

## 동맥혈관 평활근세포 증식에 대한 오보바톨 유도체(A-8)의 억제효과

임용 · 이미애\* · 투데브명흐\*\* · 박은석\*\* · 정재경\*\* · 윤여표\*\*#  
동의대학교 임상병리학과, \*세계사이버대학 사회복지과, \*\*충북대학교 약학대학  
(Received December 24, 2010; Revised March 4, 2011; Accepted April 11, 2011)

## Inhibitory Effects of A-8 on Abnormal Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

Yong Lim, Mi-Yea Lee\*, Munkhtsetseg Tudev\*\*, Eun-Seok Park\*\*, Jae-Kyung Jung\*\* and Yeo-Pyo Yun\*\*.#

*Department of Clinical Laboratory Science, Dong-eui University, Busan 614-714 Korea*

*\*Department of Social Welfare, World Cyber College, Gwangju 464-895, Korea*

*\*\*College of Pharmacy and CBITRC, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

**Abstract** — Abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) plays an important role in the development and progression of proliferative cardiovascular diseases, including hypertension and atherosclerosis. To find antiproliferative agent (A)-8 had inhibitory effect on VSMCs proliferation. Therefore, we examined the antiproliferative effect of A-8, a newly synthesized obovatol derivative. To investigate the antiproliferative effect of A-8, we examined cell counting and [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation assays. The pre-incubation of A-8 (1~4 μM) significantly inhibited proliferation and DNA synthesis of 5% fetal bovine serum (FBS)-stimulated rat aortic VSMCs in concentration-dependent manner. Whereas, A-8 did not show any cytotoxicity in rat aortic VSMCs in this experimental condition by WST-1 assay. In addition, A-8 significantly inhibited 5% FBS-induced cell cycle progression in rat aortic VSMCs. These results show that A-8 may be developed as a potential antiproliferative agent for treatment of angioplasty restenosis and atherosclerosis. Furthermore, A-8 should be examined for further clinical application either as a single agent or in combination with other angioplasty restenosis or atherosclerosis agents.

**Keywords** atherosclerosis, smooth muscle cell, FBS, obovatol

최근 급속한 경제발전과 생활수준의 향상 및 그로 인한 생활 방식의 다양화, 활동감소, 과잉영양 등으로 인해 감염위주의 질환에서 선진국형의 만성퇴행성질환이 증가하는 추세이다. Abelson은 현대인 사망의 주원인이 흡연 및 비만에 기인한 암과 심혈관 질환 때문이라고 보고하였고,<sup>1)</sup> Lusis는 서구사회의 사망원인 50%가 심혈관질환에 기인한다고 보고하였다.<sup>2)</sup> 또한 최근의 보건통계에 따르면 한국인의 주요 사망원인도 암과 심혈관질환으로 나타났다. 최근에는 심혈관질환으로 인한 사망률이 암에 의한 사망률을 상회하고 있는 실정이다.

심혈관 질환의 대부분을 차지하는 동맥경화증은 흡연, 당뇨병 등의 여러 요인에 의해 혈관이 손상을 받거나 혈관내피 세포의 기능에 문제가 생기는 경우 발생하게 된다. 동맥경화반의 생성과 이로 인한 혈전의 생성은 각 장기로의 원활한 혈액 공급을 저

해해 심각한 결과를 초래한다. 동맥경화는 심근경색과 같은 허혈성 심장질환과 뇌졸중 같은 심각한 질병을 야기한다. 성인병으로 알려진 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등에 흔히 동반될 뿐 아니라 신장질환이나 염증성 질환 등과도 관련이 있다. 동맥경화성 혈관 병변의 치료 목적으로 풍선도자 확장술이나 스텐트 삽입술과 같은 내과적 혈관확장술이 이용되고 있으나, 시술 후 약 30~40%는 혈관재협착증이 여전히 문제로 남아있다.<sup>3)</sup> 이러한 혈관재협착증은 혈관평활근 세포의 증식, 이동 그리고 세포외 기질(extracellular matrix)의 분비 등에 기인한다고 알려져 있다.<sup>4,6)</sup> 따라서, 동맥경화의 진행과 혈관 재협착의 방지를 위해 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cell, VSMC)의 증식을 억제하는 약물에 대한 연구가 진행되고 있으며, 현재 몇 가지 약물이 환자의 치료에 사용되고 있다.<sup>7)</sup> 그러나 현재 사용되고 있는 약물들의 경우 그 효과가 완벽하지 못해 우수한 혈관평활근세포의 증식 억제 기능을 가진 새로운 약물의 개발이 요구된다.

혈관 평활근세포의 비정상적 증식과 비대는 고혈압의 중요한 특징으로 나타나며, 이와 같은 특징은 심혈관질환의 주원인으로

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-2821 (팩스) 043-268-2732  
(E-mail) ypyun@chungbuk.ac.kr

작용하고 있으며, 혈관평활근세포의 비정상적 증식 억제 약물의 탐색 및 작용기전규명은 심혈관질환의 예방 및 치료에 있어 대단히 중요한 과제로 여겨진다.

그러므로, 본 연구에서 안전하면서도 효과적으로 혈관 재협착을 억제할 수 있는 물질을 탐색하기 위해 오보바톨로부터 새롭게 합성된 A-8 유도체를 fetal bovine serum(FBS)로 유도 되어진 혈관평활근세포에서의 억제효과를 살펴보았다.

## 실험방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 A-8은 충북대학교 약학대학 정재경교수에게서 제공 받아 사용하였다. A-8은 전보에 보고한 방법대로 합성되었으며 혈관평활근세포의 증식억제효과 확인 시험에 사용했다.<sup>7)</sup> FBS와 cell culture에 쓰인 시약들은 Gibco-BRL(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 그 외의 다른 모든 시약은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)에서 최상급 순도를 가진 것을 구입하여 사용하였다.

### 세포 배양

혈관평활근세포는 enzymatic dispersion을 이용하여 분리한 primary culture cell을 사용하였다. 혈관평활근세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS)과 100 units/ml penicillin-streptomycin, 8 mM HEPES 그리고 2 mM L-glutamine이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 이 실험에서 쓰이는 혈관평활근세포의 passage는 6~9이다.

### 세포수 측정

혈관평활근세포 수를 측정하기 위해서, 12-well culture plates (5×10<sup>4</sup> 세포/well)에 seeding 하고, 세포를 배양하여 ~70%의 confluency에 도달하게 되면, 최소배지로 교체해 준 후에 준비한 시험물질을 각 well에 10 μl씩 농도에 따라 처리하였다. 시험물질 처리한 후 24시간 뒤에 5% 우태혈청으로 증식을 24시간 유도하였다. 그 뒤에 각 well에 trypsin을 처리하여 세포를 시험관에 옮겨 담고, 현미경과 hemocytometer를 이용해서 cell counting을 하였다.

### DNA 합성 측정

혈관평활근세포는 24-well culture plate에 seeding하고 70% confluence를 이루면 최소배지로 바꾸어 주고 각 농도별로 시험물질을 처리한다. 시료 처리 후 24시간이 지나면 5% 우태혈청을 첨가하고 20시간 후 1 μCi/ml의 [<sup>3</sup>H]-thymidine을 배지에 첨가한다. [<sup>3</sup>H]-thymidine을 처리하고 4시간 동안 배양한다. 그 후에 배지를 제거하고 얼음 위에서 10% trichloroacetic acid가 포함된 PBS와 ethanol/ether(1:1, vol/vol)로 세척 해준다. 산에 용

해되지 않는 [<sup>3</sup>H]-thymidine은 well 당 0.5 M NaOH 250 μl을 넣어 추출하고 이 용액의 100 μl는 scintillation cocktail 5 ml과 섞어 liquid scintillation counter로 counting하고 나머지 50 μl는 BCA reagent를 이용하여 정량한다.

### 세포주기 측정

혈관평활근세포는 6 well plates에서 배양해 PBS로 세척 후 시험물질을 넣은 최소배지에서 24시간 배양한다. 5% 우태혈청으로 24시간 혈관평활근세포의 증식을 유도해 3×10<sup>4</sup>세포를 1,200 rpm에서 10분 동안 원심분리 하고 pellet을 5 ml sample buffer로 혼탁하여 1,200 rpm으로 10분간 원심분리 2번 반복하여 세척 해준다. 세척된 pellet은 70% ethanol로 혼탁하고 4°C에서 하룻밤 고정 과정을 거친다. 고정된 세포를 혼탁하여 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 ethanol은 버리고 0.5 ml propidium iodide (PI) 용액에 염색시킨다. 1시간 정도 실온에서 염색시킨다. 준비된 각 시료의 세포핵의 DNA-PI 복합체는 FACSCalibur(Becton & Dickinson Co., USA)로 측정되며 세포주기에서의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S 그리고 G<sub>2</sub>/M 기 비율은 ModFit LT V2.0 program(Verity Software)에 의해 측정된다.

### 통계처리

모든 실험결과들은 평균±표준편차 나타내었고 통계 처리는 Student's t-test를 실시하여 P<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 실험결과 및 고찰

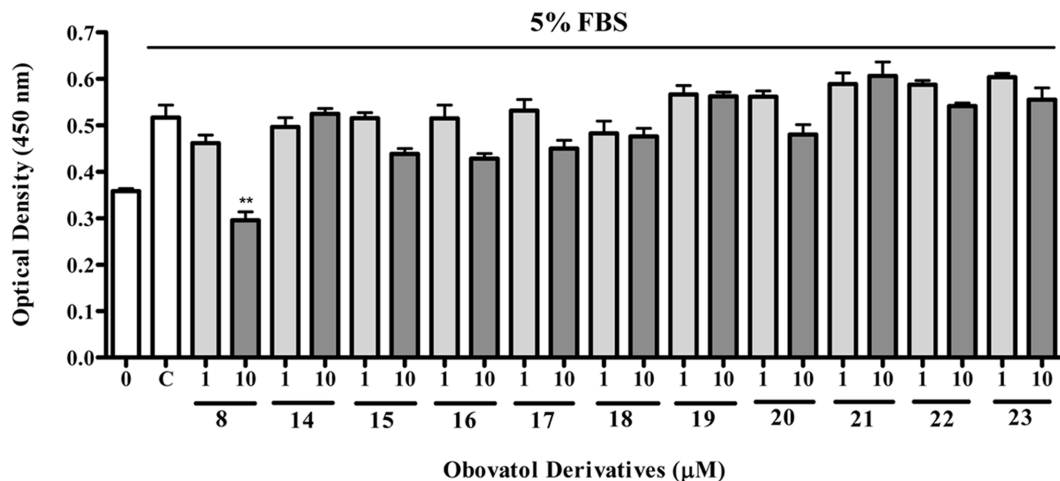
### 혈관평활근세포 증식에서 오보바톨유도체의 효과

동맥벽의 주요 구성은 혈관평활근세포로 이루어져있다. 비정상적인 혈관평활근세포의 증식은 동맥경화와 풍선도자확장술로 인해 나타난다.<sup>8)</sup> 그러므로 동맥경화를 포함한 심혈관질환을 위한 예방 및 치료를 위해 혈관평활근세포의 증식을 억제하는 물질을 찾는 것은 중요하다.

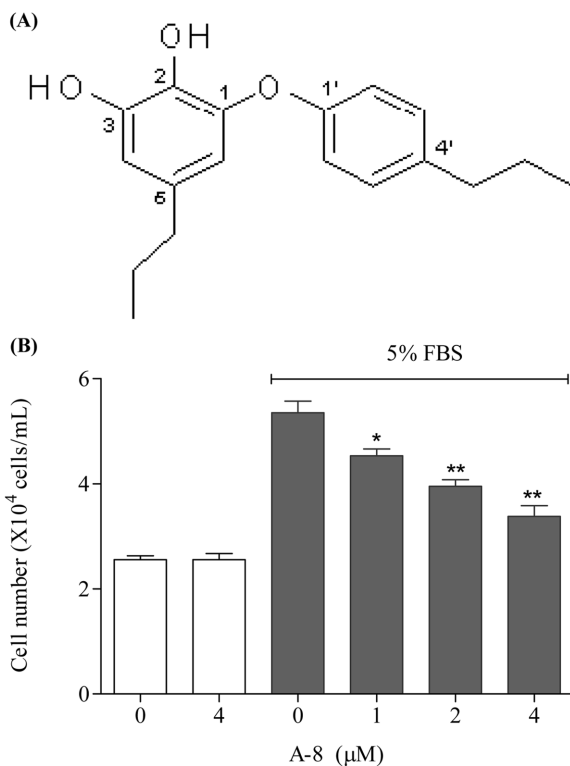
우태혈청으로 유도된 혈관평활근세포 증식을 오보바톨 유도체들을 이용해 WST-1 방법으로 증식억제 정도를 확인해 보았다. 그 결과 5% 우태혈청으로 유도된 혈관평활근세포를 오보바톨 유도체 8번이 강하게 억제하였다(Fig. 1).

### 혈관평활근세포 증식에서 A-8의 세포수 감소 효과

이 실험에서는 항증식 효과를 나타내는 오보바톨 유도체 A-8 (Fig. 2A)을 1, 2 그리고 4 μM 농도로 전처리하여 5% 우태혈청으로 유도된 혈관평활근세포의 세포수 감소를 직접 계수하여 확인하였다. 5% 우태혈청으로 혈관평활근세포수는 대조군에 비교하여 유의적으로 증가하였으며 전처리된 A-8에서는 농도의존적



**Fig. 1** – Effects of obovatol derivatives on FBS-induced rat aortic VSMCs proliferation. VSMCs were seeded with  $4 \times 10^3$  cells/well at 96 well plate, and precultured serum free medium in 96 well plates and precultured in serum free medium in the presence or absence of obovatol derivatives (1,10  $\mu$ M). After 24 hr, cells were stimulated by 5% FBS. WST-1 reagent was added after 22 hr and further incubated for 2 hr. Then the absorbance was determined in an ELISA at a wavelength of 450 nm.

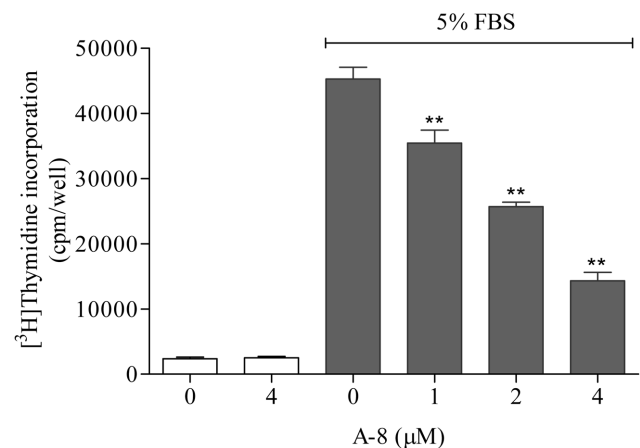


**Fig. 2** – (A) Chemical structure of A-8, a newly synthesized obovatol derivative. Effect of A-8 on 5% FBS-stimulated proliferation of rat aortic VSMCs. (B) For the cell proliferation assay, rat aortic VSMCs were precultured in serum-free medium in the presence or absence of 1, 2, or 4  $\mu$ M A-8 for 24 hr and then stimulated with 5% FBS for 24 hr. The cells were trypsinized and counted. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from three independent sets of experiments \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01 vs. FBS-induced rat aortic VSMCs.

으로 감소되었다(Fig. 2B).

#### 혈관평활근세포 DNA합성에서 A-8의 효과

세포증식의 또 다른 지표인 DNA 합성에서 A-8의 효과를 확인하였다. 5% 우태혈청에 의해 혈관평활근세포는 대조군 보다 유의적으로 DNA 합성량이 증가하였다. 하지만 A-8을 전처리하여 우태혈청으로 자극되어진 DNA 합성은 농도의존적으로 DNA 합성을 억제하였다. 시험물질 농도 1, 2 그리고 4  $\mu$ M에서 각각

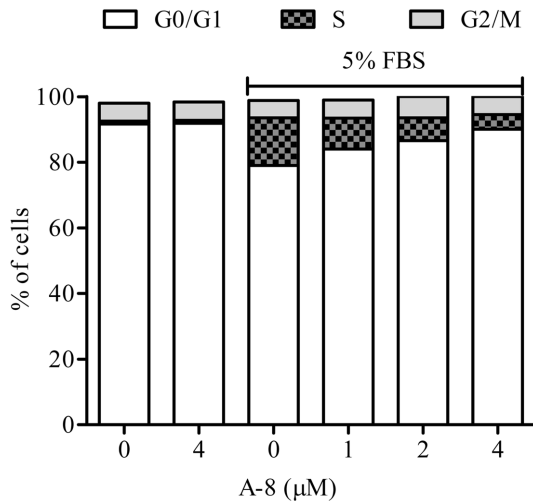


**Fig. 3** – For the DNA synthesis assay, rat aortic VSMCs were sequentially cultured in serum-starved medium in the presence or absence of A-8 (1, 2, or 4  $\mu$ M) for 24 hr, 5% FBS for 24 hr, and with 1  $\mu$ Ci/mL [<sup>3</sup>H]-thymidine for 4 hr. The labeling reaction was terminated, and radioactivity was quantified using a liquid scintillation counter. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from three independent sets of experiments \*\* $P$ <0.01 vs. FBS-induced rat aortic VSMCs.

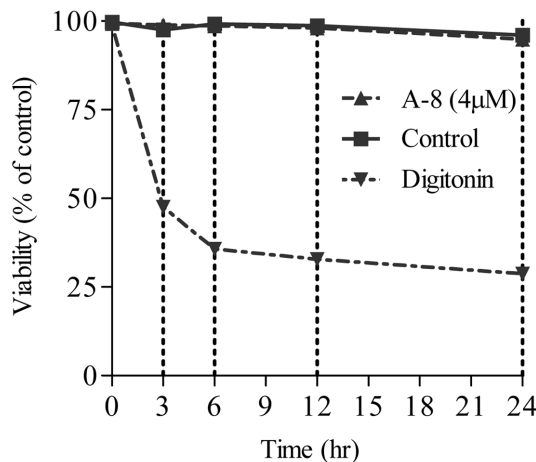
32, 71 그리고 97%로 강하게 DNA 합성을 억제하였다(Fig. 3).

**혈관평활근세포 세포주기 진행에서 A-8의 효과**

여러 종류의 유사분열 자극인자에 의해 혈관평활근세포 증식이 나타나고 이는 심혈관질환에 있어서 중요하다. 이처럼 많은 자극인자들에 의한 증식을 조절하기 어렵기 때문에 최근에는 공



**Fig. 4** – Effect of A-8 on FBS-induced cell cycle progression. Rat aortic VSMCs were precultured in the presence or absence of A-8 (1, 2, or 4 µM) in serum-depleted medium for 24 hr. Rat aortic VSMCs were then stimulated with 5% FBS for 24 hr, harvested by trypsinization, and treated as described in the Materials and Methods section. The individual nuclear DNA content was measured as the fluorescence intensity of incorporated PI. Each item is derived from a representative experiment, where data from at least 10,000 events were obtained. Data are representative of at least three independent experiments with similar results.



**Fig. 5** – Effect of A-8 on rat aortic VSMCs viability. Rat aortic VSMCs were exposed to 4 µM A-8 or 100 µg/ml digitonin. At the indicated times (3, 6, 12 and 24 hr), cells were processed for their viability by the WST-1 assay.

통경로인 세포주기 조절을 통해 세포의 증식을 조절하려는 연구가 진행되고 있다.<sup>9)</sup> 5% 우태혈청에 의해 세포주기 S단계가 대조군에 비해 유의적으로 늘어 났지만 시험물질에 의해 전처리된 시험군에서는 농도의존적으로 줄어 들었다. 이 결과는 혈관평활근증식에 있어 세포주기의 초기 단계인 check 1 단계를 조절하여 혈관평활근세포 증식억제를 나타내는 것임을 보여준다(Fig. 4). 세포증식 억제 효과는 세포독성에서도 나타날 수 있기 때문에 확인한 결과 실험에 사용한 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 5). 따라서 새롭게 합성되어진 오보비톨 유도체 A-8은 세포독성이 세포주기 check 1 단계를 조절하여 혈관평활근세포 증식을 강하게 억제하는 물질임을 확인 할 수 있었다.

**결 론**

심부전, 관상동맥질환, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 선천성 심장질환, 심근경색증, 협심증 등의 심장질환과 뇌졸중, 말초혈관질환 등의 심혈관계 질환은 다양한 연령층에서 발생하며 적기에 치료하지 않으면 심각한 후유증과 더불어 사망에 이르게 할 수 있다. 관상동맥질환에 대한 대표적 치료법으로 풍선도자확장을 이용한 스텐트삽입술이 많이 사용되고 있으나, 3내지 6개월이 경과한 후에는 약 30~40% 가량의 환자들에 있어서 혈관 재협착이 일어난다는 문제점이 있다. 이러한 스텐트 시술후의 혈관 재협착을 방지하기 위하여 억제제를 스텐트에 코팅해 사용함으로써 혈관 재협착 발생 비율은 줄었지만 혈관 재협착 억제제에 의한 부작용으로는 혈관 재협착을 방지하는 것 이외의, 상처재생 억제, 혈관손상, 간독성, 신장손상, 혈소판응집억제에 의한 출혈량 증가 등의 다양한 부작용을 나타내었기 때문에, 사람에 대하여 안전성이 입증된 혈관 재협착을 억제할 수 있는 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 이번 연구에 의해 밝혀진 오보비톨 유도체 A-8은 동맥경화를 포함하는 심혈관질환의 치료 또는 예방 물질로 이용할 수 있을 거라 사료된다.

**감사의 말씀**

이 논문은 2010학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

**참고문헌**

- 1) Abelson, P. H. : Flaws in risk assessments. *Science* **270**, 215 (1995).
- 2) Lusis, A. J. : Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233 (2000).
- 3) Garas, S. M., Huber, P. and Scott, N. A. : Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. *Pharmacol. Ther.* **92**, 165 (2001).

- 4) Kearney, M., Ann, P., Laura, H., Douglas, W., Vicente, A., Robert, S., Kenneth, R. and Jeffrey, M. I. : Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* **95**, 1998 (1997).
- 5) Schwartz, S. M. : Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J. Clin. Invest.* **99**, 2814 (1997).
- 6) Doevendans, P. A. and Eys, G. : Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovasc. Res.* **54**, 499 (2002).
- 7) Lee, M. S., Yang, J. E., Choi, E. H., In, J. K., Lee, S. Y., Lee, H., Hong, J. T., Lee, H. W., Suh, Y. G. and Jung, J. K. : Synthesis of obovatol derivatives and their preliminary evaluation as antitumor agents. *Bull. Korean Chem. Soc.* **28**, 1601 (2007).
- 8) Ross, R. : The pathogenesis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801 (1993).
- 9) Braun-Dullaeus, R. C., Mann, M. J., Sedding, D. G., Sherwood, S. W., von der Leyen, H. E. and Dzau, V. J. : Cell cycle-dependent regulation of smooth muscle cell activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 845 (2004).