



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

Quantum dot 기반 CD44, CD24,  
Aldehyde dehydrogenase 1 동시관찰을 통한  
벤조피렌 유도 암 줄기세포 검출

Quantum dot-based Concurrent Monitoring of CD44,  
CD24, and Aldehyde dehydrogenase 1 for the  
Diagnosis of Benzo[a]pyrene-induced  
Breast Cancer Stem Cell

2015년 8월

서울대학교 대학원  
약학과 약품분석학전공  
심 유 미

Quantum dot 기반 CD44, CD24,  
Aldehyde dehydrogenase 1 동시관찰을 통한  
벤조피렌 유도 암 줄기세포 검출

Quantum dot-based Concurrent Monitoring of CD44,  
CD24, and Aldehyde dehydrogenase 1 for the  
Diagnosis of Benzo[a]pyrene-induced  
Breast Cancer Stem Cell

지도교수 송 준 명

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2015년 5월

서울대학교 대학원  
약학과 약품분석학전공  
심 유 미

심유미의 약학석사학위논문을 인준함

2015년 6월

위 원 장	<u>박 정 일</u>	(인)
부 위 원 장	<u>권 성 원</u>	(인)
위 원	<u>송 준 명</u>	(인)

## 국 문 초 록

암 줄기세포 가설은 이전부터 많은 연구가 진행되어 왔다. 암 줄기세포는 암 치료에 있어서 많은 관심을 받아왔다. 그 이유는 암 줄기세포가 약물, 방사선에 저항성이 있기 때문이다.

본 연구에서는 MCF-7으로부터 벤조피렌에 의해 유도된 암 줄기세포를 정량적으로 관찰하였다. 유방암 줄기세포는 MCF-7세포에서 마그네틱 비드를 사용해 얻었으며 하이콘텐트 방법으로 관찰하였다. 암 줄기세포 정량과 검출의 정확성을 높이기 위해 AOTF, Quantum dot (Qdot)을 사용하였다. 또한 carcinogen으로 잘 알려진 벤조피렌을 처리해 암 줄기세포 증가를 정량적으로 관찰하였다.

벤조피렌의 농도는  $0.2\ \mu\text{M}$ ,  $2\ \mu\text{M}$ ,  $5\ \mu\text{M}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ 을 처리했고 24시간동안 처리하였다. 세 가지 마커로 검출한 암 줄기세포의 양은 control 부터 순서대로  $0.35\pm 0.032\%$ ,  $0.45\pm 0.038\%$ ,  $0.55\pm 0.075\%$ ,  $1.02\pm 0.28\%$ ,  $1.19\pm 0.27\%$ 였다. 벤조피렌 농도가 증가함에 따라 암 줄기세포 수가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

암 줄기세포 증가의 원인은 벤조피렌에 의한 BPDE-DNA adduct 형성에 의한 돌연변이일 것이다. 이것을 확인해 보기 위해 벤조피렌 처리 후 DNA를 추출한 뒤 BPDE-DNA adduct 농도를 측정하였다. 앞선 논문과 비교해 돌연변이가 일어나기 충분한 농도임을 확인하였다. 본 연구는 벤조피렌이 세포에서 BPDE-DNA adduct를 형성해 돌연변이가 일어나게 함을 관찰하였다. 또한 이 돌연변이가 암 줄기세포를 증가하게 하는 것을 확인했다.

기존에 많이 사용하던 방법인 FACS와 비교했을 때 Qdot은 과장의 겹침을 줄여주는 장점이 있다. AOTF는 단과장만 선택하게 하는

filter로 파장 겹침을 줄여준다. FACS로 암 줄기세포를 검출했을 때와 비교했을 때 AOTF, Qdot을 사용한 본 실험 결과와 큰 차이가 없었다.

### 주요어

암 줄기세포, BPDE-DNA adduct, 하이콘텐트, Quantum dot, AOTF

학번: 2013-23464

# 목 차

국문초록 .....	i
목 차 .....	iii
List of Figures .....	iv
List of Tables .....	v
I. 서 론 .....	1
II. 실 험 .....	3
1-1. 세포 배양 .....	3
1-2. 벤조피렌 처리 .....	3
1-3. 마이크로 비드를 이용한 세포 분리 .....	3
1-4. 양자점-항체 결합 및 imaging cytometry .....	4
1-5. 유세포 분석법 .....	5
1-6. BPDE DNA 부가물 .....	5
III. 결 과 .....	9
1. 유방암 줄기세포 관찰 .....	9
2. 유세포 분석법 .....	10
3. MCF-7세포에서 BPDE-DNA 부가물 형성 .....	14
IV. 고 찰 .....	16
V. 결 론 .....	22
VI. 참고문헌 .....	23
Abstract .....	25

## List of Figures

그림 1. 암 줄기세포 검출 도식 .....	7
그림 2. CD44, CD24, ALDH1의 동시 검출을 이용한 유방암 줄기세포 관찰 .....	8
그림 3. 유세포 분석기를 통한 벤조피렌 유도 암 줄기세포 증가의 관찰	13
그림 4. BPDE-DNA 부가물의 UV스펙트럼 .....	15

## List of Tables

표 1. 암 줄기세포 비율과 벤조피렌에 의해 유도된 암 줄기세포 비율 ..	12
표 2. BPDE-DNA 부가물의 흡광도 및 농도 .....	15



# I. 서론

초기에 진단이 된 유방암의 90%는 거의 완치가 된다. 하지만 후기에 진단이 된 경우에는 완치가 어렵다. 특히 유방암의 경우는 수술 후에도 재발하는 경우가 많고 후기로 갈수록 재발률이 증가한다. 유방암은 0기에서 3기로 총 네 단계로 나눌 수 있는데 각각의 재발률은 0.5%, 1.5%, 20~25%, 60%로 증가하는 것을 볼 수 있다. 따라서 암의 재발은 암 치료에서 중요한 위험요소중 하나라고 볼 수 있다. 최근 암 줄기세포는 항암 치료방법 중 하나로 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>1</sup> 암 줄기세포가 암을 예방하고 치료하는 방법으로서 대두되고 있다.

암 유발의 전통적인 모델은 stochastic 모델로 기관의 어느 세포들이나 돌연변이 등을 통해 암이 될 수 있다는 가설이다. 이 가설에 의하면 암의 모든 세포는 암유발의 잠재력을 가지고 있다. 반면에 hierachical 모델은 암을 일으킬 수 있는 잠재력을 가진 세포는 조직의 줄기세포나 전구 세포 같은 극히 일부라고 정의 내린다. 이 모델에 의하면 이러한 세포들이 잘 조절되던 자가 분화 기작이 망가져 암을 유발한다고 설명한다.<sup>2, 3</sup> 최근 유방암 연구에서 CD44 양성, CD24 음성, Lin 음성인 세포를 분리하였다. 암에서 이러한 세포는 약 200개정도 보이고 나머지 20000여개 세포에서는 이러한 표현형이 보이지 않았다. 이 결과는 소수의 세포가 암을 유발 시킬 수 있다는 것을 뒷받침 해준다. 또한 암 줄기세포는 약물저항성, 방사선 저항성, 오랫동안 증식할 수 있는 특성을 가졌다. 이러한 특성이 암 치료를 어렵게 하며 치료 후에도 남아 있는 암 줄기세포에 의해 암이 재

발 될 수 있는 것이다.<sup>4-7</sup>

벤조피렌은 담배연기나 탄 음식 등에 포함된 발암물질 중 하나이다. 벤조피렌은 그 자체로 발암물질의 역할을 하지 않는다. 체내에 들어가 Benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)로 산화되면 발암물질의 역할을 하게 된다. 이 BPDE는 DNA의 구아닌 염기와 반응해 부가물을 형성한다. 형성된 BPDE-DNA 부가물은 돌연변이를 유발에 암을 형성하게 된다.<sup>8-10</sup> 최근 여성의 흡연율은 증가하고 있고 흡연률 증가에 따라 이러한 발암물질에 노출되는 확률이 증가하고 있다.<sup>11-12</sup> 지금까지 벤조피렌에 의한 DNA 돌연변이는 많이 연구가 되었지만 벤조피렌과 암 줄기세포와의 상관관계에 관한 연구는 진행되지 않았다.

이번 연구에서는 벤조피렌에 의해 유도된 지방암 줄기세포를 관찰하였다. 벤조피렌을 농도별로 처리해 증가하되는 암 줄기세포를 확인하였다. 지방암 줄기세포의 마커로 알려진 CD44, CD24, Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)을 Quantum dot을 기반으로 한 Hyper-multicolor cellular imaging을 통해 동시에 관찰하였다. 기존의 방법인 유세포 분석방법은 bandpass filter를 통해 동시관찰 하였는데 이번 방법은 acousto-optical tunable filter (AOTF)를 사용해 단파장만 분석하여 정확도를 높였다. 이를 통해 false-positive error율을 낮춰 암 줄기세포 검출의 정확도를 높였다.

## II. 실험

### 1-1. 세포 배양

유방암세포인 MCF-7은 한국 세포주은행에서 공급받은 것을 사용하였다. 배지 조성은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 11995-073, Gibco), 5 mg/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, 10 mg/mL neomycin (PSN; 15640-055, Gibco)을 혼합하여 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 1-2. 벤조피렌 처리

벤조피렌을 처리하기 전에 세포를 log phase까지 배양한다. 그 후 세럼과 항생제가 없는 배지로 갈아서 6시간동안 배양한다. 벤조피렌은 DMSO에 녹여 1 mM로 만들고 이를 희석하여 0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, and 10  $\mu$ M로 세포에 하루 동안 처리한다. 최종 DMSO농도는 0.1% 미만이 되도록 처리한다.

### 1-3. 마이크로 비드를 이용한 세포 분리

암 줄기세포의 마커중 하나는 CD44이다. MCF-7 세포에서 암 줄기세포를 분리하는데 이 마커를 사용해 CD44 양성 세포를 모은다. 분리 버퍼의 조성은 47.3 mL 1xPBS, 2.5 mL 10% BAS, 200  $\mu$ L 0.5 M EDTA이다. 벤조피렌을 처리한 MCF-7세포를 1xPBS로 한

번 wash하고 accutase 효소를 20분동안 실온에서 처리한다. 그 후 떼어진 세포를 모아서 230 rcf 에서 3분 동안 원심분리 한다. 원심분리 후 상층액은 제거하고 모아진 세포는 80  $\mu$ L 분리 버퍼로 풀어준다. 풀어준 뒤 다시 300 g에서 10분동안 원심분리 한다. 그 후 상층액은 버리고 모아진 세포를 20  $\mu$ L CD44 microbead solution (CD44 microbead kit human; 130-095-194, MACS Miltenyi Biotec)을 넣어 풀어준 다음 4°C에서 15분 동안 배양한다. 세포는 1 mL 분리 버퍼로 풀어주고 300 g에서 10분 동안 원심분리 한다. 원심분리 후 500  $\mu$ L 분리 버퍼를 넣어서 풀어 준 뒤 LS컬럼 (LS column; 130-042-401, MACS Miltenyi Biotec)에 넣어준다. 1 mL 분리 버퍼를 세 번 넣어 세포를 흘려보내준다. 컬럼 안에 모아진 세포는 5 mL 분리 버퍼를 넣고 시린지로 밀어서 모아준다.

#### 1-4. 양자점-항체 결합 및 imaging cytometry

CD44, CD24, ALDH1 항체를 각각 양자점 525, 565, 625와 결합시킨다. (Quantum Dot Conjugation Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 항체는 dithiothreitol(DTT)를 처리해 이황화결합을 분리한다. 그 후 maleimide-functionalized 양자점을 넣어 결합시킨다. 양자점 항체 결합체는 실온에서 1시간동안 인큐베이션 한다. 그 후 결합체에 2-mercaptoethanol을 처리해 maleimide기를 제거한다. 그 후 결합되지 않은 양자점을 제거하기 위해 컬럼으로 분리한다. 양자점-항체 결합체는 1% BSA에 1:200으로 희석해서 사용한다. 위에서 분리한 CD44 양성 세포에 4% 포름 알데히드를 처리해 고정시킨

뒤 1xPBS로 wash해준 다음 230g에서 3분간 원심분리 해서 세포만 얻는다. 얻은 세포에 0.2% 사포닌을 처리하고 위와 동일한 과정을 수행한다. 사포닌까지 처리한 세포에 양자점-항체 결합체를 1시간동안 실온에서 처리한다. 처리한 세포는 1xPBS로 wash 한 뒤 원심분리해서 세포만 얻는다. 얻은 세포는 50  $\mu$ L 1xPBS로 풀어 준 뒤 10  $\mu$ L만 취해서 1.5  $\mu$ -slide vi (1.5  $\mu$ -slide vi; ibide GmbH, Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried, Germany)에 넣고 형광 현미경과 AOTF를 통해 양자점의 형광을 관찰한다.<sup>13, 14</sup>

#### 1-5. 유세포 분석법

유세포 분석은 암 줄기세포 관찰에서 일반적으로 사용해온 방법이다. CD44와 ALDH1 양자점-항체 결합체를 사용하였다. MCF-7 세포에 벤조피렌을 농도별로 (0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) 37°C에서 하루동안 처리한다. 그 뒤 accutase를 처리해 세포를 떼어낸다. 떼어낸 세포는 1-4의 방법과 동일하게 양자점-항체 결합체를 처리한다. 양자점-항체 결합체를 처리한 세포는 2 mL 1xPBS를 넣어 풀어준 뒤 분석에 사용한다 (FACS ARIA II; BD Bioscience).

#### 1-6. BPDE DNA 부가물

MCF-7세포에 벤조피렌을 농도별로 (0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) 37°C에서 하루 동안 처리한다. 그 후 세포로부터 DNA를 분리한다. 분리 과정은 분리 키트의 지침을 따랐다 (Blood and Cell Culture DNA Mini Kit; 13323; Qiagen). 먼저 세포는 accutase를

처리해서 단일 세포로 분리 한 뒤 lysis 버퍼를 처리한다. 그 후 proteinase를 처리 한 뒤 컬럼을 사용해 DNA를 분리한다. 그 후 isopropanol을 사용해 DNA를 침전시킨다.

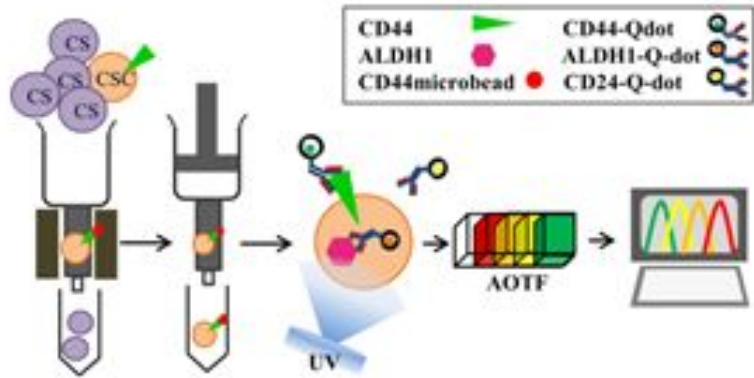


그림 1. 암 줄기세포 검출 도식

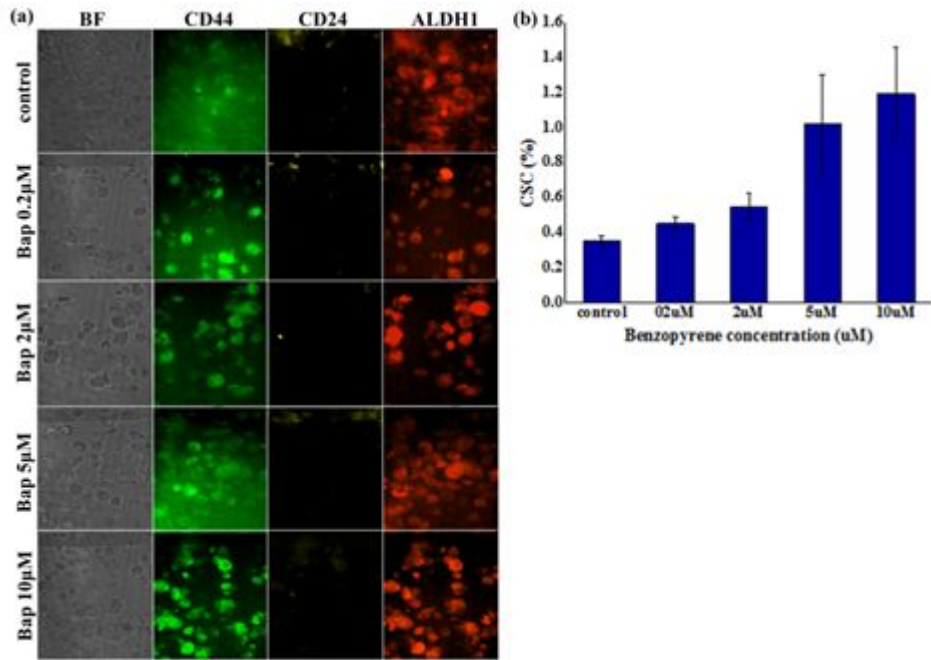


그림 2(a). CD44, CD24, ALDH1의 동시 검출을 이용한 유방암 줄기세포 관찰. 암 줄기세포는 CD44 양성, CD24 음성, ALDH1 양성  
의 표현형을 갖는다. 각각의 마커를 양자점525, 565, 625를 통해 관  
찰 하였다. 그림 2(b). 벤조피렌에 의해 증가 된 암 줄기세포.  
MCF-7세포에 벤조피렌을 농도별로 (0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  
 $\mu$ M) 처리 한 뒤 얻은 암 줄기세포를 그래프로 나타내었다. x축은  
벤조피렌 농도이고 y축은 암 줄기세포의 비율을 나타내었다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 유방암 줄기세포 관찰

벤조피렌이 암 줄기세포 증가에 영향을 주는지 확인하였다. 세포에 벤조피렌을 0.2  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ 을 처리한다. 유방암 줄기세포 마커는 CD44, CD24, ALDH1이다. CD44와 CD24는 세포 이동, 부착, 증식에 관여하는 세포 표면에 있는 단백질이다. ALDH1은 aldehyde 분해효소이다. 유방암 줄기세포는 CD44 양성, CD24 음성, ALDH1 양성을 보인다. 먼저 마이크로 비드를 이용해 CD44 양성인 세포를 모은다. 여기에 양자점525-CD44항체 결합체, 양자점565-CD24항체 결합체, 양자점625-ALDH1항체 결합체를 처리한다. 그 뒤 AOTF를 이용해 CD44는 525nm 에서 확인하였고 CD24는 565nm, ALDH1은 625nm에서 확인하였다. (그림 1) 그림 2(a)에서 CD44 마이크로 비드를 통해 분리된 CD44 양성 세포에서 CD44와 ALDH1에서 양성을 보이고 CD24에서는 음성이었음을 확인하였다. Control 과 벤조피렌처리 세포 모두에서 암 줄기세포가 관찰되었다. 전체 세포 중 암 줄기세포가 차지하는 비율을 계산하기 위해 hemacytometer로 마이크로 비드를 통한 분리 전 세포 수와 분리된 CD44 양성 세포 수를 세었다. 그림 2(a)에서 보듯이 분리된 CD44 양성 세포 모두 암 줄기세포로 확인 되었다. 따라서 분리된 CD44 양성 세포는 암 줄기세포라고 할 수 있다. 전체 중 암 줄기세포 비율은 CD44 양성 세포/ 전체 세포로 계산하였다. 표 1에 그 비율을 나타내었다. 정확도를 높이기 위해 같은 실험을 3번 반복하였다.

표 1에서 각 세트별 암 줄기세포 비율의 평균 값은 control에서  $0.35 \pm 0.032\%$ , 벤조피렌  $0.2 \mu\text{M}$ 은  $0.45 \pm 0.038\%$ ,  $2 \mu\text{M}$ 은  $0.55 \pm 0.075\%$ ,  $5 \mu\text{M}$ 은  $1.02 \pm 0.28\%$ ,  $10 \mu\text{M}$ 은  $1.19 \pm 0.27\%$ 였다. 벤조피렌 농도가 증가함에 따라 암 줄기세포 비율이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이 값은 그림 2(b) 그래프로 나타내었다. Control에 대비해서는  $\text{bap } 0.2 \mu\text{M}$ 은 0.1%가 증가했고,  $2 \mu\text{M}$ 는 0.2%,  $5 \mu\text{M}$ 는 0.67%,  $10 \mu\text{M}$ 는 0.84%가 증가했다. (표 1)

## 2. 유세포 분석법

FACS를 이용해 암 줄기세포를 확인하였다. 앞선 연구들에서 암 줄기세포를 분리하는데 FACS를 많이 이용하였다. 이번 실험에서는 기존의 방법과 다르게 형광현미경과 AOTF, 양자점을 이용했다. 따라서 본 실험 방법과 결과 비교를 위해 FACS 실험을 진행하였다. 유방암 줄기세포 마커는 CD44, CD24, ALDH1 이다. 분리된 CD44 양성 세포의 양자점-항체 결합체 염색을 통한 관찰에서 거의 모두 암 줄기세포로 관찰 되었다. CD44 양성 세포에서 거의 대부분이 CD24 음성이었기 때문에 FACS에서는 CD44 양성, ALDH1 양성 세포를 관찰하였다. 분리된 CD44 양성 세포에 CD44-APC (488Ex/600-750Em)형광체와 ALDE Fluor (488Ex/525Em)형광체를 처리해 관찰하였다. Excitation은 형광체의 조건에 맞는 488nm를 사용하였다. Emission 파장은 ALDH1의 경우 530/30(emission maximum/bandwidths)에서 관찰하였고, CD44는 610/10에서 관찰하였다. 그림 3(a)~(e)의 x축은 CD44의 emission을 나타내고 y축은 ALDH1의 emission을 나타낸다. x축에서 오른쪽으로 갈수록

CD44 양성율 의미하고 y 축에서 위로 올라갈 수 록 ALDH1 양성율 의미한다. 암 줄기세포는 CD44 양성, ALDH1 양성이므로 그림 3(a)~(e)의 그래프에서 오른쪽 위를 확인하면 된다. 총 10000개의 세포를 분석했을 때 control은 암 줄기세포 비율이 0.22%, 벤조피렌 0.2  $\mu$ M은 0.52%, 2  $\mu$ M은 0.59%, 5  $\mu$ M은 0.68%, 10  $\mu$ M은 0.82%를 보였다. Single cell image cytometry를 이용했을 때와 마찬가지로 벤조피렌 농도가 증가할수록 암 줄기세포 비율이 증가함을 보였다. 그림 3(f)는 위의 값을 그래프로 나타낸 것이다. Control과 비교해서 벤조피렌 0.2  $\mu$ M은 0.3%증가, 2  $\mu$ M은 0.37%증가, 5  $\mu$ M은 0.46%증가, 10  $\mu$ M은 0.6% 증가를 보였다.

		<b>Total cell</b>	<b>CD44 positive cell</b>	<b>CSC (%)</b>	
<b>Set 1</b>	<b>Control</b>	1.94X10 <sup>7</sup>	6.0X10 <sup>4</sup>	0.31	
	<b>Bap 0.2μM</b>	2.04X10 <sup>7</sup>	10.0X10 <sup>4</sup>	0.49	
	<b>Bap 2μM</b>	1.80X10 <sup>7</sup>	8.6X10 <sup>4</sup>	0.47	
	<b>Bap 5μM</b>	1.86X10 <sup>7</sup>	2.5X10 <sup>5</sup>	1.34	
	<b>Bap 10μM</b>	1.80X10 <sup>7</sup>	2.6X10 <sup>5</sup>	1.44	
<b>Set 2</b>	<b>Control</b>	1.90X10 <sup>7</sup>	7.2X10 <sup>4</sup>	0.37	
	<b>Bap 0.2μM</b>	1.74X10 <sup>7</sup>	7.4X10 <sup>4</sup>	0.42	
	<b>Bap 2μM</b>	2.02X10 <sup>7</sup>	1.12X10 <sup>5</sup>	0.55	
	<b>Bap 5μM</b>	2.06X10 <sup>7</sup>	1.78X10 <sup>5</sup>	0.86	
	<b>Bap 10μM</b>	1.94X10 <sup>7</sup>	1.76X10 <sup>5</sup>	0.91	
<b>Set 3</b>	<b>Control</b>	1.82X10 <sup>7</sup>	6.5X10 <sup>4</sup>	0.36	
	<b>Bap 0.2μM</b>	1.90X10 <sup>7</sup>	8.2X10 <sup>4</sup>	0.43	
	<b>Bap 2μM</b>	1.70X10 <sup>7</sup>	1.06X10 <sup>5</sup>	0.62	
	<b>Bap 5μM</b>	1.84X10 <sup>7</sup>	1.57X10 <sup>5</sup>	0.85	
	<b>Bap 10μM</b>	1.94X10 <sup>7</sup>	2.38X10 <sup>5</sup>	1.22	
	<b>Set 1</b>	<b>Set 2</b>	<b>Set 3</b>	<b>Average</b>	<b>BP induced CSC (%)</b>
<b>Control</b>	0.31	0.37	0.36	0.35±0.032	0
<b>Bap 0.2μM</b>	0.49	0.42	0.43	0.45±0.038	0.1
<b>Bap 2μM</b>	0.47	0.55	0.62	0.55±0.075	0.2
<b>Bap 5μM</b>	1.34	0.86	0.85	1.02±0.28	0.67
<b>Bap 10μM</b>	1.44	0.91	1.22	1.19±0.27	0.84

표 1. 암 줄기세포 비율과 벤조피렌에 의해 유도된 암 줄기세포 비율

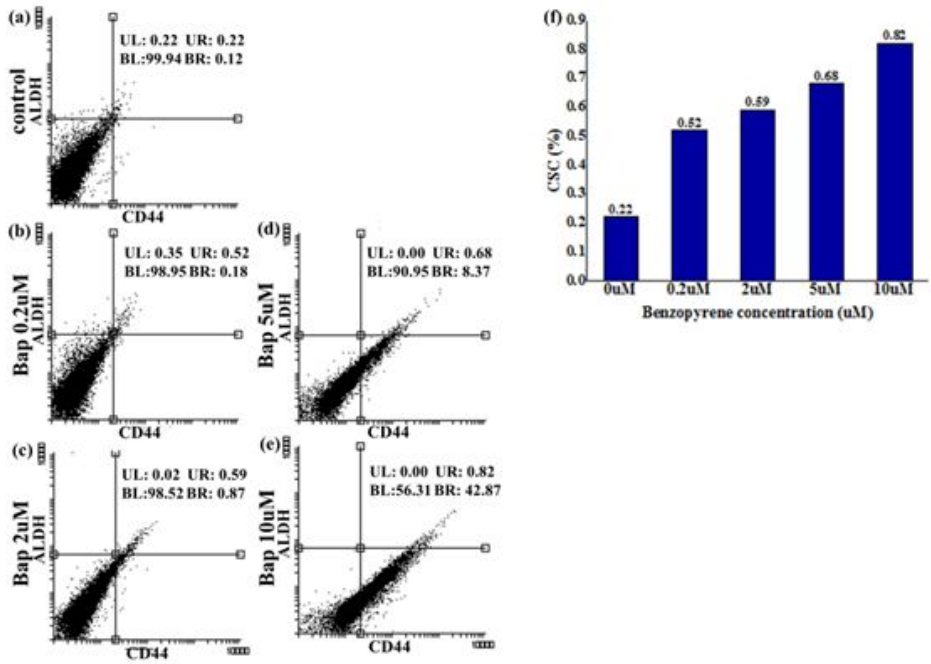
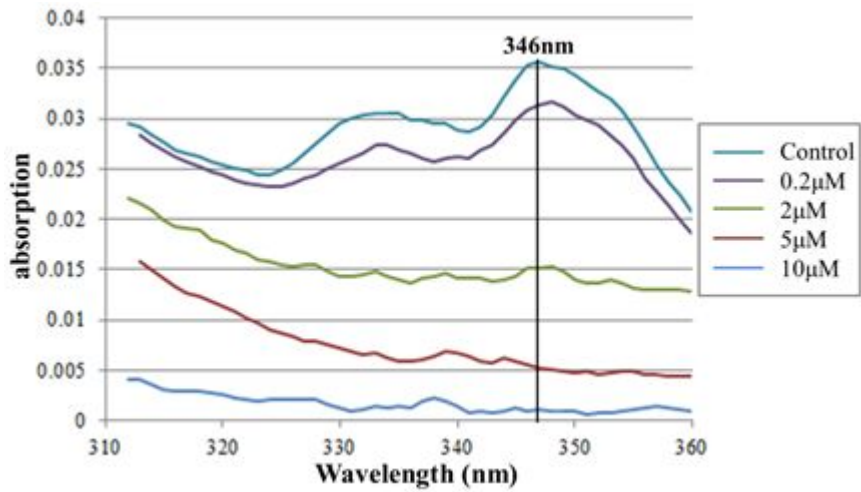


그림 3. 유세포 분석기를 통한 벤조피렌 유도 암 줄기세포 증가의 관찰. 벤조피렌 유도 암 줄기세포를 APC/ALDE fluor 형광체를 통해 관찰하였다. 그래프의 x축은 CD44 emission을 나타내고 오른쪽으로 갈수록 양성이다. y축은 ALDH1의 emission을 나타내며 위로 올라 갈수록 양성을 나타낸다.

### 3. MCF-7세포에서 BPDE-DNA 부가물 형성

그림 4는 BPDE-DNA 부가물을 확인한 결과이다. 벤조피렌은 pro-carcinogen으로 이 자체로는 암을 유발하지 않는다. 벤조피렌이 체내로 들어가 cytochrome P1 family에 의해 변환된 BPDE가 발암의 역할을 한다. 따라서 이를 ultimate carcinogen이라고 한다. BPDE는 DNA 염기 중 구아닌과 반응해 BPDE-DNA 부가물을 생성한다. 이번 실험에서는 MCF-7 세포에 벤조피렌을 농도 별로 처리한 뒤 DNA를 추출 해 BPDE-DNA 부가물 형성 정도를 확인하였다. BPDE는 346nm 에서 흡광도를 관찰해 확인 하였다. 흡광도 A는  $\epsilon$  cl 로 ( $\epsilon$ =몰흡광계수, c=몰농도, l=큐벳 길이=1cm) 흡광도를 통해 BPDE-DNA 부가물의 농도를 구할 수 있다. 표 2에서 흡광도 값은 control이 0, 벤조피렌 0.2  $\mu$ M이 0.004, 2  $\mu$ M이 0.0155, 5  $\mu$ M이 0.0321, 10  $\mu$ M에서 0.0356이다. BPDE의  $\epsilon$ 은  $29000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이므로 농도를 계산하면 벤조피렌 0.2  $\mu$ M은  $1.38 \times 10^{-7}\text{M}$ , 2  $\mu$ M은  $5.34 \times 10^{-7}\text{M}$ , 5  $\mu$ M은  $1.11 \times 10^{-6}\text{M}$ , 10  $\mu$ M은  $1.23 \times 10^{-6}\text{M}$ 이다. (표 2) 벤조피렌 농도가 높아질 수록 BPDE-DNA 부가물 농도가 증가하는 것을 볼 수 있다. BPDE-DNA 부가물은 carcinogenesis를 시작하게 해서 암을 발생시킨다. 따라서 BPDE-DNA 부가물 농도의 증가는 암 줄기세포 증가와도 연관이 있다고 할 수 있다.



	Absorption	BPDE concentration (M)
<b>Control</b>	0	0
<b>Bap 0.2µM</b>	0.004	$1.38 \times 10^{-7}$
<b>Bap 2µM</b>	0.0155	$5.34 \times 10^{-7}$
<b>Bap 5µM</b>	0.0321	$1.11 \times 10^{-6}$
<b>Bap 10µM</b>	0.0356	$1.23 \times 10^{-6}$

그림 4. BPDE-DNA 부가물의 UV스펙트럼. 346nm에서 BPDE의 흡광도를 관찰하였다. 흡광도를 통해 BPDE-DNA 부가물의 농도를 계산하였다.

표 2. BPDE-DNA 부가물의 흡광도 및 농도

## IV. 고찰

세계에서 암은 주요한 건강 관련 문제 중 하나이다. 최근 통계 자료에 의하면 전체 사망자중 27.6%가 암에 의해 사망한다. 다양한 화학치료법과 항암제가 있지만 암은 치료 후에도 병기가 높을수록 재발률이 증가한다.<sup>15</sup> 재발의 원인으로는 치료 후에도 남아있는 암세포 때문이다. 특히 암 줄기세포가 암 재발을 가능하게 한다. 암 줄기세포는 조직의 줄기세포나 전구세포의 자가 증식 기작의 조절이 망가지면서 생겨난다. 암 줄기세포는 자가 증식 기작 이외에 다른 능력도 가지고 있다. 약물저항성과 방사선저항성이 있어 암 치료 후에도 생존율이 높다. 특히 이러한 약물저항성과 방사선 저항성이 암 암 치료를 방해하는 큰 요인이 된다. 암 줄기세포의 약물 저항성 원리는 몇 가지가 있다.

먼저 ATP binding cassette transporter (ABC)이다. 암 줄기세포 검출방법 중 lipophilic fluorescent dye의 배출을 보는 것이 있다. 암 줄기세포는 이 형광체를 바깥으로 내보내 염색이 되지 않는 것을 이용한 것이다. 이런 암 줄기세포는 tail like structure(sp)가 있다. SP는 ABC transporter family 중 하나이다. ABC transporter는 화학물질의 농도를 유지하는 역할을 한다. 약물이 들어왔을 때 약물의 농도를 독성을 유발하지 않는 수준으로 내보내서 약물 저항성이 가능하게 한다. ABC transporter 는 49개 단백질을 포함한다. 그 중 잘 알려진 것이 breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2), multidrug resistance protein (MRP1, ABCG1), P-glycoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1) 이다. 다른 여러 종류의 암의 줄기세포에서 ABC transporter가 많이 발현된 것이 보고 되어 왔고 이것은 약물



저항성을 야기시킨다.

또 다른 것은 암 줄기세포 마커로 잘 알려진 ALDH family 이다. ALDH는 세포 내에서 산화적 스트레스에 중요한 역할을 한다. ALDH는 방사선 유도 free radical을 제거하거나 antioxidant인 NAD(P)H를 만든다. ALDH의 활성은 radiosensitivity 조절에 중요하다. 더불어 ALDH1A1과 ALDH3A1 isoform의 활성 증가는 암 줄기세포가 chemotherapeutic agent를 대사하게 만든다. 그리고 대사 중간산물의 독성 중화에도 관여한다. 즉 ALDH 활성 증가는 약물 저항과 방사선 저항 두 가지를 가능하게 한다.<sup>16-18</sup>

암 줄기세포는 이러한 저항성을 가지고 있어서 약물치료나 방사선 치료에도 살아남아 자가 증식 기작을 통해 암 재발을 가능하게 하는 것이다. 따라서 암 줄기세포 검출은 항암 치료로서 가능성이 있다.

본 연구에서는 발암물질에 의해 암 줄기세포가 얼마나 증가하는지 정량 하였고 암 줄기세포 마커를 통해 암 줄기세포를 검출 하였다. 발암물질로는 벤조피렌을 사용하였다.

벤조피렌은 담배 연기, 탄 음식 등에 들어있다. 특히 여성 흡연율이 해마다 증가하는데 담배연기 속 유해물질 중 하나인 벤조피렌과 암과의 상관관계는 이미 많은 논문에서 다뤄졌다. 벤조피렌은 그 자체로는 발암물질이 아니다. 비 활성 상태인 pro carcinogen이다. 이것이 체내로 들어와 cytochrome P family에 의해 대사되면 BPDE가 생긴다. BPDE는 DNA의 구아닌과 결합해 BPDE-DNA 부가물을 만든다. BPDE가 실제적인 암을 유발하는 발암물질인 alter carcinogen이다.

DNA 돌연변이에는 여러 가지가 있다. 크게 DNA base damage, DNA backbone break, Cross link가 있다. DNA base damage는 O6-methyl guanine, thymine glycol을 포함한 DNA 염기 손상이 있다. 이것은 reactive oxygen species 나 ionize radiation에 의해 생긴다. DNA backbone damage는 abasic site, single strand DNA break, double strand DNA break를 포함한다. Abasic site는 불안정한 base adduct 나 base excision repair로 생긴다. Single strand break는 damage agent, 1~30 nucleotide 의 gap에 의해 생긴다. Double strand DNA break는 ionizing radiation 이나 damage agent가 유발한다. Cross link는 DNA double helix modification을 통해 손상을 준다. 이것은 bulky adduct에 의해서도 가능하다. DNA double helix modification은 UV 나 reactive oxygen species, cisplatin, mitomycin D 와 같은 약물이나 화학 종에 의해 유발된다. 이런 DNA damage는 transcription 이나 replication의 장애가 된다. BPDE-DNA 부가물도 bulky adduct중 하나로 transcription, replication을 방해할 수 있다. 이러한 돌연변이가 생기면 먼저 repair system이 작동한다. DNA damage repair 실패는 세포 기능의 심각한 손상을 가져온다. Repair 되지 않은 DNA가 발현되면 altered expression 되거나 세포 사멸을 초래하기도 한다. 이 과정에서 암이 유발되기도 하는 것이다. altered express 처럼 damage가 tolerance 되기도 하는데 이런 mechanism 중 하나가 translesion DNA synthesis 이다. 이런 기작이 자가 증식 기작의 정교한 조절을 망가트리면 세포는 계속해서 증식하게 된다.

이번 연구에서는 벤조피렌 처리로 암 줄기세포 수 증가를 정량적으로 확인했다. 벤조피렌에 의한 돌연변이가 생겼을 때 repair기작이 있

지만 그럼에도 불구하고 암 줄기세포가 증가한 것이다. 암 세포의 암 줄기세포로의 변화는 위와 같은 repair실패로 인한 translesion process에 의해서 일 것이다. 이것을 확인하기 위해 BPDE-DNA 부가물 형성을 확인하였다. BPDE-DNA 부가물에 의한 돌연변이를 확인하기 위해 농도 별로 벤조피렌을 처리한 뒤 DNA를 추출해 BPDE-DNA 부가물 형성을 관찰했다.

앞선 논문에서는 DNA를 추출한 뒤 BPDE를 바로 처리했었다. DNA는 GFP를 coding 하는 것이었다. (A1GFP1) 여기에 BPDE를 처리해 BPDE adduct에 의한 GFP 발현 감소를 보았다. 이 때 BPDE 처리 농도는 10  $\mu$ M (12 hr), 10  $\mu$ M (48 hr), 100  $\mu$ M (24 hr), 20  $\mu$ M (48 hr)였다. 각각에서 만들어진 BPDE-DNA 부가물 농도는  $4 \times 10^{-7}$  M,  $2.24 \times 10^{-6}$  M,  $4.1 \times 10^{-6}$  M,  $8.59 \times 10^{-6}$  M 이었다. Control 과 비교했을 때 GFP 발현률 차이는 2.47%, 11.19%, 16.49%, 23.71% 였다. BPDE 농도가 높을수록 혹은 처리 시간이 길수록 GFP 발현률 차이가 증가했다. Confocal GFP image 의 intensity를 보면 control은 40.83, 벤조피렌 처리한 것은 33.62, 25, 22.33, 20으로 감소했다. BPDE-DNA 부가물에 의한 돌연변이를 확인 할 수 있었다.<sup>19</sup>

본 연구는 앞선 논문보다 보다 실현 가능성 있는 조건에서 수행했다. 실제 환경에서는 BPDE보다 벤조피렌을 많이 접하기 때문이다. 세포에 직접 벤조피렌을 처리해 BPDE-DNA 부가물 형성을 정량화 하였다. 실제로 세포 내에서 벤조피렌 대사에 의한 BPDE-DNA 부가물 형성을 본 것이다. 본 연구에서 얻은 BPDE-DNA 부가물의 농도는  $1.38 \times 10^{-7}$  M,  $5.34 \times 10^{-7}$  M,  $1.11 \times 10^{-6}$  M,  $1.23 \times 10^{-6}$  M이

었다. 본 실험의 BPDE-DNA 부가물 농도가 앞선 실험의 BPDE-DNA 부가물 농도 범위에 들어가는 것을 볼 수 있었다. 앞선 연구의 BPDE-DNA 부가물의 농도가 GFP발현을 감소시키는 것을 통해 그 농도가 돌연변이 시키기에 충분한 농도라고 할 수 있다. 따라서 이번 연구에서의 BPDE-DNA 부가물 농도 또한 돌연변이를 일으키기에 충분하다고 할 수 있다. 즉 본 연구의 벤조피렌 농도는 세포 내에서 돌연변이를 일으킬 수 있는 충분한 농도였다고 할 수 있다. 또한 벤조피렌 농도가 증가함에 따라 암 줄기세포 수가 증가하는 것을 보았다. 이것은 암 세포가 벤조피렌에 의해 돌연변이가 일어나고 repair가 완벽하게 일어나지 않게 되어 암 줄기세포로 변이가 일어날 수 있음을 보여준다고 할 수 있다. 본 연구 방법은 image를 통해 암 줄기세포를 검출 가능하게 할 수 있고, 벤조피렌에 의한 돌연변이로 유발된 암 줄기세포 수를 정량 하였다.

이러한 암 줄기세포 검출과 정량에 있어서 정확성을 제공하는 중요한 검출 방법은 AOFT와 양자점이다. 앞선 연구 방법에서 암 줄기세포 검출 방법으로 많이 사용하는 것이 FACS였다. FACS는 검출 시 fluorescent dye를 사용하고 emission확인에 bandpass fliter를 사용한다.

이번 연구는 fluorescent dye대신 양자점을 사용했고 bandpass filter 대신 AOTF를 사용했다. 먼저 양자점은 기존의 형광체를 대신 해서 사용한 것으로 여러 가지 장점이 있다. 먼저 단파장으로 갈수록 excitation을 잘 한다. Fluorescent dye에 비해 emission파장의 폭이 좁다. 또한 빛에 더 안정해 광탈색이 적고 수명이 길다. 무엇보다 emission파장의 폭이 좁아 여러 개 양자점을 이용해 동시에 많은 수

의 마커를 관찰 할 수 있다. 또한 단파장으로 갈수록 excitation을 잘 하기 때문에 동시에 많은 양자점을 excitation시킬 수 있다. 암 줄기 세포 같이 특정 세포들을 분리할 때 정확도를 높이는 방법은 마커를 많이 보는 것이다. 기존의 형광체는 양자점에 비해 emission 파장의 범위가 넓고 dye별로 excitation 파장도 달라 한 번에 여러 개를 보기 어려웠다. 하지만 양자점을 이용하면 여러 개를 동시에 볼 수 있게 된다. AOTF는 filter로 단파장을 선택할 수 있게 해준다. Bandpass filter의 경우 wavelength범위가 10~40nm까지 다양하다. 파장 범위가 넓으면 다른 형광체나 양자점의 emission이 끼어들어 정확도가 낮아진다. 반면 AOTF는 단파장만 선택할 수 있기 때문에 다른 형광체나 양자점과 겹치지 않게 할 수 있게 해준다.

이번 연구에서는 양자점과 AOTF를 둘 다 사용해 여러 가지 마커를 한 번에 정확하게 볼 수 있게 했다. 따라서 암 줄기세포의 검출 정확도를 높였다고 할 수 있다.

## V. 결 론

본 연구는 벤조피렌에 의해 유도된 암 줄기세포를 양자점 기반의 high-content 방법으로 정량 검출을 보여주었다. 벤조피렌은 BPDE로 산화되는데 BPDE가 BPDE-DNA 부가물을 형성하면서 세포 내에서 실제적인 발암물질로서 작용한다. BPDE-DNA 부가물의 형성과 그에 따른 돌연변이를 기존 연구보다 현실 가능한 *in vitro* 모델로서 관찰이 가능하였다. 벤조피렌의 농도가 증가함에 따라 BPDE-DNA 부가물의 농도가 증가하였고 이것에 의해 돌연변이가 유발된다고 할 수 있다. 따라서 벤조피렌의 농도가 증가할수록 암 줄기세포의 수도 증가한다는 것을 알 수 있었다. 암 줄기세포는 CD44, CD24, ALDH1의 동시관찰을 통해 성공적으로 검출 되었다.

## VI. 참고문헌

1. M. Cojoc, K. Mabert, M. H. Muders and A. Dubroska, *Seminars in cancer biology*, 2014
2. B. Dave and J. Chang, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2009, **14**, 79–82
3. M. Kakarala and M. S. Wicha, *Journal of Clinical Oncology*, 2008, **26**, 2813–2820
4. N. Ababneh, W. Alshaer, O. Allozi, A. Mahazah, M. El-Khateeb, H. illaireau, M. Noiray E. Fattal and S. Ismail, *Nucleic acid therapeutics*, 2013, **23**, 401–407
5. M. Balic, D. Schwarzenbacher, S. Stanzer, E. Heitzer, M. Auer, J. B. Geigl, R. J. Cote, R. H. Datar and N. Dandachi, *BMC cancer*, 2013, **13**, 358
6. A. V. Molofsky, R. Pardal and S. J. Morrison, *Current opinion in cell biology*, 2004, **16**, 700–707
7. M. Shipitsin and K. Polyak, *Laboratory Investigation*, 2008, **88**, 459–463
8. T. Ahrens, J. P. Sleeman, C. M. Schempp, N. Howells, M. Hofmann, H. Ponta, P. Herrlich and J. C. Simon, *Oncogene*, 2001, **20**, 3399–3408
9. J. Douville, R. Beaulieu and D. Balicki, *Stem cells and*

*development*, 2009, **18**, 17–25

10. L. Lin, B. Hutzen, H-F. Lee, Z. Peng, W. Wang, C. Zhao, H-J. Lin, D. Sun, P-K. Li and C. Li, *PloS one*, 2013, **8**, e82821

11. H. Takemura, H. Nahayoshi, T. Matsuda, H. Sakakibara, M. Morita, A. Matsui, T. Ohura and K. Shimoi, *Toxicology*, 2010, **274**, 42–48

12. S. L. Hockley, V. M. Arlt, D. Brewer, I. Giddings and D. H. Phillips, *BMC genomics*, 2006, **7**, 260

13. M. J. Kim, S. C. Lee, S. Pal, E. Han and J. M Song, *Lap on a chip*, 2011, **11**, 104–114

14. Y. K. Tak, P. K. Naoghare, B. J. Kim, M. J. Kim, E. S. Lee and J. M. Song, *Nano Today*, 2012, **7**, 231–344

15. E. C. Friedvberg, *Nature*, 2003, **421**, 436–440

16. L. Pan, J. Penney and L-H. Tsai, *Journal of molecular biology*, 2014, **436**, 3376–3388

17. B. Sadikovic and D. I. Rodenhiser, *Toxicology and applied pharmacology*, 2006, **216**, 458–468

18. A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz and S. Linn, *Annual review of biochemistry*, 2004, **73**, 39–85

19. Y. K. Tak, P. K. Naoghare, K-H. Lee, S-S. Park and J. M. Song, *Analytical biochemistry*, 2008, **380**, 91–98



## Abstract

### Quantum dot-based Concurrent Monitoring of CD44, CD24, and Aldehyde dehydrogenase 1 for the Diagnosis of Benzo[a]pyrene-induced Breast Cancer Stem Cell

Yumi Shim

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis  
The Graduate School  
Seoul National University

The cancer stem cell (CSC) hypothesis has been reported previously in many studies. Due to drug and radiation resistance inherent to CSC, it has received great attention in the field of cancer therapy. In this study, it was found that breast CSCs were produced from MCF-7 cells by benzo[a]pyrene (BP)-induced mutation. Breast CSCs were obtained using magnetic bead-based sorting from MCF-7 cells and detected through high-content monitoring of three different markers, namely, CD44, CD24 and aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1), using a hypermulticolor cellular imaging system based on an acousto-optical tunable filter

(AOTF). The BP-induced mutation was quantitatively observed via absorption spectra of BPDE-DNA adducts that were formed in MCF-7 cells by the treatment of MCF-7 cells with BP. MCF-7 cells were treated with BP at different concentrations of 0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, for 24 h. The resultant CSCs in the entire MCF-7 cells were determined to be  $0.35\pm 0.032\%$ ,  $0.45\pm 0.038\%$ ,  $0.55\pm 0.075\%$ ,  $1.02\pm 0.28\%$  and  $1.19\pm 0.27\%$  in control, and 0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M, respectively. Until now, FACS has been utilized for the detection of CSCs as a general tool. In this work, it is verified that the present multicolor cellular imaging is quite advantageous for the detection of CSCs because spectral overlap among probes of CSC biomarkers can be eliminated and diagnostic accuracy can be greatly improved, compared with conventional FACS.

### **Keyword**

Cancer stem cell, BPDE-DNA adduct, Highcontent, Quantum dot, AOTF

**Student Number:** 2013-23464