대한피부연구학회지 제 14 권, 제 1 호
Korean Journal of Investigative Dermatology
2007 ; Vol. 14, No. 1, pp. 1 - 9

이차원 액체 크로마토그래피와 질량분석기를 이용한 혈관내피세포의 노화 관련 단백의 발굴

이주희[1,2] · 오상호[1,2] · 오문호[2,3] · 홍인애[2,3] · 이광훈[1,2,3]

연세대학교 의과대학 피부과학교실[1], 피부생물학연구소[2], 두뇌한국21 의과학사업단[3]

Proteomic Analysis of Aging-related Proteins in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells by 2-D Liquid Chromatography and Mass Spectrometry

Ju Hee Lee[1,2], Sang Ho Oh[1,2], Wu Wen Hao[2,3], In Ae Hong[2,3], and Kwang Hoon Lee[1,2,3]

Departments of [1]Dermatology, [2]Cutaneous Biology Research Institute and [3]Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Endothelial cell is an interphase between blood and tissue that acts as a media for active interactions between plasma and intracellular environment for homeostasis. Proteins in blood can have an effect on the proteins of endothelial cells. However, endothelial cell proteins influenced by blood components according to the aging process are not known yet and it is difficult to identify biomarkers in blood component because that is low abundant proteins.

This study is to identify human microvascular endothelial cell (HDMEC) proteins changed by human sera from aged man.

HDMECs were subcultured with sera from healthy children (< 6 yrs), adults in their 4th decades, and elderly in their 7th to 8th decades. We applied ProteomeLab® PF2D system that uses chromatofocusing according to pI and non-porous reversed-phase column chromatography according to hydrophobicity. we could obtain 2D proteome map by PrteoVue software. Using nano LC-MS/MS, we identified differential protein. As the result, we could identify adipocyte-fatty acid binding protein(A-FABP), which showed highly increased expression on HDMEC treated with adult to elderly sera. The further study about the delicate functional mechanism of A-FABP on endothelial cell aging will be needed.

Key words : Endothelial cell, Aging, PF2D, A-FABP

서 론

혈관내피세포는 혈관을 구성하는 단층의 세포로 혈액 내 물질에 대하여 반투과성 장벽 역할을 하여 대사에 중요한 역할을 하는 세포이다. 혈관내피세포는 혈액과 일차적으로 접해 있어 백혈구이동, 염증반응, 상처치유, 종양전이 및 혈관형성 등 다양한 생물학적 진행 과정에 필수적인 역할을 하며 혈액 구성 요소의 자극에 의하여 세포의 성장, 노화 및 세포고사가 유도되거나 억제될 수 있다[1]. 혈관내피세포의 비정상적인 기능이 관련된 것으로 보고된 질환이나 상태는 피부의

저자연락처: 이 광 훈, (120-752) 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 피부과학교실,
Tel: 02) 2228-2080 / Fax: 02) 393-9157 / E-mail: kwanglee@yuhs.ac

* This study was supported in part by a grant of the Korea Health 21 R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (03-PJ10-PG6-GP01-0002).

* 본 연구는 Brain Korea 21 의과학사업단에 의하여 지원되었음.

내인성 노화 이외에도 죽상경화증, 고혈압, 울혈성 심부전 등의 심혈관질환과 당뇨, 신부전, 고콜레스테롤증 등이 있다[2]. 특히 혈관내피세포의 노화는 세포막의 Na^+ 펌프의 이상을 초래하거나[3], 혈관 확장 능력이 저하되며[4], endothelin-1에 의한 수축 작용의 저하를 초래하여 여러 질환을 일으키는 것으로 보고되었다[5]. 혈관내피세포의 노화는 다양한 자극에 의해 촉진되며 최근에는 산화적 스트레스(oxidative stress)가 가장 큰 원인으로 대두되고 있으나[6], 그 정확한 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 혈관내피세포의 노화 관련된 보고에서 노화된 세포에서 glutathione S-transferase P, calumenin, reticulocalbin, carbohydrate sulfotransferase 3이 증가하고 cytokeratin 7, F-box only protein 21 isoform 1, and Era G-protein-like 1 등이 감소된다는 것이 보고된 바가 있으며[7], 본 연구진의 프로테오믹스 기법을 이용한 종전의 실험에서 fatty acid binding protein (FABP)이 증가되고[8], moesin, rho GDP dissociation inhibitor가 감소하는 것으로 나타났다[9].

혈관내피세포는 혈액 내의 여러 가지 영양 성분에 의해서도 영향을 받는데 염분의 섭취 제한이나 칼슘의 섭취가 심혈관질환을 유발한다는 것으로 알 수 있다[10-13]. 혈관내피세포가 혈액과 일차적으로 접해 있기 때문에 혈액 내의 성분의 변화에 의하여 혈관내피세포의 고사 및 노화에 영향을 받을 것으로 생각되나 혈액 내의 노화에 따른 혈액 성분이 혈관내피세포와 어떤 상호 작용을 하는지에 대하여 정확히 알려진 바는 없었다.

혈청이나 세포의 바이오마커의 후보 단백을 발굴하기 위하여 최근에 이차원 전기영동 (two dimensional (2-D) gel electrophoresis), 영상 분석 (image analysis), 질량 분석기(mass spectrometry), 아미노산 서열 분석 (amino acid sequencing), bioinformatics를 이용하는 프로테오믹스 기법이 사용되고 있는데, 그 중 가장 흔히 사용되는 방법이 이차원 전기영동을 이용한 방법이다. 그러나 이차원 전기영동은 throughput 기능이 부족하고 염기성 단백이나 저발현 단백(low abundance protien: LAP)에서는 재현성의 문제가 있다는 단점이 있다[14,15]. 최근에는 이차원 액체 컬럼 크로마토그래피(2-dimensional liquid chromatography: 2-D LC)와 chromatofocusing을 병용하는 ProteomeLab PF2D® 기법이 사용되어 염기성 단백이나 저발현 단백이 많은 포유류의 세포에서도 재현성 있게 바이오마커를 발굴할 수 있다[16]. PF2D® 2-D LC 기법은 이차원적으로 PF2D® 시스템으로 분획화(fractionation)하는 방법으로 세포의 단백을 pI별로 chromatofocusing 하는 첫 번째 단계와 non-porous reverse-phase column chromatography (NPRP)를 이용하는 두 번째 단계로 이루어진다. 이 방법을 이용하여 대식세포, 근육세포, 혈장 등의 단백을 분석한 보고들이 있으나[17-19], 아직까지 PF2D® 2-D LC 기법을 이용하여 혈관내피세포의 단백을 분석한 보고는 없었다.

혈청이나 혈장은 혈액 내 존재하는 알부민이나 면역 글로블린과 같은 고발현 단백 (high abundance protein: HAP)이 존재하기 때문에 의미있는 LAP를 발굴하기가 쉽지 않아 immunoaffinity column이나 여러 가지 단백 분획화 방법을 동원해야 한다는 단점이 있다. PF2D® 2-D LC 기법이 어느 정도 이러한 단점을 극복할 수 있는 부분이 있으나 혈청이나 혈장 자체의 변이가 개체마다 크기 때문에 혈장이나 혈청에서는 본 연구진이 알아보고자 하는 노화 관련 단백을 재현성 있게 발굴하기가 용이하지 않았다. 따라서, 변이가 큰 혈액 성분보다는 프로테오믹스 기법을 이용하여 세포의 단백을 발굴하는 것이 더 용이할 것으로 생각되어 6세 미만, 30대, 70대 건강한 성인의 혈청을 배양된 인체 진피 미세 혈관내피세포 (human dermal microvascular endothelial cells: HDMEC)에 처리를 하여 혈액의 영향을 받은 혈관내피세포의 단백을 분석해 보기로 하였다.

이에 새로운 방법인 PF2D® 2-D LC 기법을 이용하여 연령에 따른 혈청을 HDMEC에 처리를 하여 노화된 혈액에 의해 변화하는 HDMEC 단백을 발굴하여 혈관내피세포의 노화와 관련된 단백을 발굴하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 혈청의 수집

연세대학교 의과대학 세브란스병원 건강검진센터 및 비자클리닉에 방문하여 각종 검사 상 이상이 전혀 없는 건강한 한국인을 대상으로 하여 6세 미만, 30대, 60 - 70대에 해당하는 남녀 각각 30명을 임의로 추출하여 pooled serum을 만들었다.

2. HDMEC의 배양

혈관내피세포로 HDMEC (Cambrex, Walkersville, MA, U.S.A.)를 구입하여 사용하였다. HMVEC을 준비하여 0.1 % 젤라틴을 처리한 조직배양용기에서 human epidermal growth factor, hydrocortisone acetate, VEGF, human fibroblast growth factor-B, gentamicin, amphotericin B, 5% fetal bovine serum (FBS), R^3-insulin growth factor-1, ascorbic acid가 함유된 microvascular endothelial cell medium-2 (Cambrex, Walkersville, MA, U.S.A.)을 사용하여 37℃, CO_2 항온기에서 passage 5부터 계대배양하였다. HDMEC의 계대배양 시 대조군은 5% FBS를 처리하였고 각각의 실험군은

5% FBS를 처리하는 대신 배양액을 교체할 때마다 비활성화된 각 연령군의 혈청의 pooled serum을 처리하여 3 passage 이상 경과한 후 세포를 수집하였다.

3. PF2D® 2-D LC system

1) 2-D LC에 의한 일차원적 분획

수집된 HDMEC을 주입하기 이전에 20 mM triethylamine (pH11.3) 용액에 용해시켰다. 단백이 용해된 용액의 1 mg을 starting buffer (buffer A)와 함께 일차원 컬럼인 Mono P HR 5/20 column (5 × 200 mm (Amersham Biosciencesm Uppsala, Sweden)에 주입하여 실온에서 0.3 mL/min 의 속도로 주입하였다. 280 nm의 파장으로 컬럼의 유출액을 모니터링하였으며, 샘플 주입 후 3분 30초 이후에 buffer 스위치가 자동적으로 elution buffer인 Polybuffer96 (pH8.3) (Amersham Biosciencesm Uppsala, Sweden)로 변경되었다. 유출액은 자동적으로 분획화되어 96-well plate에 0.3 pH unit 간격으로 수집되었다.

2) NPRP에 의한 이차원적 분리

Beckerman Coulter NPRP 2-D column을 이용하여 50℃에서 0.75 mL/min의 속도로 단백을 분리하였으며 컬럼의 유출액은 214 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매 A (0.1% w/v TFA in distilled water)와 용매 B (0.08% w/v TFA in ACN)을 사용하였고 일차원 분획에 의해 얻어진 각각의 분획은 자동적으로 NPRP column에 주입되었다. NPRP column을 통과한 용액은 자동적으로 96-well plate에 15초 간격으로 수집되었다.

각 군의 그래프의 절정 부분의 형식이 비슷한 흡광도에서 관찰되는 여부로 각각의 시료의 분리와 점적 사이에 상당한 재현성을 결정하였다.

각각의 흡광도는 자동화되어 저장되었고 ProteomeLab™ system의 PrteoVue 소프트웨어를 사용하여 고해상도의 2-D liquid proteome map을 작성하였다.

4. Nano LC MS/MS

각 군간의 차이가 있는 분획은 단백의 규명을 위하여 자동화된 sampler, capillary pump, nano-flow pump, micro 6- ort column-switching valve, MSD XCT IT mass spectrometer와 nanoelectrospray로 구성되는 Nano Proteomics Solution System (Agilent)을 이용하였다. Nanoflow gradient는 5%에서 시작하여 65%까지 ACN 농도를 증가시켰다. Salt gradient는 1.5, 5, 15, 50, 100%의 1 M ammonium acetate 용액의 단계로 펌프되었다. Salt 용액은 15분 간격으로 gradient가 형성되어 SCX column이 micro 6-ports valve 로 변환되었다. Column의 흐름은 15 μL/min이었고 건조 가스는 5 L/min, 325℃였다. 이 시스템에서 얻어진 펩타이드 MS/MS 스펙트럼은 Spectrum Mill 소프트웨어를 이용하여 데이터베이스를 수집하여 검색하였다. 서열은 단백 서열 데이터베이스인 NCBI의 검색 알고리즘에서 검색하였다. Protein score > 13, petide score > 10, scored peak intesity (%) > 70인 경우를 데이터 분석하였다.

결 과

1. 일차원 chromatofocusing 분석 결과

5% FBS, 6세 이전, 30대, 60 - 70대의 혈청을 처리한 HDMEC을 일차원 chromatofocusing을 pH 8.0에서 시작하여 pH 4.0까지 gradient를 적용한 결과, 각각의 일차원 그래프를 얻을 수 있었다. 대조군인 FBS를 처리한 군에서 buffer에 의한 간섭 현상이 관찰되었고, 나머지 군에서는 비교적 일정한 일차원 그래프가 관찰되었다 (Fig. 1).

2. 이차원 크로마토그램

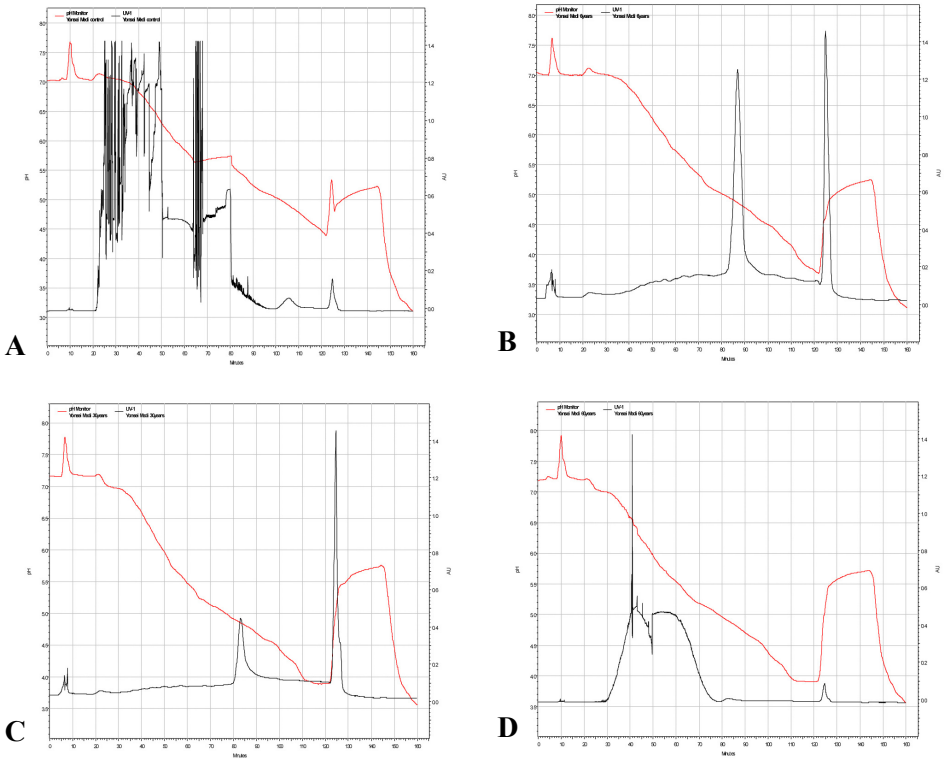
5% FBS, 6세 이전, 30대, 60 - 70대의 혈청을 처리한 HDMEC을 일차원 chromatofocusing 이후 각 분획을 이차원적으로 크로마토그래피를 실시한 결과, pH 분획 8, 13, 14에서는 각 군의 시료에서 재현성 있게 나오는 단백의 피크를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A). 반면에 pH 분획 30, 43, 48에서는 노인의 혈청을 처리한 HDMEC 시료에서만 증가되는 피크를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B).

특히 49번째 분획에서는 30대, 60 - 70대의 혈청을 처리한 HDMEC의 시료에서만 새롭게 나타나는 단백의 피크가 관찰되었다 (Fig. 3).

3. 2-D liquid proteome map

각각의 혈청을 처리한 HDMEC 의 이차원적인 프로테옴 지도를 ProteomeLab™ system의 ProteoVue 소프트웨어를 이용하여 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 단백질 양에 따라 색의 강도 차이를 보이므로 lane 12에서 가장 강한 흡광도가 관찰되어 단백질의 양이 많을 것을 알 수 있었다.

49번째 분획에서의 성인의 혈청을 처리했을 때 증가하는 단백도 2-D liquid proteome map으로 나타낸 결과 대조군과 소아의 혈청을 처리한 군에서는 관찰되지 않으나 성인 및 노인의 혈청을 처리했을 때에만 나타나는 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 3).



A: control, B: neonate, C: adult, D: elderly

Fig. 1. The first dimension separation is done at ambient temperature with a flowrate of 0.2 ml/min and absorbance of the column effluent was measured at 280 nm.

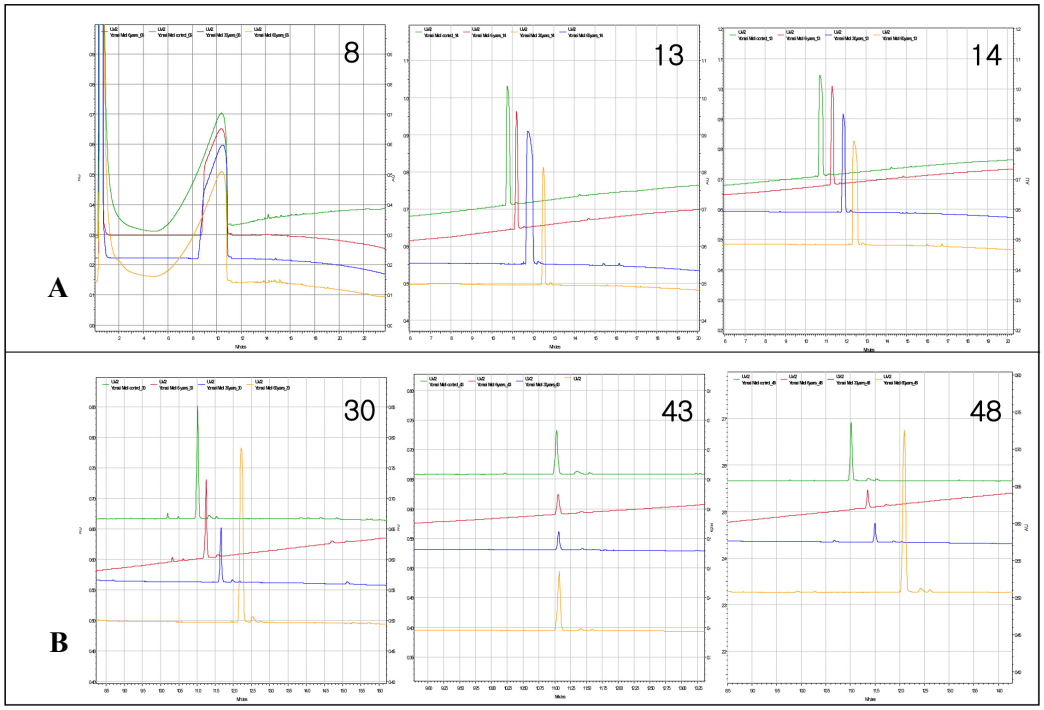


Fig. 2. (A) The 2nd -dimension chromatogram of the pH fraction 8, 13, 14 from HDMEC streated with each sera. Repetitive peaks show correspondent proteins in each sample. (B) The 2nd -dimension chromatogram of the pH fraction 30, 43, 48 from HDMEC streated with each sera. They show increased intensitiy of peaks in the HDMEC treated with sera from the elderly.

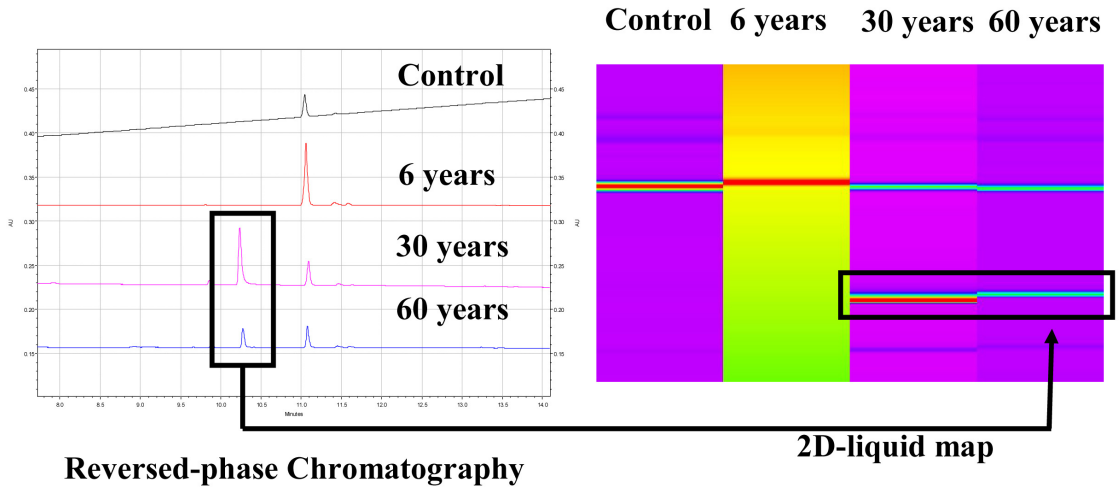


Fig. 3. Differential protein of HDMEC treated with sera from the elderly is seen correspondent band in 2D-liquid proteome map (49th fraction). The protein was identified as fatty acid binding protein by LCMS/MS.

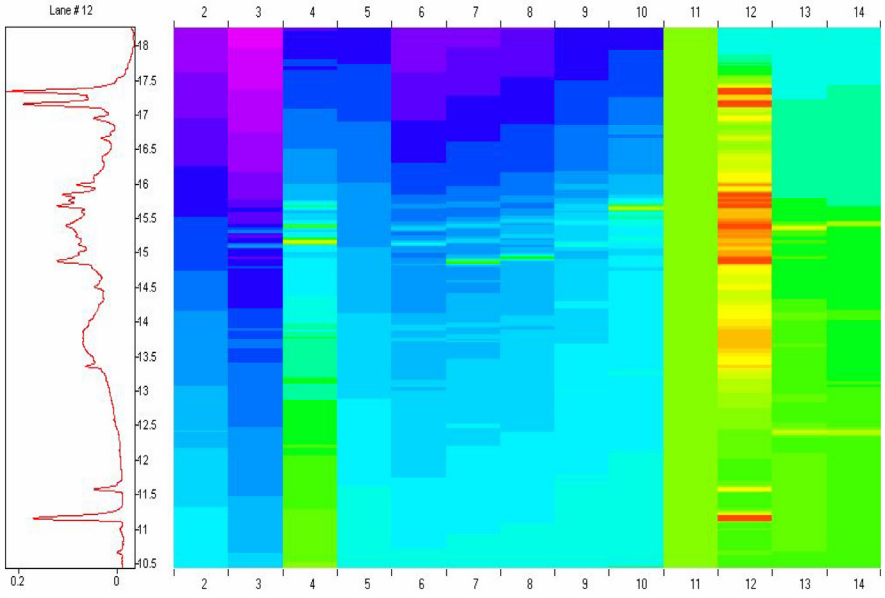


Fig. 4. The representative 2D-liquid proteome map of the HDMEC sample as viewed with the ProteoVue software. Each lane represents the absorbance intensity of the 2-D separation of each fraction collected in the first dimension. The x-axis, 0.03 - 0.1, is pI units. The y-axis is percent B of the RP-HPLC gradient at 214 nm UV detection and the spectrum is the chromatogram for given fraction. Color intensity is proportional to differences in protein levels.

4. Nano LC-MS/MS를 이용한 단백의 규명

49번째 분획에서 성인과 노인의 혈청을 처리한 경우에만 새롭게 나타난 밴드에 해당하는 단백을 질량분석기를 이용하여 MS/MS 스펙트럼을 얻었다. NCBI 검색 알고리즘인 UCSF에서 제공되는 MS-Fit를 이용하여 획득한 스펙트럼에 대하여 Spectrum Mill 소프트웨어를 이용하여 데이터베이스를 수집하여 검색을 한 결과, 성인과 노인의 혈청을 처리한 경우에만 새롭게 나타난 단백은 지방세포 (adipocyte)의 fatty acid-binding protein (A-FABP)인 것으로 동정되었다 (Table 1).

고 찰

혈관내피세포는 생체내 대사 및 항상성 조절에 중요한 기능을 하는 세포로 혈관내피세포가 비정상적인 기능으로 인하여 죽상경화증, 고혈압, 울혈성 심부전, 당뇨, 신부전, 고콜레스테롤증 등의 질환이 유발되며 호르몬, 약물, 노화, 흡연,

Table 1. Determination of the newly expressed protein differentially displayed in HDMEC treated with adult and aged sera in fraction number 49 (pH 5.04-5.95)

No. of spectra	Distinct peptides	Distinct summed MS/MS search score	% AA coverage	Mean peptide spectral intensity	Accession No.	Protein name
16	4	53.30	0 (0)	4.46e+008	30582457	Fatty acid binding protein 4, adipocyte

영양소 등이 혈관내피세포의 기능이상에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[2].

혈관내피세포에 영향을 미치는 여러 가지 요소 중 호르몬에 대해 먼저 살펴보면, 에스트로겐이 가장 많이 밝혀져 있다. 에스트로젠은 직접적으로 혈관내피세포에 영향을 미쳐 nitric oxide생성을 증가시키고 백혈구의 부착을 억제하며 항산화, 항염증 작용을 유발하게 된다[20]. 프로게스테론은 에스트로젠의 유익한 효과를 억제시키는데 특히 혈관수축작용을 유발시키는 것으로 증명되었고 역학연구에서는 정맥혈전증의 위험도를 증가시키는 것으로 알려졌다[21]. 노화의 경우 나이가 들어감에 따라 혈관내피세포에는 여러 가지 기능적, 구조적 변화가 유발되게 되는데, 아세틸콜린에 의한 혈관내피세포의 혈관확장이 노화가 진행되면서 손상되고[4] noradrenaline, endothelin-1에 의한 혈관수축 반응은 감소, 세포외 칼슘농도에 따른 혈관 수축 반응은 증가되게 된다[5]. 또한 노화가 진행된 경우 혈관내피세포의 재생과 연관된 nitric oxide의 분비가 적절치 않고[22] 세포막의 Na^+ 펌프의 이상에 의해 혈관기능에 이상이 발생된다[3]. 영양소 중에 전해질의 가장 기본적인 나트륨은 고혈압과 그에 따른 합병증과 관련이 많으며[10] 칼륨과 마그네슘은 혈압을 낮추는 효과를 보인다[23]. 특히 혈장 나트륨의 농도가 높은 경우 혈관내피세포는 경직 현상이 급격히 발생되는데 이와 같이 혈중 나트륨 농도가 혈관내피세포의 기능과 혈관의 tone을 조절하는데 중요한 역할을 함을 보여준다[11]. 칼슘을 많이 섭취하면 혈압이 감소되는데 이는 혈관내피세포와 혈관 평활근을 통한 혈관확장을 통해 이루어진다[24]. n-3 polyunsaturated fatty acid를 이용한 meta-analysis에서 고혈압 환자에서 수축기 및 이완기 혈압이 감소됨을 밝혀냈고 이는 혈관내피세포에 prostanoid 형성 증가와 eicosanoid합성 감소와 연관이 있는 것으로 알려져 있다[25].

이와 같이 혈관내피세포에 영향을 주는 많은 인자들이 연구되고 보고되고 있으며 이와 함께 나이가 들어감에 따라 혈액 내에도 호르몬, 전해질, 비타민 등의 수치에 있어 많은 변화가 나타나는 것으로 보고되고 있다. Kelso[26]는 나이든 사람의 경우 몇 가지 피검사에 있어서는 기존의 정상치보다 수치가 다를 수 있음을 보고하였는데 그 예로 alkaline phosphatase가 정상보다 2.5배 상승, 금식 시 혈당이 135 - 150 mg/dL, 식후 혈당이나 glucose tolerance test에서 10세마다 정상 -10 mg/dL 정도 상승, 크레아틴 배설기능 감소, BUN 증가, 적혈구 침전율 증가, 혈색소의 감소 등의 검사 소견을 언급하였다. Veldhuis 등[27]은 성장호르몬의 분비가 나이가 들면서 눈에 띄게 줄어든다고 보고하면서 나이가 든 경우 GHRH 감소, somatostatin 과잉, 적당한 성장호르몬 분비 조절 기능의 손상 등이 발생하기 때문에 성장호르몬 분비가 줄어든다고 얘기하였다. 혈중 vitamin B12 (cobalamin)의 수치도 나이가 들어감에 따라 정상인에 비해 장 흡수의 감소로 감소되는 경우가 많으며 이에 의해 신경학적 또는 대사장애를 유발시키게 된다[28]. 또한 나이가 들어가면 혈중내 아연 결핍이 발생할 가능성이 증가하며 이러한 아연 결핍은 흉선과 흉선호르몬의 기능 감소, Th2로 면역 불균형, 백신에 대한 반응 감소, innate immunity의 감소 등의 면역학적 변화를 유발하는 것으로 보고되었다[29]. 당뇨가 있는 경우 혈관의 노화도 빨리 진행하는데 고혈당의 상태가 세포고사를 유발하는 신호인 apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)의 발현을 증가시켜 혈관내피세포의 노화를 유발하는 것으로 알려졌다[30]. 노화와 연관된 다른 혈액의 성분으로는 염증과 관련된 interferon-gamma inducible chemokine인 MIG나 IP-10과 eotaxin, soluble TRFR-II 등이 정상 성인군에 비해 노인에서 증가하고, epidermal growth factor (EGF) receptor와 EGF는 감소한다고 보고된 바가 있다[31].

혈액 성분은 개인마다 차이가 있지만 노화가 진행되면서 혈액 내의 성분에 변화가 분명히 나타날 것으로 생각되고 이러한 혈액 내 성분 변화가 접하고 있는 혈관내피세포의 기능에 영향을 미칠 수 있다. 혈액은 매우 다양한 단백으로 이루어져 있는데, 신체 중 가장 많은 단백의 혼합 요소로 되어 있으며 HAP이 많은 양을 차지하여 실제 바이오마커로 활용될 수 있는 LAP의 경우 분석이 어려운 점이 있어 혈액에 의하여 변화하는 혈관내피세포의 단백을 규명하여 이에 영향을 미치는 혈액 요소를 찾는 것이 더 정확할 것으로 보여 실험을 계획하게 되었다.

그 방법으로서 혈액 단백을 분획화하여 분석하는 PF2D® 2-D LC 기법을 이용하였는데, 혈관내피세포에서는 최초의 보고이다. PF2D® 2-D LC 기법이 LAP를 분석하는 데 용이하며 재현성이 있는 장점이 있는 반면 단백의 pI와 elution buffer의 pH 간 차이를 보이는 position shift가 있다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해서 2D 프로테옴 지도를 비교하여 position shift를 정량하는 방법을 사용할 수 있었다. 2D 지도의 결과 염기성 단백이 주로 많이 관찰이 되었는데, 향후 더 많은 세포를 이용하여 반복적인 실험을 통하여 2D 지도를 비교해보고 각각의 차이나는 단백을 동정하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 혈액 내의 노화에 따른 혈액 성분 변화가 혈관내피세포와 어떤 상호 작용을 하는지를 밝히기 위해 나이에 따른 혈액을 혈관내피세포에 처리하여 변화되는 성분을 PF2D® 2-D LC 기법과 nano LC-MS/MS기법을 이용하여 밝혀내고자 하였고, 그 결과 지방세포의 FABP를 동정하였다. 49번 분획의 본 단백의 변화가 가장 뚜렷하여 49번 분획을 선택하였다.

FABP와 결합하는 지방산은 세포막 형성, 에너지 전달, 인지질이나 콜레스테롤의 합성에 반드시 필요하다. 이러한 지방산은 식사를 통해 얻어지고 지방세포에서 분비되거나 간에서 당으로부터 합성된다. 지방산은 albumin, lipocalin, FABP 등과 결합하여 친수성으로 변하고 이동이 쉽게 된다. 이 중 FABP는 세포 성장의 조절, 세포 신호전달, 유전자 전사의 조절과 같은 지방산으로 매개되는 과정에 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다[32,33]. FABP는 크게 plasma membrane과 연관된 FABPpm과 세포내, 세포질 단백질인 FABPc의 두 가지로 나뉘며[34] FABPc는 조직의 특이성에 따라 현재까지 간, 장, 심장, 지방세포, 표피, 회장, 뇌, 말초신경, 고환의 9가지 장기에서 발견 되었다[35]. 본 저자들이 과거에 본 연구진이 시행한 연구에서 혈관내피세포를 통해 노화와 연관된 것으로 밝혀낸 단백 중에서도 FABP는 표피(epidermis) FABP (E-FABP, psoriasis-associated FABP)였는데 노화가 진행될수록 증가하는 것이 발견되었다[36]. 본 연구를 통해 노화와 연관된 것으로 의심되는 것은 A-FABP이다. A-FABP는 지방조직의 세포질에 풍부히 발견되고 지방세포의 분화때 발현이 조절되며[37] 지방산에 의해서도 A-FABP mRNA의 발현이 조절된다[38]. 최근 A-FABP의 발현이 없는 마우스 연구에서 A-FABP가 대사성 질환과 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌는데 A-FABP가 부족한 경우 식이 또는 유전에 의한 비만과 연관된 고인슐린혈증과 인슐린 내성이 감소되는 것으로 나타났다[39,40]. 더욱이 A-FABP는 비만에서 혈당 및 지방의 대사에 영향을 미치며 지방세포의 지방분해에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다[41,42]. 또한 대식세포에서 발현된 A-FABP가 죽상경화증의 유발을 증가시키는 결과도 보였다. 결과적으로 A-FABP가 죽상경화증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 FABP가 지방이상, 인슐린 내성, 죽상경화증의 치료에 중요한 표적이 될 것으로 기대되고 있다[43].

A-FABP는 지방세포 외에도 피부, 태아 갑상선, 태반, ciliary ganglion 등에서 발견되나[38,44,45] 아직까지 혈관내피세포에서 발견되었다는 보고는 없으며 노화와 연관되었다는 보고도 없다. 나이가 들어갈수록 당뇨나 인슐린 내성, 지방수치 이상, 죽상경화증의 발생이 증가하기 때문에 본 연구에서 나이 든 사람의 혈액 성분에 영향을 받아 혈관내피세포에서 A-FABP가 발현되었다는 것은 큰 의미가 있을 수 있다. A-FABP가 이러한 대사장애 뿐 아니라 혈관내피세포의 노화와도 밀접한 관련이 있을 수 있으며 혈액 성분의 어떠한 성분에 의해 A-FABP의 발현이 유도되어 노화가 진행되었을 가능성이 있다. 향후 A-FABP가 노화에서의 기능을 규명하며 노화와 이 단백의 연관성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감 사 문

본 연구에 많은 도움을 주신 장남수 기사와 BPRC의 이형주 연구원에게 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.* Blood 1998;91:3527-61
2. Vapaatalo H, Mervaala E. *Clinically important factors influencing endothelial function.* Med Sci Monit 2001;7:1075-85
3. Marin J, Redondo J. *Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging.* Pharmacol Ther 1999;84:249-71
4. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. *Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension.* Circulation 1995;91:1981-7
5. Marin J, Rodriguez-Martinez MA. *Age-related changes in vascular responses.* Exp Gerontol 1999;34:503-12
6. Olsen A, Siboska GE, Clark BF, Rattan SI. *N(6)-Furfuryladenine, kinetin, protects against Fenton reaction-mediated oxidative damage to DNA.* Biochem Biophys Res Commun 1999;265:499-502
7. Chang MW, Grillari J, Mayrhofer C, et al. *Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells.* Exp Cell Res 2005;309:121-36

8. 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
9. 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
10. Mervaala EMA, Vapaatalo H, Karppanen H. *Role of sodium, potassium, and magnesium in hypertension.* J Cardiovasc Med Sci 1998:1:155-62
11. Oberleithner H, Riethmuller C, Schillers H, Macgregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. *Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release.* Proc Natl Acad Sci USA 2007;2:Epub ahead of print
12. Makynen H. *Calcium intake and control of arterial tone in experimental hypertension. Acta Universitatis Tamperensis, Series A, No 493.* Tampere, Finland: University of Tampere, 1991
13. Morris MC, Sacks F, Rosner B. *Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials.* Circulation 1993;88:523-33
14. Rabilloud T. *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains.* Proteomics 2002;2:3-10
15. Lee HJ, Lee EY, Kwon MS, Paik YK. *Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics.* Curr Opin Chem Biol 2006;10:42-9
16. Shin YK, Lee HJ, Lee JS, Paik YK. *Proteomic analysis of mammalian basic proteins by liquid-based two-dimensional column chromatography.* Proteomics 2006;6:1143-50
17. Sheng S, Chen D, Van Eyk JE. *Multi-dimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phased of the human serum proteome: optimization and protein database.* Mol Cell Proteomics 2006;5:26-34
18. Linke T, Ross AC, Harrison EH. *Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser description ionization time-of-flight mass spectrometry.* J Chromatogr A 2006;1123:160-9
19. Anderson NL, Anderson NG. *The human plasma proteome.* Mol Cell Proteomics 2002;1:845-67
20. Patel ST, Kent KG. *Risk factors and their role in the diseases of the arterial wall.* Semin Vasc Surg 1998;11:156-68
21. Badimon L, Bayes-Genis A. *Effects of progestogens on thrombosis and atherosclerosis.* Human Reproduction Update 1999;5:191-9
22. Shimokawa H, Flavahan Na, Vanhoutte PM. *Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endo-thelium removal in porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G proten.* Circ Res 1989;65:740-53
23. Nurminen M-L, Korpela R, Vapaatalo H. *Dietary factors in the pathogenesis and treatment of hypertension.* Ann Med 1998;30:143-50
24. Wuorela H. *Effects of calcium supplementation on electrolyte homeostasis and vascular responses in experimental hypertension.* Acta Universitatis Tamperensis, Series A, No 370. Tampere, Finland: University of Tampere, 1991
25. De Caterina R, Spiecker M, Solani G, et al. *The inhibition of endothelial activation by unsaturated fatty acids.* Lipids 1999;34(suppl):S191-4
26. Kelso T. *Laboratory Values in the elderly different?* Emerg Ned Clin North Am 1990;8:241-54
27. Veldhui JD, Iranmanesh A, Weltman A. *Elements in the pathophysiology of diminished growth hormone(GH) secretion in aging humans.* Endocrine 1997;7:41-8
28. Nilsson-Ehle H. *Age-related changes in cobalamin(vitamin B12) handling. Implications for therapy.* Drugs Aging 1998; 12:277-92
29. Haase H, Mocchegiani E, Rink L. *Correlation between zinc status and immune function in the elderly*. Biogerontology 2006;7:421-8
30. Yokoi T, Fukuo K, Yasuda O, et al. *Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells.* Diabetes 2006;55:1660-5
31. Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Chatta GS, Tourkova IL, Shurin MR, Lokshin AE. *Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging.* Cytokine 2007;7:123-9 Epub ahead of print
32. Rikio W, Hiroshi F, Shoji O, et al. *Molecular cloning of a cDNA encoding a novel fatty acid-binding protein from rat skin.* Biochem Biophys Res Commun 1994;200:253-9
33. Isabell M, Gerry H, Toin H, et al. *Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid binding protein.* Circ Res 1997;81:297-303
34. Glatz JFC, van der Vusse GJ. *Cellular fatty acid bindign proteins: their function and physiological significance.* Prog Lipid Res 1996;35:243-82
35. Chmurzynska A. *The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism.* J Appl Genet 2006;47;39-48
36. MK Ha, KY Chung, JH Lee, D Bang, YK Park, KH Lee. *Expression of psoriasis-associated fatty acid-binding protein in senescent human dermal microvascular endothelial cells.* Exp Dermatol 2004;13:543-50
37. Apiegelman BM, Frank M, Green H. *Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for*

glycerolphosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. J Biol Chem 1983;258:10083-9

38. Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. *Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression.* J Lipid Res 1991;32:1449-56
39. Hotamisligil GS, Hohnson RS, Distel RJ, et al. *Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein.* Science 1996; 274:1377-9
40. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, et al. *Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2.* Endocrinology 2000;141:3388-96
41. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. *Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels.* J Lipid Res 1999;40:967-72
42. Kushiro M, Takahashi Y, Ide T. *Modulation of cutaneous fatty acid-binding protein mRNA expression in rat adipose tissues by hereditary obesity and dietary fats.* J Oleo Sci 2007;56:533-41
43. Boord JB, Fazio S, Linton MF. *Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol 2002;13:141-7
44. Bernlohr DA, Coe NR, Simpson MA, Hertzel AV. *Regulation of gene expression in adipose cells by polyunsaturated fatty acids.* Adv Exp Med Biol 1997;422:145-56
45. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al. *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes.* Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:6062-7