를 첨가한 후에 3,310±338.6 cpm/μg protein으로 증가하였다($p<0.005$). PDGF-BB의 자극하에서 VSMCs를 배양하면서 paclitaxel을 0.1, 1, 5, 10, 100 μmol/L의 농도로 20분간 처리하고 씻어낸 후 계속 24시간 더 배양한 후의 ^{3}H-thymidine incorporation은 각각 2,454±149, 2,067±167, 2,048±142, 2,110±255, 1,323±69 cpm/μg protein으로 대조군(3,310±338.6 cpm/μg protein)에 비하여 유의한 점진적인 감소를 보여(Fig. 1A, $p<0.005$), paclitaxel이 VS-MCs의 증식을 농도의존적으로 억제함을 보여주었다.

PDGF-BB의 첨가없이 같은 실험을 반복한 경우, paclitaxel을 0.1, 1, 5, 10, 100 μmol/L의 농도로 20분간 처리한 후의 ^{3}H-thymidine incorporation은 0.1 μmol/L(1,051±85 cpm/μg protein)과 1.0 μmol/L(873±354 cpm/μg protein)의 경우에는 대조군(1,275±592 cpm/μg protein)과 차이가 없었으나, 5, 10, 100 μmol/L의 농도에서의 ^{3}H-thymidine incorporation은 각각 388±45, 428±189, 303±30 cpm/μg protein으로 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 1B, $p<0.0005$).

백서 경동맥 손상모델에서 Paclitaxel의 협착방지효과

백서 경동맥의 내피세포 제거로 유발되는 신생내막 형성에 paclitaxel 국소요법이 미치는 영향을 알아보기 위해 사용한 paclitaxel은 *in vitro* 실험에서 VSMCs의 증식을 효과적으로 억제하며, 손상을 가한 경동맥 주위의 정상조직에는 영향을 미치지 않을 즉 자극되지 않은 상태의 VSMCs은 증식을 억제시키지 않는 농도인 0.1 μmol/L(n=4)과 1 μmol/L(n=8)로 동물실험을 진행하였다. 경동맥의 내피세포를 제거한 후 대조군과 paclitaxel 치료군 모두에서 시술 2주 후에 경동맥조영술을 실시하였다. 대조군은 손상을 가하지 않은 좌측

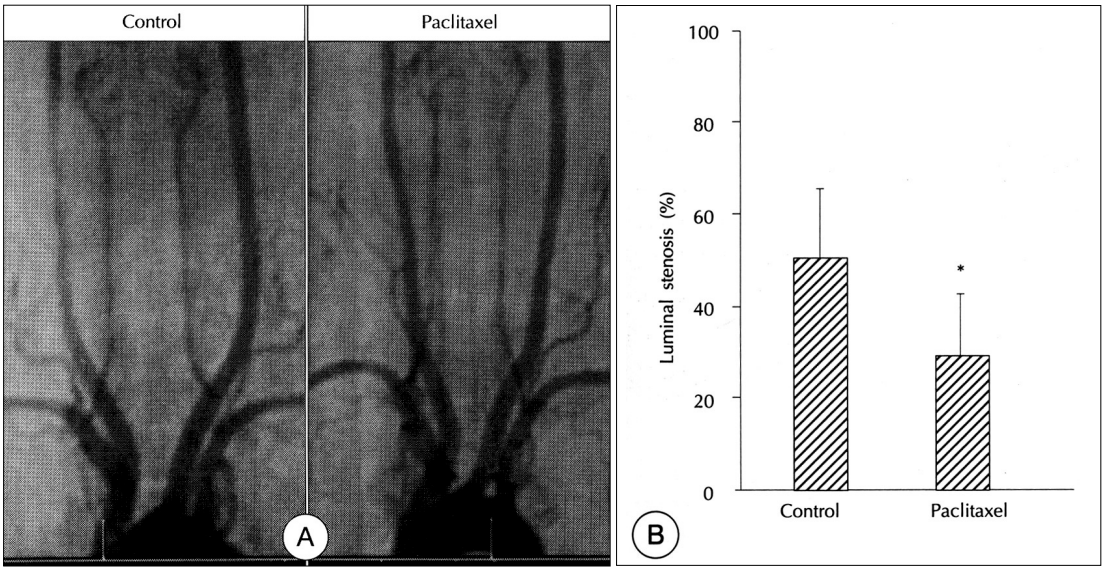

Fig. 2. Representative carotid angiographic finding performed 2 weeks after carotid artery injury of control and paclitaxel-treated group. (A) Diffuse and significant narrowing of the right carotid artery was observed in the control group. The luminal narrowing was markedly reduced after local delivery of paclitaxel (1 μmol/L) for 20 minutes. (B) Paclitaxel-treated group (n=12) showed significant reduction in the luminal narrowing of carotid artery compared with control group (n=10). *$p<0.01$ control vs paclitaxel-treated group.

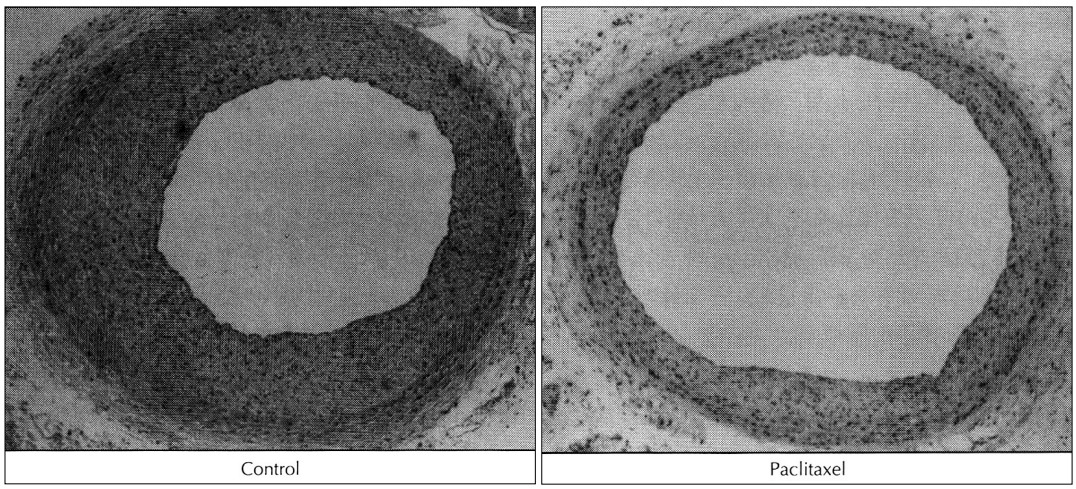

Fig. 3. Cross sections (100X) of the rat carotid artery taken 14 days after balloon injury demonstrate significant inhibition of neointimal formation and subsequent reduction of luminal narrowing in paclitaxel-treated group.

경동맥보다 손상을 가한 우측 경동맥이 전체적으로 내경이 좁아진 협착이 관찰되었으나, paclitaxel을 20분간 일회 처치한 paclitaxel 치료군은 대조군에 비해 경동맥의 내경이 넓어져 있었다(Fig. 2A). 손상받지 않은 좌측 경동맥의 내경을 10 arbitrary unit으로 하여 분석하였을 때, paclitaxel 치료군의 가장 좁은 내경은 5.9±1.6 arbitrary unit로 대조군의 4.3±1.4 arbitrary unit에 비하여 유의하게 증가되었으며($p<0.05$), 협착의 정도(%stenosis)도 대조군의 50.2±12.7%에 비하여 paclitaxel 치료군이 31.9±11.9%로 감소하였다(Fig. 2B, $p<0.01$).

경동맥조영술 후 경동맥을 관류고정하고 병리조직학적 검사를 실시하였다. 대조군(n=7)과 paclitaxel 치료군(n=11) 모두에서 내피세포의 제거 2주 후에 발생하는 경동맥 내강의 협착은 주로 VSMCs의 증식에 의한 신생내막의 형성에 의한 것임을 확인할 수 있었으며, paclitaxel 치료군과 대조군의 조직소견을 비교해보면 치료군이 VSMCs의 증식과 신생내막의 형성이 현저히 적어 경동맥 내강의 협착이 방지됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 고배율(100×) 하에서 분석한 paclitaxel 치료군의 중막의 두께는 대조군과 비슷하였으나($p=0.79$), 내막의 두께는 대조군에 비해 paclitaxel 치료군이 유의한 감소가 있었고($p<0.001$), 내막의 면적도 paclitaxel 치료군에서 0.25±0.08 mm^2로 대조군의 0.42±0.10 mm^2에 비하여 유의하게 감소되어 있었다(Table 1, $p<0.005$). 또한 내막과 중막의 면적비는 대조군의 1.58±0.50%에 비하여 paclitaxel 치료군이 1.12±0.37%로 유의하게 작았으며($p<0.05$), 결과적으로 협착의 정도(% stenosis)도 대조군의 46.3±7.5%에 비하여 paclitaxel 치료군에서 32.2±9.8%로 신생내막의 형성이 30.4% 감소하였다($p<0.01$). 이상을 종합하면 백서 경동맥의 내피세포를 제거한 후 일회, 20분간의 paclitaxel 처치는 경동맥조영술과 병리조직학적 검사상 VSMCs의 증식과 신생내막의 형성을 억제하여 결과적으로 경동맥의 협착을 방지하는 효과가 있었다.

Table 1. Quantitative histopathological analysis of the rat carotid artery obtained 2 weeks after endothelial denudation

	Control (n=7)	Paclitaxel (n=11)	P value
Tintima	195.6 ±56.1	118.8 ±23.5	0.0009
Tmedia	62.9 ± 7.0	62.0 ± 6.1	0.79
Aintima	0.42± 0.10	0.25± 0.08	0.001
Aintima/media	1.58± 0.50	1.12± 0.37	0.04
%Stenosis	46.3 ± 7.5	32.2 ± 9.8	0.005

Tintima : intimal wall thickness (mm), *Tmedia* : medial wall thickness (mm), *Aintima* : Intimal area (mm^2), *Aintima/media* : area ratio between intimal and medial area.

고 찰

본 연구는 PTCA 후의 재협착을 방지하기 위한 방법의 모색으로 이루어졌다. 재협착의 발생에 VSMCs의 증식이 중요하다는 점에서[4-6] VSMCs의 증식을 억

제할 수 있는 효과적인 방법을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 검정한 것이다. 경동맥의 협착을 유도하기 위한 동물모델로 균질성을 좀더 기대하기 위하여 inbred rat인 Fisher 344 쥐를 이용하였다. 백서를 사용한 이유는 동맥의 내피세포를 제거하였을 때 발생되는 협착의 주기전이 VSMCs의 증식이며, 협착의 정도가 일정하게 나타나기 때문이다.[23] 실제 본 실험에서 손상을 가하지 않았던 좌측 경동맥보다 손상을 가한 우측 경동맥은 전장에 걸쳐 내경이 좁아졌으며 중간부위에 50% 정도의 협착이 관찰되었다.

최근 연구에 의하면 신생내막(neointima)의 형성과정에 VSMCs이 여러 번의 변형을 거치는데 여기에 미세소관(microtubule)의 정상적인 기능이 필요하다. 따라서 미세소관에 작용하는 항암제인 paclitaxel이 신생내막의 형성을 억제할 수 있으리라 생각되며, Sollott 등[20]은 nanomol 농도의 paclitaxel이 VSMCs의 이동과 증식을 억제할 수 있다고 하였다. 또한 백서 경동맥 손상모델을 이용하여 paclitaxel 2 mg/kg를 복강내 투여하였을 때, 신생내막의 형성이 억제된다고 하였으나 많은 양을 전신투여하여야 함으로 항암제의 부작용을 피할 수 없는 단점이 있다. VSMCs가 paclitaxel에 짧은 시간동안 노출되더라도 오랫동안 증식억제가 일어나고 지용성이어 세포내로의 전달이 용이하다는 점에서, 효과가 있는 최소 농도의 paclitaxel을 국소적으로 투여할 수 있다면 매우 적은 용량으로도 협착의 방지를 기대할 수 있을 것이며, 이에 대한 연구를 본 실험을 통해 확인하였다.

^{3}H - thymidine incorporation을 이용한 VSMCs의 *in vitro* 증식실험에서 paclitaxel을 20분간의 단기간, 일회 노출만을 시켰음에도 불구하고 0.1 μmol/L의 낮은 농도부터 100 μmol/L의 고농도까지 PDGF - BB 자극에 의한 VSMCs의 증식을 농도의존적으로 억제하였다. 그러나 PDGF - BB를 첨가하지 않은 경우, 0.1 μmol/L과 1.0 μmol/L의 paclitaxel을 처치한 경우에는 대조군에 비하여 ^{3}H - thymidine incorporation이 유의한 차이가 없으나, 5, 10, 100 μmol/L의 농도에서 대조군에 비해 ^{3}H - thymidine incorporation이 유의한 감소를 보여, 5 μmol/L 이상의 paclitaxel은 자극되지 않은 상태의 VSMCs 증식을 억제하였다. 이 결과는 nanomol 농도의 paclitaxel이 VSMCs의 이동과 증식을 억제할 수 있다는 Sollott 등[20]의 보고와 차이가 있으며, 이는 paclitaxel의 전처치(pretreatment) 기간과 ^{3}H - thymidine incorporation의 측정방법이 상이했기 때문으로 생각되었고, Axel 등[21]은 1 μmol/L의 paclitaxel을 20분간 단회처치시 VSMCs의 증식이 95% 이상 억제된다 하였으나 본 연구에서는 38%만 억제하였는 데 이는 사용한 VSMCs의 종(human vs rat)이 다르고 세포증식의 측정방법(BrdU - ELISA and MTT test vs ^{3}H - thymidine incorporation)이 달라 결과에 영향을 미쳤으리라 생각되었다. Paclitaxel을 용해하는 용매에는 알코올이 고농도로 들어 있으며, 알코올 자체가 VSMCs의 증식을 억제하는 효과가 있음이 보고된 바 있다.[27] 따라서 본 연구에서 관찰된 효과가 알코올에 의함이 아닌 것을 증명하기 위하여 paclitaxel을 녹인 용매(lipoid vehicle)만 첨가한 실험을 하였다. 용매군의 ^{3}H - thymidine incorporation은 대조군과 차이가 없었으며, 이는 본 실험에서 사용되어진 농도의 용매는 VSMCs에 직접적인 손상을 초래하여 성장억제 효과를 가져올 수 있다는 가능성을 배제할 수 있었다.

경동맥 손상모델에서 협착방지효과를 검증하기 위한 동물실험을 위해 사용한 paclitaxel의 농도는 VSMCs의 증식을 효과적으로 억제하며, 손상을 가한 경동맥 주위의 정상조직에는 영향을 미치지 않을 즉 세포독성이 없는 paclitaxel의 농도중 0.1 μmol/L와 1 μmol/L를 선택하였다. 내피세포를 제거한 경동맥에 저농도의 paclitaxel을 *in vitro* 실험에서와 같이 일회, 20분간 반응시켰음에도 불구하고 2주후에 협착의 완화정도가 뚜렷함을 관찰할 수 있었으며, 이는 주로 VSMCs의 증식억제에 의한 신생내막의 형성이 현저히 감소한 것임을 조직병리학적 소견에서 확인할 수 있었다. 본 연구에서 20분을 선택한 이유로는 VSMCs의 *in vitro* 증식실험에서 paclitaxel을 5분, 20분, 60분, 24시간을 각각 반응시켰을 때, 20분부터 대조군에 비해 ^{3}H - thymidine incorporation이 유의한 감소를 보였으며, 과거 본 연구진에 의해 *ex vivo*로 유전자를 경동맥에 이입할 때 20분간 반응시켜 성공적인 유전자전달(gene transfer)과 유전자치료를 하였다고 보고한 바 있으며,[23][24] 경동맥을 폐쇄하는 시간이 너무 길어지면 경동맥이 혈전 등으로 완전폐쇄가 일어나 추후 분석에 이용할 수가 없으며 큰 뇌경색이 발생할 수 있어 경과중에 사망할 수 있기 때문이다.

Axel 등[21]은 사람의 VSMCs와 내피세포를 같이 배

양한 후 paclitaxel을 20분 혹은 24시간 처치하면 VSMCs 성장이 2주까지 억제되나, 전기자극으로 내막을 손상시켜 경동맥 협착을 유발시킨 토끼모델에서 microporous balloon을 이용하여 paclitaxel을 국소주입하였을 때 신생내막의 면적, 두께 및 협착 정도의 감소하는 경향은 있으나 대조군에 비해 통계적인 유의한 차이는 없었다고 보고하였다. 본 연구의 실험결과와 비교해 볼 때, *in vitro* 결과는 동일하나 동물실험의 결과가 상치되는 것으로, 실험동물의 종이 다른 점, paclitaxel을 혈관에 전달하는 방법의 차이 및 재관류 시켰을 때 전달된 약물이 씻겨져 나가는 정도가 달라진 점등이 실험결과에 영향을 미칠 수 있으리라 생각된다. 최근 Assadnia 등[28]은 유전적배경이 다른 여러종류의 백서에서 본 실험과 같은 방법으로 장골동맥의 내피세포를 제거한 후 생성되는 신생내막의 형성정도는 자발성고혈압쥐, Sprague-Dawley rat, Fischer 344 rat, Brown-Norway rat등의 순이었다고 보고한 바가 있다. 스텐트에 paclitaxel을 직접[23] 혹은 biodegradable polymer[24]를 이용하여 입혀 국소전달한 연구와 paclitaxel의 microbead나 slow-release microsphere를 혈관내부가 아닌 외부(adventitia)로 투여하여 신생내막 생성을 억제시킬 수 있다는 예비보고들을 종합해 볼 때 PTCA후 재협착 방지에 paclitaxel이 국소약물요법으로 사용되어질 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

본 연구는 풍선으로 내피세포를 제거한 백서 경동맥 손상모델에서 paclitaxel의 국소요법이 전신 부작용을 최소화하며 효과적으로 신생내막의 형성을 억제하고 협착의 완화를 가져올 수 있다는 점을 입증하였다. 그러나, 임상에 적용되기에는 혈관벽 손상과 혈류를 제한하지 않고 혈관 벽에 필요한 양의 약물을 전달하는 장치의 개발과 치료효과를 얻기 위해 충분한 기간동안 투여한 약물이나 유전적 물질이 존재할 수 있는 전달방법의 개발 등이 문제점으로 남아 있으며, 정상혈관 부위에도 약물이 작용할 수 있으므로 혈관벽이 약화된다든지, 동맥류의 형성 혹은 혈관 재형성이 일어나는 등의 원하지 않는 일들이 발생할 수 있다. 또한 경동맥을 풍선으로 넓혀 내막을 제거하면 mitogen-activated protein kinase의 활성화에 의한 VSMCs의 증식이 일어난다고 알려져 있고, 여러 가지 cytokine도 증식에 관여한다고 보고되어 있어,[4] 앞으로 paclitaxel의 VSMCs 증식억제가 세포 내에서 어떠한 신호전달체계에 영향을 미쳐 일어나는지 혹은 apoptosis가 관여하는 지 등의 기전에 관한 규명은 병태생리를 조명하는 데 도움이 될 것이다. PTCA후 재협착을 방지하기 위해 관동맥내 방사선 조사요법이 현재 임상에서 이용되고 있으며,[29][30] paclitaxel은 세포주기중 G2나 M기의 정지를 가져오므로 paclitaxel 국소전달요법과 방사선조사를 병행하여 실시한다면 PTCA후 재협착 방지에 더 좋은 효과를 기대할 수 있겠다.

재협착은 VSMCs의 증식과 이동에 의해서만 발생하는 것은 아니며, PTCA후 50 70%의 환자는 재협착이 일어나지 않는다는 점, 죽상반 파열이나 혈관의 폐쇄는 대식세포와 지질이 많이 모여있는 부위에 잘 일어나며 VSMCs나 섬유조직이 많은 곳에서 잘 일어나지 않는다는 점, 국소 치료에 의하여 정상 VSMCs가 손상을 받아 혈관을 약하게 만들 우려가 있다는 점에서 paclitaxel을 이용한 부위특이적 치료가 희망적이지만은 않다. 그러나, 본 연구를 통해 paclitaxel은 VSMCs의 증식을 효과적으로 억제하였고 동물실험을 통해 경동맥의 내피세포를 제거한 후 신생내막의 형성에 paclitaxel이 억제효과가 있음이 확인되어 PTCA 시술시 재협착을 방지하기 위한 부위특이적 보조요법으로 임상에서 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

요 약

연구배경 :

경피적 관동맥성형술(PTCA)을 시술받은 30 50%의 환자에서 6개월내에 재협착이 발생되며, 그 기전의 하나로 VSMCs의 증식과 이동이 중요한 것으로 알려져 있다. 재협착을 방지하기 위한 국소약물요법은 부작용을 줄이며 고농도의 약물투여가 가능하며 PTCA 시술시 손쉽게 시행할 수 있다는 점에서 유리하다. Paclitaxel은 tubulin의 중합화(polymerization)를 유도하여 미세소관이 비정상적으로 과안정시켜 세포분열에 필요한 정상 미세소관의 역동을 파괴시키며, 지용성으로 세포막의 비수용성 장벽을 쉽게 통과할 수 있으므로 세포 내 흡수가 신속히 일어나며, 종양세포와 VSMCs를 이용한 in vitro 실험에서 단시간의 일회 처치로 장시간 지속되는 항증식효과가 있다.

재료 및 방법 :

본 연구는 VSMCs를 배양하여 *in vitro*에서 pacl-

itaxel의 농도와 처치시간에 따른 VSMCs의 증식억제 효과를 알아보고, 풍선으로 내피세포를 제거한 백서 경동맥 손상모델에서 적정농도의 paclitaxel을 단기간, 일회처치하는 국소요법이 신생내막의 형성과 혈관협착을 방지시킬 수 있는 지를 검증하기 위해 경동맥조영술과 조직병리학적 분석을 하였다.

결 과 :

1) 혈청을 제거한 배양액에 VSMCs를 PDGF-BB 자극하에 배양한 후 paclitaxel을 0.1, 1, 5, 10, 100 μmol/L의 농도로 20분간 처리한 후의 ^{3}H-thymidine incorporation은 대조군에 비하여 유의하게 감소를 보였고($p<0.005$), paclitaxel이 VSMCs의 증식을 농도의존적으로 억제하였다. PDGF-BB의 첨가없이 같은 실험을 반복한 경우, ^{3}H-thymidine incorporation은 0.1 μmol/L과 1.0 μmol/L의 경우에는 대조군에 비해 차이가 없었으나, 5, 10, 100 μmol/L의 농도에서는 감소를 보였다($p<0.0005$).

2) 경동맥의 내피세포를 제거한 2주 후 실시한 경동맥조영술상 0.1 μmol/L 혹은 1 μmol/L의 paclitaxel을 20분간 일회 처치한 치료군(n=12)의 경동맥의 내경(5.9±1.6 arbitrary unit)은 대조군(n=10)의 내경(4.3±1.4 arbitrary unit)에 비해 넓어져 있었으며($p<0.05$), 협착의 정도는 paclitaxel 치료군(31.9±11.9%)이 대조군(50.2±12.7%)에 비해 감소되었다($p<0.01$).

3) 조직병리학적 검사상 paclitaxel 치료군의 중막의 두께는 대조군과 비슷하였으나, 내막의 두께는 대조군(195.6±56.1 μm)에 비하여 치료군(118.8±23.5 μm)이 유의하게 감소하였고($p<0.001$), 내막의 면적도 치료군(0.25±0.08 mm^2)이 대조군(0.42±0.10 mm^2)에 비하여 감소하였다($p<0.005$). 또한 내막과 중막의 면적비는 대조군(1.58±0.50%)에 비하여 치료군(1.12±0.37%)이로 유의하게 작았으며($p<0.05$), 협착의 정도(% stenosis)도 대조군의 46.3±7.5%에 비하여 paclitaxel 치료군에서 32.2±9.8%로 신생내막의 형성이 30.4% 감소하였다($p<0.01$).

결 론 :

In vitro 실험을 통해 VSMCs의 증식을 효과적으로 억제시키는 paclitaxel의 농도를 구하였으며, 이 농도의 paclitaxel을 경동맥의 내피세포를 제거한 후 일회, 20분간 처치하면 VSMCs의 증식과 신생내막의 형성을 억제하여 결과적으로 경동맥의 협착을 방지하는 효과가 있었다. 이는 PTCA후 재협착 예방을 위한 국소약물요법에 paclitaxel을 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

중심 단어 : 경동맥 · 신생내막 · 협착 · Paclitaxel · 국소전달.

이 연구는(재)한곡의학 장학회 연구비의 지원으로 이루어졌음.

REFERENCES

1) Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. *Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. Circulation 1991;84:1426-36.*
2) Gruentzig AR, King SB Ⅲ, Schlumpf M, Siegenthaler W. *Long-term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty. N Engl J Med 1987;316:1127-32.*
3) Mientz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, *et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: A serial intravascular ultrasound study. Circulation 1996;94:35-43.*
4) Kagan SA, Myers SI. *Mediators of restenosis. Surg Clin North Am 1998;78:481-500.*
5) McBride W, Lange RA, Hillis LD. *Restenosis after successful coronary angioplasty: Pathophysiology and prevention. N Engl J Med 1988;318:1734-7.*
6) Califf RM, Fortin DF, Frid DJ, Harlan WR Ⅲ, Ohman EM, Bengtson JR, *et al. Restenosis after coronary angioplasty: An overview. J Am Coll Cardiol 1991;17:2B-13B.*
7) Schwartz SM, Reidy MA, O'Brien ERM. *Assessment of factors important in atherosclerotic occlusion and restenosis. Thromb Haemost 1995;74:541-51.*
8) Schwartz RS, Edwards WD, Huber KC, Antoniades LC, Bailey KR, Camrud AR, *et al. Coronary restenosis: Prospects for solution and new perspectives from a porcine model. Mayo Clin Proc 1993;68:54-62.*
9) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, *et al. A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 1994;331:489-95.*
10) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, *et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. N Engl J Med 1994;331:496-501.*
11) Baek SH, March KL. *Gene Therapy for Restenosis: Getting Nearer the Heart of the Matter. Circ Res 1998;82:295-305.*
12) Brieger D, Topol E. *Local drug delivery systems and prevention of restenosis. Cardiovasc Res 1997;35:405-13.*
13) Yla-Herttuala. *Vascular gene transfer. Curr Opin Lipidol 1997;8:72-6.*
14) Laitinen M, Yla-Herttuala S. *Adventitial gene transfer to arterial wall. Pharmacol Res 1998;37:251-4.*
15) Gelmon K. *The taxoids: Paclitaxel and docetaxel. Lancet 1994;344:1267-72.*
16) Rowinsky EK, Donehower RC. *Paclitaxel (Taxol). N Engl J Med 1995;332:1004-14.*

17) Sauro MD, Camporesi DA, Sudakow RL. *The anti-tumor agent, taxol, attenuates contractile activity in rat aortic smooth muscle. Life Sci 1995;56:157-61.*
18) Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. *Promotion of microtubule assembly in vitro by Taxol. Nature 1979;277:665-7.*
19) Schiff PB, Norwitz SB. *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77: 1561-5.*
20) Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M, *et al. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. J Clin Invest 1995;95:1869-76.*
21) Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, *et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. Circulation 1997;96:636-45.*
22) Heller PF. *Paclitaxel and arterial smooth muscle cell proliferation. Circulation 1998;97:1651.*
23) Heldman AW, Cheng L, Heller P, Jenkins M, Ware M, Nater C, *et al. Paclitaxel applied directly to stents inhibits neointimal growth without thrombotic complications in a porcine coronary artery model of restenosis. Circulation 1997;96:A1602.*
24) Farb A, Heller PF, Carter AJ, Cheng L, Min DH, Kolodgie FD, *et al. Paclitaxel polymer-coated stents reduce neointima. Circulation 1997;96:A3394.*
25) 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. The Korean Circulation Journal 1998;28: 977-89.*
26) Kim ST, Kim DW, Oh TG, Ahn HY, Kim YK. *Gene therapy using retroviral vector containing rat crythropoietin gene. The Korean Journal of Hematology 1997;32:22-31.*
27) Liu MW, Anderson PG, Luo JF, Roubin GS. *Local delivery of ethanol inhibits intimal hyperplasia in pig coronary arteries after balloon injury. Circulation 1997;96:2295-301.*
28) Assadnia S, Rapp JP, Nestor AL, Pringle T, Cerilli GJ, Gunning WT, *et al. Strain differences in neointimal hyperplasia in the rat. Cir res 1999;84:1252-7.*
29) King SB, Williams DO, Chougule P, Klein JL, Waksman R, Hilstead R, *et al. Endovascular beta-radiation to reduce restenosis after coronary balloon angioplasty: Results of the beta energy restenosis trial (BERT). Circulation 1998;97:2025-30.*
30) Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, *et al. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. N Engl J Med 1997; 336:1697-703.*