대한방사선의학회지 2003;48:391 - 399

토끼 뒷다리 만성허혈모델에서 phVEGF$_{165}$ 유전자 치료: 동맥내 주입과 근육내 주사의 비교[1]

곽병국 · 심형진 · 김건상 · 이종범 · 송인섭 · 문영호[2] · 김동환[2] · 김상욱[3] · 김진수[4] · 정진욱[5] · 박재형[5]

목적: 혈관신생의 기능이 있는 phVEGF$_{165}$를 합성하고, 토끼 뒷다리의 만성허혈모델에서 동맥내 주입과 근육내 주사를 통하여 혈관신생의 효과를 비교하고자 하였다.

대상과 방법: 토끼의 좌측 뒷다리에 만성허혈모델을 만들고, 대조군 6마리와 동맥내 주입군 7마리, 근육내 주사군 5마리로 나누었다. HL60 세포주로부터 혈관내피세포성장인자(VEGF)를 발현하는 phVEGF$_{165}$를 제조하여, CHO 세포주에 유전자 전달감염시켜 western blot 분석을 하고, CPAE 세포주에 대한 증식효과를 분석하였다. 만성허혈모델을 만든 2주째에 phVEGF$_{165}$ 500 μg/2.5 ml를 동맥내 주입군은 좌측 총장골동맥으로, 근육내 주사군은 대퇴부 근육내 주사하였다. 유전자 주입 전과 주입 후 4주째에 혈관조영영상을 얻었다. 영상분석은 대퇴골의 수직이등분선과 만나는 혈관의 개수의 비를 구하였다. 유전자 주입 후 0, 4, 7, 14, 21일에 혈청 VEGF$_{165}$ 양을 측정하였다. 통계분석은 Wilcoxon signed rank test로 하였다.

결과: 유전자가 전달감염된 CHO 세포주의 배양배지에서 VEGF$_{165}$ 단백질 발현이 확인되었다. CPAE 세포주의 증식실험에서 흡광도가 대조군은 0.73±0.043, phVEGF$_{165}$은 1.09±0.015를 보여 증식효과가 있었다. 토끼 뒷다리 만성허혈모델에서 유전자 치료 전후에 혈관 수의 변화가 대조군은 1.32±0.13과 1.30±0.07, 동맥내 주입군은 1.42±0.15와 1.59±0.09, 근육내 주사군은 1.59±0.27과 1.14±0.12를 보였으나, $p > 0.05$로서 유전자 치료전후에 두군 모두 통계적인 유의성은 없었다. 혈청내 VEGF는 동맥내 주입군에서는 유전자 주입 전 39.96±1.08 pg/ml, 4일째 44.99±2.13 pg/ml, 1 주 째 48.18±1.49 pg/ml, 2주째 45.70±3.77 pg/ml, 3주째 46.54±5.47 pg/ml로 증가를 보였다. 대조군과 근육내 주사군에서는 증가가 관찰되지 않았다.

결론: 제작된 phVEGF$_{165}$가 실험실내에서 혈관내피세포의 증식에 효과가 있었다. 토끼 뒷다리 만성허혈모델에서 phVEGF$_{165}$ 유전자 치료는 동맥내 주입과 근육내 주사 간에 혈관조영술과 혈청 VEGF 측정의 결과에서 차이가 없었다.

하지 원위부의 말초혈관 질환으로 인한 만성 허혈성 하지 질환을 앓고 있는 많은 환자들이 하지절단술을 받거나 통증으로 고생하고 있다. 중증의 허혈성 하지질환에서 일차적으로 선택할 수 있는 약물치료법은 아직 없으며, 이들 환자를 대상으로 수술적 혈관 재개통이나 경피적 풍선혈관성형술이나 스텐트 삽입술을 고려할 수는 있지만, 불행하게도 많은 환자들은 이런 치료법의 대상이 되지 못하고 있는 실정이다(1). 현재 이러한 환자들은 혈관을 확장시키기 위한 교감신경 차단술을 받거나, 약물로는 프로스타글란딘 E1과 같은 혈관확장과 항혈소판 작용에 의한 치료 효과를 기대하고 있으나 근원적인 치료가 되지 못하여 환자들은 사지 절단술을 받게 된다(2, 3). 따라서, 이러한 만성 허혈성 하지 질환에서 신생혈관 생성을 유도하는 치료는 환자의 질환에 대한 근원적인 치료가 될 것으로 기대되며, 대상 질환으로는 버거씨 병, 동맥경화증, 당뇨병성 족부궤양 등이 있다.

혈관내피세포 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)는 혈관내피세포에만 특이성을 갖는 혈관내피세포 분열촉진물질(mitogen)이다. VEGF는 1989년에 동정되었고, 태생기에는 혈관형성(vasculogenesis)에 관여하며, 성인에서는 허혈성 질환, 상처치유 및 여성의 생산기능 등과 관련

[1]중앙대학교 의과대학 방사선과학교실 심혈관센터
[2](주)제노텍
[3]중앙대학교 의과대학 내과학교실
[4]광명성애병원 성형외과
[5]서울대학교 의과대학 진단방사선과학교실
이 논문은 2000년도 게르베방사선의학연구기금의 지원을 받은 것임.
이 논문은 2001년 11월 11일 접수하여 2003년 4월 10일에 채택되었음.

있는 것으로 알려져 있으며, 또한 종양과 같은 질환 시에 종양세포의 영양공급과 성장을 위해 종양세포에서 형성되는 단백질이다. VEGF는 34 - 45 kDa의 염기성, 헤파린 결합성, 동종이합체 당단백질이다. mRNA의 재조합에 의해 크기가 다른 5가지 단백질(VEGF$_{121, 145, 165, 189, 201}$)이 만들어지며, 이중에서 VEGF$_{165}$가 혈관내피세포 성장에 가장 강력한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(4 - 13).

VEGF를 단백질 혹은 유전자의 형태로 허혈성 질환에 사용하여 혈관신생(angiogenesis) 작용이 있음이 확인되었으며(14 - 16), 현재 임상 실험까지 진행 중에 있다(17 - 19). VEGF를 비롯한 허혈성 질환에 대한 유전자를 주입하는 방법으로는 여러 가지 기구를 이용한 혈관내벽에 유전자 치료와 근육내 주사하는 방법으로 시행하고 있다(15, 16, 18, 19). 동맥을 통한 유전자의 직접 주입에 관하여는 악성종양 모델에서 적은 수에서 실험적으로 시행되어왔고 직접 주입하는 것보다 효율성이 높다는 보고들이 있다(20, 21). 또한 정보제공유전자(reporter gene)를 이용한 다른 연구에서 플라스미드 DNA가 동맥을 통하여 많은 양을 빠르게 주입될 때, 혹은, 혈류를 차단하고 주입될 때, 골격근에 충분한 양이 발현됨을 보고하였다(22 - 24). 그러나 허혈성 질환에서 동맥을 통한 VEGF를 비롯한 혈관신생을 유도하는 유전자의 직접 주입에 대해서는 연구되어 있지 않다.

본 연구의 목적은 첫째로, 전골수세포백혈병(promyelocytic leukemia) 세포주인 HL60으로부터 사람의 VEGF$_{165}$ cDNA를 얻어서, 이것이 CMV(cytomegalovirus) 촉진자(promoter)하에서 발현되도록 플라스미드 DNA를 합성하고, CHO(chinese hamster ovary) 세포주를 이용한 VEGF$_{165}$의 발현을 확인하고, 만들어진 VEGF$_{165}$가 혈관내피세포 증식에 효과가 있는 가를 실험실내에서 확인하는 것이다. 둘째로, 생체내 실험으로서 토끼 뒷다리를 이용하여 만성허혈모델을 만들고, phVEGF$_{165}$가 혈관신생의 효과가 있는 가를 알아보기 위하여, 대조군과 함께 기존의 주입 방법인 근육내로 주사하는 방법과 새롭게 알고자 하는 동맥내로 주입하는 방법으로 유전자를 전달하고, 혈관조영술로 혈관의 신생을 확인하고 ELISA 방법으로 혈청 VEGF의 농도를 측정하여 치료효과를 비교하는데 있다.

대상과 방법

대상

토끼 뒷다리 만성허혈모델의 제작

Hong 등(25)이 만든 것과 같은 방법으로 토끼의 뒷다리를 이용하여 모델을 만들었다. 21마리의 수컷 New Zealand White 토끼(3.0 - 4.5 kg)를 케타라®(ketamine hydrochloride, 유한, 서울, 한국) 35 mg/kg와 럼푼®(xylazine hydrochloride, 바이엘코리아, 서울, 한국) 5 mg/kg을 근육 주사하여 마취시켰다. 이 때 1마리가 마취와 관련하여 사망하였다. 나머지 20마리를 좌측 서혜 인대에서 슬개골 직상부까지 대퇴부 내측의 대퇴동정맥 구(groove)를 길게 절개하였다. 대퇴동맥을 따라 가며 분지들인 하복벽 동맥, 심대퇴 동맥, 좌측회선 동맥, 천복벽 동맥들을 묶고 분리하였다. 아래쪽으로 슬와 동맥과 복제 동맥을 묶고 분리하였다. 서혜 인대 직상부의 외장골 동맥을 묶은 다음에 전체 대퇴 동맥을 대퇴부에서 적출하여 허혈 모델을 만들었다(25, 26)(Fig. 1). 이후 3일 동안 세프테졸나트륨®(Ceftezole - Na, 신풍, 서울, 한국)을 100 mg/kg로 1회 근육주사하였다. 따로 진통제는 사용하지 않았다.

실험군

준비된 모델 20마리 중에 2마리는 유전자를 주입하기 전 혈관조영술 과정에서 사망하였다. 따라서 18마리를 대조군으로 6마리(평균 무게 3.2 kg, 범위 2.9 - 3.5 kg)와 동맥내 주입 군 7마리(평균 무게 3.6 kg, 범위 3.2 - 4.3 kg), 그리고 근육내 주사군 5마리(평균 무게 3.5 kg, 범위 3.2 - 4.5 kg)로 나누었다.

방법

VEGF165 발현 벡터의 제작

전골수세포백혈병(Promyelocytic leukemia) 세포주인 HL60(한국세포주은행, 서울, 한국)으로부터 Trizol(Gibco, MD, U.S.A.)을 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 형판으로 하여 역전사효소로 cDNA를 합성하고, 이를 다시 시동체(primer)로 VEGF5Bg(5 ' - GAAGATCTAT - GAACTTTCTGCTGTCTTGG - 3 ')와 VEGF3E(5 ' - GGAATTCTCACCGCCTCGGCTTGTCACA - 3 ')를 사용하여 중합효소연쇄반응으로 VEGF 유전자를 증폭하고, 증폭된 DNA 절편을 아가로오즈 겔에서 전기영동을 수행한 후, VEGF$_{165}$ 크기에 해당하는 DNA 절편을 오려 클로닝 벡터(pRIP, 바이오니아, 한국)에 클로닝하였다. 클로닝된 DNA 절편을 염기서열을 분석하여 VEGF$_{165}$ 유전자를 확인하였다.

VEGF$_{165}$ 유전자를 CMV(cytomegalovirus) 촉진자(promoter)하에 발현시키기 위하여 클로닝된 pRIP를 *Bgl*II와 *Eco*RI으로 이중절단하고, 역시 *Bgl*II와 *Eco*RI으로 이중절단된 pEGFP - N1(Clontech, CA, U.S.A.)에 삽입하여 사람의 VEGF$_{165}$ 발현벡터(phVEGF$_{165}$)를 완성하였다(Fig. 2).

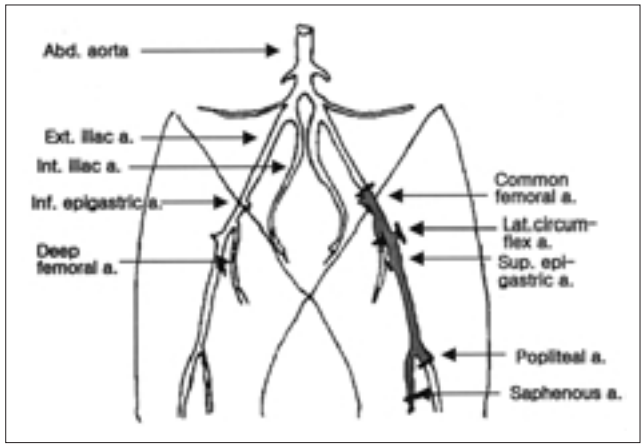

Fig. 1. Schematic drawing of surgical operation of chronic ischemic model of rabbit hindlimb. Shaded femoral artery was ligated and excised.

$VEGF_{165}$ 발현 벡터의 활성 검정

제작한 $phVEGF_{165}$와 대조군으로 pEGFP - N1을 Chinese hamster ovary 세포주(CHO, 한국세포주은행, 서울, 한국)에 유전자 전달감염(transfection) 시켰다. 먼저 lipofectamine (Gibco, MD, U.S.A.)을 이용하여, 유전자 전달감염 하기 24시간 전에 CHO 세포주를 6 - well plate에 9개의 well에 well당 3×10^5개씩 분주하였다. 다음날 각 $phVEGF_{165}$, pEGFP - N1 2 μg과 lipofectamine 4 μℓ를 혈청과 항생물질이 포함되지 않은 배지 200 μℓ와 섞어서 45분간 실온에 방치하였다. 이것을 각각 배양하고 있는 CHO 세포주 배지 각 3개씩에 넣고, 전체 부피가 1 ml 되도록 배지를 첨가한 후, 5시간 동안 37 ℃에서 CO_2 배양기에 두었다. 그 후에 배지를 버리고 새로운 배지로 갈아주었다. 48시간 후에 세포 및 배양배지를 회수하여 다음 실험에 사용하였다. pEGFP - N1과 $phVEGF_{165}$가 도입된 CHO 세포로부터 $VEGF_{165}$ 단백질의 발현 정도를 알아보기 위하여, 세포 및 배양배지로부터 단백질을 분리하여 다음과 같이 western blot 분석을 실시하였다. 전체 단백질 30 μg을 비환원형(nonreducing)과 beta - mercaptoethanol를 넣은 환원형(reducing) 조건에서 SDS - PAGE로 분획하고, PVDF 막(membrane) (Amersham, NJ, U.S.A.)으로 이동시킨 후, 일차항체로 마우스단일클론항체인 anti - VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)를 이용하여 4 ℃에서 15시간 반응을 시켰다. 이차항체는 Goat Anti - Mouse IgG를 사용하였고, 항원항체 반응은 ECL (Enhanced Chemiluminescence Luminogram reagents) 방법(Amersham, NJ, U.S.A.)을 이용하였다. 음성 대조 실험으로서 일차항체 없이 반응을 시행하였다.

$VEGF_{165}$의 혈관내피세포 증식실험

CPAE (calf pulmonary artery endothelial cell) (ATCC, VA, U.S.A.) 세포주를 20% FBS가 포함된 RPMI 배지(Gibco, MD, U.S.A.)에서 배양하였다. 먼저 96 - well plate에 CPAE 세포를 1×10^4씩 분주한 후, 상기의 배양액, 즉 상기의 pEGFP - N1과 $phVEGF_{165}$가 도입된 CHO 세포로부터 VEGF가 발현된 배양윗물(culture supernatant)을 각각 3 개의 well에 첨가하여 5일간 더 배양하였다. 세포증식분석은 CellTiter 96™ Non - Radioactive Cell Proliferation Assay kit(Promega, Madison, U.S.A.)을 사용하여 측정하였다. 먼저 VEGF가 함유된 세포배양액을 처리한 각각의 96 - well에 15 μℓ dye solution(3 - (4, 5 - dimethylthiaxol - 2yl) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide, MTT)을 첨가하여 37 ℃에서 CO_2 배양기에 4시간 동안 처리한 후, stop solution을 100 μℓ씩 첨가하고, 1시간 동안 37 ℃에 방치하였다. 96 - well plate를 ELISA reader로 옮긴 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

플라스미드 DNA 대량 분리

먼저 $VEGF_{165}$ 발현벡터가 도입된 *E. coli* 균주를 2.5 ℓ 정도 하룻밤 배양하여 균체를 원심분리하여 획득하였다. 획득한 균주를 Endo - Free Plasmid Giga Kit (Qiagen, CA, U.S.A.)를 이용하여 내독소가 제거된 플라스미드 DNA를 대량 분리하였다.

유전자 전달(gene transfer)

허혈 모델을 만든 후, 자체적인 측부 혈관이 충분히 발생되었다고 생각되는 2주 후에 $phVEGF_{165}$ 유전자를 주입하였다. 준비된 모델 20마리 중에 2마리는 유전자를 주입하기 전 혈관조영술 과정에서 사망하였다. 따라서 18마리 중 대조군(6마리)에 대하여는 혈관조영술만 시행하였으며, 동맥내 주입 군(7마리)은 혈관조영술 후, 좌측총경동맥으로 삽입된 4 F Cobra 도관(Terumo, Tokyo, Japan)으로 수술한 쪽의 총장골동맥(common iliac artery)을 선택하여 $phVEGF_{165}$ 유전자를 500 μg(2.5 ml)을 1회 주입하였다. 근육내 주사군(5마리)은 혈관조영술 후, $phVEGF_{165}$ 유전자 500 μg(2.5 ml)을 1회 3등분하여 대퇴부의 안쪽넓은근(vastus medialis muscle)에 두 군데와 모음근(adductor muscle) 한 군데에 26 G 투베르쿨린 주사기로 근육내 주사하였다.

평가 및 분석

혈관조영술

허혈 모델을 만든 후 2주째에 유전자 주입할 때와 효과 분석을 위해 6주째(유전자 주입 후 4주째)에 혈관조영술을 시행하였다(14 - 16). 토끼를 마취한 후 목의 복측을 절개하여 좌측 총경동맥을 통해 4 F Cobra 도관을 Seldinger 기술로 복부 대동맥이 이분되는 상부 1 - 3 cm 까지 삽입하였다. Visipaque

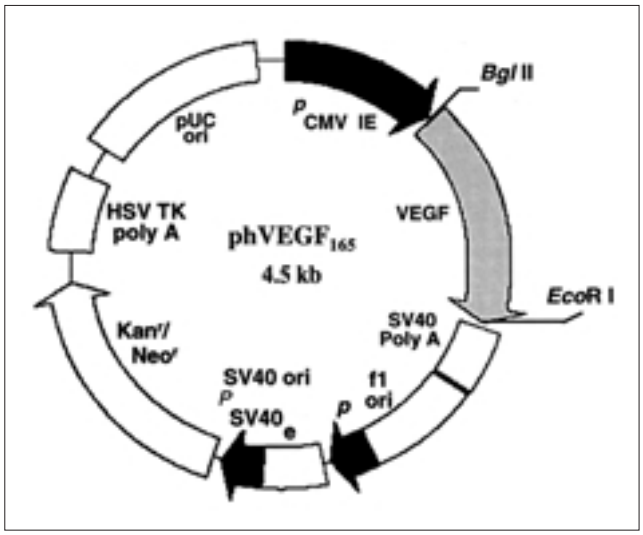

Fig. 2. Construction of plasmid ($phVEGF_{165}$) expressing vascular endothelial growth factor (VEGF). Abbreviations: *Bgl*II, *Eco*RI, restriction endonucleases; ^{P}CMV IE, human cytomegalovirus immediate early promoter; SV40 polyA, SV40 early mRNA polyadenylation signal; f1 ori, f1 single-strand DNA origin; SV40 ori, SV40 origin of replication; $^PSV40_e$, SV40 early promoter; Kan^r/Neo^r, kanamycin/neomycin resistance gene; HSV TK polyA, herpes simplex virus thymidine kinase polyadenylation signal; pUC ori, pUC plasmid replication origin.

®(Iodixanol 320 mgI/ml, Nycomed, Oslo, Norway) 8 ml를 초당 3 ml의 속도로 손으로 주입하며 1 초당 1장씩 12초 동안 양측 뒷다리의 혈관 조영 사진을 찍었다. 사용한 장비는 Shimadzu - 3200 (Shimadzu, Kyoto, Japan)이었다. 효과 판정은 혈관조영술로 얻은 혈관 조영 사진 중에서 조영제 주입 후 4 - 5초 사진 중 대퇴부 혈관이 가장 현저하게 나타난 사진을 이용하였다. 좌측 수술한 부위에 대퇴 동맥 전체가 없는 것을 확인하고, 양쪽 대퇴골의 골두(head)와 골과(condyle)의 연결선을 그어 절반 되는 점에서 수직선을 그어 수직선과 만나는 혈관의 개수 세었다. 2명의 방사선과 의사가 각각 세어 평균을 내었고, 정상인 우측에 대한 좌측의 비를 구하였다(25).

ELISA에 의한 혈중 VEGF$_{165}$ 측정

토끼 혈청에서 VEGF$_{165}$ 단백질 양을 측정하기 위하여 모델을 만든 날과 phVEGF$_{165}$ 유전자 주입 후 0, 4, 7, 14, 21일에 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 4 ℃에서 3600 rpm으로 원심분리한 후 혈청을 - 70 ℃에 보관하여, immunoassay system (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.)을 이용하여 혈청 VEGF$_{165}$ 양을 측정하였다. 효과 판정에 포함된 개체 수는 혈청을 얻을 수 있었던, 대조군 4마리, 동맥내 주입 군 6마리, 근육내 주사군 3마리에서만 분석하였다. 그러나 각 군의 개체의 수가 적어서 통계학적 검정은 하지 않았다.

통계학적 분석

모든 자료들은 mean±standard error로 표현하였다. 통계분석은 비모수적방법으로 Wilcoxon signed rank test를 이용하였고, 0.05이하를 유의수준으로 하였다. 두 명의 방사선과 의사가 판독한 혈관수의 변화의 비를 Spearman의 상관계수를 이용하여 일치도를 분석하였다.

결 과

VEGF$_{165}$ 발현 벡터의 염기서열분석 및 전기영동

HL60 세포주로부터 역전사와 중합효소연쇄반응을 이용하여 VEGF$_{165}$ cDNA를 얻고, 염기서열을 분석하여 확인하였다. 또한 phVEGF$_{165}$를 제한효소 *Bgl*II와 *Eco*RI으로 이중절단하여 아가로오즈 겔에서 전기영동한 결과, 발현벡터가 정확하게 제조된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

VEGF$_{165}$ 발현 벡터의 시험관내실험 효과분석

Western blot

phVEGF$_{165}$ 유전자가 전달감염된 CHO 세포주의 배양배지의 western blot에서 VEGF$_{165}$ 단백질이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 4). pEGFP - N1로 유전자 전달된 배지에서는 VEGF의 발현이 없었다. 또한 일차항체 없이 반응을 시행한 음성 대조실험에서도 VEGF의 발현이 없었다.

CPAE 세포 증식 분석

pEGFP - N1과 phVEGF$_{165}$로 전달감염된 CHO 세포의 배양윗물(culture supernatant)을 이용한 CPAE 세포주의 증식 실험에서 pEGFP - N1로 유전자도입 시킨 대조군은 흡광도가 0.73±0.043, phVEGF$_{165}$는 1.09±0.015를 보였다. 대조군을 100%로 하였을 때, VEGF$_{165}$ 발현벡터가 149%의 CPAE 세

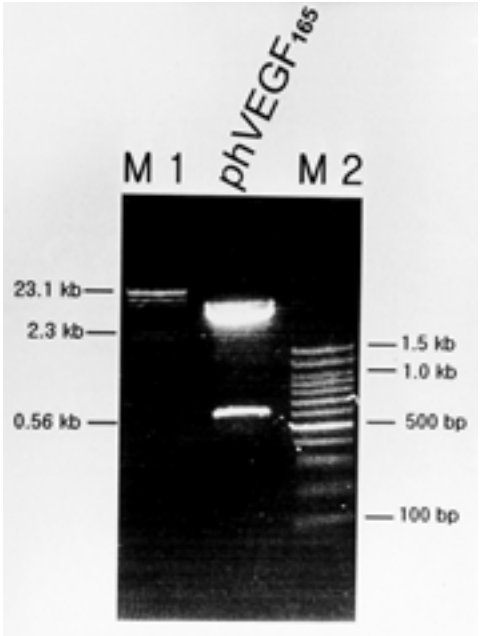

Fig. 3. Agarose gel eletrophoresis of VEGF$_{165}$ gene. phVEGF$_{165}$ was treated with restriction endonucleases (*Bgl*II and *Eco*RI). Two bands from restricted phVEGF$_{165}$ are visualized. M1 and M2 are markers for DNA size.

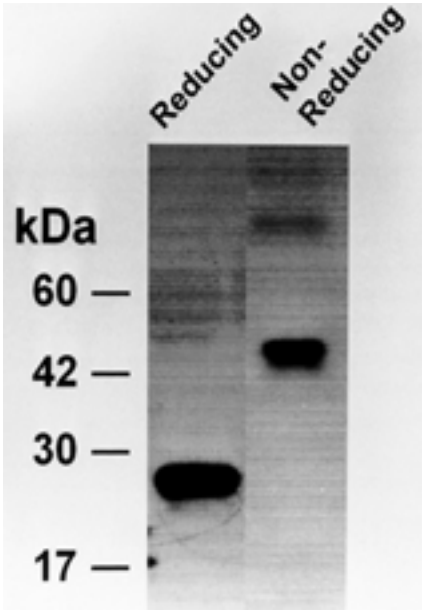

Fig. 4. Western blot of VEGF$_{165}$. Chinese hamster ovary (CHO) cells have been transfected with phVEGF$_{165}$. VEGF$_{165}$ is expressed at the culture medium of CHO cells in reducing and non-reducing forms.

포 증식 효과를 보였다(Fig. 5).

토끼 뒷다리 허혈 모델에서 phVEGF$_{165}$ 유전자 치료 효과

혈관조영술

유전자 주입과 관련된 토끼의 사망은 없었다. 토끼 뒷다리 만성허혈모델에서 좌측에 모델을 만든 후 2주 때에 대조군 6마리에서 우측에 대한 좌측의 혈관의 수의 변화는 평균 1.32±0.13이었으며, 모델 만든 후 6주 때에는 1.30±0.07을 보였다. 동맥내 주입 7마리 경우는 평균값이 모델 만든 후 2주에 1.42±0.15, 모델 만든 후 6주(유전자 주입 후 4 주)에 1.59±0.09, 근육내 주입 군 5마리에서는 평균값이 모델 만든 후 2 주에 1.59±0.27, 모델 만든 후 6주(유전자 주입 후 4주)에 1.14±0.12이었다(Table 1, Fig. 6). Wilcoxon signed rank test에서 $p > 0.05$으로서 유의한 차이를 보이지 않았다. 두 명의 방사선과 의사 간의 일치도는 상관계수가 0.623로 의미 있었다($p < 0.01$).

ELISA

대조군 4마리에서 만성허혈모델 제작으로 인하여 발생한 다리의 허혈로 인한 혈청내 VEGF의 증가는 없었다. 동맥내 주입군 6마리에서는 유전자 주입 전 혈청내 VEGF의 농도의 평균값이 39.96±1.08 pg/ml, 4일 째 44.99±2.13 pg/ml, 1 주 째 48.18±1.49 pg/ml, 2주 째 45.70±3.77 pg/ml, 3주째

Table 1. Ratio of Number of Vessels in the Chronic Ischemic Limb to the Contralateral Normal Limb of Rabbit in Each Group of Control, Intra-arterial and Intramuscular Administrations

	Control group (n=6)	I.A. group (n=7)	I.M. group (n=5)
Pre-gene therapy (L/R ratio)	1.32±0.13	1.42±0.15	1.59±0.27
Post-gene therapy (L/R ratio)	1.30±0.07	1.59±0.09	1.14±0.12

* Data are the mean±standard error. I.A. = intra-arterial, I.M. = intramuscular.

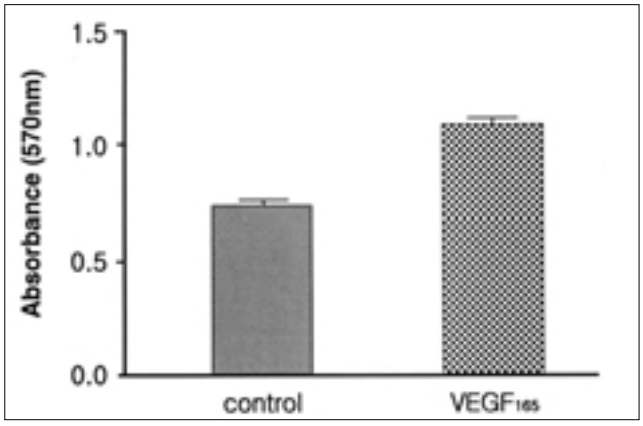

Fig. 5. Cell proliferation assay. Calf pulmonary artery endothelial (CPAE) cells have been cultured at the medium containing VEGF$_{165}$. CPAE cells are more proliferated in VEGF$_{165}$ groups than in control group.

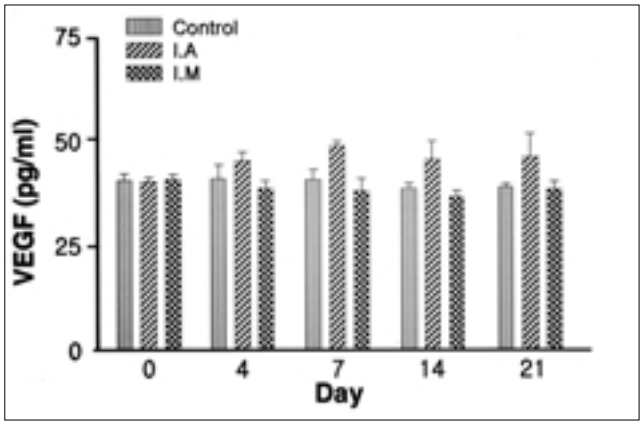

Fig. 7. ELISA of serum VEGF. No demonstrable increase of VEGF in control and intramuscular groups. The intra-arterial group shows increase of VEGF, but not statistically proven.

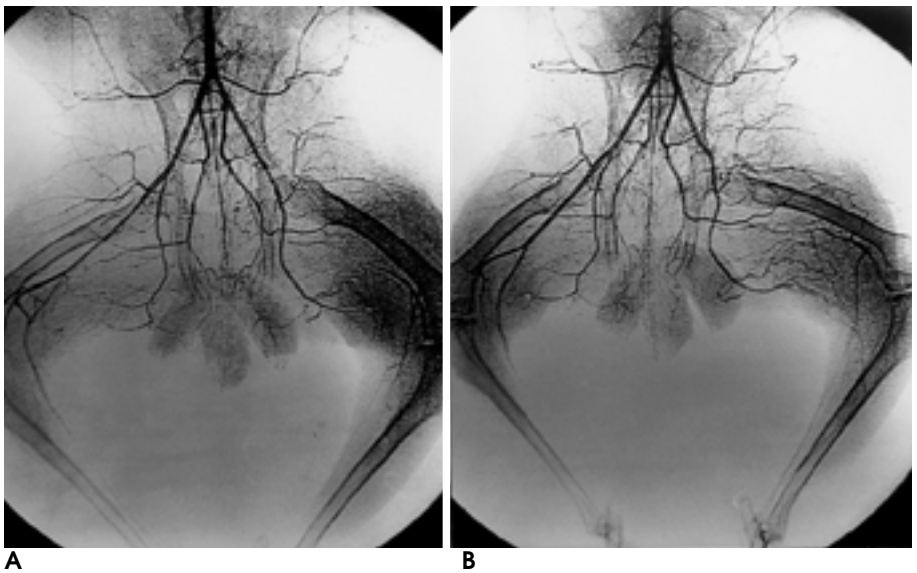

Fig. 6. Angiographic evaluation after intra-arterial gene therapy of phVEGF$_{165}$ on chronic ischemic disease model of rabbit.
A. Angiography(pre-gene therapy) at 2 weeks after making the model at left thigh.
B. Angiographic finding of same rabbit at 4 weeks after intra-arterial administration of phVEGF$_{165}$. Collateral vessels are increased in number at left thigh after gene therapy.

46.54±5.47 pg/ml를 보여 4일 째부터 3주까지 평균값의 10% 이상증가를 보였다. 근육내 주사군 3마리에서는 혈중 VEGF의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 7).

고 찰

만성 허혈성 하지 질환으로 인하여 하지절단술을 받아야 하는 환자의 비율이 경피적 풍선혈관성형술이나 스텐트 삽입술과 같은 중재방사선학적 치료에 의하여 줄어든 것은 사실이다(2, 3). 그러나 하지 말초 혈관의 만성 허혈성 하지 질환의 경우에 혈관수술이나 중재방사선학적 치료로 문제를 해결할 수 없고, 약물요법도 큰 도움을 주지 못한다(1). 따라서 혈관신생을 유도하는 치료법의 도입이 절실히 필요한 형편이다.

1994년에, Takeshita 등은 VEGF$_{165}$를 단백질 형태로 토끼 허혈모델에 동맥내로 주입하여 뒷다리의 관류와 측부혈관의 개수가 증가되는 것을 관찰하였다(14). 그 후 유전자 형태로 수화겔 중합체가 코팅되어 있는 혈관성형술 풍선카테터(15, 16)나 주입-관류 카테터(19)를 이용하여 동맥내로 접근하여 혈관 벽에 도입시켜 측부혈관의 발달과 혈압과 혈류의 상승, 모세혈관의 증가를 확인한 바 있다. 그러나 이러한 방법들은 사용하는 혈관성형술 풍선카테터나 주입-관류 카테터 혹은 구멍 카테터들은 그 자체로 혈관 벽에 손상을 주며, 또한 만성 허혈성 하지 질환의 병변이 말초인 것을 생각할 때, 큰 도움을 주지 못하였다.

그 후, phVEGF$_{165}$ 유전자의 근육내 주사하는 방법에 관한 많은 연구가 토끼를 이용한 모델과 임상에서 시도되었다(18). 이 경우 유전자의 근육 세포내 도입과 발현은 극히 적어 1% 정도로 보고하고 있다(15, 16). 이것은 극히 적은 발현이라고 생각되는데, 다른 유전자 치료 질환과 다르게 만성 허혈성 하지 질환의 경우 적은 유전자 발현에도 불구하고, 적은 양의 VEGF로도 치료 효과가 있는 것으로 해석하고 있다(15, 22, 27, 28).

방사선 영상과 중재적 시술은 유전자의 체내 전달에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다(29). 초음파나 CT 영상 유도하에 원하는 부위에 정확하게 유전자를 주입할 수 있으며, 주입 후 다시 조직을 생검하여 주입된 유전자의 발현을 확인할 수 있다. 또한 혈관조영술 유도를 이용하면 병변의 영양 공급 혈관에 정확하게 위치 선정 할 수 있는 장점이 있다. 동맥내로 주입은 주입된 유전자가 폐순환과 간 등의 세망내피계에서 소실되는 것을 막을 수 있는 장점이 있으며, 다른 여러 기구를 사용할 수 있는 장점이 있다. 풍선카테터 등으로 일시적으로 혈류를 차단시켜 유전자와 원하는 혈관의 접촉시간을 늘릴 수 있으며, 혈관성형술 풍선카테터나 주입-관류 카테터 혹은 구멍 카테터 등과 같은 특수 카테터를 이용할 수도 있다. 또한 색전물질을 같이 사용할 경우 세포와 접촉 시간을 길게 하여 유전자 도입율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

유전자 치료에서 유전자의 인체 내 전달 경로는 여러 가지가 있으며, 질환에 따라 가장 적당한 주입 경로를 찾는 것은 일반적으로 유전자 치료의 발현 효율이 낮은 것을 생각할 때 중요한 부분을 차지한다(29). 하지의 골격근에 공급하고 있는 혈관은 모세혈관의 내피세포가 연속적이고 창이 없는 형태로서 특히 입자가 큰 물질에 대하여는 투과성이 낮다(30). 또한 혈관내로 주입된 플라스미드는 변성되어 효과를 기대하기 힘든 것이 사실이다. 그럼에도 아데노바이러스나 양이온 지질-DNA 복합체(cationic lipid-DNA complex)를 간혈관내로 주입했을 때, 주로 혈관내피세포와 굴모양혈관(sinusoid)을 통과하여 간세포에 발현된 것을 보고하고 있다(31). 동맥을 통한 유전자 치료에 대해서는 악성종양 모델에서 적은 수에서 실험적으로 시행되어 왔으나 직접 주입하는 것보다 효율성이 높다는 보고들이 있다(20, 21). 정보제공유전자(reporter gene)를 이용한 다른 연구에서 플라스미드 DNA가 동맥을 통하여 많은 양을 빠르게 주입될 때, 혹은, 혈류를 차단하고 주입될 때, 골격근에 충분한 양이 발현됨을 보고하였다(22-24). 또한 혈관조영술 유도하에서 동맥을 통한 유전자 주입은 여러 가지 장점을 가지고 있다. 유전자를 대상 질환이나 조직에 정확하고 높은 특이성으로 주입할 수 있다. 정맥을 통한 전신으로 주입하는 경우는 유전자가 폐순환과 체순환을 하며 주입한 많은 양의 유전자의 손실을 가져온다. 반면에, 허혈 상태에 있는 조직의 혈관은 일반 상태보다 혈관투과성이 현저히 증가되어 있기 때문에 동맥을 통해 주입된 유전자는 주입된 혈관의 내피 세포 뿐 아니라 간질조직으로 빠져나가 그곳의 세포 내로 들어갈 기회가 높아질 것으로 생각된다(29). 실제 사람의 하지의 허혈성 질환은 국소적이지 않은 경우가 대부분이며, 이 경우 근육내 주사로는 극히 국소적인 주입만 가능하고 하지의 넓은 영역에 주입하는 것은 불가능하다. 반면에, 목표 기관이나 조직의 공급 혈관으로 주입할 경우 질환 장기나 조직에 전체적인 접근을 기대할 수 있겠다.

그러나 동맥을 통한 유전자 주입으로 하지 허혈에 대한 치료에 대한 보고된 바 없으며, 근육을 통한 국소 주입 방법이 많이 연구되어 왔다(17, 18). Tsurumi 등은 근육 주사 후 30일째에 결과 분석에서 대조군에 비하여 유전자 치료의 혈관조영영상점수의 의미 있는 증가를 보고하였다(27). 다른 연구 논문이 혈관조영영상점수를 허혈을 만든 한 쪽 다리에서 분석하였으나 본 연구에서는 토끼 각 개체의 변이를 보상해 주고자 정상 다리와의 비를 분석하였으므로 다른 결과와 비교할 수 없다. 그러나 결과적으로는 근육 주사를 시행한 군에서는 대조군과 같았으며, 본 연구에서 혈중 VEGF의 농도와 뒷다리에서 혈관의 개수가 동맥으로 주입한 경우 평균치의 증가를 보였다. 그러나 통계학적인 검증이 되지 않았고, 앞으로 정보제공유전자를 이용하여 동맥내 주입에 대한 연구를 더 해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

본 실험 결과에서는 근육내 주사로 인한 치료 효과를 혈관의 개수를 세는 방법과 혈중 VEGF 농도의 ELISA 방법 모두에서 VEGF 유전자 발현의 증거를 찾지 못했다. 본 연구에서 근육내 주입이 다른 비슷한 연구 결과와는 달리 VEGF의 혈중 농도나 혈관의 개수로 볼 때, 대조군과 차이를 보이지 않았다. 이것은 본 연구에서 사용한 유전자의 양이 적거나, 동물 개체의 변이, 정확한 근육내 주입이 이루어지지 못하였을 가능성을

원인으로 생각해 볼 수 있겠다.

토끼 뒷다리를 이용한 만성 허혈 모델은 이미 많은 연구자들이 혈관 신생을 유도하는 여러 가지 치료 방법의 효과 분석을 위하여 사용되어 왔다. 본 실험에서 이용한 토끼의 뒷다리 허혈 모델은 수술 후 10일까지 허혈상태에 대한 자체적인 측부순환과 신생혈관을 형성한다고 알려져 있다(25, 26). 따라서 본 연구에서는 허혈 모델의 자체적인 측부혈관이 충분히 형성된 2주가 지난 후에 유전자 치료에 이용하였다. 또한, 유전자 주입 후 4주째에 효과 분석을 위한 혈관조영술을 시행한 이유는 다른 연구에서 주입된 유전자의 발현이 3일에서 2주 사이에 현저하였고, 30일에 효과 분석을 위한 혈관조영술을 시행하였기 때문이다(27).

본 연구의 제한점으로는 실험실내 실험과 토끼를 이용한 생체 실험의 개체수가 적어 통계학적인 검증이 어려웠고, 또한 혈관신생의 판정 방법에서 여러 가지 문제점들이 있는데, VEGF의 발현을 세포단위에서 확인하지 못하였으며, 혈관조영영상에서 혈관의 개수 비교가 혈관신생 정도를 얼마나 반영할 수 있는가 하는 점 등이 있다. 또 유전자 치료의 경우 실험실 내 실험에서 얻은 좋은 결과도 동물이나 사람의 개체 변이가 심하여, 일정한 결과를 얻기 힘들다는 점이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 정보제공유전자를 이용한 반복실험이 필요하리라 생각된다. 또한 VEGF가 혈소판에서 분비될 수 있는 것을 고려할 때, 혈청을 이용한 ELISA 실험 결과의 영향을 생각하여야 할 것이다.

결론적으로, 제작된 $phVEGF_{165}$가 실험실내에서 혈관내피세포의 증식 효과가 있었다. 토끼 뒷다리 만성허혈모델에서 $phVEGF_{165}$ 유전자 치료는 동맥내 주입과 근육내 주사 간에 혈관조영술과 혈청 VEGF 측정의 결과에서 차이가 없었다. 앞으로 효과적인 유전자 주입 방법을 찾기 위해서는 실험동물의 대상 수를 늘리고, 정보제공유전자를 사용하여 세포 수준에서 유전자 도입과 발현을 확인하고, 세포내 유전자의 전달을 늘리기 위한 새로운 방법들을 고안해야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Circulation* 1991;84 (Suppl IV):IV1-IV26
2. Karlstrom L, Bergqvist D. Effects of vascular surgery on amputation rates and mortality. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:273-283
3. Ebskov LB, Schroeder TV, Holstein PE. Epidemiology of leg amputation: the influence of vascular surgery. *Br J Surg* 1994;81:1600-1603
4. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309
5. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25
6. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858
7. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376:62-66
8. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4:336-340
9. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-845
10. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985
11. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814
12. Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-11954
13. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039
14. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994;93:662-670
15. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, et al. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 1996;75:487-501
16. Takeshita S, Weir L, Chen D, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:628-635
17. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996;348:370-374
18. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-1123
19. Laitinen M, Makinen K, Manninen H, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum Gene Ther* 1998;9:1481-1486
20. Seol JG, Heo DS, Kim HK, et al. Selective gene expression in hepatic tumor with trans-arterial delivery of DNA/liposome/transferrin complex. *In Vivo* 2000;14:513-517
21. Gerolami R, Cardoso J, Bralet MP, et al. Enhanced in vivo adenovirus-mediated gene transfer to rat hepatocellular carcinomas by selective administration into the hepatic artery. *Gene Ther* 1998;5: 896-904
22. Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene ther* 1998;5: 272-276
23. Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA. Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2001;12:427-438
24. Pampinella F, Pozzobon M, Zanetti E, et al. Gene transfer in skeletal muscle by systemic injection of DODAC lipopolyplexes. *Neurol Sci* 2000;21:S967-969
25. Hong JH, Bahk YW, Suh JS, et al. An experimental model of ischemia in rabbit hindlimb. *J Korean Med Sci* 2001;16:630-635
26. Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, et al. A persistent hindlimb is-

chemia model in the rabbit. *J Invest Surg* 1994;7:49-60
27. Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, et al. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation* 1997;96(suppl II):II-382-II-388
28. Dulak J, Jozkowicz A, Ratajska A, Szuba A, Cooke JP, Dembinska-Kiec A. Vascular endothelial growth factor is efficiently synthesized in spite of low transfection efficiency of pSG5VEGF plasmids in vascular smooth muscle cells. *Vasc Med* 2000;5:33-40
29. Voss SD, Kruskal JB. Gene therapy: a primer for radiologists. *Radiographics* 1998;18:1343-1372
30. Taylor AE, Granger DN. *Exchange of macromolecules across the microcirculation.* In Renkin EM, Michel CC, eds. Handbook of physiology: The cardiovascular system (Microcirculation). Bethesda: American Physiological Society Book. 1984:467-520
31. Kwon HC, Kim JH, Kim KC, et al. In vivo antitumor effect of herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in rat hepatocellular carcinoma: feasibility of adenovirus-mediated intra-arterial gene delivery. *Mol Cells* 2001;11:170-178

대한방사선의학회지 2003;48:391 - 399

J Korean Radiol Soc 2003;48:391 - 399

A Comparative Study of Intra-arterial and Intramuscular Administration of phVEGF$_{165}$ in a Chronic Ischemic Model of Rabbit Hindlimb[1]

Byung Kook Kwak, M.D., Hyung Jin Shim, M.D., Kun Sang Kim, M.D., Jong Beum Lee, M.D., In Sup Song, M.D., Young Ho Moon, Ph.D.[2], Dong Hwan Kim, M.S.[2], Sang Wook Kim, M.D.[3], Jin Soo Kim, M.D.[4], Jin Wook Chung, M.D.[5], Jae Hyung Park, M.D.[5]

[1]*Cardiovascular Center, Department of Radiology, Yongsan Hospital, Chung-Ang University College of Medicine*
[2]*GenoTech Corporation*
[3]*Department of Cardiology, Yongsan Hospital, Chung-Ang University College of Medicine*
[4]*Department of Plastic Surgery, Kwangmyung Hospital*
[5]*Department of Radiology, Seoul National University College of Medicine*

Purpose: To obtain phVEGF$_{165}$ for angiogenesis and to compare the effects of its intra-arterial and intramuscular administration in a chronic ischemic rabbit hindimb model.

Materials and Methods: Chronic ischemic models were constructed in the left hindlimb of rabbits and divided into control ($n=6$), intra-arterial ($n=7$) and intramuscular groups ($n=5$). Plasmid DNA (phVEGF$_{165}$) expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) was obtained from HL60 cells, and transfection into CHO cells and western blot analysis of the medium, as well as proliferation assay of CPAE cells were performed. Two weeks after construction of the models, 500 μg phVEGF$_{165}$ was injected into both the left common iliac artery and thigh muscles. Angiography was performed and the number of vessels counted, and ELISA was used to determine the quantity of VEGF in blood samples. Wilcoxon signed rank test was employed for statistical analysis.

Results: VEGF$_{165}$ was expressed on western blot of the culture medium. Proliferation assay showed that optical densities were 0.73±0.043 in the control study and 1.09±0.015 in phVEGF$_{165}$. The angiographic scores were 1.32±0.13 (pre-gene therapy) and 1.30±0.07 (post-gene therapy) in the control group, 1.42±0.15 and 1.59±0.09 in the intra-arterial group, 1.59±0.27 and 1.14±0.12 in the intramuscular group. The differences were not statistically significant. In the intra-arterial group, serum VEGF levels were 39.96±1.08 pg/ml (pre-gene therapy), 44.99±2.13 pg/ml (4th day), 48.18±1.49 pg/ml (1st week), 45.70±3.77 pg/ml (2nd week), and 46.54±5.47 pg/ml (3rd week), but in the control and intramuscular groups there were no increases.

Conclusion: phVEGF$_{165}$ affected the proliferation of CPAE cells. There was no difference in angiographic scores and serum VEGF levels between intra-arterial and intramuscular administrations.

Index words : Angiogenesis
Ischemic disease
Plasmid DNA
Gene therapy
Vascular endothelial growth factor

Address reprint requests to : Byung Kook Kwak, M.D., Cardiovascular Center, Department of Radiology, Yongsan Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, 65-207 Hangangro-3-Ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea.
Tel. 82-2-748-9791 Fax. 82-2-798-4745 E-mail: kwakbk@cau.ac.kr