

토끼 허혈성 하지 모델에서 VEGF 발현 Naked DNA 벡터인 pCK-VEGF의 근육내 투여가 측부혈관형성에 미치는 영향

채제건 · 전현순 · 박은진* · 김종묵* · 김덕경** · 김선영#

전북대학교 의과대학, *(주)바이로메드, **성균관대학교 의과대학 #서울대학교 생명과학부

(Received October 31, 2000; Revised December 8, 2000)

Direct Intramuscular Gene Transfer of Naked DNA Expressing Human Vascular Endothelial Growth Factor (pCK-VEGF) Enhances Collateral Growth in a Rabbit Ischemic Hind Limb Model

Jei-Keon Chae, Hyun-Sun Jeon, EunJin Park*, Jong-Mook Kim*,
Duk-Kyung Kim** and Sunyoung Kim#

Institute of Cardiovascular Research, College of Medicine, Chonbuk National University

**ViroMed Limited*

***Division of Cardiology, Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Medical Center*

#School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742

Abstract — We have recently reported the development of a high efficiency expression vector, pCK, which can drive a high level of gene expression in mouse skeletal muscle. In this study, we tested the therapeutic potential of pCK expressing human VEGF165, pCK-VEGF, in the rabbit ischemic hind limb model. To determine the optimal dose of plasmid DNA, various concentrations of pCK-CAT, were injected into the muscle of a rabbit hind limb and the levels of CAT activity were determined. It was found that the expression level of the exogenously added gene became stable between 250 and 1,000 µg. Based on this result, we tested whether intramuscular transfer of 500 µg of pCK-VEGF could actually modulate collateral vessel development in a rabbit ischemic hind limb model. It was found that relative to the control group injected with the pCK lacking the VEGF sequence, single intramuscular doses (500 µg) of pCK-VEGF produced statistically significant augmentation of collateral vessels as determined by the angiographic vessel count, maximal blood flow by Doppler flowmeter, and the number of capillaries by histology. These results suggest that a single 500 µg-delivery of pCK-VEGF is potent enough to induce sufficient angiogenic activity and achieve therapeutic benefit on this rabbit model.

Keywords □ Naked DNA gene therapy, VEGF, ischemic disease

말초동맥질환은 하지동맥의 협착 또는 폐색으로 인하여 다리에 허혈증상을 일으키는 질환이다. 혈관 협착 정도에 따라 간헐적 파행(intermittent claudication) 증상부터, 심하면 휴식기의 통증, 족부 궤양이나 괴저 등을 동반하여 다리를 절단해야 하는 경우까지 다양한 임상 양상을 보인다.¹⁾ 치료방법으로는 약물 요법과 함

께 혈관 재개통을 위한 경피적 혈관 성형술(percutaneous transluminal angioplasty), 혈관우회술(bypass surgery) 등의 관혈적 요법이 있다.²⁾ 하지만 중증도 이상의 증상을 갖는 환자들에게 이와 같은 방법의 적응증이 되지 못하거나, 치료에 실패하는 경우, 병변이 계속 진행되면 하지 병변 부위를 절단해야 한다. 하지 절단 환자의 예후는 매우 나쁘고 정신적으로도 말기 암환자가 겪는 정도의 고통을 겪는 것으로 알려져 있다.³⁾ 그러나 최근까지 기존의 치료에 반응하지 않는

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 82-2-880-7529 (팩스) 82-2-875-0907

말초동맥질환에 대한 효과적 치료 방법이 없어 새로운 치료제와 치료방법의 개발이 절실히 요구되고 있었다.

측부혈관(collateral vessel)이란 동맥이 좁아지거나 막힌 부위의 혈관과 막히지 않은 다른 혈관 사이에 새로운 혈관이 생성되어 이어주는 것을 말한다.⁴⁾ 측부혈관은 동맥 경화에 의한 혈관 협착, 폐쇄시 다리의 허혈 정도를 감소시킴으로써 증상을 완화시켜 주며, 임상상 및 예후를 결정하는 중요한 인자이다. 말초동맥의 측부혈관 발달 유무에 따라 허혈성 지체질환의 임상상은 크게 좌우되나 환자 개개인마다 측부혈관의 발달 정도는 다르다.

측부혈관의 형성은 넓은 의미에서 혈관생성(angiogenesis)의 한 형태로서, 최근 들어 혈관생성의 분자세포학적 메커니즘이 밝혀짐에 따라 단백질이나 유전자 형태로 혈관생성인자(angiogenic factor)를 허혈 부위에 투여하여 측부 혈관의 형성을 증진시켜 허혈성 질환을 치료하고자 하는 새로운 시도들이 진행중이다.⁵⁾

Vascular permeability factor(VPF)라고도 알려진 vascular endothelial growth factor(VEGF)는 혈관내피세포를 특이적으로 성장, 분화시키는 분비형의 당단백질로서, 일반적인 혈관형성에 관여한다.⁶⁾ VEGF 유전자의 전사체는 스플라이싱에 의해 각각 121, 165, 189, 206개의 아미노산으로 이루어진 4가지 동종체(isoform)인 VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206단백질들을 만든다. 미국 Jeffrey Isner 그룹은 허혈성 말초동맥질환 환자에서 VEGF165를 naked DNA 형태로 투여하여 혈관생성을 촉진시켜 측부혈관을 형성시킴으로써 치료에 사용할 수 있는 가능성을 테스트하기 위해 제1상 임상시험을 실시한 바 있다. 그 결과 VEGF165 발현벡터를 2 mg 씩(500 µg씩 4군데), 월 1회, 2번 하지근육에 투여한 9명의 환자중 8명의 환자에서 치료 효과가 있었으며, 전 환자에서 유의한 부작용은 없었음을 보고하였다.⁷⁾ 특히 이중 2명의 환자는 족부 절단술을 권유받았으나 유전자 주사후 수술이 불필요하게 되는 뛰어난 치료 효과가 관찰되었다.

본 연구자들은 상기 Isner 그룹이 사용한 유전자 발현 벡터에 비하여 유전자 발현효율이 뛰어난 pCK 발현시스템을 개발하고, 이에 VEGF165를 삽입하여 pCK-VEGF를 만들어 마우스의 근육 조직에 주사할 경우 VEGF165가 높은 효율로 발현됨을 보고한 바 있다.^{8,9)} 이 번 연구에서는 pCK 벡터가 허혈성 질환 치료에 실제 사용될 수 있는지를 확인하기 위해 토끼

에서 허혈성 하지 모델(ischemic hind limb model)을 만들고 pCK-VEGF를 허혈 하지 근육내에 직접 주사한 뒤, 측부 순환의 발달과 혈관 형성을 유도하여 치료 효과를 낼 수 있는 지를 조사하였다.

실험 재료 및 방법

플라스미드 - 본 실험에 사용된 플라스미드는 pCK, pCK-CAT, pCK-VEGF로서 이미 보고한 바 있다.^{8,9)} 이들 플라스미드를 *E. coli* strain(DH5α)에 트랜스포메이션 시켜 단일 콜로니를 연속으로 계대하여 순수 분리하였다. 분리된 균주를 30 µg/ml 카나마이신이 첨가된 배양액에서 배양한 후, Alkaline lysis, PEG 정제, 음이온 크로마토그래피 및 Gel filtration 크로마토그래피 방법으로 플라스미드를 순수정제하여 1~5 mg/ml의 농도로 PBS에 용해하여 사용하였다. 자세한 제조 방법은 향후 다른 논문을 통해 상세히 서술될 것이다.

토끼 하지 근육에서 CAT 분석 - pCK-CAT을 주사한 토끼의 대퇴근과 전경골근을 추출하여 Reporter Lysis Buffer(Promega, Madison, WI, USA)에 담가 분쇄 후 그 추출액의 단백질 농도를 측정하여 15 µg의 단백질을 이용 90 µl로 희석한 반응액을 Gorman 등¹⁰⁾의 방법에 따라 반응시켜 CAT 분석을 수행하였다.

토끼 허혈성 하지 모델 - 허혈성 하지 모델은 뉴질랜드산 흰토끼(수컷, 평균 12~14개월 생, 3.8~4.2 kg) 23마리를 Takeshita 등¹¹⁾의 방법에 따라 만들었다(Fig. 3). Xylazine 5 mg/kg을 근육 주사하여 전처치한 후 ketamine(50 mg/kg, IM)으로 마취시킨 상태에서 토끼의 왼쪽 대퇴부를 절개하여 대퇴(femoral) 동맥의 분지들을 모두 박리하여 묶고 근위부로부터 복재(saphenous)동맥과 슬와(popliteal)동맥의 분기점까지를 절제하였다.

수술후 cefazolin(15 mg/kg/day)을 5일간 근육주사하였고, morphine(0.3 mg/day)를 10일간 근육주사하였다.

허혈성 하지 근육내 VEGF의 투여 - VEGF 발현벡터인 pCK-VEGF 혹은 대조물질인 pCK자체를 플라스미드 DNA형태로 0.5 ml(500 µg)만들어, 이를 saline 1.5 ml와 섞어 2 ml를 만든 후 주요 대퇴 근육 4 부위(adductor 2군데, vastus medialis 1군데, semimembranous 1군데)에 각각 0.5 ml(125 µg)씩 주사 하였다.

토끼 허혈성 하지 모델에서의 실험 과정 - 실험 0일

째(day 0): pCK 투여군 9마리와 pCK-VEGF 투여군 14 마리를 무작위로 추출하여 토끼 허혈성 하지 모델을 만들었다. 실험 10일째(day 10): 좌측 허혈유발 사지의 동맥조영술을 실시하였고, 혈관 내에 도플러 소식자(probe)를 직접 넣은 후 혈류량을 측정하여 기준값으로 삼았다. pCK군과 pCK-VEGF군 각각에 pCK와 pCK-VEGF 플라스미드를 근육 주사하였다. 실험 40일째(day 40): 혈관 조영 촬영을 실시하고 도플러를 이용하여 혈류량을 측정하여 day 10의 결과와 비교하였으며, 두 군의 허혈 유발 하지 근육에서 조직절편을 채취하여 모세혈관 밀도를 평가하였다.

선택적 내장골 동맥 조영술(selective internal iliac arteriography) - 토끼 허혈성 하지 모델에서 측부(collateral)동맥의 발생은 내장골 동맥으로부터 기원하므로 실험 10일째와 40일째에 선택적 내장골 동맥 조영술을 실시하여 비교하였다. Seldinger technique에 의해 우측 경동맥을 cannulation한후 대동맥을 거쳐 허혈 하지의 좌측 내장골 동맥에 3F의 도관(Terumo, Japan)을 위치시켜 5 ml의 조영제(Hexabrix, Guerbet)를 초당 1 ml의 속도로 주입하면서 cine film을 촬영하여 Pu 등¹²⁾의 방법에 의해 측부혈관의 정량적 분석을 하였다. 조영제 주입 4초 후 얻은 사진에서 대퇴 중간부에 대퇴골에 수직인 가상의 선을 그어 그 선을 통과하는 혈관의 수를 세어 정량화하였으며, 두 번 측정 후 결과의 평균값을 사용하였다.

안정시와 papaverine(5 mg) 자극시의 혈류량 측정 - Bauters 등¹³⁾의 방법에 따라 0.014-inch Doppler-guidewire(Cardiometrics)를 좌측내장골동맥의 근위부에 위치시킨 후, nitroglycerine을 50 μ l/kg를 주입하고 5분 이상 기다려 안정시 혈류 속도를 측정하고, papaverine 5 mg을 투여한 후의 최대 혈류 속도를 측정하였다. 혈류량은 다음 공식에 의하여 계산하였다.

$$Q_D = (\pi d^2/4)(0.5 \times APV)$$

[Q_D : Doppler-derived time average flow (ml/min),
d: vessel diameter,

APV: time average of the specific peak velocity]

모세혈관 밀도 측정 - 실험 40일째에 허혈 하지에서 얻은 근육조직을 O.C.T. compound(Miles Inc., Elkhart, Indiana, USA)에 담가 액화 질소에서 얼려 조직절편을 만든 후 모세혈관 내피세포를 indoxyl-tetrazolium 방법을 사용하여 alkaline phosphatase 염색을 하였다.

현미경 하에서 관찰하고 모세혈관 밀도는 1,000개의

근세포(myocyte)당 모세혈관의 수로서 계산하였다.

통계학적 분석 - 모든 결과는 mean \pm SD으로 표시하였으며, 통계적인 유의성은 t-test나 one way ANOVA 후 post-hoc test로서 student-Newman-Keuls test를 이용하여 검증하였다. 통계적으로 유의한 값은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

실험결과

사용된 플라스미드 - 본 실험에 사용한 플라스미드는 pCK, pCK-VEGF, pCK-CAT으로서 이미 본 연구자들이 보고한 바 있다.^{8,9)} 간략히 요약하면 pCK 벡터는 human cytomegalovirus(HCMV)의 즉시 초기(immediate early, "IE") 유전자의 인핸서/프로모터와 엑손1, 인트론A, 엑손2의 비코딩서열과 다클로닝 부위, bovine growth hormone 폴리아데닐화 신호부위, 카나마이신 내성 유전자, ColE1 복제원점을 주요 구성요소로 포함한다. VEGF165 cDNA는 정상인의 vascular smooth muscle cell에서 분리한 total RNA

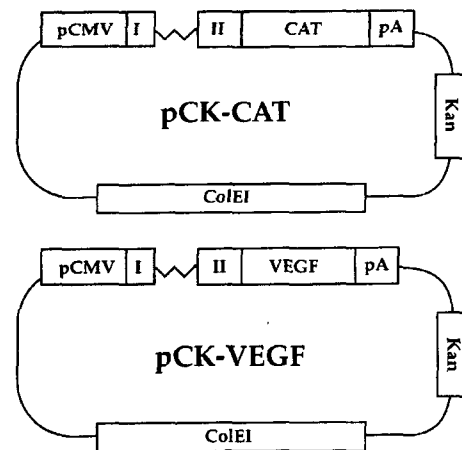


Fig. 1 - Structure of pCK expressing CAT (pCK-CAT) and human VEGF165 (pCK-VEGF). pCMV, HCMV major immediate-early (IE) promoter; pA, poly A signal; Kan, Kanamycin resistance gene; ColEI, *E. coli* origin of replication; I and II indicate untranslated exons from the IE region of HCMV. A wavy line indicates intron. pCK contains not only the full length IE promoter of HCMV but also its entire 5' untranslated region consisting of the entire exon 1 and intron A, and a part of exon 2. pCK was designed in such a way that the start codon of the inserted gene coincides with the ATG codon of the original IE gene of HCMV.⁹⁾

를 사용하여 RT-PCR 방법으로 클로닝한 후 염기서열을 확인하였고, 이를 pCK 벡터에 삽입하여 pCK-VEGF 플라스미드를 제조하였다. pCK-CAT은 박테리아의 CAT(chloramphenicol acetyl transferase) 유전자를 pCK에 삽입하여 사용하였다(Fig. 1).

토끼 근육에서 pCK 벡터의 발현 효율 - 본 연구진은 Naked DNA 형태의 pCK 벡터를 마우스의 근육에 직접 주입하였을 때, 높은 수준으로 유전자를 발현함을 이미 보고한 바 있다.^{8,9)} 본 연구에서는 naked DNA를 토끼 허혈성 하지 모델의 근육에 직접 주입하였을 때, 치료 효과를 볼 수 있는지 조사하기 위한 예비 실험으로서 CAT를 표지유전자(reporter gene)로 발현하는 pCK-CAT를 먼저 사용하여 조사하였다. CAT를 사용한 이유는 마우스에서 플라스미드 농도가 유전자 발현량에 미치는 영향을 조사하였을 때 CAT과 VEGF가 매우 유사한 결과를 보여주었고 CAT은 측정이 간편하여 많은 샘플을 빠르게 분석할 수 있기 때문이었다.

250 µg, 500 µg, 1,000 µg의 pCK-CAT(Fig. 1) 플라스미드 DNA를 토끼(수컷, 평균 12~14개월 생, 3.8~4.2 kg)의 대퇴근과 전경골근에 주사하였고 이에 대한 음성 대조군으로 동일량의 pCK를 사용하였다. 주입후 48시간이 지난 뒤, 주입 부위의 근육을 얻어 추출액에서 분쇄하여 전체 단백질을 얻었다. 이 중 15 µg를 사용하여 30분간 CAT 반응을 수행하였다. 그 결과, 250 µg, 500 µg, 1,000 µg를 주입한 군에서 모두 평균 34%에서 55% 정도의 CAT 활성도를 나타내었고 pCK를 주입한 음성 대조군에서는 CAT 활성도를 전혀 감지할 수 없었다(Fig. 2). 이상의 결과는

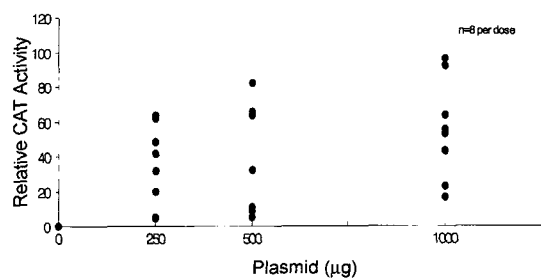


Fig. 2 - Effect of plasmid concentration on the level of gene expression in the rabbit hind limb muscle. Tibialis anterior muscles were injected with various concentrations of pCK-CAT and two days later, muscles around the injected area were excised and CAT activity was determined (n=8 per dose).

pCK 벡터가 마우스의 근육에서와 동일하게 토끼의 근육에서도 주입한 유전자를 효율적으로 발현하고 있음을 보여준다.⁹⁾ 또, 250 µg을 주입한 군에 비해 1,000 µg을 주입한 군에서 유전자 발현 정도가 증가하는 경향은 있으나 현저한 차이를 보이지 않으므로 허혈성 사지 모델에서의 효능 실험에서는 500 µg 정도의 pCK DNA를 주입하는 것이 적절하다고 판단하였다.

토끼 허혈성 하지 모델에서의 pCK-VEGF의 효능 분석 방법 - 상기 실험으로 pCK 벡터가 토끼의 근육에서도 유전자를 효율적으로 발현함을 확인하였다. 다음으로 pCK-VEGF 플라스미드를 허혈성 하지 모델 토끼의 근육에 직접 주입하였을 때, 측부혈관이 생성되어 치료 효과를 볼 수 있는지를 조사하였다. 이를 위해 실험 방법에 서술되어 있는 바와 같이 토끼에서 허혈성 하지 모델을 만들고 500 µg의 pCK-VEGF 플라스미드 DNA를 대퇴근의 4부위에 나누어 주입하

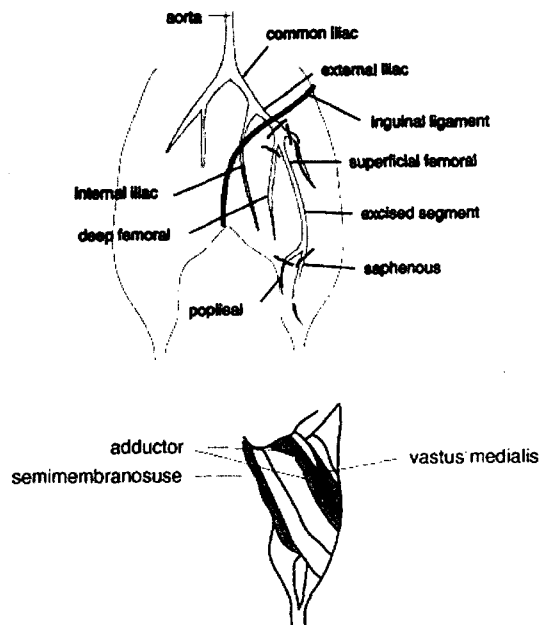


Fig. 3 - Rabbit hind limb ischemia model. The femoral artery of male New Zealand White rabbits weighing 3.8~4.2 kg was excised from its origin as a branch of the external iliac artery, to the point distally where it bifurcates into the saphenous and popliteal arteries. After performing a baseline angiogram at day 10 postoperatively, pCK or pCK-VEGF was injected into 4 different areas of the femoral muscle (2 different points in the abductor, 1 in semi-membraneous and 1 in vastus medialis).

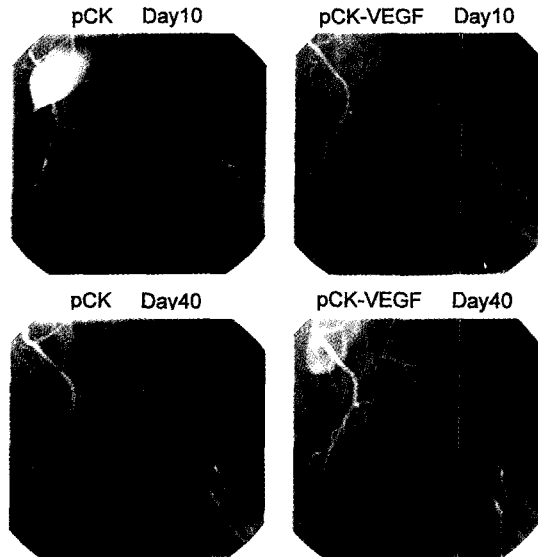


Fig. 4 - Selective internal iliac angiography of rabbits injected with pCK, the control plasmid lacking the VEGF coding sequence (A), and pCK-VEGF (B). Angiography was performed at day 10 prior to DNA injection and also at day 40, which was 30 days after gene delivery. In VEGF-treated animals, collateral artery development in the medial thigh was more evident compared with controls.

였다. 이때 음성 대조군으로는 VEGF 유전자 염기서열이 삽입되어 있지 않은 pCK를 근육 주사하였다.

VEGF 투여에 대한 치료 효과를 측정하는 방법으로는 첫째, 부검을 통해 모세혈관 수준에서의 혈관생성(angiogenesis)이 증가되었는지를 보여주고, 둘째, 혈관 조영술로 세동맥(arteriole)수준의 동맥생성(arteriogenesis)의 증가를 보이는 방법과, 셋째, 위와 같이 증가된 혈관이 생리적으로 기능을 하여 실제로 혈류량이 증가되는지를 검증하는 도플러 이용 혈류량 측정법이 있다. 본 실험에서는 이 방법들을 모두 사용하여 pCK-VEGF의 치료 효과를 분석하였다. 토끼 허혈성 하지 모델을 만든 날을 day 0으로 잡고, 10일 후 DNA를 주사하기 전 측정된 전술한 parameter(day 10)들과 DNA 주사 30일 후 측정된 parameter(day 40)들을 비교 분석하여 실험결과를 정리 하였다.

선택적 내장골 동맥 조영술 결과 비교 - 실험 10일째와 40일째 pCK-VEGF군과 pCK군을 비교한 대표적인 혈관 조영 결과는 Fig. 4에 보여진다. 실험 10일째 측정된 두 군의 측부혈관 분포는 pCK를 주입한 음성

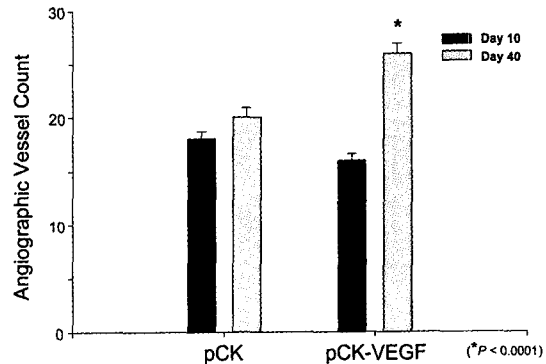


Fig. 5 - Effect of intramuscular transfer of pCK and pCK-VEGF on angiographic vessel count at day 10 (prior to gene delivery) and day 40 (30 days after DNA injection).

대조군이 18.00 ± 2.00 개, pCK-VEGF를 주입한 군이 16.07 ± 2.34 개로서 차이가 없었다($p=NS$). 실험 40일째의 혈관 조영 결과에서 pCK군은 20.22 ± 2.64 개를 보여 기저치와 차이가 없었으나($p=NS$), pCK-VEGF를 주입한 군은 26.36 ± 3.23 개로 기저치에 비하여 대퇴부 측부혈관의 유의한 증가를 보였다($p < 0.0001$)(Fig. 5).

혈관내 도플러 측정을 통한 안정시와 최대 혈류량 비교 - 실험 10일째 측정된 안정시의 혈류량은 pCK군에서 27.13 ± 7.35 ml/min, pCK-VEGF를 주입한 군에서 22.41 ± 5.30 ml/min로서 두 군간에 차이가 없었다($p=NS$). 실험 10일째의 최대 혈류량 역시 pCK군에서 53.65 ± 13.15 ml/min, pCK-VEGF군에서 46.44 ± 8.98 ml/min로서 두 군간에 차이가 없었다($p=NS$)(Table I). 실험 40일째의 혈류량을 실험 10일째와 비교해보면 안정시의 혈류량은 pCK군에서 29.48 ± 5.18 ml/min, pCK-VEGF를 투입한 군에서 33.48 ± 8.19 ml/min로 두 군 모두 유의한 증가를 보이지 않았다($p=NS$). 그러나, 최대 혈류량은 pCK군이 62.46 ± 11.39 로 유의한

Table I - Serial intraarterial Doppler measurements of resting and maximal blood flow in the ischemic limb

| | pCK | pCK-VEGF |
|---------|-------------------|---------------------|
| Resting | | |
| Day 10 | 27.13 ± 7.35 | 22.41 ± 5.30 |
| Day 40 | 29.48 ± 5.18 | 33.48 ± 8.19 |
| Maximal | | |
| Day 10 | 53.65 ± 13.15 | 46.44 ± 8.98 |
| Day 40 | 62.46 ± 11.38 | $87.08 \pm 27.09^*$ |

(Unit : ml/min)

(* $p < 0.05$)

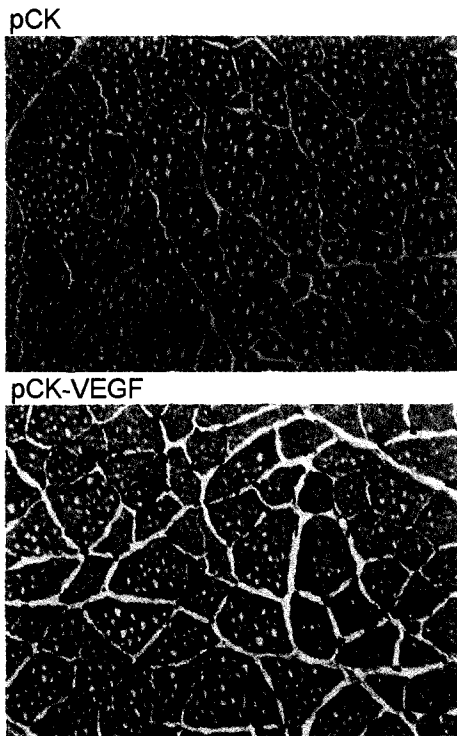


Fig. 6 – Photomicrograph of alkaline phosphatase staining of ischemic hind limb muscle harvested at day 40 from adductor muscle injected with pCK and pCK-VEGF. Dark blue dots indicate capillaries.

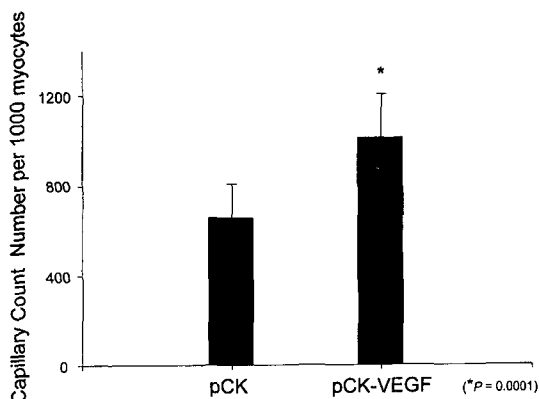


Fig. 7 – Effect of VEGF gene transfer on capillary density of ischemic muscle tissue at day 40.

증가를 보이지 않은 것에 비해 pCK-VEGF 투여군은 87.08±27.09 ml/min로 유의한 증가를 보였다(p<0.05) (Table I).

모세혈관 밀도 비교 – 실험 40일째 허혈 사지 근육 조직의 모세혈관 밀도는 pCK-VEGF를 주입한 군에서

1,016.90±188.58/1,000 myocytes로서 657.11±150.78/1,000 myocytes을 나타낸 음성 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(p<0.0001)(Fig 6, 7).

고 찰

VEGF는 45-kD의 헤파린에 결합하는 당단백질이지만, 헤파린에 결합하는 다른 혈관 생성인자들과 다른 점이 있다. 예를 들면 NH₂-말단부 앞에 signal sequence가 있어 손상되지 않은 세포에서도 분비될 수 있고, flt-1이나 KDR/flk-1과 같은 VEGF 수용체가 혈관 내피세포에서만 발현되기 때문에 혈관 내피세포 특이 mitogen으로 생각되고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾

FGF(fibroblast growth factor)와 같은 다른 혈관생성인자들은 fibroblast를 포함한 mesenchyma 근원의 거의 모든 세포에 작용하기 때문에 원하지 않는 섬유화나 myointimal hyperplasia를 일으키는데 비해, VEGF는 내피세포에 선택적으로 작용하므로 치료 목적의 혈관생성인자로서 좋은 후보 물질로 여겨진다.

VEGF는 121, 165, 189, 206개 아미노산으로 이루어진 4가지 형태의 monomer가 존재한다.¹⁷⁻¹⁹⁾ Miles 등의 보고에 의하면 이 단백질들은 세포외 간질(extracellular matrix)과의 결합능에 차이가 있어, VEGF189나 VEGF206이 세포 표면에 있는 헤파린 함유 proteoglycan에 붙어 있는 반면 VEGF165는 산포성(diffusible form)으로 존재한다.^{20,21)} 따라서 VEGF-165는 직접 혈관이나 조직에 투여하기 적당하다.^{7,21,22)} VEGF의 생물학적 반감기는 짧은 것(수분 이내)으로 되어있지만 세포외 간질의 구성 성분인 proteoglycan에 붙게되면 상당 시간 효과가 유지되는 것으로 알려져 있다.²¹⁾

허혈성 질환 치료를 위해 혈관생성인자를 인체에 전달하는 방법에는 두 가지가 있는데 단백질자체를 사용하는 것과 유전자 자체를 전달하는 것이다. 단백질 투여는 치료 용량의 혈관형성인자를 전신적으로나 국소적으로 투여하는 것인데, 전신적인 투여는 단백질의 반감기가 워낙 짧고 저혈압과 같은 독성효과를 초래할 수 있고 잠재하고 있는 암이나 망막에 원치 않는 혈관형성을 일으킬 수 있다는 단점이 있다.²³⁾ 한편, 플라스미드(naked DNA)나 바이러스성 벡터(예, 아데노바이러스, AAV, 레트로바이러스)를 이용한 유전자 요법은 한 번 투여로도 유전자를 비교적 오랫동안 발현시킬

수 있고 유전자를 투여한 부위에 제한되어 단백질을 생산한다는 장점이 있다.^{24,25)}

소위 “therapeutic angiogenesis”라 불리는 “혈관생성 치료법”에서는 naked DNA나 아데노바이러스가 임상시험에 사용하고 있는데 벡터를 직접 허혈 부위의 혈관 내 또는 혈관벽에 투여하거나 허혈 부위의 근육에 주사한다.^{7,11,22,24-26)} Naked DNA의 경우 혈관벽에 직접 투여하는 경우에는 hydrogel-coated angioplasty balloon을 이용하였다.²²⁾ 그러나 이러한 방법은 관혈적인 방법으로 환자에게 고통과 불편감을 주며 합병증을 유발할 수 있고 유전자 전달 효율이 매우 낮다. 반면 Baumgartner 등은 허혈성 사지질환 가진 9명의 환자를 대상으로 phVEGF165의 플라스미드 DNA를 직접 근육 내에 투여하여 안전하며, 치료 효과가 있음을 예측하게 하는 제1상 임상시험 결과를 관찰하였다.⁷⁾ 특히 이들은 측부혈관의 증가가 허혈 사지에 제한되어 있음을 관찰하였다.^{27,28,29)} 토끼 허혈성 하지 모델을 이용한 본 연구 결과를 종합해보면 pCK-VEGF를 주입한 군에서는 혈관조영술상 대퇴부 측부 혈관의 약 1.6배의 증가를 보였고, 도플러를 이용한 혈류 측정에서도 최대 혈류량이 2배에 가깝게 증가하였으며, 조직에서 계산한 모세혈관 밀도 역시 약 1.5배 증가를 보였다.

결론적으로 pCK-VEGF 플라스미드를 허혈성 하지 근육 내에 직접 주사할 경우 측부혈관과 측부혈류가 증가되는 것을 관찰하였다. 이와 같은 결과들로 미루어보아 pCK-VEGF 플라스미드의 근육 내 투여는 기존의 치료에 반응하지 않는 심한 허혈을 동반하는 하지 동맥 폐색성질환 환자에게 치료제로 사용할 수 있으리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부(HMP-99-B-02-0001)와 (주) 바이로메드의 지원에 의해서 수행되었다.

문헌

- 1) Criqui, M. H., Fronek, A., Barret-Connor, E. K., Klauber, M. R., Gabriel, S. and Goodman, D. : The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*, **71**, 510 (1985).
- 2) European Working Group on Critical Leg Ischemia :

Second European consensus document on chronic critical leg ischemia. *Circulation*, **84**, IV-1 (1991).

- 3) Albers, M., Fratezi, A. C., and DeLuccia, N. : Assessment of quality of life of patients with severe ischemia as a result of infrainguinal arterial occlusive disease. *J. Vasc. Surg.*, **16**, 54 (1992).
- 4) Folkman, J. and Shing, Y. : Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931 (1992).
- 5) Hockel, M., Schlenger, K., Doctrow, S., Kissel, T., and Vaupel, P. : Therapeutic Angiogenesis. *Arch. Surg.*, **128**, 423 (1993).
- 6) Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. **246**, 1306 (1989).
- 7) Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K., and Isner, J. M. : Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. **97**, 1114 (1998).
- 8) 이영주, 박은진, 조홍찬, 서연림, 김덕경, 김선영 : Naked DNA를 이용한 말초동맥폐색성질환 치료용 VEGF 발현벡터의 안전성 실험. *J. Toxicol. Pub. Health.*, **15**, 373 (1999).
- 9) Lee, Y., Park, E. J., Yu, S. S., Kim, D. K., and Kim, S. : Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: Implication for gene therapy of ischemic disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 230 (2000).
- 10) Gorman, C. M., Moffat, N. F. & Howard, B. H. : Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **2**, 1044 (1982)
- 11) Takeshita, S., Zheng, L. P., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L. Q., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F., and Isner, J. M. : Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.*, **93**, 662 (1994).
- 12) Pu, L. Q., Sniderman, A. D., Arekat, Z., Graham, A. M., Brassard, R., and Symes, J. F. : Angiogenic growth factor and revascularization of the ischemic

- limb: evaluation in a rabbit model. *J. Surg. Res.*, **54**, 575 (1993).
- 13) Bauters, C., Asahara, T., Zheng, L. P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N. and Symes, J. F., and Isner, J. M. : Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hind limb. *Am. J. Physiol.* **267**, 1263 (1994).
 - 14) Ferrara, N., and Hezel, W. J. : Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 851 (1989).
 - 15) Conn, G., Soderman, D., Schaeffer, M. T., Wile, M., Hatcher, V. B., and Thomas, K. A. : Purification of glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 1323 (1990).
 - 16) Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Westernedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., and Heldin, C. H. : Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature.* **338**, 557 (1989).
 - 17) Ferrara, N., Houck, K. A., Jakeman, L. B., Winer, J., and Leung, D. W. : The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J. Cell. Biochem.* **47**, 211 (1991).
 - 18) Tisher, E., Mitchell, R., Hartmann, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J., Abraham, J. A. : The human gene for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947 (1991).
 - 19) Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. : The vascular endothelial growth factor family; identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1806 (1991).
 - 20) Miles, A. A. and Miles, E. M. : Vascular reaction to histamine, histamine liberators or leukotoxins in the skin of the guinea pigs. *J. physiol.* **118**, 228 (1952).
 - 21) Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., and Ferrara, N. : Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 26031 (1992).
 - 22) Isner, J. M., Pieczek, A., Schainfeld, R., Blair, R., Haley, L., Asaharra, R., Rosenfield, K., Razvi, S., Walsh, K., and Symes, J. F. : Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet.* **348**, 370 (1996).
 - 23) Folkman, J. : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med.* **1**, 27 (1995).
 - 24) Takeshita, S., Tsurmi, Y., Couffinahi, T., Asahara, T., Bauters, C., Symes, J., Ferrara, N., and Isner, J. M. : Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest.* **75**, 487 (1996).
 - 25) Giordano, F. J., Ping, P., McKirnan, M. D., Nozaki, S., DeMaria, A. N., Dillmann, W. H., Mathieu-Costello, O., and Hammond, H. K. : Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nature Med.* **2**, 534 (1996).
 - 26) Isner, J. M., Walsh, K., Symes, J., Pieczek, A., Takeshita, S., Lowry, J., Rossow, S., Rosenfield, K., Weir, L., Brogi, E. : Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation.* **91**, 2687 (1995).
 - 27) Folkman, J. : Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation.* **97**, 1108 (1998).
 - 28) Tuder, R. M., Flook, B. E., and Voelkel, N. F. : Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia : modulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. invest.* **95**, 1798 (1995).
 - 29) Brogi, E., Schattman, G., Wu, T., Kim, E. A., Vaticovski, L., Keyt, B., and Isner, J. M. : Hypoxia-induced paracrine regulation of receptor expression. *J. Clin. Invest.* **97**, 469 (1996).