

## 전기자극에 의한 유전자 전달 골격근을 이용한 간편하고 정량적인 혈관신생 유전자 평가 시스템 개발

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 삼성서울병원 심장혈관센터, 삼성생명과학연구소

김현중\* · 장형석\* · 김정민 · 이영삼 · 김경리

김정아 · 전은석 · 변종희 · 김덕경

### A Simple, Quantitative Method for Assessing Angiogenic Genes Using Skeletal Muscle by Electroporation-Mediated Naked DNA Delivery

Hyun-Joong Kim\*, MD, Hyung-Suk Jang\*, MS, Jeong-Min Kim, BS,  
Yong Sam Lee, MS, Kyung Ree Kim, MS, Jeong-A Kim, PhD, Eun-Seok Jeon, MD,  
Jong Hoe Byun, PhD and Duk-Kyung Kim MD

Department of Medicine, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Cardiac and Vascular Center, Samsung Medical Center, Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

**Background and Objectives** : For the development of an arteriogenic gene therapy in peripheral artery occlusive disease, we developed a novel angiogenesis assay, with electroporation-mediated naked DNA delivery to the skeletal muscle. **Materials and Methods** : The levels of the expression CAT were compared between pJDK and pcDNA3.1, in HeLa and C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cell lines, and skeletal muscle. The well known angiogenic gene, pJDK-hVEGF<sub>165</sub>, was injected, intramuscularly, into the tibialis anterior muscle of Balb/C mice, which was followed by electroporation. Two days later, the anterior tibialis muscles were divided into halves, embedded, and cultured in growth factor-reduced Matrigel. The capillary network area formed by the newly sprouting tube-like structures was calculated. For validation of this *ex vivo* assay, the connective tissue growth factor gene (pJDK-CTGF) was tested both by this new assay, and by the mice-hind limb ischemia model, with Laser Doppler imaging. **Results** : The pJDK showed a significantly higher level of CAT expression than the pcDNA3.1. From the pJDK-hVEGF<sub>165</sub> injected explants, endothelial cell migration and tube-like formation occurred on day 2, and the capillary network formation peaked on day 7. The capillary network formation in the pJDK-hVEGF<sub>165</sub> group was markedly increased to that in the pJDK group. From the skeletal muscle assay, the pJDK-CTGF showed no angiogenic activity or attenuated VEGF-induced capillary network formation. The LDI flux ratio, on day 10 in the mice-hind limb ischemia model, for the mice treated with the pJDK-CTGF and pJDK-hVEGF<sub>165</sub> was significantly lower than that of the mice treated with the pJDK-hVEGF<sub>165</sub> alone. **Conclusion** : The skeletal muscle *ex vivo* assay, using an electroporation-mediated naked DNA delivery, is a simple, quantitative and reproducible method for assessing angiogenic genes. CTGF could be an anti-angiogenic factor due to its inhibition of VEGF. (Korean Circulation J 2003;33 (4):321-332)

**KEY WORDS** : Gene therapy ; Angiogenesis assay ; Skeletal muscle ; Electroporation ; Vascular endothelial growth factor (VEGF) ; Connective tissue growth factor (CTGF).

논문접수일 : 2002년 11월 25일

심사완료일 : 2003년 1월 29일

교신저자 : 김덕경, 135-710 서울 강남구 일원동 50 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 순환기내과 심혈관질환 분자치료연구실

전화 : (02) 3410-3419 · 전송 : (02) 3410-3849 · E-mail : dkkim@smc.samsung.co.kr

변종희, 135-710 서울 강남구 일원동 50 성균관대학교 의과대학 삼성생명과학연구소 심혈관질환 분자치료연구실

전화 : (02) 3410-6827 · 전송 : (02) 3410-6829 · E-mail : jonghoe@smc.samsung.co.kr

\*These 2 authors contributed equally to this work.

## 서론

말초동맥폐색질환(peripheral artery occlusive disease, PAOD)은 상지나 하지로 가는 혈관의 협착 혹은 폐색에 의해 파행, 휴식기 통증, 궤양, 괴저에 이르는 증상이 나타나는 질환으로 기존 치료방법에 반응을 하지 않는 이른바 'no option patient'에서 혈관신생 유전자 치료(angiogenic gene therapy)가 새로운 치료 방법으로 연구되고 있다.<sup>1)2)</sup> 혈관신생 유전자 치료의 임상실험에는 주로 vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF) 등의 단일 혈관신생 유전자가 사용되고 있다.<sup>1-6)</sup> 그러나, 보다 효과적인 혈관신생 유전자 치료를 위하여는 서로 상승작용을 나타내는 다양한 혈관신생인자를 복합적으로 사용하여 혈관신생(angiogenesis)보다는 성숙되고 기능적인 혈관이 만들어지는 동맥신생(arteriogenesis)이 이루어지는 "복합 동맥신생 유전자 치료(combined arteriogenic gene therapy)"가 개발되어야 한다.<sup>7-9)</sup> 이러한 복합 동맥신생 유전자 치료를 하기 위해서는 다양한 혈관신생인자들의 혈관신생능을 평가할 수 있는 혈관신생 평가기법(angiogenesis assay)이 필요하다. 그러나 대부분의 기존 혈관신생 평가기법은 혈관신생인자 단백을 사용하므로 혈관신생유전자를 직접 전달하여 혈관신생능을 평가할 수 있는 방법은 없었다. 혈관신생인자 단백을 사용할 경우 이용하고자 하는 단백을 쉽게 얻을 수 없으며 고순도의 단백을 정제하기 힘들다는 제약이 따르게 된다. 반면, 혈관신생유전자를 직접 전달할 경우 원하는 유전자를 쉽게 클로닝할 수 있고, 유전자치료를 사용되는 방법인 유전자 전달을 이용함으로써 좀 더 실제 생물학적인 환경을 반영한다는 장점이 있다.

이러한 혈관신생유전자를 이용한 angiogenesis assay의 개발을 위해서는 유전자를 손쉽게 고효율로 전달할 수 있어야 한다. 원하는 유전자를 골격근에 전달하는 방법으로 유핵발현백터를 이용한 naked DNA는 가장 간단하고 안전하여 많은 연구에서 사용되지만 낮은 전달 효율 때문에 사용상에 많은 제약이 있다. 이러한 점을 극복하기 위해 naked DNA에 의한 유전자의 발현을 증가시키는 몇 가지 방법들이 연구되고 있다. 첫째, 유전자 전달 plasmid의 유전자 발현 효율은 사용되는 프로모터에 의하여 좌우되는데 강력한 프로모터를 사용하여 plasmid의 유전자 발현율을 높이는 방법이다.<sup>10)</sup> 또한 프

로모터 부위에 adeno-associated virus(AAV)의 ITR(inverted terminal repeat)을 추가하면 유핵발현백터의 유전자 발현을 증가시키는 것으로 알려지고 있다.<sup>11)</sup> 둘째, skeletal muscle에 naked DNA를 주입한 후 전기자극(electroporation)을 시행하여 유전자의 발현과 기간을 크게 증가시킬 수 있다.<sup>12)13)</sup> 따라서 ITR을 포함하는 강력한 프로모터를 갖는 유핵발현백터를 전기자극을 이용하여 유전자를 전달하면 naked DNA에 의한 유전자 발현을 극대화할 수 있을 것으로 생각된다.

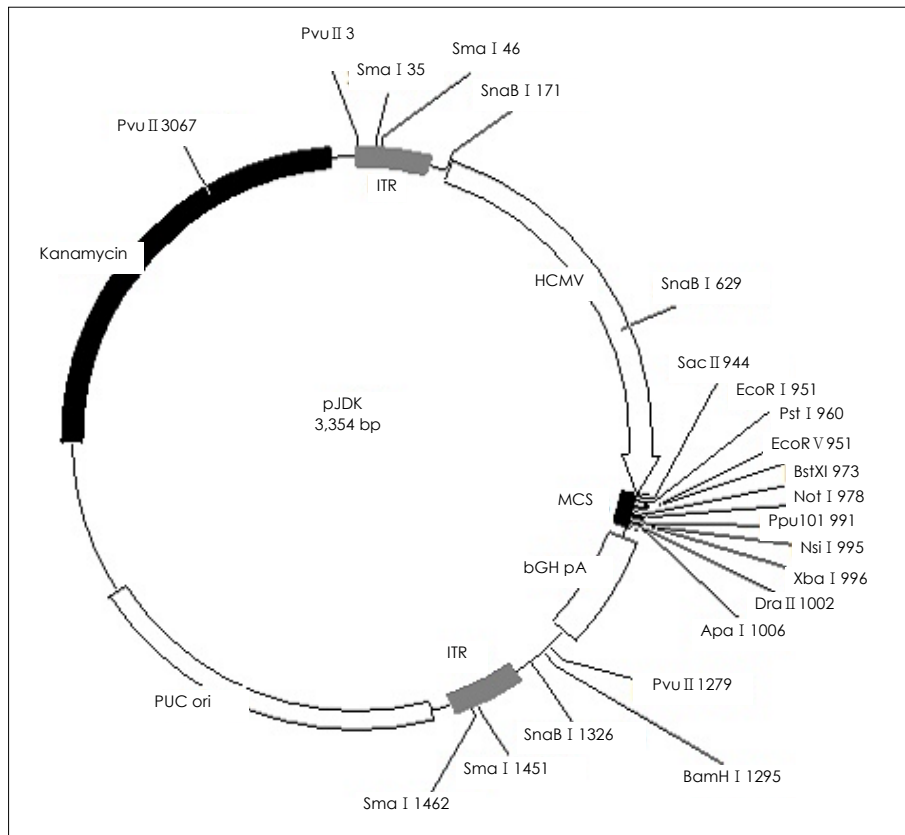
또한 말초동맥질환 환자에서 유전자 주입 대상인 골격근은 외부 유전자 발현에 의해 다양한 분비 단백질(secretory protein)을 생성할 수 있으며, 혈관의 분포가 매우 많은 조직으로 angiogenesis assay에 적용하기 유용한 조직으로 사료되나 이를 이용한 angiogenesis assay는 없는 상태이다.<sup>14)</sup>

따라서 본 연구의 최종 목적은 "혈관신생 유전자를 고효율로 전달한 골격근을 이용한 혈관신생 평가 시스템(angiogenesis assay using direct gene-transferred skeletal muscle)"을 개발하는 것이다. 이를 위하여 첫째, 본 교실에서 자체 개발한 CMV promoter와 ITR을 포함한 유핵발현백터인 pJDK가 기존의 백터보다 우수한지를 알아보고, 둘째, pJDK 백터와 전기자극을 이용하여 혈관신생유전자를 전달한 골격근이 이러한 시스템에서 유용한 모델이 될 수 있는지를 대표적인 혈관신생인자인 VEGF<sub>165</sub> 유전자를 이용하여 검증하고, 셋째, 이렇게 개발된 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay를 이용하여 다양한 혈관신생 유전자 조합의 혈관신생능을 평가할 수 있는지 알아보기 위하여 2개의 성장인자, 즉 혈관신생능에 대하여 상반된 보고가 있는 connective tissue growth factor(CTGF)와 VEGF를 사용한 경우의 유전자 상호작용을 평가하며, 넷째, 위 실험 결과가 실제 말초동맥질환 동물 모델인 mice hindlimb ischemia model에서 재현되는지를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### plasmid 백터

본 연구에 사용된 유핵발현백터는 pcDNA3.1과 pJDK이다. pcDNA3.1(Invitrogen, CA, USA)은 상업적으로 구입이 가능하며, cytomegalovirus immediate early (CMV IE) 유전자의 프로모터를 갖고 있어 유전자 발현



**Fig. 1.** Schematic diagram of pJDK vector.

효율이 높아 일반적으로 널리 쓰이는 plasmid이다. pJDK는 본 교실에서 제작한 plasmid로서 CMV promoter와 AAV의 ITR을 포함하는 벡터이며, 인체 사용이 가능하도록 selection marker로 ampicillin resistance gene 대신 kanamycin resistance gene이 삽입되어 있다 (Fig. 1). pcDNA3.1와 pJDK에 CAT, human VEGF<sub>165</sub>, CTGF cDNA를 삽입하여 pcDNA3.1-CAT, pJDK-CAT, pJDK-hVEGF<sub>165</sub>, pJDK-CTGF를 제작하였다.

#### Plasmid preparation

Plasmid DNA는 *Escherichia coli*에 전이시키고 정제된 plasmid DNA를 plasmid purification Mega kits (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 통해서 분리 후 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

#### *In vitro* gene transfection and CAT assay

HeLa세포(ATCC ; CCL-2), C<sub>3</sub>H mice의 골격근아

세포주인 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>(ATCC ; CRL-1772) 세포를 DMEM/10% FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL, CA, USA) 배양액 하에서 12웰 플레이트에  $1.5 \times 10^4$ 개로 깔아 준 후 1일 후 트랜스펙션 실험을 수행하였다. 마이크로튜브 내에 pcDNA3.1-CAT과 pJDK-CAT 각각 2 µg과 FuGENE6(Roche, Switzerland)를 1 : 3(v/v)의 비율로 혼합하고, 실온에서 15분간 반응시킨 다음 리포플렉스(lipoplex)를 HeLa세포 또는 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>세포의 배양액에 점적하였다. 48시간 배양 후 세포를 모아 CAT 정량을 하였다. 세포를 4℃ PBS로 씻어 준 후 200 µL의 CAT 용균 완충액(lysis buffer)에 처리하였다. 세포를 스크래퍼로 긁어 모은 후 얼음에서 30분간 반응시켰다. 이후 4℃에서 20분간 13,000 rpm의 속도로 원심분리 하였다. 부유액을 1/10 내지 1/100 희석 후 CAT의 양을 CAT ELISA kit(Boehringer Mannheim, CA, USA)를 이용하여 정량하였다.

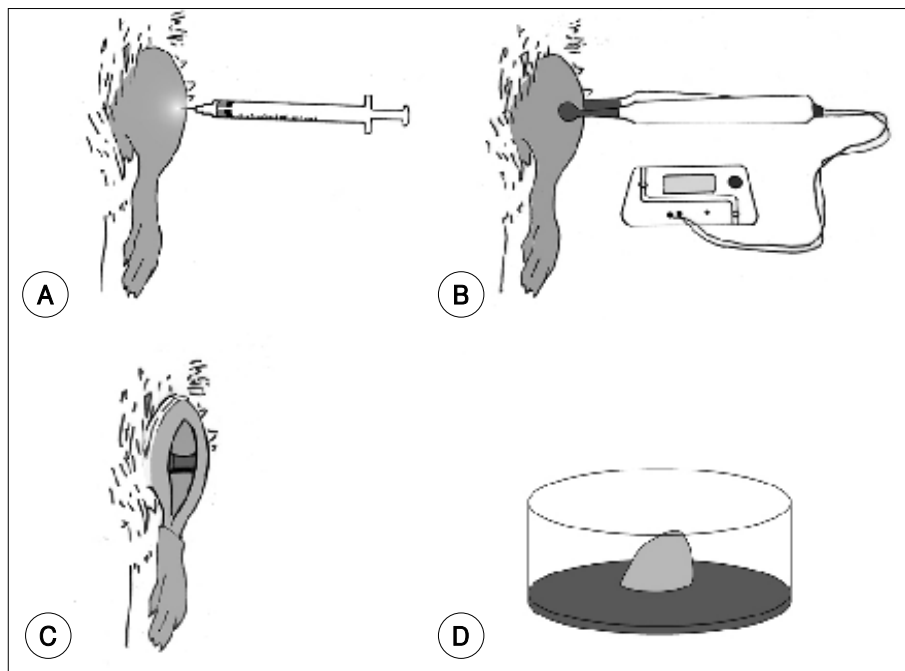
### Naked DNA injection and electroporation

동물실험은 미국 국립보건연구원(Guide for the care and use of laboratory animals, NIH publication No. 85-2, revised 1996) 및 삼성서울병원 임상의학연구소의 동물실험규칙에 따라 실시하였다. 생후 12주 수컷 BALB/C mice를 2.215 mg의 Ketamine (Ketalar<sup>®</sup> 50 mg/mL, Yuhan Co, Korea)과 0.175 mg의 Xylazine (Rompun<sup>®</sup> 23.32 mg/mL, Bayer, Korea)을 혼합한 용액을 0.1 mL복강 내로 주입하여 마취하였다. Hair cutter를 이용하여 mice의 하복부와 양쪽 하지의 털을 어느 정도 제거하고 depilatory cream을 충분히 바른 후에 알코올을 적신 거즈로 문질러 남은 털을 완전히 제거하였다. 대상 naked DNA를 30  $\mu$ L half saline에 녹여 30 gauge insulin syringe를 이용하여 mice의 정강근 (tibialis anterior muscle)에 주사하였다. 주사시 P10 튜브를 바늘의 끝에 끼워 주사의 깊이를 3 mm로 유지하였다. 주사 후 전기자극기 (electroporator, ECM830, The BTX Division of Genetronics, Inc, San Diego,

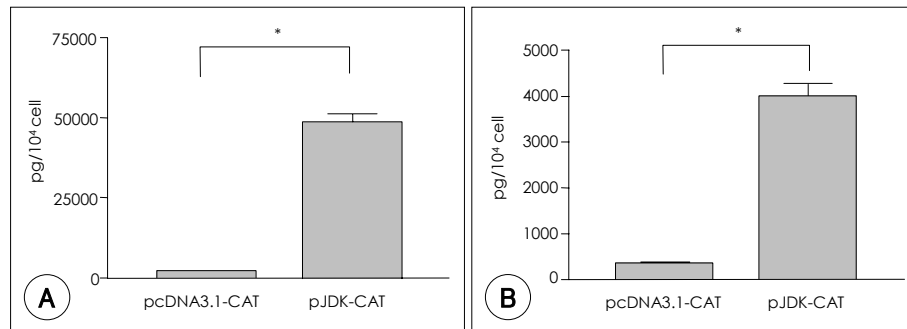
CA, USA)를 사용하여 전기자극을 주사부위에 직각으로 가하였다(Fig. 2). 전기자극의 parameter로는 125 V/cm, 50 ms, 8회, 1 Hz를 사용하였다.<sup>15)</sup> CAT assay는 적출한 tibialis anterior muscle을 2 mL의 CAT lysis buffer에 넣고 homogenize 후 CAT ELISA kit를 이용하여 정량하였다.

### Skeletal muscle Matrigel embedding *ex vivo* model

Naked DNA를 전기자극으로 전달 후 2일 후에 mice를 희생시켜 양쪽 정강근을 적출하고 근육의 길이방향에 직각으로 잘라 2등분을 하였다. 잘라진 정강근을 3 mL의 PBS가 든 튜브에서 2시간 동안 넣어 세척하고 다시 PBS를 이용하여 3회 씻었다. Growth factor reduced Matrigel (Collaborative Biochemical Products, Becton Dickinson, Bedford, MA)을 4°C 에서 24 웰 플레이트에 200  $\mu$ L씩 주입하였다. 여기에 정강근의 잘린 면이 아래를 향하도록 하여 플레이트 바닥에 심고 37°C 에서 30분간 놓아두었다. 이 위에 M199, 2% heat-



**Fig. 2.** Procedures of skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay (A). Twelve-week-old BALB/C mice was anesthetized by intraperitoneal injection of mixture of ketamine and xylazine. After shaving of legs, 10  $\mu$ g DNA in 30  $\mu$ L of half Saline was injected into the tibialis anterior muscle with a 30-gauge insulin syringe (B). About thirty seconds after DNA injection, transcutaneous electric stimulus using electroporator (ECM 830) through two electrodes placed on the surface of the injection site (125 V/cm, 50 msec, 1 Hz, 8 times) were delivered (C). Mice were humanely killed 2 days after DNA transfer, tibialis anterior muscles were retrieved, cut in halves horizontally (D). Explanted muscle was embedded in growth factor-reduced Matrigel and it was covered with 1.5 mL of M199 medium containing 2% FBS and cultured in 37°C incubator for 14 days.



**Fig. 3.** Comparison of CAT expression between pcDNA3.1-CAT and pJDK-CAT in HeLa (A) and in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (B). The CAT level using pJDK-CAT was 28-fold and 12-fold higher than that of pcDNA3.1-CAT in HeLa and in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, respectively. The data are mean  $\pm$  SEM (n=4) (\* : p<0.05).

inactivated fetal bovine serum을 1.5 mL 주입한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다(Fig. 2).

### Morphological analysis of Matrigel

정강근을 Matrigel에 심은 후에 광학현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 정강근 주위로 Matrigel에서 자라나는 내피세포와 이들의 형태학적 변화를 1일 간격으로 관찰하였다. 혈관신생의 정량적인 분석을 위하여 현미경 15배의 배율 하에서 영상을 촬영한 다음 정강근 주변에서 내피세포가 튜브형성을 하여 자라난 모세혈관망의 면적을 ImageLab imaging software(MCM DESIGN, Denmark)를 사용하여 측정하였다.

### Mice hindlimb ischemia model

위에서 기술한 것과 동일하게 mice를 마취하고 양측 다리의 털을 완전히 제거하였다. 해부대 위에 mice를 올려 놓고 좌측 다리의 중간부위의 피부를 들어 올려서 해부가위로 피부를 절개한 후 박리하여 주변 지방조직을 제거하였다. 서혜부 상방으로 대퇴동맥을 찾아 동맥과 정맥을 같이 묶은 후 묶은 이하 부위의 혈관을 박리하여 완전히 제거하였다. Naked DNA를 20  $\mu$ g을 half saline 40  $\mu$ L에 녹여서 묶은 혈관 주위의 골격근(vastus medialis, adductor magnus)의 4곳에 나누어 10  $\mu$ L 씩 주사하였다. Mice의 수술부위를 봉합한 후 위에서 기술한 방법과 동일하게 전기자극을 가하였다. 이후 1일 간격으로 mice의 수술한 다리의 형태학적 변화를 관찰하고 Laser Doppler imaging(LDI)을 수술 10일 후에 촬영하였다.

### Laser Doppler imaging(LDI)

측정하고자 하는 mice를 5분 동안 heating pad 위에 올려 놓고 보온을 위하여 거즈로 충분히 덮어준 후 MoorLDI system(Moor instrument Inc, Wilmington, DE, United Kingdom)을 이용하여 다리의 flux image를 얻고 MoorLDI software를 이용하여 양측 다리의 LDI flux 값을 측정하였다.

### Statistical analysis

자료의 표시는 mean  $\pm$  SEM 으로 하였다. 두개의 그룹 간의 차이는 Mann-Whitney U test를 사용하고, 여러 그룹 간의 차이는 ANOVA와 Bonferroni's posthoc analysis를 사용하였고 유의수준은 p<0.05로 하였다.

## 결 과

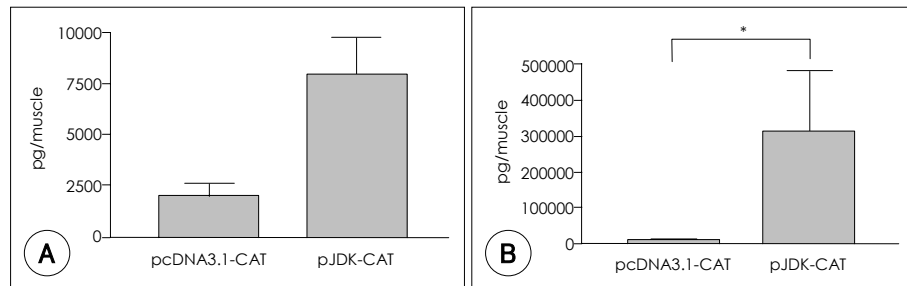
### pcDNA3.1과 pJDK의 유전자 발현 효율 비교

#### *In vitro* assay

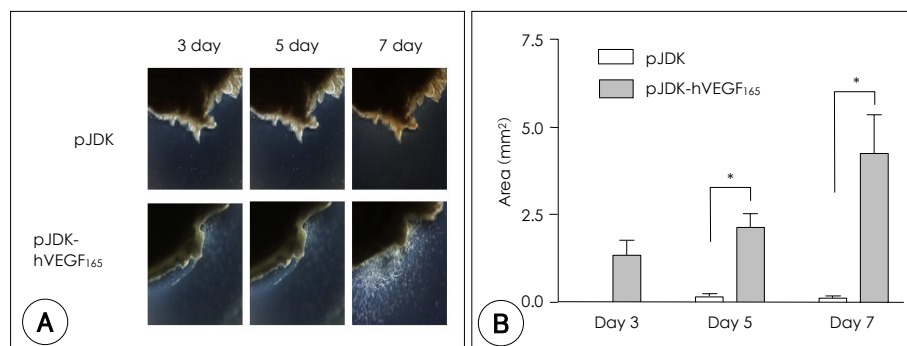
HeLa세포(n=4)에서의 pJDK에 의한 CAT 발현은 pcDNA3.1에 비하여 약 28배 높았으며(pcDNA3.1-CAT vs pJDK-CAT=1,711  $\pm$  11 vs 48,464  $\pm$  2,950 pg/10<sup>4</sup> cell, p=0.03), C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>세포(n=4)에서의 pJDK를 이용한 CAT 발현 역시 pcDNA3.1에 비하여 약 12배 높았다(pcDNA3.1-CAT vs pJDK-CAT=331  $\pm$  34 vs 3,987  $\pm$  290 pg/10<sup>4</sup> cell, p=0.03) (Fig. 3).

#### *In vivo* assay

pcDNA3.1-CAT와 pJDK-CAT DNA 10  $\mu$ g을



**Fig. 4.** Effect of electroporation on CAT expressions from pcDNA3.1-CAT and pJDK-CAT (A). Without electroporation, the CAT level of pJDK-CAT was 3-fold higher (B). With electroporation, the CAT level of pJDK was 33-fold higher than that of pcDNA3.1-CAT. The data are mean  $\pm$  SEM (n=5) (\* :  $p < 0.05$ ).



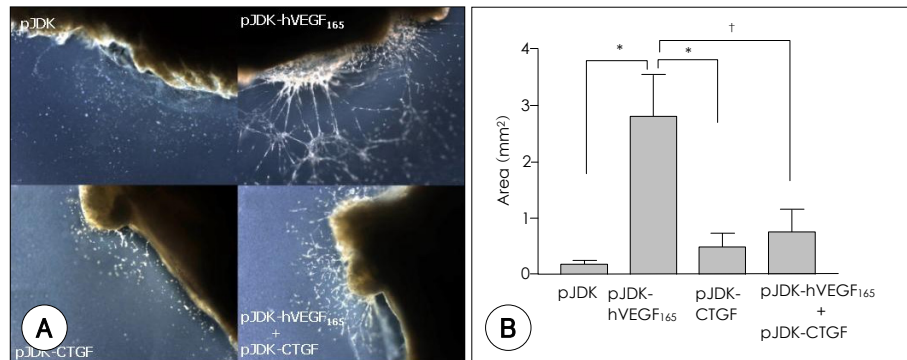
**Fig. 5.** Comparison of pJDK-hVEGF<sub>165</sub> with pJDK for degree of sprouting around the explanted muscle (A). Sprouting vessels from the explanted muscles were observed over time in pJDK-hVEGF<sub>165</sub>-injected group while little endothelial mobilization or tube formation was seen in pJDK group (B). Measurement of the area of capillary network. pJDK-hVEGF<sub>165</sub> group showed significantly larger area of capillary network than pJDK group (n=8) (\* :  $p < 0.05$ ).

30  $\mu$ L의 half saline에 녹여 전기자극을 가하지 않고 정강근(n=5)에 주사한 후 CAT 발현량을 측정한 결과 pJDK에 의한 CAT 발현은 pcDNA3.1에 비하여 3배 높은 소견을 보였지만 유의하지 않았다(pcDNA3.1-CAT vs pJDK-CAT=2,030 $\pm$ 683 vs 6,238 $\pm$ 3,692 pg/muscle,  $p=0.69$ ). 그러나 pJDK-CAT 주입 후 전기자극을 가한 경우 pJDK에 의한 CAT 발현은 pcDNA3.1에 비하여 약 33배 높았다(pcDNA3.1-CAT vs pJDK-CAT=9,299 $\pm$ 2921 vs 312,216 $\pm$ 175,366 pg/muscle,  $p=0.01$ ). 전기자극에 의해 pcDNA3.1-CAT는 약 4배 유전자 발현이 증가되었으나, pJDK는 50배 유전자 발현이 증가되었다(Fig. 4). 따라서 pJDK는 기존에 널리 사용되는 유핵발현벡터인 pcDNA3.1에 비하여 유전자 전달 효율이 높아 매우 좋은 고효율의 벡터임을 알 수 있었다. 따라서 이하의 실험들은 모두 pJDK를 이용하여 진행되었다.

#### Angiogenic effect of VEGF in skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay

Naked DNA를 전기자극으로 전달한 골격근이 유용한 혈관신생의 모델이 될 수 있는지를 평가하기 위하여 대표적인 혈관신생인자인 pJDK-hVEGF<sub>165</sub> 10  $\mu$ g와 pJDK 10  $\mu$ g을 30  $\mu$ L의 half saline에 녹여 각 군에 2마리씩 모두 4마리의 mice의 양측 정강근에 주입한 후 전기자극을 위와 같은 최적의 조건으로 가하여 2일 후에 정강근을 적출하여 이를 2등분하여 각 군당 8개의 단편을 만들고 Matrigel에 심어 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay를 만들어 시간에 따른 변화를 관찰하였다.

현미경으로 관찰한 결과 pJDK만을 주입한 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay의 정강근의 주변에서는 시간이 지남에 따라 큰 변화가 관찰되지 않았지만 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 주입한 정강근 주변의 Matrigel에서는 활발한 내피세포의 이동과 튜브형성을 통한 모



**Fig. 6.** Attenuation of angiogenic activity of VEGF by CTGF in skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay (A). Photograph of muscle explant culture at day 7. Little sprouting vessels were seen in pJDK and pJDK-CTGF groups, while extensive sprouting was observed in pJDK-hVEGF<sub>165</sub> group. Modest sprouting was seen in the group treated with both VEGF and CTGF (B). Comparison of quantitative integrated area of sprouting vessels in each group. The data are mean  $\pm$  SEM (n=8) (\*:  $p < 0.05$ , †:  $p = 0.06$ ), VEGF: vascular endothelial growth factor, CTGF: connective tissue growth factor.

세혈관망의 형성이 관찰되었다. 이러한 내피세포의 이동은 3일 경과 후부터 시작하여 모세혈관망의 발달은 7일째 최고조에 달하였고 14일째까지 안정적인 상태를 유지했다. 이러한 과정은 Matrigel에 심은 정강근 주변으로 내피세포가 이동한 후 이들이 주위 세포들과 반응하여 길쭉한 모양으로 변하고 서로 연결되어 그물과 같은 모세혈관망을 이루면서 진행되었다. 7일 후에 이러한 정강근 주변 모세혈관망의 평균면적을 계산한 결과 pJDK군에서는  $0.20 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ 인 반면 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 주사한 군에서는  $2.79 \pm 0.77 \text{ mm}^2$ 으로 10배 이상 의미있게 넓었다( $p < 0.001$ ) (Fig. 5). 이와 같은 결과로 보아 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay는 VEGF<sub>165</sub>의 혈관신생능을 평가할 수 있는 유용한 방법임을 알 수 있었다. 다음으로 이러한 기법을 사용하여 혈관신생능에 대한 상반된 보고가 있는 CTGF를 대상으로 실험하였다.

#### Angiogenic effect of CTGF in skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay

CTGF는 내피세포에 대하여 혈관신생을 일으키는 것으로 보고되었으나<sup>16)</sup> 최근에는 VEGF의 작용을 길항하여 혈관신생을 억제한다는 상반된 보고가 있어 그 작용기전이 확실하지 않은 상태이다.<sup>17)</sup> 따라서 본 연구에서 개발한 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay를 사용하여 CTGF의 혈관신생능력과 VEGF와의 상호작용을 알아보았다.

위와 같은 방법으로 mice를 각군에 2마리씩 4군으로 나누어 각군에 DNA의 총량이 20  $\mu\text{g}$ 이 되도록 pJDK 20  $\mu\text{g}$ , pJDK-hVEGF<sub>165</sub> 10  $\mu\text{g}$ +pJDK 10  $\mu\text{g}$ , pJDK-CTGF 10  $\mu\text{g}$ +pJDK 10  $\mu\text{g}$ , pJDK-hVEGF<sub>165</sub> 10  $\mu\text{g}$ +pJDK-CTGF 10  $\mu\text{g}$ 을 30  $\mu\text{L}$ 의 half saline에 녹여 혼합하여 주사하고 7일째에 모세혈관망의 형태학적 변화를 관찰하였다. pJDK-CTGF를 단독으로 투여한 정강근의 주변에서는 pJDK를 투여한 군과 유사한 정도로 모세혈관망의 발달이 미미했다. pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 투여한 군에서는 활발한 모세혈관망의 발달이 보였으나 pJDK-CTGF와 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 혼합 투여한 군에서는 pJDK만을 투여한 군과 거의 같은 정도로 모세혈관망의 발달이 미미하여 pJDK-CTGF에 의해 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>의 역할이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(pJDK vs pJDK-hVEGF<sub>165</sub> vs pJDK-CTGF vs pJDK-hVEGF<sub>165</sub>+pJDK-CTGF =  $0.19 \pm 0.06$  vs  $2.75 \pm 0.76$  vs  $0.49 \pm 0.24$  vs  $0.76 \pm 0.40 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 6). 즉 CTGF의 혈관신생능에 대해 서로 상반된 보고가 있었으나, 본 연구의 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay를 이용하여 평가한 결과 CTGF는 혈관신생 억제인자임을 알 수 있었다.

#### Angiogenic effect of CTGF in mice hindlimb ischemia model

Skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay에서 나타난 CTGF의 혈관신생 억제능이 실제 질환모델에서도

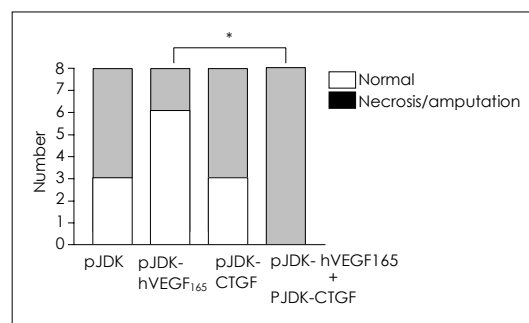


그대로 재현되는지를 알아보기 위하여 말초동맥질환의 동물 모델인 mice hindlimb ischemia model을 이용하였다. Mice를 각군에 8마리씩 4군으로 나누어 각군에 DNA의 총량이 20  $\mu$ g이 되도록 pJDK 20  $\mu$ g, pJDK-hVEGF<sub>165</sub> 10  $\mu$ g+pJDK 10  $\mu$ g, pJDK-CTGF 10  $\mu$ g+pJDK 10  $\mu$ g, pJDK-hVEGF<sub>165</sub> 10  $\mu$ g+pJDK-CTGF 10  $\mu$ g을 40  $\mu$ L의 half saline에 녹여 혼합하여 4곳에 나누어 주사하고 전기자극을 가한 후 형태학적 변화와 LDI flux ratio를 시간별로 측정하였다.

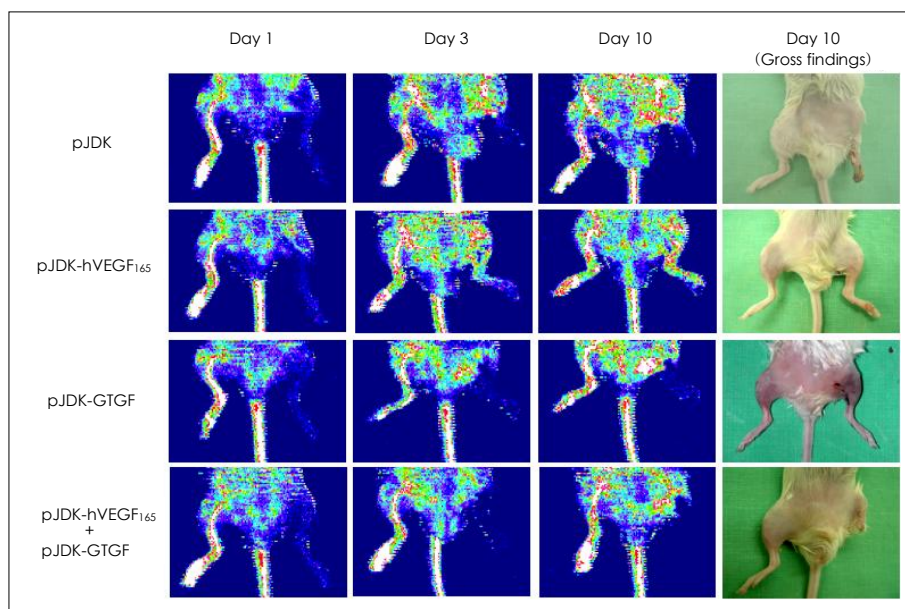
#### 형태학적 변화

Mice의 대퇴동맥을 제거하고 난 후의 다리는 매우 심한 청색증의 소견을 보였다. 시간이 경과함에 따라 서서히 혈관신생에 의하여 혈류의 흐름이 재개되는 mice에서는 3일째부터 청색증이 점차 호전되어 10일 정도에는 수술 전과 구별할 수 없을 정도로 거의 완전한 회복이 되지만 혈류가 회복되지 않는 mice에서는 수술 후 3~5일 경부터 심한 괴사의 소견을 보이며 심한 경우 스스로 절단되는 양상을 보였다. 유전자 투여 후 10일째 수술한 다리의 형태학적 변화를 정상인 군과 절단 혹은 괴사된 2개의 군으로 나누어 관찰하였다. pJDK-hVE-

GF<sub>165</sub>를 단독으로 투여한 군에서는 8마리 중 6마리 (75.0%)가 형태학적으로 정상 소견을 보여 주었으며 2마리(25.0%)에서 절단 혹은 괴사소견을 보였다. pJDK를 투여한 군에서는 8마리 중에서 3마리(37.5%)만이 정상 형태를 나타내었고 pJDK-CTGF의 경우도 pJDK군과 유사하였다. 특히 pJDK-CTGF와 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 혼합 투여한 군에서는 8마리(100%) 모두 절단 혹은 괴사된 소견을 보였다. 따라서 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>

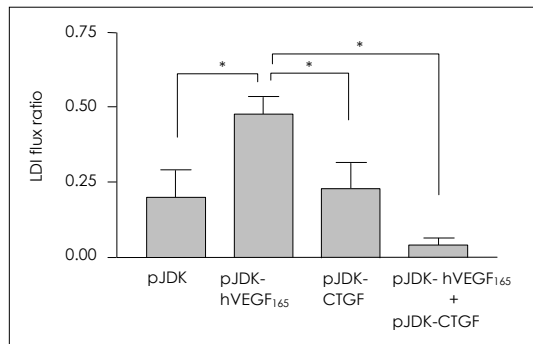


**Fig. 7.** Limb necrosis in pJDK, pJDK-hVEGF<sub>165</sub>, pJDK-CTGF, and pJDK-hVEGF<sub>165</sub>+pJDK-CTGF groups. Mice treated with pJDK-hVEGF<sub>165</sub> had normal limb in most cases (6 of 8 mice), however, all mice treated with pJDK-hVEGF<sub>165</sub>+pJDK-CTGF showed limb necrosis or autoamputation at day 10 (n=8) (\* : p<0.05).



**Fig. 8.** Laser Doppler imaging (LDI) of hindlimb blood flow and gross findings in mice with hindlimb ischemia : one day after femoral artery ligation, marked reduction in blood flow in affected hindlimb was depicted in blue. In pJDK-hVEGF<sub>165</sub> group, perfusion restored from day 3 and completely recovered by day 10 with nearly normal gross finding. In contrast to pJDK-hVEGF<sub>165</sub> group, flow recovery was not observed in pJDK-hVEGF<sub>165</sub>+pJDK-CTGF group at day 10, and all mice in this group showed necrosis or autoamputation.





**Fig. 9.** LDI flux ratio among pJDK, pJDK-hVEGF<sub>165</sub>, pJDK-CTGF, and pJDK-hVEGF<sub>165</sub>+pJDK-CTGF groups : differences in flow recovery were statistically significant at day 10 (\* :  $p < 0.05$ ). The data are mean  $\pm$  SEM (n=8).

를 단독으로 투여한 군에서는 pJDK-CTGF를 혼합 투여한 군에 비해 형태학적으로 정상인 경우가 유의하게 많았다( $p < 0.05$ ) (Fig. 7).

#### LDI flux ratio

Mice의 좌측 다리를 수술한 직후에 촬영한 LDI 영상에서는 확연하게 혈류가 감소한 것을 볼 수 있었다. 혈관신생에 의해 유전자 주입 후 3일이 경과하면서 부분적인 혈류 회복이 일어나고 10일째에는 혈류 회복이 거의 완전한 수준으로 되는 것을 관찰할 수 있었지만 혈관신생이 일어나지 못한 mice에서는 지속적으로 혈류 부족이 관찰되었다(Fig. 8). Naked DNA의 종류에 따라 구분한 4개의 군에서 10일째에 측정된 수술한 다리의 LDI flux 값을 정상인 다리의 LDI flux 값으로 나누어 flux ratio를 구하였다. 여기에서도 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 단독으로 투여한 군에서 flux ratio가  $0.48 \pm 0.06$ 으로 가장 높았으며 pJDK-CTGF와 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 동시에 투여한 군에서  $0.04 \pm 0.02$ 로 매우 의미있게 낮았다( $p < 0.01$ ) (Fig. 9).

따라서 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay에서 CTGF에 대해서 확인된 결과가 실제 혈관신생 유전자가 치료목적으로 사용되는 질환 동물 모델인 mouse hindlimb ischemia model에서도 그대로 재현됨을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

본 연구에서는 효율적인 혈관신생 유전자 치료 개발

에 사용될 수 있는 혈관신생 유전자를 직접 전달한 혈관신생 평가 시스템을 개발하여 다음의 결과를 얻었다. 첫째, CMV 프로모터와 ITR을 포함한 유핵발현벡터인 pJDK 벡터는 pcDNA3.1에 비해 유전자 전달 효율이 높았다. 둘째, skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay를 개발하였으며, 셋째, 이를 이용하여 CTGF가 혈관신생억제 효과가 있음을 밝혀내었고, 넷째, skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay 결과가 실제 질환 모델인 mice hindlimb ischemia model에서도 그대로 재현됨을 확인하였다. 따라서 pJDK 벡터와 전기자극을 이용한 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay는 매우 간편하고 정량적인 새로운 혈관신생 평가 시스템을 알 수 있었다.

본 연구에서는 사용된 pJDK는 기존에 널리 사용되는 CMV 프로모터를 갖는 유핵발현벡터인 pcDNA3.1에 비하여 *in vitro*, *in vivo* 실험에서 유전자 전달 효율이 약 10~30배 가량이 높은 것으로 나타났다. 이는 강력한 바이러스 프로모터인 CMV 프로모터, 전핵발현벡터의 유전자 발현을 증가시키는 것으로 알려진 ITR, 그리고 전사 RNA의 안정성을 증가시킨다고 알려진 BGH의 폴리아데닐레이션 신호들 간의 상호작용에 기인할 것으로 생각된다.<sup>11)</sup> ITR은 145 bp의 palindromic 구조로 되어 있으며 AAV의 복제와 염색체의 integration에 관여한다. 그러나 아직 naked DNA의 유핵발현벡터에 ITR 첨가시 유전자 발현을 증가시키는 기전은 알려져 있지 않다. 또한 유전자를 주입한 skeletal muscle에 전기자극을 가한 경우에는 가하지 않은 경우보다도 pJDK에 의한 CAT 유전자의 발현이 pcDNA3.1에 의한 것보다 높은 양상을 보였다. 따라서 pJDK 벡터는 생체내외에서 유전자 전달효율 및 발현 효율이 pcDNA3.1에 비해 우수함을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서 전기자극에 의한 pcDNA3.1의 유전자 전달이 전기자극을 시행하지 않은 경우보다 약 4배 정도 밖에 증가하지 않았는데, 기존의 연구결과에 따르면 전기자극에 의해 유전자 전달 효율이 수십 배 이상 증가하는 것으로 되어 있어 본 연구의 결과는 이에 비하면 전기자극에 의한 증가량이 비교적 적은 것으로 나타났다. 이는 본 연구에서 사용한 전기자극의 변수들이 타 연구와 다르기 때문으로 생각된다.

지금까지 잘 알려진 혈관신생인자로는 acidic and basic fibroblast growth factors(aFGF and bFGF), epidermal growth factor(EGF), transforming growth

factors(TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ), prostaglandin E<sub>2</sub> (PG E<sub>2</sub>), monobutyrin, tumor necrosis factor(TNF- $\alpha$ ), platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), angiogenin and interleukin-8등이 있다.<sup>18)</sup> 이렇게 다양한 혈관신생유전자들의 혈관신생능을 평가하기 위한 *ex vivo* model로서 rat-aortic ring assay 와<sup>19)</sup> chorioallantoic membrane(CAM) assay 등이<sup>20)</sup> 있는데 이러한 방법들은 주로 혈관신생인자들로 유전자가 아니라 단백질 형태를 사용한다. 그러나 혈관신생인자를 단백질 형태로 적용하기가 어려운 경우가 있으며 특히 단백질 정제에 어려움이 있는 경우 사용이 불가능하다. 혈관신생능을 평가하는 *in vivo* model로서 mice, rat, rabbit 을 이용한 microangiography, Doppler ultrasonography, special tissue staining, Matrigel implant assay, LDI flux imaging 등의 방법들이 있다.<sup>21-26)</sup> 이러한 대부분의 실험방법이 복잡하고 시간이 오래 걸리며 특히 주변 조건에 의해 많은 영향을 받아 실질적인 평가에 많은 제한점을 가지고 있다. 이중 mice ischemia hindlimb ischemia model은 비교적 쉽게 만들 수 있고 LDI를 이용한 flux ratio는 혈관신생의 정도를 비침습적으로 객관적 정량화가 가능하다는 장점이 있어 많이 사용되고 있다.<sup>24)</sup> 그러나 역시 *in vivo* model의 특성상 수술적 기법이 필요하고 주변 환경과 여건에 따라 많은 변수가 존재하여 일관된 결과를 얻기가 힘들며 여러 종류의 혈관신생인자의 단독 혹은 복합 사용의 평가를 위해서는 비교적 많은 시간과 노력이 소모되는 단점이 있다. 반면에 본 연구에서 제시하는 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay는 기존 실험방법에 비하여 다음과 같은 장점들을 가지고 있다. 첫째, 만들기가 매우 간편하고 신생혈관을 실시간으로 관찰하면서 시간에 따른 정량적인 측정을 반복할 수 있으며, 둘째, 여러 종류 혈관신생인자들을 동시에 평가할 수 있고, 셋째, 혈관신생 자극물질로서 위에서 기술한 naked DNA 이외에도 단백질이나 약물도 쉽게 사용할 수 있으며, 넷째, 혈관신생을 자극하는 물질 뿐만 아니라 억제하는 물질도 같이 사용하여 혈관신생 혹은 억제인자 간의 상호작용을 쉽게 알 수 있고, 마지막으로 골격근은 실제 PAOD 환자에서 치료의 목표가 되는 장기로서 본 모델에서는 유전자 전달의 목적으로 골격근을 실제로 사용한다는 것들이다.

본 연구의 대상인 CTGF는 CTGF/cysteine-rich 61/

nephroblastoma over-express gene의 한 종류로 주로 fibroblast를 자극하여 extracellular matrix의 생성을 증가시켜 조직 섬유화를 일으키고 동맥경화의 발현에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.<sup>27-29)</sup> 또한 CTGF는 metalloproteinase-2, fibronectin, collagen type I 등의 분비를 증가시키고 내피세포를 자극하여 혈관신생을 촉진한다고 알려져 있다.<sup>16)</sup> 그러나 최근 연구 결과에 의하면 CTGF는 VEGF와 같이 작용할 경우 extracellular matrix 내에서 VEGF와 CTGF의 단백질 간의 결합으로 VEGF의 작용을 방해하여 결과적으로 혈관신생을 오히려 억제한다고 알려져 CTGF의 혈관신생능에 관해서는 서로 상반된 보고가 있어 왔다.<sup>17)</sup> 본 연구의 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay에 의하면 CTGF와 VEGF를 동시에 유전자로 투여하는 경우 VEGF에 의한 모세혈관망 발달이 CTGF에 의해 확연하게 억제되는 것으로 나타났다. 또한 이러한 변화는 PAOD의 동물 모델인 mice hindlimb ischemia model에서도 재현되었다. 그러나 본 연구에서 주입한 CTGF가 실제로 골격근에서 발현하였는지를 정량화하지 않았으므로 이의 확인을 위해서는 CTGF의 발현을 mRNA 수준에서 보거나 생산된 단백을 Western blot, ELISA 등의 방법으로 검증이 필요하다.

본 연구의 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay는 이러한 장점에도 불구하고 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫째로, 본 모델은 mouse hindlimb ischemia model과 같은 진정한 허혈성 병리학적 상태가 아니므로 허혈상태에서 발현되는 다양한 혈관신생 유전자들의 과발현에 의한 효과가 제대로 반영되지 않는다. 따라서 향후 연구를 통하여 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay를 허혈조건 하에 배양하는 방법이 개발되면 이러한 제한점을 극복할 수 있을 것으로 생각된다. 두 번째로, 본 모델에서 얻은 결과는 골격근에서 국한되어 관찰되었던 것인데 실제 angiogenesis는 생체 내의 여러 부위에서 발생하므로 이러한 다른 조직에서의 혈관신생반응은 관련 물질이나 환경에 따라 골격근과는 다를 가능성이 있다는 것이다. 그러므로 향후 골격근 이외의 다른 조직에서도 이러한 유전자 전달 *ex vivo* model을 개발하여 여러 조직에서의 혈관신생능을 다양하게 관찰할 필요가 있다. 셋째, 본 모델에서 혈관신생의 모세혈관망의 발달은 실제로 Matrigel 내에서 3차원적으로 이루어지는 반면 현미경상에서 관찰하는 모세혈관

망의 면적은 2차원적이므로 정확한 모세혈관망의 발달을 평가하기에는 제한이 있다. 따라서 이를 위해서는 confocal microscopy 등을 이용한 3차원적인 새로운 정량적 측정방법의 개발이 요구된다. 넷째, 본 모델에서는 내피세포와 튜브형성, 모세혈관망의 생성이 잘 관찰되지만 이러한 세포들이 더욱 발달하여 실제로 혈관을 만드는 단계에 이르면 angiogenesis와 arteriogenesis를 구별하기 위해서 내피세포와 평활근세포를 구분할 수 있어야 하는데 현재의 모델에서는 단순히 현미경 상에서 이러한 구별을 하기가 어렵다. 따라서 Matrigel 내부에서 발생하는 tube-like structure의 구성 세포들을 구별할 수 있는 immunohistochemistry 방법 개발이 필요하리라 생각한다.

그러나 이러한 제한점에도 불구하고 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay은 위에서 열거한 많은 장점으로 인하여 여러 가지 유전자 뿐만 아니라 단백질, 약물과 같은 다양한 혈관신생인자들의 혈관신생능과 상호작용을 평가하는 screening test로서 매우 좋은 실험 기법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 유전자 전달 후 골격근 배양을 이용한 새로운 혈관신생 평가법(skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay)을 개발하였다. VEGF<sub>165</sub>는 skeletal muscle *ex vivo* angiogenesis assay에서 혈관신생을 유도함을 관찰할 수 있었으며, CTGF는 VEGF의 혈관신생능을 방해하여 혈관신생 억제인자로 작용하는 것으로 생각되나 향후 추가적인 연구가 필요하다.

## 요 약

### 배경 및 목적:

말초동맥질환 환자에게 시행되는 유전자 치료의 개발을 위해서 전기자극에 의해 유전자를 전달한 골격근을 이용하여 새로운 혈관신생 평가방법을 개발하였다.

### 방 법:

플라스미드 벡터 pJDK와 pcDNA3.1을 이용하여 CAT의 유전자 전달효율을 HeLa와 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포에서 비교하였다. 잘 알려진 혈관신생인자인 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 Balb/C mice의 정강근에 주입한 후 전기자극을 가하였

다. 2일 후 정강근을 적출하여 2등분한 후 성장인자가 제거된 Matrigel에 심어 배양하였다. 정강근 주변으로 새로이 자라나는 모세혈관망을 관찰하고 그 면적을 계산하여 혈관신생의 정도를 측정하였다. 이러한 *ex vivo* 모델을 이용하여 CTGF의 혈관신생능을 평가하여 보았다. 또한 CTGF를 mice-hindlimb ischemia model에도 적용하여 Laser Doppler imaging으로 혈관신생 정도를 평가하였다.

### 결 과:

pJDK는 pcDNA3.1에 비하여 HeLa와 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>세포에서 모두 높은 CAT 발현율을 보였다. pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 주입한 정강근의 주변에는 2일째부터 내피세포의 이동과 튜브구조의 형성이 시작되었고 이로 인한 모세혈관망의 발달은 7일째에 최고에 이르렀다. 모세혈관망의 면적은 pJDK 군에 비하여 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 주입한 군에서 유의하게 넓은 것으로 나타났다. pJDK-CTGF를 주입한 정강근에서는 모세혈관망이 거의 생성되지 않았으며 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>를 같이 주입한 경우에는 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>에 의한 모세혈관망의 발달을 억제하는 양상을 보였다. LDI flux ratio를 이용하여 평가한 mice-hindlimb ischemia model에서도 pJDK-CTGF는 pJDK-hVEGF<sub>165</sub>에 의한 혈류의 회복을 억제하는 것으로 나타났다.

### 결 론:

저자들은 전기자극에 의한 유전자 전달 골격근을 이용한 새로운 혈관신생 평가법을 개발하였다. CTGF는 VEGF의 역할을 방해하여 혈관신생을 억제하는 것으로 생각된다.

**중심 단어:** 유전자 치료; 혈관신생 분석법; 골격근; 전기자극; Vascular endothelial growth factor(VEGF); Connective tissue growth factor(CTGF)

본 논문은 과기부 국가지정연구실(NRL) 사업의 연구비(M1-0203-00-0048 to DK Kim)와 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비(01-PJ1-PG1-01CH06-0003 to DK Kim), 산자부 차세대 신기술 개발사업 연구비로 이루어 졌음.

## REFERENCES

- 1) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circul-*

- ation 1998;97:1114-23.
- 2) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. *Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomized trial. Lancet* 2002;359:2053-8.
  - 3) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. *Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF<sub>165</sub> as sole therapy for myocardial ischemia. Circulation* 1998;98:2800-4.
  - 4) Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. *Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF<sub>121</sub> cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. Circulation* 1999;100:468-74.
  - 5) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. *Angiogenesis gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. Circulation* 2002;105:1291-7.
  - 6) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. *Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Ther* 2001;8:181-9.
  - 7) Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med* 2000;6:389-95.
  - 8) Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. *Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2573-8.
  - 9) Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. *Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. Circ Res* 1998;83:233-40.
  - 10) Lee Y, Park EJ, Yu SS, Kim DK, Kim S. *Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: implication for gene therapy of ischemic diseases. Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:230-5.
  - 11) Miralles VJ, Cortes P, Stone N, Reinberg D. *The adenovirus inverted terminal repeat functions as an enhancer in a cell-free system. J Biol Chem* 1989;264:10763-72.
  - 12) Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4262-7.
  - 13) Aihara H, Miyazaki J. *Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. Nat Biotechnol* 1998;16:867-70.
  - 14) MacColl GS, Goldspink G, Bouloux PM. *Using skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. J Endocrinol* 1999;162:1-9.
  - 15) Lee MJ, Cho SS, Jang HS, Lim YS, You JR, Park J, Suh H, Kim JA, Park JS, Kim DK. *Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation. Exp Mol Med* 2002;34:265-72.
  - 16) Babic AM, Chen CC, Lau LF. *Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. Mol Cell Biol* 1999;19:2958-66.
  - 17) Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y. *Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. FASEB J* 2002;16:219-21.
  - 18) Folkman J, Klagsbrun M. *Angiogenic factors. Science* 1987;235:442-7.
  - 19) Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F. *Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. Nat Med* 1997;3:1203-8.
  - 20) Ribatti D, Gualandris A, Bastaki M, Vacca A, Iurlaro M, Roncali L, Presta M. *New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. J Vasc Res* 1997;34:455-63.
  - 21) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. *Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. J Clin Invest* 1994;93:662-70.
  - 22) Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. *Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. Circulation* 1994;90:11228-34.
  - 23) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. *Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Ther* 2001;8:181-9.
  - 24) Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B, Isner JM. *Mouse model of angiogenesis. Am J Pathol* 1998;152:1667-79.
  - 25) Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, Alizadeh N, Baetens D, Montandon D, Aebischer P, Pepper MS. *Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. Gene Ther* 2001;8:523-33.
  - 26) Ito Y, Iwamoto Y, Tanaka K, Okuyama K, Sugioka Y. *A quantitative assay using basement membrane extracts to study tumor angiogenesis in vivo. Int J Cancer* 1996;67:148-52.
  - 27) Bork P. *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. FEBS Lett* 1993;327:125-30.
  - 28) Grotendorst GR. *Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- $\beta$  action on fibroblasts. Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:171-9.
  - 29) Oemar BS, Luscher TF. *Connective tissue growth factor: friend or foe? Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1483-9.