

혈관내피성장인자에 의한 혈관에서 Interleukin-8 발현

¹차의과학대학교 의생명과학부, ²연세대학교 자연과학연구소 종양줄기세포연구실

신가희¹ · 박경순¹ · 정광희^{1,†} · 이태희^{2,†}

Up-regulation of Interleukin-8 by Vascular Endothelial Growth Factor in Vasculatures *in vivo*

Ga-Hee Shin, M.S.¹, Kyung-Soon Park, Ph.D.¹, Kwang-Hoe Chung, Ph.D.^{1,†} and Tae-Hee Lee, Ph.D.^{2,†}

¹Thrombosis and Vascular Biology Lab., Department of Medical Science, CHA University, Seongnam

²Laboratory of Cancer & Stem Cell Biology, Natural Science Institute, Yonsei University, Seoul, Korea

Background: Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays an essential role in promoting angiogenesis during tumor development. In addition, VEGF can mediate the inflammatory response in tumors. VEGF increases the level of neutrophil migration by upregulating interleukin-8 (IL-8) in endothelial cells *in vitro*. However, it is unclear if VEGF can mediate IL-8 production *in vivo*.

Methods: To address this issue, this study examined the effect of VEGF on IL-8 production *in vivo* using an adenovirus transduction and mouse ear assay.

Results: Adenovirus-encoded VEGF (VEGF-Ad) increased the level of IL-8 production in endothelial cells *in vitro* compared to the control-adenovirus (CTL-Ad). The mouse ear assay showed that VEGF-Ad increased the level of IL-8 production in the endothelium. Immunohistochemistry showed that the IL-8 proteins were expressed in the vasculature within a human glioblastoma, which is known to strongly express VEGF.

Conclusion: These results suggest that VEGF can mediate the inflammatory response in endothelial cells *in vivo* via the up-regulation of IL-8. (*Korean J Hematol* 2009;44:199-204.)

Key Words: Vascular endothelial growth factor, Interleukin-8, Endothelial cells, Chemokine, Inflammation

서 론

혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 암세포들에 의해 이루어지는 혈관신생(angiogenesis)에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{1,2)} 즉, 암세포의 성장은 혈관 생성을 유도하는 암세포의 능력에 비례하는 것으로서 VEGF는 유방암(breast cancer),

뇌종양(brain tumor), 난소암(ovarian cancer) 등 알려진 거의 모든 종류의 암세포에서 발현되는 것으로 보고되고 있다.³⁻⁶⁾ 그러므로 VEGF 억제 물질은 혈관 신생을 억제하여 암세포의 성장을 저해할 수 있다.⁷⁾

VEGF는 암세포들이나 기타 세포들에 의해 생성된 후 내피세포(endothelial cells)에 작용하거나(paracrine) 또는 내피세포 자체에서 생성되어 같은 내피세포에 작용함으로써(autocrine) 효과를 발휘한다. 이런 효과들

접수 : 2009년 11월 27일, 수정 : 2009년 12월 7일

승인 : 2009년 12월 10일

교신저자 : 정광희, 경기도 성남시 야탑동 222번지

☎ 463-836, CHA의과학대학교 의생명과학과

Tel: 031-725-8379, Fax: 031-725-8350

E-mail: hoe@cha.ac.kr

이 논문은 2007년 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구이다(KRF-2007-313-C00722).

[†]공동교신저자.

Correspondence to : Kwang-Hoe Chung, Ph.D.

Thrombosis and Vascular Biology Lab., Department of Medical Science, CHA University

222, Yatap-dong, Seongnam 463-836, Korea

Tel: +82-31-725-8379, Fax: +82-31-725-8350

E-mail: hoe@cha.ac.kr

[†]These corresponding authors contributed equally to this work.

을 발현하기 위해서 VEGF는 내피세포의 표면에 존재하는 수용체인 VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 혹은 neuropilin-1 (NRP-1) 등과 결합하는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 이들 수용체중에서 VEGFR-2가 VEGF에 의한 내피세포의 신호전달에 핵심 역할을 하는 것으로 보고되었다. 즉, VEGF는 내피세포 표면에 있는 VEGFR-2와 결합하여 내피세포의 성장(proliferation), 생존(survival), 흡착(adhesion), 이동(migration), 맥관형성(tube formation) 등 혈관생성의 알려진 거의 모든 단계에 관여한다. 실제로 VEGFR-2의 인산화 활성화(tyrosine kinase activity)를 억제하는 화합물들은 혈관신생을 강력히 억제 하는 것으로 밝혀졌고, 이들 억제제들은 암환자들에 대한 임상 실험에서 그 효능이 증명되고 있다.⁹⁾

한편 VEGF는 종양에 의한 생체내 염증 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 암환자들에서 혈전의 위험성이 증가하는 것은 염증과 깊은 상관관계가 있을 것으로 보고되었다.¹¹⁾ 염증을 유발하는 인자들중에는 케모카인(chemokine)으로 알려져 있는 저분자 단백질들이 있다. 지금까지 알려진 케모카인들은 44종류이고 그 수용체는 21개 정도로 알려져 있는 단백질 군집을 이루고 있다.¹²⁾ VEGF는 이들 케모카인의 일종인 SDF-1과 MCP-1의 발현을 증가시켜 백혈구등의 면역세포를 염증유발 자리로 이동을 유도하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 더욱이 VEGF는 혈관내피세포에서 IL-8의 발현을 증가시켜 호중구의 이동을 유도하는 것으로 밝혀졌다.¹⁴⁾ 하지만 VEGF가 혈관내피세포에서 IL-8의 발현을 증가시키는 것은 오직 in vitro에서만 보고되었다. 본 연구에서는 VEGF가 생체에서 실제로 IL-8의 발현에 관여하는지 여부를 연구하는 것을 주요 목표로 설정하였다.

대상 및 방법

1. 연구계획

VEGF 발현 아데노바이러스를 이용하여 VEGF가 생체에서 IL-8의 발현을 유도함을 증명하고 실제 질환에서 VEGF와 IL-8 발현의 상관성을 연구함을 목적으로 한다.

2. 연구대상선택

생쥐의 양쪽 귀에 아데노바이러스를 주입하는 방법을 통하여 생체에서의 VEGF에 의한 IL-8 발현 검증과 VEGF가 과량 발현하는 것으로 알려진 악성뇌종양에

서의 IL-8의 발현을 조직염색법을 이용하여 연구를 수행했다.

3. 연구 방법

1) VEGF 발현 아데노바이러스(Ad)

VEGF-Ad와 CTL-Ad는 Harvard Medical School의 Harold Dvorak 박사로부터 분양받았다.

2) 세포배양

HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)은 Cambrex사에서 구입하였고 EBM-2 배지에서 배양되었다.

3) Western blot 분석

전기영동법은 기존에 보고된 방법에 의해 수행되었다.¹⁵⁾

4) ELISA 분석법에 의한 IL-8 정량

HUVEC을 6-well 판에서 subconfluent하게 배양하였다. 그 후 성장인자가 제거된 EBM-2 배지에 5시간 배양한 후 VEGF-Ad 혹은 control-Ad 10 MOI (multiplicity of infection)를 처리하였다. 3일후 배양액을 수거

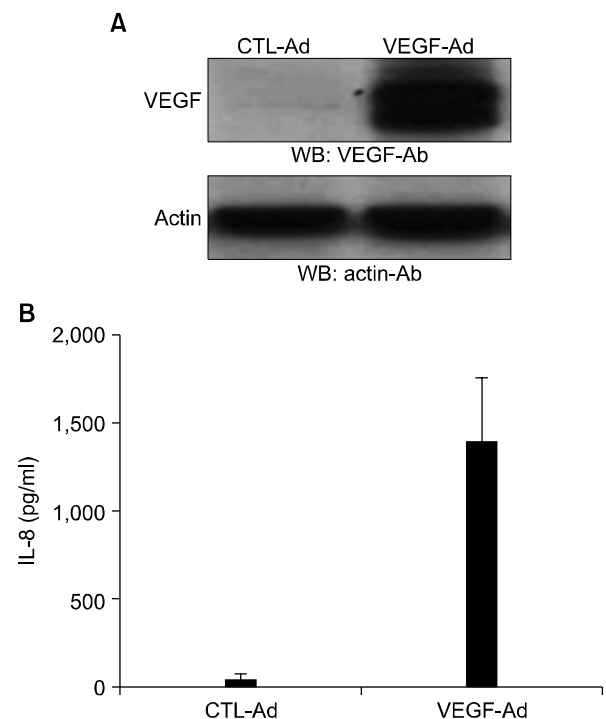


Fig. 1. IL-8 production by VEGF-Ad infection in HUVECs. HUVECs were grown subconfluently in 6-well plates and infected with 10 MOI of VEGF-Ad or CTL-Ad. After incubation of 3 days, cells were lysed and VEGF expression was examined by western blot analysis (A). Alternatively, supernatants were harvested and IL-8 proteins were measured by using ELISA (B).

한 후 R&D Systems사의 IL-8 정량용 ELISA 키트를 사용하여 IL-8 양을 측정하였다.

5) 생체내 IL-8 유도

생쥐의 귀에 VEGF-Ad 혹은 CTL-Ad 100 MOI를 미세주사기를 이용하여 주입하였다. 7일 후 생쥐를 안락사 한 후 귀를 절개하여 동결한 상태에서 5 μ m로 절편한 후 조직염색법으로 IL-8 발현을 확인하였다.

6) 조직 염색법

생쥐의 귀조직을 100% 원액의 차가운 메탄올로 10분간 고정시킨 후 차단용액(Dako Inc., Carpinteria, CA)으로 비특이적 결합부위들을 차단하였다. 그 후 IL-8,

VEGF, von Willebrand factor (vWF) 항체를 1 : 100으로 처리한 후 밤 새 반응시켰다. 생리식염수로 세 번 세척한 후 2차 항체를 1시간동안 반응시켰다. 생리식염수로 세 번 세척한 후 표본 용액으로 고정한 후 현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 혈관내피세포(HUVEC)에서 VEGF에 의한 IL-8 발현

제조된 VEGF-Ad가 VEGF를 발현시키는지 조사하

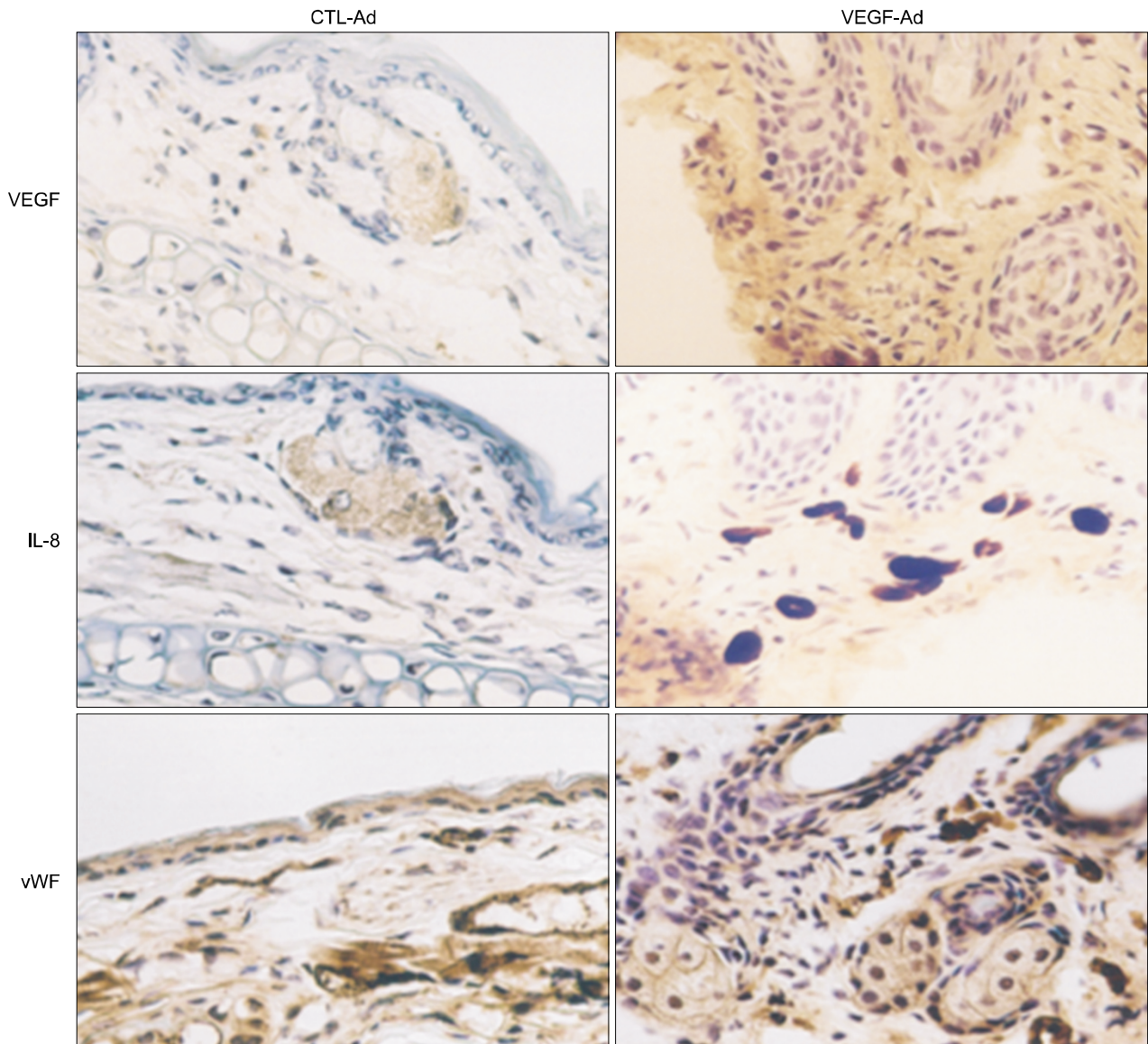


Fig. 2. IL-8 production by VEGF-Ad infection in mouse ears. Mouse ears were infected with 100 MOI of VEGF-Ad or CTL-Ad. After 7 days, mice were sacrificed and ears were excised to be frozen. The ears were cut into 5 mm and fixed with cold methanol. Immunohistochemistry was performed as described under "methods". vWF, von Willebrand factor.

기 위해 HUVEC에 VEGF-Ad를 3일간 감염시킨 후 세포를 lysis하여 전기영동을 시행하였다. Fig. 1A에서 보이는 것처럼 10 MOI의 VEGF-Ad를 감염시킨 HUVEC에서의 VEGF의 발현이 CTL-Ad에 비해 현격히 증가함을 알 수 있었다. 다음으로 VEGF-Ad에 감염된 HUVEC의 상층액을 수집하여 ELISA방법을 이용하여 IL-8의 양을 측정하였다. 그 결과 VEGF-Ad는 CTL-Ad에 비해 IL-8의 발현을 현격히 증가시킴을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이 결과는 재조합 VEGF 단백질이 혈관내피세포에서 IL-8의 발현을 유도한다는 이전보고와 일치하였다.¹⁴⁾

2. 생쥐의 귀조직에서 VEGF에 의한 IL-8 발현

VEGF가 생체에서 IL-8의 발현을 증가시키는지 조사하기 위해 VEGF-Ad와 CTL-Ad 100 MOI를 생쥐의 귀에 주입하였다. 7일후 생쥐의 귀를 절개한 후 동결절편을 만들어서 조직 염색을 시도하였다. Fig. 2에서 보이는 것처럼 VEGF-Ad를 주입한 조직에서 VEGF의 발현이 확인됨과 동시에 IL-8이 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러나 CTL-Ad를 주입한 조직에서는 VEGF와 IL-8이 발현하지 않았다(Fig. 2). 다음으로 발현된 IL-8이 귀조직의 혈관내피세포에서 유래함을 확인하기 위해 혈관내피세포 표식인자인 vWF와 같이 국소화(colocalization) 되는지 여부를 동일초점(confocal) 현미경을 이용하여 조사하였다. 그 결과 VEGF-Ad가 주입된 조직의 혈관에서 IL-8이 발현함을

확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과는 VEGF가 생체의 혈관조직에서 IL-8의 발현을 유도한다는 것을 명확히

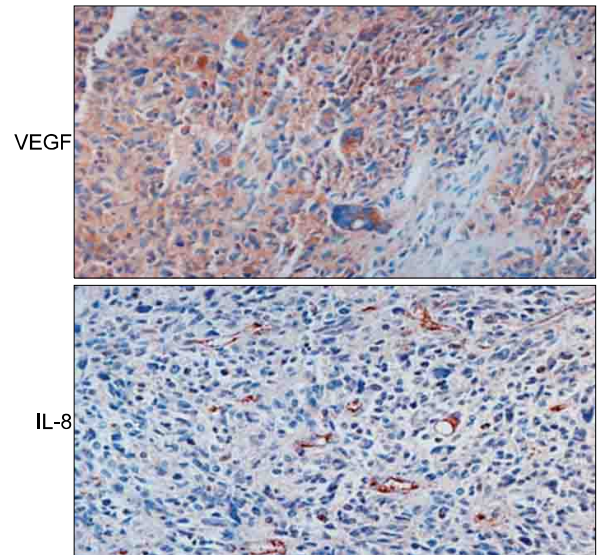


Fig. 4. VEGF and IL-8 expression in human glioblastoma. The tissues were deparaffinized and fixed with 10% formaldehyde, then treated with 0.1% trypsin for 30 min to improve antigen accessibility. After blocking nonspecific binding to secondary antibodies by treatment with blocking solution (Dako Inc.) for 1 h, the tissues were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against VEGF or IL-8 polyclonal antibodies. The tissues were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Vector Laboratories) for 1 h. After washing, tissues were stained using the Vectastain ABC kit.

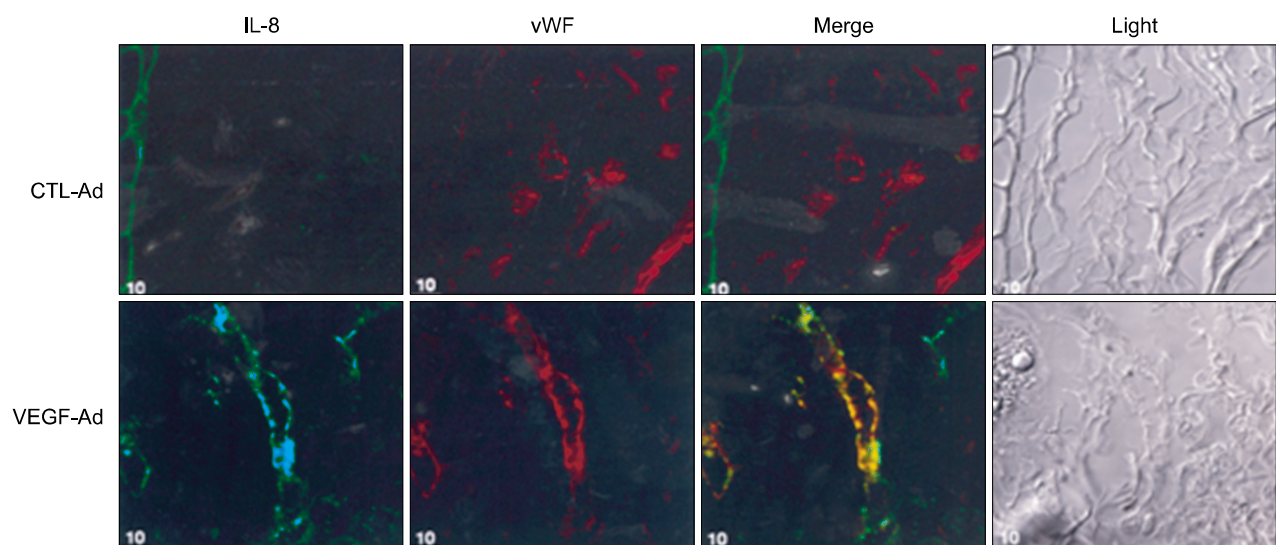


Fig. 3. IL-8 and vWF colocalization in the VEGF-Ad infected mouse ears. Mouse ears were infected with 100 MOI of VEGF-Ad or CTL-Ad. After 7 days, mice were sacrificed and ears were excised to be frozen. The ears were cut into 5 μ m and fixed with cold methanol. Colocalization of IL-8 and vWF was observed by using confocal microscopy. vWF, von Willebrand factor.

보여주는 것으로 사료된다.

3. 아교모세포종(glioblastoma)에서 IL-8 발현

다음으로 악성뇌종양의 하나인 아교모세포종 조직에서 IL-8의 발현을 조사하였다. 아교모세포종은 VEGF를 과량으로 발현하는 암으로 알려져 있을 뿐만 아니라 종양조직에서 염증을 유발하는 면역세포들이 과량 존재한다고 보고되었다.¹⁶⁾ 따라서 악성뇌종양의 염증과 IL-8의 발현의 상관관계를 연구하기 위해 아교모세포종에서 IL-8의 발현을 조사하였다. Fig. 4에서 보이는 것처럼 아교모세포종은 VEGF를 과량으로 발현하였고 종양의 혈관에서 IL-8이 발현됨을 관찰하였다. 이상의 결과는 VEGF가 생체내 혈관에서 IL-8의 발현에 직접적으로 관여함을 보임과 동시에 VEGF가 IL-8의 발현을 통해 염증을 일으킬 수 있음을 보여주는 것으로 사료된다.

이전 연구에 의하면 VEGF는 혈관내피세포에서 IL-8의 발현을 유도하여 호중구의 화학주성을 증가시키는 것으로 보고하였다.¹⁴⁾ 하지만 실제 생체에서 VEGF가 IL-8의 발현에 관여한다는 보고는 아직 연구되지 않은 실정이다. 본 연구는 VEGF가 생체의 혈관에서 IL-8의 발현을 유도하는 것을 처음으로 관찰하였다. 염증반응은 암세포의 생체내 성장에도 밀접히 관여하므로 VEGF의 기능을 억제하는 것은 혈관신생억제와 더불어 염증반응억제를 통해 암세포의 성장을 억제할 수 있음을 본 연구는 제시하고 있다.

요 약

배경: 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 암세포들에 의해 이루어지는 혈관-신생(angiogenesis)에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 VEGF는 종양에 의한 생체내 염증 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다. VEGF는 혈관내피세포에서 IL-8의 발현을 유도하여 호중구의 이동에 관여한다. 그러나 VEGF가 실제 생체에서 IL-8의 발현에 관여하는지는 아직 연구되지 않은 실정이다.

방법: VEGF가 생체에서 IL-8의 발현에 관여하는 것을 증명하기 위해 아데노바이러스를 이용한 VEGF 발현 시스템을 이용하여 생쥐의 귀조직에서 VEGF와 IL-8 발현의 상관성을 연구하였다.

결과: VEGF 발현 아데노바이러스는 시험관에서 배양된 혈관내피세포에서 VEGF를 발현하였고 동시에 IL-8발현도 유도하였다. VEGF 발현 아데노바이러스

를 생쥐의 귀조직에 주입하였을 경우 VEGF 발현 부위에서 강한 IL-8 발현이 관찰되었다. 더욱이 IL-8은 혈관에서 발현하는 것이 관찰되었다. VEGF를 과량으로 발현하는 악성뇌종양의 일종인 아교모세포종 조직에서 IL-8의 발현을 조사한 결과 혈관조직에서 특이적으로 발현하는 것이 관찰되었다.

결론: 본 연구 결과는 VEGF가 생체에서 IL-8의 발현을 유도하여 염증반응에 관여함을 제시해주고 있다.

참 고 문 헌

- 1) Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2004;23:1011-27.
- 2) Cai J, Ahmad S, Jiang WC, et al. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 2003;52:2959-68.
- 3) Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986;46:5629-32.
- 4) Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, et al. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993;91:153-9.
- 5) Boockock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:506-16.
- 6) Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995;26:86-91.
- 7) Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-4.
- 8) Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
- 9) Thomas AL, Morgan B, Dreys J, et al. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: PTK787/ZK 222584. *Semin Oncol* 2003;3:32-8.
- 10) Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2007;2:251-75.
- 11) Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant

- mechanisms in tumour cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22:49-60.
- 12) Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 2001; 14:377-86.
- 13) Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 1999;48: 1131-7.
- 14) Lee TH, Avraham H, Lee SH, Avraham S. Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:10445-51.
- 15) Lee TH, Seng S, Sekine M, et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007;4:e186.
- 16) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
-