

인간 MnSOD 유전자 과발현에 따른 마우스 조혈모세포의 자기복제 능력의 변화

¹원광대학교 의과대학 내과학교실, ²피츠버그대학교 암연구소 방사선종양학교실

박무림¹ · Feng Xu² · Tao Cheng²

The Effect of an Ectopic Overexpression of MnSOD in Mouse Hematopoietic Stem Cells

Moo Rim Park, M.D.¹, Feng Xu, M.D.² and Tao Cheng, M.D.²

¹Department of Internal Medicine, Wonkwang University School of Medicine Iksan, Korea,

²Department of Radiation Oncology, University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, USA

Background: Intracellular reactive oxygen species (ROS) have dual effects depending on their cellular level. ROS act as secondary messengers at a low concentration, although ROS exhaust the hematopoietic stem cell (HSC) compartment at a higher oxidized state. So, we investigated whether maintaining a low level of ROS could preserve the hematopoietic stem cell function according to the MnSOD over expression.

Methods: Human MnSOD cDNA was introduced into mouse HSCs and progenitor cells by using a MSCV-PGK-GFP retrovirus. The hematopoietic function of over-expressing MnSOD was evaluated *in vitro* on a colony-forming cell assay and *in vivo* in a competitive transplantation model. MnSOD-transduced, lineage negative, GFP+ B6.SJL (CD45.1+) mouse bone marrow cells were transplanted into lethally irradiated C57BL/6J (CD45.2+) mice in competition with CD45.1/45.2 double positive bone marrow mononuclear cells. We also measured the basal mRNA levels of antioxidants, including MnSOD, catalase and cellular glutathione peroxidase (GPx1), of C57BL/6J HSCs.

Results: On the colony-forming cell assay, a MnSOD over expression significantly preserved the CFU-M with irradiation as compared with the mice without irradiation. HSCs with an MnSOD over expression showed a tendency for higher engraftment ability on the competitive transplantation assay even after 200 cGy re-irradiation, and we observed a significantly higher myeloid differentiation potential after the second serial transplantation. The basal mRNA levels of MnSOD and catalase were less than 1~2% and 2~5%, respectively, in the long-term and short-term HSCs, respectively, and these cells didn't activate in spite of radiation stress.

Conclusion: These results show that only an over expression of MnSOD without downstream catalase activation can not augment the mouse hematopoietic stem cell repopulation activity. (*Korean J Hematol* 2009;44:82-91.)

Key Words: Superoxide dismutase, Hematopoietic stem cells, Transplantation

접수 : 2009년 2월 23일, 수정 : 2009년 3월 27일

승인 : 2009년 3월 30일

교신저자 : 박무림, 전북 익산시 신용동 344-2번지

☎ 570-711, 원광대학교 의과대학 원광대학교병원 내과학교실

Tel: 063-859-2641, Fax: 063-859-2025

E-mail: mrpark21@wonkwang.ac.kr

이 논문은 2006학년도 원광대학교 숭산 학술연구기금의 지원에 의해 연구됨.

Correspondence to : Moo Rim Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Wonkwang University School of Medicine

344-2, Shinyong-dong, Iksan 570-711, Korea

Tel: +82-63-859-2641, Fax: +82-63-859-2025

E-mail: mrpark21@wonkwang.ac.kr

서론

활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 세포 대사의 산물로 생산되며 전통적으로 독성 물질로 알려져 왔다. 그러나 최근 활성산소는 일부 세포의 신호전달 과정에 이차 전령으로서 역할을 하며,^{1,2)} 활성산소의 양과 노출 시간에 따라 세포주기의 진행에도 영향을 주는 것으로 알려지고 있다. 즉, 고농도의 활성산소에 장시간 폭로되었을 때에는 세포주기가 정지되지만 저 농도의 활성산소는 세포주기의 진행을 오히려 촉진시킨다.³⁾ 신경 줄기세포도 일부 환원된 상태에서는 세포 생존과 분열을 유발하는 물질에 잘 반응하지만, 산화된 상태에서는 세포 분화나 세포 사멸을 유발하는 약제에 더 잘 반응한다고 한다.⁴⁾ 이러한 사실은 정상적인 세포의 생리적 활동이 세포내 산화 환원 환경의 미세한 조절에 의해 이루어짐을 의미한다.

조혈모세포의 기능도 활성산소에 의해 조절되고 있음이 밝혀지고 있다. 현재까지 알려진 조혈모세포의 활성산소 조절에 관여하는 유전자는 ataxia telangiectasia mutated (Atm)와 Forkhead O (FoxO)이다.^{5,6)} Ito 등^{5,7)}은 Atm 유전자 결핍 마우스는 활성산소가 증가되어 p38 MAPK를 통해 조혈모세포를 고갈시키므로 Atm 유전자가 세포내 활성산소를 조절함으로써 조혈모세포의 자기복제 능력을 유지시킨다고 하였다. 이후 Tothova 등⁶⁾도 FoxO 유전자 결핍 마우스에서 활성산소가 증가되어 lineage-, Sca-1+, c-kit+ (LKS) 조혈모세포를 고갈시킴을 보고하였다. 그리고 이들 마우스에게 항산화 효소인 N-acetyl-L-cysteine (NAC)을 투여했을 때 조혈모세포의 자기복제 기능이 회복되어 Atm과 FoxO 유전자가 과도하게 증가된 활성산소로부터 조혈모세포를 보호함을 알게 되었다.

반대로 조혈모세포의 기능 유지에 일정 부분의 활성산소가 필요하다는 보고들도 있다. Piccoli 등⁸⁾은 인간 조혈모세포의 세포막에 NADPH oxidase의 NOX1, NOX2, NOX4 이형체(isoform)들이 존재하여 평상시에도 지속적으로 활성산소를 생산하고 있다고 하였으며, 장 등⁹⁾은 골수 미세환경의 활성산소 농도가 조혈모세포의 기능에 영향을 미친다고 하였다. 마우스 조혈모세포를 세포내의 활성산소 발현 정도에 따라 저 농도와 고농도로 분리하였을 때 세포내 활성산소의 발현이 낮은 세포가 발현이 높은 세포에 비해 조혈모세포의 자기복제 능력이 우월하다고 하였다. 이러한 최근의 연구들을 통하여 낮은 농도의 생리적 활성산소는

조혈모세포의 기능을 유지하는데 필요하지만 병적으로 증가된 활성산소는 조혈모세포의 재증식 능력을 저해하며, 조혈모세포가 성장, 증식, 분화 사이의 균형을 유지하는데 산화 환원 신호를 미세하게 조율하는 기전을 가지고 있음을 알게 되었다.

세포 내에서 과도하게 생산된 활성산소는 항산화 효소들에 의해 제거된다. 세포 호흡에 의해 발생된 superoxide anion radical (O_2^-)은 항산화제 superoxide dismutase (SOD)에 의해 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)로 전환되며 이는 Fenton 반응에 의해 가장 독성이 높은 hydroxy radical로 전환되지만 대부분의 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase (GPx1)에 의해 무해한 물로 전환된다.¹⁾ 진핵 세포의 SOD는 세포질과 핵 내에 존재하는 구리, 아연-SOD (CuZnSOD, SOD1), 미토콘드리아 내에 존재하는 망간-SOD (MnSOD, SOD2), 그리고 세포 외 SOD (EC-SOD, SOD3) 3종류가 있다.¹⁰⁾ 그 중 미토콘드리아는 세포 호흡이 일어나는 주 장소로서 미토콘드리아 항산화제인 MnSOD의 발현을 증가시킨 일부 실험실적 연구가 진행되었으나 서로 상반되는 결과를 보고하고 있다. NIH3T3 세포주에서는 MnSOD의 과발현이 세포의 성장을 감소시킨다고 한 반면,^{11,12)} 32D cl3 세포주, K562 세포주, 마우스 일차 골수세포에서는 산화 자극에 의한 세포고사를 방지하였다.¹³⁻¹⁵⁾ 조혈모세포이식은 전신 방사선조사나 고용량 항암제를 이용한 전치치로 인하여 유해한 활성산소가 유발된다. 그러므로 저자들은 조혈모세포 이식 전후 활성산소의 조절이 조혈모세포의 자기복제 능력에 미치는 영향을 알아보고자 인간 MnSOD 유전자를 마우스 조혈모세포에 과발현시켜 전신 방사선조사한 마우스에 이식하여 조혈모세포의 자기 복제 능력을 연구하였다.

대상 및 방법

1. 리트로바이러스 생산

인간 MnSOD cDNA를 pRevTRE-MnSOD 플라스미드(Dr. Michael W. Epperly에게서 제공 받음)로부터 EcoRI와 BglII 제한효소부위가 양 끝에 표지된 시동체를 이용하여 PCR 반응으로 증폭한 후 미리 EcoRI와 BglII 제한효소로 자른 pMSCV-PGK-GFP (Dr. Guy Sauvageau로부터 제공 받음) 벡터에 삽입하여 pMSCV-MnSOD-PGK-GFP 벡터를 구축하였으며, pMSCV-PGK-GFP 벡터를 대조군으로 사용하였다(Fig. 1). 삽입된 MnSOD DNA 염기서열을 피츠버그대학교 Genomic

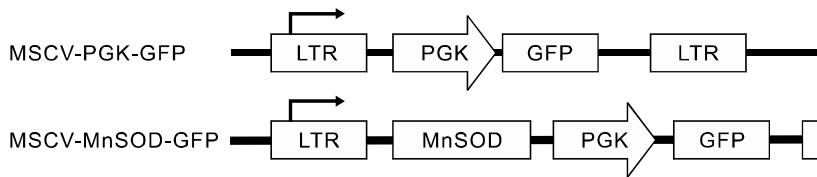


Fig. 1. Constructs of control vector MSCV-PGK-GFP and MSCV-MnSOD-GFP.

and Proteomics Core Laboratories에서 확인하였고 이후 Western blot 분석을 통해 기능을 하는 벡터 1개를 최종 선택하였다.

리트로바이러스는 10 μ g pMSCV-MnSOD-PGK-GFP, 2.5 μ g plasmid vesicular stomatitis virus glycoprotein (pVSVG), 2.5 μ g pKat을 Lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad, CA)과 함께 HEK293T 세포에 핵산전달감염 (transfection) 한 후 무혈청 배지 Opti-MEM (Gibco, Carlsbad)에서 48시간 동안 배양하여 생산하였으며 상층액을 0.45 μ M 필터(Millipore)에 거른 후 시험관내 실험을 위해서는 AFT024 세포주 (ATCC, Manassas, VA) 또는 C57BL/6J (CD45.2+) 마우스 골수 세포에, 조혈모세포 이식을 위해서는 B6.SJL (CD45.1+) 마우스 골수 세포에 형질도입을 하였다. 실험에 이용된 마우스는 Jackson 연구소(Bar Harbor, ME)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 마우스 Lineage 음성 조혈모세포의 분리 및 형질도입

마우스 대퇴골과 정강뼈에서 얻은 골수 세포를 200 μ l biotin 표지 항 CD3, CD4, CD8a (T 림프구), CD45R (B 림프구), Ly-6G (과립구), CD11b (단핵구), TER-119 (적혈구) 항체(Caltag, Carlsbad) 혼합액과 4°C에서 15분간, 200 μ l streptavidin microbead (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)와 20분간 순차적으로 반응 시킨 후 MACS LS 컬럼과 Magnetic cell separator (Miltenyi Biotec)를 이용하여 lineage 음성 세포를 얻은 다음, 50ng/mL SCF, 10ng/mL Flt3L, 10ng/mL TPO (Peprotech, Rocky Hill, NJ)가 혼합된 XVIVO-15 (Cambrex, East Rutherford, NJ) 배양액에서 하루 밤 동안 전처리한 후 바이러스 상층액과 polybrene (8 μ g/mL), 앞서의 3가지 싸이토카인액과 혼합한 후 Retro-nectin (10 μ g/well, Takara Bio, Shiga, Japan)이 처리된 비조직배양 플레이트에 분주하고 4°C 원심분리기에서 1,700rpm으로 45분간 원심 분리한 후 32°C에서 배양하였다. 다음 날 바이러스 상층액을 1회 더 반복하여 처리하였다. 최초 형질도입 48시간 후 반응을 중단 시킨 다음 이들 후 세포를 수확하여 MoFlo Sorter (Dako-

Cytomation, Denver, CO)를 이용하여 GFP 양성 세포만을 분리한 후 후속 연구에 사용하였다.

3. Western blot

인간 MnSOD 유전자의 AFT024 기질 세포주로의 형질도입율이 95% 이상이었어서 전체 세포를 초음파 파쇄기로 파쇄시킨 후 4°C에서 원심 분리하여 얻어진 단백질을 상층액을 가열한 후 12% SDS-PAGE 및 PVDF transfer membrane (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA)으로 이동시킨 후 rabbit anti-SOD (1 : 2,000, Upstate, Billerica, MA), mouse anti-actin (1 : 200, Santa-Cruz, Santa Cruz, CA) 항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit 또는 mouse IgG (Santa-Cruz, 1 : 2,500)와 반응시킨 다음 Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus kit (PerkinElmer LAS)을 이용하여 필름에 광각하였다.

4. SOD activity assay

형질도입된 마우스 골수 세포의 SOD 효소 활성은 SOD assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD)를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96 well 플레이트에 세포 파쇄 상층액을 넣고 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 배양한 후 microplate reader (PerkinElmer LAS)에서 450nm 파장을 측정하였다. SOD 활성도는 다음 공식으로 계산하였다. $[(A_1 - A_3) - (A_5 - A_2)] / (A_1 - A_3) \times 100$, A_1 , A_2 , A_3 , A_5 는 각각 uninhibited test, blank sample, blank reagent, 그리고 sample의 측정 값이다.

5. Colony-forming cell (CFC) assay

골수 조혈모세포의 집락 형성능은 형질도입된 GFP 양성 골수 세포를 50ng/mL recombinant mouse (rm) SCF, 10ng/mL rm IL-3, 10ng/mL rm IL-6 (모두 Pepro-tech), 3U/mL human EPO가 혼합된 methylcellulose 배지(MethoCult M3434, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)와 잘 섞은 후 well 당 4×10^3 개의

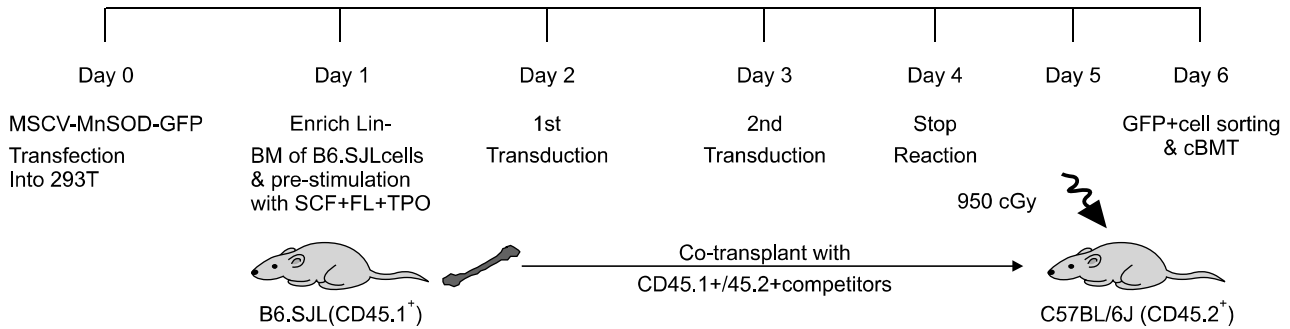


Fig. 2. Schema of retroviral transduction into the mouse hematopoietic cells and the competitive transplantation.

세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂, 고습도 환경에서 배양하고 8일째 형성된 집락을 계산하였다. 또한 MnSOD 과발현이 방사선조사로부터 조혈모세포를 보호하는지 알아보기 위해 배양 48시간 후 200cGy 방사선을 조사하여 배양하는 별도의 실험도 진행하였다.

6. 경쟁적 조혈모세포 이식 및 이차 이식

B6.SJL (CD45.1⁺) 마우스의 lineage 음성 골수 세포에 인간 MnSOD 유전자를 형질도입한 후 GFP 양성 세포를 추출하여 1×10^5 개의 CD45.1⁺/CD45.2⁺ 마우스 골수세포와 함께 950cGy 방사선 조사를 시행 받은 생후 6~8주된 C57BL/6J (CD45.2⁺) 암 마우스의 측면 꼬리정맥에 주사하였다(Fig. 2). 대조군으로는 GFP만을 발현하는 조혈모세포를 이식하였으며, 각군당 5~6마리씩 독립적인 이식 실험을 2회 반복하였다. 이차 이식은 독립적인 실험으로 첫 번째 이식 후 14주째 각군당 두 마리의 골수에서 CD45.1⁺ GFP⁺ 공여자 세포를 추출하여 4×10^5 세포를 1×10^5 CD45.2⁺ 골수 세포와 함께 1,000cGy를 조사한 C57BL/6J 암 마우스에 이식하였다. 동물실험은 피츠버그대학교 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 승인 하에 실행되었다.

7. 유세포 분석

이식 후 생착 능력 및 다양한 혈액 세포로의 분화 능력은 말초혈액을 PEcy5.5-CD45.1 (SJL), PE-CD45.2, PEcy7-CD3, PE-TexasRed-CD45R (B220), APC-CD11b 항체로 염색하여 측정하였다. 골수세포의 lineage-, c-Kit⁺, Sca-1⁺ (LKS) 세포 분석은 PEcy7-lineage marker (CD3e, CD4, CD8, B220, CD11b, Gr-1, TER-119) 카테일, PEcy5.5-Sca1 (Ly-6A/E), APC-c-kit (CD117), PE-CD45.1, biotinylated CD45.2, streptavidin-PE-TexasRed 항체를 이용하였으며, 이들 항체는 eBioscience (San

Diego, CA)와 BD Pharmingen (San Diego)으로부터 구입하여 사용하였다. 모든 세포는 Fcγ RII/III에 대한 비특이 결합을 방지하기 위하여 CD16/32 항체로 미리 배양한 후 일차 항체를 부착하였으며, 살아있는 세포만을 분석하기 위해 측정 직전에 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 염색을 한 후 CyAN_{ADP} 유세포 분석기(Dako Cytomation)에서 Summit v4.3 프로그램을 이용하여 분석하였다. 말초혈액 표현형은 GFP⁺, CD45.1⁺인 공여자 세포 분획에서, LKS 세포는 CD45.1⁺, lineage 음성인 세포 분획에서 분석하였다.

8. 골수 조혈모세포 및 각종 수임세포의 항산화 효소 mRNA 측정

마우스 골수세포에서 항산화 유전자 MnSOD, catalase, 및 GPx1의 평상시 및 방사선 조사에 따른 mRNA 발현 정도를 정량적으로 측정하였다. 생후 1.5~3개월된 C57BL/6J 마우스 암컷 20마리의 골수 세포를 얻은 다음 Tothova 등¹⁰⁾의 방법대로 CD34, Sca1, c-Kit, IL-7Rα, CD16/CD32 항체로 염색한 후 FACSria (BD, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 long-term hematopoietic stem cell (LT-HSC), short-term hematopoietic stem cell (ST-HSC), common myeloid progenitor (CMP), granulocyte-monocyte progenitor (GMP), megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP), common lymphoid progenitor (CLP) 세포 분획을 각각 따로 모은 후 그 중 일부 세포에 방사선 조사를 시행하고 Absolute RNA nanoprep kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 정량 RT-PCR은 Superscript First Strand Synthesis system (Invitrogen)을 이용하여 First strand cDNA를 합성한 후 DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzyme, Espoo, Finland)를 사용하여 지침대로 PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research,

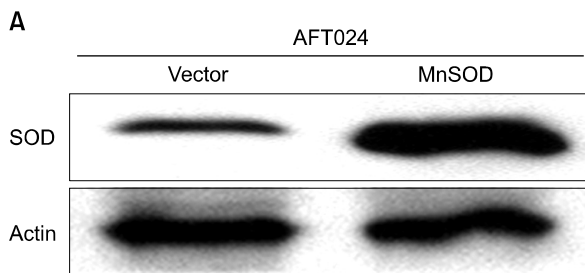
Ramsey, MN)에서 측정하였으며, PCR 조건은 95°C에서 15분간 1주기 시행 후 94°C에서 15초, 61°C에서 20초, 72°C에서 20초를 44주기 반복하였으며 각각 3회 이상 독립적인 실험을 진행하였다.

시발체(Primer)는 Primer3 software (available at http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)를 이용하여 제작하였으며, 사용된 Primer (5'-3')는 각각 다음과 같다. 마우스 MnSOD, GCGGTCGTGTAAACCTCAATAATG (forward), CCAGAGCCTCGTGGTACTTCTC (reverse); 마우스 Catalase, ACATGGTCTGGGACTTCTGG (forward), CAAGTTTTTGATGCCCTGTGTC (reverse); 마우스 GPx1, GTCCACCGTGTATGCTTCTC (forward), GTCCACCGTGTATGCCTTCTC (reverse).

또한 마우스에 형질도입된 인간 MnSOD 유전자의 지속적인 발현을 검증하기 위해 이식 받은 마우스의 말초혈액에서 GFP+CD45.1+ 세포를 추출한 후 다음 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. 인간 MnSOD, CTGGACAAACCTCAGCCCTA (forward), CTGATTGACAAAGCAGCAA (reverse).

9. 통계분석

결과들은 평균±표준오차(SEM)로 표시하였으며 두 군간의 비교는 non-parametric Mann-Whitney U test를 이용하였다. *P*값은 양측 검정으로 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 판정하였다. 통계프로그램은 SPSS program (version 12.0, Korea)을 이용하였다.



결 과

1. 형질도입된 MnSOD 유전자의 기능 검사

리트로바이러스 벡터를 이용한 인간 MnSOD 유전자의 AFT024 세포주로의 형질도입율은 95%를 상회하였고, 마우스 lineage 음성 골수 세포로의 형질도입율은 MnSOD 벡터 34.3±11.1%, 대조군 벡터 46.1±17.2%였다(data 생략). 전체 AFT024 세포 파쇄 단백질 40 μg을 Western blot하여 SOD 단백질 발현 정도를 측정한 결과 MnSOD 벡터군이 대조군에 비해 2.37배 증가하였다(Fig. 3A). 또한 형질도입 골수 세포 파쇄 단백질 50 μg의 SOD 효소 활성도는 MnSOD 벡터군이 51.91±2.5%, 대조군이 32.27±4.3%로 MnSOD 벡터군이 60% 이상 높았다(*P*<0.01, Fig. 3B). 대조군 벡터만을 형질도입한 세포에서도 일정 부분 SOD가 발현되었는데 이는 저자들이 사용한 SOD 항체가 SOD1, SOD2, SOD3 모두 측정하기 때문이며, 양군간의 발현의 차이가 MnSOD의 형질도입에 의한 과발현에 해당하므로 연구자들이 구축한 리트로바이러스 시스템이 잘 작동한다고 판단하였다.

2. MnSOD 과발현의 방사선 조사로부터 CFU-M 집락 보호

MnSOD를 과발현시킨 골수세포의 단기 자기복제 능력을 확인하기 위해 형질도입된 GFP 양성 세포만을 추출한 후 colony-forming cell (CFC) assay를 시행한 결과 일반 배양 조건에서는 MnSOD 발현군과 대조군

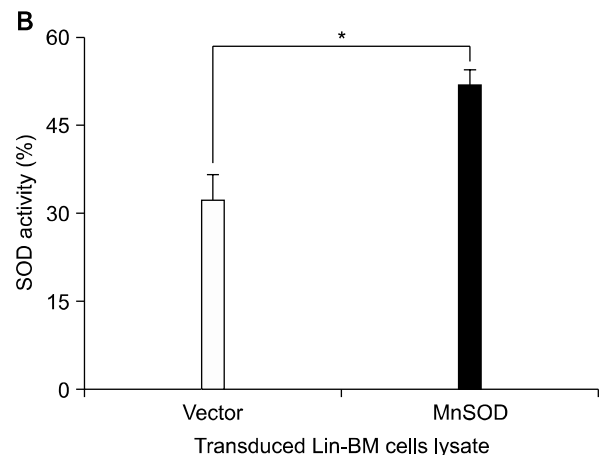


Fig. 3. Ectopic expression of human MnSOD in mouse cells. (A) Overexpression of MnSOD protein in the transduced AFT024 cells. Whole cell protein extracts were reacted with rabbit anti-human SOD and Actin antibodies. (B) Functional activity of overexpressed MnSOD protein in the transduced C57BL/6J bone marrow cells. Data are mean±sem of 2 independent experiments (**P*<0.01).

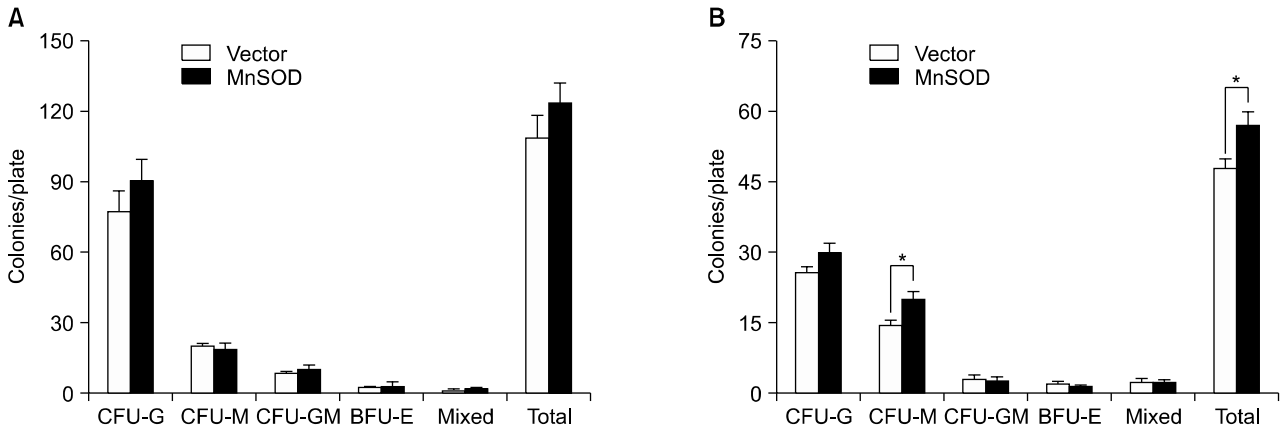


Fig. 4. In colony forming cell assay, MnSOD transduced HSCs significantly preserved CFU-M after 200cGy irradiation. CFCs were scored on day 8 in the non-irradiated plates (A) and 200cGy irradiated plates (B) after 4×10^4 per plate sorted GFP+ cells from MSCV-MnSOD-GFP or MSCV-PGK-GFP infected bone marrow cells were cultured in the Methocult M3434 medium. Data are mean \pm sem of 3 independent experiments (* $P < 0.05$).

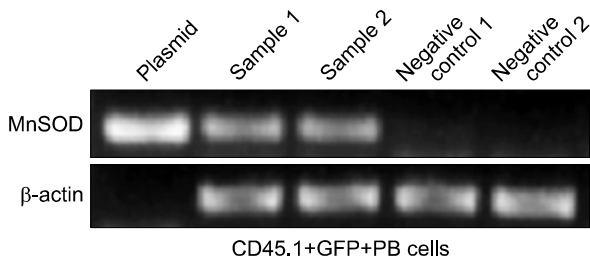


Fig. 5. In vivo verification of human MnSOD gene in the CD45.1+GFP+ peripheral blood cells of transplanted mouse.

간에 집락의 수는 차이가 없었다(Fig. 4A). 그러나 배양 48시간 후 200cGy를 조사한 배지에서는 BFU-E와 CFU-GEMM의 수는 변화가 크지 않은 반면 CFU-G 집락은 현저하게 감소하여 CFU-G가 방사선에 민감함을 알 수 있었다. 그러나 CFU-M 집락은 방사선 조사를 하지 않은 경우 대조군 19.7 ± 1.6 , MnSOD군 18.4 ± 2.5 였는데, 방사선 조사한 경우 대조군 14.7 ± 0.93 , MnSOD군 20.14 ± 1.7 로 체외에서 MnSOD의 과발현이 방사선 조사로부터 CFU-M을 보호하는 효과가 있음을 확인하였다 ($P=0.01$, Fig. 4B).

3. MnSOD 과발현의 생체내 조혈모세포 능력에 미치는 영향

MnSOD를 과발현시킨 골수 세포의 장기 자기 복제 능력을 확인하기 위해 마우스 이식 실험을 시행하였다. 양군간의 형질도입율의 차이에 따른 오차를 제거하기 위해 GFP 양성 세포만을 추출하여 이식하였으며, 이들 세포의 lineage 음성, Sca1 양성 조혈모세포의

비율도 MnSOD 발현군 $11.56 \pm 5.46\%$, 대조군 $9.14 \pm 4.68\%$ 로 양군간에 차이가 없었다($P=0.38$). 그러나 이식 후 3개월째 말초혈액 중 GFP 양성세포 비율이 대조군에서 $96.53 \pm 0.87\%$, $80.87 \pm 3.61\%$ 로 유지된 반면, MnSOD 발현군에서는 $33.38 \pm 9.51\%$, $46.09 \pm 9.85\%$ 로 현저히 저하되었다($P < 0.01$). 이식에 따른 유전자 silencing 유무를 확인하기 위해 이식 받은 마우스의 말초혈액에서 인간 MnSOD 유전자를 검사한 결과 인간 MnSOD 유전자가 증명되어(Fig. 5), GFP 단백질 발현의 소실은 MnSOD cDNA 크기가 666bp로 대조군 벡터에 비해 크기가 큼에 따라 PGK의 전사 능력이 저하되어 생긴 현상으로 추정하였다.

그러므로 저자들은 공여자 세포의 정확한 생착 능력을 측정하기 위하여 GFP+CD45.1+ 세포를 말초혈액에서 분석하였다. 이식 후 3개월째 대조군에 대한 MnSOD 발현군의 상대적 생착율은 1.59 ± 0.51 배 높았으나 통계적으로는 유의하지 않았다($P=0.32$). 그래서 생착된 조혈모세포의 스트레스 유발 후 변화를 관찰하기 위하여 이식한 마우스에 200cGy를 재조사하였으며 상대적 생착율이 1개월째 3.39 ± 1.42 배, 3개월 후 2.98 ± 1.1 배로 높았으나 통계적으로는 유의하지는 않았다(Fig. 6A).

그러므로 저자들은 보다 원시적인 LT-HSC에서의 MnSOD 과발현의 효과를 알아보기 위해 독립적인 2차 조혈모세포이식을 MnSOD 발현군 6마리, 대조군 8마리에 시행하였다. 이식 후 4주째 첫 말초혈액 분석 때까지 MnSOD 발현군은 모두 생존한 반면 대조군은 6마리만 생존하여 생존율은 MnSOD 발현군이 우수하였

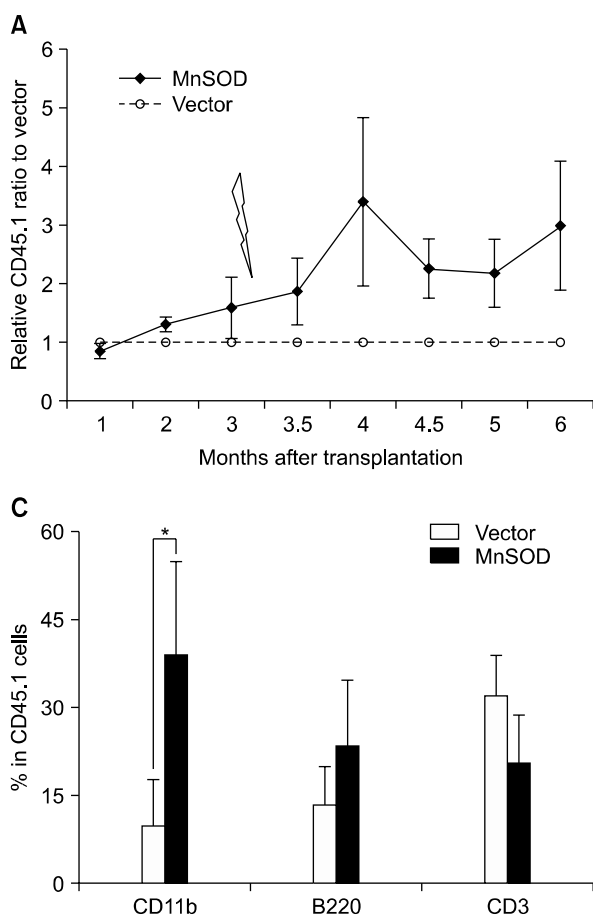


Fig. 6. Competitive in vivo transplantation assay. (A) MnSOD overexpressed HSCs showed higher engraftment potential than those of control vector after 200cGy re-irradiation. Data represent mean \pm sem of relative CD45.1+ ratio of MnSOD to vector in the peripheral blood of 2 independent transplantation experiments (N=10 in vector group; N=11 in MnSOD group). (B) Maintain the repopulating capacity of MnSOD overexpressed HSCs in the serial transplantation. (C) Multilineage reconstitution showed preserving more myeloid differentiation in MnSOD overexpressed HSCs of second transplantation. Data are mean \pm sem (N=6 in each group, * $P < 0.05$).

다. 그러나 이때까지 생존한 마우스를 대상으로 분석한 결과 GFP 발현율은 1차 이식과 동일한 양상이었으며, 생착률도 두 군간에 통계학적인 차이는 없었다 ($P=0.63$, Fig. 6B). 그러나 말초혈액의 림프구와 과립구/단핵구의 분화 양상은 두군에 차이가 있었다. 2차 이식 2개월 제 말초혈액 분석에서 대조군은 공여자 기원 세포의 70% 이상이 CD3 양성 T 림프구였고 CD11b 양성 단핵구/과립구가 10% 미만이었던 반면, MnSOD 발현군은 CD11b 양성 세포가 26%로 대조군에 비해 유의하게 높아 다양한 말초혈액 세포로의 분화 능력이 우월함을 알 수 있었다($P=0.037$, Fig. 6C).

4. 마우스 조혈모세포의 기저 항산화 효소 mRNA 발현

생체 이식 실험에서 예상과는 달리 MnSOD 과발현이 마우스의 골수 조혈모세포의 자기 복제 능력을 현저하게 증가시키지 못함에 따라 그 원인을 알아보고자 C57BL/6J 마우스의 골수 조혈모세포 및 다양한 수임세포(Committed cell)에서 기저 상태 및 방사선을 조사한

후 변화를 보기 위해 MnSOD, catalase, GPx1의 mRNA 발현 정도를 β -actin의 mRNA 발현 정도에 대하여 정량적으로 측정하였다. 기저 상태에서 항산화제 중 GPx1의 발현이 ST-HSC에서 25%, LT-HSC에서 5%로 상대적으로 높은 반면 MnSOD 및 catalase는 LT-HSC에서 각각 0.4, 1.7%에 불과했으며, ST-HSC에서도 발현이 2~5% 미만으로 매우 저조하였다(Fig. 7). 방사선 조사는 활성산소를 유리하고 이를 제거하기 위해 항산화제가 증가할 것이라는 일반적인 생각과는 달리 조혈모세포에서 방사선 조사는 항산화 효소의 활성을 전혀 증가시키지 않았다. 방사선 조사량의 증가에 따른 mRNA 발현의 변화를 알아보기 위해 저선량(200cGy)과 고선량(800cGy)을 조사하였는데 거핵세포-적혈구수임세포(MEP)에서만 800cGy에서 catalase의 발현이 유의하게 증가하였고(Fig. 7B), 대부분은 기저 상태에 비해 방사선 조사가 항산화 효소 활성을 증가시키지 못하였다. 오히려 ST-HSC에서 증가되어 있었던 GPx1은 방사선 조사 후 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 7C).

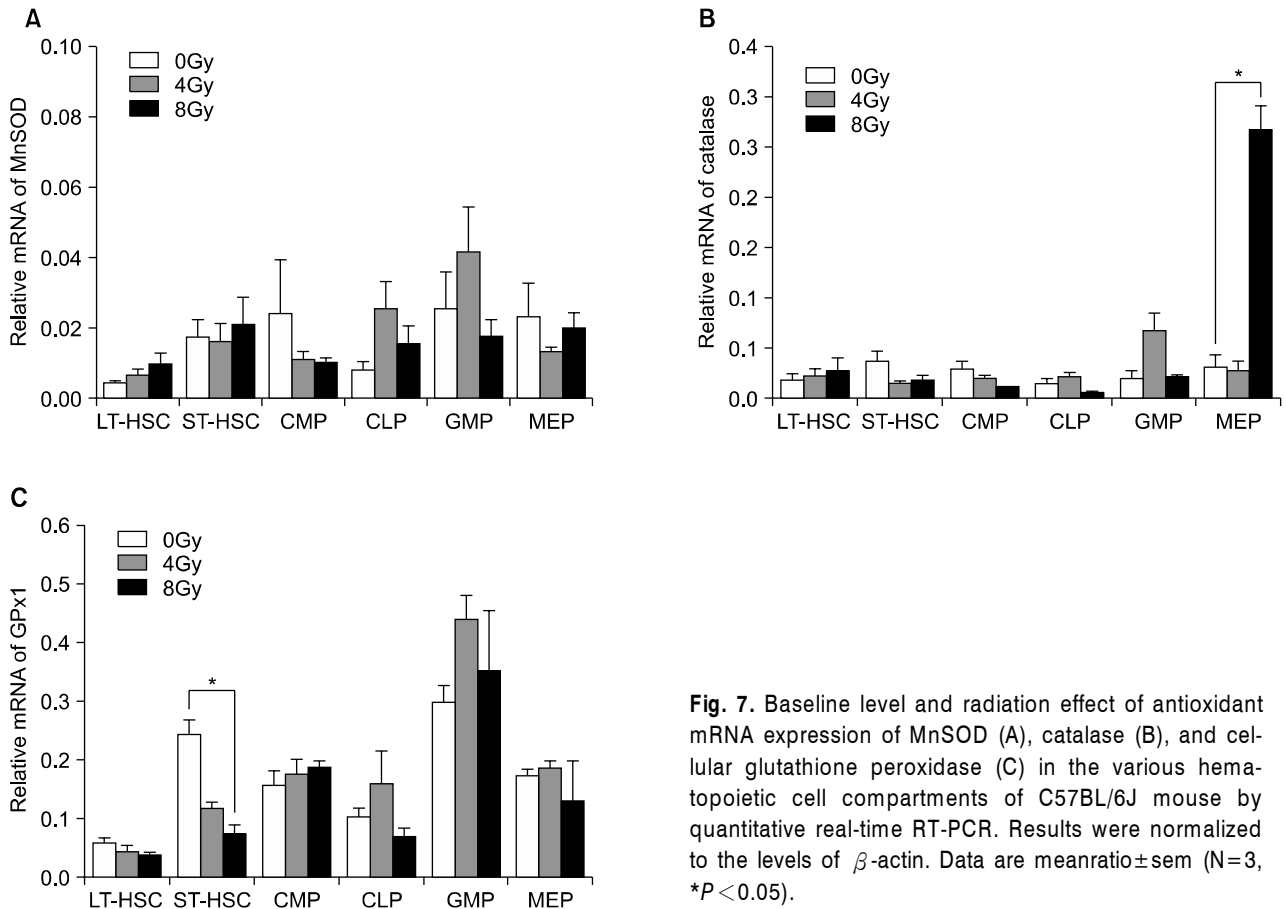


Fig. 7. Baseline level and radiation effect of antioxidant mRNA expression of MnSOD (A), catalase (B), and cellular glutathione peroxidase (C) in the various hematopoietic cell compartments of C57BL/6J mouse by quantitative real-time RT-PCR. Results were normalized to the levels of β -actin. Data are mean ratio \pm sem (N=3, * P <0.05).

고 찰

MnSOD는 미토콘드리아 단백질로 세포 호흡에 의해 형성된 superoxide radical을 과산화 수소로 전환시키는 역할을 한다. 조혈모세포에서 MnSOD의 감소에 따른 기능 변화에 관한 연구는 극히 제한적이다. MnSOD knockout 마우스는 생후 수 주 내에 심장 기형과 뇌 장애에 의해 사망하기 때문이다.^{16,17)} 이에 Friedman 등¹⁸⁾은 조기 사망을 극복하기 위하여 마우스 태아 간모세포(fetal liver cell)에서 MnSOD 유전자를 결핍시킨 후 생체내 이식을 시행하는 방법을 사용하여 MnSOD의 결핍이 적혈구 수임세포가 산화 자극에 의해 용혈성 빈혈을 초래한다는 사실을 밝혀냈다. 그러나 림프구나 골수구의 생착에는 아무런 영향이 없었다. 반면에 MnSOD를 과발현시킨 연구는 서로 상반되는 결과를 보고하고 있다. 32D cl3 마우스 조혈모세포주, K562 세포주 및 마우스의 일차 골수세포에서 MnSOD를 과발현 시켰을 때 방사선조사에 의한 세포고사가 감소한다

고 한 반면,¹³⁻¹⁵⁾ Oberley 그룹에서는 NIH3T3 마우스 섬유모세포에서는 활성산소가 증가하고 G1-S 세포주기 이행시간이 증가하여 세포 성장이 감소하며, 지속적으로 발현할 경우 세포고사를 초래한다고 하였다.^{11,12)} 이러한 생체 외 실험 결과는 MnSOD는 superoxide radical을 제거하는 항산화제로서 기능을 하는 반면 과산화수소를 생산하게 하는 산화물질로도 작용함을 보여준다. 이러한 상반된 결과들은 저자들로 하여금 조혈모세포에 직접 MnSOD를 과발현시켜 생체내 효과를 보고자 하였다.

저자들의 리트로바이러스를 이용한 인간 MnSOD 유전자의 마우스 골수 세포로의 형질 도입은 Western blot과 SOD 효소 활성 측정을 통해 유전자가 작동함을 증명하였고, MnSOD의 과발현이 방사선 조사로부터 CFU-M을 보호함을 보여줬다. 그러나 생체내 이식 실험에서는 MnSOD 과발현에 따른 조혈모세포의 재분화 능력을 뚜렷하게 향상시키지는 못하였다. 이식 후 3개월째 대조군에 비해 공여자 세포의 생착 능력이 1.59배 증가하였고, 방사선 재조사 후 3.39배까지 증가 하

였지만 개체간 편차가 심하여 통계학적으로 유의 있는 결과를 보이지 못했다. 그러나 2차 이식에서는 MnSOD 과발현군의 말초혈액에서 골수구계 세포의 재분화 능력이 대조군에 비해 우월함을 보여줬다. 이러한 결과는 저자들의 MnSOD 과발현 시스템이 조혈모세포의 능력을 향상시키기에는 미흡하지만 방사선 조사와 이차 이식 같은 스트레스 상황에서는 조혈모세포의 자기 분화 능력을 유지시켜 준다는 사실을 알 수 있었다.

본 연구에서 MnSOD 과발현이 조혈모세포의 능력에 뚜렷한 영향을 미치지 못한 이유로 첫째 단백질의 효소 활성도를 들 수 있다. Oberley 등은 MnSOD 단백질의 능력은 효소의 활성도에 달려있으며,¹⁹⁾ 유방암 세포주 실험에서 아미노산 58이 isoleucine으로 변형된 단백질의 효소 활성도가 가장 높다고 보고 하였다.²⁰⁾ 저자들의 MnSOD 유전자는 단백질의 발현은 2.4배 증가시킨 반면 효소 활성도는 약 60% 정도만 증가되어 효소의 활성도가 상대적으로 약했다고 판단된다.

또 다른 설명으로는 MnSOD는 과산화수소를 생성하며, 이를 해독하기 위해서는 반드시 catalase나 GPx1이 필요하다는 것이다. MnSOD 효소에 의해 형성된 과산화수소는 catalase와 GPx1에 의해서 물로 전환되지만 만일 이들 효소가 활성화 되지 않을 경우 독성물질인 hydroxy radical로 전환되기 때문이다. 그러나 항산화 효소가 잘 알려져 있음에도 불구하고 조혈모세포에서 이들 효소 활성화에 관한 기존 연구가 없었다. 본 연구에서 MnSOD 및 catalase의 기저 mRNA 발현은 LT-HSC, ST-HSC에서 1~3% 밖에 되지 않았으며 더욱이 방사선 조사에 의해 전혀 이들 효소가 활성화 되지 않았다. 이러한 결과는 조혈모세포에서 catalase나 GPx1 효소가 활성화되지 않은 상태에서 MnSOD만을 과발현 시켰을 때 증가된 과산화수소가 catalase나 GPx1에 의해 효과적으로 해독되지 못함으로써 독성이 가장 심한 수산화 라디칼로 전환되어 세포에 오히려 해를 초래할 수 있다는 것이다. 실제로 이러한 사실은 많은 암세포, 즉, 악성 흑색종, 유방암 세포주 MCF-7, 신경교종, 구강 편평상피암, 전립선암, 췌장암 세포주에서 MnSOD를 과발현 시킨 결과 암세포의 성장을 억제하였다고 보고하고 있다.²¹⁻²⁴⁾ 그리고 이러한 MnSOD 과발현에 의한 항종양 효과가 catalase 유전자를 과발현 시켰을 때 과산화수소의 농도를 감소시켜 항종양 효과가 소실되어 MnSOD가 항종양 효과가 있음을 증명한 보고도 있다.²⁵⁾

결론적으로 마우스 조혈모세포에서 MnSOD의 과발현은 다음 단계의 catalase의 활성이 저하되어 있어 조

혈모세포의 재분화 능력을 뚜렷하게 향상시키지 못하였으므로 이차 전후 활성산소 농도 조절에 따른 조혈모세포의 재분화 능력의 향상을 위해서는 MnSOD와 catalase 유전자를 모두 활성화 시키는 연구가 필요하겠다.

요 약

배경: 세포내 활성산소는 농도에 따라 이중 역할을 한다. 낮은 농도에서는 이차 전령으로서 역할을 하는 반면 고농도의 산화 환경에서는 조혈모세포를 고갈시킨다. 그러므로 본 연구에서는 항산화제 MnSOD를 과발현시켰을 때 마우스 조혈모세포의 재분화 능력에 미치는 영향을 관찰하였다.

방법: 인간 MnSOD 유전자가 삽입된 MSCV-MnSOD-GFP 리트로바이러스를 제작하여 마우스 조혈모세포에 형질도입하여 생체 외 집락 형성능과 생체내 이식을 시행하였다. 형질도입된 GFP+CD45.1+ B6.SJL 골수 세포를 CD45.1+/CD45.2+ 마우스 골수 단핵구와 함께 950cGy 방사선 조사를 받은 C57BL/6J (CD45.2+) 마우스로 이식하여 말초혈액에서 생착율을 측정하였다. 또한 C57BL/6J 마우스의 조혈모세포에서 기저 상태 및 방사선 조사 후의 항산화제 MnSOD, catalase, GPx1의 mRNA 발현을 조사하였다.

결과: MnSOD 과발현은 방사선 조사로부터 CFU-M 집락을 유의하게 보호하였다. MnSOD 과발현은 경쟁적 이식 3개월째 대조군에 비해 생착 능력이 1.59배 높았고 재방사선 조사 후 3.39배까지 높았으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. 이차 이식에서 MnSOD 과발현군에서 골수구 세포로의 분화 능력이 유의하게 높았다. 또한 마우스 조혈모세포에서 MnSOD와 catalase의 효소 활성이 매우 낮았으며 이들은 방사선 조사에 의해서도 활성이 증가하지 않았다.

결론: 마우스 조혈모세포에서 catalase의 활성 없이 MnSOD만의 과발현은 조혈모세포의 재분화 능력을 유의 있게 향상시키지 못하였다.

참 고 문 헌

- 1) Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999;27:936-44.
- 2) Giles GI. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr Pharm Des* 2006; 12:4427-43.
- 3) Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with

- reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004;337:1-13.
- 4) Noble M, Mayer-Pröschel M, Pröschel C. Redox regulation of precursor cell function: insights and paradoxes. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1456-67.
- 5) Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature* 2004;431:997-1002.
- 6) Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007;128:325-39.
- 7) Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006;12:446-51.
- 8) Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, et al. Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:965-72.
- 9) Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 2007;110:3056-63.
- 10) Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human cancers. *Free Radic Biol Med* 2004;36:718-44.
- 11) Li N, Oberley TD. Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-over expressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle. *J Cell Physiol* 1998;177:148-60.
- 12) Kim A, Zhong W, Oberley TD. Reversible modulation of cell cycle kinetics in NIH/3T3 mouse fibroblasts by inducible over expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:489-500.
- 13) Epperly MW, Bernarding M, Gretton J, Jefferson M, Nie S, Greenberger JS. Overexpression of the transgene for manganese superoxide dismutase (MnSOD) in 32D cl 3 cells prevents apoptosis induction by TNF-alpha, IL-3 withdrawal, and ionizing radiation. *Exp Hematol* 2003;31:465-74.
- 14) Epperly MW, Osipov AN, Martin I, et al. Ascorbate as a "redox sensor" and protector against irradiation-induced oxidative stress in 32D CL 3 hematopoietic cells and subclones over expressing human manganese superoxide dismutase. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:851-61.
- 15) Southgate TD, Sheard V, Milsom MD, et al. Radio-protective gene therapy through retroviral expression of manganese superoxide dismutase. *J Gene Med* 2006;8:557-65.
- 16) Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376-81.
- 17) Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9782-7.
- 18) Friedman JS, Rebel VI, Derby R, et al. Absence of mitochondrial superoxide dismutase results in a murine hemolytic anemia responsive to therapy with a catalytic antioxidant. *J Exp Med* 2001;193:925-34.
- 19) Zhang Y, Smith BJ, Oberley LW. Enzymatic activity is necessary for the tumor-suppressive effects of MnSOD. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1283-93.
- 20) Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res* 1999;59:6276-83.
- 21) Church SL, Grant JW, Ridnour LA, et al. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3113-7.
- 22) Liu R, Oberley TD, Oberley LW. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum Gene Ther* 1997;8:585-95.
- 23) Li N, Oberley TD, Oberley LW, Zhong W. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate* 1998;35:221-33.
- 24) Weydert C, Roling B, Liu J, et al. Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the over expression of manganese superoxide dismutase. *Mol Cancer Ther* 2003;2:361-9.
- 25) Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE, Meléndez JA. Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. *Free Radic Biol Med* 2000;29:801-13.