

## 올리고 마이크로어레이를 이용한 활성화된 인간 제대 정맥 내피세포의 유전자 발현 조사

김선용 · 오호균 · 이수영<sup>1</sup> · 남석우<sup>2</sup> · 이정용<sup>2</sup> · 안현영<sup>3</sup> · 신종철<sup>3</sup> · 홍용길 · 조영애\*

가톨릭대학교 의과대학원 암연구소, <sup>1</sup>의과대학 자연과학교실 화학과, <sup>2</sup>병리학교실, <sup>3</sup>산부인과

Received September 14, 2004 / Accepted October 3, 2004

**DNA Microarray Analysis of the Gene Expression Profile of Activated Human Umbilical Vein Endothelial Cells.** Sun-Yong Kim, Ho-Kyun Oh, Soo-Young Lee<sup>1</sup>, Suk Woo Nam<sup>2</sup>, Jung Yong Lee<sup>2</sup>, Hyun-Young An<sup>3</sup>, Jong-Chul Shin<sup>3</sup>, Yong Kil Hong and Young Ae Joe\*. *Cancer Research Institute, Catholic Research Institutes of Medical Sciences, <sup>1</sup>Department of Natural Sciences, College of Medicine, <sup>2</sup>Department of Pathology, College of Medicine, <sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Maternal-Fetal Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea* – Angiogenesis has been implicated in progression of inflammation, arthritis, psoriasis, atherosclerosis as well as tumor growth and metastasis. Intensive studies have been carried out to develop a strategy for cancer treatment by blocking angiogenesis. During angiogenesis, endothelial proliferation and migration essentially occurs upon activation. In this study, we compared the expression profiles of human umbilical endothelial cells activated by incubating *in vitro* in the rich medium containing several growth factors, and non-activated ones. cDNA targets derived from total RNAs of HUVEC activated for 13 h in M199 medium containing endothelial cell growth supplement, 20% fetal bovine serum, and heparin, after reaching 70~80% confluency, or non-activated, were hybridized onto oligonucleotide microarrays containing 1,8864 genetic elements. Unsupervised hierarchical clustering analysis resulted in two subgroups on dendrogram exhibiting activated and non-activated HUVECs. We then extracted 122 outlier genes which were shown to be up-regulated or under-expressed by at least 2-folds in activated HUVECs. Among these, 32 annotated genes were up-regulated and 38 were down-regulated in activated HUVECs. Interestingly, genes involved in cell proliferation, motility, and inflammation/immune response were up-regulated in activated HUVEC, whereas genes for cell adhesion or vessel morphogenesis/function were down-regulated. Unexpectedly, the expression of genes well-characterized as angiogenesis markers was not changed except Eph-B4, which was down-regulated about 4 folds. 52 unknown genes were also up- or down-regulated. Therefore, these results could provide an opportunity to targeting new vascular molecules for the development of anti-angiogenic molecules.

**Key words** – angiogenesis; microarray, expression profile, motility, endothelial cell

신혈관 형성은 암의 성장 및 전이 뿐만 아니라 염증, 관절염, 건성, 동맥경화증 등의 병적인 진행에 주요한 역할을 하며, 특히 최근에 들어서는 혈관신생 억제를 통한 암의 치료를 시도하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다[10,15,16]. 신혈관 형성은 현재 두 가지 과정에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다. 신혈관 형성에는 병변 부위로 혈관 벽을 이룰 수 있는 내피 세포의 recruitment가 이루어져야 하는데, 하나는 기존의 혈관 벽의 내피세포가 활성화되어 증식, 이동에 의해 이루어지고[6,17], 다른 하나는 골수에 존재하는 혈관 근간세포(endothelial progenitor cell)가 혈액 중에 순환하다가 homing하여 분화, 증식 단계를 거쳐 혈관형성에 관여하게 된다[3-5,12,14]. 혈관근간세포에 대한 연구는 비교적 최근에 시작되었으므로, 아직 신혈관 형성에 있어 이들의 역할 규명이 좀더 정확히 이루어지는 것이 필요하다. 반면에 기존 혈관에 존재하는 내피세포에 의한 혈관 형성은 비교적 확립

이 잘 된 상태이다[6,17]. 정상적인 내피세포는 현저하게 휴면상태의 세포 형태로 지내게 되어 약 1000일에 한 번씩 증식이 진행하게 되는 것으로 알려져 있는 반면에, 혈관신생에 일어나는 기간 동안에는 1~2일 마다 세포 증식이 일어나도록 활성화되어 있다. 따라서, 활성화된 혈관 내피세포를 표적으로 하는 저해제들은 정상적인 혈관 내피세포의 기능을 저해하지 않고, 병변 부위에서 일어나는 혈관신생을 조절할 수 있다.

본 연구에서는 활성화된 내피세포의 유전자 발현 형태를 활성화되지 않은 세포를 기준으로 비교 조사하여 새로운 혈관신생 억제 표적을 찾고자 하였다. 최근 유전자 칩을 이용한 유전자 발현 연구가 많이 이용되고 있는데, 많은 유전자를 하나의 유리판(slide)에 올려놓고 발현 변화 양상을 한번에 확인할 수 있는 효율적인 연구 기법으로써 여러 질병 진단에도 사용되고 있다[8,9]. 본 연구에서는 이러한 기법을 이용하여 혈관 신생 과정에서 혈관 신생 인자들에 의해 내피세포들이 활성화 되는 것과 비슷한 조건을 시험관내에서 임의로 조성하여 활성화시킨 내피세포와 그렇지 않은 내피세포 간에 어

**\*Corresponding author**

Tel : +82-2-590-2404, Fax : +82-2-532-0575

E-mail : youngjoe@catholic.ac.kr

떠한 유전자들의 발현 변화가 있는지를 약 19,000개의 유전자를 포함하는 올리고 칩을 이용하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 인간 제대로부터 제대정맥 내피세포(HUVEC)의 분리 및 배양

내피세포는 Jaffee 등[13]이 제안한 방법을 수정하여 다음과 같이 분리하였다. 길이가 15 cm 이상 되는 제대 정맥에 제작된 바늘을 꽂고 등장액(phosphate buffered saline; PBS)으로 제대 정맥 내부를 2 차례 세척하여 주고, 0.2% collagenase를 정맥 내에 주입하여 주었다. 37°C에서 25 분간 반응시키고 난 후, 분리된 세포들을 튜브에 담고 1,000×g에서 7 분간 원심분리 하였다. 분리된 세포들은 20% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum; FBS, Life Technologies, Grand Island, NY), 내피세포 성장 시약(endothelial cell growth supplement; ECGS, 30 µg/ml; Sigma, St Louis, MO), 헤파린(90 µg/ml; Sigma, St Louis, MO)이 함유된 M199 배지를 사용하여 gelatin이 피복되어 있는 배양 접시에서 배양하였다. 배지는 3 일 마다 교체해 준 후 세포를 수확한 HUVEC과 3 일 후 배양 배지를 교체하고 13 시간 후에 세포를 수확한 것을 array 실험에 사용하였다. 이 때 HUVEC의 계대수가 2~4인 것을 사용하였다.

### HUVEC으로부터 total RNA의 분리

각기 다른 조건에서 배양하여 수확한 HUVEC으로부터 Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY) 용액을 이용하여 분리하였다. 수확한 세포에 Trizol 1 ml 을 첨가하여 세포를 파괴시킨 후 클로로포름을 첨가하여 주고 12,000×g, 4°C에서 15 분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮긴 후에 이소프로판올을 가하고 다시 12,000×g, 4°C에서 10 분간 원심분리 하였다. 얻은 RNA pellet을 공기 중에 말린 후 DEPC-처리한 물로 잘 녹여 준 후, 전기영동 gel에서 18S, 28S의 band가 뚜렷하고, 260/280 비율이 1.8 이상인 시료만을 array 분석용으로 보관하였다.

### Oligonucleotide microarray의 hybridization

올리고 칩은 가톨릭대학교 미세유전체 질환 연구센터에서 제작한 19K 인간 올리고 칩을 사용하였다. 칩의 질과 실험방법의 재현성은 NIH3T3 세포로부터 유래한 total RNA를 가지고 dye swap 실험에 의해 검증하였다. HUVEC의 total RNA 30 µg, 또는 reference RNA UHR (Universal Human Reference RNA; Stratagene, La Jolla, CA) 20 µg을 사용하여, Superscript II 역전사 효소(Invitrogen, Grand Island, NY)를 반응시켜서 각각의 cDNA를 제작 하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 UHR cDNA는 Cy3 (NEN Life Science,

Boston, MA)로 표지하였고 HUVEC cDNA는 Cy5 (NEN Life Science, Boston, MA)로 표지하였다. 이렇게 제작된 프로브는 Microcon YM-30 column (Amicon, Stonehouse, Gloucester, UK)으로 정제를 하였고, 올리고 칩과 37°C에서 16 시간 이상 hybridization시켰다. 반응이 종료된 후 칩을 세척하여 준 후 GenePix 4000B scanner (Molecular Devices Comporation, Union, CA, USA)를 이용하여 이미지를 얻었고 일차적인 데이터 정리 후, BASE 프로그램으로 데이터의 normalization 및 filtering을 실시하였고 Cluster 프로그램을 통하여 clustering을 실시하였다.

### Hierarchical clustering

스텐포드 대학에서 제공하는 hierarchical clustering 알고리즘을 사용하여 clustering을 실시하였고, clustering한 데이터는 스텐포드 대학에서 제공하는 Treeview 프로그램을 이용하여 이미지로 얻었다. Clustering시 각 lane 위에 가지들은 유전자 발현이 비슷한 것들끼리 연결시킨 것을 의미한다. 붉은색은 reference RNA UHR 보다 유전자 발현이 증대된 것을 의미하고, 초록색은 UHR 보다 유전자의 발현이 감소된 것을 의미한다.

### 데이터 분석

활성화시키지 않은 HUVEC (RHUVEC)의 유전자 발현을 기준으로 하여 활성화시킨 HUVEC (AHUVEC)의 유전자 발현 변화량을 분석하였다. BASE 프로그램을 통하여 내려받은 자료를 엑셀 프로그램(Microsoft Excel)을 이용하여 정리한 후, RHUVEC 보다 AHUVEC의 유전자 발현차이가 2배 이상 되는 유전자만을 선별하여 분석, 정리 하였다.

## 결 과

### 유전자 발현 패턴의 총괄적 분석

혈관신생을 유도하는 인자들로서 bFGF, VEGF, IL-8, angiopoetin 등을 포함하여 여러 다른 성장인자 및 사이토카인들이 알려져 있으므로, 본 연구에서는 이들 인자들이 충분히 존재한다고 사료되는 ECGS (신경조직추출물)와 20% FBS, heparin을 첨가한 배지를 이용하여 내피세포를 충분히 활성화시키고자 하였다. 계대수가 2~4인 HUVEC을 사용하였고, 이들 배지를 처리하여 13 시간 후의 유전자 발현 pattern을 처리하지 않은 것과 비교하였는데, 이 두 그룹의 세포 모양은 전형적인 코볼스톤모양을 나타내었고, 형태상의 차이점은 관찰되지 않았다.

이들 세포로부터 얻은 cDNA를 labeling하여 19K 올리고 칩과 hybridization 시켜서 유전자 발현을 분석하였다. Un-supervised hierarchial clustering을 실시하였을 때, 활성화된 HUVEC과 활성화되지 않은 HUVEC이 각각 clustering되

는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 각 lane의 data가 개개의 개체로부터 일차 배양된 HUVEC 세포로부터 얻어진 것을 감안할 때, 뚜렷하게 2 분법적으로 활성화된 그룹과 활성화되지 않는 그룹으로 clustering되지 않더라도, 단계적으로 그룹 내의 시료부터 clustering되어 나가는 패턴을 보이고 있어 일차 배양된 세포들이 실험조건 내에서 어느 정도 일관성 있는 세포 특성을 나타내는 것을 알 수 있다. 전체적으로 같은 세포 type에서 이루어진 실험이라 많은 유전자의 변화를 관찰할 수는 없었지만, 적어도 수십 개의 유전자들에서 발현의 차이가 현저하였다(Fig. 2).

**발현의 차이를 보이는 유전자들의 분석**

활성화된 HUVEC (AHUVEC)과 그렇지 않은 HUVEC (RHUVEC) 두 그룹의 유전자 발현의 clustering을 기초로,



Fig. 1. Unsupervised hierarchical clustering of activated HUVEC (AHUVEC) and non-activated HUVEC (RHUVEC). The global gene expression patterns of two types of HUVEC were sorted on based on similarity by hierarchical clustering. Approximately, 18,758 genes were selected from the total data set, based on 80% presence with  $SD \geq 0.2$ . Genes with similar up-regulation (red) or down-regulation (green) trend were placed close to each other. Yellow box indicates genes differently expressed in two samples.

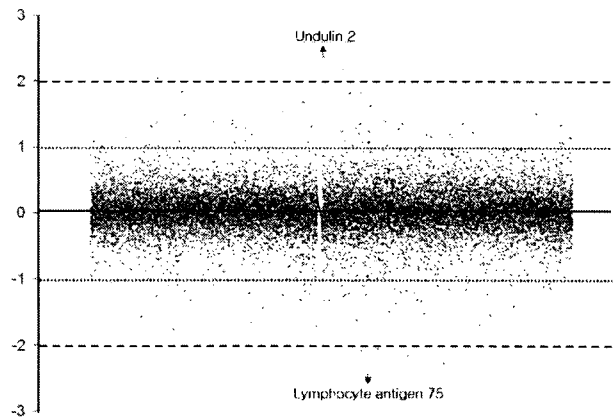


Fig. 2. Overview of the gene expression ratio of activated HUVEC vs. non-activated HUVEC. Most of gene expression profile is similar between two types of HUVEC. A few genes were expressed differentially, such as undulin 2 and lymphocyte antigen 75. Y column value represents  $\log_2$  ratio. The dotted line indicates 2 fold (---) or 4 fold (---) change.

구체적으로 발현의 차이를 보이는 유전자들을 조사하여 보았다. 먼저, AHUVEC이 RHUVEC 보다 2 배 이상 발현이 많이 되어 있는 유전자들을 분석하였다(Table 1). 총 58 개의 유전자들이 검색되었고 이중 11 개의 유전자에서 3 배 이상의 발현 증가가 관찰되었고 기능이 알려진 유전자는 7 개가 포함되었다. 발현이 2 배 이상 증가된 유전자들을 보면, 면역/염증관련 유전자와 세포 운동성 및 증식에 관련되어 있는 유전자들이 많이 포함되어 있는 특징을 나타내었다. 세포 운동성과 관련하여 matrix metalloproteinase 3, tissue-inhibitor of metalloproteinase 1, type 1 collagen, undulin 2, moesin, connective tissue growth factor, GDP-dissociation inhibitor protein, src family associated phosphoprotein 2 등의 발현이 증대되는 것이 관찰되었다. 이는 배양 조건으로 인해 세포들이 휴지기 상태에서 활성화 되면서 증식 및 이동에 관련된 유전자들의 발현이 증대된 것 같다. 기능이 아직 밝혀지지 않은 유전자들로 발현이 2 배 이상 증대된 것이 26 종 발견되었고(Table 2), 이중에는 혈관신생에 직접적으로 관련이 있는 것들도 포함되어 있을 것이라 생각되어진다.

이번에는 두 세포 그룹간의 유전자 발현 변화 중 활성화시킨 HUVEC에서 2 배 이상 발현이 감소된 유전자들을 분석해 보았다(Table 3). 2 배 이상 발현이 적은 유전자들은 총 64 개가 검색되었다. 이들 유전자들을 살펴보면, 활성화시킨 HUVEC에서는 세포의 흡착과 junction을 형성하거나 혈관의 morphogenesis와 형태 유지에 관련한 인자들의 발현이 상대적으로 적은 것을 알 수 있었다. 활성화시킨 세포에서 증식 및 세포 이동에 관련된 유전자들의 발현이 증가한 것과 상응하는 양상을 보이는 것을 알 수 있다. 15 종의 유전자가 3 배 이상 down-regulation된 것으로 관찰되었고, 이 중에서

Table 1. Up-regulated gene expression in activated HUVEC

Description	Function	GenBank ID	Fold change
undulin 2	extracellular matrix glycoproteins	M64109	4.8
steroid-5-alpha-reductase	metabolizing enzyme	NM_001047	4.4
selenoprotein N	selenium-rich plasma glycoprotein	AF166125	4.0
Friend leukemia virus integration 1	transcription factors	NM_002017	3.6
epithelial membrane protein 1	development, cell proliferation	NM_001423	3.6
natriuretic peptide precursor B	chloride channel inhibitor, regulation of vascular permeability	NM_002521	3.2
major histocompatibility complex, class I, F	immune response, antigen presentation	NM_018950	3.0
tissue inhibitor of metalloproteinase1	collagenase inhibitor, development, positive regulation of cell proliferation	NM_003254	2.8
heat shock 90kDa protein 1	protein folding	NM_007355	2.6
dual specificity phosphatase 6	inactivation of MAPK	NM_001946	2.6
solute carrier family 1	L-glutamate transport	NM_004170	2.6
zinc finger protein	regulation of transcription	X52345	2.6
GDP-dissociation inhibitor protein	GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein	L20688	2.6
chaperonin containing TCP1	protein folding	NM_001762	2.6
src family associated phosphoprotein 2	signal transduction, protein complex assembly	NM_003930	2.6
ribosomal protein L4	protein biosynthesis	NM_000968	2.4
matrix metalloproteinase 3	collagen catabolism	NM_002422	2.4
T-box 21	T-box transcription factor	NM_013351	2.4
connective tissue growth factor	development, cell motility, cell adhesion	NM_001901	2.4
heat shock 70kDa protein 8	protein folding	NM_006597	2.4
nuclear factor I/B	transcription-replication proteins	NM_005596	2.2
ClpX caseinolytic protease X	protein transport, protein folding	NM_006660	2.2
adenylosuccinate synthase	AMP biosynthesis	NM_001126	2.2
moesin	cytoskeleton, cell motility	NM_002444	2.2
GRB2-associated binding protein 1	scaffolding protein, cell proliferation	NM_002039	2.2
microsomal glutathione S-transferase 2	expressed in HUVEC and converts LTA4 into a single product	NM_002413	2.2
elongation factor TU	elongation factor	X03689	2.2
chemokine-like factor super family 6	chemotaxis	NM_017801	2.0
insulin-like growth factor binding protein 7	regulation of cell growth, regulation of cell proliferation	NM_001553	2.0
thioredoxin reductase 1	electron transport, signal transduction	NM_003330	2.0
Type I collagen	extracellular matrix	X55525	2.0
prolylcarboxypeptidase	serine protease	NM_005040	2.0

The expression profile of known genes up-regulated over 2-folds was presented.

12 개의 유전자가 그 기능이 알려져 있다. Eph-B4의 유전자가 약 4 배 이상 발현이 감소된 것으로 관찰되었는데, Eph-B4는 정맥의 morphogenesis에 중요하게 관여하는 것으로 보고 되었다[2,11,18]. 2 배 이상 발현이 적게 되는 유전자들 중에도 그 기능이 밝혀지지 않은 것들이 26 종 포함되어 있다(Table 2).

**혈관 신생에 관여하는 인자들의 발현 변화 검색**

마지막으로, 현재 혈관신생에 직접적으로 관여하는 것으로 잘 알려진 유전자들의 발현 변화를 조사하여 보았다. 실험이 수행된 조건에서 대부분의 알려진 혈관 신생 인자들의

발현이 유의성 있게 차이를 보이지 않는 것을 관찰할 수 있었다(Table 4). 다만, 앞서도 언급하였지만 정맥의 morphogenesis시에 중요하게 작용한다고 보고되어 있는 Eph-B4 유전자의 발현이 활성화시킨 HUVEC에서 그렇지 않은 HUVEC 보다 약 4 배 이상 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이는 제대 정맥에서 유래한 내피세포를 사용하여 조사하였기 때문에 정맥 내피세포의 특성이 두드러지게 나타난 것으로 생각된다. 10개의 암세포 세포주의 mRNA로부터 유래한 reference RNA를 기준으로 하였을 때 Eph-B4 뿐만 아니라, 두 그룹 간에 발현의 차이를 보이지 않았지만 염증관련 내피 세포 adhesion 분자인 ICAM2, vesicular endothelial growth

Table 2. Differential expression of unknown genes in activated HUVEC

Gene name (GenBank ID)	Fold change	Gene name (GenBank ID)	Fold change
FLJ10045 (AK000907)	+3.6	SERPINA1 (M26123)	-3.4
clone hmd3c12 (D16914)	+3.2	FLJ22690 (AK026343)	-3.4
SEC15L (AL137438)	+3.0	Insert cDNA (AF088044)	-3.2
FLJ10518 (AK001380)	+3.0	FLJ31660 (AK056222)	-2.8
RBIG1 (AK024697)	+2.8	H210 (M87790)	-2.6
FLJ13262 (AK023324)	+2.8	FLJ11494 (AK021556)	-2.6
HSPC285 (AF161403)	+2.8	COQ4 (BE899154)	-2.6
FLJ21042 (AK024695)	+2.6	MPDU1 (NM_004870)	-2.6
TCR 2 (AF140710)	+2.6	HSPC098 (AF161361)	-2.6
VMP1 (AK024969)	+2.6	DKFZp434M162 (AL137406)	-2.4
FLJ22209 (AK025862)	+2.6	KIAA0014 (NM_014665)	-2.4
FLJ22746 (AK026399)	+2.4	FLJ22545 (AK026198)	-2.4
LMO7 (NM_005358)	+2.4	cytokeratin 8 (D28446)	-2.4
xs127 (Z36874)	+2.2	PSAP (D17028)	-2.4
YN63B03 (AF075040)	+2.2	FLJ10561 (AK001423)	-2.4
xs138 (Z36789)	+2.2	C8orf17 (NM_020237)	-2.2
FLJ22191 (AK025844)	+2.0	KIAA0220 (AK023827)	-2.2
PLXNA2 (AB007932)	+2.0	RNase MRP (AF458223)	-2.2
G6PT1 (AK000422)	+2.0	RGS8 (AF300649)	-2.2
EEF1B2 (S81522)	+2.0	PART1 (NM_016590)	-2.2
FLJ21264 (AK024917)	+2.0	FLJ13154 (AK023216)	-2.2
HSPCA (D87666)	+2.0	SKP1A (D17203)	-2.2
HLH 1R21 (X69111)	+2.0	GBA2 (AB046825)	-2.2
FLJ14800 (AF131774)	+2.0	FLJ14349 (AK024411)	-2.0
MLLT2 (AF177238)	+2.0	NUP210 (AK026042)	-2.0
PRO0566 (AF116649)	+2.0	SYNJ2 (AL157424)	-2.0

factor (VEGF)의 major receptor인 KDR, 그리고 내피세포 특이적인 endothelin의 발현 수준도 높은 것을 관찰할 수 있었다.

### 고 찰

세포 증식 상태에 따라 내피세포의 세포 표면에 존재하는 단백질의 종류가 다르다는 것이 보고된 이래, 다양한 growth factor들에 의한 유전자 발현 양상 변화에 관심을 가져 왔다. 대부분이 특정 growth factor들에 의해 발현되는 유전자 패턴에 대한 보고가 주를 이루고 있다[1,20]. 본 연구에서는 다양한 growth factor들에 의해 영향 받을 수 있는 in vivo 조건을 고려하고, 이러한 복합적인 자극들에 의해 공통적으로 나타날 수 있는 혈관의 표적 분자들을 발굴하여, 개개의 growth factor들의 개별화된 표적 분자들 보다 효율적으로 조절될 수 있는 분자를 탐색하고자 하였다.

포괄적인 유전자 발현 분석을 통해 각 조직에 있는 내피 세포들의 발현 패턴이 다양하여 조직의 특성을 나타내는 것으로 최근에 보고되었다[7]. 흥미롭게도 본 실험에서 특이하게 활성화된 HUVEC에서 Eph-B4의 발현이 강하게 감소되었는데, 이는 Eph-B4가 정맥혈관의 확립에 주요한 역할을 하는 것을 고려할 때[2,11,18], 체대정맥에서 유래된 내피세포가

증식, 이동 모드로 전환됨에 따라 혈관 구조 및 기능을 유지하는 단백질의 발현이 감소된 것으로 생각된다. 올리고 칩을 이용한 분석을 통해 각종 growth factor들에 대한 인간 모세혈관 내피세포의 유전자 발현 패턴이 보고되었는데[19], 정량적인 평가가 이루어지지 않아 비교하기 어렵지만, 대체적으로 발현 차이를 보여주는 유전자들이 본 연구에서 제시한 것과 상당히 상이하였다. 유일하게 connective tissue factor의 발현 증가가 일치하는 경우로 관찰되었다. 최근에는 주요한 혈관신생 인자인 VEGF에 의해 활성화된 HUVEC의 유전자 발현 양상이 보고된 바 있지만[1], 제시된 유전자 발현 패턴 또한 본 실험 및 앞에서 언급된 모세혈관 내피세포의 유전자 발현 양상과도 상이한 pattern을 보여 주고 있다[19]. 이러한 상이한 결과는 내피세포의 종류, 사용된 chip, 그리고 활성화에 사용된 인자들의 종류 등의 차이에 의해 나타나는 것으로 추정된다. 따라서, 본 연구 결과로부터 얻은 유전자 발현 분석에서 나온 결과는 새로운 혈관신생 표적 분자로 개발하기 앞서, 분자, 세포학적인 보다 자세한 연구를 통한 검증이 필요할 것 같다.

최근에는 혈관 내피세포의 자극 인자로서 염증 유발 인자인 TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , LPS에 의한 유도되는 유전자 발현을 비교 분석하였을 때, 공통적으로 발현이 조절되는 유전자들도 있

Table 3. Down-regulated gene expression in activated HUVEC

Description	Function	GenBank ID	Fold change
lymphocyte antigen 75	immune response	NM_002349	4.8
phospholipid transfer protein	lipid transport, lipid metabolism	NM_006227	4.6
Ins(1,3,4,5)P4-binding protein	calcium homeostasis	X89399	4.6
Eph-B4	organogenesis, vascular development	NM_004444	4.4
E2F transcription factor 4	transcription factor	NM_001950	4.2
tyrosine phosphatase, receptor type, F	cell adhesion, protein tyrosine phosphatases	NM_002840	4.2
TSC-22-like protein	transcriptional repressor activity	AJ133115	3.6
nuclear transcription factor Y, gamma	regulation of transcription	NM_014223	3.4
CD22 antigen	cell adhesion	NM_001771	3.2
thyroid hormone receptor-associated protein	regulation of transcription, transcription initiation from Pol II promoter	NM_014815	3.2
distal-less homeo box 3	morphogenesis and development	NM_005220	3.0
zinc finger protein 205	regulation of transcription	NM_003456	3.0
olfactory receptor, family 7	spermatogenesis	NM_017506	2.8
complement component 1, q subcomponent, receptor 1	cell-cell adhesion	NM_012072	2.8
cathepsin F	acid protease, generate LDL-derived lipid	NM_003793	2.8
zinc finger protein 147	putative transcription factor, carcinogenesis	NM_005082	2.6
keratin 18	cytoplasmic network, differentiation-dependent manner	NM_000224	2.6
ryanodine receptor 3	intracellular calcium release channels, calcium ion homeostasis	NM_001036	2.6
alanyl aminopeptidase	membrane-bound metalloproteases, angiogenesis	NM_001150	2.6
inter-alpha (globulin) inhibitor	extracellular interaction	NM_002216	2.4
claudin 4	tight junction-associated proteins	NM_001305	2.4
cytokine receptor-like factor 1	metabolism, development	NM_004750	2.4
dynactin 1	microtubule-binding, neurogenesis	NM_004082	2.4
cytokeratin 8	cytoplasmic network, differentiation-dependent	D28446	2.4
calreticulin	antigen chaperone molecules, regulation of transcription	NM_004343	2.4
echinoderm microtubule associated protein like 2	binding to microtubules and other cytoskeletal components	NM_012155	2.4
RAS p21 protein activator 2	intracellular signaling cascade	NM_006506	2.4
stanniocalcin 2	cell-cell signaling, response to nutrients	NM_003714	2.2
retinoic acid receptor, beta	morphogenetic stabilizing activity	NM_000965	2.2
metallothionein 2A	metal detoxification and homeostasis, cell growth	NM_005953	2.2
H2A histone family, member X	nucleosome assembly, chromosome organization and biogenesis	NM_002105	2.2
putative protein kinase	low blood pressure, while deletions of the WNK1	AJ296290	2.2
ERK activator kinase	ERK activator kinase	L11285	2.2
cyclin-dependent kinase inhibitor	cyclin-dependent kinase inhibitor	U03106	2.2
LIV-1 protein	subfamily of zinc transporters	NM_012319	2.0
amphiphysin	endocytosis, synaptic transmission	NM_001635	2.0
selenoprotein P	selenium binding, response to oxidative stress	NM_005410	2.0
mesoderm specific transcript	catalytic activity	NM_002402	2.0

The expression profile of known genes down-regulated over 2-folds was presented.

지만 상이한 조절을 받는 유전자들도 있는 것이 보고 되어 [20], 이들 인자중 하나인 TNF- $\alpha$  만을 차단하는 것으로는 염증을 완전히 억제시키지 못한다는 임상 실험 결과를 뒷받침하기도 하였다. 따라서, 본 연구에서 실시한 복합적인 자극인자에 의해 발현의 증감이 현저한 유전자를 탐색하는 전략은

이런 측면에서 효과적인 방법이 될 수 있겠다.

활성화시키는 조건에서 배양한 세포의 경우 세포의 증식, 이동에 관한 유전자의 발현이 증가된 반면, 세포의 흡착 및 혈관 조직의 유지에 관련한 유전자의 발현이 감소된 점은 예상된 내피세포의 기본적인 특성이 잘 반영된 것으로 생각되

Table 4. The expression profile of angiogenic markers in activated HUVEC

Gene name	GenBank ID	Signal intensity <sup>a</sup>		Fold change <sup>c</sup>
		AH <sup>b</sup>	RH <sup>b</sup>	
integrin beta1	X07979	0.9	0.1	+1.6
integrin alpha V	NM_002210	0.7	0.1	+1.2
integrin alpha 5	NM_002205	0.8	0.6	+0.4
integrin beta 5	NM_002213	-0.3	-0.3	0.0
integrin beta 3	NM_000212	0.1	0.6	-1.0
PECAM1	NM_000442	1.3	1.0	+0.6
CD34 antigen	NM_001773	0.01	0.1	-0.2
CD47 antigen	NM_001777	0.2	0.1	+0.2
selectin P	NM_003005	0.3	0.1	+0.4
ICAM1	NM_000201	0.1	0.2	-0.2
ICAM2	NM_000873	4.6	4.4	+0.4
KDR/flk-1	AF035121	3.5	3.4	+0.2
vWF	NM_000552	1.1	0.9	+0.4
endothelin 1	NM_001955	2.2	1.6	+1.2
NOTCH4	NM_004557	-0.5	-0.3	-0.4
eNOS	NM_015953	0.7	0.5	+0.4
Eph-B4	NM_004444	-0.4	1.8	-4.4
endoglin	NM_000118	-0.1	0.7	-1.6
COX-2	NM_000963	0.3	0.6	-0.6

<sup>a</sup>log<sub>2</sub> ratio of reference.<sup>b</sup>AH ; activated HUVEC, RH ; non-activated HUVEC.<sup>c</sup>Differential expression : +; up-regulated, - ; down-regulated.

며, 이 관점에서 같은 분석 system에서 확인된 기능이 알려져 있지 않은 유전자들이 새로운 혈관 표적 단백질 탐색에 효과적으로 이용될 수 있음을 시사한다.

## 요 약

혈관 신생은 암의 성장 및 전이 뿐만 아니라 염증, 관절염, 건성, 동맥경화 등의 병적인 진행에 주요한 역할을 하며, 혈관신생 억제제를 통한 암의 치료를 시도하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 혈관 신생 시 내피세포의 증식, 이동을 유도하는 활성화 과정이 필수적으로 일어나는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 in vitro에서 내피세포를 배양하여, 각종 growth factor가 풍부한 배지에서 활성화 시켰을 때, 그렇지 않은 세포들과의 유전자 발현 형태를 비교 조사하였다. HUVEC을 70~80% confluency로 배양시킨 후에 endothelial cell growth supplement (ECGS), 20% fetal bovine serum, heparin이 첨가된 M199 배지에서 13 시간 활성화 시킨 세포(AHUVEC)와 대조군 세포(RHUVEC)로부터 분리한 total RNA로부터 cDNA를 제작하였고, 이것을 18,864 개의 유전자가 올려져있는 인간 올리고 칩과 hybridization 반응을 시켰다. 반응된 유전자를 이용하여 random clustering 분석을 실시한 결과, 활성화 시켰던 HUVEC과 그렇지 않은

HUVEC으로 dendrogram 상에서 두개의 subgroup으로 나뉘어 지는 것을 확인할 수 있었다. 최소 2 배 이상 발현 변화가 있는 유전자 122 종이 활성화 시켰던 HUVEC으로부터 추출되었다. 이 중에서 기능이 알려진 32 개의 유전자는 활성화 시킨 HUVEC에서 발현이 증가하였고, 38 개의 유전자 발현은 감소하였다. 흥미롭게도 세포 증식과 이동, 염증, 면역반응에 관련한 유전자의 발현이 증가된 반면에 세포 흡착과 혈관 조직과 기능에 관련한 유전자의 발현이 감소된 것이 관찰되었다. 예상 외로 규명이 잘된 혈관신생 인자와 관련한 유전자들의 발현에는 크기 차이를 보이지 않았으나, Eph-B4의 발현은 약 4 배 감소된 것으로 관찰되었다. 또한, 2 배 이상 발현에 차이를 보이고 기능이 알려져 있지 않은 유전자 52 종이 발견되었다. 따라서, 이러한 연구 결과로부터 새로운 혈관 표적 물질 개발에 대한 기회가 제공될 수 있을 것이라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국 과학재단의 강원대 혈관연구센터 연구비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Abe, M. and Y. Sato. 2001. cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 289-298.
2. Adams, R. H., G. A. Wilkinson, C. Weiss, F. Diella, N. W. Gale, U. Deutsch, W. Risau and R. Klein. 1999. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 13, 295-306.
3. Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver and J. M. Isner. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 18, 3964-3972.
4. Asahara, T., T. Murohara, M. Sullivan, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
5. Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner and J. M. Isner. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 85, 221-228.
6. Bussolino, F., A. Mantovani and G. Persico. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci.* 22, 251-256.
7. Chi, J. T., H. Y. Chang, G. Haraldsen, F. L. Jahnsen, O. G. Troyanskaya, D. S. Chang, Z. Wang, S. G. Rockson, M.

- van de Rijn, D. Botstein and P. O. Brown. 2003. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **16**, 10623-10628.
8. Chuaqui, R. F., R. F. Bonner, C. J. Best, J. W. Gillespie, M. J. Flaig, S. M. Hewitt, J. L. Phillips, D. B. Krizman, M. A. Tangrea, M. Ahram, W. M. Linehan, V. Knezevic and M. R. Emmert-Buck. 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.* **32**, 509-514.
  9. Churchill, G. A. 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **32**, 490-495.
  10. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27-31.
  11. Gerety, S. S., H. U. Wang, Z. F. Chen and D. J. Anderson. 1999. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor Eph-B4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol. Cell* **4**, 403-414.
  12. Gill, M., S. Dias, K. Hattori, M. L. Rivera, D. Hicklin, L. Witte, L. Girardi, R. Yurt, H. Himel and S. Rafii. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ. Res.* **88**, 167-174.
  13. Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and R. Minick. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745-2756.
  14. Kalka, C., H. Masuda, T. Takahashi, W. M. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J. M. Isner and T. Asahara. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3422-3427.
  15. Moulton, K. S., K. Vakili, D. Zurakowski, M. Soliman, C. Butterfield, E. Sylvain, K. M. Lo, S. Gillies, K. Javaherian and J. Folkman. 2003. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4736-4741.
  16. O' Reilly, M. S., L. Holmgren, C. Chen and J. Folkman. 1996. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* **2**, 689-692.
  17. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
  18. Wang, H. U., Z. F. Chen and D. J. Anderson. 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-753.
  19. Zhang, H. T., M. Gorn, K. Smith, A. P. Graham, K. K. Lau and R. Bicknell. 1999. Transcriptional profiling of human microvascular endothelial cells in the proliferative and quiescent state using cDNA arrays. *Angiogenesis* **3**, 211-219.
  20. Zhao, B., S. A. Stavchansky, R. A. Bowden and P. D. Bowman. 2003. Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, 1577-1583.