

## bFGF가 유도하는 혈관신생과정에서 HMGI(Y)의 작용에 관한 연구

부산대학교 분자생물학과, <sup>1</sup>서울대학교 약학대학 생화학교실

구선영 · 김명숙 · 백진현 · 문은정 · 배문경 · 김규원<sup>1</sup>

### Involvement of High Mobility Group Protein I(Y) in Basic Fibroblast Growth Factor-induced Angiogenesis

Sun-Young Koo, Myoung Sook Kim, Jin Hyen Baek,  
Eun-Joung Moon, Moon-Kyoung Bae and Kyu-Won Kim<sup>1</sup>

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

<sup>1</sup>Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Expression of High mobility group protein (HMG)I(Y), architectural transcription factor is elevated in a lot of cancer and highly proliferating cells such as fibroblast and smooth muscle cells. HMGI(Y) has been implicated in the control of cell proliferation and gene expression. Here we observed the expression of HMGI(Y) in proliferating Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). When basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), a well-known angiogenic factor, induced cell proliferation, HMG I(Y) mRNA was increased by RT-PCR. To investigate role of HMGI(Y) in cell proliferation, we used distamycin A, natural antibiotics which is also known as competitor of HMGI(Y). In MTT assay, bFGF induced proliferation of HUVECs but distamycin A with bFGF decreased cell proliferation. Moreover, distamycin A blocked bFGF-induced angiogenesis *in vivo* mouse matrigel plug assay and chorioallantoic membrane (CAM) assay. Taken together, we suggest that HMGI(Y) plays an important role in bFGF-induced angiogenesis especially through controlling of cell proliferation.

**Key Words:** High mobility group protein I(Y), basic Fibroblast Growth Factor, Angiogenesis, Proliferation, Distamycin A

### 서 론

HMGI(Y)는 핵내에 존재하는 아주 작은 기능성 단백질로, 동일 유전자에서 유래한 두가지 단백질, HMGI와 HMGY를 말한다.<sup>1)</sup> 이 단백질은

architectural transcription factor로서 세포증식 및 유전자 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup>

HMGI(Y)는 활발하게 분열하는 세포에서 발현이 증가하고, 분화된 세포에서는 발현이 감소한다.<sup>3)</sup> 특히, 암세포에서 HMGI(Y)의 발현을 조사한 결

책임저자 : 김규원, ☎ 151-742, 서울시 관악구 신림 9동 산 56-1, 서울대학교 약학대학 생화학교실

Tel: 02-880-6988, Fax: 02-872-1795, E-mail: qwonkim@plaza.snu.ac.kr

접수일 : 2002년 5월 13일, 게재승인일 : 2002년 6월 15일

과, 다양한 종류의 암세포에서 발현이 증가됨이 보고되어, tumor maker로 알려져 있다.<sup>4-6)</sup> 섬유아 세포나 근육세포에서도 분열을 유도할 경우, HMGI(Y)가 현저하게 증가됨이 알려져 있다.<sup>7,8)</sup>

HMGI(Y)는 AT-hook이라는 구조를 통해 DNA의 AT-rich sequence에 결합을 하며, 크로마틴 구조를 변화시키거나 다른 전사조절인자의 결합을 유리하게 도와줌으로써 특정 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> iNOS의 경우, HMGI(Y)는 DNA에 결합하여 NF-kB의 결합을 더욱 용이하게 하는 사실이 보고되었고,<sup>9)</sup> IFN- $\beta$ 나 COX-2의 경우 역시, HMGI(Y)가 enhanceosome의 형성을 도와 유전자 발현을 조절하는 것이 보고되었다.<sup>10,11)</sup>

이 실험에서 HMGI(Y)의 경쟁자로 사용한 디스타마이신 에이는 자연에 존재하는 항생제의 일종으로 DNA의 minor groove의 AT-rich sequence에 강하게 결합하는 성질을 가지고 있다.<sup>12)</sup> 디스타마이신 에이 자체는 세포독성을 거의 갖지 않으나, DNA에 특이적으로 결합하는 성질을 이용해 디스타마이신 에이의 골격에 약간의 변형을 가하여 세포독성효과를 가지는 화합물을 합성하는 시도도 이루어지고 있다.<sup>13,14)</sup>

혈관신생과정은 발생과정 뿐만 아니라, 암, 당뇨병성 망막증, 건선 등 여러 질환을 유발하는 생물학적 현상으로 그 발생기전을 정확히 이해하는 일이 중요하다.<sup>15)</sup> 현재까지 많은 연구가 진행되어 오고 있는 가운데, 본 연구에서는 분열중인 혈관 내피세포에서의 HMGI(Y)의 발현을 조사하고, 이 단백질이 혈관신생과정에 어떻게 작용하는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 혈관내피세포의 배양 및 시약

혈관내피세포인 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)은 umbilical cord에서 분리하였고, 0.3% 젤라틴이 코팅된 세포 배양 플라스크에서 20% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, USA), 3 ng/ml bFGF, 100 ug/ml heparin, 100 units/ml penicillin, and 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 Medium 199 (M199) 배지에서 단층 배

양하였다. 세포는 37°C, 포화 습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였고, passage 3~8의 세포를 실험에 사용하였다. Basic fibroblast growth factor (bFGF, 50 ng/ml) 처리 시, HUVEC은 미리 10% 혈청이 들어있는 M199 배지로 4시간 동안 적응시킨 다음, 12시간 동안 bFGF를 처리하였다. 디스타마이신 에이(Sigma, USA)는 96% 에탄올에 5 mg/ml로 녹여 사용하였다.

### 2) RT-PCR

bFGF를 처리한 HUVEC에서 TRI reagent (Molecular Research Center, USA)를 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 역전사반응은 RNA 5 ug에 대해 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 이용해 42°C에서 52분, 70°C에서 15분간 실시하였고, 역전사 산물 1 ul에 대해 아래와 같은 조건으로 HMGI(Y)에 대해 PCR 하였다. 즉, HMGI(Y) cDNA의 3~24그리고 540~560 nucleotide에 해당하는 5'-GAGTGAGTCGAGCTCGAAGTC-3'과 5'-GGAGGGCATGTGTGTATGCGT-3'를 프라이머로 하여 25 cycles (30 sec at 94°C, 2 min at 55°C and 2 min at 72°C)의 PCR을 수행하였다.<sup>16)</sup> Glycerol-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였고, PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 EtBr로 염색한 뒤, UV 하에서 관찰하였다.

### 3) MTT assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay로 혈관내피 세포 생존율을 조사하였다. 혈관내피세포를 96-well culture plate에 4×10<sup>3</sup>개가 되도록 심어 하루동안 안정화시킨 후, 0.5% 혈청이 들어있는 M199로 starvation 하였다. bFGF 처리 세시간 전에 디스타마이신 에이를 전처리하고, bFGF와 디스타마이신을 처리하여 사흘동안 배양하였다. MTT를 최종농도 0.5 mg/ml로 넣어 4시간 배양한 뒤, 배지를 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 가하여 생성된 formazan crystal을 녹여낸다. 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 혈관 내피세포의 증식에 대한 영향을 조사하였다(reference 파장 650 nm). 각 조건 별로 triple로 하였고, 실험은 2회 반복하였다.

4) *In vivo* mouse Matrigel plug assay<sup>17)</sup>

Matrigel 500 ul에 heparin (15 unit/ml)을 섞은 뒤 ice에서 bFGF (100 ng/ml) 단독 혹은 디스타마이신(100 ug)과 조합으로 넣고, C57BL/6J 쥐에 피하 주사하였다. Matrigel을 주사한지 5일째, 쥐를 희생시켜서 Matrigel plug을 꺼내어 사진을 찍고, 일부는 3.7% formaldehyde/phosphate-buffered saline (PBS)에서 고정시킨 다음, hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. Plug 내에 생긴 혈관을 정량화하기 위해 Drabkin reagent kit 525 (Sigma, USA)로 헤모글로빈양을 측정하였다.

5) CAM assay<sup>18)</sup>

수정란을 구입하여 45시간 동안 18°C에 놓아둔 다음, 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양하였다. 3일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 2 ml 뽑아낸 뒤, 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 70% 알코올로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들었다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프를 구멍을 막았다. 이것을 계속 배양기에서 키워 4일배가 되면 thermanox coverslip에 디스타마이신 에이를 도포하고 이를 40분 동안 말린다. 다 마른 것을 확인하고 4일배의 유리테이프를 떼어낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프로 창문을 막았다. 이를 배양기에서 3일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipose, 녹십자)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경(magnification×8)으로 혈관신생 억제

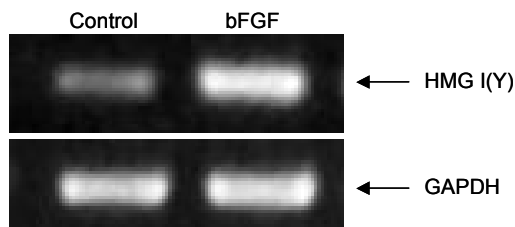


Fig. 1. Induction of HMGI(Y) expression on the endothelial cells by bFGF. 효과를 관찰하고, CAM의 사진을 찍었다.

결 과

1) 분열중인 혈관내피세포에서 HMGI(Y)의 발현 조사

bFGF를 12시간 동안 처리하여 세포증식을 유도한 혈관내피세포에서 HMGI(Y)의 발현을 조사하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과(Fig. 1), HMGI(Y)의 mRNA가 control에 비해 발현이 증가되었다.

2) MTT assay를 통해 HMGI(Y)가 혈관내피 세포증식에 미치는 영향 조사

bFGF에 의해 발현이 증가된 HMGI(Y)가 세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 HMG I(Y)의 경쟁자로 알려진 디스타마이신 에이를 이용하여 MTT assay를 실시하였다. Fig. 2에서와 같이, bFGF (10 ng/ml)를 3일 동안 처리한 경우 HUVEC은 control에 비해 2.3배 증식하였으나, bFGF와 디스타마이신 에이를 동시에 처리한 경우 bFGF 단독처리의 66% 수준으로 분열이 감소하였다.

3) Matrigel plug assay에서 디스타마이신 에이를 이용하여 HMGI(Y)가 혈관신생과정에 미치는 효과 조사

HMGI(Y)의 기능을 *in vivo*에서 확인해 보기 위해, bFGF와 디스타마이신 에이를 이용하여 Ma-

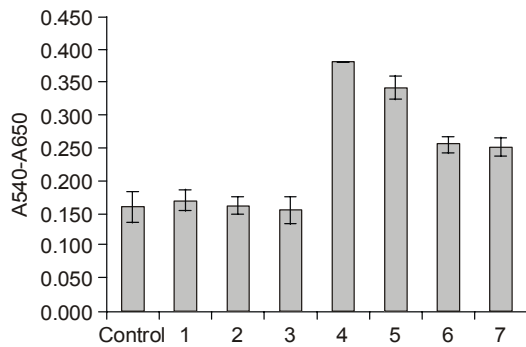
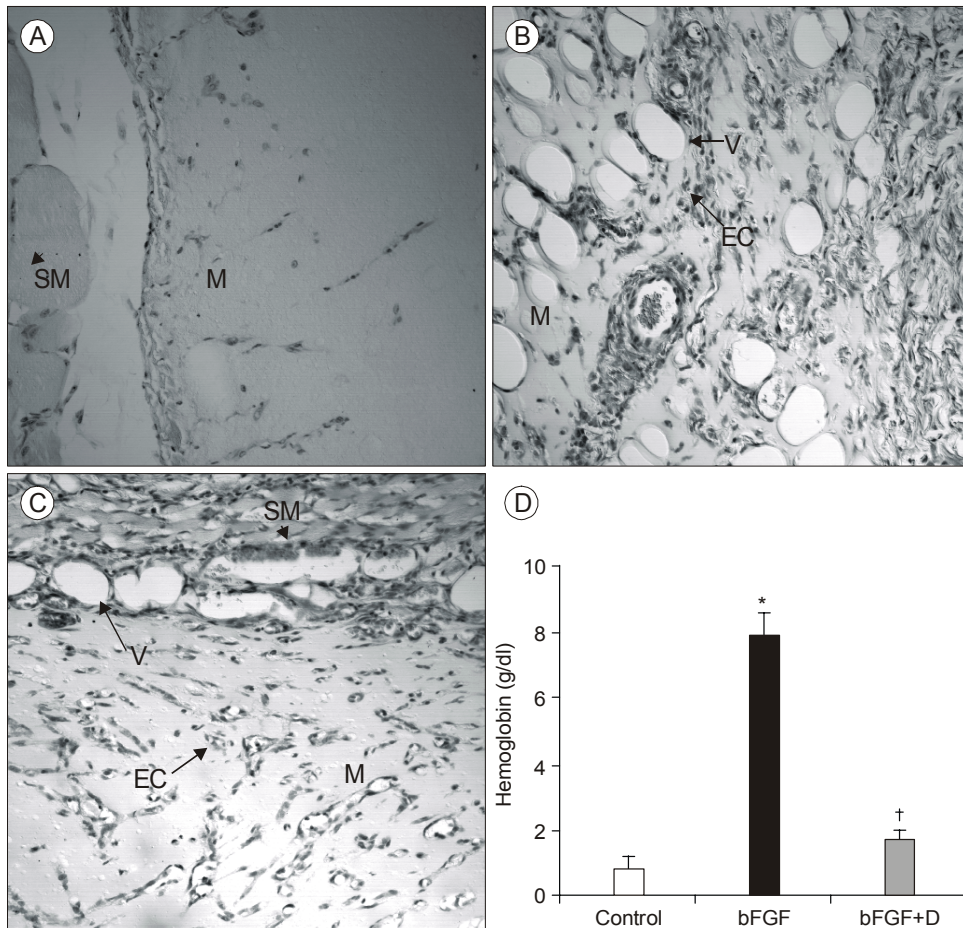


Fig. 2. Effect of HMGI(Y) on the proliferation of endothelial cells. Control; 0.1% ethanol in media, 1; Distamycin A 1 uM, 2; Distamycin A 5 uM, 3; Distamycin A 10 uM, 4; bFGF 10 ng/ml, 5; bFGF 10 ng/ml+Distamycin A 1 uM, 6; bFGF 10 ng/ml+Distamycin A 5 uM, 7; bFGF 10 ng/ml+Distamycin (mean±SE).



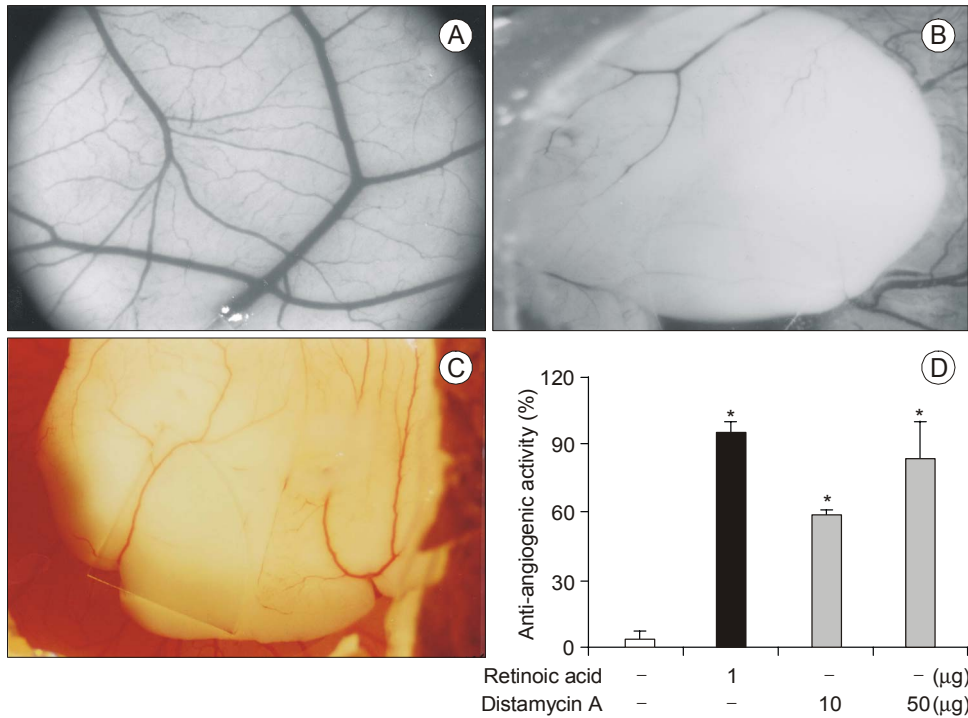
**Fig. 3.** Anti-angiogenic activity of distamycin A in in vivo mouse Matrigel plug assay. After distamycin A was subcutaneously injected to mouse with Matrigel (n=7), Matrigel was stained. (A) There is little vessel in control. (B) When bFGF was treated, bFGF-induced angiogenesis is occurred. (C) Distamycin A inhibited bFGF-induced angiogenesis. (D) Quantitative analysis of Hb content is shown.

Matrigel plug assay를 수행하였다(n=7). Matrigel plug 내의 혈관을 관찰하기 위해 헤마톡실린과 에오신으로 염색하여 현미경하에서 관찰하는 한편, 실제 혈관내의 헤모글로빈 양 측정을 통해 혈관신생억제 효과를 정량화하였다. Fig. 3에서와 같이 bFGF (100 ng/ml)를 처리하였을 경우(B), 아무것도 처리하지 않은 대조군(A)에 비해 혈관신생이 현저하게 증가되고, bFGF와 디스타마이신 에이(100 ug/ml)를 동시에 처리한 경우(C)에 혈관형성이 억제되었다. Fig. 3 D에서 대조군의 헤모글로빈은 0.8 ± 0.3 g/dl, bFGF 처리한 경우는 7.8 ± 0.6 g/dl이고,

bFGF와 디스타마이신 에이를 동시에 처리한 경우는 1.7 ± 0.3 g/dl로 감소하였다.

#### 4) CAM assay를 통한 디스타마이신 에이의 혈관신생 억제작용 조사

HMGI(Y)의 기능을 in vivo 조건에서 다시 확인하기 위하여 디스타마이신 에이를 처리하여 CAM assay를 수행하였다. 아무것도 처리하지 않은 것과 레티노익 에시드를 처리한 대조군을 각각 실험의 음성 및 양성 대조군으로 사용하여, 디스타마이신 에이를 10 ug 또는 50 ug 처리했을 때, 각



**Fig. 4.** Anti-angiogenic activity of distamycin A on CAM assay. Anti-angiogenic activity of distamycin A was evaluated by CAM assay. (A) control (only containing ethanol) CAM shows normal angiogenesis. (B) Angiogenesis was completely blocked by RA (1 ug/egg) treatment. (C) Distamycin A (50 ug/egg) treated CAMs significantly decreased the angiogenesis. (D) Anti-angiogenic activity of distamycin A was represented by statistic comparison and S.E.M was calculated for independent experiments. \*(P<0.05 compared to control) RA; retinoic acid, D; distamycin A.

각 58.57±1.43, 83.34±16.66%의 혈관신생억제 효과를 보였다(Fig. 4).

### 고찰

본 연구에서는 분열 중인 혈관내피세포에서 HMGI(Y)의 발현이 증가됨을 확인하였고, 증가된 HMGI(Y)의 기능을 혈관신생 관점에서 살펴보았다. 즉, 세포수준에서 세포분열과 관련하여 HMGI(Y)의 기능을 조사하였고, HMGI(Y)의 경쟁자를 이용한 in vivo 실험을 통해 HMGI(Y)가 혈관신생과정에 관여할 가능성을 확인하였다. HMGI(Y)의 경쟁자로 사용한 디스타마이신은 자체로서는 세포독성이 없고, 이미 iNOS의 유전자 발현시 HMGI(Y)와 경쟁적으로 작용하여 iNOS 발현을 감소시킨다는 것이 보고되었다. HMGI(Y)가 혈관신생의 분자수

준에서 어떠한 기능을 하는지 알기 위해서는 보다 더 자세한 연구가 이루어져야 하나, 기존의 보고를 토대로 혈관신생과정에서 HMGI(Y)의 기능을 추측해 보면 다음과 같다.

HMGI(Y) 자체는 전사조절인자의 기능이 없으나 DNA의 AT-rich sequence에 결합하여 염색체의 구조를 변형시킴으로써 다른 전사조절인자들의 결합을 용이하게 하고 enhanceosome의 형성을 유도한다고 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 이런 맥락에서 볼 때, 크로마틴 구조에서 CpG island가 실질적으로 전사가 일어나는 곳이라면, HMGI(Y)가 결합하는 AT-rich sequence는 구조적으로 조절이 이루어지는 곳이고, HMGI(Y)는 구조적 조절을 하는 기능성 인자가 된다. 즉, HMGI(Y)는 그 존재유무가 유전자 발현에 절대적으로 영향을 미치지 않지만 전사가 일어나기 쉬운 구조적인 환경을 조성함으로써

유전자 발현에 상당한 영향을 끼칠 것으로 생각되어진다. HMGI(Y)가 리크루트 한다고 알려져 있는 전사조절인자로는 NF-kB, AP-1, CBP/P300, NF-AT 등이 있고,<sup>19)</sup> 현재까지 IFN-b, COX-2 등의 유전자에서 HMGI(Y)의 기능에 대한 연구가 보고되어 있다.<sup>10,11)</sup> 이런 관점에서 HMGI(Y)가 혈관신생관련 특정 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 앞으로 조사해 볼 필요가 있다. 결론적으로 본 연구에서는 in vitro 및 in vivo 혈관신생측정법에 의해 HMGI(Y)가 혈관신생과정에 관여할 가능성을 제시하였다.

### 감사의 글

이 연구는 서울대학교 발전기금 및 간접연구경비에서 지원된 연구비에 의해 수행하였음.

### 참고 문헌

- 1) Bustin M, Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1996; 54: 35-100.
- 2) Reeves R, Beckerbauer L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1519: 13-29.
- 3) Giannini G, Kim CJ, Marcotullio LD, Manfioletti G, Cardinali B, Cerignoli F, Ristori E, Zani M, Frati L, Screpanti I, Guilino A. Expression of the HMGI(Y) gene products in human neuroblastic tumours correlates with differentiation status. *Br J Cancer* 2000; 83: 1503-1509.
- 4) Chiappetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, Abe N, Di Bonito M, Vento MT, Giuliano A, Fedele M, Viglietto G, Santoro M, Watanabe T, Giancotti V, Fusco A. High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int J Cancer* 2001; 91: 147-151.
- 5) Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, Manfioletti G, Martinez-Tello FJ, Pentimalli F, de Nigris F, Mastro A, Botti G, Fedele M, Berger N, Santoro M, Giancotti V, Fusco A. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4193-4198.
- 6) Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Uchimura H, Fujioka Y, Chiappetta G, Fusco A, Atomi Y. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins. *Cancer Res* 2000; 60: 3117-3122.
- 7) Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol* 1982; 12: 3919-3929.
- 8) Chin MT, Pellacani A, Hsieh CM, Lin SS, Jain MK, Patel A, Huggins GS, Reeves R, Perrella MA, Lee ME. Induction of high mobility group I architectural transcription factors in proliferating vascular smooth muscle *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2199-2205.
- 9) Pellacani A, Chin MT, Wiesel P, Ibanez M, Patel A, Yet SF, Hsieh CM, Paulauskis JD, Reeves R, Lee ME, Perrella MA. Induction of high mobility group-I(Y) protein by endotoxin and interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells. Role in activation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 1525-1532.
- 10) Thanos D, Maniatis T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 1995; 83: 1091-1100.
- 11) Ji YS, Xu Q, Schmedtje JF, Jr. Hypoxia induces high-mobility-group protein I(Y) and transcription of the cyclooxygenase-2 gene in human vascular endothelium. *Circ Res* 1998; 83: 295-304.
- 12) Zimmer C, Wahnert U. Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. *Prog Biophys Mol Biol* 1986; 47: 31-112.
- 13) Baraldi PG, Romagnoli R, Beria I, Cozzi P, Geroni C, Mongelli N, Bianchi N, Mischiati C, Gambari R. Synthesis and antitumor activity of new benzoheterocyclic derivatives of distamycin A. *J Med Chem* 2000; 43: 2675-2684.
- 14) Arcamone FM, Animati F, Barbieri B, Configliacchi E, D'Alessio R, Geroni C, Giuliani FC, Lazzari E, Menozzi M, Mongelli N. Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives. *J Med Chem* 1989; 32: 774-778.
- 15) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1: 27-31.
- 16) Eckner R, Bimstiel ML. Cloning of cDNAs coding for human HMG I and HMG Y proteins: both are capable of binding to the octamer sequence motif. *Nucleic*

- Acids Res* 1989; 17: 5947-5959.
- 17) Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992; 67: 519-528.
- 18) Suh H, Jung EJ, Kim TH, Lee HY, Park YH, Kim KW. Anti-angiogenic activity of ursodeoxycholic acid and its derivatives. *Cancer Lett* 1997; 113: 117-122.
- 19) Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 2001; 277: 63-81.
-