

Puromycin을 투여한 백서에서 지질 변화가 신증의 진행에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 소아과학교실, 병리학교실*, 약리학교실†,
계명대학교 의과대학 소아과학교실‡

최광해 · 정효석 · 박용훈 · 김용진* · 하정희† · 김홍식‡

= Abstract =

The Effect of Atorvastatin on the Development of Puromycin Aminonucleoside(PAN)-induced Nephrosis in Rats

Kwang Hae Choi, M.D., Hyo Seuk Chung, M.D., Yong Hoon Park, M.D.
Yong Jin Kim, M.D.*, Jeong Hee Ha, M.D.† and Heung Sik Kim, M.D.‡

Department of Pediatrics, Pathology* and Pharmacology†,
College of Medicine, Yeungnam University,

Department of Pediatrics‡, College of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Purpose : Several studies have suggested that hyperlipidemia might be a causative factor contributing to the progression of initial glomerular injury through the development of glomerulosclerosis. We examined the potential beneficial effect of atorvastatin - which blocks the rate limiting step of cholesterol synthesis by inhibiting HMG-CoA reductase - in PAN-induced nephrosis.

Materials and Methods : Glomerulosclerosis was induced in Sprague-Dawley male rats by repeated administration of PAN. Sprague-Dawley male rats were divided into 3 groups : group I(control), group II(PAN 20 mg/kg, subcutaneous injection), group III(PAN 20 mg/kg subcutaneous injection and atorvastatin 50 mg/kg/day per oral). On the 11th week, upon sacrifice of the experimental animals, blood sampling, 24-hr urine collection and nephrectomy were performed.

Results : Group III had significantly lower BUN and higher serum albumin(30.9 ± 17.2 vs. 17.3 ± 2.5 mg/dL; 2.3 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.2 g/dL, $P < 0.05$) compared with group II. In the lipid profiles, group III was associated with a reduction in total cholesterol and LDL(291 ± 173 vs. 167 ± 72 mg/dL; 57 ± 53 vs. 27 ± 12 mg/dL, $P > 0.05$) compared with group II. Atorvastatin administration lowered the glomerular sclerosing index significantly(26.2% vs. 13.3% , $P < 0.05$).

Conclusion : Puromycin-induced glomerulosclerosis could be ameliorated by the reduction of hyperlipidemia with atorvastatin. This suggests that hyperlipidemia contributes to the pathogenesis of glomerulosclerosis. (J Korean Soc Pediatr Nephrol 2003;7:9-15)

Key Words : Puromycin, Atorvastatin, Glomerulosclerosis, Hyperlipidemia

접수 : 2003년 2월 20일, 승인 : 2003년 4월 6일
책임저자 : 박용훈, 대구광역시 남구 대명동 317-1
영남대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : 053)620-3536 Fax : 053)629-2252
E-mail : yhpark@medical.yu.ac.kr

서 론

국소성 분절성 사구체 경화는 신증후군의 드물
지 않은 한 형태이면서, 선행 질환이나 병인이

최광해 외 5인 : Puromycin을 투여한 백서에서 지질 변화가 신증의 진행에 미치는 영향

무엇이냐에 관계없이 점차 신기능의 악화가 진행하여 만성 신부전증을 초래할 수 있는 신질환이다. 더욱이 신증후군의 치료에 주로 사용하는 스테로이드 치료뿐만 아니라 여러 종류의 치료에 잘 반응하지 않는 경우도 많아 병 진행 과정을 완화시키는 것이 매우 중요하다^{1,2)}. 신장 질환에서 지질대사의 변화는 오래 전부터 관찰되어 왔으며, 국소성 분절성 사구체 경화증으로의 진행을 설명하는 여러 가지의 가설들이 있으나, 사구체 손상이 시작된 후 사구체 경화로 진행되는 데 고지혈증이 하나의 원인인자로 작용할 것이라는 보고들이 있으며^{3,4)}, 실험쥐에 puromycin aminonucleoside(PAN)를 투여하여 만든 신증후군에서 고 콜레스테롤 식이를 시킨 결과 정상 식이를 한 대조군에 비해 사구체여과율이 떨어지고, 국소성 분절성 사구체 경화가 1.5배 정도 더 발생하였다는 보고도 있다⁵⁾.

고지혈증의 개선에 1980년대 초에 개발되어 임상적으로 소개되고 있는 lovastatin, pravastatin과 simvastatin 등은 간장에서 콜레스테롤 합성과정의 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase를 경쟁적으로 억제하여 지질대사를 개선하는 것으로 알려져 있으며, 최근에 소개된 같은 계열의 atorvastatin은 간에서 콜레스테롤의 합성을 억제하고 간세포 표면의 LDL 수용체의 수를 증가시킴으로써 low density lipoprotein(LDL)과 총 콜레스테롤의 수치를 안전하고 효과적으로 낮추는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

이와 같은 사실들을 배경으로, 본 연구는 반복적으로 PAN을 투여하여 국소성 분절성 사구체 경화로 진행된 쥐 모델에서 HMG-CoA reductase inhibitor로 작용하여 콜레스테롤을 낮추는 약제로 알려진 atorvastatin을 투여함으로써, 지질대사에 대한 효과와 지질대사의 변화가 쥐 모델의 신장 변화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

실험 동물은 200-230 gm의 male Sprague-Dawley rats를 사용하였으며, 빛은 12시간 주기로 차단하였고, 먹이는 삼양사료사의 표준 사료를 주었으며, 물과 먹이는 자유롭게 먹도록 하였다. 실험 동물군은 대조군, PAN 단독 투여군과 PAN-atorvastatin 동시 투여군 3군으로 나누었다.

• 제 I 군(대조군): PAN 투여군과 같은 양의 생리 식염수를 피하 주사하였다.

• 제 II 군(PAN 단독 투여군): PAN(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)을 체중 100 gm 당 2 mg을 첫 피하 주사한 후 1, 3, 5, 7, 9주에 반복하여 피하 주사하였다.

• 제 III 군(PAN과 atorvastatin 동시 투여군): PAN을 체중 100 gm 당 2 mg을 첫 피하 주사한 후 1, 3, 5, 7, 9주에 반복하여 피하 주사하였으며, PAN을 투여 시부터 실험쥐를 도살하기 전까지 매일 atorvastatin (Lipitor®, Pfizer)을 체중 100 gm 당 5 mg을 물에 녹여 경구 투여하였다.

실험 개시 후 11주에 실험쥐를 에테르 마취 후 심장천자로 혈액을 채취하고, 신장을 적출한 다음 형태학적 관찰을 위해 고정액에 고정시켰다. 각 군의 실험쥐를 도살하기 하루 전에 metabolic cage로 옮겨서 물을 제외하고는 음식을 시키면서 24시간 동안 소변을 모아 검사하였다.

생화학적 검사로 소변의 protein과, 혈청의 VLDL은 HIDACHI Photometer 4020(Hewlett Packard, USA)을 사용하여 측정하였고, 혈청 albumin, BUN, creatinine, cholesterol, triglyceride, HDL, LDL과 소변의 creatinine은 Olympus AU5400(Japan)을 사용하여 측정하였다.

신장의 형태학적 관찰은 10% 중성 포르말린에 고정된 조직을 파라핀 포매 후 4 μ m 두께로 박절한 후 Periodic acid-Schiff(PAS) 염색을 하여

Table 1. Comparison of Biochemical Parameters among 3 Groups of Rats

| | Group I(n=5) | Group II(n=5) | Group III(n=5) |
|--------------------------|--------------|---------------|-----------------------|
| Serum albumin(g/dL) | 2.6±0.1 | 2.3±0.1* | 2.5±0.2 |
| Urine protein(mg/day) | 33.6±12.6 | 245.9±119.1* | 230.5±137.8* |
| BUN(mg/dL) | 17.3±2.5 | 30.9±17.2* | 17.6±2.4 [†] |
| Serum creatinine(mg/dL) | 0.5±0.1 | 0.6±0.2 | 0.5±0.1 |
| Urine protein/creatinine | 2.6±0.7 | 26.5±10.9* | 18.8±11.3* |

Values : mean±SD; BUN : blood urea nitrogen

*P<0.05 compared with group I, [†]P<0.05 compared with group II

광학현미경 검사를 하였다. 사구체경화는 분엽성의 모세혈관강 소실 및 경화증을 보일 때를 양성으로 하고 각 절편마다 100개의 사구체를 관찰하여 이들 중에 경화가 있는 사구체 수를 백분율로 표시하였다.

실험 자료는 평균±표준편차로 표시하였으며, 통계학적 분석은 Kruskal-Wallis test를 한 후 Multiple Comparisons test를 하여 P값이 0.05 미만일 경우 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 생화학적 검사 결과

1) 혈청 albumin(g/dL)

혈청 albumin은 I군이 2.6±0.1, II군이 2.3±0.1, III군이 2.5±0.2이었으며, II군이 III군보다 유의하게 감소하였다(P<0.05).

2) 총 요단백량(mg/24hr)

총 요단백량은 I군이 33.6±12.6, II군이 245.9±119.1, III군이 230.5±137.8로 I군보다 II군과 III군에서 총 요단백량이 증가하였으며, II군과 III군 사이에는 유의한 차이는 없었다.

3) BUN과 혈청 creatinine(mg/dL)

BUN은 I군이 17.3±2.5, II군이 30.9±17.2, III군이 17.6±2.4로 II군이 III군보다 유의하게 증가하였다(P<0.05). 혈청 creatinine은 I군이 0.5±0.1, II군이 0.6±0.2, III군이 0.5±0.1로 III군이 II군보다 감소하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

Table 2. Comparison of Lipid Profiles among 3 Groups of Rats

| | Group I | Group II | Group III |
|---------------------------|---------|----------|-----------|
| Total cholesterol (mg/dL) | 85±6 | 291±173* | 167±72* |
| LDL(mg/dL) | 13±3 | 57±53* | 27±12* |
| HDL(mg/dL) | 66±5 | 97±28* | 93±25* |
| VLDL(mg/dL) | 149±113 | 441±321* | 384±144* |
| Triglyceride (mg/dL) | 80±27 | 315±214* | 313±97* |

Values : mean±SD

*P<0.05 compared with group I

4) 소변의 protein/creatinine

소변의 protein/creatinine은 I군이 2.6±0.7, II군이 26.5±10.9, III군이 18.8±11.3이었으며, III군이 II군보다 감소하였으나 두 군 사이에는 통계학적으로 유의성은 없었다(Table 1).

5) 혈청 지질(mg/dL)

총 콜레스테롤이 I군이 85±6, II군이 291±173, III군이 167±72였고, LDL은 I군이 13±3, II군이 57±53, III군이 27±12로 III군이 II군보다 감소하였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. HDL은 I군이 66±5, II군이 97±28, III군이 93±25였으며, VLDL은 I군이 149±113, II군이 441±321, III군이 384±144였고, triglyceride는 I군이 80±27, II군이 315±214, III군이 313±97로 II군과 III군의 비교 시 유의한 변화가 없었다(Table 2).

2. 광학 현미경적 소견

I군에서는 사구체의 경화증은 발견되지 않았고

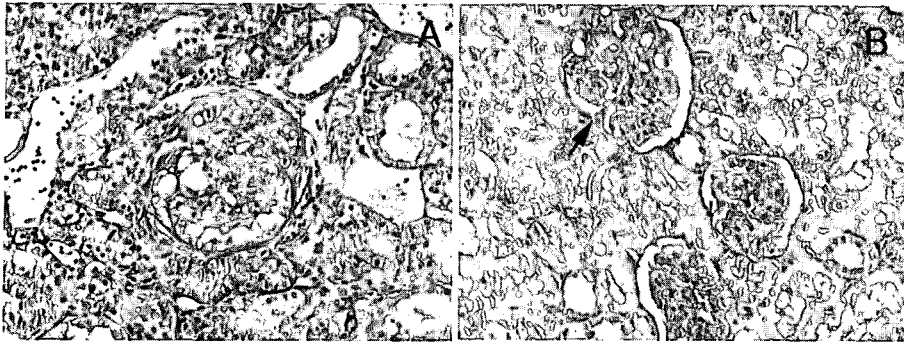


Fig. 1. Periodic acid-Schiff(PAS) stained glomeruli, original magnification $\times 100$. (A) Many glomeruli show segmentally or totally sclerotic in group II. The incidence of sclerotic glomeruli is about 26.2%. Tubular atrophy and interstitial fibrosis are noted in the central area. Some distended tubules contain casts in their lumen. (B) The incidence of sclerotic glomeruli is decreased about 13.3% in group III. Tubules and interstitium are mostly preserved. Glomerulosclerosis was indicated by arrow.

세뇨관의 위축이나 간질의 염증 등도 없었다. II 군에서는 사구체의 경화가 26.2%였고 경화된 부위의 사구체 모세혈관은 찌그러지고 내강은 불규칙하게 메워져 있었으며 또한 메산지움에 확장되고 여기에 PAS에 붉게 염색되는 초자양 물질이 침착되기도 하였으며 메산지움에 지방공포가 나타나기도 하며 심한 경우는 보우만 낭과의 유착도 관찰되었다. 경화가 심한 개체에서는 신 세뇨관의 위축과 간질 내에 대식세포와 림프구로 구성된 단핵구성 염증세포들의 침윤을 관찰할 수 있었다. III군에서는 사구체의 경화가 13.3% 정도로 줄었으며, 세뇨관 및 간질의 변화도 줄었다 (Fig. 1).

고 찰

신장병과 지질대사의 관련성에 대하여 Virchow⁷⁾가 처음으로 언급한 이래로 신장질환에서 사구체와 신간질 조직에서 여러 형태의 지질 침착이 관찰되어 왔으며, Moorhead 등⁸⁾이 사구체와 세뇨관에 대한 콜레스테롤의 신독성 가능성을 제기한 이후로 지질대사와 신장질환과의 상호 관련성에 관하여 연구가 이루어지고 있으며, 동물 실험에서 전신적인 지질대사의 변화가 고혈압성 소인과 함께 사구체 경화성 변화를 일으키는 하

나의 대사성 유발요인 또는 촉진 요소로 생각되고 있다. 지단백이 신장 손상을 일으키는 기전으로는 LDL이 사구체맥관막 세포(mesangial cell)와 사구체 모세 혈관 내피 세포(glomerular capillary endothelial cell)에 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1), M-CSF(macrophage-colony stimulating factor), MCP-1(monocyte chemotatic protein-1) 등의 adhesion molecules와 단핵구 주화인자(monocyte chemoattractants)의 부착을 유발시켜 사구체맥관막으로 단핵구의 침윤을 일으키고, 지단백과 cytokine에 의해 발생한 손상은 사구체 모세혈관 내피를 변화시켜 지단백과 고분자들 그리고 단핵구들의 사구체맥관막 안으로의 삼출을 초래하고, 사구체맥관막 안의 LDL은 혈소판, 다핵구, 단핵구 그리고 손상된 사구체 세포들에 의해 생성된 지방 산화 물질에 의해 산화되며, 산화된 지단백은 사구체 초기 손상에 연관되는 cytokine(endothelial adhesion molecules와 mesangial monocyte chemotattractant peptides)의 생성을 증가시키고 또한 사구체 경화증과 다른 신장 질환에 나타나는 대식세포의 lipid-rich foam-like 세포로의 변형을 촉진시킨다. 또한 사구체의 과증식에 관여하는 cytokine(platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β)의 분비를

축진시킴으로써 사구체에 손상을 일으킨다고 한다⁹⁾.

따라서 본 연구는 반복적으로 PAN을 투여하여 국소성 분절성 사구체 경화를 만드는 쥐 모델에서 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase inhibitor로서 콜레스테롤을 낮추는 약제인 atorvastatin을 투여하여 고지혈증을 조절함으로써 지질대사의 변화가 사구체 경화증 발생에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

PAN을 복강이나 피하주사로 단기간 투여할 경우 초래되는 백서의 신장 병변은 사람의 미세 변화 증후군과 유사하여 사구체 상피세포 죽돌기의 결손 및 융합, 투과 간격의 감소, 사구체 기저막의 음이온 부하의 감소와 미용모의 출현 등을 보이므로 인체의 미세 변화 신증후군의 동물 모델로 많이 이용되고 있다¹⁰⁻¹²⁾. 한편 puromycin을 복강이나 피하주사로 장기간 투여 시에는 심한 단백뇨를 동반한 국소성 분절성 사구체 경화증을 일으키며 보고자에 따라 7-12%에서 국소성 분절성 사구체 경화증이 발생한다고 한다¹³⁻¹⁵⁾. 본 연구에서는 Grond와 Weening¹⁴⁾ 그리고 Marinides 등¹⁶⁾이 이용한 장기간의 피하 주사 방법을 이용하였으며, 실험 11주째에 사구체 경화의 빈도가 26.2%로 비교적 높게 나타났다.

HMG-CoA reductase inhibitor는 간의 콜레스테롤 생성 속도 조절 효소인 HMG-CoA reductase를 경쟁적으로 억제하고, 간세포 표면의 LDL 수용체를 증가시킴으로써 혈중 콜레스테롤과 LDL 등을 낮추는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 이 중에 atorvastatin은 최근에 혈중 콜레스테롤을 낮추는데 광범위하게 사용되고 있으며, Krause과 Newton¹⁸⁾에 의하면 HMG-CoA reductase inhibitor 중 처음으로 광범위하게 사용된 lovastatin보다 atorvastatin이 더 강력한 약제로 보고되어 본 연구에서는 HMG-CoA reductase inhibitor 약제들 중에 atorvastatin을 사용하였다. 본 연구의 결과에서 혈청 지질은 총 콜레스테롤이

puromycin만 투여한 군이 291 ± 173 mg/dL였고, puromycin과 atorvastatin을 같이 투여한 군이 167 ± 72 mg/dL로 puromycin만 투여한 군보다 약 43% 정도 감소하였으며, LDL은 puromycin만 투여한 군이 57 ± 53 mg/dL, puromycin과 atorvastatin을 같이 투여한 군이 27 ± 12 mg/dL으로 puromycin만 투여한 군보다 53% 정도 감소하였는데 이는 이러한 약제들이 혈중 콜레스테롤과 LDL을 25-35% 정도 감소시킨다는 보고^{19, 20)}들 보다 더 많이 혈중 콜레스테롤과 LDL을 감소시켰지만 통계적으로는 의미가 없었다. 이는 각 군의 실험쥐를 5마리씩 하였는데, 집단의 예수가 충분히 크지 못하여 비모수적 통계를 적용하였으므로 통계적 검증력(statistical power)이 충분하지 못하여서 이러한 결과가 나왔을 것으로 생각되어진다.

결론적으로 atorvastatin을 투여한 군이 통계학적으로 유의성을 검증하지는 못하였지만 혈중 총 콜레스테롤과 LDL이 감소하였고, 국소성 분절성 사구체 경화의 빈도가 낮게 나타났다. 그러므로 고지혈증이 사구체 경화성 변화의 하나의 중요한 원인으로 작용하며 HMG CoA reductase inhibitor가 사구체 경화의 진행을 억제하는 효과를 기대할 수 있다고 생각된다.

한 글 요약

목적 : PAN-induced nephrosis 쥐 모델에서 HMG-CoA reductase inhibitor로 작용하여 콜레스테롤을 낮추는 약제로 알려진 atorvastatin을 투여함으로써, 지질대사에 대한 효과와 지질대사의 변화가 쥐 모델의 신장 변화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하여 대조군(I군), PAN 단독 투여군(II군), PAN과 atorvastatin 동시 투여군(III군) 3군으로 나누었으며, PAN은 체중 100 gm 당 2 mg을 첫 피하 주사한 후 1, 3, 5, 7, 9주에 반복하여

피하 주사하였으며, atorvastatin은 체중 100 gm 당 5 mg을 물에 녹여 매일 경구 투여하였다. 실험 개시 후 11주에 24시간 소변과 혈액을 채취한 다음 신장을 적출 하였으며, 소변의 protein과 creatinine 그리고 혈청의 albumin, BUN, creatinine, lipid profiles를 측정하고, 신장의 형태학적 변화를 관찰하였다.

결 과 : 혈청 총 콜레스테롤은 II군이 291 ± 173 mg/dL, III군이 167 ± 72 mg/dL, LDL은 II군이 57 ± 53 mg/dL, III군이 27 ± 12 mg/dL로 II군 보다 III군에서 감소하였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. 광학 현미경 검사상 사구체 경화의 빈도는 II군이 26.2%, III군이 13.3%로 II군보다 III군에서 적게 나타났다.

결 론 : Atorvastatin을 puromycin과 같이 투여한 경우 총 콜레스테롤과 LDL을 낮추었으며 사구체 경화의 빈도도 감소시킨 것으로 보아 고지혈증이 사구체 경화성 변화에 중요한 원인 중의 하나로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Saint-Hillier Y, Morel-Maroger L, Woodrow D, Richet G. Focal and segmental hyalinosis. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1975;5: 67-88.
- 2) Goldszer RC, Sweet J, Cotran RS. Focal segmental glomerulosclerosis. *Annu Rev Med* 1984;35:429-49.
- 3) Oda H, Keane WF. Lipids in progression of renal disease. *Kidney Int* 1997;52(suppl 62): S36-8.
- 4) Attman PO, Alaupovic P, Samuelsson O. Lipoprotein abnormalities as a risk factor for progressive nondiabetic renal disease. *Kidney Int* 1999;56(suppl 71):S14-7.
- 5) Diamond JR, Karnovsky MJ. Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol supplementation. *Kidney Int* 1987;32(5):671-7.
- 6) Wierzbicki AS. Atorvastatin. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2(5):819-30.
- 7) Virchow R. A more precise account of fatty metamorphosis; in Chance, *Cellular Pathology*. 2nd ed. Birmingham, Gryphon Editions, 1860:342-66.
- 8) Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982;2(8311):1309-11.
- 9) Kamanna VS, Roh DD, Kirschenbaum MA. Hyperlipidemia and kidney disease: concepts derived from histopathology and cell biology of the glomerulus. *Histol Histopathol* 1998; 13(1):169-79.
- 10) Ryan GB, Rodewald R, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1975;33(5):461-8.
- 11) Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8(4):219-32.
- 12) Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM, Troy JL, Willis WT. Mechanisms of the puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1977;60(1):152-61.
- 13) Glasser RJ, Velosa JA, Michael AF. Experimental model of focal sclerosis. I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1977;36(5):519-26.
- 14) Grond J, Weening JJ. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest* 1984;51(3):277-85.
- 15) Marinides GN, Groggel GC, Cohen AH, Cook T, Baranowski RL, Westenfelder C, et al. Failure of angiotensin converting enzyme inhibition to affect the course of chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Am J Pathol* 1987;129(2):394-401.
- 16) Marinides GN, Groggel GC, Cohen AH, Border WA. Enalapril and low protein reverse chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Kidney Int* 1990;37(2):749-57.
- 17) Goldstein JL, Hobbs HH, and Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Dis-*

- ease, Vol. II, seventh ed. New York. McGraw-Hill Inc, 1995:1981-2030.
- 18) Krause BR, Newton RS. Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. *Atherosclerosis* 1995;117(2):237-44.
- 19) Bradford RH, Shear CL, Chremos AN, Dujovne C, Downton M, Franklin FA, et al. Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results. I. Efficacy in modifying plasma lipoproteins and adverse event profile in 8245 patients with moderate hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* 1991; 151(1):43-9.
- 20) Waters D, Higginson L, Gladstone P, Kimball B, Le May M, Boccuzzi SJ, et al. Effects of monotherapy with an HMG-CoA reductase inhibitor on the progression of coronary atherosclerosis as assessed by serial quantitative arteriography. The Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial. *Circulation* 1994;89(3):959-68.