

Farnesyl Transferase Inhibitor의 혈관 평활근 세포증식 및 신내막 증식에 미치는 영향

연세대학교 원주의과대학 순환기내과학교실,¹ 응급의학과학교실,² LG 화학³

유병수¹ · 윤정환¹ · 김장영¹ · 최현민¹ · 이승환¹ · 황성오² · 최경훈¹ · 고종성³

The Effect of Farnesyl Transferase Inhibitor on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Neointima Formation

Byung-Su Yoo, MD¹, Jung han Yoon, MD¹, Jang Young Kim, MD¹, Hyun-Min Choi, MD¹,
Seung-Hwan Lee, MD¹, Sung-Oh Hwang, MD², Kyung-Hoon Choe, MD¹ and Jong Sung Ko, PhD³

¹Department of Cardiology, ²Emergency Medicine, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju and

³LG Chemical, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : We tested the hypothesis that prolonged oral administration of farnesyl transferase inhibitor (FTI, LB42908a, MW=604, LG chemical, Korea) inhibits the proliferation and neointimal thickening of smooth muscle cells (SMC) in a rat carotid injury model. **Materials and Methods** : Cultured rat aortic vascular SMCs were exposed to sequential concentrations of FTI, and the proliferation inhibition analyzed using the MTT assay. In the rat carotid injury model, the FTI, at 3 dose levels (low-dose ; 10 mg/kg, bid ; mid-dose ; 50 mg/kg, bid ; high-dose ; 100 mg/kg, bid), or as a placebo, was administered orally, twice a day for 14 days, starting from 30 minutes before injury, until sacrifice. The histo-morphometric analysis was performed. The immunohistochemical detection of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was performed for 3 days. **Results** : FTI inhibited the PDGF or FBS-induced cellular proliferations in a dose dependently manner. In the rat carotid artery balloon injury model, the mean neointimal area was significantly less in the mid-dose group than in the placebo and low-dose groups (control : $0.35 \pm 0.04 \text{ mm}^2$, low-dose : $0.23 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ and mid-dose : $0.19 \pm 0.04 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$), and the mean ratio of the neointima to medial areas were significantly less in the mid-dose group than in the placebo and low dose group (placebo : 3.02 ± 0.34 , low-dose : 2.24 ± 0.54 and mid-dose : 1.47 ± 0.31 , $p < 0.05$). The labeling index of the PCNA was significantly less in the mid-dose group than in the placebo and low-dose groups (control : 71 ± 9 , low-dose : 73 ± 9 , mid-dose : 54 ± 14 and high-dose : 53 ± 9 , $p < 0.05$). **Conclusion** : The FTI inhibits SMC proliferation in a dose dependent manner. The prolonged oral administration of FTI, for 14 days, is effective in reducing neointimal hyperplasia in the rat carotid balloon injury model. (Korean Circulation J 2003; 33(4):311-320)

KEY WORDS : Farnesyl transferase inhibitor ; Neointima ; Smooth muscle cell.

논문접수일 : 2002년 12월 13일

수정논문접수일 : 2003년 2월 13일

심사완료일 : 2003년 3월 6일

교신저자 : 윤정환, 220-701 강원도 원주시 일산동 162번지 연세대학교 원주의과대학 순환기내과학교실

전화 : (033) 741-0917 · 전송 : (033) 741-0502 · E-mail : yoonj@wonju.yonsei.ac.kr

서론

관동맥 협착 병변에서 경피적 풍선 성형술(percutaneous transcutaneous coronary angioplasty ; 이하 PTCA)의 효과가 입증되고 시술 관련 기술이 발전하였으나 재협착은 PTCA 시술 환자의 10~50%에 이르러 재시술을 필요로 하는 등 환자에게 고통과 위험을 가중시키고 의료비의 상승을 유발하는 요인이 되고 있다.¹⁻³⁾ PTCA후 재협착의 기전으로 신내막 증식 및 수축성 혈관 개형(constrictive vascular remodeling)이 중요한 재협착의 기전으로 여겨진다. 그간 많은 동물 실험에서 수많은 약제가 신내막 증식을 감소시키는데 효과적이었으나, 임상 실험에서는 오직 제한적인 결과가 있을 뿐이었다. 이와 같은 신내막 증식에 혈관 평활근 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 재협착을 막는 근본적인 치료로서 새로운 약제나 기구를 이용한 많은 활발한 연구가 진행중이다.⁴⁻⁶⁾

최근 이런 노력의 일환으로 세포주기를 조절하는 특이한 물질이나 세포의 발현 등을 목표로 하여 혈관 평활근 세포의 증식억제와 PTCA등으로 인한 기계적 손상 후에 내피세포의 기능을 회복시키는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 최근 종양학 분야에서 ras-protein의 활성화에 관여하는 farnesyl transferase를 억제하여 ras의 oncogenic activity를 막는 항암제로 경구용 약제가 개발되어 아주 적은 농도에서도(10 nmol) 선택적으로 ras processing을 막아 항암제의 심각한 약제 독작용을 막을 수 있다고 알려졌다.⁷⁻¹²⁾ 이들 약제의 ras-protein의 작용이 혈관 평활근 세포에도 알려지고 최근 혈관내막증식을 치료하려는 시도가 보고되어 치료제로서의 효과가 기대되는 실정이다.¹³⁻¹⁵⁾ 이에 본 연구는 실험실적으로 개발된 경구용 farnesyl transferase inhibitor(이하 FTI)를 심장내과 영역에서 문제점으로 대두되고 있는 재협착 치료제로의 가능성을 알아보고자 실험실내에서 혈관 평활근 세포의 증식억제 및 생체 내에서 풍선 손상후 신내막 증식 억제 효과에 대한 작용을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 약물

본 실험에서 farnesyl transferase inhibitor는 실험

실에서 제조된 경구용 수용성(water soluble, oral bio-availability 43.1%) 약제(LB42908a(Lot No : FT08a-02R1P1, MW 604), LG chemical, Taejeon, Korea)를 제공받아 사용하였다.

세포 배양 및 세포 증식의 분석

세포 배양

혈관 평활근 세포는 흰쥐(Rattus norvegicus)의 흉부 대동맥에서 분리한 세포를 구입하여(CRL-1444, American Type Culture Collection, Manassas, VA) 실험에 사용하였다. 이들 세포는 현미경으로 혈관 평활근 세포의 hill-and-valley 모양을 현미경으로 확인하였고 혈관 평활근 세포로 확인된 세포들을 10% fetal calf serum(Sigma, St. Lois, MO) 이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) 배지(37℃, 5% CO₂/95% O₂)에서 배양하였다.

세포증식정도 측정

FTI에 의한 혈관 평활근 세포의 증식의 정도를 알기 위해 MTT test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma)]를 시행하였다. 이 방법은 Modified fluorometric assay로 MTT assay를 시행하여 생존세포의 양(Determinant of cellular mitochondrial dehydronase(이하 MD))의 활성도를 측정하여 여러 가지 농도의 FTI가 혈관 평활근 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 실험에 사용할 혈관 평활근 세포는 배양된 세포를 phosphate buffered saline(이하 PBS)로 씻고 trypsin으로 처리하여 떼어낸 후 96 well microtiter plate에 배양하였으며, 각 well에는 200 μ L의 배지와 함께 약 $3\sim4\times10^4$ 개의 세포를 배양하였다. 혈청을 제거하고 platelet derived growth factor(이하 PDGF)가 없는 배양액에서 혈관 평활근 세포를 배양한 후 측정 MD 활성도를 대조군으로 하여 대조군과의 비율(% of control)로 세포 증식의 정도를 나타내었다. FTI의 효과를 보기 위해 모든 시료는 PBS로 희석하였고 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco-BRL)으로 세포 증식을 자극한 군, PDGF(PDGF-BB, Sigma, 5 ng/mL)로 자극한 군 그리고 PDGF나 FBS의 첨가 없이

약제만 투여한 군으로 나누었고 각기 FTI를 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M 농도까지 증가시키면서 배양하였다. 각 well의 배지는 24시간마다 교환하였고 각 농도별로 6개의 well을 배정하였다. FTI를 투여한 후부터 72시간 동안 배지를 교환하면서 중단 없이 연속 배양(nonstop assay) 하였고 이후 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 well에 2.5 mg/mL MTT용액 10 μ L를 가하였으며, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이 때 음성 대조군으로 배지만을 가한 well을 확보하였다. 4시간 경과후 각 well에서 약 150 μ L정도의 상층액을 조심스럽게 제거한 다음, 0.04 M HCl 100 μ L을 각 well에 가하여 형성된 생성물을 용해시켜 균질 용액으로 광학도(optical density)를 측정할 수 있게 하였다. 모든 결정이 낮은 것을 재차 확인하기 위하여 실온에 5분 간 경과 후에 micro ELISA reader를 이용하여 595 nm에서 광학도를 측정하였다. 각 농도에서의 세포증식 정도는, 약을 가하지 않은 대조군과의 비율(% of control)로 표시하였다.

흰쥐 경동맥 손상 모델에서 신내막 증식에 대한 FTI 효과

실험동물(animal model)의 선택

실험대상 동물로서는 Sprague-Dawley rat을 사용하였으며 성별에 따른 차이를 없애기 위해 모두 생후 10주 정도의 수컷을 사용하였다. 실험에 사용된 흰쥐는 모두 42마리로서 평균체중은 314 ± 6 g이었다.

실험군 및 약제 투여방법

흰쥐의 총경동맥에 풍선도자를 이용하여 손상을 가한 후 약물의 투여는 실험 군에 따라 경동맥 손상 전(30분 이상) 경구투여 하였으며 혈관손상 시술자는 실험표본이 속한 실험 군을 모르도록 맹검상태를 취하였다. 손상 후는 각각의 약제와 생리 식염수를 하루 2번 12시간 간격으로 Zonde 카테터를 이용하여 경구투여하였다. 수용성인 본 약제는 생리 식염수에 해당 농도를 희석하였고 약물 투여의 방법 및 농도는 LG화학에서 흰쥐를 대상으로 시행한 약동학 실험 결과(LG화학 내부자료)를 근거로 실험 군을 나누었다. 실험 군은 혈관 손상 후, 1)용배(생리식염수 3 cc) 만 경구 투여한 군(대조군) 2)저용량(10 mg/kg, bid)의 경구용 FTI를 경

구 투여한 군 3)중간용량(50 mg/kg, bid)의 경구용 FTI를 경구 투여한 군 4)고용량(100 mg/kg, bid)의 경구용 FTI를 경구 투여한 군 으로 나누었다. 각각의 실험 군은 대략 10마리 정도로 계획하였고 실제 42마리를 대상으로 시술자가 모르게 무작위로 실험 군을 나누었다.

흰쥐 경동맥의 풍선손상 방법

먼저 흰쥐의 마취는 Ketamine(6 cc/Kg) 및 lidocaine(2 cc/Kg) 혼합액을 복강 내 주사하여 마취를 유지하였다. 목의 정중부로 절개를 한 후 좌측 총경동맥과 내경동맥, 외경동맥이 드러나도록 한 후 총경동맥의 주변을 혈관의 견인 및 손상이 없도록 박리하여 혈관의 외막이 깨끗하게 노출되도록 하였다. 외경동맥의 원위부를 완전 결찰하고 내경동맥의 근위부를 임시 결찰한 후 총경동맥의 원위부에 검자를 설치하였다. 외경동맥 결찰부의 근위부에 미세 절개를 가한 후 2 Fr의 Forgarty 동맥 색전제거술용 도자(Baxter Edwards Health Corp. Irvine, CA)를 삽관하였다. 도자의 말단부가 총경동맥을 지나서 흉부 대동맥에 이르도록 한 후 생리식염수로 풍선을 부풀려 견인하면서 대동맥궁에서 총경동맥이 분지 하는 기시부에 걸리도록 한 뒤 풍선을 감압하여 총경동맥 안으로 미끄러져 들어오게 하면서 다시 풍선을 부풀려 일정한 저항이 느껴질 정도로 풍선의 팽창을 유지하면서 견인하였다. 같은 과정을 3회 반복하여 혈관 내피세포의 박리를 유발시켰다. 3회의 혈관 내막손상을 가한 후에 외경동맥의 기시부를 완전 결찰한 뒤 내경 동맥의 임시 결찰을 해제하고 총경동맥의 검자를 제거하여 혈류를 회복시킨 후 봉합하였다. 시술 후 실험동물은 37의 항온 및 60%의 항습이 유지되는 실험용 축사에서 2주간 사육하였다.

실험동물의 희생, 관류-고정 및 표본 제작

실험동물은 혈관 손상 시술 후 2주째 마취 후 목의 정중부를 절개하고 피하를 박리 하여 경정맥을 노출시켜 놓은 뒤 배의 정중부를 절개하고 내장을 췌한 후 복부 대동맥을 노출시킨 다음 18 G의 정맥주사용 도자를 대동맥 내로 천자 삽입하였다. Pressure infusion bag을 이용하여 압력을 100 mmHg로 유지시키면서 생리 식염수를 주입하였고 미리 노출시켜 둔 경정맥을 절개하여 출혈을 시키면서 경정맥 절개부로 맑은 생리식염

수가 나올 때까지 세척한 후 소형검자로 경정맥을 절찰하고 생리식염수 주입을 중지 후 다시 같은 압력을 가하면서 10% formalin 용액을 5분 이상 주입하여 관류고정을 시켰다. 생리 식염 고정기 끝난 후 흉곽의 정중부를 절개하여 심장과 경동맥을 같이 절제해 내어 10% formalin 용액이 담긴 표본병에 넣어 보관하였다. 이중 좌측 경동맥을 잘라내어 2 mm 간격으로 썰어서 5~6개의 절편으로 분리하고 이들을 파라핀에 포매한 후 5 m씩의 미세 절편을 만들어 hematoxylin-eosin(HE) 염색 및 Elastic-Van Gieson(EVG) 염색을 시행하였다.

조직형태학적 분석

광학 현미경(BH-2, Olympus, Japan)에 부착된 CCD color camera(IK-642K, Toshiba, Japan)로 표본의 영상을 포착한 후 video adaptor(buzTM, Iomega, Roy, Utah)가 장착된 PC를 이용하여 영상 파일(BMP file)로 제작하였다. 영상 분석 프로그램(SigmaScan Pro-4.01, Jandel Co. USA)으로 표본의 내강 면적(lumen area)을 측정하고 한 마리에서 나온 표본 중 내강 면적이 가장 작은 표본을 택하였고, 이들의 내탄력층 면적(internal elastic lamina area)과 외탄력층 면적(external elastic lamina area)을 측정하고, 내막 면적(intimal area), 중막 면적(medial area)과 내막 대 중막 비율(I/M ratio)을 계산하였다.

PCNA 면역 형광 조직학적 분석

Proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA) 면역조직학적 분석을 위해 위에서 기술 한 같은 방법으로 평균 308 ± 6 g의 흰쥐의 총경동맥에 풍선도자를 이용하여 손상을 가한 후 각기 실험 군별로 8마리씩 32마리를 3일 간 사육하였다. 또한 PCNA 면역조직화학 분석은 손상 후 3일째 희생하여 좌측 경동맥을 잘라내어 2 mm 간격으로 썰어서 5~6개의 절편으로 분리하고 이들을 파라핀에 포매한 후 5 m씩의 미세 절편을 만들었다. 각 절편은 파라핀 제거 후 citrate 완충 용액에 처리하고 항 PCNA 항체(Biomed, Foster, Ca)를 4°C에 18시간 동안 반응시켰다. 이후에 DAKO Kit(Dako, Carpinteria, CA)에 포함된 biotinylated anti-mouse immunoglobulin과 peroxidase conjugated streptavidine을 각각 1시간씩 반응시키고 PBS로 세척한 후 3-amino-9-ethylcarbazole로 발색시켰다. Hematoxy-

lin을 이용하여 대조염색으로 이용하였다. 광학 현미경 하에 PCNA가 함유되지 않은 세포는 hematoxylin만 염색되어 세포질이 파랗게 염색되고 이를 염색반응 음성세포로, 갈색으로 염색된 핵이 보이는 세포를 PCNA가 함유된 염색반응 양성 세포로 하였다. 또한 PCNA가 함유되어 염색된 세포 수를 중막에서 세고 혈관 내 분포를 평가하였다. 혈관 내 분포의 평가는 표지지수(labelling index=염색반응 양성 핵수/총 핵수)×100으로 표현하였고 중막에 관찰된 총핵 수도 표시하였다.

자료 분석 및 통계처리

모든 측정치는 평균±표준오차로 표시하였다. 형태학적인 분석 시 연구자는 치료 군에 대하여 맹검 상태를 취하였다. 측정값들은 통계 프로그램(SPSS 7.5, SPSS Inc., USA)을 이용하여 각 군간 차이의 통계학적인 유의성 여부를 알기 위하여 ANOVA test를 하였고 차이가 존재하는 군의 관계 확인을 위해 Scheffe 검정을 시행 하였으며 p값이 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

혈관 평활근 세포의 증식에 대한 FTS의 효과

혈청을 제거하고 PDGF가 없는 배양액에서 혈관 평활근 세포를 배양한 후 측정된 MD 활성도를 대조군으로 하여 대조군과의 비율(% of control)로 세포 증식의 정도를 나타내었다. 배양액에 FBS를 첨가한 후에

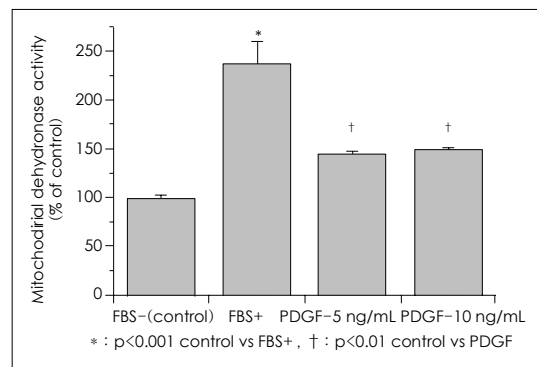


Fig. 1. Effect of various stimuli on MD (determinant of cellular mitochondrial dehydrogenase) activity of rat smooth muscle cells (SMC). The PDGF-induced growth stimulatory effect or 10% FBS inoculation on rat SMCs proliferation significantly increases MD activity (p<0.005 control vs PDGF, p<0.001 control vs FBS), FBS : fetal bovine serum, PDGF : platelet derived growth factor.

는 $212.2 \pm 20.6\%$ 로, PDGF (5 ng/mL)를 첨가한 후 $138.8 \pm 8.0\%$ 로, PDGF를 10 ng/mL를 첨가 한 후에는 $144.2 \pm 5.0\%$ 으로 이는 모두 대조군 보다 유의한 MD 활성도의 증가 소견을 보였다(Fig. 1, $p < 0.05$). 또한 이 결과를 토대로 PDGF (5 ng/mL) 혹은 FBS 첨가 하에 혈관 평활근 세포를 배양하면서 FTI를 농도별로 20분간처리 한 후 3일간 연속 배양을 시행하였다. PDGF의 자극 하에서 혈관 평활근 세포를 배양하면서 FTI를 1, 10, 100 nmol/L, 1, 10, 100 μ mol/L의 농도로 20분간 처리하고 씻어낸 후 72시간 배양한 후의 MD 활성도의 대조군과의 비율은 각각 136.1 ± 7.7 , 125.7 ± 6.2 , 116.9 ± 7.2 , 107.1 ± 7.5 , 91.6 ± 9.3 , $52.3 \pm 3.1\%$ 로 FTI 농도가 증가할수록 MD 활성도는 감소하였고 1 μ mol/L의 농도부터 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 2, $p < 0.05$). 또한 FBS 첨가 하에도 244.3 ± 15.1 , 178.1 ± 12.4 , 166.1 ± 6.2 , 138.8 ± 13.9 , 101.1 ± 20.1 , $61.7 \pm 1.5\%$ 로 10 nmol/L의 농도부터 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 2, $p < 0.05$). PDGF 나 FBS의 첨가 없이 같은 시험을 반복한 경우에도 FTI농

도에 따라 112.5 ± 7.7 , 95.1 ± 3.1 , 91.3 ± 2.3 , 85.2 ± 4.6 , 69.4 ± 2.3 , $62.8 \pm 2.1\%$ 로 10 μ mol/L의 농도부터 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 2, $p < 0.05$).

원위 경동맥 손상 모델에서 신내막 증식에 대한 FTI 효과

대상 및 결과

총 42마리 중 시술 시 3마리는 마취제 과다투여로 손실되었고 2마리는 시술 직후 손실되었다. 13마리는 약제투여 기간 중 손실되어(저용량 1, 중간 용량 5, 고용량 7) 시술 2주 후에는 대조군 9마리, 저용량 약제 투여군 7마리, 중간용량 약제 투여군 6마리, 고용량 약제 투여군 2마리가 생존하여 분석에 이용하였다. 사망 원인은 저용량 약제 투여군 1마리는 손상 후 3일에 특이 소견 없이 발견되었고, 중간용량 약제 투여군 5마리 중 3마리는 각각 6, 8, 13일에 식도 파열 및 폐출혈 소견이 동시에 관찰되었으며, 2마리는 7일 12일에 특이 소견 없이 사망하였다. 고용량 약제 투여군 7마리는 3마리는 8일, 12일에 식도 파열이 발견되었고, 2마리는

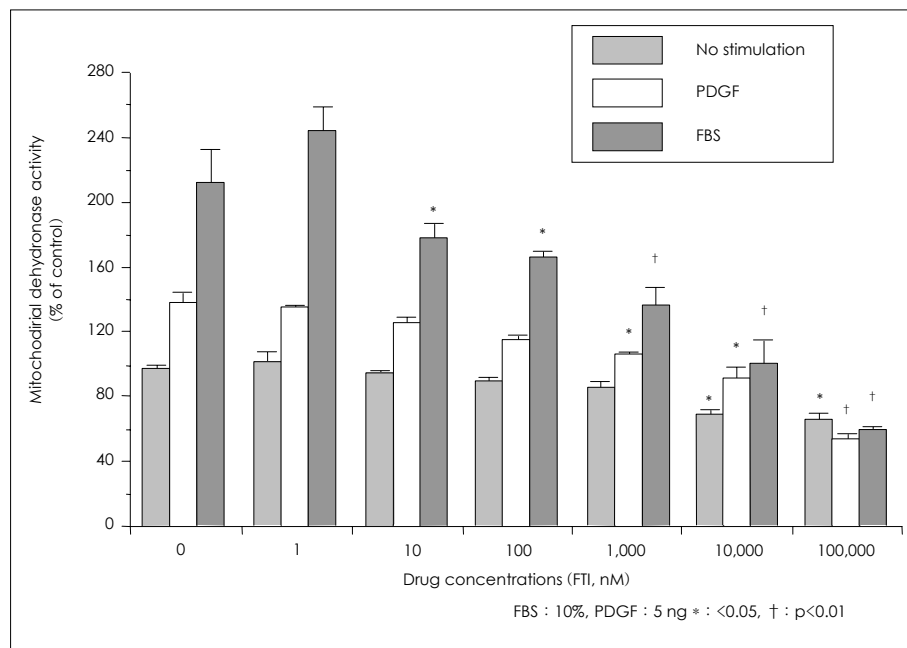


Fig. 2. Inhibitory effects of FTI on rat aortic SMCs proliferation with or without stimulation. The PDGF-induced growth stimulatory effects on rat SMCs proliferation were significantly blocked after 20-minute single incubation at concentrations greater than 1 μ mol/L (1 to 10 μ mol/L : $p < 0.05$, 100 μ mol/L : $p < 0.01$). Inhibitory effects of FTI on rat SMCs proliferation with 10% FBS were significantly blocked after 20-minute single incubation at concentrations greater than 10 nmol/L (10 to 100 nmol/L : $p < 0.05$, 1 to 100 μ mol/L : $p < 0.01$). Inhibitory effects of FTI on rat VSMCs proliferation without stimulation were significantly blocked after 20-minute single incubation at concentrations greater than 10 μ mol/L (10 to 100 μ mol/L : $p < 0.05$). FTI : farnesyl transferase inhibitor, SMC : smooth muscle cell, PDGF : platelet derived growth factor, FBS : fetal bovine serum.

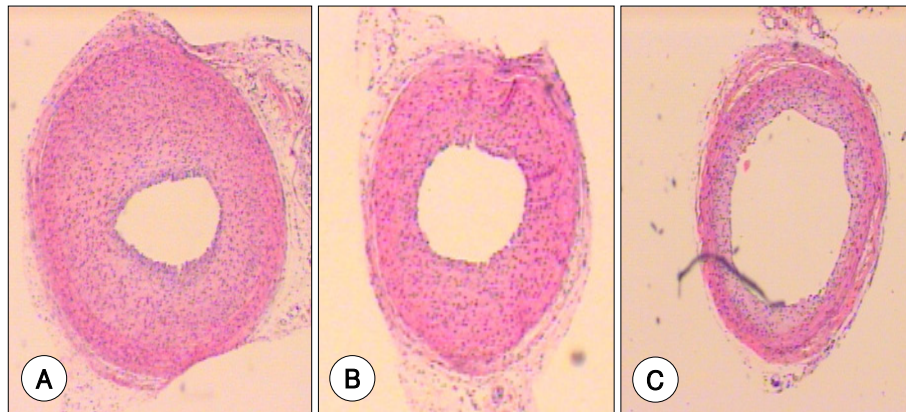


Fig. 3. Representative light micrographs of each study group. In rat carotid artery balloon injury model, the mean neointimal area was significantly less in mid-dose group (C) than placebo group, (A) or low-dose group (B) ($p < 0.05$, HE stain, $\times 40$).

폐농양과 폐출혈이 9일, 13일에 관찰되었으며 2마리는 12일, 13일에 특이 소견 없이 사망하였다. 고용량 약제 투여군은 2마리만 생존하여 통계 분석에서는 제외시켰다. 실험 시작 당시의 실험동물의 체중은 대조군이 313 ± 4 g, 저용량 약제 투여군 312 ± 9 g, 중간용량 약제 투여군 319 ± 5 g, 고용량 약제 투여군 315 ± 8 g로서 각 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 2주 후 희생시 체중이 감소하였으나 각 군간에 유의한 차이는 없었고 체중의 변화율에 있어서도 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

조직 형태학적 분석 결과

내막면적은 대조군 0.35 ± 0.04 mm², 저용량 약제 투여군 0.23 ± 0.04 mm², 중간 용량 약제 투여군이 0.19 ± 0.04 mm²로서 중간용량 약제 투여군이 대조군에 비해 유의하게 작은 값을 보였으나($p < 0.05$) 저용량 약제 투여군과는 유의한 차이가 없었다. 내강 면적은 대조군이 0.14 ± 0.02 mm², 저용량 약제 투여군이 0.11 ± 0.03 mm², 중간용량 약제 투여군이 0.21 ± 0.02 mm²로서 중간용량 약제 투여군이 저용량 약제 투여군과 대조군에 비해 유의하게 큰 값을 보였다(Fig. 3, 4, $p < 0.05$). 중막 면적 내탄력층 면적 및 외탄력층 면적에서는 세 군간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 내막 대 중막 비율은 대조군이 3.02 ± 0.34 , 저용량 약제 투여군이 2.24 ± 0.54 , 중간용량 약제 투여군이 1.47 ± 0.31 로서 중간용량 약제 투여군이 저용량 약제 투여군과 대조군에 비해 유의하게 작은 값을 보였다(Fig. 4, $p < 0.05$).

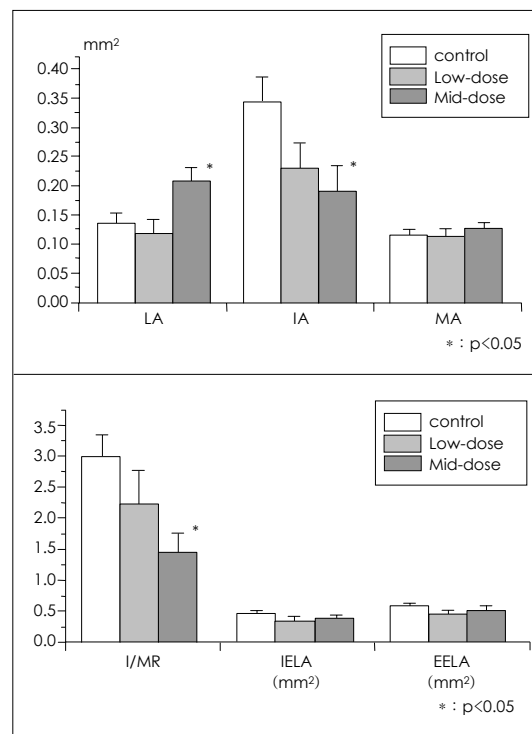


Fig. 4. Comparison of luminal area (LA), intimal area (IA) and medial area (MA) among the each group (upper column). The mean neointimal area was significantly less in mid-dose group than placebo group or low-dose group ($p < 0.05$). Comparison of internal elastic lamina area (IELA), external elastic lamina (EELA) and the mean ratio of neointima to medial area (I/M ratio) (lower column). The mean ratio of neointima to medial area were significantly less in mid-dose group than in placebo group or low dose group ($p < 0.05$).

PCNA 면역조직화학적 분석 결과

PCNA 면역조직화학적 분석을 위해 사용한 흰쥐는 모두 32마리로서 시술 시 2마리는 마취제 과다투여로 손실되어 시술 3일 후에는 대조군 6마리, 저용량 약제 투여군 8마리, 중간용량 약제 투여군 8마리, 고용량 약제 투여군 8마리가 생존하여 분석에 이용하였다. 표지 지수 (labelling index)는 대조군 71 ± 9 , 저용량 약제 투여군 73 ± 9 , 중간용량 약제 투여군 54 ± 14 , 고용량 약제 투여군 53 ± 9 로 중간용량 약제 투여군과 고용량 약제 투여군에서 대조군과 저용량 약제 투여군에 비하여 유의하게 낮았고 (Table 1, Fig. 5, $p < 0.05$), 중간용량 약제 투여군과 고용량 약제 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 또한 손상 후 중막에 관찰된 총핵수도 중간용량 약제 투여군과 고용량 약제 투여군에서 대조군과 저용량 약제 투여군에 비하여 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$).

Table 1. Comparison of PCNA (+) cell count and labelling index among control, low-dose, mid-dose and high-dose group

	PCNA (+) cell count	Labelling index
Control (n=6)	121 ± 32	71 ± 9
Low-dose (n=6)	107 ± 21	73 ± 9
Mid-dose (n=6)	$80 \pm 31^*$	$54 \pm 14^*$
High-dose (n=6)	$74 \pm 12^\dagger$	$53 \pm 9^\dagger$

Values are expressed mean \pm SD, * : $p < 0.05$: control or low dose vs. mid-dose † : $p < 0.05$: control or low dose vs. high-dose

고 찰

본 연구에서 Farnesyl transferase inhibitor를 이용하여 실험실내에서 혈관 평활근 세포의 증식억제 및 흰쥐의 풍선 손상 모델에서 풍선 손상 후 신내막 증식 억제를 증명하였다.

세포내 Ras-protein과 Farnesyl transferase inhibitor

과도한 혈관 손상 후 신내막 형성의 과정으로는 평활근 세포의 활성화와 증식, 내피로의 이동과 섬유아 세포에서 생성되는 세포외 기질의 생성으로 알려져 있다. 이런 혈관 평활근 세포의 증식과 내피로의 이동을 촉진시키는 물질로 손상받은 혈관에서 활성화된 혈소판 및 내피세포에서 생성되는 PDGF와 손상 받은 중막의 평활근 세포에서 생성되는 PDGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor (TGF), insulin growth factor (IGF) 등의 성장인자가 관여하며 angiotensin II, serotonin 및 endothelin 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁾⁵⁾¹⁶⁾ 그러므로 기전적으로 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 약제는 혈관 손상 후의 신내막 형성을 억제할 수 있다. 이런 평활근 세포를 포함한 세포의 증식 및 활성화에는 ras-protein이 세포 내로 신호(signal)가 전달되는 매개 역할을 하여 protooncogene(c-myc, c-myc, c-fos)을 활성화시켜 세포의 활성화가 촉진된다고 알려지고 있다.⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾ 이

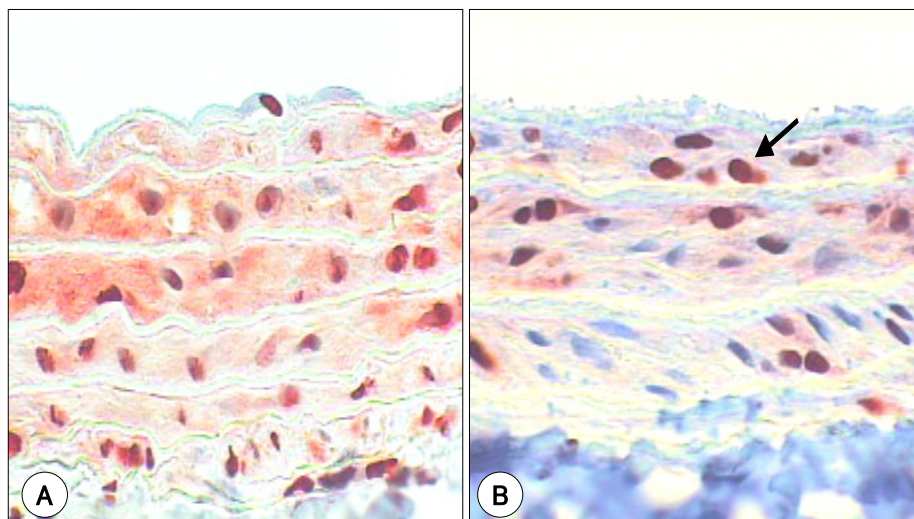


Fig. 5. Three days after balloon injury, photomicrographs showed nuclear incorporations of PCNA (brown color, arrow) in the media of carotid artery after balloon injury. There are higher intensity of PCNA staining cell in control (A) than mid-dose (B) group (Immunohistochemical stain for PCNA, $\times 200$), PCNA : proliferating cell nuclear antigen.

런 ras-protein의 활성화에 farnesyl transferase에 의한 catalyze가 중요 단계(key step)로 중요한 역할을 하며 ras-protein은 세포막(plasma membrane)과 핵내 세포(nuclear effect cell) 사이에 신호를 전달하는 중요한 연결 고리로 작용하는 것으로 보고되었다. 또한 종양학 분야에서는 세포의 활성화에 연관된 ras-protein의 mutation이 ras의 GTPase를 파괴하여 활성화 상태를(GTP bound form) 지속적으로 유지하게 돼 세포내 신호 전달이 계속되어 세포 성장을 제어할 수 없게 되어(uncontrolled cell growth) 암 생성이 유발 기전으로 알려져 있다. 이에 ras-protein의 활성화를 막는 것이 세포 증식 및 활성화를 억제에 중요하며 ras-protein의 활성화에 관여하는 farnesyl transferase를 억제하여 항암제로 사용하려는 연구 및 약제개발이 활발하게 되고 있다.¹²⁾¹³⁾ 이와 같은 ras-protein의 작용이 혈관 평활근 세포에도 알려지고 최근 혈관내막 증식을 유전적 방법으로 치료하려는 시도가 있으면서 antisense oligonucleotide technology를 이용하여 farnesyl transferase에 대한 antisense oligonucleotide를 주입하여 산내막증식을 억제했다는 보고가 있었다.⁶⁾¹⁴⁾

실험실에서 FTI의 혈관 평활근 세포 증식 억제에 대한 효과

본 연구에 이용된 약제는 실험실에서 개발된 farnesyl transferase inhibitor의 일종으로 본 실험에서 그 기전 내지는 신호 전달 체계를 증명하기보다는 약제가 실제 혈관 평활근 세포를 억제하는지에 대한 효능에 관한 실험이다. 최근 Cohen 등¹⁵⁾이 farnesyl transferase inhibitor의 analogue 등을 이용하여 human smooth muscle cell line을 이용하여 세포 증식에 대한 연구를 보고하였다. 이 연구에서도 PDGF 혹은 bFGF를 자극된 DNA합성을 약제의 농도에 따라 감소시켰고 일부 약제에서는 100 μ M의 농도로 29시간 전처리 후에 DNA합성 정도를 평가하여 합성이 유의하게 억제됨을 보고하였다. 이 중 가장 약제 효과가 강한 것이 IC₅₀ value가 340 nM로 약한 약제는 1~10 μ M 보고하였다. 이 연구와 본 연구를 비교하여 보면 본 연구에서는 흰쥐 혈관 평활근 세포를 이용하였으므로 직접적인 비교는 어렵지만 본 연구에서도 약제가 농도와 비례하여 PDGF로 자극된 세포의 증식 정도를 억제하였다. 본 약제는 IC₅₀ value가 100 μ M 정도로 Cohen 등¹⁵⁾의 약제보다는 약한 것으로 사료되나 본 연구에서는 세포의 활성화도

(viability, MTT assay)로 세포의 증식을 측정하였고 Cohen 등¹⁵⁾은 DNA 합성을 이용하여 평가하였기 때문에 그 정도 및 결과는 다소 차이가 있을 것이라 사료된다. 본 연구에서도 PDGF로 자극된 세포에서나 FBS 첨가시 약제의 효과가 더 강화되어 나타났고 자극 없이 약제만 투여한 실험에서는 높은 농도에서만 세포 증식이 억제되었다. 이는 항암제가 가지는 약제의 특성 상 높은 농도에서 세포의 증식을 억제하여 위와 같은 결과를 얻었을 것이라 추정된다. 또한, PDGF로 자극된 세포에서 세포 성장을 억제 하였던 데 이는 기전 상 PDGF 등은 세포 주기 G1 phase에 Ras-MAP kinase signal transduction 경로를 통해 세포의 성장을 활성화 시키므로¹⁶⁾ 본 약제도 이 경로를 억압하여 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 것으로 추정할 수 있다. 하지만 본 실험이 기전적 연구에서 DNA 합성 및 cell viability 모두 측정하지 않았고 cell viability만을 보았으므로 경로 및 기전을 규명하기에는 미흡하다고 사료된다. 또한 PDGF로 자극된 세포의 증식 정도가 대조군에 비하여 140%정도 증식되지 않아 약제의 효과 정도를 분석하는데 제한점이라 할 수 있다. 최근 HMG-CoA reductase inhibitor인 statin계열의 약물이 cellular mevalonate의 고갈(depletion)에 의해 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 것으로 보고하였고 이에 기전 또한 mevalonate-derived farnesyl transferase protein의 고갈로 인한 것으로¹⁶⁾ 본 연구에서 시도되었던 FTI와 기존의 statin계열의 약제를 동시 투여하는 것이 세포의 증식을 억제하는데 효과적일 것이라 생각된다.

흰쥐 경동맥 손상 모델에서 신내막 증식에 대한 FTI 효과

본 실험에서는 흰쥐 경동맥 손상 모델을 이용하였고 실질적인 혈관 손상 후 신내막 증식의 정도를 조직학적인 분석을 통하여 입증하였다. 하지만 약제의 투약에 있어 본 약제가 경구용으로 개발되어 하루에 2회씩 마취 없이 직접 경구 투여하였기 때문에 전 실험 동물에서 시술전에 비하여 희생 당시 체중의 감소가 관찰되었고 약제 투여와 연관되어 동물에 상당한 스트레스로 작용되었을 것으로 사료되나 각 군간의 체중에 통계적인 유의성은 없었다. 또한 시술 중 혹은 시술 직후 사망한 동물을 제외하고, 14일 간의 경구 투약 기간 중 약제의 용량이 높은 군에서 실험대상의 손실이 보다 많이 관찰되어 약제의 장기적인 투여의 합병증의 가능성을 시사

한다고 하겠다.

본 연구에서 사용된 혈관손상 방법은 풍선을 이용하여 쥐의 경동맥 내강을 훑어냄으로써 혈관 내피의 손상을 유발하는 방법으로 혈관손상이 국소적이며 손상혈관의 전장에 걸쳐 혈관 평활근 세포의 이동과 증식이 개체마다 높은 재현성을 가지고 나타나 혈관 재협착 연구에 있어 매우 좋은 생체 내 실험 모델이다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 본 연구에서의 각기 조직학적 측정치들이 다른 연구자들이 보고한 수치와 비슷하였다.²⁰⁾ 또한 신내막 증식에 대한 약제의 효과에서 용량이 증가할수록 신내막 면적의 감소가 관찰되고 있으나 저용량 군에서는 대조군에 비하여 통계학적인 유의성은 관찰되지 않았고, 중간 용량 투여군에서는 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 신내막 억제 효과가 있음을 보여주었다. 본 실험에서는 생존이 2마리에 불과하여 분석에서는 제외하였으나 신내막 면적에 있어서는 현저한 효과를 보여 주고 있다. 이와 같은 결과는 어느 정도 농도에 비례하여 신내막 증식을 억제하였으리라 추측된다.

또한 일반적인 혈관 내피 손상을 유발시킨 부위에는 혈관 평활근과 내피세포의 증식이 뒤따르게 되고 손상 후 24시간에서 72시간 사이에 증식중인 평활근 세포의 대부분은 성장기로 진입하여 중막에서 내막으로의 이주를 시작한다.⁴⁾¹⁶⁾ 본 연구에서는 PCNA를 이용하여 내막으로 이동하기 전 중막에서 성장하는 성장기 세포의 정도를 측정하였고, 중간 용량 및 고용량 투여군에서 대조군 및 저용량 투여군보다 표시지수가 낮아 성장하는 평활근 세포의 정도를 측정하여 약제의 효과가 이들 평활근 세포의 성장을 억제함을 확인하였다. 본 실험의 결과로 본 약제가 실험실에 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하고 소동물 모델에 혈관 손상 후 신내막 증식을 억제하였으므로 보다 큰 동물의 재협착 모델에서 신내막 증식 억제에 대한 실험이 필요하리라 생각된다. 또한 약제의 독성이나 안정성을 고려하여 경구투여의 임상적 적용은 제한이 있을 것이라 생각된다. 그러나, 추후 약제의 물성을 변경시켜 독성을 줄여 경구 투여가 가능한 형태로 개발하거나 약제 삽입 스텐트(drug coating stent) 등의 다양한 형태의 관동맥 성형술 후 재협착 치료제로서의 가능성을 전망할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구의 제한점

첫째로, 본 연구는 FTI의 다양한 세포 내 기전에 대

한 연구를 선행하지 않아 평활근 세포에 대한 효과의 기전을 설명할 수 없었다. 추후 apoptosis 등 세포내 기전에 대한 추후 연구가 필요하리라 생각된다. 둘째로, 고용량 투여군에서 많은 수가 사망되어 추후 고용량 투여 시 약제 독성에 대한 추가 검토가 되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적 :

신내막 증식에 혈관 평활근 세포가 중요한 역할을 하며 세포 내에서 활성화된 ras-proteins이 protooncogene을 활성화 시켜 세포의 활성화가 촉진된다고 알려져 있다. 이런 ras-protein의 활성화에 farnesyl transferase에 의한 catalyze가 key step으로 중요한 역할을 하여 본 연구에서 farnesyl transferase inhibitor(이하 FTI)가 실험실내에서 혈관 평활근 세포의 증식억제 및 생체 내에서 풍선 손상 후 신내막 증식 억제 효과에 대한 작용을 검증하고자 하였다.

방 법 :

실험실내에서 혈관 평활근의 세포 증식에 관한 FTI의 효과를 분석하기 위해 흰쥐 대동맥의 혈관 평활근을 사용하였고, FTI에 의한 혈관 평활근 세포의 증식의 정도를 알기 위해 MTT test[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma)]를 시행하였다. 흰쥐의 경동맥 손상 모델에서 실험 군으로 대조군, 저용량 투여군(10 mg/kg, bid), 중간용량 투여군(50 mg/kg, bid), 고용량 투여군(100 mg/kg, bid)으로 나누어 손상 후 2주째 희생시켜 얻은 경동맥 표본을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 평활근 세포의 증식을 생체에서 확인하기 위해 경동맥 손상 후 3일째 희생하여 PCNA 염색을 하였다.

결 과 :

PDGF-BB(5 ng/mL) 자극 혹은 FBS 첨가하에 혈관 평활근 세포를 배양하면서 FTI를 농도별로 20분간 처리 한 후 3일 간 지속적인 배양을 시행하였고 FTI농도가 증가할수록 MD 활성화도는 감소하였고 대조군에 비하여 유의한 점진적 감소 소견을 보였다($p < 0.005$). 흰쥐의 경동맥 손상 모델에서 내막면적은 대조군이 $0.35 \pm 0.04 \text{ mm}^2$, 저용량 약제 투여군이 $0.23 \pm 0.04 \text{ mm}^2$, 중간용량 약제 투여군이 $0.19 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 로 중간용량 약제 투여군이 대조군에 비해 유의하게 작은 값을 보였

으며($p<0.05$), 저용량 약제 투여군과는 유의한 차이가 없었다. 내강 면적은 대조군 $0.14\pm0.02\text{ mm}^2$, 저용량 약제 투여군 $0.11\pm0.03\text{ mm}^2$, 중간용량 약제 투여군 $0.21\pm0.02\text{ mm}^2$ 로 중간용량 약제 투여군이 저용량 약제 투여군과 대조군에 비해 유의하게 큰 값을 보였다($p<0.05$). PCNA 면역 조직화적분석의 결과 표지지수 (labelling index)는 대조군 71 ± 9 , 저용량 약제 투여군 73 ± 9 , 중간용량 약제 투여군 54 ± 14 , 고용량 약제 투여군 53 ± 9 로 중간용량 약제 투여군과 고용량 약제 투여군에서 대조군과 저용량 약제 투여군에 비하여 유의하게 낮았다($p<0.05$).

결론 :

이상의 결과로 흰쥐의 혈관 평활근 세포의 증식을 FTT가 농도가 증가함에 따라 세포의 증식을 억제하였고, 흰쥐의 경동맥 손상 모델에서 신내막 증식에 대한 약제의 효과는 용량이 증가할수록 신내막 면적의 감소가 관찰되었다.

중심 단어 : Farnesyl transferase inhibitor ; 신내막 ; 평활근 세포.

본 연구비는 2000년도 연세대학교 원주의과대학 교수 연구비 지원으로 이루어짐.

REFERENCES

- 1) Gruentzig AR, Senning A, Siegenthaler W. Nonoperative dilation of coronary artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1979;301:61-8.
- 2) McBride W, Lange RA, Hillis LD. Restenosis after successful coronary angioplasty: pathophysiology and prevention. *N Engl J Med* 1988;318:1734-7.
- 3) Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:616-23.
- 4) Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res* 1990;67:651-9.
- 5) Casscells W, Engler D, Willerson JT. Mechanisms of restenosis. *Tex Heart Inst J* 1994;21:68-77.
- 6) Isner JM, Walsh K, Rosenfield K, Schainfeld R, Asahara T, Hogan K, Pieczek A. Arterial gene therapy for restenosis. *Hum Gene Ther* 1996;7:989-1011.
- 7) Gibbs JB, Graham SL, Hartman GD, Koblan KS, Kohl NE, Omer CA, Oliff A. Farnesyltransferase inhibitors versus Ras inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 1997;1:197-203.
- 8) Kohl NE, Koblan KS, Omer CA, Oliff A, Gibbs JB. Biochemical and biological analyses of farnesyl-protein transferase inhibitors. *Methods Mol Biol* 1998;84:283-91.
- 9) Qian Y, Sebt SM, Hamilton AD. Farnesyltransferase as a target for anticancer drug design. *Biopolymers* 1997;43:25-41.
- 10) Kelloff GJ, Lubet RA, Fay JR, Steele VE, Boone CW, Crowell JA, Sigman CC. Farnesyl protein transferase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:267-82.
- 11) Liu M, Bryant MS, Chen J, Lee S, Yaremko B, Li Z, Dell J, Lipari P, Malkowski M, Prioli N, Rossman RR, Korfmacher WA, Nomeir AA, Lin CC, Mallams AK, Doll RJ, Catino JJ, Girijavallabhan VM, Kirschmeier P, Bishop WR. Effects of SCH 59228, an orally bioavailable farnesyl protein transferase inhibitor, on the growth of oncogene-transformed fibroblasts and a human colon carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:50-8.
- 12) Mangues R, Corral T, Kohl NE, Symmans WF, Lu S, Malumbres M, Gibbs JB, Oliff A, Pellicer A. Antitumor effect of a farnesyl protein transferase inhibitor in mammary and lymphoid tumors overexpressing N-ras in transgenic mice. *Cancer Res* 1998;58:1253-9.
- 13) Aoyama T, Satoh T, Yonemoto M, Shibata J, Nonoshita K, Arai S, Kawakami K, Iwasawa Y, Sano H, Tanaka K, Monden Y, Kodaera T, Arakawa H, Suzuki-Takahashi I, Kamei T, Tomimoto K. A new class of highly potent farnesyl diphosphate-competitive inhibitors of farnesyltransferase. *J Med Chem* 1998;41:143-7.
- 14) Chemla E, Castier Y, Julia P, Pirottski E, Carpentier A, Fabiani JN. Inhibition of intimal hyperplasia by an antisense oligonucleotide of farnesyl transferase delivered endoluminally during iliac angioplasty in a rabbit model. *Ann Vasc Surg* 1997;11:581-7.
- 15) Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Du J, Negre-Aminou P, Valentijn AR, Overhand M, van der Marel GA, van Boom JH. Inhibition of human smooth muscle cell proliferation in culture by farnesyl pyrophosphate analogues, inhibitors of in vitro protein: farnesyl transferase. *Biochem Pharmacol* 1999;57:365-73.
- 16) Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, van Thiel GC, van Leeuwen RE, Cohen LH. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:259-68.
- 17) Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: v. role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation. *Lab Invest* 1989;60:360-4.
- 18) Himmelfarb J, Couper L. Dipyridamole inhibits PDGF- and bFGF-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Kidney Int* 1997;52:1671-7.
- 19) Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:418-32.
- 20) Yoon YS, Jang YS, Chung KH, Kim HK, Park YS, Kang WC, Kwon JW, Chung BY, Cho SH, Kim SS. The effect of estrogen containing liposome local delivery on the neointimal hyperplasia in the rat carotid artery balloon-injury model. *Korean Circ J* 1998;28:1357-71.