

Thrombospondin-1 첫 번째 type I repeat 펩티드의 신혈관형성 억제작용

유보임, 정구보

가천대학교 의학전문대학원 해부학교실

(2015년 11월 13일 접수, 2015년 12월 4일 수정접수, 2015년 12월 8일 게재승인, Published Online 30 December 2015)

간추림 : 신혈관형성(angiogenesis)은 척추동물의 발생과정 또는 질병 시에 수반되는 중요한 생물학적 현상이다. 혈관형성 억제물질의 하나로 알려진 Thrombospondin-1 (TSP-1)은 CSVTCG 아미노산 서열을 포함하는 두 번째와 세 번째 type I repeat 부분이 혈관내피세포의 이동을 억제함으로써 혈관형성을 차단하는 것으로 알려져 있으나 CSVTCG 서열과 다른 서열을 갖는 첫 번째 type I repeat 부분의 역할은 잘 알려져 있지 않았다. 따라서 본 연구에서는 아미노산 서열의 차이를 나타내는 사람과 소 TSP-1의 첫 번째 type I repeat 부분(TSR-1)이 신혈관형성 억제능력에 있어서 어떠한 차이를 나타내는지 규명하였다.

이를 위해 TSR-1 펩티드 또는 PBS를 섞은 Matrigel에 bFGF를 첨가하여 생쥐복부피하에 주사함으로써 신혈관형성을 유도하였고 일주일 후에 헤모글로빈 양, 혈관의 개수, Matrigel의 색수치 등을 비교하여 신혈관형성 억제능력을 비교하였다. 또한 계란의 용모막 시험법을 통해서도 혈관형성을 억제하는지 확인하였다. 시험관내분석을 위해서는 TSR-1 펩티드를 배양 중인 HUVEC 세포에 처리하여 세포의 증식, 이동 및 맥관형성능력 등을 비교하였다. TSR-1 펩티드의 세포사멸효과는 유세포분석법으로 비교하였다.

실험 결과 소와 사람의 TSR-1 펩티드는 *in vivo* Matrigel assay와 CAM assay에서 신혈관형성을 억제하였으며, 소의 TSR-1 펩티드가 사람의 TSR-1 또는 대조군 펩티드(CSVTCG)에 비해 강한 억제효과를 나타내었다. 그리고 소와 사람 TSR-1 펩티드 및 CSVTCG 펩티드는 모두 HUVEC 세포의 증식은 억제하지 못했지만 세포이동 및 세포사멸을 조절함으로써 신혈관형성을 억제하였다. 이상의 실험 결과를 통해 사람과 소의 TSR-1 펩티드는 아미노산 서열은 다르지만 CSVTCG 서열이 아니더라도 유사한 펩티드로서 신혈관형성을 억제하는 능력을 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 신혈관형성, Thrombospondin-1, TSR-1, 소의 TSP-1, 혈관내피세포

서 론

최근 항암제의 개발은 암세포에 대한 직접적인 세포독성 효과보다 신혈관형성을 억제하여 암세포에 공급되는 영양분 공급을 차단함으로써 암세포의 번성을 유도하는 데 주안점을 두고 있다[1-3]. 신혈관형성은 맥관형성(vasculogenesis)과 혈관신생(angiogenesis)으로 구분할 수 있다. 신혈관형성은 장기나 조직 내에 분포하고 있는 기존 혈관의 내피세포가 특정 사이토카인이나 혈관형성인자의 자극에 의

*이 논문은 2014학년도 가천대학교 교내연구비지원에 의한 결과임 (GCU 2014-5103).

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 정구보(가천대학교 의학전문대학원 해부학교실)
전자우편 : gbjcong@gachon.ac.kr

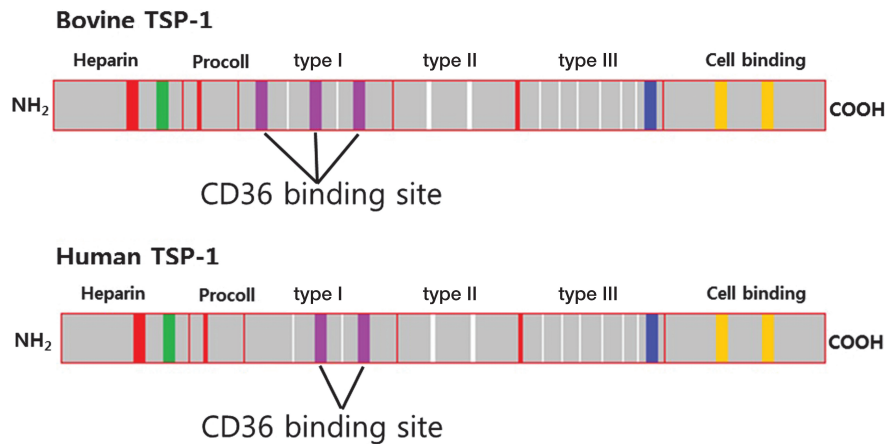


Fig. 1. Domain structures of bovine and human Thrombospondin-1. Bovine TSP-1 has three CD36 binding sites, in contrast human TSP-1 has two CD36 binding sites in type I repeat domain.

해 혈관내피세포의 일부가 활성화되어 세포증식 및 이동이 일어나면서 혈관 씩이 생김으로써 새로운 혈관이 자라나는 과정이다 [4]. 신혈관형성은 여성의 생식주기와 관련되어 생리적으로 진행되거나 상처가 생긴 부위의 치유과정에서 일어나며, 배아발달 시 조직 및 장기의 성장 시에도 신혈관형성이 동반된다. 질병상황에서는 류마티스 관절염, 당뇨병성 망막증, 동맥경화, 혈관종 및 고혈압 등에서 신혈관형성이 유발된다 [1,5,6]. 특히, 암이나 류마티스 관절염 등의 질병상태에서는 신혈관형성이 중단되지 않고 지속적으로 일어나는데 이는 질병 부위에서 신혈관형성 촉진인자가 지속적으로 분비되거나 신혈관형성 억제인자의 생산 또는 분비기능이 약화되기 때문이다 [7-10].

혈관형성 억제인자로 잘 알려져 있는 Thrombospondin-1 (이하 TSP-1)은 세포외기질단백질로서 세포-세포 간 또는 세포-기질 간 상호작용에 관여하며 세포막단백질과 사이토카인에 동시에 작용하여 세포외기질구조와 세포의 표현형을 조절한다. 이때 조절을 받는 혈관내피세포의 원형질막 단백질로는 integrins과, integrin 연관단백질인 CD47, CD36, proteoglycan 등이 있다 [11]. TSP-1은 다섯 가지 TSP 단백질 중에서 첫 번째로 발견된 당단백질로 사람의 혈소판에서 분비되고 신혈관형성을 억제함으로써 암의 성장을 저해할 수 있는 물질로는 자연계에서 처음으로 밝혀졌다 [12,13]. TSP-1의 분자량은 450 kD이며, 혈소판 외에 거대핵세포, 단핵구, 콘포식세포 등 혈액세포, 혈관내피세포, 민무늬근세포, 섬유아세포, 뇌의 신경아교세포 등에서 분비되어 상처 회복, 염증, 신생혈관형성, 종양 형성과 같은 다양한 생명현상을 조절한다 [14-17]. TSP-1의 구조와 다양한 기능은 Fig. 1의 분자구조에서 알 수 있듯 여섯 개의 복잡한 도메인 구조를 통해 나타난다. 이들 도메인 중 세 번째 구조인 type I repeat

부분은 세 번 반복되는데 TSP-1에서 신혈관형성 억제효과가 가장 크게 나타나는 부분이다 [18-20].

TSP-1의 type I repeat에 존재하는 CSVTCG 아미노산 서열 특히 VTCG 아미노산 서열은 세포 표면의 CD36 수용체와 결합한다 [19]. CD36은 분자량이 88 kDa인 원형질막의 관통단백질로 커다란 세포외단백질 부분을 가지고 있으며 원래 혈소판과 단핵구에서 발견되는 수용체이지만 신생혈관을 형성하는 모세혈관의 내피세포에서도 발견된다 [21-24]. 또한 scavenger receptor로도 작용하여 음전하를 띠는 인지질과 산화된 LDL 지질 (OxLDL)이 세포 내로 유입하는 데 작용한다 [25-28]. 그리고 동맥경화반이 발생할 때 foam cell의 형성에 관여하며 사멸된 세포를 탐식하는 데도 중요한 역할을 한다 [29-31]. TSP-1의 CSVTCG 아미노산 서열에 의한 신혈관형성의 억제와 세포사멸은 TSP-1이 CD36 단백질에 결합하여 p59fyn, caspase-3 단백질 분해효소, p38 MAPK 등이 연속적으로 활성화됨으로써 일어나는 것으로 알려져 있다 [32-34]. 동물에 따라 TSP-1의 아미노산 서열은 달라서 사람 TSP-1 type I repeat의 첫 번째 부분인 TSR-1에서는 CSVTCG 아미노산 서열 부위가 CSTSCG 서열로 되어 있어서 신혈관형성을 억제하지 못하는 것으로 보고되고 있으며 [19], 집쥐의 경우도 CSATCG 서열로 구성되어 있다. 그러나 소의 경우는 사람이나 다른 동물들과 달리 CSVTCG 서열이 포함되어 있어 혈관형성 억제효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다 (Table 1).

지금까지 TSP-1에 관한 연구는 주로 사람 TSP-1의 type I repeat 중 TSR-2와 TSR-3에 대한 펩티드와 단백질 조각을 이용한 연구가 수행되었다 [19,35]. 그리고 사람의 TSP-1도 CSVTCG 아미노산 서열을 가지고 있는 TSR-2와 TSR-3 사이에 신혈관형성 억제효과가 서로 달라서 TSR-3 부위

Table 1. Sequences of Human, Bovine, and Mouse TSP-1

Human (Homo sapiens)	
1	mglawglglv flmhvcgtnr ipesggdsv fdifeltgaa rkgsgrrlvk gdpsspaftr
61	iedanlippv pdkkfqdlvd avrtekgfl laslrmkkt rgtllalerk dhsgqvsvv
121	sngkagtlld sltvqgkqhvs vsveallat gqwkstlflv qedraqlyid cekmenaeld
181	vpiqsiftrd lasiarlria kggvndnfqg vlqnvrfvfg tpedilrnk gcsstsvll
241	tldnnvnsgs spairtnyig hktkdlqaic giscdelssm vlelgrlrti vtllqdsirk
301	vteenkelan elrrpplcyh ngvqyrnee wtvdsctech cqnsvtick vscpimpcsn
361	atvpdgeccp rcwpsdsadd gwspswsewts cstscngngiq qrgscdsln nrcegssvqt
421	rtchiqecdk rfkqdgwsh wpswsscsvt cgdgvtirir lcnspspqmn gkpcegeare
481	tkackkdaep inggwgpwsp wdicsvtcgg gvqkrslcn nptpqfggkd cvgdvtenqi
541	cnkqdepidg clsnpcfagv kctsydgsw kcgacppgys gngiqctdvd eckevpdacf
601	nhngehren tdpynclpc pprftgsqpf gqgehatan kvckprnpe tdgthdcnkn
661	akcnlyghys dpmyrceckp gyagngiicg edtdldgwpn enlvcanat yhckkdnpcn
721	lpnsgqedyd kdigidacdd dddndkipdd rdncpfhynp aqydydrddv gdrdcncpyn
781	hnpdqaddn ngegdacaad idgdilner dncqyvynvd qrtdmdgvg dqcdncpleh
841	npdqldsdsd rigdtdcnnq didedghqnn ldncpyvna nqadhdkdkg gdacdhddd
901	dqipddkdcn rlvnpdqkd sdgdgrgac kddfdhdsvp diddicpenv disetdfrf
961	qmipldpkt sqndpnwvvr hqgkelvqtv ncdpplavgy defnavdfsg tffinterdd
1021	dyagfvfygq sssrfyvnmw kvvtqsywdt npraqgysg lsvkvvnstt gpgehlmal
1081	whgntpgqv rtlwhdprhi gwkdftayrw rlsrpkgtf irvmyegkk imadsgpiyd
1141	kyaggrlgl fvfsqemvff sdlkyecrdp //
Bovine (Bos taurus)	
1	mglawglglv llhhacgsnr ipesggdsv fdifeltgaa rkrsgrrlvk gdpsspaftr
61	iedanlippv pdkkfqdlvd avraekgfl laslrmkkt rgtllaverk dhsgqvsvi
121	sngkagtlld sltvqgkqhvs vsveallat gqwkstlflv qedraqlyid cekmenaeld
181	vpiqsiftrd lasiarlria kggvndnfqg vlqnvrfvfg tpedilrnk gcsstsvfv
241	tldnnvnsgs spairtdyig hktkdlqaic giscdelssm vlelgrlrti vtllqdsirk
301	vteenkelan elrrpplcyh ngvqyrtgde wtvdsctech cqnsvtick vscpimpcsn
361	atvpdgeccp rcwpsdsadd gwspswsewts csvtcngngiq qrgscdsln nrcegssvqt
421	rtchiqecdk rfkqdgwsh wpswsscsvt cgdgvtirir lcnspspqmn gkpcegekare
481	tkacqkscp inggwgpwsp wdicsvtcgg gvqkrslcn npkpqfggkd cvgdvtenqi
541	cnkqdepidg clsnpcfagv qctsydgsw kcgacppgys gdgveckdvd eckevpdacf
601	nhngehren tdpynclpc pprftgsqpf grgvehatan kvckprnpe tdgthdcnkn
661	akcnlyghys dpmyrceckp gyagngiicg edtdldgwpn edllcanat yherkdnpcn
721	lpnsgqedyd kdigidacdd dddndkipdd rdncpfhynp aqydydrddv gdrdcncpyn
781	hnpdqaddn ngegdacaad idgdsilner dncqyvynvd qktdmdgvg dqcdncpleh
841	npdqldsdsd rigdtdcnnq didedghqnn ldncpyvna nqadhdkdkg gdacdhddd
901	dqipddrnc rlvnpdqkd sdgdgrgac kddfdqdkvp diddicpenv disetdfrf
961	qmipldpkt sqndpnwvvr hqgkelvqtv ncdpplavgy defnavdfsg tffinterdd
1021	dyagfvfygq sssrfyvnmw kvvtqsywdt npraqgysg lsvkvvnstt gpgehlmal
1081	whgntsgqv rtlwhdprhi gwkdftayrw hlshrpkgtf irvmyegkk imadsgpiyd
1141	kyaggrlgl fvfsqemvff sdlkyecrds //

의 억제효과가 더 좋은 것으로 보고되고 있으며 이는 인접한 아미노산들에 의한 영향 때문이다 (Table 2) [19].

따라서 본 연구에서는 혈관내피세포의 사멸 또는 혈관형성을 직접 억제할 수 있는 새로운 펩티드를 연구하려는 것이다. 특히 아직 그 신혈관형성 억제효과가 잘 알려져 있지 않은 TSP-1의 type I 반복서열 부분의 가능성을 연구하였다. 특히 소의 TSR-1 펩티드에는 CSVTCG 서열이 존재하므로 소의 TSR-1 (Table 2) 펩티드가 사람의 TSR-1 부분과는 어떻게 다른 신혈관형성 억제능력을 갖는지 규명하는데 초점을 두었다.

재료 및 방법

1. 혈관내피세포(HUVEC)의 분리 및 확인

사람 배꼽정맥내피세포(이하 HUVEC)는 Jaffe의 방법 [36]에 따라 분리하였다. 세포 분리에 사용한 탯줄은 기증서 약서를 통해 샘플제공자의 동의를 구하고 충북대학교병원 산부인과를 통해 공급받았으며, 분만 후 12시간 이내의 탯줄을 사용하였다. 먼저 탯줄 내 배꼽정맥에서 남아있던 혈액을 phosphate-buffered saline (DPBS, GibcoBRL)으로 제거하고 0.2% collagenase I (Sigma) 10 mL를 채운 다음 PBS

Table 1. Continued

House mouse (<i>Mus musculus</i>)	
1	mellrglgvl fllhmcsnr ipesggdngv fdifeligga rrgprrlvk gqdlsspafr
61	ienanlipav pddkfqdld avwadkgfif laslrqmkkt rgtllaverk dntgqifsvv
121	sngkagtldl slslpgkqqv vsveallat gqwksitlv qedraqlyid cdkmesaeld
181	vpiqsiftrd lasvarlrva kgdvnndfqq vlqnvrvfvg tpedilrnk gcsstnvl
241	tldnnvngs spairtnyig hktkdlqaic glscdelssm vlekglrti vtllqdsirk
301	vteenrelvs elkrpplcfh ngvqyknee wtvdsctech cqnsvtickk vscpimpcsn
361	atvpdgeccp rcwpsdsadd gwpwsewts csatcngngiq qrgrscdln nrcegssvqt
421	rtchiqecdk rfkqdgwsh wswsscsvt cgdgvitrr lcnspspqmn gkpcegeare
481	tkackkdacp inggwgpwsp wdicsvtcgg gvqrrslcn nptpqfegkd cvgdvtenqv
541	cnkqdcpidg clsnpfaga kctsydgsw kcgacppgys ngngiqekdvd eckevpdacf
601	nhngehrckn tdpgynlpc pprftgsqpf grgvehaman kvvckprnpc tdgthdcnkn
661	akcnylghys dpmrceckp gyagngiicg edtdldgwpn enlvcvanat yhckkdnpcn
721	lpnsgqedyd kdigidacdd dddndkipdd rdnpcfhynp aqydydrddv gdrdcncpyn
781	hnpdqattdk ngegdcavd idgdgilner dncqyvnyvd qrtdmdgvg dqcdncpleh
841	npdqldsdsd ligdtcdnnq didedghqnn ldnpcyvpna nqadhdkgk gdacdhddd
901	dqipddrnc rlvnpdqkd sdgdgrdac kddfdhdnvp diddicpenf disetdfrf
961	qmipldpktg sqndpnwvvr hqgkelvqtv ncdpglavgy defnavdfsg tfinterdd
1021	dyagfvfgyq sssrfyvwmw kvvtqsywdt npraqyysg lsvkvvnst gpgehlmal
1081	whgtntpgqv rtlwhdprhi gwkdftayrw rlshrpktgy irvmyegkk imadsgpiyd
1141	kyaggrlgl fvfsqemvff sdmkyecrds //

* first type I repeat: 371-430, second type I repeat: 431-490, third type I repeat: 491-550.

Table 2. Comparison of TSR peptides of human and bovine TSP-1

	Peptides from type I repeats of human TSP1	Peptides from type I repeats of bovine TSP1
TSR-1	-SEWTSCSTSCGNGIQQRGK-	-SEWTSCSVTCGNGIQQRGK-
TSR-2	-SPWSSCSVTCGDGVITRIR-	-SPWSSCSVTCGDGVITRIR-
TSR-3	-SPWDICSVTCGGGVQKRSK-	-SPWDICSVTCGGGVQKRSK-
CD36 binding region	-CSVTCG	

가 담긴 비이커에 담가 37°C water bath에서 30분간 처리하여 collagenase I의 효소반응이 잘 일어나도록 하였다. 그 후 탱줄을 주물러 내피세포가 잘 떨어지도록 한 다음 다시 PBS를 이용하여 분리된 내피세포를 회수하였다. 이때 혈관 내피세포는 M199 배양액 (GibcoBRL)에 20% heat-inactivated FBS (Biowhittaker), 50 µg/mL ECGS (Biotechnology Inc.), 2 mM L-Glutamine (GibcoBRL), 100 µg/mL heparin (GibcoBRL), 1% antibiotic/antimycotic (GibcoBRL)을 첨가하여 만든 HUVEC 배양액이 5 mL 들어있는 50 mL conical tube에 회수하였고 세 번 정도 PBS로 혈관 내부를 추가로 세척하여 남아있는 혈관내피세포를 모두 회수하였다. 그 후 원심분리기 (Himac centrifuge CR5B2, Hitachi, Japan)를 이용하여 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 침전시키고 상층액을 제거한 후 HUVEC 배양액을 섞은 세포부유액을 만들어 100 mm culture dish (Nunc)에 1×10⁴/mL 세포밀도로 깔고 5% CO₂가 유지되는 37°C CO₂ incubator (Optima Inc, Model 560, USA)에서 배양하였다. 다음날 붙지 않는 세포들은 제거하고 새로운 배양액으로 교체하여 배양하였다. 혈관내피세포의 배양액은 2~3일에 한 번씩 새

로운 배양액으로 바꿔주며 연속 계대 배양하였다. HUVEC은 passage 2에서 액체질소에 얼려 보관하며 실험에 사용하였다. 실험 시에는 passage 4~7의 HUVEC을 사용하였다. 분리한 혈관내피세포는 위상차현미경 (CK40, Olympus, Japan)을 통해 cobble stone 형태를 확인하였고, anti-human Factor VIII 단클론항체 (DAKO)를 이용한 면역형광염색을 시행하여 혈관내피세포 마커를 확인하였다.

2. TSR-1 펩티드 합성

사람과 소 TSP-1의 type I repeat 중 아직 기능이 밝혀지지 않은 TSR-1의 일부 펩티드들을 합성하여 사용하였다 (Table 3). 이 펩티드들은 TSR-1에 해당하는 부분으로 사람과 소의 아미노산 서열을 각각 합성하되, CSVTCG 서열 주변을 중심으로 합성하였다. 대조군 펩티드로는 혈관형성 억제효과가 잘 알려진 CSVTCG 아미노산 서열을 합성하여 혈관형성 억제능력을 비교하였다. 펩티드의 합성은 The American Peptide Company Inc. (USA)을 통해 주문 생산했으며 reverse phase HPLC로 정제 (97%)하였고 Mass spectrophoto-

Table 3. Peptides synthesized from TSR-1 of human and bovine TSP-1

peptides from type 1 repeats of Human TSP1	peptides from type 1 repeats of Bovine TSP1
(H) SEWTSCSTSCGNGIQQRGR (control) CSVTCG	(B) SEWTSCSVTCGNGIQQRGR

meter로 농도를 측정 후 사용하였다.

3. *In vivo* Matrigel plug assay

합성한 펩티드들의 신혈관형성 억제능력을 확인하기 위하여 *In vivo* Matrigel plug assay를 생쥐의 복부 피하조직에서 시행하였다 [37,38]. Matrigel (Becton Dickinson)은 50 ng/mL의 recombinant bFGF (Sigma)와 40 unit/mL의 heparin을 첨가하여 혼합한 후 사용하였다. 혼합액은 얼음 위에서 제조하여 gel이 굳지 않도록 하였으며 사용된 모든 pipette와 tip은 냉장고에 보관한 다음 사용하였다.

5~6주 된 C57BL/6J 수컷생쥐 (대한바이오링크, Korea)를 1주일 동안 동물실에 계류시킨 다음 실험에 사용하였다. 생쥐는 에테르로 마취한 후 복부 피하조직에 500 μ L/마리의 Matrigel을 천천히 주사하였으며 주사가 끝난 후에는 gel이 새어 나오지 않도록 주의하였다. 주사기는 냉동실에 보관했던 1 mL 주사기(녹십자)와 23 G 주사바늘을 사용하였다.

실험군은 양성대조군과 음성대조군, 펩티드 처리군으로 구분하였는데 양성대조군 (Con(P))에서는 Matrigel에 bFGF와 heparin을 함께 섞어 주사하였고 음성대조군 (Con(N))은 Matrigel에 PBS만 섞어 주사하였다. 그리고 펩티드 처리군들은 Bovine과 Human의 TSR-1 서열부분과 CSVTCG 서열의 펩티드를 PBS에 희석하여 사용하였으며 각각 10 μ M과 40 μ M 농도로 투여하여 비교하였고 (B-10, B-40, H-10, H-40) 각 군당 6~7마리가 되도록 하였다. Matrigel은 주사 후 7일째 되는 날 생쥐를 에테르로 마취한 후 복부 피부를 벗겨내고 관찰하였는데 이때 digital camera (Coolpix 990, Nikon, Japan)로 사진을 찍어서 영상을 비교하고 조직처리하여 조직절편을 제작하였다.

4. Image analysis

In vivo Matrigel assay에서 여러 가지 펩티드에 의한 혈관형성 억제양상은 image analysis를 통해 비교하였고 Akhrat 등의 방법 [38]을 변형하여 실험하였다. Matrigel plug의 혈관형성도를 비교하기 위해 digital camera로 찍은 각 군의 동물사진들을 iMT (VT) Image Analysis program (iMT

Technology, Korea)을 이용하여 optical density를 측정하였다. Optical density는 혈액이 gel 내에 포함되어 있는 헤모글로빈의 색수치를 비교한 것으로서 양성대조군과 음성대조군의 값을 기준으로 상대적인 수치를 구한 다음 평균값과 표준편차를 계산해 통계 처리하였고, 이 수치를 비교하여 펩티드들의 신혈관형성 억제 정도를 판단하였다.

5. 헤모글로빈 측정

Matrigel에 함유되어 있는 헤모글로빈 양은 혈관 내 혈액량에 비례하여 신혈관형성 정도를 간접적으로 확인할 수 있으므로 Bandyopadhyay 등의 방법 [39]에 따라 Drabkin's kit (Sigma)를 사용하여 정량하였다. Matrigel에 포함되어 있는 헤모글로빈 양을 측정 후 비교하였다. 헤모글로빈을 측정하기 위하여 생쥐의 복부 피하조직에서 적출한 Matrigel을 액체질소에 담가 얼린 후 homogenizer로 분쇄한 후 0.9% NaCl을 500 μ L 첨가하였다. 잘 혼합된 Matrigel 20 μ L에 Drabkin's reagent를 2 mL씩 첨가하고 다시 혼합하여 15분 동안 반응시킨 다음 spectrophotometer (Uvikon 860, Kontron, Switzerland)를 이용하여 545 nm 파장에서 O.D. 값을 측정하여 헤모글로빈 양을 정량하고 군별로 비교하였다.

6. Matrigel의 조직학적 관찰과 신생혈관 측정

Matrigel plug에 유도된 신생혈관과 주위 조직과의 관계, 그리고 gel 내에 형성된 혈관을 계수하여 펩티드에 의해 신혈관형성이 억제되는 양상을 비교하였다. 떼어낸 Matrigel은 PBS에 세척하여 RBC를 제거한 후 4% paraformaldehyde로 하루 동안 고정하였다. 고정이 끝난 Matrigel은 흐르는 물에 3~4시간 정도 수세하고 Automatic Tissue Processor (Histokinette-2000, Reichert-Jung, Hong Kong)를 이용하여 70, 80, 90, 95, 100% 알코올 시리즈로 처리하여 탈수시키고 xylene을 처리하여 투명화하였으며 파라핀으로 포매한 후 5 μ m 두께로 절편을 제작하여 3-aminopropyl triethoxysilane (APES, Sigma)로 coating한 유리슬라이드에 부착시켰다. Matrigel 조직절편 슬라이드는 H & E 염색을 통해 전체적인 조직구조를 확인하였고 RCA120 (Biotinylated Ricinus Communis Agglutinin I, Vector)으로 생쥐의 혈관내피 세포 표면에 특이적으로 존재하는 lectin을 염색하여 혈관형성을 관찰하였다. 또한 조직의 구조를 더 자세히 관찰하고 혈관의 개수를 비교하기 위하여 Masson's Trichrome 염색을 시행하였다. 골격근과 결합조직에 있는 혈관은 제외하였으며 Matrigel 내에서 적혈구를 포함하고 있는 혈관만을 250배 현미경 (YS 100, Nikon, Japan) 시야에서 10군데 영

역 내 혈관을 세어 평균치를 비교하였다.

또한, Masson's Trichrom 염색을 한 조직은 현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 100×와 200×, 400×로 배율을 달리하면서 각 군마다 새로 생기는 혈관의 특징과 침윤된 세포, 그리고 골격근과 결합조직에 존재하는 혈관들이 Matrigel에서 분비되는 물질들에 의해 유도되고 펩티드들에 의해 억제되는 양상을 관찰하여 차이를 확인하였으며 CCD camera (DP50, Olympus)와 Viewfinder lite version 1.0 program (Pixera Co.)을 이용하여 영상을 저장하였다.

7. Chorioallantoic membrane (CAM) assay

펩티드들이 CAM assay에서도 신혈관형성 억제효과를 보이는지 관찰하기 위하여 CAM assay를 시행하였다. 실험방법은 유정란(한살림)을 37°C, 90%의 습도가 유지되는 부란기 (Jeio Tech. Korea)에 넣고 배양하면서 3일 후 주사기로 2 mL 정도 알부민을 제거하고 window를 만든 다음 parafilm으로 밀봉하여 습기가 보존되도록 하였다. Thermanox filter를 일정한 크기로 자른 후 clean bench의 자외선을 조사하여 멸균하였으며, 멸균이 끝난 thermanox filter에 bFGF (50 ng/filter)와 펩티드를 20 µL씩 점적한 후 clean bench에서 건조시켜 사용하였다. Window를 제작한 후 2일 더 배양하여 용모막이 생긴 것을 확인한 후 혈관형성을 관찰하기 용이한 곳에 thermanox filter를 놓고 2일 후 혈관형성을 비교하였다. 양성대조군 Con(P)는 bFGF (50 ng/egg)을 20 µL coating하였고, 음성대조군 Con(N)은 vehicle로 멸균증류수를 20 µL 처리하였다. 펩티드 처리군은 bFGF와 펩티드 (10 µM/egg)를 혼합하여 coating해 주었으며, B와 H 펩티드군 및 CSVTCG군으로 나누어서 실험하였다. 2일 후에 parafilm을 제거하고 1 mL 주사기로 intralipose (녹십자)를 CAM 아래 공간에 주입하고 입체현미경 (Leica, Heidelberg, German)에서 CCD camera를 이용하여 비교분석하였다. 실험에는 각 군별로 유정란을 10개씩 배정하여 실험하였고, 전체적인 결과를 비교하였다.

8. Proliferation assay

HUVEC 세포를 96 well plate (Nunc)에 5×10^3 개/well씩 넣어 부착시킨 후 2% FBS가 포함된 EBM (endothelial cell basal medium) 배양액으로 교체하여 배양함으로써 하룻밤 starvation시켰다. 다음날 세포증식을 유도하기 위해 20 ng/mL bFGF가 첨가된 배양액으로 교체하여 세포증식 억제 실험을 실시하였다. HUVEC 세포의 증식 억제효과를 비교하기 위하여 각 펩티드 (B, H, CSVTCG)는 0.5, 5, 50, 500, 및 5000 nM 농도로 처리하였으며 72시간 배양한 후 각

각 Phenazine methosulfate (PMS, Sigma)와 Cell Titer 96 (MTS, Promega)가 포함된 phenol-red가 들어있지 않은 배양액으로 교체하고 4시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 추가 배양하였다. 발색반응이 나타난 정도를 microplate reader (Titertek Multiskan Plus MKII, Labsystems, Finland)를 이용하여 492 nm 파장에서 O.D. 값을 측정하여 대조군과 비교하였다.

9. Migration assay

HUVEC 세포가 bFGF에 의해 이동하는 것을 TSR-1 펩티드들이 억제하는지 알아보기 위하여 8 µm pore size의 transwell insert (Nunc)를 이용하여 migration assay를 시행하였다. Polycarbonate filter의 membrane 아래쪽을 1% gelatin으로 coating한 후 HUVEC 세포를 1×10^5 개/well를 chamber의 위쪽에 넣어 37°C, CO₂ incubator에서 1.5~2시간 정도 부착시켰다. 그 후 부착된 세포를 PBS로 3번 세척한 후 2% FBS가 포함되어 있는 M199 배양액 (EBM)과 펩티드들과 함께 넣어주고, chamber의 아래 부분에는 10 ng/mL bFGF를 넣고 4시간 더 배양하여 chemotaxis에 의한 세포이동을 조사하였다.

배양이 끝난 후에는 세포가 부착되어 있던 위쪽 chamber 안쪽을 면봉으로 깨끗이 닦아 세포가 남아 있지 않도록 하였다. 그 후 membrane을 chamber와 분리시키고 phenol red가 들어있지 않은 M199 배양액 500 µL를 넣고 Phenazine methosulfate (PMS, Sigma)와 Cell Titer 96 (MTS, Promega)을 혼합한 액을 20 µL/100 µL 농도로 첨가한 후 37°C 배양기에서 4시간 배양하여 발색반응을 유도한 다음 microplate reader를 이용하여 492 nm에서 O.D. 값을 각각 측정하였다.

대조군은 upper chamber에 2% FBS가 들어있는 M199 media를 넣어주고 lower chamber에는 bFGF를 10 ng/mL 넣어 주었다. 그리고 실험군들은 각 펩티드들을 2, 10, 100 및 200 nM씩 농도별로 upper chamber에 추가로 넣어 줌으로써 bFGF에 의해 세포가 이동하는 것이 각 펩티드에 의해 억제되도록 하였다. 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구해 비교하였는데 bFGF에 의해 이동한 수치를 100% 이동한 것으로 간주하고 각 펩티드군의 O.D. 평균값을 구하여 대조군과 비교하였다.

10. In vitro angiogenesis assay

Matrigel은 4°C에 보관하여 액체 상태로 유지하면서 4 well dish (Nunc)의 각 well당 300 µL씩 넣어준 다음 37°C incubator에서 30분 정도 굳혔다. 굳은 Matrigel에 HUVEC

세포를 1×10^5 개/well 넣어 37°C incubator에서 배양하였다. 30분 후 HUVEC 세포가 Matrigel 표면에 모두 부착된 것이 확인되면 B, H, CSVTCG 펩티드를 각각 1, 10 또는 100 μ M 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하며 혈관형성 정도를 비교하였다. 24시간 후에는 NIH image analysis program을 이용하여 형성된 tube의 길이를 측정하여 평균값과 표준편차를 구하여 각 TSR-1 펩티드에 의해 혈관형성이 억제되는 양상을 비교 조사하였다.

11. Flow cytometry

직경 6센티미터의 세포배양접시에 HUVEC 세포를 1×10^5 개/well 넣고 하룻밤 세포를 부착시킨 후 B 펩티드들을 50 nM과 100 nM로 각각 처리하여 48시간 후 Vybrant Apoptosis Assay Kit의 YO-PRO 1과 propidium iodide (PI) (Molecular Probes)를 넣어 15분 배양한 후, PBS로 세 번 세척하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 회수하였다. 1% PFA를 포함하는 PBS에 현탁시킨 후 FACS Caliber (Becton Dickinson, USA)에서 분석하였다. FACScan에서 데이터분석은 우측위부분 (UR), 좌측위부분 (UL), 우측아래부분 (LR) 그리고 좌측아래부분 (LL)으로 나누어 분석하였으며 UR은 YO-PRO 1과 propidium iodide (PI)가 동시에 염색되는 후기 단계의 세포사멸 세포가 오도록 하였고, LR의 경우는 초기부터 중기의 세포사멸이 진행 중인 세포가 나타나도록 하였다. 그리고 UL의 경우는 세포변성에 의해서 죽은 세포임을 확인할 수 있었고 LL에서는 염색되지 않고 살아있는 정상세포를 측정하였다. 따라서 UR과 LR에 분포하는 세포를 세포사멸인 세포로 간주하여 분석하였다.

12. 통계분석

본 연구에서 HUVEC 세포를 이용한 세포증식, 세포이동, 세포사멸 및 CAM assay에서 얻은 데이터는 student *t*-test 방법으로 통계 분석을 실시하였다. 그리고 신혈관형성 유도 및 혈관형성 억제효과의 분석을 위해 Matrigel 내 헤모글로빈 양, 혈액 양에 대한 흡광도 수치도 student *t*-test로 각 실험군 간의 차이를 통계처리하여 확인하였으며, *p*값이 0.05 이하인 경우만 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. TSR-1 펩티드의 *In vivo* Matrigel assay

합성한 TSR-1 펩티드들을 Matrigel에 혼합하여 생쥐 복부에 피하 주사하고 7일 후 혈관형성을 관찰하였다. 실험

결과 각 실험군 생쥐 gel 내에는 혈액이 들어있어 혈관형성이 유도된 것을 알 수 있었다. 양성대조군인 Con(P)의 경우 신혈관형성이 유도되어 gel이 혈액으로 가득 차 있는 반면, 음성대조군 Con(N)은 gel 내에 혈관이 형성되지 않아 혈액이 들어있지 않았다. Matrigel을 생쥐에 피하주사하면 gel 주변에 있는 결합조직(connective tissue)과 골격근(skeletal muscle)에 있는 내피세포뿐만 아니라 다른 세포들도 자극을 받는다. 그러나 펩티드들을 처리한 실험군의 생쥐에서는 gel 내로 혈관유입이 이루어지지 않아 gel은 음성대조군인 Con(N)과 비슷한 색깔을 띠고 있었다. 그러나 gel 주변부에는 혈관형성이 자극을 받아 울혈현상이 관찰되어 Matrigel의 주변 조직으로부터 혈관형성은 유도되었으나 gel 내로 혈관이 자라 들어오지 못하였음을 알 수 있었다. 또한 10 μ M의 B 펩티드를 처리한 실험군에서 혈관형성 억제가 뚜렷한 반면 40 μ M의 B 펩티드에서는 농도가 높은데도 불구하고 혈관형성이 억제되지 않는 모습을 볼 수 있어 고농도의 B 펩티드는 효과가 약한 것을 알 수 있었다(Fig. 2A).

Matrigel을 주사한 신혈관형성의 억제양상을 혈액 색깔의 영상분석, 헤모글로빈 측정, gel 내 혈관수 측정 등을 통해 억제효과를 다양한 방법으로 확인하였다. iMT Image analysis program으로 Matrigel의 혈관형성 정도를 카메라로 영상을 촬영하여 색깔을 비교해 보면 양성대조군 Con(P)의 경우 1.05 ± 0.219 의 O.D.값을 나타냈고, 혈관이 유도되지 않은 음성대조군 Con(N)의 경우 0.50 ± 0.029 ($p < 0.05$)로 큰 차이를 나타내었다. 또한 TSR-1 펩티드 투여군에서는 B 펩티드를 10 μ M/마리 투여한 군에서는 0.69 ± 0.168 ($p < 0.05$)로 양성대조군에 비해 통계적으로 유의한 억제효과를 보였으나 40 μ M에서는 0.92 ± 0.289 ($p < 0.1$)로 통계적인 유의성이 약하게 나타났다. 사람의 TSR-1 펩티드(H)의 경우 10 μ M에서는 0.70 ± 0.119 ($p < 0.01$)와 40 μ M에서는 0.73 ± 0.256 ($p < 0.05$)로 신혈관형성 억제효과를 보여 유의성 있게 신혈관형성을 억제하는 것을 보였으나 B 펩티드에 비해서는 억제효과가 약한 것을 알 수 있었다.

Matrigel 조직을 Masson's Trichrome 염색을 한 후 적혈구가 들어있는 혈관을 계수하였다. 이때 적혈구가 들어있는 혈관의 수는 양성대조군 Con(P)는 16.10 ± 5.25 개인데 비해, B 펩티드군은 10 μ M인 경우 2.45 ± 2.263 개 ($p < 0.05$)이었고 40 μ M은 9.06 ± 2.06 개 ($p < 0.1$)로 농도가 낮은 10 μ M 투여군에서 혈관의 숫자가 더 적은 것으로 나타났다. H 펩티드군은 10 μ M에서 3.3 ± 2.07 개 ($p < 0.05$), 40 μ M에서는 3.82 ± 1.90 개 ($p < 0.05$)가 측정되어 Matrigel 내에 형성된 혈관의 개수를 비교해 보면 B 펩티드를 40 μ M의 고농도로 처리한 경우를 제외하면 모든 펩티드군에서 대조군에 비해 혈관형성이 현저하게 억제되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2B).

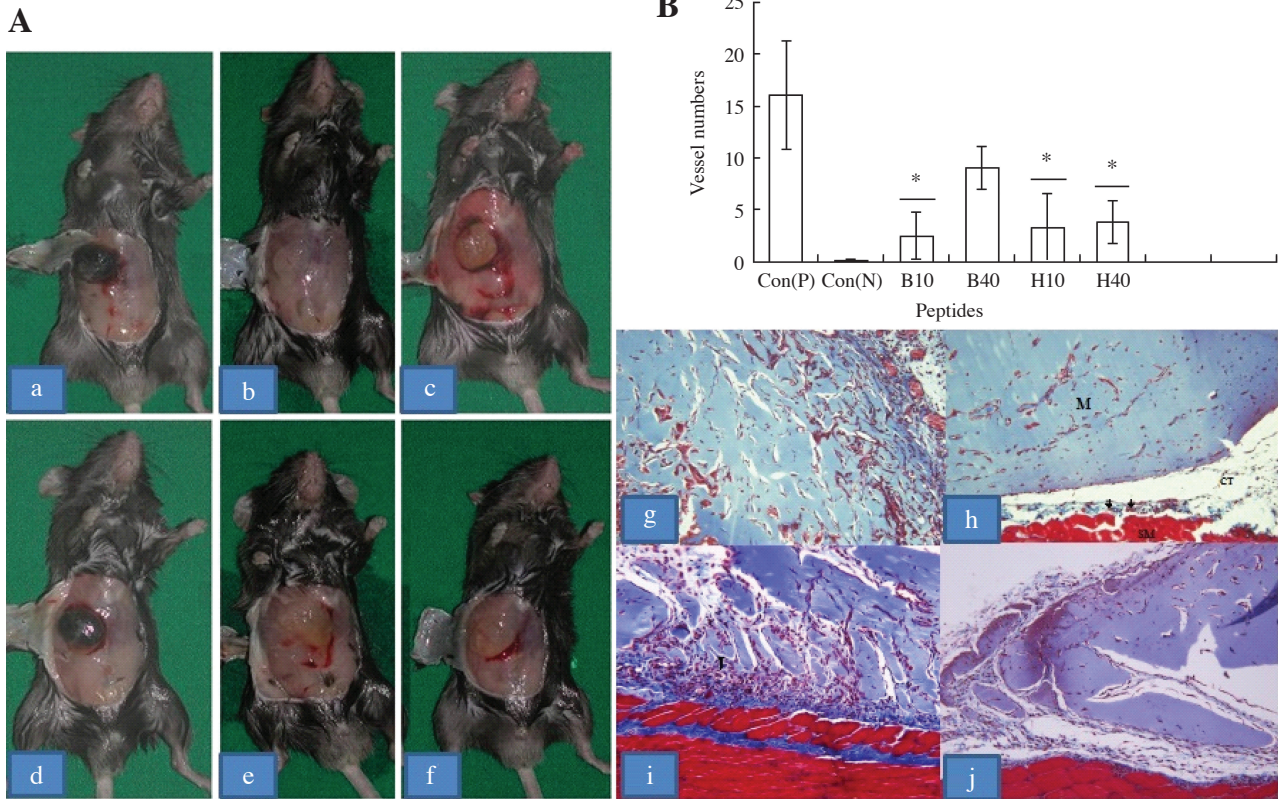


Fig. 2. *In vivo* Matrigel plug assay and microvessel images of Matrigel. A. Matrigel plugs (n=6 per group) were implanted into mice and were investigated after 7 days. Positive control (a, g) mice were injected with Matrigel mixed with bFGF (5 ng/mL) which induced angiogenesis in contrast negative control mice plugs (b, h) didn't induce angiogenesis. B and H peptides inhibited bFGF-induced angiogenesis in Matrigels (c, d, e, f). a: Positive control, b: Negative control, c, i: 10 μ M B peptide, d: 40 μ M B peptide, e, j: 10 μ M H peptide, f: 40 μ M H peptide. B. Matrigel sections were stained with Masson's Trichrome, and then mean numbers of vessels were counted in 10 fields (ROI) at 250 \times magnification. *p<0.05 (vs. positive control)

2. *In vivo* Matrigel의 조직학적 소견

Matrigel을 생쥐피하에 주사하여 혈관형성을 유도할 때 B 펩티드와 H 펩티드를 각각 10 μ M로 처리하고 날짜별로 관찰하면 양성대조군의 경우 날짜에 따라 혈관형성이 꾸준히 증가하나 B 펩티드와 H 펩티드를 처리한 Matrigel 내에서는 4일째부터 헤모글로빈 농도도 증가하지 않고 날짜가 더 지나더라도 gel 내에 혈액이 보이지 않아 혈관형성이 내부까지 침투되면서 유도되지는 못하는 양상을 확인할 수 있었다.

Matrigel plug을 5 μ m 두께로 파라핀 절편을 만들어 Masson's Trichrom stain을 하여 400배로 관찰하면 양성대조군 Con (P)의 경우 Matrigel 전체가 혈액으로 채워져 전체적으로 붉은 색을 띄었는데 이는 조직학적 소견에서도 gel 내에 많은 미세혈관 및 큰 혈관이 관찰되었으며 음성대조군 Con (N)은 gel 속에서 혈관이 형성되지 않아 주입한 그

대로의 깨끗한 Matrigel 모습을 그대로 유지하고 있었다. 그러나 펩티드들을 처리한 군에서는 B 펩티드를 10 μ M을 투여한 Matrigel에서는 gel 내에 혈관이 형성되었으나 혈관의 개수가 적게 관찰되어 전체적으로 억제된 양상을 보이고 있었다. H 펩티드군의 경우는 10 μ M과 40 μ M을 처리한 경우 혈관이 gel 내에 형성되는 양상을 보여 억제효과가 다른 펩티드들에 비해 약한 것을 알 수 있었다. 이상의 gel 소견을 고배율로 관찰하면, Matrigel과 골격근 사이에 많은 염증세포들을 관찰할 수 있었다. 이러한 염증세포들은 양성대조군에서는 신생혈관과 함께 더 많이 관찰되었다. 한편 음성대조군에서도 gel 내에 염증세포와 혈관들이 결합조직과 골격근 근처에 일부 모여 있는 것을 볼 수 있었다. Matrigel plug에서 신혈관형성의 유도는 Matrigel 내에 침윤되어 들어온 connective septa를 중심으로 큰 혈관들이 관찰되어 Matrigel 내에 혈관이 형성될 때는 결합조직기둥을 따라 형성되는 것을 알 수 있었다. 현미경 소견을 통해 H 펩티드도 혈관

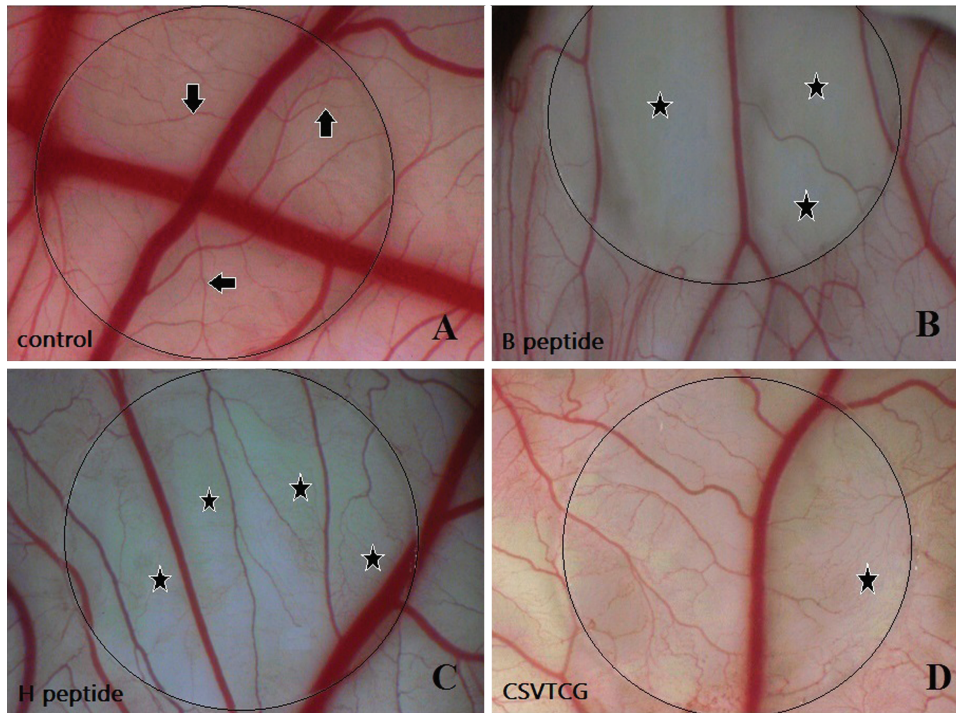


Fig. 3. CAM assay by TSR-1 peptides. Microvessels were induced in positive control (A) by 50 ng bFGF coating. In contrast group B showed strong inhibitory effect on CAM assay. C and D groups showed weak inhibitory effects on CAM assay ($\times 16$). A: positive control, B: 10 μM B peptide, C: 10 μM H peptide, D: 10 μM CSVTCG peptide. —; Thermanox filter area, ★; angiogenesis inhibition area, arrows (↑); angiogenic vessels.

형성을 억제하였으나 B 펩티드에 비해 혈관형성의 억제정도가 약함을 확인할 수 있었다(Fig. 2g~j).

3. CAM assay

In vivo Matrigel assay를 통해 펩티드의 혈관형성 억제효과가 높은 10 μM 의 농도에서 합성한 H 펩티드와 B 펩티드 그리고 CSVTCG 펩티드를 Thermanox filter에 처리하여 bFGF (50 ng/egg)에 의해 유도된 신혈관형성이 처리된 TSR-1 펩티드에 의해 억제되는지 CAM assay를 통해 확인하였다. 이때 양성대조군 (n=10)의 경우 bFGF에 의해 Thermanox filter 전체에 신혈관형성이 유도되는 모습을 관찰할 수 있었으나 H 펩티드 (n=10)와 CSVTCG 펩티드 (n=10)의 경우는 혈관형성이 약하게 억제되었고 B 펩티드 (n=10)는 CAM assay에서도 bFGF에 의해 유도된 혈관형성이 크게 억제되어 신생혈관이 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. 세포증식 억제효과

In vivo Matrigel assay와 CAM assay를 통해 TSR-1 펩티드들이 bFGF에 의해 유도된 신혈관형성을 억제하는 것을

확인하였으므로 신혈관형성의 억제기전을 확인하기 위하여 2% FBS와 10 ng/mL bFGF가 포함된 EBM 배양액에 배양 중인 HUVEC 세포에 각 펩티드들(B, H, CSVTCG 펩티드)을 0.5 nM~500 nM의 농도로 농도별로 처리하고 72시간 후에 MTS/PMS assay 방법으로 O.D.값을 측정하여 세포증식이 억제되었는지 비교하였다. 실험 결과 72시간 후 대조군의 HUVEC 세포는 세포수가 증가하였으나 B 펩티드를 처리한 HUVEC 세포에서는 2~4%, H 펩티드와 CSVTCG 펩티드의 경우 1~2%가 억제되는 데 그쳐 통계적인 유의성이 없었다. 따라서 TSR-1 펩티드는 HUVEC 세포의 증식을 억제하지 못하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

5. 세포이동 억제효과

Transwell insert를 이용한 migration assay에서는 HUVEC 세포가 10 ng/mL의 bFGF에 의해 transwell insert의 아래쪽 chamber쪽으로 이동할 때 각 펩티드들에 의해 이동이 억제되는지 조사하였다. 실험 결과 HUVEC 세포의 이동은 B 펩티드를 처리한 경우 bFGF에 의한 HUVEC의 세포이동이 통계적으로 유의하게 억제 ($p < 0.05$)된 반면, CSVTCG 펩티드와 H 펩티드를 처리했을 때는 HUVEC 세포의 이동이

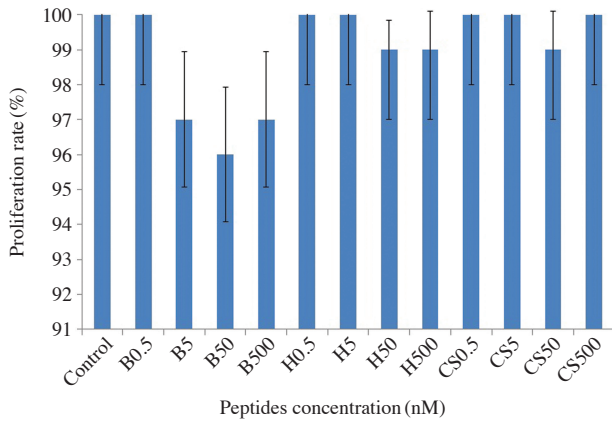


Fig. 4. Proliferation assay of HUVEC by TSR-1 peptides. HUVECs were cultured in 20 ng/mL bFGF supplemented EBm media with or without various concentrations of TSR-1 peptides for 72h. HUVECs proliferation were analyzed by MTS/PMS assay. B and H peptides showed weak inhibitory effects but didn't statistically significant.

약하게 억제되어 통계적인 유의성을 확인할 수 없었다(Fig. 5). 4시간 동안에 이동한 세포수를 조사해 보면 CSVTCG 펩티드의 경우는 100 nM에서는 55%로 세포의 이동이 억제되는 반면 ($p < 0.05$), H 펩티드는 전체적인 농도범위에서 억제효과가 낮게 나타나고 농도에 따른 펩티드에 의한 특이적인 세포이동 억제효과는 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 그렇지만 B 펩티드의 경우 2 nM~100 nM의 농도범위에서 70~77%로 전체적으로 세포이동이 억제되었으나 ($p < 0.05$) 200 nM에서는 세포이동이 억제되지 않는 양상을 보였다. 한편, CSVTCG 펩티드와 H 펩티드도 통계적인 유의성은 없었으나 bFGF에 의한 세포이동을 10~20% 범위 내에서 억제하는 경향을 보였다.

6. 혈관형성 억제효과

In vitro Matrigel assay에서 HUVEC은 처음 10시간 동안은 세포가 모여서 network를 형성하여 다양한 branch를 내는 cord formation stage를 진행하고 그 후 6~8시간 더 배양을 하면 HUVEC이 Matrigel 내에서 reorganized되며 내강을 갖는 tube를 만들게 된다. 이때 대조군에서는 정상적인 혈관모양의 tube network를 형성하게 되므로 본 연구에서는 B 펩티드에 의해 tube 형성이 억제되는지 비교하기 위하여 tube formation assay를 실시하였다. 이때 B 펩티드를 HUVEC 세포와 함께 각각 처리하고 18시간 후에 관찰하여 보면 대조군에서는 tube 형성이 정상적으로 진행되었으나 B 펩티드를 고농도(100 μ M)처리한 HUVEC에서는 tube 형성이 이루어지지 않고 tube 사이의 공간이 대조군에 비해 넓어졌으며, tube formation에 참여하지 못하고 배양액에 떠있

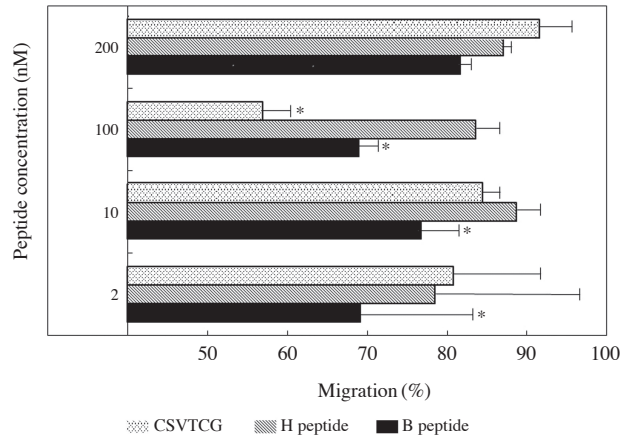


Fig. 5. Migration assay by TSR-1 peptides. TSR-1 peptides were treated to HUVEC medium in the upper chamber. Ten ng/mL basic FGF induced HUVEC migrations was inhibited by B, H and CSVTCG peptides after 4 h of incubation. B peptides inhibited migration of HUVEC significantly. * $p < 0.05$ (vs. bFGF induced migration)

는 세포들이 많이 관찰되었다. 또한 대조군에 비해 tube의 모습이 완전하지 않았고 끊어진 곳이 많았다(Fig. 6B). 이는 TSR-1 펩티드에 의해 혈관형성이 억제되었음을 나타내는 것이다.

7. 세포사멸 유도효과

TSR-1 펩티드에 의한 혈관형성 억제효과가 TSR-1 펩티드의 세포사멸 효과 때문인지 확인하기 위하여 HUVEC 세포에 각 펩티드를 50 nM 처리하고 Apoptosis assay kit를 이용하여 배양중인 세포를 염색한 후 FACScan으로 정량하였다. 실험 결과 B 펩티드와 H 펩티드 및 CSVTCG 펩티드를 각각 50 μ M 처리한 HUVEC 세포에서 세포사멸을 나타내는 세포가 대조군에 비해 증가하였다. 대조군에서는 우측상단과 우측하단에 보이는 세포의 합이 9.03%인데 비해 B 펩티드군에서는 19.42%였고, H군의 세포에서는 20.58%, CSVTCG군의 세포에서는 18.95%를 나타내어 각각 대조군에 비해 세포사멸이 증가되었으나 세 종류의 펩티드 간의 세포사멸효과는 큰 차이가 없었다(Fig. 6C).

고 찰

TSP-1은 분자량이 크고 여러 가지 기능성 펩티드를 함께 가지는 복합단백질로서 여러 종류의 세포에서 분비되어 [15], 세포의 증식, 이동, 부착 및 세포사멸 등 신혈관형성의 여러 단계를 각각 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 다양

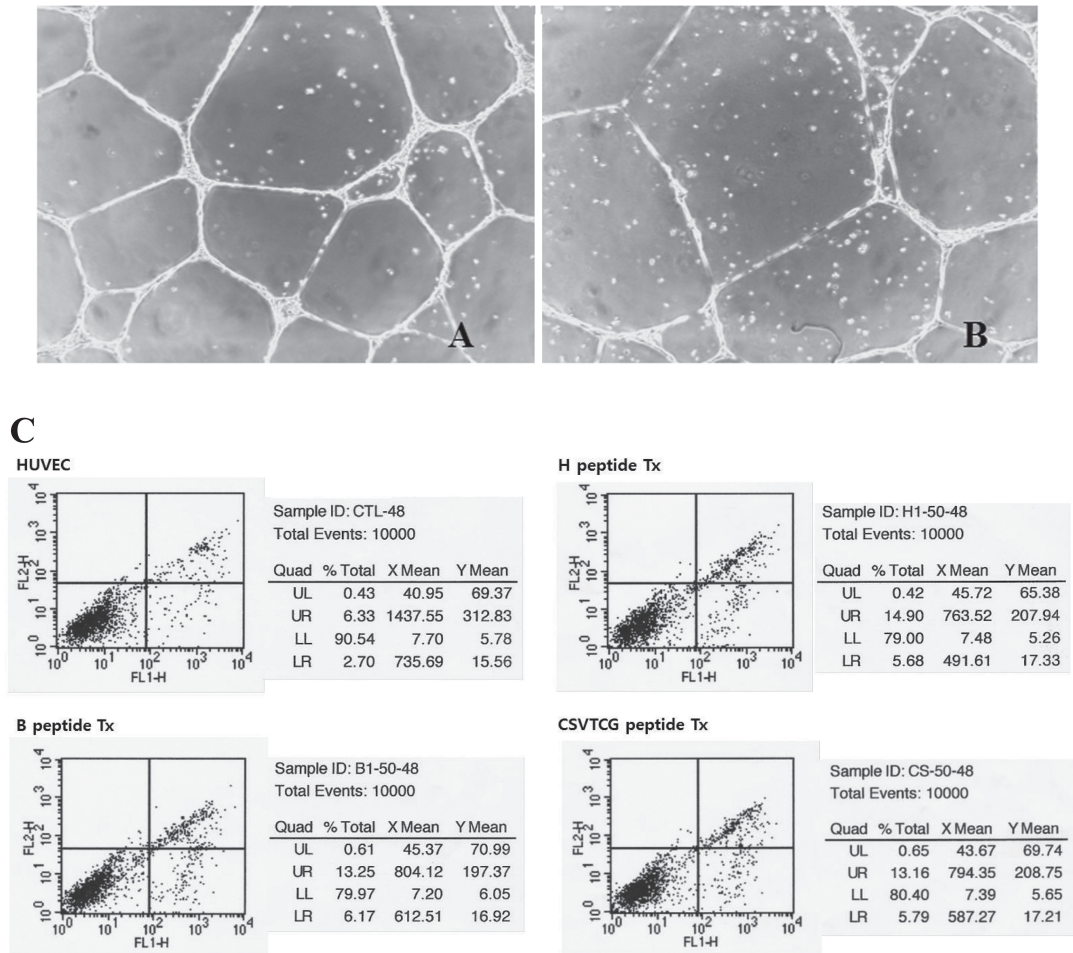


Fig. 6. A, B. Tube formation assay by TSR-1 peptides. HUVEC cells showed tube formation in *in vitro* Matrigel assay after 18 hr. In contrast, B peptide (100 μ M) group showed thin cell cords and interrupted capillary network in Matrigel. C. Apoptosis assay results by TSR-1 peptides. subpopulations of HUVEC (UR and LR) were increased in B, H, and CSVTCG peptides (50 nM) incorporation. UR and LR area indicate apoptotic cells.

한 종류의 암세포에 TSP-1을 과발현시키면 신혈관형성 및 암세포의 성장이 억제된다고 보고되었다[40,41].

TSP-1에서 기능을 나타내는 여섯 가지 부위 중 가장 신혈관형성 억제효과가 큰 부위는 TSR 부위로 특히 두 번째 (TSR-2)와 세 번째 (TSR-3) 부위에 CSVTCG 아미노산 서열이 포함되어 있어 혈관내피세포 표면의 CD36 단백질에 결합하면 내피세포의 이동이 억제되고 사멸이 일어난다[24]. 사람 TSP-1의 경우 TSR-1에는 CSVTCG가 아니라 CSTSCG 서열이 있어서 CD36과 반응하지 않으므로 CD36을 통한 신혈관형성 억제작용은 나타나지 않은 것으로 그동안 알려져 있었다[19]. 그렇지만 여러 동물의 TSP-1의 아미노산 서열을 조사해 보면 소의 TSP-1는 사람의 TSP-1과 유사한 아미노산 서열을 가지고 있으나 TSR-1에 CSVTCG가 그대로 유지되고 있다. 따라서 본 연구에서는 이와 유사한 펩티드

들을 합성하여 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통하여 TSR-1 펩티드들의 신혈관형성 억제작용을 비교 관찰하였다. 조직학적으로 *in vivo* Matrigel assay에서 혈관형성을 단계별로 관찰한 결과, 생쥐의 피하조직에 Matrigel을 주사하면 24시간이 지나면 gel 내에 bFGF 등의 chemotactic factors에 의해 여러 가지 세포들이 침윤되고 혈관내피세포들이 증가되며, 48시간이 지나면 주입된 Matrigel 가장자리에 혈관이 모여드는 것이 관찰되고 72시간부터 명백하게 gel 내부에 혈관이 유도되는 것이 관찰되었다. 그 후 혈관형성 억제효과를 나타낼 것으로 생각한 H 펩티드와 B 펩티드군의 경우 10 μ M 농도에서 혈관형성의 유도가 억제되는 양상을 보였는데 gel의 가장자리에는 신혈관형성이 유도되는 것으로 관찰되었으나 gel 중심으로 혈관이 침투하는 과정은 억제되어 gel 내 혈액 양이나 혈관수가 양성대조군에 비해 현저히 적었다

(Fig. 2). 특히 Matrigel을 이식하고 3일부터 날짜별로 억제 효과 양상을 관찰한 실험에서는 B 펩티드나 H 펩티드 모두에서 3일부터 혈관형성이 억제되는 것을 알 수 있었고 조직학적 소견을 보면 Matrigel 주변의 결합조직 내에 있는 모세혈관들은 확장된 양상으로 관찰되어 초기에는 주변의 혈관내피세포가 gel 내에 포함된 bFGF의 영향을 받아 혈관형성이 시작되지만 gel 내로 혈관내피세포가 이동하여 침투되는 기전은 억제되는 것을 알 수 있었다. 이는 B 펩티드와 H 펩티드들이 모두 10 μ M의 농도에서 신혈관형성을 유의성 있게 억제하는 것을 나타내는 것이다. 이에 대해 Tolsma 등은 사람의 TSR-2와 TSR-3은 rat cornea angiogenesis에서 신혈관형성 억제효과가 있었으나 TSR-1은 억제효과가 없다고 보고 하여[35] 본 실험의 결과와 다른 것을 알 수 있었는데 본 실험에서는 CSVTCG 아미노산 서열이 없는 사람 TSP-1의 type I repeat 부분인 H 펩티드와 CSVTCG 서열을 포함하는 소의 TSR-1 펩티드부분인 B 펩티드가 정도의 차이는 있지만 모두 Matrigel plug assay에서 억제효과를 나타내었으므로 다른 결과를 나타낸 것이다.

또한, B와 H 펩티드는 CAM assay에서도 억제효과에 차이가 있어서 50 ng의 bFGF를 처리하여 유정란에서 혈관형성을 유도할 경우 B 펩티드가 H 펩티드보다 강한 억제효과를 나타내었으나 양쪽 모두 혈관형성 모델에 상관없이 뚜렷한 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 동물 모델 및 유도하는 신혈관형성인자 등 실험방법에 따라 관련된 내피세포나 억제기전이 다를 수 있으므로 각 펩티드에 대한 효과가 다르게 나타난 것으로 생각된다[42]. 특히 CAM assay의 경우 배아발생과정에서 유도되는 혈관형성을 관찰하는 것이기 때문에 혈관내피세포의 형태학적인 면과 gradual change라는 면에서 빠르게 변하는 점을 가지고 있고 또 닭의 세포를 이용하여 하는 실험이므로 펩티드의 작용기전 상 여러 가지 제한이 있을 것으로 생각된다. 다른 펩티드를 이용한 실험에서도 Tolsma 등[43]은 rat cornea pocket assay에서 TSP-1의 procollagen domain (294~317) 펩티드가 신혈관형성 억제효과를 보인다고 보고한 반면, Iruela-Arispe 등은 이 부분이 fusion protein과 합성한 펩티드에서는 억제효과가 나타나지 않아 결과가 일치하지 않은 보고가 있으며 이는 실험동물 모델에 따른 억제효과 차이라고 설명하였다[19].

본 연구에서 사용한 Matrigel은 Engelbreth-Holm-Swarm tumor를 생쥐의 복강에 이식할 때 형성되는 기저막단백질인 Matrigel을 생쥐의 복부 피하조직에 이식하여 혈관형성을 유도하는 방법이다. Matrigel은 4°C에서는 액체 상태로 존재하지만 체온이 37°C인 복부 피하조직에 들어가면 gel을 형성하여 혼합되어 있는 신혈관형성 유도인자들을 천천

히 유출하여 지속적으로 혈관을 자극하게 하는 특징이 있다[37]. 또한 혈관내피세포의 부착, 이동, 맥관형성 등 여러 단계를 거치며 진행되는 신혈관형성의 특성상 다양한 관찰 시점에서 혈관형성 유도나 억제를 관찰할 수 있으며 gel 내 단백질과 헤모글로빈 양을 측정할 수 있고, 조직학적인 관찰도 병행할 수 있다. 한편, cornea와 CAM assay를 이용한 모델에서는 bFGF와 tumor necrosis factor에 의해 나타나는 신혈관형성 유도 작용에 α v β 3 integrin이 관련되며, VEGF나 TGF- β , 또는 phorbol 12-myristat 1-acetate (PMA)에 의해서 나타나는 신혈관형성에는 integrin α v β 5가 관련된다고 보고하였다. 이는 같은 실험방법이라도 혈관형성 유도제와 억제제에 따라 관련된 억제기전이 다를 수 있음을 나타내는 것이다[44]. 본 연구에서 B 펩티드와 H 펩티드의 억제 기전에 integrin과 관련된 혈관형성 억제 기전은 자세하게 밝히지 않았으나 이에 관한 연구는 더 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 CD36 binding site인 CSVTCG 서열이 없는 H 펩티드와 CSVTCG 아미노산 서열을 포함하는 B 펩티드 간의 신혈관형성 억제효과에 차이가 있는지 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 실시하였다. CD36은 TSP-1에 의한 내피세포의 이동과 혈관형성 억제에 필수적인 부분이고, CD36에 대한 blocking antibody를 처리하면 TSP-1의 억제효과가 나타나지 않는 것으로 알려져 있다. 그렇지만 본 실험에서는 CD36 수용체가 없는 HUVEC으로 migration assay를 시행하였음에도 CSVTCG 펩티드의 경우 100 nM의 고농도에서는 억제효과가 나타났으나 2~10 nM에서는 억제능이 약해지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 CSVTCG 펩티드의 아미노산 서열을 인식하는 CD36 수용체가 HUVEC에 없기 때문이지만 고농도에서는 HUVEC의 이동이 CSVTCG 펩티드에 의해 억제되는 것을 통해 CSVTCG 서열이 아니더라도 삼차원적인 구조가 유사하면 다른 기전을 통해 이동이 억제될 수 있음을 나타내는 것이다.

한편 B 펩티드가 H 펩티드에 비해 전반적으로 HUVEC의 이동을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 세포이동의 억제효과를 나타내는 CSVTCG 서열이 포함되면 CD36 수용체가 세포의 이동을 보다 강하게 억제할 수 있음을 나타내는 것이다. 지금까지의 보고에 의하면 HUVEC 같은 큰 혈관 내피세포에는 CD36 수용체가 존재하지 않아 CSVTCG 펩티드는 반응하지 않는 것으로 알려져 있어서 본 연구결과와는 다른 결과임을 알 수 있었다[45]. 지금까지 CSVTCG 펩티드를 이용한 실험은 Bovine adrenal capillary endothelial cells (BAEC)이나 human dermal microvessel cell (HMVEC)와 같이 CD36 수용체가 발현되는 세포들을 사용하여 *in vitro* 실험 결과만 발표하여 본 실험의 연구결

과를 포함하는 보다 심도 있는 연구가 추가로 필요할 것으로 생각된다.

Matrigel assay를 이용한 tube formation assay에서도 B 펩티드와 H 펩티드는 각각 신혈관형성을 억제하였다. 그러나 세포증식 실험에서는 이 펩티드들에 의해 HUVEC 세포의 증식이 모두 영향을 받지 않은 것으로 나타나 이러한 실험 결과는 실험에 사용된 펩티드들이 HUVEC세포의 증식이 아닌 세포이동이나 세포사멸 등을 통해 신혈관형성을 억제한 것으로 생각된다. 그러나 같은 CSVTCG 서열을 포함하더라도 억제효과는 차이가 있었는데 이는 B 펩티드와 CSVTCG 펩티드의 경우 각각 작용하는 부위가 다를 수 있으며 HUVEC 세포의 이동을 억제하는 효과에는 CSVTCG 또는 이와 유사한 다른 단백질도 CD36 수용체의 삼차원적 구조에 작용할 수 있다면 유사한 억제효과를 나타낼 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

신혈관형성 억제에 관한 연구는 암과 같은 병적인 상황에서는 중요한 의미를 갖는다. 특히 고형암의 경우 암조직 내에 매우 빠른 속도로 신혈관형성이 유도되고 전이되도록 하므로 TSR-1 펩티드를 이용하여 신혈관형성을 억제할 수 있다면 암의 성장을 억제할 수 있을 것이다. 또한 세포독성을 유발하는 기존의 항암제에 비해 신혈관형성 억제제를 사용할 경우 부작용을 줄일 수 있다는 장점이 있다. 또한 본 논문에서는 TSR-1 펩티드의 경우 지금까지 효과가 없는 것으로 알려졌던 첫 번째 type I repeat 펩티드(TSR-1)도 혈관형성 억제효과가 있으며 실험모델에 따라 TSR-1 펩티드 간의 혈관형성 억제효과가 다르게 나타날 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 TSP-1은 TSR-1뿐 아니라 아데노신 수용체인 A2B 수용체를 통해서도 caspase-3의 발현을 증가시켜 혈관내피세포의 세포사멸을 유도할 수 있는 것으로 Li 등의 보고[46]를 통해 알려진 바 있으므로 혈관내피세포의 세포사멸을 통한 혈관형성 억제기전은 다양하게 존재하는 것으로 생각되며 암의 증식에 필수적인 산소와 영양분 공급원으로서의 혈관신생을 혈관내피세포의 사멸을 통해 억제할 수 있다면 암 치료의 효과적인 방법의 하나가 될 수 있을 것이다. 따라서 본 연구를 통해 밝혀진 TSR-1의 신혈관형성 억제기능은 TSP-1의 향후 신혈관형성 억제제 또는 항암제로서 개발가능성을 더욱 높일 수 있는 연구결과로 생각된다. 또한 그간 혈관형성 억제효과가 없는 것으로 알려졌던 TSR-1의 신혈관형성 억제효과가 확인되었으므로 TSR-1의 삼차원적인 구조를 통한 B 펩티드와 H 펩티드에 대한 보다 다양한 작용기전을 밝히는 연구가 추가로 더 필요할 것으로 사료된다. 또한 TSR-1에 CSVTCG 아미노산 서열이 포함된 소의 TSP-1의 신혈관형성 억제작용이 사람의 TSP-1보다 신혈관형성과 암의 성장에 보다 강력한 효과를 나타

낼 수 있는지도 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고 문헌

1. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *New Engl J Med* 1995; 333:1757-63.
2. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:159-67.
3. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69:135-74.
4. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 2003; 24:586-603.
5. Folkman J. What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23:361-3.
6. Koch AE, Polerini PJ, Leibovich SJ. Stimulation of neovascularization by human rheumatoid synovial tissue macrophages. *Arthritis Rheum* 1986; 29:471-9.
7. Kraling BM, Bischoff J. A simplified method for growth of human microvascular endothelial cells results in decreased senescence and continued responsiveness to cytokines and growth factors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34:308-15.
8. Leikens S, de Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 253-70.
9. Cornelius LA, Nehring LC, Roby JD, Parks WC, Welgus HG. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol* 1995; 105:170-6.
10. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994; 160:194-202.
11. Tarabozetti G, Robert D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990; 111:765-72.
12. Kanda S, Shono T, Tomasini-Johansson B, Klint P, Saito Y. Role of Thrombospondin-1-derived peptide, 4N1K, in FGF-2-induced angiogenesis. *Exp Cell Res* 1999; 252:262-72.
13. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6624-8.
14. Morandi V, Fauvel-Lafeve F, Legrand C, Legrand YJ. Role

- of thrombospondin in the adhesion of human endothelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; 29A:585-91.
15. Dreyfus M, Lahav J. The build-up of the thrombospondin extracellular matrix. An apparent dependence on synthesis and on preformed fibrillar matrix. *Eur J Cell Biol* 1988; 47: 275-82.
 16. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:634-40.
 17. Wang TN, Qian XH, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on oral squamous carcinoma cell invasion of collagen. *Am J Surg* 1995; 170:502-5.
 18. Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 2000; 275:32167-32173.
 19. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC, Lawler J, Roberts DD. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 1999; 100:1423-31.
 20. Chen H, Strickland DK, Mosher DF. Metabolism of thrombospondin-2 binding and degradation by 3T3 cells and glycosaminoglycan-variant chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1996; 271:15993-9.
 21. Petzelbauer P, Bender JR, Wilson J, Pober JS. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol* 1993; 151:5062-72.
 22. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992; 80:1105-15.
 23. Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol* 1992; 148:78-83.
 24. Frazier WA. Thrombospondin: a modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol* 1987; 105:625-32.
 25. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995; 270:16221-4.
 26. Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:269-75.
 27. Nozaki S, Kashjwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 1995; 96:1859-65.
 28. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993; 268:11811-6.
 29. Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by $\alpha v \beta 3$ /CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* 1996; 149:911-21.
 30. Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 1995; 181:1857-62.
 31. Silverstein RL, Baird M, Lo SK, Yesner LM. Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (Glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *J Biol Chem* 1992; 267:16607-12.
 32. Bagavandoss P, Wilks JW. Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:867-72.
 33. de Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 2001; 7:401-7.
 34. Guo N, Kruttsch HC, Inman JK, Roberts DD. Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 1997; 57:1735-42.
 35. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Pulverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993; 122:497-511.
 36. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-56.
 37. Passaniti A, Taylor RM, Pill R, Guo Y, Long PV, Haney JA, et al. Methods in laboratory investigation; A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992; 67:519-28.
 38. Akhrat N, Dickerson EB, Auerbach R. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 2002; 5:75-80.
 39. Bandyopadhyay A, Zhu Y, Malik SN, Kreisberg J, Brattain MG, Sprague EA, et al. Extracellular domain of TGF- β type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells. *Oncogene* 2002; 21:3541-51.
 40. Weinstat-Saslow D, Vazquez F, VanHoute K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:6504-11.

41. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 155:441-52.
42. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: A critical overview. *Clin Chem* 2003; 49:32-40.
43. Tolsma SS, Stack MS, Bouck N. Lumen formation and other angiogenic activities of cultured capillary endothelial cells are inhibited by thrombospondin-1. *Microvasc Res* 1997; 54:13-26.
44. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varnier JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct αv integrins. *Science* 1995; 270:1500-2.
45. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997; 138:707-17.
46. Li H, Jin SY, Son HJ, Jeong GB. Caffeine-induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis. *Anat Cell Biol* 2013; 46:57-67.

Inhibition of Angiogenesis by the First Type I Repeat Peptides of Thrombospondin-1

Bo-Im Yoo, Goo-Bo Jeong

Department Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Gachon University, Incheon, Korea

Abstract : Angiogenesis is the fundamental biological phenomenon in the development of vertebrates and various pathophysiological process such as cancer, inflammation and wound healing. Thrombospondin-1 is a well-known anti-angiogenic molecule which is distributed in the extracellular matrix of various tissues. The second and third type I repeats of human TSP-1 have inhibitory effects on endothelial cell migration and induce angiogenesis inhibition. However the role of the first type I repeat was not elucidated. In addition, the first type I repeat of bovine TSP-1 has CSVTCG amino acid sequence which is known to have anti-angiogenic activity. In the present study, we compared the inhibition of angiogenesis to investigate the role of the first type I repeat of the human and bovine TSP-1.

Matrigel was mixed with or without TSR-1 peptides and then injected into C57BL/6J mice. We compared angiogenesis inhibition activity by hemoglobin assay, microvessel density and optical density value after 7 days. Furthermore, inhibition of angiogenesis was confirmed on CAM assay by TSR-1 peptides. For *in vitro* angiogenesis assay, TSR-1 peptides were treated on the proliferation, migration, and tube formation assay of HUVEC. Apoptosis effect of TSR-1 peptides was confirmed by apoptosis assay kit and flow cytometry.

Bovine and human TSR-1 peptides blocked neovascularization in *in vivo* Matrigel plug assay and CAM assay at 10 μ M. Bovine TSR-1 peptides have shown stronger angiogenesis inhibition in bFGF-induced angiogenesis than human TSR-1 and CSVTCG peptides. However, all of TSR-1 peptides inhibit migration and tube formation of HUVEC in *in vitro*. Furthermore, these peptides also induced apoptosis of HUVEC. These results suggest that TSR-1 peptides of bovine and human TSP-1 have angiogenesis inhibition activity.

Keywords : Angiogenesis, Thrombospondin-1, TSR-1, Bovine TSP-1, Endothelial cell