

Rapamycin의 angiogenin 유도성 가토 각막의 혈관신생 억제

권영삼 · 김재찬 · 장광호*¹

중앙대학교 의과대학

*경북대학교 수의과대학

Rapamycin Inhibits Rabbit Corneal Neovascularization Induced by Angiogenin

Young-sam Kwon, Jae-chan Kim and Kwang-ho Jang*¹

College of Medicine, Chung-Ang University

*College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

Abstract : The purpose of this study was to determine whether immunosuppressant, rapamycin could inhibit corneal angiogenesis induced by angiogenin and to evaluate its role by micropocket assay. The rabbit's eye was implanted intrastromally into the superior cornea with pellet for the control group, pellet containing of angiogenin for the angiogenin group, and pellet containing of angiogenin and rapamycin for the rapamycin group. We could observe that the angiogenin induced corneal angiogenesis was inhibited by rapamycin. The score of neovascularization was significantly decreased in the rapamycin group than in the angiogenin group at 7 and 10 days after pellet implantation ($p < 0.05$). Histologically, the cornea treated with rapamycin group also showed much less new vessels than the cornea treated with angiogenin. In conclusion, rapamycin appears to inhibit angiogenin induced angiogenesis in a rabbit corneal micropocket assay and may have therapeutic potential as an antiangiogenic agent.

Key words : rapamycin, rabbit, neovascularization, angiogenin.

서 론

혈관신생은 여러 안과질환에서 시력저하의 중요한 역할을 한다. 그러한 질병으로 신생혈관성 녹내장, 당뇨병성 망막병증, 각막 화상 및 바이러스 감염 등이 있다⁵. 또한 동종 각막이식에서 공여자 각막이 항원에 지속적으로 노출되어 면역 체계가 활성화되면 거부 반응으로 혈관 신생이 나타나 이식에 실패하게 된다. 이와 같은 혈관 신생에는 vascular endothelial growth factor (VEGF)², basic fibroblast growth factor (bFGF)¹, angiogenin¹⁸ 등 여러 인자 들이 관여되며, 이들에 대해 다양한 연구가 이루어져 앞으로 이를 통해 심근경색이나 허혈성 질환에서의 치료 가능성을 높일 수 있을 것이다. 그러나 혈관신생이 폭발적으로 진행되는 종양이나 혈관이 존재하지 않는 각막에서는 반대로 혈관신생의 억제에 관한 연구가 절실히 요구되며, 여러 가지의 억제 물질들이 개발되고 사용되고 있다. Rapamycin은 macrolide계의 항생물질로서 1975년에 *Streptomyces hygroscopicus*에서 발견되었으며²¹ 항진균성³과 면역억제 효과¹⁴가 최근에 발견되었다. 1994년 동종각막이식에서 조직거부반응과 혈관신생을 억제하는 효과가 발견되는 등 안과영역에서의 이용가능성이 높은 약제임이 입증되고 있다¹⁵. 따라서 본 실험에서는 마우스 알칼리 화상 모델의 창상 치유 과정 중 각막 혈관 신생을 저하시킨 이전의 실험 결과를 토대로, 가토에서의

angiogenin 유도에 의한 각막 혈관 신생에 대한 rapamycin의 억제효과를 평가하였다.

재료 및 방법

Recombinant angiogenin의 분리 및 제조

pET11a-bovine angiogenin/E.coli을 LB 배지 (Trypton: Yeast Extract:NaCl = 2:1:1)에 접종하여 37°C 배양 후, isopropyl thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)을 0.1 mM 첨가하여 2~3 시간 배양하였다. 그 후 cell을 원심분리 (6000 rpm, 4°C, 15분)하여 -70°C에 방치하였다. 동결된 cell을 buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10% sucrose containing 2.5 mM PMSF, 100 μg/ml Lysozyme, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA)에 재부유하여 얼음 속에서 45분 동안 방치하였다. 마지막으로 2.5 mM PMSF를 첨가하여 초음파분쇄기나 프렌치 프레스(French pressor)로 cell을 용해시켰다. Cell을 원심분리(17300 g, 25분, 4°C)하고 SDS-PAGE를 실시하여 angiogenin의 발현 상태를 확인하였다. 그 결과 angiogenin은 봉입체로 발현되었다. 그 후 봉입체로 재구성을 수행하였다. 20 mM Tris-HCl, pH 7.6으로 봉입체를 수세하고 7 M guanidine-HCl, pH 7.5 (Containing 100 mM potassium phosphate, 100 mM mercaptoethanol)로 용해시켰다. 용해된 angiogenin을 100 mM NaCl이 포함된 50 mM Tris-HCl, pH 8.5 용액에 희석하였다. 그리고 이것을 4°C 에서 24시간 방치하고 6~8시간 동안 교반하였다. 마지막으로 1 M NaCl

¹Corresponding author.
E-mail : khojang@knu.ac.kr

Table 1. Recombinant angiogenin의 sequence

1	AQDDYRYIHF LTQHYDAKPK GRNDEYCFNM MKNRRLTRPC KDRNTFIHGN KNDIKAICED
61	RNGQPYRGDL RISKSEFQIT ICKHKGGSSR PPCRYGATED SRVVGCEG GLPYHFDESF
121	ITPRH

를 서서히 첨가하였다. 그런 다음 이 시료를 농축하여 C18 reversed-phase HPLC로 분리했다. Recombinant angiogenin의 sequence는 Table 1과 같다.

Corneal Micropocket Assay

Phosphate Buffered Saline (PBS)으로 용해시킨 angiogenin을 동결건조 시킨 후, 100% 에탄올을 첨가하여 1 µg/µl 농도의 angiogenin을 포함한 12% polyhydroxyethylmethacrylate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 용액을 제조하였다. 4 µl 씩 lab film에 분주한 후 clean bench내에서 건조시켜 직경 3 mm의 pellet을 제조하였다. 동일한 방법으로 rapamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 1 µg/µl의 농도로 2 µl 씩 분주하여 pellet을 제조하였다. 실험동물은 2.5~3 kg의 New Zealand White rabbit 15마리를 xylazine (바이엘, 한국) 2 mg/kg과 ketamine hydrochloride (유한양행, 한국) 5 mg/kg로 근육주사하여 전신마취하고, 0.5% proparacaine hydrochloride (Allergan, Inc., Irvine, USA)를 점안한 후 수술 현미경하에서 diamond blade로 12시 방향 각결막 경계 부 내측 2 mm에서 tunnel incision을 가하여 직경 3 mm 크기의 corneal pocket을 기질층에 형성한 후 대조군에는 아무-것도 포함되지 않은 pellet, angiogenin 군에는 4 µg의 angiogenin이 포함된 pellet을 또한 rapamycin 군에는 4 µg의 angiogenin이 포함된 pellet과 2 µg의 rapamycin이 포함된 pellet을 동시에 삽입한 후 0.5% chloramphenicol eye drop (종근당, 한국)과 neomycin-dexamethasone-polymyxin ointment (Alcon Laboratory, Inc., Forth Worth, USA)를 1 일 3회씩 7일동안 처치하였다.

Evaluation of Corneal Angiogenesis

가도 각막의 관찰은 pellet 삽입 후 3일, 7일, 10일, 14일에 xylazine과 ketamin hydrochloride로 전신마취 후 slit lamp (model SM-50F; Takagi, Nakano, Japan)로 혈관신생 정도를 관찰하고 사진을 촬영했다.

혈관신생 평가를 위해서 CCD 카메라와 digital analyzer system이 장착된 image analyzer (CCD TR-900; Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 현상한 슬라이드 사진에서의 혈관의 크기와 길이를 직접 측정했다. 혈관신생 점수는 신 등¹⁸⁾의 방법을 이용하여 Table 2에서 구분한 윤부로부터 자라나온 혈관의 길이에 따른 등급과 혈관의 수를 곱하여 산정했다.

Histologic Examination

Pellet 삽입 후 14일째에 xylazine과 ketamine hydrochloride로 진정시킨 후 이정맥으로 공기를 주입하여 공기색

Table 2. Grade of Neovascularization

Grade of New vessel	New vessel's Length
0	~ 0.3 mm
1	0.4~0.6 mm
2	0.7~0.9 mm
3	1.0~1.9 mm
4	2.0 mm~

전증을 유발, 안락사시켰다. 안구적출술을 실시하여 각막조직을 4% paraformaldehyde에 고정하여 탈수과정을 거쳐, 파라핀 포매 후 4~6 µm로 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직학적 검사를 실시했다.

Statistical Analysis

모든 데이터는 평균과 표준편차로 표시하였다. 각 군의 유의성 검증은 Mann-Whitney U test를 실시하여 p값이 0.05 미만인 경우 유의성을 인정하였다.

결 과

The Score of Corneal Neovascularization

각막 혈관신생은 angiogenin 군에서 2~3일째부터 윤부의 혈관으로부터 시작되었다. 윤부 및 결막의 총혈이 현저하게 증가된 angiogenin 군에 비해 대조군과 rapamycin 군에서는 이러한 소견이 관찰되지 않았다. Pellet 삽입 부위에서의 염증반응, 부종, 혼탁과 같은 증상은 나타나지 않았다. 각막 혈관 신생 점수는 3일째에 대조군, angiogenin 군, rapamycin 군에서 8.20 ± 2.86 , 17.75 ± 4.19 ($p < 0.05$), 6.20 ± 1.92 ($p < 0.05$)로, 7일째는 대조군, angiogenin 군, rapamycin 군에서 10.80 ± 3.56 , 23.25 ± 5.32 ($p < 0.05$), 7.25 ± 2.06 ($p < 0.05$)로, 10일째는 대조군, angiogenin 군, rapamycin 군에서 9.80 ± 3.19 , 26.00 ± 7.62 ($p < 0.05$), 7.75 ± 2.50 ($p < 0.05$)로 각각 나타났다. Angiogenin 군에서 혈관신생 점수는 전실험기간 동안 대조군에 비해 유의성 있게 증가하여 ($p < 0.05$) 10일째에 혈관신생이 최고치를 나타내었고, 그 후 14일째는 혈관신생이 감소하는 경향을 나타내어 10일째의 수치와 유사하였다. Rapamycin 군은 전 실험기간 동안 angiogenin 군에 비해 혈관신생이 유의성 있게 ($p < 0.05$) 감소되었다 (Fig 1 and 2).

Histologic Examination

Angiogenin에 의해 혈관신생의 정도와 분포를 관찰하기 위

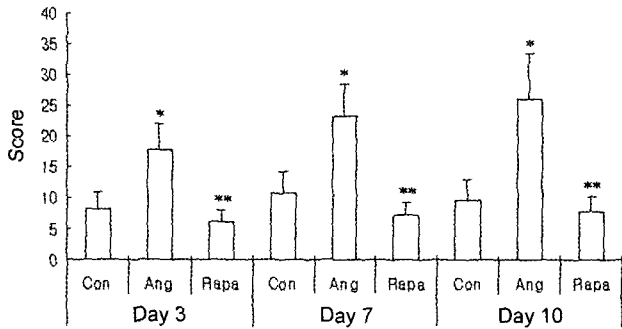


Fig 1. The score of neovascularization was evaluated by number of newly developed vessels multiplied by length of vessels from limbus on 3, 7 and 10 days after pellet implantation. Mean scores of angiogenin group significantly increased when compared with control group during the experimental period. But, it was observed that the score of rapamycin group were significantly less than that of angiogenin group. *: $p < 0.05$ compared with the control group, **: $p < 0.05$ compared with the angiogenin group.

해 각막윤부에서 각막 중심부로 자라나오는 혈관 방향과 수직으로 조직을 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. 조직 채취는 14일째 마지막 slit lamp examination 직후에 실시했다. 대조군에서는 거의 염증반응이나 혈관의 분포

가 관찰되지 않았고, angiogenin 군에서는 각막 실질에 수많은 크고 작은 혈관분포가 관찰되었으나, 염증세포나 각막의 부종은 관찰되지 않았다. Rapamycin 군에서도 또한 염증이나 부종의 소견은 없었으나, angiogenin 군에 비해 현저하게 혈관이 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 3).

고찰

각막의 혈관신생은 창상이나 혼탁과 비정상적인 치유로 인한 시력 저하를 초래하는 안질환 등에 의해서 발생한다⁵. 이것은 또한 각막동종이식시에 공여각막이 항원으로서 면역계에 노출되어 나타나는 이식거부반응에서 나타난다⁶. 그러므로, 혈관신생 억제능과 면역억제효과를 동시에 가지는 약제인 rapamycin을 본 연구의 가토 corneal micropocket assay를 통해서 그 효과를 알아보았다.

Rapamycin은 1975년 동부 아일랜드의 토양에서 처음 분리되었고, streptomycete *Streptomyces hygroscopicus*에서 생성된다². 그 후 *Candida albicans*에 특히 효과적인 항균능이 발견되었고³, 1980년대 후반에 tacrolimus와 구조적 유사성 때문에 면역억제제로서 재조명되었다. 여러동물모델에서 동종장기이식의 거부반응을 억제했다는 연구결과가 1980년대 말에서 1990년대 초에 보고되기 시작되었다⁴. 안과 영역에서는 1994년 Olsen 등¹⁵에 의한 랫트에서의 각막 동종 이

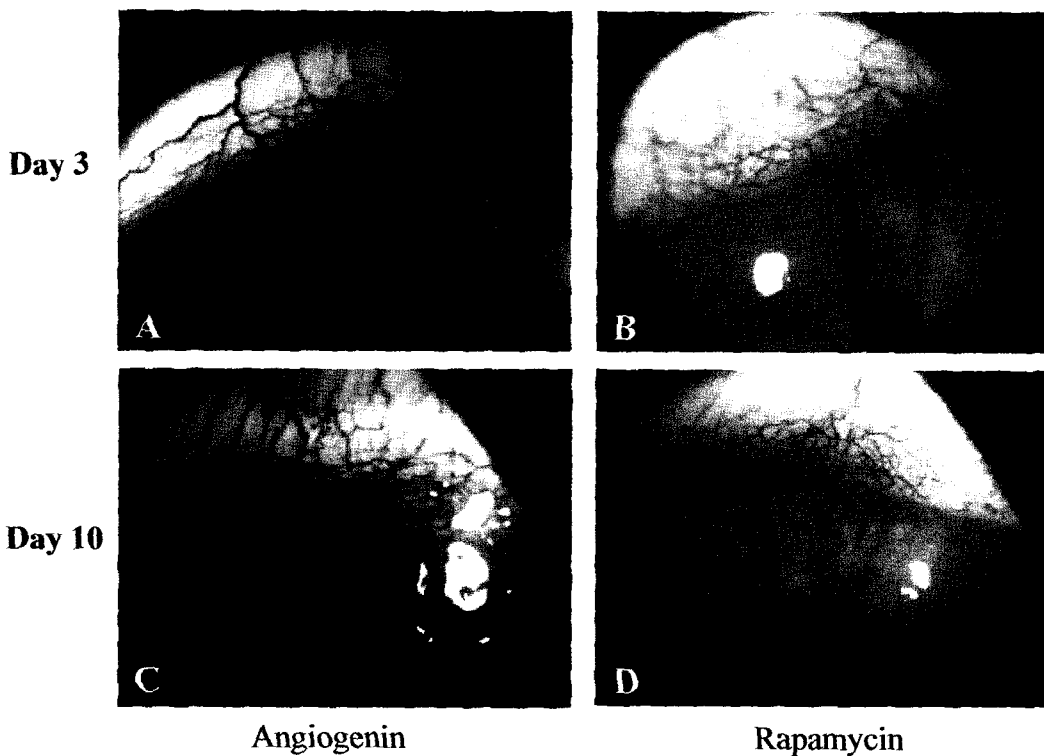


Fig 2. Slit lamp photographs of rabbit corneas 3, and 10 days after pellet implantation. Inhibition of angiogenin induced rabbit corneal angiogenesis by rapamycin. A: Rabbit cornea of angiogenin group on day 3 after implantation. B: Rabbit cornea of rapamycin group on day 3 after implantation. C: Rabbit cornea of angiogenin group on day 10 after implantation. D: Rabbit cornea of rapamycin group on day 10 after implantation. $\times 30$

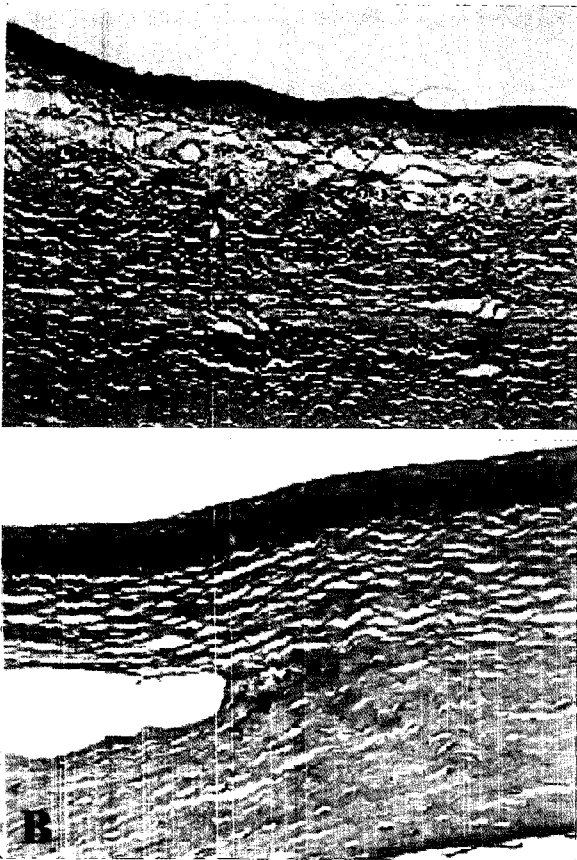


Fig 3. Histological photographs of rabbit cornea on day 14 after pellet implantation. The number of new vessels (arrow) decreased in the rapamycin group. A: Angiogen group, B: Rapamycin group. $\times 200$

식 후 rapamycin이 이식거부반응과 각막혈관신생을 억제한다는 연구결과가 발표되었다.

Angiogenin은 닭 배아의 양요막(Chorioallantoic membrane)에서 혈관신생 유도능을 가지며¹⁷, 또한 각막과 토끼 슬관절의 반달관¹¹에 혈관 형성을 유도한다. 그 작용기전은 기저막과 세포외기질을 분해하는 프로테아제를 활성화시키고⁷, 혈관 내피 세포의 유착¹⁹과 침투⁷를 촉진하여, 혈관세포의 tubule을 형성함으로써 혈관 신생을 촉진한다. Angiogenin과 유사한 혈관 생성 촉진 물질들로는 VEGF², bFGF¹, IL-2¹², IL-8¹³ 등이 알려져 있다. 이러한 물질들의 연구는 주로 심장 및 백관계에서의 허혈성 질환의 치료를 목적으로 하고 있다. 이와 반대로, 종양이나 혈관의 분포가 없는 각막에서는 혈관의 발생 및 성장을 억제함으로써 종양의 전이를 억제하고 각막의 투명성을 유지하기 위한 연구가 행해지고 있다.

본 연구는 백색 가토 각막에서의 angiogenin의 유도에 의한 혈관 신생을 rapamycin이 억제한다는 사실을 직접적으로 증명한 것이다. 실험에 사용된 angiogenin의 용량은 신 등¹⁸이 사용한 4 μ g을 적용하였으며, rapamycin은 corneal pocket assay를 본 연구에서 처음 실시하는 것으로서 예비실

험을 통하여 결정하였다. 또한, 본 저자들은 rapamycin이 혈관내피세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 세포 독성을 나타내지 않는 농도에서 내피세포의 bFGF에 의한 이주 촉진을 강하게 억제하는 것을 관찰하였다. 이러한 혈관내피세포의 이주와 증식 억제는 rapamycin이 FK506 binding protein 12 (FKBP-12)와 결합하여 그 다음 신호인 rapamycin의 target을 억제함에 기인하며 *in vivo* 실험에서는 마우스 각막 알칼리 화상 후 발생하는 혈관신생을 rapamycin이 감소시킨다는 것을 관찰 하였다. 이는 5-fluorouracil과 mitomycin C와 같은 약제에 비해 rapamycin이 독성이 적고, 유효 용량이 작으며, 효능이 좋다는 이전의 연구들^{9,10,22}과 유사한 결과이다. 면역억제제인 cyclosporin A에 의한 간, 신장 및 신경독성에 관여되는 calcineurin system에 rapamycin이 작용하지 않는다는 연구결과도 보고되었다^{16,20}. 이상의 연구 결과를 배경으로 본 실험에서 rapamycin이 angiogenin 유도에 의한 각막혈관신생을 억제한다는 것을 육안적, 조직학적 검사를 통해 확인하였다.

따라서, rapamycin은 각막혈관신생과 연관되는 각막 질환, 혈관신생에 의해 증식하는 종양 및 장기 이식 등의 치료제로서의 이용 가능성이 높은 약제라고 사료되며, 이에 대한 실제 임상 이용에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

결 론

백색가토에서 angiogenin 유도성 각막혈관신생을 rapamycin이 억제능을 육안적 그리고 조직학적으로 확인하였다. 따라서 rapamycin의 안질환 및 각막 이식 후 면역거부 반응에 의한 각막혈관신생에서의 치료제로서 사용 가능성에 대한 기반을 토대로 실용화를 위한 구체적 연구를 진행할 계획이다.

참 고 문 헌

1. Adamis AP, Meklir B, Joyce NC. In situ injury-induced release of basic-fibroblast growth factor from corneal epithelial cells. *Am J Pathol* 1991; 139: 961-967.
2. Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 18-22.
3. Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* 1978; 31: 539-545.
4. Calne RY, Collier DS, Lim S, Pollard SG, Samaan A, White DJ, Thiru S. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 1989; 22: 227
5. Epstein RJ, Stulting RD, Hendricks RL, Harris DM. Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea* 1987; 6: 250-257.
6. Hill JC, Maske R. An animal model for corneal graft rejection in high-risk keratoplasty. *Transplantation* 1988; 46: 26-30.
7. Hu G, Riordan JF, Vallee BL. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 1994; 91: 12096-12100.
8. Jimi S, Ito K, Kohno K, Ono M, Kuwano M, Itagaki Y, Ishikawa H. Modulation by bovine angiogenin of tubular morphogenesis and expression of plasminogen activator in bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 476-483.
 9. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 263-267.
 10. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Smith MF, McGorray S. Effects of intraoperative 5-fluorouracil or mitomycin C on glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1993; 100: 367-372.
 11. King TV, Vallee BL. Neovascularisation of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73: 587-590.
 12. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-1801.
 13. Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 405-407.
 14. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977; 55: 48-51.
 15. Olsen TW, Benegas NM, Joplin AC, Evangelista T, Mindrup EA, Holland EJ. Rapamycin inhibits corneal allograft rejection and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1471-1475.
 16. Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ. Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp Nephrol* 1994; 2: 324-333.
 17. Schott RJ, Morrow LA. Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1155-1161.
 18. Shin SH, Kim JC, Chang SI, Lee H, Chung SI. Recombinant kringle 1-3 of plasminogen inhibits rabbit corneal angiogenesis induced by angiogenin. *Cornea* 2000; 19: 212-217.
 19. Soncin F. Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2232-2236.
 20. Sturrock ND, Lang CC, Struthers AD. Cyclosporin-induced nephrotoxicity and hypertension. *Br J Hosp Med* 1992; 48: 483-485.
 21. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975; 28: 721-726.
 22. Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR. Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology* 1990; 97: 1204-1210.