연세대학교 대학원

의과학과

편 욱 범

연세대학교 대학원

의과학과

편 욱 범

### 지도교수 조 승 연

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원 의과학과 편 욱 범

## 편욱범의 박사 학위논문을 인준함

심사위원	<u>인</u>
심사위원	인

## 연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 늘 아낌없는 관심과 지도를 베 풀어주신 조승연 선생님께 진심으로 감사드립니다. 연 구의 진행에 있어 많은 조언과 격려를 주신 장양수 선 생님, 본 연구의 시작에서 마치기까지 세심한 지도를 해주신 정광회 선생님께 다시 한번 고개 숙여 감사드 립니다. 그리고 연구를 진행함에 있어서 실험의 기법과 해석에 도움을 주신 심혈관연구소의 손영덕 선생님, 추 운 겨울부터 유난히도 비가 많았던 여름이 지나도록 실험을 도와주신 심혈관연구소의 선새아 선생님, 강수 정 선생님께도 감사드리며, 유전자 재조합 saxatilin을 분리 제공해주신 홍성유 선생님께도 이 자리를 통해 감사드립니다.

항상 든든한 후원자가 되시는 양가의 부모님, 대학 원 입학에서 논문이 나오기까지 늘 힘이 되어준 아내 백혜정, 어느덧 5학년이 되는 아들 도현이, 유치원에 가는 주은이와 이 논문을 함께 하고자 합니다.

2003년 12월 저자 씀

차	례
---	---

그림 차례
국문요약 1
I. 서론 3
II. 재료 및 방법8
1. 유전자 재조합 saxatilin 단백질8
2. Saxatilin 유전자 발현벡터 구축 및 발현 실험8
3. 인테그린 발현 억제용 RNA interference 벡터의 구축9
4. 혈관 평활근세포와 COS7 세포의 배양
5. 혈관 평활근세포 부착억제 실험
6. 혈관 평활근세포 증식억제 실험
7. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-
PCR)분석
8. Actin cytoskeleton 염색
9. 횐쥐 대동맥유래 평활근세포의 유전자발현 변화 분석14
10. 유전자 전달
11. 조직학적 염색분석
12. 통계분석

III. 결과 ······17
1. 혈관 평활근세포에서 saxatilin 유전자 발현
2. 혈관 평활근세포로의 인테그린 RNAi 전달
3. RNAi를 전달한 혈관 평활근세포의 인테그린 발현 변화20
4. 인테그린 RNAi 벡터를 전달한 혈관 평활근세포의 부착
변화
5. 혈관 평활근세포의 형태 및 actin cytoskeleton 변화23
IV. 고찰
V. 결론 ···································
잠고눈헌
성포소하
ንቲይዣ

### 그림 차례

그림 1. 인테그린의 구조
그림 2. Saxatilin의 구조 및 염기서열6
그림 3. Saxatilin cDNA를 포함하는 plasmid (pFLA G-CMV1-SAX) 의 구조9
그림 4. 인테그린 av 및 a5에 대한 RNAi 벡터의 구 축 및 그 구조10
그림 5. LacZ 유전자를 이용한 평활근세포로의 유 전자전달 효율
그림 6. Nucleofection에 의한 세포의 saxatilin 유전 자 발현 ······18
그림 7. Saxatilin 유전자전달에 의한 평활근세포의 부착 억제효과
그림 8. RNAi를 처리한 RAoSMC의 세포 형태학적 변화

그림 11. 재조합 saxatilin 유전자 및 인테그린 RNAi 벡터를 전달한 혈관 평활근세포의 actin cyto -skeleton의 변화 ......24

#### 국문 요약

#### 인테그린의 활성 및 발현억제가

#### 혈관 평활근세포에 미치는 영향

연구배경: 관상동맥 질환의 경피적 중재술 후에 발생하는 혈관의 재 협착은 혈관 내피세포의 손상과 이로 인한 혈소판과 염증세포의 활성 화가 혈관 평활근세포의 부착, 이동 및 증식을 일으켜 신생내막증식 을 유도하여 발생한다. 본 연구에서는 한국산 칠점사 (*Agkistrodon saxatilis emelianov*)의 뱀독으로부터 분리한 신규 디스인테그린 (disintegrin)인 saxatilin에 대한 유전자를 혈관 평활근세포에 전달하 고 발현시켜 세포의 부착 억제 효과를 알아보고, RNAi (RNA interference)를 통한 인테그린 (integrin) 유전자의 발현억제가 혈관 평활근세포에 미치는 영향 및 작용기전을 규명하고자 하였다.

방법및결과: 1) Pichia 효모에서 발현 정제한 유전자 재조합 saxatilin 단백질이 혈관 평활근세포의 부착을 억제함을 관찰하였다. 2) CMV (cytomegalovirus) 프로모터를 포함한 saxatilin유전자 발현벡터를 nucleofection방법으로 혈관 평활근세포와 COS7 (African green monkey kidney cell line)세포에 주입하여 만들어진 saxatilin단백질이 혈관 평활근세포의 부착을 억제하는지 관찰하였다. 3) 인테그린 av 및 a5에 대한 발현억제용 RNAi를 구축하고 혈관 평활근세포에 전달하였 으며, 세포외간질 단백질인 vitronectin과 fibronectin에 대한 세포의 부 착에 미치는 영향을 관찰하였다. 4) 인테그린 av 및 a5에 대한 RNAi (interference) 벡터를 혈관 평활근세포에 전달한 후 인테그린 유전자 들의 발현변화를 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)법으로 측정하였고, 혈관 평활근세포의 actin cytoskeleton 변 화를 관찰하였다.

결론: 혈관 평활근세포의 부착과 증식에 있어서 인테그린의 활성억제 물질인 디스인테그린 saxatilin의 단백질 뿐 아니라 유전자치료가 세 포의 부착과 증식을 억제함을 확인하였다. 또한 RNAi기법을 이용한 인테그린 a<sub>v</sub> 및 a<sub>5</sub>의 유전자의 직접적인 발현억제가 혈관 평활근세포 의 부착 및 증식에 보다 강한 억제활성을 보였으며, actin cytoskeleton의 활성화를 억제함을 확인하였다. 이는 인테그린에 대한 활성 및 발현 억제가 경피적 중재술 후에 발생하는 혈관 재협착을 억 제하는데 이용될 수 있음을 시사하고, 이를 증명하기 위한 in vivo 연 구가 필요하다고 사료된다.

핵심 되는 말: 인테그린, 디스인테그린, saxatilin, 혈관 평활근세포, RNAi

<지도교수 조 승 연>

연세대학교 대학원 의과학과

#### 편 욱 범

#### I. 서 론

동맥경화증 (atherosclerosis)은 고지혈증, 고혈압과 같은 위험인자 에 의해 혈관의 내피세포가 손상 받아 염증세포인 단핵구와 T-임파 구가 부착되고 지질이 침착되면서 시작 된다<sup>1</sup>. 이들 염증세포에서 분 비되는 사이토카인 (cytokines)과 성장인자 (growth factors)에 의해 염증세포가 더욱 모이고, 혈관 평활근세포가 이동 증식되어 죽상동맥 경화반 (atheromatous plaque)을 형성하여 혈관의 내경이 좁아져 장 기의 허혈을 유발하게 된다. 이를 치료하기 위해서 약물요법과 관상 동맥 우회술, 그리고 물리적으로 좁아진 혈관을 확장시키는 경피적 관상동맥 풍선성형술 (PTCA; percutaneous transluminal coronary angioplasty)과 스텐트 (stent) 삽입술이 최근 보편화되어 현재 전 세 계적으로 100만 건이 넘는 경피적 시술이 시행되고 있다<sup>2</sup>. 그러나 경 피적 관상동맥 풍선성형술을 받은 환자의 약 30-40%, 스텐트 삽입술 을 시행받은 환자의 약 20%에서 혈관이 다시 좁아지는 혈관 재협착 (restenosis)이 나타나 아직 해결해야 할 문제로 남아있다<sup>3</sup>. 혈관 재 협착은 물리적인 혈관의 확장에 따른 혈관손상의 치유과정 중 나타나 는 현상으로 혈관내경이 50%이상 좁아진 경우를 말한다. 이를 줄이기 위해 여러 약물요법이 시도되었지만 스텐트를 삽입하는 것이 가장 효 과적인 것으로 보고 되고 있다4. 혈관 재협착의 발생기전은 풍선확장 후에 혈관자체의 탄력에 의해 다시 좁아지는 탄성반도 (elastic recoil), 혈관 자체가 작아지는 혈관재형성 (negative remodeling), 그 리고 혈관의 내막이 증식하는 신생내막증식 (neointimal hyperplasia) 이 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>5</sup>. 스텐트를 삽입하여 탄성반도와 혈 관재형성을 어느 정도 억제할 수 있으나 신생내막증식을 억제하지 못 하여 여전히 20% 내외의 재협착을 일으킨다. 이런 신생내막증식은 혈 관손상 직후 혈소판의 응집과 활성화, 염증세포의 부착, 이로부터 분 비되는 다양한 사이토카인과 성장인자에 의한 혈관 평활근세포의 이 동과 증식, 과도한 세포외간질 (ECM; extracellular matrix)의 합성 분 비에 기인한다. 이와 같이 혈관 재협착 과정에는 평활근세포가 매우 중요한 역할을 하는데, 특히 세포의 표면에 존재하는 인테그린과 세 단백질 간의 상호작용이 중요하다. 인테그린은 포외가질 heterodimeric 수용체로 구성되어 있으며 (그림 1), 세포막을 가로질러 존재하여 세포의 부착, 이동, 증식, 분화 및 생존 등의 기본적인 세포 작용에 중요한 역할을 한다<sup>6, 7</sup>. 인테그린은 α와 β의 subunit로 구성되 어 있는데, 현재까지 18 종류의 α subunit와 8 종류의 β subunit로 조 합된 총 24개의 인테그린이 보고 되고 있으며, 각기 다른 ligand의 선 택성과 세포신호 특성을 부여 받는다<sup>8</sup>. 특히, 심혈관계에서 중요하게 관여하는 인테그린으로는 혈소판 응집에 중요한 당단백 IIb/IIIa (glycoprotein IIb/IIIa)과 평활근세포의 증식과 이동에도 중요한 인테 그린 avb3와 a5b1을 들 수 있다. 실제로 흰쥐의 경동맥 풍선손상 모델 에서 인테그린 ανβ<sub>3</sub>나 당단백 IIb/IIIa와 결합하는 항체인 abciximab (Reopro, Centocor, Einstein Weg, Netherlands)을 투여한 경우 혈관

의 신생내막 증식을 억제한다<sup>9</sup>.



그림 1. 인테그린의 구조.

MIDAS; metal ion-dependent adhesion site, TM; transmembrane segment, Cyto; cytoplasmic tail (adapted from Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. Circ Res 2001;88:1112-1119.)

인테그린 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>는 vitronectin과 결합하는 수용체로 알려져 있으며 내피세포, 종양세포와 파골세포 (osteoclast)에서 발현되어 동맥경화증, 종양세포의 신생혈관 형성 (angiogenesis), 종양세포의 전이, 식세포 작용, 골조직의 재형성에 관여하고 당뇨병성 망막증에서의 신생혈관 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>10-14</sup>.

뱀독에는 혈소판응집을 억제하는 kistrin<sup>15,16</sup>, flavoridin<sup>17,18</sup>, albolabrin<sup>19</sup>, echistatin<sup>20-24</sup>등의 디스인테그린 단백질이 보고 되고 있 으며 분자 내에 특징적인 RGD (arginine-glycin-aspartate) 서열을 포 함하고 있다. 최근, 인테그린에 특이적으로 길항하여 혈소판의 응집, 종양세포의 전이, 신생혈관의 형성을 억제한다는 사실이 보고 되고 있다<sup>25</sup>. Saxatilin (Genbank No. AY005480)은 이런 디스인테그린의 하나로 우리나라에 서식하는 칠점사의 뱀독에서 분리되었으며 기존의



그림 2. Saxatilin의 구조 및 염기서열.

살모사에서 분리된 salmosin에 비해 3배에서 5배 많은 양을 유전공학 적으로 얻을 수 있는 장점이 있다 (그림 2). 선행된 연구에서 국내 뱀 독유래 디스인테그린은 혈소판의 응집뿐만 아니라 혈관내피세포가 세 포외간 단백질에 부착하는 것을 억제하고, 암세포의 전이와 성장을 억제하며, 수정체의 posterior capsule의 opacification을 억제하는 등 다양한 생물학적 활성이 보고 된 바 있다<sup>26-30</sup>. 그러나 아직 혈관 평활 근세포에 대한 효과는 보고가 없다.

RNAi (RNA interference)는 dsRNA (double strand RNA)가 특이 적으로 mRNA (messenger RNA)를 파괴하여 transcription과 translation을 억제함으로써 목표 유전자를 knock down시킬 수 있다 는 사실이 밝혀진 후 최근 새로운 유전자 치료기술로 대두되고 있다 <sup>31</sup>.

본 연구에서는 혈관 재협착에 관여하는 혈관 평활근세포의 부착 과 증식에 대한 새로운 디스인테그린인 saxatilin의 효과와 그 작용기 전을 알아보고, 혈관 평활근세포의 부착에 관여하는 인테그린 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>와 α<sub>5</sub>β<sub>1</sub>의 작용기전과 RNAi를 이용한 유전자 발현 억제효과를 관찰하고 자 하였다.

#### Ⅱ. 재료 및 방법

1. 유전자 재조합 saxatilin 단백질

한국산 칠점사유래 saxatilin을 유전공학적으로 대량생산하기 위하 여 cDNA를 *Pichia pastoris* 효모에 클로닝한 후, Hong등<sup>30</sup>의 방법으 로 48시간 동안 고농도배양하고 원심분리한 다음 효모 배양액만을 취 한 뒤 1.5 M ammonium sulfate로 평형시킨 phenyl-sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) column 에 loading한 후 1 M ammonium sulfate 용액으로 용출하였다. 이 분 획을 다시 Source 30 RPC (reverse phase chromatography; Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) column에 loading 하고 acetonitrile 농도구배 (0 - 50%)로 용출하여 순수한 유 전자 재조합 saxatilin을 분리 정제하여 사용하였다.

2. Saxatilin 유전자 발현벡터 구축 및 발현 실험

Saxatilin의 유전자를 세포 및 체내에 전달하기 위하여 saxatilin cDNA를 mammalian 발현벡터인 pFLAG-CMV1 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)의 CMV 프로모터 및 FLAG epitope의 하류 (down stream)에 HindIII-BamHI 제한효소 부위에 삽입하여 pFLAG-CMV1-SAX 발현벡터를 구축하였고 (그림 3), 최종적으로 염 기서열 분석을 통하여 발현벡터 내에 saxatilin 유전자가 잘 삽입되었 음을 확인하였다.



그림 3. Saxatilin cDNA를 포함하는 plasmid (pFLAG-CMV1-SAX) 의 구조.

3. 인테그린 발현 억제용 RNA interference 벡터의 구축

Vitronectin과 fibronectin에 대한 세포 표면의 수용체인 인테그린 α<sub>v</sub> β<sub>3</sub>와 α<sub>5</sub>β<sub>1</sub>을 RNAi기법으로 선택적으로 억제하기 위하여 subunit인 α <sub>v</sub>와 α<sub>5</sub>에 대한 RNAi 발현벡터를 제조하였다. 이를 위해 α<sub>v</sub>에 대한 프 라이머 A: 5-acaccGACGTTGGGGCCT GTTGTTCttgcttgaaGAACAA CAGGCCCAACGTCt-3와 프라이머 B:5-gCTGCAA CCC GGACAA CAAGaacgaacttCTTGTTGTCCGGGTTGCAGaaaaa-3을, α<sub>5</sub>에 대한 프라이머 C: 5-acaccGGTGACGGGACTCAACAACttgcttgaaGTTGT TGAGTCC CGTCACCt-3 및 프라이머 D: 5-gCCACTGCCCTGAGT TGTTGaacgaacttCAA CAACTCAGGGCAGTGGaaaaa-3를 각각 합 성 (Genotech, 대전, 대한민국)하였다. 이들 프라이머 set를 동일한 농 도로 배합한 후 95℃로 가열한 다음, 분 당 0.5℃씩 PCR 장치를 이용 하여 온도를 상온까지 하강시켜 프라이머 annealing을 수행함으로써 double strand의 adaptor를 형성시킨 후 U6 cassette RNA interference system (Allele-Biotech Co. San Diego, CA, USA)의 U6 promoter에 삽입한 construct를 완성하였다 (그림 4). 이 RNAi용 벡 터는 유전자 전달 후 G418 내성 유전자를 이용하여 형질전환 세포를 선별하였다.



그림 4. 인테그린 av 및 a5에 대한 RNAi 벡터의 구축 및 그 구조.

#### 4. 혈관 평활근세포와 COS7 세포의 배양

Saxatilin의 혈관평활근 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰 쥐의 대동맥유래 평활근세포 (rat aorta smooth muscle cell; RAoSMC)를 사용하였다. RAoSMC는 Chamley-Campbell<sup>32</sup> 등의 방법 에 따라 Sprague-Dawley rat (male, 10 주령)의 대동맥을 적출한 뒤 부위를 깨끗이 제거한 후 adventitia Type 1 collagenase (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)와 elastase (Worthington Biochemical Co., USA)를 처리하고 5% CO₂, 37℃에서 30분간 반응하 였다. 그 다음 DMEM (Dulbelco's modified Eagle medium; Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA) 배양액으로 1회 세척하고 잘게 절편을 낸 후 다시 Type 1 collagenase 와 elastase를 처리하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃조건에서 1시간 더 반응하였다. 이 배양액을 원심분리하고 상층액을 버린 후 분리한 세포만을 풀어서 10% FBS (fetal bovine serum)이 포함된 DMEM 배양액에서 배양하였다. 이후 smooth muscle actin에 양성이고 vWF (von Willebrand factor)에 대하여 음 성여부를 western blot을 통하여 평활근세포임을 확인한 후 3 - 7계 대 내의 세포만을 실험에 이용하였다. 또한 african green monkey kidney 세포주인 COS7 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액에 서 배양하였다.

#### 5. 혈관 평활근세포의 부착억제 실험

혈관 평활근세포의 부착억제 실험을 위하여 96-well plate에 vitronectin (7.5 mg/ml) (Takara Co, Otsu, Japan) 혹은 fibronectin

(25 mg/ml) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)을 각각 4 °C 에서 12시간 코팅한 후, 0.1% bovine serum albumin으로 blocking하 여 비특이적 결합을 제거하였다. Trypsin처리로 떼어낸 RAoSMC을 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에 넣어 1.5 ml microtube에 분주 하고, RNAi를 처리하여 20분간 37 ℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였 다. Vitronectin 또는 fibronectin으로 코팅된 96-well plate에 1.5×10° cells/well의 세포를 분주하여 37 ℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 약 3시간 배양하여 plate에 부착되도록 하였다. 부착이 끝난 후 96-well plate를 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척하여 미부착 세포들을 제 거한 후 4% paraformaldehyde로 고정하고 crystal violet 염색용액으 로 염색하였다. 염색한 96-well plate를 multi-channel spectrophotometer (BioRad, USA)를 이용 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포 부착율을 계산하였다.

#### 6. 혈관 평활근세포의 증식억제 실험

RAoSMC를 96-well plate에 2,000 cells/well의 농도로 부착시킨 후 48시간동안 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 succinate-tetrazolium reductase의 활성에 의한 생존세포의 측정시약 인 PreMix WST-1 cell proliferation assay kit (Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여 세포증식을 측정하였다.

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

혈관 평활근세포에서 중요한 인테그린인 avb3 및 a5b1의 subunit 유 전자들의 발현변화를 확인하기 위해 인체 인테그린 유전자서열을 토 대로 설계한 다양한 PCR primer들 즉, av의 sense primer; caccagcaatcagagatggatact (Tm:  $61.0^{\circ}$ ),  $a_v$  antisense primer; tcccgtgtcattcttttcaggcat (Tm: 61.0℃), a5의 sense primer; atggcctcctattttggctat (Tm: 58.4℃), a₅의 antisense primer; ggagggcagagccaaagaagt (Tm: 64℃)를 합성하였다. 10% FBS가 포함 된 DMEM 배양액에 RAoSMC를 70% 포화도 (confluency)로 배양한 세포를 차가운 PBS로 1회 세척한 후 UltraspecII RNA isolation kit (Biotecx, Huston, TX, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출 한 RNA를 reverse transcription kit (Promega Co, Madison, WI, USA)를 이용하여 반응시킨 다음, 이 반응물을 template로 하여 확인 하고자 하는 유전자의 발현수준을 PCR을 통해 분석하였다. 이때 세 포의 RNA양에 대한 대조군으로 Glyseraldhyde-3-phosphate dehvdrogenase (GAPDH) cDNA에 대하 primer (sense: accacagtccatgccatcac, antisense: tccaccaccctgttgctgta)를 이용하여 상 대적인 양을 보정하였으며, 그 반응 조건은 열변성 94℃ 1분, anneling 반응은 인테그린 a<sub>v</sub> 는 51℃, a<sub>5</sub>는 48℃, GAPDH는 50℃로 각각 1분, 중합반응은 72℃에서 1분을 1 cycle로 30주기 반응을 RoboCycler<sup>™</sup> (Stratagene, La Jolla, CA, USA) PCR 기기를 이용하 여 수행하였다. 최종 반응물은 1.5% agarose 전기영동 후 Etidium bromide 염색을 통해 확인하였다.

8. Actin cytoskeleton 염색

RAoSMC를 부착하기 하루 전 세포배양 cover slip (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)을 24-well plate에 미리 넣은 후 세포를 그 위에 부착시켰다. 다음날 세포의 배양액을 a<sub>v</sub>와 a<sub>5</sub> RNAi가 첨가된 0.2% FBS함유 DMEM 배양액으로 교체하고 세포가 부유하는 시점까지 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 세포가 부유하기 시 작하면 3.7% formaldhyde로 고정시키고 0.1% Triton X-100을 이용하 여 세포를 투과한 다음 rhodamine-phalloidin (Sigma- Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 actin cytoskeleton을 염색하였다. 염색된 세포가 붙어있는 cover slip을 24-well plate에서 slide glass로 옮겨 mounting하고 광학현미경에서 400배로 관찰하였다.

9. 흰쥐 대동맥유래 평활근세포의 유전자발현 변화 분석

인테그린에 대한 억제활성을 지닌 saxatilin 유전자 또는 인테그린 RNAi construct를 혈관 평활근세포에 전달한 후, 37 ℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 culture plate (100 mm)상 약 70% 정도의 포화상태에 도달 할 때까지 배양하였다. 이때 대조군으로 유전자 주입과정을 수행하지 않은 군 및 mock construct를 주입한 군을 비교하였다. 그 다음, 유전 자가 전달된 세포를 4 ℃의 PBS로 1회 세척하고 세포파쇄 용액 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF)으로 처리하였다. 4 ℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 BCA 단 백질정량 시약 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL, USA)을 사 용하여 단백질농도를 측정하였다. 또한 세포 배양액으로 분비된 단백

절은 20% TCA용액을 가한 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 다 음 acetone으로 세척하였다. 이어서 획득한 단백질 100 ug을 4 -12% NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA) 상 에서 전기영동하고 Immobilon-P transfer membrane (Millipore Co, Bedford, MA, USA)에 전기이동하였다. 단백질이 부착된 막을 10% non-fat skim milk를 포함한 blocking 용액으로 비특이적 background 를 없앤 다음, primary antibody를 넣어 1차 반응을 시키고 horseredish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruze Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)를 한 번 더 반응시켰다. 그 다음 ECL (enhanced chemiluminescence) detection system (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA)을 이용 하여 membrane을 현상하였다.

#### 10. 유전자 전달

유전자 전달을 위한 방법으로는 Lipofectamin PLUS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), GenePorter (Genetherpy Systems Inc. San Diego, CA, USA), JetPEI (Polyplus-Transfection Inc. Stras bourg, France), Escort IV (Sigma-Aldrich, Spruce St Louis, MO, USA)등 의 시약과 nucleofection방법을 병행하였으며, 표시자로 LacZ 유전자 가 삽입된 플라즈미드로 유전자전달 효율을 비교 측정하였다. 전기적 유전자 전달을 위해서 Nucleofector<sup>TM</sup> kit (Amaxa Biosystems, Koeln, Germany)를 이용한 nucleofection을 수행하였으며, 이때 사용 된 transfection buffer는 제조사로부터 공급되는 human aortic smooth muscle cell 전용 buffer를 사용하였다. 24-well plate에서 RAoSMC를 transfection하는 경우, 먼저 세포를 실험 전날 7×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 plate에 도포한 후 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub>의 배양기에서 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액 내에서 배양하였다. 한번의 반응 에 1×10<sup>6</sup> 개의 세포가 사용되었다. Trypsin을 이용하여 분리한 세포 를 플라즈미드 DNA 5 ug과 RAoSMC용 nucleofection 용액 100 ul과 섞어 Nucleofector에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후에는 6-well plate 나 60 mm culture plate에 넣어 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액 에서 37 ℃ 및 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 48시간 배양한 후 유전자전달 효 율을 확인하였다.

11. 조직학적 염색분석

LacZ 유전자를 transfection 후에 전달효율을 측정하기 위해 βgalactosidase 발색반응을 이용하였다. Transfection된 세포는 PBS로 세척한 후 세포 고정화 용액 (2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde)으로 10분간 반응시킨 다음, 세포를 X-gal 염색 용액 (1 mg/ml X-gal, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>)을 첨가하고 14 - 24시간 동안 37 ℃에서 반응하였다. Transfection된 세포의 β- galactosidase에 의한 X-gal 기질의 분해로 나타나는 푸른색의 3,5'-dichromo-4,4'-dichloroindigo를 관찰하여 transfection 효율을 분석하였다.

12. 통계분석

통계분석은 SPSS (version 10.0)를 이용하여 독립된 두 개의 평균치 비교에는 unpaired t-test 법을 이용하였고, p값이 0.05 미만인 경우 유의하다고 판정하였다.

#### Ⅲ. 결과

1. 혈관 평활근세포에서 saxatilin 유전자 발현

Nucleofection 방법을 이용한 경우 세포손상이 다소 높지만 LacZ 대조군 발현벡터의 beta-galactosidase 염색으로 확인해 본 결과 50 -90%에 이르는 매우 높은 transfection 효율을 얻을 수 있었다 (그림 5).



그림 5. LacZ 유전자를 이용한 평활근세포로의 유전자전달 효 율. 전달된 LacZ 유전자로 인해 발현된 β-galactosidase가 염 색에 의해 파란색으로 보인다 (화살표) (X 40).

(a) Escort IV: polycationic lipid

- (b) Geneporter:DOPE/DHC (neutral lipid/cationic lipid hydrophilic conjugate)
- (c) Jet-PEI: polyethylenimine (proton-sponge)
- (d) Jet-PEIRGD: polyethylenimine (proton-sponge)/RGD peptide
- (e) Lipopectamine+ OSPA/DOPE (polycationic lipid/neutral lipid)
- (f) Nucleofection

Saxatilin 유전자가 전달된 혈관 평활근세포로부터 saxatilin단백질 이 잘 발현되었는지 확인하기 위하여 세포 배양액을 회수한 뒤 anti-saxatilin guinea pig antibody를 이용하여 분석한 결과 약 8 kDa 정도의 단백질 밴드를 확인할 수 있었다 (그림 6).



그림 6. Nucleofection에 의한 세포의 saxatilin 유전자 발현. lane 1; saxatilin 표준단백질 (1.5ug) lane 2; pFLAG-CMV1-SAX lane 3; FLAG lane 4; LacZ lane 5; 대조군 그러나, saxatilin의 유전자 발현에도 불구하고 평활근세포의 부착 이나 증식 및 ERK, FAK 등의 활성화에 유의성있는 차이가 관찰되지 않았다. 그 이유는 전기전달 하는 동안 높은 전달효율에도 불구하고 세포손상이 많았거나 발현 수준이 낮아 정량적인 saxatilin의 억제효 과를 보기 어려웠기 때문으로 추정된다. 이를 입증하기 위하여 비교 적 유전자전달이 용이한 COS7 세포에 saxatilin 발현벡터와 대조군으 로 pFLAG-CMV1 발현벡터를 Escort IV시약을 이용한 유전자전달 후 그 세포 배양액이 평활근세포의 부착 억제 활성을 나타내는지 조 사하였다. 그 결과, COS7 세포에 saxatilin 유전자를 전달한 세포배양 액의 경우 대조군에 비하여 vitronectin에 대한 세포 부착 억제효과가





28.2% 정도임을 확인하였다. 이는 COS7 세포의 유전자전달 효율

30%를 감안했을 때 saxatilin이 잘 발현되어 활성을 유지하고 있음을 보여주고 있다 (그림 7). 따라서, 혈관 평활근세포로의 전기적 saxatilin 유전자전달은 발현의 문제보다 세포손상으로 그 활성을 관 찰하기 힘듦을 알 수 있었다.

2. 혈관 평활근세포로의 인테그린 RNAi 전달

혈관 평활근세포에 인테그린 av 및 a5에 대한 RNAi 벡터를 nucleofection 방법을 이용하여 transfection하였다. 이들 인테그린 RNAi 발현벡터 및 mock 벡터가 주입된 혈관 평활근세포를 G418 (400ug/ml)으로 처리한 결과, 이들 벡터가 들어간 세포만이 G418 내 성을 획득하여 생존하였다. RNAi 가 전달된 세포는 형태학적 변화 가 나타나는데, 정상적인 RAoSMC에 비하여 인테그린 RNAi가 전달 된 세포의 부착형태에 크게 차이가 남을 확인할 수 있었다. 인테그 린 RNAi를 처리한 혈관 평활근세포는 시간이 경과함에 따라 정상세 포의 형태인 spindle 모양으로부터 점차 세포 부착면적이 축소된 원형 모습으로 변화함을 관찰하였다 (그림 8).

3. RNAi를 전달한 혈관 평활근세포의 인테그린 발현 변화

인테그린 RNAi를 전달한 평활근세포에서 인테그린 유전자의 발현 억제 여부 및 변화를 분석하였다. 즉, 평활근세포 내 인테그린 중 vitronectin의 수용체인 인테그린 a<sub>v</sub>β<sub>3</sub>와 fibronectin의 수용체인 인테 그린 a<sub>5</sub>β<sub>1</sub> 두 가지에 대한 인테그린 subunit 4종류의 mRNA 변화를 RT-PCR로 측정하였다 (그림 9). RNAi의 target subunit인 a<sub>v</sub>와 a<sub>5</sub> 인테그린 유전자의 발현은 감소되고 β subunit 유전자는 정상적으로 발현됨을 확인 하였다





그림 8. RNAi를 처리한 RAoSMC의 세포 형태학적 변화. 상대조군 에 비해 RNAi를 처리한 군에서 세포가 원형으로 접착이 감소하고 세 포 의 수가 감소되어 있다 (X 40).

- (a) 정상대조군; RNAi를 처리하지 않은 RAoSMC
- (b) a<sub>v</sub>-RNAi를 처리한 RAoSMC
- (c) a<sub>5</sub>-RNAi를 처리한 RAoSMC



그림 9. RT-PCR을 이용한 RNAi에 의한 혈관 평활근세포 인 테그린의 발현 변화. av RNAi 처리군에서 lane 1이 lane 2의 대 조군에 비해 발현이 감소되어 있으며 a5 RNAi 처리군에서 lane 4가 lane 2의 대조군에 비해 발현이 감소되어 있다.

lane 1; RAoSMC에 인테그린 av RNAi 처리군

lane 2; RNAi mock벡터

lane 3; RAoSMC 대조군,

lane 4; RAoSMC에 인테그린 a<sub>5</sub> RNAi 처리군

lane S; Lambda BstEII DNA standard

4. 인테그린 RNAi 벡터를 전달한 혈관 평활근세포의 부착 변화

인테그린 RNAi 벡터를 전달한 혈관 평활근세포를 vitronectin 및 fibronectin에 대한 세포부착 변화를 조사한 결과, saxatilin과 av RNAi 경우는 vitronectin에 대하여 a5 RNAi 는 fibronectin에 대하여 부착능이 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (그림 10). 그러나, 서로 다른 리간드에 대한 인테그린 RNAi 전달세포의 부착능은 변화가 없 음을 확인하였는데, 즉 av RNAi 전달세포는 fibronectin에 대해서 a5

RNAi 전달세포는 vitronectin에 대해서 정상 대조군과 동일한 세포부 착능을 나타내었다. 이를 통해 인테그린에 대한 RNAi 효과가 해당 subunit 특이적으로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.



그림 10. RNAi를 처리한 RAoSMC의 세포부착능 비교.

5. 혈관 평활근세포의 형태 및 actin cytoskeleton 변화

인테그린 RNAi를 전달한 혈관 평활근세포는 시간이 경과함에 따라 서 정상세포의 spindle형태에서 세포 부착면적이 점차 축소된 원형에 가까운 모습으로 변함을 관찰할 수 있었다 (그림 8). 이러한 인테그린 RNAi에 특이적인 세포외간질 단백질에 대한 세포부착과 세포골격계 의 변화를 분석하기위해 인테그린 RNAi 처리 RAoSMC들을 각각 vitronectin과 fibronectin 코팅된 표면에 부착반응을 수행한 후 actin cytoskeleton 변화를 rhodamine-phalloidin으로 염색하여 관찰하였다 (그림 11). 그 결과 정상군에 비하여 인테그린 RNAi 유전자 처리군

의 actin cytoskeleton이 vitronectin과 fibronectin에 대해 뚜렷한 차이 가 있음을 확인할 수 있었다.

a<sub>5</sub> RNAi 처리

av RNAi 처리



(b)

그림 11 . 재조합 saxatilin 유전자 및 인테그린 RNAi 벡터를 전달한 혈관 평활근세포의 actin cytoskeleton의 변화. 세포 내에 붉게 보이는 것이 활성화된 actin cytoskeleton이 염색된 것으로 av RNAi를 처리 한 혈관 평활근세포는 vitronectin에 대해, a5 RNAi를 처리한 혈관 평 활근세포는 fibronectin에 대해 actin cytoskeleton의 활성이 억제 되어 있다 (X 400).

(a) fibronectin에 대한 부착 (b) vitronectin에 대한 부착

Ⅳ. 고찰

관상동맥 협착증의 치료 중 보편적인 시술인 경피적 관상동맥 풍 선성형술 및 스테트 삽입술은 혈관확장 후 혈관이 좁아지는 혈관재협 착이 여전히 문제로 남아 있다. 혈관재협착은 혈관확장 중 혈관 내피 세포가 파괴되면서 내피하조직이 혈액에 노출되면 혈소판과 염증세포 가 부착되고 여러 가지 사이토카인과 세포증식인자가 분비된다<sup>33</sup>. 이 들 인자들은 이어서 혈관 평활근세포를 자극하게 되고 이동과 증식을 촉진하게 되는데 이것이 신생내막증식의 가장 중요한 기전인 것으로 알려져 있다<sup>34</sup>. 이러한 재협착 현상을 감소시키기 위한 시도로써 항혈 소판 요법을 시행하였으나 임상에서 긍정적인 결과를 얻지 못하였다. 그 이유는 혈관 내피세포가 손상된 조직에서 혈소판의 응집억제가 분 명하지 않고 실제로 혈소판응집을 억제한다 하여도 혈관손상에 의한 사이토카인이나 성장 촉진인자의 분비까지 억제하지 못하기 때문이 다. 이들 인자는 손상된 내피세포, 평활근세포, 염증세포에서 분비되므 로 혈소판의 억제가 재협착의 억제를 위한 치료에 충분하지 못함을 시사한다<sup>9</sup>. 그러나 혈관 평활근세포 자체를 억제하는 시도는 신생내막 형성의 마지막 중요단계를 억제하므로 재협착의 치료에 중요한 표적 이라 할 수 있다<sup>34</sup>.

한편, 혈관 평활근세포의 증식과 이동에 중요하게 관여하는 세포 표면 부착단백질인 인테그린의 활성 또는 발현을 억제하면 신생내막 증식을 감소시킬 수 있다. 실제로 인테그린 α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>와 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>를 억제하면 쥐의 경동맥손상 모델에서 재협착을 억제할 수 있음을 보고하였다<sup>9</sup>. 혈관 평활근세포의 표면에는 여러 개의 인테그린이 존재하는데 그중 vitronectin 단백질의 수용체인 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, fibronectin 단백질의 수용체인 α<sub>5</sub>

β1이 세포의 부착, 이동, 증식에 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있 다<sup>35</sup>. 따라서 인테그린을 억제하기 위한 방법으로는 인테그린에 대한 항체, 억제 유전자, 새로운 화합물, 그리고 뱀독에서 유래한 디스인테 그린을 들 수 있다. 디스인테그린은 원래 뱀독에서 분리된 단백질로 현재까지 salmosin, kistrin, flavoridin, albolabrin, echistatin등 약 30 여 가지가 분리되었고 일부에서는 그 3차 구조까지 규명된 바 있다 <sup>15-24</sup>. 최근 한국산 살모사에서 분리된 salmosin은 종양세포의 성장과 증식, 전이를 억제하고, 내피세포의 부착과 이동, 증식을 억제한다는 사실을 발표한 바 있다<sup>29-30</sup>. 그러나 아직까지 이들 디스인테그린이 혈 관 평활근세포에 미치는 영향은 거의 보고가 없다.

본 연구에서는 혈관 평활근세포의 인테그린을 억제하기 위한 전략 으로 최근 새롭게 규명한 디스인테그린인 saxatilin의 유전자재조합 단백질과 유전자의 치료, 그리고 인테그린에 대한 RNAi 요법에 의한 혈관 평활근세포에 미치는 영향 및 그 작용기전을 규명하고자 하였 다.

디스인테그린 saxatilin을 단백질 상태로 외부적으로 첨가한 경우 혈관평활근 세포의 증식과 부착에 강한 억제활성을 보임을 확인하였 으며, 특히 vitronectin에 대한 결합을 선택적으로 방해하는 것으로 보 아 세포표면의 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>를 길항하는 것으로 보인다. 또한, 평활근세포의 증 식과 세포골격계가 완전히 억제되는 농도의 saxatilin 단백질을 처리 하였을 때 세포의 부착능력이 상실되고 결국은 apoptosis에 이르게 됨 을 추가로 확인하였다. 혈관 평활근세포에 saxatilin 유전자를 전달한 결과, 평활근세포의 특성상 라이포좀 등 시약에 의한 유전자의 전달 은 효율이 매우 낮아 사용할 수 없으며, 전기적 전달법인 nucleofection법은 전달효율은 높으나 세포손상이 너무 크고 생체 내 에 적용할 수 없는 등 많은 제한이 있음을 알 수 있었다. 한편,

saxatilin유전자를 평활근세포에 transfection후 western blot을 통해 saxatilin단백질 발현은 확인할 수 있었으나 대조군과 처리군 사이에 정량적인 생물학적 활성 차이를 측정하기 불가능하였다. 이러한 문제 점을 규명하기 위하여 유전자 전달이 용이한 COS7 세포에 saxatilin 발현벡터를 전달시킨 후 그 배양액을 모아 농축한 뒤 평활근세포가 vitronectin에 대한 세포부착을 측정한 결과, 약 28%의 세포부착 억제 활성을 나타냄을 확인하였다. 이는 saxatilin단백질이 혈관 평활근세포 가 vitronectin에 대한 50% 부착 억제 농도 (IC<sub>50</sub>)인 65nM의 절반에 해당하는 양으로 세포손상 없이 유전자를 전달할 수 있다면 충분한 활성을 기대할 수 있음을 보여 주고 있다. 따라서, 향후 강력하고 충 분한 기간 동안 발현이 유지될 수 있는 새로운 시스템이 개발된다면 디스인테그린 유전자치료도 혈관 재협착의 억제목적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

혈관 평활근세포의 인테그린을 억제하기 위한 더욱 직접적인 시도 로써, 최근에 각광받고 있는 RNAi (RNA interference) 기법을 이용하 였다. RNAi기법은 특정 mRNA를 선택적으로 제거할 수 있는 기술로 서 특정 transcript에 염기서열을 인식할 수 있는 작은 크기의 서열 선택적 transcript를 발현시켜 이로부터 형성된 double strand RNA가 Dicer와 RISC (RNA induced silencing complex)라는 RNA분해효소 와 결합함으로써 endogenous하게 발현된 mRNA을 분해시킬 수 있다 <sup>37, 38</sup>. 이는 기존의 antisense RNA처리보다 적어도 10배 이상의 강력 한 발현억제 효과를 보여주고 있다.

이러한 RNAi 기법을 이용하여 혈관 평활근세포의 증식, 부착 및 이동에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 인테그린인 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>와 α<sub>5</sub> β<sub>1</sub>의 발현을 선택적으로 억제하고자 하였다. 인테그린 α<sub>v</sub>와 α<sub>5</sub>는 각각 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>와 α<sub>5</sub>β<sub>1</sub>을 구성하는 중요한 subuint로써 각기 vitronectin과

fibronectin에 대한 세포 표면의 수용체로 작용한다. 인테그린 heterodimer에서 cytoplasmic adaptor 분자들과 상호작용하는 β subunit를 RNAi에 의해 발현을 억제할 경우  $a_v\beta_3$ 와  $a_5\beta_1$  이외에  $\beta_3$ 와 βı을 갖는 다른 종류의 인테그린도 동시에 억제할 수 있다. 따라서, αv β<sub>3</sub>와 α<sub>5</sub>β<sub>1</sub>에 대해 선택성을 증가시키기 위하여 α<sub>v</sub>와 α<sub>5</sub>에 대한 RNAi를 설계하였다. 이 두 가지 RNAi 유전자를 평활근세포에 전달한 후 세 포의 부착, 이동 및 증식에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, av 인테그린를 억제하면 혈관 평활근세포가 상응한 세포외간질 단백질인 vitronectin 대한 세포부착이 강하게 저해되고, a5 인테그린을 억제하 면 fibronectin에 대한 세포부착이 억제됨을 관찰하였다. 또한, 평활근 세포 내 인테그린 유전자 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 결과 에서도 해당 subunit의 유전자가 특이적으로 억제됨을 확인하였다. 이 러한 사실은 평활근세포의 증식억제를 통한 혈관재협착 예방에 있어 서 인테그린 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> 뿐만 아니라 인테그린 α<sub>5</sub>β<sub>1</sub>까지도 동시에 억제할 필 요가 있음을 암시하는 것이다. 한편, 인테그린의 β subunit들은 세포 질 내에서 talin, vinculin, paxillin, FAK, CAS 등의 부속단백질과 작 용하여 actin cytoskelecton 변화 및 세포신호 전달경로 변화에 영향 을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>39</sup>. 이러한 유전자 발현 억제 실험을 통하여 변화된 혈관 평활근세포의 세포생물학적 특징과 광범위한 유 전자 발현 및 프로테옴 변화를 비교 분석한다면 보다 새로운 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 또한 RNAi로 특정 유전자의 발현을 손상시킨 혈관 평활근세포에 대해 PDGF-BB (platelet derived growth factor-BB)나 bFGF (basic fibroblast growth factor) 같은 성 장인자를 처리한 후 신호전달계에 관여하는 단백질들의 변화를 분석 한다면 혈관재협착 억제에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사 료된다.

V. 결론

혈관 재협착의 주요원인인 혈관 평활근세포의 부착, 이동, 증식에 관여하는 인테그린을 억제하기 위한 시도로써, 흰쥐 대동맥유래 평활 근세포에 인테그린 활성을 저해하는 뱀독유래 신규 디스인테그린 saxatilin의 단백질 및 유전자 치료를 수행하였다. 아울러 인테그린 유 전자 자체의 발현을 억제하는 인테그린 a<sub>v</sub> 및 a<sub>5</sub>에 대한 RNAi 유전 자 전달을 수행하였다.

Pichia 효모에서 발현한 유전자재조합 saxatilin 단백질을 혈관 평 활근세포에 처리한 경우 세포간단백질 중 vitronectin에 대해 선택적 억제활성을 보이는 것으로 보아 혈관 평활근세포 표면의 인테그린 α<sub>v</sub> β<sub>3</sub>를 길항한다는 사실을 확인하였다. 또한, 디스인테그린 saxatilin의 유전자를 혈관 평활근세포에 전달하기 위한 여러 시도를 하였으나 세 포 특성 상 전달효율이 낮고 세포손상으로 인해 정량적 활성 억제를 관찰하지 못하였다.

인테그린 유전자 발현 자체를 억제하기 위한 방법으로 최근 소개된 RNAi 기법을 이용한 a<sub>v</sub>β<sub>3</sub>와 a<sub>5</sub>β<sub>1</sub> 유전자를 억제한 평활근세포에 대한 변화를 관찰하였다. a<sub>v</sub> 인테그린을 억제하면 혈관 평활근세포가 상응 한 세포외간질 단백질인 vitronectin 대한 세포부착이 강하게 저해되 고 a<sub>5</sub> 인테그린을 억제하면 fibronectin에 대한 세포부착이 억제됨을 관찰하였다. 또한, 평활근세포 내 인테그린 유전자 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 결과에서도 해당 subunit의 유전자가 특이적 으로 억제됨을 확인하였다. 이러한 사실은 평활근세포의 증식억제를 통한 혈관 재협착 예방에 있어서 인테그린 a<sub>v</sub>β<sub>3</sub> 뿐만 아니라 인테그린 a<sub>5</sub>β<sub>1</sub>까지도 동시에 억제할 필요가 있음을 암시하고 있다.

이상과 같이 혈관 평활근세포의 인테그린에 대한 길항작용을 갖는 단백질 또는 유전 발현의 억제 연구를 통해 얻어진 새로운 정보는 앞 으로 혈관 재협착이나 동맥경화증의 예방과 치료에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

- Ross R. Mechanism of atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340:115–126.
- Smith SC, Dove JT, Jacobes AK, Kenedy JW, Kereiakes D, Kern MJ, et al. ACC/AHA guidelines for percutaneous coronary intervention: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. J Am Coll Cardiol 2001;37(8):2215–2238.
- Poon M, Badimon JJ, Fuster V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. Lancet 2002;359:619–622.
- Kiemeneij F, Serruys PW, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Albertsson G, et al. Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: five-year clinical follow-up of Benestent-1 trial. J Am Coll Cardiol 2001;37(6):1598-1603.
- Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, et al. Pattern and mechanisms of in-stent restenosis: a serial intravascular ultrasound study. Circulation 1996;94:1247-1254.
- Folkman J, D'Amore PA. Blood Vessel Formation: What Is Its Molecular Basis? Cell 1996;87:1153–1155.

- 7. Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. Circ Res 2001;88:1112–1119.
- Reddy KVR, Mangale SS. Integrin receptors; the dynamic modulators of endothelial function. Tissue & Cell 2003;35:260–273.
- 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.
- Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, Hesselbacher SE, Feldman MJ, McNamara CA, et al. Selective α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atheroscrerotic rabbit. Circulation 2001;103:1906–1911.
- 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.
- 12. Felding-Habermann B, Cheresh DA. Vitronectin and its receptor. Curr Opin Cell Biol 1993;42:162–172.
- Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J. A role of sialyl lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis Nature 1993;365: 267–269.
- 14. 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.

- 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.
- Adler M, Carter P, Lazarus RA, Wagner G. Cysteine pairing in the glycoprotein IIbIIIa antagonist kistrin using NMR, chemical analysis, and structure calculations. Biochemistry 1993;32: 282–289.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chen Y, Pitzenberger 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.

- 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.
- 22. 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.
- Saudek V, Atkinson RA, Pelton JT. Three-dimensional structure of echistatin, The smallest active RGD protein. Biochemistry 1991;30:7369–7372.
- 24. 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.
- Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. Semin Hematol 1994;31:289–300.
- 26. Kang IC, Chung KH, Lee SJ, Yun YD, Moon HM, Kim DS. Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. Thromb Res 1998;91:9165–9173.

- 27. Kang IC, Lee YD, Kim DS. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. Cancer Res 1999;59(15):3754–3760.
- Park DS, Kang IC, Kim HD, Chung KH, Kim DS, Yun Y. Cloning and characterization of novel disintegrins from *Agkistrodon halys* venom. Molecules and Cells 1998;(8)5:578–584.
- 29. Kang IC, Kim DS, Jang YS, Chung KH. Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. Biochem Biophy Res Com 2000;275:169–173.
- Hong SY, Koh YS, Chung KH, Kim DS. Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. Thromb Res 2002;105:79–86.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 1998;391:806–811.
- 32. 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 Tiss Res 1977;177:503–522.
- 33. Itoh H, Mucoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle growth response to angiotensin II. J Clin Invest

1993;91:2268-2274.

- 34. Gottsauner-Wolf M, Moliterno DJ, Lincoff AM, Topol EJ. Restenosis-an open file. Clin Cardiol 1996;19:347-356.
- 35. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. Circulation 1992;86:723-729.
- 36. Davenpeck KL, Marcinkiewicz C, Wang D, Niculescu R, Shi Y, Zalewski A. et al. Regional differences in integrin expression; role of  $a_5\beta_1$  in regulating smooth muscle cell function. Cir Res 2001;88:352–358.
- Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease.Mol Genet Metab. 2003;80(1–2):121–128.
- Shuey DJ, McCallus DE, Giordano T. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. 2002;7(20):1040-1046.
- 39. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. 1999;285: 1028 -1032.

#### Abstract

#### Inhibition of integrin activation and expression in vascular smooth muscle cells

Wook Bum Pyun

Department of Medical Science The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung Yon Cho)

Backgrounds: The restenosis of coronary artery is responsive process after percutaneous coronary intervention and initiated by endothelial denudation, which causes aggregation and adhesion of platelets and inflammatory cells such as monocytes and lymphocytes. After that, activation, migration and proliferation of vascular smooth muscle cell cause neointimal hyperplasia as main mechanism for restenosis. The purposes of this study were to know the effects and mechanisms of new elegant disintegrin, saxatilin from Korean snake venom and down regulation of integrin by RNA interference in vascular smooth muscle cells.

**Methods and Results:** The recombinant saxatilin was highly expressed from Phichia pastoris and purified. We observed the saxatilin inhibited adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells. We investigated adhesion of vascular smooth muscle cell and COS7 cell after saxatilin gene transfection on the cells. The surface integrins  $a_v$  and  $a_5$  of vascular smooth muscle cell were down regulated by RNA interference successfully, which was proved by RT-PCR and revealed morphologic changes, inhibition of adhesion, proliferation, and actin cytoskeletal activation.

**Conclusions:** These results may provide new insights into role of integrins,  $a_{\nu}\beta_3$  and  $a_5\beta_1$ , on smooth muscle cell as well as role of smooth muscle cell in the process of neointimal hyperplasia and have significant implications for inhibition and down regulation of

integrin targeted to smooth muscle cell might be beneficial for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention.

**Key Words:** integrin, disintegrin, saxatilin, smooth muscle cell, RNA interference.