

생체에서 분리된 혈관조직에서 아데노바이러스벡터를 이용한 특정 단백질의 발현

허양훈 · 김학림*#

한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부, *단국대학교 의과대학 약리학교실
(Received June 14, 2013; Revised July 8, 2013; Accepted July 18, 2013)

Targeted Protein Expression in Freshly Isolated Vascular Tissues by Using Adenoviral Vector

Yang Hoon Huh and Hak Rim Kim*#

Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea
*Department of Pharmacology, College of Medicine, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea

Abstract — Treatments of vascular disease via modulating the expression of specific proteins by gene transfer have been attempted in various studies over the past few years. Among several methods to deliver genes, adenovirus currently has been used because of a number of positive aspects. In this study, we test adenoviral vector as a potential mediator in the treatment of vascular disease by using freshly isolated vascular tissues not cultured vascular cells. Freshly isolated vascular tissues were directly exposed to adenoviral vector pAd5CMVmcSIRESeGFPpA to check the possibility of GFP expression in different layer of vascular tissues. We found that the GFP expression by using adenoviral vector experiments is mainly focused on the adventitia and failed to detect GFP expression at endothelial layer or vascular smooth muscle layer in vascular tissues. However, we also found that several integrin receptors are robustly expressed in vascular smooth muscle, thus the limited expression of protein in vascular smooth muscle are not likely the lack of integrin receptors. In conclusion, adenovirus could not be a good tool for a specific protein expression in vascular smooth muscle cell. Thus, the application of adenovirus as a tool for gene therapy of vascular smooth muscle cells in clinical therapeutic trial need to be optimized further.

Keywords □ adenovirus vector; integrin, vascular smooth muscle cell, protein expression, tissue culture

전 세계적으로 많은 환자들이 심혈관계 질환으로 사망하고 있으며 특히 고혈압, 당뇨, 비만 및 고지혈증 등과 같은 심혈관계 질환 위험요인의 증가는 심혈관계 질환의 발생, 유병률 및 사망률의 급격한 증가를 나타내고 있다. 특히 혈액순환의 통로인 혈관은 생명유지에 필수적인 여러 핵심장기에 혈액을 공급하는 핵심적인 역할을 담당하고 있으며 혈관질환으로 인한 장애는 그 혈관이 혈액공급을 담당하는 장기의 기능에 심각한 영향을 미치게 된다.¹⁻³⁾

혈관의 구성은 일반적으로 내피층(intima)를 형성하고 있는 내피세포(endothelial cell)과 내부 탄성층(elastical interna)이 가장 안쪽에 존재하고 그 주변에 혈관평활근 세포들이 놓여 있는 중간층(media)과 섬유아세포(fibroblast) 등으로 구성된 외피층

(adventitia)로 구성되어 있다.¹⁾ 특히 혈관평활근은 혈관의 긴장도(tone)를 유지하여 혈액공급조절과 관련한 중요한 역할을 담당하고 있다. 혈관질환의 치료를 위하여 유전자 전달을 통한 단백질 발현을 조절하려는 다양한 시도들이 실험동물 등을 이용한 연구에서 시도되어 왔다.^{4,5)} 실험실 또는 유전자 치료를 위한 임상시험에서 세포에 어떤 특정 유전자를 전달하거나, 유전자 치료를 시도할 때 사용하는 다양한 유전자 전달 방법들이 지난 수십 년간의 많은 연구를 통해서 이루어져 왔다. 특히 유전자를 전달하는 여러 방법들 중에서 아데노바이러스는 세포의 증식에 관계없이 다양한 세포를 감염시킬 수 있고, 또한 감염 후 숙주의 유전자에 통합되지 않으므로 삽입성 돌연변이 위험이 낮기 때문에 유전자 치료에 현재까지 가장 많이 사용되어 왔다.^{4,6)} 아데노바이러스는 envelope가 없으며 capsid내에 이중나선의 유전자를 가지고 있으며 capsid의 표면에 존재하는 penton 복합체가 바이러스의 세포 내 유입에 중요한 조절자 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 아데노바이러스를 이용해 유전자를 표적세포에 전달

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-550-3935 (팩스) 041-551-3866
(E-mail) hrkim@dankook.ac.kr

하려고 할 때, 표적세포의 CAR(coxsackie virus and adenovirus receptor)와 인테그린(integrin) 수용체의 존재 유무가 유전자 전달의 효율을 결정하는데 있어서 중요한 인자들로 알려져 있다.⁸⁾ 어떤 특정세포에서 전달된 유전자가 발현되기를 원한다면 조직 혹은 세포 특이성 promoter를 이용하는 것이 적합하다.⁹⁻¹¹⁾ 체내의 많은 세포가 아데노바이러스에 감염이 잘 되지만, 최근의 연구에 의하면 혈관내피세포와 평활근세포, 분화된 호흡기도의 외피세포, 임파구, 혈액모세포 및 섬유세포 등이 CAR과 인테그린(integrin)의 발현이 낮아서 바이러스에 대한 감염률이 낮은 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴⁾

따라서 본 연구에서는 실험실에서 배양된 혈관세포¹⁵⁾ 또는 내피세포가³⁾ 아닌 동물에서 분리한 혈관조직을 이용하여 혈관조직에 직접 노출시킨 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달이 혈관의 구성세포들에서 단백질의 발현 조절과 아데노바이러스 감염에 중요한 역할을 담당하는 혈관조직에서의 인테그린의 발현을 확인하여 혈관질환의 치료에 있어서 유전자 전달의 매개체로써 아데노바이러스의 사용 가능성을 살펴보았다.

실험방법

시약

다음과 같은 약품이 사용되었다. Phenylephrine, Potassium chloride, Monoclonal anti-beta-actin, Monoclonal anti-alpha-smooth muscle actin(Sigma, St. Louis, MO, USA). GFP antibody (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). IRDye 800CW conjugated goat(polyclonal) anti-mouse IgG(LI-COR Biosciences, Lincoln, NB, USA). Integrin screen kit(Millipore), Integrin antibody sampler kit(Cell Signaling Technology). Alexa Fluor Dye conjugated secondary antibodies(Invitrogen). 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs 용액이나 생리식염수에 첨가되었다. 일반적인 시약은 분석등급 또는 그 이상의 것을 사용하였다.

조직준비

모든 동물 실험은 실험동물의 보호와 사용에 관한 가이드라인(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH 1996)을 준수하여 수행되었다. 200g 정도의 Sprague-Dawley 흰쥐를 과량의 isoflurane을 흡입하여 인락사 시킨 후 개복하여 대동맥과 대퇴동맥(femoral artery)을 재빨리 적출한 후 냉각된(4°C) 생리학적 생리식염수에 위치하였다. 생리학적 식염수의 조성은 다음과 같다(단위 mM); 120 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 11.5 dextrose, 1 CaCl₂, and 1.4 MgCl₂(pH 7.4). 분리된 혈관들은 외부에서 medical oxygen(95% O₂-5% CO₂)을 공급하는 상태에서 혈관평활근과 내피세포를 포함하여 혈관 이외

의 부수적인 조직들을 제거한 후 실험에 사용하였다.

혈관 수축력의 측정

배양된 혈관의 일부를 절제한 고리 조각은 봉합실을 이용하여 온도가 유지되는 기관수조에 현수 되었다. 현수된 혈관은 등장력 변환기에 연결하여 자극에 의한 혈관수축의 변화가 측정되도록 하였다. 기관수조 내 용액은 생리학적인 식염수를 사용하였으며 37°C에서 medical oxygen(95% O₂ and 5% CO₂)을 공급하였다. 1시간의 평형 기간 동안 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절되었으며 평형 기간 후에 혈관고리는 KCl(51 mM) 및 phenylephrine (1 μM)로 자극하여 근육의 수축을 측정하였으며 충분한 수축이 발생하였을 때 추가적인 실험이 진행되었다.¹⁶⁾

Western blot

단백질의 발현을 확인하기 위한 실험에 사용된 혈관을 lysis buffer로 용해하고 용해되지 않은 혈관구성물들은 원심 분리하여 제거하였다. 상등액을 취하여 SDS-PAGE로 변성 분리하고 이를 PVDF membrane에 이전시켰다. 이를 상온에서 Odyssey blocking buffer에 넣어 1시간 동안 block한 후 적절한 1차 항체에 넣어 4°C에서 밤새도록 반응시킨 후 tris buffered saline (TBS)으로 집중적으로 세척한 후 형광이 표지된 적절한 2차 항체 용액에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 본 실험에 사용한 GFP항체는 Cell Signaling(Beverly, MA)으로부터 구입하여 1:1000의 비율로 희석하여 사용하였으며, 인테그린 항체는 Integrin screen kit(Millipore), Integrin antibody sampler kit (Cell Signaling Technology)을 구입하여 1:1000의 비율로 사용하였다. 또한 2차 항체는 IRDye® 800CW conjugated goat (polyclonal) anti-mouse IgG(LI-COR® Biosciences, Lincoln, NB, USA)을 구입하여 1:5000의 비율로 사용하였다. TBS로 충분히 세척한 후 Odyssey infrared imaging system(LI-COR Biosciences)를 이용하여 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

아데노바이러스 벡터

본 실험에 사용된 아데노바이러스 벡터는 침투한 세포 내에서 자가복제가 발생하지 않아 증식이 불가능한 pAd5CMVmcs-IRESeGFPpA로서 Gene Transfer Vector Core Laboratory at University of Iowa에서 분양 받았다.⁶⁾ Human adenovirus serotype 5(Ad5) DNA constructs는 ±37.5 kb의 full-length copy로 구성되어 있으며 복제를 위한 E1A와 E1B 유전자 초기 부분이 green fluorescent protein(GFP)를 위한 cDNA로 대체되었으며 진핵세포(eukaryotic cell)에서 최대의 발현효과를 가질 수 있도록 변형하였다. 리포터 유전자의 발현은 특이성 없는 Cytomegalovirus(CMV) promoter에 의해 유도되었다. 재조합 바이러스는 E1 early viral promoters가 보유했던 human embryonic

kidney(HEK) 293 cells에서 성장시켰으며 생성된 바이러스는 sucrose(3%)가 첨가된 phosphate-buffered saline (PBS)에 현탁되어 실험실에 전달되었다.¹⁷⁾

조직배양

분리된 혈관은 1% glutamine, 50 units/ml penicillin 및 50 microgram/ml streptomycin이 첨가된 DMEM high glucose에서 배양하였으며, 혈관의 수축형 표현형을 유지하기 위하여 fetal bovine serum을 첨가하지 않았다. 혈관 조직은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 혈관조직에 대한 아데노바이러스의 감염은 분리된 대동맥 또는 대퇴동맥(femoral artery) 내측에 주사기를 이용하여 적절한 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)의 아데노바이러스가 현탁된 배양액을 흘려 넣어 감염시켰다.⁷⁾

조직면역염색

실험에 사용된 혈관조직을 액체질소에서 급속 냉동시킨 후 OCT 용액에 넣어 액체질소에 담가 급속 동결시킨다. Cryostat을 이용하여 5~10 micrometer 두께로 조직을 얇게 자른 후 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드 글라스에 부착시킨다. 고정액(4% paraformaldehyde)으로 조직을 고정한 후에 비특이적 반응들을 blocking 한 후 적절한 항체를 처리한다. PBS로 잘 washing하고 적절한 형광표지된 2차 항체를 넣어 염색한 후 최종 washing 전에 DAPI 용액을 넣어 counter staining을 한다. 수용성 mounting solution을 이용하여 커버글래스를 마운팅한 후 CFI Plan Apo VC 20X 대물렌즈가 장착된 Nikon 형광현미경을 이용하여 염색된 형광을 관찰하였다.¹⁶⁾

통계처리

모든 측정 가능한 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군 간의 차이는 Student's *t*-test를 사용하여 p<0.05 수준에서 통계적 유의성을 판단하였다.

실험결과 및 고찰

아데노바이러스에 감염된 혈관의 조직배양 후 수축력

실험동물로부터 분리한 혈관조직을 위에 기술한 대로 준비하여 혈관의 인쪽부분에 충분한 양의 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA 아데노바이러스 현탁액을 흘려 넣어 감염시킨 후 DMEM 배양액에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3일간 배양하였다. 조직배양 후 혈관조직을 배양접시에서 회수하여 혈관 고리를 만들고 위에서 기술한 바와 같이 기관수조에 현수 하였다. 배양액에서 3일간 배양한 후 혈관조직의 주요 기능인 수축력을 측정하여 구성하고 있는 혈관평활근의 생존과 사멸여부를 확인하였다. 분리된 혈관중에서 대동맥혈관은 KCl 또는 phenylephrine의 수축자극

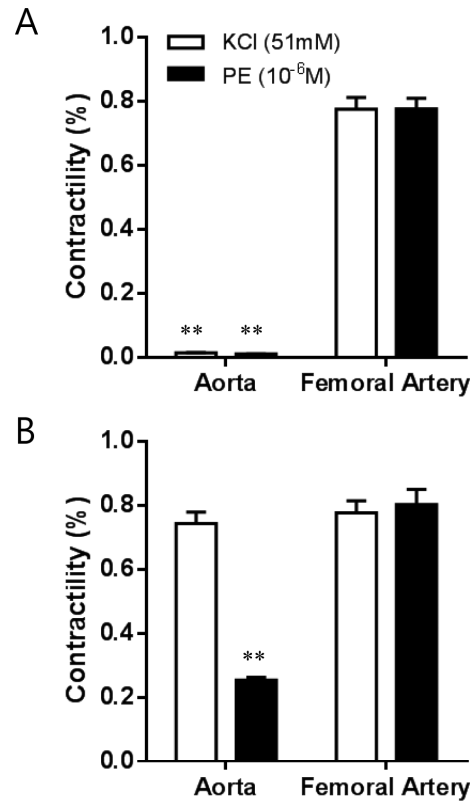


Fig. 1 – Vascular smooth muscle contractility of cultured vascular tissues after infecting with pAd5CMVmcsIRESeGFPpA. A. vascular tissues are cultured in 37°C CO₂ incubator for 3 days after infection. B. vascular tissues are cultured in 25°C medical oxygen supplied organ-bath for 3 days. Contractility is measured after stimulating by either KCl (51 mM, for 10 minutes) or phenylephrine (10⁻⁶ M, for 10 minutes). P<0.01, aorta vs femoral artery.

에 반응하지 않아 위에 배양조건에서는 추가적인 실험을 진행하지 않았다(Fig. 1A). 그러나 대동맥 혈관조직을 2g의 장력이 있는 상태로 medical oxygen을 공급하면서 25°C에서 조직배양을 하는 경우에는 KCl을 이용하여 자극하는 경우에는 충분한 수축력을 나타내었으나 이 경우에도 phenylephrine에 의한 수축반응은 매우 낮았다(Fig. 1B). 그러나 혈관의 내경이 작은 대퇴동맥(femoral artery)은 DMEM 배양액에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3일간 배양한 후에도 KCl 및 phenylephrine의 자극에 모두 충분한 수축력을 나타내었다(Fig. 1A). 따라서 이후의 실험에서는 충분한 혈관수축력을 나타내는 대퇴동맥을 사용하여 실험을 진행하였다.

아데노바이러스에 감염된 혈관조직에서의 green fluorescent protein의 발현

분리된 혈관에 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA를 감염시킨 후 배양하면 감염된 혈관조직의 세포들에서 green fluorescent protein (GFP)이 발현하게 된다. 혈관조직에서의 GFP 발현을 확인하기

위하여 감염 후 배양된 혈관조직을 급속냉동한 후 lysis buffer 로 용해하여 GFP 특이적 항체를 이용하여 Western blot 을 시행하여 단백질의 발현 여부를 확인하였다. Fig. 2와 같이 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA에 감염된 혈관조직에서는 강한 GFP 단백질의 발현이 관찰되었다. 바이러스에 감염되지 않은 동일한 조건의 혈관조직에서는 GFP 단백질의 발현이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 본 실험에 사용된 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA 아데노바이러스 벡터가 혈관조직에서 외부에서 유래된 이중 단백질인 GFP를 성공적으로 발현 시킬 수 있음을 나타낸다.

면역세포염색을 이용한 혈관조직에서의 GFP 발현의 관찰

실험동물에서 분리된 혈관의 구성은 일반적으로 내피층(intima) 를 형성하고 있는 내피세포(endothelial cell)과 내부 탄성층 (elastical interna)이 가장 안쪽에 존재하고 그 주변에 혈관평활 근 세포들이 놓여 있는 중간층(media)과 섬유아세포(fibroblast) 등으로 구성된 외피층(adventitia)로 구성되어 있다. Western blot 을 통해서 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA 아데노바이러스 벡터에 감염된 혈관조직에서 GFP가 충분히 발현된다는 것을 확인하였지만(Fig. 2), 이러한 발현이 혈관조직의 어느 부분에 집중되는 가에 대한 정보는 확인되지 않았다. 따라서 GFP가 발현되어 있는 혈관조직을 면역염색을 통해 발현부위를 확인하고자 하였다. 특히 혈관평활근은 혈관의 긴장도(tone)을 유지하여 혈액공급조 절과 관련한 중요한 역할을 담당하고 있어 혈관평활근층에 GFP 의 발현여부를 집중적으로 확인하였다. 횡단면으로 절단된 혈관 조직을 GFP 특이적 항체로 염색하고 DAPI를 counter staining 으로 하여 세포핵을 염색하였다. 대조군 혈관조직과는 달리 실험군으로 사용한 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA 아데노바이러스 벡터에 감염된 혈관조직에서는 GFP가 형광현미경에서 green

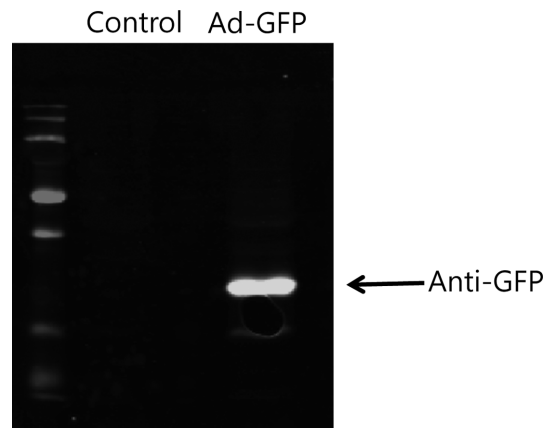


Fig. 2 – Representative immunoblot of GFP in cultured femoral artery after infecting with pAd5CMVmcsIRESeGFPpA.

channel에서 관찰되었으며, GFP 특이적 항체염색에서도 강한 형광을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 혈관조직에 많이 존재하는 것으로 알려져 있는 콜라겐 섬유들은 강한 auto-fluorescent를 가지고 있다는 것이 알려져 있으며 본 실험에서도 강한 auto-fluorescent를 관찰할 수 있었다(Fig. 3, green channel). GFP가 발현된 부위가 혈관의 구성부위 중 외피층에 집중되어 있어 본 실험의 주요타깃인 혈관평활근에서의 발현 여부를 확인하기 위하여 혈관평활근세포의 marker로 사용되는 alpha-smooth muscle 특이적 항체를 이용하여 혈관평활근층을 형광 염색하였다(Fig. 4). 혈관평활근층을 대표하는 alpha-smooth muscle 항체에 염색된 부위와(Fig. 4, green)과 GFP 항체에 염색된 부위(Fig. 4, red color)간에 co-localization이 나타나는 부위를 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 혈관조직에 사용한 pAd5CMVmcsIRESeGFPpA 아데노바이러스 벡터에 감염에 따른 GFP의 발현은 주로 외피층

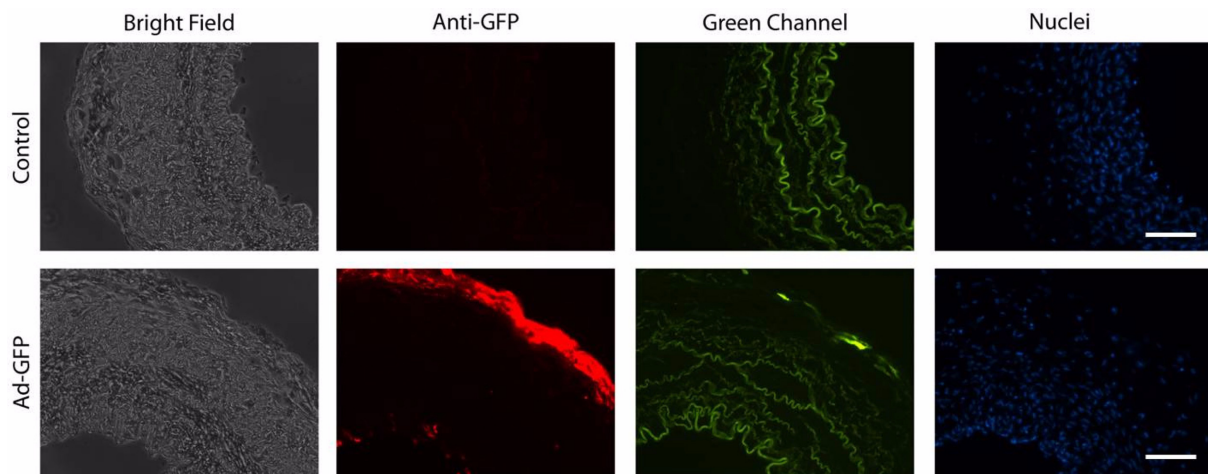


Fig. 3 – GFP expression in cultured vascular tissues. The images at upper row are control and the images at bottom row are after infecting with pAd5CMVmcsIRESeGFPpA. Nuclei are stained with DAPI (blue). GFP is stained with GFP antibody (red color). Green channel shows expressed GFP and collagen fibers (auto fluorescence). Scale bar=100 micrometer.

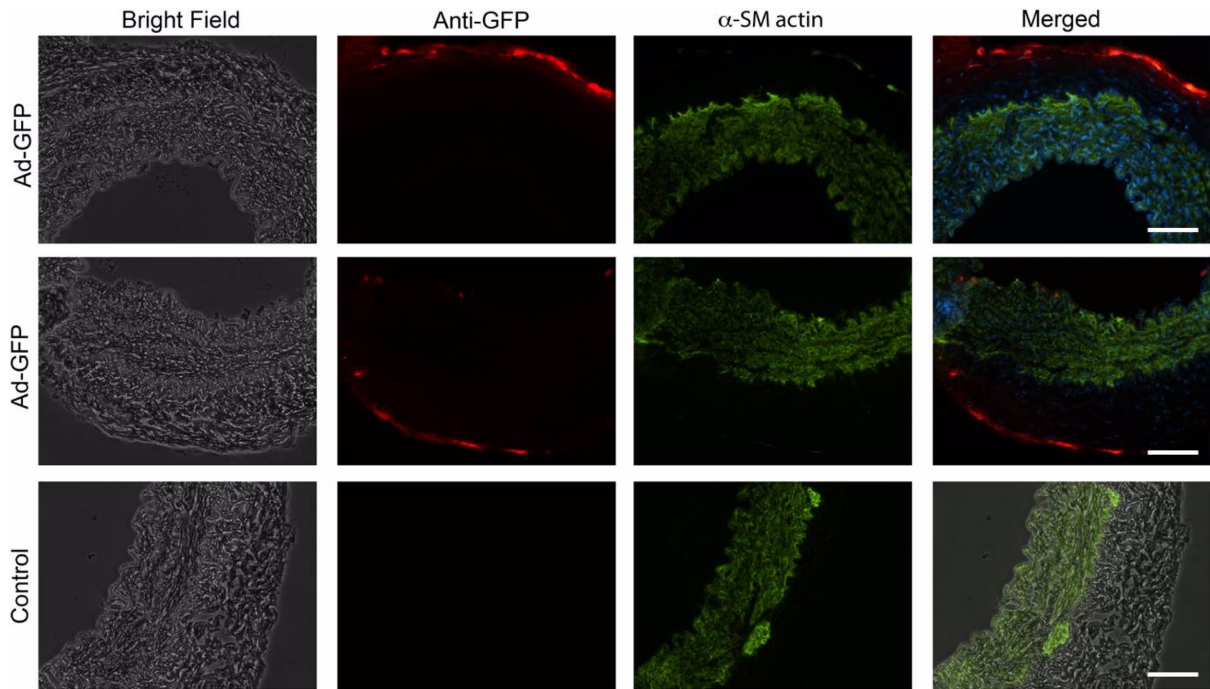


Fig. 4 – GFP is intensively expressed at adventitia in cultured vascular tissues. Vascular smooth muscle layer is stained with alpha-smooth muscle antibody (green color). Nuclei are stained with DAPI (blue). GFP is stained with GFP antibody (red color). Scale bar=100 micrometer.

에 집중되며 혈관평활근층인 중간층 또는 내피세포가 주를 이루고 있는 내피층에서는 발현이 제한되어 있음을 알 수 있다. 실험에 사용된 바이러스 현탁액을 세포 외부가 아닌 혈관내부에 주로 주입하였음을 미루어 볼 때 CMV promoter를 가지고 있는 아데노바이러스 벡터는 혈관평활근의 세포들에서 외부 단백질의 발현을 조절하기 어렵다는 것을 알 수 있다.¹³⁾

아데노바이러스에 감염된 혈관의 조직배양 후 수축력

아데노바이러스를 이용해 유전자를 표적세포에 전달하려고 할 때, 표적세포의 CAR(coxsackie virus and adenovirus receptor)와 더불어 인테그린(integrin) 수용체의 존재 유무가 유전자 전달의 효율을 결정하는데 있어서 중요한 인자들로 알려져 있다. 지금까지 알려진 바와 같이 많은 세포가 아데노바이러스에 의해 감염이 잘 되지만, 최근의 연구에 의하면 혈관내피세포와 평활근세포 등은 CAR과 인테그린(integrin)의 발현이 낮아서 바이러스에 대한 감염률이 낮은 것으로 알려져 있다.^{5,13,18)} 따라서 혈관조직에서 아데노바이러스에 의해 감염이 잘 되지 않아 GFP의 발현이 낮은 내피세포와 혈관평활근 세포에서 인테그린의 발현을 확인해 보았다(Fig. 5). 인테그린 수용체는 특히 외부에서 세포 내로 전달되는 기계적 자극을 인식하는 mechano-sensitive 수용체로 알려져 있으며 세포간 혹은 세포기질과의 상호작용에 있어서 매우 중요하며, 추가적으로 염증반응, 혈관신생(angio genesis) 등과 같은 생체 내 현상에서도 중요한 역할을 담

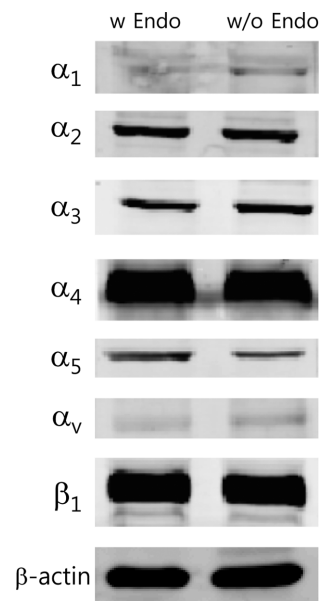


Fig. 5 – Integrin subunits are expressed in vascular tissue. Representative immunoblots of integrin receptors in femoral artery with endothelial layer (w Endo) or without endothelial layer (w/o Endo). Integrin α_2 , α_3 , α_4 , α_5 and β_1 are strongly expressed but not α_1 , α_v in femoral artery. Actin band is used as a loading control.

당하는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ 인테그린 수용체는 alpha subunit과 beta subunit의 비공유 결합으로 이루어져 있으며 현재까지

alpha subunit이 18종류, beta subunit이 8종류가 알려져 있으며 이들간의 구성 가능한 조합으로 24종의 조합이 알려져 있다.¹⁹⁾ 본 연구에서는 이중에서 alpha subunit 6종과 beta subunit 1종을 각각의 특이적 항체를 이용하여 혈관의 내피세포와 혈관평활근 세포에서의 발현여부를 확인하였다(Fig. 5). 시험에 사용된 혈관조직에서 혈관내피세포와 혈관평활근 세포에서는 alpha 2, 3, 4, 5의 발현이 확인되었으며 특히 alpha 4 subunit이 강하게 발현되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 동일한 혈관에서 alpha 1과 alpha v의 경우에는 비교적 낮거나 흔적 정도의 양으로 발현이 되고 있음을 확인하였다. 아울러 혈관내피세포와 혈관평활근세포에서 인테그린 beta 1 subunit가 강하게 발현하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 혈관의 내피세포 또는 혈관평활근 세포에서 나타나는 낮은 GFP의 발현은 혈관평활근 및 내피세포에서의 낮은 인테그린 수용체의 발현보다는 CAR의 낮은 발현으로 인해 아데노바이러스의 감염이 낮아진 것으로 추정 할 수 있다. 하지만 본 실험에서는 혈관의 내피세포 또는 혈관평활근에서 실제로 CAR의 발현이 낮은지 여부에 대하여서는 확인하지 못하였으며 생체에서 분리된 혈관평활근과 내피세포에서의 CAR의 발현에 대한 확인 실험이 요구된다.

결 론

본 연구에서는 생체에서 분리된 혈관조직을 이용하여 혈관조직에 직접 노출시킨 pAd5CMVmcSIRESeGFpA 아데노바이러스 벡터의 감염에 따른 GFP의 발현가능성을 확인하는 실험을 통해 아데노바이러스에 의한 단백질의 추가적인 발현은 주로 외피층에 집중되는 것을 확인하였으며 혈관내피세포 및 혈관평활근층에는 발현되지 않는다는 것을 확인하였다. 따라서 생체조직에서 아데노바이러스를 이용하여 혈관내피 또는 혈관평활근층에 특정한 단백질을 발현시키려는 임상적 치료적 접근법에는 제약이 있을 가능성이 있으며, 이러한 낮은 발현은 이전에 알려진 바와 같이 조직에서 낮은 인테그린 수용체의 발현에 따른 것이 아님을 제시한다.¹²⁾

감사의 말씀

"이 논문은 한국기초과학지원연구원의 지원(T33210)과 2011년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No 2011-0014382)".

참고문헌

- Graham, I., Cooney, M.-T., Bradley, D., Dudina, A. and Reiner, Z. : Dyslipidemias in the prevention of cardiovascular disease: Risks and causality. *Curr. Cardiol. Rep.* **14**, 709 (2012).
- Zimmerman, F. H. : Cardiovascular disease and risk factors in law enforcement personnel: a comprehensive review. *Cardiol. Rev.* **20**, 159 (2012).
- Shin, I.-S., Kim, J.-M., Kim, K. L., Jang, S. Y., Jeon, E.-S., Choi, S. H., Kim, D.-K., Suh, W. and Kim, Y.-W. : Early growth response factor-1 Is associated with intraluminal thrombus formation in human abdominal aortic aneurysm. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 792 (2009).
- Ali, M., Lemonine, N. and Ring, C. J. A. : The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther.* **1**, 367 (1994).
- El-Armouche, A., Singh, J., Naito, H., Wittkpper, K., Didi, M., Laatsch, A., Zimmermann, W.-H. and Eschenhagen, T. : Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKC α improves contractile function in reconstituted heart tissue. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **43**, 371 (2007).
- Anderson, R. D., Haskell, R. E., Xia, H., Roessler, B. J. and Davidson, B. L. : A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther.* **7**, 1034 (2000).
- Ross, P. J. and Parks, R. J. : Construction and characterization of adenovirus vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.* **4**, pdb.prot5011 (2009).
- Imler, J. L., Dupuit, F., Chartier, C., Accart, N., Dieterle, A., Schultz, H., Puchelle, E. and Pavirani, A. : Targeting cell-specific gene expression with an adenovirus vector containing the lacZ gene under the control of the CFTR promoter. *Gene Ther.* **3**, 49 (1996).
- Berman, S. D., Calo, E., Landman, A. S., Danielian, P. S., Miller, E. S., West, J. C., Fonhoue, B. D., Caron, A., Bronson, R., Bouxsein, M. L., Mukherjee, S. and Lees, J. A. : Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 11851 (2008).
- Inesi, G., Lewis, D., Sumbilla, C., Nandi, A., Strock, C., Huff, K. W., Rogers, T. B., Johns, D. C., Kessler, P. D. and Ordahl, C. P. : Cell-specific promoter in adenovirus vector for transgenic expression of SERCA1 ATPase in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **274**, C645 (1998).
- Lee, E. J., Anderson, L. M., Thimmapaya, B. and Jameson, J. L. : Targeted expression of toxic genes directed by pituitary hormone promoters: a potential strategy for adenovirus-mediated gene therapy of pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 786 (1999).
- Sharma, A., Li, X., Bangari, D. S. and Mittal, S. K. : Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res.* **143**, 184 (2009).
- Freimuth, P. : A human cell line selected for resistance to adenovirus infection has reduced levels of the virus receptor. *J. Virol.* **70**, 4081 (1996).

- 14) Ogorelkova, M., Elahi, S. M., Gagnon, D. and Massie, B. : DNA delivery to cells in culture: generation of adenoviral libraries for high-throughput functional screening. *Methods Mol. Biol.* **246**, 15 (2004).
- 15) Lim, H.-J., Park, H.-Y., Ko, Y.-G., Lee, S.-H., Cho, S.-Y., Lee, E. J., Jameson, J. L. and Jang, Y. : Dominant negative insulin-like growth factor-1 receptor inhibits neointimal formation through suppression of vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and induction of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1106 (2004).
- 16) Kim, H. R., Graceffa, P., Ferron, F., Gallant, C., Boczkowska, M., Dominguez, R. and Morgan, K. G. : Actin polymerization in differentiated vascular smooth muscle cells requires vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C559 (2010).
- 17) Vasquez, E. C., Johnson, R. F., Beltz, T. G., Haskell, R. E., Davidson, B. L. and Johnson, A. K. : Replication-Deficient Adenovirus Vector Transfer of GFP Reporter Gene into Supraoptic Nucleus and Subfornical Organ Neurons. *Exp. Neurol.* **154**, 353 (1998).
- 18) Lafont, A., Durand, E., Vilde, F., Moreyra, C., Drechsel, S., Mirshahi, S. S., Mirshahi, M., Gurot, C. and Lemarchand, P. : Thrombus generation after adenovirus-mediated gene transfer into atherosclerotic arteries. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2795 (1998).
- 19) Hynes, R. O. : Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549 (1987).