

Anti-inflammatory Effect of Conditioned Medium From an Immortalized Adipose-derived Stem Cell Line by SV40 T Antigen

Ye Jin Lee, So Yeong Lee, Min Gyeong Jeong, Seong Moon Park and Dong Wan Kim*

Department of BioHealth Sciences, college of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received January 22, 2024 /Revised February 1, 2024 /Accepted February 5, 2024

Adipose-derived stem cells (ADSCs) are capable of differentiation into multiple lineages of cells, which has attracted attention for clinical therapy. However, ADSCs have poor proliferation capacity and a short life span in culture, which is an impediment in the application to clinical use. Previously, to overcome growth disadvantages, we had established an immortalized ADSC line (ADSC-T) by introducing the SV40 T antigen coding gene into primary human ADSC. In the present study, we evaluated the differentiation potential of this cell line and assessed the anti-inflammatory effect of its conditioned medium (CM). ADSC-T appeared to maintain the differentiation potential into adipocyte and chondrocyte. The CM of ADSC-T suppressed the NF- κ B activity and its target gene expression of COX-2 and iNOS. Furthermore, the phosphorylations of MAPKs, including ERK, JNK and p38, were suppressed by the ADSC-T CM. The expressions of pro-inflammatory cytokines such as TGF- β , TNF- α , IL-6, and IL-13 were also suppressed by the CM of ADSC-T. In the Nc/Nga atopic model mice, the CM showed therapeutic effect on DNCB-induced atopic dermatitis. These results indicate that the immortalized ADSC-T maintains the beneficial properties of primary ADSC and could be a versatile cell source for not only research into ADSC but also for production of CM suitable for clinical application.

Key words : Adipose-derived stem cell, anti-inflammation, conditioned medium, differentiation, immortalization

서 론

지방줄기세포(adipose-derived stem cells, ADSCs)는 비정상적인 인체 면역상태를 정상화시킬 수 있는 다양한 cytokine과 성장인자를 분비하는 것으로 알려져 있으며 면역과민반응에 의한 난치성 염증 질환인 아토피피부염, 천식, 류마티스 관절염 등에 우수한 효능이 있는 것으로 밝혀져 ADSC를 활용한 염증 치료제 개발연구가 주목받고 있다[13, 22, 26]. 현재의 줄기세포 치료제 연구의 세계적인 동향은 줄기세포 효능을 극대화하기 위하여 효능물질 생산 증가를 위한 배양 공학적 연구, 세포의 유전학적, 분자생물학적 개조를 통한 치료효과 향상 등이 주로 연구되고 있다[5, 12, 14, 31]. ADSC의 항염증 효능은 ADSC가 분비하는 분비물(secretome) 내에 함유된 물질에 의한 것

으로 추정된다. 그러므로 ADSC를 배양하여 생산한 배양상등액을 염증 부위에 도포하였을 경우 우수한 항염증 효과가 나타나는 것으로 알려져 있으며[3, 8, 18] 이러한 이유로 ADSC의 배양액에 함유된 분비물(secretome)을 염증치료제로 활용하고자 하는 연구가 지방줄기세포의 새로운 연구 분야로 부각되고 있다[2, 29, 30]. 현재의 지방줄기세포의 수급은 환자 본인의 지방조직에서 분리하거나 성형외과에서 비만치료를 목적으로 흡입하여 폐기되는 흡입지방을 환자의 동의를 얻어 수거하여 줄기세포를 분리하여 사용한다. 그러나 ADSC는 세포의 증식속도가 느리고 세포의 수명이 짧아 공여자로부터 반복적인 채취가 필요하고, 폐기되는 지방조직에서 세포를 분리하여 사용하기에는 세포의 수가 매우 부족한 상황이며, 다수의 공여자로부터 흡입한 지방조직을 모아서 사용할 경우 세포성질의 차이, 바이러스 등 질병 전염의 위험성, 윤리적 문제 등으로 세포수급에 많은 문제점을 가지고 있다[28]. 이러한 세포수급의 문제로 인하여 기초연구를 위해 다수의 공여자로부터 채취한 ADSC를 이용할 경우 세포성질의 개인적 차이로 인하여 연구결과의 일관성이 없고[6, 15], 세포의 부족으로 인해 ADSC의 약리기전에 대한 기초 연구는 충분히 이루어지지 않고 있으며, 이로 인해 ADSC를 활용한 치료제의 개발도 지연되고 있는 실정이다

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3482, Fax : +82-55-213-3489

E-mail : dwkim@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다. 본 연구팀은 선행연구에서 이러한 ADSC 세포수급 문제를 해결하기 위해 ADSC에 simian virus 40 (SV40)의 T항원 유전자를 도입하여 불사화(immortalization)시킨 지방줄기세포주를 개발하여 ADSC-T라 명명하였으며, 이 세포주가 primary ADSC에 비해 증식속도가 향상되고 세포수명이 연장되었음을 보고한 바 있다[10, 11]. 본 연구에서는 ADSC-T의 분화능력을 검토하여 지방줄기세포주로서의 이용가치를 판정하고, ADSC-T를 혈청이 첨가되지 않은 무혈청 배지로 배양하여 생산한 무혈청 배양상등액 (serum-free conditioned medium)의 항염증 효능을 검토하여 염증치료제 및 화장품의 원료로 활용할 수 있는 근거를 마련하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 transfection

원숭이의 신장세포인 COS-7 세포와 RAW 264.7 macrophage 세포를 Fetal bovine serum (FBS)이 10% 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였으며, FBS와 DMEM배지는 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)제품을 사용하였다. 세포에 plasmid DNA를 도입하기 위한 transfection은 FuGENE6 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용한 lipofection 방법으로 하였으며 sample 당 10~20 µg의 DNA를 serum free DMEM과 FuGENE6의 혼합액에 섞고 실온에서 20분간 반응시켜 lipid와 DNA의 복합체를 형성시킨 다음 recipient cell에 적하하고 배양하였다. recipient 세포는 70~80%의 밀도로 배양된 것을 사용하였다.

지방세포(adipocyte) 분화 및 Oli Red O 염색

10%의 FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한 ADSC-T 세포를 지방세포 분화 유도 배지로 교환하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3일간 배양한 후 지방세포 분화 유지 배지로 교환하여 15일간 배양하였다. 지방세포 분화 유도 배지는 0.5 mM IBMX (1-methyl-3-isobutylxanthine), 0.2 mM indomethacin, 5 mM dexamethasone, 10 µg/ml insulin 및 10% FBS를 포함한 DMEM이며, 지방세포 분화 유지 배지는 1 µg/ml insulin 및 10% FBS를 포함한 DMEM을 이용하였다. Oli Red O 염색은 분화시킨 세포를 10% formalin으로 Fix 한 후, 0.3% Oli Red O 용액을 투여하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다.

골세포(osteocyte) 분화 및 Von Kossa 염색

10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한 ADSC-T 세포를 골세포 분화 유도 배지로 교환하여 3일간 배양한 후 10% FBS를 함유한 DMEM 배지로 교환하여 골세포 분화를 유지하였다. 골세포 분화 유도 배지는 0.25 mM

ascorbic acid, 5 mM β-glycerol phosphate, 1 µM dexamethasone, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를 사용하였다. Von Kossa 염색은 분화된 세포를 10% formalin으로 Fix 한 후 5% silver nitrate solution을 처리하고 UV light 아래에서 30분간 방치하여 은 이온 치환반응을 유도하였다. 그 후 H₂O로 wash하여 결과를 확인하였다.

ADSC-T 세포의 무혈청 배양상등액 (serum-free conditioned medium) 생산

10%의 FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 100 mm plate에 cells/ml의 세포를 투입하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 FBS가 포함되지 않은 DMEM/F12 (Gibco BRL., Grand Island, NY, USA)로 배지를 교체하여 72시간 배양한 후 배양상등액을 수거하고 0.2 µm bottle top filter (Thermo scientific)로 여과하여 conditioned medium (CM)으로 사용하였다.

Luciferase assay

Luciferase activity를 측정하기 위하여 Nano-Glo Substrate (Promega)를 Nano-Glo buffer (Promega)에 100배 희석하여 사용하였으며 cell lysate는 96-well plate에 20 µl 씩 분주하여 사용하였다. Substrate는 luminometer program (Microwin assay reader 2000, Centro LB960 Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)을 이용하여 노즐을 70% ethanol로 50회 wash하고 멸균 증류수로 50회 wash 한 후 투여하였다. 효소반응은 20 µl 씩 substrate가 분주되도록 하였으며 luciferase activity를 10초 간격으로 측정하였다.

Western blotting

시료단백질을 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 90 V로 2시간 동안 nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science, Germany)에 electrotransfer 한 뒤 5% 탈지분유를 포함한 TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 용액으로 1시간 동안 실온에서 blocking 하였다. Membrane을 1차 항체와 실온에서 2시간 반응시키고 TBS-T용액으로 3번 세척한 후 peroxidase-conjugated 2차 항체로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 TBS-T용액으로 3번 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp. Arlington Heights, IL, USA)로 발광시킨 후 Amersham Imager 600 (GE Healthcare)을 이용하여 결과를 확인하였다. 항체는 anti-actin (sc-7210), anti-COX2 (sc-376861), anti-iNOS (sc-651), anti-ERK (sc-135900), anti-p-ERK (sc-7383), anti-JNK (sc-7345), anti-p-JNK (sc-6254) (Santa Cruz Bio Technology, CA, USA), anti-p38 (#8690), anti-p-p38 (#4511) (cell signaling Technology, Inc, USA), anti-IKKβ-EE (Sigma St. Louis, Mo, USA)을 제조사의 사용법에 따라 사용하였다.

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

Gene name	Primer sequences (5' → 3')	Amplicon Length
PPAR γ -2	F:ATTCTCCTATTGACCCAGAAAGCG R:AGCTTTATCTCCACAGACACGACATT	419
Adipsin	F:CAAGCAACAAAGTCCCGAGC R:CCTGCGTTCAAGTCATCCTC	262
RUNX-2	F:CCCCACGACAACCGCACCAT R:CACTCCGGCCCAAAATC	289
Osteopontin	F:CTAGGCATCACCTGTGCCATAACC R:CAGTGACCAGTTCATCAGATTTCAT	373
TGF- β	F:GCCCTGGACACCAACTATTG R:CGTGTCCAGGCTCCAAATG	168
TNF- α	F:GAAAGTCAGCCTCCTCTCCG R:CTCCAAAGTAGACCTGCCCG	194
IL-6	F:GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG R:GAAACCATCTGGCTAGGTAACA	412
IL-13	F:CCTGGCTCTTGCTTGCCCTT R:GGTCTTGIGTGATGTTGCTCA	116
GAPDH	F:GGGCTGCTTTAACTCTGG R:TGGCAGGTTTTCTAGACGG	702

F : Forward, R : Reverse

RT-PCR

세포를 Trizol (Ambion, CA, USA)용액으로 처리하여 total RNA를 분리한 후 Accupower Roketscript cycle RT pre-mix (Bioneer Corp. Korea)을 이용하여 cDNA를 제작하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 3분 동안 predenature 하고, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 35 cycle 거친 후, 72 $^{\circ}$ C 10분으로 완료하였다. RT-PCR의 결과는 2.5% agarose gel로 전기영동하여 확인하였다. 사용한 primer는 Table 1과 같다.

통계처리

실험은 3회 반복하였고. 결과는 Graphpad prism 5를 이용하여 평균(mean)표준편차(SD)로 나타내었다. one way ANOVA와 T-test를 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다. p값이 0.05 이하면 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

ADSC-T 세포의 지방세포(adipocyte) 분화

Primary ADSC 세포에 SV40의 T 항원 유전자를 도입하여 증식속도를 높이고 세포의 수명을 연장시킨 ADSC-T 세포가 줄기세포의 성질을 유지하고 있는지 확인하기 위하여 줄기세포의 가장 중요한 특징인 분화능력을 검토하였다. ADSC는 중간엽줄기세포로서 지방세포(adipocyte), 골세포(osteocyte), 연골세포(chondrocyte) 등 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다[23]. 이러한 분화능력은 줄기세포의 가장 중요한 필수기능이라 할 수 있다. 먼저

지방세포 분화능력을 검토하기 위하여 지방세포 분화 유도 배지에서 3일간 배양한 결과 ADSC-T의 세포 내에 지방립이 형성되는 것을 현미경으로 관찰할 수 있었고, 분화 유지 배지에서 10일간 추가로 배양한 후에는 많은 양의 지방립이 형성됨을 현미경 관찰로 확인하였으며(Fig. 1B), 이는 Oil Red O 염색을 통하여 지방립임을 증명하였

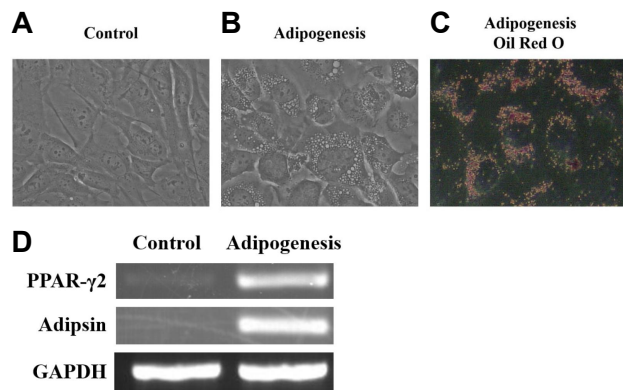


Fig. 1. Differentiation of ADSC-T into adipocyte. ADSC-T cells were cultured in DMEM (A) or adipogenic medium for 3 days and adipocyte maintenance medium for 10 days (B, C), and then the lipid droplets were photographed (magnification, $\times 100$) (B). The adipocyte-induced cells were fixed in 10% formalin and stained with 50% Oil Red O solution (magnification, $\times 100$) (C). (D) Total mRNAs of ADSC-T cells cultured with DMEM (control) or adipogenic medium were isolated and assayed by RT-PCR.

다(Fig. 1C). 반면, DMEM 배지에서 배양한 ADSC-T에는 지방립이 형성되지 않았다(Fig. 1A). 또한 지방세포 분화를 유도한 ADSC-T로부터 total mRNA를 분리하여 지방세포에서 특이적으로 생산되는 PPAR- γ 2와 Adipsin의 mRNA 양을 RT-PCR로 검토했던 결과 분화를 유도한 ADSC-T에서 다량으로 검출되어 ADSC-T는 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1D).

ADSC-T의 골세포(osteocyte) 분화

ADSC-T의 분화능력을 더욱 검증하기 위하여 골세포(osteocyte) 분화를 유도하였다. ADSC-T를 골세포 유도 배지에서 3일간 배양하여 골세포 분화를 유도하였으며 그 후 골세포 유지 배지에서 10일간 배양한 후 분화 여부 판정을 위하여 Von Kossa 염색을 실시하였다. 그 결과 분화를 유도한 ADSC-T에서 extracellular matrix의 무기질화(mineralization)가 Von Kossa 염색으로 확인되었다(Fig. 2B). 반면, DMEM에서 배양된 ADSC-T에서는 무기질화가 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 또한 골세포 분화를 유도한 ADSC-T로부터 total mRNA를 분리하여 골세포에서 특이적으로 발현되는 RUNX-2와 osteopontin의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과 분화를 유도하지 않은 control에 비하여 분화를 유도한 세포에서 많은 양의 mRNA가 발현됨을 확인하였다(Fig. 2C). 이 결과로부터 ADSC-T는 지방세포뿐만 아니라 골세포로도 분화할 수 있음을 확인하였으며, 이로부터 ADSC-T가 T항원 도입에 의해 immortalization 된 후에도 줄기세포의 중요한 기능인 분화능력을 보유하고 있음을 알 수 있었다.

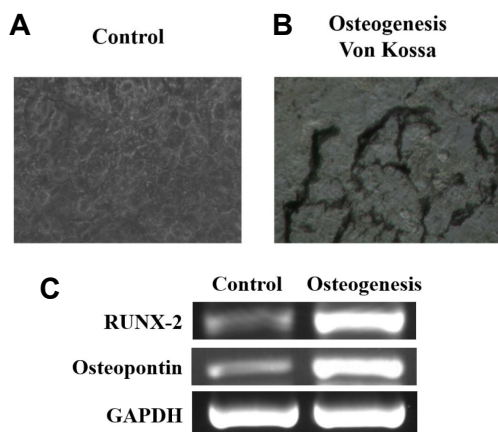


Fig. 2. Differentiation of ADSC-T into osteocyte. ADSC-T cells were cultured in DMEM (A) or osteogenic medium for 3 days and osteocyte maintenance medium for 10 days (B), and the mineralized extracellular matrix was visualized by Von Kossa staining (magnification, $\times 100$) (B). (C) Total mRNAs were isolated from ADSC-T cells cultured with DMEM (control) or osteogenic medium and assayed by RT-PCR.

ADSC-T 배양상등액(conditioned medium)의 NF- κ B 활성 억제 효과

NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) signaling pathway는 세포의 방어 기전 중의 하나로 세포 염증을 유발하는 대표적인 신호 전달 경로이다[9, 27]. NF- κ B는 inhibitor로 작용하는 I κ B와 결합하여 비활성화된 형태로 세포질에 존재하며 세포 외부로부터 염증을 유발하는 자극이 주어졌을 때 활성화된 IKK (I κ B kinase) complex로 인해 I κ B가 인산화되어 분해되면 NF- κ B가 핵 내부로 이동하여 염증을 일으키는 target 유전자에 결합하여 유전자의 전사를 촉진한다[21]. 그러나, NF- κ B의 과도한 활성화는 만성 염증을 일으키고 염증성 암의 원인이 되기도 하며 암세포의 전이를 촉진하여 암세포의 악성화를 초래하기도 한다[7]. 본 실험에서는 ADSC-T 세포를 무혈청 배지로 배양한 배양상등액(conditioned medium, CM)이 NF- κ B의 활성을 억제하는 효능을 가지는지 검토하기 위하여 pNL3.2- κ B-RE luciferase reporter plasmid (Promega, code N1111)를 이용하였다. 이는 luciferase promoter 부위에 5개의 NF- κ B 결합 부위를 가지고 있다. 또한 NF- κ B를 활성화시키기 위하여 IKK β 의 활성형 mutant인 IKK β -EE를 사용하였다. IKK β -EE는 IKK β 의 activation loop의 Ser 177과 Ser 181 부위를 glutamate로 교체시켜 NF- κ B를 활성화시키는 외부의 자극이 없어도 항상 활성화되어 I κ B를 인산화하고 NF- κ B를 활성화시킨다[20]. COS-7 세포에 reporter plasmid와 IKK β -EE 발현 plasmid를 transfection하고 24시간 후 무혈청 기본 배지인 DMEM/F12와 ADSC-T를 DMEM/F12로 배양한 무혈청 배양 상등액(CM)을 각각 50%씩 첨가하여 48시간 경과 후 luciferase assay를 실시하였다. 그 결과 Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 IKK β -EE에 의해서 NF- κ B가 활성화되었으며 DMEM/F12 기본 배지를 첨가한 경우에 비하여 CM을 첨가한 경우 luciferase 활성이 감소하여 활성화된 NF- κ B가 억제됨을 알 수 있었다. 또한 이러한 NF- κ B의 활성 억제가 NF- κ B의 저해제인 I κ B α 의 분해 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 세포 내 I κ B α 의 양을 비교한 결과 IKK β -EE에 의해 감소한 I κ B α 가 CM을 첨가한 경우 증가한 것으로 나타났다(Fig. 3B). 이러한 결과는 CM에 의한 NF- κ B의 억제가 세포 내 NF- κ B 저해 물질인 I κ B α 의 분해 억제로 인한 I κ B α 의 증가 때문인 것으로 보여지며 이는 CM에 IKK complex의 활성 저해인자가 함유되어 있을 가능성을 시사하는 것으로 보여진다.

ADSC-T CM에 의한 NF- κ B target 유전자의 발현 억제

COX-2 (cyclooxygenase-2)와 iNOS (inducible nitric oxide synthase)는 NF- κ B의 활성화에 의해 생산이 증가하는 대표적인 NF- κ B의 target gene 산물이다[25]. COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandin H2로 전환시켜 염증을 유발하며, iNOS는 L-arginine으로부터 nitric oxide (NO)의 생산을

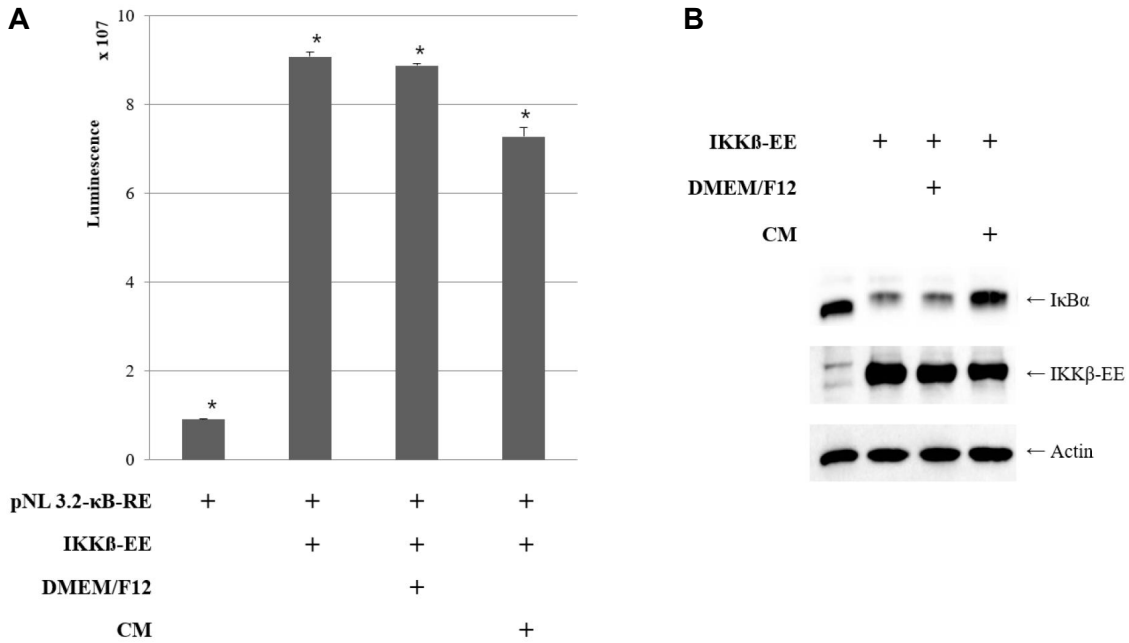


Fig. 3. Inhibition of NF-κB activity by conditioned medium of ADSC-T. COS-7 cells were co-transfected with pNL 3.2-κB-RE plasmid and IKKβ-EE expression plasmid as indicated. After 24 hr, the cells were treated with 50% DMEM/F12 or 50% conditioned medium of ADSC-T (CM) for 48 hr. NF-κB activity was estimated by luciferase assay (A) (mean SD, n=3, **p*<0.001), and proteins were detected by Western blotting (B).

축매하는 효소로서 NO에 의한 염증발생의 원인이 된다. 그러므로 COX-2와 iNOS의 억제제는 염증억제로 이어지며 염증치료의 target으로 알려져 있다[25]. ADSC-T의 CM이 NF-κB의 활성을 억제하였으므로 염증성 자극이 주어진 세포에서 ADSC-T의 CM이 COX-2와 iNOS의 발현도 억제하는지 검토하였다. Raw 264.7 macrophage 세포에 염증 유발 물질인 LPS (Lipopolysaccharide)를 농도별로 처리하고 동시에 DMEM/F12 기본 배지와 ADSC-T CM을 각각 50% 농도로 첨가하여 5시간 배양 후 COX-2와 iNOS의 발현량을 Western blotting으로 검토하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 COX-2와 iNOS 모두 LPS의 농도가

증가함에 따라 발현량이 증가하였으며, ADSC-T의 CM이 첨가된 경우 기본 배지인 DMEM/F12가 첨가된 경우에 비해 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. DMEM/F12 기본배지는 LPS의 작용에 영향을 주지 않았다 (data not shown). 이 결과로부터 ADSC-T의 CM은 NF-κB를 억제함으로써 염증을 유발하는 NF-κB의 target gene의 발현도 억제하여 항염증 작용을 할 것으로 판단할 수 있었다.

ADSC-T CM의 MAPKs 회로 억제 효과

MAPKs (ERK, JNK, p38)회로는 세포 표면에 존재하는 수용체인 TLR4 (Toll like receptor 4)로부터 자극된 신호 전달을 매개시키는 회로로서 세포 내 염증을 유발하는 각종 단백질의 생산을 촉진하는 전사인자들을 활성화시키는 것으로 알려져 있고, 이러한 MAPK 회로의 억제는 염증 치료 방안 중의 하나로 주목받고 있다[19]. 이에 따라 ADSC-T CM이 MAPKs 회로에 미치는 영향을 검토하고자 RAW 264.7 세포에 LPS를 0.25 μg/ml, 0.5 μg/ml의 농도로 처리하여 염증반응을 유발시킨 뒤, DMEM/F12 기본 배지와 ADSC-T CM을 각각 50% 농도로 처리하였다. 그 결과, ERK의 경우 ADSC-T CM의 처리에 의해 ERK의 발현량에는 차이가 없었으나 ERK의 인산화(p-ERK)에 차이를 보였다. CM을 15시간 처리하였을 때 LPS에 의해 증가한 p-ERK가 감소하였으며 특히 LPS 0.25 μg/ml에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 5A). 이 결과로부터 ADSC-T CM은 ERK 회로를 억제함을 알 수 있었다. JNK의 경우도 마찬가지로

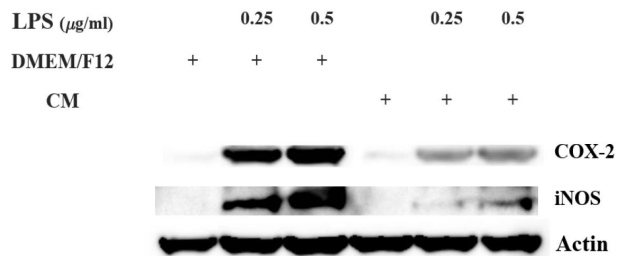


Fig. 4. Effect of conditioned medium of ADSC-T on the expression of NF-κB target genes. RAW 264.7 cells were treated with LPS and 50% DMEM/F12 or 50% conditioned medium of ADSC-T (CM) for 5 hr, and the expression level of COX-2 and iNOS was evaluated by Western blotting.

가지로 LPS에 의해 증가한 p-JNK가 CM을 15시간 처리하였을 때 감소한 것으로 나타났으며 LPS 0.5 µg/ml을 처리하였을 때 더욱 두드러진 결과를 보였고, 인산화되지 않은 JNK에는 변화가 없었다(Fig. 5B). p38의 경우도 CM을 15시간 처리한 결과 LPS에 의해 증가한 p-p38이 DMEM/F12를 처리한 것에 비해 현저하게 감소하는 것으로 나타났고 인산화되지 않은 p38에는 변화가 없었다(Fig. 5C). 이 결과로부터 ADSC-T CM은 MAPKs 회로를 억제함을 알 수 있었다.

다음은 MAPKs 회로의 활성화에 의해 발현이 증가하여 염증을 유발하는 것으로 알려진 pro-inflammatory cytokines가 ADSC-T CM에 의해 발현이 억제되는지 검토하기 위해 RAW 264.7 세포를 LPS (0.5 µg/ml)와 50%의 DMEM/F12 또는 50% ADSC-T CM으로 처리한 후 RT-PCR을 실시한 결과 LPS에 의해 mRNA 생산이 증가한 TGF-β, TNF-α, IL-6, IL-13이 ADSC-T CM에 의해 mRNA 생산이 감소한 것으로 나타나 ADSC-T CM이 pro-inflammatory cytokine의 생산을 억제하여 항염증 작용을 하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

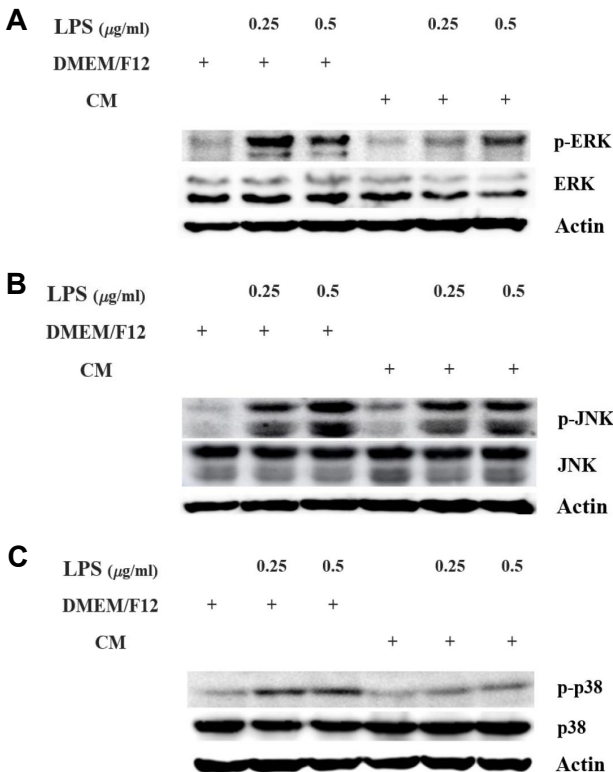


Fig. 5. Suppression of MAPKs by the conditioned medium of ADSC-T. RAW 264.7 cells were treated with 0.25 µg/ml or 0.5 µg/ml of LPS together with 50% DMEM/F12 or 50% conditioned medium of ADSC-T (CM) for 15 hr, and each protein was detected by Western blotting.

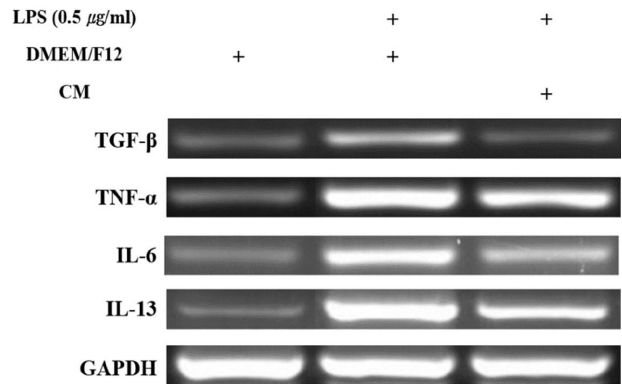


Fig. 6. Effect of conditioned medium of ADSC-T on the expression of pro-inflammatory cytokines. RAW 264.7 cells were treated with 0.5 µg/ml of LPS and 50% DMEM/F12 or 50% CM of ADSC-T for 12 hr. The mRNA levels were measured by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control.

ADSC-T CM의 아토피 치료 효과

ADSC-T CM이 염증을 유발하는 NF-κB와 MAPKs 회로를 억제하고 COX-2, iNOS 및 pro-inflammatory cytokine의 발현을 억제하는 것으로 나타났으므로 실제로 염증 질환에 치료 효과가 있는지 알아보기 위해 아토피 모델 마우스인 NC/Nga를 이용하여 아토피 피부염 치료 효과를 검토하였다[4, 22]. 실험은 아주대학교 동물실험센터에서 수행되었으며 동물실험윤리 가이드를 준수하였다(승인번호 2020-003). NC/Nga 마우스에 사람과 유사한 아토피 피부염을 유발하기 위하여 0.5% DNCB (1-chloro-2, 4-dinitrochlorobenzene)를 아세톤과 Olive oil에 섞어 제모한 마우스의 등에 매일 도포하였으며 20일 후에는 매일 DNCB 용액 도포 후 7시간 뒤에 대조군(control)으로 DMEM/F12를 도포하고 실험군(CM군)에는 ADSC-T CM을 도포하였다. 그 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 DNCB 도포 20일 후에 도포 부위에 상처의 혈액과 진물이 두꺼운 가피를 형성하여 아토피 피부염이 유발되었고 DMEM/F12를 도포한 대조군에서는 계속해서 아토피 병변이 유지되었으나 ADSC-T CM을 도포한 실험군에서는 도포 10일 후부터 가피가 벗겨지고 상처가 치유되기 시작하였으며 도포 20일 후에는 염증이 대부분 사라진 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 ADSC-T의 CM은 아토피 피부염 치료 효과가 있음을 증명할 수 있었다.

고 찰

SV40는 1960년 이전에 생산된 poliovirus 백신에 살아있는 상태로 혼입되어 전세계적으로 수천만명 이상의 인류에 투여된 바이러스이며 SV40로 오염된 백신 투여자를 수십년간 추적 관찰한 결과 SV40가 인류에 암을 비롯한

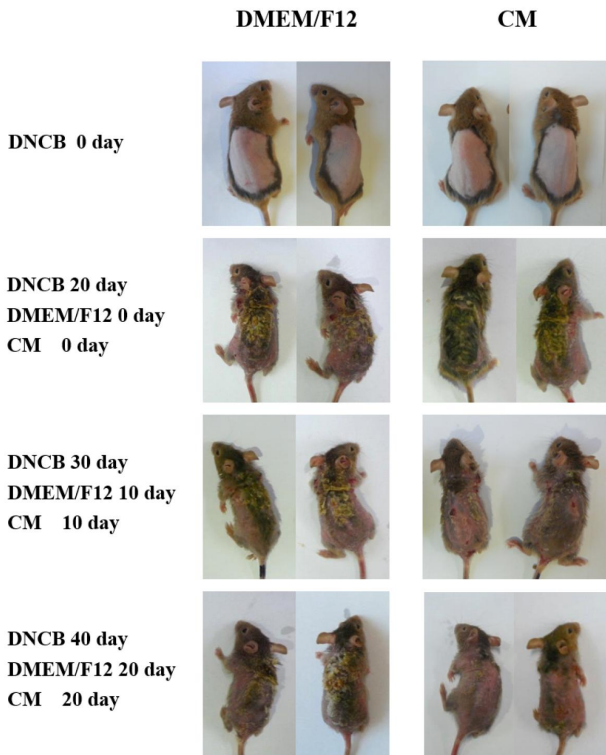


Fig. 7. Anti-atopic effect of ADSC-T conditioned medium. Nc/Nga mice were treated with 0.5% DNCB (1-chloro-2, 4-dinitrochlorobenzene) for 20 days to induce atopic inflammation and then treated with 0.5% DNCB together with DMEM/F12 or conditioned medium of ADSC-T (CM) for 20 days.

어떠한 질병을 일으킨다는 근거를 찾지 못하였다[24]. SV40가 설치류 동물에 감염될 경우 암을 일으킨다는 사실을 근거로 일부 연구자들이 석면에 노출되어 발생한 일부 중피종(mesothelioma) 환자에서 SV40가 검출되어 SV40가 발암을 촉진할 수 있다는 의문을 제시하였으나 직접적인 증거는 부족하여 SV40가 인류에 암을 일으킨다는 주장은 거의 받아들여지지 않고 있다[1, 17]. 특히 사람의 primary bone marrow mesenchymal stem cell에서 SV40는 세포의 증식을 촉진하였으나 암세포로는 전환하지 않음이 보고되었다[16]. 이러한 사실을 근거로 본 연구실의 이전 연구에서 human primary ADSC에 SV40의 T항원을 생산하는 유전자를 발현하는 plasmid를 도입하여 immortalization 된 ADSC-T 세포주가 제작되었으며[10, 11] 대부분의 암세포가 분화능력을 상실함에 반하여 ADSC-T는 줄기세포의 가장 중요한 특징인 분화능력을 보유한 정상 세포임이 본 연구에서 증명되었다.

지방줄기세포 연구의 가장 큰 장애물은 충분한 연구용 세포수급이 어려운 점과 지방 공여자에 따라 지방 줄기세포의 성질의 차이로 인한 연구결과의 차이일 것이다. ADSC-T는 빠른 증식속도와 세포수명의 연장으로 동일한

성질의 세포를 대량으로 공급이 가능하여 세포 수급 문제를 해결할 수 있으며, 앞으로 지방줄기세포의 분화 연구, 세포증식 연구, 세포치료제 연구 등 광범위한 줄기세포 연구에 활용될 수 있을 것이다. 특히 ADSC-T를 혈청이 함유되지 않은 무혈청배지로 배양하여 생산한 배양상등액(CM)이 인체에 염증을 유발하는 핵심 물질인 NF-κB를 저해하고, NF-κB의 대표적 target gene인 COX-2와 iNOS의 발현을 억제하였을 뿐 아니라 MAPKs를 구성하는 ERK, JNK, p38 모두 ADSC-T CM에 의해 인산화가 저해되는 것으로 나타나 MAPK 회로가 ADSC-T CM에 의해 억제됨이 밝혀졌으며, 세포 내 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 TGF-β, TNF-α, IL-6, IL-13의 발현이 ADSC-T CM에 의해 저해됨이 본 연구에 의해 밝혀져 ADSC-T CM은 강한 항염증 작용을 할 것으로 추정되었고, 실제로 아토피 모델인 Nc/Nga 마우스에서 아토피 치료 효과가 확인되었다. 향후 줄기세포 연구개발의 세계적 추세는 줄기세포 이식에 의한 부작용과 위험성이 없이 줄기세포 효능을 불특정 다수에게 활용하는 범용성의 확대에 나아갈 것으로 추정하고 있으며 이를 위해 줄기세포 배양액의 활용이 주목받고 있다. 이러한 관점에서 ADSC를 immortalization 시켜 만든 ADSC-T 세포주는 지방줄기세포의 연구 목적을 위한 세포의 공급뿐 아니라 높은 효능을 보유한 지방줄기세포의 배양액 생산에도 널리 이용될 수 있는 우수한 세포주라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2023-2024년도 창원대학교 지원연구비에 의해 수행된 것이며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Aoe, K., Hiraki, A., Murakami, T., Toyooka, S., Shivapurkar, N., Gazdar, A. F., Sueoka, N., Taguchi, K., Kamei, T., Takeyama, H., Sugi, K. and Kishimoto, T. 2006. Infrequent existence of simian virus 40 large T antigen DNA in malignant mesothelioma in Japan. *Cancer Sci.* **97**, 292-295.
2. Cai, Y., Li, J., Jia, C., He, Y. and Deng, C. 2020. Therapeutic applications of adipose cell-free derivatives: a review. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 1-16.
3. Carceller, M. C., Guillén, M. I., Ferrández, M. L. and Alcaraz, M. J. 2015. Paracrine *in vivo* inhibitory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in the

- early stages of the acute inflammatory response. *Cytherapy*. **17**, 1230-1239.
4. Cho, B. S., Kim, J. O., Ha, D. H. and Yi, Y. W. 2018. Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. *Stem cell Res. Ther.* **9**, 1-5.
 5. Dai, R., Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K. I. and Kim, K. 2016. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem cells int.* **2016**, 6737345.
 6. Di Taranto, G., Cicione, C., Visconti, G., Isgrò, M. A., Barba, M., Di Stasio, E., Stigliano, E., Bernardini, C., Michetti, F., Salgarello, M. and Lattanzi, W. 2015. Qualitative and quantitative differences of adipose-derived stromal cells from superficial and deep subcutaneous lipospirates: a matter of fat. *Cytherapy*. **17**, 1076-1089.
 7. DiDonato, J. A., Mercurio, F. and Karin, M. 2012. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* **246**, 379-400.
 8. Guillén, M. I., Platas, J., Perez del Caz, M. D., Mirabet, V. and Alcaraz, M. J. 2018. Paracrine anti-inflammatory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in human monocytes. *Front. Physiol.* **9**, 661.
 9. Hoessel, B. and Schmid, J. A. 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86.
 10. Kim, D. W., Seo, M. J., Lee, G., Joo, W. H. and Kim, S. H. 2014. Culture medium of adipose-derived stem cell, method for preparing the same, and composition for promoting hair growth comprising the same. *Korea patent*, 10-1422559.
 11. Kim, G. B., Joo, W. H. and Kim, D. W. 2014. Composition of a medium for serum-free culture of an adipose-derived stem cell line established with the simian virus 40 T Antigen. *J. Life Sci.* **24**, 1301-1307.
 12. Kim, M. H., Wu, W. H., Choi, J. H., Kim, J., Jun, J. H., Ko, Y. and Lee, J. H. 2018. Galectin-1 from conditioned medium of three-dimensional culture of adipose-derived stem cells accelerates migration and proliferation of human keratinocytes and fibroblasts. *Wound Repair Regen.* **26**, S9-S18.
 13. Kotani, T., Masutani, R., Suzuka, T., Oda, K., Makino, S. and Ii, M. 2017. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of intravenous adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced interstitial pneumonia. *Sci. Rep.* **7**, 14608.
 14. Lee, E. Y., Xia, Y., Kim, W. S., Kim, M. H., Kim, T. H., Kim, K. J., Park, B. S., Sung, J. H. 2009. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen.* **17**, 540-547.
 15. Lee, J., Lee, K. S., Kim, C. L., Byeon, J. S., Gu, N. Y., Cho, I. S. and Cha, S. H. 2017. Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* **18**, 141-148.
 16. Lee, K. S., Shim, J. S., Paik, M. J., Joo, W. H., Kim, S. H., Lee, G. and Kim, D. W. 2015. Characterization of a growth-elevated cell line of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by SV40 T-antigen. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **20**, 498-505.
 17. Leithner, A., Weinhaeusel, A., Windhager, R., Schlegl, R., Waldner, P., Lang, S., Dominkus, M., Zoubek, A., Popper, H. H. and Haas, O. A. 2002. Absence of SV40 in Austrian tumors correlates with low incidence of mesotheliomas. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 374-378.
 18. Li, L., Ngo, H. T., Hwang, E., Wei, X., Liu, Y., Liu, J. and Yi, T. H. 2019. Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents UVB-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 49.
 19. Ma, Z., Piao, T., Wang, Y. and Liu, J. 2015. Astragalin inhibits IL-1 β -induced inflammatory mediators production in human osteoarthritis chondrocyte by inhibiting NF- κ B and MAPK activation. *Int. Immunopharmacol.* **25**, 83-87.
 20. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B. and Rao, A. 1997. Ikk-1 and Ikk-2: Cytokine-activated ikkappa B kinase essential for NF- κ B activation. *Science*. **278**, 860-866.
 21. Mitchell, S., Vargas, J. and Hoffmann, A. 2016. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 227-241.
 22. Park, H. S., Son, H. Y., Choi, M. H., Son, Y., Kim, S., Hong, H. S. and Park, J. U. 2019. Adipose-derived stem cells attenuate atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Exp. Dermatol.* **28**, 300-307.
 23. Saeedi, P., Halabian, R. and Fooladi, A. A. I. 2019. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and modification strategies. *Stem Cell Investig.* **6**, 34.
 24. Shah, K. V. 2007. SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int. J. Cancer.* **120**, 215-223.
 25. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Res. Mol. Mech. Mutagen.* **480**, 243-268.
 26. Ueyama, H., Okano, T., Orita, K., Mamoto, K., Ii, M., Sobajima, S., Iwaguro, H. and Nakamura, H. 2020. Local transplantation of adipose-derived stem cells has a significant therapeutic effect in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* **10**, 3076.
 27. Vallabhapurapu, S. and Karin, M. 2009. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 693-733.
 28. Varghese, J., Griffin, M., Mosahebi, A. and Butler, P. 2017. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 1-15.
 29. Yang, D., Wang, W., Li, L., Peng, Y., Chen, P., Huang, H., Guo, Y., Xia, X., Wang, Y., Wang, H., Wang, W. E. and Zeng, C. 2013. The relative contribution of paracrine

- effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS ONE*. **8**, e59020.
30. Yano, F., Takeda, T., Kurokawa, T., Tsubaki, T., Chijimatsu, R., Inoue, K., Tsuji, S., Tanaka, S. and Saito, T. 2022. Effects of conditioned medium obtained from human adipose-derived stem cells on skin inflammation. *Regen. Ther.* **20**, 72-77.
31. Zhou, S., Wang, Y., Zhang, K., Cao, N., Yang, R., Huang, J., Zhao, W., Rahman, M., Liao, H. and Fu, Q. 2020. The fabrication and evaluation of a potential biomaterial produced with stem cell sheet technology for future regenerative medicine. *Stem Cells Int.* **2020**, 9567362.

초록 : SV40의 T항원으로 불사화한 지방줄기세포주로부터 생산한 배양액의 항염증 효능

이예진 · 이소영 · 정민경 · 박성문 · 김동완*
(창원대학교 생명보건학부)

지방줄기세포는 다양한 세포로 분화할 수 있어서 세포치료제로 주목받고 있으나 세포 증식 속도가 느리고 세포의 수명이 짧아 임상 적용에 어려움이 있다. 본 연구팀은 선행연구에서 지방줄기세포의 증식속도를 향상시키고 세포 수명을 연장시키기 위해 SV40의 T항원 유전자를 사람의 ADSC에 도입하여 불사화시킨 ADSC 세포주를 제작하였으며 ADSC-T라고 명명하였다. 본 연구에서는 ADSC-T 세포의 분화능력을 검증하고, ADSC-T 세포를 배양하여 획득한 무혈청 배양액의 항염증 효능을 평가하였다. 그 결과, ADSC-T 세포주는 지방세포와 골세포로 분화할 수 있는 능력을 보유하고 있어 줄기세포의 가장 중요한 특징인 분화능력을 유지하고 있음을 알 수 있었다. 또한 ADSC-T의 배양액은 염증을 유발하는 NF-κB의 활성을 억제하였고, NF-κB의 표적 유전자인 COX-2와 iNOS의 발현도 억제하였다. 또한 ADSC-T 배양액은 ERK, JNK, p38의 인산화를 저해하여 세포 내 염증 유발 신호 전달 회로인 MAPKs 회로를 억제하는 것으로 나타났다. 염증을 유발하는 cytokine인 TGF-β, TNF-α, IL-6, IL-13의 발현도 억제하는 효과를 보여 강한 항염증 효능이 있을 것으로 추정되었다. 실제로, 아토피 모델 쥐인 Nc/Nga 마우스를 DNCB로 처리하여 아토피 피부염을 유발한 뒤 ADSC-T 배양액을 도포한 결과 강한 치료 효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터, 불사화된 ADSC-T 세포주는 지방줄기세포의 장점과 효능을 유지하고 있으며 향후 지방줄기세포의 세포 수급 문제를 해결할 수 있을 뿐 아니라 임상 적용이 가능한 배양액의 생산에도 널리 이용될 수 있을 것으로 사료된다.