Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
2001; 6(4): 232-239

Histone Deacetylase (HDAC) 활성 저해제에 의한 혈관신생 관련유전자 발현의 억제 작용

부산대학교 분자생물학과, [1]세종대학교 생명공학과, [2]서울대학교 약학대학 약학과, 종합약학연구소

김세희 · 배명호 · 정주원 · 배문경 · 권호정[1] · 유미애 · 김규원[2]

The Effect of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors on the Expression of Angiogenesis-related Genes

Se-Hee Kim, Myung-Ho Bae, Joo-Won Jeong, Moon-Kyoung Bae, Ho Jeong Kwon[1], Mi-Ae Yoo and Kyu-Won Kim[2]

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan, Korea
[1]Departmentof Bioscienceand Biotechnology, Sejong University, Seoul, Korea
[2]Angiogenesis Research Laboratory, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

The acetylation and deacetylation of histones play significant roles in the regulation of transcription. Histone deacetylases (HDACs) are important enzymes that regulate gene transcription and alter chromatin assembly with essential and conserved functions. Function of HDACs has been focused on their transcriptional corepression of a large number of targets in chromatin remodeling processes inside nucleus. Our previous study has suggested that HDACs regulate the expression of angiogenesis-related genes. Therefore HDAC inhibitors have a potential as anti-cancer drugs, but the detailed function on their anti-angiogenic activity is not well understood.

To determine the function of HDAC inhibitors in the angiogenic process, we investigated the effect of the HDAC specific inhibitors, such as trichostatin A (TSA) and FR901228, on the expression of angiogenesis-related genes, transcription factors and a tumor suppressor gene. We performed the Western blot analysis after the treatment of HepG2 human hepatoblastoma cells with TSA or FR901228. The protein levels of angiogenesis-related genes, i.e.,VEGF, MT1-MMP, Sp1, c-Jun and c-Fos and transcription factors, i.e., Egr-1 and Ets1 were decreased by TSA and FR901228. Especially, FR901228 showed a stronger inhibitory activity than TSA. The protein expression of a tumor suppressor gene, i.e., gelsolin was increased by TSA and FR901228. These results suggest that HDAC inhibitors suppress the angiogenic processes through regulation of the expression of angiogenesis-related genes.

Key Words: Trichostatin A, FR901228, Histone Deacetylase inhibitor, Angiogenesis

책임저자 : 김규원, ㉾ 110-799, 서울특별시 관악구 신림동, 서울대학교 약학대학 약학과
Tel: 02-880-6988, Fax: 02-872-1795, E-Mail: qwonkim@plaza.snu.ac.kr

서 론

유전자 발현은 다양한 전사 인자들의 작용에 의해 조절된다. 전사 인자들은 표적 유전자들이 가지고 있는 조절 부위에 결합함으로써 전사를 억제하거나 활성화시키는 기능을 가지고 있다. 따라서 전사인자의 작용을 알아내는 것은 그 전사 인자의 작용으로 발현되는 유전자를 적절히 조절할 수 있는 정보를 밝히는데 중요하다. 특히, 암세포에 있는 특정 유전자의 전사에 관여하는 전사 인자의 작용을 알아내는 것은 암 발생과정을 이해하는데 중요한 정보를 제공해 주며, 이러한 사실을 이용하여 암 치료에 관한 연구도 진행될 수 있을 것이다.[1)]

이와 관련하여 최근 크로마틴의 구조에 관여하는 histone acetyltransferases (HATs)와 histone deacetylases (HDACs)의 전사 조절에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. HAT는 히스톤의 N말단의 acetylation을 촉진하여 크로마틴의 구조를 불안정한 상태로 만드는 효소이다. 반면 HDAC은 히스톤의 아세틸 그룹을 제거시켜 크로마틴의 구조를 안정화 시킴으로써, 전사인자들이 표적유전자에 접근하는 것을 방해하여 전사활성을 억제시키는 것으로 알려져 있다.[2,3)] 따라서 HDAC은 히스톤의 acetylation과 deacetylation에 관여함으로써 진핵세포의 전사조절에 중요한 역할을 하며, 크로마틴의 assembly를 조절하는데도 직접적으로 관여한다.[2)] 이와 관련하여 저산소 상태에서 유도된 HDAC이 종양 억제 유전자들의 발현을 억제 시키고, 혈관형성에 관련된 유전자들의 발현을 촉진시킨다는 사실이 보고된 바 있다.[4)]

이들 HDAC의 기능을 밝히기 위해 최근 여러가지 HDAC 활성 저해제가 사용되고 있다.[5)] HDAC 활성 저해제는 세포주기를 차단하고, 종양 세포의 분화와 세포사멸을 유도하는 기능을 하며,[6,7)] 특히 기존 항암제와는 기전이 다른 새로운 항암제로의 개발이 시도되고 있다.[8)] 초기에 사용되었던 HDAC 저해제인 butyrate는 HDAC에 특이적이지 않고, 단백질의 인산화와 메틸화에도 영향을 미치는 반면, 후에 개발된 trichostatin A (TSA), SAHA, depsipeptide (FR901228), oxamflatin 등과 같은 다른 HDAC 활성 저해제들은 HDAC에 대해 좀 더 특이적이고, 낮은 농도에서도 활성을 가지는 것으로 알려져 있다.[9)] 이들 중에서 TSA는 세포성장의 억제 및 종양 형성 억제 활성이 있다고 보고 되어 있으며,[4),10)] FR901228은 인간의 유방암 세포와 B-cell 만성 림프구성 백혈병 세포에서 새로운 치료제로서의 가능성이 연구되고 있다.[11),12)] 또한 여러 가지 *in vitro* 및 *in vivo* 혈관 신생 실험을 통해 TSA와 FR901228이 고형암의 성장에 필수적인 혈관 신생과정에 현저한 혈관 신생 억제효과가 있음이 보고되어 있다.[4)] 뿐만 아니라, TSA는 저산소 상태에서 암 억제 유전자인 p53, von Hippel-Lindau의 발현 증가와, 혈관 신생 관련 인자인 hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α), vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현 감소를 유도하여 결과적으로 혈관 신생 활성을 억제시켜, 암의 성장을 저해 시킨다는 사실이 보고되었다.[4)]

이러한 결과를 토대로 본 연구에서는 HDAC 활성 저해제들이 혈관 신생 과정에 관여하는 여러 조절 인자들 VEGF, MT1-MMP, Egr-1, Ets1, Sp1, c-Jun, c-Fos의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 HDAC에 의해 암 억제 유전자인 p53의 발현이 감소한다는 보고를 기초로 하여 HDAC 활성 저해제에 의한 또 다른 암 억제 유전자인 gelsolin의 발현 변화를 조사하여 HDAC 활성 저해제의 항암 활성을 살펴보았다.

재료 및 방법

1) 세포배양

인간 간암세포주인 HepG2 세포와 인간의 배아 신장세포인 293세포는 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Dulbesco's modified eagle media (DMEM)에 1% Penicillin-Streptomycin을 첨가한 배지에서 단층 배양되며, 2일에서 3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 세포배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO_2 배양기에서 시행하였다.

2) Calcium phosphate transfection

Calcium phosphate-DNA coprecipitation은 pBJ5 및 pBJ5/Wt-HDAC1, pBJ5/Mt-HDAC1 각각의 DNA

10μg (220μl in TE buffer)과 250μl의 2×HBS를 섞은 후 31μl 의 2 M $CaCl_2$를 천천히 섞어 상온에서 25분간 방치하였다. 지름 100 mm 배양접시에서 단층으로 자라고 있는 HEK 293세포의 배지를 제거한 후 새 배지 10 ml을 가하고 흔들면서 calcium phosphate-DNA 침전액을 한방울씩 넣고 37°C CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 새 배지 10 ml을 가한 후 24시간 동안 더 배양하였다

3) 항체

HIF-1α, VEGF, Egr-1, Ets1, Sp1, c-Jun, c-Fos, gelsolin의 항체는 Santa Cruez Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였고, HDAC, p53의 항체는 Upstate (NY, USA)에서 구입하였으며, α-tubulin의 항체는 InnoGenex (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MT1-MMP 항체는 일본 도쿄대학의 Motoharu Seiki 박사로부터 제공받아 사용하였다.

4) HDAC 활성 저해제 처리 및 단백질 분리

HepG2 세포를 60 mm dish에 5×10^5 cells로 심은 다음, 24시간 안정화 시키고 TSA, FR901228을 각각 100 ng/ml, 10ng/ml의 농도로 24시간 처리하였다. 이때 control로는 어떤 저해제도 처리하지 않은 것을 사용하였으며, 다른 샘플과 함께 배양시킨 뒤, PBS buffer로 두 번 세척하였다. 그리고 lysis buffer [40 mM Tris-HCl (pH7.4), 10 mM EDTA (pH8.0), 120 mM NaCl, 0.1% NP-40] 100μl를 처리하여, 세포를 모아, 이것을 5초간 강하게 혼합시키고 30분간 얼음에 두었다가, 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 이렇게 분리한 단백질은 BCA protein Assay 방법으로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다.

5) Western blot analysis

정량한 단백질 20μg을 gel loading buffer 4μl에 섞어 100°C에서 3분간 끓인 뒤, 9% spolyacrylamide gel에서 SDS-PAGE를 실시하였다. gel로부터 NC 필터로의 transfer가 끝난 필터는 5% skim milk가 들어 있는 PBS-T (PBS/0.5% Tween 20) buffer로 1시간 blocking 시킨 뒤, PBS-T로 충분히 세척하였다. 항원-항체 반응은 필터에 1차 항체를 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝나면 PBS-T로 세척한 후, 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. PBS-T로 세척한 필터는 Amersham에서 구입한 ECL Western blotting detection reagent로 반응을 끝낸 뒤, X-ray film에 감광하여 발현 정도를 조사하였다. α-tubulin은 단백질의 정량 보정용으로 사용하였다.

Western blot으로 detection된 bands를 보정하기 위해 프로그램 TINA2.0을 사용하여 α-tubulin의 density로 normalize하였다. mock과 control로 사용

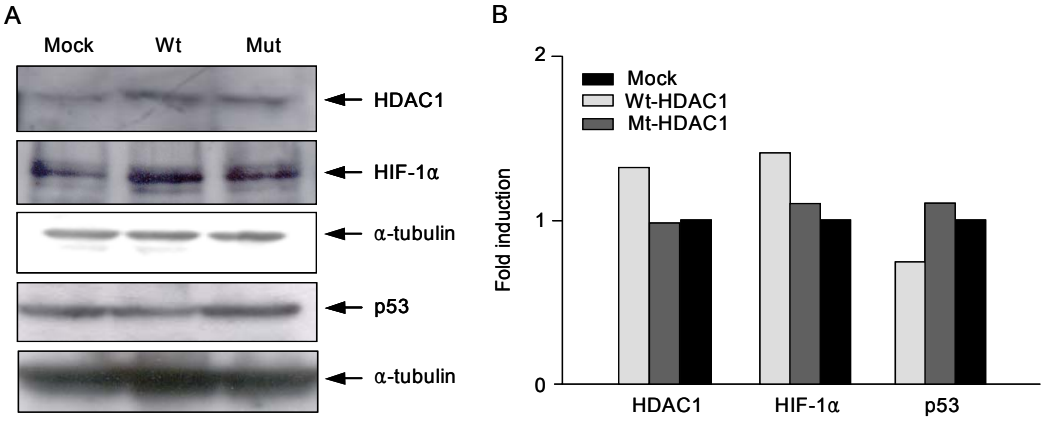

Fig. 1. HDAC 과다 발현에 의한 HDAC1, HIF-1α및 p53 발현의 조사. (A) HDAC 과다 발현에 의한 HDAC1, HIF-1α 및 p53의 발현 조사(Wt; Wild type HDAC1, Mut; Mutant type HDAC1). (B) α-tubulin으로 보정한 유전자 발현 변화.

한 값을 가지고 다른 band의 값을 보정한 후, 그래프로 나타내었다.

결 과

1) HDAC1 과다 발현에 의한 HIF-1α 발현 증가 및 p53 발현 감소

HDAC 유전자가 혈관신생과정에 관여하는 여러 유전자들의 발현을 조절하는지 조사하기 위해, HEK 293세포에 wild-type HDAC1 (wt-HDAC1)과 mutant HDAC1 (mt-HDAC1)을 발현시키는 벡터를 transfection시켰다. 이때 사용된 mt-HDAC1은 wt- HDAC1의 141번째인 histidine을 alanine으로 point mutation시킨 것이다. 그 결과 HIF-1α의 발현이 HDAC1에 의해 증가한 반면, p53의 발현은 감소하였다(Fig. 1A). 그러나 wt-HDAC1과는 달리, mt-HDAC1은 HIF-1α의 발현과 p53의 발현에 변화를 주지 못하였다(Fig. 1A). Fig. 1B에서는 HDAC1, HIF-1α, p53의 발현량을 α-tubulin으로 보정하여 그래프로 나타내었다. 결과적으로 HDAC1의 활성이 HIF-1α와 p53의 발현에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

2)HDAC 활성 저해제에 의한 VEGF 발현 감소

HDAC 활성 저해제인 TSA와 FR901228을 각각 100 ng/ml, 10 ng/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후, 강력한 혈관신생 유도 인자로 알려진 VEGF의 발현을 Western blot 분석을 이용하여 조사하였다. 이때 저해제를 처리하지 않은 세포를 control로 사용하였으며, VEGF의 발현은 control에 비해 TSA와 FR901228에 의해 감소하였고, FR901228보다는 TSA에 의한 감소가 더 크게 나타났다(Fig. 2A). TSA, FR901228에 의한 VEGF 발현 변화를 α-tubulin으로 보정하였고, 또한 이것을 Fig. 2B와 같이 그래프로 도식화하였다.

3) HDAC 활성 저해제에 의한 MT1-MMP 발현 감소 및 Sp1, c-Fos, c-Jun 발현 감소

혈관신생과정에서 혈관내피세포의 이동과 침윤에 관여하는 유전자로 알려져 있는 MT1-MMP의 발현에 HDAC 활성 저해제가 어떤 영향을 미치는지 Western blot 분석으로 알아보았다. MT1-MMP의 경우, control과 비교하였을 때 TSA에 의해서는 발현에 변화가 없었지만, FR901228에 의해서는 감소되었다 (Fig. 3A, B). 또한 혈관신생과정 중 혈관내피세포의 증식에 관여하는 것으로 알려진 Sp1, c-Fos, c-Jun의 발현에 HDAC 활성 저해제가 영향을 미치는지 알아본 결과, control에 비해 TSA, FR901228에 의해 발현이 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C). 특히 Sp1과 c-Jun의 경우, TSA에 의한 효과보다 FR901228에 의한 효과가 더욱 강력함을 확인하였다. c-Fos의 경우는 TSA에 의한 발현 변화는 거의 없었으나, FR901228에 의해서는 크게 감소하였다(Fig. 3C, D). Fig. 3D는 이들의 발현 변화를 보정하여 그래프로 나타낸 것이다.

4) HDAC 활성 저해제에 의한 Egr-1, Ets1 발현 감소 및 gelsolin 발현 감소

혈관신생과정에 관여하는 인자들의 활성을 조절하는 전사인자인 Egr-1, Ets1의 발현에 HDAC 활성 저해제가 어떤 영향을 미치는지 Western blotting을 통해 알아보았다. Egr-1의 경우, TSA와

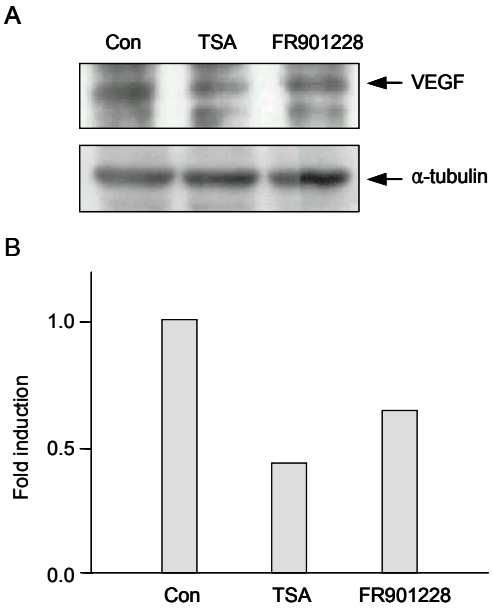

Fig. 2. TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 VEGF의 발현 조사. (A) TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 VEGF의 발현 조사(Con; HDAC 활성 저해제 처리 안함, TSA; 100 ng/ml 처리, FR901228; 10 ng/ml 처리). (B) α-tubulin으로 보정한 유전자 발현 변화.

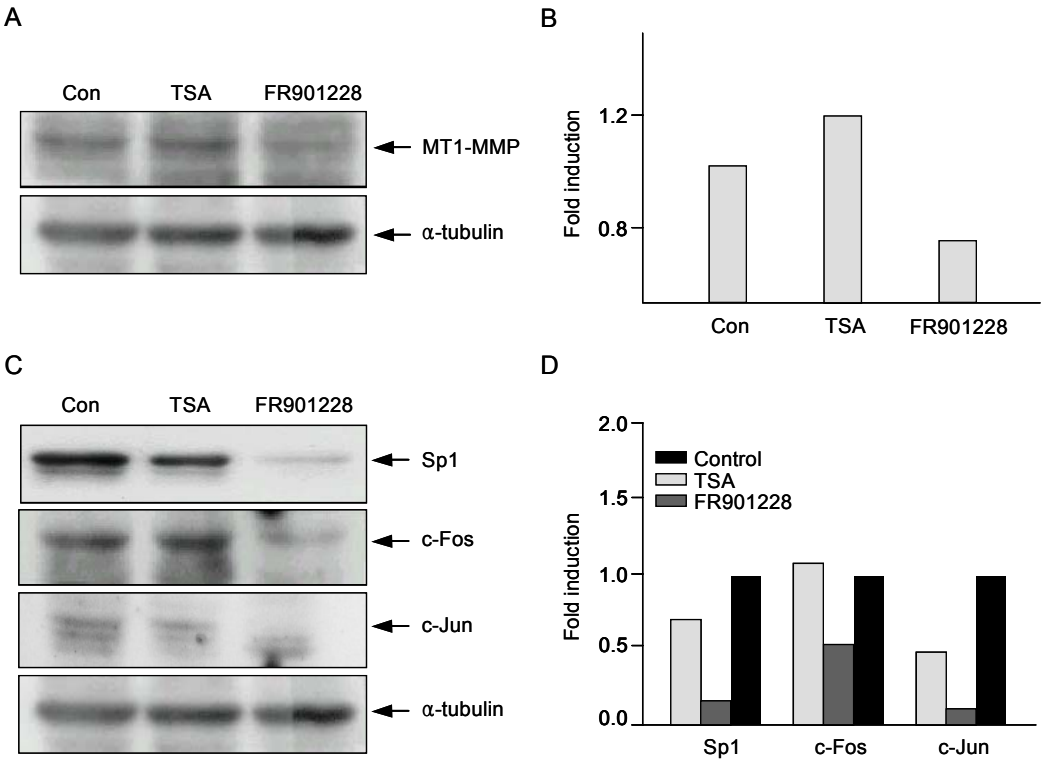

Fig. 3. TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 MT1-MMP, Sp1, c-Fos, c-Jun의 발현 조사. (A) TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 MT1-MMP의 발현 조사(Con; HDAC 활성 저해제 처리 안함, TSA; 100 ng/ml 처리, FR901228; 10 ng/ml 처리). (B) α-tubulin으로 보정한 유전자 발현 변화. (C) TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 Sp1, c-Fos, c-Jun의 발현 조사(Con; HDAC 활성 저해제 처리 안함, TSA; 100 ng/ml 처리, FR901228; 10 ng/ml 처리). (D) α-tubulin으로 보정한 유전자 발현 변화.

FR901228에 의해 발현이 크게 감소하였고, Ets1의 경우는 TSA에 의해서는 발현 변화가 거의 없었으나, FR901228에 의해서는 발현이 크게 감소하였다(Fig. 4A, B). 또한 암세포의 전이 억제작용을 보이는 gelsolin의 발현은 control에 비해 TSA에 의해서는 2.5배, FR901228에 의해서는 2.9배 증가하는 것을 보였으며(Fig. 4C), 이들을 보정한 값을 Fig. 4D에 그래프로 나타내었다.

고 찰

인체조직을 구성하고 있는 모든 세포들의 생존은 혈관에 의한 산소와 영양분의 공급 및 대사산물의 배출이 필수적으로 요구된다. 따라서 인체의 각 조직에는 혈관의 미세 그물망이 존재하며, 이러한 혈관은 인체의 각 기관과 조직의 정상적인 기능과 대사활동에 절대적으로 필요하다. 따라서 다세포 유기체가 계속 성장하기 위해서는 혈관생성 경로인 혈관형성(vasculogenesis)과정과 혈관신생(angiogenesis)과정에 의한 새로운 혈관의 생성이 필요하다. 이 중 혈관신생과정은 혈관벽이 이완되어 혈관벽의 투과성이 증가되고, 혈관 내피세포들간의 결합이 끊어져서 세포의 수축이 일어난다. 그 다음, 다양한 protease가 활성화되어 기저막을 분해하며, 혈관내피세포들은 혈관벽으로부터 자극이 있는 방향의 혈관주변 조직으로 이동, 증식하여 루프를 형성하며, 형성된 루프들이 분화되어 혈관망을 생성하게 된다. 이러한 혈관신생은 발생과정에서 기관이 형성되고 조직이 성장하는 동안 매우 활발하게 일어나며 출생 후, 성인에 이

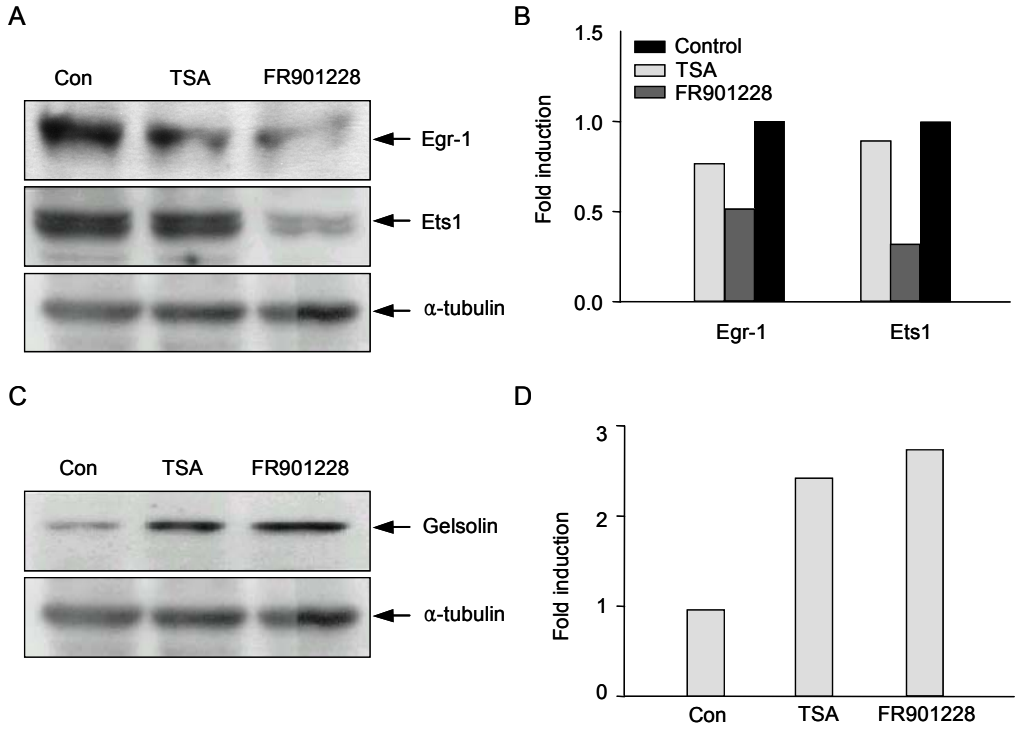

Fig. 4. TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 Egr-1, Ets1, gelsolin의 발현 조사. (A) TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 Egr-1, Ets1의 발현 조사(Con; HDAC 활성 저해제 처리 안함, TSA; 100 ng/ml 처리, FR901228; 10 ng/ml 처리). (B) α-tubulin으로 보정한 유전자 발현 변화. (C) TSA와 FR901228에 의한 HepG2 세포에서의 gelsolin의 발현 조사(Con; HDAC 활성 저해제 처리 안함, TSA; 100 ng/ml 처리, FR901228; 10 ng/ml 처리). (D) α-tubulin으로 보정한 유전자 발현 변화.

르기까지 이 기전이 혈관생성을 담당한다. 따라서 발생단계에서부터 노화단계에 이르기까지 일생에 걸쳐 혈관신생은 새로운 혈관을 만드는 핵심기전으로 작용하고, 이의 조절이상은 수많은 질병의 발생과 직결된다. 즉, 혈관신생이 과다한 경우는 고형암, 당뇨병성 망막증, 류마티스성 관절염, 건선, 화농성 육아종, 신혈관 녹내장 등의 질환과 관련되어 있고, 그 반대로 부족한 경우는 만성궤양, 지연성 상처치유, 선천성 기형, 그리고 허혈성 뇌졸중과 동맥 경화성 치매 등 노인성 질환의 발생과 관련이 있다. 이러한 혈관신생과정은 pro-angiogenic 분자와 anti-angiogenic 분자의 상호작용에 의해 조절된다. 혈관신생 인자에는 여러 가지가 있는데, 특히 혈관 내피세포의 증식과 이동에 관여하는 인자에는 acidic FGF, basic FGF, angiogenin, TGF-α, TGF-β, wound fluid, prostaglandis, adipocyte lipids, PD-ECGF, TNF-α, VPF/VEGF 등이 있다.[13] 그리고 혈관 신생과정을 조절하는 inducer로 역할을 하는 분자들이 있는데 이들은 혈관 내피 세포들의 성장과 이동을 억제시키는 억제 인자로 작용을 한다. 대표적인 억제 인자로는 암 억제 유전자, protein fragments, soluble inhibitors 등이 있다. 특히 암 억제 유전자 중의 하나인 p53은 VEGF 생성을 억제하고, 혈관신생 억제 인자인 thrombospondin-1 (TSP-1)의 분비를 촉진시킨다.[14]

본 연구에서는 이미 보고된 HDAC의 기능을 근거로 HDAC 활성 저해제가 혈관신생과정에 관여하는 여러 가지 조절 인자들의 작용에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 먼저, 인간의 배아신장세포에서 HDAC1을 과다 발현 시켰을 때, 대표적인 혈관신생 관련 유전자인 HIF-1α의 발현이 감

소하였으며, 암 억제 유전자인 p53의 발현이 감소하였다(Fig. 1). 이것은 HDAC이 혈관신생 관련 유전자들의 발현을 증가시킴으로써, 혈관신생과정을 유도하는데 관여할 것으로 추측된 최근의 보고와 일치한다.[4] 그리고 HDAC 활성 저해제를 처리하였을 때, 혈관신생의 중요한 촉진제로 작용하는 VEGF의 발현이 감소하였다(Fig. 2). 이것은 HDAC의 활성이 HIF-1α와 같은 혈관신생에 관련된 유전자의 발현을 증가시킨다는 보고와 일치하는 것이다. 또한 혈관신생과정에서 혈관내피세포의 이동, 침윤 과정에 관여하는 것으로 알려진 MT1-MMP[15]의 발현도 HDAC 활성 저해제에 의해 감소하였다(Fig. 3). 이러한 사실을 통해, HDAC 활성 저해제가 암세포에서 일어나는 혈관신생과정 중 혈관내피세포의 이동에 관련된 유전자의 발현을 억제 시킴으로써 혈관 형성을 억제시키는 기능을 가지고 있음을 예측할 수 있다. 또한 proto-oncogene으로 작용하는 전사인자인 AP-1 (c-Jun, c-Fos), 그리고 tumorigenesis에 관여하는 전사인자인 Sp1[16]의 발현도 HDAC 활성 저해제에 의해 감소하였다(Fig. 3). c-Jun, c-Fos와 함께 nuclear proto-oncogene으로 작용하는 전사인자인 Egr-1[17]과 혈관신생과정에서 혈관신생인자들의 기능을 조절하는 전사인자인 Ets1[18]의 발현도 HDAC 활성 저해제에 의해 감소하였다(Fig. 4). 마지막으로 세포의 이동에 관여하는 중요한 액틴 결합 단백질인 동시에 tumorigenecity를 억제하며, 암 전이 억제를 통해 종양 억제유전자 활성을 가지는 것으로 알려진 gelsolin[19]의 발현이 TSA와 FR901228에 의해 크게 증가하였다(Fig. 4). 이것은 이미 보고된 사실인 TSA가 gelsolin의 발현을 증가시켜, gelsolin의 기능인 종양 세포의 분열을 억제 시키는 기능을 도와주는 역할을 한다[19]는 보고와 일치하는 결과로, HDAC 활성 저해제는 gelsolin의 발현을 증가시켜 종양 세포의 증식을 억제하는 기능이 있으며, anti-metastasis 기능을 가지고 있을 것으로 예측할 수 있다. Fig. 4C는 HDAC 활성이 p53과 같은 암 억제 유전자의 발현을 감소시켜 궁극적으로 tumorigenesis를 일으킨다는 사실과도 일치하는 것이다. 특히, 본 연구 결과들은 TSA 보다는 FR901228를 처리하였을 때 더 큰 효과를 보였다.

위의 결과들을 종합해 보면, HDAC 활성이 혈관신생관련 유전자들의 발현을 증가시키고, 암 억제 유전자들의 발현을 감소시켜 tumorigenesis를 일으키는데 중요한 기능을 하므로[4] HDAC 활성 저해제인 TSA와 FR901228은 종양 세포의 혈관신생과정에 관여하는 인자들인 VEGF, MT1-MMP, Sp1, c-Fos, c-Jun과 이러한 인자들의 기능을 조절하는 전사인자인 Egr-1, Ets1의 단백질 발현을 저해하여 혈관 신생과정을 억제시킬 것으로 보인다. 또한 암 억제 유전자인 gelsolin의 발현을 유도함으로써 HDAC 활성 저해제가 항암 활성을 가진다는 사실을 입증할 수 있다. 따라서 본 연구를 통해 HDAC 저해제들의 혈관신생 억제활성을 확인함으로써, 항암제로서의 개발가능성을 제시하였다.

결 론

본 연구에서는 이미 보고된 바 있는 HDAC의 활성이 혈관신생과정에 관여하는 유전자인 HIF-1α의 발현을 증가시키는 반면, p53과 같은 암 억제유전자의 발현을 감소시킨다는 사실을 확인하였다. 이러한 사실에 기초하여 HDAC 활성 저해제를 처리하여 혈관신생과정 중 혈관내피세포의 이동과 분열에 관련된 유전자들인 VEGF, MT1-MMP, Sp1, c-Fos, c-Jun의 발현과 혈관신생에 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자들인 Egr-1, Ets1의 발현, 그리고 암 억제 유전자인 gelsolin의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 VEGF, MT1-MMP, Sp1, c-Fos, c-Jun, Egr-1, Ets1의 발현이 감소하였으며, gelsolin의 발현은 증가함을 보였다 (Fig. 1～4).

이러한 사실로 볼 때, 종양 세포가 혈관을 새롭게 형성 해 나가는 과정에서 인간의 간암 세포주인 HepG2에 HDAC 활성 저해제를 처리하면, 이들은 혈관신생과정에 관련된 여러 조절 인자들의 발현을 억제 시킴으로써, 혈관 신생과정을 억제하는 역할을 하는 것으로 보인다. 따라서 이러한 결과를 통해 HDAC 활성 저해제가 항암 활성을 가지며, 나아가 종양 치료제로서의 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업 (HMP-01-PJ1-PG1-01CH04-0005)에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1) Victor I. Sementchenko and Dennis K Watson. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000; 19: 6533-6548.
2) Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352.
3) Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 7.
4) Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Med* 2001; 7: 437-443.
5) Kosugi H, Towatari M, Hatano S, Kitamura K, Kiyoi H, Kinoshita T, Tanimoto M, Murate T, Dawashima K, Saito H, Naoe T. Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. *Leukimia* 1999; 13: 1316-1324.
6) Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* 1995; 17: 423-430.
7) Shimada J, Kwon HJ, Sawamura M, Schreiber SL. Synthesis and cellular characterization of the detransformation agent, (-)-depudecin. *Chem Biol* 1995; 2: 517-525.
8) Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 171-174.
9) Oliver H. Kr mer, Martin G ttlicher and Thorsten Heinsel. Histone deacerylase as a therapeutic target. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2001; 12: 294-300.
10) Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot* 1976; 29: 1-6.
11) Byrd JC, Shinn C, Ravi R, Willis CR, Waselenko JK, Flinn IW, Dawson NA, Grever MR. Depsipeptide (FR901228): a novel therapeutic agent with selective, in vitro activity against human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Bloods* 1999; 94: 1401-1408.
12) Rajgolikar G, Chan KK, Wang HC. Effects of a novel antitumor depsipeptide, FR901228, on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51:29-38.
13) Judah Folkman, Michael Klagsbrun. Angiogenic Factors. *Science* 1987; 223: 442-446.
14) Federico Bussolino, Alberto Mantovani, Graziella Persico. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends in Biochemical Sciences* 1997; 22: 251-256.
15) Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 1999; 274: 22679-22685.
16) Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li XC, Xie K. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 4143-4154.
17) Brand T, Sharma HS, Fleischmann KE, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W. Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1992; 71: 1351-1360.
18) Etienne Lelievre, Frederic Lionneton, Fabrice Soncin, Bernard Vandenbunder. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *The Int J Biochem & Cell Biol* 2001; 33: 391-407.
19) Fujita H, Okada F, Hamada J, Hosokawa M, Moriuchi T, Koya RC, Kuzumaki N. Gelsolin functions as a metastasis suppressor in B16-BL6 mouse melanoma cells and requirement of the carboxyl-terminus for its effect. *Int J Cancer* 2001; 93: 773-780.