

# 신경줄기세포(HB1.F3)에서 나트륨요소 공동수송체 도입유전자 발현

서울대학교 뇌과학 협동과정, 서울대학교 의과대학 핵의학교실

김윤희, 이동수, 강주현, 이용진, 정준기, 이명철

## Expression of Sodium/iodide Symporter Transgene in Neural Stem Cells

Yun Hui Kim, B.S.,<sup>1,2</sup> Dong Soo Lee, M.D.Ph.D.,<sup>1,2</sup> Joo Hyun Kang, Ph.D.,<sup>2</sup> Yong Jin Lee, M.S.,<sup>2</sup> June-Key Chung, M.D.,Ph.D.,<sup>2</sup> Myung Chul Lee, M.D.,Ph.D.<sup>2</sup>

Program in Neuroscience,<sup>1</sup> Seoul National University, Department of Nuclear Medicine,<sup>2</sup> Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

### Abstract

**Purpose:** The ability to noninvasively track the migration of neural progenitor cells would have significant clinical and research implications. We generated stably transfected F3 human neural progenitor cells with human sodium/iodide symporter (hNIS) for noninvasively tracking F3. In this study, the expression patterns of hNIS gene in F3-NIS were examined according to the cultured time and the epigenetic modulation.

**Materials and Methods:** F3 human neural stem cells had been obtained from Dr. Seung U. Kim (Ajou University, Suwon, Korea). hNIS and hygromycin resistance gene were linked with IRES (Internal Ribosome Entry Site) under control of CMV promoter. This construct was transfected to F3 with Liposome. To investigate the restoration of hNIS gene expression in F3-NIS, cells were treated with demethylating agent (5-Azacytidine) and Histone deacetylase inhibitor (Trichostatin A: TSA). The expression of hNIS was measured by I-125 uptake assay and RT-PCR analysis. **Results:** The iodide uptake of the F3-NIS was higher 12.86 times than F3 cell line. According to the cell passage number, hNIS expression in F3-NIS gradually diminished. After treatment of 5-Azacytidine and TSA with serial doses (up to 20µM, up to 62.5nM, respectively) for 24 hours, I-125 uptake and mRNA of hNIS in F3-NIS were increased. **Conclusion:** These results suggest that hNIS transfected F3 might undergo a change in its biological characters by cell passage. Therefore, the gene expression of exogenous gene transferred human stem cell might be affected to the epigenetic modulation such as promoter methylation and Histone deacetylation and to the cell culture conditions.

**Key Words :** neural stem cell, human sodium/iodide symporter, promoter methylation, histone deacetylation

### 서론

퇴행성 뇌질환과 뇌졸중 같은 뇌 손상의 치료에 신경 줄기세포 이식이 시도되고 있다.<sup>1,2)</sup> 생체 내에서 이식한 줄기세포의 추적은 줄기세포의 이동 동태, 분화 과정, 재생 능력 등을 이해하는데 중요하다. 동물 실험에서 이식한 줄기세포를 추적하기 위하여 LacZ 유전자나 GFP를 사용하나 이러한 유전자는 대상물을 희생하여야 하므로 한 개체 내에서 반복적으로 관찰하기 어렵다. 생체 내

Received December. 5, 2003; accepted January. 16, 2004

Corresponding author: Dong Soo Lee, M.D.Ph.D.

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital 28 Yungun-Dong, Chongno-Ku, Seoul 110-744, Korea

Tel: (02) 760-2501 Fax: (02) 745-7690

E-mail: dsl@plaza.snu.ac.kr

에 이식한 줄기세포 추적을 위한 분자영상법에 자기 공명 영상(MRI), 핵의학 영상, 광학 영상이 있다.<sup>3)</sup> MRI는 해상력이 좋고 같은 개체 내에서 반복적으로 영상을 획득할 수 있으나 다양한 분자 리포터 유전자가 없다. 광학 영상은 싸고 반복 영상이 쉽지만 쥐나 랫트 같은 작은 동물에서만 영상획득이 가능하다. 핵의학 영상은 생체 내에서 유전자 발현을 민감하고 정량적으로 측정할 수 있다. 사람의 나트륨요오드 공동수송체(Human sodium/iodide symporter; hNIS)는 갑상선에서 주로 발현되는 막 단백질로 643개의 아미노산으로 구성되어 있고 전기화학적 농도 차이에 따라 세포 내로 요오드가 섭취되는 통로이다. hNIS를 이용한 핵의학 영상법은 방사성요오드나 Tc-99m 등 영상용 방사성기질이 구하기 쉽고 체내 분포와 대사과정이 잘 알려져 있다는 장점이 있다.<sup>4)</sup>

암 세포에서 유전자 발현이 DNA 메틸화나 히스톤 아세틸화 같은 에피지네틱 조절(epigenetic modulation)에 의해 영향 받는다는 사실이 잘 알려졌다.<sup>5)</sup> 뉴클레오솜(nucleosome)은 H2A, H2B, H3, H4라 불리는 단백질 8개의 복합체와 그것을 감싸고 있는 146개 염기쌍의 DNA로 구성되어 있다. 뉴클레오솜의 히스톤 단백질의 N-말단의 리신(lysine) 잔기는 아세틸기가 붙어 DNA와 히스톤 단백질의 결합을 느슨하게 하면 열린 크로마틴 구조가 형성되고 해당 유전자가 발현 된다. 그러나 어떤 이유로 유전자 프로모터의 CpG섬이 메틸화되면 메틸-시토신 결합 단백질이 결합하고 히스톤탈아세틸화효소(histone deacetylase; HDAC)를 유도하면 히스톤단백질 N-말단의 리신 잔기의 아세틸기가 떨어져서 닫힌 크로마틴 구조가 형성되어 해당 유전자 발현이 억제된다.

이 연구에서는 신경줄기세포 이식 후 체내분포를 추적하기 위해 신경 줄기세포(HB1.F3)에 hNIS 유전자를 도입 하고 계대 배양 할 때 방사성요오드 섭취가 여러번 계대되면서 방사성요오드 섭취율이 감소하는 이유와 감소를 복구할 방법을 조사하였다. hNIS 유전자를 도입한 신경줄기세포의 hNIS 유전자 발현에 DNA 메틸화와 히스톤 아세틸화를 통하여 에피지네틱 조절 기전이 작동한다 가정하

고 탈메틸화 약품인 5-Azacytidine과 히스톤 탈아세틸화효소 저해제인 Trichostatin A (TSA)를 처리하였을 때, hNIS 도입유전자 발현 양상을 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 배양

신경줄기세포로 HB1.F3 세포를 아주대학교 김승업 박사께 분양 받아 사용하였다. 이 세포는 15주째 태아 종뇌 뇌실부분에서 분리 하여 *v-myc*으로 불멸화한 세포주이다.<sup>6,7)</sup> 이 세포는 5% 말 혈청(GibcoBRL Co., USA)과 5% 소태아혈청(GibcoBRL Co., USA), 10 U/ml의 페니실린(Invitrogen Co., USA), 10 µg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen Co., USA)이 첨가된 DMEM배양액에서 배양하였다.

### 2. hNIS 유전자와 하이그로마이신 저항 유전자 클로닝

pIRES 벡터(Clontech Co., USA)의 MCS A 부분에 제한효소인 EcoRI과 XhoI을 이용하여 hNIS 유전자를 삽입하고, MCS B부분에 하이그로마이신 저항 유전자를 XbaI과 NotI으로 삽입하여 pIRES-hNIS/HYG 벡터를 제작하였다.

### 3. hNIS 유전자를 안정적으로 발현하는 세포 주 확립

pIRES-hNIS/HYG 벡터를 Lipofectamine plus agent (Invitrogen Co., USA)를 사용하여 HB1.F3 세포에 도입하였다. 2주간 하이그로마이신 B (Invitrogen Co., USA)를 200 µg/ml 처리하여 pIRES-hNIS/HYG 벡터를 도입한 HB1.F3세포를 선별하였다. 선별세포주를 F3-NIS 세포주라 하였다.

### 4. 5-Azacytidine 과 TSA처리

24 우물배양용기의 한 우물에 8-10번 계대배양한 F3NIS III 세포를  $1 \times 10^5$ 개/우물로 24시간 동안 배양하였다. 새로운 배양액으로 교체한 후 5-Azacytidine (Sigma Co., USA)을 40 µM부터 2배씩 희석하여 2.5 µM까지 처리하였다. TSA는 0,

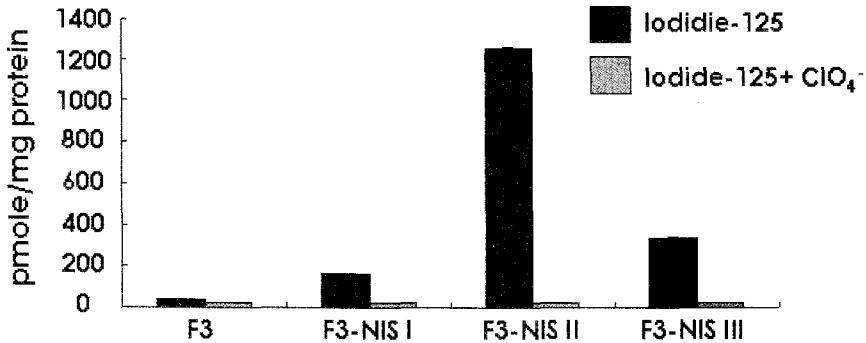


Fig. 1. The measurement of NIS gene expression in F3-NIS by radioiodine uptake assay. pIRES-hNIS/HYG vector was transferred to HB1.F3 by liposome and selected for 2 weeks by hygromycin B. Results are means  $\pm$  standard deviation (n=4).

25, 37.5, 50, 62.5 nM로 처리하였다. 각 시약을 처리한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다.

이 실험은 5-Azacytidine과 TSA 각각 5번씩 처리하여 수행하였다.

### 5. 방사성옥소 섭취율 측정

5-Azacytidine과 TSA를 처리하고 24시간 배양한 우물에 0.5% 소혈청 알부민과 0.2  $\mu$ Ci/ml의 방사성옥소(I-125) 그리고 10  $\mu$ M의 NaI가 들어 있는 Hanks balanced salt solution (HBSS)에 30분 동안 배양하였다. 차가운 HBSS로 두 번 씻어낸 후 0.2% SDS 용액으로 세포를 떼어 내어 감마카운터로 방사능을 측정하고 세포의 단백질 양은 BCA 단백질 정량 키트(Bio-RAD Co., USA)로 정량하였다.

0.5% 소 혈청 알부민과 0.2  $\mu$ Ci/ml의 방사성옥소(I-125) 그리고 10  $\mu$ M의 NaI가 들어 있는 HBSS에 50  $\mu$ M KClO<sub>4</sub>를 첨가하여 30분 동안 배양한 후 방사성옥소 섭취율을 측정하여 이입 hNIS의 작용이 저해되는지 보았다.

### 6. hNIS mRNA의 역전사효소 중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR) 측정

5-Azacytidine과 TSA를 24시간 동안 전 처리한 F3-NIS III 세포에 Trizol 시약 (Invitrogen Co., USA)을 사용해 총 RNA를 분리한 후 SuperscriptII RNase H 역전사효소 (GibcoBRL Co., USA)를 사용해 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 주형으로 삼아 hNIS 프라이머로 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행한 후 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 브롬화에티듬(EtBr)으로 염색해 PCR 산물을 확인하였다. 양성 대조군으로는 베타액틴 프라이머로 PCR을 수행하였다.

## 결 과

### 1. 계대배양에 따른 hNIS 유전자 발현

HB1.F3 세포에 pIRES-hNIS/HYG 벡터를 리포솜을 이용해 형질 도입하여 하이그로마이신 B로 2주간 선별하여 3개의 콜로니를 얻었다. 이 콜로니 세포는 HB1.F3세포(34.8 $\pm$ 2.9 pmole/mg 단백질)

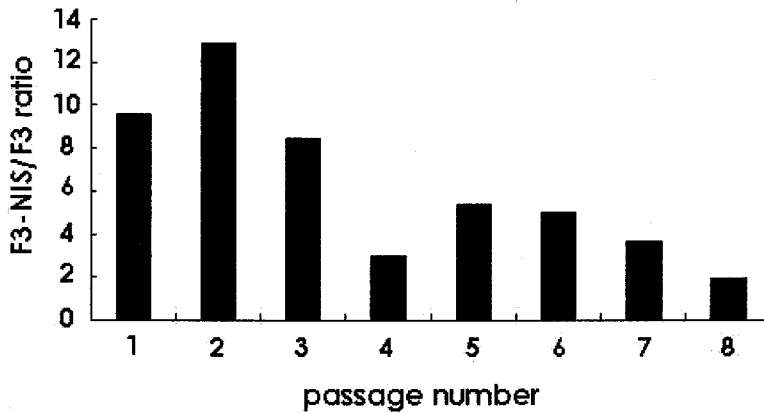


Fig 2. The measurement of NIS gene expression in F3-NISIII according to the cell passage number. The expression of hNIS gene was gradually decreased. Results are means  $\pm$  standard deviation (n=4).

에 비해 방사성옥소를 각각 4.5 (156.6 $\pm$ 1.4 pmole/mg 단백질), 36.1 (1257.2 $\pm$ 8.2 pmole/mg 단백질), 9.5 (330.6 $\pm$ 5.9 pmole/mg 단백질)배 많이 세포내로 섭취하였다. 방사성옥소의 섭취는 KClO<sub>4</sub>를 처리하면 모두 저해되었다(Fig. 1).

hNIS 유전자를 발현하는 F3-NIS III 세포를 계대 배양 하면서 방사성옥소 섭취율을 측정한 결과 F3-NIS III 세포가 처음에는 HB1.F3세포에 비해 최대 12.9배이었던 방사성옥소 섭취율이 계대할수록 감소하여 8번째 계대 때에는 1.9배로 감소하였다(Fig. 2).

### 2. 5-Azacytidine과 TSA 처리 후 방사성 옥소 섭취율 측정

F3-NIS III 세포에 5-Azacytidine을 처리하면 5-Azacytidine의 농도가 40  $\mu$ M일 때 5-Azacytidine을 처리하지 않은 F3-NIS III 세포(56.1 $\pm$ 2.7 pmole/mg 단백질)에 비해 방사성옥소를 최대 1.8 (99.5 $\pm$ 6.5 pmole/mg 단백질)배 더 많이 섭취되었으며, NIS의 억제제인 KClO<sub>4</sub>를 처리하면 방사성옥소 섭취율이 완전히 저해되었다(Fig. 3a).

F3-NIS III 세포에 TSA를 처리하면 TSA의 농도

가 62.5 nM일 때 TSA처리하지 않은 F3-NIS III 세포(47.8 $\pm$ 3.5 pmole/mg 단백질)에 비해 최대 36.2 (1,727.7 $\pm$ 85.8 pmole/mg 단백질)배 더 많이 섭취되었으며, NIS의 억제제인 KClO<sub>4</sub>를 처리하면 방사성옥소 섭취율이 완전히 저해되었다(Fig. 3b). TSA (62.5 nM)를 hNIS 유전자를 이입하지 않은 HB1.F3 세포에 처리(24시간)하였을 때에도 방사성옥소 섭취율이 HB1.F3 세포(36.7 $\pm$ 3.9 pmole/mg 단백질)에 비해 3 (110.8 $\pm$ 8.6 pmole/mg 단백질)배 더 많이 섭취하였다. 이 섭취율은 같은 농도의 TSA를 F3-NIS 세포에 처리하였을 때에 비하여 1/31이었다.

100 nM의 TSA와 0, 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ M의 5-Azacytidine을 함께 F3-NIS III 세포에 24시간 동안 처리 후에는 5-Azacytidine 처리 농도에 따라 처리 하지 않은 군(685.0 $\pm$ 14.2 pmole/mg 단백질)에 비해 1.01 (725.8 $\pm$ 1.6 pmole/mg 단백질), 1.05 (727.9 $\pm$ 42.5 pmole/mg 단백질), 1.10 (766.9 $\pm$ 13.0 pmole/mg 단백질), 1.12 (794.0 $\pm$ 19.5 pmole/mg 단백질)배 씩 방사성옥소 섭취율이 증가 하였다(Fig. 4).

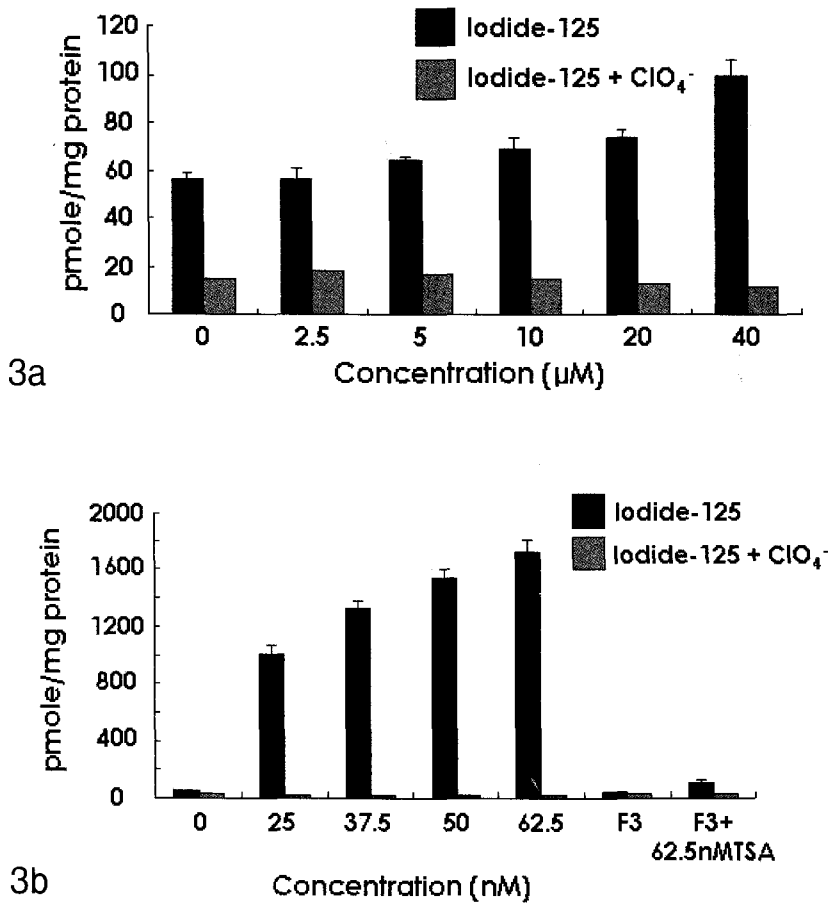


Fig. 3. DNA demethylation by 5-azacytidine and histone deacetylase inhibition by TSA can increase radioiodine uptake in F3-NISIII. a. After treatment of 5-azacytidine with 0-40 μM for 24 hr, radioiodine uptake was increased in F3-NISIII. b. After treatment of TSA with 0-62.5 nM for 24 hr, radioiodine uptake was increased in F3-NISIII. After treatment of TSA with 62.5 nM for 24 hr to HB1.F3, radioiodine uptake was also increased, but the radioiodine uptake of HB1.F3 was lower than F3-NIS. Results are means ± standard deviation (n=4).

### 3. 5-Azacytidine과 TSA 처리 후 hNIS 유전자 mRNA양 측정

Fig. 5와 같은 방법으로 각각 5-Azacytidine과 TSA를 처리 한 F3-NISIII 세포에서 총 RNA를 분리 한 후 hNIS와 베타액틴 프라이머로 수행한 RT-PCR 결과 처리한 시약의 농도에 따라 hNIS mRNA의 양이 5-Azacytidine은 1.9배, TSA는 1.9배

까지 각각 증가 하였다(Fig. 5).

### 고 찰

줄기세포를 생체에 이식한 후 추적에 MR을 이용하는 경우는 줄기세포가 증식한 후에는 MRI 표지자가 딸세포에 넘어가지 않으므로 이식 줄기세포가 증식한 후에는 영상을 얻는 것이 불가능하

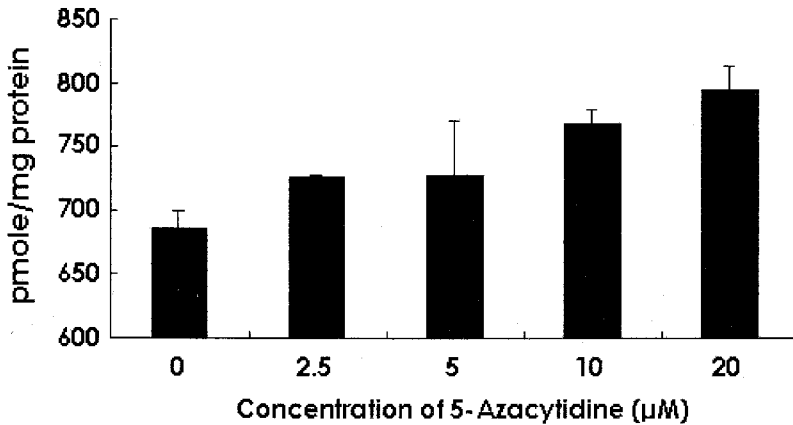


Fig. 4. F3-NIS was treated for 24 hr with 100 nM TSA and various concentration of 5-azacytidine. The expression of hNIS was not affected synergistically by 5-azacytidine treatment. Results are means  $\pm$  standard deviation (n=4).

여<sup>8-17)</sup> 광학영상이나 핵의학 영상을 시도하는 것이 바람직하다. 그러나 광학영상용으로 GFP (Green fluorescent protein)를 이입한 유전자도 여러 세대 계대 후에는 발현하지 않게 되고,<sup>18)</sup> 핵의학 영상용으로 사용 가능한 hNIS도 신경줄기세포에 이입 후 계대하면 발현이 감소하여 분자영상용 표지자로 사용하는데 어려움이 있다.<sup>19)</sup>

이 연구에서는 생체내로 이식한 줄기세포의 추적적을 위해 HB1.F3세포에 hNIS 유전자를 리포솜을 이용하여 도입하여 3개의 콜로니를 얻었다. Fig. 1에 보듯이 3개 콜로니의 hNIS 유전자 발현 정도가 다른 것은 hNIS 유전자가 HB1.F3세포의 염색체에 도입되는 과정에서 무작위적으로 도입되어 우선 이입 안정화에 성공한 양이 다르고 이에 더하여 hNIS 유전자의 발현이나 에피제네틱 조절에 영향을 받은 것이라 생각한다.

신경줄기세포에 이입한 유전자가 생체 내에 투여한 후에 증식, 분화하면서 침묵유도(silencing)되지 않게 하려면, 침묵유도의 기전을 시험관에서 조사하고 침묵유도를 방지하거나 회복하게 하여 이입유전자가 꾸준히 발현하게 할 방법을 찾아야 한다. 유전자의 침묵유도 기전은 수정란에서

대립유전자의 침묵유도,<sup>20)</sup> 이입유전자의 침묵유도,<sup>18)</sup> 발생초기 세포에서 분화에 관여하는 유전자들의 점멸,<sup>21)</sup> 암세포에서 암억제 유전자의 침묵유도<sup>22)</sup> 등 여러 분야에서 연구되었다. 이 중 에피제네틱 조절 기전으로 DNA의 메틸화/탈메틸화, 히스톤의 아세틸화/탈아세틸화 기전이 잘 알려져 있고, 특히 암세포에서는 DNA의 메틸화와 히스톤의 탈아세틸화를 각각 또는 함께 억제하면 암억제유전자가 발현되어 항암효과가 나타났다.<sup>22)</sup> 이때 두 기전은 상승작용을 하였다.<sup>22)</sup>

유전자 프로모터 부분 DNA의 메틸화에 의해 유전자 발현이 억제된 상태에서 DNA를 탈메틸화하면 관련 전사인자들이 인지하므로 유전자 발현이 시작된다.<sup>5,21,23,24)</sup> 암세포에서 여러 유전자가 침묵유도된 경우에 유전자 프로모터 부분이 메틸화되어 유전자 발현이 완전히 억제되지는 않은 경우에 어느 정도 DNA의 탈메틸화가 선행된 후에 히스톤탈아세틸화효소를 억제 하면 유전자 발현이 상승할 수 있다.<sup>22,25)</sup> 이입유전자의 발현이 억제되는 데에 다른 침묵유도 기전이 작동하기도 하지만<sup>26)</sup> DNA의 메틸화와 히스톤탈아세틸화에 의해서 침묵유도가 이루어지기도 한다.<sup>18,27)</sup> 따라

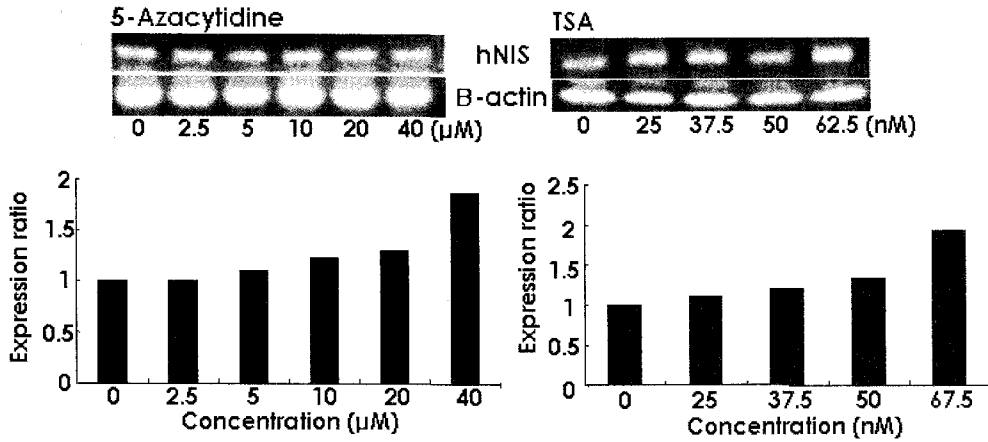


Fig. 5. Recovery of hNIS gene transcription after 5-azacytidine and TSA treatment. RT-PCR analysis of total RNA obtained from cells by hNIS specific primer. The mRNA level of hNIS was increased according to 5-azacytidine and TSA treatment.

서 이 연구에서처럼 hNIS를 이입하였을 때 처음에는 hNIS 유전자의 발현이 십수 배에 이르다가 계대하면서 많이 감소한 경우, 계대하여 hNIS 유전자 발현이 저하된 세포는 hNIS 전령 RNA가 발현되고 방사성옥소를 소량 섭취하지만 KClO<sub>4</sub>로 저해되므로 이입한 hNIS 유전자는 계대화석되지 않고 F3-NIS III 세포에 존재한다고 생각한다. 이 이입 hNIS 유전자는 발현단계에서 주로 DNA 메틸화와 히스톤탈아세틸화에 의해 침묵유도된 것이라 생각한다. 우리는 이 연구에서 신경줄기세포에 이입한 hNIS 유전자가 계대도중 발현되지 않는데 DNA 메틸화와 히스톤탈아세틸화 저해로 유전자 발현을 복구하였으므로 침묵유도에 위의 두 가지 기전이 관여함을 밝혔다. 다만 양적으로 보아서 계대도중 침묵유도되는 데에 DNA 메틸화보다는 히스톤탈아세틸화가 더 크게 기여하는 것 같다.

Rosenqvist 등<sup>18)</sup>은 신경줄기세포에 GFP를 이입하고 이 유전자가 발현 억제되는데 히스톤탈아세틸화가 주요 기전임을 밝혔다. TSA로 히스톤탈아세틸화를 저해하였더니 세배이상 GFP 발현이 증가하였기 때문이다. GFP 대신에 이 연구에서 사

용한 hNIS는 생물학적 활성을 측정하는데 막 이온수송체인 나트륨/옥소 수송체를 사용하여 옥소의 세포내 이입을 조사한다. 따라서 이중형광단백질인 GFP의 세배 증가와 hNIS 활성의 36배 증가가 단순 비교 대상이라 할 수는 없지만, 분자영상을 얻으려할 때는 hNIS의 신호가 훨씬 유리할 것이라 추정된다.

DNA 탈메틸화는 안정적이고 유전가능한(heritable) 상태로 유전자임프린팅(genetic imprinting)에 관여한다고 알려졌다.<sup>20,23)</sup> 이 연구에서 우리는 유전자를 이입한 후 8번 계대한, 유전자이입전 신경줄기세포(F3)에 비해 2배정도의 hNIS 활성 즉 방사성옥소섭취율을 보이는 세포(F3-NIS III)를 실험에 사용하였다. 8회 보다 더 많은 횟수 계대하면 혹시 DNA 메틸화가 진전되어 탈메틸화가 이입유전자 발현에 더 큰 효과를 보일지 모른다. 또는 반대로 계대 횟수가 적었다면 DNA 탈메틸화의 효과가 달리(더 크게) 나타났을 수도 있다. 그러나 이 가상 실험 결과는 추측하기 어려우며 이 연구결과로는 오로지 hNIS 활성이 거의 사라진 그러나 hNIS가 신경줄기세포에 아직

남아있는 침묵유도된 신경줄기세포에서 히스톤탈아세틸화효소저해로 hNIS 활성을 다시 충분히 끌어올릴 수 있었음을 알 수 있다.

신경줄기세포에 hNIS를 이입하지 않은 세포에 히스톤탈아세틸효소 저해제를 투여한 경우에 NIS 활성이 나타난 것은 시사하는 바가 크다. 정상적으로도 신경줄기세포의 NIS활성은 히스톤아세틸화/탈아세틸화의 균형에 의해 조절되는 것 같다. 만일 생체에 hNIS를 이입한 신경줄기세포를 이식하고 히스톤탈아세틸화 저해제를 마우스에게 투여하면 이입 신경줄기세포의 hNIS뿐 아니라 마우스 자체의 배후세포들도 NIS를 발현할 가능성을 시사한다. 이럴 경우 신호잡음비가 감소하므로 히스톤탈아세틸화저해제를 투여하는 것이 줄기세포 거동 관찰에 도움될지는 마우스와 랫트를 이용한 생체실험으로 밝혀야 한다.

이 연구에서는 DNA 탈메틸화와 히스톤탈아세틸화 저해의 상승작용을 입증하지 못하였다. 100 nM의 TSA와 0-20  $\mu$ M의 5-Azacytidine을 F3-NIS III 세포에 24시간 동안 처리 후 측정된 방사성옥소 섭취율이 5-Azacytidine 처리 농도에 따라 1.01, 1.05, 1.10, 1.12배로 조금 증가하기는 하였으나 상승작용을 보이지는 않았기 때문이다. F3-NIS III 세포에서 hNIS 유전자 발현이 과메틸화로 완전히 억제 되어 있지 않기 때문이라고 추측된다. 그러나 동시에 F3-NIS III 세포에 5-Azacytidine을 처리한 후 측정된 hNIS mRNA 양은 5-Azacytidine 처리 농도에 따라 증가하였으므로 hNIS의 전사후 번역 또는 hNIS활성을 나타내는데 기여하는 다른 유전자들이 DNA 메틸화이외의 기전에 의해 묶여 있기 때문이라고 추정된다. 반대로 히스톤탈아세틸화 저해에 의해 hNIS mRNA의 활성이 조금밖에 증가하지 않았는데 hNIS 활성이 많이 증가한 것은 hNIS의 전사 후 번역 또는 hNIS가 막수송체로서 활성을 나타내는데 기여하는 다른 유전자의 활성에 히스톤탈아세틸화저해가 관여하는 것일 수 있다. 어쨌든 이 연구는 F3-NIS 세포를 계대배양 하면 hNIS 유전자 발현이 억제되는데 DNA 메틸화와 히스톤탈아세틸화가 모두 관여함을 입증하였다.

DNA 탈메틸화와 히스톤탈아세틸화저해는 모두 세포의 분화와 증식에 관여한다. 둘 다 유전자 발현에 기여하되, 발현된 여러 유전자의 역할과 균형에 따라, 세포는 분화하거나 증식하기도 하고<sup>28)</sup> 또는 휴지기에서 증식기로 나오기도 한다.<sup>29)</sup> 신경세포에서는 히스톤탈아세틸화저해로 뉴런의 성장이 유도되기도 하고,<sup>30)</sup> 회돌기세포로 분화하는 것이 차단되기도 하며,<sup>31)</sup> 제2형 성상세포로 분화가 허용되는 등<sup>31)</sup> 세포혈통에 따라 다른 효과가 나타났다. 특히 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 유전자의 5' 부위 특정부위의 CG가 탈메틸화되면 신경세포혈통으로 분화한다.<sup>32)</sup> 이렇게 DNA탈메틸화와 히스톤탈아세틸화저해가 이입유전자 뿐 아니라 신경세포의 분화에 관여하므로, 이입유전자의 발현과 세포의 혈통별 분화의 공시성을 연구하면 hNIS 같은 이입 유전자로 이식 신경줄기세포의 증식과 분화를 추적 영상화할 길이 열릴 가능성이 있다.

리포터 유전자를 이입하고 생체 내에 이식한 신경줄기세포를 추적하여 줄기세포의 이동 동태, 분화 과정, 재생 능력 등을 이해하려 할 때 이입 유전자가 안정적으로 발현되는 것이 중요하다. 이 연구에서 히스톤탈아세틸화저해제와 DNA탈메틸화 약제를 처리하면 신경줄기세포에 이입한 유전자를 발현하도록 조율할 수 있다는 사실을 밝혔다. 생체 내에서 이런 조율이 작동할지 밝히는 연구가 이어져야 한다.

## 요 약

**목적:** 생체 내로 이식한 신경 줄기 세포의 이동과 증식을 비침습적으로 추적하는 것은 기초와 임상에서 중요한 것으로 알려져 있다. 신경줄기 세포주(F3)를 생체내로 이식 후, 비침습적으로 추적하기 위해 사람의 hNIS 유전자를 F3 세포에 안정적으로 형질 도입하여 세포 배양 시간 및 조건에 따른 F3-NIS 세포 내에서 hNIS 유전자의 발현 변화를 알아보았다. **방법:** HB1.F3는 태아 종뇌에서 신경 줄기 세포를 분리한 후 *v-myc* 유전자로 불멸화한 신경줄기 세포주이다. CMV 프로모터 조절 받



도록 hNIS와 하이그로마이신 저항 유전자를 IRES(internal ribosomal entry site)를 이용하여 재조합하였다(pIRES-NIS/Hyg). pIRES-NIS/Hyg를 리포솜을 이용하여 HB1.F3 세포를 형질전환 하였다. 탈메틸화시약(5-Azacytidine)와 히스톤탈아실화효소저해제(trichostatin; TSA)을 세포주에 24시간 처리한 후, hNIS 발현을 I-125 섭취율과 역전사효소 증합효소연쇄반응(RT-PCR)으로 측정하였다. **결과:** pIRES-NIS/Hyg 재조합 유전자를 HB1.F3에 형질도입 후, 2주 동안 하이그로마이신 B를 처리해 hNIS 유전자를 안정적으로 발현하는 HB1.F3 세포를 얻었다(F3-NISⅢ). I-125 섭취율은 HB1.F3에 비해 F3-NIS가 12.9배 높았으며, KClO<sub>4</sub>를 처리 했을 때 F3-NIS의 I-125 섭취가 완전히 저해되었다. F3-NIS를 계대 배양하면 hNIS 유전자의 발현이 1.9배 까지 서서히 감소하였다. 5-Azacytidine과 TSA를 F3-NIS에 24시간 처리한 결과, I-125 섭취율이 5-Azacytidine과 TSA 농도에 따라 증가되었다. 또한 같은 방법으로 F3-NIS 세포에 5-Azacytidine과 TSA를 처리 한 후 hNIS 프라이머로 RT-PCR을 수행한 결과 hNIS mRNA가 농도에 따라 증가 되었다. **결론:** hNIS 유전자 이입된 F3 세포는 계대 배양하는 동안 생물학적인 특성이 변화되는 것으로 관찰되었으며, 이는 줄기 세포에 이입된 외래 유전자의 발현이 DNA 탈메틸화나 히스톤아세틸화를 통한 에피지네틱 조절 때문이라고 생각한다.

### 참고문헌

- 1) Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci.* 2000;3:537-44.
- 2) Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, Zhang L, Wang L, Zhang L, et al. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol.* 2003;53:259-63.
- 3) Blasberg RG, Gelovani J. Molecular-genetic imaging: a nuclear medicine-based perspective. *Mol Imaging.* 2002;1:280-300.
- 4) Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med.* 2002;43:1188-200.
- 5) Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene.* 2003;22:6479-83.
- 6) Cho T, Bae JH, Choi HB, Kim SS, McLarnon JG, Suh-Kim H, et al. Human neural stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *Neuroreport.* 2002;13:1447-52.
- 7) Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2003;34:2258-63.
- 8) Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol.* 2000;18:410-4.
- 9) Bulte JW, Ben-Hur T, Miller BR, Mizrachi-Kol R, Einstein O, Reinhartz E, et al. MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain. *Magn Reson Med.* 2003;50:201-5.
- 10) Stroh A, Lorenz P, Marschinke F, Grune T, Pilgrim H, Zimmer C. Detection of transplanted stem cells in a parkinson rat model by molecular magnetic resonance imaging. *Mol Imaging.* 2003;2:266. (Abstract)
- 11) Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology.* 2003;229:838-46.
- 12) Anderson S, Glod J, Arbab A, Noel M, Fine H, Frank J. Tracking of labeled endothelial precursor cells into neovasculature in a mouse malignant glioma model by *in vivo* MRI. *Mol Imaging.* 2003;2:266. (Abstract)
- 13) Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, Settles M, Piontek G, Metz S, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology.* 2003;228:760-7.
- 14) Daldrup-Link H, Rudelius M, Piontek G, Oostendorp R, Metz S, Pichler B, Schlegel J, et al.

- Gadophrin-2 labeled hematopoietic progenitor cells can be depicted *in vitro* and *in vivo* with MR imaging and optical imaging. *Mol Imaging*. 2003;2:268. (Abstract)
- 15) Magnitsky S, Watson D, Walton R, Pickup S, Bulte J, Glickson J, Wolfe J, et al. *In vivo* and *Ex vivo* magnetic resonance imaging of transplanted stem cells in the mouse brain. *Mol Imaging*. 2003;2:270. (Abstract)
  - 16) Rudelius M, Daldrup-Link HE, Heinzmann U, Piontek G, Settles M, Link TM, Schlegel J. Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30:1038-44.
  - 17) Rudelius M, Daldrup-Link H, Piontek G, Settles M, Rummeny E, Schlegel J. *In vivo* tracking of genetically modified neuronal stem cells. *Mol Imaging*. 2003;2:268. (Abstract)
  - 18) Rosenqvist N, Hard Af, Segerstad C, Samuelsson C, Johansen J, Lundberg C. Activation of silenced transgene expression in neural precursor cell lines by inhibitors of histone deacetylation. *J Gene Med*. 2002;4:248-57.
  - 19) Kim YH, Lee DS, Kang JH, Lee YJ, Chung J-K, Jeong JM, et al. Neural stem cell tracking with NIS (Sodium/iodide synporter) reporter gene. *Mol Imaging*. 2003; 2:269 (Abstract).
  - 20) El Kharroubi A, Piras G, Stewart CL. DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276:8674-80.
  - 21) Kierszenbaum A. Genomic imprinting and epigenetic reprogramming: unearthing the garden of forking paths. *Mol Reprod Dev*. 2002;63:269-72.
  - 22) Shaker S, Bernstein M, Momparler LF, Momparler. Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res*. 2003;27:437-44.
  - 23) Reik W, Dean W, Walter. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293:1089-93.
  - 24) Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G, et al. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*. 2001;27: 31-9.
  - 25) Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*. 1999;21:103-7.
  - 26) McBurney MW, Mai T, Yang X, Jardine K. Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured Mammalian cells: inactivation of tandem repeats of transfected genes. *Exp Cell Res*. 2002;274:1-8.
  - 27) Bartoli A, Fettucciari K, Fetriconi I, Rosati E, Ianni MD, Tabilio A, et al. Effect of trichostatin a and 5'-azacytidine on transgene reactivation in U937 transduced cells. *Pharmacol Res*. 2003;48:111-8.
  - 28) Niki T, Rombouts K, De Bleser P, De Smet K, Rogiers V, Schuppan D, et al. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology*. 1999;29:858-67.
  - 29) Travers H, Spotswood HT, Moss PA, Turner BM. Human CD34+ hematopoietic progenitor cells hyperacetylate core histones in response to sodium butyrate, but not trichostatin A. *Exp Cell Res*. 2002;280:149-58.
  - 30) Schinstine M, Iacovitti. 5-Azacytidine and BDNF enhance the maturation of neurons derived from EGF-generated neural stem cells. *Exp Neurol*. 1997;144:315-25.
  - 31) Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnel P. Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *J Neurosci*. 2002;22:10333-45.
  - 32) Condorelli DF, Dell'Albani P, Conticello SG, Barresi V, Nicoletti VG, Caruso A, et al. A neural-specific hypomethylated domain in the 5' flanking region of the glial fibrillary acidic protein gene. *Dev Neurosci*. 1997;19:446-56.