동맥혈관 평활근세포에서 Sodium butyrate (SB), Halofuginone hydrobromide (HH) 및 고농도 포도당이 세포성장 및 유전자 발현의 변동에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교 의과대학 면역학교실1

박준호 · 이상준 · 여준기 · 전영준 · 권기영 · 송홍석 · 한승범 · 이인규 · 김정철1

The Effect of Sodium Butyrate (SB), Halofuginone Hydrobromide (HH) and High Glucose Concentration on Cell Growth and Gene Expression in Human Aortic Smooth Muscle Cell

Park June-Ho, M.D., **Yeo Jun-Ki,** M.D., **Lee Sang-Jun,** M.D., **Jeon Young-June,** M.D., **Song Hong-Suk,** M.D., **Kwon Ki-Young,** M.D., **Han Seung-Beom,** M.D., **and Lee In-Kyu,** M.D., **Kim Jung-Chul1,** M.D.

Department of Internal Medicine Keimyung University Dongsan Medical Center, Department of Immunology Kyungpook University School of Medicine1, Taegu, Korea

ABSTRACT

Background: Vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation associated with arterial injury causes restenosis, which remains to be resolved in cardiovascular disease, especially after balloon angioplasty. Although numerous factors including hyperglycemia, hyperinsulinemia, angiotensin, basic fibroblast growth factor (BFGF), etc are suggested as potent mitogens for VSMCs, other mechanisms are still needed to take into new consideration.

Advances in molecular biology have led to the development of powerful methods for the analysis of differential gene expression. There, we clarified the effect of glucose, sodium butyrate and halofuginon hydrobromide on gene expression which play a role in VSMC growth.

Methods: Therefore, we evaluate the changes of gene expression in response to high glucose concentration, sodium butyrate which is an inhibitor of platelet-derived growth factor (PDGF), and halofuginon hydrobromide which is an inhibitor of specific type 1 collagen, using differntial expressed sequence tag (EST) sequencing and cDNA microarray hybridization. Human mammary artery VSMC isolated from patients undergoing coronary bypass surgery. Cells from passage 3 to

접수일자: 2000년 3월 6일
통과일자: 2000년 6월 30일
책임저자: 이인규, 계명대학교 의과대학 내과학교실

5 were used in experiment with serum-free media with varying conditions.

Results: After 6 days of culture, the cells (VSMC) were resuspended with PBS and counted in a hemocytometer, and viable cells were counted using the trypan blue test. VSMC number reached 36×104 cell under high glucose concentration (H/G: 22 mM) and 29×104 cell under low glucose concentration (L/G: 5.5 mM) at 6 day of culture ($p<0.01$). Sodium butyrate (SB) inhibited VSMC growth at varying butyrate concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mM) by 84%, 87%, 94%, 96%, 98%, respectively. Halofuginon hydrobromide (HH) also inhibited VSMC growth at varying halofuginon concentrations (10-11, 10-9, 10-7, 10-5 mM) by 15%, 30%, 85%, 100%, respectively. Using a differential EST screening technique to assay the relative level of expression of each of large numbers of cloned cDNA sequences after treatment with high glucose concentration (22 mM), sodium butyrate (5 mM), and halofuginon (1 ㎛M). Among the total 1,730 cDNA clones, 6 cDNA clones were down-regulated after treatment with sodium butyrate (5 mM) and halofuginon (1 ㎛M). Those were revealed homology to genes encoding connective tissue growth factor (cTGF), Betaig-H3, nm23-H1 nm23-H2, enigma and copine 1. On the contrary, four clones were up-regulated after treatment with high glucose concentration (22 mM). Those clones (BO94-5, K1316-5, K1764-5, B1835-5) didn't match any sequence in the public data base.

Conclusion: These results indicate that this EST analysis is useful technique in targeting genes which are associated with atherosclerosis in VSMC. These identified clones may be used to assist in the positional cloning of genes which are related with atherosclerosis (J Kor Soc Endocrinol 15:272-285, 2000).

Key Words: Vascular smooth muscle cell, Glucose, Gene expression, EST

서 론

당뇨병 환자에서 죽상동맥경화증의 빈도는 일반인에 비하여 매우 높으며, 당뇨병 환자에 있어서 동맥혈관 평활근세포의 증식은 죽상동맥경화증의 발생에 매우 중요한 과정이다. 또한 풍선혈관확장술 이후에 나타나는 동맥혈관 평활근세포의 증식은 시술 후, 수 주 혹은 수개월에 나타날 수 있는 재협착의 중요한 기전 중 하나이다[1 3]. 그러므로 이러한 혈관 평활근세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있다면 당뇨병 환자에서 뿐만 아니라 혈관 풍선확장술 이후의 혈관 재협착을 방지하는데 큰 도움이 될 수 있으며 나아가서는 죽상동맥경화증의 예방에도 기여할 수 있는 방법이 될 것이다.

배양실험 등에서 혈관 평활근세포의 증식을 유발하는 인자로서는 고혈당을 비롯하여 안지오텐신[4], basic fibroblast growth factor (BFGF)[2], platelet-derived growth factor (PDGF)[5], 인슐린[6] 등이 알려져 있으며 이들 세포의 증식에는 세포주기에 관여하는 CdC2 Kinase와 proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)이 중요한 것으로 알려져 있다[7].

최근에는 cDNA 서고(library)에서 분리된 임의클론(random clones)들의 핵산염기서열을 분석한 expressed sequence tag (EST) 정보를 이용하여 서로 다른 조직에서의 유전자 발현의 차이를 검색하려는 노력이 시도되고 있다. 특히 EST 클론을 나일론 막(nylon membrane)에 부착시키고 이것을 서로 다른 조직에서 얻은 cDNA를 탐침자(probe)로 하여 hybridization하는 differential EST screening (DES) 방법[8]이 개발됨으로써 한결 간편하게 소량의 조직에서 한번

에 상당히 많은 수의 유전자 발현의 차이를 분별할 수 있게 되었다.

그러므로 본 연구자는 혈관 평활근세포의 증식을 유발하는 인자 중 당뇨병과 관련된 인자로 중요한 고혈당 상태와, PDGF유발 혈관 평활근세포 증식을 억제하는 약제로 알려진 sodium butyrate (SB)[9] 및 specific type I collagen inhibitor로 혈관 내막(intima) 증식억제제인 halofuginone hydrobromide (HH)[10]가 시험관내(In vitro)상태에서 혈관 평활근세포 증식에 미치는 영향을 알아보고, 그 기전을 규명하고자 이와 관련된 유전자 변화를 differential EST screening (DES) 방법[8]으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 세포성장 측정

수술실에서 관상동맥우회수술시 사용하고 남은 길이 2 3 cm정도의 내유동맥(internal mammary artery)을 채취하여 실험실로 가져와서 동맥주변부에 부착된 이물질을 박리하였다. 박리된 동맥을 phosphate완충액으로 세척하고 혈관 외막을 제거하고, 장축방향으로 절개하여 내막을 제거하였다. 작은 가위를 이용하여 2 3 mm의 절편으로 자른 후 20% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 ㎍/mL)이 함유된 DME 배지에 절편들을 접종하고 5% CO2 37℃ 항온상태에서 배양하였다. 2일마다 배지를 교환하고 6 10번 계대배양된 세포를 이용하여 여러 가지 조건을 주고 실험을 시행하였다.

2. cDNA array의 제작

1) EST library와 Dot blot panel의 제작

인간 모유두 세포 cDNA 서고의 구축과 이로부터 얻은 세포의 신호전달, 세포분열, 세포자연사(apoptosis), 세포분화 등에 관여하는 유전자 cDNA 1,730종을 이용한 dot blot panel은 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 남성형 대머리의 전두부 두피에서 모유두 세포를 얻어서 배양하여, 세포가 70% 정도 밀생상태로 자랐을 때 poly (A+) RNA를 추출하였다. 모유두 세포에서 추출한 poly (A+) RNA 5 ㎍을 가지고 Uni-Zap XR cDNA synthesis kit (Stratagene, 미국)을 이용하여 ZAP II vector (Stratagene사, 미국)에 클로닝하여 cDNA 서고를 만들었다. 증폭하기 전의 서고 complexity는 약 5×106 plaque-forming unit (pfu)이었으며, 삽입된 cDNA의 평균 길이는 약 1.3 kb였다. Phage library는 ExAssist/SOLR system (Stratagene사. 미국)을 이용한 mass in vivo excision에 의해 pBlueScript phagemid cDNA 서고로 변환시켜 플라즈미드클론(plasmid clone)을 얻었다. 각각의 군체(colony)를 무작위로 선택하여 1개의 cDNA 염기서열를 가진 각각의 플라즈미드를 분리하였다.

각 클론을 5 mL의 LB에 하룻밤 배양해서 Promega Wizard plasmid purification kit (Promega, 미국)로 plasmid DNA를 분리하고, 증류수에 녹였다. 각각의 DNA 200 ng을 나일론 막에 부착하여 hybridization 형판(template)으로 이용하였다. 블롯(blotting)하기 위해 Hybond N+ nylon membrane (Amersham사, 미국)에 DNA를 고정시켰다. 막은 5분간 증류수에 적신 다음 96 well dot blot 장치(BioRad사, 미국)에 놓고 고정하였다. 플라즈미드 DNA는 0.25 M NaOH/0.5 M NaCl을 섞어 상온에서 10분간 변성시킨 다음 0.1× SSC/0.125 M NaOH에 희석하여 각 dot에 200 ng씩 블롯 하였다. 이때 선별의 효율성을 높이기 위해 동일 유전자의 cDNA 클론이 3종류 이상 있으면 3종류의 클론을, 2종류가 있으면 2종류를, 그리고 한 종류밖에 없으면 플라즈미드 DNA 농도를 200 ng과 400 ng으로 블롯하였다. 막을 0.5 M NaCl/0.5 M Tris pH 7.5에 세척하여 중성화시키고 공기 중에서 건조한 다음 125 mJ로 UV crosslink (Stratagene사, 미국) 하였다. 이렇게 만들어진 유전자 패널(cDNA array)은 사용 시까지 -25℃에 보관하였다.

3. RNA 추출 및 probe 제작

처치를 하지 않은 혈관평활근세포와 SB (5 mM), HH (1 ㎛M) 및 포도당(5.5, 22 mM)으로 24시간 처치한 세포에서 총 RNA를 TRI 시약(Molecular Research Center사, 미국)을 이용하여 분리하였다. 즉 세포를 TRI 시약 용액에 녹인 후, bromochloropropane을 넣고 혼합한 후 원심분리시키고 상층액을

다른 시험관에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 넣고 -20℃에서 1시간 동안 RNA를 침전시켰다. 4℃에서 5,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 pellet를 75% 에탄올로 씻고 공기중에서 건조시켜 diethyl-pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 충분히 녹였다.

분리한 총 RNA 50 ㎍에 10 unit의 RNase inhibitor와 10 unit의 RNase free-DNase I를 넣어 37℃에서 30분간 반응시킨 후, phenol/chloroform으로 추출하고 0.3 M sodium acetate (pH 4.2) 존재하에서 에탄올로 침전시키고 DEPC 처리한 증류수에 다시 녹였다.

총 RNA 10 ㎍에 2.5 ㎛M anchored oligo dT primer를 넣어 65℃에서 10분간 반응시킨 후, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 8 mM MgCl2, 20 mM dithiothreitol, 200 mM dNTPs, 500 units Molony murine reverse transcriptase (BRL사, 미국), 30 units human placental RNase inhibitor (BRL사, 미국)를 포함하는 cDNA 합성용 완충액을 첨가시키고, 42℃에서 90분간 두어서 first strand cDNA를 합성시켰다. cDNA 탐침자의 제작은 random primed DNA labelling 방법을 이용하여 아래와 같은 방법으로 32P 방사능 동위원소를 부착하여 만들었다. 즉 first strand cDNA reaction tube에 random primer를 넣고 90℃에서 10분간 반응시킨 후 5분간 얼음에 넣어 둔 후 reaction mixture (2.5 ㎕ 0.5 mM dNTPs, 2.5 ㎕ Klenow buffer, 32P-dCTP, Klenow fragment 1U/ ㎕를 넣어 총량이 30 ㎕이 되도록 하였다. 반응은 37℃에서 30분간 진행시킨 후, TE 완충액을 넣어서 반응을 중지시킨 다음, Nick column (Amersham사, 영국)을 사용해서 DNA로 편입되지 않은 유리 누클레오티드 (nucleotide)를 방사능 표지된 DNA 탐침자로부터 분리하였다.

4. Hybridization

막을 2×SSC에 적셔서 hybridization 용기에 넣고, Express Hybridization solution (Clone- tech사, 미국)을 5 mL 넣어 68℃ hybridization 오븐에서 30분간 prehybridization 시킨 후, 용액을 버리고 방사능 표지된 DNA 탐침자와 새 용액을 섞어 넣고 1시간 hybridizatioin 하였다. 2×SCC/0.05% SDS로 막을 40분간 실온에서 세척하고 0.1×SSC/0.1% SDS로 50℃에서 40분간 더 세척한 다음, 3 7일 동안 자가방사선 기록법 (autoradiography)을 시행하였다.

5. Northern blot hybridization

처치하지 않은 혈관평활근세포와 SB (5 mM), HH (1 ㎛M) 및 포도당 (5.5 mM, 22 mM)으로 처치한 세포에서 추출한 각각의 총 RNA 50 ㎍씩을 50% formamide, 18% formaldehyde, 40 mM MOPS와 섞어서 0.7% agarose gel (40 mM MOPS, 18% formaldehyde) 상에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색하여 자외선 조명 하에서 폴라로이드 사진을 촬영하였다. 젤을 0.05 M NaOH/1.5 M NaCl 용액으로 30분간 변성시킨 후, 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl 용액으로 20분간 renaturation한 다음, 20×SSC에 담근 후 나일론 막으로 RNA를 전달하였다. RNA 전달이 끝난 막은 2×SSC에 잠시 헹구어 80℃에서 1시간 동안 굽고, 자외선 하에서 교차결합 (cross-linking)해서 고정시켰다. Hybridization은 앞에서 기술한 방법으로 하되, cDNA array법으로 선택된 클론의 cDNA를 random primed labelling 방법으로 방사능표지하여 탐침자로 사용하였다.

결 과

1. 동맥혈관 평활근세포의 성장에 미치는 효과

배양액의 포도당농도가 동맥혈관 평활근세포의 성장에 미치는 효과를 보기위하여 5.5 mM (L/G) 농도상태와 22 mM (H/G) 농도상태에서 8일간 배양을 시행하였다. 각기 다른 포도당 농도에서 배양된 동맥혈관 평활근세포를 trypan blue 검사법으로 살아있는 세포를 찾아 헤모사이토메터 (hemocytometer)로 세포수 측정시, 배양 6일째부터 22 mM 배양액 속의 세포수는 36.1×104 cell로 5.5 mM 배양액 속의 세포수 29.3×104cell 보다 성장의 증가를 볼 수 있었다 ($p<0.01$) (Fig 1).

SB와 HH가 동맥혈관 평활근세포의 성장에 미치는

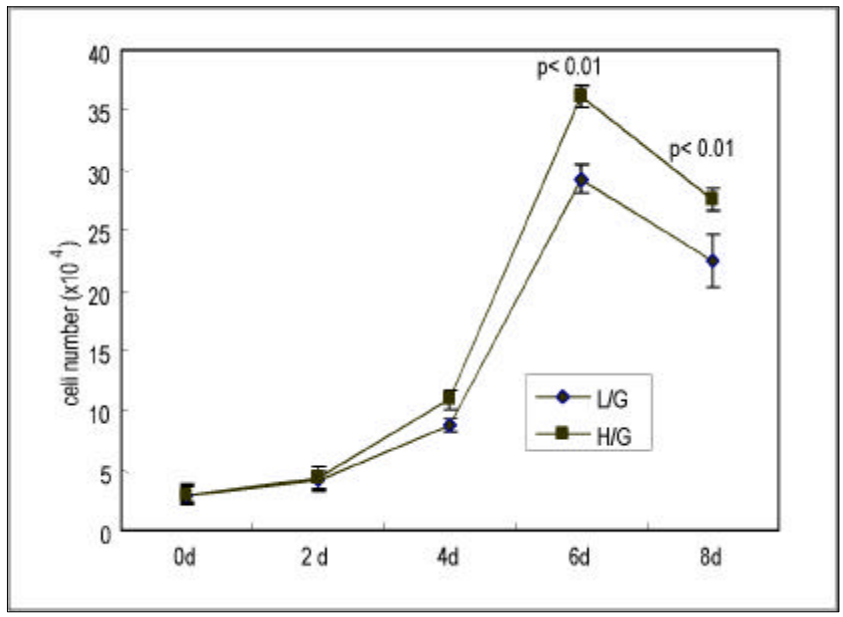

Fig. 1. The effects of different glucose concentration on growth of human aortic smooth muscle cells. Cells were treated with glucose 5.5 mM (L/G) and 22 mM (H/G)

효과는 각기 다른농도의 SB와 HH를 넣고 5일간 배양한 뒤 동맥혈관 평활근세포의 수를 계산하였다. SB 농도 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mM에서 배양 5일째 동맥혈관 평활근세포의 성장은 대조군에 비해 16%, 13%, 6%, 4%, 2%로 억제되었다. HH를 넣어 배양하였을 때도 SB의 경우와 비슷하게 농도에 따른 성장속도의 감소를 볼 수 있었다. 즉 HH 농도 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}, 10^{-11} M에서 5일간 배양하였을 때 동맥혈관 평활근세포의 성장은 대조군에 비해 0%, 15%, 70%, 85%로 억제되었다. 그리고 SB및 HH를 각기 다른 농도로 투여한 상기 실험시 trypan blue 염색으로 세포의 생존율을 측정한 결과 생존율에는 차이가 없었다 (Fig. 2, 3).

2. 유전자 발현의 차이

세포주기와 세포자연사, 신호전달, DNA 단백합성, 항상성유지, 대사, 세포외 기질에 관련된 유전자 및 분석이 되지 못한 유전자 1,730종의 유전자로 만든 cDNA array를 이용하여 SB를 처치한 세포, HH를 처치한 세포, 5.5 mM의 포도당을 처치한 세포 및 22 mM의 포도당을 처치한 동맥혈관 평활근세포의 유전자 발현의 차이를 알아보았다. 아무런 처치를 하지 않은 혈관평활근세포, SB를 처치한 세포, HH를 처치한 세포, 5.5 mM의 포도당을 처치한 세포 및 22 mM의 포도당을 처치한 세포의 RNA로부터 역전사 합성한 cDNA를 탐침자로 하여 hybridization을 실시하고 서로 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

총 10종의 cDNA가 발현의 변화를 보였다. 아무런 처치를 하지 않은 혈관평활근세포와 비교하였을 때 SB 및 HH 처치한 혈관평활근세포에서는 connective tissue growth factor (cTGF), Beta IG-H3, nm23-H1 nm23-H2, enigma, copine I 유전자 등 6종의 유전자의 발현 감소를 볼 수 있었다 (Fig. 4, 6). 또한 포도당을 처치하지 않은 세포와 비교하였을 때 5.5 mM과 22 mM의 포도당을 처치한 세포에서 4종의 유전자 발현의 증가를 볼 수 있었다. 이들 유전자는 모두 새로 발견된 유전자로 BO94-5, K1316-5, K1764-5, B1835-5로 명명된 것이었다(Fig. 5, 7). 그리고 이들의 유전자

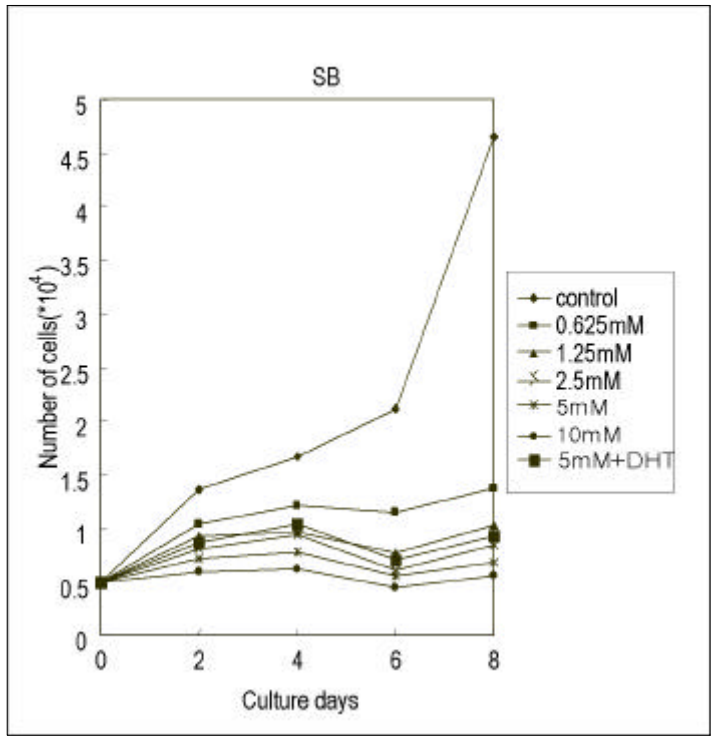

Fig. 2. Effect of sodium butyrate on the growth of arterial vascular smooth muscle cells

발현을 확인하기 위하여 Northern 블롯을 실시하여 발현의 변화를 재확인할 수 있었다.

고 찰

정상세포와 질병세포의 유전자 발현은 상당히 다르며 최근까지 이를 분별하는 기술로서 subtractive hybridization[11]과 differential hybridization[12]을 많이 이용하여 왔다. 그러나 이 방법들은 많은 양의 RNA를 필요로 할 뿐 아니라 복잡하고 기술상의 어려움 또한 많아서 세포 내에 소량으로 발현되는 유전자를 분별하는 기술로서는 적당하지 못하다. Polymerase chain reaction (PCR)방법이 개발된 후, PCR 방법으로 미량의 mRNA를 사용하여 유전자를 분별하는 기술 즉 DD-PCR (differential display PCR)법[13,14]이 소개되었다. 비교적 간편하게 다른 두 세포나 조직의 유전자 발현의 차이를 알아볼 수 있는 이 방법은 현재 유전자를 분별하는 기술로 많이 사용되고 있다. 그러나 이 방법도 위양성, 즉 DD-PCR에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 클로닝하여 Northern 블롯으로 확인하였을 때 아무런 차이를 보이지 않는 경우가 많고[15] 복잡하여 그 효용성에 한계를 보이고 있다.

최근 인간 게놈 프로젝트의 진행으로 인간의 많은 유전자들이 밝혀지고 있다. 특히 발현되는 각 유전자의 일부분을 분석하여 얻은 expressed sequence tags (EST)는 현재 약 30만 종류에 이르고 있다. 다른 한편으로 미국과 일본 등에서는 제2세대 게놈프로젝트를 시행하고 있다. 제2세대 게놈프로젝트란 제1세대 인간 게놈프로젝트로 밝혀낸 새로운 유전자의 기능과 인체에서의 역할을 밝히는 사업으로 일명 포스트게놈세대 (postgenome era)로 불려지고 있다. 지금까지 밝혀진 유전자의 경우에 있어서도 전체의 3/4이 아직 작용을

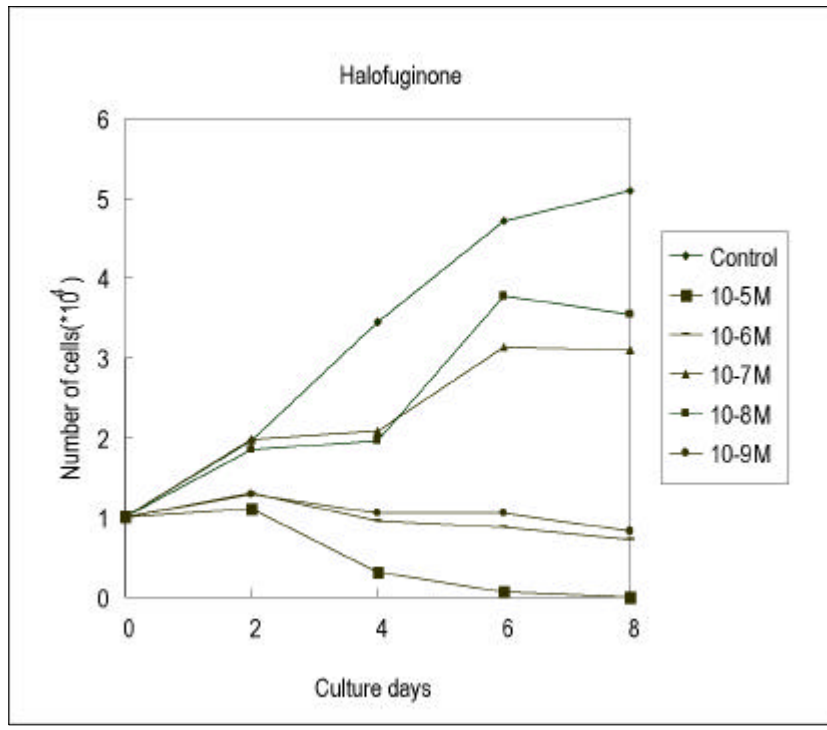

Fig. 3. Effect of HH on the growth of arterial VSMC

잘 모르는 상태이다. 제 2세대 게놈프로젝트를 수행하기 위한 기술로는 최근 Johns Hopkins 의대에서 개발된 SAGE (serial analysis of gene expression) 방법이 있으나[16] 이 방법도 실제로 9개의 염기서열로 유전자를 판독해야하기 때문에 아직은 문제점이 많은 실정이다. 본 연구에서는 유전자 발현의 변화로 SAGE 방법을 변형시킨 differential EST screening (DES) 방법으로 조사하였다.

1977년 Riggs 등[17]은 세포배양 시에 SB처치를 하면 histone deacetylase를 억제하여 histon을 hyper-acetylation시킨다는 사실을 보고하였다. Histone이 acetylation되면 염색질 (chromatin)의 구조와 전사를 조절하고 많은 종류의 세포에서 세포성장을 억제한다[18,19].

간암세포주인 HTC 세포에서는 세포주기 중 G1 단계에서 성장을 멈추게 하며[20,21], 췌장선암세포주에서는 세포성장을 억제하고 alkaline phosphatase 활성도를 증가시키며 분비기능을 가진 세포로의 분화를 유도하고[22], 대장암세포주의 경우에는 butyrate를 처치하면 세포자연사가 일어난다[23].

SB의 이러한 작용들은 여러 가지 유전자 발현의 조절을 통해서 일어난다고 생각된다. 즉 SB는 3T3세포[24], 직장암 세포주[25]에서는 원종양인자 (proto-oncogene)인 c-myc 유전자의 발현을 억제하며 대장암 세포주에서는 Rb 유전자와 p53 유전자의 발현을 억제한다[26]. 반면에 Swiss 3T3 세포주에서는 c-fos와 c-jun 유전자의 발현을 유도한다[24]. 또한 SB는 여러 종류의 세포에서 histone H1 variant인 histone H1 ° 유전자의 발현을 증가시킨다[27].

SB는 혈관 평활근세포의 성장억제 작용이 있다. 또한 Ranganna 등[9]은 SB는 5 mmol/L의 낮은 농도에서도 platelet-derived growth factor (PDGF)-AA-, -AB-, 및 -BB-유도성 (induced) 혈관 평활근세포의 성장억제작용이 있다고 보고하였다. SB 전처치시에

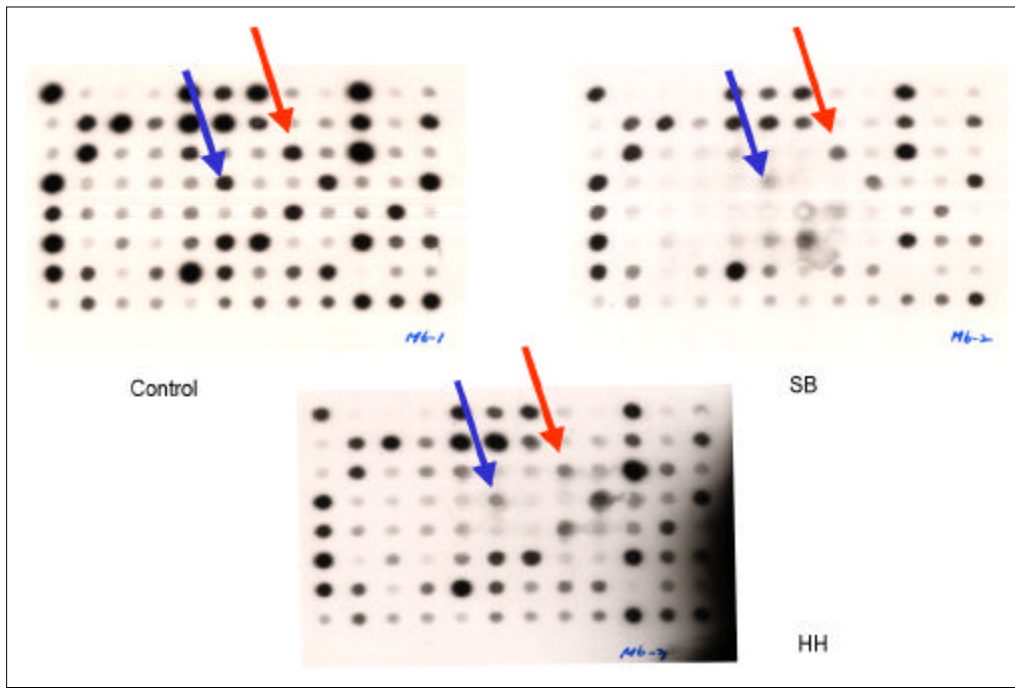

Fig. 4. Gene expression in untreated-AVSMC, SB (5 mM), HH (1 ㎛M) treated-AVSMC. Arrows indicate differentially expressed genes.

PDGF-BB 유도성 MAP-kinase 활성도, c-fos, c-jun 및 c-myc가 억제되는 것을 볼 수 있으므로 PDGF 유도성 성장억제작용의 기전이 이들의 억제로 인한 것임을 주장하였다. 또한 이런 현상이 PDGF-BB없이 SB 자체만으로는 일어나지 않으므로 PDGF 경로를 통하여 일어날것으로 추측하였다[9].

본 연구에서는 SB가 혈관 평활근세포의 성장을 억제하는데 관여하는 유전자를 조사할 목적으로 혈관 평활근세포에 SB를 처치한 후 유전자 발현의 변화를 DES 방법으로 조사하였다. 먼저 SB가 혈관 평활근세포의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 SB는 농도에 비례해서 혈관 평활근세포성장을 억제하였으며, 세포의 생존에는 큰 영향을 미치지 않았다. 혈관 평활근세포에 SB를 처치한 결과 connective tissue growth factor (cTGF), Betaig-H3, nm23-H1 nm23-H2, enigma, copine I 유전자 등 6종의 유전자의 발현 감소를 볼 수 있었다.

이들 중 cTGF는 36 38 kDa 펩타이드로서 transforming growth factor-beta에 의해 유도되며 조직재생의 기능을 가진다고 알려져 있다. 급성심근경색증이 유발된 백서에서 cTGF는 심근경색이 일어난 주변의 심근에서 발현되며, 이때의 발현은 방추형모양의 간엽세포에 주로 나타난다고 한다[28]. 또한 cTGF는 동맥경화증과 밀접한 관련이 있는 시토카인인 TNF-alpha 투여시에 혈관 내피세포와 섬유아세포 및 혈관 평활근세포에서 발현이 증가되며 동맥경화증이 있는 혈관 부위에도 그 발현이 증가되어 있다[29]. 그러므로 cTGF는 혈관 병변으로 TNF-alpha 농도가 높아진 동맥경화증과 같은 경우에 중요한 역할을 수행할 것이라는 것을 추측할 수 있다[30]. 한편 고농도의 포도당 (30 mM) 상태에서 배양한 메산지움 세포 (mesangial cell)에서는 저농도 포도당 (5 mM) 상태에서 배양한 메산지움 세포에 비해 cTGF mRNA발현이 증가되어있으며 세포외 기질의 증가를 관찰할 수 있다고 한다. 이러

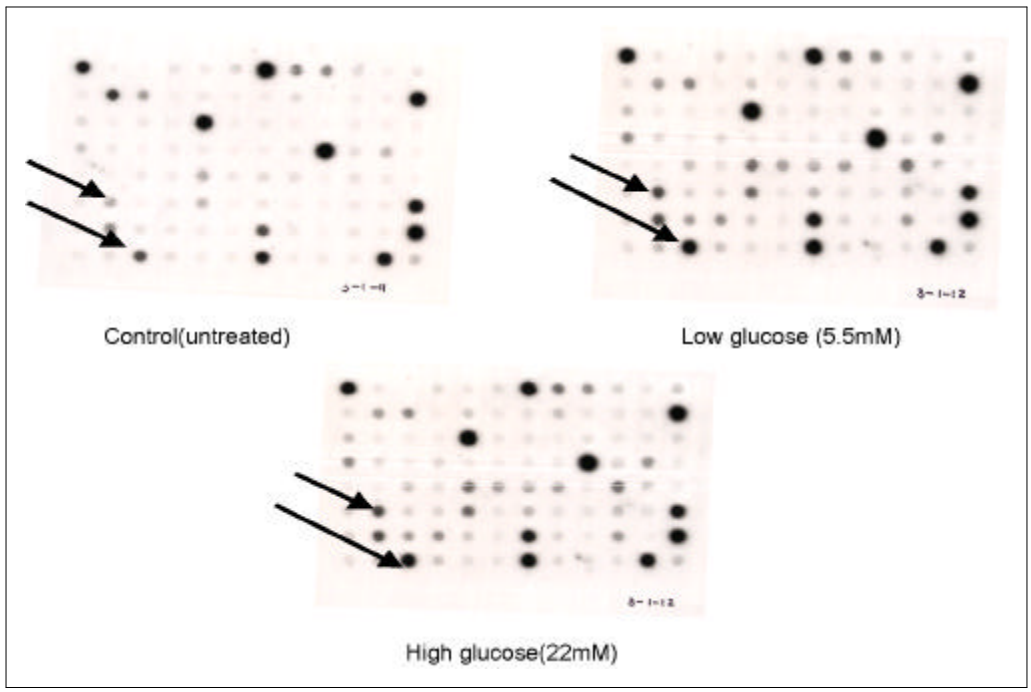

Fig. 5. Gene expression in untreated-AVSMC, glucose (5.5, 22 mM) treated-AVSMC. Arrows indicate differentially expressed genes

한 증가는 TGF-beta 1의 증가로 인해 일어날것으로 사료되며 이러한 현상은 당뇨병상태에서 신장합병증이 발생하는 기전으로 설명된다[31]. 그리고 cTGF는 cysteine-rich 펩타이드로서 PDGF와 비슷한 생물학적, 면역학적 활성도를 가진다[32]. 특히 이 보고는 PDGF 유도성 혈관 평활근세포의 성장억제작용이 있다고 알려진 SB를 투여하였을 때 cTGF유전자의 감소를 나타낸, 본 연구의 결과와 일치하는 소견으로 생각된다.

Transforming growth factor-beta induced protein (Betaig-H3)은 Kerato-epithelin으로 불리는 물질로서 현재까지 그 역할의 규명이 확실하지는 않으나 이 유전자의 돌연변이는 각막 이영양증(cornea dystrophy)을 초래한다고 알려져 있다[33].

그외 nm23-H1, nm23-H2 유전자는 악성종양의 전이를 억제하는 역할이 있는 것으로 알려져 있으며 전립선암[34], 위암[35], 비인두암[36], 백혈병[37] 등의 악성종양에서 보고가 되고 있으나 Betaig-H3 유전자와 같이 혈관평활근세포에서는 보고가 아직 없는 실정이다. 본 연구에서 혈관평활근세포에서 SB 및 HF 처리 후 이들 유전자의 감소는 최초의 보고로 생각되며 향후 추가 연구가 요망된다.

Enigma는 group 3 LIM 단백질로 LIM domain을 3개 갖고 있으며 이 그룹에는 enigma 외에 Hic5, testin이 속해있다. Enigma는 insulin 수용체와 결합할 뿐 아니라 receptor tyrosine kinase인 c-ret 원종양인자와 결합한다. 특히 갑상선 유두암(papillary thyroid cancer)에서 나타나는 ret/ptc2와 결합해서 세포분열을 야기하는데 중요한 역할을 한다[38].

Copine I도 Nakayama 등[39]이 최근에 보고한 유전자로서 hippocampus에 존재하며 kainate 자극에 의해 발현이 증가된다고 알려져 있으나 혈관평활근세포에서는 아직 보고가 없다. SB 및 HH 투여후 혈관 평활근세포에서 유전자 발현 감소가 어떤 의미나 역할이 있는지는 향후 규명해야 할 과제이다.

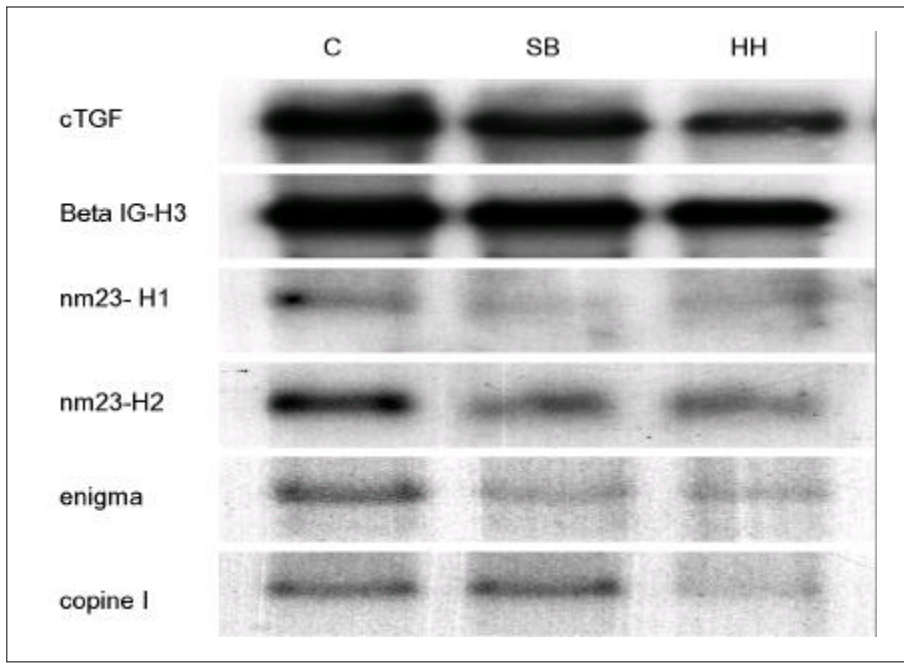

Fig. 6. Nothern blot analysis with 6 DNA clones which expressions are down-regulated during incubated with SB (5 mM), HH (1 uM) for 24 hours in AVSMC. C;control

HH 투여시에도 SB 투여시와 동일한 유전자의 발현의 감소를 보였다. 그러므로 SB와 HH가 혈관평활근세포의 증식을 억제시키는 결과를 나타내는 과정에는 비슷한 유전자 변화를 동반할 것으로 생각되며 이 또한 향후 추가 연구를 통해 규명해야 할 것으로 본다.

고농도 포도당 투여 후 발현이 증가된 3종의 유전자는 모두 지금까지 밝혀지지 않은 새로운 유전자로 향후 이들 유전자에 대한 클로닝이 시도되어야 하고 그 역할을 규명해야 할 것이다.

이상의 연구결과로 보아 포도당 농도의 증가는 동맥평활근세포의 증식을 초래하며 SB 및 HH의 처치는 증식을 억제시키는 것으로 생각된다. 그리고 이런 결과는 여러 가지 유전자 발현의 변화를 동반하고 있음을 알 수 있었다. 향후 이들 유전자 작용을 정확히 분석하면 관동맥경화증의 발생기전의 규명 및 치료약제 개발에 도움이 될 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 혈관평활근세포의 증식을 유발하는 인자 중 당뇨병과 관련된 중요한 인자로 고혈당 상태와 PDGF유발 혈관평활근세포증식을 억제하는 약제로 알려진 sodium butyrate (SB) 및 specific type I collagen inhibitor로 혈관 내막 (intima) 증식억제제인 halofuginone hydrobromide (HH)가 시험관내 상태에서 혈관평활근세포증식 및 억제에 어떤 효과를 미치는지 알아보고, 그 기전을 규명하고자 이와 관련된 유전자 변화를 cDNA array를 사용한 hybridization법으로 조사하였다.

방법: 혈관 평활근의 증식에 영향을 미치는 혈당과 SB 및 HH의 농도를 달리 해서 내유동맥을 배양한 후 이들의 효과를 비교했다. 또한 혈당, SB 및 HH가 어떠한 유전자의 발현을 통하여 세포성장 및 억제를 유발하는지 규명하기 위하여, differential EST screening (DES) 방법을 이용하여 세포 분화에 관여하는

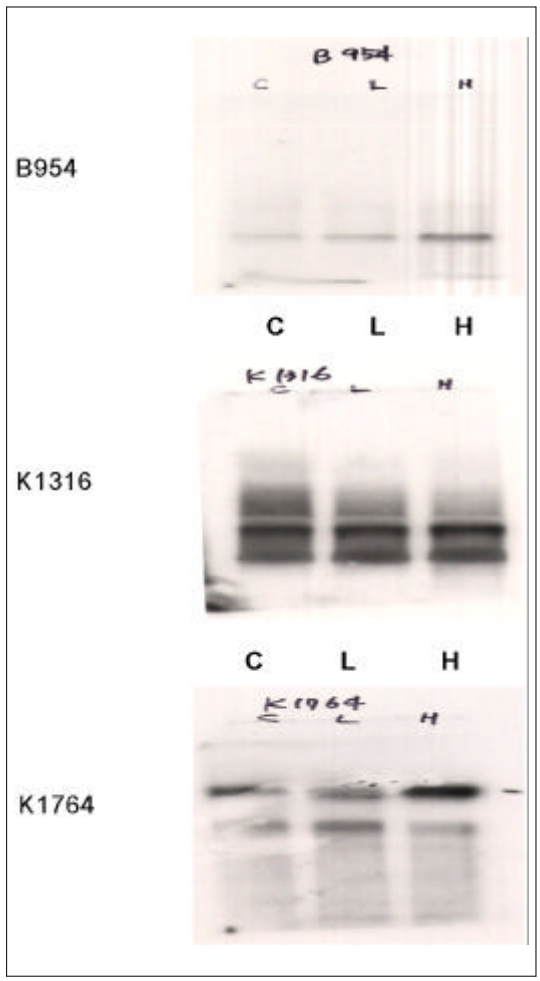

Fig. 7. Nothern blot analysis with 3 DNA clones which expressions are upregulated during incubated with glucose in AVSMC. C;control, L;5.5 mM glucose, H;22 mM glucose

gene chip에서 발현 증가 및 억제가 유도된 유전자를 규명하였다.

결과: 동맥혈관 평활근세포를 각기 다른 포도당 농도에서 배양 후 배양된 동맥혈관 평활근세포의 살아있는 세포수 측정시, 배양 6일째부터 22 mM 배양액 속의 세포수는 36.1×104cell로 5.5 mM 배양액 속의 세포수 29.3×104cell 보다 성장의 증가를 볼 수 있었다.

SB와 HH는 배양 5일째 SB 농도 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mM에서 세포성장은 대조군에 비해 16%, 13%, 6%, 4%, 2%로 억제되었다. HH를 넣어 배양하였을 때는 HH 농도 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}, 10^{-11}M에서 세포성장은 대조군에 비해 0%, 15%, 70%, 85%로 억제되었다. 그리고 이들 각각의 실험시 trypan blue 염색으로 세포의 생존율을 측정한 결과 생존율에는 차이가 없었다.

세포의 신호전달, 세포분열, 세포자연사 그리고 세포의 분화와 관련이 있는 1,730종의 cDNA array를 이용하여 조사하였다. 아무런 처치를 하지 않은 혈관평활근세포, SB를 처치한 세포, HH를 처치한 세포, 5.5 mM의 포도당을 처치한 세포 및 22 mM의 포도당을 처치한 세포의 RNA로부터 역전사 합성한 cDNA를 탐침자로 하여 hybridization을 실시한 결과 10종의 cDNA가 발현의 변화를 보였다.

SB, HH 처치시 발현이 감소한 6종의 유전자는 connective tissue growth factor (cTGF), Betaig-H3, nm23-H1 nm23-H2, enigma, copine I 유전자였고, 포도당 처치시 발현이 증가한 4종의 유전자는 새로운 유전자로 BO94-5, K1316-5, K1764-5, B1835-5로 명명된 것이었으며 이들 모두 Northern 블롯으로 발현의 변화를 확인할 수 있었다.

결론: 이상의 연구결과로 보아 포도당 농도의 증가는 동맥평활근세포의 증식을 초래하며 SB 및 HH의 처치는 증식을 억제시키는 것으로 사료된다. 그리고 이런 결과는 여러 가지 유전자 발현의 변화를 동반하고 있음을 알 수 있었고 향후 이들 유전자 작용을 정확히 분석하면 관동맥경화증의 발생기전의 규명 및 치료에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK: *A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. Circulation 86(6 Suppl):47-52, 1992*
2. Ali S, Becker MW, Davis MG, Dorn GW 2nd: *Dissociation of vasoconstrictor-stimulated basic fibroblast growth factor expression from hypertrophic growth in cultured vascular smooth*

muscle cells. Relevant roles of protein kinase C. Circ Res 75:836-843, 1994

3. Califf RM, Fortin DF, Frid DJ, Harlan WR 3d, Ohman EM, Bengtson JR, Nelson CL, Tcheng JE, Mark DB, Stack RS: *Restenosis after coronary angioplasty: an overview. J Am Coll Cardiol 17(Suppl B):2B-13B, 1991*
4. Han Y, Runge MS, Brasier AR: *Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. Circ Res 84:695-703, 1999*
5. Avena R, Mitchell ME, Neville RF, Sidawy AN: *The additive effects of glucose and insulin on the proliferation of infragenicular vascular smooth muscle cells. J Vasc Surg 28:1033-1038, 1998*
6. Pukac LA, Carter JE, Ottlinger ME, Karnovsky MJ: *Mechanisms of inhibition by heparin of PDGF stimulated MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells. J Cell Physiol 172:69-78, 1997*
7. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM: *Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. J Clin Invest 96:2260-2268, 1995*
8. Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ: *Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. Nucleic Acids Res 27:1517 -1523, 1999*
9. Ranganna K, Joshi T, Yatsu FM: *Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 2273-2283, 1995*
10. Nagler A, Katz A, Aingorn H, Miao HQ, Condiotti R, Genina O, Pines M, Vlodavsky I: *Inhibition of glomerular mesangial cell proliferation and extracellular matrix deposition by halofuginone. Kidney Int 521561-1569, 1997*
11. Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM: *Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature 308(5955):149-153, 1984*
12. Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BL: *Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. EMBO J 5:1465-1472, 1986*
13. Liang P, Pardee AB: *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257(5072): 967-971, 1992*
14. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB: *Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res 52:6966-6968, 1992*
15. Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T: *Differential display by PCR: novel findings and applications. Nucleic Acids Res 23:1832-1833, 1995*
16. Adams MD: *Serial analysis of gene expression: ESTs get smaller. Bioassays 18:261-262, 1996*
17. Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM: *n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. Nature 268(5619):462-464, 1977*
18. Leibovitch MP, Kruh J: *Effect of sodium butyrate on myoblast growth and differentiation. Biochem Biophys Res Commun 87:896-903, 1979*
19. Dyson JE, Daniel J, Surrey CR: *The effect of sodium butyrate on the growth characteristics of*

human cervix tumour cells. Br J Cancer 65: 803-808, 1992

20. Van Wijk R, Tichonicky L, Kruh J: *Effect of sodium butyrate on the hepatoma cell cycle: possible use for cell synchronization. In Vitro 17:859-862, 1981*
21. Gupta S, Alpini G, Vemuru RP, Hurston E, Shafritz DA: *Butyrate synchronization of hepatocytes: modulation of cycling and cell cycle regulated gene expression. Growth Factors 10:171-180, 1994*
22. Mullins TD, Kern HF, Metzgar RS: *Ultrastructural differentiation of sodium butyrate-treated human pancreatic adenocarcinoma cell lines. Pancreas 6:578-587, 1991*
23. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C: *Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fiber in the prevention of large-bowel cancer. Int J Cancer 55:498-505, 1993*
24. Toscani A, Soprano DR, Soprano KJ: *Molecular analysis of sodium butyrate induced growth arrest. Oncogene Res 3:223-238, 1988*
25. Heruth DP, Zirnstein GW, Bradley JF, Rothberg PG: *Sodium butyrate causes an increase in the block to transcriptional elongation in the c-myc gene in SW837 rectal carcinoma cells. J Biol Chem 268:20466-20472, 1993*
26. Gope R, Gope ML: *Effect of sodium butyrate on the expression of retinoblastoma (RB1) and P53 gene and phosphorylation of retinoblastoma protein in human colon tumor cell line HT29. Cell Mol Biol 39:589-597, 1993*
27. Chabanas A, Khoury E, Goeltz P, Froussard P, Gjerset R, Dod B, Eisen H, Lawrence JJ: *Effects of butyric acid on cell cycle regulation and induction of histone H1 °in mouse cells and tissue culture. Inducibility of H1 °in the late S-G2 phase of the cell cycle. J Mol Biol 183:141-151, 1985*
28. Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya Y, Takigawa M, Tsuji T: *Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. J Mol Cell Cardiol 30:2411-2422, 1998*
29. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher TF: *Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. Circulation 95:831-839, 1997*
30. Lin J, Liliensiek B, Kanitz M, Schimanski U, Bohrer H, Waldherr R, Martin E, Kauffmann G, Ziegler R, Nawroth PP: *Molecular cloning of genes differentially regulated by TNF-alpha in bovine aortic endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells. Cardiovasc Res 38:802-813, 1998*
31. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, Brady HR: *Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. J Biol Chem 274:5830-5834, 1999*
32. 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 4:637-645, 1993*
33. Mashima Y, Nakamura Y, Noda K, Konishi M, Yamada M, Kudoh J, Shimizu N: *A novel mutation at codon 124 (R124L) in the BIGH3 gene is associated with a superficial variant of granular corneal dystrophy. Arch Ophthalmol*

117:90-93, 1999

34. Lim S, Lee HY, Lee H: *Inhibition of colonization and cell-matrix adhesion after nm23-H1 transfection of human prostate carcinoma cells. Cancer Lett 133:143-149, 1998*
35. Muller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE: *Expression of nm23 in gastric carcinoma: association with tumor progression and poor prognosis. Cancer 83:2481-2487, 1998*
36. Guo X, Min HQ, Zeng MS, Qian CN, Huang XM, Shao JY, Hou JH: *nm23-H1 expression in nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinical outcome. Int J Cancer 79596-600, 1998*
37. Wakimoto N, Yokoyama A, Okabe-Kado J, Nagata N, Motoyoshi K, Honma Y: *Combined analysis of differentiation inhibitory factor nm23-H1 and nm23-H2 as prognostic factors in acute myeloid leukaemia. Br J Cancer 77:2298-2303, 1998*
38. Durick K, Wu RY, Gill GN, Taylor SS: *Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain. J Biol Chem 271:12691-12694, 1996*
39. Nakayama T, Yaoi T, Yasui M, Kuwajima G: *N-copine: a novel two C2-domain-containing protein with neuronal activity-regulated expression. FEBS Lett 428:80-84, 1998*