대한성형외과학회지. 제 33 권, 제 1 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 33, No. 1, 5 - 12, 2006

신호전달 경로의 저해제를 이용한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 기전에 대한 연구

배용찬 · 박숙영 · 남수봉 · 허재영 · 강영석

부산대학교 의과대학 성형외과학교실

A Study for the Mechanism of Abnormal Proliferation in Vascular Endothelial Cells using Inhibitors to the Signal Transduction Pathway

Yong Chan Bae, M.D., Suk Young Park, M.D.,
Su Bong Nam, M.D., Jae Young Herh, M.D.,
Young Seok Kang, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Pusan National University, Busan, Korea

Protein tyrosine kinase(PTK), protein kinase C(PKC), oxidase, as a mediator, take a significant role in signal transduction pathway of angiogenesis. The authors utilized the inhibitors, targeting the formation of three co-enzyme in signal transduction pathway in order to quantify the suppression of abnormal vascular endothelial cell proliferation induced by DMH, to compare the level suppression in each up-regulated growth factors, CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2, and to identify the relationship between abnormal cell proliferation and signal transduction pathway. Five groups were established; Control group, Group of DMH, Group of DMH-mixed Herbimycin, inhibitor of protein tyrosine kinase, Group of DMH-mixed Calphostin C, inhibitor of protein kinase C, Group Of Dmh-Mixed 10 U Catalase, Inhibitor Of oxidase. The rise of vascular endothelial cell was compared by MTT assay, and four growth factors were analysed with RT-PCR method, at pre-administration, 4, 8, 12, and 24 hours after administration. In comparison of abnormal proliferation of vascular endothelial cell induced by DMH, suppression was noticed in Herbimycin and Calphostin C group, and Calphostin C group revealed higher suppression effect. Nevertheless, Catalase group did not have any suppression. In manifestation of four growth factors, Herbimycin and Calphostin C group presented similar manifestation with control group, except in ITGβ. Catalse group had similar manifestation with DMH group in all four growth factors. Abnormal proliferation of vascular endothelial cell induced by DMH have a direct relationship with PTK and PKC, more specifically to PKC. Oxidase was confirmed not to have any relevance.

Key Words: Proliferation, Angiogenic growth factor, Vascular endothelial cells

Received September 27, 2005
Revised November 8, 2005

Address Correspondence : Yong Chan Bae, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Pusan National University, 1-10 Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea. Tel: 051) 240-7269 / Fax: 051) 243-9405 / E-mail: bayc2@hanmail.net

I. 서 론

혈관형성의 신생과 재생 기전은 혈관 내피세포와 관련된 매개체 즉 전달물질과 성장인자 등의 상호작용 및 다양한 신호 전달 경로(signal transduction pathway)에 따라 이뤄지며,[1-4] 이러한 복잡한 과정 중에서 신호 전달 경로의 중요한 매개분자로 주목받고 있는 효소로서는 protein tyrosine kinase(PTK), protein kinase C(PKC), oxidase를 들 수 있다.[4-9] 혈관 형성의 비정상적인 증식 과정도 이와 유사한 경로를 가지고 있으므로, 비정상적인 세포 증식과 깊은 연관을 가진 신호 전달 과정을 예측해 보기 위해서 저해제를 이용한 신호 전달 경로의 교란 방법을 사용하였다. 이에 대한 기초 연구로서 저자들은 혈관종양을 유발한다고 알려진 DMH(1,2-dimethylhydrazine)를 이용하여 *in vitro*에서 HUVECs(human umbilical vein endothelial cells)의 증식을 유발하는 실험모델을 만들었고, 비정상적으로 증식이 유발된 혈관 내피세포에서 차등적으로 발현되는 인자들을 확인하였다.[10] 따라서 위 세 가지 매개효소의 생성에 대한 각각의 저해제를 사용하여 DMH에 의해 유도되는 비정상적인 세포 증식 과정에서 저해 정도를 알아보고, 동시에 이전 연구에서 확인된 성장인자로서의 CTGF (connective tissue growth factor), CYR61(cysteine-rich 61), ITGβ1(integrin beta 1), FHL2(four and half LIM domains 2) 발현의 저해 효과를 비교하여 비정상적인 세포 증식과 깊은 연관을 가진 신호 전달 과정을 예측하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

혈관내피세포는 분리가 용이하고 혈관형성에 관련된 실

험에 주로 이용되고 있는 인체 제대정맥 내피세포(HUVECs)을 이용하였다. 세포주는 'Modern Tissue Technologies, Inc.'로부터 분양받았다. HUVECs은 계대배양을 10회 이상할 경우 세포의 변형이 일어날 수 있으므로, 본 실험에서는 8회를 넘기지 않았다. 세포는 5% CO_2, 37℃ 조건의 가습된 배양기에서 배양하였다.

Protein tyrosine kinase(PTK)의 저해제로는 모든 세포 영역에서 효과를 인정받은 Herbimycin을 선택하였고,[4] protein kinase C(PKC)와 관련된 저해제도 여러 종류가 있지만 그 중에서도 PKC의 활성저해에 대표적으로 사용되는 Calphostin C를 선택하였다.[7] 또한 Oxidase의 저해제로서는 잘 알려진 Catalase를 이용하였다.

가. 세포증식 저해물질 농도결정

HUVECs을 96 well plate에 배양한 후, PTK에 대한 저해물질 Herbimycin, PKC의 저해물질 Calphostin C, Oxidase의 저해제 Catalase를 세포에 단독 처리하였다.

처리하지 않은 대조군의 세포 성장율과 비교했을 때, 저해제 단독처리시에는 대조군의 세포성장율에 변화를 주지 않는 농도를 결정해야했으므로, 저해제 처리 후 세포수를 관찰한 결과, Herbimycin 6×10^{-9} M, Calphostin C 5×10^{-9} M, Catalase 10U 농도에서 대조군과 비슷한 세포성장을 나타내었다(Fig. 1).

나. *in vitro*에서 혈관내피세포의 증식 유도와 증식 저해물질 처리

1) DMH를 이용한 세포증식 유도

96well plate에 각 well 당 10^4개로 HUVECs을 분주하고, EBM완전배지(Endothelial cell basal medium, 0.1% hEGF(human epidermal growth factor), 0.1% hydrocortisone, 0.1% GA-1000, 0.4% BBE(bovine brain extract), 2% FBS(fetal bovine serum))로 배양하고, 2일째는 무혈청 배지로 교체하여 1일간 배양하였다. 3일째에 세포의 비정상 증식을 유도하는 DMH를 10^{-1} ng/ml 농도로 처리하였다. 세포배양은 5% CO_2와 37℃ 조건의 가습된 배양기에서 배양하였다.

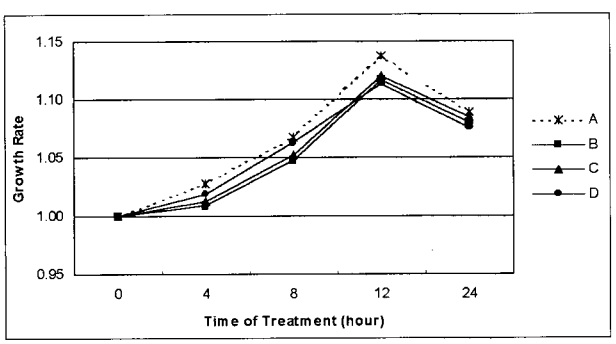

Fig. 1. Measured growth rate depending on time after treatment with three inhibitors for growth factors. A, untreated group (control); B, 6×10^{-9} M Herbimycin; C, 5×10^{-9} M Calphostin C, D, 10 U Catalase.

2) 세포증식에 대한 저해물질 처리 후 세포수 측정

a. 성장인자에 대한 저해제 처리

혈관 내피세포의 비정상적인 증식을 유도하는 모델에서 DMH를 처리할 때, 세포 증식의 억제물질인 Herbimycin, Calphostin C, Catalase를 DMH와 각각 동시 처리하였다. 처리 농도는 Herbimycin 6×10^{-9} M, Calphostin C 5×10^{-9} M, Catalase 10 U 농도로 DMH와 함께 처리하였다. 처리 전과 처리 후 4시간, 8시간, 12시간, 24시간에서 세포의 저해정도를 관찰하였다.

b. MTT(the tetrazolium salt) assay

처리 시간에 따른 세포의 저해를 MTT assay 방법으로 비교하였다.

DMH와 저해물질이 포함된 배양배지를 완전히 제거하고, 각 well에 MTT labeling reagent(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여(최종 농도는 0.5 mg/ml), 5% CO_2, 37℃ 조건의 가습된 배양기에서 5시간 반응시켰다. 반응액을 조심스럽게 제거한 후, DMSO(dimethylsulfoxide)을 각 well에 넣고 5분간 반응시켰고, 환원된 MTT를 완전히 용해시켜 scanning multiwell spectrophotometer(ELISA reader, Molecular Devices, USA)를 사용하여 570 nm의 파장에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다.

다. 세포증식에 대한 저해제 처리 후 성장인자의 발현양상 비교

DNA chip 분석을 통해 얻은 성장인자들의 유전정보를 이용하여 각각의 primer를 제작하였다. DMH와 저해제의 처리시간에 따른 대조군과 처리군에서 RNA를 추출하고, RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 시행하여 증폭 band를 비교하였다(Table I).

1) RNA 추출

RNA 추출 과정 중 세포 파괴 시에도 RNA가 RNase에 노출될 수 있으므로, RNA 추출 시에는 RNase 저해제인 DEPC(Diethyl pyrocarbonate), 4 M-Guanidine isothiocyanate, β-mercaptoethanol 등이 포함된 용액을 사용하였다. RNA 추출 시행 전 모든 기구는 증기멸균을 하였으며, 증기멸균이 불가능한 기구는 0.1% DEPC-treated water (0.1% DEPC 25 + 75% water)로 세척하였다. 실험 중 기구는 반드시 polyglove와 mask를 착용한 후 오염되지 않도

Table I. Specific Primer's Sequences of Selected Gene in Regulation Related Gene in HUVECs by DMH

Name		Sequence	Product Size
CTGF	sense	5′-gca gct ggg cga gct gtg cac cg	(331-353, 23 mer)
	antisense	5′-gcc tga cca tgc aca ggc g	(866-848, 19 mer)
CYR61	sense	5′-gct gga atg caa ctt cgg cg	(442-461, 20 mer)
	antisense	5′-gcc gca cct cac aaa tcc g	(1028-1010, 19 mer)
ITGβ1	sense	5′-gct gga gga atg tta cac g	(923-941, 19 mer)
	antisense	5′-gcc ctt cat tgc acc tgc acg	(1609-1588, 21 mer)
FHL2	sense	5′-gcc ctt tgc tgc caa gga gg	(813-832, 20 mer)
	antisense	5′-gca gtc gtt atg cca ctg ccg	(1323-1303, 21 mer)

록 하였고, RNA의 불안정으로 인하여 항상 실험환경은 저온(4℃)을 유지시켰다.

RNA 추출의 과정은 대조군과 처리군의 plate에서 배양배지를 제거 후, 세포층을 HBSS(Hank's base salt solution)로 세척하고 0.25% trypsin-EDTA를 처리하였다. 부유된 세포를 15 ml 관에 담아 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였으며, 관 바닥의 세포 덩어리만 남기고 용액을 완전히 제거한 후, 1 ml TRIzol®(phenol + guanidine isothiocyanate)을 첨가하였다. RNA의 방출이 용이하도록 피펫을 사용하여 반복적으로 현탁하여 실온에서 5분간 반응시키고, chloroform첨가하여 12,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 분리된 층 중에서 RNA가 함유된 최상층액만을 분리하여 1.5 ml 관으로 옮기고 isopropanol을 첨가하였다. 12,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하고 RNA 덩어리만 남기고 나머지 용액을 제거하였다. 0.1% DEPC가 처리된 물로 만든 75% ethanol로 세척하였고 7,500 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하였다. RNA덩어리를 37℃에서 가볍게 건조시킨 후 RNase가 포함되지 않은 물로 RNA를 용해시키고, 초저온 냉동고에 보관하였다.

2) 추출한 RNA 정량분석

추출한 RNA의 순도와 양을 측정하기 위해 정량분석을 시행하였다. RNA와 DNA는 260 nm의 파장을 흡수하고 단백질은 280 nm의 파장을 흡수하는 원리를 이용하여 260 nm와 280 nm의 파장에서 그 흡광도를 분광측정기(spectrophotometer)를 사용하여 측정하였다. 추출한 RNA의 A_{260}과 A_{280}의 비(A_{260}/A_{280})는 1.8로 측정되었다.

3) RT-PCR 반응

선별된 물질들의 DMH 처리시간에 따른 발현 정도를 알고자 RT-PCR을 실시하였으며, 성장인자와의 연관성도 살펴보았다.

a. 역전사 반응(RT)

성장인자에 대한 유전자를 증폭시키는 PCR은 cDNA상태에서 반응이 진행되므로 각 시간대에서 추출한 대조군과 처리군의 RNA를 cDNA로 전환시키는 역전사 과정을 다음과 같이 실행하였다.

각각의 100 ng RNA와 100 pmole oligo dT primer를 섞어서 65℃에서 5분간 반응시킨 후, 얼음 위에서 식혔다. 반응액을 RT premix(Bioneer, Korea)넣고 최종부피 20 ㎕가 되도록 RNase free water를 첨가한 뒤 잘 배합하여 42℃에서 60분을 두고, 다시 94℃에서 5분간 반응시켰다. 역전사 반응을 마친 용액은 4℃ 보관하였다.

b. 성장인자의 primer에 대한 증폭반응(PCR)

RT반응을 마친 용액과 선별 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣고 최종부피 20 ㎕가 되도록 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 그리고 각 primer에 대한 Tm(melting temperature)이 다르므로 두 가지 과정으로 나누어 PCR 과정을 진행하였다.

CTGF, CYR61, FHL2에 대한 primer가 첨가된 관은 94℃에서 5분 동안 반응시킨 뒤, 94℃(30초)-61℃(1분)-72℃(1분) 과정을 21번 반복하고, 72℃서 5분간 반응을 완료하였다. ITGβ1의 primer가 첨가된 관은 94℃에서 5분간 반응시킨 뒤, 94℃(30초)-56℃(1분)-72℃(1분) 과정을 21번 반복하고, 72℃에서 5분간 반응을 완료하였다.

c. 전기영동 및 PCR 단편의 흡광도 측정

PCR 반응을 마친 용액은 1% 아가로스 겔로 전기영동하였고, Ethidium bromide(Sigma, USA)를 이용하여 PCR 단편을 염색시켰다. 염색된 PCR 띠는 Gel image analysis system(UVItec, UK)을 사용하여 PCR 띠의 밝기와 굵기 정도를 육안으로 확인하고 사진을 얻었으며, 동일한 기계에서 UV 365 nm 파장으로 각 PCR 단편에 대한 흡광도를

측정하였다. 또한 측정한 흡광도를 이용하여 그래프로 전환시켰고, 각각의 그래프를 이용하여 선별물질에 대한 대조군과 처리군의 시간별 발현차이를 비교분석 하였다.

라. 통계 처리 및 검정

세포증식 저해제 농도결정 및 세포증식에 대한 저해제 처리 후 세포수 측정, 세포증식에 대한 저해제 처리 후 성장인자의 발현양상 비교 실험 모두 같은 실험 과정을 9회 반복하였으며, 0, 4, 8, 12, 24 시간별로 대조군 및 DMH에 의한 세포증식군에 대한 각각의 처리군과의 비교 결과를 Tukey test를 사용하여 통계적으로 분석하였다. $p<0.001$의 경우에 한하여 통계적 유의성을 부여하였다.

III. 결 과

가. *in vitro*에서 혈관내피세포의 증식 유도와 증식 저해제 처리

HUVECs에 세포의 비정상적인 증식을 유도하는 DMH와 세포성장에 대한 protein tyrosine kinase의 저해제 Herbimycin, protein kinase C의 저해제 Calphostin C, oxidase의 저해제 Catalase와 동시 처리하여 세포의 증식률을 측정하였다(Fig. 2).

DMH와 Herbimycin의 동시처리군은 DMH 처리군과의 비교에서 처리 후의 모든 시간대에서 현저한 차이를 보였으며, 오히려 세포증식률은 대조군과 비슷한 양상을 보였다. 대조군보다 처리 후 4시간에서 감소하였고, 처리 후 8시간과 12시간, 24시간에서는 대조군보다 조금 증가하였다.

DMH와 Calphostin C의 동시처리군은 Herbimycin과 같이 DMH 처리군과의 비교에서 처리 후 모든 시간에서 현저한 차이를 보였으며, 처리 후 세포증식률은 대조군과 거의 일치함을 알 수 있었다. 대조군보다 처리 후 4시간에서 역시 조금 감소하였고, 처리 후 8시간, 12시간은 대조군과 거의 일치하였으며, 처리 후 24시간에서 대조군보다 약간 증가하였다.

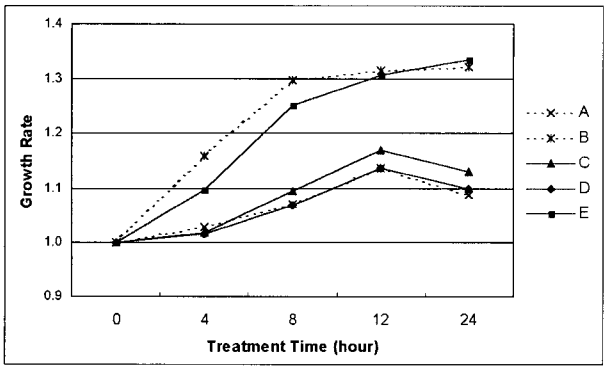

Fig. 2. Measured growth rate depending on time after treatment with DMH and inhibitors of growth factors. A, control group; B, 10^{-1} ng/㎖ DMH; C, DMH and Herbimycin; D, DMH and Calphostin C, E, DMH and Catalase.

DMH와 Catalase의 동시처리군에서는 Herbimycin과 Calphostin C와 대조적으로 대조군과의 비교에서 처리 후 모든 시간대에서 현저한 차이를 보였으며, 오히려 세포증식률은 모든 시간대에서 DMH 처리군과 비슷한 양상을 볼 수 있었다. 처리 후 8시간까지는 증식률이 DMH 처리군보다 낮았으나, 처리 후 12시간에서는 DMH 처리군와 거의 일치하였고, 처리 후 24시간에서는 DMH 처리군보다 조금 증가함을 보였다.

DMH에 의해 유도되는 비정상적인 세포 증식의 저해효과는 Herbicmycin 동시처리군과 Calphostin C 동시처리군에서 확인할 수 있었고($p<0.001$), Catalase 동시처리군에서는 저해 효과가 없는 것으로 나타났다($p>0.001$).

나. 세포증식에 대한 저해제 처리 후 성장인자의 발현양상 비교

혈관 내피세포인 HUVECs의 비정상적인 증식을 유도한 저자들의 이전 '*in vitro* 모델' 연구에서, 대조군과 처리군 간에 발현의 차이를 보인 물질들 중 알려진 성장인자와 밀접한 관계에 있는 또 다른 혈관형성인자를 규명할 수 있었는데, 이들 물질이 CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2이다. 이러한 네 가지 물질에 대한 specific primer를 제작하였고(Table I), DMH와 각각의 저해제를 동시 처리 전 0시와 처리 후 6, 12시, 24시간에서 RNA를 추출하여 RT-PCR 기법으로 세포 내 이들 물질에 대한 발현 양상을 비교해 보았다.

CTGF의 경우, Herbimycin 동시처리군은 0시간에서 처리 후 24시간까지 지속적인 발현 증가를 보였다. 대조군과 비교해볼 때, 처리 후 4시간에서는 보다 감소하였고, 처리 후 8시간, 12시간에서는 증가하였으며 처리 후 24시간에서는 동일하였다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 모든 시간대에서 발현이 낮았다. Calphostin C 동시처리군은 0시간에서 처리 후 24시간까지 지속적인 증가를 보였으며, 대조군과 비교했을 때, 처리 후 모든 시간대에서 발현 정도가 약간 낮게 나타났으나 통계적 차이는 없었다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 모든 시간대에서 발현이 낮았다. Catalase 동시처리군은 0시간부터 처리 후 24시간까지 지속적인 발현증가를 보였다. 대조군과는 처리 후 모든 시간대에서 발현이 높게 나타났고, DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 8시간까지는 DMH 처리군보다 발현이 낮았으나 처리 후 12시간, 24시간에서는 발현정도가 동일하였다(Fig. 3).

CYR61의 경우, Herbimycin 동시처리군에서는 처리 후

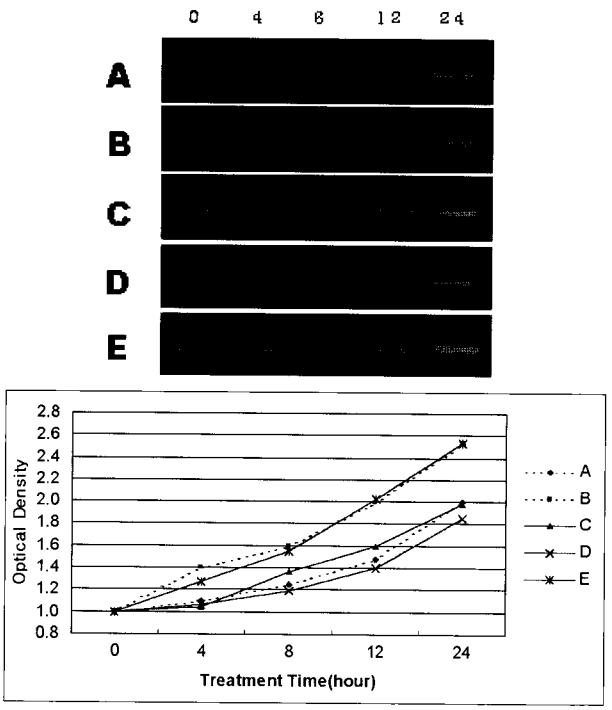

Fig. 3. (Above) CTGF mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH(10^{-1} ng/ml) and inhibitors, the cells were collected in 0, 4, 8, 12 and 24 hour. A, control (non treatment; B, DMH treatment; C, DMH and Herbimycin(6×10^{-9} M) treatment; D, DMH and Calphostin C(5×10^{-9} M) treatment; E, DMH and Catalase(10 U) treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

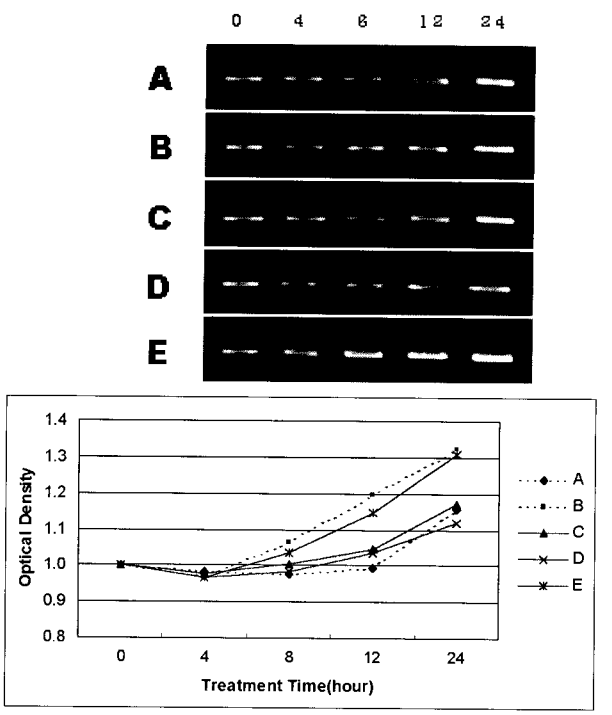

Fig. 4. (Above) CYR61 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH(10^{-1} ng/㎖) and inhibitors, the cells were collected in 0, 4, 8, 12 and 24 hour. A, control (non treatment); B, DMH treatment; C, DMH and Herbimycin(6×10^{-9} M) treatment; D, DMH and Calphostin C(5×10^{-9} M) treatment; E, DMH and Catalase(10 U) treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

4시간에서 발현이 감소하였고, 처리 후 8시간 이후로는 지속적으로 발현이 증가하였다. 대조군과 비교해 볼 때, 처리 후 4시간, 8시간에서는 발현이 같았고, 12시간에서 대조군보다 증가하였으며, 처리 후 24시간에서는 동일하였다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 4시간에서 발현이 동일하였고, 처리 후 8시간 이후로는 발현이 낮았다. Calphostin C 동시처리군에서도 처리 후 4시간에서 발현의 감소를 보였고, 처리 후 8시간 이후로는 지속적으로 발현이 증가하였다. 대조군과의 비교에서 처리 후 4시간, 8시간에서는 발현이 같았고, 처리 후 12시간에서는 대조군보다 높았으나 처리 후 24시간에는 발현이 낮았다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 4시간에서는 발현정도가 동일하였고, 처리 후 8시간 이후로는 DMH 처리군보다 발현이 낮았다. Catalase 동시처리군에서도 위의 두 가지 저해제와 마찬가지로 처리 후 4시간에서 발현이 감소하였고, 처리 후 8시간 이후에는 계속적인 증가를 보였다. 대조군과의 비교에서 처리 후 4시간에서는 대조군과 같았으나, 처리 후 8시간 이후에는 발현이 높았다. DMH 처리군과 비교해 볼 때, 처리 후 4시간, 8시간에서는 발현이 동일하였고, 처리 후 12시간에서는 DMH 처리군보다 발현이 낮았으나 처리 후 24시간에서는 같았다(Fig. 4).

ITGβ1의 경우, Herbimycin 동시처리군은 0시간 이후로 지속적인 발현 증가를 보였다. 대조군과의 비교에서는 처리 후 12시간까지 발현이 낮았으나, 처리 후 24시간에서는 발현이 같았다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 4시간에서 발현이 같았으나, 이후 모든 시간대에서는 발현이 낮았다. Calphostin C 동시처리군은 처리 후 4시간에서 발현이 감소하였고, 처리 후 8시간 이후로는 지속적으로 발현이 증가하였다. 대조군과의 비교에서는 Herbimycin 동시처리군과 동일한 결과를 보였고, DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 모든 시간대에서 발현이 낮았다. Catalase 동시처리군은 0시간 이후 지속적인 발현 증가를 보였으며, 대조군과 비교했을 때, 처리 후 4시간, 8시간에는 발현이 낮았고, 처리 후 12시간에서는 같았으며, 처리 후 24시간에서는 발현이 높았다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 모든 시간대에서 발현이 낮았다(Fig. 5).

FHL2의 경우, Herbimycin 동시처리군은 0시간 이후로 지속적인 발현 증가를 보였다. 대조군과 비교해 볼 때, 처

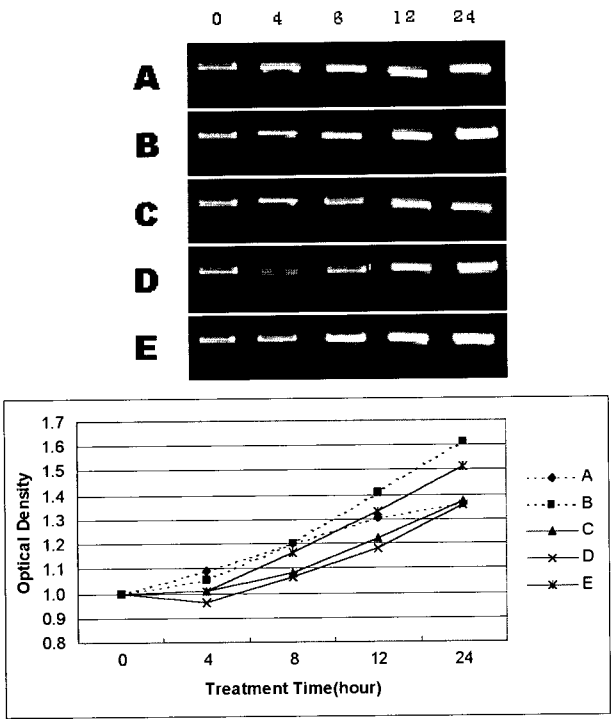

Fig. 5. (Above) ITGβ1 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH(10^{-1} ng/㎖) and inhibitors, the cells were collected in 0, 4, 8, 12 and 24 hour. A, control (non treatment); B, DMH treatment; C, DMH and Herbimycin (6×10^{-9} M) treatment; D, DMH and Calphostin C(5×10^{-9} M) treatment; E, DMH and Catalase(10 U) treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

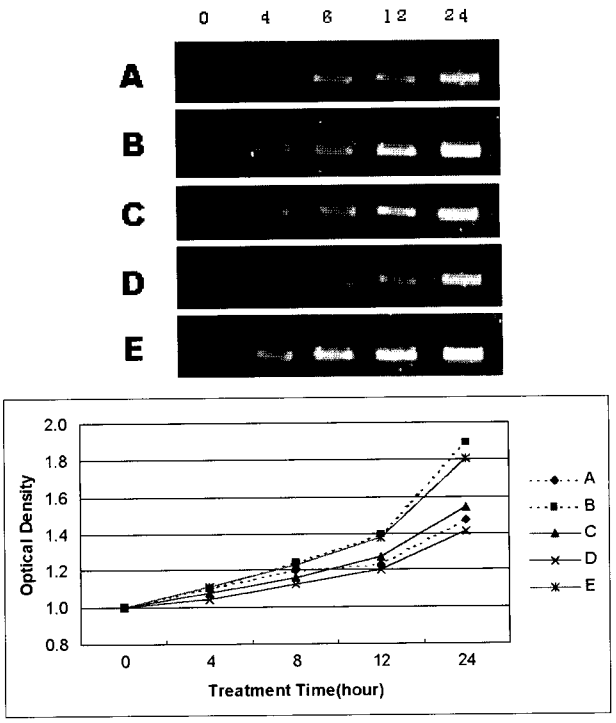

Fig. 6. (Above) FHL2 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/㎖) and inhibitors, the cells were collected in 0, 4, 8, 12 and 24 hour. A, control (non treatment); B, DMH treatment; C, DMH and Herbimycin (6×10^{-9} M) treatment; D, DMH and Calphostin C(5×10^{-9} M) treatment; E, DMH and Catalase(10 U) treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

리 후 4시간에서는 발현이 같았고, 처리 후 8시간에서는 낮았으며, 처리 후 12시간, 24시간에서는 발현이 높았다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 4시간에서 발현이 같았으나 이후 모든 시간대에서는 발현이 낮게 나타났다. Calphostin C 동시처리군도 0시간 이후 지속적인 발현 증가를 보였다. 대조군과의 비교에서는 처리 후 4시간, 8시간에서 발현이 낮았고, 처리 후 12시간에서는 같았으나, 처리 후 24시간에서는 발현이 높았다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 모든 시간대에서 발현이 낮게 나타났다. Catalse 동시처리군 또한 0시간 이후 지속적으로 발현이 증가하였다. 대조군과의 비교에서는 처리 후 4시간에서 발현이 같았으나, 이후 시간대에서는 모두 발현이 높게 나타났다. DMH 처리군과의 비교에서는 처리 후 24시간대를 제외하고 모든 시간대에서 발현이 동일하였다(Fig. 6).

위에서 언급한 것과 같이, 비정상적인 증식이 일어난 HUVECs의 세포 내에서 성장인자로서 선별된 CTGF와 CYR61, ITGβ1, FHL2에 대한 specific primer를 이용하여 DMH와 저해제를 동시처리한 후 이들 4가지 물질의 발현을 비교한 결과, CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2의 발현률은 Calphostin C 동시처리군에서 가장 낮음을 보였다. 그리고 네가지 성장인자의 증폭반응에서 공통적으로 나타난 것은 Herbimycin과 Calphostin C 동시처리군이 ITGβ1을 제외한 세 가지 성장인자에서는 대조군과 발현양상이 비슷하였으며, Catalase 동시처리군은 네 가지 성장인자 모두 DMH 처리군과 발현양상이 비슷함을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

새로운 혈관 형성이 정상적인 신체 상태에서는 일어나지 않는데, 상처 치유 과정이나 염증 반응과 같은 상황, 혹은 종양이나 당뇨망막증 등과 같은 병적인 상태에서 발생하게 된다.[1] 전자와 같은 정상적인 반응에서 관찰할 수 있는 혈관 형성과 함께, 특히 후자와 같은 병적 상태에서 혈관 형성의 정확한 기전을 알아낼 수 있다면, 혈관 형성 과정을 조절할 수 있게 됨으로서 질병의 치유가 가능할 수 있을 것으로 생각되어 진다. 이에 저자들은 이러한 비정상적인 혈관 형성의 기전을 알아보기 위한 기초 연구로서 첫째, 이전의 연구에서 혈관종양을 유발한다고 알려진 DMH

(1,2-dimethylhydrazine)를 이용하여 *in vitro*에서 HUVECs (human umbilical vein endothelial cells)의 증식을 유발하는 실험모델을 만들었고,[10] 둘째, DNA microarray 기법을 이용하여 DMH에 의해 비정상적으로 증식이 유발된 혈관 내피세포에서 차등적으로 발현되는 인자들을 확인하였다. 그리고 이러한 인자들에 대한 RT-PCR을 통해 시간에 따른 발현양상을 분석하여 DMH에 의한 HUVECs의 비정상적인 증식의 기전을 설명하기 위한 대표적인 성장 인자들을 선별할 수 있었다. 이러한 이전의 연구 결과를 바탕으로, 비정상적인 혈관 내피세포 증식과 깊은 연관을 가진 신호 전달 과정을 예측해 보고자, protein tyrosine kinase, protein kinase C, oxidase가 혈관형성과 관련된 신호 전달 경로에서 중요한 매개분자로 주목받고 있는 효소이므로, 이들에 대한 저해제를 사용하여 혈관 내피세포의 수를 측정해 보고, 각각의 저해제 동시 처리군에서 앞서 말한 대표적인 성장 인자의 발현 정도를 알아보았다.

Protein tyrosine kinase는 세포의 성장에 결정적인 작용하는 인자로써, 세포형태와 증식, 분화에 영향을 주며, EGF(epidermal growth factor), PDGF(platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) 등의 성장인자들의 활성으로 신호를 전달하여 세포의 증식을 유도한다.[4-6,9] Protein kinase C 역시 세포 증식을 조절하는 인자로 잘 알려져 있고, 세포질 내 신호전달에 중요한 역할을 하는 효소지만 변이가 발생할 시 세포증식의 조절에 문제가 발생하고 종양성 세포에서 활성이 증대된다고 한다.[7,8] 그리고 Oxidase의 경우 세포 내 활성산소의 농도를 감소시키며, 그것이 원인이 되어 혈관형성을 촉진시킨다고 한다.[2] 또 다른 매개분자로서의 성장인자는 2가지 부류로 분류되는데, 내피세포를 직접 자극하는 인자(direct angiogenic factor, DAF)와 혈관주위 세포를 자극하여 DAF의 생성을 통하여 혈관신생을 유발하는 인자(indirect angiogenic factor, IAF)이다. 이들 중 현재 혈관형성과 관련되어 가장 주목받고 있는 물질로는 VEGF(vascular endothelial growth factor)로써, 혈관내피세포를 분열 증식시키는 가장 강력한 물질로 알려져 있다.[3] 저자들은 여러 가지 성장인자들 중에서 CTGF(connective tissue growth factor), CYR61 (cysteine-rich 61), ITGβ1(integrin beta 1), FHL2(four and half LIM domains 2) 4가지를 대상으로 연구하였는데, 이들 4가지 성장인자들은 등록된 유전자정보와 RT-PCR 기법을 통해 세포 내 발현 양상을 비교하여 알려진 성장인자의 발현을 촉진하거나 스스로 성장인자로서 역할을 한다는 것을 이전 저자들의 연구에서 확인된 결과 등을 참조하여 알게 되었다.[3,11-13] 그리고 이들 4가지 성장인자들은 VEGF의 활성촉진으로 세포증식에 관여하는 것으로 알려져 있다.[3,10-13]

세포 증식 저해 물질의 농도 결정을 위해서 HUVECs을 96 well plate에 배양한 후, PTK에 대한 저해제 Herbimycin, PKC의 저해제 Calphostin C, Oxidase의 저해제 Catalase를 세포에 단독 처리하였다. 처리하지 않은 대조군의 세포 성장율과 비교했을 때, 세포저해제 단독 처리시에는 대조군의 세포성장율에 변화를 주지 않는 농도를 결정해야했으므로, 저해제 처리 후 세포수를 관찰한 결과, Herbimycin 6×10^{-9} M, Calphostin C 5×10^{-9} M, Catalase 10 U 농도에서 대조군과 비슷한 세포성장을 나타내었다($p>0.001$). 3종류 저해제 모두 처리 후의 모든 시간대에서 대조군보다 세포성장율은 낮았으며, 저해제간 비교에서 Herbimycin과 Calphostin C 저해제는 모든 시간대에서 세포성장률이 거의 동일하였고 Catalase는 처리 후 12시간 이후에서 Herbimycin과 Calphostin C 저해제와 성장률이 거의 일치하였다(Fig. 1).

혈관형성의 비정상적인 증식을 효과적으로 저해시키는 방법으로 현재 가장 많이 이용되는 것이 신호 전달 경로의 교란이다. 저자들은 2가지 실험을 통해 비정상적인 혈관 내피세포 증식과 깊은 연관을 가진 신호 전달 과정을 예측해 보고자 하였다. 첫 번째로 위 3가지 매개효소의 생성에 대한 각각의 저해제를 이용하여 DMH에 의해 유도되는 비정상적인 혈관 내피세포 증식의 저해 정도를 MTT assay로 알아봄으로서 3가지 매개효소와 관련된 신호 전달 과정 중 가장 연관이 깊은 경로를 예측해 보고자 하였다. 실험 결과 DMH와 Herbimycin의 동시처리군과 DMH와 Calphostin C의 동시처리군은 DMH 처리군과의 비교에서 처리 후의 모든 시간대에서 현저한 차이를 보였으며, 오히려 세포증식률은 대조군과 비슷한 양상을 보였다. 특히 처리 후 24시간대까지 Calphostin C 동시처리군은 대조군과 통계학적인 차이가 없는 것으로 보아 DMH에 의한 비정상적인 혈관 내피세포 증식과 가장 깊은 연관이 있을 것으로 추측되어지나, Herbimycin의 동시처리군도 깊은 연관이 있을 것으로 추측되어지며, 이들 두 group 간의 통계학적 차이는 없었다. 그러나, DMH와 Catalase의 동시처리군에서는 Herbimycin과 Calphostin C와 대조적으로 대조군과의 비교에서 처리 후 모든 시간대에서 현저한 차이를 보였으며, 오히려 세포증식율은 모든 시간대에서 DMH 처리군과 비슷한 양상을 보여 줌으로서 저해 효과가 없는 것으로 판단되며, DMH에 의한 비정상적인 혈관 내피세포 증식과는 연관이 없는 것으로 추측되어진다.

두 번째로 위 3가지 매개효소의 생성에 대한 각각의 저해물질을 이용하여 DMH에 의해 유도되는 비정상적인 혈관 내피세포 증식의 저해 정도를, 선별된 4가지 성장인자인 CYR61, ITGβ1, FHL2에 대한 specific primer를 이용하여 DMH와 저해제를 동시처리한 후 이들 4가지 물질의 발

현을 비교함으로서 저해 효과를 비교해 보았다. 그 결과, CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2의 발현률은 Calphostin C 동시처리군에서 가장 낮았으며, 네 가지 성장인자의 증폭반응에서 공통적으로 나타난 것은 Herbimycin과 Calphostin C 동시처리군이 ITGβ1을 제외한 세 가지 성장인자에서는 대조군과 발현양상이 비슷하였고, Catalase 동시처리군은 네 가지 성장인자 모두 DMH 처리군과 발현양상이 비슷함을 알 수 있었다.

이러한 내용을 종합해 볼 때, '*in vitro* 모델'을 이용하여 유도한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식은 Calphostin C에 의해 가장 효율적으로 저해된다고 할 수 있으며, Herbimycin의 효과도 어느 정도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자들은 혈관형성의 비정상적인 증식을 효과적으로 저해시키는 방법으로 현재 가장 많이 이용되는 것이 신호 전달 경로(signal transduction pathway)의 교란이므로, 3가지 신호전달경로인 PTK, PKC, Oxidase에 대한 저해제를 사용하여 DMH 처리로 유도된 혈관 내피세포의 비정상적인 증식에 효과를 보인 저해제를 구별할 수 있다면, 효과를 보인 저해제에 대한 신호 전달 경로와 깊은 연관이 있다고 추측할 수 있다는 점에 착안하였다. PTK의 저해제로서 Herbimycin과 PKC의 저해제로 Calphostin C, Oxidase의 저해제로 Catalase를 DMH와 함께 동시 처리했을 때, DMH에 의해 유도되는 비정상적인 혈관 내피세포의 증식 저해 효과는 Herbicmycin 동시처리군과 Calphostin C 동시처리군에서 확인할 수 있었으나, Catalase 동시 처리군에서는 저해 효과가 없는 것으로 나타났다. 그리고 네 가지 성장인자의 발현 양상을 비교하였을 때, Herbimycin 동시처리군과 Calphostin C 동시 처리군은 ITGβ1을 제외한 세 가지 성장인자에서는 대조군과 발현양상이 거의 동일하였으며, Catalase 동시처리군은 네 가지 성장인자 모두 DMH 처리군과 발현 양상이 비슷함을 알 수 있었다. 이 중에서도 Calphostin C 동시처리군이 Herbimycin 동시처리군보다 저해 효과나 성장인자의 발현 양상의 비교에서 대조군의 양상과 비슷하였다.

이러한 내용을 종합해 볼 때, '*in vitro* 모델'을 이용하여 유도한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식은 Calphostin C에 의해 가장 효율적으로 저해된다고 보이므로 PKC의 신호전달 과정과 깊은 관련이 있으며, Herbimycin의 효과도 어느 정도 영향을 미치므로 PTK에 대한 경로도 유의할 필요가 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Folkman J: Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757, 1995
2. Bischoff J: Perspectives series; Cell adhesion in vascular biology. *J Clin Invest* 99: 373, 1997
3. Veikkola T, Alitalo K: VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biol* 9: 211, 1999
4. Lutz MP, Silke Eβer IB, Flossmann-Kast BBM, Vogelmann R, Luhrs H, Friess H, Buchler MW, Adler G: Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 503, 1998
5. Levitzki A: Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 82: 231, 1999
6. Farivar RS, Thorpe JG, Ito H, Arshad H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE: The efficacy of tyrosine kinase inhibitors on human pancreatic cancer cell lines. *J Surg Res* 115: 219, 2003
7. Grabam MA, Rawe I, Dartt DA, Joyce NC: Protein kinase C regulation of corneal endothelial cell proliferation and cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4124, 2000
8. Chabannes E, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Adessi GL, Bittard H: Protein kinase C signalling pathway is involved in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in human bladder transitional carcinoma cells. *Cell Signal* 13: 585, 2001
9. Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG: Sphingosine1-phosphat induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 743, 1999
10. Kim HO, Kang YS, Bae YC, Park SY, Hwang SM, Nam SB: Gene expression profiling of 1,2-Dimethylhydrazine-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 858, 2004
11. Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y: Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactiveate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 277: 36288, 2002
12. Brigstock DR: Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor(CTGF) and cysteine-rich 61(CYR61). *Angiogenesis* 5: 153, 2002
13. Amaar YG, Thompson GR, Linkhart TA, Chen ST, Baylink DJ, Mohan S: Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J Biol Chem* 277: 12053, 2002