

방사선을 조사한 혈관내피세포에 대한 Angiopoietin-1의 방사선 방어 기작

서해대학 방사선과 · 군산대학교 자연과학대학 화학과*

이송재 · 장재철*

Angiopoietin-1 Is An Radiation-induced Apoptosis Survival Factor for Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Song Jae Lee · Chae Chul Chang*

Dept. of Radiotechnology, Sohae College

*Dept. of Chemistry, Kunsan National University**

Angiopoietin-1(Ang-1) is a vasculogenic factor that signals through the endothelial cell-specific Tie2 receptor tyrosine kinase. We examined the effect of angiopoietin-1(Ang-1) on radiation-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) and receptor/second messenger signal transduction pathway for Ang-1's effect on HUVECs. The percent of apoptotic cells under control condition(0Gy) was 8.2%. Irradiation induced apoptosis was increased in a dose(1, 5, 10, and 15Gy)- and time 12, 24, 48 and 72hr)-dependent manner. The percent of apoptotic cells was approximately 34.9% after 15 Gy of irradiation. Under these conditions, pretreatment with Ang-1's (50, 100, 200, and 400 ng/ml) inhibited irradiation-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in a dose-dependent manner. Two hundred ng/ml of Ang-1 inhibited approximately 55-60% of the apoptotic events that occurred in the 10 Gy-irradiated cells. Pre-treatment with soluble Tie2 receptor, but not Tie1 receptor, blocked the Ang-1's antiapoptotic effects. Phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3-kinase) specific inhibitor, wortmanin and LY294002, blocked the Ang-1-induced antiapoptotic effect. Ang-1 promotes the survival of endothelial cells in irradiation-induced apoptosis through Tie2 receptor binding and PI3-kinase activation. Pretreatment of Ang-1 could be beneficial in maintaining normal endothelial cell integrity during irradiation therapy.

I. 서 론

혈관은 여러 가지 세포들로 구성되어 있으며, 구조와 기능에 따라 모세혈관과 동맥 및 정맥으

로 구분된다. 혈관의 여러 가지 구성 세포들 중 혈관내피세포는 혈관 가장 안쪽에 단일 세포층으로 구성되어 있으며, 조직의 항상성, 혈액 응고, blood-tissue exchange, 정상조직 혹은 종양

의 신생혈관 생성 등 다양한 생리적 현상이나 질병의 진행에 있어서 혈액세포의 활성화 등 여러 가지 기능을 수행한다¹⁾. 또한, 혈관내피세포는 혈장과 혈액 구성 세포들과 직접 접촉하므로 독소, 약제 등과 같은 여러 가지 해로운 자극제의 표적이 된다^{2,3)}. 혈관내피세포는 이같은 중요성으로 인해 많은 연구자들이 여러 동물을 이용한 *in vivo* 실험⁴⁾과, 여러 장기 또는 조직으로부터 혈관내피세포를 분리하여 배양한 *in vitro*⁵⁾의 연구가 이루어져왔다. 특히, *in vitro* 실험을 위해 여러 장기와 조직으로부터 분리 배양한 혈관내피세포들은 각각 고유한 세포의 형태와 기능을 유지하고 있어 이 세포들을 이용하여 다양한 실험들이 행하여지고 있다⁶⁾.

세포에 대한 방사선 조사의 효과는 일반적으로 일시적인 세포주기의 정지와 DNA 손상복구의 증가 그리고 복구할 수 없는 손상에 의한 세포의 죽음이 유도된다^{7,8)}. 세포의 죽음은 necrosis와 생체내에는 생리적 또는 병적인 상태에서 원하지 않는 세포들을 자체적으로 조절하는 생물학적인 과정인 Apoptosis로 분류할 수 있으며, 이중 apoptosis가 일어나는 세포의 형태적 생리적 특징으로 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축, DNA의 분절, 세포막을 이루는 지질인 포스파티딜 세린(phosphatidyl serine)의 세포 외부로의 노출 등이 나타난다⁹⁾.

최근에 많은 연구자들이 여러 장기와 조직으로부터 혈관내피세포를 분리한 *in vivo*와 *in vitro* 실험¹⁰⁾을 통해서, 혈관내피세포에 방사선을 조사하면 apoptosis가 유도됨을 보고하였으며, 혈관내피세포에서 방사선에 의해 유도된 apoptosis는 vascular endothelial growth factor¹¹⁾, Basic fibroblast growth factor¹²⁾ 등과 같은 growth factor와 endothelin-1¹³⁾과 같은 cytokine에 의해 억제됨을 보고하였다. 이같은 분자들은 혈관내피세포의 증식을 촉진할 뿐만 아니라 apoptosis를 억제함으로써 일정하게 세포수를 유지할 수 있는 작용을 한다.

최근까지 특정 유전자 결손에 따른 보고들에 의하면 Angiopoietin-1(Ang-1)은 배형성 단계

에서 혈관생성과 혈관유지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{14,15)}. Ang-1은 Tie2라고 하는 혈관내피세포 tyrosine kinase 수용체와 결합을 하여 자체적인 생물학적인 기능을 발휘한다¹⁵⁾. 유전자 활성과 관련된 *In vivo* 실험을 통하여 Ang-1이 혈관내피세포 주변의 지지세포들을 유지시키며 보강해주는 것을 확인할 수 있었으며¹⁶⁾, *In vitro* 실험은 다른 growth factor들과는 달리 Ang-1이 혈관내피세포 증식효과는 없지만 강력하게 신생혈관을 생성하고, sprouting을 유도하는 것을 보고하였다¹⁷⁾. 한편, Ang-1는 혈청이 제거된 상태에서 일어나는 apoptosis를 강력하게 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. Ang-1이 혈관내피세포의 증식을 유도하지 않으면서 apoptosis를 강력하게 억제하는 효과는 Ang-1이 방사선 조사와 관련하여 혈관내피세포를 보호할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 방사선 조사에 의한 혈관내피세포에 대한 Ang-1의 효과는 거의 알려진 바가 없다.

이에 본 연구에서는 방사선 조사에 의하여 human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)에서 apoptosis를 유도하고, Ang-1이 방사선에 의해 HUVECs 유도된 apoptosis에 미치는 영향과 그 신호전달 전이 기작을 규명하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포의 분리 및 배양과 시약

혈관 내피세포는 사람 제대 정맥(Human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)으로부터 콜라젠 효소를 처리하여 분리하였고, 분리된 세포를 면역 형광 검출방법(factor VIII)을 이용하여 혈관 내피세포임을 확인하였다(>95% positive)¹⁹⁾. 분리된 혈관내피세포는 M-199 배양액에 20% 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)를 첨가하여, 37°C-5% 이산화탄소 환경에서 배양하였다. 이 연구에 사용된 배양세포는 일차 세포 배양법으로 배양한 2~4대째의 배양 세포를 이용

하였다. 본 실험에 사용한 M-199 배양액과 fetal bovine serum(FBS)는 Life Technology로부터, Anti-Tie2 antibody는 Santa Cruz biotechnology, Anti-phosphotyrosine antibody는 Upstate Biotechnology, Wortmain과 LY294002는 RBI, Hoechst 33258과 Sytox Green은 Molecular Probes로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외 모든 시약들은 Sigma로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 혈관내피세포의 apoptosis의 유도

혈관내피세포는 젤라틴을 도포한 24-well plates(5×10^4 cells/well)에 20% FBS를 첨가한 M-199 배양액에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양된 혈관내피세포는 방사선 조사하기 1시간 전에 buffer용액과 Ang-1을 첨가하였다. 혈관내피세포에 apoptosis를 유도하기 위하여 선형가속장치(Simens, 6MV X-ray, 200 cGy/min)를 이용하여 방사선을 조사하였다. 균일한 선량분포를 얻기 위해 1cm 두께의 bolus를 사용하였다.

3. Apoptosis의 정량적 결정

혈관내피세포에 방사선조사로부터 유도된 apoptosis를 다음과 같은 방법으로 측정하였다¹⁸⁾. 24-well plate내의 부유세포를 두 번의 PBS로 씻은 후 수집하였고, 바닥에 부착된 세포는 trypsin를 이용하여 수집하였다. 부유세포와 부착세포의 수는 Coulter Model Z1 Dual Counter System로 측정하였다. 배양용기 바닥에 부착된 세포들 중 apoptosis를 측정하기 위하여, 세포가 들어 있는 배양용기를 0.9% sodium chloride로 씻고 0.5% glutaraldehyde로 15분동안 고정한 후, Sytox green으로 세포핵을 염색하였다. apoptosis가 일어난 세포를 2명이 각각 4곳을 임의로 선정하여 형광현미경(Zeiss)으로 수를 측정하였다. 또한, 세포의 형태적 변화를 측정하기 위해 방사선 조사 후 24시간에 현미경을 이용하여 사진을 찍었다.

4. Angiopoietin-1(Ang-1)의 투여

24시간 배양한 혈관내피세포를 방사선 조사하기 1시간 전에 Ang-1을 투여한 후 방사선조사를 시행하였다. 방사선 조사 후 바로 5% FBS가 함유된 신선한 배양액으로 교환하였고 Ang-1을 첨가하였다. 대조군은 실험군과 동일한 양의 buffer를 투여하였다.

5. DNA 분절의 분석

DNA 추출과 전기영동은 다음과 같은 방법으로 시행하였다²⁰⁾. 간략하면, 5×10^6 세포를 차거운 PBS로 두 번 씻은 후 lysis buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, 50 μ g/ml proteinase K)를 이용하여 43°C로 overnight하여 세포를 용해하였다. DNA 용액은 0.5M NaCl과 50 μ g/ml RNase로 37°C로 1시간 동안 배양하였다. 전기영동은 Tris-borate buffer 안에 1.6% agarose gel를 이용하여 80V에서 4시간 실시하였다. DNA band는 ethidium bromide로 염색하여 UV light로 확인하였다.

6. 혈관내피세포에 대한 수용성 Tie2 수용체와 PI3-Kinase 억제제의 적용

방사선 조사에 의한 혈관 내피세포 내의 apoptosis 억제 기작을 확인하기 위해 2 μ g/ml의 수용성의 Tie-1과 Tie-2를 Ang-1(200 ng/ml) 처리 30분 전에, PI3 Kinase 억제제인 Wortmanin(30 nM)과 LY294002(100 nM)는 1시간 전에 처리한 후 방사선을 조사하였다. 방사선조사 후 바로 동일한 양의 Ang-1, 수용성의 Tie-1과 Tie-2, Wortmanin(30 nM)과 LY294002(100 nM)이 들어 있는 신선한 배양액으로 교환하였다.

7. 통계

각 실험군에서 apoptosis 발생 백분율을 un-

paired Student's t-test로 검증하여 95%의 신뢰 구간에서 유의성을 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

전리방사선이 배양 혈관내피세포에 apoptosis가 유도되는지를 확인하기 위해 여러 가지 선량별(1, 5, 10, 15Gy)로 배양세포에 조사하였다. 또한, 방사선 조사 후 시간 변화에 따른 혈관내피세포에서 apoptosis의 유도를 실험 측정하였다. 혈관내피세포에 방사선을 조사한 실험군에서 선량이 증가함에 따라, 시간이 경과함에 따라 선량과 시간 의존적인 양상의 apoptosis가 유도되었다(Fig. 1). 특히, 24시간 후에 apoptosis는 대조군(0Gy)에서 8.2%가 유도되었고, 방사선을 1, 5, 10, 15Gy를 조사한 실험군에서는 각각 12.3%, 17.6%, 28.2%, 34.9%의 apoptosis가 유도되었다. 이같은 결과는 다른 연구자들이 보고한 것과 매우 유사하였다⁹⁾.

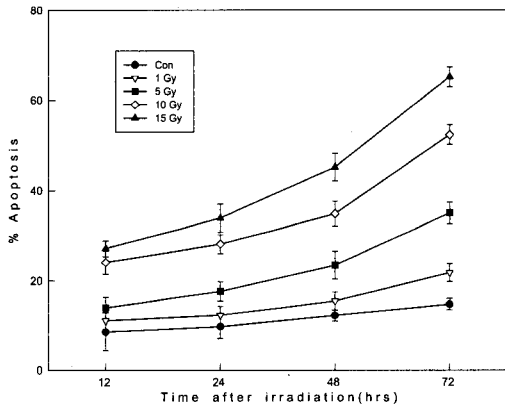


Fig. 1. Irradiation induce apoptosis in HUVECs. HUVECs were grown for 24 h in M199 medium with 5% FBS. The cells were irradiated (0, 1, 5, 10, and 15 Gy) using a linear accelerator and then incubated for 12, 24, 48, 72 hrs.

Kwak 등은(1999) 사람 제대정맥(human umbilical cords)으로부터 혈관내피세포를 분리한 후

배양액내에 혈청을 제거하여 apoptosis를 유도하였고, Ang-1과 같은 growth factor에 의해 apoptosis가 강력하게 억제됨을 보고하였다.

본 연구에서도 Angiotensin-1(Ang-1)의 투여가 apoptosis를 억제하는지를 관찰하기 위하여, HUVECs에 10Gy의 방사선을 조사 직전과 직후에 Ang-1(50, 200, 400 ng/ml)를 투여하고 24시간 경과한 후에 apoptosis의 변화를 측정한다. 결과 Ang-1의 투여량이 증가함에 따라서 apoptosis가 억제되었다(Fig. 2). 특히, 200 ng/ml의 Ang-1 투여는 10Gy를 조사한 혈관내피세포에서 대략 55~60%의 apoptosis가 억제되었다.

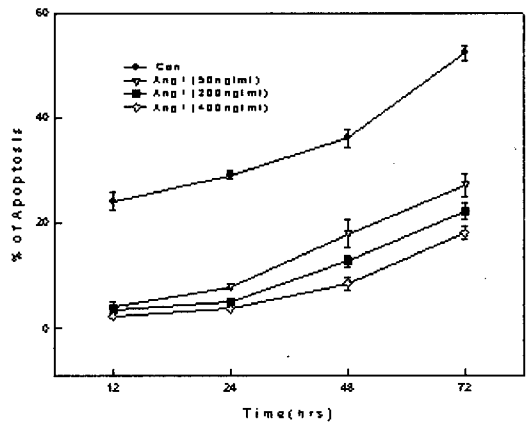


Fig. 2. Ang1* inhibits irradiation-induced apoptosis in HUVECs. The cells were exposed to the indicated amount of Ang1* before irradiation (10Gy), and were incubated for the next 24h in the presence of same concentration of Ang1*. The points and bars show the mean standard deviation of five independent experiments.

Gelatin이 도포된 35 mm 배양접시에 혈관내피세포를 배양하고, Ang-1를 투여한 실험군과 투여하지 않은 실험군에 10Gy의 방사선을 조사하고, 혈관내피세포에 유도된 apoptosis를 위상차 현미경(Fig. 3)과 Sytox green 형광 염색법(Fig. 4)을 이용하여 관찰하였다. 먼저, 방사선을 조사하지 않은 대조군과 방사선을 10Gy를

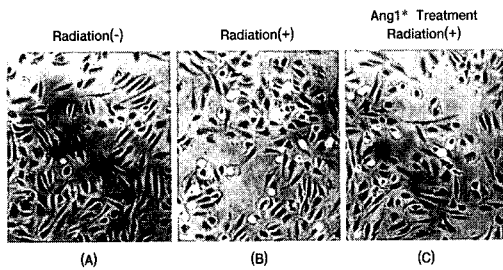


Fig. 3. Effect of Ang1* on irradiation-induced apoptosis. Ang1*(200 ng/ml) or control buffer was added to irradiated(10 Gy) in HUVECs. Phase-contrast microscopy. (A) Sham-irradiated cell, (B) Irradiated cells, Ang1* removed from the medium, (C) Irradiated cell, Ang1* in the medium. Note that there are fewer adherent cells and more floating dead cells 24 hr after irradiation. The cells exposed to Ang1* are more adherent than the cells exposed to control buffer. Magnifications are $\times 200$.

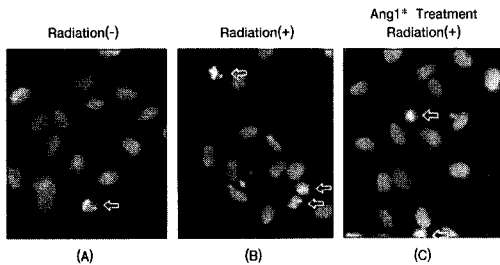


Fig. 4. Detection of apoptotic cells by morphological analysis of Sytox Green nucleic acid-stained nuclei at 24h after irradiation (10 Gy). (A) Sham-irradiated cell, (B) Irradiated cells, Ang1* removed from the medium, (C) Irradiated cell, Ang1* in the medium. Arrows indicate yellow apoptotic cells with fragmented or condensed DNA. All magnifications are $\times 400$. The detailed procedures for fixation and staining are described in 'Materials and methods' section.

조사한 실험군을 위상차 현미경을 이용한 혈관내피세포의 형태적 변화를 관찰하였다. 대조군에 비하여 방사선을 조사한 실험군에서 부착된 세포보다 부유세포의 비율이 증가함을 보였다. 반면, Ang-1 200 ng/ml를 투여한 실험군에서는

방사선만을 조사한 실험군에서 보다 훨씬 적은 부유세포를 관찰할 수가 있었다. Apoptosis는 세포내에서 핵의 응축과 DNA 분절이 나타나는 특징을 가진다. Apoptosis의 특징이 HUVECs에서도 나타나는지를 확인하기 위하여 Sytox green으로 염색한 결과, 역시 대조군에 비하여 10 Gy의 방사선을 조사한 실험군에서 핵의 응축과 DNA 분절들을 관찰할 수가 있었다. 역시 Ang-1 200 ng/ml를 투여한 실험군에서는 핵의 응축과 질라진 파편들이 방사선만을 조사한 실험군에 비해 억제되었다. 세포내에서 DNA 분절이 일어남을 확인하기 위해 혈관내피세포로부터 DNA를 추출하여 전기영동을 시행해본 결과, 10 Gy을 조사한 실험군에서 전형적인 DNA laddering이 관찰되었으며 반면, Ang-1 200 ng/ml를 투여한 실험군에서는 대조군과 같이 DNA laddering이 나타나지 않았다(Fig. 5). 이 같은 결과는 Ang-1에 의한 apoptosis의 억제효과로 생각된다. 혈관내피세포에

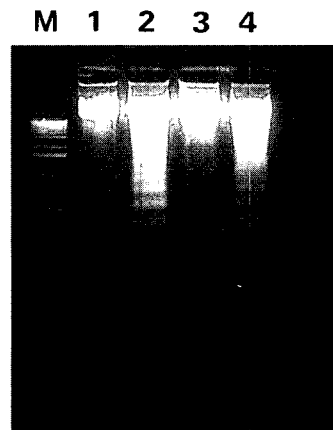


Fig. 5. Internucleosomal DNA fragmentation in HUVECs deprived of Ang1* and/or irradiated. DNA was extracted from the cultures and separated on 1.6% agarose gel, 24 hr after irradiation(10 Gy) and/or Ang1 deprivation. Lane M, A standard 1-kb DNA ladder(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) is included on the gel. Lane 1, sham-irradiated; Lane 2, 10 Gy irradiation; Lane 3, 10 Gy, Ang1* in the medium; Lane 4, 10 Gy, Ang1, rTie2-Fc in the medium.

서 일어나는 Ang-1에 의한 apoptosis 억제효과가 세포내에서 어떤 과정과 신호전달을 통하여 일어나는지를 확인하기 위하여, Ang-1 200 ng/ml를 투여한 실험군에 수용성 Tie2-Fc을 투여하자 완전히 apoptosis 억제효과가 차단되었다(Fig. 6). 혈관내피세포내에서 이같은 억제효과가 어느 신호 전달기작을 통하여 일어나는지를 확인하기 위하여 Phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3-Kinase)의 신호전달체계를 억제하는 물질인 Wortmanin과 LY 294002를 투여하면 완전하게 apoptosis 억제효과가 차단되었다(Fig. 7). 이 결과는 Ang-1에 유도된 apoptosis 억제효과는 혈관내피세포내의 Tie2 수용체와 결합한 후 PI3-Kinase 신호전달 체계를 통하여 이루어짐을 알게 해 준다. VEGF(vascular endothelial growth factor), bFGF 등이 혈관내피세포에 다양한 효과를 가지고 있는 반면, Ang-1은 혈관내피세포내의 Tie2 수용체에만 작용하여 방사선에 대한 강력한 apoptosis 억제효과를 가지고 있기 때문

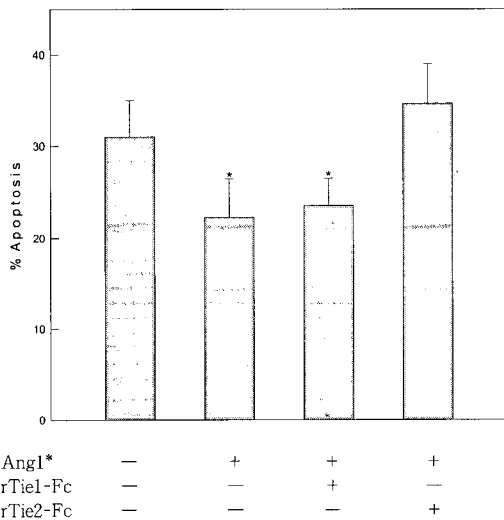


Fig. 6. Effect of Ang1* on irradiation-induced apoptosis in HUVECs after 24 hr. Ang1* (200 ng/ml) and five-fold molar excess (2 μ g/ml) of rTie1-Fc or rTie2-Fc were added to irradiated (10 Gy) cells. The bars represent the mean \pm S.D. from five independent experiments. *, $p < 0.01$ versus control.

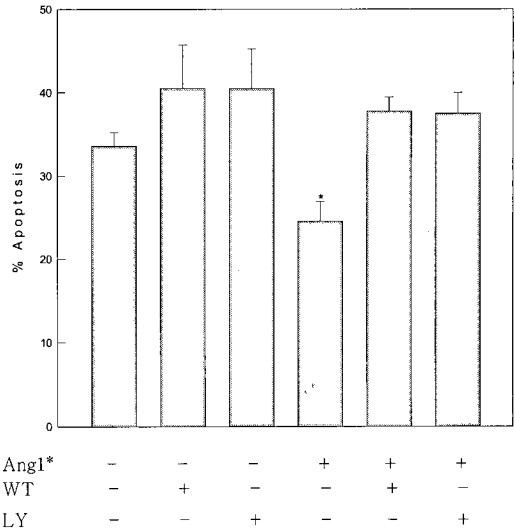


Fig. 7. Effect of Ang1* on irradiation-induced apoptosis in HUVECs after 24 hr. Ang1* (200 ng/ml) and five-fold molar excess Wortmanin (30 nM) or LY 294002 (100 nM) were added to irradiated (10 Gy) cells. The bars represent the mean \pm S.D. from five independent experiments. *, $p < 0.01$ versus control.

에 방사선 치료시 문제가 되고 있는 혈관 보호제로 이용하면 상당한 도움을 줄 것으로 생각되며, 앞으로 생체내의 실험이 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

IV. 결 론

Angiopoietin-1 (Ang1)은 혈관내피세포의 Tie2 receptor를 통하여 신호를 전달하며, 혈관 생성과 혈관 유지 과정에서 중요한 역할을 한다. 최근 Ang-1이 human umbilical vein endothelial cell (HUVECs)에서 혈청을 제거함으로써 유도되는 apoptosis를 억제한다는 보고가 있었다. 본 연구에서는 방사선 조사에 의해 혈관내피세포에서 apoptosis가 유도되는지, 유도가 된다면 Ang-1에 의해 apoptosis가 억제되는지 그리고 어떤 경로를 거치는 것인지를 실험하였다.

혈관내피세포에 방사선을 조사한 결과, 대조

군(0 Gy) 8.2%에 비하여 선량(1, 5, 10, 그리고 15 Gy)이 증가함에 따라, 시간(12, 24, 48 그리고 72시간)이 증가함에 따라 apoptosis가 증가하였다. 같은 조건하에서 Ang-1는 농도 의존적으로(50, 200, 400 ng/ml) apoptosis를 억제하였다. 특히, 10 Gy의 방사선을 조사한 HUVECs에 Ang-1(200 ng/ml)를 처리 한 경우 대조군에 비하여 apoptosis를 약 55~60% 정도 억제하였다. Antiapoptotic factor로서 Ang-1이 어떤 신호 과정을 경유하는지를 밝히고자, HUVECs에 방사선 조사로 apoptosis를 유도하면서 soluble Tie1 receptor 또는 soluble Tie2 receptor를 처리하였다. 그 결과, Ang-1은 Tie1 receptor가 아닌 Tie2 receptor와 결합하여 Ang-1의 Antiapoptotic 효과를 차단하였다. Phosphatidylinositol 3'-kinase(PI3-kinase) 특정 억제 물질인 wortmanin(30 nM)과 LY294002(100 nM)을 방사선 조사한 HUVECs에 Ang-1과 함께 처리했을 때 Ang-1에 의해 유도된 apoptosis 억제 효과를 차단하였다.

참 고 문 헌

- Warren JB. The Endothelium : an Introduction to Current Research. New York, NY : Wiley-Liss, Inc. 1990
- Linder H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann M, Klauke I, Schultz-Hector S and Eissner G : Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair : Role of cytokines. *Blood*. 1997 ; 89 : 1931-1938
- Eissner G, Kolhuber F, Grell M, Ueffing M, Scheurich P, Hieke A, Multhoff G, Bornkamm GW, Holler E : Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- α in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood*. 1995 ; 86 : 4184
- Nicosia RF and Ottinetti A : Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. *Lab Invest*. 1990 ; 63 : 115-122
- Kantak SS, Diglio CA and Onoda JM : Low dose radiation-induced endothelial cell retraction. *Int J Radiat Biol*. 1993 ; 64 : 319-328
- Rose RW, O'Hara MD, Williamson SK and Grant DS : The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation. *Radiat Res*. 1999 ; 152 : 14-28
- Yarnold J : Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997 ; 44 : 1-7
- Siles E, Villalobos M, Jones L, Guerrero R, Eady JJ, Valenzuela MT, Nunez MI, McMillan TJ and Ruiz de Almodovar JM : Apoptosis after gamma irradiation. Is important cell death modality? *Br J Haematol*. 1998 ; 78 : 1594-1599
- Langley RE, Bump EA, Quartuccio SG, Mederiros D and Braunhut SJ : Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *BR J Cancer*. 1997 ; 75 : 666-672
- Gaugler M-H, Squiban C, Claraz M, Schweitzer K, Weksler B, Gourmelon P and Van der Meeren A : Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. *BR J Haematol*. 1998 ; 103 : 980-989
- Gerber H, Dixit V, Ferrara N : Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998 ; 273 : 13313-13316
- Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLouglin M, Ehleiter D, Schwartz JL, Seddon AP, Cordon-Cardo C and Haimovitz-Friedman A : Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced

- programmed cell death in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 2582-2590
13. Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y : Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 1997 ; 30 : 1198-1203
 14. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996 ; 87 : 1161-1169
 15. Maisonpierre PC, Suri Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997 ; 277 : 55-60
 16. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996 ; 87 : 1171-1180
 17. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, and Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Current Biol.* 1998 ; 8 : 529-532
 18. Kwak HJ, So J-N, Lee SJ, Kim IJ, Koh GY : Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett.* 1999 ; 448 : 249-253
 19. Jaffe EA, Nachman NL, Becker CG, Minnick CR : Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973 ; 52 : 2745
 20. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980 ; 284 : 555-556