



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042778
(43) 공개일자 2023년03월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7034 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7034 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2021-0125439
(22) 출원일자 2021년09월23일
심사청구일자 2021년09월23일
- (71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
- (72) 발명자
송희상
광주광역시 남구 봉선로133번길 4, 3동 1004호(봉선동, 금호타운1차)
- 임리진
광주광역시 남구 봉선로133번길 4, 3동 1004호(봉선동, 금호타운1차)
- (74) 대리인
특허법인리체

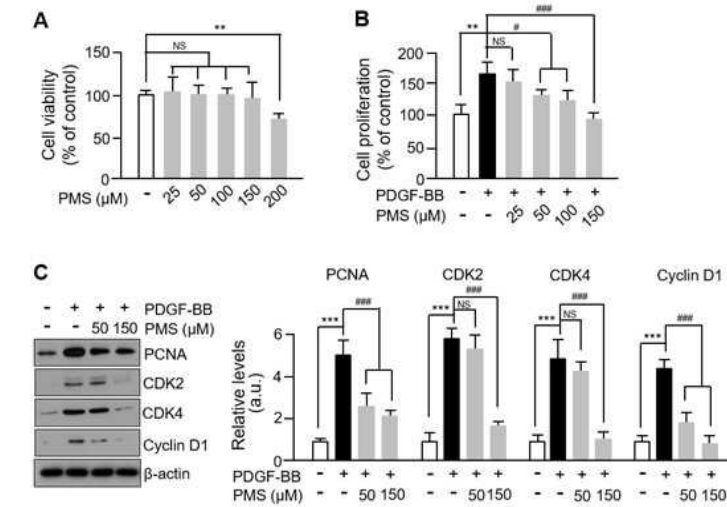
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 혈관 평활근세포 관련 심혈관질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 플란타마조사이드를 포함하는 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 MMP 발현 및 활성 억제를 매개로 하여 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제하여 동맥경화증을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711139811
과제번호	2020R1A2C1102726
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	허혈/재관류로 인한 심근손상에서 LRP6의 독립적 심근세포 보호 기전 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

플란타마조사이드(Plantamajoside)를 포함하는 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 폐동맥 고혈압, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 선천성 심장질환증, 고혈압성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 동맥경화증 및 아테롬성 동맥경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 조성물.

청구항 3

플란타마조사이드(Plantamajoside)를 포함하는 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 폐동맥 고혈압, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 선천성 심장질환증, 고혈압성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 건강기능식품.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 동맥경화증 및 아테롬성 동맥경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플란타마조사이드(Plantamajoside)를 포함하는 혈관 평활근세포의 이동 및 증식을 억제하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 동맥경화증 (atherosclerosis)은 심혈관계 질환의 주요 원인으로 최근 20~30년간 급격한 사회적, 경제적 발전에 따른 서구화된 생활 방식 등에 의해 발병률이 급격히 증가하고 있으므로 이에 대한 병인, 기전 및 치료에 관한 연구의 중요성이 점차 증대되고 있다.

[0004] 동맥경화증은 혈관 내피세포의 산화적 손상으로부터 시작된 염증반응에 의해 내피세포와 단핵구에서 사이토카인이 분비되고 그에 따른 평활근세포의 혈관 내막 내로의 이동(migration)과 증식을 촉진하며, 그 결과 혈관 내막의 플라그 형성으로 인해 혈행이 저해되는 질환이다.

[0005] 현재까지 개발된 동맥질환에 대한 치료법으로는 약물요법, 유전자 치료법, 관상동맥 풍선 확장술, 스텐트 삽입술(percutaneous transluminal coronary angioplasty and stenting, PTCA) 또는 외과적으로 수술하는 관동맥 우회술(coronary artery bypass graft, CABG)의 혈관 재생술(revascularization therapy) 등이 있으며, 상기

방법 중 혈관 재생술이 많이 이용되고 있다. 그러나 상기 관상동맥 풍선 확장술이나 스텐트 삽입술과 같은 관상 동맥 재생술은 시행 3 내지 6개월 경과 시점에 약 40%의 환자들에서 혈관 재협착(restenosis)이 나타난다는 문제점이 있다.

[0006] 이러한 혈관 재협착은 풍선이 장착된 카테터에 의해 손상된 혈관내피 세포, 활성화된 혈소판 또는 대식세포에서 여러 가지 사이토카인과 성장인자 등이 분비되면서 혈관 평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMCs)의 이동 및 증식이 촉진되고, 이에 따라 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 생성 및 분비가 촉진되어 혈관 내막의 과형성(hyperplasia)이 일어나 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 최근 연구에 따르면 혈관 평활근세포의 이동과 증식이 동맥경화의 형성과 진행에 중요한 과정으로 밝혀져 있다. 구체적으로 동맥경화의 진행 및 형성에 관련된 주요인자 중 기질 금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)는 동맥경화에 관련된 사이토카인에 의해 자극된 대식세포, 혈관내피세포, 평활근세포 등에서 발현되며, 증가된 MMPs의 단백질 분해 활성에 의해 평활근세포 주변의 세포외 기질이 분해되어 세포가 혈관 내막으로 이동하게 된다. 특히, 응집된 혈소판에서 방출되는 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)가 혈관 평활근세포의 세포막에 존재하는 PDGF 수용체와 결합하여 세포를 중막에서 내막으로 이동시키고, 동시에 세포의 증식을 유도하여 혈관 내벽에는 신생 혈관 내막이 형성된다. 이러한 과정은 혈관 내경의 축소와 혈류 장애 등을 유발하여 동맥경화의 초기 반응을 매개한다.

[0008] 또한, PDGF와 PDGF 수용체의 결합은 수용체의 티로신(tyrosine) 잔기에서 인산화가 일어나게 되어 세포 내 PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase)와 MAPKs(mitogen-activated protein kinase)의 신호전달이 활성화 되며, 이는 세포의 증식과 이동을 조절한다.

[0009] 구체적으로, 상기 PI3K의 활성화는 다양한 하위 신호 전달을 활성화시키며, 대표적으로는 PKB(protein kinase B; AKT)를 활성화시킨다. 상기 PKB는 세포의 주기조절과 단백질 합성에 관여하며, 세포 사멸과 증식을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다. 상기 MAPKs는 세포의 이동과 증식을 조절하는 대표적인 신호전달 체계로, 특히 혈관 평활근세포의 이동과 증식을 조절하는 것으로 잘 알려져 있으며, 크게는 p38 MAPK, ERK 1/2(extracellular-regulatory protein kinase) 및 JNK(c-jun N-terminal kinase) 세 가지 신호전달 체계가 존재한다. 따라서 MMPs 의존적 경로와 세포 증식 신호전달경로의 억제는 평활근세포의 이동 및 증식을 저해하여 동맥경화 또는 혈관 재협착을 예방 또는 개선할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국 등록 특허 10-1593307호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 플란타마조사이드(Plantamajoside)를 포함하는 혈관 평활근세포의 이동 및 증식을 억제하는 조성물에 관한 것으로, 혈관 평활근세포 관련 심혈관질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 1. 플란타마조사이드(Plantamajoside)를 포함하는 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 폐동맥 고혈압, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 선천성 심장질환증, 고혈압성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 조성물.

[0015] 2. 위 1에 있어서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 동맥경화증 및 아테롬성 동맥경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 조성물.

[0016] 3. 플란타마조사이드(Plantamajoside)를 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 폐동맥 고혈압, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 선천성 심장질환증, 고혈압성 심장질환증, 뇌졸중 및 말초혈관협착증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 건강기능식품.

[0017] 4. 위 3에 있어서, 상기 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관협착증, 혈관재협착증, 동맥경화증 및 아테롬성 동맥경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 건강기능식품.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 플란타마조사이드를 포함하는 조성물은 MMP 발현 및 활성 억제를 매개로 하여 혈관 평활근세포의 증식 및 이동을 억제하여 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 플란타마조사이드(plantamajoside, PMS) 처리에 따른 VSMC의 생존능, 세포 증식을 확인하고, 관련 인자의 발현 수준을 확인한 결과로서, PMS 처리는 PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC 증식을 억제한다.

도 2는 PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC의 이동에 대한 PMS의 효과를 확인한 결과이다. PDGF-BB에 의해 VSMC의 이동 거리 및 이동한 세포의 수는 증가하며, 이러한 효과는 PMS 처리에 의해 농도-의존적으로 억제된다.

도 3은 PDGF-BB에 의해 유도된 MMP 발현과 활성에 대한 PMS의 억제 효과를 확인한 결과로서, MMP 2, 9 및 13에 대한 단백질, mRNA 수준 및 세포 내 발현 정도를 확인하였다.

도 4는 PMS는 Smad1 전사인자의 조절을 통해 TIMP 발현을 조절함을 확인한 결과로서, PMS 처리에 따른 TIMP 유전자 및 단백질의 발현을 확인하고, 관련 인자의 발현을 확인하였으며, Smad1 전사인자에 의해 조절됨을 확인하기 위해 Smad1-특이적 siRNA-트랜스펙션된 VSMC에서 TIMP 및 MMP의 수준을 확인하였다.

도 5는 PDGF-BB에 의해 유도된 FAK-관련 및 p38 신호 전달 경로에 대한 PMS의 효과를 확인한 결과이다.

도 6은 풍선-손상 쥐의 경동맥에서 신생내막 형성에 대한 PMS의 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 플란타마조사이드를 포함하는 혈관 평활근세포 증식성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[0025] 플란타마조사이드(Plantamajoside)는 질경이(차전초, *Plantago asiatica* L.)에서 분리된 화합물질로서, 이는 LPS에 의해 유발된 급성 폐 손상(ALI) 마우스 모델에 보호 효과뿐 아니라 폐 염증 치료효능 외에도 지방 축적 억제 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

[0026] 혈관 평활근세포 이동 및 증식성 질환은 혈관을 이루는 평활근 세포의 혈관 내로의 이동과 증식에 의해 발생하는 질환을 말하는 것으로, 구체적으로 그 종류는 예를 들면 혈관협착증, 혈관재협착증, 폐동맥 고혈압, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 심부전증, 심근경색증, 협심증, 부정맥증, 선천성 심장질환증, 고혈압성 심장질환증, 뇌졸중 또는 말초혈관협착증일 수 있고, 바람직하게는 혈관협착증, 혈관재협착증, 동맥경화증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 동맥경화증은 혈관 내피세포의 산화적 손상으로부터 시작된 염증반응에 의해 내피세포와 단핵구에서 사이토카인이 분비되고 그에 따른 평활근 세포의 혈관 내막 내의 이동(migration)과 증식을 촉발하며, 그 결과 혈관 내막의 플라그 형성으로 인해 혈행이 저해되는 질병을 말하며, 최근에는 혈관 평활근 세포의 이동과 증식이 동맥경화의 형성과 진행에 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다.

[0028] 용어 "예방"은 상기 혈관 평활근세포 증식성 질환을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 말하며, 용어

"치료"는 혈관 평활근세포 증식성 질환 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.

- [0029] 상기 개체는 혈관 평활근세포 증식성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태일 수 있고, 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 주사제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있고, 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있는 것으로, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등일 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물 제형은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있으며, 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조될 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물 제형은 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제조될 수 있다.
- [0033] 제제화를 위한 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 충전제, 향응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물 투여 경로는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식이 선택될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 mg 내지 1000mg/kg 또는 0.001mg 내지 500mg/kg으로 투여될 수 있다. 본 발명 약학 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 또한, 본 발명은 플란타마조사이드(Plantamajoside)를 포함하는 혈관 평활근세포 증식성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.
- [0040] 혈관 평활근세포 증식성 질환은 상기 기술한 바와 같다.
- [0041] 본 발명의 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형화될 수 있다.
- [0042] 건강기능식품은 예컨대, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강기능성 식품류일 수 있다.
- [0043] 건강기능식품에 포함될 수 있는 첨가제는 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제(치즈, 초콜렛 등), 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0044] 천연 탄수화물은 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디

오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0045] 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제, 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 등을 더 포함할 수 있다.

[0046] 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제는 이에 한정되는 것은 아니나, 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0047] 본 발명 건강기능식품을 제제화할 경우에는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예

[0052] 1. 실험방법

[0053] (1) VSMC 분리

[0054] 쥐의 대동맥 VSMC 분리 및 풍선-손상 경동맥 쥐 모델을 포함한 모든 동물 실험은 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 국제 가이드에 따라 수행되었다. 프로토콜은 조선대학교 의과대학 동물연구위원회 (Protocol No. CIACUC2020-S0032)의 승인을 받았다.

[0055] 쥐의 대동맥 VSMC는 이전에 설명한 대로(Lim et al., 2015) 6주 된 Sprague-Dawley 쥐에서 분리되었다. 간단히 말해서, 제거된 대동맥은 결합 조직과 혈전으로부터 분리되고 그 다음 절단되어, I형 콜라게나아제 (1 mg/mL, Sigma)와 엘라스타제 (0.5 mg/ mL)의 혼합물을 포함하는 튜브로 옮겨지고 37 °C에서 30분 동안 배양되었다. 대동맥은 100mm 세포 배양 접시에 놓여, 외막(adventitia)은 양안 현미경 하 포셉으로 제거되었다. 각 대동맥 조각은 5mL의 효소 해리 혼합물 (콜라게나아제 및 엘라스타제 포함)을 튜브로 옮겨지고, 튜브는 37 °C에서 2시간 동안 배양되었다. 조직의 분산은 느린 피펫팅으로 수행되었다. 현탁액을 원심분리하고 (5분 동안 1600 xg), 얻어진 펠렛은 10% FBS (WeIGENE)이 포함된 DMEM에 재현탁시켰다. 이 해리 단계는 조직이 완전히 분산될 때까지 반복되었다. 세포는 95% 공기와 5% CO₂의 가습의 대기가 있는 인큐베이터 내 37 °C에서 배양되었으며 이 연구에서 최대 10회 계대에 사용되었다.

[0057] (2) 풍선-손상 모델

[0058] Sprague-Dawley 쥐 (6~7주령, 체중 200±50g)에 20mg/kg의 Zoletil 50®(Virbac Corp.) 및 10mg/kg의 Rompun® (Bayer Corp.)을 근육 주사하여 마취시켰다.

[0059] 목의 정중선 절개 후 좌측 외경동맥을 노출시킨 후 총경동맥의 대동맥 출구에 삽입한 2-F 풍선 카테터 (Edwards Lifesciences Corp.)를 사용하여 손상시킨 후, 팽창과 수축으로 동맥을 확장하고 내피세포를 박피하였다. 이러한 과정을 3 또는 4회 반복한 후, 카테터를 제거하고, 외경동맥을 결찰하고 상처를 봉합하였다. PMS (3.3 mg/kg)는 풍선 손상 1일 전 및 손상 후 2일마다 시험 동물에게 7회 복강내 주사하였다. PMS 주입과 같은 날에 동일한 부피의 PBS를 sham 그룹에 주입했다.

[0061] (3) 세포 증식 및 이동 분석

[0062] 96웰 플레이트의 세포를 지정된 농도의 PDGF-BB 및 PMS로 처리한 다음, 제조업체의 지침에 따라 BrdU 세포 증식

비색 ELISA 시스템 (Promega)을 사용하여 24시간 후 증식을 평가했다.

[0063] 세포 이동은 3차원 Boyden 챔버 분석 및 2차원 상처 치유 분석에 의해 조사되었다. Boyden 챔버 분석의 경우, 세포 ($5 \times 10^3/100 \mu\text{l}$)를 하부 표면에 1% 젤라틴 용액으로 코팅된 트랜스웰 챔버의 상부 구획에 배치하였다. PDGF-BB 또는 PMS는 각각의 하부 또는 상부 구획에 지정된 농도로 처리되었다. 37 °C에서 8시간 동안 배양한 후, 필터의 아래쪽 표면에 있는 세포는 고정 및 염색되고, 5개의 무작위 영역/막을 x200 배율로 계산했다. 상처 치유 분석을 위해, 세포 스크래퍼를 사용하여 직사각형 손상(lesion)을 만든 다음, 세포는 지정된 시간 동안 지정된 농도의 PDGF-BB 또는 PMS로 배양되었다. 손상의 가장자리에서 가장 많이 이동된 세포까지의 거리를 측정하고, 거리의 평균값을 각 배양접시에서 세포의 이동도로 간주하였다.

[0065] (4) 지모그래피(Zymography)

[0066] 대조군 및 시험 배지의 분주량(aliquots)은 0.8%의 젤라틴을 함유하는 10% SDS-폴리아크릴아미드 젤 상에서 전기영동하였다. 젤은 SDS를 제거하기 위해 2.5% Triton X-100으로 1시간 동안 워싱하고, DW로 1시간 동안 워싱한 다음 현상(developing) 완충액 (젤라틴 배양 완충액: 50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 5 mM CaCl_2 , 1 M ZnCl_2 , 0.02% 아지드화나트륨, 1% Triton X-100)에서 48시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 48시간 후, 젤을 1시간 이상 동안 1% 쿠마시 블루로 염색한 다음, 밴드와 파란색 배경 사이에 좋은 해상도가 될 때까지 탈색하였다. 젤을 촬영하고 Image J 소프트웨어 (NIH)를 사용하여 효소 분해 영역을 정량화하였다.

[0068] (5) 전사인자 (TF) 분석

[0069] 전사 인자의 활성은 제조사의 프로토콜에 따라 TF 활성 프로파일 플레이트 키트 (Signosis, Inc.)를 사용하여 조사되었다. VSMC를 60mm 플레이트에 4.0×10^5 cells/mL로 시딩하고 24시간 동안 기아 상태로 만들어, 그 세포를 1시간 동안 PMS로 전처리한 다음 20ng/mL PDGF-BB로 추가 3시간 동안 처리하였다. 먼저, 핵 추출 키트 (Signosis, Inc.)를 사용하여 배양된 세포에서 핵만을 추출하였다. 그 다음, 추출된 핵 단백질을 10ug을 비오틴-표지된 프로브와 함께 배양하여 TF/DNA 복합체를 형성했다. 워싱 및 용출 후, 96웰 플레이트에서 혼성화를 수행하였고, HRP (Streptavidin-horseradish peroxidase)를 첨가하여 마이크로플레이트 루미노미터(Microlumat Plus)로 발광도를 측정하였다.

[0071] (6) 세포 면역염색 (Immunocytochemistry)

[0072] 커버글라스를 24웰 플레이트에 놓고, 세포를 DMEM(10% FBS)에 2×10^4 /웰로 시딩하여 37° C에서 24시간 동안 배양하였다. 이를 24시간 동안 기아 배지로 교체하고, 세포를 6시간 동안 PMS로 전처리한 후 20ng/mL PDGF-BB로 추가 24시간 동안 처리하였다. 면역형광 표지의 경우, 세포를 차가운 1X PBS로 세척하고 PBS 내 차가운 2% 파라포름알데히드로 실온에서 15분 동안 고정하였다. PBS로 3회 워싱하고, 각각, PBS 내 0.5% Triton-X-100을 사용하거나 사용하지 않고 실온에서 15분 동안 투과화(permeabilized) 또는 비-투과화시켰다. 1차 항체를 2% BSA이 포함된 PBS에서 밤새 4° C 배양한 다음, 2차 항체를 암실 내 실온에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 워싱한 후, 세포 핵을 0.2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (Sigma-Aldrich)로 염색하고 커버글라스를 슬라이드에 마운팅하였다. 마지막으로, 세포는 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Fluoview FV1000, Olympus)으로 시각화되었다.

[0074] (7) 형태 분석

[0075] 양측 경동맥은 수술 14일 후 절제하여, 4% 파라포름알데히드(PFA)로 고정하였다. 양측 경동맥은 H&E 염색 및 조직면역 염색(IHC)에 의한 신생내막 형성의 형태학적 분석을 위해 파라핀에 포매되었다. 내강 영역(LA), 내막 영역(IA) 및 내측 영역(MA)을 포함한, 혈관층의 단면적은 Image J 소프트웨어(NIH)를 사용하여 최소 3개의 다른 섹션(근위, 중간 및 원위)에서 정량화되었다.

[0077] (8) 조직 면역염색 (Immunohistochemistry)

[0078] 파라핀에 포매된 절편은 항원 복원(antigen retrieval) 전에 자일렌 및 등급 에탄올 시리즈를 통해 탈파라핀화 및 재수화되었다. 절편을 TBS 내 0.025% TritonX-100으로 5분간 두 번 워싱하고, 실온에서 2시간 동안 10% 정상 염소 혈청으로 블로킹한 다음, 예를 들어 기질 단백질분해효소의 조직 억제제 1 (TIMP1), TIMP2, MMP2, MMP9 및 MMP13 (Abcam, Cambridge, MA, US, 1:50로 희석), p-FAK(Y397) 및 p-FAK(Y925)(Cell Signaling, Danvers, MA, 미국, 1:50로 희석)와 같은 1차 항체로 4 °C에서 밤새 배양하였다. 절편을 TBS 내 0.025% TritonX-100으로 5분 동안 두 번 워싱하고 암실 내 실온에서 1시간 동안 2차 항체로 염색하였다. 핵은 0.2 µg/ml DAPI(Sigma-Aldrich)로 1분 동안 염색되었다. 마지막으로, 세포는 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Fluoview FV1000, Olympus)으로 시각화되었다.

[0080] (9) 면역블롯 분석

[0081] 경동맥의 조직을 차가운 PBS로 워싱하고, 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 및 프로테아제 억제제 각 테일을 함유하는 RIPA 완충액에서 해리시켰다. 단백질 농도는 Bradford 단백질 분석 키트(Bio-Rad)를 사용하여 측정되었고, 동일한 양의 단백질은 10% 젤에서 SDS-PAGE로 분리하고 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(Bio-Rad)으로 트랜스퍼하였다. 비-특이적 결합을 방지하기 위해 5% 탈지유를 함유한 TBS-T (Tris-buffered saline +0.1% Tween 20)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양한 후, 막은 4 °C에서 1차 항체와 함께 밤새 배양되었다. 1차 항체는 블로킹 완충액에서 다음 희석 비율로 사용되었다: MMP2(1:4000), MMP9(1:1000), TIMP1(1:1000), TIMP2(1:2000), Talin(1:1000) 및 인테그린 β1(1:10000)(Abcam), FAK(1:1000), p-FAK(Y397)(1:500), p-FAK(Y925)(1:500), Src(1:4000), p-Src(1:2000), Akt(1:4000), p-Akt(1:2000), ERK(1:3000), p-ERK(1:5000), P38(1:2000), p-P38(1:1000), PCNA(1:2000) 및 CDK2(1:1000)(Cell Signaling), MMP13(Novus, 1:1000), Paxillin(Millipore, Burlington, 1:2000), Vinculin(Santa cruz, 1:1000), Smad1(Abcam, 1:1000) 및 β-액틴 (Sigma, 1:10,000). 막을 5분 동안 TBS-T로 5회 워싱하고 적절한 2차 항체와 함께 실온에서 1.5시간 동안 배양 하였다. 광범위한(extensive) 워싱 후, ECL 시약 (BIONOTE, Animal Genetics Inc.)이 적용되어 밴드가 감지되었다.

[0083] (10) 정량적 실시간 PCR

[0084] 총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 Trizol 시약(QIAGEN,)을 사용하여 분리되었다. Total RNA는 HelixCript™ First-Strand cDNA 합성 키트(NanoHelix)를 이용하여 역전사되었다. RealHelix™ qPCR 키트(NanoHelix)를 이용한 Real-time qPCR은 Applied Rotor-Gene 3000TM(Corbett Research, Sydney, AU)을 이용하여 SYBR Green 방법으로 수행되었다. 실험 및 대조군 샘플에서 관심 유전자의 전사 수준의 비율은 해당 샘플의 GAPDH 전사 수준의 비율과 비교되었다. qPCR에 대한 프라이머 서열은 표 1 (real-time qPCR에 사용되는 프라이머 서열)에 나열하였다.

표 1

[0086]

서열 번호	유전자	프라이머 서열
1	β-actin	정방향: 5'- AGG GAA ATC GTG CGT GAC -3'
2		역방향: 5'- AGG GAA ATC GTG CGT GAC -3'
3	MMP2	정방향: 5'- GCG ATG GCA AGG TGT GGT GT -3'
4		역방향: 5'- GTA CCA GTG TCA GTA TCA GC -3'
5	MMP9	정방향: 5'- AGG CGC CGT GGT CCC CAC TTA CTT -3'
6		역방향: 5'- GCA GGG TTT GCC GTC TCC GTT GCC -3'
7	MMP13	정방향: 5'- TCG CAT TGT GAG AGT CAT GCC AAC A -3'
8		역방향: 5'- TGT GGT TCC AGC CAC GCA TAG TCA -3'
9	TIMP1	정방향: 5'- ATC GCG GGC CGT TTA AGG A -3'
10		역방향: 5'- CAA GGG ATG GCT GAA CAG GGA -3'
11	TIMP2	정방향: 5'- ATC TCC TCC CCG GAT GAG TG -3'
12		역방향: 5'- GGC AAA GAA CTT GGC CTG G -3'

[0087] (11) 통계 분석

[0088] 적어도 3중 샘플의 모든 정량화 데이터는 GraphPad Prism 8.0 소프트웨어(La Jolla)로 분석되었다. 데이터는 평균±SD로 표시된다. 두 그룹 간의 통계적 비교는 스튜던트 t-검정을 사용하여 수행되었고, F 통계량이 유의할 때 일원 ANOVA에 이어 Bonferroni 사후 검정을 사용하여 여러 그룹 간의 통계적 비교가 수행되었다. 양측 P<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0090] 2. 실험 결과

[0091] (1) PMS는 PDGF-BB에 의해 유발된 VSMC 증식을 억제한다.

[0092] PMS의 세포 독성을 측정하기 위해 (도 1A), VSMC는 24시간 동안 증가하는 농도의 PMS로 처리되었다. 도 1B에 표시된 바와 같이, 25-150 μ M PMS 처리는 VSMC의 생존력에 어떠한 변화도 유발하지 않았다; 그러나 200 μ M 농도에서, PMS는 VSMC에 상당한 세포독성을 유도하였다.

[0093] 또한, PDGF-BB 처리에 의해 유도된 증가된 증식이 용량-의존적 방식으로 50 μ M 이상의 농도에서 PMS에 의해 유의하게 억제됨을 관찰하였다 (도 1C). 따라서 후속 실험을 위해 PMS의 50 및 150 μ M 농도를 선택했다. 추가적으로, 세포증식과 연관성이 높고, VSMC에서 PDGF-BB에 의해 상향 조절되는 것으로 알려져 있는 (Li et al., 2020; Pan et al., 2007), 증식 세포 핵 항원 (PCNA), 사이클린-의존성 키나아제2 (CDK2), CDK4 및 사이클린 D1의 변경된 발현 수준을 평가하였다. 조사된 단백질들의 발현 수준은 PDGF-BB에 의해 현저하게 증가한다는 것을 관찰했으며, 이 효과는 PMS 처리에 의해 용량-의존적 방식으로 유의하게 억제되었다 (도 1D). 이러한 결과는 PMS가 세포주기 조절 단백질의 발현을 억제함으로써 VSMC의 증식을 억제함을 시사한다.

[0094] PMS는 PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC 증식을 억제한다 (도 1. A) PMS의 세포독성은 MTT assay로 평가함. 혈청-결핍 VSMC는 24시간 동안 PMS로 (25-200 μ M)로 처리됨; B) VSMC 증식에 대한 PMS의 효과는 BrdU 결합 (incorporation) 분석을 사용하여 평가됨. 혈청-결핍 VSMC를 6시간 동안 PMS (25-200 μ M)로 처리한 다음, 20ng/mL의 PDGF-BB와 함께 24시간 동안 배양; C) Western blotting을 이용하여 PCNA, CDK2, CDK4, cyclin D1의 변화된 수치로부터 VSMC 증식을 확인. 밴드 밀도는 β -액틴 밴드 밀도로 정규화. 표시된 젤 이미지는 최소 3번의 독립적인 실험에서 얻은 이미지를 나타냄. 평균 $\pm$ SD. **p < 0.01 및 ***p < 0.001 PDGF-BB vs. 대조군; #p < 0.05 및 ###p < 0.001 PMS vs. PDGF-BB 단독; NS, 유의미하지 않음).

[0096] (2) PMS는 PDGF-BB에 의해 유발된 VSMC 이동을 억제한다.

[0097] 기존 연구에 따르면 PDGF-BB는 VSMC의 이동과 증식을 유도하여 경동맥 손상 동물 모델에서 신생내막 증식을 유도한다. PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC 이동에 대한 PMS의 영향을 조사하기 위해, 상처 치유 및 트랜스웰 분석을 수행하였다. 상처 치유 분석 결과는 비처리 대조군 세포와 비교하여 PDGF-BB가 VSMC의 이동을 유의하게 향상시켰고, PMS는 유의하게 이러한 효과를 무효화하였음을 보여주었다 (도 2A). 이러한 결과를 검증하기 위해, Boyden 챔버 분석을 수행하였고, PMS가 PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC 이동을 용량-의존적 방식으로 유의하게 억제한다는 것을 확인하였다 (도 2B). 따라서, PMS는 PDGF-BB에 의해 자극된 VSMC의 이동을 약화시킨다.

[0098] PMS는 PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC 이동을 억제한다 (도 2. A) VSMC 이동에 대한 PMS의 효과는 상처 치유 분석에 의해 측정됨. 상처 치유 분석의 이미지는 스크래칭 시점 및 스크래칭 후 48시간에 찍은 5번의 독립적인 실험의 대표 이미지임. 검은 선은 시간 0의 스크래칭 포인트를 나타내고 검은 화살표는 가장 많이 이동한 세포의 거리를 나타냄. 이동 거리는 Image J 소프트웨어를 사용하여 측정됨; B) 이동한 세포 수를 보여주는 Boyden 챔버 분석. 트랜스웰 분석의 이미지는 시딩 후 12시간에 찍은 5번의 독립적인 실험의 대표 이미지임. 평균 $\pm$ SD. **p < 0.01 및 ***p < 0.001 PDGF-BB vs. 대조군; #p < 0.05 및 ###p < 0.001 PMS vs. PDGF-BB 단독).

[0100] (3) PMS는 VSMC에서 PDGF-BB에 의해 유발된 MMP 발현 및 활성을 억제한다,

[0101] MMP는 종양 및 VSMC를 포함한 다양한 세포 유형의 이동 및 침입과 밀접한 관련이 있고, 혈관의 세포외 기질 (ECM)에서 MMP2 및 MMP9의 효소 분해 활성은 VSMC 이동을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는, 예상대

로 PDGF-BB가 MMP2 및 MMP9의 발현 수준을 유의하게 증가시켰고, 이 효과는 PMS 처리에 의해 성공적으로 제거되었다 (도 3A). MMP13의 수치도 PDGF-BB 처리 후 증가하였고, PMS는 증가된 MMP13 수치를 유의하게 억제할 수 있었다 (도 3A). PDGF-BB에 의해 유도된 VSMC에서 PMS의 MMP 발현 억제를 확인하기 위해, PDGF-BB/PMS-처리 VSMC에서 MMP의 mRNA 수준을 조사하였다.

[0102] 면역 블로팅 결과와 일치하게, PDGF-BB에 의해 증가된 MMP2, MMP9 및 MMP13의 mRNA 수준은 PMS에 의해 유의하게 억제되었다 (도 3B). 두 경우 모두에서, MMP7의 수준은 변하지 않았으며 (데이터는 미표시), 이는 PMS가 PDGF-BB에 의해 유도된 MMP 발현을 특이적으로 억제한다는 것을 시사한다. 또한, PDGF-BB/PMS-처리 VSMC에서 비투과 조건하 면역형광 염색 및 MMP 활성 분석을 수행하여 효소 분해 활성의 변경을 조사했다. 도 3C에 나타난 바와 같이, MMP2, MMP9 및 MMP13의 세포의 수준은 비처리 대조군 세포에 비해 PDGF-BB로 자극된 VSMC에서 증가하였다. 그러나, PMS 처리는 MMP2, MMP9 및 MMP13의 증가된 발현을 하향 조절하였다. 유사한 결과로, 자이모그래피 분석이 PDGF-BB/PMS-처리 VSMC의 배양 배지에서 관찰되었다 (도 3D). 이러한 결과들은 PMS가 PDGF-BB-유도 VSMC에서 MMP 발현 및 활성을 모두 억제한다는 것을 입증한다.

[0103] PMS는 PDGF-BB에 의해 유도된 MMP 발현과 활성을 억제한다 (도 3. A) MMP 발현에 대한 PMS의 효과. 혈청-결핍 VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음, PDGF-BB (20 ng/mL)에 24시간 동안 노출시킴. 밴드 밀도는 β -액틴 밴드 밀도로 정규화; B) MMP의 mRNA 수준은 RT-qPCR을 사용하여 평가; C) MMP의 세포의 수준은 비투과 조건하 면역세포화학 염색을 사용하여 평가; 및 D) 젤라틴 자이모그래피를 사용하여 평가. 혈청-결핍 VSMC를 6시간 동안 지정된 농도의 PMS로, 그 다음 24시간 동안 20 ng/mL의 PDGF-BB로 처리하여 수집된 배지가 이 분석에 사용됨. 표시된 모든 미지는 최소 3번의 독립적인 실험에서 얻은 이미지를 나타냄. 평균 $\pm$ SD. $^{**}p < 0.01$ 및 $^{***}p < 0.001$ PDGF-BB vs. 대조군; $\#p < 0.05$ 및 $###p < 0.001$ PMS vs. PDGF-BB 단독; NS. 유의미하지 않음).

[0105] (4) PMS는 VSMC에서 Smad1 인자의 조절을 통해 금속 단백질분해효소 (TIMP) 발현의 조직 억제제를 조절한다,

[0106] MMP 활성에 대한 TIMP의 조절 효과가 기존에 알려져 있으므로, PDGF-BB/PMS-처리 VSMC에서 TIMP 수준의 변화를 조사하였다. TIMP1 및 TIMP2의 수준은 PDGF-BB 처리된 세포에서 유의하게 감소되었음을 관찰했지만, PMS를 처리한 경우에는 각각 5배 및 3배 이상(비처리 대조군 세포 대비), 및 10배 이상(PDGF-BB 처리 대비) 발현을 증가시켰다 (도 4A). 비투과 면역세포화학 염색은 TIMP1 및 TIMP2의 세포의 수준이 비처리 대조군 및 PDGF-BB 처리된 세포보다 PMS-처리 VSMC에서 뚜렷하게 더 높다는 것을 보여주었다 (도 4B).

[0107] 또한, 대조군 및 PDGF-BB-처리 세포와 비교하여, PMS-처리 세포에서 TIMP1 및 TIMP2의 mRNA 발현 수준이 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다 (도 4C). TIMP1 및 TIMP2의 mRNA 발현은 비처리 대조군과 비교하여 PDGF-BB 처리 세포에서 유의하게 감소하지 않았다. TIMP 발현 조절에 참여하는 TF를 추가로 조사하기 위해, TF 활성화 프로파일링 분석을 수행하였다. 테스트한 16개 TF 중 활성 단백질 1(AP1), E26 형질전환 특이적 패밀리 1(ETS1), 저산소증 유도 인자(HIF) 및 Smad1은 PDGF-BB 처리된 세포에 비해 PMS-처리 VSMC에서 유의하게 상향 조절되었다. (도 4D).

[0108] TF 활성화에 대한 데이터는 표 2 (PMS에 의한 VSMC의 전사인자 활성 변화)에 제시되었다. Smad1이 TIMP 발현을 조절하는 TF 중 하나라는 증거는 없지만, MMP의 조절 메커니즘에 참여할 수도 있다는 기존의 보고(Lian et al., 2021)에 따라, Smad1이 PMS-처리 VSMC에서 TIMP 조절에 참여하는 핵심 요소라고 가정하였다. 예상한 대로, Smad1의 발현 수준은 PDGF-BB 처리된 VSMC에서 유의하게 감소되었으며, 이는 PMS 처리에 의해 성공적으로 회복되었다.

[0109] 또한, Smad1-특이적 siRNA를 트랜스펙션한 VSMC에서 PMS 처리 후 TIMP1과 TIMP2의 발현 수준이 크게 변하지 않았음을 관찰하였다. 상기 VSMC에서는 PMS가 MMP2, MMP9 및 MMP13의 수준에 영향을 미치지 않음을 관찰할 수 있었다 (도 4E). 이러한 결과는 Smad1이 VSMC에서 PMS-매개 TIMP 발현 조절에 관여하는 조절 TF임을 나타낸다.

[0110] PMS는 Smad1 전사인자의 조절을 통해 TIMP 발현을 조절한다 (도 4. A) TIMP의 발현에 대한 PMS의 효과. 혈청-결핍 VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음, PDGF-BB (20 ng/mL)와 함께 24시간 동안 배양. 밴드 밀도는 β -액틴 밴드 밀도로 정규화; B) TIMP의 세포의 수준은 비투과 조건하에 면역세포화학 염색을 사용하여 평가; C) MMP의 mRNA 수준은 RT-qPCR을 사용하여 평가; D) TF 활성은 방법에 기재된 TF 활성화 프로파일링 분석 키트를 사용하여 평가. 혈청-결핍 VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음, 20 ng/mL PDGF-BB와 함께 24시간 동안 배양. 핵 분획을 수집하고 용해물을 분석에 사용; E) TIMP 및 MMP의 수준은 Smad1-특이적

siRNA-트랜스펙션된 VSMC에서 평가됨. siRNA 트랜스펙션 24시간 후, VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음, PDGF-BB (20 ng/mL)와 함께 24시간 동안 배양. 밴드 밀도는 β -액틴 밴드 밀도로 정규화. 표시된 모든 이미지는 최소 3번의 독립적인 실험에서 얻은 이미지를 나타냄. 평균 $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ PDGF-BB vs. 대조군; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 및 ### $p < 0.001$ PMS vs. PDGF-BB 단독; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, 및 \$\$\$ $p < 0.001$ Smad1 siRNA-트랜스펙션 vs. 비-트랜스펙션 세포; NS, 유의미하지 않음).

[0111]

표 2

[0112]

전사 인자	PDGF	PDGF/PMS
AP1	3.01 $\pm$ 0.66	3.83 $\pm$ 0.38
ATF4	1.68 $\pm$ 0.20	1.75 $\pm$ 0.44
CBF/NFY	16.23 $\pm$ 4.88	6.83 $\pm$ 2.74
EGR1	3.26 $\pm$ 0.75	2.48 $\pm$ 0.31
ETS	2.73 $\pm$ 0.42	4.43 $\pm$ 1.10
FOXO1	1.68 $\pm$ 0.14	1.88 $\pm$ 0.21
HIF	1.21 $\pm$ 0.34	2.07 $\pm$ 0.37
HSF	2.49 $\pm$ 1.02	2.00 $\pm$ 0.42
IRF	1.45 $\pm$ 0.15	1.76 $\pm$ 0.36
NFAT	1.05 $\pm$ 0.16	1.35 $\pm$ 0.26
NF- κ B	0.82 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.09
NRF2/ARE	1.87 $\pm$ 0.24	2.55 $\pm$ 0.31
P53	4.67 $\pm$ 1.24	7.12 $\pm$ 2.01
Smad1	1.12 $\pm$ 0.26	6.12 $\pm$ 0.32
SRF	1.85 $\pm$ 0.25	3.54 $\pm$ 0.41
Stat3	2.26 $\pm$ 0.63	2.83 $\pm$ 0.77

[0113]

VSMC를 20 ng/mL의 PDGF-BB로 처리한 다음, 150 μ M PMS와 함께 배양하였다. 데이터는 비처리된 대조군 세포와 비교하여, 평균 $\pm$ S.D로 표시된다.

[0114]

(5) PMS는 VSMC에서 국소 접착 키나아제 (FAK)-관련 및 p38 신호 전달 경로의 PDGF-BB에 의해 유도된 활성화를 약화시킨다

[0115]

TIMP는 인테그린 β 1/FAK 복합체에 결합하여 MMP 활성을 중단시키는 내인성 억제제로 작용하기 보다는 MMP 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. PDGF-BB 처리 후 Y397 및 Y925 부위 모두에서 FAK의 인산화된 수준이 유의하게 증가했으며, 이 효과는 PMS에 의해 성공적으로 제거됨을 관찰하였다. 또한, p-Src, paxillin, talin 및 vinculin과 같은 FAK-관련 단백질의 수준은 PDGF-BB 또는 PMS 처리 후 유사한 정도로 변경되었다 (도 5A). PDGF-BB 또는 PMS 처리 후 인테그린- β 1의 수준에는 변화가 관찰되지 않았다. 예상한대로, Y397 및 Y925 부위 모두에서 FAK의 인산화는 Smad1-siRNA 형질감염된 VSMC에서 PMS 처리에 의해 억제되지 않았다 (도 5B).

[0116]

더욱이, p38의 인산화된 수준은 PDGF-BB 처리 후 유의하게 증가되었고, PMS는 이러한 효과를 용량-의존적 방식으로 회복시켰다 (도 5C). 그러나, 단백질 키나아제 B(Akt) 및 세포의 신호 조절 키나아제(ERK)의 인산화된 수준도 PDGF-BB 처리에 의해 유의하게 증가되었고 PMS에 의해 영향을 받지 않았다 (도 5C). 이러한 결과는 PMS-매개로 변경된 TIMP 발현이 FAK-관련 및 p38 미토젠-활성화 단백질 키나아제(MAPK) 경로를 통해 MMP 발현의 조절에 관여한다는 것을 입증했다.

[0117]

PMS는 PDGF-BB에 의해 유도된 FAK-관련 및 p38 신호 전달 경로를 약화시킨다 (도 5. A) FAK 관련 단백질의 발현에 대한 PMS의 효과. A) 혈청-결핍 VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음 PDGF-BB (20ng/mL)로 24시간 동안 처리; B) 인산화된 FAK의 수준은 Smad1-특이적 siRNA-트랜스펙션된 VSMC에서 평가. siRNA 트랜스펙션 24시간 후, VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음 PDGF-BB (20ng/mL)로 24시간 동안 처리; C) MAPK의 발현에 대한 PMS의 효과. 혈청-결핍 VSMC를 지정된 농도의 PMS로 6시간 동안 처리한 다음 PDGF-BB (20ng/mL)와 함께 1시간 동안 배양. 인산화된 단백질의 밴드 밀도는 전체 단백질 수준으로 정규화 (그 외 다른 단백질은 β -액틴으로 정규화). 표시된 젤 이미지는 최소 3번의 독립적인 실험에서 얻은 이미지를 나타냄. 평균 $\pm$ SD. * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ PDGF-BB vs. 대조군; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 및 ### $p < 0.001$ PMS vs. PDGF-BB 단독; \$\$ $p < 0.01$ 및 \$\$\$ $p < 0.001$ Smad1 siRNA-트랜스펙션 vs. 비-트랜스펙션 세포; NS, 유의미하지 않음

음).

[0119] (6) PMS는 풍선으로 손상된 쥐의 경동맥에서 신생내막 형성을 억제한다

[0120] 풍선으로 손상된 쥐의 경동맥에서 신생내막 형성에 대한 PMS 투여의 효과를 평가했다. H&E 염색은 풍선 손상 후 부피가 큰 동심원 신내막 형성을 나타내었지만 대조군 (손상되지 않은) 혈관에서는 그렇지 않았다. PMS-처리된 풍선-손상 쥐에서 신생내막 면적과 내막/중막의 비율이 확실히 감소하였다 (도 6A). 이후, 면역조직화학염색은 TIMP1 및 TIMP2에 대해 양성으로 염색된 세포 수가 Sham 동물의 혈관에 비해 풍선-손상 혈관에서 감소함을 보여주었으며, 이 효과는 PMS-처리 풍선-손상 혈관에서 회복되었다. MMP2, MMP9 및 MMP13의 수준은 역전되었다. 또한, Y397과 Y925 부위 모두에서 인산화된 FAK의 염색 강도는 풍선-손상 혈관에서는 증가했지만, PMS-처리 혈관에서는 감소했다 (도 6B). 이러한 결과는 신생내막 형성에 대한 PMS의 보호 효과가 VSMC에서 TIMP 발현의 조절과 FAK의 인산화를 통해 구체적으로 발생했음을 나타낸다.

[0121] PMS는 풍선-손상 쥐의 경동맥에서 신생내막 형성을 억제한다 (도 6. 손상 2주 후, 경동맥은 분리, 고정되어, 파라핀에 포매. A) PMS-처리된 풍선-손상 경동맥의 신생내막 면적 및 내막/중막 비율을 측정하여 BI 단독과 비교. H&E 염색 경동맥의 이미지는 5개 이상의 독립적인 실험에서 얻은 이미지를 나타냄 (각각 Sham, BI 및 BI/PMS 그룹에 대해 n = 5, 6, 5). B) 면역조직화학적 염색을 이용하여 혈관 내 단백질의 발현 수준을 평가하였다. 평균 $\pm$ SD. ***p < 0.001 BI vs. Sham 대조군; ###p < 0.001 PMS vs. BI 단독).

[0123] [이 발명을 지원한 연구과제 정보]

[0124] 1. 국가연구과제- 한국연구재단

[0125] (과제고유번호) 1711139811

[0126] (과제번호)2020R1A2C1102726

[0127] (부처명) 과학기술정보통신부

[0128] (연구관리전문기관) 한국연구재단

[0129] (연구사업명) 개인기초연구 (과기정통부)(R&D)(13111015015512001234301)

[0130] (연구과제명) 허혈/재관류로 인한 심근손상에서 LRP6의 독립적 심근세포 보호 기전 규명

[0131] (주관기관) 조선대학교 산학협력단

[0132] (연구기간) 2020-09-01 ~ 2021-08-31

[0134] 2. 조선대학교 교내과제

[0135] (과제고유번호) 2020-0510(조선대학교 자체과제)

[0136] (부처명) 조선대학교 산학협력단

[0137] (연구사업명) 대학연구활동지원사업

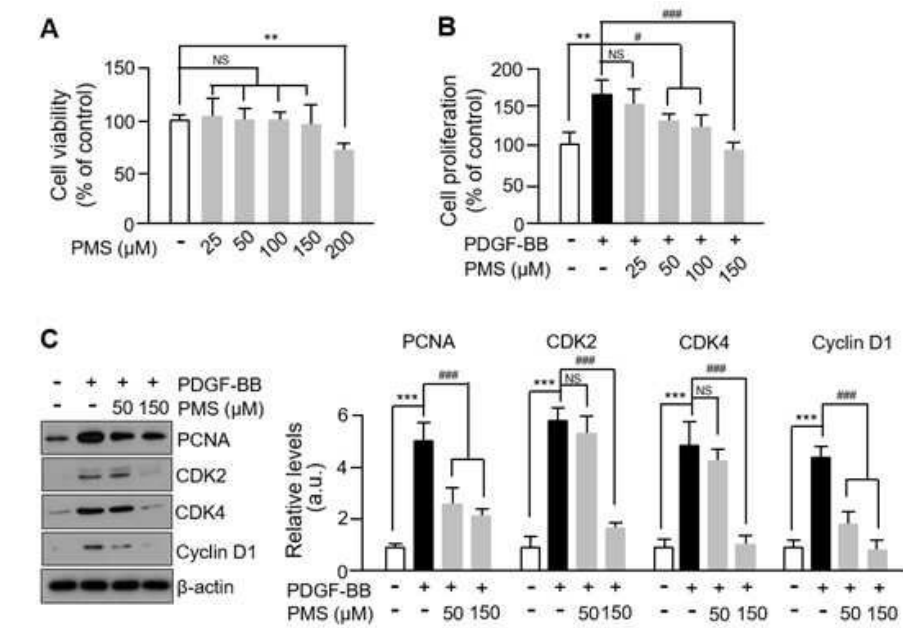
[0138] (연구과제명) 생체적용 기능성 천연물 소재의 탐색

[0139] (주관기관) 조선대학교 산학협력단

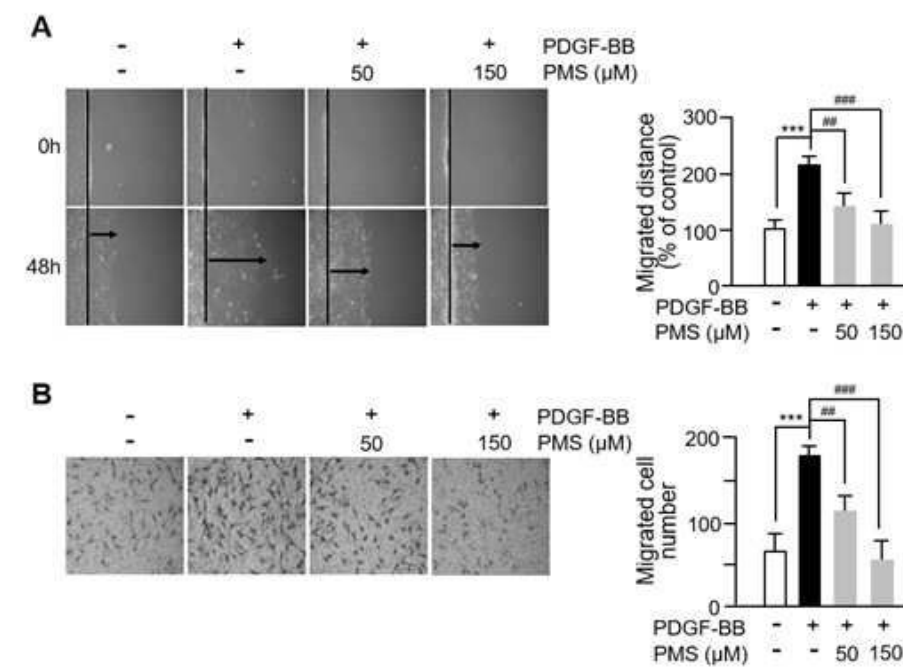
[0140] (연구기간) 2020-06-01 ~ 2021-05-31

도면

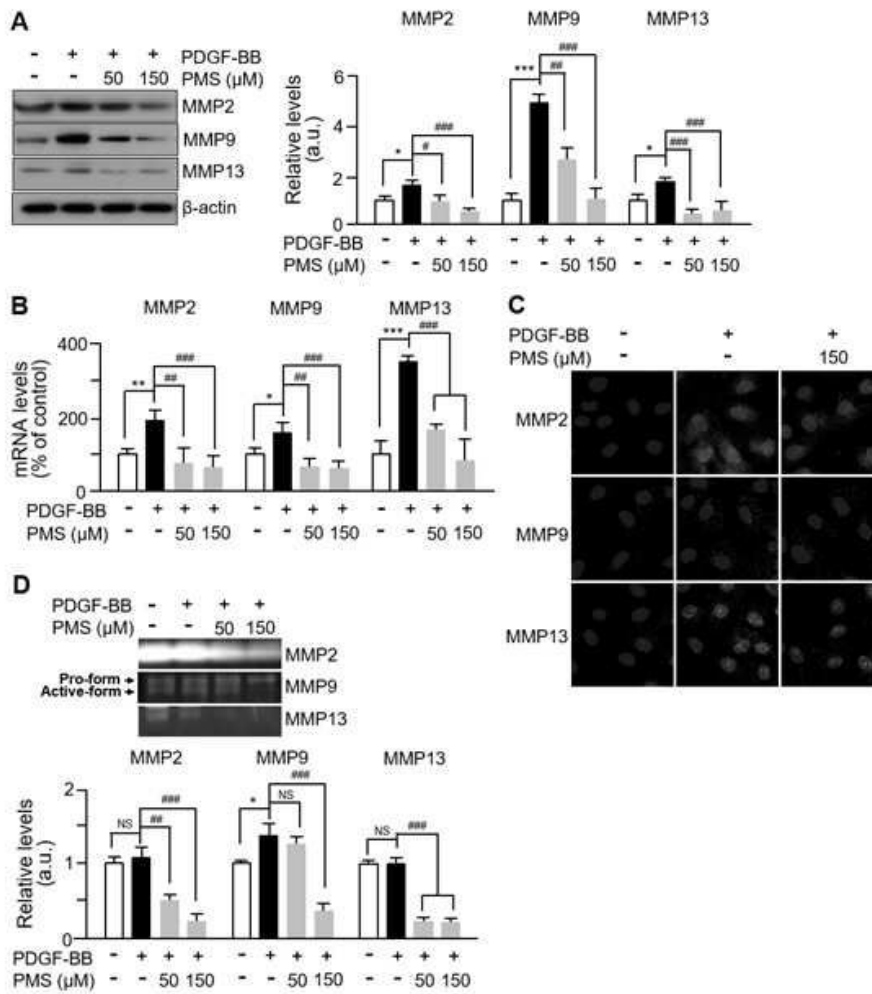
도면1



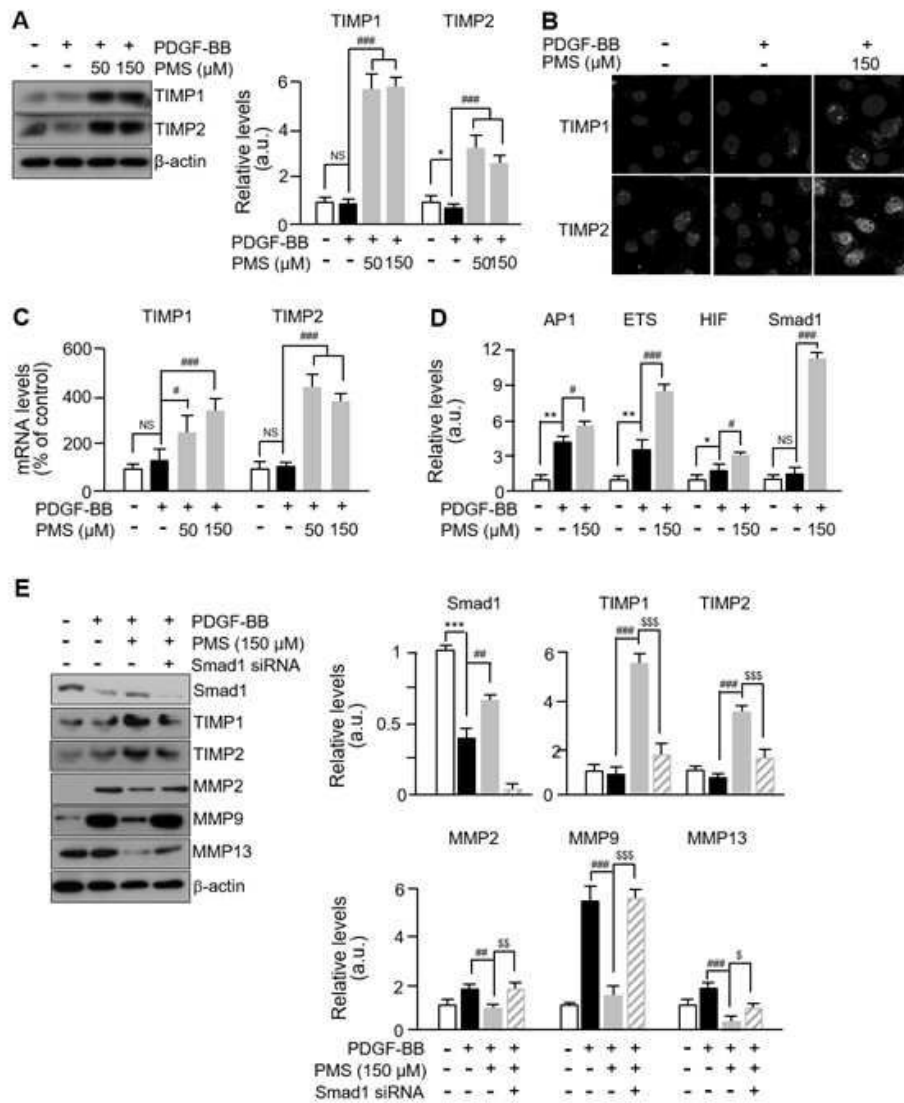
도면2



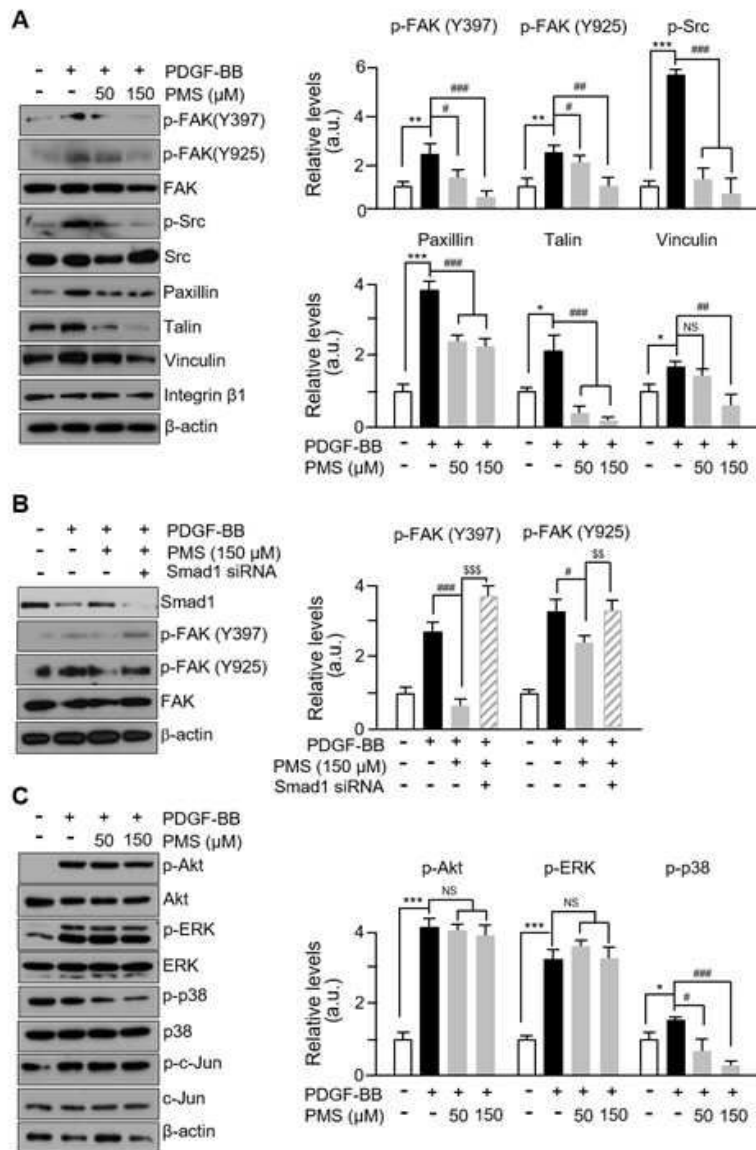
도면3



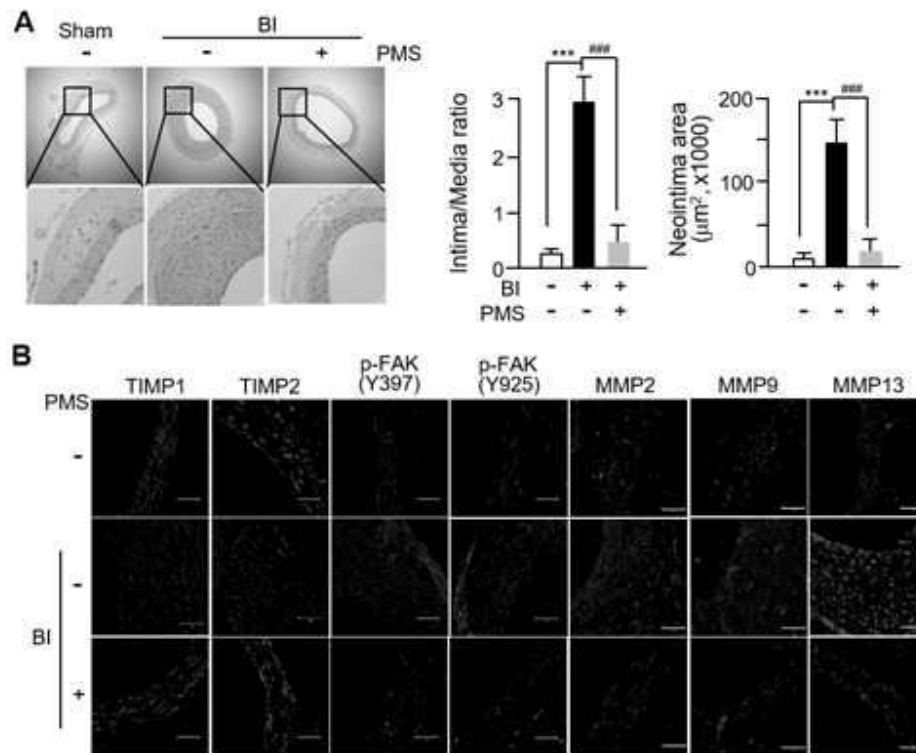
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> Compositions preventing or treating cardiovascular diseases
associated with smooth muscle cell

<130> 21P08004

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin primer_F

<400> 1

agggaatcg tgcgtgac

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin primer_R

<400> 2

agggaaatcg tgcgtgac

18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP2 primer_F

<400> 3

gcgatggcaa ggtgtggtgt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP2 primer_R

<400> 4

gtaccagtgt cagtatcagc

20

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP9 primer_F

<400> 5

aggcgccgtg gtccccactt actt

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP9 primer_R

<400> 6

gcagggtttg ccgtctccgt tgcc

24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP13 primer_F

<400> 7

tcgcattgtg agagtcatgc caaca

25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP13 primer_R

<400> 8

tgtggttcca gccacgcata gtca

24

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TIMP1 primer_F

<400> 9

atcgcgggcc gtttaagga

19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TIMP1 primer_R

<400> 10

caagggatgg ctgaacaggg a

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TIMP2 primer_F

<400> 11

atctcctccc cggatgagtg

20

<210> 12

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> TIMP2 primer_R
<400> 12

ggcaaagaac ttggcctgg

19