

## 돼지에서 pCK-VEGF165의 심근내 주입에 의한 치료적 혈관조성

최재성\* · 김기봉\* · 한 웅\*\* · 김동식\*\* · 박진식\*\*\* · 이종진\*\*\*\* · 이동수\*\*\*\*

### Therapeutic Angiogenesis by Intramyocardial Injection of pCK-VEGF165 in Pigs

Jae-Sung Choi, M.D.\*, Ki-Bong Kim, M.D.\*, Woong Han\*\*, Dong Sik Kim\*\*  
Jin Sik Park, M.D.\*\*\*, Jong Jin Lee, M.D.\*\*\*\*, Dong Soo Lee, M.D.\*\*\*\*

**Background:** Gene therapy is a new and promising option for the treatment of severe myocardial ischemia by therapeutic angiogenesis. The goal of this study was to elucidate the efficacy of therapeutic angiogenesis by using VEGF165 in large animals. **Material and Method:** Twenty-one pigs that underwent ligation of the distal left anterior descending coronary artery were randomly allocated to one of two treatments: intramyocardial injection of pCK-VEGF (VEGF) or intramyocardial injection of pCK-Null (Control). Injections were administered 30 days after ligation. Seven pigs died during the trial, but eight pigs from VEGF and six from Control survived. Echocardiography was performed on day 0 (preoperative) and on days 30 and 60 following coronary ligation. Gated myocardial single photon emission computed tomography imaging (SPECT) with <sup>99m</sup>Tc-labeled sestamibi was performed on days 30 and 60. Myocardial perfusion was assessed from the uptake of <sup>99m</sup>Tc-labeled sestamibi at rest. Global and regional myocardial function as well as post-infarction left ventricular remodeling were assessed from segmental wall thickening; left ventricular ejection fraction (EF); end systolic volume (ESV); and end diastolic volume (EDV) using gated SPECT and echocardiography. Myocardium of the ischemic border zone into which pCK plasmid vector had been injected was also sampled to assess micro-capillary density. **Result:** Micro-capillary density was significantly higher in the VEGF than in Control ( $386 \pm 110/\text{mm}^2$  vs.  $291 \pm 127/\text{mm}^2$ ;  $p < 0.001$ ). Segmental perfusion increased significantly from day 30 to day 60 after intramyocardial injection of plasmid vector in VEGF ( $48.4 \pm 15.2\%$  vs.  $53.8 \pm 19.6\%$ ;  $p < 0.001$ ), while no significant change was observed in the Control ( $45.1 \pm 17.0\%$  vs.  $43.4 \pm 17.7\%$ ;  $p = 0.186$ ). This resulted in a significant difference in the percentage changes between the two groups ( $11.4 \pm 27.0\%$  increase vs.  $2.7 \pm 19.0\%$  decrease;  $p = 0.003$ ). Segmental wall thickening increased significantly from day 30 to day 60 in both groups; the increments did not differ between groups. ESV measured using echocardiography increased significantly from day 0 to day 30 in VEGF ( $22.9 \pm 9.9$  mL vs.  $32.3 \pm 9.1$  mL;  $p = 0.006$ ) and in Control ( $26.3 \pm 12.0$  mL vs.  $36.8 \pm 9.7$  mL;  $p = 0.046$ ). EF decreased significantly in VEGF ( $52.0 \pm 7.7\%$  vs.  $46.5 \pm 7.4\%$ ;  $p = 0.004$ ) and in Control ( $48.2 \pm 9.2\%$  vs.  $41.6 \pm 10.0\%$ ;  $p = 0.028$ ). There was no significant change in EDV. The interval changes (days 30~60) of EF, ESV, and EDV did not differ significantly between

\*서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital

\*\* (주)바이로메드

ViroMed Limited, Seoul, Korea

\*\*\*서울대학교병원 내과

Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital

\*\*\*\*서울대학교병원 핵의학과

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital

†본 논문은 서울대학교병원 일반연구비(Grant No. 04-2003-006-0)와 (주)바이로메드의 위탁연구비(Grant No. 06-2003-035-0) 지원에 의해 이루어진 것임.

‡본 논문은 대한흉부외과학회 제36차 추계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

논문접수일: 2005년 2월 28일, 심사통과일: 2005년 4월 9일

책임저자: 김기봉 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3482, (Fax) 02-764-3664, E-mail: kimkb@snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

groups both by gated SPECT and by echocardiography. **Conclusion:** Intramyocardial injection of pCK-VEGF165 induced therapeutic angiogenesis and improved myocardial perfusion. However, post-infarction remodeling and global myocardial function were not improved.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2005;38:323-334)

**Key words:** 1. Growth factor  
2. Angiogenesis  
3. Myocardial ischemia  
4. Myocardial perfusion

## 서 론

허혈성 심장질환의 치료 영역에는 최근 내과적 치료법으로는 drug-eluting stent의 개발, 외과적 치료법으로는 심폐 바이패스 없이 시행하는 관상동맥우회수술(off-pump CABG)의 도입 등 괄목할 만한 발전이 이루어지고 있다. 하지만 광범위한 미만성 관상동맥의 질환이 있거나, 이식도관으로 사용할만한 혈관이 없는 경우, 또는 동반 위험성으로 인하여 경피적 관상동맥중재술이나 관상동맥우회술 등의 직접적 재관류의 방법을 쓸 수 없거나 시행한다 하더라도 불완전 재관류 시술이 되는 경우가 적지 않으며[1,2] 이러한 환자들에서는 특히 높은 유병률과 사망률을 보이고 있다[3]. 이런 환자들의 치료에 있어 새로운 대체 방법으로 떠오르고 있는 치료적 혈관조성(therapeutic angiogenesis)은 Takeshita 등[4]에 의해 명명된 이래 미국의 Jeffrey Isner 그룹에 의해 말초동맥질환으로 인한 하지 허혈 환자에서 처음으로 임상적 치료에 이용된[5] 치료개념으로, 심근 허혈 부위에 이를 적용하였을 때 심각한 부작용 없이 부행 혈류를 만드는 자생적인 기전을 더욱 촉진시켜 허혈 부위의 심근 관류를 증가시키며 나아가 심근의 기능회복을 가져올 수 있다는 이론적 장점을 가지고 있다.

허혈성 말초혈관질환이나 심질환에서 혈관조성에 관여하는 여러 인자나 cytokines 중, vascular endothelial growth factor (VEGF)[4], platelet derived growth factor (PDGF)[6], fibroblast growth factor (FGF)[7], hepatocyte growth factor (HGF)[8,9], angiopoietin (AP)[10,11] 등이 주로 연구 대상이 되고 있다. VEGF는 폴리펩티드를 구성하는 아미노산의 수에 따라 206, 189, 165, 121의 4가지 동종형태를 지닌, 혈관내피세포에 선택적으로 작용하는 분열유발성 인자[12]로서 FGF와 함께 가장 많은 연구가 이루어지고 있

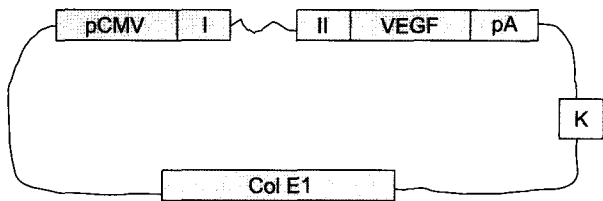
며, 사지의 말초혈관질환에서는 이미 우수한 임상실험결과[13-18]가 다수 보고되었고, 허혈성 심질환의 경우도 1년 임상 추적관찰 결과[19]를 비롯하여, 제 1상 임상연구 결과[20-24]까지 일부 보고되고 있는 실정이다. 그러나 아직까지 VEGF 단백질을 직접 투여하거나 유전자요법을 통해서 얻을 수 있는 치료적 효용성의 정도(extent of efficacy)가 정립되어 있지 않아 혈관조성으로 인해 실제로 충분한 심근관류의 개선이 이루어지는지, 나아가 전반적인 심근기능의 호전을 기대할 수 있는지 등에 대해선 아직도 많은 전임상 및 임상실험 결과의 축적이 필요한 상태이다.

본 연구의 목적은 pCK 플라스미드 벡터에 VEGF-165 (vascular endothelial growth factor isoform 165) 유전자를 삽입한 pCK-VEGF165를 돼지의 심근 허혈 부위에 근주한 후, 치료적 혈관조성을 조직학적으로 증명하고 그 치료적 효용성의 범위를 밝히는 것이다.

## 대상 및 방법

### 1) 플라스미드 제조

본 실험에 사용된 pCK-VEGF는 VEGF165 유전자를 함유하고 있는 plasmid DNA로서, Lee 등[25]이 유전자 발현 효율이 기존의 벡터에 비해 우수함을 보고한 바 있다. pCK 벡터는 human cytomegalovirus (HCMV)의 즉시초기유전자(immediate early, IE)의 인핸서/프로모터와 엑손1, 인트론 A, 엑손2의 비코딩서열과 다클로닝부위, bovine growth hormone 폴리아데닐화 신호부위, 카나마이신 내성 유전자, ColE1 복제원점 등을 주요 구성요소로 포함한다. VEGF-165 cDNA는 정상인의 vascular smooth muscle cell에서 분리한 total RNA를 사용하여 RT-PCR 방법으로 클로닝한 후 염기서열을 확인하였고 이를 pCK 벡터에 삽입하여 pCK-



**Fig. 1.** Structure of pCK expressing human VEGF165 (pCK-VEGF). pCMV, HCMV major immediate-early (IE) promoter; pA, poly A signal; K, Kanamycin resistance gene; ColE1, 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 (From Chae JK, Jeon HS, Park EJ, Kim JM, Kim DK, Kim S. 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. J Pharm Soc Korea 2001;45:108-115.).

VEGF 플라스미드를 제조하였다(Fig. 1).

## 2) 돼지의 심근경색 모델

(1) 약 30 kg (31.2±1.9 kg)의 수컷 돼지를 사용하였다. 마취유도는 xylazine (2 mg/kg), ketamine (20 mg/kg), atropine (0.05 mg/kg)을 근주하여 진정시켰으며 thiopental sodium (10 mg/kg)을 정주하고 경구기관 내 삽관한 후 enflurane으로 흡입 마취하였다. 수술 중 호흡은 양압 기계호흡을 적용하고 산소는 FiO<sub>2</sub> 0.2~0.3 정도로 유지하였다. 심전도, 산소 포화도를 수술 중 연속적으로 모니터 하였으며, 대퇴동맥에 22 gauge medicut sheath를 삽입하여 동맥혈압을 연속 모니터 하였다.

(2) 좌측 개흉술을 통해 심낭막을 열고 관상동맥을 노출시킨 후 lidocaine (1 mg/kg)을 정주하고, 좌전하행지 관상동맥의 원위부 1/3을 가능하면 결찰부위가 두번째 사선분지의 아래에 위치하도록 5-0 polypropylene sutures buttressed with a small piece of nelaton (4 Fr.)를 이용하여 3분간 결찰하고 5분 동안 재관류시키는 허혈 전 처치(Ischemic preconditioning)를 시행하면서 심전도 모니터에서 ST분절의 변화를 관찰하였다. 허혈 전처치를 1회 시행한 후 관상동맥을 결찰하고, 15분 후에 다시 lidocaine (1 mg/kg)을 정주하였다. 심낭막은 interrupted suture로 봉합하고 28 Fr. 크기의 흉관을 삽입하였으며 흉부 절개부를 봉합한 뒤 자발호흡이 충분히 돌아오면 기관 내 튜브를 발관하고, 이어서 wall suction에 연결되

어있는 흉관도 제거하였다.

(3) 좌전하행지 관상동맥 결찰을 시행한 30일 후, 심근 SPECT 및 경흉부 심초음파 검사를 시행하여 기준으로 삼았으며, 좌전하행지 관상동맥 결찰시와 같은 방법으로 마취하고 좌측 또는 우측으로 재개흉술을 실시한 후 pCK-VEGF165 또는 대조물질인 null-vector (pCK)를 심근에 근주하였다.

(4) 다시 30일 후에 역시 심근 SPECT 및 경흉부 심초음파 검사를 시행하여 이전에 실시한 기준치와 비교하였으며, 실험 돼지를 pentobarbital 과용량(120 mg/kg)을 정주하여 안락사시킨 후 심장을 적출하였다.

## 3) VEGF의 심근내 주입

pCK-VEGF 혹은 대조물질인 pCK 자체를 플라스미드 DNA 형태로 1 mL (1000 μg) 만든 후, 육안적으로 심근벽이 얇아지고 섬유화되어 보이는 경색부위와 정상조직 사이의 전측부 허혈부위에, 좌전하동맥과 두번째 사선분지의 주행을 따라 1.5 cm 간격으로 27 게이지 인슐린 주사기를 이용하여 총 5군데에 근주하였다. 근주 부위는 5-0 polypropylene 봉합사를 이용하여 심외막에 표시하여 두었다.

## 4) 경흉부 심장초음파 검사

전신마취 상태에서 돼지를 좌측와위로 눕히고 2.5/2.0-MHz transducer를 이용하여 초음파 영상 및 도플러(SO NOACE8800, Medison, Korea) 검사를 하였다. 실험 전에 심장 초음파검사를 시행하여 심낭질환이나 판막질환 등이 동반되어 있거나, 심근벽의 운동이상, 부정맥 등이 있는 돼지는 실험에서 배제되었다. 심장초음파검사는 좌전하동맥 결찰 30일과 60일 후에 다시 시행하였다. M-mode 상에서 이완기시 심실중격(IVST) 및 좌심실후벽의 두께(LVPWT), 좌심실수축기말직경(LVESD), 좌심실이완기말직경(LVEDD) 등을 측정하였으며 수축기말심실용적(ESV), 이완기말심실용적(EDV), 좌심실구출률(EF) 등은 각 측정치들을 가지고 공식에 따라 계산하였다.

$$ESV = [7.0 / (2.4 + LVESD)] \times LVESD^3, EDV = [7.0 / (2.4 + LVEDD)] \times LVEDD^3, EF = (EDV - ESV) / EDV \times 100$$

## 5) 심근 SPECT

좌전하행지 동맥 결찰 30일과 60일 후에 <sup>99m</sup>Tc-methoxyisobutylisonitrile (MIBI) 게이트 SPECT (Vertex EPIC, ADAC Labs, CA, USA)를 시행하였다. 심전도 게이트를 통해 구축된 영상들은 자동정량화 프로그램(AutoQUANT, ADAC

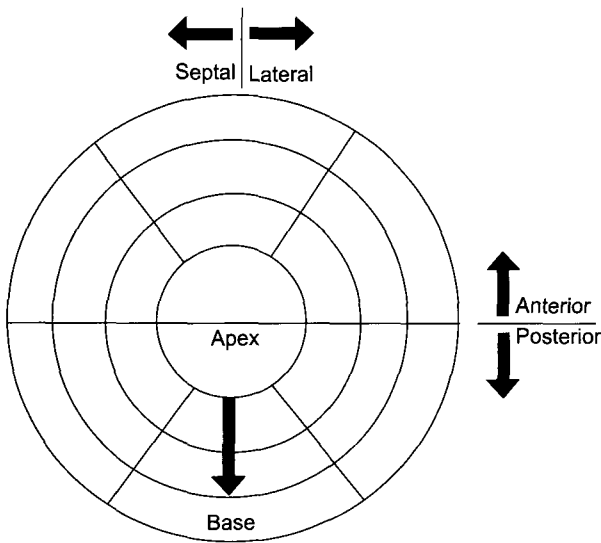


Fig. 2. Diagram of 20 segments model used in SPECT analysis.

Labs., CA, USA)을 이용하여 분석자의 수작업에 의한 편견을 제거하였다. 국소분절 분석은 20개 분절 모델(Fig. 2)을 채택하였고, 심장의 심저부위에 해당하는 6개의 분절은 좌전하행지동맥의 결찰에 전혀 영향받지 않으면서 오히려 심장 주변의 인공음영(artifact)이나 횡격막 감소(diaphragm attenuation) 등에 영향을 받을 수 있는 부위이므로 분절 분석에서 제외하였다. 분절관류의 정도는  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ 의 섭취를 측정하여 정량화하였으며 감소 보정(attenuation correction)을 시행한 상태에서 최대 섭취량에 대한 백분율로 표시하였고, 저관류 분절은  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ 의 섭취가 최대량의 70% 미만인 분절로 정의하였다. 수축시의 심실벽 비후화는 게이트 영상에서 확장기말의 심실벽 두께에 대한 백분율로 표시하였다. EF와 ESV, EDV 역시 자동정량화 프로그램을 이용하여 정량화 하였다.

#### 6) 미세혈관 밀도 측정

마지막 심초음파검사와 심근 SPECT 검사를 모두 마친 VEGF군 3마리와 대조군 4마리의 돼지를 대상으로 alkaline phosphatase를 이용한 indoxyl-tetrazolium법으로 혈관내 피세포 염색을 시행하였다. 우선 적절한 심장에 5-0 polypropylene 봉합사로 표시되어 있는 5군데의 플라스틱 주입 부위를 절편하여 이를 O.C.T. compound (Miles Inc, Elkhart Indiana, USA)로 조직블록을 만든 후 냉동절편기(HM550, MICROM international, Germany)를 이용하여 조직절편을 만들었다. 이렇게 만들어진 절편을 아세톤에 5

분간 고정하고 1차 증류수로 세척한 후 alkaline phosphatase substrate (NBT/BCLP, fast-red, Sigma, Missouri, USA)를 Tris 완충액 10 mL에 용해하였다. Phosphatase substrate가 용해되어 있는 혼합액을 슬라이드에 분주하여 10분간 반응을 한 다음 Eosine으로 대조 염색을 실시하였고 각 슬라이드당 다섯 부위를 무작위 선정하여 200배( $0.6\text{ mm}^2$ )에서 미세혈관의 개수를 측정한 후, 이를 단위면적( $1\text{ mm}^2$ ) 당 개수로 환산하여 미세혈관 밀도를 구하였다.

#### 7) 실험동물 관리

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No.85-23, revised 1996)에 의거하여 실험 돼지를 사육하고 실험하였다.

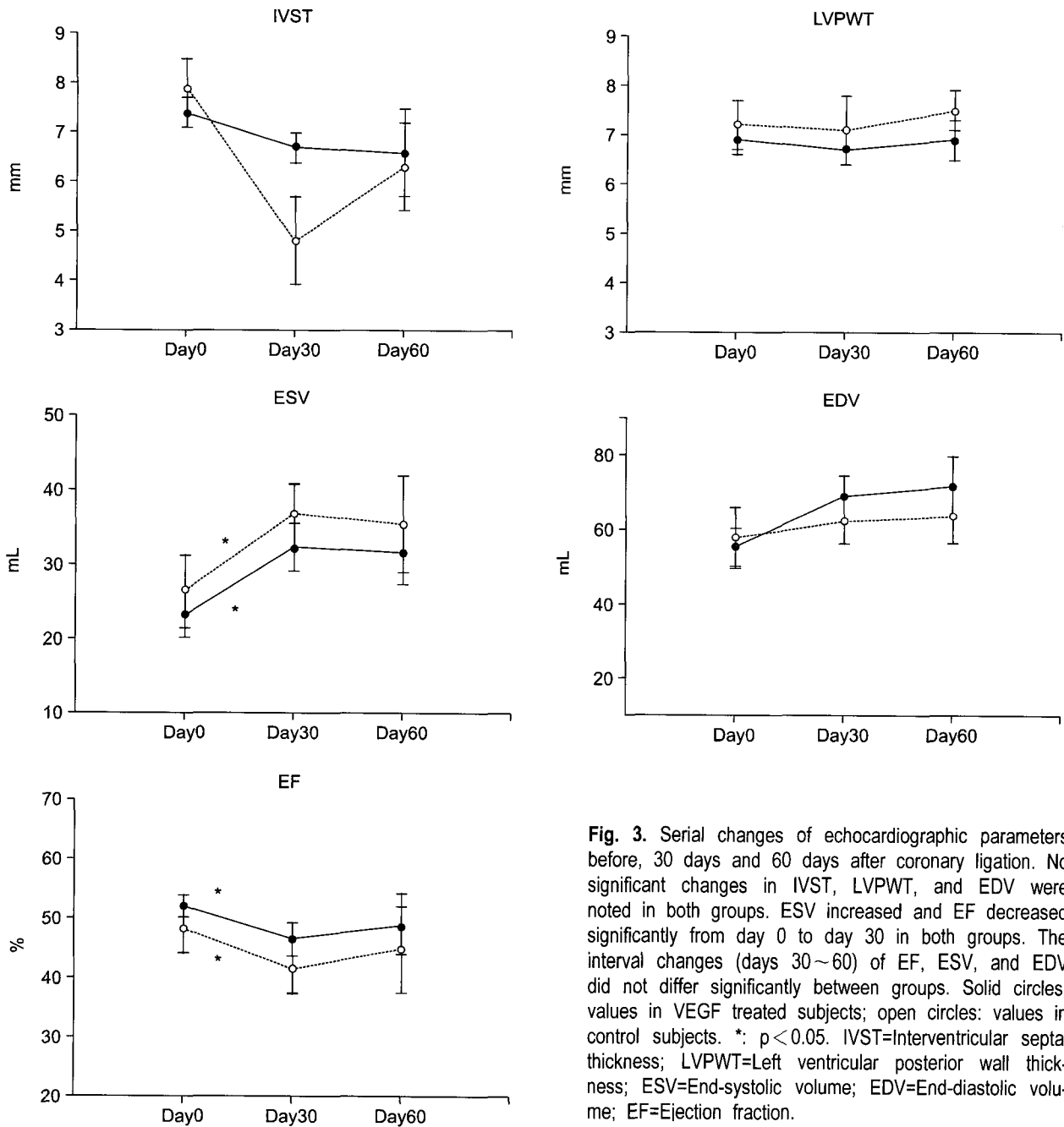
#### 8) 통계 분석

총 21마리의 돼지를 맹검 하에 무작위로 VEGF군 및 대조군으로 나누어 실험을 진행하여, 7마리(33%)가 실험 도중 사망하고 결과적으로 VEGF군은 8마리, 대조군은 6마리가 최종 통계 분석에 이용되었다. 심근 SPECT 상의 분절관류 및 심실벽 비후화 분석은 같은 군에 속해 있는 돼지들끼리의 각 개체에 따른 차이가 없었으므로(예, 분절관류 분석의 경우, VEGF군,  $p=0.334$ ; 대조군,  $p=0.087$ , by Kruskal-Wallis test), 각 분절을 하나의 개체로 간주하여 (VEGF군의 저관류 분절,  $n=65$ ; 대조군의 저관류 분절,  $n=46$ ) 두 군간의 비교는 independent-samples t-test를 사용하였고, 동일 군 내에서 백터주입 전, 후의 비교는 paired-samples t-test를 사용하였다. 분절분석 외에 다른 지표들의 분석은 자료의 개체수가 적고 정규분포를 갖지 못하여 비모수 검정(Mann-Whitney test 또는 Wilcoxon signed ranks test)를 사용하였다. 비연속 자료는 Fisher's exact test를 사용하였다. 모든 결과는 백분율(%) 혹은 평균값(mean  $\pm$  SD)으로 표시하였다. 통계분석 프로그램은 SPSS (Version 10.0, Chicago, IL)를 사용하였으며, 통계적으로 유의한 값은  $p < 0.05$ 로 정하였다.

## 결 과

### 1) 국소적 관류 및 심근기능

(1) 경흉부 심초음파: 심근경색이 발생한 부위보다 근위부인 심실의 중간 레벨에서 측정한 이완기 시 심실 중격 및 좌심실 후벽의 두께는 양 군 모두에서 수술 전에서 플라스틱 주입 전과 후에 걸쳐 유의한 변화가 없었다.



**Fig. 3.** Serial changes of echocardiographic parameters before, 30 days and 60 days after coronary ligation. No significant changes in IVST, LVPWT, and EDV were noted in both groups. ESV increased and EF decreased significantly from day 0 to day 30 in both groups. The interval changes (days 30~60) of EF, ESV, and EDV did not differ significantly between groups. Solid circles: values in VEGF treated subjects; open circles: values in control subjects. \*:  $p < 0.05$ . IVST=Interventricular septal thickness; LVPWT=Left ventricular posterior wall thickness; ESV=End-systolic volume; EDV=End-diastolic volume; EF=Ejection fraction.

ESV은 양 군 모두에서 수술 전에 비해 관상동맥 결찰 후 유의하게 증가하였고(VEGF군,  $22.9 \pm 9.9$  mL vs  $32.3 \pm 9.1$  mL,  $p=0.006$ ; 대조군,  $26.3 \pm 12.0$  mL vs  $36.8 \pm 9.7$  mL,  $p=0.046$ ), EF은 유의하게 감소하였으며(VEGF군,  $52.0 \pm 7.9\%$  vs  $46.5 \pm 7.4\%$ ,  $p=0.004$ ; 대조군,  $48.2 \pm 9.2\%$  vs  $41.6 \pm 10.0\%$ ,  $p=0.028$ ), EDV은 양 군 모두에서 유의한 변화가 없었다. 한편, 플라스미드 주입 전과 후의 비교에서는 양 군 모두

에서 EF, ESV, EDV 값의 변화량에 유의한 차이가 없었다 (Table 1)(Fig. 3).

(2) **심근 SPECT:** 좌전하행지 관상동맥 결찰 30일과 60일 후의 심근 SPECT 영상 비교에서 VEGF군이 대조군에 비해  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ 의 섭취가 더 많이 증가하였다(Fig. 4). 정량적인 분석에서는 총 196개의 대상 분절 중, VEGF 그룹에선 65개의 분절이, 대조군에선 46개의 분절이 저관류

**Table 1.** Comparison of data from transthoracic echocardiogram

	Control (n=6)					VEGF (n=8)					Comparison of % changes btw. 2 groups (p)	
	Day0	Day30	Day60	p*	p <sup>†</sup>	Day0	Day30	Day60	p*	p <sup>†</sup>		
IVST (mm)	7.9±1.6	4.8±2.2	6.3±2.3	0.116	0.246	7.4±1.2	6.7±0.8	6.6±2.4	0.101	0.674	0.093	
LVPWT (mm)	7.2±1.4	7.1±1.7	7.5±1.0	0.893	0.600	6.9±1.0	6.7±0.8	6.9±1.1	0.844	0.528	0.747	
ESV (mL)	26.3±12.0	36.8±9.7	35.4±15.8	0.046	0.917	22.9±9.9	32.3±9.1	31.7±12.5	0.006	0.779	0.796	
EDV (mL)	57.9±20.1	62.3±14.5	63.7±17.9	0.917	0.500	55.3±16.5	69.0±15.1	71.9±22.4	0.152	0.674	0.796	
EF (%)	48.2±9.2	41.6±10.0	44.8±17.5	0.028	0.600	52.0±7.7	46.5±7.4	48.8±14.4	0.004	0.484	0.699	

p\*=Day0 versus Day30; p<sup>†</sup>=Day30 versus Day60; % changes=[(Day60 - Day30)/Day30] × 100

IVST=Interventricular septal thickness; LVPWT=Left ventricle posterior wall thickness; ESV=Left ventricle end systolic volume; EDV=Left ventricle end diastolic volume; EF=Ejection fraction.

Day30(30 days after ligation of distal LAD)



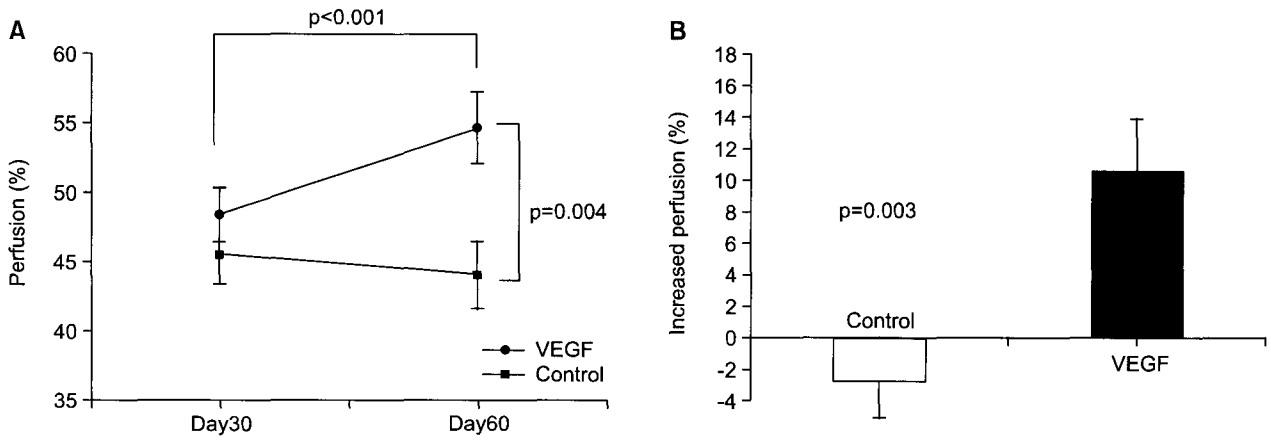
Day60(30 days after intramyocardial injection of pCK-VEGF)



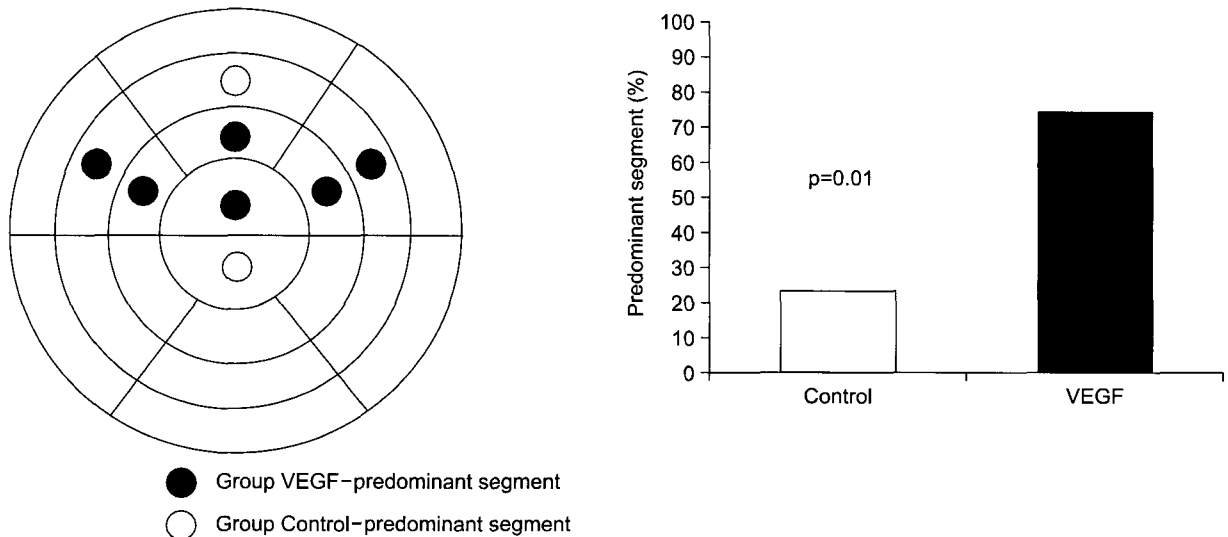
**Fig. 4.** Serial SPECT myocardial perfusion imaging 30 and 60 days after coronary ligation. Perfusion defect in apical and antero-septal wall territories and perfusion decrease in lateral wall territory on Day30 SPECT image (A) improved substantially on Day60 SPECT image (B).

분절이었다. 플라스미드 주입 후 분절의 관류정도는, 대조군이 주입 전보다 2.7±19.0% 감소한 것과 달리, VEGF군에서는 11.4±27.0%로 주입 전에 비해 유의하게 증가하였으며(p<0.001), 두 군간 비교에서도 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.003)(Fig. 5). 20개 분절 모델에서 각 저관류 분절에 대해 플라스미드의 심근주입 전후의 관류증

가가 더 우세했던 군을 분석해 보면, 적어도 돼지 한마리 이상에서 저관류를 보였던 8개 분절 중 75%인 6개 분절에서 VEGF 군이 더 우세함을 보였다(p=0.01)(Fig. 6). 반면 수축시 심실벽 비후화는 양 군 모두에서 플라스미드 주입 후 유의하게 증가하였으나 증가한 정도는 두 군 간에 차이가 없었다. 플라스미드 주입 전과 후에 각각 측정된 EF,



**Fig. 5.** Comparison of perfusion changes between right before (Day30) and 30 days after intramyocardial injection (Day60) of pCK vector. (A) The segmental perfusion increased significantly in VEGF and the perfusion amount checked on Day60 was higher in VEGF than in Control. (B) In comparison of the amounts of the perfusion changes, 11.4±27.0% increase was noted in VEGF, while 2.7±19.0% decrease in Control.



**Fig. 6.** Comparison of perfusion-predominant segments. Comparing the perfusion increments in each segment between the two groups, VEGF was a predominant group in 6 out of 8 segments.

LVESV, LVEDV 수치들의 경우는 경흉부 심초음파로 측정 한 수치들과 비교적 잘 부합하였으며, 역시 양 군 모두에서 플라스미드 주입 전과 후에 유의한 변화가 없었고, 그 수치의 변화량도 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 2).

## 2) 육안소견 및 모세혈관 밀도

육안적 소견에서 심근경색으로 인한 섬유화는 주로 심첨부를 포함한 심실중격 및 전중격 부위에 일어났으며 이는 심근 SPECT상의 관류결손부위와 잘 부합하였다(Fig.

7). 조직학적 정량분석의 결과는, VEGF군에서는 mm<sup>2</sup> 당 386±110개의 미세혈관이 측정된 반면, 대조군에서는 291±127개로 측정되어 VEGF 주입에 의해 실제로 대조군에 비해 더욱 많은 미세혈관이 생겼음을 보여주었다(Fig. 8).

## 고 찰

이번 연구에서는 VEGF 유전자를 코딩한 naked plasmid DNA를 돼지의 허혈성 심근내에 직접 주입하고 그 결과를

**Table 2.** Comparison of data from gated myocardial SPECT

	Control (n=6)			VEGF (n= 8)			Comparison of % changes btw. 2 groups (p)
	Day30	Day60	p	Day30	Day60	p	
Perfusion (%)	45.1±17.0	43.4±17.7	0.186	48.4±15.2	53.8±19.6	<0.001	0.003
Wall thickening (%)	24.0±13.2	29.2±17.6	0.008	23.8±16.1	28.3±16.6	0.021	0.264
ESV (mL)	33.3±13.8	34.0±15.1	0.833	33.3±11.8	30.9±12.2	0.496	0.245
EDV (mL)	62.3±13.6	68.2±15.6	0.172	65.3±12.3	64.7±19.1	0.734	0.121
EF (%)	49.0±11.7	51.7±10.2	0.528	50.1±7.5	53.6±7.5	0.173	0.897

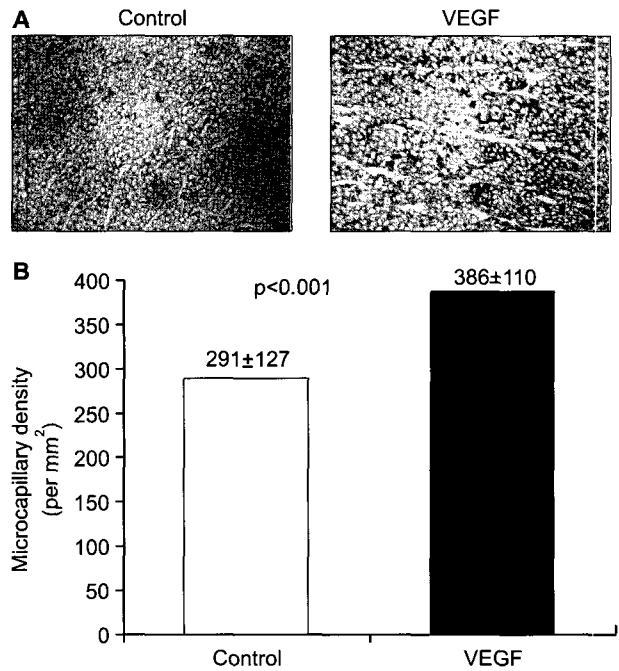
% changes=[(Day60-Day30)/Day30]×100; SPECT=Single photon emission computed tomography; ESV=Left ventricle end systolic volume; EDV=Left ventricle end diastolic volume; EF=Ejection fraction.



**Fig. 7.** Gross specimen showed postinfarction fibrosis in the apex, anteroseptal and anterolateral wall. Septal and anteroseptal wall thinning with relative hypertrophic changes in lateral and posterior walls were also shown.

대조군과 비교하였으며, SPECT 및 조직학적 분석 결과들을 정량화하여 제시하였고, pCK-VEGF의 심근내 직접 주입이 혈액학적 불안정성이나 심근내 혈관종 형성 등의 합병증 없이 미세혈관 생성 및 심근의 관류를 유의하게 증가시킴을 밝힘으로써 VEGF 유전자를 이용한 치료적 혈관조성의 임상적 적용 가능성의 토대를 제시하였다.

VEGF를 이용하여 치료적 혈관조성을 획득하는 전략엔 크게 VEGF 단백질을 이용하는 방법과 VEGF 유전자를 이용하는 요법이 있으며, 유전자 요법에서는 아데노바이러스와 같은 바이러스전달체를 쓰거나 플라스미드를 쓸 수 있으며, 전달경로도 관상동맥이나 기타 동맥에 주입하거나 심근내에 직접 주입하는 방식이 있다. 이번 연구에



**Fig. 8.** Micro-capillary density. (A) Larger number of micro-vessels stained by alkaline phosphatase were observed in VEGF than in Control (×200). (B) Comparison of the counted numbers of micro-vessels between the two groups.

서 플라스미드를 이용한 심근내 직접주입 방식의 VEGF 유전자 요법을 선택한 이유는 다음과 같다. 첫째, 유전자 요법은 VEGF 단백을 합성하여 투여하는 것에 비해 자체 세포에서 자연적으로 VEGF 단백을 계속 분비하게 함으로써 지속적인 투여효과를 기대할 수 있고[26,27] 단백질 투여에 의한 전신저혈압 등을 피할 수 있다. 둘째, 아데노바이러스를 전달체로 사용하는 경우, 특히 이를 관상동맥



혈관 내로 주입할 경우, 아데노바이러스에 전신이 노출되어 염증반응 및 면역학적 반응을 일으킬 수 있는 이론적 단점이 있으며[28], 아데노바이러스 게놈과 VEGF 단백질의 측정치가 심근내 직접주입 방식에 비해 더 낮은 것으로 보고되었다[29]. 다만, 이 경우 아데노바이러스가 전이 감염(transfection)의 효율 자체는 더 우수할 수 있으나, VEGF가 혈관내피세포에 특이적으로 작용하고[30,31], 이번에 쓰인 pCK-VEGF가 기존의 것보다 유전자발현 효율이 높음을[25] 감안하면 굳이 바이러스를 이용하지 않아도 치료적 혈관조성을 유발하기에 충분하다고 생각하였다.

안정상태에서 VEGF 주입 4주 후에 시행한 SPECT 검사 결과, 심근 허혈로 인하여 70% 이하의 저관류를 보이던 분절들의 심근관류는 12%가 증가하여 반대로 관류가 3% 감소한 대조군과 유의한 차이를 보였다. 이러한 VEGF의 혈액관류 증가 효과는 여러 저자들에게 의해서도 증명된 바 있다[24,32,33]. 특히 이번 실험과 똑같이 플라스미드를 이용한 심근내 직접주입 방식의 VEGF 유전자 요법을 사용하여 시행한 제1상 임상연구들[22,24]에서도 동일한 결과들이 보고되었으나, 비교할만한 대조군이 없이 VEGF 주입의 전후 비교에 의한 결과만을 제시하여 플라세보 효과와 다른 관찰자에 의한 바이어를 배제하지 못하였다. 이번 연구는 실험-대조군 연구로 맹검하에 무작위화되어 진행되었다. 본 연구 결과와는 달리 심실벽의 운동성이 개선되고 대상 환자 모두에서 협심증의 증상개선이 있었으나, 심근관류의 증가는 없었다는 보고[23]도 있다.

이번 연구에서 좌전하행지 관상동맥 결찰 30일 후, EF와 ESV가 두 군 모두에서 수술 전에 비해 유의하게 증가하여 경색 후 좌심실 리모델링이 일어났음을 보여주었다. 반면, 플라스미드 주입 30일 후에 EF와 ESV를 다시 측정할 결과 양 군 모두에서 유의한 변화가 없었고 그 변화량도 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않아, VEGF 유전자 요법이 이미 진행된 심실리모델링을 역전시키지는 못하는 것으로 보인다. 그러나 수개월 후 말기 리모델링[34]이 더욱 진행하면 좌심실의 리모델링이 전반적으로 일어나 심실 용적이 더 늘어나고 심실 모양이 왜곡되며 심근의 벽재성 비후가 더 뚜렷해질 수 있으므로 VEGF가 이러한 리모델링의 진행을 억제할 수 있는 효과를 갖는지 알아보기 위해선 더 늦게까지 추적관찰하여 비교연구를 다시 할 필요가 있을 것이다. Chachques 등[35]은 심근경색을 만든 지 12주 후에 시행한 심장초음파검사를 통하여 자가 근모세포를 이식한 경우 경색 후 리모델링의 정도가 감소한 반면 VEGF를 주입한 경우는 리모델링이 개선되지 않았

다고 보고하였다.

수축기시 심실벽이 두꺼워지는 정도나 좌심실구출률 등의 국소적 또는 전반적인 심근기능을 나타내는 지표들은 심근스캔 및 경흉부 심초음파검사 모두에서 VEGF 주입 전후에 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 심근관류의 증가가 심근 기능의 유의한 호전으로까지는 발전하지 못한 것을 의미한다. 토끼의 심근 허혈 모델에서 아데노바이러스를 관상동맥 내에 주입 후 좌심실구출률이 통계적으로 유의하게 증가하는 것이 보고되기도 하였으나[36], 대동물이나 사람을 대상으로 한 연구들에서는 유전자 요법이든 VEGF 단백질의 심근내 직접 주입이든 그 방법론에 관계없이 아직까지 심근의 국소적 기능의 호전을 보여주는 것 [23,33] 외에 전반적인 심근 기능의 유의한 호전을 통계적으로 제시하지는 못하고 있는 것으로 보인다. 물론, 이번 연구보다 좌심실구출률이 더욱 낮은 동물 또는 사람을 대상으로 좀 더 많은 숫자를 가지고 전반적인 심기능 개선에 대한 비교 연구를 다시 해 볼 필요가 있겠지만, 혈관조성만으로는 심근 허혈을 유의하게 개선시킬 수 없고, 전반적인 심근기능의 개선을 위해서는 보다 충분한 심근관류를 확보할 수 있는 동맥혈관조성(arteriogenesis)이 필요할 수도 있다고 생각된다[37]. 따라서 보다 확실한 심근기능의 개선을 위해선 동맥혈관조성까지 일으키는 것으로 알려진 PDGF, HGF, FGF 등의 성장인자들을 VEGF와 병용하여 허혈 부위의 심근관류량을 더욱 증폭시키는 방법도 연구해 볼 필요가 있다. 이 외에도 심근경색 부위에 이식된 골격근모세포나 골수세포가 경색 부위의 확대와 심실 확장 등을 막고 국소 심근 수축력을 증가시킨다는 최근 보고들[35,38]을 감안할 때, 이러한 세포 요법을 병용하는 연구도 필요하리라 생각되며, 실제로도 이러한 여러 가지 병용 요법들을 통한 연구 결과에 대한 보고가 점차 늘고 있는 것으로 보인다.

미세혈관밀도의 분석은 alkaline phosphatase로 염색하여 200배(현미경시야 면적: 0.6 mm<sup>2</sup>)에서 염색된 혈관을 모두 세어 비교하였는데, VEGF에 관한 연구에서 소동물이 아닌 돼지의 심근에서 직접 미세혈관을 염색하여 조직학적인 정량분석을 한 것은 이번 연구가 처음이다. 조직학적 분석결과 VEGF 유전자 주입부위에 유의하게 더 많은 미세혈관이 생성된 사실은, VEGF에 의해 자연적인 혈관조성이 더욱 증폭되었음을 보여주는 것으로 돼지 심장의 ex vivo 혈관조영술에서 부행혈관 열기(vascular plexus of collateral vessels)의 개수 및 부행혈류 지표의 유의한 증가를 보여준 기존의 연구 결과[29]와도 부합한다.

이번 연구에서는 VEGF 유전자를 관상동맥 결찰 30일 후에 주입하고 그 효과를 플라스미드 주입 30일 후에 평가하였다. 사람의 경우 자연발생한 VEGF의 혈장농도는 급성심근경색 후 2주째에 최고치에 달하며 적어도 3주째 까지 그 농도가 증가하고[39], rat의 경우는 6주까지 심근에 VEGF 수용체가 증가하는 것이 보고된 바[40] 있으나, 돼지의 경우는 장기간의 관찰결과를 보고한 것이 없어 이번 연구에서 관상동맥 결찰후 자연발생한 VEGF의 농도가 4주째에 어떤 상태에 있는지 정확히 추론하기 어려울 뿐 아니라, 본 연구에서의 추정과 같이 심근경색 유발 30일째가 자연발생한 VEGF의 효과가 거의 없어지는 시점이라 하더라도 실제로 이 시점이 자연발생한 VEGF의 영향을 최소화할 수 있다는 장점은 있으나 좌심실의 리모델링으로 심근의 섬유화가 진행되는 과정에서 30일째가 VEGF 유전자 주입의 효과를 극대화할 수 있는 시점인지는 알 수 없다. 추가로, VEGF 유전자 주입의 효과를 평가하는 시점 역시 돼지에서 VEGF 단백질의 발현양상에 따라서 그 평가 시기를 좀 더 늦추거나 앞당김으로써 VEGF 주입 효과의 정도가 달리 평가될 수 있다. 이는 이번 연구의 제한점으로, 향후 심근 허혈 경계부위에서 심근경색 유도 후와 VEGF 유전자 주입 후의 시간에 따른 VEGF 농도를 측정하는 연구가 필요하다. 다음으로, 조직검사상 미세혈관 개수의 평균비교를 위해 심근의 허혈성 경계 부위에서 조직을 채취하고 이 조직 슬라이드에서 다섯 부위를 무작위 선정하여 현미경 검사를 하였는데, 이 과정에서 VEGF 군에서 혈관조성이 특히 증가되어 있는 조직이나 현미경 관찰부부분이 더 많이 채취되거나 선정되었을 가능성을 배제할 수 없다는 제한점이 있으나, 조직 채취시 미리 표시된 조직부위를 채취하고 현미경 관찰도 추후 다른 조직병리 연구원이 같은 작업을 반복하게 하여 동일한 결과를 확인하는 것으로 그 가능성을 최소화하였다.

## 결 론

이번 실험 연구에서 VEGF165 유전자를 삽입한 플라스미드를 돼지의 심근내에 직접 주입함으로써 대동물에서 허혈성 생존 심근 부위에 혈관조성과 심근관류가 유의하게 증가하는 것을 증명하였다. 그러나, 심근기능이나 경색 후 리모델링 경과의 호전은 관찰할 수 없었다. 따라서, VEGF 유전자 요법이 난치성 허혈성 심질환의 유용한 임상적 치료법의 하나로 자리매김하기 위해서는, 향후 VEGF 유전자의 발현효율을 더욱 극대화시키는 방법, 관상동맥

우회술같은 기존의 재관류 요법이나 다른 성장인자들을 병용하는 방법 등에 대한 추가적인 연구를 통하여 대동물에서 심근기능의 유의한 호전을 나타내는 결과들을 축적하는 것이 필요하다.

## 참 고 문 헌

1. Mukherjee D, Bhatt DL, Roe MT, Patel V, Ellis SG. *Direct myocardial revascularization and angiogenesis-how many patients might be eligible?* Am J Cardiol 1999;84:598-600.
2. Jones EL, Craver JM, Guyton RA, Bone DK, Hatcher CR, Jr, Riechwald N. *Importance of complete revascularization in performance of the coronary bypass operation.* Am J Cardiol 1983;51:7-12.
3. Scott R, Blackstone EH, McCarthy PM, et al. *Isolated bypass grafting of the left internal thoracic artery to the left anterior descending coronary artery: late consequences of incomplete revascularization.* J Thorac Cardiovasc Surg 2000; 120:173-84.
4. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. *Therapeutic angiogenesis: a single intra-atrial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model.* J Clin Invest 1994;93:662-70.
5. Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. *Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease.* Circulation 1995;91:2687-92.
6. Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, et al. *PDGF(BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF(BB), and PDGF(AB).* J Surg Res 2002;107:203-9.
7. Ueno H, Li JJ, Masuda S, Qi Z, Yamamoto H, Takeshita A. *Adenovirus-mediated expression of the secreted form of basic fibroblast growth factor (FGF-2) induces cellular proliferation and angiogenesis in vivo.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:2453-60.
8. Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, et al. *Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease: downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells.* Circulation 1999;100 (suppl 2):301-8.
9. Ueda H, Sawa Y, Matsumoto K, et al. *Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart.* Ann Thorac Surg 1999;67:1726-31.
10. Siddiqui AJ, Blomberg P, Wardell E, et al. *Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium.* Biochem Biophys Res Commun 2003;24:1002-9.
11. Matsunaga T, Warltier DC, Tessmer J, Weihrauch D, Simons M, Chilian WM. *Expression of VEGF and angiopoietins-1 and -2 during ischemia-induced coronary angiogenesis.* Am

- J Physiol Heart Circ Physiol 2003;285:352-8.
12. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins.* Endocr Rev 1992;13:18-32.
  13. Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. *Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene.* Circulation 1997; 96(suppl 2):382-8.
  14. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G. *Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results.* J Vasc Surg 1998;28:964-73.
  15. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. *Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia.* Circulation 1998;97:1114-23.
  16. Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, et al. *Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia.* Arch Neurol 2001;58:761-8.
  17. Mohler ER 3rd, Rajagopalan S, Olin JW, et al. *Adenoviral-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor in critical limb ischemia: safety results from a phase I trial.* Vasc Med 2003;8:9-13.
  18. Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. *Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia.* Am J Med 2003;114:85-92.
  19. Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, et al. *One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients.* Am J Cardiol 2003;92:436-9.
  20. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, et al. *Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect.* Circulation 2000;101:118-21.
  21. Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, et al. *Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease.* Am Heart J 2001;142:872-80.
  22. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al. *Gene therapy with vascular endothelial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia.* Circulation 1998;98:2800-4.
  23. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. *Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease.* Circulation 1999;100:468-74.
  24. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, et al. *Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease.* Ann Thorac Surg 1999;68:830-7.
  25. Lee YJ, Park EJ, Yu SS, Kim DK, Kim S. *Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: implication for gene therapy of ischemic diseases.* Biochem Biophys Res Commun 2000;272:230-5.
  26. Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, et al. *The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.* J Biol Chem 1991;266:11947-54.
  27. Ylä-Herttua S, Alitalo K. *Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth.* Nat Med 2003;9:694-701.
  28. Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. *Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart.* J Clin Invest 1992;90:626-30.
  29. Lee LY, Patel SR, Hackett NR, et al. *Focal angiogenic therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121.* Ann Thorac Surg 2000;69:14-24.
  30. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor.* Endocr Rev 1997;18:4-25.
  31. Henry TD, Abraham J. *Review of preclinical results with vascular endothelial growth factors for therapeutic angiogenesis.* Curr Intervent Cardiol Rep 2000;2:228-41.
  32. Tio RA, Leberherz C, Scheuermann T, et al. *Evidence of collateral development following intramyocardial gene therapy with vascular endothelial growth factor.* Surg Forum 1998; 49:220-1.
  33. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA, et al. *Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart.* J Thorac Cardiovasc Surg 1998;115:168-76.
  34. Sutton MG, Sharpe N. *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathology and therapy.* Circulation 2000;101:2981-8.
  35. Chachques JC, Duarte F, Cattadori B. *Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study.* J Thorac Cardiovasc Surg 2004;128: 245-53.
  36. Tanaka E, Hattan N, Ando K, et al. *Amelioration of microvascular ischemia by gene transfer of vascular endothelial growth factor in rabbits.* J Thorac Cardiovasc Surg 2000; 120:720-8.
  37. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, et al. *Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: an expert panel summary.* Circulation 2000;102:E73-86.
  38. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, et al. *Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers.* Circulation 2003;108(suppl 1):II-259-63.
  39. Hojo Y, Ikeda U, Zhu Y, et al. *Expression of vascular en-*

endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2000;35:968-73.

40. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Si-

mons M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. Am J Physiol 1996; 270:H1803-11.

=국문 초록=

배경: 유전자 치료에 의한 치료적 혈관조성은 허혈성 심질환의 새로운 치료전략의 하나로 최근 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구의 목적은 대동물에서 pCK 플라스미드 벡터에 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor isoform 165; VEGF165) 유전자를 삽입한 pCK-VEGF를 이용한 치료적 혈관조성의 효용성을 증명하는 것이다. 대상 및 방법: 총 21 마리의 돼지를 이용하여 좌전하행지동맥의 원위부를 결찰하여 심근경색 모델을 만든 후, 4주 후에 VEGF 유전자를 삽입한 플라스미드를 심근내에 주입하거나(VEGF군), 유전자 없이 플라스미드 만을 주입하였다(대조군). 실험 대상 동물군을 맹검하에 무작위로 VEGF군 및 대조군으로 나누어 실험을 진행하였는데, 7마리는 실험 도중 사망하였으며 결과적으로 VEGF군은 8마리, 대조군은 6마리가 최종분석에 이용되었다. 좌전하행지동맥 결찰 후 30일째에 심근 SPECT와 심장초음파검사를 시행하고 심근내에 플라스미드를 주입하였으며, 이로부터 30일째에 심근 SPECT와 심장초음파검사를 다시 시행하였다. 허혈부위의 심근관류의 변화는 심근 SPECT상의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취 정도로 비교하였으며, 국소 및 전체 심근기능 및 심실리모델링 등은 심장초음파 또는 게이트SPECT 검사상의 수축시 심실벽 비후화, 좌심실기출출물(EF), 수축기말용적(ESV), 이완기말용적(EDV) 등으로 비교하였다. 혈관조성의 정도는 조직검사상의 미세혈관의 밀도를 측정하여 비교하였다. 결과: 미세혈관의 밀도는 VEGF군에서 유의하게 더 높았으며( $386 \pm 110/\text{mm}^2$  vs  $291 \pm 127/\text{mm}^2$ ,  $p < 0.001$ ), 분절의 관류 정도도 VEGF군에서는 관상동맥 결찰 60일째가 30일째에 비해 더 증가한 반면(플라스미드 주입 전, 후,  $48.4 \pm 15.2\%$  vs  $53.8 \pm 19.6\%$ ,  $p < 0.001$ ) 대조군에서는 유의한 변화가 없었고(플라스미드 주입 전, 후,  $45.1 \pm 17.0\%$  vs  $43.4 \pm 17.7\%$ ,  $p = 0.186$ ), 그 변화량도 두 군간에 유의한 차이를 보였다( $11.4 \pm 27.0\%$  증가 vs  $2.7 \pm 19.0\%$  감소,  $p = 0.003$ ). 수축시의 심실벽 비후화는 양 군 모두에서 플라스미드 주입 후 유의하게 증가하였으나 증가한 정도는 두 군간에 차이가 없었다. 심장초음파검사상 ESV는 양 군 모두에서 수술 전에 비해 관상동맥 결찰 후 유의하게 증가하였고(VEGF군,  $22.9 \pm 9.9$  mL vs.  $32.3 \pm 9.1$  mL,  $p = 0.006$ ; 대조군,  $26.3 \pm 12.0$  mL vs.  $36.8 \pm 9.7$  mL,  $p = 0.046$ ), EF은 유의하게 감소하였으며(VEGF군,  $52.0 \pm 7.9\%$  vs.  $46.5 \pm 7.4\%$ ,  $p = 0.004$ ; 대조군,  $48.2 \pm 9.2\%$  vs  $41.6 \pm 10.0\%$ ,  $p = 0.028$ ), EDV은 양 군 모두에서 유의한 변화가 없었다. 플라스미드 주입 전과 후의 비교에서는 양 군 모두에서 심장초음파 및 게이트 SPECT 검사상의 EF, ESV, EDV 값의 유의한 차이가 없었다. 결론: VEGF165 유전자를 삽입한 플라스미드의 심근내 주입 후 허혈성 생존 심근 부위에 혈관조성이 일어나고 심근관류가 유의하게 증가하였다. 그러나 심근 기능이나 좌심실의 리모델링 경과엔 유의한 차이가 없었다.

- 중심 단어 : 1. 성장인자  
2. 혈관조성  
3. 심근허혈  
4. 심근관류