

백서 경동맥 재협착 모델에서  
Dominant Negative Insulin-like  
Growth Factor 1 Receptor를  
이용한 유전자 치료

연세대학교 대학원

의과학과

임 현 정

백서 경동맥 재협착 모델에서  
Dominant Negative Insulin-like  
Growth Factor 1 receptor를  
이용한 유전자 치료

연세대학교 대학원

의과학과

임 현 정

백서 경동맥 재협착 모델에서  
Dominant Negative Insulin-like  
Growth Factor 1 Receptor를  
이용한 유전자 치료

지도교수 조 승 연

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

임 현 정

# 임현정의 박사 학위논문을 인준함

심사위원

인

---

심사위원

인

---

심사위원

인

---

심사위원

인

---

심사위원

인

---

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

## 감사의 글

지도 교수님이신 조승연 교수님과 논문의 길잡이 역할을 해주신 박현영 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문에 대해 세심한 관심을 가져주신 장양수 교수님, 조상호 교수님, 김정섭 교수님, 유경종 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 언제나 관심과 격려로 지켜 봐 주셨던 이희란 교수님과 정광희 교수님을 비롯한 심혈관 연구소 모든 교수님께도 감사드립니다. 몇 년간의 실험실 생활 동안 함께 했던 심혈관 연구소의 모든 동료와 후배 모두에게도 고마움을 전하며 보다 나은 내일이 함께 하길 바랍니다.

오랜 시간 함께 하며 힘이 되어준 수현이, 바쁜 저를 대신해 아이들 육아에 보탬을 준 은하, 점룡이, 킨더슬레 선생님들과 승민이, 지윤이 어머니에게도 감사의 마음을 전합니다.

이 길을 갈 수 있도록 한결같은 믿음과 변함없는 따뜻한 마음으로 살피주신 아버지, 어머니, 그리고 바빠하며 제대로 며느리 노릇 못해도 항상 걱정해 주시고 어려운 일 생기면 한달음에 달려와 주시던 아버님, 어머님께 깊은 감사의 마음을 드립니다. 엄마의 손길이 가장 필요한 시기에 유치원과 놀이방을 오가며 일찍부터 혼자하기에 익숙해져 버린 사랑하는 우리 정아, 정주와 곁에서 함께 힘들어 해주고 격려를 아끼지 않았던 오랜 친구이며 더불어 사는 김용환님에게 미안함과 고마움을 전하며 이 결실을 드리고자 합니다.

임현정 씀

# 차 례

국 문 요 약 .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재 료 및 방 법 .....	9
1. 대상 세포주 및 세포 배양 .....	9
2. 재조합 adenovirus 제조 및 virus 생산 .....	9
3. Western blot과 조직 면역학적 염색 .....	11
4. 평활근 세포에서 세포증식 및 DNA 합성 분석 .....	12
5. 세포 이동 측정 .....	12
6. FDA (fluorescein-di-acetate) 염색 .....	13
7. LDH (lactate dehydrogenase) 활성 측정 .....	13
8. 세포고사 확인 및 TUNEL 분석 .....	13
9. 유전자 전달 효율 검증 .....	14
10. Quantitative PCR을 이용한 adenovirus 감염 정도 분석 .....	15
11. 백서 풍선확장 손상 유발 및 유전자 전달 .....	15
12. 면역 조직화학 검사 및 형태학적 분석 .....	16
III. 결 과 .....	17
1. 혈관 평활근 세포에서의 DN-IGF-1R 및 -gal 유전자 발현 검증 .....	17
2. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 증식 억제 효과 .....	20
3. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 이동 <sup><math>\beta</math></sup> 억제 .....	20

4. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 생존 효과	24
5. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 세포고사 유도	24
6. DN-IGF-1R 과발현에 의한 세포내 신호 전달체계의 변화	24
7. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여 후 백서 경동맥에서의 유전자 발현	29
8. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여에 따른 백서의 각 장기 조직별 안전성	29
9. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여가 혈관 손상 후 신생 내막 형성에 미치는 영향	35
10. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여에 따른 백서 경동맥 손상 모델에서 조직학적 소견	35
IV. 고찰	39
V. 결론	44
참고 문헌	46
영문 요약	52

## 그림 차례

Figure 1. Schematic presentation of molecular mechanism of restenosis .....	4
Figure 2. Schematic representation of IGF-1R structure .....	6
Figure 3. Construction of adenoviral vectors expressing DN-IGF-1R and $\beta$ -gal .....	10
Figure 4. $\beta$ -gal expressions in different cell lines .....	18
Figure 5. Expression of DN-IGF <sup><math>\beta</math></sup> -1R in rVSMCs .....	19
Figure 6. Effects of viral dose on proliferation of DN-IGF-1R overexpressing rVSMCs .....	21
Figure 7. Effects of growth factors on proliferation of DN-IGF-1R overexpressing rVSMCs .....	22
Figure 8. Effects of DN-IGF-1R overexpression on DNA synthesis .....	23
Figure 9. Effects of DN-IGF-1R overexpression on migration of rVSMCs .....	25
Figure 10. Effects of DN-IGF-1R overexpression on cell survival of rVSMCs .....	26
Figure 11. Microscopic image using DAPI in the adenoviral vector infected rVSMCs .....	27



Figure 12. Flow cytometric analysis in DN-IGF-1R and $\beta$ -gal overexpressing rVSMCs .....	28
Figure 13. Expression <sup><math>\beta</math></sup> of phospho-Erk1/2 and phospho-Akt in rVSMCs .....	30
Figure 14. Expression of caspase-3, PCNA and HSP70, in rVSMCs .....	31
Figure 15. <i>In situ</i> expression of $\beta$ -gal in rat carotid arteries .....	32
Figure 16. <i>In situ</i> expression of DN-IGF-1R <sup><math>\beta</math></sup> in rat carotid arteries .....	33
Figure 17. Expression of adenoviral genomes in various tissues after local infection .....	35
Figure 18. Effects of DN-IGF-1R overexpression on neointima formation .....	36
Figure 19. Effects of DN-IGF-1R overexpression on apoptosis in carotid arteries .....	37
Figure 20. Effects of DN-IGF-1R overexpression on cell proliferation in arterial sections .....	38

## 국문요약

### 백서 경동맥 재협착 모델에서 Dominant Negative Insulin-like Growth Factor 1 Receptor를 이용한 유전자 치료

관동맥 질환의 치료에 혈관 성형술이 널리 이용되고 있으나 30-40%의 재협착율이 중요한 임상적 문제로 남아 있다. 이런 재협착은 일종의 상처 치유 과정에서 중막의 혈관 평활근 세포가 내막으로 이동하여 증식함으로써 발생된다. 이 과정에는 다양한 성장 인자와 cytokine이 관계하는 것으로 알려져 있고, 유사한 발생 기전을 가진 동맥경화의 진행에 성장 인자인 IGF-1 (insulin-like growth factor 1)이 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. IGF-1과 IGF-1R의 발현이 재협착 경동맥에서 증가되어 있고, 또한 IGF-1 유전자를 과발현 시킨 transgenic mice에서 혈관 평활근 세포 증식이 발생되었으며, IGF-1을 억제한 경우 백서 경동맥 모델에서 혈관 평활근 세포 증식 억제 등의 결과들은 IGF-1이 재협착의 주된 원인인 혈관 평활근 세포의 이동과 증식에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 뒷받침해 주고 있다.

본 연구는 dominant negative IGF-1R (DN-IGF-1R) 유전자를 포함한 adenoviral 벡터를 이용하여 IGF-1/IGF-1R pathway 억제를 유도함으로써 혈관 평활근 세포 이동과 증식에 대한 효과를 알아보려고 하였으며, 이런 IGF-1/IGF-1R pathway 차단에 의해 혈관 손상 이후 발생하는 재협착을 감소시킬 수 있는지 알아보려고 하였다.

그 결과, DN-IGF-1R를 과발현 시킨 혈관 평활근 세포에서 세포 이동과 증식이 억제됨을 확인할 수 있었고, 이런 세포 증식 억제 효과는 과발현된 DN-IGF-1R에 의한 세포고사를 동반함을 관찰하였다. DN-IGF-1R은 IGF-1 특이적 반응 뿐 아니라 PDGF나 혈청에 의해 유도된 세포 증식도 함께 억제하였다. DN-IGF-1R 과발현에 의한 세포 증식 억제 효과는 혈관 평활근 세포의 PI3kinase 경로와 MAP kinase 경로를 억제하고 세포 생존에 중요한 역할을 하는 HSP70 단백질을 발현을 억제함으로써 유도됨을 확인하였다. 또한 백서 경동맥 손상 모델에서

DN-IGF-1R 유전자 과발현이 혈관 내막의 증식을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

본 연구에서는 백서 경동맥 모델에서 DN-IGF-1R 과발현이 혈관 성형술 이후 발생하는 재협착을 억제할 수 있음을 알 수 있었으며, 이는 DN-IGF-1R 유전자 과발현을 이용한 유전자 치료가 혈관 재협착의 예방 및 치료에 응용될 수 있음을 시사한다.

핵심 되는 말 : IGF-1, Dominant negative IGF-1R, 재협착, 평활근 세포, 세포고사, 세포 증식, adenovirus , 신생내막

---

# 백서 경동맥 재협착 모델에서 Dominant Negative Insulin-like Growth Factor 1 Receptor를 이용한 유전자 치료

<지도교수 조승연>

연세대학교 대학원 의과학과

## 임 현 정

관동맥 협착의 치료에 있어 혈관 성형술이 널리 시행되고 있으나 시술 후 6개월 이내에 30-40%의 높은 재협착을 일으켜 치료의 주요 문제점으로 대두되고 있다.<sup>1-2</sup> 이를 해결하기 위한 노력으로 스텐트 삽입, heparin, 국소 항암제등을 투여하고 있으며, 분자 생물학적인 기전을 바탕으로 세포 증식 시 과발현되는 유전자의 발현 억제나 증식 억제 효과가 있는 유전자 과발현을 유도한 유전자 치료 등에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>3</sup>

일반적으로 관동맥의 재협착은 원래 존재하고 있었던 동맥 경화반에 혈관 확장 시 가해지는 손상의 치유과정에서 일어나는 일종의 과잉 반응으로 인식되고 있다.<sup>4</sup> 즉, 풍선확장 시에 관상동맥 혈관의 손상이 초래되며, 이로 인하여 분비된 여러 cytokine 및 성장 인자들의 자극에 의해 혈관 중막의 평활근 세포가 활성화되고 혈관 내막 하로 이동, 증식함으로써 혈관 내경을 감소시켜 재협착을 가져온다고 알려져 있다 (Figure 1).<sup>5</sup> 혈소판 뿐 아니라 혈관 내피 세포, 대식 세포 및 평활근 세포에서 재협착에 관여하는 다양한 성장인자 및 cytokine등이 생성되고 이들은 세포 표면의 수용체와 결합하여 세포주기 조절인자 중 세포증식을 유도하는 물질의 생성을 촉진한다.<sup>6-7</sup> 이러한 성장 인자들에 의해 혈관 평활근 세포의 기능이 contractile 상태에서 synthetic 상태로 전환되며, synthetic 상태의 평활근 세포는 세포외 기질을 생성, 분비하여 증식된 평활근 세포와 함께 새로운 내막을 형성하게 되어 재협착을 초래한다.

재협착 예방을 위한 유전자 치료는 평활근 세포의 증식을 억제하는 것을 기본 목적으로 세포 증식의 억제와 내피 세포의 증식을 유도하는 유

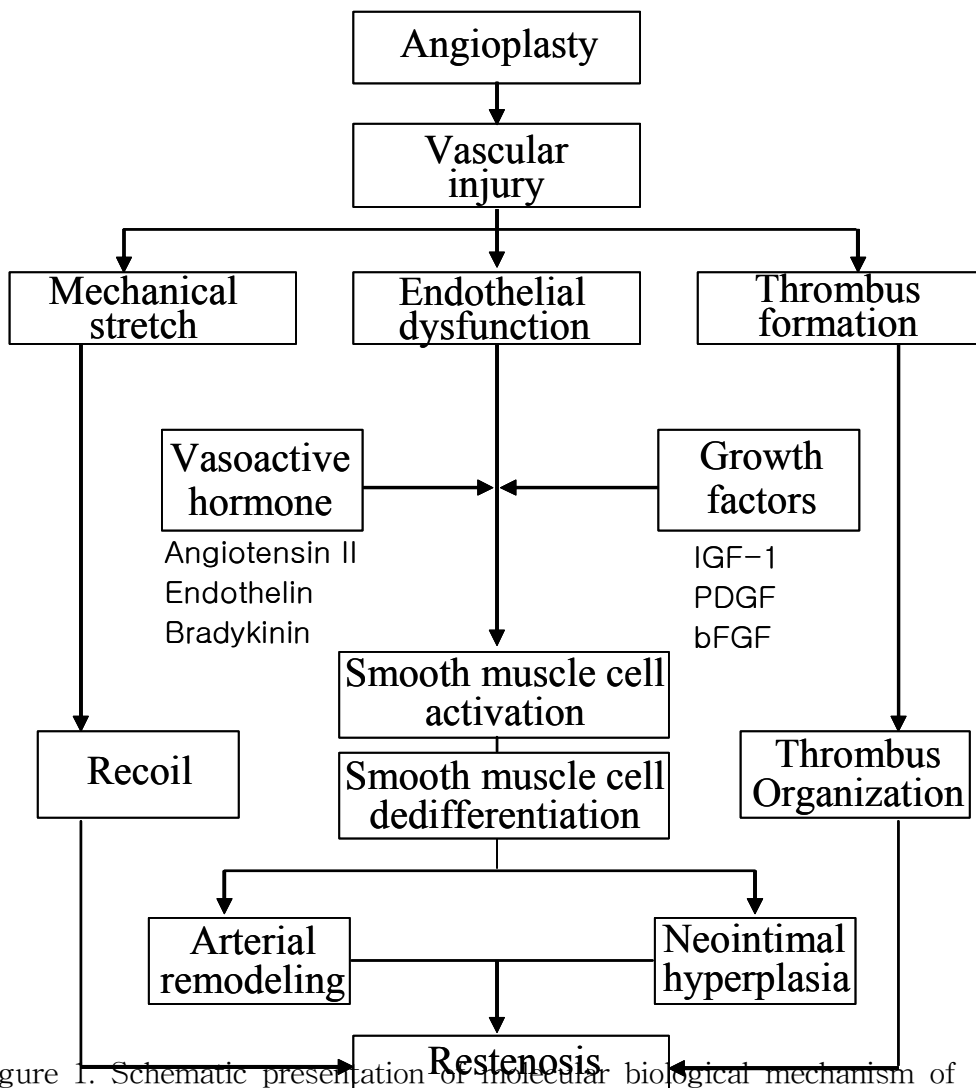


Figure 1. Schematic presentation of molecular biological mechanism of restenosis. Following balloon angioplasty, recoil occurs followed by activation of growth factors and smooth muscle cell proliferation. Following intracoronary stent placement, the majority of lumen loss is from neointimal hyperplasia. In most cases the mechanism of restenosis are likely interrelated. Modified from textbook of cardiovascular medicine. Lippincott-Raven publishers ; 1998.

전자를 전달하고자 하는 방향으로 연구들이 진행되어 왔다. 즉, HSV-tk (herpes simplex virus-thymidine kinase), p53, p21 등의 암 억제 유전자를 이용하여 세포 주기를 차단하거나, PDGF (platelet-derived growth factor) 수용체 억제제인 TK1963을 이용하여 PDGF 수용체의 tyrosine kinase를 억제함으로써 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동을 억제하거나 bFGF (basic fibroblast growth factor)의 기능과 세포외 기질의 기능을 저해하는 pI-88 (phosphomannopentaose sulfate)를 사용하여 성장 인자 신호 전달 과정을 차단하는 유효한 방법으로 진행되어 왔다.<sup>8-9</sup> 또한 혈관 평활근 세포 성장을 억제하는 것으로 알려진 약제 (dexamethasone, estrogen)들이 동물 실험을 통해 재협착 방지에 효과가 있음이 알려지면서 많은 기대를 모았으나, 임상 시험 결과 만족할 만한 성과를 얻지 못하였고, 최근 방사선 치료, 유전자 요법, 항암제를 이용한 국소 약물요법 등이 시도되고 있으며 일부 연구에서 효과가 있음이 입증되었다.<sup>10</sup> 이러한 결과는 대부분의 임상실험이 재협착 과정에 작용하는 수많은 인자들 중에서 일부만을 표적으로 하였던 것에 기인한다고 생각된다. 따라서 재협착 예방을 위한 유전자 치료는 여러 성장 인자에 공통으로 작용하는 주요 인자를 표적으로 하는 것이 효율적인 것으로 기대된다.

현재까지 혈관 재협착에 관여하는 성장 인자들 중에서 PDGF와 bFGF는 평활근 세포가 세포 분열 주기에 들어가도록 함으로서 평활근 세포 증식에 관여하고, IGF-1 (insulin-like growth factor 1)과 EGF (epidermal growth factor)는 세포 증식의 restriction points 통과를 촉진하는 인자로 IGF-1은 평활근 세포의 이동과 증식, EGF는 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>11-12</sup> IGF-1과 IGF-1 수용체 (IGF-1R)는 평활근 세포를 비롯하여 혈관 내피 세포, 대식 세포 등 여러 종류의 혈관 구성 세포에서 발현된다. IGF-1R은 리간드 결합 domain인 2개의 chain과 세포내 신호전달에 필요한 2개의 chain으로 구성되어 있으며 (Figure 2), IGF-1과 특이적으로 반응하여, 평활근 세포의 증식과 분화에 매우 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>13-14</sup> 섬유아 세포, 평활근 세포, 신경 세포, 심근 세포, 암 세포 등을 비롯한 여러 세포에 강력한 생존 인자로 작용하며 IGF-1과 IGF-1R의 활성화는 여러 방법으로 유발된 세포고사 (apoptosis)를 억제한다고 알려져 있으며<sup>15-16</sup>, IGF-1 특이적 항체 혹은 antisense oligodeoxynucleotide에 의한 세포내 신호

a

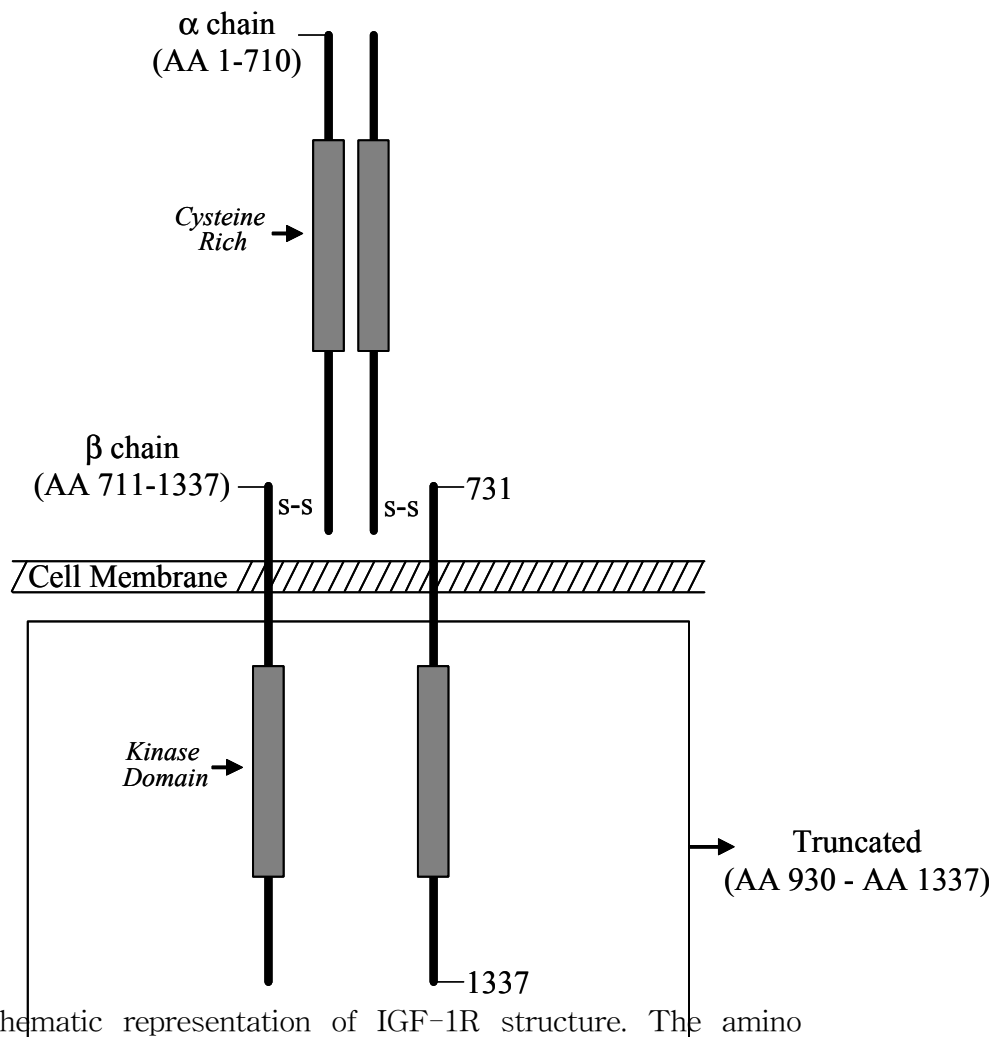


Figure 2. Schematic representation of IGF-1R structure. The amino acids in the  $\beta$  chain at positions from 930 to 1337(box) were deleted for construction of DN-IGF-1R.

$\beta$

전달 체계의 차단은 *in vivo*와 *in vitro*에서 세포고사를 유도한다고 보고 되었다.<sup>17</sup>

또한 IGF-1은 평활근 세포의 이동과 증식에서 PDGF 같은 다른 성장 인자들과 상승효과를 나타내는 것으로 알려졌고<sup>18</sup>, IGF의 성장 촉진 효과는 엔지오텐신이나 섬유아세포 성장 인자의 효과와도 상호 작용하는 것으로 보고 되고 있다.<sup>19</sup> 그러므로 IGF-1과 IGF-1R의 autocrine loop는 IGF-1 뿐 아니라 PDGF, EGF, bFGF 같은 성장 인자의 mitogen 효과와 cell transformation에 있어서 필수 요건이라 할 수 있고<sup>20-21</sup>, 이런 IGF-1과 IGF-1R의 신호 전달 과정을 차단하는 경우 혈관 확장 혹은 손상 후 혈관 평활근 세포의 증식 및 재협착을 효과적으로 억제할 수 있을 것이다. 또한 정상 경동맥에 비해 재협착 조직의 초기 병변에서 혈관 평활근 세포의 IGF-1 발현이 매우 높았지만 손상 몇 달 후 IGF-1 발현이 저하됨을 보고 한 바 있다.<sup>22</sup> 이런 결과는 혈관 손상 초기에 IGF-1에 의해 혈관 평활근 세포의 이동과 증식이 촉진된다는 사실을 뒷받침하고 있다. 더욱이 somatostatin analogues octreotide 와 angiopeptin을 사용하여 IGF-1 발현 수준을 감소시킨 경우 혈관 평활근 증식의 억제와 동물 모델에서 신생내막 형성을 억제한다고 보고 되었다.<sup>23-24</sup> 이러한 연구 결과들은 DN-mutant form의 IGF-1R을 이용하여 IGF-1의 기능을 차단함으로써 재협착을 방지할 수 있는 가능성을 제시하였다.

1990년대 초반 관상동맥 확장술과 같은 손상을 입은 백서 경동맥에서 adenovirus를 이용한 표적 유전자의 발현이 평활근 세포 중 신생내막, 즉 재협착을 이루는 부위에 집중되고 유전자 전달체로서의 가능성을 보고한 이래 adenovirus는 심혈관 질환의 유전자 치료 관련 연구에서 널리 이용되고 있다.<sup>25</sup> Adenovirus의 장점은 세포주기에 상관없이 근육 세포, 내피 세포 등의 다양한 인체 세포에 표적 유전자를 과발현시킬 수 있으며 virus 게놈이 숙주 세포의 염색체내로 삽입되지 않아 insertional mutagenesis의 위험이 없고 생산 역가가 높다는 점이다. 하지만, adenovirus에 대한 염증 및 면역 반응으로 인해 유전자 발현 기간이 짧고 반복 투여 시 효과가 급감하는 것이 단점으로 지적되고 있다. 이를 극복하기 위하여 adenovirus의 변형을 통해 조직 특이성을 증가시키는 방법으로 표적화에 개발을 주력하고 있다.

본 연구의 목적은 adenovirus를 이용하여 DN-IGF-1R유전자를 과발현



시킴으로써 IGF-1/IGF-1R pathway를 차단하였을 때 혈관 평활근 세포 증식을 억제할 수 있는지 알아보고 그 기전에 대해 분석하고자 하였다. 또한 백서 경동맥 재협착 동물 모델에서 DN-IGF-1R를 과발현시킨 유전자 치료가 신생내막 형성 억제에 효과가 있는지 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상 세포주 및 세포 배양

Male Sprague-Dawley rat (300~400 g)의 흉부 대동맥을 적출한 후 혈관 주위의 loose connective tissue를 제거한 다음, 1 mg/ml type II collagenase 와 0.25 mg/ml elastase로 5분간 처리하여 혈관 내피 세포 adventitia를 박리하였다. 얻어진 중막을 잘게 자른 후 다시 type II collagenase와 elastase를 37°C에서 1 시간 처리한 후 원심 분리하여 혈관 평활근 세포를 얻었다. 혈관 평활근 세포의 동정은 특징적인 hills and valleys 패턴과  $\alpha$ -smooth muscle actin 염색으로 확인하였으며, 실험에 사용된 혈관 평활근 세포는 5 계대와 13 계대 사이의 세포를 이용하였다. 재조합 adenovirus의 생산을 위해 293 세포주 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 이용하였다. 293 세포주와 혈관 평활근 세포는 10%의 우태아혈청 (GIBCO BRL, NY, USA)이 함유된 DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium, GIBCO BRL, NY, USA) 배지로 5% CO<sub>2</sub>의 존재 하에서 37°C 배양기에서 배양하였다.

### 2. 재조합 adenovirus 제조 및 virus 생산

심혈관 치료용 유전자 치료제의 제조를 위하여 초기 발현 유전자 E1A/E3가 소실된 adenovirus vector dl309/356에 flag epitope을 포함한 DN-IGF-1R cDNA를 클로닝하였다. 우선 IGF-1R 전체 유전자 중에서 ORF 2982 bp 뒷부분을 제거한 다음 pBluescript 벡터 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 삽입하였다. 삽입된 유전자는 제한 효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 adenovirus의 일부 유전자를 갖는 서플벡터 pCA14 (Microbix, Toronto, Canada)에 첨가하였다. 제 5형 adenovirus인 dl309/356 (Promega, Madison, WI, USA)를 *PacI* 제한 효소를 이용하여 단일 가닥으로 절단한 후 truncated IGF-1R가 포함된 서플 벡터와 재조합 대장균 BJ5183 (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA)에서 상동 재조합을 이용하여 DN-IGF-1R 유전자가 과발현되는 adenovirus (Ad/IGF-1Rt)를

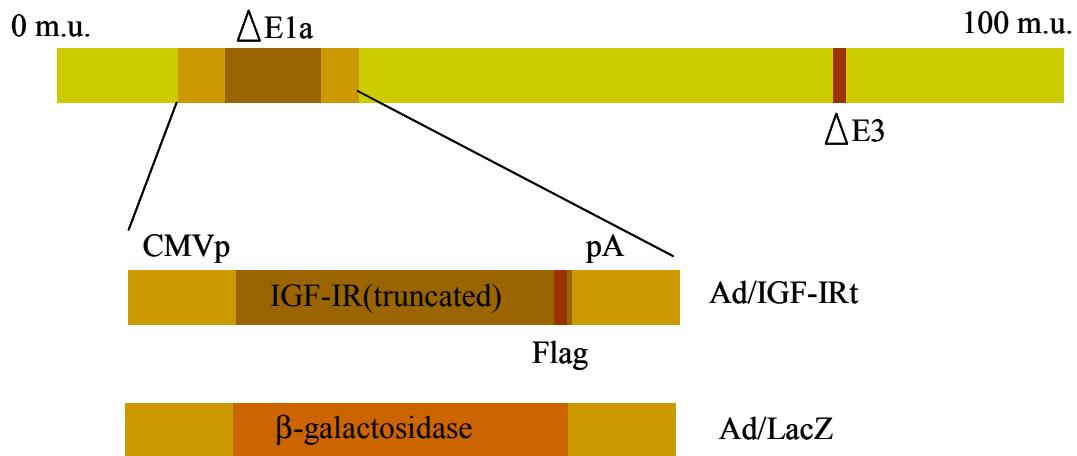


Figure 3. Construction of adenoviral vectors expressing DN-IGF-1R and  $\beta$ -gal. Ad/LacZ contains  $\beta$ -gal gene and Ad/IGF-1Rt contains DN-IGF-1R gene controlled by CMV promoter in the place of E1 gene. Ad/IGF-1Rt vector carries flag epitope (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)<sub>β</sub> to identify expression of recombinant DN-IGF-1R.

제작하였다 (Figure 3). 대조군으로 증식 불능 adenovirus에 -galactosidase (LacZ) 유전자가 내재된 Ad/LacZ을 이용하였다. 지속적인 실험 수행을 위해 virus들은 293 세포주에서 증식시켰으며 CsCl gradient로 농축하여 순수 분리하였다. 293 세포를 70~80% confluence 되도록 준비하고 adenoviral vector를 plate 당 2 MOI (multiplicity of infectivity) virus를 처리하였다. 3~4일 후 virus가 생성되어 plate에서 세포가 거의 떨어지면 pipetting으로 완전히 세포를 떼어내고 이 용액을 3,000 g에서 10분 동안 원심 분리하여 배양액을 따로 모았다. 세포 pellet은 드라이아이스와 37°C 수조에서 얼리고 녹이는 과정을 3회 반복하여 세포를 파괴하였다. 파괴된 세포는 1.5 M NaCl/20% PEG 8,000용액 150 ml을 넣고 4°C에서 12시간 이상 stirring하였다. PEG 8,000으로 virus를 침전시키고 난 다음 원심 분리를 이용하여 11,500 rpm에서 10분 동안 4°C에서 원심 분리시켰다. 세포 pellet을 모아 PBS 완충용액 5 ml에 녹여 다시 3,000 g에서 10분 원심 분리 하였다. 분리한 상층액에 0.5 g/ml의 양으로 CsCl를 섞어 ultra clear tubes에 넣고 80,000 rpm, 10°C, 4시간 동안 원심분리하고, virus 밴드를 0.2 cc 주사기를 이용하여 모은 다음 dialysis bag에 이를 넣고 4°C에서 세 번 투석하였다. 마지막 투석에서 glycerol을 최종 10% 농도가 되도록 첨가하고, 멸균한 1.5 ml tube에 나누어 -70°C에 보관하였고, adenovirus 역가는 293 세포주에서 limiting dilution 방법으로 결정하였다.<sup>26</sup>

### 3. Western blot과 조직 면역학적 염색

10 cm plate에  $2 \times 10^6$ 개의 혈관 평활근 세포를 분주하고 다음날 adenovirus를 MOI 300으로 5 시간 감염시킨 다음 새로운 배지로 교체하고 PBS로 2회 세척한 후 48시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양이 끝나면 PBS로 두 번 세척하고 NP-40과 단백질 inhibitor가 포함된 lysis 용액을 50~100  $\mu$ l 첨가해서 5분 동안 vortex하였다. 4°C에서 30분 방치한 다음 원심 분리하고, 상층액은 Bradford 방법에 따라 단백질 정량을 실시하였다. 이때 단백질 정량의 기준으로 소 혈청 알부민 (BSA)를 사용하였다. 동일량의 단백질을 10 % SDS-PAGE을 이용하여 전기영동 후 PVDF-membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)에 transfer하고 5

μ

% skim milk로 blocking 하였다. Anti-Flag-HRP (Sigma, Louis, MO, USA)(1:1000)로 반응시켜 ECL (Enhanced chemiluminescence detection system)(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)을 이용하여 DN-IGF-1R 발현을 확인하였다.

면역 염색법을 이용한 유전자 발현의 검증은 혈관 평활근 세포를 4 well chamber slides cultures dishes에  $1 \times 10^4$ 개로 분주 후 MOI 200~500의 adenovirus를 감염시키고 anti-Flag-FITC (Sigma; 10 g/ml)로 반응시킨 후 형광 현미경을 이용하여 유전자 발현을 확인하였다.

Ad/IGF-1Rt를 처리한 다음 조직과 세포에서 신호 전달체의 변화는 Anti-p-Erk1/2 (1:1000), Anti-p-Akt (1:1000), Anti-Erk1/2 (1:1000), Anti-Akt (1:1000) Anti-PCNA (1:1000), Anti-Caspase-3 (1:1000), Anti-HSP70 (1:1000) (SantaCruz, SantaCruz, CA, USA)등의 항체를 사용하였다.

#### 4. 혈관 평활근 세포에서 세포 증식 및 DNA 합성 분석

96 well plate에  $5 \times 10^3$  혈관 평활근 세포를 분주 후 60% confluence 상태가 되면 혈청이 없는 배지에서 24 시간 처리하여 세포 주기를 균일하게 한 뒤 치료 유전자와 리포터 유전자를 가진 adenovirus를 5 시간 감염시켰다. 감염 후 시간에 따른 MTT 분석과 3일째 thymidine incorporation 분석을 수행하였다. DNA 합성을 조사하기 위해 0.5 Ci/ml/well의  $^3\text{H}$ -thymidine를 4 시간 동안 처리 후 세척하고 3일 뒤에 세포를 떼어 내어  $\beta$ -counter를 이용하여 측정하였다. 이상의 실험은 각각 세 번 정도의 반복 과정으로 실행하였다.

μ

#### 5. 세포 이동 측정

혈관 평활근 세포의 이동을 측정하는 방법으로는 가장 보편적인 방법인 Boyden chamber 분석법을 변형하여 사용하였다.<sup>27</sup> Adenovirus 벡터로 감염시킨 다음 48 시간 경과한 후, 세포수를 결정하고 1% BSA를 함유한 배지로 세포 농도를  $5 \times 10^4$  cells/100 μl 되도록 한다. Lower chamber에 혈청이 제거된 배지를 100 μl 첨가하고 upper chamber (8-

μ

μ

μ

m pore size transwell)(Costar, Cambridge, MA, USA)에  $5 \times 10^4$  개의 세포를 분주 후 최소 7 시간 이상 배양기에서 방치하였다. 아래쪽으로 이동한 세포만을 관찰하기 위하여 transwell의 위쪽에 붙어있는 세포는 면봉을 이용하여 제거하고 crystal violet을 이용하여 세포를 염색 후 400 배 현미경하에서 관찰하였다. 이동한 세포수는 well 당 10 field 이상에서 측정하여 평균값으로 비교하였다.

#### 6. FDA (fluorescein-di-acetate) 염색

감염된 혈관 평활근 세포 배양액에 15 g/ml FDA (Sigma, Louis, MO, USA)를 3분 동안 실온에서 처리한 후 세포는 fluorescence scope (Axiovert 200; Zeiss, Greenvale, NY, USA)하에서 관찰하였다. 생존 세포에서 FDA가 세포막 효소, esterase에 의해 흡수되어 초록색의 형광을 나타내게 된다.

#### 7. LDH (lactate dehydrogenase) 측정

배양 용액 내 LDH의 활성은 LDH/LD 표준시약 (Sigma, Louis, MO, USA)으로 Beckman DU-640 (Beckman, Corona, CA, USA) 흡광 광도계를 이용하여 enzyme dynamic 방법에 의해 측정되었다. LDH reagent를 준비하고 340 nm 파장에서 보정하고 sample start reagent 2.5 ml에 시료를 100  $\mu$ l 첨가하고 30초 후 1분, 2분, 3분 동안 340 nm 파장에서 OD를 읽는다. 분당 파장 변화를 결정하고 kit에 지시된 수식에 따라 LDH 활성을 계산하였다.

#### 8. 세포고사 확인 $\mu$ 및 TUNEL 분석

Adenovirus가 처리된 혈관 평활근 세포  $5 \times 10^5$  개를 원심 분리하여 모아, 500  $\mu$ l ice-cold PBS 용액으로 두 번 세척한 다음 80% 에탄올로  $-20^\circ\text{C}$ 에서 1시간 고정시켰다. 고정이 끝나면  $4^\circ\text{C}$ , 800 rpm에서 5분간 원심분리하고 세포 pellet에 500  $\mu$ l의 0.1% triton X-100/0.1% trisodium citrate 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 다시 PBS로 세척

하고 50 g/ml propidium iodide와 50 g/ml RNase로 처리한 다음 37°C에서 반응시키고 FACS scan을 이용하여 DNA content를 측정하였다.

세포고사의 특징인 핵의 분절화는 세포 배양액을 제거한 뒤 PBS로 두 번 수세하고 DAPI를 PBS 용액에 0.5 g/ml 농도로 희석하고 100 μl 첨가 하여 형광현미경 하에서 관찰하였다.

조직에서의 세포고사는 TUNEL 분석을 이용하여 분석하였다. 파라핀 포매 조직에서 xylene과 ethanol을 이용하여 파라핀을 제거하고 함유하였다. 슬라이드를 10 mM citric acid 용액에 넣고 전자레인지에서 1분간 가열 후 슬라이드는 수세하고 PBS 용액에 방치하였다. 조직 위에 1X equilibration buffer를 두 방울 떨어뜨린 후, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 이용하여 분절화된 DNA의 양쪽 끝에 digoxigenin이 결합되어 있는 DNA를 연결시킨 후 FITC가 결합된 digoxigenin 항체와 반응시켰다. 이렇게 표지된 DNA 절편들을 형광현미경하에 관찰하였다.

## 9. 유전자 전달 효율 검증

6-well plate에 혈관 평활근 세포와 293 세포를 well 당  $1 \times 10^6$  개를 분주한 다음, 80% confluence해지면 Ad/LacZ를 다양한 MOI로 처리하였다. Virus 용액은 동일 용적의 배지에 희석하여 사용하였다. 감염 5시간 후 세포 배양액을 갈아주고 처음 감염 시간부터 48 시간이 지난 다음 -gal 유전자 발현 정도를 x-gal 염색을 통하여 분석하였다. X-gal 염색은 우선 감염시킨 세포를 0.2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde로 실온에서 5분 동안 고정한 후 PBS 용액으로 간단히 세척한 다음 0.4 mg/ml X-gal, 4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl<sub>2</sub> 으로 37°C에서 4시간 이상 반응 시켰다. 유전자 전달 효율은 100 μm 현미경하에서 -gal을 생산하는 푸른색 콜론의 평균 개수로 결정하였다. 조직에서의 -gal 유전자 발현은 조직을 적출 후, cryocut하여 5 μm 두께로 준비하고 세포에서와 동일한 방법의 x-gal 염색법으로 adenovirus 감염 정도를 관찰하였다.

X β  
β

μ

## 10. Quantitative PCR을 이용한 adenovirus 감염 정도 분석

유전자 전달 후 백서 경동맥 및 각 장기에서 adenovirus 감염 정도를 확인하기 위하여 viral 벡터 감염 후 3 일 뒤 백서의 각 장기 조직을 적출하였다. Adenovirus로 감염된 백서의 경동맥 및 각 장기의 DNA 추출은 tissue DNA extraction kit (DNeasy tissue kit)(QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하였고, 추출된 DNA 50 ng은 adenovirus E4 upstream 부분의 primer를 이용하여 TaqMan assay를 이용한 quantitative PCR을 수행하였다. Sense primer는 5'-ACA ACT CCA AGT GCA TAC TC-3' 으로 antisense primer는 5'-CTG ATC AGC GTT TGG CTC GA-3'을 이용했으며, probe primer로는 6FAM-CTG GTC TGG CCA CAA CTA CAT TAA-TRMRA (applied Biosystems)을 사용하였다. PCR 반응액에는 1× TaqMan Buffer A; 0.4 mol/L sense, antisense primer ; 50 nmol/L probe ; 0.2 mmol/L dATP, dCTP, dGTP; 0.4 mmol/L dUTP ; 4.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 2.5 units of AmpliTaq GOLD polymerase; 0.5 units of AmpErase UNG가 첨가되었고, 반응 조건은 50°C, 2분; 95°C, 10분 시킨 다음 95°C, 15초; 60°C, 1분으로 40회 반복하였다. 실험 결과는 sequence detection system unit을 사용하여 알고 있는 virus copy number를 기준으로 세포 당 copy수를 결정하였다.

μ

## 11. 백서 풍선확장 손상 유발 및 유전자 전달

체중 0.3~0.4 kg의 백서에 ketamin (50 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)을 근육 내 주사하여 마취시키고, 수술대에 고정시켰다. 백서 경부 정중부 피부를 수직으로 절개하고 경동맥을 노출시킨 후 2F fogarty embolectomy catheter를 내경 동맥을 통해 삽입하여 총 경동맥에 위치시킨 후, 풍선을 확장시켜 2~3회 이상 전후로 움직여 혈관 내벽 손상을 유발시켰다. 대조군에는 각각 생리 식염수, Ad/LacZ를 투여하였으며 실험군으로 DN-IGF-1R 유전자가 들어간 adenovirus 벡터 Ad/IGF-1Rt를  $1 \times 10^9$  virus/100 l로 20분 동안 local retention을 통해 주입시켰다. 내경 동맥을 결찰하고 혈류 흐름을 확인한 뒤 피부 절개를 봉합하였다. 손상 2 주일 뒤 백서를 위와 동일한 방법으로 수술을 시행하여 경동맥을



적출하였다.

## 12. 면역조직 화학 검사 및 형태학적 분석

경동맥은 2 % 포르말린 용액에 고정시키고 파라핀 블록을 만들었다. 5 m 간격으로 혈관 주행에 수직으로 절편을 만들고 hematoxylin-eosin 염색 및 세포고사와 관련된 다양한 일차 항체를 이용하여 염색하였다. 신생<sup>μ</sup>내막 면적과 두께는 digital camera-generated photomicrographs를 이용하여 IEL (internal elastic lamina)과 EEL (external elastic lamina)을 측정하고, linear regression 분석 프로그램을 이용하여 4배 현미경하에서 3회 이상 반복 측정하였다.

### III. 결과

#### 1. 혈관 평활근 세포에서 DN-IGF-1R 및 $\beta$ -gal 유전자 발현 검증

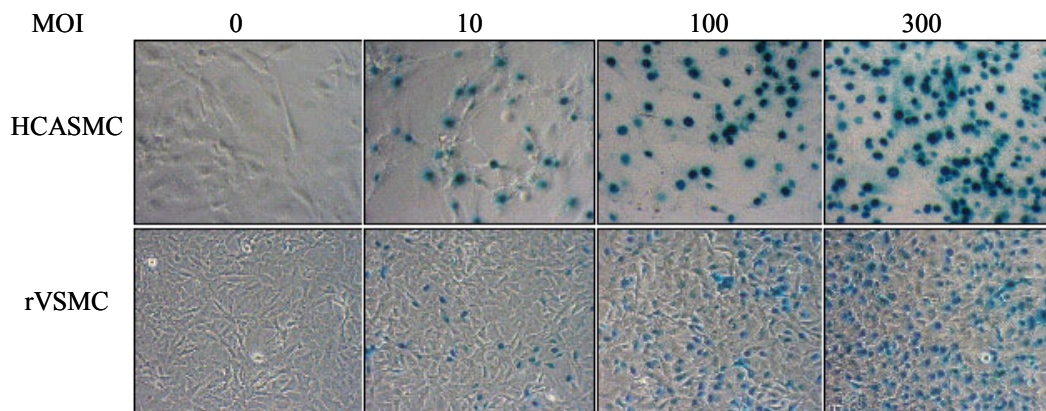
제작된 adenovirus에 의한 유전자 전달 효율을 알아보기 위하여 Ad/LacZ를 각각 여러 농도의 역가로 이틀 동안 감염시킨 다음 각각의 세포에서 x-gal 염색을 통해 발현 정도를 관찰하였다 (Figure 4). 암 세포와 정상 세포 모두에서 감염시킨 virus 역가에 비례하여  $\beta$ -gal 발현이 증가함을 알 수 있었다. 암 세포에서는 낮은 역가 (MOI 10, MOI 30)에서도  $\beta$ -gal의 높은 발현을 유도하였으나 (Figure 4B), 사용된 정상 세포주인 혈관 평활근 세포들에서는 MOI 100 또는 MOI 300 등의 높은 역가에서도  $\beta$ -gal의 발현이 암 세포에 비해 낮게 나타남을 관찰하였다 (Figure 4A). 이를 바탕으로 본 실험에서는 혈관 평활근 세포의 유전자 전달 효율이 50% 이상 나타나는 MOI 300를 기준으로 실험을 진행하였다.

혈관 평활근 세포에서 Ad/LacZ 및 Ad/IGF-1Rt MOI 300으로 감염 후, 3일째 각각의 세포를 얻어 제작된 adenovirus에 클로닝된 flag에 대한 항체를 이용하여 western 분석을 시행한 결과, Ad/LacZ가 감염된 음성 대조군과 어떤 처리도 하지 않은 대조군에서는 anti-flag-HRP 발현을 전혀 볼 수 없었으나 Ad/IGF-1Rt 감염된 혈관 평활근 세포에서는 DN-IGF-1R의 c-terminal에 첨가한 flag 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 5A).

Flag를 이용한 DN-IGF-1R의 발현은 유세포 분석을 이용하여 재확인하였다. 앞선 western 분석에서와 동일하게 Ad/IGF-1Rt와 Ad/LacZ를 MOI 300의 역가로 혈관 평활근 세포에 각각 감염시키고 3 일 뒤 세포를 회수하여 flag로 염색시켰다. Ad/IGF-1Rt의 경우, 음성 대조군으로 감염된 세포에 비해 감지된 파장의 이동을 통해 flag에 염색된 세포수가 유의하게 증가되었음을 관찰하였다 (Figure 5B).

또한, Ad/IGF-1Rt의 발현을 면역 형광 염색 방법을 이용하여 Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포의 세포막에서 flag-FITC 발현 여부를 관찰하였다. 음성 대조군 Ad/LacZ로 감염된 혈관 평활근 세포에서는 FITC 발현을 볼 수 없었으며, Ad/IGF-1Rt를 처리한 세포에서는

### A. Normal cells



### B. Cancer cells

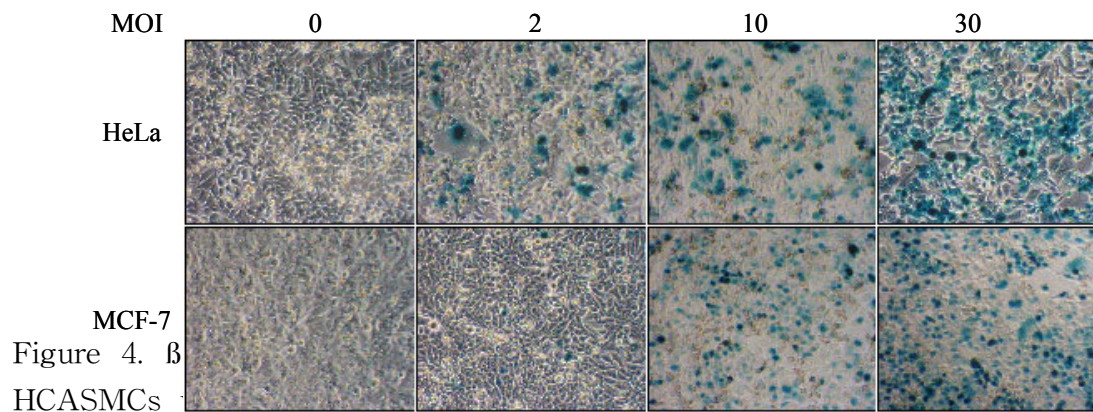
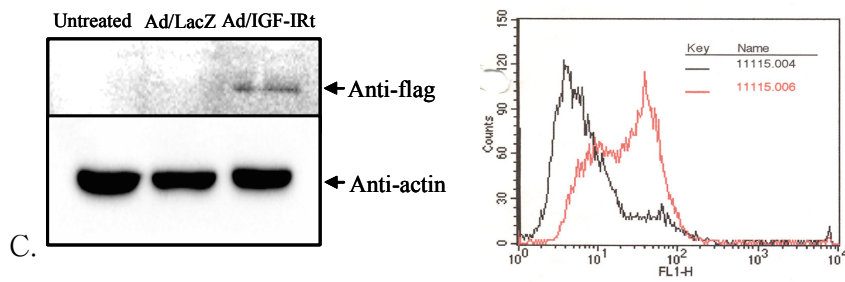


Figure 4.  $\beta$   
HCASMCs

Cancer cells were transfected at MOI of 2 to 30. After 48 hours, the cells on plate were fixed and stained with X-gal. When transfected at more than MOI 300, transfection efficiency was more than 70% in HCASMCs and rVSMCs. In HeLa cells and MCF-7 cells 70% of transfection efficiency was achieved when transfected with a MOI of 10. rVSMCs ; rat vascular smooth muscle cells, HCASMCs ; human carotid artery smooth muscle cells.

A.

B.



C.

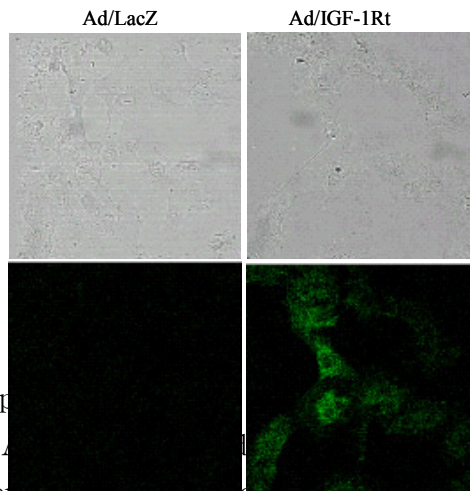


Figure 5. Expression and localization of Ad/IGF-1Rt in rVSMCs. rVSMCs were infected with Ad/IGF-1Rt and Ad/LacZ at 300 of MOI. rVSMCs infected with Ad/IGF-1Rt were subjected to staining with FITC- or TRITC-conjugated anti-flag monoclonal antibody. A, Western blot analysis of Ad/IGF-1Rt in rVSMCs. Cells were infected with Ad/LacZ and Ad/IGF-1Rt at 300 of MOI. In rVSMCs treated with Ad/LacZ or untreated was not detected flag epitope, whereas rVSMCs infected with Ad/IGF-1Rt showed the expression of flag epitope. B, DN-IGF-1R expression panel of rVSMCs analyzed by FACS with FITC-conjugated anti-flag antibody. The intensity of fluorescence was increased when the cells were infected with Ad/IGF-1Rt, in comparison to Ad/LacZ. C, Immunofluorescence localization of Ad/IGF-1Rt in rVSMCs. Fluorescence was detected only in cytoplasm of rVSMCs infected with Ad/IGF-1Rt .

핵을 제외한 cytoplasm 가장자리에서 FITC 발색을 관찰할 수 있었다 (Figure 5C).

## 2. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포 증식 억제 효과

평활근 세포에서 Ad/IGF-1Rt 감염에 의한 세포 증식의 효과를 알아보기 위해 음성 대조군 Ad/LacZ와 표적 유전자 Ad/IGF-1Rt를 감염시킨 후 세포 증식 정도를 분석하였다. Ad/IGF-1Rt로 감염시킨 경우 IGF-1 (50 ng/ml)과 PDGF (20 ng/ml)에 의해 유도된 혈관 평활근 세포의 증식이 억제되었다 (Figure 6A). 또한, Ad/LacZ와 Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포에서 혈청 2%와 5%로 증식을 유도하였을 경우, Ad/LacZ로 감염된 혈관 평활근 세포에서는 처리하지 않은 대조군과 유사한 증식 양상을 나타내었으나, Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포에서는 세포 증식이 대조군 및 Ad/LacZ 투여군에 비해 유의하게 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Figure 6B).

혈청으로 유도된 혈관 평활근 세포 증식은 adenovirus가 처리되지 않은 실험군과 음성 대조군 Ad/LacZ에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염된 세포에서 3일째부터 세포 성장이 억제되었고 이런 세포 증식의 억제는 5일째까지 지속적으로 관찰되었다 (Figure 7). Adenovirus 발현 효율이 낮은 MOI 100의 역가에서는 세포 증식 억제의 효과가 좀더 완만하게 나타나는 반면 (Figure 7A), 50% 이상의 유전자 발현 효율을 나타내는 MOI 300의 역가 이상에서는 훨씬 급격한 세포 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었다 (Figure 7B).

Ad/IGF-1Rt 감염에 의한 DNA 합성 억제를 확인 하고자, <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation 정도를 비교하였다. 결과에서 보는 것처럼 음성 대조군 Ad/LacZ에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염시킨 실험군에서 혈관 평활근 세포내 DNA 합성이 35.7% 감소되었음을 관찰하였다 (p=0.002)(Figure 8).

## 3. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 이동 억제

*In vitro*에서 혈관 평활근 세포에서 세포 이동 억제의 효과를 분석하

A.

\* \* \*

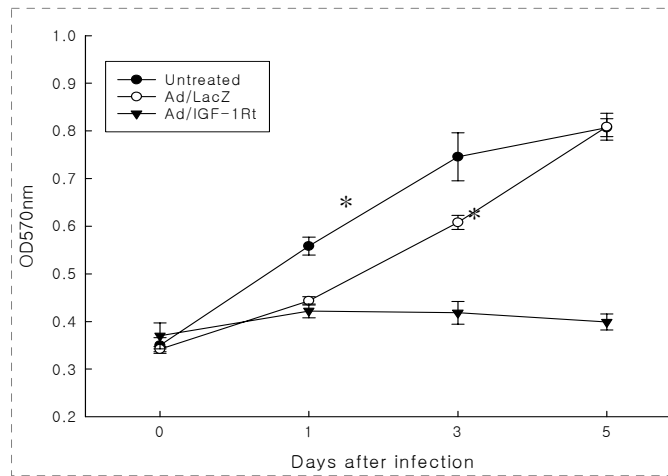
B.

\* \* \*

Figure 6. Effects of viral dose on proliferation of DN-IGF-1R overexpressing rVSMCs. A, Cells were treated with IGF-1 (50 ng/ml) or PDGF-BB (20 ng/ml) for 72 hours. rVSMCs infected with Ad/IGF-1Rt showed inhibited IGF-1 or PDGF induced cell proliferation. B, Cellular proliferation was induced with 2% or 5% serum. There are no significant change in either control or serum-induced cell proliferation in cells treated to Ad/LacZ. However, rVSMCs treated with Ad/IGF-1Rt significantly inhibited cell proliferation. \* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.

A.

MOI 100



B.

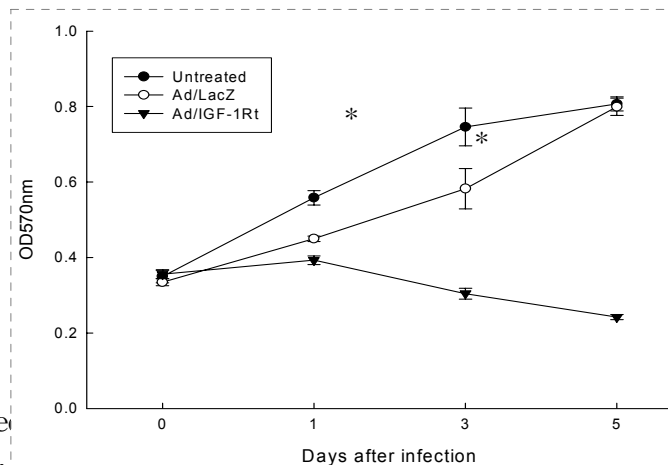


Figure 7. Effect of IGF-1R overexpressing rVSMCs. A and B, rVSMCs were stimulated with 0.1% FBS and uninfected or infected with Ad/LacZ and Ad/IGF-1Rt at respectively MOI of 100 and 300 in the presence 2% serum. The rVSMCs infected with MOI 100 and 300 of Ad/IGF-1Rt displayed a hinder cellular proliferation from the third day and this anti-proliferation effect was still observed on the fifth day.

\* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.

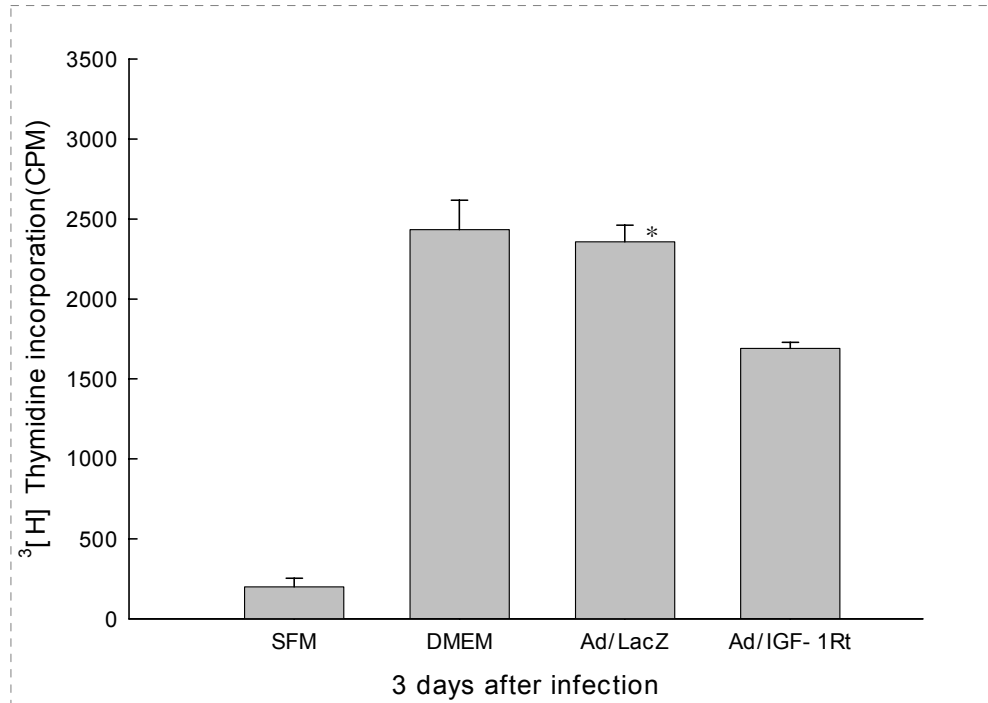


Figure 8. Effects of DN-IGF-1R overexpression on DNA synthesis. The rVSMC infected Ad/IGF-1Rt were incubated in SFM alone, or DMEM with 5% FBS for 72 hours. There was no significant difference in rVSMCs exposed to Ad/LacZ compared to DMEM only treatment. However, the rVSMCs treated with Ad/IGF-1Rt showed 35.7% inhibition in <sup>3</sup>[H]-thymidine incorporation.

\* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.



기 위해 transwell 방법을 이용하였다. 1% 혈청 또는 Ad/LacZ 처리군에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염시킨 혈관 평활근 세포에서 60% 이상의 세포 이동 억제 효과를 나타내었다 ( $p=0.05$ )(Figure 9).

#### 4. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포 생존 효과

혈관 평활근 세포의 세포 증식 억제 효과가 세포사와 관련 있는지를 살펴보기 위해 Ad/IGF-1Rt와 Ad/LacZ로 감염된 혈관 평활근 세포에서 세포 생존율을 살펴보기 위해 FDA 염색을 수행한 결과, Ad/IGF-1Rt 처리 세포주에서 FDA 염색 세포수가 유의한 감소를 보여 생존율이 현저하게 저하되었음을 알 수 있었다 (Figure 10A). 반면 Ad/LacZ 처리군과 2% 배지에서 자란 양성 대조군에서는 균일하게 FDA가 염색되었다. 또한 LDH 활성도 분석에서도 Figure 10B에서 보듯이 Ad/LacZ로 감염된 대조군에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염된 군에서 virus 농도 의존적으로 LDH 활성이 증가되었음을 관찰하였다. 따라서 DN-IGF-1R의 과발현에 의해 세포사가 유도됨을 확인하였다.

#### 5. DN-IGF-1R 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 세포고사 유도

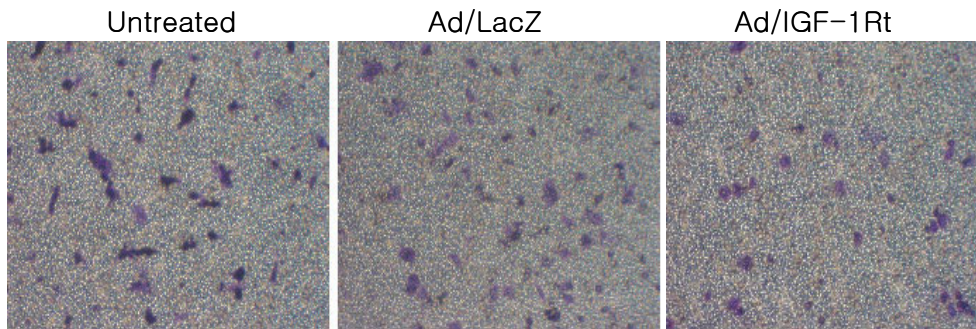
Ad/IGF-1Rt에 의한 세포고사 효과를 알아보기 위해 핵의 모양을 형광현미경 하에서 (UV filter) 관찰한 결과, Ad/LacZ로 감염된 세포에서는 정상적인 세포의 핵 모양을 볼 수 있었으나, Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포의 핵에서는 세포 고사의 특징인 분절된 핵 모양이 관찰되었다 (Figure 11).

유세포 분석을 이용하여 세포 주기를 분석하였을 때, Ad/IGF-1Rt로 감염된 평활근 세포에서 subG1 상태의 세포가  $21.29 \pm 5$  %로 Ad/LacZ군의  $2.95 \pm 0.96$  %에 비해 유의하게 증가되었다 ( $p < 0.05$ )(Figure 12).

#### 6. DN-IGF-1R 과발현에 의한 세포내 신호 전달 체계의 변화

DN-IGF-1R에 의한 세포 신호 전달 체계의 변화를 관찰한 결과, MOI 300 역가로 혈관 평활근 세포에 감염시키고 2% 혈청으로 세포 성장을

A.



B.

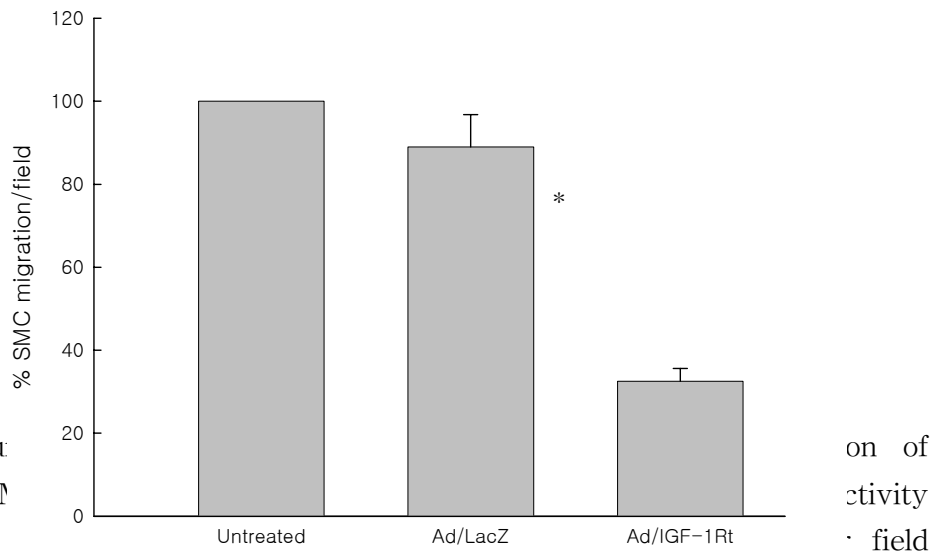
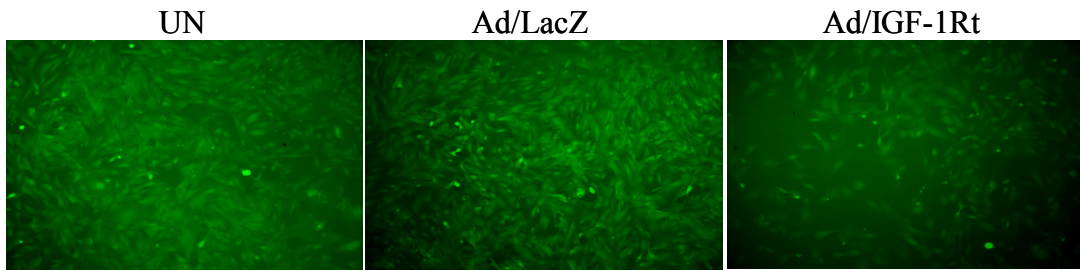


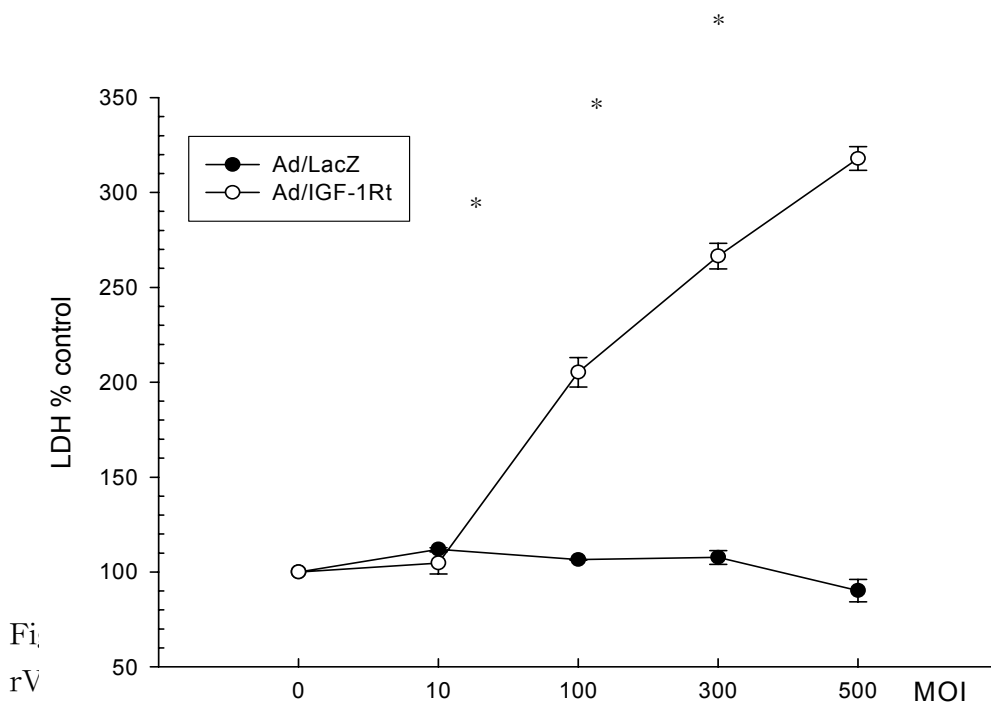
Figure  
rVSM  
was

( $\times 400$ ). A, Crystal violet staining of rVSMCs on transwell chamber. The number of migrated cell was markedly decreased in Ad/IGF-1Rt infected group. B, Migration was shown as percent ratio of each value to that of untreated group; Ad/IGF-1Rt markedly inhibited the migration to  $32.6 \pm 8.8$  % of control value. \* Compared difference was significant at  $p < 0.001$  with Ad/LacZ.

A.



B.



Fi  
rV

or Ad/IGF-1Rt for 72 hours. Cell survival was monitored by FDA stain(A) and the activity of secreted lactate dehydrogenase (LDH) (B). Ad/IGF-1Rt reduced FDA-staining cells implying alive. LDH activities were increased in Ad/IGF-1Rt-infected rVSMCs in comparison to Ad/LacZ-infected group in a dose-dependent manner.

\* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.

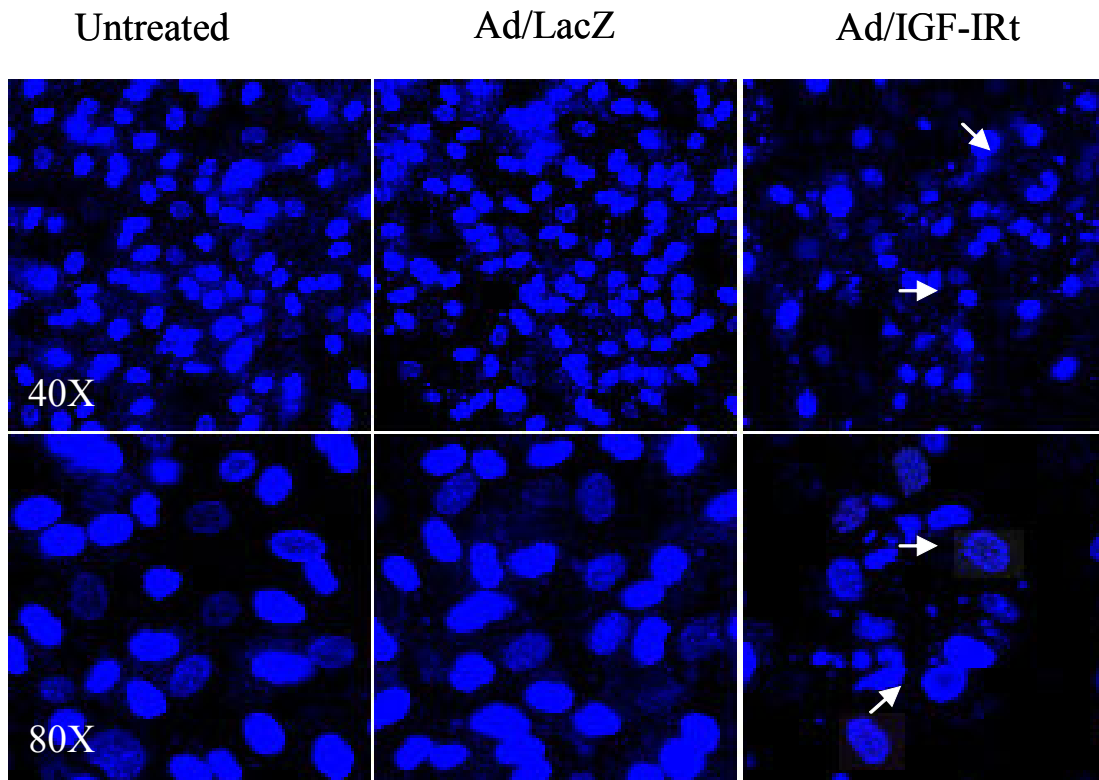
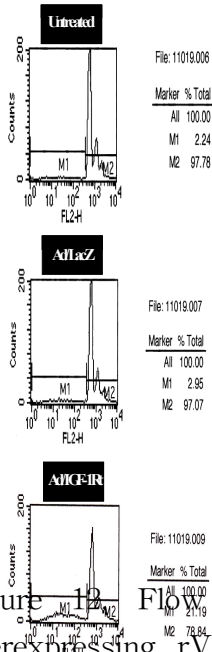


Figure 11. Microscopic image using DAPI in the Ad/LacZ- or Ad/IGF-1Rt-infected rVSMCs at MOI of 300. Microscopic examination showed nuclear fragmentation in Ad/IGF-1Rt-infected rVSMCs, but not in the Ad/LacZ or uninfected cells. Arrows note the characteristic morphological features of chromatin condensation and nuclear blebbing.

A.



B.

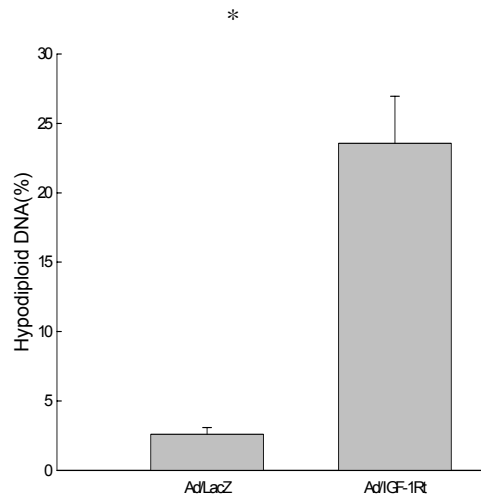


Figure 12. Flow cytometric analysis in DN-IGF-1R and control overexpressing rVSMCs. A, The numbers show the percentages of cells in the different phases of cell cycle : M1 containing sub G1 ; M2 containing G1, S, and G2/M. The data are representative of three separate experiments. B, Percentage of hypodiploid cells infected with Ad/LacZ or Ad/IGF-1Rt for 3 days. The percentages of the cells containing sub-G1 quantity (M1) of DNA was higher in Ad/IGF-1Rt infection (21.29%) than in uninfected cells (2.24%) or Ad/LacZ infection (2.95%). \* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.

β

유도한 후 각각 24 시간째 PI3 kinase/Akt와 MAPK 활성도를 관찰하였다. Ad/LacZ가 감염된 대조군에 비해 Ad/IGF-1Rt가 감염된 실험군에서 phospho-Akt와 phospho-Erk1/2의 발현이 현저하게 감소되었다 (Figure 13). PCNA 발현 및 세포 보호 뿐 아니라 세포고사에 영향을 미치는 HSP70 발현은 Ad/LacZ로 감염된 군에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포에서 현저하게 감소되었으며 caspase-3 발현의 경우 Ad/IGF-1Rt 감염된 혈관 평활근 세포에서 유의하게 증가된 발현을 관찰하였다 (Figure 14).

#### 7. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여 후 백서 경동맥에서의 유전자 발현

국소적 adenovirus 감염에 의한 유전자 발현이 효율적인지 분석하기 위해 Ad/LacZ를 백서 경동맥에  $1 \times 10^9$  viral particle 투여 후 3일째 경동맥을 적출하여 x-gal 염색을 실시하였다 (Figure 15). Ad/LacZ를 투여한 경동맥의 조직에서 -gal 발현이 강하게 유도되었으며, 경동맥의 단면에서 염색한 결과 20~40%의 혈관 평활근 세포에서 -gal 유전자가 발현됨을 관찰할 수 있었다.

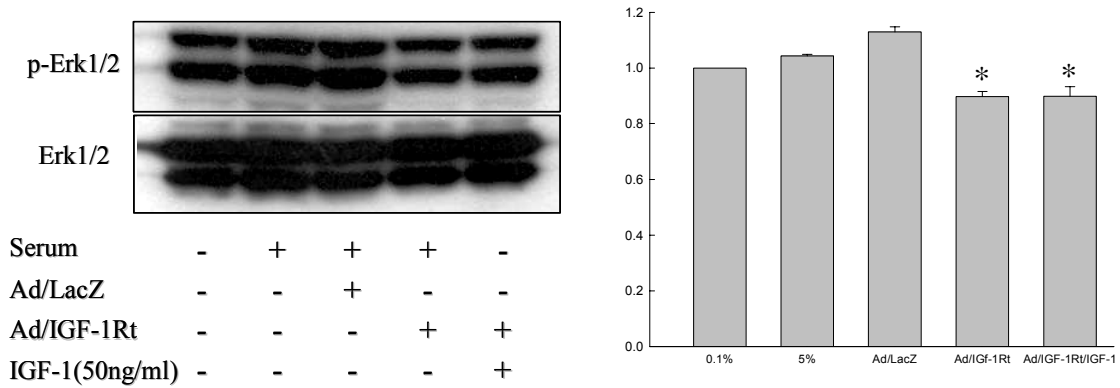
Ad/IGF-1Rt의 virus 감염 정도를 분석하기 위하여 동량의 Ad/IGF-1Rt를 투여한 다음 3일 뒤 경동맥에서 viral genomic DNA와 특이적 primer로 증폭하여 세포 당 viral copy수를 확인한 결과, 경동맥에 adenovirus를 투여 후 3일째에 세포 당 평균 18~25 copy 수를 나타내었다.

경동맥 조직에서 Ad/IGF-1Rt 감염에 의한 유전자 발현은 Anti-flag-FITC 항체를 이용한 조직 면역학적 염색을 통해서 재확인하였다. 혈관 손상 경동맥에서 adenovirus를 투여 후 14일째 경동맥의 단면을 잘라 anti-flag-FITC와 PI로 이중 염색을 실시하였다. Ad/LacZ 투여군에 비해 Ad/IGF-1Rt 투여 군에서 투여 후 14일째까지 미약하지만 flag-FITC의 발현이 지속되고 있음을 확인하였다 (Figure 16).

#### 8. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여에 따른 백서의 각 장기 조직별 안전성

특이적 표적화가 되지 않은 Ad/IGF-1Rt의 경동맥에서의 국소적 투여

A.



B.

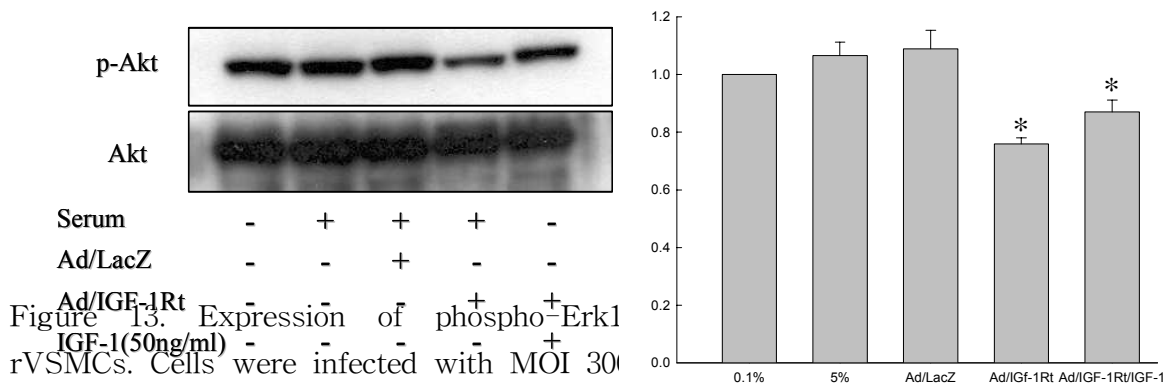


Figure 13. Expression of phospho-Erk1  
rVSMCs. Cells were infected with MOI 30

48 hours. Equal amount of whole cell extracts were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with mouse monoclonal antibodies against p-Erk1/2 (A) and p-Akt (B). The Akt or Erk1/2 phosphorylation was decreased in cells infected with Ad/IGF-1Rt.

\* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.

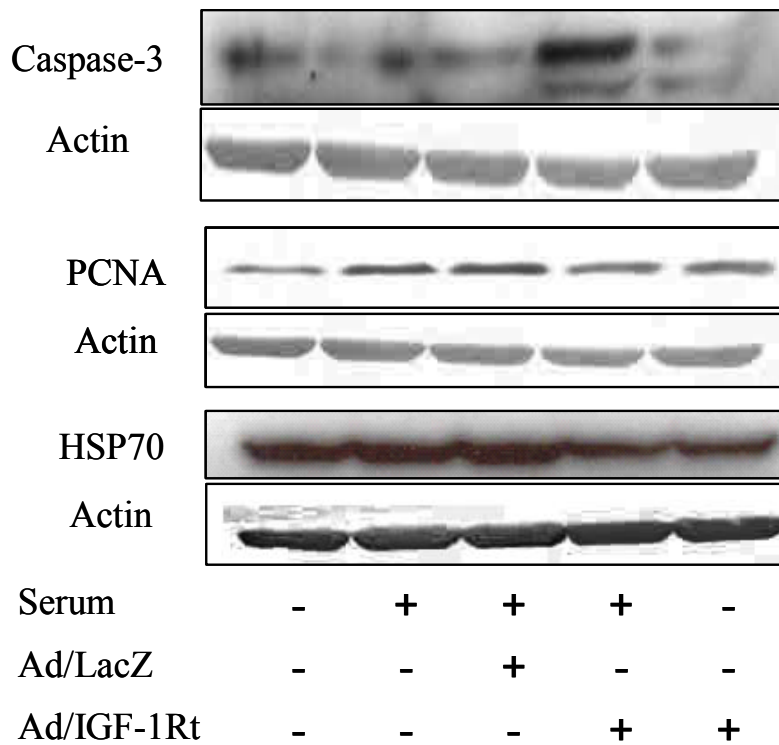


Figure 14. IGF-1 (50ng/ml) + Caspase-3, PCNA, and HSP70 in rVSMCs. Cells were infected with MOI 300 of adenoviral vectors for 48 hours. Equal amount of whole cell extracts were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies against caspase-3, PCNA, and HSP70. However, Ad/IGF-1Rt infected rVSMCs showed markedly decrease of expression of HSP70 and PCNA. Expression of caspase-3 were increased by rVSMCs infected Ad/IGF-1Rt.



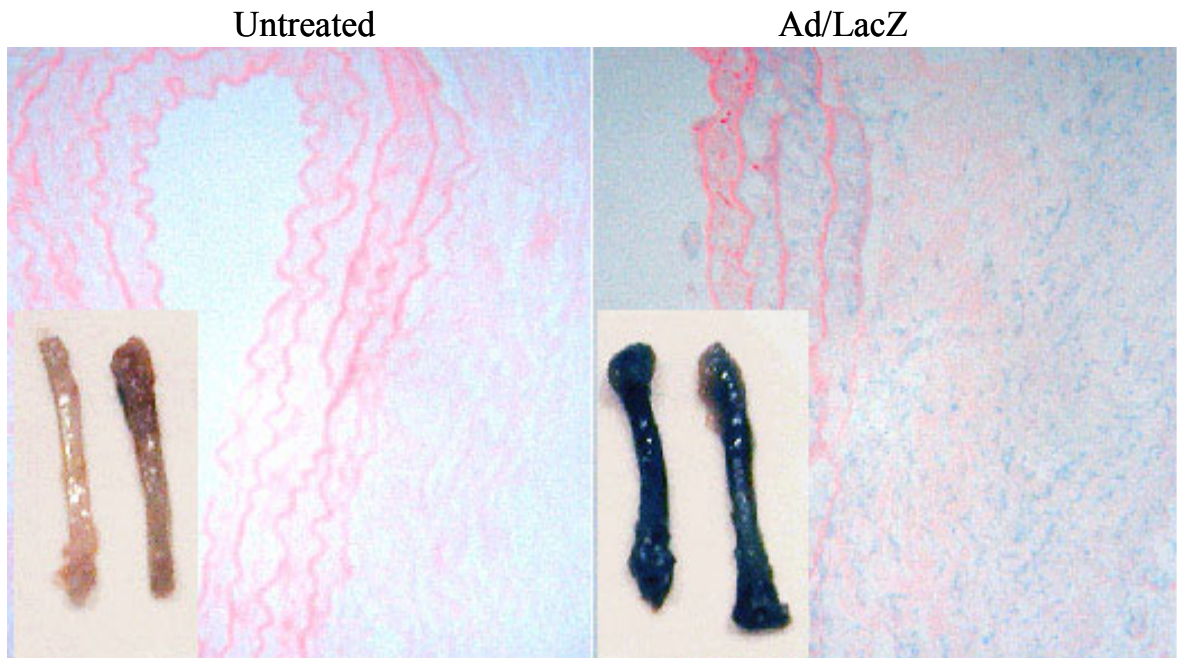


Figure 15. *In situ* expression of  $\beta$ -gal in rat carotid arteries. Ad/LacZ exposed vessels were stained with X-gal to detect  $\beta$ -galactosidase expression. At 72 hours after injection, rats were sacrificed and the carotid arteries were stained.

$\beta$

$\beta$

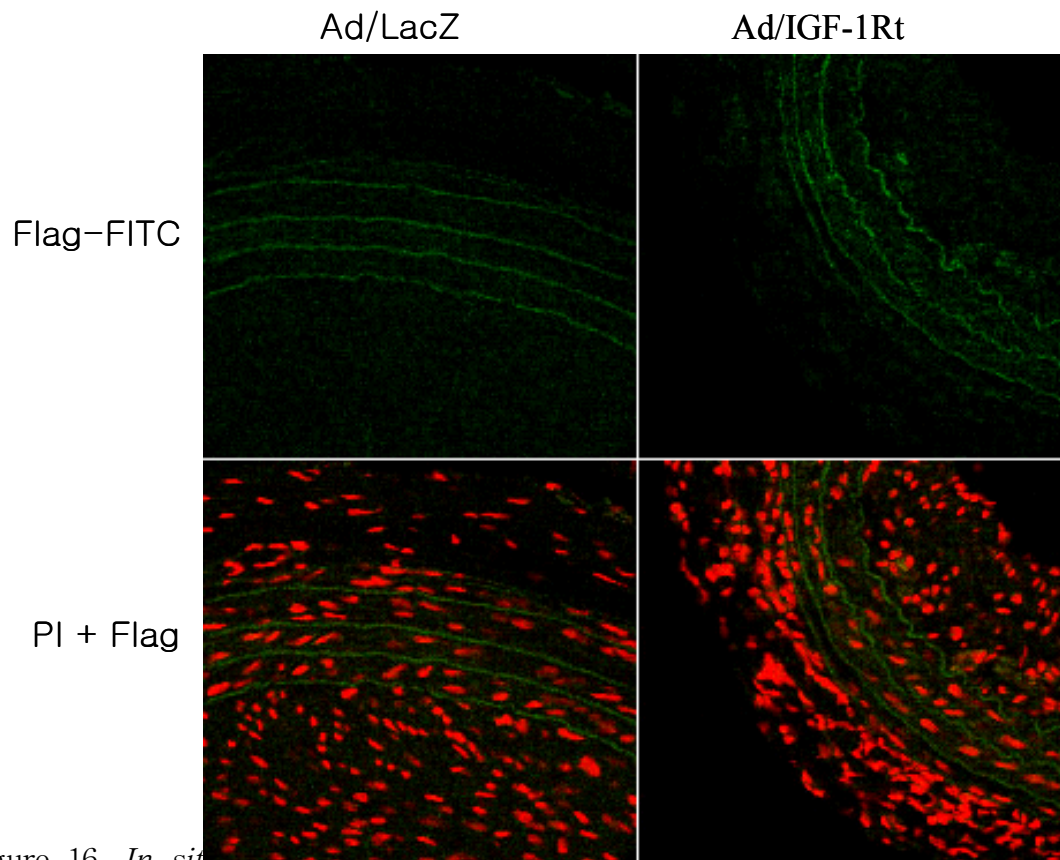


Figure 16. *In situ* expression of DN-IGF-1R in rat carotid arteries. Rats arteries were infected with Ad/LacZ or Ad/IGF-1Rt in the mid and distal common carotid artery for 20 minutes. After 2 weeks, Vessel has been double-stained for PI (red) and flag-FITC (green). Immuno staining confirmed that the expression of DN-IGF-1R in the media and adventitia lasted up to 2 weeks after the infection (Right upper panel). Nuclear staining showed diminution in neointima formation in the vessels compared with the Ad/LacZ groups indirectly.

에 의한 다른 장기 조직에서의 adenovirus 감염 여부를 알아보기 위해 간, 비장, 신장 등 각 장기 조직을 적출하여 각각의 genomic DNA를 추출하고 viral 유전자 E4 부분의 특이적 primer를 이용하여 adenovirus의 존재 여부를 분석한 결과 경동맥에서만 400 bp의 PCR 생성물을 확인하였으며 다른 조직에서는 viral DNA가 검출되지 않았다 (Figure 17).

#### 9. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여가 혈관 손상 후 신생 내막 형성에 미치는 영향

DN-IGF-1R에 의한 IGF-1 signal pathway 억제가 혈관 손상 후 신생 내막 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈관 손상 후 Ad/IGF-1Rt를 투여한 다음 14 일째에 신생 내막 형성 정도를 분석 하였다. Ad/LacZ가 투여된 경동맥의 신생 내막 면적은  $0.19 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 를 나타낸 반면 Ad/IGF-1Rt가 투여된 경동맥의 경우,  $0.08 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ 의 신생 내막 면적을 나타내었다 ( $p=0.002$ )(Figure 18). 신생 내막 면적을 중막 면적에 의해 normalized 시킨 neointima/media ratio의 경우, Ad/LacZ 투여 백서에서  $1.66 \pm 0.3$ 을 나타내었고 Ad/IGF-1Rt 투여 백서에서  $0.66 \pm 0.45$ 의 값을 보여줌으로써 Ad/IGF-1Rt 투여한 경우 신생 내막의 형성이 61% 감소됨을 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ ).

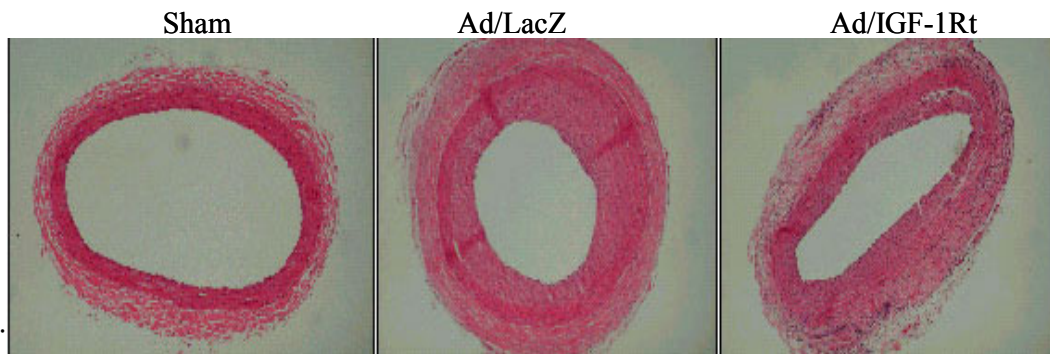
#### 10. 국소 Ad/IGF-1Rt 투여에 따른 백서 경동맥 손상 모델에서 조직학적 소견

Ad/IGF-1Rt 과발현이 세포고사 유도에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈관 손상 모델에서 TUNEL 분석을 실시하였다 Ad/IGF-1Rt를 감염시킨 경동맥의 내막과 중막에서 TUNEL 양성 세포를 관찰할 수 있었다 (Figure 19). 하지만 Ad/LacZ를 감염시킨 경동맥 조직에서는 TUNEL에 양성으로 반응하는 세포를 거의 관찰할 수 없었다. 이러한 결과를 통해 DN-IGF-1R 과발현은 경동맥에서의 세포 고사를 유도함을 확인할 수 있었다. 세포 증식의 표지자인 PCNA의 발현을 분석하였을때 Ad/LacZ가 감염된 동맥에서 보다 Ad/IGF-1Rt가 감염된 동맥에서 현저하게 낮은 PCNA 발현이 관찰되었다 (Figure 20).



Figure 17. Expression of adenoviral genomes in various tissues after local infection. The rats were infected with Ad/IGF-1Rt of  $1 \times 10^9$  pfu/cell at left common carotid arteries. After 3 days, DNA from heart, kidney, liver, lung, spleen, and carotid arteries were extracted and the viral genome was detected using E4 specific primers analyzed using PCR. PCR products were run out on a 1.2% agarose gel and detected only at carotid arteries.

A.



B.

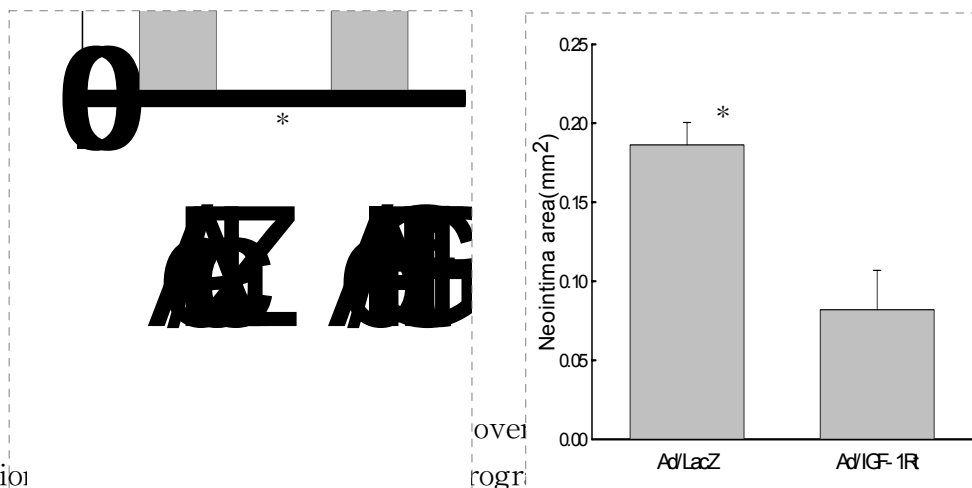


Figure  
formation

over  
progr

carotid arteries at day 14. Sham, without injury; Ad/LacZ, balloon injury followed by Ad/LacZ ( $1 \times 10^9$  pfu/cell); Ad/IGF-1Rt, balloon injury followed by Ad/IGF-1Rt ( $1 \times 10^9$  pfu/cell). B, Intima/media ratio at days 14 (n=8). C, I/M ratios were 61% lower rVSMCs infected with Ad/IGF-1Rt than with control or Ad/LacZ infected rVSMCs. The neointima area was much smaller in arteries infected with Ad/IGF-1Rt ( $0.08 \pm 0.06$  mm<sup>2</sup>) than Ad/LacZ infected arteries ( $0.19 \pm 0.04$  mm<sup>2</sup>). \* Compared difference was significant at  $p < 0.05$  with Ad/LacZ.

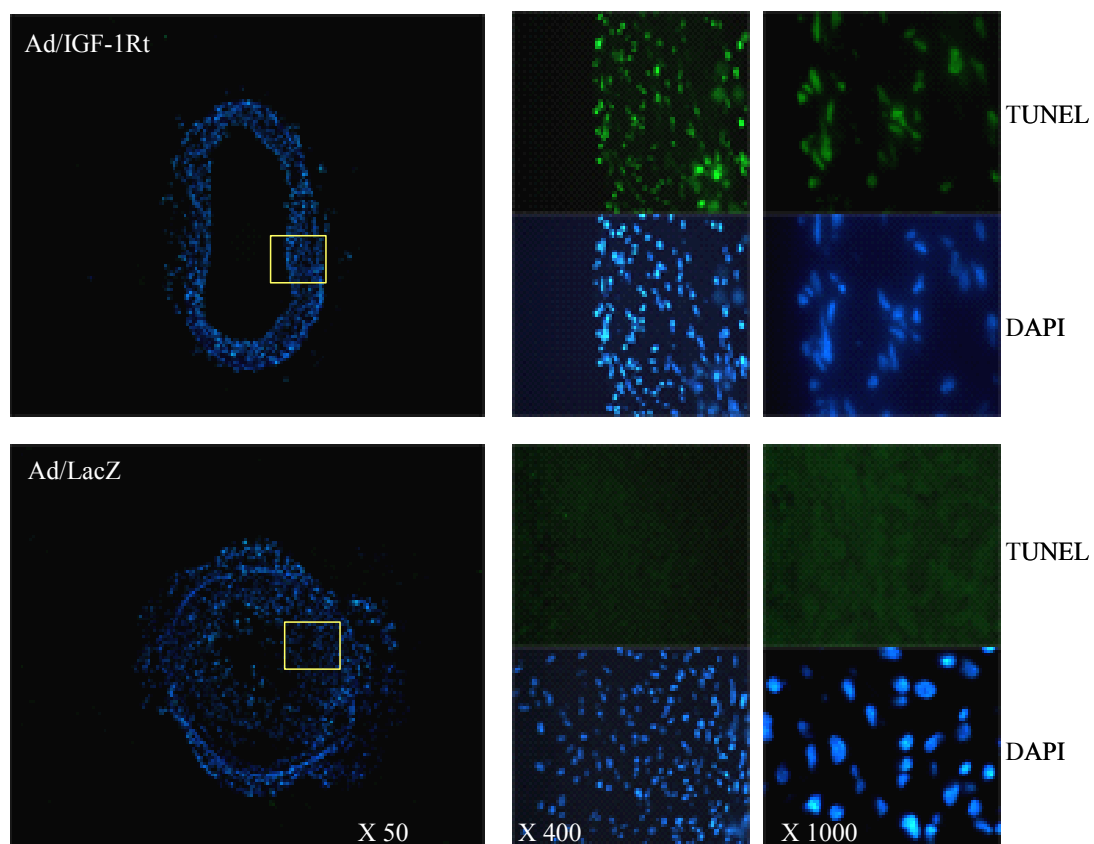


Figure 18. Effect of IGF-1R overexpression on apoptosis in carotid arteries. The sections in carotid arteries were stained with the TUNEL (green) and DAPI (blue). After 2 weeks of vascular injury, Expression of TUNEL positive in the neointima of Ad/IGF-1Rt infected arteries were significantly increased more than that of Ad/LacZ infected arteries.

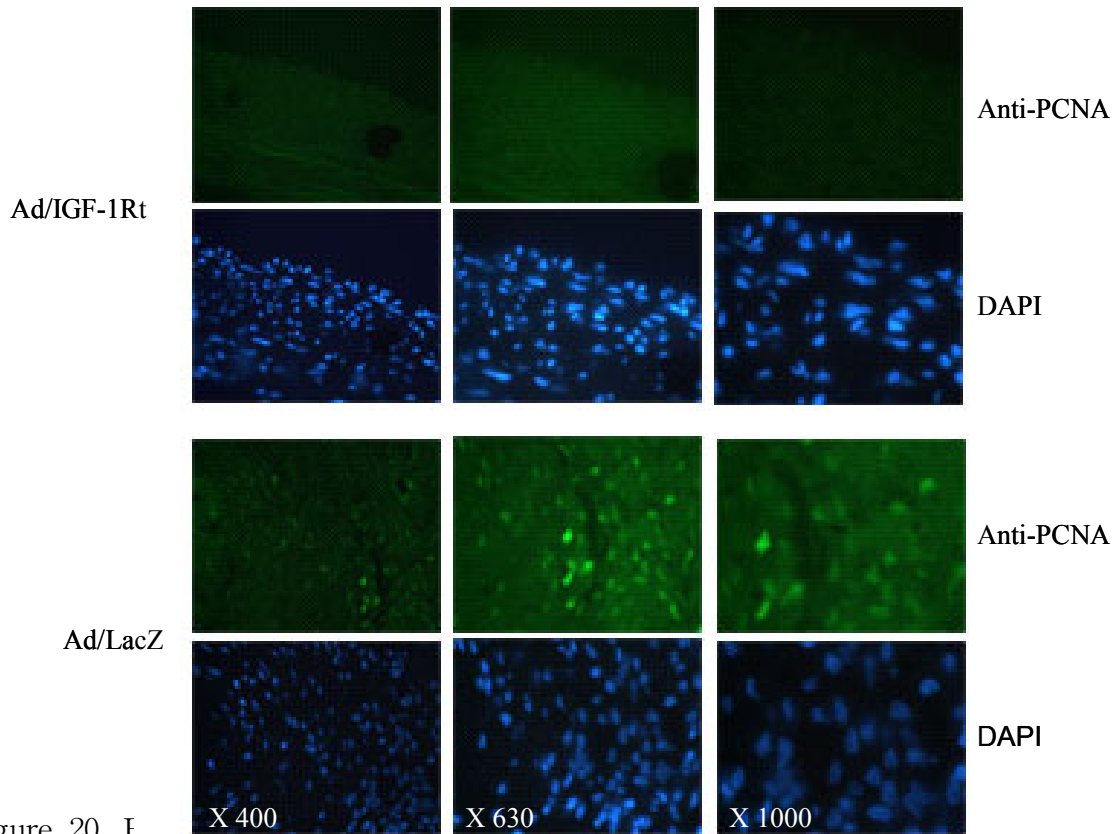


Figure 20. I  
in arterial s  
infected with Ad/LacZ and Ad/IGF-1Rt. The sections in carotid  
arteries were stained with the PCNA (green) and DAPI (blue). After  
2 weeks of vascular injury, high level PCNA expression was  
observed in the intima and media areas of arteries treated with  
Ad/LacZ, whereas PCNA expression was markedly decreased in the  
Ad/IGF-1Rt treated arteries.

## 고찰

### IV.

혈관 평활근 세포의 이동과 증식에 의한 재협착은 혈관 성형술 후 항상 문제점으로 남아있다. 다양한 동물 실험과 임상적 연구 결과 IGF-1은 혈관 평활근 세포 이동 및 증식 과정에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려졌다.<sup>28</sup> 재협착 부위의 경동맥 평활근 세포는 정상 경동맥에 존재하는 혈관 평활근 세포보다 높은 농도의 IGF-1을 발현하고 있으며, IGF-1은 농도와 시간 의존적으로 경동맥 평활근 세포 증식을 유도한다고 보고하므로써 IGF-1의 병리학적 기능을 보고한 바 있다.<sup>29-30</sup>

IGF-1R는 protein tyrosine kinases family에 속하는 것으로 리간드 결합 domain인 두개의 chain과 세포내로 신호를 전달하는 2개의 chain으로 이루어져 있다 (Figure 2).<sup>31</sup> IGF-1R은 혈관 평활근 세포, 혈관 내피 세포, 및 대식 세포 등 다양한 혈관 구성 세포에서 발현되고 정상 혹은 비정상적인 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>32</sup> IGF-1R의 세포내 신호 전달은 수용체의 autophosphorylation과 Shc와 IRS (insulin receptor substrate)의 tyrosine phosphorylation에 의해 이루어진다. Shc는 docking protein으로서 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt와 mitogen-activated protein kinase (MAPK)등 multiple signal pathway를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다.<sup>33</sup> 이런 신호 전달 체계의 활성화를 통해 세포 증식, 분화, 이동과 생존 향상 등이 나타난다. 뿐만 아니라 IGF-1은 다른 여러 성장 인자 수용체와의 cross-talk에 의해 더욱 복잡한 신호 전달 체계를 가지는 것으로 보고 되어 있다.<sup>34</sup> 혈관 평활근 세포에서 bFGF, thrombin, 엔지오텐신 등은 각각의 수용체에 의한 직접적 작용으로 IGF-1R 발현을 증가시킴으로서 강력한 mitogen 효과를 가진다.<sup>35-36</sup> 따라서 IGF-1R의 발현 정도가 혈관 평활근 세포의 이동과 증식에 중요한 결정 인자로 작용하고 있다는 것을 시사하고 있다.

본 연구에서는 이러한 연구들을 바탕으로 혈관 평활근 세포의 증식과 이동에 중요한 인자이면서 다른 성장 인자와 상호 작용하는 IGF-1R 유전자를 adenovirus를 이용하여 dominant negative 수용체 형태로 과발현시켜 혈관 평활근 세포의 세포 이동, 증식 및 생존에 대한 효과를 살펴보고 더 나아가 백서 모델에서 혈관 손상 후 신생내막 형성에 미치는 효과도 살펴보고자 하였다. Antisense전략, dominant negative mutant를

β



이용한 IGF-1R의 활성 억제를 통해 다양한 암 조직에서 치료 효과가 있음이 보고 되기도 하였으나, 혈관 재협착에서의 보고는 없었다.<sup>31</sup> 본 연구에서는 전체 IGF-1R 유전자에서 세포내 신호 전달에 중요한 역할을 하는 chain의 930 a.a.-1337 a.a.를 결손시켜 truncated 형태를 만들고 CMV 프로모터 하에서 발현되도록 adenovirus를 제작하였다 (Figure 3).

정상 세포인 혈관 평활근 세포에서 세포 증식과 이동에 미치는 효과를 살펴 본 결과 adenovirus로 과발현된 DN-IGF-1R 처리군은 대조군인 Ad/LacZ 처리 군에 비해 IGF-1 (50 ng/ml)과 혈청으로 유도된 세포 증식 효과를 50% 이상 억제하는 것으로 나타났다 (Figure 6A, 6B). 또한 혈관 평활근 세포의 강력한 mitogen중의 하나인 PDGF-BB (20 ng/ml)로 유도된 평활근 세포 증식도 유사하게 억제함을 관찰하였다 (Figure 6A). 또한 IGF-1을 비롯한 다양한 성장 인자를 포함한 혈청에 의해서도 농도 의존적으로 혈관 평활근 세포의 증식을 증가 시켰으며, Ad/IGF-1Rt 감염에 의해 60% 이상의 세포 증식 억제 효과를 보여 주었다. 이러한 결과들은 기존 논문에서와 같이 PDGF, bFGF에 의한 세포 증식이 anti-IGF-1 항체에 의해 억제되는 것을 보임으로써, 이들 성장 인자에 의한 세포 증식이 IGF-1에 의존적이라는 연구와 일치한다.<sup>37</sup> Dominant negative IGF-1R에 의한 이런 효과는 PDGF-BB와 혈청에 의해 유도된 혈관 평활근 세포 증식에 있어 autocrine IGF-1 리간드와 수용체의 역할을 간접적으로 시사해 주는 것으로 사료된다. 또한 Ad/IGF-1Rt에 의한 혈관 평활근 세포의 증식 억제 효과는 virus 농도에 따라 의존적으로 일어나며 감염 3일째부터 시작하여 5일째까지 세포 증식을 억제하고 있음을 관찰하였다 (Figure 7). 이러한 세포 증식 억제 효과는 세포수 뿐 아니라 DNA 합성에 미치는 영향 분석에서도 재확인하였다 (Figure 8).

Ad/IGF-1Rt의 과발현에 의한 혈관 평활근 세포의 이동 효과를 transwell system을 이용하여 살펴본 결과, Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포의 경우 대조군인 Ad/LacZ 감염군에 비해 혈청에 의해 유도된 세포 이동 효과는  $32.6 \pm 8.8\%$ 로 Ad/IGF-1Rt 과발현에 의해 60% 이상 세포 이동이 억제함을 관찰하였다. 따라서 Ad/IGF-1Rt의 과발현은 IGF-1 (50 ng/ml) 이나 혈청에 의해 유도된 혈관 평활근 세포의 증식과 이동을 효과적으로 억제하고 있음을 관찰할 수 있었다. 전립선 암 세포

와 간암 세포에서 IGF-1R의 억제에 의해 암세포의 침윤이 감소되고, IGF-1 signal이 laminin에 대한 세포부착에 관여함이 알려져 있고,<sup>38</sup> 암 세포 이동에 IGF-1/IGF-1R의 신호 전달 체계가 중요한 역할을 하는 것이 이미 보고된 바 있으며 이것은 본 연구 결과와 일치한다.<sup>39</sup>

다양한 암 세포에서 Ad/IGF-1Rt 과발현, 특히 intracellular domain의 anti-apoptotic mutation에 의해 암 세포의 세포사를 유발한다고 알려져 있다.<sup>40</sup> 본 연구에서 제작된 벡터의 경우 세포내 신호 전달 역할을 담당하는 domain의 전부가 제거되었으므로 혈관 평활근 세포에서도 혈관 평활근 세포의 증식 억제가 혈관 평활근 세포의 생존 저하와 세포사에 의한 것인지 알아보려고 하였다. Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포의 경우 Ad/LacZ 처리군에 비해 현저하게 FDA 발색 반응이 감소 뿐만 아니라 LDH 활성의 증가가 관찰되었다. Ad/IGF-1Rt 과발현에 의한 세포고사가 혈관 평활근 세포의 증식 억제에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

IGF-1 및 IGF-1R 억제에 의한 세포 증식 및 고사에 관련된 보고가 있으나 그 기전에 대한 연구는 적다. IGF-1/IGF-1R 세포내 신호 전달에 밀접한 관련이 있는 MAPK의 활성화에 대해 분석한 결과, 혈관 평활근 세포에서 Erk1/2는 constitutive하게 발현 되는 반면, Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포에서는 IGF-1 (50 ng/ml) 또는 혈청으로 유도된 Erk1/2의 활성을 48시간 이후 대조군에 비해 유의하게 억제하는 것이 관찰되었다 (Figure 13A). 또한 PI3kinase의 downstream signal인 Akt의 경우, 혈청과 IGF-1 첨가에 의해 활성화되었으나, Ad/IGF-1Rt 감염에 의해 현저하게 저하되는 것을 관찰하였다 (Figure 13B). 이런 결과들은 autophosphorylated residues가 결핍된 truncated IGF-1R가 IGF-1이나 혈청에 의한 endogenous IGF-1R의 활성을 억제함으로써 Akt 활성의 감소와 함께 Erk1/2 활성의 감소에 의해 세포 성장에 필요한 인자들의 활성을 억제하기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 대표적인 기전에 관여하는 두 가지 단백질 변화 이외에 cell proliferating index로 이용되고 있는 PCNA와 Akt의 downstream에서 antiapoptosis에 관여하는 것으로 알려진 caspase-3와 HSP70 (heat shock protein)의 발현도 살펴보았다. PCNA 발현의 경우 Erk1/2 활성 억제와 유사하게 음성대조군인 Ad/LacZ 감염된 혈관 평활근 세포에 비

해 Ad/IGF-1Rt로 감염된 세포에서 현저하게 저하됨을 관찰하였다. Caspase-3는 Akt 활성을 경유한 BAD 인산화에 의해 억제되어지는 downstream signal로 알려져 있다. Caspase-3 발현은 혈청 제거에 의한 발현 보다 Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포에서 증가되었음을 관찰하였다. 이러한 결과로 볼 때 Akt의 활성 저하에 의해 caspase-3 단백질 발현이 증가되어진 것으로 기대된다. HSP70은 세포사가 일어난 세포를 보호하는 단백질로서 잘 알려져 있다.<sup>41</sup> 최근 *in vitro* 신생내막 형성 모델에서 세포 생존과 세포사에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려졌다 특히, HSP70 발현의 차단은 혈관 평활근 세포 및 다양한 세포에서 세포고사를 유발한다고 보고 된바 있다.<sup>42</sup> 또한 MAPK 단백질의 활성화와 세포주기 관련 단백질 발현 및 caspase-3 활성을 억제에 관계하고 있다.<sup>43</sup> 이 외에도 HSP90과 HSP27 단백질이 세포고사와 Akt의 탈 인산화를 방지함으로써 Akt를 안정화하도록 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>44</sup> 이에 본 연구에서 HSP70 발현을 살펴보았다. Figure 14에서 볼 수 있듯이, HSP70의 발현은 Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포의 경우 IGF-1 또는 혈청에 의해 유도된 이들 단백질 발현을 현저하게 감소시켰음을 관찰하였다. 따라서 이들 HSP 단백질 발현 저하에 따른 Ad/IGF-1Rt 유전자에 의한 혈관 평활근 세포의 생존저하와 세포고사 유도에 관여하고 있다고 생각되어지며 추후 HSP와 세포고사 기작에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이들 *in vitro* 연구 결과를 바탕으로 *in vivo* 모델에서 Ad/IGF-1Rt의 투여에 의한 재협착 억제가 가능한 지를 살펴보았다. Ad/IGF-1Rt 유전자의 경동맥 내 발현은 감염 후 3일째 세포 당 18~25 copy number 정도의 발현을 보였으며 2주까지 미약하지만 지속적으로 관찰되었다 (Figure 16). 혈관 손상 후 발생하는 신생 내막 형성 유도하는 주된 과정은 혈관 평활근 세포 이동, 증식, 그리고 세포고사에 의한 세포 손실 등의 생리학적 과정의 균형에 의해 발생된다. 혈관 손상 후 혈관 평활근 세포의 증식과 세포고사는 증가되며 7일째 가장 활발히 진행되어 14일째 감소되지만, 이후 세포고사 보다 세포 증식이 우세하게 진행됨으로서 신생 내막이 형성된다. 본 연구에서 Ad/LacZ 투여군에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염된 경동맥에서 신생 내막 형성이 61%정도 유의하게 감소되었음을 확인하였다 (Figure 18). 혈관 손상 후 14일째 비록 Ad/IGF-1Rt로

감염된 경동맥 조직의 평활근 세포의 경우, 평활근 세포 증식에 대한 효과가 전혀 없었으나 신생 내막에 존재하는 평활근 세포의 세포고사는 유의하게 증가함을 관찰하였다. 이렇게 증가된 신생 내막 평활근 세포의 세포고사는 과발현된 DN-IGF-1R에 의한 신생 내막 형성을 억제하는 기전으로 작용하였을 것으로 생각되어진다.

이상의 결과로 본 연구에서는 DN-IGF-1R 과발현에 의해 백서 혈관 평활근 세포에서 혈청과 IGF-1 (50 ng/ml)에 의해 유도된 세포 이동 및 증식을 억제하고 세포사를 유도할 수 있고 나아가 *in vivo* 모델에서 신생내막의 형성이 유의하게 감소하였음을 증명하였다.

## V. 결론

본 연구에서는 adenovirus 전달체를 이용하여 DN-IGF-1R 유전자를 과발현시킴으로써 IGF-1/IGF-1R pathway 억제를 유도한 경우 혈관 평활근 세포 이동과 증식에 대한 효과와 혈관 손상 이후 발생하는 재협착을 줄일 수 있는지 알아보았으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 백서의 평활근 세포에서 MOI 300의 역가로 Ad/IGF-1Rt를 과발현시킨 후 세포 증식을 측정한 결과 IGF-1 (50 ng/ml) 뿐만 아니라 PDGF (20 ng/ml) 그리고 혈청 (2~5%)에 의해 유도된 혈관 평활근 세포 증식을 유의하게 억제하였다. 이런 억제 양상은 virus 농도 의존적이었으며 평활근 세포 증식 억제 효과는 DNA 합성 저하와 동반됨을 확인하였다.

2. DN-IGF-1R 과발현에 의한 세포 이동의 효과를 살펴 본 결과 Ad/LacZ 감염군에 비해 Ad/IGF-1Rt 감염된 평활근 세포에서  $32.6 \pm 8.8\%$ 의 세포 이동 효과를 확인하였다.

3. DN-IGF-1R 과발현된 혈관 평활근 세포에서 FDA 발색의 감소와 LDH 활성의 증가를 관찰하므로써 세포사가 일어남을 확인하였다. 핵 염색 결과 세포고사의 전형적인 형태를 나타내었으며, 유세포 분석에서 Ad/IGF-1Rt 감염군에서 subG1 상태가  $21.29 \pm 5\%$ 로 Ad/LacZ 감염된 세포의  $2.95 \pm 0.96\%$ 에 비해 유의하게 증가되어 DN-IGF-1R 과발현에 의한 세포사는 세포 고사에 의한 것임을 확인하였다.

4. Ad/IGF-1Rt로 감염된 혈관 평활근 세포에서 Akt 와 Erk1/2의 활성화가 유의하게 감소하였으며, Erk1/2의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 HSP70 발현이 억제됨을 알 수 있었다. 이 외에도 세포 증식 index인 PCNA 발현이 감소하였고 세포 고사를 유도하는 caspase-3 발현이 증가되었다.

5. Ad/LacZ 처리군에 비해 Ad/IGF-1Rt로 감염된 경동맥 신생내막 형성이 61% 정도 유의하게 감소하였고, 신생내막이 감소된 경동맥 조직에서

PCNA 발현 감소와 TUNEL 양성 발색이 유의하게 증가됨을 확인하였다.

결론적으로 DN-IGF-1R 과발현에 의해 혈관 평활근 세포의 증식과 이동이 억제되고 이것은 세포고사 과정의 Akt 활성화 억제와 downstream에 있는 caspase-3 활성화를 통한 기전과 세포 생존과 증식에 관여하는 Erk1/2 활성화를 억제하는 기전을 통하여 혈관 평활근 세포의 증식과 생존을 억제하고 궁극적으로 동물 모델에서 신생내막 형성을 억제하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 혈관 평활근 세포의 증식에 중요한 mitogen이면서 다른 여러 성장 인자나 성장 인자 수용체와도 상호 작용 효과를 가지는 것으로 알려진 DN-IGF-1R를 이용하여 IGF-1 뿐 만 아니라 다른 인자에 의해 유발되는 혈관 평활근 세포의 이동과 증식을 억제함을 관찰하였다. 또한 백서 경동맥 모델을 통하여 효과적으로 재협착을 억제할 수 있음을 증명함으로써 재협착 예방과 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Landau C, Lange RA, Hillis LD. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994;330:981-993.
2. Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K, et al. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res* 2003;92:e62-e69.
3. Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;40:107-116.
4. Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1284-1293.
5. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 1992;86:III47-III52.
6. George J, Sack J, Barshack I, Keren P, Goldberg I, Haklai R, et al. Inhibition of intimal thickening in the rat carotid artery injury model by a nontoxic Ras inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:363-368.
7. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999;41:361-368.
8. Francis DJ, Parish CR, McGarry M, Santiago FS, Lowe HC, Brown KJ, et al. Blockade of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal thickening after balloon injury by the sulfated oligosaccharide PI-88: phosphomannopentaose sulfate directly binds FGF-2, blocks cellular signaling, and inhibits proliferation. *Circ Res* 2003;92:e70-e77.
9. Bilder G, Amin D, Morgan L, McVey M, Needle S, Galczynski H, et al. Stent-induced restenosis in the swine coronary artery

- inhibited by a platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, TKI963. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:817-829.
10. Radke PW, Weber C, Kaiser A, Schober A, Hoffmann R. Dexamethasone and restenosis after coronary stent implantation: new indication for an old drug?. *Curr Pharm Des* 2004;10:349-355.
  11. Savolainen-Peltonen H, Loubtchenkov M, Petrov L, Delafontaine P, Hayry P. Estrogen regulates insulin-like growth factor 1, platelet-derived growth factor A and B, and their receptors in the vascular wall. *Transplantation* 2004;77:35-42.
  12. Reilly CF, Fritze LM, Rosenberg RD. Antiproliferative effects of heparin on vascular smooth muscle cells are reversed by epidermal growth factor. *J Cell Physiol* 1987;131:149-157.
  13. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 2000;86:125-130.
  14. Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:435-444.
  15. Zhu B, Zhao G, Witte DP, Hui DY, Fagin JA. Targeted overexpression of IGF-I in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury. *Endocrinology* 2001;142:3598-3606.
  16. Yamasaki H, Prager D, Gebremedhin S, Melmed S. Human insulin-like growth factor I receptor 950tyrosine is required for somatotroph growth factor signal transduction. *J Biol Chem* 1992;267:20953-20958.
  17. Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 2003;107:873-877.



18. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992;89:507-511.
19. Jiang F, Frederick TJ, Wood TL. IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Dev Biol* 2001;232:414-423.
20. Scheidegger KJ, Cenni B, Picard D, Delafontaine P. Estradiol decreases IGF-1 and IGF-1 receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. Mechanisms for its atheroprotective effects. *J Biol Chem* 2000;275:38921-38928.
21. Thommes KB, Hoppe J, Vetter H, Sachinidis A. The synergistic effect of PDGF-AA and IGF-1 on VSMC proliferation might be explained by the differential activation of their intracellular signaling pathways. *Exp Cell Res* 1996;226:59-66.
22. Wilson VJ, Ward JP, Burnand KG, Thomas CR. Upregulation of IGF-I and collagen I mRNA in human atherosclerotic tissue is not accompanied by changes in type 1 IGF receptor or collagen III mRNA: an in situ hybridization study. *Coron Artery Dis* 1996;7:569-572.
23. Lundergan C, Foegh ML, Vargas R, Eufemio M, Bormes GW, Kot PA, et al. Inhibition of myointimal proliferation of the rat carotid artery by the peptides, angiopeptin and BIM 23034. *Atherosclerosis*. 1989;80:49-55.
24. Bauters C, Van Belle E, Wernert N, Delcayre C, Thomas F, Dupuis B, et al. Angiopeptin inhibits oncogene induction in rabbit aorta after balloon denudation. *Circulation* 1994;89:2327-2331.
25. Chang MW, Ohno T, Gordon D, Lu MM, Nabel GJ, Nabel EG, et al. Adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene inhibits vascular smooth muscle cell

- proliferation and neointima formation following balloon angioplasty of the rat carotid artery. *Mol Med* 1995;1:172-181.
26. Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med* 1997;3:808-811.
  27. Hendrickson RJ, Okada SS, Cahill PA, Yankah E, Sitzmann JV, Redmond EM. Ethanol inhibits basal and flow-induced vascular smooth muscle cell migration in vitro. *J Surg Res* 1999;84:64-70.
  28. Savolainen-Peltonen H, Loubtchenkov M, Petrov L, Delafontaine P, Hayry P. Estrogen regulates insulin-like growth factor 1, platelet-derived growth factor A and B, and their receptors in the vascular wall. *Transplantation* 2004;77:35-42.
  29. Ruiz-Torres A. The role of insulin-like growth factor 1 and insulin in ageing and atherosclerosis. *Novartis Found Symp* 2002;242:143-153.
  30. Wong AH, Amabile PG, Yuksel E, Waugh JM, Dake MD. Perivascular release of insulin-like growth factor-1 limits neointima formation in the balloon-injured artery by redirecting smooth muscle cell migration. *J Vasc Interv Radiol* 2001;12:347-350.
  31. Prager D, Li HL, Asa S, Melmed S. Dominant negative inhibition of tumorigenesis in vivo by human insulin-like growth factor I receptor mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2181-2185.
  32. Kalebic T, Tsokos M, Helman LJ. In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. *Cancer Res* 1994;54:5531-5534.
  33. Zong CS, Chan J, Levy DE, Horvath C, Sadowski HB, Wang LH. Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 2000;275:15099-15105.

34. Belaus A, Merkle C, Fritsche M, Groner B. Crosstalk between the extracellular domain of the ErbB2 receptor and IGF-1 receptor signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:105-115.
35. Hernandez-Sanchez C, Werner H, Roberts CT, Jr., Woo EJ, Hum DW, Rosenthal SM, et al. Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor. *J Biol Chem* 1997;272:4663-4670.
36. Polanco JI, Albajar M, Pocovi M, Rodriguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:917-922.
37. Hayry P, Aavik E, Myllarniemi M. Blockade of growth factor synthesis and growth factor action: two possible sites of interference in allograft vessel disease and coronary bypass or balloon injury. *Metabolism* 1996;45:101-103.
38. Jones JI, Pevette T, Gockerman A, Clemmons DR. Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2482-2487.
39. Zheng B, Clemmons DR. Blocking ligand occupancy of the alphaVbeta3 integrin inhibits insulin-like growth factor I signaling in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11217-11222.
40. Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology* 2000;141:4784-4792.
41. Galvin DJ, Watson RW, Gillespie JI, Brady H, Fitzpatrick JM. Mechanical stretch regulates cell survival in human bladder smooth muscle cells in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F1192-F1199.

42. Alcocer F, Whitley D, Salazar J, Jordan W, Bland KI. Mutual exclusion of apoptosis and hsp70 in human vein intimal hyperplasia in vitro. *J Surg Res* 2001;96:75-80.
43. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000;33:341-365.
44. Gabai VL, Sherman MY. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* 2002;92:1743-1748.

## Abstract

Gene therapy using a Dominant Negative Insulin-like Growth Factor 1 Receptor in rat carotid artery model after balloon injury

Hyun-Joung Lim

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor )

Seung-Yeon Cho

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation are the key events occur in neointima responding to vascular injuries. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) has been implicated in this process. Therefore, inhibition of IGF-1 signaling pathway through the by disabling IGF-1 receptor (IGF-1R) could be a potent therapeutic strategy to treat restenosis. In the present study, we have examined the effect of a dominant negative IGF-1R expressed in primary rat VSMCs *in vitro* and injured rat carotid artery *in vivo*.

Rat VSMCs were infected with adenoviral vectors containing a dominant negative IGF-1R cDNA (Ad/IGF-1Rt) under the control of cytomegalovirus (CMV) promoter. An adenoviral vector carrying -galactosidase was used as a control. Ad/IGF-1Rt infection inhibited VSMC migration and proliferation, and also induced apoptosis by inhibiting Akt and Erk phosphorylation *in vitro*. Consistent with antiproliferative and apoptotic effects observed *in vitro*, Ad/IGF-1Rt infection markedly reduced neointima formation in injured rat carotid arteries. PCNA expression, a frequently used proliferation index, was decreased whereas TUNEL positive signal was increased. These

β

results indicate that a dominant negative IGF-1R mutant has a potential to induce apoptosis of VSMCs and reduce neointimal formation of injured rat carotid arteries. Delivery of dominant negative IGF-1Rs to the site of angioplasty may provide a useful strategy for inhibiting restenosis.

Key Words :

---

*dominant-negative IGF-1R ,adenovirus, gene therapy, restenosis, vascular smooth muscle cells*