

Analysis of Expression Patterns of Thymosin β 4 and CD133 in Normal StomachMee Sun Ock¹ and Hee-Jae Cha^{1,2,*}¹Department of Parasitology and Genetics, ²Institute for Medical Science, Kosin University College of Medicine, Busan 602-703, Korea

Received September 18, 2012 / Revised October 4, 2012 / Accepted October 5, 2012

Thymosin β 4 (T β 4) has been reported to be overexpressed in CD133-positive colorectal cancer stem cells. We analyzed the relationship between T β 4 and CD133-positive stem cells in normal stomach by examining the expression patterns of T β 4 and CD133 in normal stomach tissues by immunohistochemical staining; co-localization of T β 4 and CD133 was studied by immunofluorescence and confocal laser-scanning microscopy. Both T β 4 and CD133 were expressed in stomach glands and showed similar expression patterns. Immunofluorescence staining of T β 4 and CD133 showed that the expression of T β 4 and CD133 was co-localized. In summary, both T β 4 and CD133 were expressed in glands of normal stomachs and expression patterns were co-localized. These data suggest that T β 4 expression is strongly related to CD133 expression.

Key words : CD133, stem cell, stomach, thymosin β 4

서 론

Thymosin β 4 (T β 4)는 송아지의 흉선에서 흉선 성장인자로 처음 밝혀졌다[12]. 하지만 thymosin β 4는 세포의 이동을 주관하는 액틴 단백질과 결합하여 액틴 단백질의 중합과정을 조절하는 것으로 밝혀지며 여러 가지 기능이 규명되기 시작했다[19]. 티모신 베타4는 단량체의 G-액틴 단백질과 1:1로 결합한다고 보고되었는데[18] thymosin β 4가 이렇게 단량체의 G-액틴 단백질과 결합해 있다가 세포의 이동을 위해 단량체의 F-액틴으로 중합될 때 G-액틴 단백질을 공급할 수 있어 thymosin β 4에 의해 세포의 이동이 촉진됨이 여러 보고에 의해 밝혀졌다[24]. 이러한 티모신 베타4에 의한 세포이동 촉진현상은 혈관신생 촉진[5], 상처치유[13], 모발형성 촉진[15] 등 thymosin β 4의 여러 생리학적인 기능을 설명해 주고 있다. 하지만 이러한 기능 외에도 티모신 베타4는 세포사멸 억제[7], 항 염증작용[29] 등 여러 가지 기능을 하는 것으로 보고되어 있다. Thymosin β 4는 암의 성장 및 전이와도 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있는데 암 조직에서 thymosin β 4의 발현 증가는 유방암 및 자궁암에서 보고되었으며[11,21], 대장암과 폐암에서 전이현상과 관련됨이 보고되었다[8,26]. 또한 섬유육종 및 흑색종 암세포에서 thymosin β 4의 발현이 증가하였을 때 전이 현상이 촉진됨이 관찰되었으며[1,10] 대장암의 성장과 침윤현상을 촉진시키는 것이 동물실험을 통해 입증되었다[26].

Thymosin β 4는 최근 암 줄기세포와 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 보고되고 있는데 유방암 세포 중 존재하는

작은 크기의 항암제 내성 및 줄기세포 성향을 지닌 세포군에서 티모신 베타4의 발현이 높은 것이 관찰되었으며[23] 대장암 줄기세포의 마커인 CD133 단백질을 지니고 있는 암 줄기세포를 선택적으로 분리하였을 때 분리한 암 줄기 세포군에서 일반 대장암보다 thymosin β 4의 발현이 높은 것이 관찰되었다[17]. 이러한 결과는 티모신 베타4가 암 줄기세포 중 특히 CD133 마커와 밀접한 관련을 가지고 있을 가능성을 제시해준다.

CD133 마커는(Prominin-1 혹은 AC133이라고도 알려짐) 핵막을 5번 관통하는 막 단백질로 조혈모세포 등 줄기세포의 마커로 알려져 있으며[14,27] 최근 뇌암[22], 전립선암[2], 간암[28], 췌장암[6], 폐암[4] 및 대장암[16]에서 암 줄기세포의 특성을 나타내는 마커로 보고되고 있다.

본 연구 결과에서는 정상 위 조직에서 티모신 베타4와 CD133의 발현을 최초로 조사함으로써 thymosin β 4와 CD133이 정상 위 조직에서 어떠한 양상으로 발현 되는지와 그 발현의 상관관계가 어떠한지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

환자 조직

환자 조직은 tissue microarray를 Super Bio Chip (Super Biochips Laboratories, Seoul, KOREA)사로부터 구입하여 사용하였다. 나이와 성별을 제외한 조직을 제공한 환자의 정보는 가지고 있지 않다.

면역조직화학검사(Immunohistochemistry)

면역조직화학검사를 위해 tissue microarray 슬라이드를 탈파라핀화와 수화를 거친 다음 citrate buffer (0.01 M, pH 6.0)

***Corresponding author**Tel : +82-51-990-6428, Fax : +82-51-990-3081
E-mail : hcha@kosin.ac.kr

(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 상에서 전자레인지로 최고출력으로(700W 이상) 5분간 두 번 antigen retrieval을 실시하였다. PBS하에서 슬라이드를 충분히 식힌 후 3% hydrogen peroxide 용액에서 5분간 반응하여 endogenous peroxidase를 제거하였다. 이후 PBS로 5분간 3번 씻어 준 다음 PBS에 희석된 rabbit polyclonal thymosin β 4 항체(ALPCO Diagnostics, Windham, NH, USA)를 1: 2,000 희석비율로 혹은 CD133 항체(Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)를 1:100 희석 비율로 4°C에서 overnight 배양하였다. 다음날 PBS로 5분씩 3번 씻어 준 후 2차 항체를 처리하여 1시간 동안 반응한다. PBS로 5분 동안 3번 씻어 준 후 Dako's EnVision Kit (DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 DAB 발색반응을 유도하였다. 슬라이드는 이후 대조 염색을 Meyer's hematoxylin (DAKO)로 10 초간 염색 후 탈수반응을 거친 다음 Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)로 고정하였다.

면역형광염색검사

면역형광염색을 위해 tissue microarray 슬라이드를 탈 파라핀화와 수화를 거친 다음 citrate buffer (0.01 M, pH 6.0)

상에서 전자레인지로 최고출력으로(700W 이상) 5분간 두 번 antigen retrieval을 실시하였다. PBS하에서 슬라이드를 충분히 식힌 후 3% hydrogen peroxide 용액에서 5분간 반응하여 endogenous peroxidase를 제거하였다. 이후 PBS로 5분간 3번 씻어 준 다음 PBS에 희석된 rabbit polyclonal thymosin β 4 항체(ALPCO Diagnostics)를 1:2,000 희석비율로 혹은 CD133 항체(Abcam Inc.)를 1:100 희석비율로 4°C에서 overnight 배양하였다. 다음날 PBS로 5분간 세 번 씻어 준 Alexa Fluor 546 anti-mouse antibody와 Alexa Fluor 488 anti-rabbit antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 1시간 배양한 후 confocal laser-scanning microscope로 관찰한다.

결 과

위 조직에서 thymosin β 4의 발현은 주로 위선(stomach gland)에서 발현되는 것으로 관찰되었으며 특히 상피부분보다 내피의 깊은 선조직에서 강하게 발현되고 있었다(Fig. 1A, B). CD133의 발현 역시 티모신 베타4와 매우 유사한 발현 형태를 나타내고 있었으며 위선 중에서도 deep gland에서 강하게 발현되는 양상을 나타내고 있었다(Fig. 1C, D). 티모신 베타4

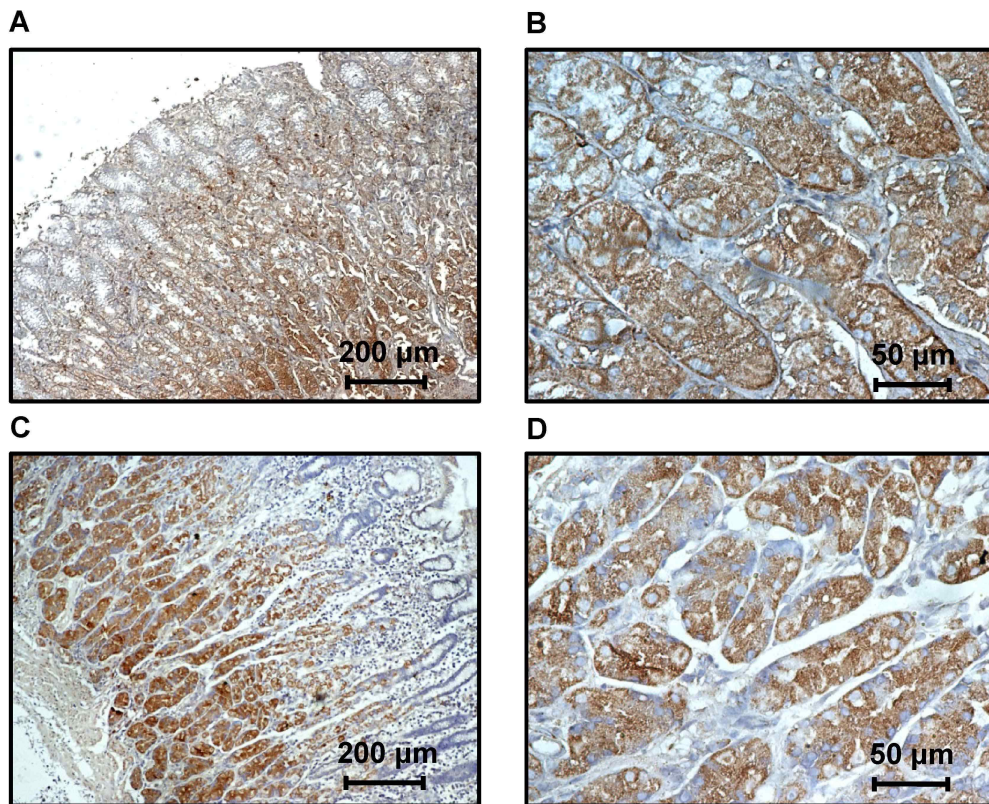


Fig. 1. Expression of T β 4 and CD133 in normal stomach. Expression patterns of T β 4 (A, B) and CD133 (C, D) were analyzed by immunohistochemical staining. Tissue slides were immunostained with mouse monoclonal antibody to T β 4 (1:100) or rabbit polyclonal antibody to CD133 (1:100). After primary antibody incubation, slides were incubated with secondary antibodies and detected with Dako's EnVision Kit. Original magnification X 200 (A, C) and X 400 (B, D).

와 CD133의 발현양상을 두 가지 항체를 동시에 사용한 형광면역 염색법을 사용하여 조사한 결과 두 가지 단백질이 위선을 중심으로 같은 부위에서 발현되고 있음을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2) 이러한 결과를 통해 일반 위 조직에서 thymosin β 4와 CD133이 밀접한 연관관계가 있음을 추정할 수 있었다.

고 찰

최근 암 줄기세포의 이론이 등장하면서 암의 악성화, 재발 및 전이를 이해하기 위한 새로운 관점이 도입되었다. 암 조직 속에 존재하는 소량의 암 줄기세포가 실제로 항암제 내성을 지니며 암의 전이를 주도하는 세포로 작용하며 외과적 절제 및 항암치료에서 살아남은 소량의 암 줄기세포가 암의 재발 및 전이를 일으켜 생명을 앗아간다는 이론이 제기되었다[25]. 이러한 암 줄기세포는 특이한 암 줄기세포의 표식자를 지니고 있는데 CD133은 가장 널리 알려진 대표적인 암 줄기세포의 표식자이다[2,16,22,28]. 최근 보고에 의하면 대장암 조직에서 CD133을 지닌 대장암 줄기세포를 선택적으로 분리하였을 때 이러한 대장암 줄기세포에서 티모신 베타4의 발현이 일반 대장암에 비해 현저하게 높아지며 thymosin β 4가 암의 성장 및 악성화에 중요한 역할을 담당하는 것이 관찰되었다[17]. 또한 antisense RNA를 통해 티모신 베타4의 발현을 억제하였을 때 대장암 줄기세포의 성장 및 이동이 현저하게 감소되는 것이 관찰 되었다[17].

CD133은 암 줄기세포의 마커로 알려지기 이전 정상 줄기세포의 마커로 더 잘 알려져 있었다. 조혈모세포(hematopoietic stem cells)[14,27], 혈관 전구세포(endothelial progenitor cells)[3], 신경 및 신경교 줄기세포(neuronal and glial stem cells)[20]의 대표적인 표식자로 알려진 CD133은 줄기세포의 특징을 나타내는 중요한 인자로 줄기세포와 암 줄기세포 모두에서 중요한 역할을 담당하며 줄기세포의 암화에 의한 암 줄기세포화에도 관련이 있을 가능성을 가지고 있다. Thymosin β 4 역시 암 조직 외의 일반 조직에서도 몇몇 특정 부위에서 강하게 발현되고 있고[9] 혈관 신생 및 면역세포의 염증 반응 등 줄기세포가 필요한 부위에서 특이하게 발현되고 있다. 따라서 암 조직에서 CD133과 thymosin β 4의 연관성 외에 정상 조직에서의 연관성도 함께 고찰되어야 하며 이러한 연구가 CD133과 thymosin β 4의 상관관계를 입증하는 중요한 연구가 될 수 있다. 본 논문에서는 정상 위 조직에서 thymosin β 4와 CD133의 발현현상을 조사하고 연관관계를 규명하여 정상조직에서의 thymosin β 4와 CD133의 관련성을 조사하였다.

본 연구결과에 의하면 CD133과 thymosin β 4 모두 깊은 부분의 선조직(deep gland)에서 강하게 발현되었고 두 단백질이 많은 부분에서 동시에 위치하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 표피의 선조직에 비해 미분화된 내피 깊은 곳의 선조직에서 줄기세포의 마커인 CD133과 thymosin β 4가 함께 선조직의 분화 및 성장에 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 또한 대부분 위암의 발생이 이러한 선조직을 중심으로 이루어지는 점을 생각할 때 thymosin β 4 및 CD133이 위암의 발생과도 상관이 있을 가능성을 제시해 주고 있다. 하지만 이러한 CD133과 thymosin β 4의 관련성과 기능을 입증하기 위해 보다 구체적인 연구가 필요하다고 할 수 있다.

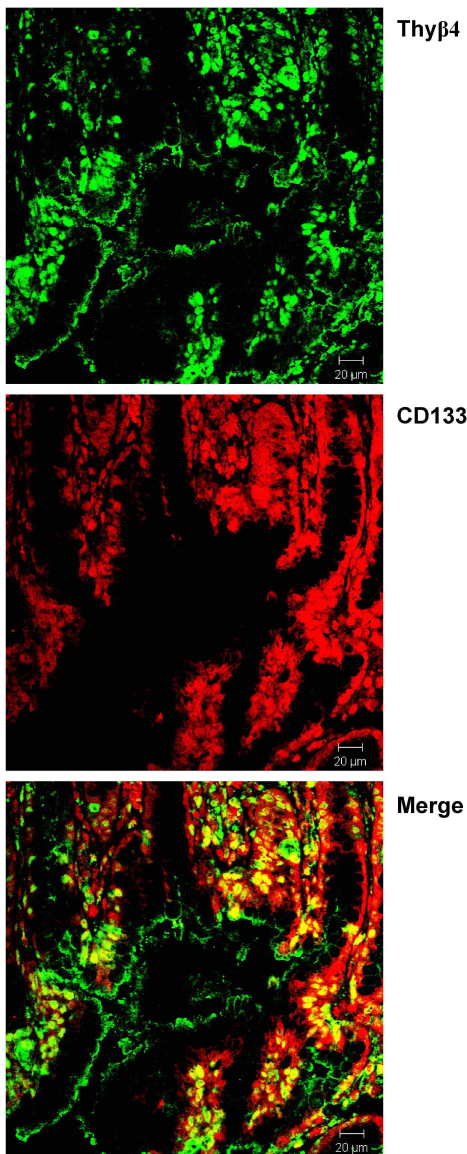


Fig. 2. Co-localization of T β 4 and CD133 in normal stomach. Localization of T β 4 and CD133 in normal stomach were analyzed by immunofluorescence staining with double antibodies. Tissue slides were immunostained with mouse monoclonal antibody to T β 4 (1:100) and rabbit polyclonal antibody to CD133 (1:100). After primary antibody incubation, slides were incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 546 anti-mouse antibody and Alexa Fluor 488 anti-rabbit antibodies). The slides were observed for epifluorescence with the use of a confocal laser-scanning microscope.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(KRF-20090066740).

References

1. Cha, H. J., Jeong, M. J. and Kleinman, H. K. 2003. Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1674-1680.
2. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. and Maitland, N. J. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* **65**, 10946-10951.
3. Corbeil, D., Roper, K., Hellwig, A., Taviani, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W. and Huttner, W. B. 2000. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J. Biol. Chem.* **275**, 5512-5520.
4. Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C. and De Maria, R. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* **15**, 504-514.
5. Grant, D. S., Rose, W., Yaen, C., Goldstein, A., Martinez, J. and Kleinman, H. 1999. Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis* **3**, 125-135.
6. Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J. and Heeschen, C. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Stem Cell* **1**, 313-323.
7. Iguchi, K., Usami, Y., Hirano, K., Hamatake, M., Shibata, M. and Ishida, R. 1999. Decreased thymosin beta4 in apoptosis induced by a variety of antitumor drugs. *Biochem Pharmacol.* **57**, 1105-1111.
8. Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Boing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H. and Muller-Tidow, C. 2003. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* **22**, 8031-8041.
9. Jo, J. O., Kang, Y. J., Ock, M. S., Kleinman, H. K., Chang, H. K. and Cha, H. J. 2011. Thymosin beta4 expression in human tissues and in tumors using tissue microarrays. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **19**, 160-167.
10. Kobayashi, T., Okada, F., Fujii, N., Tomita, N., Ito, S., Tazawa, H., Aoyama, T., Choi, S. K., Shibata, T., Fujita, H. and Hosokawa, M. 2002. Thymosin-beta4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells. *Am J. Pathol.* **160**, 869-882.
11. Larsson, L. I. and Holck, S. 2007. Occurrence of thymosin beta4 in human breast cancer cells and in other cell types of the tumor microenvironment. *Hum. Pathol.* **38**, 114-119.
12. Low, T. L. and Goldstein, A. L. 1982. Chemical characterization of thymosin beta 4. *J. Biol. Chem.* **257**, 1000-1006.
13. Malinda, K. M., Sidhu, G. S., Mani, H., Banaudha, K., Maheshwari, R. K., Goldstein, A. L. and Kleinman, H. K. 1999. Thymosin beta4 accelerates wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 364-368.
14. Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K. and Buck, D. W. 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**, 5013-5021.
15. Philp, D., Nguyen, M., Scheremeta, B., St-Surin, S., Villa, A. M., Orgel, A., Kleinman, H. K. and Elkin, M. 2004. Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J.* **18**, 385-387.
16. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. and De Maria, R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115.
17. Ricci-Vitiani, L., Mollinari, C., di Martino, S., Biffoni, M., Pilozi, E., Pagliuca, A., de Stefano, M. C., Circo, R., Merlo, D., De Maria, R. and Garaci, E. 2010. Thymosin beta4 targeting impairs tumorigenic activity of colon cancer stem cells. *FASEB J.* **24**, 4291-4301.
18. Safer, D., Elzinga, M. and Nachmias, V. T. 1991. Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* **266**, 4029-4032.
19. Safer, D., Golla, R. and Nachmias, V. T. 1990. Isolation of a 5-kilodalton actin-sequestering peptide from human blood platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2536-2540.
20. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. and Berger, M. S. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* **353**, 811-822.
21. Santelli, G., Califano, D., Chiappetta, G., Vento, M. T., Bartoli, P. C., Zullo, F., Trapasso, F., Vigiuetto, G. and Fusco, A. 1999. Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am J. Pathol.* **155**, 799-804.
22. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. and Dirks, P. B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401.
23. Steiniger, S. C., Coppinger, J. A., Kruger, J. A., Yates, J., 3rd and Janda, K. D. 2008. Quantitative mass spectrometry identifies drug targets in cancer stem cell-containing side population. *Stem Cells* **26**, 3037-3046.
24. Van Troys, M., Dewitte, D., Goethals, M., Carlier, M. F., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. 1996. The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.* **15**, 201-210.
25. Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G. and Medema, J. P. 2008. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ.* **15**, 947-958.
26. Wang, W. S., Chen, P. M., Hsiao, H. L., Wang, H. S., Liang, W. Y. and Su, Y. 2004. Overexpression of the thymosin be-

- ta-4 gene is associated with increased invasion of SW480 colon carcinoma cells and the distant metastasis of human colorectal carcinoma. *Oncogene* **23**, 6666-6671.
27. Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J. and Buck, D. W. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-5012.
28. Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., Yang, S., Zheng, S. and Gu, J. 2007. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int. J. Cancer* **120**, 1444-1450.
29. Young, J. D., Lawrence, A. J., MacLean, A. G., Leung, B. P., McInnes, I. B., Canas, B., Pappin, D. J. and Stevenson, R. D. 1999. Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat. Med* **5**, 1424-1427.

초록 : 정상 위 조직에서 thymosin β 4와 CD133의 발현 양상 분석

옥미선¹ · 차희재^{1,2*}

(고신대학교 의과대학 ¹기생충학 유전학 교실, ²의과학 연구소)

Thymosin β 4 는 대장암에서 암 줄기세포 마커인 CD133을 지닌 세포에서 지니지 않은 세포에 비해 강하게 발현된다고 보고되어 있다. 본 연구에서는 thymosin β 4와 줄기세포 마커인 CD133의 상관관계를 정상 위 조직에서 관찰하였다. Thymosin β 4와 CD133의 발현 양상은 tissue microarray 조직상에서 면역화학적 방법으로 관찰하였으며 thymosin β 4와 CD133의 존재 위치는 면역형광 염색법 및 confocal microscope를 사용하여 조사하였다. Thymosin β 4와 CD133은 동일한 양상으로 발현되었으며 모두 위의 선조직에서 강하게 발현되었다. 면역형광 염색법으로 두가지 단백질을 동시에 염색한 결과 두 단백질이 동일한 위치에서 함께 존재하는 것으로 규명되었다. 이러한 결과는 thymosin β 4와 CD133은 정상위의 선조직에서 발현되며 두 단백질의 발현 양상 및 위치가 동일하여 서로 긴밀한 상호작용을 할 가능성을 제시하고 있다.