

The Role of Sirtuin-2 in Tubular Forming Activity of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Seok Yun Jung¹, Chul Min Kim¹, Da Yeon Kim¹, Dong Hyung Lee², Kyu Sup Lee², Sang-Mo Kwon^{1*}

¹Laboratory of Vascular Medicine & Stem Cell Biology, Department of Physiology, School of Medicine, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

²Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received October 15, 2012 / Revised December 26, 2012 / Accepted January 6, 2013

Sirtuin proteins have emerged as important modulators of several age-associated diseases. These include cancer and diabetes, as well as cardiovascular and neurodegenerative diseases. Among the sirtuin family members, SIRT2 mRNA is strongly expressed. To investigate the pathophysiological significance of SIRT2 as a primary regulator of angiogenesis, we focused on the biological role of SIRT2 under hypoxic conditions, examining the gene expression pattern of sirtuin family members in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). SIRT2 was expressed primarily in the cytoplasm, but it was dynamically trans-located in the nuclear by hypoxia stimuli. Interestingly, both SIRT2 and the pro-angiogenic factor, VEGF, were up-regulated by hypoxia. A Matrigel assay demonstrated that the HUVECs formed a tube-like structure under hypoxia. The SIRT2 inhibitor, AK-1, significantly decreased the tube-forming activity of the HUVECs under either normoxia or hypoxia conditions. These findings suggest that SIRT2 might be a key regulator of angiogenesis.

Key words : SIRT2, hypoxia, angiogenesis, HUVEC

서 론

Silent Information Regulator-2 (SIR2)는 박테리아부터 식물, 동물에 이르기까지, 다양한 종에서 생명을 연장하고 노화를 지연시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다[7]. 포유류에서는 sirtuin으로 명명되는데, sirtuin 단백질이 암, 당뇨병, 뇌 신경계 질환 같은 노화와 관련한 질병과 연관이 있다는 연구 결과들에 의해서 이들 단백질에 대한 관심이 증가하고 있다. Sirtuin 단백질은 SIRT1-7의 총 7종이 보고되어 있고, 이 단백질들은 중심부위에 NAD⁺-binding site와 catalytic domain을 가진다[6,10,21,22]. Sirtuin 단백질 중 SIRT1, 2, 3, 5는 NAD⁺-dependent deacetylase, SIRT4와 6는 ADP-ribosyl-transferase로 작용하는 것으로 알려져 있으나, SIRT7의 기능에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다[1, 12, 13, 15, 20]

인체의 각 조직은 다양한 산소농도를 가지는데, 동맥혈의 경우 14%의 pO₂를 유지하나, 대부분의 조직은 5% 이하의 pO₂로 유지되고 있다[4]. 조직 내의 낮은 산소상태는

Hypoxia-inducible factors (HIFs)를 안정화시키고, 이 전사인자에 의해서 혈관신생 성장인자(pro-angiogenic factor)들이 유도되며, 혈관신생(angiogenesis)이 촉진된다고 알려져 있다 [8,23,24]. Hypoxia에서의 Sirtuin 단백질에 대한 연구는 SIRT1에 대한 결과가 보고되었는데, NAD⁺-dependent deacetylase인 SIRT1은 HIF-1 α 의 transcriptional activity를 억제하고, HIF-2 α 를 탈아세틸화 시켜 그것의 transcriptional activity를 증가시킴으로써 HIF- α 의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[5,11].

본 연구에서는, HUVEC을 이용하여 hypoxia에 의한 Sirtuin 단백질의 발현 정도를 비교하고 가장 강하게 발현되는 SIRT2 단백질에 초점을 두고 실험하였다. 그리고 Hypoxia에 의한 SIRT2의 세포 내 발현양상과 혈관신생에 관여하는 성장인자 발현을 확인하고, SIRT2 특이억제제인 AK-1을 사용하여 혈관형성능력의 변화를 조사함으로써 Hypoxia상태에서 증진되는 혈관신생에서의 SIRT 기능을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

인간 제대혈 유래의 혈관내피세포인 Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC)은 5% FBS가 포함된 EGMTM-2MV BulletKitTM (Lonza)에 100 μ g/ml penicillin streptomycin (Welgene)을 첨가하여 사용하였다. 세포는 1% gelatin (sigma)로 코팅한 culture dish에 깔아 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8075, Fax : +82-51-510-8076

E-mail : smkwon323@hotmail.com

S.Y. J. and C.M. K. are equally contributed in this work

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 배양하였으며, 세포가 80~90% confluence가 되면 Trypsin-EDTA (Welgene)을 처리하여 계대배양하였다.

Hypoxia 유도 실험

세포에 저산소 상태를 유발하기 위해서 50 μM의 CoCl₂ (Sigma)나 100 μM의 DFO (Deferoxaminemesylate salt, Sigma)를 처리하여 저산소 상태와 유사한 환경을 조성하거나, 2% O₂, 5% CO₂, 93% N₂로 이루어진 혼합가스를 주입한 hypoxia chamber를 사용하였다.

RNA 추출 및 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

RNA는 Trizol[®] (TAKARA)을 사용하여 분리하고 멸균한 3차 증류수에 녹여 사용하였다. cDNA 합성은 PrimScript[™] 1st strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA)를 사용하여 RNA 1 μg을 포함하는 반응액으로 60분 동안 42°C에서 진행하였다. HUVEC에서의 SIRT1-7의 발현은 TaKaRa Ex Taq[™] (TAKARA)를 이용하여 타겟 DNA를 합성하여 전기영동을 통해 확인하였다.

면역조직화학염색 및 관찰

HUVEC을 6-well plate에 HUVEC을 2.5x10⁴개로 심고 안정화된 후, 100 μM의 CoCl₂를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 3번 세척하고 2% paraformaldehyde (Wako)에 5분간 반응시킨 후 PBS로 5분간 세척하고 0.1% Triton X-100 (Sigma)에 5분간 반응시켰다. anti-SIRT2 (1:100; abcam)를 2% BSA가 첨가된 PBS 용액에 희석하여 4°C에서 12시간 처리하고 PBS로 세척 후, 형광이 부착된 2차항체(1:200; anti-rabbit Alexafluor 488 anti-rabbit IgG, invitrogen)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 핵 염색을 위하여 상

온에서 1분간 4',6-diamidino-2-(DAPI; Invitrogen)를 반응시켰다. 염색된 샘플은 형광현미경(Olympus)을 사용하여 관찰하였다.

Matrigel을 이용한 저산소환경(hypoxia condition)에서의 혈관투브형성능력 비교 실험

Matrigel Matrix (Becton Dickinson)를 96 well plate에 40 μl씩 넣어 37°C CO₂ incubator에서 30분 배양시켜 겔로 굳혔다. Matrigel위에 10,000개의 HUVEC과 1%의 FBS를 포함한 EBM-2 배지 100 μl를 넣어 3시간 30분 배양하였다. Hypoxia는 hypoxia chamber를 이용하였으며, SIRT2 inhibitor인 AK-1 (3-(azepan-1-ylsulfonyl)-N-(3-nitrophenyl) benzamide, Calbiochem)을 10 μM 처리하였다. HUVEC의 혈관형성능력은 Image J 프로그램을 사용하여, 세포의 길이를 측정하고 Excel로 통계처리 하였다.

결 과

저산소상태에서의 인간 제대혈 유래의 혈관내피세포(HUVEC)의 세포형태

Hypoxia에 의해 세포의 성장(growth), 부착(attachment), 증식(proliferation) 능력이 증진된다는 보고를 바탕으로, 먼저 HUVEC을 hypoxia 상태에서 배양하였을때, 세포의 형태를 확인하였다. 광학현미경으로 관찰한 결과, 정상산소상태(normoxia)에서 보다 hypoxia chamber에서 18시간 배양한 세포의 부착능력과 세포상태가 더 양호하였다(Fig. 1).

저산소상태에서의 HUVEC세포의 SIRT family member의 발현

Hypoxia에 의해 인간 제대혈 유래의 혈관내피세포에서의

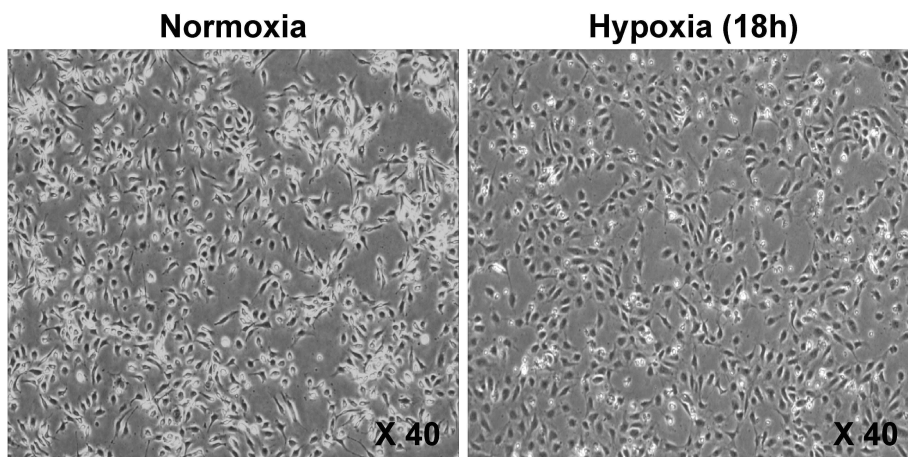


Fig. 1. Morphological change of HUVEC under normoxia or hypoxia. HUVEC incubated under 5% CO₂ incubator or 2% O₂ hypoxia chamber. After incubation for 18 hours, morphological change of hypoxic or normoxia conditioned HUVEC was examined using microscopy (x40 magnification).

SIRT family member의 발현을 확인하기 위해서, hypoxia 상태에서 4시간 배양한 세포에서의 SIRT family의 mRNA 발현을 측정된 결과, hypoxia상태의 HUVEC에서 SIRT1-5가 발현되며, SIRT1, 3, 4는 SIRT2, 5에 비해 현저하게 약하게 발현됨을 확인하였다. 그 중 SIRT2의 mRNA 발현이 가장 강한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 사실을 바탕으로 하여, hypoxia와 SIRT2의 연관성을 알아보려고 다음의 실험을 진행하였다.

저산소상태에서의 SIRT2의 핵 내 이동현상

SIRT2 단백질은 주로 세포질 내에 존재하며, 세포주기에 의존하여 세포분열의 간기(interphase)와 유사분열(mitosis)동안에 핵 내로 이동한다고 보고되었다[15, 16]. 이러한 연구결과들을 바탕으로 hypoxia에 의해 SIRT2 단백질이 세포질에서 핵 내로 이동하는지 확인하기 위하여, CoCl₂를 50 μM의 농도로 처리하여 hypoxia와 유사한 상태를 HUVEC에 주어 24시간 배양하였다. 그리고 면역조직화학염색법을 이용하여

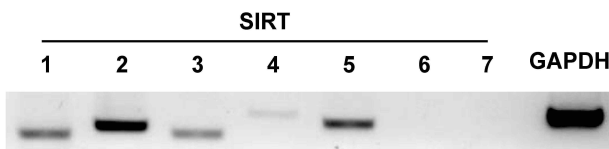


Fig. 2. mRNA expression of SIRT family members in HUVEC. HUVEC were cultured under hypoxia chamber for 4 hours. The mRNA expression pattern of SIRTs (1-7) was analyzed by RT-PCR.

SIRT2가 세포 내에 발현되는 위치를 확인한 결과, Normoxia에서는 SIRT2가 세포질에서 발현되었으나, Hypoxia에 의해 세포질에 위치해 있던 SIRT2가 핵 내로 이동된 것을 확인하였다(Fig. 3).

저산소상태에서의 SIRT2 발현과 혈관신생성장인자의 발현 증가

기존의 연구들은 Hypoxia가 HIF-1α를 안정화시키고, 안정화된 HIF-1α에 의해 혈관신생성장인자의 발현을 유도하여 혈관신생을 일으킴을 보고하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 하여 Hypoxia에 의해 HUVEC에서 SIRT2와 혈관신생성장인자가 유도되는지를 mRNA 발현을 확인하였다. DFO를 100 μM의 농도로 처리하여 세포에 hypoxia를 유도하여 24시간 배양한 결과, 기존 연구결과와 마찬가지로 hypoxia에 의해 HIF-1α의 mRNA 발현이 강하게 증가하였다(Fig. 4).

SIRT2 억제제에 의한 HUVEC의 혈관투브형성능력 감소

Fig. 4에서 Hypoxia에 의해 SIRT2와 VEGF의 발현이 증가한 사실을 바탕으로 하여, SIRT2의 발현에 의해서 혈관신생이 조절되는지 알아보기 위하여, Matrigel assay를 수행하였다. Matrigel에 HUVEC을 심고, SIRT2 억제제인 AK-1을 10 μM을 배지에 처리하여 normoxia와 hypoxia chamber를 이용한 hypoxia상태에서 3시간 30분을 배양하였다. 그 결과, normoxia 배양에서 보다 hypoxia배양에 의해 HUVEC의 혈관투브형성능력이 현저하게 증가한 것을 관찰하였으며, 산소농도가 다른

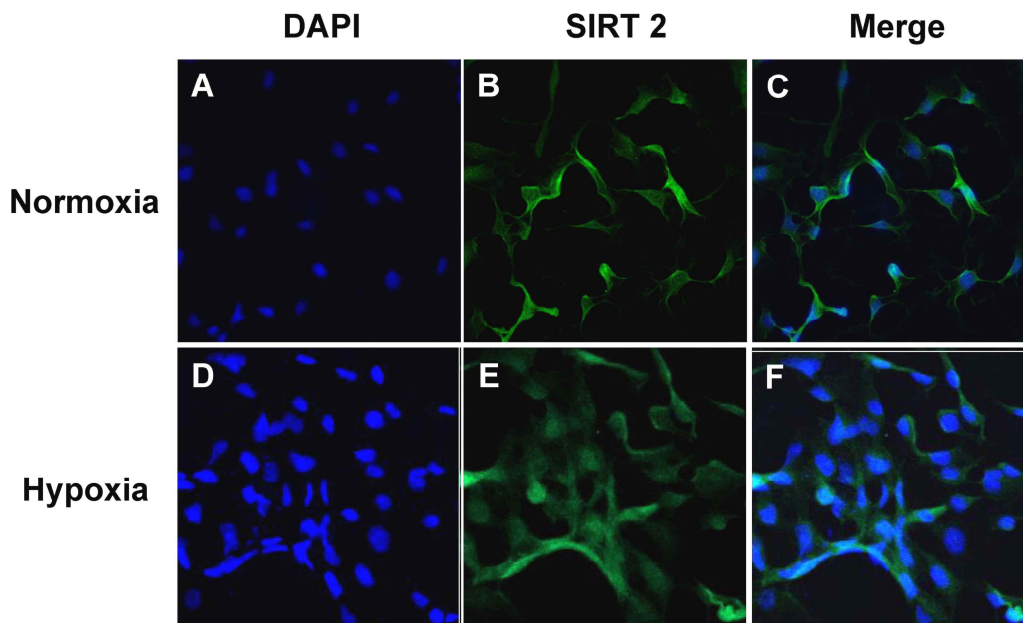


Fig. 3. Trans-localization of SIRT2 by hypoxia. HUVEC were cultured under normoxia for 24 hours with or without CoCl₂ 50 μM. CoCl₂ induced hypoxia-mimic condition in the cells. Representative immunofluorescence of SIRT2 (Green) in HUVEC. SIRT2 expressed in the cytoplasm under normoxia (A-C), but translocated into nucleus by hypoxic signals (D-F).

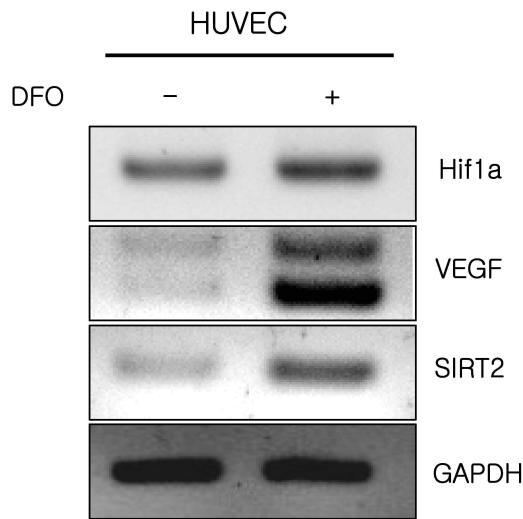


Fig. 4. Enhanced expression of SIRT2 and VEGF by hypoxia. HUVEC were cultured in condition of normoxia for 24 hours with or without DFO 100 μ M. DFO can induce hypoxia-mimic condition in the cells. Hypoxia up-regulated HIF-1 α , SIRT2, and pro-angiogenic factor, VEGF.

두 배양조건에 SIRT2 억제제인 AK-1을 처리하였을 때 모두 HUVEC의 혈관튜브형성능력이 감소됨을 관찰하였다(Fig. 5). 이를 통해서 SIRT2의 발현억제를 통해서 HUVEC의 혈관형성능력이 억제됨을 확인하였다.

고찰

Sirtuin family 단백질은 암, 당뇨, 심혈관 질환, 뇌신경계 질환과 같은 노화와 연관된 질병들의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[2, 3, 9, 13, 14, 18, 19]. Sirtuin 단백질 중 SIRT2 단백질은 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경질환의 치료제로, 이 단백질의 억제제를 사용할 수 있음을 보고한 연구결과가 있다[17]. 또한, SIRT2가 세포주기 진행을 조절하고, α -tubulin을 디아세틸화시킨다는 보고가 있다[15]. 최근 SIRT2 억제제를 분석한 논문에서는 SIRT2 유전자 억제와 약물을 이용한 발현억제를 통해서 세포배양 동안 쌓이는 α -synuclein 독성을 줄여줌을 보고하였다[17]. 하지만 혈관형성과정에서의 SIRT family의 발현양상과 그 기능에 대해서는 알려진 바가 없어 본 연구에서는 혈관내피세포인 HUVEC을 이용하여 Hypoxia에서의 sirtuin family의 발현확인을 통해, 혈관형성과정에서의 SIRT 단백질의 역할을 규명하고자 하였다. HUVEC에 hypoxia 자극을 주어 7가지의 SIRT family 단백질의 발현양상을 확인한 결과, Hypoxia에 의해서 SIRT family 단백질 중 SIRT2가 가장 강하게 발현이 되었다(Fig. 2). 이 결과를 바탕으로 하여 Hypoxia 상태에서의 SIRT2의 기능을 밝히고자 면역조직화학염색을 사용하여 SIRT2의 세포 내 발현양상을 관찰하였다. 정상산소상태에서의 SIRT2는 대부분 세포질에 존재하고 있으나, hypoxia에 의해서 SIRT 단백질이 핵

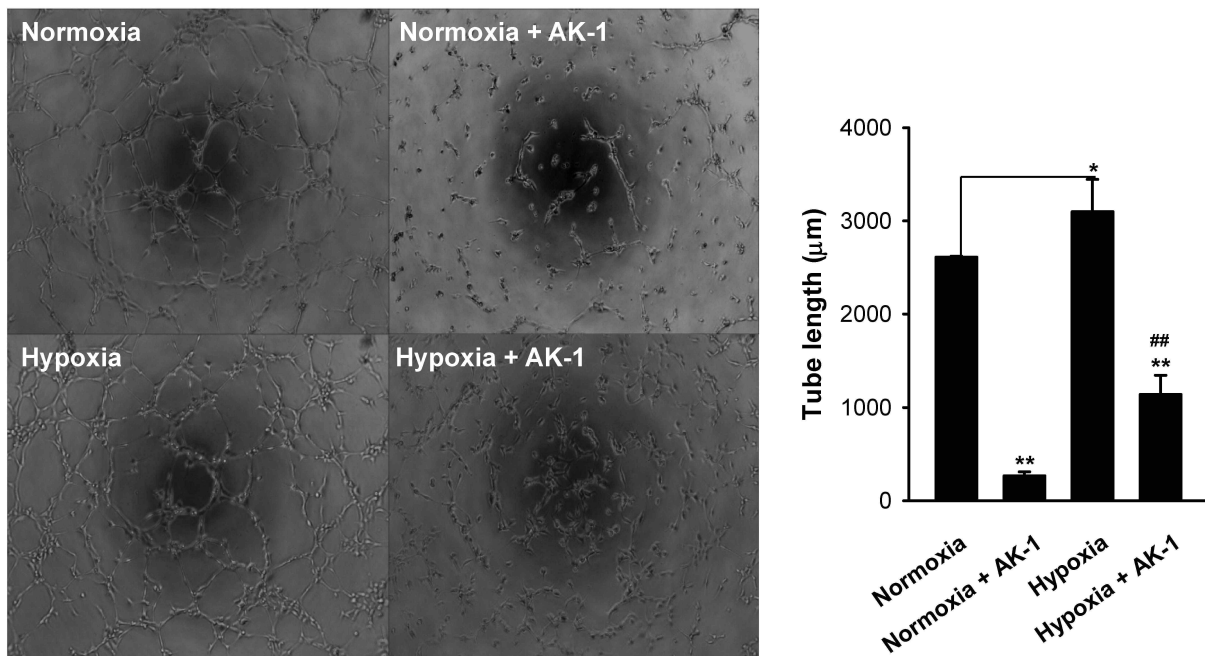


Fig. 5. Inhibitory tubular formation activity of HUVEC by SIRT2 inhibitor, AK-1. HUVEC were cultured on matrigel matrix under normoxia or hypoxia for 3 hours with or without AK-1 (SIRT2 inhibitor, 10 μ M). The images show tube like structure (x40 magnification). Quantitative analysis measured tube length using Image J program. * $p < 0.05$ vs. normoxia, ** $p < 0.01$ vs. normoxia, ## $p < 0.01$ vs. hypoxia. n=3.

내로 이동이 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 3). SIRT2 단백질은 세포질에 주로 발현되며, 이는 binding partner인 미세소관 디아세틸화효소(microtubule deacetylase)인 HDAC6과 결합하여, 미세소관(microtubule)과 co-localization 되어있고 미세소관의 디아세틸화는 세포의 이동(migration)에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[15]. Fig. 4와 5의 실험결과에서 hypoxia 자극에 의해 안정화된 HIF-1 α 가 SIRT2의 발현을 증가시켜 HUVEC의 tube formation 능력이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 하지만 SIRT2 억제제인 AK-1을 처리한 HUVEC에서는 normoxia와 hypoxia 상태 모두에서 혈관형성능력이 현저하게 감소되었다. 이전 결과들과 본 연구결과를 종합해보면, 미세소관 디아세틸화효소인 SIRT2 단백질은 hypoxia에 의해서 발현이 증가되고, SIRT2 발현증가에 의해 HUVEC의 혈관형성능력이 증가되며, SIRT2 발현억제에 의해 혈관류브형성능력이 감소됨을 알 수 있다. 본 실험결과는 시험관 내의 현상을 관찰한 것으로 앞으로 어떤 신호분자인가가 관여되며, 이런 현상이 실제로 혈관신생 과정에서 어떤 의미를 가지는지를 고찰할 필요가 있다. 본 연구결과를 통하여 혈관신생을 조절하는 SIRT2의 새로운 역할의 가능성과 암 혈관신생 및 다양한 여러 혈관관련 질환에서의 역할에 대한 기초적인 단서를 제공하는데 의의가 있다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년, 2010.09.01-2012.08.31)에 의하여 연구되었음.

References

- Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B. J., Castronovo, V., Maechler, P. and Verdin, E. 2007. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **282**, 33583-33592.
- Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., Tian, B., Wagner, T., Vatner, S. F. and Sadoshima, J. 2007. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* **100**, 1512-1521.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R. and Sinclair, D. A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**, 337-342.
- Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. and Kieda, C. 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**, 1239-1253.
- Dioum, E. M., Chen, R., Alexander, M. S., Zhang, Q., Hogg, R. T., Gerard, R. D. and Garcia, J. A. 2009. Regulation of hypoxia-inducible factor 2 alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* **324**, 1289-1293.
- Frye, R. A. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 793-798.
- Haigis, M. C. and Sinclair, D. A. 2010. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* **5**, 253-295.
- Krock, B. L., Skuli, N. and Simon, M. C. 2011. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* **2**, 1117-1133.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. and Auwerx, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127**, 1109-1122.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5807-5811.
- Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E. and Park, J. W. 2010. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* **38**, 864-878.
- Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. and Guarente, L. 2005. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **280**, 21313-21320.
- Mattagajasingh, I., Kim, C. S., Naqvi, A., Yamamori, T., Hoffman, T. A., Jung, S. B., DeRicco, J., Kasuno, K. and Irani, K. 2007. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 14855-14860.
- Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., Jin, L., Boss, O., Perni, R. B., Vu, C. B., Bemis, J. E., Xie, R., Disch, J. S., Ng, P. Y., Nunes, J. J., Lynch, A. V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D. A., Olesfsky, J. M., Jirousek, M. R., Elliott, P. J. and Westphal, C. H. 2007. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **450**, 712-716.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M. and Verdin, E. 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **11**, 437-444.
- North, B. J. and Verdin, E. 2007. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One* **2**, e784.
- Outeiro, T. F., Kontopoulos, E., Altmann, S. M., Kufareva, I., Strathearn, K. E., Amore, A. M., Volk, C. B., Maxwell, M. M., Rochet, J. C., McLean, P. J., Young, A. B., Abagyan, R., Feany, M. B., Hyman, B. T. and Kazantsev, A. G. 2007. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* **317**, 516-519.
- Potente, M., Ghaeni, L., Baldessari, D., Mostoslavsky, R., Rossig, L., Dequiedt, F., Haendeler, J., Mione, M., Dejana,

- E., Alt, F. W., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. 2007. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* **21**, 2644-2658.
19. Saunders, L. R. and Verdin, E. 2007. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* **26**, 5489-5504.
20. Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. and Boeke, J. D. 2006. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* **75**, 435-465.
21. Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. and Boeke, J. D. 2000. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6658-6663.
22. Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R. and Denu, J. M. 2000. Silent information regulator 2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14178-14182.
23. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5510-5514.
24. Wang, G. L. and Semenza, G. L. 1993. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* **268**, 21513-21518.

초록 : 인간 제대혈 유래 혈관내피세포의 혈관 튜브 형성능에 미치는 Sirtuin-2 (SIRT2)의 역할

정석운¹ · 김철민¹ · 김다연¹ · 이동형² · 이규섭² · 권상모^{1*}

(¹부산대학교 의학전문대학원 생리학교실 혈관의학 및 줄기세포학 실험실, ²부산대학교병원 산부인과)

Sirtuin family 단백질은 암, 당뇨, 심혈관 질환, 뇌신경계 질환과 같은 노화와 연관된 질병들의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 우선적으로 혈관내피세포를 이용하여 Hypoxia에서의 sirtuin family의 발현을 확인한 결과, SIRT2 mRNA가 가장 강하게 발현되는 결과를 얻었다. 혈관신생과정에서의 SIRT2 단백질의 생리학적 역할을 규명하고자, 본 실험실에서는 저산소상태에서의 SIRT2의 생리학적 의미에 주안점을 두었다. Normoxia에서 SIRT2는 세포질에 존재하고 있으나, hypoxia에 의해서 SIRT2 단백질이 핵 내로 이동이 일어남을 확인하였다. 또한 hypoxia에 의해서 SIRT2와 혈관신생인자인 VEGF의 발현이 증가하며, Normoxia와 hypoxia 두 환경에서 혈관내피세포의 혈관형성능력이 SIRT2 inhibitor인 AK-1에 의해서 억제된 것을 확인하였다. 본 연구결과를 통해서 SIRT2가 혈관신생과정을 조절하는 중요한 역할을 함을 시사하였다.