

## Pertussis Toxin 민감 G 단백질 수용체를 통한 신호전달이 골수 중간엽줄기세포 증식에 미치는 영향

충남대학교 의과대학 내과학교실

김성우 · 황진희 · 진선아 · 윤각원 · 양영준 · 박남환 · 이호진 · 윤환중 · 조덕연 · 김삼용

### Role of Pertussis Toxin-sensitive G Protein-coupled Receptor Signaling in the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Seong-Woo Kim, Jin-Hee Hwang, Seon-Ah Jin, M.D., Gak-Won Yun, M.D., Young-Joon Yang, M.D., Nam-Whan Park, M.D., Hyo-Jin Lee, M.D., Hwan-Jung Yun, M.D., Deog Yeon Jo, M.D. and Samyong Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

**Background:** Bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSCs) can be expanded over 20~30 cell doublings *in vitro* even in the absence of any growth factors. However, the mechanisms that govern MSC proliferation are not well understood.

**Methods:** We investigated the role of signaling of the pertussis toxin (PTX)-sensitive G protein-coupled receptor in the proliferation of BM MSCs.

**Results:** PTX inhibited the proliferation of human BM MSCs and murine BM stromal MS-5 cells in a dose-dependent manner. Among the chemokines produced by the BM stromal cells, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) enhanced the proliferation of BM MSCs, while MIP-1  $\alpha$ , MCP-3 or RANTES did not. PTX also inhibited the proliferation of some fibroblasts, such as MRC-5 and NIH-3T3, but did not affect the proliferation of HeLa and HSF cells. HSF cells did not express CXCR4 mRNA, but did produce SDF-1. In contrast, HeLa cells expressed CXCR4 strongly on the cell surface, but did not produce SDF-1. BM MSCs, MS-5, MRC-5, and NIH-3T3 cells all expressed CXCR4 minimally on the cell surface. These cells, however, had abundant CXCR4 protein in their cytoplasm, which was demonstrated by flow cytometric analysis performed after permeabilization of the cells. In addition, an ELISA performed on the culture supernatants of the cells revealed that these cells constitutively produce and secrete SDF-1.

**Conclusion:** These results indicate that the signaling through the PTX-sensitive G protein-coupled receptor, which is induced by autocrine factors, plays an important role in the proliferation of BM MSCs and in some fibroblasts, and that SDF-1 is the most probable candidate for the autocrine growth factor. (*Korean J Hematol* 2007;42:24-32.)

**Key Words:** Bone marrow, Mesenchymal stem cells, G protein-coupled receptor, Pertussis toxin, Stromal cell-derived factor-1, Cell proliferation

접수 : 2006년 9월 19일, 수정 : 2006년 10월 9일

승인 : 2006년 11월 9일

교신저자 : 조덕연, 대전광역시 중구 대사동 640

☎ 301-721, 충남대학교병원 내과

Tel: 042-280-7162, Fax: 042-257-5753

E-mail: deogyeon@cnu.ac.kr

본 연구는 한국학술진흥재단 지역대학우수과학자지원사업 (KRF-2005-202-E00085) 지원으로 수행되었음.

Correspondence to : Deog Yeon Jo, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungnam National University

640, Daeja-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea

Tel: +82-42-280-7162, Fax: +82-42-257-5753

E-mail: deogyeon@cnu.ac.kr

## 서 론

골수 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)는 조골 세포, 연골세포, 근육세포 및 지방세포 등 다양한 세포로의 분화가 가능하여 임상적 적용을 위한 연구가 활발하다.<sup>1)</sup> 중간엽줄기세포가 시험관 내에서 별도의 성장인자 없이도 20~30배가 되지만 이러한 증식 또는 자기갱신의 조절기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이 세포들이 그리 높지 않은 농도의 혈청이 존재하는 기본 배지에서 잘 증식하는 것은 이들 세포가 자가 성장인자(autocrine growth factor)를 분비할 가능성이 있음을 암시한다. 최근 CXC 케모카인(chemokine)의 하나인 stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)이 일부 골수 기질세포의 자가 성장인자로 작용한다고 보고된 바 있다.<sup>2)</sup>

골수 기질세포 또는 중간엽줄기세포는 SDF-1 이외에도 다양한 케모카인을 생성하고 분비한다.<sup>3-5)</sup> 케모카인은 세포의 화학주성을 유발하는 것이 고유의 활성이지만 종종 수용체를 발현하는 세포의 증식을 촉진하거나 억제하기도 한다. 즉, 케모카인 수용체 CXCR3와 CCR7을 통한 신호전달을 통해 T 세포 증식을 억제한다.<sup>6)</sup> CXC 케모카인인 platelet factor 4와 IP-10은 제대 정맥내피세포의 증식을 억제하고,<sup>7,8)</sup> 케모카인 수용체 CXCR2를 경유한 신호전달은 골수구계 전구세포의 증식을 억제한다.<sup>9)</sup> SDF-1을 비롯한 케모카인은 골수에서 생성되는 일반적인 시토카인과는 달리 G-단백 연계 수용체(G-protein-coupled receptor)를 경유한 신호전달을 통해 그 효과를 나타내는데,<sup>10)</sup> G 단백질 종류에 따라 신호전달이 pertussis toxin (PTX)에 의해 차단될 수 있다. PTX는 Bordetella pertussis에 의해 생성되는 독소로 A 촉진자와 B 올리고머로 구성되어 있다. A promoter의 S1 subunit은 ADP의 리보실화(ribosylation)를 통해 일부 G단백의 신호전달을 차단하는데,<sup>11)</sup> 이러한 특성으로 인하여 PTX가 G 단백질 연계 신호전달을 차단하기 위한 방편으로 각종 연구에 이용되고 있다.<sup>12)</sup> 본 연구에서는 PTX가 골수 중간엽줄기세포의 증식에 미치는 영향을 조사하고 그 의미를 분석하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 골수 중간엽줄기세포 및 세포주

골수세포는 동종골수이식 시 동의를 구한 후 정상 공여자로부터 얻었다. Ficoll을 사용하여 단핵세포를

분리한 후 MiniMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)를 이용해 제공된 지침에 따라 CD34 양성세포를 분리하고 남은 CD34 음성세포를 MEM- $\alpha$  (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에 12.5%의 말혈청(GIBCO-BRL), 12.5%의 우태혈청(GIBCO-BRL),  $10^{-6}$ M의 hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO, USA) 및  $5 \times 10^{-5}$ M의 2-mercaptoethanol (Sigma)를 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다. 부착 세포가 밀집 상태에 도달한 후 수확하고, 동일한 배지를 사용하여 주 1회 계대배양하였다. 3회의 계대배양을 시행한 후 CD45 양성세포는 거의 발견되지 않았으며, 이 세포를 중간엽줄기세포로 사용하였다. 골수 기질세포주로는 생쥐 세포주인 MS-5를 사용하였다. 10% 우태혈청(GIBCO-BRL)을 함유한 MEM- $\alpha$  (GIBCO-BRL)를 배지로 하여 주 1회 계대배양하였다. MS-5는 사람의 미성숙 조혈세포의 장기배양을 지지하며<sup>13)</sup> SDF-1을 분비한다.<sup>14)</sup> PTX가 중간엽줄기세포의 성장에 미치는 영향이 세포 특이적인 것인지를 알아보기 위하여 수종의 섬유아세포(fibroblast)에 대한 분석을 병행하였다. 이를 위해 생쥐 섬유아세포주인 NIH-3T3와 사람 섬유아세포주인 MRC-5, HSF 및 HeLa 등을 사용하였다.

### 2. 케모카인 처리 및 배양

SDF-1, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3 및 RANTES 등의 케모카인은 모두 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 골수 기질세포 및 각종 섬유아세포주를 MEM- $\alpha$  또는 무혈청배지X-VIVO (BioWhittaker, Walkerville, MA, USA)에 배양하면서 케모카인 및 PTX (Sigma)를 일정한 농도로 첨가하여 배양하면서 이들이 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하였다.

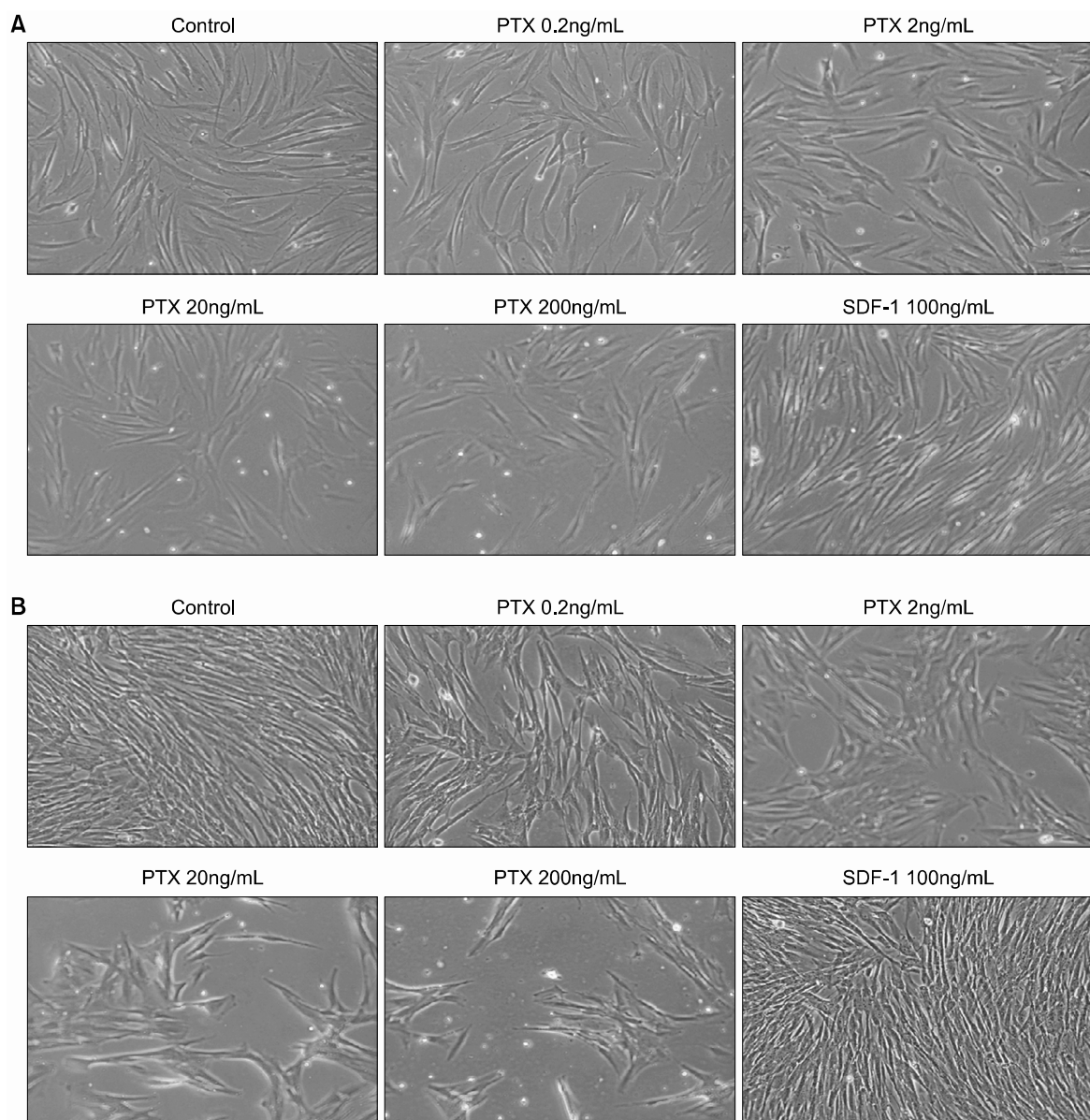
### 3. 유세포분석

세포 표면의 CXCR4 발현은  $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  세포를 phycoerythrin (PE)이 부착된 항CXCR4 단클론항체 (12G5; BD PharMingen, San Diego, CA, USA)를 첨가하여, 4°C에서 30분간 반응시킨 후 Coulter Elite flow cytometer (Coulter Electronics Ltd., Hialeah, FL, USA)를 사용하여 분석하였다. 세포질 내 CXCR4 발현은 세포를 1% paraformaldehyde로 고정하고 saponin을 함유한 투과화 시약(permeabilization reagent; Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA)을 처리한 후 위와 동일한 방법으로 분석하였다. Apoptosis 분석을 위해서는 대상 세포를 annexin V (R&D Systems)와 propidium iodide (PI)로 이중 염색한 후 분석하였다.

#### 4. 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

Trizol™ (Gibco-BRL)을 이용하여 제조사가 제공한 지침에 따라 RNA를 획득하였다. 정제 후 1 µg의 RNA를 대상으로 SuperScript 역전사효소(Gibco-BRL)와 universal primer oligo dT<sub>15</sub> (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA를 제조하였다. 1 µL의 cDNA를 2 µmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µmol/L specific primers 및

1U/reaction tube of Koma Taq polymerase (Koma International, Seoul, Korea)가 첨가된 PCR buffer (Gibco-BRL) 24 µL에 첨가하였다. 중합연쇄반응은 GeneAmp PCR system (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)을 사용하여 94°C 1분, 55~65°C 45초, 그리고 72°C에서 1분의 순으로 30회 시행하였다. 다음과 같은 primer를 사용하였다. 사람 CXCR4 sense-AAT CTT CCT GCC CAC CAT CTA CTC C, antisense-GCG GTC ACA GAT ATA TCT GTC ATC TGC C. 사람 SDF-1

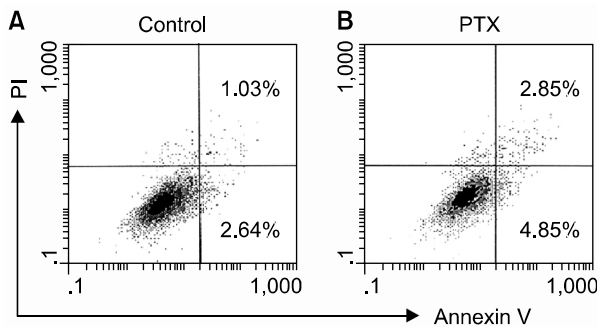


**Fig. 1.** Pertussis toxin (PTX) inhibits the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in a dose-dependent manner. MSCs were incubated in IMDM (A) or IMDM supplemented with 10% FBS (B) in the absence (control) or presence of PTX (0.2~200ng/mL) or SDF-1 (100ng/mL). After 3 days, the cultures were observed under the phase contrast microscope. A representative result of two independent experiments is shown.

sense-AGA ATT CAT GAA CGC CAA GG, anti-sense-AGG ATC CTC ACA TCT TGA ACC. 사람 GAPDH sense-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC, antisense-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC. 생쥐 CXCR4 sense-TCA GTG GCT CTC CTC TT, antisense-TTT CAG CCA GCA GTT TCC TT. 생쥐 SDF-1 sense-GCT CTG CAT CAG TGA CGG TA, antisense-TAA TTT CGG GTC AAT GCA CA. 생쥐 GAPDH sense-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG, antisense-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA.

## 5. ELISA 분석

대상 세포를 T25 배양 플라스크에 적절한 배지를 사용하여 배양하였다. 세포가 플라스크 표면을 완전히 덮으면 상청액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS), Gibco-BRL를 사용하여 3회 이상 세척한 후 3mL의 무혈청배지 X-VIVO를 첨가하여 배양하였다. 3일 동안 배양한 후 상청액을 취하여 2 $\mu$ m 필터로 여과한 후 분석할 때까지 4°C에 보관하였다. 배양 상청액의 SDF-1  $\alpha$  농도는 ELISA kit (R&D Systems)를 사용하여 측정하였다. 검체를 제조사가 제시한 지침에 따라 처리한 후 spectrophotometer (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 optical density를 얻고, Softmax프로그램(Molecular Device Co.)을 이용하여 표준 곡선과 SDF-1  $\alpha$ 치를 얻었다.



**Fig. 2.** Effects of pertussis toxin (PTX) on the apoptosis of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs were incubated in serum-free X-VIVO medium in the absence (A) or presence (B) of PTX (200ng/mL). After 24 hours of incubation, the cells were stained with propidium iodide (PI) and annexin V, and then subjected to a flow cytometric analysis. A representative result of three independent experiments is shown.

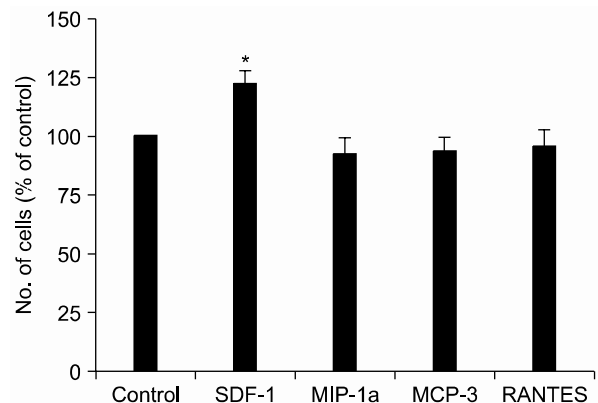
## 6. 통계처리

통계량은 Student-*t* test로 검정하였으며, *P*값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 의미가 있다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. PTX가 골수 중간엽줄기세포의 증식과 apoptosis에 미치는 영향

혈청이 들어있지 않은 MEM- $\alpha$  배지를 사용하여 중간엽줄기세포를 배양하면서 PTX를 0.2~200ng/mL의 다양한 농도로 첨가했을 때 PTX가 용량 의존적으로 세포 증식을 억제하였다. SDF-1 (100ng/mL)을 첨가한 경우에는 반대로 증식이 촉진되었다. 10% 우태혈청을 함유한 MEM- $\alpha$ 를 사용하여 배양했을 때 대조군의 경우에도 우태혈청 첨가 없이 배양한 경우에 비해 증식이 향상되었다. 이때에도 PTX는 용량 의존적으로 세포 증식을 억제하였으며, SDF-1은 증식을 향상시켰다 (Fig. 1). PTX를 2시간 동안 처리한 후 제거해도 증식 억제 효과는 지속되었다(결과 제시되지 않음). 이러한 증식 억제에 세포의 apoptosis가 관여하는지를 알아보기 위하여 annexin V와 PI를 이용한 유세포분석을 시행한 결과 PTX에 의한 apoptosis 유발 효과는 매우 경미하였다(Fig. 2).



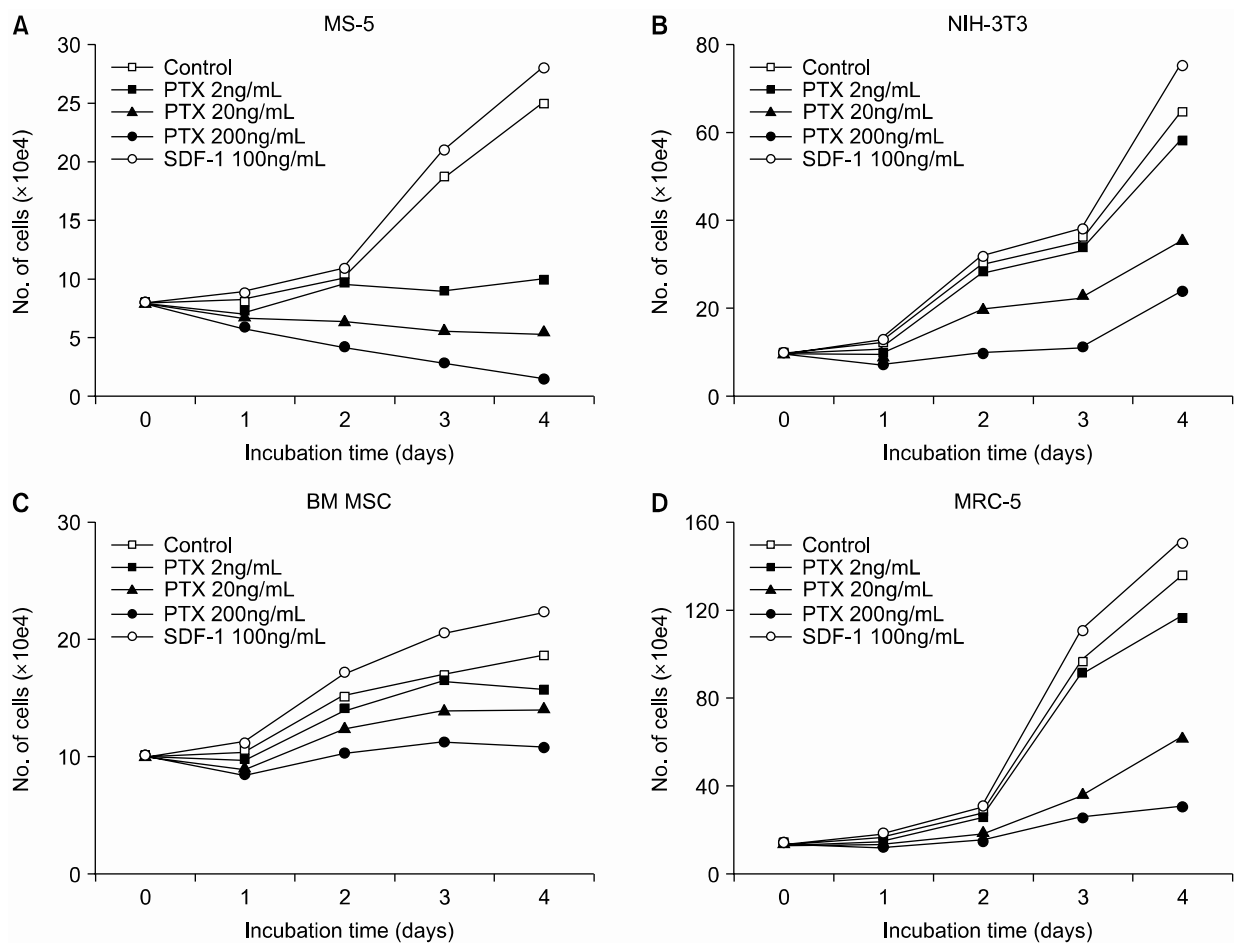
**Fig. 3.** SDF-1, but not other chemokines, enhances the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs were incubated in serum-free medium X-VIVO in the absence (control) or presence of various chemokines (100ng/mL) for 3 days. Data are the mean and S.D. of number of the cells expressed in percentage of control from three independent experiments. \**P* < 0.05.

## 2. 각종 케모카인이 중간엽줄기세포의 증식에 미치는 영향

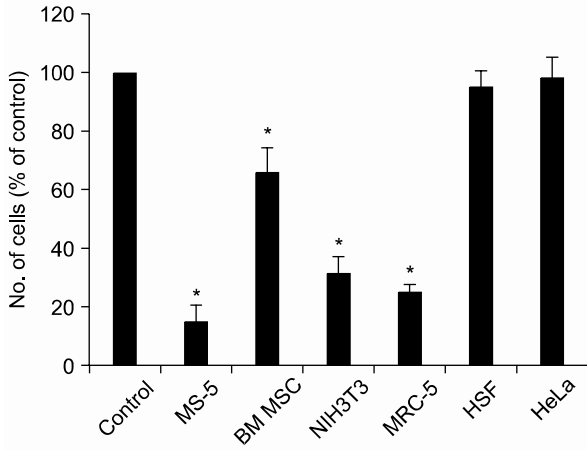
골수에서 생성되는 각종 케모카인이 중간엽줄기세포의 증식에 미치는 영향을 확인하였다. 무혈청배지인 X-VIVO를 사용하여 중간엽줄기세포를 배양하면서 SDF-1, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3 및 RANTES 등의 케모카인을 100ng/mL의 농도로 첨가하였다. 배양 4일 후 SDF-1은 대조군에 비해 세포수를  $21 \pm 5\%$  증가시켰으나( $P < 0.05$ ), 다른 케모카인은 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 배양 기간을 늘리거나 케모카인의 농도를 달리하여 첨가한 경우에도 결과는 마찬가지였다(결과 제시되지 않음).

## 3. PTX가 각종 섬유아세포의 증식에 미치는 영향

PTX에 의한 세포 증식 억제가 골수 중간엽줄기세포에 대해서만 나타나는 세포 특이적 현상인지를 확인하기 위하여 몇몇 생쥐 및 사람 섬유아세포주를 대상으로 PTX가 세포 증식에 미치는 영향을 분석하였다. 골수 중간엽줄기세포를 비롯하여 MS-5, NIH-3T3, MRC-5 등의 세포에 대해서는 PTX가 용량의존적으로 증식을 억제하였고, SDF-1은 일관성 있게 증식을 향상시켰다. 이러한 세포 증식 억제 효과는 MS-5에서 가장 뚜렷하였으며 중간엽줄기세포에서 상대적으로 미약하였다. 반면, PTX가 HSF와 HeLa의 증식에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 4, 5).



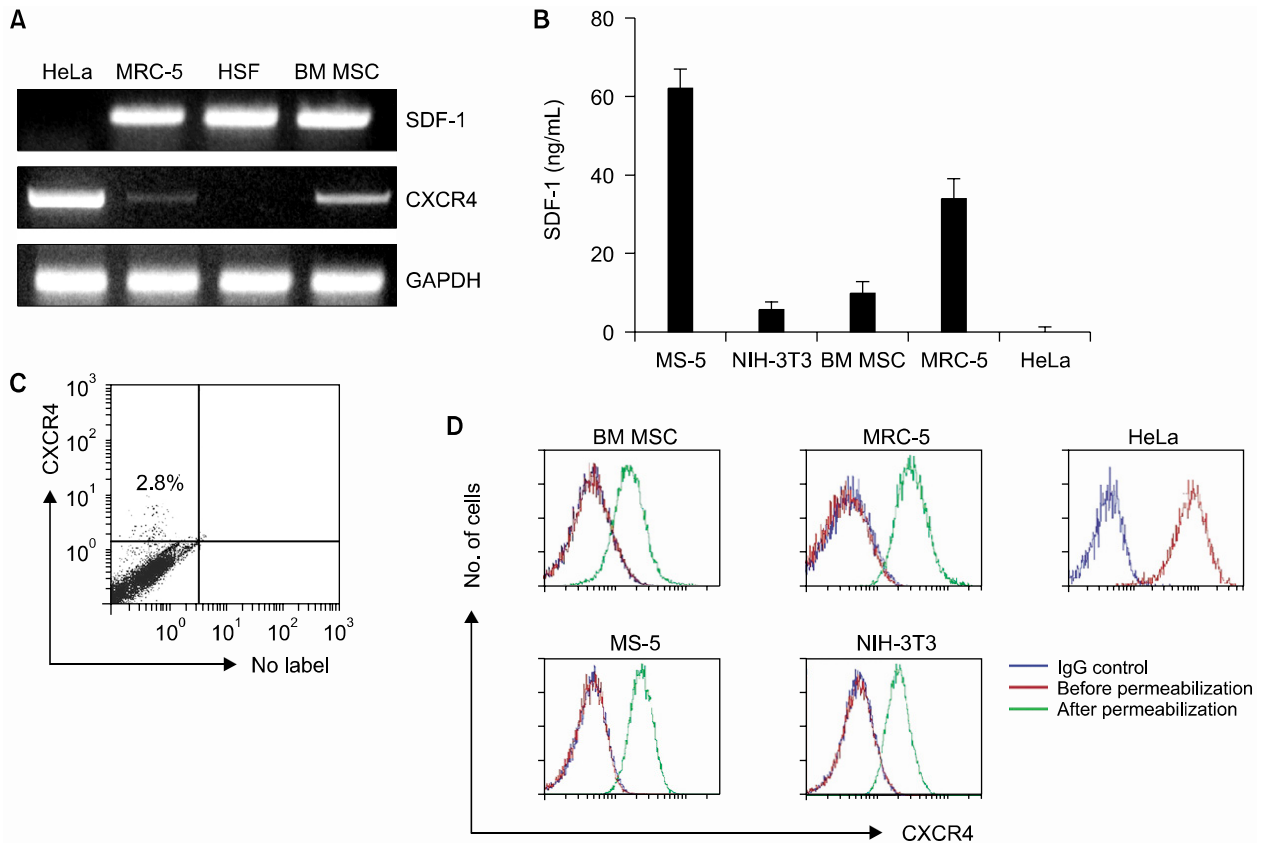
**Fig. 4.** Pertussis toxin (PTX) inhibits the proliferation not only of human bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSC) (C) but also of other several fibroblasts (A, B, D) in a dose-dependent manner. Cells were incubated in serum-free medium X-VIVO in the absence (control) or presence of PTX (0.2~200ng/mL) or SDF-1 (100ng/mL) for up to 4 days. A representative result of two independent experiments is shown.



**Fig. 5.** Pertussis toxin (PTX) does not inhibit the proliferation of HSF and HeLa cells. Cells were incubated in serum-free medium X-VIVO in the absence (control) or presence of PTX (200ng/mL) for 4 days. Data are the mean and S.D. of number of the cells expressed in percentage of control from three independent experiments. \* $P < 0.05$ .

#### 4. 중간엽줄기세포와 각종 섬유아세포의 CXCR4와 SDF-1의 발현 및 생성

세포에 따라 다른 PTX와 SDF-1에 의한 세포 증식 억제 또는 촉진 효과가 각 세포의 CXCR4의 발현 또는 SDF-1의 생성과 관련이 있는지를 확인하였다. RT-PCR에서 중간엽줄기세포와 MRC-5는 SDF-1 mRNA와 CXCR4 mRNA 모두를 발현하였으며, HeLa는 CXCR4 mRNA만을, 그리고 HSF는 SDF-1 mRNA만을 발현하였다(Fig. 6A). 이 세포들이 SDF-1을 생성하고 분비하는지를 확인하기 위하여 무혈청배지를 사용하여 3일간 배양한 후 배양 상청액의 SDF-1 농도를 ELISA 분석으로 측정하였다. 잘 알려진 바와 같이 MS-5 배양 상청액에서는 대량의 SDF-1이 검출되었고, 중간엽줄기세포, MRC-5, NIH-3T3 및 HSF 세포 배양 상청액에서도 SDF-1이 검출되었다. 이러한 결과는 이



**Fig. 6.** Expression of CXCR4 and production SDF-1 in bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and some fibroblasts. (A) Expression of mRNA for SDF-1 and CXCR4 analyzed by RT-PCR in various cell types. (B) Concentrations of SDF-1 in the supernatants of three-day culture of the cells analyzed by ELISA. (C) Cell surface expression CXCR4 in human MSCs analyzed by flow cytometry. (D) Flow cytometric analysis on CXCR4 expression in various cell types, before and after permeabilization.

들 세포가 SDF-1을 항시 생성하고 분비함을 나타낸다. 그러나 HeLa의 배양 상청액에서는 SDF-1이 검출되지 않았다(Fig. 6B). 유세포분석에서 중간엽줄기세포를 비롯하여 MRC-5, MS-5 및 NIH-3T3 세포에서는 극히 일부의 세포에서만 세포표면 CXCR4를 발현하였다(Fig. 6C). 이에 반해 HeLa는 세포 표면에 CXCR4를 강력히 발현하였다(Fig. 6D). 그러나 중간엽줄기세포, MRC-5, MS-5 및 NIH-3T3 세포에서도 투과화 시행 후의 유세포분석에서는 CXCR4가 강력히 발현되었다. 이는 세포 표면에 CXCR4를 발현하는 세포는 극히 일부이지만 대부분의 세포가 세포질 내에 CXCR4를 보유하고 있다는 것을 의미한다.

## 고 찰

현재 몇 가지의 중간엽줄기세포 분리법이 사용되고 있다. 전통적인 방법으로는 이 세포들이 조혈세포에 비해 플라스틱 표면에 대한 부착능이 우월하다는 점을 이용하여 분리하는 것이다.<sup>15)</sup> 이러한 플라스틱 표면에 대한 선택적인 부착능을 이용해 분리하는 방법은 어느 정도의 조혈세포 오염을 피할 수 없다는 점과 분리된 세포가 균일하지 않다는 점이 단점으로 지적된다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 일부 연구자들은 Stro-1 단세포군 항체를 사용하거나,<sup>16)</sup> 골수단핵구로부터 CD45 음성/glycoprotein A 음성인 세포를 분리한 후 라미닌(laminin)이 코팅된 배양판에 부착하는 세포를 선택적으로 분리하는 방법<sup>17)</sup> 등 다양한 방법을 사용해 왔다. 본 연구에서는 전통적인 방법으로 중간엽줄기세포를 획득하였는데 세포의 순도에 대한 의문이 제기될 수도 있을 것으로 생각된다. 그러나 서로 다른 방법을 통해 분리된 세포들의 주요 분화능에 별다른 차이가 없었음을 상기할 필요가 있다.<sup>18)</sup>

최근 G 단백을 통한 신호전달이 조혈의 항상성 유지에 중요하다는 증거들이 제시되고 있다. 즉, PTX의 S1 소단위를 발현시킨 조혈전구세포는 장기간 조혈기능이 저하된다.<sup>19)</sup> PTX는 interleukin-3에 의한 조혈전구세포의 증식을 억제하며,<sup>20)</sup> 생쥐에 PTX를 투여하면 조혈세포의 말초구동화가 유도된다.<sup>21)</sup> 본 연구에서는 PTX가 골수 기질세포 또는 중간엽줄기세포의 성장에도 영향을 미친다는 것을 입증하였다. 물론 PTX가 모든 세포에서 증식을 억제하는 것만은 아니다. 즉, PTX는 B 림프구 증식을 유도하는데, 백일해에서 B 림프구 증가가 관찰되는 것과 무관하지 않다.<sup>12,22)</sup>

PTX에 의한 세포 증식의 촉진 또는 저하는 일부 G

단백의 신호전달을 비가역적으로 억제함으로써 나타난다. 따라서 무혈청배지의 조건에서 PTX에 의한 중간엽줄기세포의 증식 억제는 중간엽줄기세포가 G 단백을 통해 신호를 전달하는 자가 성장인자를 분비한다는 것을 암시한다. 이러한 세포증식억제가 HeLa 등 일부 섬유아세포에서는 나타나지 않았는데 이는 PTX의 세포 증식 억제 효과가 세포 특이적임을 나타낸다. G 단백을 통한 신호전달은 케모카인과 신경전달물질의 주요한 신호전달체계이다.<sup>10)</sup> 골수 기질세포에서 상당수의 케모카인을 생성하고 분비하므로 이러한 PTX의 세포 증식 억제 효과는 케모카인과 관련이 있을 가능성이 크다. 골수 기질세포 또는 중간엽줄기세포의 케모카인 수용체 발현 양상<sup>3,4)</sup>을 참조할 때 관련 가능한 케모카인은 MIP-1 $\alpha$ , MCP-3, RANTES 및 SDF-1 등이다. 이 중 MIP-1 $\alpha$ , MCP-3, RANTES 등은 중간엽줄기세포의 증식에 별다른 영향을 미치지 않은 반면, SDF-1은 증식을 촉진하였는데, 이는 SDF-1이 Stro-1 발현에 기초하여 분리한 일부 골수 기질세포(저자들은 골수 기질줄기세포로 명명함)의 증식을 촉진한다는 최근의 보고<sup>2)</sup>와 일치한다. PTX에 의해 증식이 억제된 중간엽줄기세포, MS-5, MRC-5 및 NIH-3T3 등의 세포는 공히 SDF-1을 발현하고 생성한 반면, PTX에 영향을 받지 않은 세포 중 HeLa는 SDF-1을 생성하지 않고, HSF는 CXCR4를 발현하지 않는다는 점 역시 SDF-1이 자가 성장인자로 작용할 가능성을 뒷받침한다. 다만, 중간엽줄기세포, MS-5, MRC-5 및 NIH-3T3 등의 세포는 HeLa와는 달리 세포 표면의 CXCR4 발현이 매우 미미하다는 점이 과연 SDF-1이 자가성장인자로 작용하는지 의구심을 갖게 한다. 그러나 투과화 후 시행한 유세포분석에서 이들 세포 모두에서 세포질 내에는 CXCR4가 강력히 발현된다는 것을 확인하였다. 그간의 연구에서 CXCR4 등 대부분의 케모카인 수용체는 케모카인에 노출되면 세포 내 이입(endocytosis)을 통해 세포질 내로 들어가고, 이 중 일부는 재순환하여 세포 표면에 발현되는 것이 확인된 바 있다.<sup>23)</sup> PTX에 의해 세포 증식이 억제된 세포들 공히 SDF-1을 생성하기 때문에 이들 세포의 표면에 CXCR4가 일부 세포의 표면에만 존재하는 것은 어쩌면 당연한 현상일 수 있다. 본 연구에서 확인하지는 않았지만 이들 세포 중 극히 일부만이 세포 표면에 CXCR4를 발현함에도 불구하고 세포 증식이 PTX에 의해 강력히 억제되는 것을 보면 CXCR4의 순환이 매우 빠를 것이라 추측할 수 있다.

SDF-1은 조혈모세포를 비롯한 여러 세포의 귀소(homing)에 중심적인 역할을 한다. 최근에는 SDF-1이

세포의 이동뿐 아니라 성장에도 관여한다는 증거가 점차 축적되고 있다. 즉, SDF-1은 조혈세포, 백혈병세포, 골수종세포 등 혈액암 세포 및 일부 고형암 세포의 성장인자로 작용한다.<sup>24)</sup> 특히, SDF-1은 단독으로는 그 활성이 매우 약하지만 다른 조혈성장인자와 상승적으로 작용하여 조혈세포의 증식을 촉진한다.<sup>25)</sup> 본 연구에서는 골수 중간엽줄기세포와 일부 섬유아세포의 증식에 자가 성장인자에 의한 G 단백 연계 수용체를 통한 신호전달이 관여하며, 자가 성장인자로 SDF-1이 지목될 수 있음을 제시하였다. 이러한 결과는 향후 이들 세포의 증식 또는 자기갱신의 조절에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** 골수 중간엽줄기세포는 시험관 내에서 별도의 성장인자 없이도 20~30배가 되지만 이러한 증식 또는 자기갱신의 조절기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 골수에서는 SDF-1을 비롯한 여러 가지의 케모카인을 생성하며, 이들 케모카인은 G 단백 연계 수용체(G protein-coupled receptor)를 통한 신호전달을 통해 그 효과를 나타낸다.

**방법:** 저자들은 pertussis toxin (PTX)에 의해 억제되는 G 단백 연계 수용체를 통한 신호전달이 골수 중간엽줄기세포의 증식에 미치는 영향을 분석하였다.

**결과:** 사람 골수 중간엽줄기세포 및 생쥐 골수기질 세포주 MS-5를 PTX (2~200ng/mL)로 처리했을 때 용량 의존적으로 증식이 억제되었다. 이러한 현상은 혈청의 유무와 관계없이 관찰되었다. PTX를 일정 기간 처리한 후 제거해도 증식억제 효과는 지속되었다. 이들 세포에 SDF-1을 단독 첨가했을 때 유의하게 증식이 촉진되었으며, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3 및 RNATES 등의 케모카인은 영향을 미치지 않았다. 이러한 증식 억제 효과가 세포 특이적인지 확인하기 위하여 몇몇 섬유아세포에 대하여 PTX가 증식에 미치는 영향을 확인하였는데, NIH-3T3 및 MRC-5는 PTX 처리로 세포 증식이 용량 의존적으로 억제되었으나 HeLa와 HSF세포에서는 변화가 없었다. 유세포분석에서 HeLa만이 세포 표면에 CXCR4를 발현하였고, 골수 중간엽줄기세포 및 MS-5를 비롯한 다른 세포는 발현하지 않았다. 그러나 중간엽줄기세포, MS-5, NIH-3T3, MRC-5 등의 세포도 CXCR4 mRNA를 발현하였으며, 투과화 후 시행한 유세포분석에서 CXCR4가 거의 모든 세포의 세포질 내에 존재함을 확인하였다. CXCR4의 경우와는 반대로

HeLa는 SDF-1을 생성하지 않았으며, 골수 중간엽줄기세포, MS-5, NIH-3T3 및 MRC-5는 SDF-1을 생성하고 분비하였다.

**결론:** 이상의 결과는 골수 중간엽줄기세포와 일부 섬유아세포의 증식에 자가 성장인자에 의한 G 단백 연계 수용체를 통한 신호전달이 중요한 역할을 하며, 자가 성장인자로 SDF-1이 우선 지목될 수 있음을 시사한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004;32:414-25.
- 2) Kortessidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005; 105:3793-801.
- 3) Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006;24: 1030-41.
- 4) Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106:419-27.
- 5) Psenak O, Sefc L, Sykora V, Chang KT, Necas E. Cytokine gene expression in regenerating haematopoietic tissues of mice after cyclophosphamide treatment. *Acta Haematol* 2003;109:68-75.
- 6) Bromley SK, Peterson DA, Gunn MD, Dustin ML. Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* 2000;165:15-9.
- 7) Gentilini G, Kirschbaum NE, Augustine JA, Aster RH, Visentin GP. Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21 (Cip1/WAF1). *Blood* 1999; 93:25-33.
- 8) Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med* 1995;182: 219-31.
- 9) Sanchez X, Suetomi K, Cousins-Hodges B, Horton JK, Navarro J. CXC chemokines suppress prolifera-



- tion of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J Immunol* 1998;160:906-10.
- 10) Huang Z. Structure, function and modulation of chemokine receptors: members of the g-protein-coupled receptor superfamily. *Mini Rev Med Chem* 2002;2:373-83.
  - 11) Reisine T. Pertussis toxin in the analysis of receptor mechanisms. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1499-504.
  - 12) Kaslow HR, Burns DL. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* 1992;6:2684-90.
  - 13) Nishi N, Ishikawa R, Inoue H, et al. In vitro long-term culture of human primitive hematopoietic cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Leukemia* 1997;11(Suppl 3):468-73.
  - 14) Kim CH, Broxmeyer HE. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 1998;91:100-10.
  - 15) Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 1996;11:312-24.
  - 16) Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33:919-26.
  - 17) Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.
  - 18) Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 2002;8:739-51.
  - 19) Bonig H, Rohmer L, Papayannopoulou T. Long-term functional impairment of hemopoietic progenitor cells engineered to express the S1 catalytic subunit of pertussis toxin. *Exp Hematol* 2005;33:689-98.
  - 20) He YX, Hewlett E, Temeles D, Quesenberry P. Inhibition of interleukin 3 and colony-stimulating factor 1-stimulated marrow cell proliferation by pertussis toxin. *Blood* 1988;71:1187-95.
  - 21) Papayannopoulou T, Priestley GV, Bonig H, Nakamoto B. The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;101:4739-47.
  - 22) Hinds PW 2nd, Yin C, Salvato MS, Pauza CD. Pertussis toxin induces lymphocytosis in rhesus macaques. *J Med Primatol* 1996;25:375-81.
  - 23) Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:637-58.
  - 24) Juarez J, Bendall L, Bradstock K. Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis. *Curr Pharm Des* 2004;10:1245-59.
  - 25) Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, et al. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 2002;99:4307-17.