

정맥기형 환자에 있어서의 유전자 발현 차이

김택균¹ · 오은정² · 조병채¹ · 정호윤¹

경북대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 경북대학교 공과대학 물질기능공학과²

Difference of Gene Expression in Venous Malformation

Taek Kyun Kim, M.D.¹, Eun Jung Oh, M.S.²,
Byung Chae Cho, M.D.¹, Ho Yun Chung, M.D.¹

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea.

²Department of Advanced Material Engineering, School of Engineering, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Purpose: Venous malformation (VM) which often causes pain and discomfort is the most common type of vascular malformations. Although it is presented with disfigured appearance and associated soft tissue or skeletal hypertrophy, the molecular bases of VMs are poorly understood. Differentially expressed genes (DEGs) of VMs were investigated to illuminate the molecular mechanism of the disease entity.

Methods: Gene expressions of VM patients' subcutaneous tissue were studied in comparison with normal persons' by GeneFishing™ technique using the annealing control primers (ACPs) to identify DEGs. Candidate genes were sequenced and screened by basic local alignment search tool (BLAST) afterwards.

Results: Among seventy DEGs identified, forty DEGs which had shown significantly different expression pattern were sequenced. Twenty eight out of 40 were up-regulated while 12 were down-regulated. BLAST searches revealed that 37 were known genes and 3 were unknown genes. Many genes were involved in the differentiation and remodeling of smooth muscle cells, opposed to the previous hypothesis that a lot of angiogenic genes would be involved. Furthermore,

several transcription factors and related genes, as well as cell signaling and metabolism regulators, were up regulated.

Conclusion: It suggests that analysis of DEGs in VMs provide basic knowledge about its pathophysiology and new therapeutic approaches.

Key Words: Venous malformation, Differentially expressed genes (DEGs), GeneFishing™ technique, Annealing control primers (ACPs), Smooth muscle cell

1. 서 론

혈관이상 (Vascular anomaly)은 수세기 전부터 여러 가지 명칭으로 불려오다가, 19세기 중반에 이르러 Virchow를 비롯한 병리학자들에 의해 조직학적으로 분류되었으나, 이에 대한 연구는 산발적이었으며 통일성 있게 이루어지지 못하였다. 하지만 1982년 Mulliken에 의해 생물학적 분류체계가 소개되면서 혈관기형에 대한 연구는 새 장을 맞이하게 되었다.¹

혈관이상은 크게 종양(tumor)과 기형(malformation)으로 분류되며, 정맥기형(Venous malformation, VM)은 혈관기형 중에서 가장 흔한 유형이다. 일반적으로 푸른(bluish) 색조와 무른(soft) 감촉, 그리고 쉽게 눌려지는(compressible) 성질 등을 임상적 특징으로 하며, 피부, 피하조직, 근육, 내장기관, 관절부, 중추신경계를 포함한 여러 부위에 발생할 수 있다. 정맥기형은 다른 혈관기형과 마찬가지로 출생 시에는 가시적인 병변이 보이지 않다가 천천히 성장하는데, 이러한 과정에서 혈전(thrombosis)이 발생할 경우 병변부가 급격히 커지면서 딱딱해지고 흔히 동통을 동반하게 된다.²

진단은 주로 병력과 이학적 검사 그리고 방사선 검사로 이루어지며, 그 대표적인 도구가 자기공명촬영술(MRI)과 도플러 초음파(Doppler Ultrasonography)이다. 정맥기형은 MRI에서는 T₂에서 고신호(high signal), 초음파에서 저주파(hypoechoic)로 나타난다. 치료는 미용, 기능적 목적, 그리고 동통의 여부에 따라 시행하게 되는데, 보존적 방법, 경화 요법, 레이저, 그리고 수술적 방법이 있다.

Received June 25, 2007

Revised September 17, 2007

Address Correspondence: Ho Yun Chung, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyungpook National University Hospital, 50 Samduk 2-ga, Chung-gu, Daegu 700-721, Korea. Tel: 053) 420-5685 / Fax: 053) 425-3879 / E-mail: hy-chung@mail.knu.ac.kr

* 본 연구는 2005년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

* 본 논문은 2006년 제 61차 대한성형외과학회 학술대회에서 구연 발표되었음.

정맥기형은 조직학적으로 얇고 확장된, 그리고 다양한 크기를 가진 근육층의 관(channel)들로 구성된 혈관벽으로 이루어졌다. 또한 면역조직화학적 구성 상 정상적인 내피층을 둘러싼 혈관근무늬근육(vascular smooth muscle)의 상대적 결여를 특징으로 한다.^{3,5}

이와 같은 임상적, 조직학적 특징을 가지고 있는 정맥기형은 그 병리학적 기전이 아직 명확하지 않지만 일반적으로 그 원인을 발생학적 오류로 설명하고 있다. 현재 정맥기형의 원인에 관한 근본적인 연구로 유전자에 대한 연구들이 진행되고 있으며 일부 유전자 변형이 보고되고 있다.⁶

최근 유전자의 검사나 연구에서 차별발현유전자(Differentially Expressed Gene, DEG)를 찾아 분석하는 방법이 많이 응용되고 있는데, 차별발현유전자는 비교 대상 시료간의 mRNA 발현차이를 보이는 유전자를 말하며, 이러한 발현차이를 분석하여 질병의 원인, 발생학적 특성 등 많은 임상의학, 기초의학적 정보를 얻을 수 있다. 이 차별발현유전자를 분석하는 기법으로는 최근 발달된 분자생물학의 도움으로 많은 기법들이 소개되어 있는데, 새로운 유전자와 발현변화를 연구하는데 각각의 장점을 지니고 있다. Differential Display Reverse Transcription PCR (DDRT PCR), DNA chip, Expressed Sequence Tag(EST) analysis, Serial Analysis Gene Expression(SAGE) 등이 그 예이다.⁷ 이러한 기법들은 각각의 장점이 있지만 그 결과의 분석에 있어 구체적인 해석 및 주석을 다는 데 있어서 그 특이도가 떨어지는 경향이 있어 병인론의 근원적인 구명에는 아직 한계가 있다.

본 연구에서는 정맥기형에 관여하는 유전자와 발현변화를 확인하기 위해서 정맥기형 환자의 조직에서 mRNA를 추출하고 유전자 검사의 새로운 기법인 GeneFishingTM 기법(Seegene, Seoul, Korea)을 이용하여 차별발현유전자를 분석하고 정맥기형 발생에 관여하는 유전자의 발현변화를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

정맥기형과 관련이 있는 유전자와 발현 변화를 일으키는 유전자를 찾고자, 5명의 정상인에서 얻은 피하조직과 5명의 정맥기형 환자들의 병소에서 각각의 조직을 채취하여 동일한 조건에서 실험을 실시하였다.

가. RNA 분리

정맥기형과 관련된 유전자에 대한 mRNA 발현양상을 분석하기 위하여 채취한 조직에 트리졸 반응액(TRIZOL[®] reagent, Gibco, Germany)을 1 µl 투여하여 세

포들을 용해시킨 후, 단백질 불순물 제거를 위해 200 µl 클로르포름을 주입하여 실온에 3분간 방치하였다. 반응이 끝난 용해액을 4°C에서 14000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA가 녹아 있는 상층액을 걷어내고 그 상층액에 500 µl의 75% 이소프로필알코올을 넣고 실온에 10분간 반응시킨 후, 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 75% 에탄올로 세척한 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 RNA에 DNA 및 RNA 분해효소가 없는 증류수(DNAse, RNAse free water, Gibco, Germany)를 넣어 잘 섞은 후, 분광분석기(Eppendorf, USA)를 이용하여 260 nm 파장에서 광밀도를 측정하여 RNA 양을 산출하였다.

나. 일차 cDNA 합성(First-strand cDNA Synthesis)

정맥기형 환자의 조직에서 추출한 RNA는 역전사효소(reverse transcriptase)에 의해서 일차 cDNA를 합성하는데 이용되었다. 역전사(reverse transcription)는 정제된 RNA 3 µg, 5 × reaction buffer(Promega, Madison, WI, USA) 3 µl, dNTPs(각각 2 mM) 5 µl, 10 µM dT-ACP1 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3') 2 µl, RNasin[®] (RNase inhibitor; 40 U/µl; Promega) 0.5 µl 그리고 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/µl; Promega) 1 µl을 포함한 20 µl을 42°C에서 1시간 30분간 시행하였다. 합성된 일차 cDNA는 증류수 80 µl을 첨가하여 희석한 뒤, -20°C에서 저장하였다.

다. ACP(Annealing Control Primer)-based GeneFishingTM PCR

차별발현유전자는 GeneFishingTM DEG kits(Seegene, Seoul, Korea)를 이용하여 ACP-based PCR 방법으로 선별하였다(Fig. 1). 즉, 이차 cDNA(second-strand cDNA)은, 3-5 µl(약 50 ng)의 희석된 일차 cDNA, dT-ACP2 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3', 10 µM) 1 µl, 10 µM 임의 ACP 1 µl 그리고 2 × Master Mix (Seegene, Seoul, Korea) 10 µl를 포함한 최종 반응용량 20 µl를 이용하여 일차 PCR 첫 번째 cycle에서 합성하였다. 이차 cDNA의 합성을 위한 PCR 양식은 94°C에서 1분간, 50°C에서 3분간, 72°C에서 1분간 1회 시행하였다. 이차 DNA합성이 완료되면 94°C에서 40초간, 65°C에서 40초간, 72°C에서 40초간, 그리고 72°C에서 5분간을 40회 반복하는 이차 PCR을 시행하였고, 이에 따라 증폭된 PCR 결과물은 치화 에티디움염이 염색된 2%의 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동하였다(Fig. 2). 전기영동이 끝난 후, 자외선에 노출시켜 각각

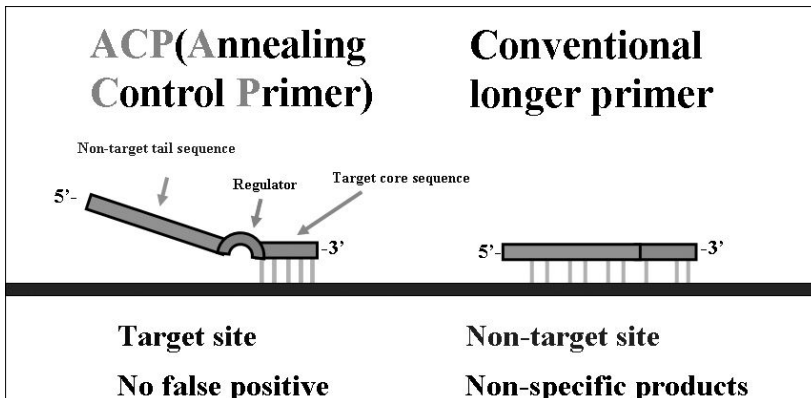


Fig. 1. Annealing Control Primer(ACP) structure. APC technology provides a primer with annealing specificity to the temple and allows only real products to be amplifies, such that it enables the researchers to find only real products as a result.

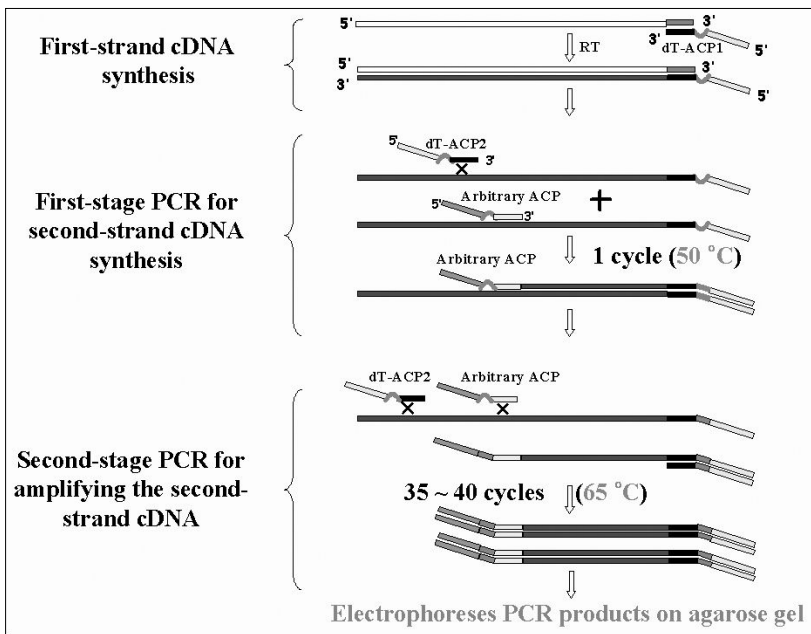


Fig. 2. Flowchart of GeneFishing™ technology which includes first-strand cDNA synthesis, first-stage PCR for second-strand cDNA and second-stage PCR for amplifying the second-strand cDNA. (dT-ACP1: 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIII(18)-3' dT-ACP2: 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(15)-3').

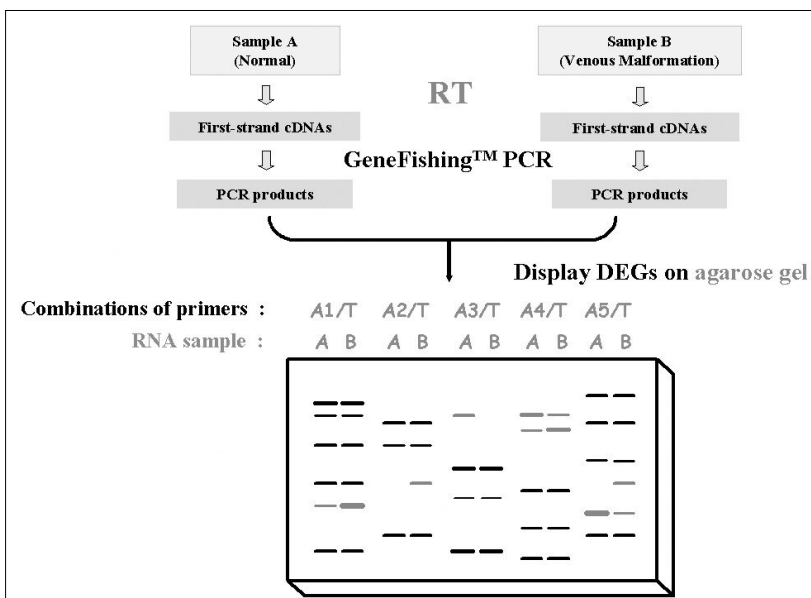


Fig. 3. Design of the Study. Samples from patients having venous malformation and samples from normal were collected and specifically amplified through GeneFishing™ technology. DEGs were compared to each other. (A1-5: samples, T: primer).

의 차별발현유전자에 대한 관찰을 시행하였고 드러난 차별발현유전자 중 발현 차이가 뚜렷한 유전자들을 선택하여 DNA 염기순서분석(sequencing)을 하였다(Fig. 3).

라. 직접 염기순서분석(Direct Sequencing)

차별적으로 발현된 유전자는, GENCLEAN II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 겔로부터 분리되어 재증폭(reamplification) 과정을 거친 후, 보편적인 시동체(universal primer, 5'-GTCTACCAGGCATTC GCTTCAT-3')를 사용한 ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 직접 유전자염기서열을 검증해냈다. 유전자 염기서열들은 BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)를 이용하여 기존의 등록되어진 유전자 염기서열 자료(sequence database)와 비교 분석하였다.

III. 결 과

정상인과 정맥기형 환자들의 조직에서 추출한 mRNA를 GeneFishing™ PCR을 통해 분석해본 결과, 정맥기형 환자의 조직에서 정상인과 다른 70개의 차별발현유전자를 발견할 수 있었고 그 중 발현차이가 명백한 40개의 차별발현유전자를 분석하였다. 아가로스 겔 상에서 확인된 40개의 유전자 중 정상피하조직과 정맥기형 환자의 조직을 비교했을 때 28개의 유전자는 발현이 증가하였으며, 12개는 발현이 감소하였다. 각각 발현이 증가 혹은 감소된 유전자에 대한 경향을 살펴보면, MB, ACTA1, TPM2, TNNI2, MYH7, MYL3, MYH8, MYH11, MYH1, MYL2 등과 같이 근육세포에 관련된 유전자, NFE2L1, APOBEC2, HDLBP와 같이 전사에 관련된 유전자, CALM1, CRYAB와 같은 세포신호와 관련된 유전자, TNXB와 같이 세포외기질과 관련된 유전자 등이 발현의 증가를 보였다(Table I). 상대적으로 JUP, S100A8와 같이 세포성장에 관련된 유전자는 감소된 발현을 보이는 경향이 있었다(Table II). 또한 그 정확한 기능이 밝혀지지 않은 유전자들이 증가 혹은 감소된 발현 군에서 나타났다. 염기서열 정보는 BLAST에 의한 분석에 따르면 37개의 유전자들은 기존에 염기서열이 알려진 유전자와 95% 이상의 일치율을 보였고, DEG 19, 38, 63B 등 나머지 3개의 유전자들은 아직 알려지지 않은 유전자 염기서열로 나타났다.

IV. 고 찰

혈관기형은 혈관종양과는 다르게 발생 과정에서의

오류에 의해 발생한다고 알려져 있다. 그래서 혈관의 발생과정에서 그 원인을 찾으려는 많은 노력들이 있었다. 우선 혈관과 림프관의 발생 과정은 크게 세 가지로 구분해 볼 수 있다. 혈관형성(vasculogenesis), 혈관신생(angiogenesis) 그리고 림프관형성(lymphangiogenesis)이다. 혈관형성은 배아(embryo)에서 혈관이 형성되는 것으로 혈관모세포(angioblast)에서 관모양(tube-shaped)의 구조물이 만들어지고 일차적 모세혈관층(primary capillary layer)을 형성하는 일련의 과정이다. 이에 비해 혈관신생은 혈관형성의 과정에서 만들어진 일차적 모세혈관층의 성장과 재형성을 통해 좀 더 복잡한 혈관망, 즉 동맥, 모세혈관, 정맥 등의 성숙한 혈관계를 구성하는 단계이다. 림프관형성은 혈관형성 단계와 비슷한 과정을 거쳐 림프관모세포(lymphangioblast)에서 림프관이 만들어지는 과정이다. 모든 형성과정들이 다양한 작용제(agonist)와 길항제(antagonist)의 상호작용에 의해서 이루어진다. 이러한 상호작용의 불균형이 혈관기형을 초래할 수 있다는 가설 하에 여러 가지 연구들이 이루어졌는데, 혈관의 발생과정에 대한 연구에서 유전자의 분석은 매우 중요하며, 최근 분자생물학의 눈부신 발전과 함께 많은 발전이 있어왔다.⁸ 그러나 이번 실험에서 나타난 큰 차이를 보인 40개의 차별발현유전자 중 혈관신생에 관련되는 유전자는 전혀 없었으며, 이는 작은 차이를 보인 나머지 30개의 차별발현유전자 중에 포함되었을 것이라고 생각된다. 이러한 맥락에서 생각해 보면 혈관신생과 관련된 유전자가 정맥기형의 발병에 영향을 미치지만 정맥기형 환자들의 유전자 치료에 있어서 적절한 표적(target)이 아닐 수도 있다는 것을 짐작할 수 있다.

대개의 혈관기형이 산발적으로 발생하지만 일부에 있어서 가족력을 가지는 경우가 있는데 지난 10여 년간 가족력을 가진 몇몇 혈관기형 중에서 이 질환에 관련된 몇 가지 유전자가 밝혀진 바 있다. 예를 들어 VMCM1은 염색체 9p21 상에 존재하면서 상염색체 우성으로 유전되며 피부와 점막의 정맥기형 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁹ 그 밖에도 내피세포의 특이 수용체인 TEK(tyrosine kinase, TIE-2)에서 발견되는 변이(R849W)가 정맥기형의 발생 원인이 된다는 보고가 있다.¹⁰ TIE-2의 경우 혈관형성과 혈관신생에 중요한 역할을 하는 유전자로 많은 연구가 되어있는데 내피세포의 TIE-2 수용체의 변이 및 Ang-1, 2와의 불균형적인 결합 과정은 혈관발생 과정에서 혈관민무늬근육의 집결(recruitment)에 영향을 미쳐 혈관민무늬근육의 상대적 결여를 일으킬 수 있을 것으로 알려져 있다. 물론 내피세포의 세포신호(cell signaling)를 혈관민무늬근육에 전

Table 1. Database Information of Complementary DNA Clones(Up-regulation)

Clones	Genebank Database
DEG 2	Homo sapiens myoglobin(MB), transcript variant1,2,3
DEG 6	Homo sapiens actin, alpha1, skeletal muscle(ACTA1)
DEG 8	Homo sapiens nuclear factor(erythroid-derived2)-like1(NFE2L1)
DEG 9	Homo sapiens apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like2(APOBEC2)
DEG 12	Homo sapiens tropomyosin2(beta)(TPM2), transcript variant1
DEG 13	Homo sapiens genethonin1(GENX-3414)
DEG 14	Homo sapiens troponinI type2(skeletal,fast)(TNNI2)
DEG 16	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide7, cardiac muscle, beta(MYH7)
DEG 19	(BLAST:EST) xt03b03. x1NCI_CGAP_Ut4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 27780293'similar to contains Alu repetitive element; contains element IVR repetitive element
DEG 24	Homo sapiens myosin, light polypeptide3, alkali; ventricular, skeletal, slow(MYL3)
DEG 27	Homo sapiens ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch2(ATP2A2), transcript variant2
DEG 28	Homo sapiens ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch2(ATP2A2), transcript variant2
DEG 31	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide8, skeletal muscle, perinatal(MYH8)
DEG 34	Homo sapiens cDNA FLJ11177fis, clone PLACE1007402
DEG 38	(BLAST:EST) zq01d08.s1 Stratagene muscle 937209 Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 6284313'similar to contains Alu repetitive element; mRNA sequence
DEG 47	Homo sapiens crystallin, alphaB(CRYAB)
DEG 49	Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD51E06
DEG 51	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide11, smooth muscle(MYH11), transcript variant SM2B, SM1A
DEG 52	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide1, skeletal muscle, adult(MYH1)
DEG 53	Homo sapiens neugrin, neurite outgrowth associated(NGRN), transcript variant1,2
DEG 54	Homo sapiens glutamic-oxaloacetic transaminase1, soluble (aspartate aminotransferase1)(GOT1)
DEG 57	Homo sapiens troponinT type1(skeletal, slow)
DEG 61	Homo sapiens actin, alpha1, skeletal muscle(ACTA1)
DEG 63	(CloneA)(query : 825) Homo sapiens high density lipoprotein binding protein(vigilin)(HDLBP) (CloneB)(query : 854)(BLAST : EST) AGENCOURT_15364363Lupski_anterior_horn Homo sapiens cDNA clone IMAGE : 305133615', mRNA sequence
DEG 64	Homo sapiens calmodulin1(phosphorylase kinase, delta)(CALM1)
DEG 66	Homo sapiens myosin, light polypeptide2, regulatory, cardiac, slow(MYL2)
DEG 69	Homo sapiens tenascinXB(TNXB), transcript variant XB, XB-S
DEG 70	PREDICTED:Homo sapiens hypothetical protein LOC642540(LOC642540)

달하는 경로가 TIE-2만 존재하는 것은 아니다. Lindahl 등¹¹에 의하면 PDGF-BB 또는 AA(platelet derived growth factor-BB, AA), TGF- β (transforming growth factor- β), HB-EGF(heparin-binding epidermal growth factor) 등이 바로 그것이다. 이처럼 정맥기형은 단 하나

의 염색체나 유전자에 변이가 생긴 것이라기보다는 서로 연관된 하나 이상의 유전자들의 변이에 의한 것이라고 볼 수 있다. 그러므로 정맥기형을 포함한 혈관기형과 관련된 염색체와 유전자를 밝히는 것은 큰 의의를 가진다고 하겠다.

Table II. Database Information of Complementary DNA Clones(Down-regulation)

Clones	Genebank Database
DEG 3	Homo sapiens solute carrier family25(mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member5
DEG 7	Homo sapiens S100 calcium binding protein A8(calgranulinA)(S100A8)
DEG 10	Homo sapiens S100 calcium binding protein A7(psoriasin1)(S100A7)
DEG 18	Homo sapiens calmodulin-like5
DEG 21	Homo sapiens UDP glucuronosyl transferase1 family, polypeptide A7(UGT1A7), A3(UGT1A3), A8(UGT1A8), A1(UGT1A1), A6(UGT1A6), transcript variant1,2
DEG 23	Homo sapiens keratin10(epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)(KRT10)
DEG 29	Homo sapiens junction plakoglobin(JUP), transcript variant1,2
DEG 32	Homo sapiens late cornified envelope2C(LCE2C)
DEG 44	Homo sapiens protein phosphatase1, regulatory(inhibitor) subunit13 like(PPP1R13L)
DEG 58	Homo sapiens periplakin(PPL)
DEG 62	Homo sapiens keratin14(epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)(KRT14)

앞서 언급한 바와 같이 임상에서 흔히 접하는 정맥기형은 가족력이 없이 산발적으로 발생하는 경우가 더 흔하다. 산발적으로 발생한 정맥기형 환자의 조직에 대해 저자들은 예비실험으로 혈관신생과 관련된 유전자와의 관계를 연구하였다. 이 때 사용된 조직은 이 후 본 실험에서도 사용되었다. 예비실험에서는 FLT4(fms-related tyrosine kinase 4, VEGFR3), TIE2(TEK), FLT1(fms-related tyrosine kinase 1, VEGFR1), ANGPT1(angiopoietin1), F2R(coagulation factor II receptor, PAR1), GPR37(G protein-coupled receptor 37), EDNRB(Endothelin receptor B), PTAFR (Platelet activating factor receptor), EDNRA (Endothelin receptor A), and F2RL1 (coagulation factor II receptor like 1, PAR2)를 포함한 혈관신생과 관련된 10개의 다른 유전자에 대한 조사를 하였는데, 정맥기형 환자와 정상인 사이에서 FLT4, TIE2, F2R, EDNRB 그리고 F2RL1의 발현에 차이를 보였다. 하지만, 이 결과만으로는 정맥기형의 병리학적 기전을 모두 설명하기에는 불충분하여 추가적인 유전학적 연구가 필요하였다.

본 연구에 사용된 유전자 분석기법인 GeneFishing™ PCR은 두 가지 이상의 핵산 사이에서 서로 다르게 발현되는 유전자를 탐색하는데 목적이 있다. 여기에서 차별발현유전자란, 앞서 언급하였듯이 비교대상 시료간의 mRNA 발현차이를 보이는 유전자들을 의미하는 것으로 현재 그 응용분야를 살펴보면 질병관련 유전자, 발생단계에서의 유전자, 약물이나 호르몬을 처리한 시료에서의 유전자, 생물학적인 변환에 따른 유전자, 항생제내성 유전자 연구 등과 같이 상호비교를 통한 유전자의 탐색에 매우 유용한 개념으로 많은 응용이 되고 있다. 기존의 차

별발현 유전자를 밝히는 기법들은 부합화(hybridization)를 기본으로 하는 differential hybridization, subtractive hybridization, suppression subtractive hybridization, microarrays, DNA chip 방법과 PCR을 기본으로 하는 representational differential analysis(RDA), DNA/RNA fingerprinting (RAP-PCR), differential display(DD-PCR), serial analysis of gene expression(SAGE) 방법으로 크게 나눌 수 있다. 그 중 PCR을 이용하는 방법이 민감도가 높아 활용이 용이하다고 알려져 있다. 요즘 들어 많이 이용되고 있는 DNA Chip의 경우, 유전자 발현 차이를 통계학적으로 분석하여 발현 변화를 확인하는 반면에, PCR법을 기본으로 한 기술은 발현된 유전자를 아가로즈 겔 상에서 육안으로 확인하는 다른 점을 가지고 있다. GeneFishing™ 기법은 최근 개발된 방법으로 다른 기법에 비해 특이성과 재현성이 뛰어나고 쉽게 시행할 수 있는 것을 장점으로 하고 있다. 세부과정을 살펴보면, ACP(Annealing Control Primer)를 이용하여 일차 PCR(Annealing Temperature, Ta=50℃)에서는 목표구역(target region)만이 시동체 기능을 하게 되고, 비목표구역(Nnon-target region)은 기능을 차단하게 된다. 그리고 이차(second-stage) PCR(Ta=65℃)에서는 비목표구역만이 특이하게 결합하여 많은 DNA를 얻을 수 있는데 이러한 ACP를 이용하여 다량의 DNA를 확보할 수 있는 장점이 있다. 기존의 DD-PCR(Differential Display- PCR)과 다른 점은 세 개 이상의 anchor dT(A anchored dT, G anchored dT, C anchored dT)를 사용하여 cDNA를 세 개 이상의 Sub-population으로 구성되어 있다는 것이고 Arbitrary ACP와 oligo-dT ACT 조합으로 PCR을 행하여 실질적 PCR 생산물(real PCR

product)만을 얻을 수 있으며 생산물을 아가로즈 젤 상에서 편리하게 확인할 수 있다는 장점이 있다.¹²

본 연구에서는 차별발현유전자 중 혈관신생과 관련된 유전자가 많이 나타날 것이라는 가설에서 크게 벗어나서 대개의 경우 근육 세포와 관련된 것으로 나타났다. 이러한 여러 가지 유전자들에 대한 분석과 해석을 위해 현재까지 연구된 보고들을 살펴보고 비교적 정맥기형의 병인론과 관련이 있는 것으로 생각되는 유전자들에 대한 고찰을 하였는데 먼저 발현이 증가된 유전자 중 APOBEC2 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2)는 유전자 지도 (gene mapping) 상 VEGF 유전자의 근위부에 위치하며 mRNA 편집 유전자(editing gene)로 알려져 있고 Vigilin은 mRNA의 안정화(stabilization)와 tRNA의 세포내 이송(transport)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 세포내 전사 혹은 그와 관련된 과정에 관여할 것으로 생각된다.⁸ 세포내 칼슘 신호체계 (calcium signaling system)에 중요한 단백질인 calmodulin 1은 산화질소(nitric oxide, NO) 합성, VEGF와 연관된 혈관민무늬근육세포(vascular smooth muscle cell)의 이송(migration), 혈관 투과도(vascular permeability)의 증가, cyclinE/CDK2 체계와 연관된 세포 주기의 변화에 따른 혈관민무늬근육세포의 세포증식 및 분화의 조절 등을 하는 gene으로 알려져 있는데, 정상세포의 이러한 작용들이 정맥기형의 비정상적인 혈관민무늬근육세포에서 어떠한 변화가 있는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.^{13,14} 세포외기질 단백질의 하나인 Tenascin X의 경우는 VEGF receptor I을 통해 세포증식을 촉진하고 세포외기질 단백질의 반접합(anti-adhesive) 기능을 하는 것으로 알려져 있고, 발현이 감소된 유전자 중 plakoglobin을 세포접합분자(cell adhesion molecule)로 혈관 투과도(vascular permeability)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 두 유전자들은 모두 세포와 세포, 세포와 세포외기질의 접합을 방해하는 쪽으로 작용하는 것으로, 혈관신생 과정 중의 하나인 혈관 투과성에 연관될 것으로 추정해 볼 수 있다.^{9,15}

여러 가지 DEG에 대한 분석을 요약해보면, 민무늬근육과 연관된 많은 유전자들은 근세포 (mural cell)나 민무늬근육의 분화, 재형성에 영향을 주는 것으로 해석되고 몇 가지 전사 혹은 관련 유전자들과 세포신호에 연관된 유전자들, 그리고 대사를 조절하는 유전자들은 생물학적 과활동과 혈관재형성에 관여하는 것으로 생각되며 그 외 세포외기질의 구성이나 이에 따른 세포와의 상호작용에 많은 변화가 있는 것으로 해석되어진다. 전

반적인 유전자들의 발현양상을 종합해볼 때 혈관민무늬근육이 가장 중요한 원인으로 작용하는 것으로 사료된다.

V. 결 론

결론적으로 정맥기형의 원인을 규명하기 위한 유전자 분석에서 차별발현유전자를 발굴, 분석한 결과, 전체적인 정맥기형 발생의 병리학적 이론을 위한 기초적인 정보를 얻을 수 있었으며 나아가 각각의 유전자들에 대한 개별적인 연구를 통하여 임상적인 응용에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Mulliken JB, Glowacki J: Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* 69: 412, 1982
- Enjolras O, Mulliken JB: Vascular tumors and vascular malformations(new issues). *Adv Dermatol* 13: 375, 1997
- Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB, Olsen BR: Molecular basis of vascular anomalies. *Trends Cardiovasc Med* 8: 281, 1998
- Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB: Molecular genetics of vascular malformations. *Matrix Biol* 20: 327, 2001
- Chaff JE, Steckman DA, Blei F: Genetics of vascular anomalies; an update. *Lymphat Res Biol* 1: 283, 2003
- Vikkula M, Boon LM, Carraway KL 3rd, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR: Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 87: 1181, 1996
- Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CI, Gu YY, Chun JY: Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques* 35: 1180, 2003
- Chiller KG, Frieden IJ, Arbiser JL: Molecular pathogenesis of vascular anomalies: classification into three categories based upon clinical and biochemical characteristics. *Lymphat Res Biol* 1: 267, 2003
- Gallione CJ, Pasyk KA, Boon LM, Lennon F, Johnson DW, Helmbold EA, Markel DS, Vikkula M, Mulliken JB, Warman ML, Pericak-Vance MA, Marchuk DA: A gene for familial venous malformations maps to chromosome 9p in a second large kindred. *J Med Genet* 32: 197, 1995
- Morris PN, Dunmore BJ, Tadros A, Marchuk DA, Darland DC, D'Amore PA, Brindle NP: Functional analysis of a mutant form of the receptor tyrosine kinase Tie2 causing venous malformations. *J Mol Med* 83: 58, 2005
- Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C: Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-efficient mice. *Science* 277: 242, 1997

12. Hwang DY, Cho JS, Oh JH, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Seo SJ, Lee SK, Lee SH, Kim YK: Differentially expressed genes in transgenic mice carrying human mutant presenilin-2(N141I): correlation of selenoprotein M with Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 30: 1009, 2005
13. Korpelainen EI, Kärkkäinen M, Gunji Y, Vikkula M, Alitalo K: Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene* 18: 1, 1999
14. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161, 1996
15. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin 2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 277: 55, 1997