

Diethylstilbestrol의 단핵구의 세포간 유착과정 조절효과

김병훈 · 조재열[#]

강원대학교 BT학부대학 생명공학부

(Received November 3, 2007; Revised January 2, 2008)

Modulatory Effect of Diethylstilbestrol on CD29-Mediated Cell-cell Adhesion in Monocytic U937 Cells

Byung Hun Kim and Jae Youl Cho[#]

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — Diethylstilbestrol (DESB) is a synthetic estrogen not only that routinely prescribed, but also that known to be a teratogen. In this study, we found a novel pharmacological feature that DESB is able to positively modulate CD29 (β 1-integrin) function. Thus, DESB up-regulated homotypic cell-cell adhesion of monocytic U937 cells mediated by CD29. However, DESB did not increase the surface level of CD29 and its binding activity to ligand (fibronectin), according to flow cytometric analysis and cell-fibronectin adhesion assay. Instead, the DESB-mediated up-regulation of cell-cell adhesion was blocked by several signaling enzyme inhibitors. Treatment of U0126 [an extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor], SB20358 (a p38 inhibitor) or Rp-8-pCPT-cGMP (a protein kinase G inhibitor) clearly inhibited DESB-mediated up-regulation of cell-cell adhesion induced by CD29. However, estrogen receptor antagonist ICI 182,780 failed to abrogate DESB effect. Therefore, our data suggest that DESB may up-regulate CD29-mediated cell-cell adhesion via modulating intracellular signaling enzymes such as ERK, PKG, and p38, independent of estrogen receptor function.

Keywords □ diethylstilbestrol (DESB), cell-cell adhesion, CD29, adhesion molecules

DESB는 합성 estrogen으로, 여성의 천연 estrogen 생산을 보충하기 위해 개발된 스테로이드성 호르몬 유도체이다. DESB는 초기에 임신부와 태아 모두에게 안전하고 효과적인 약물로 인식되었으나 처방 받은 여성의 자손들에게서 질암이 드물게 나타나는 것에 관해서 임신부의 사용을 금지하기도 하였으며, 이후 30년 동안의 장기적인 연구를 통해 기형유발물질(teratogen)로 확인되면서 제한적으로 사용된 스테로이드계 호르몬이다.¹⁾

세포-세포간 응집 혹은 유착현상(cell-cell adhesion)은 배아형성(embryogenesis), 항상성유지(hemostasis), 혈관신생, 조직치료, 면역반응, 암세포의 전이 확산과 관련된 다양한 과정에서 필수적인 과정으로 알려져 있다.^{2,3)} 이들 과정은 세포 표면에 존재하는 adhesion molecule이라고 하는 단백질의 활성화에 의해 매개된다.⁴⁾ 이들 단백질의 활성화는 adhesion molecule과 리간드 단백질간의 3차원적인 분자상호작용을 통해 각 세포내로 신호전달

과정을 유도함으로써 세포의 운동성, 세포의 유착성 및 세포의 활동성 등을 부여하여 진행되게 된다. 특별히 이들 과정을 조절하는 adhesion molecule들은 베타1-인테그린으로 알려진 CD29, 베타2-인테그린으로 알려진 CD18, cadherin 및 selectin 등이 있다.⁵⁾

면역세포의 활동성과 기능 조절의 핵심 단백질로서 CD29의 기능이 밝혀지면서 이들 단백질의 기능 향진 혹은 길항조절을 통한 면역치료제 개발이 활발히 진행되고 있다.⁶⁾ 따라서 본 연구팀도 CD29의 기능 조절을 유도하는 약물들을 탐색하고 있으며, 그 과정에서 DESB가 CD29의 기능을 촉진시킨다는 결과를 얻었기에 이에 본 연구에서 관련 내용을 보고하고자 한다. 재료 및 방법

실험 재료

이 실험에서 사용된 인간 단핵구 세포주인 U937 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA) 사로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위한 배양용 배지로는 RPMI1640 media, fetal bovine serum

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6562 (팩스) 033-253-6560
(E-mail) jaecho@kangwon.ac.kr

(FBS) 및 항생제(penicillin/streptomycin)는 Hyclone(South Logan, UT, USA)사 제품을 이용하였다. Diethylstilbestol (DESB)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Human fibronectin은 BD Biosciences(San Jose, CA, USA)사 제품을 사용하였고, CD29(MEM 101A, IgG1, ascites), CD98(7F8, purified IgG1), CD147(M6-1D4, purified IgG1) 및 CD43 (MEM59, ascites, IgG1)는 각각 V. Horejsi와 R Villella로부터 제공받았다.^{7,8)} U0126, Rp-8-pCPT-cGMP, SB203580 및 SP600125는 Cell Signaling Technologies사(Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였다. 그밖에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]를 포함한 화학시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

세포배양

U937 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양했다. 배지는 penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin(100 µg/ml)과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용했다.

MTT assay

세포독성에 미치는 DESB의 효과는 MTT assay 법으로 평가하였다.¹⁴⁾ U937 세포(1×10⁶ cells/ml)에 DESB처리하고 3시간 후에 배양을 종료하였다. 다시 배양 well에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액(5 mg/ml) 20 µl를 첨가하고 3시간을 추가적으로 동일 조건에서 배양하였다. 발색은 30% SDS 용액을 첨가하여 유도하였다. 흡광도는 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

세포-세포간 유착반응 분석

DESB를 각 농도로 조제해 96-well plate에 각각 10 µl씩 분주하고, U937 세포(1×10⁶ cells/ml) 용액을 80 µl를 처리하여 37°C에서 30분간 배양했다. 다시 여기에 10 µl의 항체(CD43 및 CD29 각 1 µg/ml)를 분주하여 유착된 정도를 시간 별로 사진촬영 하였다. 또한 세포-세포간 유착반응 정량은 이전 보고에서 처럼,⁷⁾ 이들 중 일부 세포용액을 hemocytometer에서 전체 세포수와 응집된 세포수를 측정하고 아래 계산식을 이용하여 유착율(% of adhesion)을 산출하였다.

$$\% \text{ of adhesion} = (\text{유착세포수} / \text{전체세포수}) \times 100$$

세포-fibronectin간의 유착반응 정량

Fibronectin(최종농도 50 µg/ml)을 96-well plate의 해당 well에 100 µl를 분주하고, 나머지 well에는 PBS를 분주 후, 4°C에서 18시간 동안 전배양 하였다. RPMI1640 배지로 세척 후 2 mg/ml bovine serum albumin으로 blocking시켰다. 다른 plate에

여러 가지 처리 농도로 희석된 DESB 11 µl를 분주하고, U937 (5.6×10⁶ cells/ml) 세포용액을 99 µl를 처리하여 37°C에서 한 시간 동안 배양하였다. Blocking한 plate를 RPMI1640 배지로 세 번 세척 후, DESB가 처리된 세포용액 100 µl을 fibronectin-coated plate로 옮겨 넣고, 4 시간 추가 배양을 실시하였다. 세포-fibronectin간 유착 정도는 0.1% crystal violet 용액을 첨가한 후 15분 동안 반응시키고, 10% acetic acid를 처리한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁹⁾

세포표면 단백질들의 발현량 검토

U937 세포(1×10⁶ cells/ml)를 6-well plate의 해당 well에 3 ml 분주하고, DESB 용액(최종농도: 100 µM)과 vehicle(DMSO)을 분주한 후, 30°C에서 1시간 동안 전배양하였다. 그리고 96-well round plate의 해당 well에 전배양한 세포-DESB 용액을 200 µl를 분주 후, FACS buffer로 세 번 washing을 하고, 10% rabbit serum(in PBS)을 처리하고, 해당 항체[MEM101A(1 µg/ml) for CD29, and CLB-LFA-1(1 µg/ml) for CD18]를 처리하였다. 얼음에서 45분간 배양 후 다시 FACS buffer로 세 번 washing을 하고, 이차 항체를 처리하여 얼음에서 45분간 배양 후 다시 FACS buffer로 세 번 세척하였다. 이 후, FACScan을 이용해 세포표면 단백질의 발현량을 측정하였다.⁷⁾

통계처리

각 data는 얻어진 결과는 평균±표준편차로 나타낸 것이며, 그룹 간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 P<0.05 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

DESB의 세포 생존율에 미치는 효과

DESB에 의한 U937 세포의 유착과정 조절 현상을 연구하기 위해 먼저 이들 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 특별히 이를 위해 가장 긴 배양조건을 갖는 cell-fibronectin 유착 실험의 3시간 배양조건을 선택하여 생존율을 확인하였다. Fig. 1에서 보여지듯, DESB는 100 µM까지의 농도에서도 전혀 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 대부분의 실험을 100 µM 조건에서 진행하였다.

DESB의 CD29기능 조절 효과

CD29의 기능조절연구를 위해 본 연구자는 CD29의 활성을 선택적으로 증가시키는 function-activating antibody(MEM101A)를 이용하여 CD29 매개성 세포-세포간 유착모형을 확립한 바 있다.⁷⁾ 즉, 이들 항체처리하는 초기시간에 U937 세포간 유착현상을 유도하였으며, 특별히, 이들 과정은 CD29의 function-

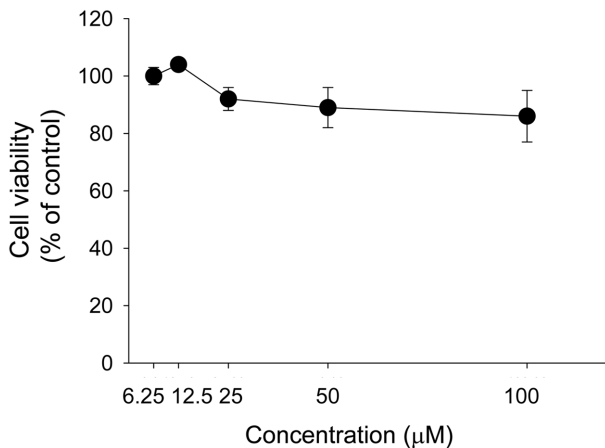


Fig. 1 – Effect of DESB on the cell viability of U937 cells. U937 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with DESB for 3 h and cell viability was determined by MTT assay as described in Materials and Method. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate.

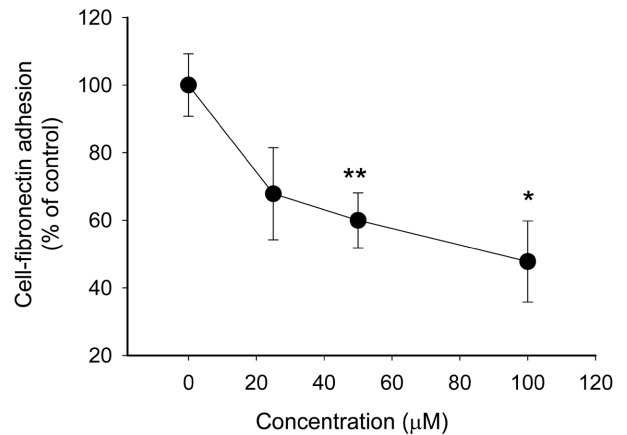


Fig. 3 – Effect of DESB on U937 cell-fibronectin adhesion. U937 cells (1×10^6 cells/ml) pre-treated with DESB for 30 min were incubated on fibronectin-coated plate for 3 h. Attached cells were determined by crystal violet (0.1%) as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to fibronectin alone.

blocking antibody인 MAR4에 의해 억제되는 것을 통해 CD29 기능과 관련 있는 것으로 보고되었다.⁷⁾ 따라서 본 연구에서는 이들 모델을 이용하여 합성 estrogen인 DESB의 CD29기능 조절 효과를 조사하여 보았다. Fig. 2A 및 2B에서 보여지듯, MEM101A 처리는 초기시간(30 min)에 세포간의 유착을 촉진하는 것으로 나타났다. 이들 조건에 추가 처리된 DESB는 초기 MEM101A가 보여준 세포간 유착현상보다 더 큰 규모의 세포 응집체를 유도한 것으로 나타났다. 하지만 DESB 단독은 세포간 유착현상을 유도하지 않았다. 이는 DESB에 의한 세포-세포간 유착현상 촉진이 CD29의 기능적 활성화와 관련이 있음을 시사한다고 하겠다.

DESB의 세포-세포외 기질(fibronectin)간 유착현상 조절 효과

따라서, 본 연구자는 CD29 분자의 활성화 촉진에 의한 세포간 유착현상 촉진이라는 가정하에 CD29의 활성을 선택적으로 평가할 수 있는 U937 세포-fibronectin 유착 모델을 확립하여 DESB에 의한 CD29기능 조절 가능성을 조사하여 보았다.⁹⁾ U937 세포와 fibronectin 간의 유착현상은 CD29의 function-blocking antibody인 MAR4 및 P5D2들에 의해 강력히 억제되었다(미공개 결과). 하지만 CD18, CD43, CD98 및 CD147 function-blocking antibody들 및 신호전달과정 저해 약물에 의해서는 유착현상이

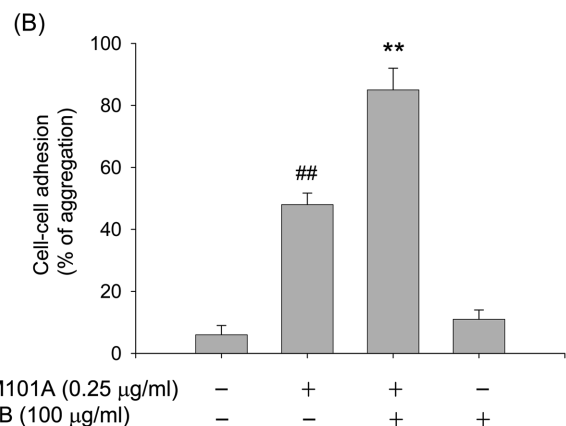
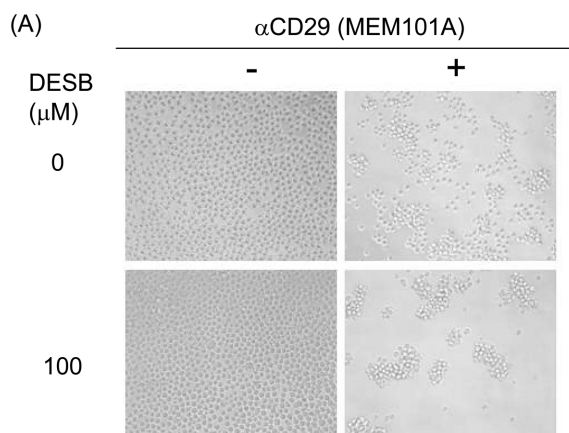


Fig. 2 – Effect of DESB on U937 cell-cell adhesion induced by CD29 function-activating antibody (MEM101A). (A) U937 cells (1×10^6 cells/ml) incubated with DESB for 30 min were treated with MEM101A (0.25 µg/ml). After 1 h, the photographs were taken. (B) Quantitative cell-cell adhesion was performed by a method as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. ##: $p < 0.01$ compared to normal culture condition, **: $p < 0.01$ compared to MEM101A.

저해되지 않았다(미공개 결과). 이는 이들 과정이 선택적으로 리간드에 대한 CD29 분자 자체의 구조적 활성 매개에 의해 수행되어 진다는 것을 시사한다고 하겠다. U937 세포-fibronectin 유착 모델에서 DESB의 조절 작용을 Fig. 3에 제시하였다. 흥미롭게도, DESB는 U937세포-fibronectin간 유착현상을 촉진하지 못하였고, 오히려 이들 과정을 농도의존적으로 억제한 것으로 나

타났다. 즉 이들 결과는 DESB가 fibronectin과 반응할 CD29 분자의 구조적 활성을 유도하지 않은 것으로 판단된다.

DESB의 CD29 막발현 조절 효과

DESB는 CD29의 리간드 단백질과의 분자적 친화성을 조절하지 않는 것으로 판단되므로, CD29 막표면 발현 촉진 가능성을

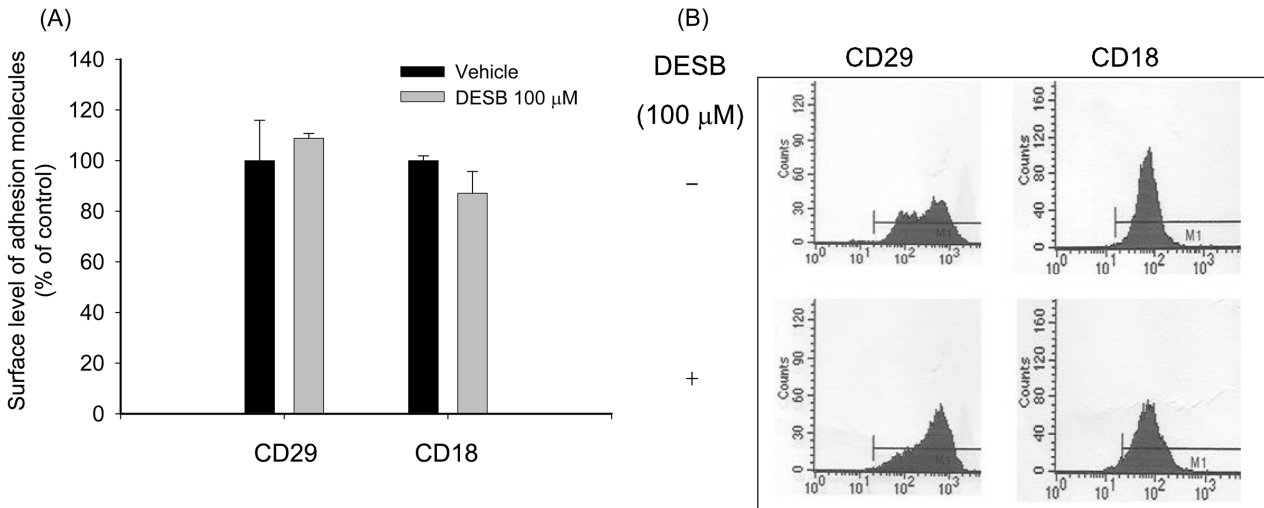


Fig. 4 – Effect of DESB on expression of the cell surface molecules. (A and B) U937cells (1×10^6 cells/ml) were treated with DESB for 1 h and stained with various antibodies [MEM101A (1 μg/ml) for CD29, and CLB-LFA-1 (1 μg/ml) for CD18] in the ice for 45 min. Cell surface molecules were analyzed by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate.

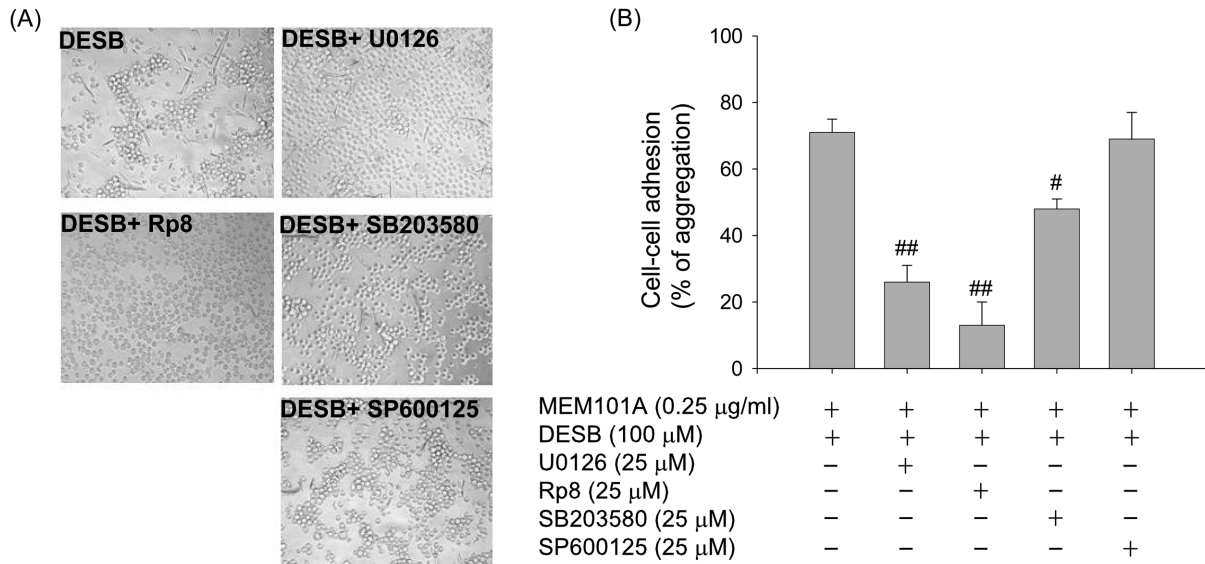


Fig. 5 – Effect of signaling enzyme inhibitors on the up-regulation of MEM101A-mediated cell-cell adhesion by DESB. (A) U937 cells (1×10^6 cells/ml) pretreated with U0126 (an ERK 1/2 inhibitor, 50 μM), Rp-8-pCPT-cGMP (a PKG inhibitor, 10 μM), SB203580 (a p38 inhibitor, 25 μM) or SP600125 (a JNK inhibitor, 10 μM) were incubated with DESB and MEM101A (0.25 μg/ml) for 30 min. The images of the cells in culture were obtained using an inverted phase contrast microscope attached to a video camera. (B) Quantitative determination of cell-cell adhesion was obtained by quantitative cell-cell adhesion assay as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. #: $p < 0.05$ and ##: $p < 0.01$ compared to DESB+MEM101A.

flow cytometric analysis를 통해 조사하였다. Fig. 4(A 및 B)에서 보여주듯, DESB는 CD29의 막 발현 정도를 촉진한 것으로 나타났다. 그러나 CD18(Fig. 4B) 및 CD43(미공개별과)의 발현양은 DESB에 의해 감소되는 것으로 확인되었다. 즉 이들 결과는 DESB가 adhesion molecule의 발현양을 조절할 수 있다는 것을 시사한다고 하겠다. 하지만, 발현양 증가 또는 감소정도가 통계적으로 유의적이지 않으므로, 이들 조절 효과가 CD29 기능 향진에 영향을 미칠 가능성은 적은 것으로 판단된다.

DESB의 세포간 유착 조절 신호전달 과정 조절 효과

세포-세포간 유착현상은 표면 CD29의 분자적 활성화에 기인된 리간드(CD49 혹은 세포외기질)/CD29간의 분자적 상호작용을 유도하고, 이들 결합은 세포내로 각종 신호전달 과정을 유도하게 된다.¹⁰ 특별히 이들 신호들은, 세포의 운동성 및 세포간 결합성을 조절하게 하는 세포골격의 변화, 세포내 에너지 대사의 증폭 등을 조절하게 된다.^{7,11} 따라서 본 연구에서는 DESB가 이들 신호전달 과정에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 보았다. 이를 위해 DESB와 CD29 antibody(MEM101A)를 처리하기 전에

U0126(ERK 1/2 inhibitor, 50 μ M), Rp-8-pCPT-cGMP(PKG inhibitor, 10 μ M), SB203580(p38 inhibitor, 25 μ M) 및 SP600125(JNK inhibitor, 10 μ M)를 30분 전처리하여, 관련 신호전달 단백질들의 활성을 억제하였다. 흥미롭게도, U0126과 Rp-8-pCPT-cGMP 처리군에서는 강력하게 세포응집 반응이 억제되었고, SB203580 처리군에서도 유의적인 억제가 일어난 것으로 나타났다(Fig. 5A 및 5B). 이는 DESB에 의한 세포유착 반응의 증가는 PKG, ERK 및 p38의 경로를 통해 세포간의 응집이 증가될 가능성이 있음을 시사한다고 하겠다.

DESB에 의한 세포간 유착 조절 향진효과에서 estrogen receptor의 관련성

DESB의 약물학적인 기능은 estrogen receptor의 매개의 의해 진행되는 것으로 알려져 있다.¹² 따라서 마지막으로 DESB에 의한 CD29 매개성 세포간 유착조절 향진효과에서 estrogen receptor의 관련성을 조사하여 보았다. 이를 위해 estrogen receptor antagonist인 ICI 182,780을 전처리하여 실험한 결과,¹³ 이들 약물에 의해서도 DESB에 의한 MEM101A의 세포 유착반

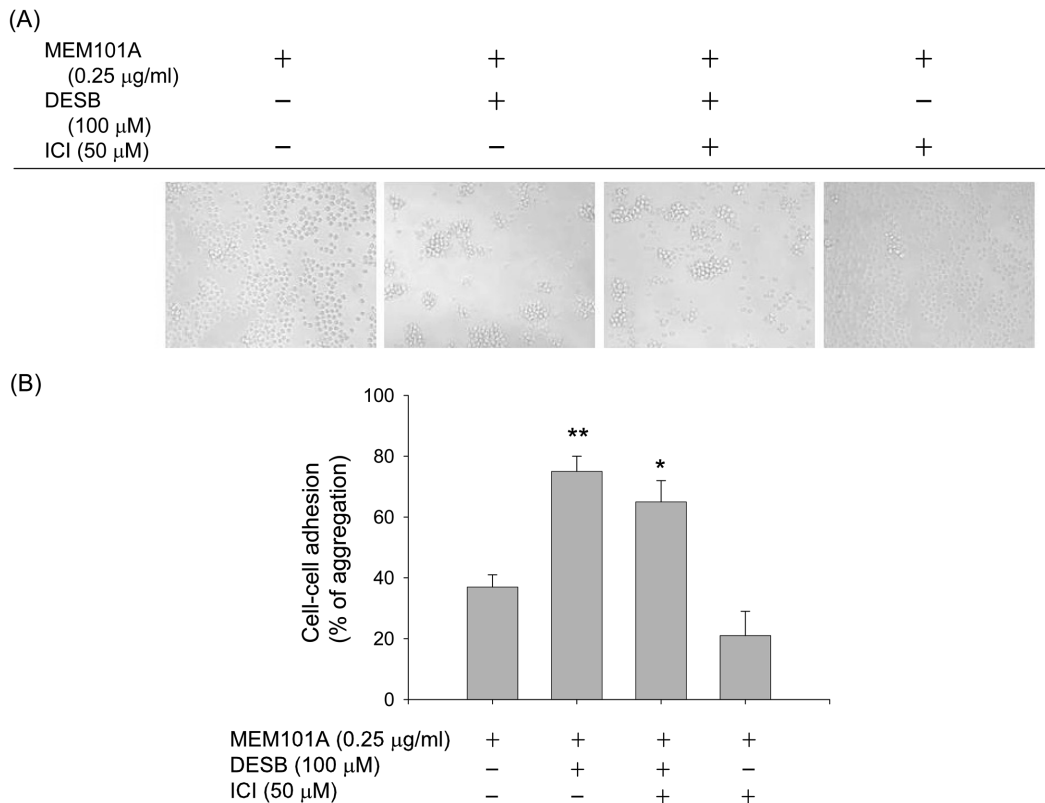


Fig. 6 – Effect of ICI 182780, an estrogen receptor antagonist, on up-regulation of MEM101A-induced cell aggregation by DESB. (A) U937 cells (1×10^6 cells/ml) pretreated with ICI 182780 were incubated with DESB and MEM101A (0.25 μ g/ml) for 30 min. The images of the cells in culture were obtained using an inverted phase contrast microscope attached to a video camera. (B) Quantitative determination of cell-cell adhesion was obtained by quantitative cell-cell adhesion assay as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm SEM of three independent observations performed in triplicate. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ compared to MEM101A.

응은 변화하지 않는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, MEM101A와 ICI 182,780만을 처리한 군에서는 MEM101A 단독 처리군과 비교시 특이한 차이점을 나타내지 않았다(Fig. 6). 따라서 본 결과로 미루어 볼 때, DESB에 의한 CD29 매개성 유착현상 항진 효과는 estrogen receptor의 기능을 경유하지는 않는 것으로 사료된다.

결 론

DESB는 세포표면 단백질인 CD29(β 1-integrin) 매개에 의한 세포유착 반응을 증가시켰다. 이들 현상은, CD29와 fibronectin 간의 단순한 결합을 확인하는 cell-fibronectin adhesion assay, 막표면 단백질의 flow cytometric analysis 및 선택적인 신호전달 단백질 저해제들과의 병용투여 실험을 통해 확인해 볼 때, CD29의 리간드 결합력 상승 및 D29의 막표면 발현양 유도에서 기인된 것 보다, 세포 내부의 신호전달 단백질들인 ERK, PKG 및 p38의 활성화 매개에 의해 진행될 가능성이 있는 것으로 판단된다. 그러나, 이들 길항작용은 estrogen receptor antagonist인 ICI 182,780와의 병용 투여를 통해, DESB의 수용체 단백질로 알려진 estrogen receptor의 매개에 의한 현상은 아닌 것으로 확인되었다. 따라서, 본 결과는 고농도의 DESB는 CD29의 기능 항진을 통해 면역세포의 면역 반응성을 조절할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 강원지역 바이오누리 인력양성사업단의 4차년도(2007~2008) 산학연계제품개발과제 사업으로부터 일부 재정적 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Mittendorf, R. : Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology* **51**, 435 (1995).
- 2) Zelenka, P. S. : Regulation of cell adhesion and migration in

- lens development. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 857 (2004).
- 3) Friedl, P., Hegerfeldt, Y. and Tusch, M. : Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 441 (2004).
- 4) Bazan-Socha, S., Bukiej, A., Marcinkiewicz, C. and Musial, J. : Integrins in pulmonary inflammatory diseases. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 893 (2005).
- 5) Schatzmann, F., Marlow, R. and Streuli, C. H. : Integrin signaling and mammary cell function. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **8**, 395 (2003).
- 6) Arnaout, M. A., Mahalingam, B. and Xiong, J. P. : Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **21**, 381 (2005).
- 7) Cho, J. Y., Fox, D. A., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Katz, D. R. and Chain, B. : The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* **98**, 374 (2001).
- 8) Cho, J. Y., Chain, B. M., Vives, J., Horejsi, V. and Katz, D. R. : Regulation of CD43-induced U937 homotypic aggregation. *Exp. Cell. Res.* **290**, 155 (2003).
- 9) Lee, Y. G., Byeon, S. E., Kim, J. Y., Lee, J. Y., Rhee, M. H., Hong, S., Wu, J. C., Lee, H. S., Kim, M. J., Cho, D. H. and Cho, J. Y. : Immunomodulatory effect of Hibiscus cannabinus extract on macrophage functions. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 62 (2007).
- 10) Mor, A., Dustin, M. L. and Philips, M. R. : Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol. Rev.* **218**, 114 (2007).
- 11) Gomez-Rodriguez, J., Readinger, J. A., Viorritto, I. C., Mueller, K. L., Houghtling, R. A. and Schwartzberg, P. L. : Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunol. Rev.* **218**, 45 (2007).
- 12) Chae, K., Lindzey, J., McLachlan, J. A. and Korach, K. S. : Estrogen-dependent gene regulation by an oxidative metabolite of diethylstilbestrol, diethylstilbestrol-4',4"-quinone. *Steroids* **63**, 149 (1998).
- 13) Branham, W. S., Fishman, R., Streck, R. D., Medlock, K. L., De George, J. J. and Sheehan, D. M. : ICI 182,780 inhibits endogenous estrogen-dependent rat uterine growth and tamoxifen-induced developmental toxicity. *Biol. Reprod* **54**, 160 (1996).