

DMH(1,2-Dimethylhydrazine)에 의해 비정상적으로 증식된 혈관 내피세포에서 발현증가 인자들에 대한 RT-PCR의 결과

김성호¹ · 강영석² · 배용찬² · 박숙영² · 남수봉²

하늘 성형외과¹, 부산대학교 의과대학 성형외과학교실²

RT-PCR of Up-Regulated Factors in Abnormally Proliferated Vascular Endothelial Cells by 1,2-Dimethylhydrazine

Sung-Ho Kim, M.D.¹, Young-Seok Kang, M.D.²,
Yong-Chan Bae, M.D.², Suk-Young Park,²
Su-Bong Nam, M.D.²

¹Ha-Neul Aesthetic Clinic, Busan, Korea, ²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Many studies for verifying angiogenesis have been in progress, especially in the field of abnormal vascular proliferation to explain the pathogenesis and to develop a treatment of several diseases. In our previous experiments, endothelial cell proliferations were induced by DMH stimulation *in vitro*, and the 177 factors(142 up-regulated and 35 down-regulated factors) were identified. Among the up-regulated factors, 9 substances (EFEMP1, CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2, SERPINE1, MYC, PTTG1 and MSH6) were selected, which were related to cell proliferation and showed high signal intensities. The RNA was isolated from HUVECs at the time of 0, 6, 12, 24 hours after the DMH treatment, and RNA of control group HUVECs was also isolated. Genetic information of selected molecules was used to make primer for each, and RT-PCR was performed to analyze both groups. In control and treatment groups, each substance presented variety of manifestation degree according to time differences. EFEMP1, CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2 and MYC were related to abnormal vascular proliferation steadily and SERPINE1, PTTG1 and MSH6 were related secondarily. CTGF was related to both normal and abnormal proliferation, but it played a more significant role in abnormal proliferation

from earlier stage. EFEMP1, CYR61, ITGβ1, FHL2 and MYC were similar to CTGF, although the relation appeared lately. Further study should be performed to analyze the expressions and the interactions of growth factors, which could be utilized in the new therapeutic development.

Key Words: Dimethylhydrazines, Endothelial cells, Umbilical veins, RT-PCR

1. 서 론

혈관형성(angiogenesis)은 인체의 생리작용에서 가장 기본적인 과정으로 현재 의학계에서 주목받고 있는 분야 중의 하나로서, 새로운 혈관의 발생은 배아 성장(embryonic growth)과 창상치유, 허혈 후 조직회복 등 동물 개체의 일생에 걸쳐 생리학적 복원에 필수적인 과정이며,¹ 비정상적인 혈관형성은 수많은 질병의 발생과 생리학적 반응에 있어서도 밀접한 연관이 있다. 혈관의 비정상 증식과 이에 관련된 질환의 범위가 광범위하여 혈관형성의 기전에 대한 연구들은 혈관의 신생과 소멸에 대해 여러 관점에서 접근되고 있으며, 얻어진 결과들은 질병의 새로운 치료법의 개발에 이용되고 있다. 그리고 혈관형성 기전의 전반적인 이해를 위해 중요시되는 부분은 혈관형성 성장인자(angiotrophic growth factor)들과의 연관성이며, 이들 성장인자들은 서로 간의 상호작용으로 세포 내에서 각각의 생성을 유도하거나 억제시키는 작용을 통하여 혈관형성을 촉진시킨다고 알려져 있다.²

혈관형성의 과정과 혈관조직의 비정상적인 증식기전을 밝히는 데 도움이 되고자, 저자들은 이전 실험을 통하여 동물실험에서 악성혈관내피종과 혈관육종 등 혈관종양을 유발한다고 알려진 DMH(1,2-dimethylhydrazine)를 이용하여,³ *in vitro*에서 HUVECs(human umbilical vein endothelial cells)의 증식을 유발하는 실험을 하였고, DNA microarray 기법을 이용하여 DMH에 의해 비정상적으로 증식이 유발된 혈관 내피세포에서 차등적으로 발현되는 인자들을 확인할 수 있었다.⁴ 이에 본 연구에서는 DMH에 의해 차등적으로 발현된 인자들에 대한 RT-PCR(reverse transcrip-

Received June 1, 2005
Revised August 17, 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: baeyc2@hanmail.net

* 본 논문은 제 58차 대한성형외과학회 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

tase-polymerase chain reaction)을 통해 시간에 따른 발현양상을 분석하여 DMH에 의한 HUVEC의 비정상적인 증식의 기전을 설명하기 위한 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

저자들은 이전의 실험에서, HUVEC에 다양한 농도의 DMH를 처리한 처리군과 DMH를 처리하지 않은 대조군에 대하여 DMH 처리 후 시간별로 각각의 군에 대한 MTT 검색법(Tetrazolium-based colorimetric assay)을 시행하여 1 ng/ml과 10⁻¹ ng/ml의 DMH 처리군에서 처리 후 24시간까지 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증식을 유발할 수 있었고(p<0.05)(Fig. 1), 증식된 HUVEC에 대한 DNA microarray 분석을 시행하여 대조군에 비해 차등적으로 발현되는 177개 인자들(발현증가 인자 142개, 발현억제 인자 35개)을 확인하였다.⁴ 본 연구에서는 DMH에 의해 발현이 증가된 인자들의 혈관 내피세포 증식에 대한 영향을 검증하고자, 발현강도가 높고 세포성장과 관계가 있는 9개의 물질을 일차 선별하여 이들의 DMH 처리 후 시간대별의 발현양상을 분석하고자 하였다.

가. DMH에 의한 비정상적 내피세포 증식과 관련된 발현증가 인자의 선별

비정상적인 세포증식의 원인을 분석하기 위해서는 발현이 증가된 177개의 인자들의 세포 내 작용과 영향에 대한 전반적인 고찰이 진행되어야 하나, 실험의 효율성을 높이

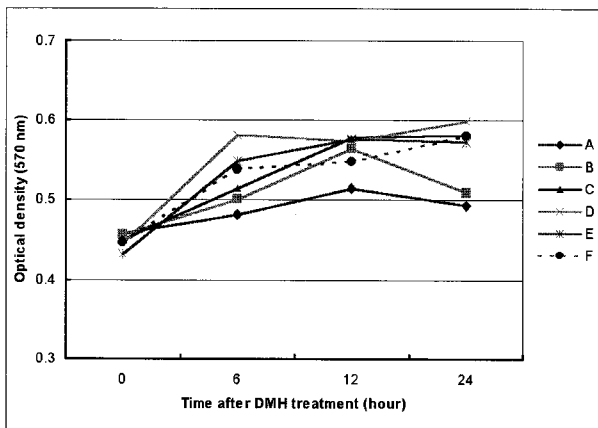


Fig. 1. Measured optical densities depending on time after treatment with various concentrations of DMH. (A: control group, B: 10 ng/ml DMH, C: 1 ng/ml, D: 10⁻¹ ng/ml, E: 10⁻² ng/ml, F: 10⁻³ ng/ml) (from Kim HO, Kang YS, Bae YC, Park SY, Nam SB, Hwang SM: Gene expression profiling of 1,2-dimethylhydrazine-stimulated human umbilical vein endothelial cells. J Korean Soc Plast Reconstr Surg 31: 858, 2004; with permission)

기 위해 우선 발현이 증가된 인자들 중 발현강도가 높고 유전자은행의 자료에 의해 세포성장과 관련이 있다고 알려진 물질들을 일차 선별하였다. 선별된 물질은 EFEMP1 (EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1), CTGF(connective tissue growth factors), CYR61(cysteine-rich, angiogenic inducer 61), ITGβ1(integrin beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)), FHL2(four and a half LIM domains 2), SERPINE1(serine or cysteine proteinase inhibitor clade E(nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)), MYC(v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog), PTTG1(pituitary tumor-transforming protein 1), MSH6(muts homolog 6)의 9가지이며(Table I, II), 이들에게서 DMH 처리 시간별 발현 정도와 양상을 비교하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 선별한 인자에 대해서 유전자은행에 있는 유전자 정보를 이용하여 각각의 specific primer의 염기서열을 결정하였다(Table III). 선별 인자들의 primer는 Bioneer Corp. (Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였다.

나. Specific primer를 이용한 RT-PCR

선별물질의 유전정보를 이용하여 각각의 specific primer를 제작하였고, 적정세포수(10⁴ cells per well)의 HUVECs를 96-well microplates에 분주하여 1일간 F12K 완전배지(F12K nutrient mixture, 10% FBS(fetal bovine serum), 0.3 mg/ml ECGS(endothelial cell growth supplement), 0.1 mg/ml (heparin, penicillin/streptomycin)로 배양하고, 2일째는 무혈청 배지로 교체하여 1일간 배양하였다. 3일째에 10⁻¹ ng/ml의 DMH를 처리하여 이를 처리군으로 하고 DMH를 처리하지 않은 HUVECs를 대조군으로 하여 각군의 HUVECs를 배양하였고, DMH 처리 후 시간에 따라 0시간, 6시간, 12시간, 24시간에 RNA를 분리하여 RT-PCR 기법으로 선별한 인자들의 발현양상을 비교 분석하였다

1) RNA 추출 및 역전사 반응

RT-PCR을 통해 유전자의 발현양상을 비교하기 위해서는 RNA를 역전사(reverse transcription)시킨 cDNA(complementary DNA)를 이용하므로, 대조군과 10⁻¹ ng/ml의 DMH 처리군의 HUVEC에서 RNA를 분리하는 과정을 다음과 같이 시행하였다. 대조군과 처리군의 plate에서 배양 배지를 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 원심 분리하였고, 관 바닥의 세포 덩어리만 남기고 용액을 완전히

Table I. Selection of Up-Regulated Factors in Proliferated HUVECs by DMH

Gene ID*	Print tip Normalized M [†]	A [‡]	Title
NM_018894.1	1.049422116	12.52197704	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
NM_001901.1	1.348069043	12.36061057	connective tissue growth factors
NM_001554.1	1.103765185	11.63771594	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
NM_002211.1	1.082311212	11.36068413	integrin, beta 1(fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
NM_001450.1	1.31927755	11.2426349	four and a half LIM domains 2
NM_000602.1	1.066344099	9.110209929	serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade E(nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)
NM_002467.1	1.625622434	8.264438013	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog(avian)
NM_004219.1	1.19727221	7.26288371	pituitary tumor-transforming protein 1
NM_000179.1	1.907222731	6.0858173745	mutS homolog 6(<i>E. coli</i>); msh6

* Gene ID in Gene Bank of NCBI(National Center for Biotechnology Information) web site

[†]Print Tip Normalized M is M Value after Print Tip Up Normalization

[‡]A is Intensity Dependent Normalized M

Table II. Functional Classification of Selected Factors in Proliferated HUVECs by DMH

Function	Title
Adhesion proteins	EFEMP1(EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1)
Cell growth factors	CTGF(connective tissue growth factors)
Protein turnover	CYR61(cysteine-rich, angiogenic inducer, 61) SERPINE1(serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade E(nexin, plasminogen activator inhibitor type 1))
Receptors	ITGβ1(Integrin, Beta 1(fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29))
Oncogenesis	FHL2(four and a half LIM domains 2) MYC(v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) PTTG1(pituitary tumor-transforming protein 1) MSH6(mutS homolog 6)

제거한 후, 1 ml TRIzol[®](phenol + guanidine isothiocyanate)을 첨가하였다. RNA의 방출이 용이하도록 피펫을 사용하여 반복적으로 현탁하여 실온에서 5분간 반응시키고, chloroform 첨가하여 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 분리된 층 중에서 RNA가 함유된 최상층액을 분리하여 1.5 ml 관으로 옮기고 isopropanol을 첨가하였다. 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하고 RNA 덩어리만 남기고 나머지 용액을 제거하였다. 0.1% DEPC가 처리된 물로 만든 75% ethanol로 세척하였고 7,500 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하였다. RNA 덩어리를 37°C에서 가볍게 건조시킨 후 RNase가 포함되지 않은 물로 RNA를 용해시키고, 초저온 냉동고에 보관하였다.

대조군과 10¹ ng/ml의 DMH 처리군의 HUVEC에서 추출한 RNA를 cDNA로 전환시키는 역전사 과정은 각각의 100 ng RNA와 100 pmole oligo dT primer를 섞어서 70°C에서 5분간 반응시킨 후, 얼음 위에서 식혔다. 200 units M-MLV RTase[®] reverse transcriptase(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 5 × M-MLV RTase[®] reaction buffer(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 100 mM DTT(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 2.5 mM dNTP mixture(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 넣고 최종부피 20 μl가 되도록 RNase free water를 첨가한 뒤 잘 배합하여 42°C에서 60분을 두고, 다시 94°C에서 5분간 반응시켰다. 역전사 반응을 마친 용액은 4°C에 보관하였다.

Table III. Specific Primer's Sequences of Selected Factors in Proliferated HUVEC by DMH

Name		Sequence	
EFEMP1	sense	5'-gcc ctc ctg gat atc aga ag	(684-703, 20mer)
	antisense	5'-gca cag acc tat cag atc g	(1301-1283, 19mer)
CTGF	sense	5'-gca gct ggg cga gct gtg cac cg	(331-353, 23mer)
	antisense	5'-gcc tga cca tgc aca ggc g	(866-848, 19mer)
CYR61	sense	5'-gct gga atg caa ctt cgg cg	(442-461, 20mer)
	antisense	5'-gcc gca cct cac aaa tcc g	(1028-1010, 19mer)
ITGβ1	sense	5'-gct gga gga atg tta cac g	(923-941, 19mer)
	antisense	5'-gcc ctt cat tgc acc tgc acg	(1609-1588, 21mer)
FHL2	sense	5'-gcc ctt tgc tgc caa gga gg	(813-832, 20mer)
	antisense	5'-gca gtc gtt atg cca ctg ccg	(1323-1303, 21mer)
SERPINE1	sense	5'-gcc gtg gac cag ctg aca cg	(609-629, 20mer)
	antisense	5'-gcc act ctc gtt cac ctc g	(1140-1122, 19mer)
MYC	sense	5'-gca gag cga gct gca gcc ccc g	(488-510, 22mer)
	antisense	5'-gct gcc ctg cgg gga gga ctc cg	(1083-1061, 23mer)
PTTG1	sense	5'-gca ccc gtg tgg ttg cta ag	(89-108, 20mer)
	antisense	5'-gca att caa cat cca ggg tcg	(625-605, 21mer)
MSH6	sense	5'-gca gaa ggg cta taa agt agc acg	(1509-1532, 24mer)
	antisense	5'-gcc att gct tta gga gcc g	(2419-2401, 19mer)

2) Specific primer에 대한 증폭반응

cDNA와 specific primer의 PCR 과정은 PCR용 관에 100 ng cDNA, 10 pmole primer, 1 unit Taq polymerase (Bioneer Corp., Seoul, Korea), 10 mM tris-HCl reaction buffer(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 40 mM KCl reaction buffer(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 1.5 mM MgCl₂ reaction buffer(Bioneer Corp., Seoul, Korea), 250 μM dNTP (Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 넣고 최종부피 20 μl가 되도록 증류수를 첨가하였다. 그리고 각 primer에 대한 Tm (melting temperature)이 다르므로 두 가지 과정으로 나누어 PCR 과정을 진행하였다.

CTGF, CYR61, FHL2에 대한 primer가 첨가된 관은 94 °C에서 5분 동안 반응시킨 뒤, 94 °C(30초)-61 °C(1분)-72 °C(1분) 과정을 21번 반복하고, 72 °C에서 5분간 반응을 완료하였다.

EFEMP1, ITGβ1, SERPINE1, MYC, PTTG1, MSH6에 대한 primer가 첨가된 관은 94 °C에서 5분간 반응시킨 뒤, 94 °C(30초)-56 °C(1분)-72 °C(1분) 과정을 21번 반복하고, 72 °C에서 5분간 반응을 완료하였다.

3) 전기영동 및 PCR 단편의 흡광도 측정

PCR 반응을 마친 용액은 1% Argarose gel로 전기영동하였고, Ethidium bromide(Sigma Inc., St. Louis, MO)를 이용하여 PCR 단편을 염색시켰다. 염색된 PCR 띠는 Gel image analysis system(UVItec Ltd., Cambridge, 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 측정된 흡광도를 이용하여 그래프로 전환시켰고, 각각의 그래프를 이용하여 선별물질에 대한 대조군과 처리군의 시간별 발현차이를 비교분석하였다.

III. 결 과

9개의 선별된 인자들의 발현을 비교분석하기 위해 각각의 specific primer를 이용하여 RT-PCR을 시행한 결과는 다음과 같았다.

EFEMP1의 경우 대조군은 6시간에서 증가하고, 12시간에 감소하며, 다시 24시간에 증가하는 불규칙한 발현을 보였으나, 처리군은 0시간부터 24시간까지 지속적으로 증가

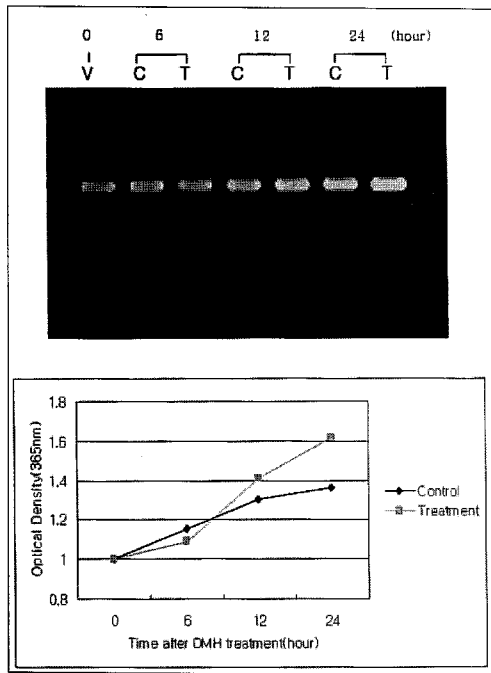


Fig. 2. (Above) DMH activates EFEMP1 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^1 ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

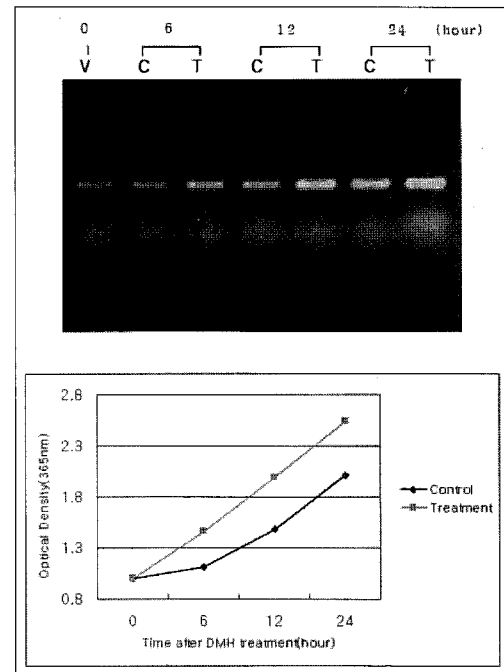


Fig. 3. (Above) DMH activates CTGF mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^1 ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

하는 발현양상을 보였다. 특히, 6시간에서는 대조군보다 처리군의 발현이 적었으나 12, 24시간에서는 대조군보다 발현양이 많음을 알 수 있었다(Fig. 2).

CTGF는 대조군에서는 0시간부터 24시간까지 지속적인 증가를 보였고, 처리군에서도 대조군과 마찬가지로 시간 경과에 따라 일정한 증가 양상을 나타내었다. 그러나 6시간부터 24시간까지 대조군보다는 처리군의 발현이 더 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 3).

CYR61에 대한 결과는 대조군에서는 12시간까지 발현의 변화를 보이지 않다가 24시간에서 발현이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 처리군은 6시간까지 변화 없었고 그 이후로 24시간까지 계속 증가함을 보였다. 그리고 대조군과 처리군의 발현양이 6시간까지는 비슷하였으나 그 이후의 시간대에서는 처리군의 발현양이 대조군보다 증가되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

ITGβ1에서 대조군은 0시간대에서부터 24시간까지 비슷한 비율로 증가를 보였고, 처리군도 시간경과에 따라 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 특히, 6시간에서는 처리군보다 대조군의 발현이 많았지만, 그 이후의 12시간, 24시간에서는 처리군이 대조군보다 더 많은 발현을 하였다(Fig. 5).

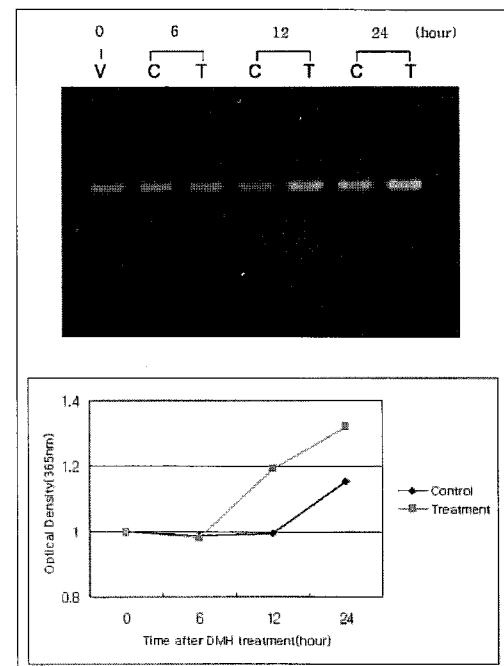


Fig. 4. (Above) DMH activates CYR61 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^1 ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

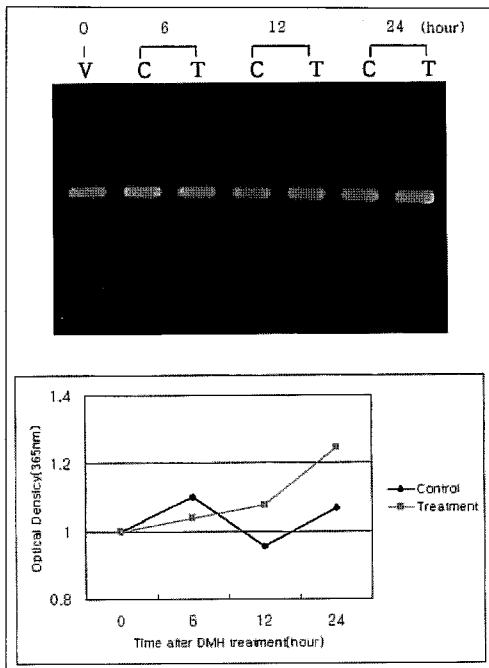


Fig. 5. (Above) DMH activates ITGβ1 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

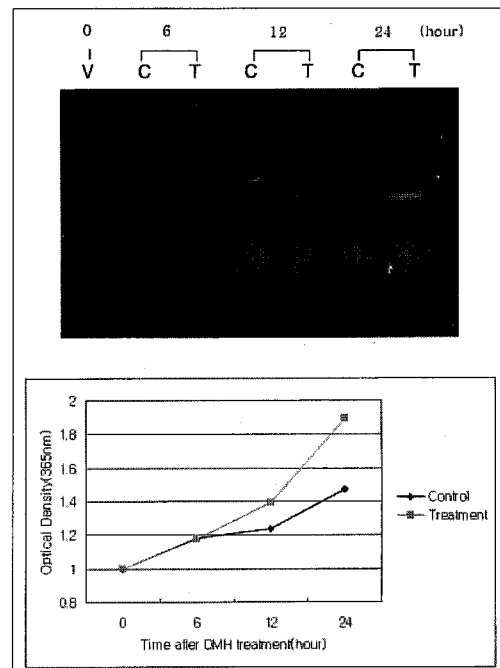


Fig. 6. (Above) DMH activates FHL2 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

FHL2의 결과에서 대조군은 시간경과에 따라 지속적인 증가를 보였으며, 처리군도 대조군과 마찬가지로 24시간 까지 증가하는 양상을 나타내었다. 6시간에서는 대조군과 처리군의 발현양이 같았고, 그 이후의 12시간 24시간에서는 대조군보다 처리군의 발현양이 더 많음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

SERPINE1의 결과는 대조군에서는 시간경과에 따른 지속적인 발현 증가양상을 나타내었다. 처리군에서는 12시간까지 대조군과 발현양이 거의 같았으나 24시간에서 감소하는 현상을 보였다(Fig. 7).

MYC에 대한 결과는 대조군은 6시간에서 증가, 12시간에서 감소, 24시간에서 다시 증가하는 불규칙한 발현양상을 보였다. 처리군에서는 시간경과에 따른 지속적인 발현 증가를 나타내었고, 특히 24시간에서 발현이 크게 증가하였다(Fig. 8).

PTTG1는 대조군은 6시간에서 발현증가, 12시간에서 감소, 24시간에서 다시 증가하는 불규칙양상을 나타내었다. 처리군은 0시간에서 12시간까지 증가하였고, 24시간에서는 감소되어 대조군보다 발현이 낮았다(Fig. 9).

MSH6에서 대조군은 시간경과에 따른 지속적인 증가를 나타냈다. 처리군은 12시간까지 지속적인 증가를 보였으나, 24시간에서 큰 폭으로 발현이 감소하는 양상을 보였

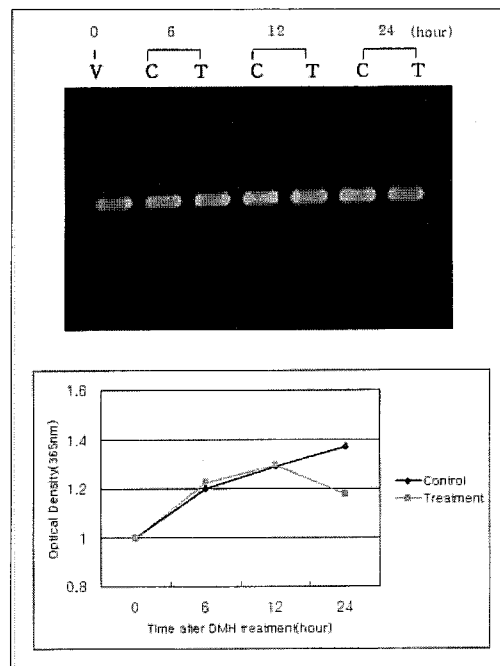


Fig. 7. (Above) DMH activates SERPINE1 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

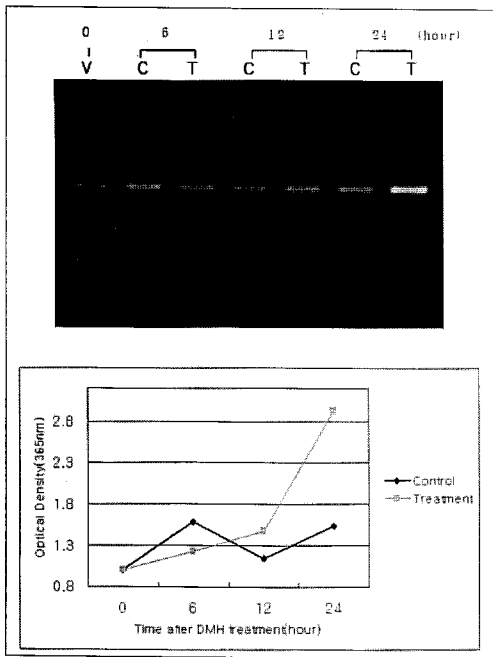


Fig. 8. (Above) DMH activates MYC mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

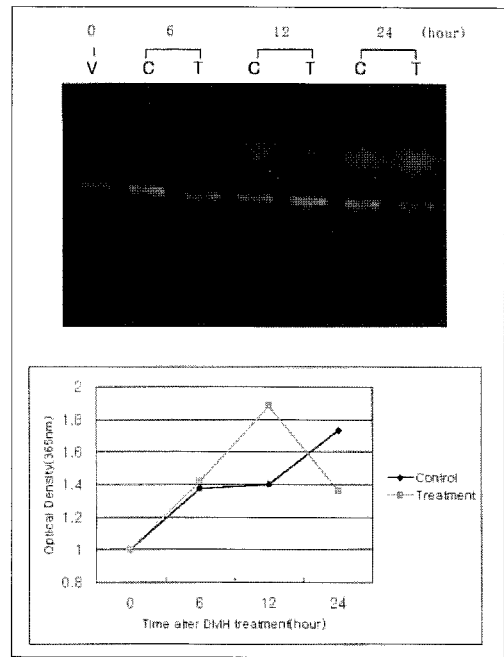


Fig. 10. (Above) DMH activates MSH6 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

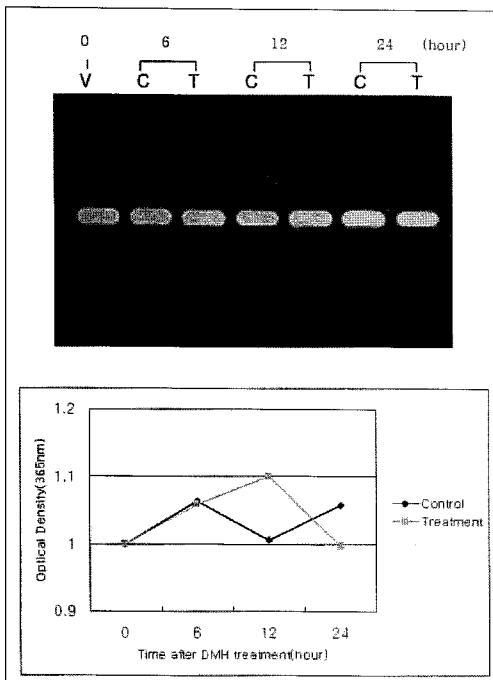


Fig. 9. (Above) DMH activates PTTG1 mRNA expression in HUVECs. HUVECs were treated with DMH (10^{-1} ng/ml), the cells were collected at 0, 6, 12 and 24 hour. V: vehicle (before treatment), C: control (non-treatment), T: DMH treatment. (Below) Measured optical density of amplified products.

다. 12시간에서는 처리군의 발현이 대조군보다 높았으나, 24시간에서는 대조군보다 낮았다(Fig. 10).

이상의 결과를 정리해보면 먼저 각 군에서의 물질들의 발현양상을 살펴본 결과, DMH를 처리하지 않은 대조군의 세포내에서 EFEMP1, MYC, PTTG1은 시간에 따라 불규칙적인 발현을 보였고, 이와 달리 CTGF, ITGβ1, FHL2, SERPINE1, MSH6은 시간 경과에 따라 지속적으로 발현이 증가되었으며, CYR61은 12시간 그 이후부터 발현이 증가되는 양상을 보였다. 따라서 CTGF, CYR61, ITGβ1, FHL2, SERPINE1, MSH6은 정상적인 혈관 내피세포의 증식에도 영향을 미치는 것으로 보인다. DMH 처리한 처리군의 세포에서는 EFEMP1, CTGF, ITGβ1, FHL2, MYC에서 시간에 따라 지속적인 발현증가를 보였고, CYR61은 6시간 이후부터 발현이 증가하였다. 반면, SERPINE1, PTTG1, MSH6은 12시간까지 발현증가가 지속되다가 24시간대에서 감소하는 현상이 나타났다. 따라서, EFEMP1, CTGF, ITGβ1, FHL2, MYC는 비정상적인 증식에 지속적으로 영향이 있는 것으로 보이며, SERPINE1, PTTG1, MSH6은 비정상증식에 영향이 있으나 24시간에 감소하는 것으로 보아 비정상 증식의 초반에 영향을 미치는 것으로 추측된다.

또한, 각 물질에 대한 대조군과 처리군의 시간별 발현차이를 비교해 본 결과, CTGF는 DMH 처리 후 바로 비정상

증식에 영향을 미치며, EFEMP1, CYR61, ITGβ1, FHL2, MYC는 6시간 이후 비정상 증식에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이러한 발현양상을 통해 CTGF는 DMH에 의해 즉각적인 반응을 보이는 물질이라고 생각할 수 있으며, EFEMP1, CYR61, ITGβ1, FHL2, MYC 등도 DMH에 의한 비정상적인 세포 증식에 많은 영향을 미치는 것으로 보인다.

이상의 비교에서, 이전의 microarray 상 발현증가를 보인 인자들에 있어 RT-PCR을 통한 대조군과의 발현비교를 통해 이러한 인자들의 발현증가가 실제적으로 DMH에 의한 비정상적인 내피세포의 증식과 연관성을 가짐을 확인할 수 있었다. 또한, 이 중에서 가장 뚜렷한 결과를 보인 것은 CTGF이며, 이 물질은 DMH 처리에 의해 빠른 반응과 함께 모든 세포증식의 시간대에서 대조군보다 발현이 높고 DMH 처리 후 세포증식이 일어나는 시간대와 발현증가의 시간대가 일치함을 보여, 세포증식에 직접적인 영향을 미치거나 혹은 관련된 성장인자와 긴밀한 연관을 가질 것으로 생각된다.

IV. 고 찰

혈관형성은 조직의 정상적인 성장에 필수적인 과정이며, 창상의 치유나 골절치유, 여성의 생리현상으로 자궁에서 이루어지고 있다. 그러나 혈관의 비정상적인 증식은 종양의 성장이나 다른 비종양성 질환과도 연관성을 가지는 등 혈관 형성 및 증식과 관련된 질환이 광범위하므로, 최근 혈관형성 기전과 관련된 연구와 함께 치료법 개발의 중요성이 더욱 부각되고 있고, 여러 분야에서 연구가 시도되고 있다. 이러한 이유로, *in vivo*에서 혈관종양을 유도하고 종양이 발생한 조직과 세포를 이용하여 혈관의 비정상 증식 기전을 밝히려는 연구가 많이 이루어지고 있다.

현재 혈관종양의 연구를 위한 *in vivo* 모델은 쥐나 토끼를 이용하여 발암물질 주입, 방사선 및 자외선에 직접 노출 또는 발암 바이러스 및 미생물 감염 등으로 종양을 유발하는 방법이 있으나, 이중 방사선이나 자외선의 이용은 노출시간의 결정이나 실험 장비 준비 등 여러 가지 면에서 장기간 준비를 필요로 하기 때문에 주로 바이러스나 박테리아의 감염이나 화학물질을 주입하여 특정세포의 증식을 유도하는 실험이 대부분이다. 특히 DMH는 동물실험에서 경구 투여나 피하주사 등의 방법으로 대장암,⁵ 폐암,⁶ 자궁육종 등⁷을 유발할 수 있으며 악성혈관 내피종과 혈관육종 등 혈관 종양³을 유발시키므로 DMH의 이용 사례가 많다. 그러나 DMH를 이용한 *in vivo* 모델은 30-50주의 시간이 소요되며 장기적인 약물투여로 인한 실험쥐의 생존률 저하, 그리고 혈관종양 외 목적하지 않은 종양이 발생하는

등의 한계점이 있다. 이에 저자들은 정확한 혈관종양의 기전을 연구할 수 있는 대체 모델이 요구된다고 사료되어, 실험실 환경에서 DMH 처리에 의한 혈관 내피세포의 인위적인 증식을 유도하는 실험모델을 제시하고, 이 실험에서 나타나는 결과를 이용하여 비정상적인 내피세포 증식의 원인규명을 통해 혈관의 이상증식 기전에 대한 새로운 근거를 제시하고자 하였다.

지금까지 보고된 연구 결과들에 의하면, CTGF는 혈관과 결합력 있고, 세포의 성장과 상처의 치유반응 등의 조절에 관여하며,⁸ 구강 편평 상피세포의 종양화를 유발시킨 세포에서도 CTGF의 발현 증가를 보여 이를 조절하는 연구가 시행되고 있다.⁹ 그리고 여러 병적인 상태에서 분비되는 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 결합하는 작용이 있다는 보고를 통해 CTGF는 VEGF와 연관을 가진다는 것을 알 수 있으며,¹⁰ 또한 비정상적인 세포증식 기전에 직접적인 작용을 할 것으로 생각된다. 그리고 CYR61은 CTGF와의 상호작용에 의해 *in vitro* 상태에서 내피세포의 증식과 확산 과정에 관여하고, VEGF의 활성을 촉진시켜 비정상적인 증식을 유도한다는 연구 결과¹¹는 CTGF 뿐 아니라 CYR61도 VEGF와 연관관계를 가지며, 혈관내피세포의 비정상 증식에 직접 작용할 것으로 사료된다.

또한, ITGβ1은 배아발생(embryogenesis), 조직재생 및 종양세포의 전이 확산 등의 다양한 생리과정에 포함되어 있고, ITG 계열 존재 하에 CYR61은 HUVEC에서 혈관형성이 촉진되며, CTGF와도 결합관계에 있다고 한다.¹¹ 이러한 내용을 통해, ITGβ1은 성장인자와의 직접적인 연관을 알 수 없으나 CTGF, CYR61과 결합하여 세포증식에 관여하는 것으로 보인다. 따라서, CTGF, CYR61, ITGβ1은 세포증식을 위한 인자들의 발현과정에서 서로 연결되어 있는 것과 이 세 가지 물질의 DNA microarray 분석에서 비슷한 수준의 발현강도가 나타난 것을 볼 때,⁴ 본 연구의 결과와 일치한다고 볼 수 있을 것이다. 이와 유사한 내용으로 CTGF와 CYR61의 내피세포 내 작용에 대한 결과가 보고되어 있는데, 여러 가지 자극물질에 의해 CTGF이나 CYR61의 발현이 유도되고 이들 발현으로 TGF-β(transforming growth factor-β)나 cAMP의 물질생성이 유도된다. 그리고 CTGF, CYR61, TGF-β, cAMP 들은 bFGF(basic fibroblast growth factor), ITGα, ITGβ 등과 상호작용하여 결과적으로 세포증식을 일으킨다고 알려져 있다.¹¹

FHL2는 종양형성에 관여하며, 성장인자인 IGF(insulin-like growth factor)와 상호작용 한다는 연구 보고를 통해,¹² 결과적으로 세포증식 관여할 것으로 생각된다. 그리고 MYC도 성장인자 TNFα(tumor necrosis factor α)와 연관을 가지며, 세포증식 등의 과정에도 직접 관여한다고 보

고되어 있다.¹³ 이러한 내용을 통해, FHL2와 MYC는 둘 다 성장인자의 발현을 촉진시키는 작용을 가지므로 비정상적인 세포증식에 미치는 영향도 클 것으로 보이고, PCR 반응 결과에서도 대조군과 처리군 간의 발현은 차등적으로 나타났다.

SERPINE1은 케로이드 섬유모세포, 간암세포, 폐 상피세포 등 다양한 세포내에서 TNF α 와 TGF β , VEGF 등의 성장인자의 생성유도에 관여한다는 연구 보고가 있지만,¹⁴ 본 실험의 결과에서는 DMH 처리에 대해 발현 차이가 크지 않았다. PTTG1도 *in vivo*에서 종양형성에 대한 활성을 가지며, *in vitro*에서 VEGF와 세포호르몬의 발현을 강하게 촉진시킨다는 결과가 있지만,¹⁵ 본 실험 결과에서 전반적으로 대조군과 처리군 간의 차이가 크지 않아, SERPINE1과 PTTG1은 다른 성장인자들과 상호작용을 하는 물질이기는 하나 HUVEC에서 DMH에 의한 비정상적인 세포증식 과정에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

EFEMP1은 유전자의 돌연변이로 혈관 및 망막 변성을 일으키는 유전자이므로,¹⁶ DMH의 영향으로 유전자의 돌연변이를 유도함으로써 내피세포증식에 관여했을 것으로 추측하였으나, DNA microarray 분석에서는 DMH 처리에 의해 발현강도 높은 것에 비해,⁴ PCR 반응에서는 처리군과 대조군간의 발현차이가 크지 않아 결과에 대한 일관성이 없어 분석의 어려움이 있다. MSH6은 손상된 DNA에 결합하는 재생단백질로서 대장암의 발생에 관여하는 것으로 볼 때,¹⁷ 세포의 비정상적인 증식과 연관이 있을 것으로 생각되지만, 본 실험에서는 처리 후 24시간에서 감소양상을 보여 연관관계를 밝히는데 어려움이 있었다.

이상으로 본 연구 결과를 토대로 계속적인 연구를 진행하여 CTGF, CYR61, ITG β 1, MYC을 중심으로 인자들 간의 상호관계를 규명하고, CTGF, CYR61, ITG β 1 이외의 인자들 가운데에서도 이들과 같이 내피세포의 증식에 영향을 미치는 인자들을 찾아 이들 간의 결합관계 또는 경쟁관계를 고찰함으로써 혈관내피세포의 비정상증식 발생기전을 이해할 수 있을 것이라 생각된다. 또한, 성장인자의 발현을 억제하는 경쟁관계에 있는 물질들을 규명하여 *in vitro* 상에서 세포증식을 감소시키는 저해제로서의 작용의 연구가 동시에 진행된다면, 혈관 내피세포증식 기전의 이해뿐 아니라 혈관종양 및 혈관증 등의 발생기전의 이해와 관련 치료법의 개발에도 의미 있는 자료를 제시할 것으로 사료된다.

V. 결 론

혈관형성의 과정과 혈관조직의 비정상적인 증식에 대한 발생기전을 밝히기 위한 시도들이 이루어지고 있으며, 저

자들은 DMH를 이용하여 *in vitro*에서 HUVECs의 비정상적 증식 유발 실험을 하였고 증식된 HUVECs에서 발현이 증가된 성장인자들 중의 몇몇 인자들에 대하여 RT-PCR을 시행하여 대조군과의 비교결과를 얻었다. 본 연구의 결과를 토대로, 앞으로 세포증식에 관여하는 여러 인자들 간의 상호관계 또는 경쟁관계를 규명하고, *in vitro*에서 세포증식과 관련된 인자에 대한 저해제를 이용한 증식 억제 실험을 추가적으로 시행하여 실질적으로 세포 증식의 억제를 유발할 수 있다면 혈관 내피세포의 비정상적 증식기전을 이해하고 혈관종양에 대한 새로운 치료법의 개발에도 의미 있는 자료를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Folkman J: Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757, 1995
2. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH: Angiogenesis: Basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 24: 586, 2003
3. Sato N, Kaku T, Dempo K, Kikuchi K: The relationship of colonic carcinogenesis and hepatic vascular tumors induced by subcutaneously injected 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in specific pathogen free mice. *Cancer Lett* 24: 213, 1984
4. Kim HO, Kang YS, Bae YC, Park SY, Nam SB, Hwang SM: Gene expression profiling of 1,2-dimethylhydrazine-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 858, 2004
5. Kim KH, Park HS: Dietary Supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition* 19: 772, 2003
6. Kim DJ, Takasuka N, Kim JM, Sekine K, Ota T, Asamoto M, Murakoshi M, Nishino H, Nir Z, Tsuda H: Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett* 120: 15, 1997
7. Zhang Z, Li J, Lantry LE, Wang Y, Wiseman RW, Lubet RA, You M: p53 transgenic mice are highly susceptible to 1, 2-dimethylhydrazine-induced uterine sarcomas. *Cancer Res* 62: 3024, 2002
8. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4: 637, 1993
9. Moritani NH, Kubota S, Nishida T, Kawaki H, Kondo S, Sugahara T, Takigawa M: Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line. *Cancer Lett* 192: 205, 2003
10. Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y: Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem* 277: 36288, 2002
11. Brigstock DR: Regulation of angiogenesis and endothelial

- cell function by connective tissue growth factor(CTGF) and cysteine-rich 61(CYR61). *Angiogenesis* 5: 153, 2002
12. 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
 13. Kumakura S, Ishikura H, Maniwa Y, Munemasa S, Tsumura H, Masuda J, Kobayashi S: Activation of protein kinase C enhances TNF- α -induced differentiation by preventing apoptosis via rapid up-regulation of c-Myc protein expression in HL-60 cells. *Leuk Lymphoma* 44: 497, 2003
 14. Hirashima Y, Kobayashi, H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T: Transforming growth factor- β 1 produced by ovarian cancer cell line HRA stimulates attachment and invasion through an up-regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human peritoneal mesothelial cells. *J Biol Chem* 278: 26793, 2003
 15. Hunter JAC, Skelly RH, Aylwin SJB, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, Monson JP, Burrin JM: The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 148: 203, 2003
 16. Stone EM, Lotery AJ, Munier FL, Heon E, Piguet B, Guymer RH, Vandenberg K, Cousin P, Nishimura D, Swiderski RE, Silvestri G, Mackey DA, Hageman GS, Bird AC, Sheffield VC, Schorderet DF: A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Nat Genet* 22: 199, 1999
 17. Kariola R, Otway R, Lonnqvist KE, Raevaara TE, Macrae F, Vos YJ, Kohonen-Corish M, Hofstra RMW, Nystrom-Lahti M: Two mismatch repair gene mutations found in a colon cancer patient-which one is pathogenic? *Hum Genet* 112: 105, 2003