

Moesin의 과발현이  
혈관내피세포의 노화에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

홍인애

Moesin의 과발현이  
혈관내피세포의 노화에 미치는  
영향

지도교수 이 광 훈

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2007 년 12 월

연세대학교 대학원

의과학과

홍 인 애

# 홍인애의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2007년 12월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성하기까지 따뜻한 배려로 지도해 주시고 격려해 주시고 학문의 길과 방향에 깨우침을 주신 은사 이광훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 많은 관심과 조언으로 도움을 주신 정현철 교수님, 정기양 교수님께 감사드립니다. 그리고 연구 진행 동안에 방향을 제시하여 주신 이주희 선생님께 진심으로 감사드립니다. 실험을 진행함에 있어서 많은 도움을 주신 장남수 선생님과 오문호 선생님, 류화 선생님께서도 깊은 감사를 드립니다.

지금까지 늘 사랑과 관심으로 곁에서 지켜봐 주신 가족들과 염려와 응원으로 함께 해준 친구들에게 감사드리며, 특히 모든 방면으로 후원해 주신 부모님께 무한한 감사와 이 기쁨을 드립니다.

마지막으로 변함없이 곁에서 지켜주고 세심하게 배려해 준 남편과 큰 힘이 되어 주었던 소중한 딸 헤민이에게도 고마움을 전하며 이 논문을 바칩니다.

저자 씬

## 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. HDMEC의 배양 .....	6
2. Lenti-virus 제작 및 HDMEC 내 형질도입 .....	6
가. Lenti-virus 제작 .....	6
나. 세포 내 형질도입 .....	8
3. 역위상차 현미경 검사 .....	9
4. 공초점 레이저 현미경 (confocal laser microscopy) 검사 .....	9
5. Reverse transcription PCR .....	10
6. 면역형광 유세포분석 .....	11
7. Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 염색 .....	12
8. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay .....	12
9. 통계학적 분석 .....	12
III. 결과 .....	14
1. HDMEC에 lenti-virus 형질도입 후 역위상차 현미경을 통한 HDMEC의 형태학적 소견 .....	14
2. Lenti-virus를 형질도입시킨 HDMEC에서 moesin의 소견 15	
가. DIF에서 moesin의 과발현 소견 .....	15
나. RT-PCR 검사에서 moesin의 과발현 소견 .....	16
다. 면역형광 유세포분석검사서 moesin의 과발현 소견 .....	18
3. Moesin을 과발현시킨 HDMEC 노화도 변화 .....	19
가. 역위상차 현미경을 통한 세포의 형태학적 변화 .....	19
나. SA- $\beta$ -gal 염색을 통한 노화도 변화 .....	21

다. 노화관련 단백질인 p16, cyclin D1, cdk4의 발현에 대한 RT-PCR 소견 .....	23
라. p16의 단백질 발현에 대한 면역 형광 유세포 분석 소견 .....	25
4. Moesin이 과발현된 HDMEC에서 MTT 검사 소견 .....	26
IV. 고찰 .....	27
V. 결론 .....	32
참고문헌 .....	33
영문요약 .....	39

## 그림 차례

그림 1. LentiM1.4vector의 구조	7
그림 2. Lenti-virus의 제작 및 세포내 형질도입 과정	8
그림 3. HDMEC에 lenti-virus 형질도입 후 passage 6 HDMEC의 역위상차 현미경 소견	14
그림 4. Lenti-virus를 형질도입시킨 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 DIF 소견	16
그림 5. Lenti-virus를 형질도입한 passage 6의 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 RT-PCR 소견	17
그림 6. Lenti-virus를 형질도입한 passage 27의 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 RT-PCR 소견	18
그림 7. Lenti-virus를 형질도입한 passage 6의 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 면역형광 유세포분석 소견	19
그림 8. Moesin이 과발현된 HDMEC의 역위상차 현미경 소견	20
그림 9. 배양초기(passage 6)의 moesin이 과발현된 HDMEC의 SA- $\beta$ -gal 염색 소견	22
그림 10. 배양말기(passage 27)의 moesin이 과발현된 HDMEC의 SA- $\beta$ -gal 염색 소견	22
그림 11. 배양 초기(passage 6)의 moesin이 과발현된	

HDMEC에서 노화관련 유전자의 발현에 대한 RT-PCR 소견 .....	23
그림 12. 배양 말기 (passage 27)의 moesin이 과발현된 HDMEC에서 노화관련 유전자의 발현에 대한 RT-PCR 소견 .....	24
그림 13. Moesin이 과발현된 HDMEC에서 p16의 단백질 발현에 대한 면역형광 유세포분석 소견 .....	25
그림 14. Moesin이 과발현된 HDMEC에서 MTT 검사 소견 .....	26



## 국문요약

### Moesin의 과발현이 혈관내피세포의 노화에 미치는 영향

혈관내피세포의 노화는 노화와 관련된 혈관 질환의 병태생리학적 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 노화의 정확한 기전이나 관련 유전자에 대해서는 알려진 바가 없다. 종전의 실험에서 혈관내피세포에서 프로테오믹스 (proteomics) 기법을 이용하여 노화 관련 단백질의 후보 물질을 대량 발굴 탐색 (high-throughput screening)을 하여, 생물정보학 (bio-informatics) 을 이용하여 규명한 결과, moesin, Rho GTP dissociation inhibitor, actin이 노화 관련 후보 물질로 규명되었다. 이 단백질들 중에서 moesin은 노화 전후의 발현 양의 변화가 가장 뚜렷하였고, 항노화제에 의하여 회복되는 양상도 가장 뚜렷하여 노화 관련 후보 물질로서 가장 유력하였다.

Moesin은 세포 골격 단백질로 노화에서의 역할은 알려진 바가 없었으며 이에 그 기능적 유용성을 밝히기 위하여 이전에 혈관내피세포 내에서 moesin의 발현을 억제하는 실험을 한 결과, 세포의 노화가 조기에 발생되었으며, 이는 세포주기 단백질 중 p16의 증가를 유발시켜 세포주기의 arrest를 초래한 것으로 관찰되었다.

본 연구에서는 moesin의 기능적 유용성을 확인하기 위하여 lenti-virus를 이용하여 혈관내피세포에서 moesin의 과발현을 유도하였다. Moesin이 과발현된 혈관내피세포에서 형태적으로 노화가 억제되었으며, 노화의 표지자인 SA- $\beta$ -gal 염색에서 세포의 노화의 진행 속도가 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 세포의 증식 속도의 지연과 대사율의 감소도 느리게 나타났으며 노화

의 지표가 되는 p16, cyclin D1, cdk4와 같은 세포주기 단백질들의 RNA나 단백질 발현을 확인한 결과, moesin이 과발현된 혈관내피세포에서 낮게 관찰되어 기능적으로도 세포 내에서의 노화의 진행을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 moesin의 발현이 혈관내피세포의 노화의 진행을 감소에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 향후 항노화의 기전을 규명하여 혈관내피세포의 노화와 관련된 질환을 예방하는 데 기초적인 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

---

핵심되는 말 : 혈관내피세포, 노화, moesin, lenti-virus, 과발현

# Moesin의 과발현이 혈관내피세포의 노화에 미치는 영향

<지도교수 이 광 훈>

연세대학교 대학원 의과학과

## 홍 인 애

### I. 서 론

세포의 노화는 염색체 말단에 존재하면서 염색체의 손상이나 다른 염색체와의 결합을 방지하는 telomere가 체세포의 거듭된 분열로 특정길이 이하로 짧아지면서 DNA가 손상되어 유도된다. 또한 cytokines나 산화적 대사 매개물 등의 내적 인자와 활성산소나 자외선, 중금속 및 대기오염물질 등의 외적인 유해인자에 의한 세포구성성분의 파괴 및 기능장애, 특히 미토콘드리아의 손상으로, 혹은 스트레스 반응 유전자가 발현되어 외부 자극에 둔감하거나 과민하게 되어서 세포가 노화되기도 한다. 그리고 종양의 형성을 방지하기 위하여 세포의 노화가 유도되기도 한다. 이처럼 세포가 노화되는 원인에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔지만 아직도 근본적인 원인은 밝혀진 바가 없고, 노화의 기전에 관여하는 유전자를 찾기 위한 연구는 계속적으로 진행되어지고 있다.<sup>1-13</sup>

그 중에 혈관내피세포는 혈장과 세포 사이의 중개 역할을 하고, 혈액과 조직 간의 경계면을 구성하며, 혈액에서 조직으로 면역 세포의 유주에 관여하는 염증반응에 중요한 역할을 하는 세포로서,<sup>14-15</sup> 심장혈관계의 장애

를 포함하여 노화와 관련된 많은 질환에 영향을 주기 때문에 혈관내피세포의 노화에 관여하는 유전자적, 세포 형태학적 연구는 매우 의미가 있다.

노화된 혈관내피세포에서는 노화되지 않은 세포에 비하여 단백질 생산의 변형이 일어나는데, 노화의 정확한 기전이나 노화와 연관성에 대해서는 아직까지 규명되지 않았으나 노화된 혈관내피세포에서 발현의 변화를 보인 단백질로 insulin-like growth factor binding protein 5, neurofilament subunit L, adenosine A2A receptor, plasminogen activator inhibitor-1, intercellular adhesion molecule-1, p16, p27 등이 보고된 바가 있다.<sup>16-19</sup>

중전의 연구에서, proteomic 기법을 이용하여 인체 진피 미세혈관 내피세포 (human dermal microvascular endothelial cell; HDMEC)의 노화 전후를 비교하고 항노화제에 의하여 회복되는 노화 관련 단백질을 발굴하였다. 그 결과 moesin, FABP, Rho-GDI 등의 단백질이 노화전후에서 발현의 차이를 보였으며, 또한 항노화제에 의하여서도 변화를 보였다. 이것은 이들이 노화에 직간접적으로 영향을 주며, 항노화제에 의하여 노화를 억제할 수 있는 단백질이라고 추정이 되었다.<sup>20</sup>

이 중에 moesin은 세포막 단백질과 세포막 아래쪽에 위치하는 actin을 연결해 주는 세포 골격 단백질로 세포 골격의 리모델링 기능 이외에도 세포의 극성이나 통합성 유지에도 역할을 하며 세포막 단백질의 신호 전달 및 조절 기능이 있다.<sup>20-21</sup> 이외에 T 세포와 항원 전달 세포의 접합<sup>22</sup>, 백혈구의 혈구누출 (diapedesis)<sup>23</sup>, 혈관내피세포의 투과성 변화나 이동<sup>24</sup>, 그리고 갑상선암<sup>25</sup> 및 신세포암<sup>26</sup> 등에서 증가되거나 예후인자로 작용한다는 보고들도 있다.

또한 moesin은 ERM (ezrin/ radixin/ moesin)단백 중에 하나로, ERM 단백질 중 ezrin은 fas를 통하여 세포고사를 일으키며, F9 teratocarcinoma cell에서 moesin 표현을 저하시켰을 때 일어나는 세포고사를 Galpha 13 활성이 저해한다는 보고가 있어 ERM 단백질과 세포고사 및 노화와 연관성을

제시하였다.<sup>29,30</sup>

이러한 moesin의 기능적 연구를 위하여 혈관내피세포에서 lenti-virus를 이용하여 moesin의 발현을 억제하고, 형태학적 변화 및 SA- $\beta$ -gal 염색 시행 결과, moesin의 발현을 억제시킨 경우 조기에 뚜렷이 노화된 세포가 관찰되었는데 바이러스를 처리하지 않은 대조군 세포에 비해서 확연한 차이를 나타내었다. MTT assay를 통하여 대사율의 감소를 확인하였으며, doubling time 및 life span 곡선을 관찰한 결과 또한, 대조군과 비교하였을 때 조기에 doubling time이 늘어나고 조기에 성장 지연기를 보였다. 그리고 RNA과 단백질 상에서도 노화된 세포에서 발현되는 p16의 발현이 의미있게 나타나는 등, 일반적인 혈관내피세포에 비하여 moesin 유전자의 발현 억제가 노화를 촉진시키는 결과가 관찰되어 moesin이 노화를 유도하는 단백임을 시사하였다.<sup>31</sup>

중전의 연구들을 바탕으로 moesin이 혈관내피세포의 노화에 관여할 것으로 예측되었으며, 현재까지 moesin을 과발현하여 노화의 역할을 관찰한 실험이 없었기에 moesin의 과발현이 노화에 어떠한 기능을 할지 검증하는 실험이 필요하였다. 이에 본 연구에서는 첫째, lenti-virus를 이용하여 HDMEC에서 moesin을 과발현시킨 후 계대 배양한 다음 HDMEC의 세포 노화 및 세포의 대사에 미치는 영향을 알아보았고, 둘째, 여러 가지 세포 주기 관련 단백질의 발현을 관찰함으로써 피부노화에서 moesin의 기능적 역할을 검증하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. HDMEC의 배양

혈관내피세포로 HDMEC (Cambrex, Walkersville, MA, USA)을 구입하여 사용하였다. HDMEC을 준비하여 0.1 %젤라틴을 처리한 조직 배양 용기에서 human epidermal growth factor, hydrocortisone acetate, vascular endothelial growth factor (VEGF), human fibroblast growth factor-B, gentamicin, amphotericin B, 5% fetal bovine serum, R<sup>3</sup>-insulin growth factor-1, ascorbic acid가 함유된 microvascular endothelial cell medium-2 (Cambrex, Walkersville, MA, USA)를 사용하여 37°C, CO<sub>2</sub> 항온기에서 passage 5부터 passage 30까지 계대배양하였다.

### 2. Lenti-virus 제작 및 HDMEC 내 형질도입

#### 가. Lenti-virus 제작

Moesin의 발현을 위한 Lentiviral vector는 LentiM1.4 vector (Macrogen Inc., Seoul, Korea)으로 EcoR I-Cla I site 사이에 moesin cDNA의 절편이 삽입되었다. Moesin cDNA의 primer sequence는 다음과 같다.

Forward : 5'-CGGAATTCGCCACCATGCCCAAACG-3'

Reverse : 5'-ATATCGATTTACATAGACTC-3'

LentiM1.4 lentiviral vectors는 mCMV promoter로 촉진된 moesin 유전자를 생산하도록 디자인되고, IRES 하에 puromycin에 내성을 갖는

유전자가 발현된다.

Lenti-virus를 만들기 위하여 lipofectamine plus (Invirogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 transfer vector와 VSV-G expression vector, gag-pol expression vector를 1:1:1의 비율로 배양된 293T 세포에 감염시켰다. 감염 48시간 후 293T 세포의 상층액을 0.45  $\mu$ m membrane filter (Nalgene, Rochester, NY, USA)에 여과시키고, 즉시 -70도 deep-freezer에 냉동 보관 하였다. Titer는  $10^{6-7}$  transduction unit (TU)이었다.

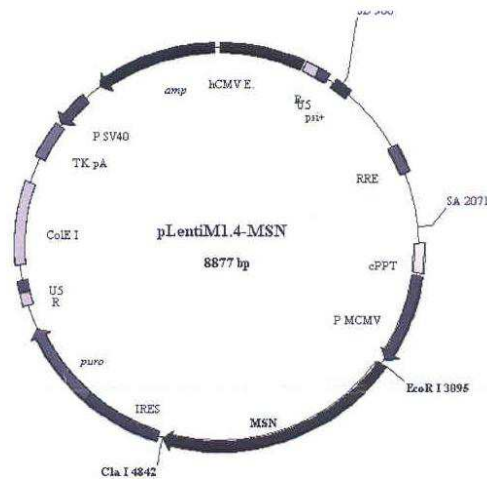


그림 1. LentiM1.4 vector의 구조. Moesin의 발현을 위한 lentiviral vector로 LentiM1.4 vector를 사용하였으며, EcoR I-Cla I site 사이에 moesin cDNA의 절편을 삽입하여 만들었다. LentiM1.4 lentiviral vectors는 mCMV promoter로 촉진된 moesin 유전자를 생산하도록 디자인하여, IRES 하에 puromycin 저항유전자가 발현된다.

## 나. 세포 내 형질도입

하루 전에 6-well 배양판에 배양된 HDMEC이 60-80% 정도 될 때 배양액과 mock 유전자가 삽입된 lenti-virus와 moesin 유전자가 삽입된 lenti-virus를 각각의 세포에 1 ml씩 넣고 6-8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 polybrene (Hexadimethrine bromide, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 넣어준 후, 20시간이 경과 배지를 교환하였다. 형질도입이 된 세포를 계대배양을 한 후 바이러스에 감염된 세포만 분리하기 위하여 puromycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 선택 분리하는 과정을 거쳤다.

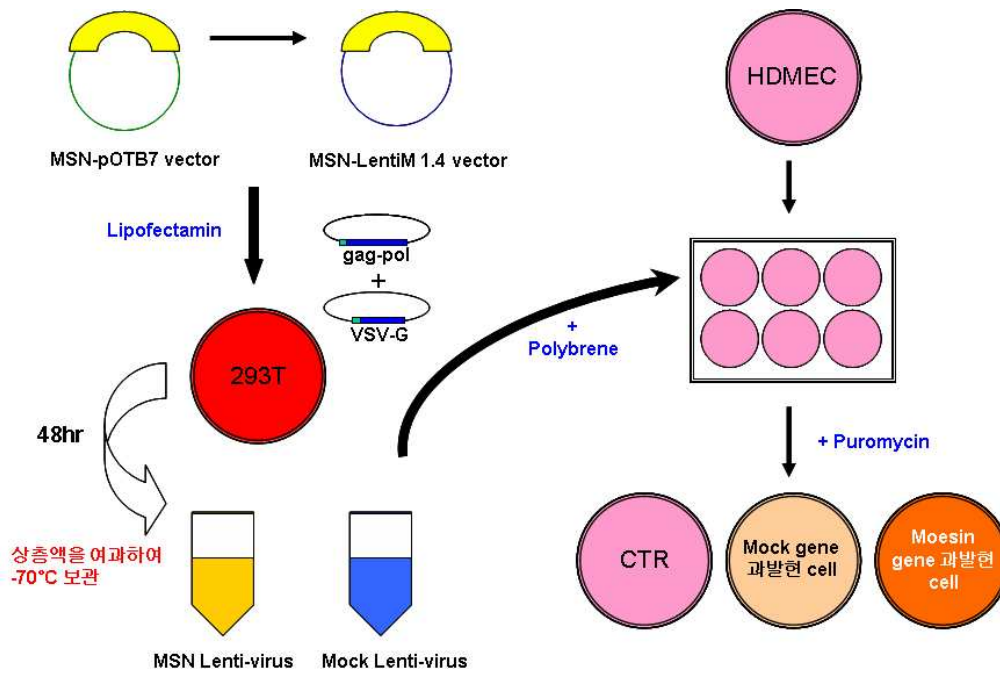


그림 2. Lenti-virus의 제작 및 세포내 형질도입 과정. lenti-virus를 lipofectamine plus를 사용하여 transfer vector와 VSV-G expression vector, gag-pol expression vector를 1:1:1의 비율로 배양된 293T 세



포에 감염시켰다. 그리고 감염 후 48시간이 경과되면 293T 세포의 상층 액을 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter에 여과시키고, 즉시  $-70^{\circ}\text{C}$  deep-freezer에 냉동보관 하였다. 형질도입하기 하루 전에 HDMEC을 6-well 배양판에 배양하고, 세포가 배양판의 60-80% 정도 될 때에 DMEM과 mock 유전자가 삽입된 lenti-virus와 moesin 유전자가 삽입된 lenti-virus를 각각의 세포에 1 ml씩 넣고 6-8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 polybrene을 같이 넣어주었다. 20시간이 경과 후 배지를 교환하고 계대배양을 한 다음, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 puromycin을 사용하여 과발현된 세포를 선택 분리하였다.

### 3. 역위상차 현미경 검사

각 바이러스가 처리된 HDMEC의 노화를 확인하고 형태학적인 변화를 관찰하여 비교하기 위하여 각 HDMEC을 역위상차 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

### 4. 공초점 레이저 현미경 (confocal laser microscopy) 검사

Moesin의 세포질 내 분포를 확인하기 위하여 직접면역형광 염색 (direct immunofluorescent stain: DIF stain)을 시행한 후 공초점 레이저 현미경으로 관찰하였다. Lab-Tek chamber에 moesin의 과발현을 유도한 HDMEC과 대조군 HDMEC 그리고 mock 유전자를 포함한 바이러스를 처리한 대조군 HDMEC을  $2 \times 10^4$ 씩 배양한 다음 methanol로 10 분간 고정시킨 후 moesin 항체를 1:200으로 희석하여 첨가한 후 30 분간 실온에 방치하였다. PBS로 3회 세척 후 FITC가 부착된 이차 항체를 첨가한 후 다시 실온에서 30

분간 반응시킨 다음 세척하였다. Mounting한 다음 각 단백질의 발현을 공초점 레이저 현미경 (Leica TCSNT, Heidelberg, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

## 5. Reverse transcription PCR

Moesin의 과발현을 유도한 HDMEC과 대조군 HDMEC 그리고 mock gene을 포함한 바이러스를 처치한 대조군 HDMEC을 각각 60 mm 배양판에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거한 후 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA의 농도는 260 nm의 파장에서 UV-1601 PC 분광 광도계를 이용하여 측정하였다. 분리한 총 RNA 1  $\mu$ g으로부터 cDNA를 oligo dT를 이용하여 AccuPower PT PreMix (Bioneer, Seoul, Korea)을 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다.

Moesin, p16, actin 각각 20 pmole primer pair 1  $\mu$ l씩과 cDNA 1  $\mu$ l를 혼합한 다음 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 총 20  $\mu$ l로 중합연쇄반응을 시행하였다. PCR 산물 5  $\mu$ l를 2% agarose gel에서 전기영동한 후 밴드의 유무를 관찰하였다.

Moesin의 sense primer로 5'- CCA CCA TGC CCA AAA CGA TC-3', anti-sense primer로 5'- GGT GCC CAT TAC ATA GAC TC-3'를 사용하였고, p16의 경우 sense primer는 5' -AGC ATG GAG CCT TCG GCT GAC-3', anti-sense primer는 5'-CTG TAG GAC CTT CGG TGA CTG AT-3'를 이용하였다. 또한 cyclin D1의 sense primer로 5'-CTA GCC ATG AAC TAC CTG GA-3', anti-sense primer로 5'-GTC ACA CTT GAT CAC TCT GG-3'를 사용하였고, cdk4의 경우

sense primer로 5'-CCA AAG TCA GCC AGC TTG ACT GTT-3', anti-sense primer로 5'-CAT GTA GAC CAG GAC CTA AGG ACA-3'를 이용하였다.

## 6. 면역형광 유세포분석

Moesin의 과발현을 유도한 HDMEC와 대조군 HDMEC 그리고 mock 유전자를 포함한 바이러스를 처치한 대조군 HDMEC을 5 mM EDTA와 1% BSA가 함유된 HBSS를 넣고 조직 배양판으로부터 세포를 수집하여 HBSS로 3회 세척 후 항체염색을 위해 각 시험관으로 분주하였다. BSA-PBS로 적절히 희석한 후 일차 항체로 항 moesin 단클론 항체를, 이차 항체로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG를 사용하여 염색 후 면역형광 유세포분석을 시행하였다. 세포질 염색은 조직 배양판으로부터 세포를 수집한 후 PERM solution (Sigma, St. louis, MO, USA)을 500  $\mu$ l씩 첨가하여 상온의 암실에서 10분간 처리하였다. 각 세포군을 시험관에 분주하고 0.5%의 BSA가 함유된 PBS로 적절히 희석한 일차항체를 각 시험관에 10  $\mu$ l씩 넣은 후 얼음 속에서 30분간 반응시키고, BSA-PBS로 3회 세척 후, BSA-PBS를 이용하여 1:20으로 희석한 이차항체를 넣고 30분간 반응시켰다. BSA-PBS로 다시 3회 세척한 후 fluorescence activating cell sorter (FACStar, Becton-Dickinson, Lincoln, NJ, USA)를 이용하여 moesin 분자의 발현 양상을 측정하였다.

## 7. Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 염색

바이러스 처리 전 후의 세포의 노화도를 비교하기 위하여 Dimri<sup>56</sup> 등이 사용한 SA- $\beta$ -gal assay를 변형하여 사용하였다. 세포를 pH7.0의 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 후 3% formaldehyde로 고정하여 실온에서 3분간 방치한 후 다시 PBS로 세척하여 5 mM의 potassium ferrocyanide와 potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ l X-gal이 포함된  $\beta$ -gal 용액을 첨가하여 37 °C 배양기에서 12시간 방치 후 현미경으로 관찰하였다.

## 8. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay

96 well 배양판에 각 well당  $1 \times 10^5$  개씩 moesin의 과발현을 유도한 HDMEC과 대조군 그리고 mock 유전자를 포함한 바이러스를 처리한 대조군을 각각 넣고 새로운 배양배지에서 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에 배양한 다음 배지를 제거한 후 각 well에 0.5 mg/ml의 MTT 용액을 200  $\mu$ l씩 첨가하여 3시간을 배양하였다. 다시 배양한 세포의 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide 용액을 각 well당 200  $\mu$ l씩 첨가한 다음 ELISA reader로 570 nm에서 optical density를 측정하였다.

## 9. 통계학적 분석

MTT assay의 결과에서 moesin의 과발현을 유도한 HDMEC과 대조군과 mock 유전자를 포함한 바이러스를 처리한 대조군의

passage 6의 배양초기와 passage 27의 배양후기의 차이를 비교하기 위하여 SPSS (statistical package for the social science) version 11.0 프로그램을 이용하였고 ANOVA를 사용하여 통계학적 유의성을 알아보았으며 유의수준은 0.05미만으로 설정하였다.

### III. 결 과

#### 1. HDMEC에 lenti-virus 형질도입 후 역위상차 현미경을 통한 HDMEC의 형태학적 소견

Passage 6의 계대배양 초기에 HDMEC에 moesin 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus를 형질도입하여 1  $\mu$ l/ml 농도의 puromycin으로 24시간 처리한 후 moesin 과발현 유전자가 형질도입된 세포만을 분리하여 일주일간 배양하여 역위상차 현미경으로 관찰한 결과, moesin이 과발현을 유도한 세포에서는 mock 유전자만 형질도입한 세포에 비해 세포수가 많이 관찰되었으나, lenti-virus를 처리하지 않은 대조군 세포에 비해 mock-lentivirus 또는 moesin-lentivirus를 처리한 세포군에서는 형태학적 변화가 유사하게 관찰되었다.(그림 3)

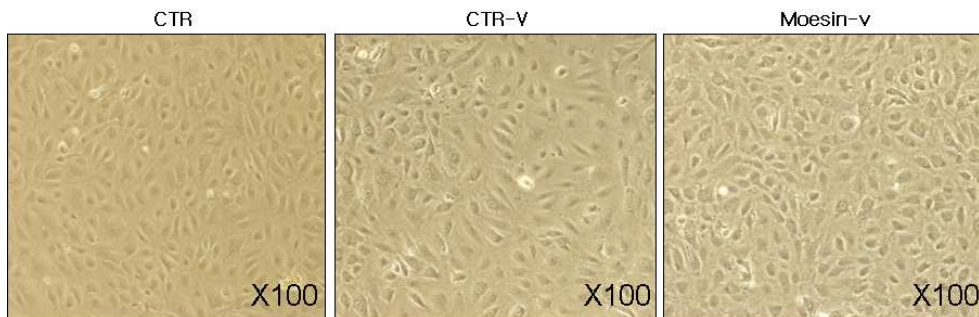


그림 3. HDMEC에 lenti-virus 형질도입 후 passage 6 HDMEC의 역위상차 현미경 소견. Passage 6의 계대배양 초기에 HDMEC에 moesin 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus를 형질도입하여 1  $\mu$ l/ml 농도의 puromycin

로 24시간 처리한 후 moesin 과발현 유전자가 형질도입된 세포만을 분리하여 일주일간 배양하여 역위상차 현미경으로 관찰한 결과, moesin이 과발현을 유도한 세포 (Moesin-v)에서는 mock gene만 형질도입한 세포 (CTR-V)에 비해 세포수가 많이 관찰되었으나, lenti-virus를 처리하지 않은 대조군 세포 (CTR)에 비해 mock- lenti-virus를 처리한 세포군 (CTR-V) 또는 moesin- lenti-virus를 처리한 세포군 (Moesin-v)에서는 형태학적 변화가 유사하게 관찰되었다.

## **2. Lenti-virus를 형질도입시킨 HDMEC에서 moesin의 소견**

### **가. DIF에서 moesin의 과발현 소견**

HDMEC에 lenti-virus의 형질도입이 성공적으로 되었는지 DIF를 이용하여 확인하였다. 그 결과, lenti-virus에 감염되지 않은 HDMEC(그림 4A)과 mock 유전자의 과발현을 유도하는 lenti- virus가 형질도입된 HDMEC(그림 4C)에서 moesin이 동일한 정도로 발광되었고, moesin 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC(그림 4D)에서는 moesin을 나타내는 형광을 나타내는 세포가 증가되어 관찰하였다. 그러나 음성대조군인 passage 27의 노화된 세포(그림 4B)에서는 moesin을 나타내는 형광이 거의 관찰되지 않는다.

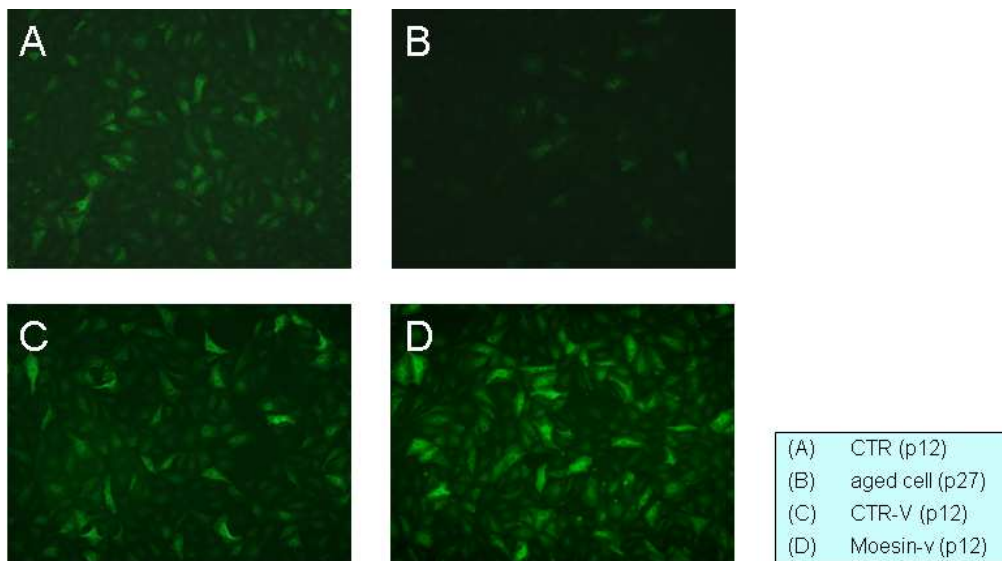


그림 4. Lenti-virus를 형질도입시킨 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 DIF 소견. Lenti-virus에 감염되지 않은 HDMEC (A)과 mock 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC (C)에서 moesin이 거의 동일하게 발광되었고, moesin 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC (D)에서는 moesin이 발현된 세포가 증가되어 관찰되었다. 음성대조군인 p27의 노화된 세포 (B)에서는 moesin이 발현된 세포가 거의 관찰되지 않았다.

#### 나. RT-PCR 검사에서 moesin의 과발현 소견

HDMEC에 lenti-virus의 형질도입 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR로 moesin mRNA를 관찰하였다. Lenti-virus에 감염되지 않은 HDMEC과 mock 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC에서 moesin mRNA가 거의 동일하게 발현되었고, moesin 유전



자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC에서는 moesin의 양이 유의하게 증가되었다.(그림 5) 또한 passage 27의 배양말기에서 다시 moesin mRNA의 발현을 관찰한 결과 moesin의 과발현이 배양말기까지 계속 유지되는 것이 확인되었다.(그림 6)

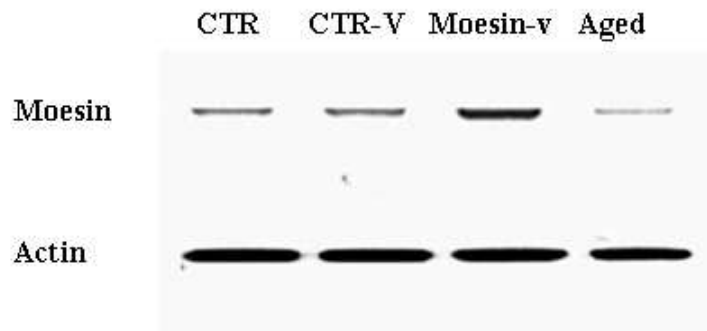


그림 5. Lenti-virus를 형질도입한 passage 6의 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 RT-PCR 소견. Passage 6의 계대배양초기의 lenti-virus에 감염되지 않은 HDMEC (CTR)과 mock 유전자를 넣은 lenti-virus를 형질도입한 HDMEC (CTR-V)의 moesin의 발현도가 비슷하여 lenti-virus에 의한 세포의 손상도는 관찰되지 않았으며, moesin 유전자를 넣은 lenti-virus를 형질도입한 HDMEC (Moesin-v)는 발현도가 높게 보이므로 moesin의 과발현이 유도되었음을 알 수 있었다. Passage 27의 노화된 HDMEC (Aged)에서는 moesin의 발현이 감소되었다.

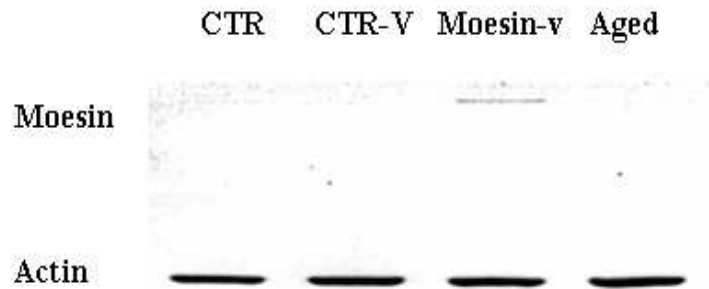


그림 6. Lenti-virus를 형질도입한 passage27의 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 RT-PCR 소견. Passage 27의 각 세포군을 RT-PCR한 결과, moesin 유전자를 넣은 lenti-virus를 형질도입한 HDMEC (Moesin-v)에서는 moesin의 발현이 높게 관찰되어 배양 말기까지 세포 내에 moesin의 과발현이 유지됨이 관찰되었다.

#### 다. 면역형광 유세포분석검사에서 moesin의 과발현 소견

HDMEC에 lenti-virus의 형질도입이 성공적으로 되었는지 moesin 단백질 발현을 확인하기 위해 면역형광 유세포분석검사를 이용하였다. Lenti-virus에 감염되지 않은 HDMEC과 mock 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC에서 moesin의 발현이 거의 동일하였고, moesin 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC에서는 moesin의 발현이 현저히 증가되었다.(그림 7)

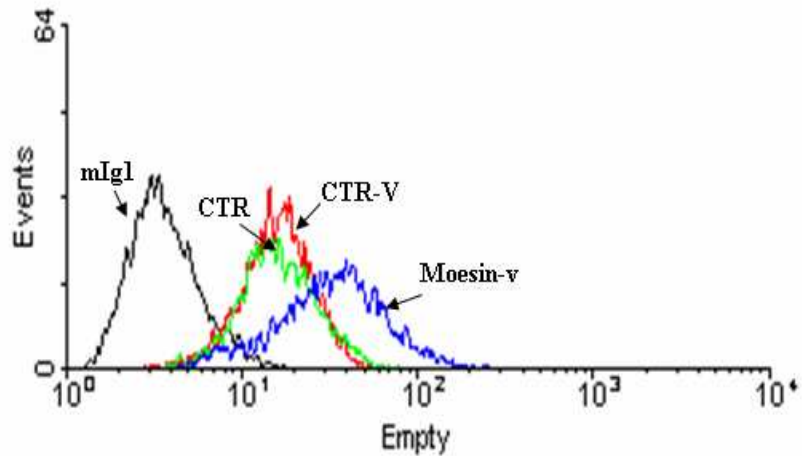


그림 7. Lenti-virus를 형질도입한 passage 6의 HDMEC에서 moesin 발현에 대한 면역형광 유세포분석 소견. HDMEC에 lenti-virus의 형질도입이 성공적으로 되었는지 moesin 단백 발현을 확인하기 위해 면역형광 유세포분석법을 이용하였다. Lenti-virus에 감염되지 않은 HDMEC (CTR)과 mock 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC (CTR-V)에서 moesin의 발현이 거의 동일하였고, moesin 유전자의 과발현을 유도하는 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC (Moesin-v)에서는 moesin의 발현이 현저히 증가되었다.

### 3. Moesin을 과발현시킨 HDMEC 노화도 변화

#### 가. 역위상차 현미경을 통한 세포의 형태학적 변화

노화의 진행도를 비교하고자 대조군인 아무것도 처치하지 않은 HDMEC 과 mock 유전자의 cDNA를 넣은 lenti-virus를 형질도입한 바이러스 감염에 대한 대조군인 HDMEC, moesin이 과발현된 HDMEC에서 역위상차 현미경을 이용하여 형태적인 변화를 비교 관찰하였다. 배양 초기에는 대조군 HDMEC과 비교하여 lenti-virus에 감염된 HDMEC이 세포의 모양에 약간의 변형이 생겼으나 각 군 간의 차이는 거의 관찰되지 않았다. 계대배양을 진행하는 동안 대조군인 일반 HDMEC에 비하여 바이러스 대조군인 HDMEC은 증식속도도 느려지고, 세포의 크기도 커지며, 세포가 납작하게 퍼지는 것이 관찰된 반면, moesin이 과발현된 HDMEC은 대조군과 비교하여 배양 초기에 비해 많은 변화를 보이지 않고 형태가 유지되었다.(그림 8)

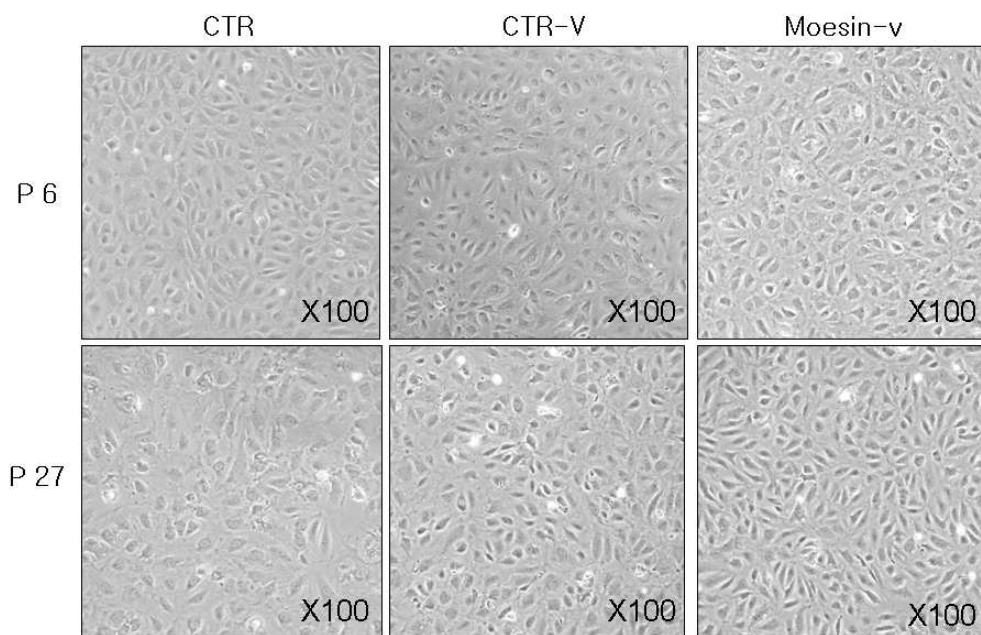


그림 8. Moesin이 과발현된 HDMEC의 역위상차 현미경 소견. 배양 초기에는 처치하지 않은 HDMEC (CTR)과 비교하여 lenti-virus에 감염된

HDMEC (CTR-V)이 세포의 모양에 약간의 변형이 생겼으나 각 군 간에 차이가 거의 관찰되지 않았다. 계대배양을 진행하여 passage 27이 되자 대조군 HDMEC (CTR)에 비하여 바이러스 대조군인 HDMEC (CTR-V)은 증식속도도 느려지고, 세포의 크기도 커지며, 세포가 납작하게 퍼지는 것이 관찰된 반면, moesin이 과발현된 HDMEC (Moesin-v)은 대조군과 비교하여 배양 초기에 비해 많은 변화를 보이지 않고 형태가 유지되는 것이 관찰되었다.

#### **나. SA- $\beta$ -gal 염색을 통한 노화도 변화**

Passage 6 HDMEC에서는 노화된 HDMEC과 비교하여, HDMEC과 동일 passage인 바이러스 대조군 HDMEC과 moesin이 과발현된 HDMEC이 모두 염색되지 않았다.(그림 9) 배양 말기 (passage 27)에는 대조군에서 푸르게 염색된 세포가 많이 관찰되었고, 동일 passage인 moesin이 과발현된 HDMEC에서는 대조군에 비하여 푸르게 염색된 SA- $\beta$ -gal 양성 세포의 수가 적음을 관찰할 수 있었다.(그림 10)

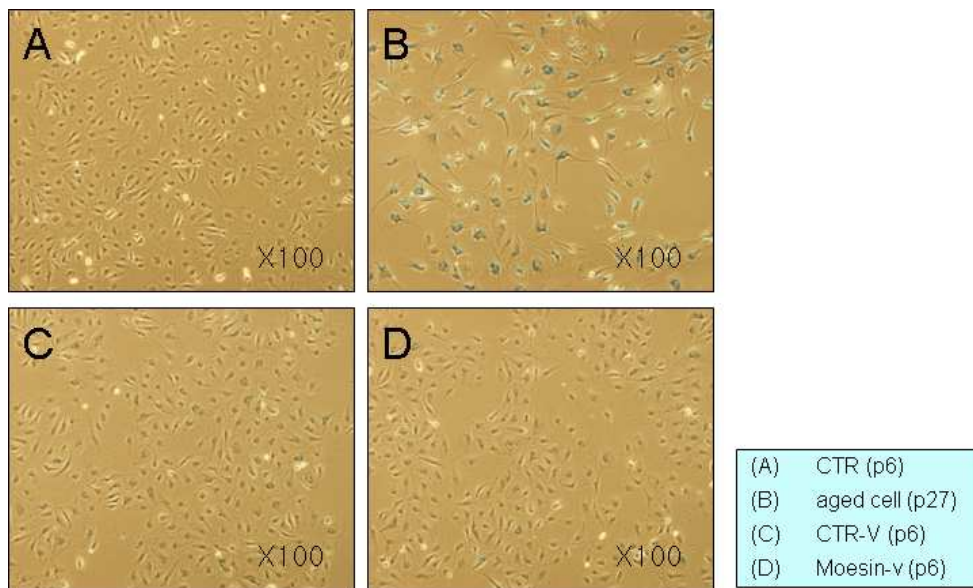


그림 9. 배양초기 (passage 6)의 moesin이 과발현된 HDMEC의 SA- $\beta$ -gal 염색 소견. Passage 27의 노화된 HDMEC (B)과 비교하여, passage 6의 대조군 HDMEC (A)과 동일 passage인 바이러스 대조군 HDMEC (C)과 moesin이 과발현된 HDMEC (D)이 모두 염색되지 않았다.

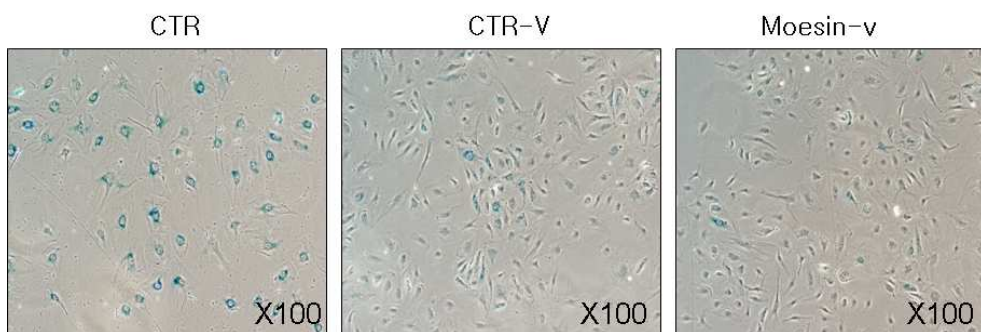


그림 10. 배양말기 (passage 27)의 moesin이 과발현된 HDMEC의 SA- $\beta$

-gal 염색 소견. Passage 27인 대조군 (CTR, CTR-V)에서 염색된 세포가 많이 관찰되었고, 동일 passage인 moesin이 과발현된 HDMEC (Moesin-v)은 대조군에 비하여 염색된 세포의 수가 적음을 관찰할 수 있었다.

#### 다. 노화관련 단백질 p16, cyclin D1, cdk4의 발현에 대한 RT-PCR 소견

RT-PCR을 이용하여 p16과 cyclin D1, cdk4의 mRNA의 발현 정도를 관찰하였다. 배양초기 (passage 6) HDMEC의 mRNA에서는 대조군 HDMEC과 바이러스 대조군 HDMEC, moesin이 과발현된 HDMEC에서 p16과 cyclin D1, cdk4가 낮게 발현되었다.(그림 11) 그러나 배양 말기 (passage 27) HDMEC에서는 대조군 HDMEC의 p16과 cyclin D1, cdk4의 발현이 증가하였다. 반면, moesin이 과발현된 HDMEC의 mRNA에서는 대조군과 동일한 passage임에도 불구하고, p16과 cyclin D1, cdk4의 발현이 낮게 관찰되었다.(그림 12)

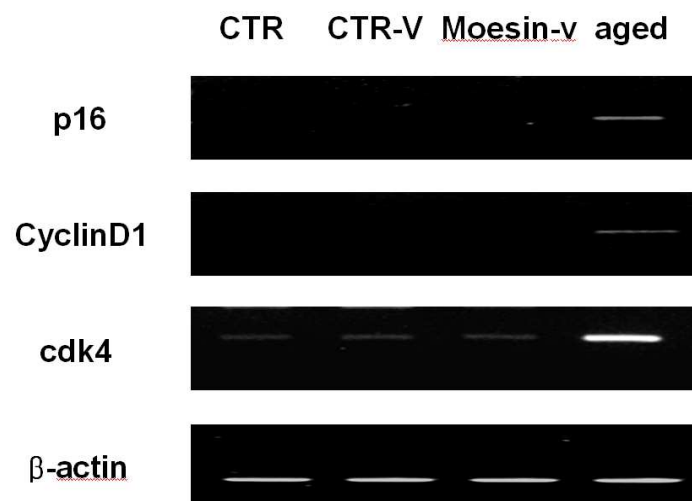


그림 11. 배양 초기 (passage 6)의 moesin이 과발현된 HDMEC에서 노화 관련 유전자의 발현에 대한 RT-PCR 소견. Passage 6 HDMEC의 mRNA에서는 대조군 HDMEC (CTR)과 바이러스 대조군 HDMEC (CTR-V), moesin이 과발현된 HDMEC (Moesin-v)에서 모두 노화된 HDMEC (aged)에 비해 p16과 cyclin D1, cdk4의 발현이 낮게 관찰되었다.

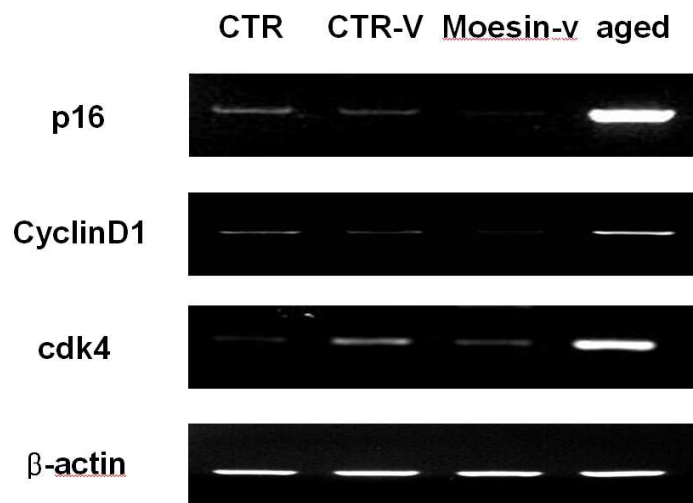


그림 12. 배양 말기 (passage 27)의 moesin이 과발현된 HDMEC에서 노화 관련 유전자의 발현에 대한 RT-PCR 소견. Passage 27 HDMEC의 mRNA에서는 대조군 HDMEC (CTR)의 p16과 cyclin D1, cdk4의 발현이 증가하였다. 반면, moesin이 과발현된 HDMEC (Moesin-v)의 mRNA에서는 대조군과 동일한 passage임에도 불구하고, p16과 cyclin D1, cdk4의 발현이 낮게 관찰되었다.



## 라. p16의 단백질 발현에 대한 면역 형광 유세포 분석 소견

FACS를 이용하여 moesin이 과발현된 passage 27의 HDMEC에서 p16의 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 배양 말기인 passage 27의 처치하지 않은 HDMEC과 바이러스 대조군 HDMEC은 p16의 단백질 발현이 증가되었으나 moesin이 과발현된 HDMEC에서는 p16의 단백질 발현이 낮게 관찰되었다.(그림 13)

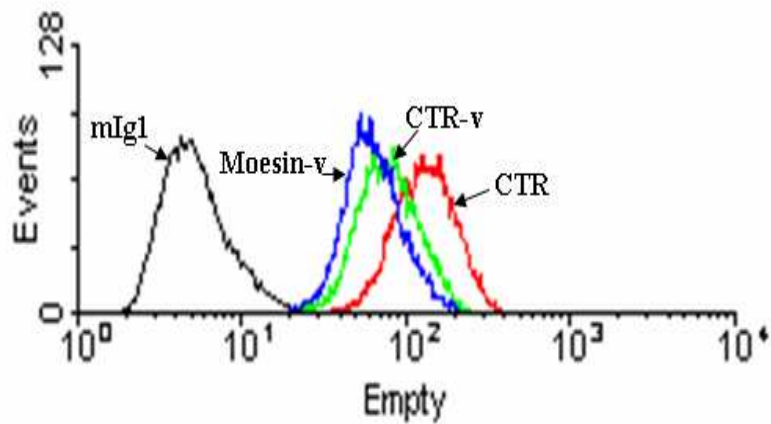


그림 13. Moesin이 과발현된 HDMEC에서 p16의 단백질 발현에 대한 면역 형광 유세포분석 소견. 동일한 passage인 대조군 HDMEC에서 p16의 단백질 발현은 증가하였다. 그러나 moesin이 과발현된 HDMEC에서는 p16의 단백질이 낮게 발현되었다.

#### 4. Moesin이 과발현된 HDMEC에서 MTT 검사 소견

96 well plate에 passage 27까지 계대 배양한 세포를 각 well 당  $1 \times 10^5$ 개씩 넣고 배양한 후 MTT assay를 시행하여 세포의 대사 활동을 측정 한 결과, moesin이 과발현된 HDMEC은 대조군 HDMEC과 바이러스 대조군 HDMEC에 비하여 대사활동 감소의 정도가 적게 관찰되었다.(그림 14)

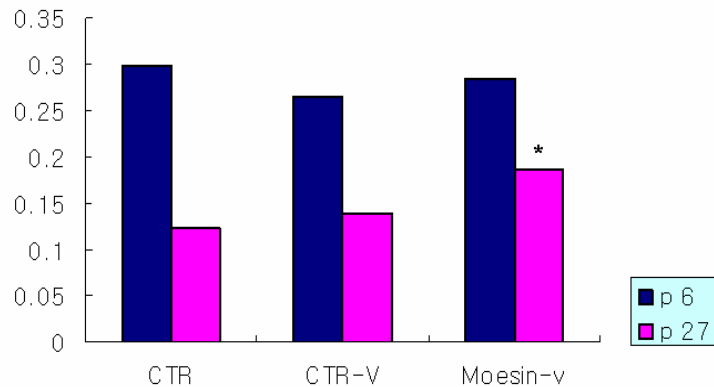


그림 14. Moesin이 과발현된 HDMEC에서 MTT 검사 소견. 96 well 배양판에 passage 6인 계대 배양 초기 세포와 passage 27인 계대 배양 말기 세포를 각 well 당  $1 \times 10^5$ 개씩 넣고 배양하여 MTT assay를 시행하여 세포의 대사 활동을 측정 한 결과, moesin이 과발현된 HDMEC (Moesin-v)은 대조군 HDMEC (CTR)과 바이러스 대조군 HDMEC (CTR-V)에 비하여 대사활동 감소의 정도가 적게 관찰되었다. (Passage 6에 비하여 passage 27 말기 배양세포에서 MTT 수치가 통계적으로 유의한 차이를 보인 경우 \*  $P < 0.05$ 로 표시하였다.)

#### IV. 고찰

혈액 요소 및 주변 세포의 자극에 의해 세포의 성장, 노화, 고사가 유도되거나 억제되고 대부분의 노화 관련 질환의 병태생리학적 현상이 미세혈관 수준에서 발생되므로 미세혈관내피세포의 노화 연구는 중요하다. 따라서 혈관내피세포의 노화에 관여하는 유전자와 단백질의 발굴은 혈관의 노화 연구에 있어서 중요한 기초가 된다.

종전의 연구에서 혈관내피세포의 노화에 관여하는 유전자의 발굴을 위하여 다양한 항노화제를 혈관내피세포에 처리한 다음 프로테오믹법을 이용하여 차이를 보이는 단백을 발굴하였으며, 이 중에서 다양한 항노화제를 처리한 세포에서 공통되게 차이를 보이는 단백질은 moesin과 Rho GTP dissociation inhibitor 이었다.<sup>20</sup>

그 중에 moesin은 ERM 단백질의 하나로 세포막과 액틴 세포골격 사이에 위치하며 ERM 단백질이 공통적으로 갖는 ~300 개의 아미노산으로 구성된 FERM (four point one ezrin, radixin, moesin) domain을 갖는데, 이러한 FERM domain과 F-actin은 척추동물 간 75%의 상동성을 가지고 있어 세포의 기본적인 기능을 하는 것으로 예상된다.<sup>32,33</sup> 또한 표피의 apical domain이 morphogenesis에 관여하고, 세포막 단백질들을 조절하는 생리적 기능도 하며<sup>20,27,28</sup>, Rho kinase를 통하여 Rho 단백질이 활성화되어 간접적으로 대식세포나 수지상세포에서 phagosome이 조절되는 것으로 보고되었고<sup>34</sup>, 백혈구에서 혈구누출 (diapedesis)에 필수적이며 이동시 필요한 Rho GTPase를 조절하는 데 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>23,35</sup>. 또한 fas를 통한 세포고사를 유발하며<sup>29</sup>, 암세포에서 moesin을 감소시켜 세포고사를 유도한 연구 결과도 있어서<sup>30</sup>, 아직 moesin과 세포의 노화와 연관된 보고는 없지만, moesin이 세포 노화의 기전에 관여할 가능성을 시사한다.

따라서 본 연구는 moesin이 혈관내피세포의 노화에 어떠한 영향을 주는 지 알아보고자 하는 것을 목적으로 하며, 세포 내의 moesin의 발현 억제가 세포의 노화가 조기에 유도된 것을 확인한 종전의 연구<sup>32</sup>와 비교, 관찰하여, 세포 내의 moesin의 과발현이 노화를 억제할 수 있는지를 확인하였다.

Moesin의 과발현을 위하여 lenti-virus를 이용하였는데, 여기에 사용된 LentiM1.4 lentiviral vectors는 mCMV promoter로 촉진된 moesin 유전자를 생산하도록 디자인되고, IRES 하에 puromycin 저항 유전자가 발현된다. 따라서 세포 내에 lenti-virus를 형질도입한 다음 바이러스에 감염되어 moesin의 과발현을 유도하는 세포만 골라내는 선택 분리과정에서 puromycin을 처리하였을 때, 감염되지 않은 세포는 모두 사멸하게 된다. 그러나 바이러스를 감염시키고, 선택 분리하는 과정이 세포에 많은 손상을 주었고, 여러 차례 바이러스의 농도와 노출시간, puromycin의 농도 등의 조절을 하였음에도 불구하고 세포가 몇 passage를 넘기지 못하고 사멸하였다. 이는 혈관내피세포가 다른 세포에 비하여 puromycin의 독성에 민감하여 세포가 견디지 못하고 사멸한 것이었고, 세포에 대한 puromycin의 노출시간을 기존 조건의 1/3로 줄여주어, 바이러스에 감염된 세포는 살고, 바이러스를 감염시키지 않은 세포가 모두 사멸하는 것을 확인함으로써 이 실험을 진행할 수 있었다. 이렇게 혈관내피세포에 lenti-virus를 형질 도입한 후, 역위상차 현미경을 이용하여 형태적으로 관찰하였을 때, lenti-virus에 의한 세포의 손상도는 있었으나 세포의 사멸의 정도는 줄일 수 있었으며, moesin 유전자가 도입된 lenti-virus가 감염된 세포의 증식 속도가 바이러스 대조군 세포에 비하여 빠른 것이 관찰되었다. DIF와 RT-PCR, FACS를 통하여 세포 내에서 moesin의 과발현이 성공적으로 유도된 것이 확인하였다. 바이러스 대조군에 비하여 moesin 유전자가 도입된 lenti-virus가 감염된 세포의 증식 속도가 빠르게 관찰된 것은 세포 내의 moesin의 과발현의 영

향이라고 생각된다.

Moesin의 과발현이 노화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 형태적 관찰 및 SA- $\beta$ -gal 염색을 시행하였다. SA- $\beta$ -gal은 노화의 조직화학적 표지자로 사용되고 있으며 인체의 섬유아세포, 각질형성세포뿐만 아니라, 혈관내피세포나 평활근 세포에서 시험관 내 또는 생체 내 노화에 대한 표지자로서 그 유용성이 보고 된 바가 있다.<sup>36,37</sup> 본 실험의 결과에서는 노화된 HDMEC과 비교하여, 배양 초기의 HDMEC과 동일 passage인 바이러스 대조군 HDMEC과 moesin이 과발현된 HDMEC이 모두 형태적인 변화가 두드러지지 않았고, SA- $\beta$ -gal 염색도 되지 않았다. 이는 lenti-virus의 형질도입이 HDMEC의 노화에 영향을 주지 않았음을 시사한다. 그리고 배양 말기에는 HDMEC과 동일 passage인 바이러스 대조군 HDMEC에서 염색된 세포가 많이 관찰되었고, 동일 passage에서 moesin이 과발현된 HDMEC은 대조군에 비하여 염색된 세포의 수가 적음을 관찰할 수 있었다. 따라서 moesin이 과발현된 혈관내피세포에서는 일반적인 혈관내피세포와 비교할 때 노화의 진행 속도가 감소하였음을 알 수 있다. 이는 앞선 실험<sup>31</sup>에서 moesin의 발현을 억제하였을 때 세포의 모양이 커지고, 초기에 노화된 세포가 관찰되는 것과는 동일한 의미의 결과로서 moesin이 노화의 진행 속도의 감소에 관여하는 것을 확인할 수 있었다.

세포의 노화와 세포 주기는 밀접한 관련이 있는데 혈관내피세포에서 노화가 일어나면 세포 주기 중 G1기에서 중단되어 G1 cyclin인 cyclin D1이나 cyclin E1, 그리고 pRB, p16, p21, p27 등의 변화가 나타난다.<sup>38</sup> 이 중 p16은 Rb를 hypophosphorylated form으로 유지시킴으로써 CDK4/6를 억제하는데 hypophosphorylated Rb는 E2F 활성을 억제하고 세포 주기의 중단을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>39,40</sup> 노화가 진행된 혈관내피세포에서는 p16이 증가되어 있고, p16을 과발현시킨 세포에서는 세포 노화가 유도된다

는 점에서 본 실험에서 세포의 노화를 증명할 수 있었다.<sup>41</sup> 또한 cyclin D1은 cyclin-dependant kinase 4 (cdk4)와 결합하여 세포 주기의 G1/S transition 에 기여한다.<sup>42</sup>

본 실험은 moesin이 세포주기에 관여하는지의 여부를 확인하고자 moesin이 과발현된 혈관내피세포의 p16, cyclin D1, cdk4 mRNA를 각각 확인하였다. 세포 노화의 표지자인 p16의 의미 있는 변화가 관찰되었는데 노화된 혈관내피세포와 동일한 passage인 moesin 과발현 세포에서 p16의 발현이 상대적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다. cyclin D1과 cdk4 역시 상대적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 또한 FACS를 이용하여 G1/S transition을 억제하는 p16의 발현을 관찰한 결과 moesin이 과발현된 세포에서 p16의 발현이 대조군에 비하여 상대적으로 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 moesin의 발현을 억제하였을 때에 세포주기 관련 단백질 중 p16의 증가를 유발시켜 세포주기의 중단을 초래한다는 앞선 연구 결과를 뒷받침할 수 있는 근거를 제시한다.

이러한 결과들을 볼 때, moesin의 과발현이 세포의 형태뿐만 아니라, 기능적으로 세포 노화의 진행을 제어하는 것으로 예상되며, moesin이 세포주기에 관여하여 항노화의 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 moesin을 세포 노화의 표지자 및 노화 정도 판정 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되며, moesin을 과발현 시키는 경우 항노화의 실험 모델을 구축하여 노화관련 실험에 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 신세포암에서 프로테오믹스 기법을 이용하여 암표지자의 후보 물질을 발굴한 결과, moesin이 암세포에서 발현이 증가되었다는 보고가 있었고<sup>26,43,44</sup>, teratocarcinoma 세포에서 shRNA를 이용하여 moesin을 knockdown시킨 경우 세포 고사가 유발되었다는 보고가 있어서,<sup>30</sup> moesin이 발암기전에 관여할 가능성 또한 있으므로, 향후 종양 발생 가능성에 대한 실험도 시행하여 moesin을 암표지자 또는

진단, 치료 시에 바이오마커로서 이용할 수 있는지에 대하여 연구해보는 것이 필요하겠다. 또한 moesin을 증가시키는 관련요소 및 그 기전을 알아낸다면 노화와 관련된 여러 질환의 기전 연구, 진단과 치료제 개발, 예후 판정, 그리고 항노화 연구에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Lenti-virus를 이용하여 moesin의 과발현을 유도하여 HDMEC의 세포 노화 및 세포의 대사 기능에 미치는 영향을 알아보고, moesin의 항노화 작용의 가능성을 관찰하고자 본 연구를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군 HDMEC과 비교하여 lenti-virus가 형질도입된 HDMEC에서 moesin의 발현이 높게 관찰되고, passage 27에서도 상대적으로 moesin이 높게 발현되어 lenti-virus에 의한 moesin의 과발현이 배양 말기까지 지속되는 것을 확인할 수 있었다.
2. 배양 말기(passage 27)의 moesin 과발현 HDMEC에서는 상대적으로 형태적 변형이 적었으며, SA- $\beta$ -gal 염색된 세포의 수도 적게 관찰되었다.
3. HDMEC을 passage 27까지 배양하였을 때, 세포 노화의 표지자인 p16의 발현이 moesin 과발현 HDMEC의 mRNA와 단백질 모두 대조군 HDMEC에 비해 현저히 낮게 관찰되었다.
4. HDMEC을 passage 27까지 배양하였을 때, 대조군과 비교하여 moesin 과발현 HDMEC에서 대사율의 감소가 상대적으로 적었다.

이상의 결과로 moesin의 과발현이 혈관내피세포의 노화 진행을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 moesin을 세포 노화의 표지자 및 노화 정도 판정 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 항노화 효과 또한 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

향후 moesin을 증가시키는 인자들 및 기전을 알아낸다면 노화와 관련된 여러 질환의 진단과 치료제 개발, 예후 판정, 그리고 항노화 연구에도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.



## 참 고 문 헌

1. Toren F, Manuel S, Maria AB. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007;448:767-74.
2. Judith C. Aging and cancer cell biology, 2007. *Aging Cell* 2007;6:261-3.
3. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007;130:223-33.
4. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:961-76.
5. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, Oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005;309:481-4.
6. Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, Blanca I, Weisinger JR, Rothstein M, et al. Effect of recombinant erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int* 1999;55: 546-53.
7. Uhrbom L, Nister M, Westermarck B. Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16INK4A. *Oncogene* 1997; 15: 505-14.
8. Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvavre R, Negre-Salvavre A. HDL and apoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2158-66.
9. Alvarez RJ, Gips SJ, Moldovan N, Wilhide CC, Millike EE, Hoang AT, et al. 17 beta-estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:372-81.

10. Kiyokawa H. Senescence and cell cycle control. *Results Probl Cell Differ* 2006;42:257–70.
11. Smith JR, Pereira-Smith OM. Replicative senescence: Implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 1996; 273: 63–7.
12. Vaziri H, Benchimol S. From telomerase loss to p53 induction and activation of a DNA–damage pathway at senescence: The telomere loss/ DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 1996; 31: 295–301.
13. Weindruch R. Caloric restriction and aging. *Sci Am* 1996; 274: 46–52
14. Pearson JD. Normal endothelial cell function. *Lupus* 2000;9:183–8.
15. Clines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman JA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91: 3527–61.
16. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 1999;9:939–45.
17. Comi P, Chiamonte R, Maier JA. Senescence–dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1995;219:304–8.
18. Tang J, Gordon GM, Nickoloff BJ, Foreman KE. The helix–loop–helix protein Id–1 delays onset of replicative senescence in human endothelial cells. *Lab Invest* 2002;82:1073–9.

19. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Durr P. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol* 2001;36:1327-47.
20. Lee JH, Chung KY, Bang D, Lee KH. Searching for aging-related proteins in human dermal microvascular endothelial cells treated with anti-aging agents, *Proteomics* 2006;6:1351-61.
20. Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:70-5.
21. Miller KG. A role for moesin in polarity. *Tren Cell Biol* 2003;13:165-8.
22. Charrin S, Alcover A. Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Front Biosci* 2006;11:1987-97.
23. Ivetic A, Ridley AJ. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signaling in leucocytes. *Immunology*. 2004;112:165-76.
24. Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu KD, et al. Estrogen receptor interacts with G $\alpha$ 13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho Kinase/Moesin pathway. *Mol Endocrin* 2006;20:1756-71.
25. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, Netea-maier RT, Chiang SA, Heinz DE, et al. Quantitative and qualitative differences in

- protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol Carcinog* 2006;45:613–26.
26. Craven RA, Stanley AJ, Hanrahan S, Dods J, Unwin R, Totty N, et al. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2006;6:2853–64.
  27. Fievet B, Louvard D, Arpin M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:653–60.
  28. Polesello C, Payre F. Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. *Trends Cell Biol* 2004;14:294–302.
  29. Fais S, De Milito A, Louzupone F. The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis. *Apoptosis* 2005;10:941–7.
  30. Krawetz R, Mackenzie MJ, Sun Q, Walton PA, Kelly GM. G $\alpha$ 13 activation rescues moesin-depletion induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 2006;312:2641–6.
  31. Yoo JH. Functional role of moesin in human skin aging. *Yonsei Univ* ;2006.
  32. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, et al. The FERM domain : a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *TIBS* 1998;23:281–2.
  33. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and

- merlin:integrators at the cell cortex. *Nat Cell Biol* 2002;3:586–99.
34. Erwig LP, McPhillips KA, Wynes MW, Ivetic A, Ridley AJ, Henderson PM. Differential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrin–radixin–moesin (ERM) proteins. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:12825–30.
  35. Dulet N, Donnadiou E, Laran–Chich MP, Niedergang F, Nassif X, Couraud PO, et al. *Neisseria meningitidis* infection of endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures. *J Cell Biol* 2006;173:627–37.
  36. Ha MK, Chung KY, Lee JH, Bang D, Park YK, Lee KH. Expression of psoriasis–associated fatty acid–binding protein in senescent human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Dermatol* 2004;13:543–50.
  37. Van der Loo B, Fenton MJ, Erusalimsky JD. Cytochemical detection of a senescence–associated beta–galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Exp Cell Res* 1998;241:309–15.
  38. Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen–Durr P. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence–associated apoptosis. *Exp Gerontol* 2001;36:1327–47.

39. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence, *Mol Cell Biol* 1996;16:13742–7.
40. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JG, Involvement of the cyclin–dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:13742–7.
41. Tessler A, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter–Kochanek K, Jansen–Durr P, et al. P16 is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006;5:379–89.
42. Yan J, Brown TR. Cell proliferation and expression of cell cycle regulatory proteins that control the G1/S transition are age–dependent and lobe–specific in the brown norway rat model of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 2007;1259:1–30.
43. Verrills NM, Liem NL, Liaw TY, Hood BD, Lock RB, Kavallaris M. Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemian in vivo study. *Proteomics* 2006;6:1681–94.
44. Madan R, Brandwein–Gensler M, Schlecht NF, Elias K, Gorbovitsky E, Belbin TJ, et al. Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: Cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28:1018–27.

## Abstract

### **The Effect of Moesin Overexpression on Aging of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells**

In Ae Hong

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kwang Hoon Lee)

Senescence of endothelial cells seems to have a significance in the pathophysiology of age-related vascular disease. However, the precise mechanism for senescence and implicated genes have not been known clearly.

A high-throughput screening in variety of aging-related proteins resulted from proteomics and major candidates for aging such as moesin, Rho GTP dissociation inhibitor, and actin were disclosed by bioinformatics. Among them, moesin was the most promising protein for aging, because the expression amount of moesin was the most significantly changed after aging and was recovered rapidly by an anti-aging agents.

Moesin is one of cytoskeleton proteins, but its role in senescence has not been known yet. To ascertain it, moesin knock-down in dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) resulted in the induction of senescence caused by the

increase of p16 and arrest of cellular cycle.

In this study, overexpression of moesin in HDMEC was realized using lenti-virus in order to investigate the functional usage of moesin. Aging retardation in moesin-overexpressed HDMEC was displayed and monitored using SA- $\beta$ -gal staining. Moreover, aging-related proteins such as p16, cyclin D1, and cdk4 were low-expressed in moesin-overexpressed HDMEC. This result revealed that moesin could suppress functionally the progress of senescence.

On the basis of these results, we could conclude that the expression of moesin influenced the senescence of HDMEC and this fundamental discovery would be used as a basis for understanding the mechanism of aging and age-related diseases.

---

Key Words: Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC), aging, moesin, lenti-virus, overexpression