돼지 관상동맥 모형에서 Echinomycin과 소수성 헤파린을 이용한 이중층 코팅 스텐트의 재협착 억제효과

고려대학교 안산병원 내과, ¹전남대학교병원 심장센터, ²메디프렉스 연구소, ³서울대학교 약학대학
임상엽 · 정명호^{1*} · 심두선¹ · 홍영준¹ · 김주한¹ · 안영근¹ · 조정관¹ · 박종춘¹ · 강정채¹ · 문현태² · 변영로³

Inhibitory Effect of Double Coating with Echinomycin and Hydrophobic Heparin in a Porcine Coronary In-Stent Restenosis Model

Sang Yup Lim, Myung Ho Jeong^{1*}, Doo Sun Sim¹, Young Joon Hong¹, Ju Han Kim¹, Youngkeun Ahn¹,
Jeong Gwan Cho¹, Jong Chun Park¹, Jung Chae Kang¹, Hyun Tae Moon² and Youngro Byun³

The Cardiovascular Center of Korea University, Ansan Hospital, Seoul, ¹The Heart Center of Chonnam National University Hospital, Gwangju, Chonnam National University Research Institute of Medical Science, ²Mediplex Corporation and ³College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

Stent thrombosis and in-stent restenosis are still major limitations of coronary stenting. Here, we report on a new type of drug-eluting stent (DES) aimed to prevent restenosis and thrombosis. The DES was prepared by coating a bare metal stent with echinomycin (an anti-proliferative drug) and hydrophobic heparin. The echinomycin-hydrophobic heparin double-coating stents were compared with control stents in a porcine coronary stent restenosis model. Stent overdilation injury (stent : artery=1.1 : 1.0) was compared in porcine coronary arteries between 4 groups: bare stent group (Group I, n=3), 1% echinomycin-heparin coating stent group (Group II, n=3), 5% echinomycin-heparin coating stent group (Group III, n=3), and 10% echinomycin-heparin coating stent group (Group IV, n=3). Follow-up quantitative coronary angiography was performed 4 weeks after the stents were inserted. The histopathologic assessments of the stented porcine coronary arteries were compared between the 4 groups. The neointimal areas of the stented arteries were $4.3 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ in Group I, $5.7 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ in Group II, $3.7 \pm 1.0 \text{ mm}^2$ in Group III, and $2.7 \pm 1.1 \text{ mm}^2$ in Group IV; the neointimal area was significantly larger in Group II than in the other groups ($p < 0.001$). The histopathologic areas of stenosis were $61.4 \pm 18.1\%$ in Group I, $79.8 \pm 24.0\%$ in Group II, $52.0 \pm 18.5\%$ in Group III, and $30.9 \pm 14.6\%$ in Group IV; the histopathologic area was significantly smaller in Group IV than in the other groups ($p < 0.001$). In conclusion, echinomycin-hydrophobic heparin double-coating stents effectively inhibit neointimal proliferation at a relatively high level.

Key Words: Stents; Restenosis; Thrombosis; Prevention

서 론

관상동맥 스텐트 시술은 풍선 확장술 후에 발생하는 elastic recoil을 억제하여 재협착률을 감소시킬 수 있으나, 스텐트 시술 후 신생내막 증식에 의한 재협착은 아직도 해결되어야 할 문제점으로 남아있다. 최근 약물 부착 스텐트가 개발되어 신생 내막 증식에 의한 재협착을 상당히 줄였으나,^{1,3} 아급성 혈전증과 같은 혈관 합병증이 완전히 해결된 것은 아니며,⁴ sirolimus나 paclitaxel 등의 증식 억제제나 항암제가 코팅된 스텐트에 의한 과민반응이나 세포독성 등에 의한 스텐트 혈전증이 우려되고 있는 실정이다.⁵ 실제로 Sirolimus eluting stent (SES)를 삽입 후 18개월이 경과한 환자가 급사한 후 부검에서 스텐트를 삽입한 동맥의 aneurysmal dilatation과 T림프구와 호산구 매개성의 심한 국소적인 과민반응이 보고된 바 있다.⁶ 이러한 과민반응이나 세포독성들은 스텐트에 코팅된 약물 혹은 polymer에 의한 것으로 생각되며,⁸ DES 삽입 후 내피손상의 회복을 지연시켜 내피화의 장애를 초래하는 것으로 알려져 있다.

이러한 스텐트 혈전증을 극복하기 위하여 여러 가지 약물들을 코팅한 스텐트가 개발되고 있다. 그중 하나인 헤파린은 본래의 항응고 효과와 무관하게 재협착과정의 중요요소인 간질세포의 성장과 분화를 억제하고 세포외액 기질 형성의 억제작용과 평활근 세포증식을 억제하는 작용을 가지고 있다.⁸⁻¹⁰ 본 교실에서도 헤파린 부착 스텐트의 재협착 예방효과에 대하여 동물실험 및 임상연구를 진행한 바 있다.¹¹⁻¹³

본 연구는 돼지 관상동맥 재협착 모형에서 새로운 세포증식억제제인 echinomycin과 항혈전제인 heparin을 이용하여 double layer로 coating 된 Arthos Pico 스텐트를 이용하여 스텐트 재협착 및 아급성 혈전증의 억제효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 돼지 관상동맥 스텐트 재협착 모형 및 스텐트 시술

동물실험은 전남대학교 의과대학 의과학연구소 및 전남대학교병원 임상연구소 윤리위원회의 허가를 받아 실시하였고, 실험동물은 체중이 25~30 kg의 돼지를 사용하였다. 동물사육사는 항온, 항습 시설이 갖추어진 곳으로써 사료 및 수돗물을 공급하였다. 시술 3일 전부터 aspirin (100 mg/day)과 clopidogrel (75 mg/day)을 투여하였다.

실험당일 ketamine 12 mg/kg와 xylazine 8 mg/kg을 근육주하여 전신마취를 유도하였다. 무균상태에서 2% 리도케인으로 목 중앙부에 국소마취를 실시한 후 돼지의 좌측 경동맥을 절개하여 7 French 동맥 유도초를 삽입하였다. 헤파린 (300 U/kg)을 동맥 내로 단일 주사요법으로 투여한 후 7 French의 관상동맥 유도도자를 C-arm (Philips사 BV-25 Gold)의 투시 하에 관상동맥 개구부에 위치시켰다. 실험 중에는 안면 산소마스크를 이용하여 지속적으로 산소를 공급하고, 귀의 정맥을 통하여 식염수를 공급하였다.

총 12마리의 25~35 kg의 암돼지를 대상으로 하여 I군은 control (n=3), II군은 1% echinomycin과 heparin을 코팅한 군(n=3), III군은 5% echinomycin과 heparin을 코팅한 군(n=3), IV군은 10% echinomycin과 heparin을 코팅한 군(n=3)으로 분류한 후, 각각 좌전하행지의 근위부에 3.5×18 mm의 스텐트를 삽입하였다. 스텐트 시술은 관상동맥의 근위부에 스텐트를 위치시키고 8~12기압의 압력으로 참고 혈관 크기보다 1.1배로 혈관이 약간 과확장 되도록 30초간 풍선을 확장시켜 삽입하였다. 스텐트 시술 전후로 관상동맥 조영술을 실시하였고, 저장된 영상을 Philips H5000 DCI program을 이용하여 정량분석을 하였다. 시술 후 경동맥을 절찰한 후 목의 피부를 봉합하였고, 돼지를 사육사로 옮겨 4주동안 관찰하였다. 이 기간 동안 계속 aspirin과 clopidogrel을 투여하였다. 스텐트 시술 4주 후에 추적 관상동맥 조영술을 시행한 후 희생시켜 조직병리검사를 실시하였다.

2. 조직형태 검사

적출한 돼지 심장은 10% 중성 포르말린으로 고정하였고 스텐트 상하부 1 cm까지 관상동맥 절편을 적출하여 혈관을 2~3 mm 간격으로 절단한 후 현미경 시야에서 혈관이 변형되거나 손상되지 않도록 스텐트 filament를 제거하였다.

동맥분절의 절단편은 정량적 조직형태학적 측정을 위하여 Hematoxyline and Eosin 염색을 하였고, 플라스틱에 고정한 후, 합성수지 포매제(methyl methacrylate, MMA)를 사용하여 침투 및 포매를 한 후 염색하였다.

조직형태 검사는 현미경에 부착된 비디오시설과 computerized visual image analysis system인 VISUS 2000 프로그램을 이용하여 스텐트 시술에 참여하지 않은 연구자가 분석하였다. 조직의 형태가 양호한 절편을 대상으로 관상동맥 근위부, 중심부, 원위부의 3부위 이상을 스텐트 시술 혈관의 외탄력층(external elastic lamina, EEL) 면적, 내탄력층(internal elastic lamina, IEL) 면적, 내강(lumen) 면적, 신

Table 1. Quantitative coronary angiographic findings of porcine coronary arteries

	Group I (n=3)	Group II (n=3)	Group III (n=3)	Group IV (n=3)	p value
Baseline (mm)					
Reference diameter	2.9±1.1	3.1±0.6	2.9±0.1	3.1±0.7	0.734
Post-stenting diameter	3.2±0.9	3.2±0.6	3.1±0.7	3.1±1.0	0.812
Four weeks after stenting (mm)					
Target reference diameter	2.7±0.3	2.8±0.3	2.9±0.1	2.9±1.0	0.521
Minimal luminal diameter (mm)	1.4±0.1	0.9±0.2	2.2±0.5	2.4±0.6	<0.001

Table 2. Histopathologic assessment of porcine coronary arteries after 4 weeks of stent implantation

	Group I (n=3)	Group II (n=3)	Group III (n=3)	Group IV (n=3)	p value
Injury score	1.7±0.7	1.6±0.3	1.3±0.5	1.7±0.7	0.445
Lumen area (mm ²)	1.6±0.2	0.6±0.2	3.9±1.5	3.5±1.2	<0.001
IEL area (mm ²)	5.9±1.1	6.3±1.3	6.6±0.5	5.9±2.3	0.502
Neointima area (mm ²)	4.3±1.3	5.7±1.3	3.7±1.0	2.7±1.1	<0.001
Area stenosis (%)	61.4±18.1	79.8±24.0	52.0±18.5	30.9±14.6	<0.001

IEL, internal elastic lamina.

생내막 면적 등을 측정하였다. 스텐트 혈관의 면적 협착 (area stenosis)은 $100 \times (1 - \text{lumen area} / \text{IEL area})$ 의 공식을 이용하여 계산하였다.

3. 통계학적 분석

모든 자료는 평균±표준편차로 표시하였으며, 변수의 비교는 MS Window용 SPSS-PC 12.0 프로그램을 이용하여 unpaired t-test와 chi-square test, ANOVA test로 하였다. p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

실험동물들은 12마리 모두 스텐트 혈전증없이 4주 후까지 생존하였다. 정량적 관상동맥 조영술 결과 풍선손상 전의 최소 내경 면적(minimal luminal diameter, MLD)은 양 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 스텐트 시술 4주 후에는 I군 1.6±0.2 mm, II군 0.6±0.2 mm, III군 2.9±1.5 mm, IV군 3.1±1.2 mm로 II군에서 MLD가 유의하게 적었다($p < 0.001$, Table 1). 조직형태학적 검사에서 세포손상 지수 및 외탄력층 면적은 각 군 간에 유의한 차이가 없었으나, 신생내막 면적은 I군 4.3±1.3 mm², II군 5.7±1.3 mm², III군 3.7±1.0 mm², IV군 2.7±1.1 mm²로서 IV군의 신생내막 면적이 유의하게 적었다($p < 0.001$). 면적협착률은 I군 61.4±18.1%, II군 79.8±24.0%, III군 52.0±18.5 %, IV군

30.9±14.6%로서 IV군의 면적 협착이 유의하게 적었다($p < 0.001$, Table 2, Fig. 1)

고 찰

본 연구는 echinomycin과 소수성 헤파린의 이중 코팅으로 혈전 억제와 재협착 억제의 두 가지 기능을 갖는 약물 방출 스텐트에 관한 연구이다.

약물방출 스텐트는 스텐트 재협착에 있어 신생내막의 증식에 의한 스텐트 재협착을 현저히 감소시킬 수 있는 혁신적인 방법이다. 최초로 임상 연구가 보고된 SES는 임상에서 성공적인 결과를 보였다.^{14,15} 그러나, 항암제나 증식억제제를 코팅한 스텐트들은 과민반응이나 세포독성 등이 문제가 되고 있다.^{5,6}

이러한 문제들을 모두 해결할 수 있는 약물방출 스텐트는 아직 개발되지 않은 상태로 현재까지 약 10여 종류의 약물이 이미 스텐트에 코팅되어 사용 중이거나 테스트 중이며, 국내에서도 지금까지 헤파린, abciximab, carvedilol 등 다양한 종류의 약물방출 스텐트를 개발 중이다.¹⁶⁻²² 그러나 세포증식 억제제와 항혈전제제를 이용하여 double layer로 코팅한 스텐트에 대한 보고는 아직까지 없었다.

헤파린은 항응고 효과와 무관하게 재협착과정의 중요요소인 간질세포의 성장과 분화를 억제하고 세포외액 기질 형성의 억제작용과 평활근 세포증식을 억제하는 작용을 가지고 있다.⁸⁻¹⁰

Fig. 1. Histopathology of pigs coronary arteries 4 weeks after stents implantation, Hematoxyline and eosin stain, (A) Group I: control (bare stent) group, (B) Group II: 1% echinomycin, (C) Group III: 5% echinomycin, (D) Group IV: 10% echinomycin, respectively.

BENESTENT-II 연구에서는 헤파린 부착 Palmaz-Schatz 스텐트를 시술받은 환자에서 급성 및 아급성 스텐트 혈전 형성에 의한 합병증의 발생이 없었으며, 6개월의 추적 관찰에서도 무사고 생존율이 높았고 추적 관상동맥 조영술에서 재협착률도 유의하게 감소하였으며, 출혈의 합병증을 보이지 않았다.²³

Echinomycin은 *Streptomyces echinatus*에서 추출된 강력한 증식억제제이다.²⁴ Echinomycin은 세포 안에서 DNA의 이중나선구조에 부착되어 두 개의 염기쌍 사이에 위치하여 신호전달을 방해하며, 동물 실험에서 혈관 손상을 억제하고 평활근 세포증식을 억제한다고 알려져 있다.^{25,26}

본 연구에서는 돼지 관상동맥 스텐트 재협착 모형에서 대조군인 일반 금속스텐트군에 비하여 echinomycin과 소수성 헤파린의 이중 코팅 스텐트가 농도 의존적으로 신생내막의 증식을 억제함을 보였다. 그러나 10%의 echinomycin coating stent군에서 혈관세포에 대한 독성작용으로 인한 adventitia의 괴사가 일부 관찰되었다. 이러한 세포독성 작용은 저농도의 echinomycin을 코팅한 그룹에서는 관찰되지 않았으나, 고농도에서 관찰되어 향후 약물농도의 조절이 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구의 제한점으로 첫째, 실험동물로 비교적 큰 동물인 돼지를 사용하는 어려움으로 인해 대상 수가 적은 편이었다. 양 군의 손상지수에 차이가 없었으나 약물방출 스텐트 사용군에서 비하여 낮은 면적 협착을 보였으며, 이는 상대적으로 적은 대상 수에 의한 것으로 보인다. 둘째, 동물 모형은 주로 연령이 적은 동물을 이용하여 정상 혈관에 인위적인 손상을 가하여 재협착을 유발한 것이며, 실제 인체 내에서는 스텐트 시술환자에서 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 흡연과 같은 다양한 위험인자가 작용하여 오랜 기간 동안 동맥경화증이 유발되어 혈관 내 동맥경화 죽상반의 파열로 관상동맥 증후군이 발생한 것이며 스텐트 재협착에 관여한다고 알려져 있는 혈관 내 혈전, 염증반응 등이 동물모형과 인체와 차이가 있기 때문이라 생각된다. 또한 동물 모형에서는 주로 4주 간의 관찰기간을 설정하였으나, 환자에서는 스텐트 재협착에 있어서 신생내막의 증식이 발생하는데 주로 6개월의 기간이 요구된다는 점도 중요한 차이점의 하나로 생각된다.

또한 고농도의 echinomycin coating stent에서는 혈관세포에 대한 독성작용이 관찰되어 추후 내막증식은 줄이면서 혈관세포에 대한 독성작용은 나타나지 않는 약물농도의 조절이 필요할 것으로 보인다.

결론적으로 10%의 Echinomycin과 heparin을 double layer로 coating시킨 스텐트는 혈전의 발생이 유발되지 않고 신생내막을 유의하게 억제하였다. 하지만 실험 대상 동물의 수가 적었고 10%의 echinomycin coating stent 군의 일부에서 혈관세포에 대한 독성작용이 관찰되어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

알 림

본 연구는 2006년도 제주대학교 학술연구비 및 중소기업청 진흥연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

References

- Holmes DR Jr, Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, et al. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation* 2004;109:634-40.
- Salam AM, al Suwaidi J, Holmes DR Jr. Drug-eluting coronary stents. *Curr Probl Cardiol* 2006;31:8-119.
- Leon MB, Bakhai A. Drug-eluting stents and glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: combination therapy for the future. *Am Heart J* 2003;146(4 Suppl):S13-7.
- Mintz GS, Tinana A, Hong MK, Lee CW, Kim JJ, Fearnot NE, et al. Impact of preinterventional arterial remodeling on neointimal hyperplasia after implantation of (non-polymer-encapsulated) paclitaxel-coated stents: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the ASian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial (ASPECT). *Circulation* 2003;108:1295-8.
- Nebeker JR, Virmani R, Bennett CL, Hoffman JM, Samore MH, Alvarez J, et al. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:175-81.
- Virmani R, Farb A, Guagliumi G, Kolodgie FD. Drug-eluting stents: caution and concerns for long-term outcome. *Coron Artery Dis* 2004;15:313-8.
- Azarbal B, Currier JW. Allergic reactions after the implantation of drug-eluting stents: is it the pill or the polymer? *J Am Coll Cardiol* 2006;47:182-3.
- Serruys PW, van Hout B, Bonnier H, Legrand V, Garcia E, Macaya C, et al. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). *Lancet* 1998;352:673-81.
- de Scheerder I, Wang K, Wilczek K, Meuleman D, vanAmsterdam R, Vogel G, et al. Experimental study of thrombogenicity and foreign body reaction induced by heparin-coated coronary stents. *Circulation* 1997;95:1549-53.
- Ragosta M, Karve M, Brezynski D, Humphries J, Sanders JM, Sarembock II, et al. Effectiveness of heparin in preventing thrombin generation and thrombin activity in patients undergoing coronary intervention. *Am Heart J* 1999;137:250-7.
- Ahn YK, Jeong MH, Kim JW, Kim SH, Cho JH, Cho JG, et al. Preventive effects of the heparin-coated stent on restenosis in the porcine model. *Catheter Cardiovasc Interv* 1999;48:324-30.
- Park HW, Jeong MH, Jang YS, Kim YR, Kim W, Park WS, et al. The effects of the heparin-coated maximum arterial re-creation(MAC) stent on porcine coronary stent restenosis. *Korean Circ J* 1999;29:498-506.
- Park HW, Jeong MH, Park OY, Kim IS, Choi MJ, Lee SH, et al. The long-term clinical effects of heparin-coated coronary stent. *Korean Circ J* 2002;32:773-780.
- Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002;346:1773-80.
- Abizaid A, Costa MA, Blanchard D, Albertal M, Eltchaninoff H, Guagliumi G, et al. Sirolimus-eluting stents inhibit neointimal hyperplasia in diabetic patients: insights from the RAVEL Trial. *Eur Heart J* 2004;25:107-12.
- Kang WC, Han SH, Ahn TH, Son MS, Son JW, Shin EK. The long-term clinical outcomes of primary PTCA with heparincoated stent in acute myocardial infarction. *Korean Circ J* 2004;34:540-7.
- Park HW, Jeong MH, Park OY, Kim IS, Choi MJ, Lee SH, et al. The Long-term clinical effects of heparin-coated coronary stent. *Korean Circ J* 2002;32:773-80.
- Kim W, Jeong MH, Lim SY, Lee SR, Kim KH, Sohn IS, et al. The first clinical trial of antioxidant, carvedilol-eluting stent in coronary artery diseases. *Korean Circ J* 2006;36:115-20.
- Hong YJ, Jeong MH, Kim W, Lim SY, Lee SH, Hong SN, et al. Effect of abciximab-coated stent on in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries. *Am J Cardiol* 2004;94:1050-4.
- Hong YJ, Jeong MH, Kim W, Lim SY, Hong SN, Lee SH, et al. The effects of abciximab(ReoPro[®])-coated stents on extracellular matrix synthesis and apoptosis. *Korean Circ J* 2005;35:290-301.
- Kim W, Jeong MH, Kim KH, Sohn IS, Hong YJ, Park HW, et al. The clinical results of a platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker (Abciximab: ReoPro[®])-coated stent in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:933-8.
- Lim SY, Bae EH, Jeong MH, Kim JH, Kim JH, Joo SY, et al. The Effect of Alpha Lipoic Acid in Porcine In-Stent Restenosis Model. *Korean Circulation J* 2006;36:495-502.
- Serruys PW, van Hout B, Bonnier H, Legrand V, Garcia E, Macaya C, et al. Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II). *Lancet* 1998;352:673-81.
- Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 2005;65:9047-55.
- Leng F, Chaires JB, Waring MJ. Energetics of echinomycin binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 2003;31:6191-7.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2(neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001;21:3995-4004.