

유전자 재조합 디스인테그린
saxatilin의 발현 및 혈관
평활근세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

선 새 아

유전자 재조합 디스인테그린
saxatilin의 발현 및 혈관
평활근세포에 미치는 영향

지도교수 정 광 회

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학과

선 새 아

선새아의 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

어느덧 2년이 넘는 시간이 흘러 작은 결실을 맺게 되었습니다. 그럼에도 불구하고 이렇게 논문을 마무리 하려니 흥가분하고 기쁜 마음보다는 아직도 부족한 점이 많아 아쉬움이 더욱 크게 남습니다. 짧지 않은 시간동안 대학원 생활을 하며 힘들 때도 많았지만 항상 힘이 되어주는 많은 이들이 옆에 있어 지금까지 올 수 있었던 것 같습니다. 작은 지면을 빌어 고마운 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다. 먼저 부족한 제가 이 논문을 완성할 수 있도록 지도해주시고 항상 잘 될 것이라는 믿음을 주셨던 정광희 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 또 바쁘신 중에도 언제나 관심을 갖고 지켜봐주셨던 장양수 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 항상 웃어주시며 격려의 말씀을 아끼지 않으셨던 황기철 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 대학원에 들어온 이후로 잘 찾아뵙지 못했지만 항상 관심 가져주시고 믿음으로 지켜봐주신 김동일 교수님께 죄송한 마음과 함께 감사한 마음을 전합니다.

2년여 동안 누구보다도 옆에서 늘 하나하나 세심하게 지도해주시고 힘이 되어주셨던 손영덕 선생님께 깊이 감사드립니다. 또 실험실 생활을 하면서 언제나 따뜻한 말 한마디와 미소로 맞아주셨던 서정철 선생님과 정지형 선생님, 임현정선생님께도 감사드립니다. 본 연구를 하는데 있어 많은 가르침과 도움을 주신 홍성유 선생님께 또한 감사의 말씀을 전합니다.

아무것도 모르고 대학원에 들어온 내게 처음부터 끝까지 든든한 버팀목이 되어주었던 경혜언니에게 고마운 마음을 전하며 형부와 언제나 행복하기를 바랍니다. 힘들고 짜증날 때에도 웃음을 잃지 않도록 특별한 매력으로 힘을 주었던 소연언니, 상현이 오빠와 늘 사이좋게 지내길 바랍니다. 힘든 날이 많았지만 특히 힘들 때 위로해주고 격려해 주기 위해서 기도해주고, 너무나 애써주었던 보희에게, 나 때문에 실험실 들어와서 고생 많이 하고도 따뜻한 말 대신 구박만 많이 받았던 희진이에게 미안한 마음과 함께 고마운 마음을 같이 전하고 싶습니다.

다. 2년여 동안 실험에 대해서나 실험실 생활에 대해서나 아낌없는 도움과 격려를 또, 웃음을 준 준혜언니, 은경언니에게도 고마운 마음을 전하며 언제나 둘의 우정이 변함없길 바랍니다. 건강한 모습으로 언제나 예쁘게 웃어주고, 같이 고민을 얘기해주었던 지누언니, 항상 걱정해주고 긍정적인 마음을 가질 수 있도록 격려해준 지은이 언니에게 고마움을 전합니다. 또한 짧은 동안이었지만 실험실에 들어와 자상하게 신경써준 현수오빠, 항상 미소 지으며 인사해주던 김일권 선생님, 이세형 선생님에게도 감사의 마음을 전합니다.

가족과 멀리 떨어져있는 내게 가족이 되어 엄마, 아빠, 동생이 되어주었던 이모네 식구들. 이모, 이모부, 현정이, 현미, 존경이에게 언제나 변함없이 귀찮아하는 내색한번 앓고 따뜻하게 대해주어서 고맙다고 말하고 싶습니다. 또 일찍 결혼해서 아무도 없는 서울에 살면서 서로 의지가 되어주었던 10년지기 친구 희선이에게 늘 옆에 있어주어 고맙다는 말을 전하고, 평생 은구오빠와 사랑하는 맘 변함없이 행복하기를 바랍니다. 또 여기 있으면서도 자주 연락하지 못했던 미경이, 가희에게 미안한 마음과 함께 고마운 마음을 전합니다. 그리고 힘들 때나 즐거울 때나 같이 고민해주고 같이 기뻐해주었던 친구들 혜영이, 지은이, 효정에게도 고마운 마음을 전하며 결혼해서 기다리던 아이를 갖게 된 지은이가 건강하기를 바랍니다. 항상 걱정해주고 격려해주던 하정이, 늘 동생처럼 귀여워해주고 걱정해주는 태옥이 오빠에게 이제 고마움을 표시합니다.

마지막으로 지난 20여 년 동안 고집 많고 자기뿐이 모르는 딸을 끝까지 믿고 물심양면으로 보살피주며 지켜봐주셨던 부모님께 누구에게보다도 이 논문과 함께 감사의 말씀을 전해드리고 싶습니다. 힘든 와중에도 맘속 깊은 곳에 계시면서 힘이 되어주셨던 엄마, 아빠, 멀리 있어서 제대로 언니, 누나 노릇 못해주었지만 항상 먼저 챙겨주는 동생들 윤아, 우규, 우리 가족들에게 고마운 마음과 함께 진심으로 사랑한다는 말을 전합니다.

2003년 6월 5일
선 새 아

차 례

그림 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 유전자 재조합 saxatilin의 발현	7
2. 유전자 재조합 saxatilin의 정제	7
3. 정제한 유전자 재조합 saxatilin의 활성측정	9
4. 혈관 평활근세포의 배양	10
5. 혈관 평활근세포 부착 억제분석	10
6. 혈관 평활근세포 증식 억제분석	11
7. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석	11
8. Actin cytoskeleton staining 분석	12
9. 쥐 대동맥 유래 평활근세포의 signal transduction 변화관찰	13
10. Transfection	14
11. 조직학적 염색분석	16

III. 결과	17
1. 유전자 재조합 saxatilin의 발현 및 배양	17
2. 유전자 재조합 saxatilin의 분리 및 정제	17
3. 유전자 재조합 saxatilin에 의한 혈소판응집 억제효과	21
4. 재조합 saxatilin에 의한 혈관 평활근세포 부착 억제효과	21
5. 재조합 saxatilin에 의한 혈관 평활근세포 증식 억제효과	25
6. 혈관 평활근세포에서의 integrin 유전자의 발현변화	25
7. 혈관 평활근세포의 형태 및 actin cytoskeleton의 변화	28
8. 혈관 평활근세포에서 saxatilin에 의한 신호전달 변화	28
9. Saxatilin에 의한 혈관 평활근세포의 apoptosis 증거	32
10. 혈관 평활근세포에서 saxatilin 유전자 발현의 영향	36
IV. 고찰	38
V. 결론	42
참고문헌	43
영문요약	50

그림 차례

그림 1. Saxatilin 발현벡터 (pPSAX)의 구축	8
그림 2. Saxatilin cDNA를 포함하는 plasmid (pFLAG-SAX)의 구조	15
그림 3. 재조합 saxatilin의 시간 별 발현양상	18
그림 4. 정제한 재조합 saxatilin의 SDS-PAGE 결과	19
그림 5. 재조합 saxatilin의 분자량 측정 및 아미노산 서열분석	20
그림 6. 재조합 disintegrin에 의한 collagen 유도 혈소판 응집 억제효과	22
그림 7. 재조합 saxatilin의 vitronectin에 대한 평활근세포 부착 억제효과	23
그림 8. 재조합 saxatilin의 fibronectin에 대한 평활근세포 부착 억제효과	24

그림 9. 성장인자 유도 시 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포의 성장 억제효과	26
그림 10. 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포에서의 integrin 유전자발현 변화	27
그림 11. 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포의 형태변화	29
그림 12. 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포의 actin cytoskeleton의 변화	30
그림 13. 재조합 saxatilin에 의한 MAP kinase의 ERK 활성화변화	31
그림 14. 재조합 saxatilin에 의한 ERK 및 FAK의 활성화	33
그림 15. 재조합 saxatilin에 의한 DNA laddering 관찰	34
그림 16. Transfection된 혈관 평활근세포의 조직학적 염색분석	36
그림 17. Nucleofection에 의한 세포에서 saxatilin 유전자 발현확인	37

유전자 재조합 인테그린 saxatilin의 발현 및 혈관 평활근세포에 미치는 영향

연구배경 경피적 중재술 이후에 발생하는 혈관 재협착증은 extracellular matrix (ECM)의 파손과 혈관 평활근세포의 부착, 이동 및 증식이 주요원인이다. 한국산 칠점사의 독으로부터 분리된 신규 디스인테그린 (disintegrin)인 saxatilin을 재조합 *Pichia* 효모에서 발현시키고, 유전자 재조합 saxatilin이 혈관 평활근세포에 미치는 영향 및 그 작용기전을 규명하고자 하였다.

방법 및 결과 *Pichia* 효모에서 발현된 saxatilin 단백질을 phenyl-Sepharose와 Source 30 역상 크로마토그래피를 이용하여 순수 정제하였으며, saxatilin의 생물학적 활성은 혈소판 응집 억제활성 측정법을 통하여 확인하였다. Saxatilin의 평활근세포 부착 및 증식 억제효과는 세포배양실험을 이용하여, integrin 유전자들의 발현변화는 RT-PCR (reversetranscription-polymerase chain reaction)을 통하여, MAP kinase 경로 변화 및 apoptosis등은 western blot을 이용하여 분석하였다. 또한 saxatilin 처리에 의한 평활근세포의 세포골격계 변화도 관찰하였다. 또한 saxatilin 유전자를 혈관 평활근세포에서 발현시키기 위하여 전기충격으로 세포 핵내 DNA를 전달하는 방법인 nucleofection을 실시하였고, 그 영향을 saxatilin 재조합 단백질을 처리한 결과와 비교 분석하였다.

이러한 과정을 통해 재조합 saxatilin을 활성형 단백질로 *Pichia* 효모로부터 발현하고 순수 정제하였다. 재조합 saxatilin은 혈소판응집을 억제하였고, 평활근세포의 vitronectin, fibronectin에 대한 세포부착 (IC_{50} for vitronectin; 65 nM, IC_{50} for fibronectin; 25 μ M)과 세포증식

(IC₅₀; 2.5~7.5 μM)을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 saxatilin은 혈관 평활근세포의 MAP kinase 경로의 ERK를 활성화시킴에도 불구하고 혈관평활근세포의 세포골격계를 해체시키고 아울러 세포 부착능력을 상실한 평활근세포들이 apoptosis에 도달하는 것을 확인하였다.

결론 이상의 결과에서 보듯이 신규 디스인테그린인 saxatilin이 혈관 재협착 및 동맥경화증에 중요한 혈관 평활근세포를 효과적으로 억제하였으며, 그 작용기전은 세포표면의 integrin에 대한 길항작용과 세포내 신호전달계에 영향을 통해 이루어진다는 사실을 규명하였다.

핵심되는 말 : integrin, disintegrin, saxatilin 유전자, 재조합 단백질, 혈관 평활근세포, apoptosis

유전자 재조합 디스인테그린 saxatilin의 발현 및 혈관 평활근세포에 미치는 영향

<지도교수 정광희>

연세대학교 대학원 의과학과

선 새 아

I. 서론

동맥경화증 (atherosclerosis)에서 관상동맥성형술 (PTCA: percutaneous transluminal coronary angioplasty)을 시행한 후 약 30~40% 재발되는 혈관 재협착증 (restenosis)에서 혈관 평활근세포의 증식 및 이동은 매우 중요한 발병원인 중의 하나이다. 이러한 질환의 발생기전으로 평활근세포 표면에 존재하는 인테그린 (integrin)과 extracellular matrix (ECM)간의 상호작용이 중요한 것으로 보고되고 있다. 세포막을 가로지르는 integrin 수용체는 세포내 세포골격 (cytoskeletal) 네트워크와 세포외부 환경을 연결시켜주는 역할을 하며, fibrinogen, vitronectin 및 laminin과 같은 세포유착 분자 (cell adhesion molecule)에서 나타나는 특징적인 핵심 아미노산 서열들은 세포유착 (adhesion)과 세포의 전파 (spread) 또는 통합 (integration)에 기여하는 것으로 알려져 있다. 또한 integrin 수용체로 전파되는 세포 신호전달은 cytoplasmic kinase의 활성화나 성장인자 (growth

factor) 수용체 및 ion channel등을 조절하여 직, 간접적으로 세포주기의 조절에 의한 세포의 증식, 사멸 및 분화 등에 광범위한 영향을 미친다고 보고 되고 있다¹.

Integrin은 α 와 β 의 subunit으로 이루어진 hetero-dimeric subunit들의 조합에 따라 각기 다른 ligand 선택성과 세포신호 특성을 부여받는다. ECM 단백질들인 fibrinogen, vitronectin, collagen, laminin, osteopontin등에 대해 각기 다른 특이성을 갖는 integrin들이 존재하며, 세포 특이적인 생리신호 전달을 담당하게 된다. 심혈관계를 구성하는 혈관계, 혈액, 심장근육 세포 및 비근육성 세포계 전반에서 integrin과 ECM 단백질간의 상호작용이 생리현상을 조절하는데, 혈소판 (platelet)표면에 존재하는 integrin인 GP IIb/IIIa는 fibrinogen과의 결합을 통해 혈소판 응집을 유발시킨다. 동맥경화와 같은 심혈관 질환의 진행에 있어서 평활근세포의 증식 및 이동에 있어서도 integrin과 ECM 단백질이 관여하여 세포 신호전달을 매개한다.

동맥경화증이나 혈전생성 등에 의하여 관상동맥이 협착 또는 폐쇄되는 경우 혈관의 재개통을 위하여 관상동맥성형술을 시술하는데, 이 시술 후 재발되는 혈관재협착 과정에 일어나는 혈관 평활근세포의 이동 및 증식에 integrin $\alpha_v\beta_3$ 가 깊게 관여하는 것으로 보고 되고 있다. 실제로 동물모델에서 풍선도자 손상 후 integrin $\alpha_v\beta_3$ 나 GP IIb/IIIa와 결합하는 항체인, Abciximab (ReoPro, Centacor, Einstein Weg, Netherlands)을 투여함으로써 혈관 신생내막 증식을 억제할 수 있었다². 또한 혈관재협착 과정에서 Abciximab을 투여한 경우, vitronectin이나 osteopontin과 같은 ECM 단백질과 평활근세포의 integrin $\alpha_v\beta_3$ 수용체 간의 상호작용을 억제할 수 있었다³. 그리고 $\alpha_v\beta_3$ integrin에 대한 항체가 아닌 화학적 합성에 의한 선택적 차단제도 혈관재협착 억제뿐 아니라 염증반응 과정에서 대식구세포 (macrophage)의 침투를 효과적으로 억제하는 것으로 밝혀졌다⁴. Integrin $\alpha_v\beta_3$ 수용체는 세포-세포 또는 세포-matrix간의 신호전달에 있어 주된 역할을 담당하므로

써 평활근세포, 내피세포 및 염증세포의 이동을 조절하며 평활근세포의 트롬빈 유도성 증식이나 TGF- β 의 생성, 신생혈관 형성, apoptosis, MMP-2의 발현 및 조절 등에 관여하고 있다⁵. 또한, ECM protein과 integrin 수용체 간의 상호작용은 혈관신생 (angiogenesis)과정에 있어, 세포성장, 상처치유 및 염증반응, 종양의 성장 및 전이에 필수적이다⁶. 더구나 혈관신생의 조절에 있어서 평활근세포와 내피세포 간 세포 유착물질이 중요한 역할을 하고 있다⁷. $\alpha_v\beta_3$ integrin의 활성화는 혈관의 성장과 분화를 촉진하는 생존 신호 (survival signal)를 자극하는데, 이는 cytokine과 integrin 수용체에 의한 신호전달이 새로운 혈관의 성장과 밀접하게 연관되어 있음을 보여 준다⁸.

한편, 뱀독에는 혈전 (thrombosis)과 지혈 (hemostasis)에 영향을 미치는 여러 가지 단백질들이 존재하고 있는데, 그중에서 혈소판응집을 억제하는 펩타이드들에 대한 연구가 가장 활발하다. 혈소판 응집반응에서 GP IIb/IIIa 수용체에 대한 fibrinogen의 결합부위에는 3개의 아미노산 즉, Arg-Gly-Asp (RGD) 서열이 매우 중요한 것으로 알려져 있다^{9,10}. 현재 kistrin^{11,12}, flavoridin^{13,14}, albolabrin¹⁵ 및 echistatin^{16,17,18,19,20} 등 혈소판 응집억제제들의 구조가 nuclear magnetic resonance (NMR)분석을 통하여 밝혀졌으며, 이들 억제제들에 의한 항 혈소판 활성화는 동물모델을 통하여 자세히 규명되고 있다^{21,22,23}. 이러한 펩타이드들이 $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 으로 대표되는 integrin에 대해 강력한 길항제 (antagonist)로 알려지면서 디스인테그린 (disintegrin)이라고 명명되었다²⁴. 또한 이러한 RGD 서열을 포함하는 disintegrin들은 암세포가 ECM 단백질에 유착되는 것을 방해함으로써 종양전이를 저해하는 것으로 확인되었다²⁵. 본 연구실에서는 한국에 서식하는 독사 중 하나인 칠점사 (*Agkistrodon saxatilis emelianov*)로부터 saxatilin (Genbank No. AY005480)이라는 분자량 약 7.7kDa의 RGD 서열을 갖는 새로운 disintegrin을 분리한 바 있다. Saxatilin은 혈소판의 응집을 강하게 저해할 뿐 아니라 혈관내피세포가 ECM 단백질에 부착하는

것을 억제하고 암세포의 성장 및 전이도 강력하게 저해한다는 사실을 보고한 바 있다^{26,27,28,29,30}.

본 연구에서는 saxatilin이 혈소판응집 억제 및 항암작용 이외에도 다른 세포, 즉 혈관 평활근세포에 어떠한 영향을 주는지 규명하고자, 유전자 재조합 효모에서 발현된 재조합 saxatilin이 뱀독유래 천연형과 동일여부를 확인한 다음, 혈관 평활근세포의 증식과 다양한 ECM과의 결합, 세포내 신호전달에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다. 아울러 disintegrin 유전자를 혈관 평활근세포에서 발현시켜 세포의 증식 및 부착 등에 미치는 영향을 관찰하였다.

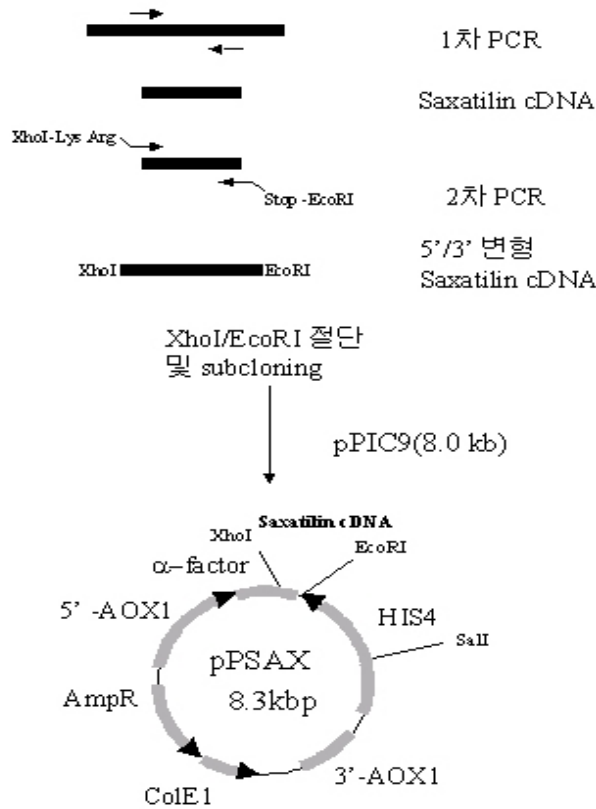
II. 재료 및 방법

1. 유전자 재조합 saxatilin의 발현

Saxatilin을 *Pichia pastoris* 효모에서 발현시키기 위하여 발현벡터 pPIC9 (8.0 kbp) (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)의 α -factor 분비신호단백질 C-terminal 부위에 saxatilin 유전자를 결합시켜 발현벡터 pPSAX (그림 1)를 구축하였다. *Pichia* GS115균주 (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)에서 형질전환하기 위하여 yeast extract pepton dextrose (YPD) 배양액 (500 ml) 30 °C 조건 하에서 1.3~1.5 OD₆₀₀까지 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 원심분리하여 회수한 다음, 증류수로 2회 세척하고 1 M sorbitol 용액 (1.5 ml)에 현탁하였다. 효모 현탁액 80 μ l와 SalI 제한효소로 처리한 5 μ g의 pPSAX DNA를 0.2 cm electro-cuvette에 섞은 후, electroporator (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA)를 이용하여 7500 V/cm, 10 ms pulse 조건 하에서 형질전환 하였다. 마지막으로 histidine 결손배지에서 성장이 가능한 표현형 saxatilin 발현균주를 선별하였다.

2. 유전자 재조합 saxatilin의 정제

앞에서 선별한 유전자재조합 *Pichia* 균주를 이용해 유전자 재조합 saxatilin을 생산하기 위해 histidine 결손배지에서 성장한 pPSAX 효모 콜로니를 1% glycerol이 포함된 BMM (100 mM potassium phosphate, 1.34% yeast nitrogen base, 4×10^{-5} % biotin) 액체배지에



```

gaggccggagaagaatgtgactgtggcgctcctgcaaaccggtgctgcgatgctg
E A G E E C D C G A P A N P C C D A
caacctgtaaactgagaccaggggcgcagtggtgcagaaggactgtggttgacca
A T C K L R P G A Q C A E G L C C D Q
gtgcagatztatgaaagaaggaacaatatgccggatggcaaggggtgatgacatg
C R F M K E G T I C R M A R G D D M
gatgattactgcaatggcatatctgctggctgtcccagaaatcccttccatgcc
D D Y C N G I S A G C P R N P F H A

```

그림 1. Saxatilin 발현벡터 (pPSAX)의 구조와 saxatilin cDNA 서열

접종하여 30 °C, 200 rpm 조건 하에서 흡광도 (OD₆₀₀)값이 3~4가 될 때까지 진탕 배양하였다. 배양이 끝난 후, 4 °C 조건에서 3000 rpm으로 원심분리하여 배양액을 제거하고 0.5% methanol이 함유된 BMM 배양액으로 교체하고 AOX 프로모터 (promoter)에 의한 saxatilin 단백질의 발현을 유도하였다. 그 다음, 24시간 주기로 1% methanol을 공급하고 약 48시간의 고농도 발효과정을 수행하였다. 배양 종료 후 효모 배양액으로부터 분리된 재조합 saxatilin을 순수분리하기 위하여 우선 원심분리로 침전물을 제거한 뒤 액체 크로마토그래피법을 이용하였다. 즉, 1.5 M ammonium sulfate로 평형 시킨 phenyl-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) column에 loading한 후 1M ammonium sulfate 용액으로 용출하였다. 이 분획을 Source 30 RPC (역상크로마토그래피) (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) column에 loading 하고 acetonitrile 농도구배(0~50%)로 유전자 재조합 saxatilin을 순수 분리하였다.

3. 분리한 유전자 재조합 saxatilin의 활성측정

유전자 재조합 saxatilin의 활성은 혈소판 응집억제 측정법 (platelet aggregation inhibition assay)으로 측정하였다. 사람의 신선한 혈액을 채취한 뒤 platelet-rich plasma (PRP)를 제조하여 사용하였다. 즉, 정상인의 혈액 400 ml로부터 얻어진 혈소판 농축액을 225 µl당 300,000 개의 혈소판이 되도록 희석한 뒤, PRP 희석액 450 µl와 phosphate buffered saline (PBS) 또는 시료용액을 50 µl를 첨가한 후 혈소판응집분석기 (Chrono-Log Co, Havertown, PA, USA)에서 37 °C의 온도로 3분간 반응하였다. 마지막으로, 2 nM의 collagen (Chrono-Log Co,

Havertown, PA, USA)을 첨가하여 혈소판응집을 유도하고 빛 투과도의 차이로 혈소판응집 억제정도를 측정하였다.

4. 혈관 평활근세포의 배양

혈관 평활근세포에 대한 saxatilin의 영향을 분석하기 위하여 실험목적에 따라 rat의 대동맥유래 평활근세포 (RAoSMC)와 인간의 대동맥유래 평활근세포 (HAoSMC)를 사용하였다. RAoSMC는 Sprague-Dawley rat (male, 10weeks)의 대동맥을 Chamley-Campbell³¹등의 방법에 따라 직접 분리한 다음 10% fetal bovine serum (FBS) DMEM (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였고, HAoSMC는 상용화된 세포 (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)를 구입하여 5% FBS SmGM2 배양액 (BioWhittaker Inc, Boston, MA, USA)에서 배양하였다.

5. 혈관 평활근세포 부착 억제분석

평활근세포 부착 억제실험을 위하여 96-well plate에 vitronectin (7.5 µg/ml) (Takara Co, Otsu, Japan) 혹은 fibronectin (25 µg/ml) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA)을 각각 4 °C에서 12시간 코팅한 후, 0.1% bovine serum albumin (BSA)으로 blocking하여 비특이적 결합을 억제하였다. Trypsin처리로 떼어낸 RAoSMC를 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에 넣어 1.5 ml microtube에 분주하고, 재조합 saxatilin을 다양한 농도로 처리하여 20분간 37 °C, 5%

CO₂ 배양기에서 배양하였다. Vitronectin 또는 fibronectin으로 코팅된 96-well plate에 1.5×10^5 cells/well의 농도로 세포를 첨가하여 37 °C 및 5% CO₂ 조건에서 약 3시간 배양하여 plate에 부착되도록 하였다. 부착이 끝난 후 96-well plate를 PBS로 2회 세척하여 미부착 세포들을 제거한 후 4% paraformaldehyde로 고정화 하고 crystal violet 염색용액으로 염색하였다. 염색한 96-well plate를 multi-channell spectrophotometer에 넣고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포 부착율을 계산하였다.

6. 혈관 평활근세포 증식 억제분석

RAoSMC를 96-well plate에 2000 cells/well의 농도로 부착시킨 후 0.2% FBS DMEM 배양액에서 72시간동안 serum을 고갈시켜 세포증식을 미리 억제시켜 놓았다. 그다음, 2% FBS와 bFGF (20 ng/ml) (Takara Co, Otsu, Japan), 또는 PDGF-BB (10 ng/ml) (Upstate Group Inc, Charlottesville, VA, USA)등의 성장인자가 함유된 배지에 saxatilin을 다양한 농도로 처리하여 48시간동안 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 succinate-tetrazolium reductase의 활성화에 의한 생존세포의 측정시약인 PreMix WST-1 cell proliferation assay kit (Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여 세포증식을 측정하였다.

7. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

평활근세포에서 중요한 integrin인 $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_5\beta_1$ 의 subunit 유전자들의 발현변화를 확인하기 위해 인체 integrin 유전자서열을 토대로 설계한 다양한 PCR primer들, 즉, α_v 의 sense primer; agatctggaccag gatggtt, α_v 의 antisense primer; atctgtggctccttcattg, β_3 의 sense primer; accactgatgccaagactca, β_3 의 antisense primer; gcatcaacaatga gctggag, α_5 의 sense primer; ccaggatggctacaatgatg, α_5 의 antisense primer; cccacaatcagatcaggata, β_1 의 sense primer; gttacacggctgcyhgt gtt, β_1 의 antisense primer; ctactgctgacttagggatc를 화학 합성하였다. 저농도 FBS (0.2%)가 포함된 DMEM 배양액에 serum이 고갈된 상태로 HAoSMC를 72시간 배양하여 세포증식을 억제시켜 놓은 후, PDGF-BB (10 ng/ml)를 첨가하고 saxatilin (200 nM)을 1시간 동안 처리하였다. 처리한 세포를 PBS로 1회 세척한 후 UltraspecII RNA isolation kit (Biotecx, Huston, TX, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 reverse transcription kit (Promega Co, Madison, WI, USA)를 이용하여 반응시킨 다음, 이 반응물을 template으로 확인하고자 하는 유전자의 발현수준을 PCR을 통해 분석하였다. 이때 세포의 RNA양에 대한 대조군으로 GAPDH cDNA에 대한 primer (sense: accacagtccatgccatcac, antisense: tccaccaccctgttg ctgta)를 이용하여 상대적인 양을 보정하였다.

8. Actin cytoskeleton staining 분석

RAoSMC를 부착하기 하루 전 cell culture cover slip (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)을 24-well plate에 미리 넣은 후 세포를 그 위에 붙여 놓았다. 다음날 세포의 배양액을 100 μ M saxatilin이 함유된 0.2% FBS DMEM 배양액으로 교체하고 세포가

부유하는 시점까지 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포가 부유하기 시작하면 3.7% formaldehyde로 고정시키고 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포를 투과한 다음 rhodamine-phalloidin (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA)을 이용하여 actin cytoskeleton을 염색하였다. 염색된 세포가 붙어있는 cover slip을 24-well plate에서 slide glass로 옮겨 mounting하고 광학현미경에서 400배로 관찰하였다.

9. 쥐 대동맥유래 평활근세포의 signal transduction 변화관찰

Culture plate (100 mm)에서 70% 정도로 증식한 RAoSMC를 0.2% FBS DMEM 배양액에서 72시간 반응시켜 세포증식을 억제시켜 놓았다. 그다음 0.2% FBS와 bFGF (20 ng/ml), PDGF-BB (10 ng/ml) 등 성장인자 또는 saxatilin (20 μM)이 함유된 DMEM 배양액으로 교체하고 37 °C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 4 °C의 PBS로 1회 세척하고 세포 lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ EDTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/ml leupeptin, 1 mM PMSF)로 파쇄하였다. 4 °C에서 13000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 BCA protein assay (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질농도를 측정하였다. 획득한 단백질 (50~100 μg)을 4~12% NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)에서 전기영동한 다음 Immobilon-P transfer membrane (Millipore Co, Bedford, MA, USA)에 전기이동 하였다. 10% non-fat skim milk를 포함한 blocking solution으로 membrane상의 비특이적 background를 없애고, blocking

solution에 primary antibody를 넣어 붙여준 다음 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 한번더 반응시켰다. 그 다음 ECL chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 membrane을 현상하였다. 단백질들의 발현을 관찰하기 위해 primary antibody로 ERK (Santa Cruze Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), FAK (Tyr397) (Upstate Group Inc, Charlottesville, VA, USA), pTyr (Santa Cruze Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)등을 사용하였다.

10. Transfection

혈관 평활근세포에 비바이러스성 벡터를 효율적으로 전달할 수 있는 조건을 확립하기 위하여 다양한 화학적 및 전기적 방법을 시도하였다. 그중 cationic liposome을 이용한 Lipofectamine PLUSTM (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)처리법과 NucleofectorTM (Amaxa Biosystems, Koeln, Germany)를 이용한 nucleofection 결과를 비교하여 transfection 효율을 계산하였다.

24-well plate에서 RAoSMC를 transfection하는 경우, 먼저 세포를 실험 전날 7×10^4 cells/well의 농도로 plate에 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂의 배양기에서 10% FBS DMEM 배양액으로 배양하였다. 동물세포용 pFLAG-CMV1 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA)을 이용하여 CMV1 프로모터와 flag epitope에 saxatilin 유전자를 fusion시킨 발현벡터 pFLAG-SAX을 구축 하였다 (그림 2).

Lipofectamine을 사용한 최적화된 transfection의 경우 serum이 없는 DMEM 배양액에서 4 µl의 plus reagent 당 1 µg의 플라스미드 DNA를 1 µl의 lipofectamine reagent와 섞어 약 250 µl의 serum이 없는

pFLAG-CMV1-SAX

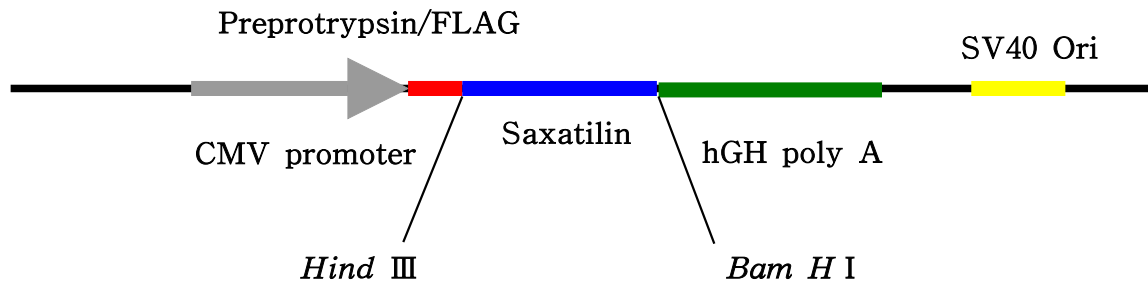


그림 2. Saxatilin cDNA를 포함하는 plasmid (pFLAG-SAX)의 구조.

DMEM 배지로 교체한 RAoSMC에 처리하였다. 37 °C 및 5% CO₂ 조건에서 6시간 배양한 후에 transfection reagent가 포함된 배지를 제거하고 1 ml의 새 10% FBS DMEM 배양액으로 교체하고 24~48시간을 더 배양하였다. β -galactosidase 효소를 encoding하는 bacterial lacZ 유전자를 reporter 유전자로 사용하였다.

Nucleofection에는 HAoSMC용 nucleofection kit (Amaxa Biosystems, Koeln, Germany)를 이용하였으며 한번의 반응에 1×10^6 개의 세포가 사용되었다. Trypsin을 이용하여 모은 세포를 5 μ g 플라즈미드 DNA와 100 μ l의 HAoSMC용 nucleofection solution과 섞어 Nucleofector에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후에는 6-well plate나 60 mm culture plate에 넣어 10% FBS DMEM 배양액에서 37 °C 및 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 이전과 마찬가지로 reporter gene으로 β -galactosidase 효소를 encoding하는 bacterial lacZ 유전자를 사용하였으며 nucleofection 24~48시간 후 분석하였다.

11. 조직학적 염색분석

LacZ 유전자의 transfection 후에는 lacZ 효소활성이 있는 경우에 β -galactosidase 발색반응을 통해 파란색의 lacZ marker protein이 발현됨을 확인할 수 있었다. Transfection된 세포는 PBS로 세척한 후 세포 고정화 용액 (2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde)으로 10분간 배양하였다. 다음에 세포를 X-gal 염색 용액 (1 mg/ml X-gal, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂)에서 14~24시간 동안 37 °C의 조건하에 반응하였다. Transfection된 세포의 β -galactosidase에 의한 X-gal 기질의 분해결과 파랑색으로 나타나는 3,5'-dichromo-4,4'-dichloroindigo 분자를 관찰하여 transfection 효율을 분석하였다.

III. 결과

1. 유전자 재조합 saxatilin의 발현 및 배양

Saxatilin 발현백터인 pPSAX으로 형질 전환시킨 *Pichia pastoris*의 His⁺ 콜로니들을 선별하여 배양한 다음 탄소원을 methanol로 교체하여 재조합 saxatilin의 발현을 유도하였다. 즉 pPSAX 발현백터는 탄소원으로 methanol이 첨가되면 AOX1 promoter에 의하여 a-factor/saxatilin 유전자의 발현이 유도되었다. 이후 24시간 간격으로 methanol을 1% 농도로 첨가하고 48시간 후 효모 배양체를 분리하고 상등액으로 분비된 saxatilin 단백질을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행한 결과 약 7~8 kDa의 saxatilin 단백질 밴드가 생성되었음을 확인하였다 (그림 3).

2. 유전자 재조합 saxatilin의 분리 및 정제

Pichia pastoris 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액을 phenyl-Sepharose column과 역상크로마토그래피 column을 통과시켜 재조합 saxatilin을 정제한 후 SDS-PAGE를 이용해 분석한 결과 분자량 약 7.7 kDa의 단일밴드임을 확인하였다 (그림 4). 또한, N-terminal 아미노산 서열분석 및 MALDI-TOF를 이용한 분자량 측정결과를 통해 정제한 재조합 saxatilin의 N-terminal이 천연형과 동일하게 보존되어 있었고 재조합 saxatilin이 보다 정확한 분자량, 7,712 Da 크기의 순수한 saxatilin임을 확인하였다 (그림 5).

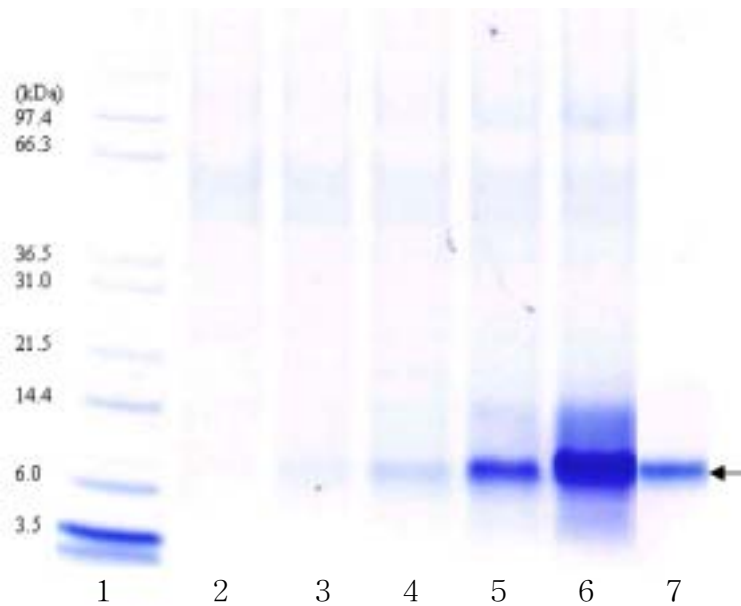


그림 3. 재조합 saxatilin의 시간별 발현양상. 그림의 왼쪽에 나타낸 숫자는 단백질 size를 kDa으로 나타내고 있다. 1은 단백질의 size marker이고, 2는 36시간동안 methanol로 유도되지 않은 배양액이며, 3, 4, 5, 6은 각기 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 methanol로 유도된 배양액이다. 그림에서 7 (화살표)은 천연형 saxatilin 표준단백질을 나타낸다.

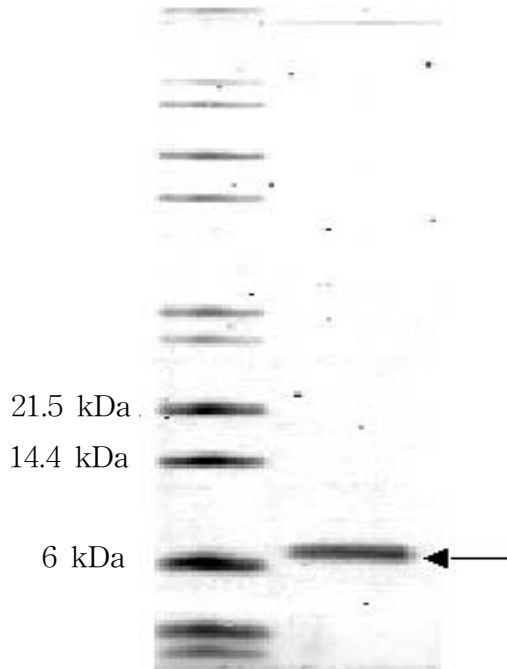
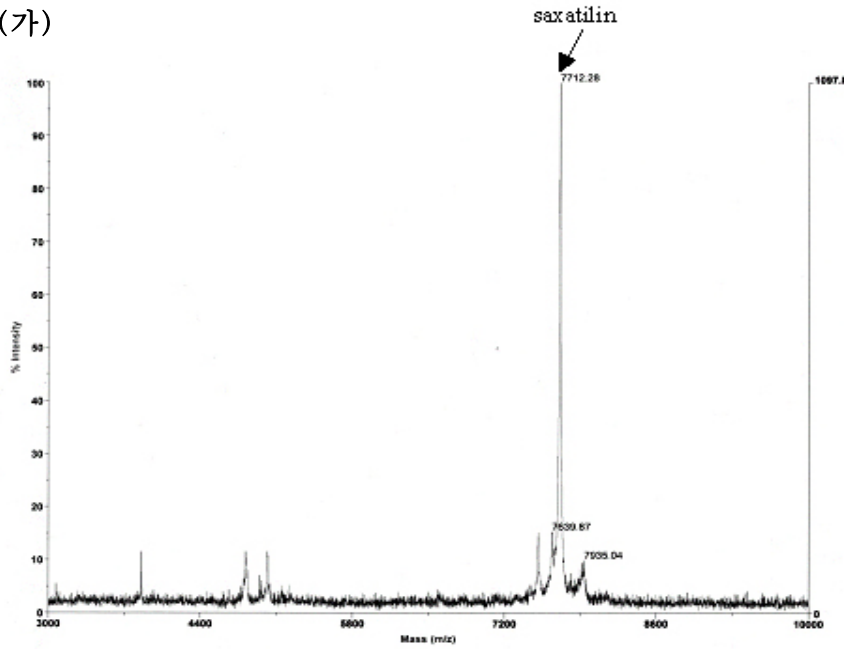


그림 4. 정제한 재조합 saxatilin의 SDS-PAGE 결과. *Pichia* 효모에서 발현된 saxatilin 단백질을 phenyl-Sepharose와 Source 30 역상크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. SDS-PAGE 분석결과 약 7 kDa 크기의 단일밴드상태의 순수한 saxatilin을 확인하였다.

(가)



(나)

EAGEECDGSPGNPCD

그림 5. 재조합 saxatilin의 질량분석 (가) 및 아미노산 서열분석 (나). 정제한 재조합 saxatilin의 질량분석결과 saxatilin과 7,712 Da임을 확인하였고, 정제된 단백질의 N-terminal 서열분석을 통하여 saxatilin과 동일함을 확인하였다.

3. 유전자 재조합 saxatilin에 의한 혈소판응집 억제효과

정제한 재조합 saxatilin의 활성을 조사하기 위하여 뱀독유래 천연형 saxatilin과 합성펩타이드인 GRGDSP를 대조군으로 사람의 혈소판 응집억제 활성을 비교 측정하였다. 실험결과 재조합 saxatilin의 IC₅₀ 값은 약 139 nM로 이는 천연형의 IC₅₀ 값인 136 nM과 비교할 때 거의 동일한 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 GRGDSP 합성펩타이드 보다는 약 2,000배 정도 강한 활성을 갖는 것으로 이는 단순히 RGD 서열만이 중요한 것이 아니라 활성을 나타내는 데 있어서 단백질의 3차원 구조가 매우 중요함을 알 수 있었다.

4. 재조합 saxatilin에 의한 혈관 평활근세포 부착 억제효과

RAoSMC의 vitronectin에 대한 평활근세포 부착은 처리한 saxatilin의 농도에 비례하여 저해 받았으며, IC₅₀는 약 65 nM로 확인되었다(그림 7). 또한 fibronectin에 대해서도 saxatilin의 농도에 비례하여 세포 부착이 저해를 받았는데 IC₅₀값은 vitronectin에 대해서보다 약 400배정도 높은 약 25 μ M임을 확인하였다 (그림 8). 따라서 saxatilin의 평활근세포 부착 억제 특이성은 특히 vitronectin에 대해 즉, vitronectin의 수용체인 $\alpha_v\beta_3$ integrin에 대해 매우 특이적이라는 사실이 확인되었다.

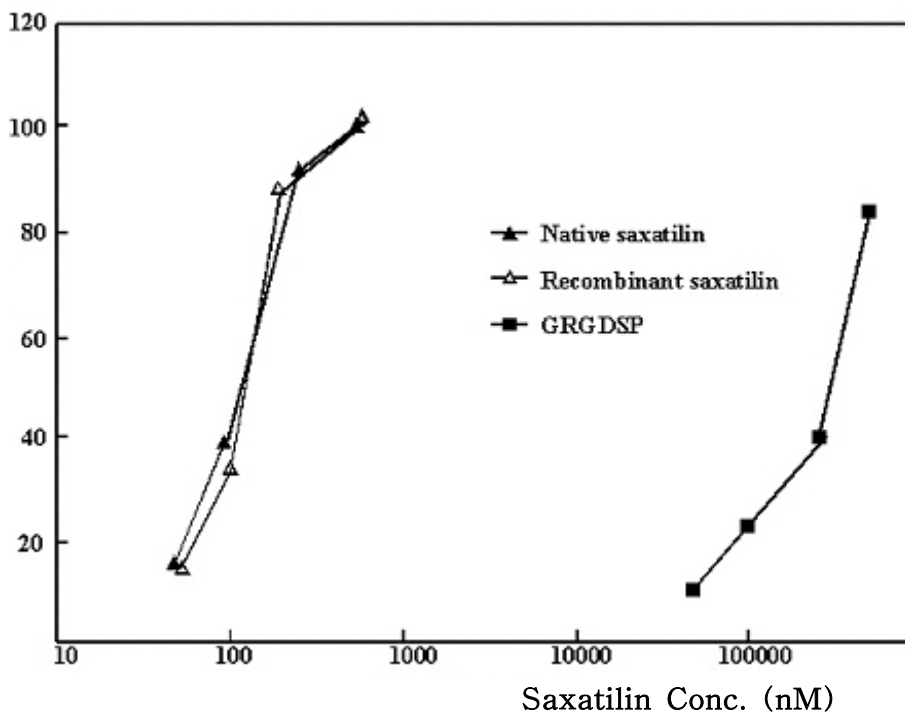


그림 6. 재조합 disintegrin에 의한 collagen 유도 혈소판 응집 억제효과. 그래프의 세로축은 처리한 혈소판 응집 억제제들의 혈소판 응집 억제 percent (%)를 나타내며 가로축은 사용한 혈소판 응집 억제제들의 농도 (nM)를 나타내고 있다. ▲는 천연형 saxatilin을, △는 재조합 saxatilin을, ■는 GRGDSP 펩타이드를 표시한다. 각각의 IC₅₀ 값은 137 nM (천연형 saxatilin), 139 nM (재조합 saxatilin), 270 mM (GRGDSP)로 측정되었다

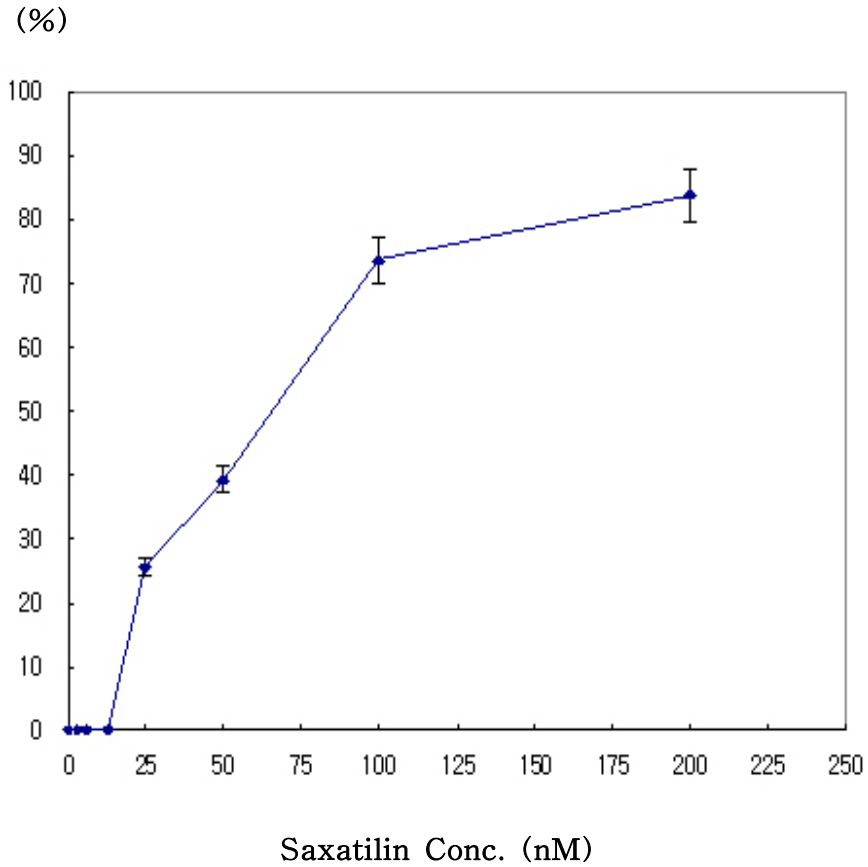


그림 7. 재조합 saxatilin의 vitronectin에 대한 평활근세포 부착 억제효과. 세로축은 vitronectin에 대한 혈관 평활근세포 부착 억제 정도를 %로 나타내며, 가로축은 처리한 재조합 saxatilin의 농도 (nM)를 나타낸다. 처리한 saxatilin의 농도에 비례하여 혈관 평활근세포의 vitronectin에 대한 부착이 억제되었다.

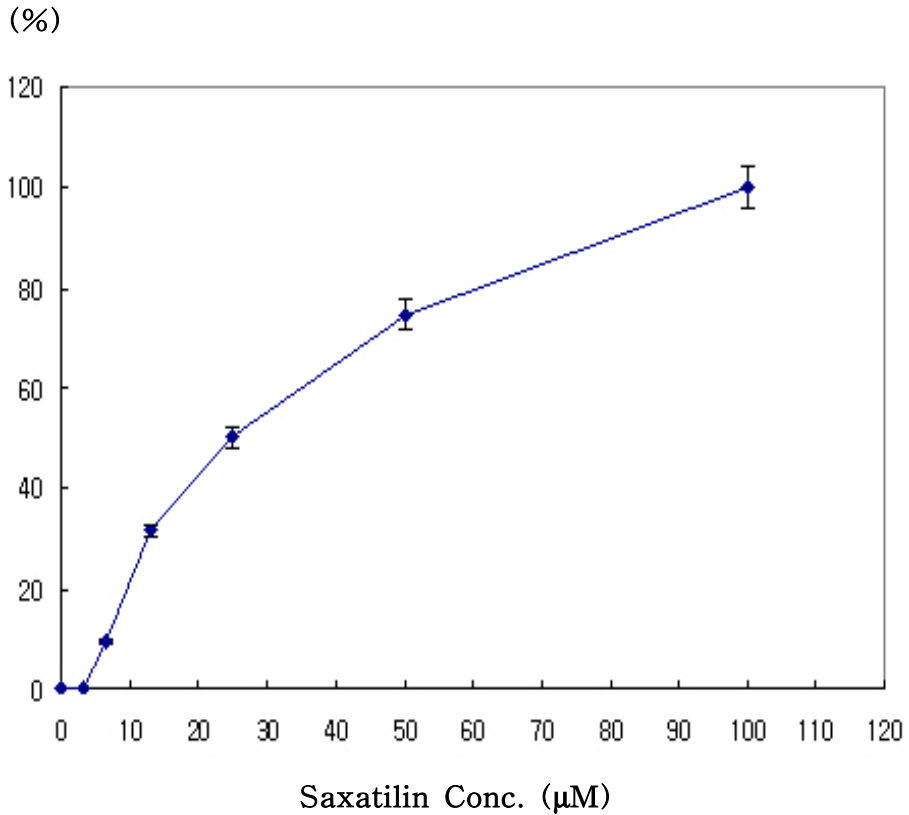


그림 8. 재조합 saxatilin의 fibronectin에 대한 평활근세포 부착 억제 효과. 세로축은 fibronectin에 대한 혈관 평활근세포의 부착 억제 정도 (%)를 나타내며, 가로축은 처리한 재조합 saxatilin의 농도 (μM)를 나타낸다. Vintronectin에 대한 결과와 마찬가지로 처리한 saxatilin의 농도에 비례하여 세포의 fibronectin에 대한 부착이 억제되었다.

5. 재조합 saxatilin에 의한 혈관 평활근세포 증식 억제효과

RAoSMC에 대한 saxatilin의 증식억제 효과는 FBS에 의한 세포증식에서는 효과가 없었으나 PDGF-BB 및 bFGF와 같은 성장인자 처리에 의한 증식에 대해서는 saxatilin의 농도에 비례하여 세포의 증식이 강하게 억제됨을 확인하였다 (그림 9). PDGF-BB, bFGF에 의한 세포 증식 억제 실험에서 IC_{50} 값은 각각 약 $7.5 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$ 로 이는 saxatilin의 vitronectin에 대한 세포 부착억제시 나타낸 IC_{50} (65 nM) 값보다 약 40~100배 이상 높은 값이었다.

6. 혈관 평활근세포에서의 integrin 유전자의 발현변화

Saxatilin이 혈관 평활근세포의 세포부착 및 증식에서 매우 강한 억제 활성을 보여 그 작용기전을 보다 분자수준에서 규명하고자 saxatilin을 처리한 평활근세포에서 integrin 유전자의 발현변화를 분석하였다. 즉, 평활근세포 내 integrin들 중 vitronectin의 수용체인 integrin $\alpha_v\beta_3$ 과 fibronectin의 수용체인 integrin $\alpha_5\beta_1$ 등 두 가지 integrin subunit들의 mRNA 변화를 RT-PCR로 측정하였다. 그림 10에서 볼 수 있듯이 saxatilin 처리 시 PDGF-BB 등의 성장인자가 존재할 때 특정 integrin 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다.

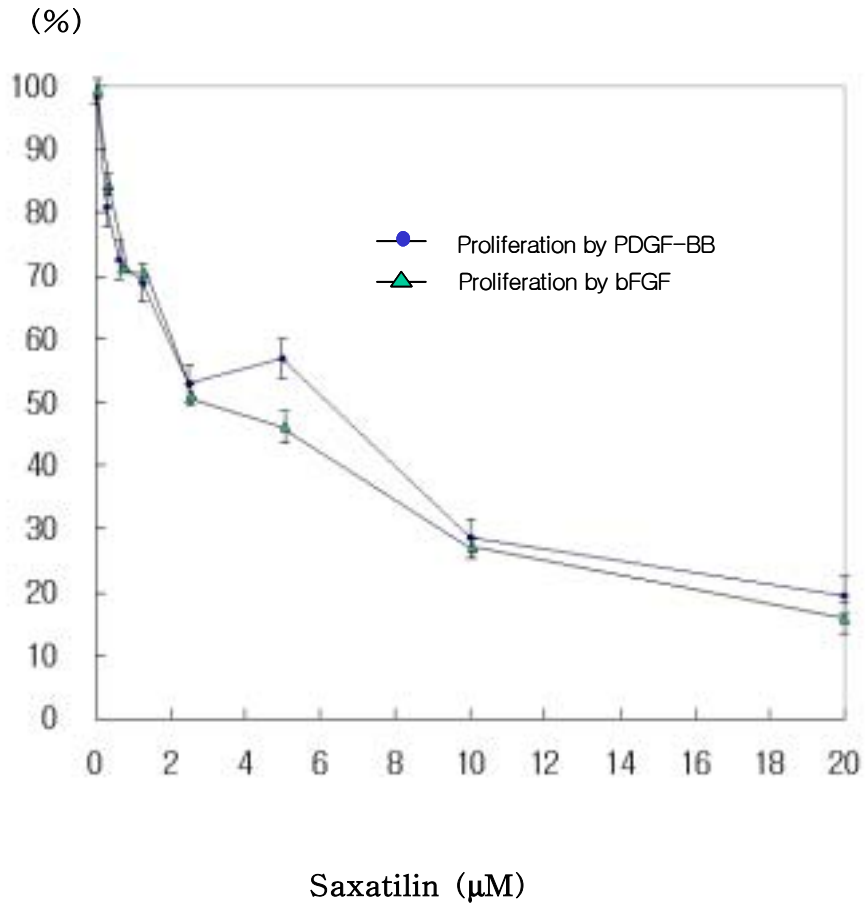


그림 9. 성장인자 유도시 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포의 성장 억제효과. 그래프의 세로축은 성장인자에 의한 세포성장을 percent (%)로 나타낸 것이며 그림에서 (○)는 saxatilin에 의한 PDGF-BB (10 ng/ml)유도 성장억제를, (△)는 bFGF (20 ng/ml) 유도 성장억제를 나타낸다.

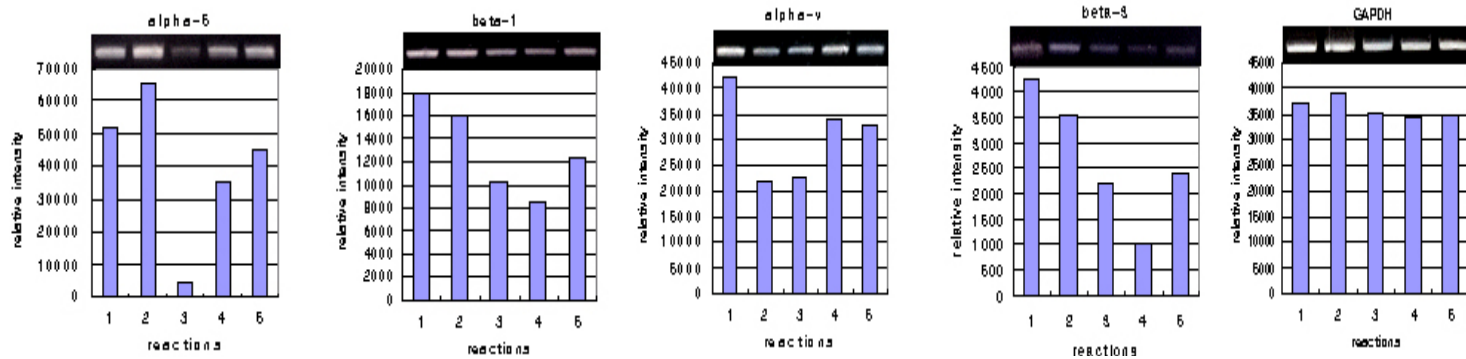


그림 10. 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포에서의 integrin 유전자 발현변화. 그림에서 세로축은 RT-PCR 산물의 상대적인 intensity를 나타내며, 가로축에서 1은 PDGF (10 ng/ml)와 2% FBS로, 2는 5% FBS (control)로, 3은 2% FBS (control)로, 4는 saxatilin (200 nM) 30분 전처리 후 PDGF (10 ng/ml)와 2% FBS로, 5는 saxatilin (200 nM) 30분 전처리와 함께 PDGF (10 ng/ml)와 5% FBS등으로 1시간 처리한 평활근세포의 integrin 유전자 (α_v , β_3 , α_5 , β_1) 발현을 나타낸다.

7. 혈관 평활근세포의 형태 및 actin cytoskeleton 변화

Saxatilin을 처리한 혈관 평활근세포는 시간이 경과함에 따라서 saxatilin을 처리하지 않은 정상세포의 형태인 그림 11의 (가)와 같은 성장 표현형에서 세포 부착면적이 점차 축소되어 원형에 가까운 모습 (그림 11 다)으로 변함을 관찰하였다. 약 50% 정도의 confluency로 부착된 혈관 평활근세포에 고농도 (50 μ M)의 saxatilin을 처리한 경우 약 5시간 전후로 대부분의 세포가 부착능력을 상실하고 부유하게 됨을 관찰하였다 (그림 11 마). 이러한 saxatilin에 의한 세포 부착능력의 상실 원인을 세포골격계의 변화에 두고 그 연관성을 밝히고자 saxatilin 처리 및 비처리군의 actin cytoskeleton 변화를 rhodamine-phalloidin으로 염색하여 관찰하였다. 그 결과 그림 12와같이 정상군에 비하여 saxatilin 처리군의 actin cytoskeleton이 급속히 해체됨을 확인할 수 있었다.

8. 혈관 평활근세포에서 saxatilin에 의한 신호전달 변화

Saxatilin이 성장인자들에 의한 세포증식 신호전달을 어떻게 저해하는지를 분석하고자 saxatilin이 MAP kinase의 ERK (ERK1, ERK2)의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위해 PDGF-BB 및 bFGF 등의 성장인자를 처리한 혈관 평활근세포의 ERK 인산화 반응을 immunoblot을 통해 확인하였는데 의외로 PDGF-BB 성장인자의 자극에 대하여 saxatilin을 처리한 군에서 PDGF-BB에만 의해서 유도된 군보다 더 긴 시간동안 ERK 인산화 반응이 연장됨을 확인하였다 (그림 13). 이러한 결과는 bFGF에 의한 자극에서도 saxatilin에 의해

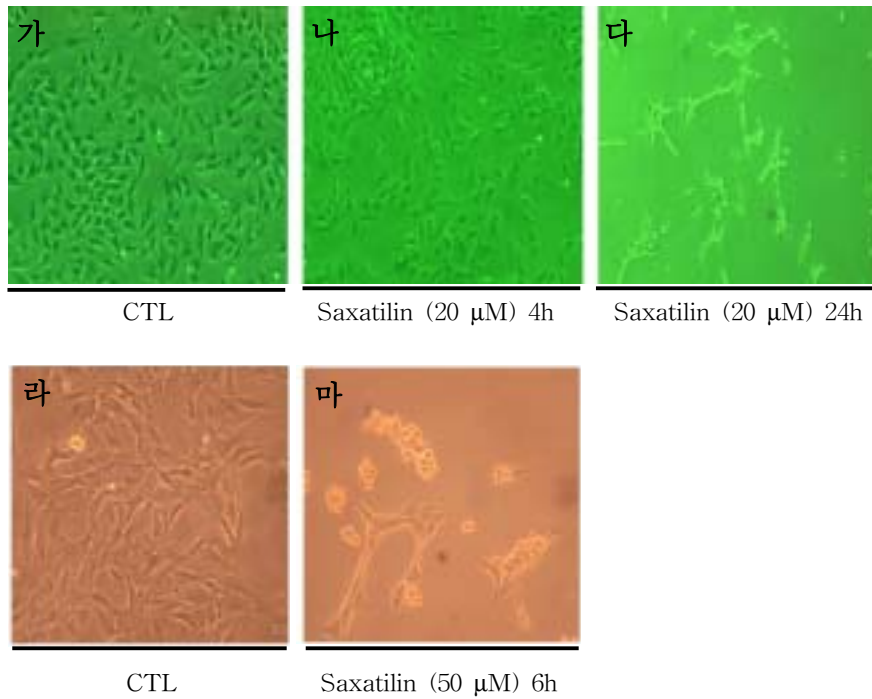


그림 11. 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포의 형태변화. 그림 (나)와 (다)는 20 μM 의 saxatilin을 처리하고 시간이 경과함에 따라 세포의 형태가 변화하는 모습을 관찰한 것이다. 그림 (마)는 고농도의 saxatilin 처리 후 5시간 전후에 세포가 부착능력을 상실한 모습의 그림이다(가~다; 40배, 라~마; 100배 관찰).

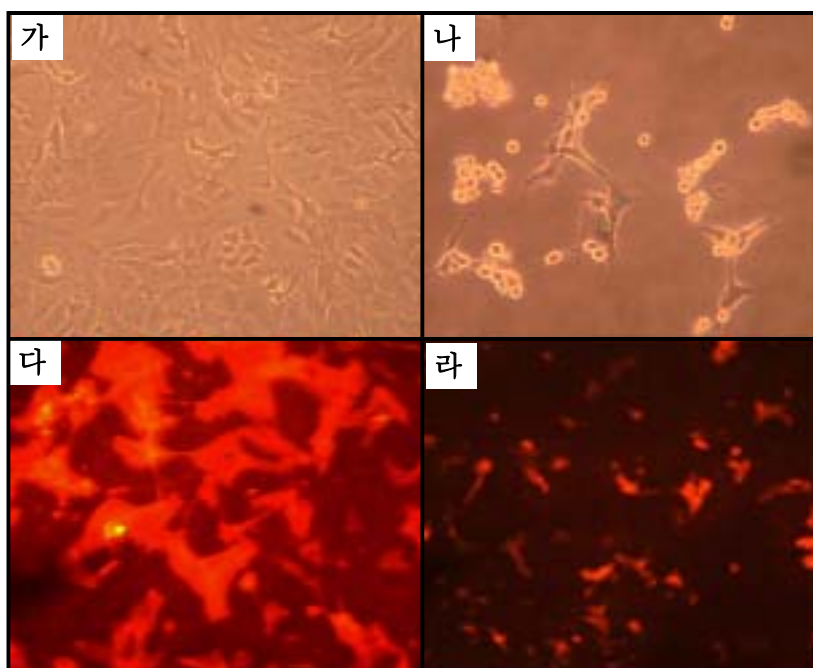


그림 12. 재조합 saxatilin에 의한 평활근세포의 actin cytoskeleton의 변화. 그림 (가)와 (나)는 각각 정상 세포와 50 μM 의 saxatilin이 처리된 세포를 나타내며 (다)와 (라)는 그에 대응하는 세포를 rhodamin-phalloidin 염색하여 관찰한 것이다(가, 나; 광학 100배, 다, 라; 형광 400배 관찰). 그림 (다)와 (라)는 각각 정상세포와 50 μM saxatilin이 처리된 세포로 (라)에서 평활근세포의 actin cytoskeleton이 해체되어 있음을 볼 수 있다.

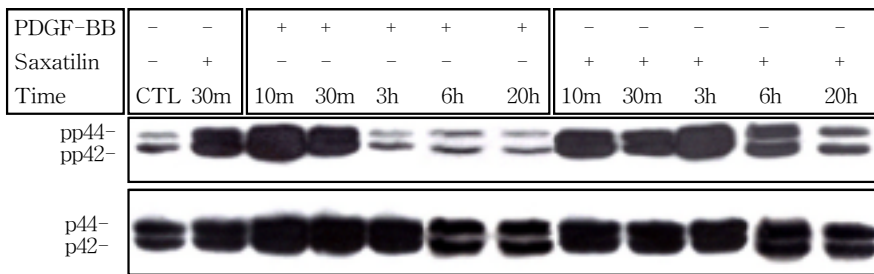


그림 13. 재조합 saxatilin에 의한 MAP kinase의 ERK 활성화변화. PDGF-BB (10 ng/ml) 성장인자와 재조합 saxatilin (20 μ M)에 의해서 ERK1 (p44)와 ERK2 (p42)가 활성화 되었다. PDGF-BB에 의한 ERK 활성화는 30분 이후로 감소하였으나 saxatilin을 전처리한 후 PDGF-BB에 의한 ERK 활성화는 3시간 이후로 조금 감소하였으나 PDGF-BB에만 의한 것보다 긴 시간 유지되었다.

ERK 인산화 반응이 더 연장됨을 동일하게 관찰할 수 있었다. 결국 성장인자 없이 saxatilin의 처리만으로도 ERK 인산화가 가능할 수 있다는 가정을 할 수 있었다. Saxatilin의 농도에 따른 ERK 인산화변화를 실험해본 결과, 그림 14의 2번째 그림에서처럼 saxatilin만으로도 농도에 비례하여 ERK의 인산화가 증가된다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 anti-pTyr antibody를 이용하여 인산화되는 모든 tyrosine 밴드를 확인할 수 있었다. 그중 120 kDa 정도 위치의 FAK에 해당하는 band 또한 saxatilin의 농도가 증가하면 인산화 된다는 흥미로운 결과를 발견하였다 (그림 14).

9. Saxatilin에 의한 혈관 평활근세포 apoptosis의 증거

혈관 평활근세포에 saxatilin을 처리한 후 발생하는 세포 부착능력 상실 현상은 그 이후에 세포를 사멸하는데 이를 것으로 추정되는 바, apoptosis 여부를 확인하기 위하여 saxatilin 처리 후 시간 경과에 따른 apoptosis 표지인자들의 변화를 immunoblot으로 확인하였다. 그 결과 그림 15와 같이 saxatilin을 처리한 혈관 평활근세포의 genomic DNA를 뽑아 정상세포의 것과 비교해 본 결과 saxatilin 처리 후에는 전형적인 apoptosis 현상인 genomic DNA의 laddering을 확인할 수 있었다 (그림 15).

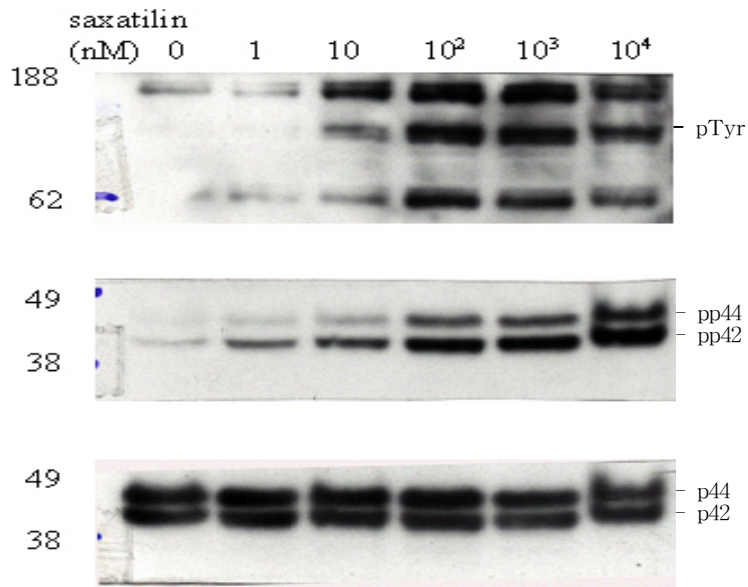


그림 14. 재조합 saxatilin에 의한 ERK 및 FAK의 활성화. 어떠한 성장인자 없이 0.2% FBS DMEM 배양액에서 평활근세포에 saxatilin을 농도별로 처리하였다. Saxatilin의 농도가 증가함에 따라 ERK (ERK 1; p44, ERK 2; p42)와 FAK에 해당하는 tyrosine이 활성화 되었다. 왼쪽의 숫자들은 단백질의 크기를 kDa으로 나타낸 것이다.

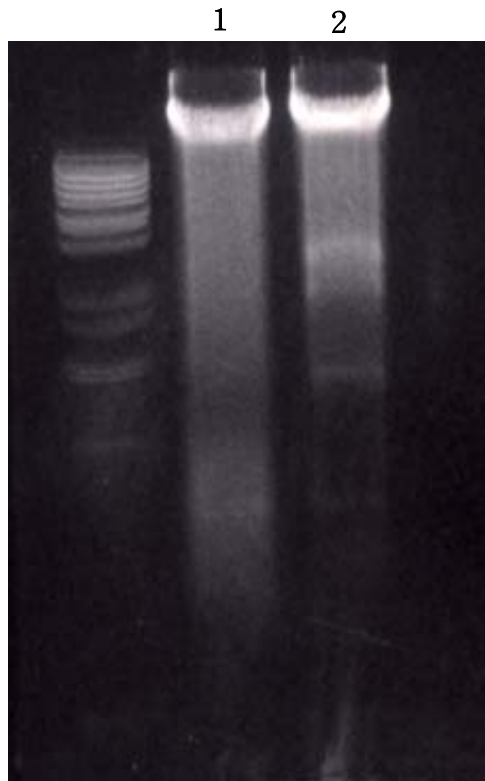


그림 15. Saxatilin에 의한 DNA laddering 현상. 50% confluent한 혈관 평활근세포에 100 μ M의 재조합 saxatilin을 처리 후 6시간에 genomic DNA의 laddering 현상을 확인하였다. 그림에서 왼쪽 끝은 DNA size marker를 나타내며, 1은 saxatilin 비처리군 (0.2% FBS DMEM), 2는 saxatilin을 처리한 군 (100 μ M saxatilin/0.2% FBS DMEM)이다.

10. 혈관 평활근세포에서 saxatilin 유전자 발현의 영향

Lipofectamin을 사용한 transfection 방법은 liposome류 중에서는 재현성이 비교적 우수했으나 조직학적 염색 분석과 advanced microscope imaging system (AMIS) 영상분석 software (Biobud, Seoul, Korea)를 이용한 염색세포수를 분석한 결과 평균적으로 10% 미만의 아주 낮은 효율로 유전자 전달이 이루어졌음을 확인하였다. (그림 16 가). 반면에 nucleofection이라는 전기적 transfection 방법을 이용한 경우 세포손상이 다소 높지만 50~90%에 이르는 매우 높은 transfection 효율을 얻을 수 있었다 (그림 16 나). 이를 통해 saxatilin 유전자가 발현된 혈관 평활근세포의 배양액을 회수하여 anti-saxatilin guinea pig antibody를 이용하여 세포로부터 분비된 saxatilin을 확인한 결과 약 8 kDa 정도의 단백질 밴드를 확인하였다 (그림 17). 이와 같은 saxatilin의 유전자 발현에도 불구하고 세포의 부착이나 증식 및 ERK, FAK의 활성화 등에는 뚜렷한 차이를 관찰하지 못하였다.

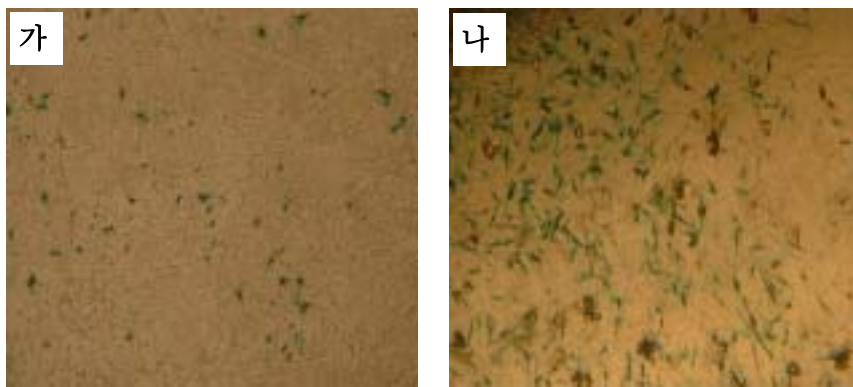


그림 16. Transfection된 혈관 평활근세포의 조직학적 염색분석. 조직학적 염색을 통해 LacZ DNA가 transfection되어 lacZ 유전자를 발현하는 세포는 푸른색을 띤다. 그림에서 (가)는 Lipofectamine을 이용하여, (나)는 Nucleofector를 이용하여 transfection된 세포를 나타낸다.

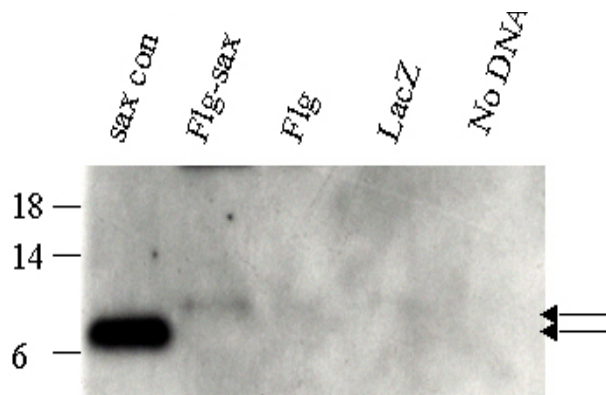


그림 17. Nucleofection에 의한 세포에서 saxatilin 유전자 발현확인. 각각 서로 다른 DNA (Flag-sax, Flag, LacZ)를 한 세트씩 만들어 Nucleofector를 이용하여 평활근세포에 transfection 하였다. 그 배양액을 2~3일 후 회수하여 anti-saxatilin antibody를 이용하여 immunoblot을 수행하였는데, 그림에서 saxatilin 표준단백질 (sax control)과 pFLAG-SAX 발현백터로 transfection된 세포에서 발현된 saxatilin (Flag-sax) 크기는 FLAG에 의한 분자량만큼 차이가 남을 알 수 있다. 그림에서 왼쪽의 숫자들은 단백질의 크기를 kDa으로 나타낸 것이다.

IV. 고찰

동맥경화증 (atherosclerosis)이나 관상동맥성형술 (PTCA)을 시행한 후 약 30~40% 재발되는 혈관 재협착증 (restenosis)은 혈관 평활근 세포의 증식 및 이동이 주요 유발원인인 것으로 알려져 있다. 특히, 평활근세포 표면에 존재하는 integrin 수용체와 fibrinogen, vitronectin 및 laminin과 같은 ECM 단백질간의 상호작용과, integrin 수용체와 세포질내의 다양한 부속물질들로 전파되는 세포 신호전달에 의한 cytoplasmic kinase의 활성화나 성장인자 수용체 및 ion channel등과의 상호작용에 의한 직간접적인 세포주기의 조절기능이 세포의 증식, 사멸 및 분화 등에 광범위한 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있다. 평활근세포에는 $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_6\beta_4$ 등 다양한 integrin family가 존재하는 것으로 보고 되고 있으나, 그 중에서도 $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ 등이 주된 integrin으로 알려져 있다. 특히 대동맥의 평활근세포에서는 vitronectin의 수용체인 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 fibronectin 수용체인 integrin $\alpha_5\beta_1$ 이 세포의 부착, 이동 및 증식에 크게 영향을 주는 것으로 연구되어 있다³³. 또한, 선행된 연구를 통해 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 vitronectin의 결합을 억제하는 항체나 RGD 포함 disintegrin 합성 억제제를 처리했을 때 다양한 종양세포와 혈관 내피세포의 세포부착, 이동 및 증식이 저해되는 것으로 확인된 바 있다.

본 연구에서는 한국산 칠점사에서 분리한 disintegrin인 saxatilin을 유전자 재조합 단백질로 생산하는 공정을 확립하였고, 효모 배양액으로부터 분리 정제한 경우에도 그 활성이 뱀독에서 유래한 천연형과 동일함을 확인하였다. 재조합 saxatilin을 평활근세포에 처리하여 세포의 부착, 이동 및 증식에 미치는 영향을 분석하였다. 평활근세포의 vitronectin에 대한 부착 억제능력 (IC_{50} 값)은 약 65 nM (그림 7)로 매

우 강력하였고, fibronectin에 대해서는 약 400배 높은 농도 (그림 8)가 필요함을 확인하여 vitronectin에 대하여 더 특이적임을 알 수 있었다. 또한, saxatilin이 평활근세포의 증식에 미치는 효과는 fibronectin과 평활근세포의 결합을 억제할 수 있는 saxatilin 농도에서 억제된다는 사실을 알게 되었다 (그림 9). 이러한 사실은 평활근세포의 증식억제를 통한 혈관 재협착증 예방에 있어서 integrin $\alpha_v\beta_3$ 뿐만이 아니라 integrin $\alpha_5\beta_1$ 까지도 동시에 억제해야 그 효과가 있음을 암시하는 것이다. 한편, integrin의 β subunit들은 세포질 내에서 tailin, vinculin, paxillin, FAK, CAS 등의 부속단백질과 작용하여 actin cytoskeleton 변화 및 세포신호 전달경로 변화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 saxatilin 처리 시 평활근세포 내 integrin 유전자 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인하였는데, saxatilin 처리 시 integrin중 $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 이 전사단계부터 저해 받는다는 새로운 사실을 규명하였다 (그림 10). 최근에 Gax transcription factor가 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 $\alpha_5\beta_1$ 의 발현을 저해한다고 보고 된바있어³⁴ 이러한 integrin의 발현을 조절하는 전사조절인자에 대한 disintegrin의 영향을 확인한다면 매우 중요한 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. RT-PCR 실험을 위해 처리한 saxatilin의 농도 (200 nM)는 integrin $\alpha_v\beta_3$ 와 vitronectin과의 결합을 억제하여 평활근세포의 부착을 억제할 정도의 농도로 결정된 것이며 향후 세포의 증식 및 integrin $\alpha_5\beta_1$ 과 fibronectin의 결합까지도 동시에 저해할 수 있는 고농도를 처리하여 변화하는 integrin 유전자의 발현 및 단백질 변화를 비교 분석한다면 매우 흥미로운 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 한편, 평활근세포의 증식과 세포골격계가 완전히 억제되는 고농도의 saxatilin을 처리하였을 때 세포의 부착능력이 상실되고 결국은 apoptosis에 이르게 됨을 추가로 확인하였다 (그림 11, 12, 15). 그럼에도 불구하고 PDGF-BB나 bFGF 같은 성장인자와 saxatilin을 같이 처리하는 경우에 성장인자에만 의한 ERK 인산화보다도 더 긴 시간동안 ERK 인산

화가 유지됨을 확인하였다. 따라서 혈관 평활근세포에 saxatilin만을 농도별로 처리하는 실험을 수행하였는데 그 결과 disintegrin인 saxatilin이 성장인자와 관계없이도 ERK를 활성화함을 새롭게 확인하였다. 즉 saxatilin에 의한 ERK 활성화는 성장인자의 수용체를 자극하는 경로와는 별도로 또는 단독으로 integrin과의 결합만으로 이루어질 수 있다는 사실을 암시하고 있다. 만약 이러한 ERK의 활성화가 정상적인 상태에서 성장인자의 자극에 의한 신호경로를 따른다면 세포가 증식되는 결과에 도달해야 한다. 최근보고에 의하면 human retinal endothelial cell에 fibronectin의 일부 절편을 처리할 경우 integrin $\alpha_5\beta_1$ 과 PI3-kinase경로를 통하여 세포부착, 증식 및 ERK활성화가 유발된다고 한다³⁵. 그러나 saxatilin을 처리하는 경우에는 MAP kinase의 활성화에도 불구하고 세포의 부착 능력과 세포골격계의 붕괴로 말미암아 결국 세포사 경로에 빠지게 되는 것으로 추정된다. 그러한 증거로서 saxatilin에 의해 caspase 9의 활성화와 genomic DNA laddering을 확인할 수 있었다. 또 다른 한국산 살모사뱀독에서 유래된 salmosin은 saxatilin의 유사체로서 endothelial cell과 cancer cell에서 saxatilin과 유사한 농도로 세포의 증식, 부착 및 이동을 억제하는 것으로 보고 된바 있다. 또한 salmosin은 강력한 세포 부착 억제능력을 통해서 B16F melanoma cell에 의한 암전이 및 증식을 억제하는 것으로 확인 되었다. 이러한 뱀독유래의 디스인테그린들이 세포들에 갖는 증식억제 능력을 토대로 혈관 평활근세포의 증식을 억제하여 혈관재협착 억제가능성을 확인해 보고자 본 연구를 수행하였다. 결과들에서 보듯이 saxatilin의 단백질로 처리된 혈관 평활근세포에서 확인된 세포의 증식억제 현상은 유사체인 salmosin의 경우, B16F melanoma cell에서 IC₅₀ 2.7 μ M로 증식을 억제하였고²⁹, saxatilin의 경우는 인간유래 체대정맥내피세포 (HUVEC; human umbilical vein endothelial cell)에서 IC₅₀ 1.12 μ M 범위로 증식을 억제하는 것과³⁰ 유사한 농도임을 확인할 수 있었다. 그러나 saxatilin의 유전자 발현벡터

를 주입한 경우 immuno blot분석에서 saxatilin의 단백질이 발현된 것을 확인할 수 있었음에도 불구하고 단백질 처리 시에 나타난 뚜렷한 세포 증식억제 현상을 보이지 못하였다. 이러한 현상은 첫째 유전자 발현에 의한 세포 배양액 내 분비된 saxatilin단백질의 농도가 낮아 외부에서 고농도로 단백질 처리한 증식억제농도에 도달하지 못하였거나 평활근세포의 integrin에 미치는 자극이 매우 저조하였거나, 둘째로 백독유래 단백질인 saxatilin이 혈관 평활근세포에서 단백질활성을 나타내는 구조를 형성시키지 못했을 가능성이 있다. 이를 미루어 좀 더 강력한 발현 체계를 이용한 disintegrin 유전자의 발현 및 혈관 평활근세포에서 발현된 saxatilin 단백질이 활성을 갖는 구조를 유지하는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

이상의 결과들을 근거로 혈관 평활근세포에서 integrin 유전자의 발현을 억제하는 전사조절인자를 규명하고, integrin $\alpha_v\beta_3$ 또는 $\alpha_5\beta_1$ 억제를 통한 세포표면 integrin 발현의 변화, 세포분열 조절계에 미치는 영향 등이 지속적으로 연구되어야 할 것이다. 본 연구에서 사용된 재조합 saxatilin은 평활근세포의 이동 및 증식 억제기전을 규명하는데 매우 중요한 정보를 제공하고 있으며, 이를 이용한 혈관 재협착증의 예방 및 치료에도 유용하게 사용될 가능성이 높다고 할 수 있다.

V. 결론

한국산 칠점사 유래의 뱀독으로부터 분리한 신규 disintegrin인 saxatilin을 재조합 *Pichia* 호모에서 고농도 배양하여 순수한 재조합 saxatilin을 정제하였다. 재조합 saxatilin은 천연형과 활성이 동일함을 확인 하였고 혈관 평활근세포에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 saxatilin이 평활근세포의 부착과 증식을 강력하게 억제하고 세포 표면의 integrin 유전자를 전사단계부터 억제한다는 사실을 새롭게 규명하였다. 또한 평활근세포에 saxatilin을 고농도로 처리할 경우 세포의 actin cytoskeleton이 해체되고 세포의 부착능력이 상실되어 결국 세포를 apoptosis로 유도함을 확인하였다. DNA laddering 분해현상을 확인함으로써 이러한 결과를 뒷받침 할 수 있었다. 여러 가지 transfection 방법을 시도하여 saxatilin 유전자전달에 의한 혈관 평활근세포에 미치는 것과 같은 효과를 기대하였으나 발현 정도가 매우 낮아 단백질 처리에서와 같은 동일한 결과는 볼 수 없었다. 그러나 재조합 saxatilin 단백질이 평활근세포에 미치는 영향 등을 통해 얻은 새로운 정보는 앞으로 혈관 재협착증 (restenosis)이나 동맥경화증 (atherosclerosis)에 있어 integrin의 역할 및 새로운 치료제 개발에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Giancotti FG, and Rouslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
2. Ching-Hsiang, Wu CH, Chen YC, Hsiao G, Lin CH, Liu CM, et al. Mechanism involved in the inhibition of neointimal hyperplasia by Abciximab in a rat model of balloon angioplasty *Thrombosis Research* 2001;101:127-138.
3. Baron JH, Moiseeva EP, de Bono DP, Abrams KR, Gershlick AH. Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by C7E3 Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis. *Cardiovascular research* 2000;48:464-472.
4. Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, Hesselbacher SE, Feldman MJ, McNamara CA, et al. Selective $\alpha_v\beta_3$ -receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 2001;103:1906-1911.
5. Mawatari K, Liu B, Kent KC. Activation of integrin receptor is required for growth factor-induced smooth muscle cell dysfunction. *J Vas Surg* 2000;31(2):375-381.

6. Folkman, J. and D'Amore, P. A. Blood Vessel Formation: What Is Its Molecular Basis? *Cell* 1996;87:1153-1155.
7. Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J. A role of sialyl lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis *Nature* 1993;365:267-269.
8. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, et al. Integrin Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels. *Cell* 1994;79:1157-1164.
9. Rouslahti E and Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987;238(4826):491-497.
10. Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, Niewiarowski S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Bio. Chem* 1987;262:16157-16163
11. Adler M, Lazarus RA, Dennis MS, Wagner G. Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. *Science* 1991;253:445-448

12. Adler M, Carter P, Lazarus RA, Wagner G. Cysteine pairing in the glycoprotein IIb/IIIa antagonist kistrin using NMR, chemical analysis, and structure calculations. *Biochemistry* 1993;32:282-289
13. Klaus W, Broger C, Gerber P, Senn H. Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. *J Mol Biol* 1993;232:897-906
14. Senn H, Klaus W. The nuclear magnetic resonance solution structure of flavoridin, an antagonist of the platelet GP IIb-IIIa receptor. *J Mol Biol* 1993;232:907-925
15. Jaseja M, Smith KJ, Lu X, Williams JA, Trayer H, Trayer IP, et al. ¹H-NMR studies and secondary structure of the RGD-containing snake toxin, albolabrin. *Eur J Biochem* 1993;218:853-860
16. Chen Y, Pitzemberger SM, Garsky VM, Lumma PK, Sanyal G, Baum J. Proton NMR assignments and secondary structure of the snake venom protein echistatin. *Biochemistry* 1991;30:11625-11636
17. Cooke RM, Carter BG, Martin DM, Murray-Rust P, Weir MP. Nuclear magnetic resonance studies of the snake toxin

- echistatin. ¹H resonance assignments and secondary structure. *Eur J Biochemistry* 1991;202:323-328
18. Cooke RM, Carter BG, Murray-Rust P, Hartshorn MJ, Herzyk P, Hubbard RE. The solution structure of echistatin: evidence for disulphide bond rearrangement in homologous snake toxins. *Protein Eng* 1992;5:473-477
 19. Saudek V, Atkinson RA, Pelton JT. Three-dimensional structure of echistatin, The smallest active RGD protein. *Biochemistry* 1991;30:7369-7372
 20. Dalvit C, Widmer H, Bovermann G, Breckenridge R, Metternich R. ¹H NMR studies of echistatin in solution. Sequential resonance assignments and secondary structure. *Eur J Biochem* 1991;202:315-321
 21. Yasuda T, Gold HK, Fallon JT, Leinbach RC, Guerrero JL, Collen D, et al. Monoclonal antibody against the platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor prevents coronary artery reocclusion after reperfusion with recombinant tissue-type plasminogen activator in dogs. *J Clin Invest* 1988;81(4): 1284-1291
 22. Gold HK, Coller BS, Yasuda T, Saito T, Fallon JT, Collen D, et al. Rapid and sustained coronary artery recanalization with

combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and monoclonal antiplatelet GPIIb/IIIa antibody in a canine preparation. *Circulation* 1988;77:670-677

23. Coller BS, Folts JD, Scudder LE, Smith SR. Antithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in an experimental animal model. *Blood* 1986; 68:783-786
24. Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol.* 1994;31:289-300
25. Trikha M, De Clerck YA, Markland FS. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. *Cancer Res* 1994;54(8):4993-4998
26. In-Cheol Kang, Kwang-Hoe Chung, Soo-Jung Lee, Yong-Dae Yun, Hong-Mo Moon, Doo-Sik Kim. Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. *Thromb Res* 1998;91:9165-73
27. In-Cheol Kang, Young-Don Lee, Doo-Sik Kim. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res*

1999;59(15):3754-3760

28. Dong-Soo Park, In-Cheol Kang, Hak-Dai Kim, Kwang-Hoe Chung, Doo-Sik Kim, Yungdae Yun. Cloning and characterization of novel disintegrins from *Agkistrodon halys* venom. *Molecules and Cells* 1998;(8)5:578-584
29. In-Cheol Kang, Doo-Sik Kim, Yang-Soo Jang, Kwang-Hoe Chung. Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:169-173
30. Sung-Yu Hong, You-Seok Koh, Kwang-Hoe Chung, Doo-Sik Kim. Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. *Thromb Res* 2002;105:79-86
31. Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD, Groschel-Stewart U. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and subculture. *Cell Tissue Res* 1977;177:503-522
32. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Meininger GA. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1427-H1433

33. Davenpeck KL, Marcinkiewicz C, Wang D, Niculescu R, Shi Y, Zalewski A. et al. Regional differences in integrin expression; role of $\alpha_5\beta_1$ in regulating smooth muscle cell function. *Cir Res* 2001;88:352-358

34. Witzensichler B, Kureishi Y, Luo Z, Le Roux A, Branellec D, Walsh K. Regulation of smooth muscle cell migration and integrin expression by Gax transcription factor. *J Clin Invest* 1999;104(10):1469-1480

35. Wilson SH, Ljubimov AV, Morla AO, Sergio Caballero, Polyxenie LC, Spoerri PE, et al. Fibronectin Fragments Promote Human Retinal Endothelial Cell Adhesion and Proliferation and ERK Activation through alpha 5 beta 1 Integrin and PI 3-Kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1704-1715

Abstract

Effects of Recombinant Saxatilin, a Novel Disintegrin from Korean Snake on Smooth Muscle Cells

Sae Ah Sun

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

(Directed by Professor Kwang Hoe Chung)

Background: Restenosis occurs in approximately 30~40% of patients following percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) for treatment of atherosclerosis. The stimulation of vascular smooth muscle cell (SMC) is critical steps in the development of the neointimal tissues that contribute to the restenosis of an arterial wall. RGD-containing peptides are able to inhibit the binding of ligands to certain beta3 integrins, such as alpha(IIb)beta(3) and alpha(v)beta(3), both of which are involved in neointimal hyperplasia. To elucidate the detailed mechanisms involved in the inhibition of neointimal hyperplasia, the effects of saxatilin, a RGD-containing disintegrin, on smooth muscle cell have been studied.

Methods and Results: The recombinant saxatilin was highly expressed in *Pichia pastoris* and purified to be homogeneity with an active form. To investigate the biological effects of the disintegrin on SMC, changes of cellular signaling, gene expression of SMC as well as inhibition of SMC adhesion and proliferation after treatment of the disintegrin have been examined by immunoblot and RT-PCR, respectively. It interacts with integrin alpha(v)beta(3) and significantly suppresses the adhesion of rat aortic SMC to vitronectin with an IC₅₀ of 65 nM and the proliferation of SMC induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) with an IC₅₀ of 2.5 μM. Saxatilin disassembled cortical actins at focal adhesions and induced cells to be rounded and

detached, but it did not alter microtubule structures in the early stage of cells being rounded. In saxatilin-treated SMC, focal adhesion kinase and ERK were phosphorylated. While SMC proliferated normally on plates coated with saxatilin, cells treated with saxatilin eventually underwent apoptosis. The disintegrin also significantly down-regulated the expression of integrins, beta 3, beta 1, and alpha 5.

Conclusion: These results may provide new insights into role of integrin in SMC pathophysiology as well as role of SMC in the process of neointimal hyperplasia and have significant implications for disintegrin therapy for the treatment of restenosis and atherosclerosis.

Key Words: integrin, disintegrin, saxatilin, recombinant proetin, smooth muscle cell, apoptosis