

## Colony Forming Unit(CFU) Assay를 이용한 제조합 단백질 Leukotactin-1(Lkn-1)의 Myelosuppression 및 Myeloprotection 연구

이규화<sup>1</sup>, 이공주<sup>2</sup>, 이은경<sup>2</sup>, 임인환<sup>2</sup>, 전은영<sup>2</sup>, 최무림<sup>2</sup>, 김동일<sup>1</sup>, 박두홍<sup>2</sup>, 윤엽<sup>2</sup>

<sup>1</sup>인하대학교 생물공학과, <sup>2</sup>목암생명공학연구소

전화 (031) 260-9831, FAX (031) 260-9808

### Abstract

Chemokines are small chemotactic cytokines that have a number of biological functions. Some chemokines regulate the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells(HSPC). Leukotactin-1(Lkn-1) is a CC chemokine and is known to reduce colony forming unit(CFU). The N-terminal truncated Leukotactin-1(rtLkn-1), produced by *Pichia pastoris*, suppressed CFU from 40 to 60%. The rtLkn-1 protected CFU from cytotoxic effect of anticancer drug such as Ara-C, doxorubicin, cyclophosphamide and 5-FU by cell cycle arrest.

### 서론

Chemokine은 cytokine의 일종으로서 분자량이 약 8-14 kDa이며 다양한 염증 반응의 성질을 가지고 있는 chemotactic cytokine이다. Chemokine은 leukocyte의 trafficking, hematopoietic stem cell 및 progenitor cell의 증식 조절, angiogenesis의 억제와 강화, lymphocyte의 활성화와 분화, HIV 감염의 저해에 관여하는 생물학적 활성을 지니는 것으로 보고되었다. 보존된 cysteine motif에 따라 Chemokine은 4 가지 종류로 분류되는데  $\alpha$ (CXC)와  $\beta$ (CC) CX<sub>3</sub>C 그리고 C chemokine이며 주로  $\alpha$ (CXC)와  $\beta$ (CC) chemokine이 연구되고 있다.<sup>1)</sup> Lkn-1은 CC chemokine의 일종으로 보존된 4개의 cysteine motif 외에 2개의 cysteine motif를 더 갖고 있으며 92개의 아미노산 염기 서열로 이루어져 있다. 또한 CCR1과 CCR3 수용체를 통해 neutrophil과 monocyte, lymphocyte를 attraction하며, calcium flux를 유도하고 특히 골수세포의 colony형성을 억제하는 작용을 하는 것이 알려져 있다.<sup>2)</sup> 본 연구에 사용된 제조합 Lkn-1(rtLkn-1)은 92개의 아미노산 염기 서열 중 26개의 염기 서열이 truncation된 것으로 *Pichia pastoris*에서 생산된 것이다. 골수 세포의 colony 형성 억제 효과는 항암 치료시 항암제나 방사능 조사에 의해 사멸될 수 있는 세포 주기 중 S phase의 골수 세포를 일시적으로 G1/G0로 들어가게 하여 cell cycle arrest를 통해 보호를 하는 것이다. 이를 통하여 추가의 골수 이식을 피할 수 있고, 효과적인 항암 치료와 골수 회복을 이룰 수 있다고 추정된다.<sup>3)</sup> 본 연구에서는 *P. pastoris*에서 생산한 rtLkn-1의 생체내 활성을 조사하기 위하여 생쥐와 인간의 골수세포에서 조혈모세포

의 colony 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 colony 형성에 미치는 rtLkn-1의 영향이 조혈모세포의 세포 주기 중 S phase와 관련된 항암제의 독성을 완화시킬 수 있음을 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

실험동물로는 생후 6주에서 8주 된 C57BL/6 자성 마우스를 사용하였다. 골수 조혈 세포 채취는 마우스를 경부 탈구시킨 후 대퇴골의 양끝을 무균적으로 절단하고 주사침(23 gauge)을 골수 강내로 삽입한 후 IMDM 배지를 주입하여 조혈세포를 유출시켰다. 유출된 조혈 세포는 cell strainer(100  $\mu$ m)로 거른 후 배지로 세척(1,300 rpm, 10분 원심분리)하였다. 인간 골수세포는 기증인의 동의하에 정상인에게 제공받았으며, 혈액과 Ficoll을 혼합하여 2,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 mononuclear cell(MNC) 만을 분리한 후 배지로 2회 세척하여 실험하였다. CFU-assay는 methylcellulose 배지(stem cell 사 M3234)에 rmGM-CSF 50 ng/mL 과 rmSCF 50 ng/mL(R&D사) 그리고 rhEPO 3 U/mL(녹십자사)을 넣고 total bone marrow cell(TBMC)을  $5 \times 10^4$ /mL로 첨가하였다. 실험에 필요한 농도에 따라 재조합 truncated Lkn-1(rtLkn-1)과 항암제를 첨가하여 비교 실험하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도 조건에서 7 일간 배양한 후 colony 수를 계산하였다. Thymidine kill assay는 IMDM 배지에 TBMC를  $1.5 \times 10^6$ /mL로 첨가하고 1  $\mu$ g/mL의 rtLkn을 첨가하여 2 시간 배양한 후 thymidine([<sup>3</sup>H]dThd) 50  $\mu$ Ci/mL을 넣고 다시 30 분 배양하였다. 배양 후 2회 세척하고 CFU-assay를 수행하였다.

### 결과 및 고찰

실험에 사용한 rtLkn-1은 기존에 발표된 문헌<sup>1)</sup>에서의 Lkn-1과 유사한 hematopoietic progenitor cell의 colony 형성 억제 효과를 보였다. Figure 1에서 colony forming unit, granulocyte-macrophage (CFU-GM)과 burst forming unit, erythroid (BFU-E), colony forming unit, granulocyte, erythrocyte, megakaryocyte, macrophage (CFU-GEMM)은 농도에 따라 유의하게 감소하였으며 약 36-57%의 suppression이 관찰되었다. Figure 2는 thymidine kill assay결과로서 S phase 상의 세포만을 선택적으로 사멸시키는 thymidine의 과량 첨가에서 rtLkn-1을 첨가하여 colony의 수가 증가하였다. 이것은 세포 주기 중 S phase상의 HPSC를 일시적으로 G1/G0로 유도하여 사멸을 막았기 때문으로 사료된다.<sup>4)</sup> 이후에 *in vitro*에서 항암제 첨가시 사멸되는 HBSC를 보호하는 rtLkn-1의 효과를 관찰하기 위한 실험을 수행하였다. Figure 3에서 나타난 것과 같이 각 항암제에 따라 colony수가 감소하였고 rtLkn-1의 첨가에 의해 27-40% 증가하였다. Figure 4는 human 골수 세포에 항암제를 첨가한 실험으로 rtLkn-1을 첨가하여 63%의 증가된 골수 세포 보호 결과를

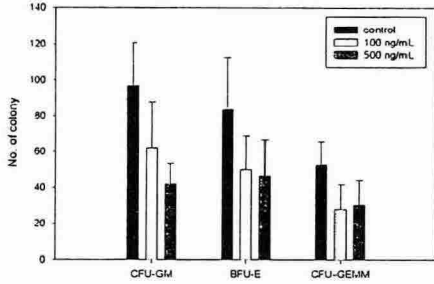


Figure 1. Effect of rtLkn-1 on colony formation by mouse TBMC. Results shown are the mean  $\pm$  SEM of data obtained in four independent experiments. The effect of rtLkn-1 addition is highly significant ( $P < 0.01$ ) by comparison with no addition.

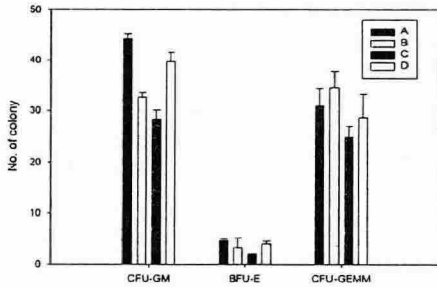


Figure 2. The effect of rtLkn-1 on the cell cycling status of CFU in mouse TBMC. control A, rtLkn-1 B, thymidine C, rtLkn-1 + thymidine D.

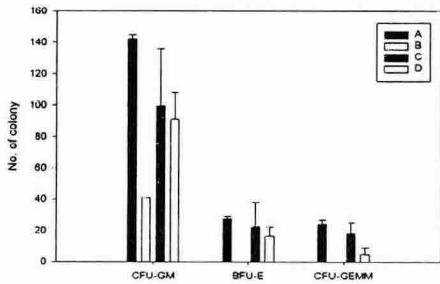


Figure 3. Effect of rtLkn-1 on myeloprotection from toxic effect of anticancer drugs in mouse TBMC. Control A, cyclophosphamide 100 $\mu$ g/mL B, rtLkn-1 500 ng/mL + cyclophosphamide C, doxorubicin 50 ng/mL D, rtLkn-1 + doxorubicin E, 5FU 100 ng/mL F, rtLkn-1 + 5FU G. ( $P < 0.01$ )

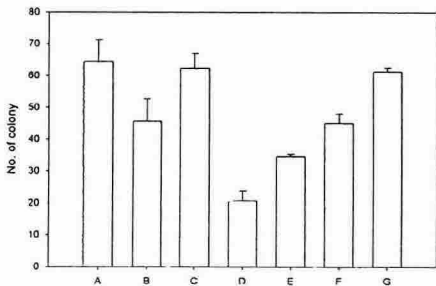


Figure 4. Effect of rtLkn-1 on myeloprotection from toxic effect of anticancer drug in human MNC. Control A, Ara-C 1 ng/mL B, rtLkn-1 500 ng/mL C, rtLkn-1 + ara-C D.

나타내었다. 항암제와 rtLkn-1을 같이 첨가하였을 때, colony가 각각의 효과만큼 줄

어 들지 않는 것은 chemokine에 의해 cell cycle arrest가 일시적으로 이루어져서 항암제에 의한 cell damage를 회복하는 atase가 회복될 시간을 부여한다는 것이 제안되었다.<sup>5)</sup>

#### 요약

*Pichia pastoris*에서 생산된 rtLkn-1은 농도에 따라 CFU의 colony 형성을 억제하였으며, 마우스와 인간 골수 세포에서 항암제에 의한 stem cell 및 progenitor cell의 사멸을 억제하였고 이것은 항암제가 작용하는 동안 세포 주기를 일시적으로 휴지기로 유도하였기 때문으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 산업자원부 공업기반기술개발사업 과제의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

#### 참고문헌

1. Rollins, B. J., "Chemokines"(1997), *Blood*, 90(3), 909-928
2. Youn, B.-S., S. M. Zhang, E. K. Lee, D. H. Park, H. E. Broxmeyer, P. M. Murphy, M. Locati, J. E. Pease, K. K. Kim, K. Antol, and Byoung S. Kwon, "Molecular cloning of leukotactin-1: A novel human  $\beta$ -chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3"(1997), *J. Immunol.*, 159, 5201-5205
3. Youn, B.-S., C. Mantel, and H. E. Broxmeyer, "Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis"(2000), *Immunol. Rev.*, 177, 150-174
4. Mantel, C., S. Aronica, Z. Luo, M. S. Marshall, Y. J. Kim, S. Cooper, N. Hague, and H. E. Broxmeyer, "Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  enhances growth factor-stimulated phosphatidylcholine metabolism and increases cAMP levels in the human growth factor-dependent cell line MO7e, events associated with growth suppression"(1995), *J. Immunol.*, 154, 2342-2350
5. Clemons, M., A. Watson, A. Howell, J. Chang, C. Heyworth, B. Lord, N. Testa, T. M. Dexter, and G. Margison, "Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  attenuates the toxic effects of temozolomide in human bone marrow granulocyte macrophage colony-forming cells"(2000), *Clin. Cancer Res.*, 6, 966-970