

## 골수 유래 기질 줄기세포의 탐식작용 매개성 케모카인 수용체 발현 연구

정영신 · 변항민 · 신지영 · 김정목\* · 정형민 · 오유경†

포천중문 의과대학교, \*한양대학교 의과대학

(2003년 10월 20일 접수 · 2003년 11월 17일 제심사 · 2003년 12월 3일 승인)

### Expression of Chemokine Receptors Involved in Receptor-Mediated Endocytosis of Bone Marrow-Derived Stromal Stem Cells

Youngsin Jeong, Hyang-Min Byun, Jee-Young Shin, Jung Mogg Kim\*, Hyung Min Chung and Yu-Kyoung Oh†

College of Medicine, Pochon CHA University, Pochon, Kyounggi-do 487-800, Korea

\*College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

(Received October 20, 2003 · Revised November 17, 2003 · Accepted December 3, 2003)

**ABSTRACT**—To design gene delivery systems which can deliver higher amounts of genes into stem cells, we studied the expression of receptors involved in the receptor-mediated endocytosis of bone marrow stromal stem cells. Bone marrow was isolated from ICR mice, and bone marrow stromal stem cells were isolated based on their plastic adherence property. Several culture conditions were screened for effective and continuous culture of marrow stromal stem cells. MesenCult medium was finally used to cultivate marrow stromal stem cells in vitro. As candidate receptors, various chemokine receptors were studied. Both bone marrow cells and marrow-derived stromal stem cells showed expression of CC chemokine receptors (CCR) and CXC chemokine receptors (CXCR). Marrow stromal stem cells showed higher expression of CCR5 and CXCR4 chemokine receptors as compared to other types of chemokine receptors. Moreover, though the expression of chemokine receptors generally decreased in most chemokine receptors with the cultivation of marrow stromal stem cells, CCR5 and CXCR4 chemokine receptors retained the higher level of receptor expressions over prolonged periods. These results suggest that the ligands exhibiting specific binding to CCR5 or CXCR4 might be used to modify gene delivery systems for increased levels of receptor-mediated gene delivery into stromal stem cells.

**Key words**—Bone marrow-derived stromal stem cells, Chemokine receptors, Receptor-mediated endocytosis, Expression

골수(bone marrow)는 적혈구, 혈소판, 단핵구, 거핵구, 림프구의 순환에 지속적인 근원을 제공한다.<sup>1)</sup> 이들 세포 집단은 일반적으로 조혈모세포(hematopoietic stem cell)로부터 유래하며 이 조혈모세포의 분화에 골수 기질(marrow stroma)이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 왔다. 골수 기질은 평활근세포나 지방세포(adipocyte), 내피세포(endothelial cell), 섬유아세포(fibroblastic cell)등을 포함한 세포들의 이종의 혼합체이며 조혈모세포와 전구세포에 물리적 지지체를 제공할 뿐만 아니라 성장인자, 사이토카인, 케모카인 등을 제공한다.<sup>2)</sup> 이 기질에는 *in vitro*에서 뼈, 연골, 지방 조직, 힘줄, 근육 등으로 발생하는 기질 줄기 세포를 가지고 있으며 이 세포는 mesenchymal origin으로서 mesenchymal stem cell 또는 골수 기질 유래 줄기 세포(marrow-derived stromal stem cell)로 불린다.<sup>1)</sup> 이 골수기질세포는 위에서 언급한 세포들로

분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 그와 같은 조직에 이상이 생겼을 경우 그 부위에 골수 기질세포를 이식하거나 골수 기질세포에 치료 유전자를 삽입한 후 이식함으로써 치료 효과를 거둘 수 있다.

세포에 특정 유전자를 삽입하는 방법으로는 바이러스성 수송체(viral vector)를 이용하는 방법과 비 바이러스성 수송체(nonviral vector)를 이용하는 방법이 있다. 바이러스성 수송체를 이용하는 방법은 감염세포에 대한 트랜스펙션 효율이 비 바이러스성 수송체에 비해 훨씬 높다는 장점이 있으나 상대적으로 작은 크기의 DNA만이 삽입될 수 있고 숙주 면역반응을 유발할 수 있으므로 반복투여 시 유전자발현효율이 감소된다. 또한 바이러스에 따라 다양한 형태의 세포에 전달되므로 특정세포에 특이적으로 유전자를 전달하기 어렵고 안전성, 독성 등의 문제가 제기되고 있다.<sup>3)</sup> 비 바이러스성 수송체를 이용하는 유전자 수송체는 바이러스성 수송체에 비해 *in vivo*에서 트랜스펙션 효율이 낮아진다는 단점이 있는 반면 제조하기 쉽고, 크기에 상관없이 DNA를 수송할

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 031)542-6671, E-mail : ohyk@cha.ac.kr

수 있으며 특정세포에 표적화하기 위해 리간드 또는 단일 항체를 결합하기 쉽다는 장점이 있다.<sup>4)</sup> 비 바이러스성 수송체로서는 주로 리포솜, 양이온성 고분자를 사용한 방법이 주로 사용되고 있다.

케모카인은 사이토카인의 일종으로 포유류, 조류 및 어류의 백혈구나 다양한 여러 종류의 세포에서 생산되는 8-10 kDa 정도의 작은 분자량의 물질이다. 케모카인은 주로 감염이 일어난 염증부위에서 분비되어 백혈구에 대한 주화성, 이주, 그리고 활성화 조절 기능을 하며, 세포의 증식에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 케모카인 수용체는 7개의 transmembrane domain 구조를 가지고 있으며, 구조 중 Cys-Cys 잔기를 가지는 것은 CC chemokine receptors (CCR), Cys-X (any amino acid)-Cys 잔기를 가지는 것은 CXC chemokine receptors (CXCR)로 크게 구분한다.<sup>5,6)</sup> CCR과 CXCR은 여러 가지 type이 있으나 CCR 중에는 CCR5, CXCR 중에는 CXCR4가 수용체 매개성 탐식 기능이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup>

본 연구는 비 바이러스성 벡터에 유전자를 실어 골수 기질 유래 줄기 세포에 전달하고자 할 때 줄기 세포 내로의 유전자 송달량을 보다 증강시키기 위한 기반 연구로서 골수 기질세포에 존재하는 유전자 전달 매개성 수용체(receptor)를 찾기 위한 목적 아래 수행되었다. 여러 수용체중 receptor-mediated endocytosis에 관련된 수용체를 우선적으로 찾기로 하였으며 여러 후보 수용체중 케모카인 수용체인 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR4가 골수기질 유래 줄기세포에서 발현되는지 그리고 수용체 사이에 발현량의 차이가 나타나는지, 또한 배양 기간 별로 수용체 매개성 탐식 작용에 관여하는 수용체들의 발현량이 변화하는지를 평가하였다.

## 실험 방법

### 재료 및 기기

줄기세포의 배양에 사용된 DMEM, RPMI-1640, 우혈청(fetal bovine serum), 마혈청(equine serum)은 각각 Gibco BRL(NY, USA)로부터 구입하였으며, Mesencult™ 배지는 StemCell Technologies(BC, Canada)에서 구입하였다. 베타-머캅토에탄올, 세포 탈착 용액(cell dissociation solution), 트립신-EDTA는 Sigma(MO, USA)로부터 구입하였다. 세포배양용 배양접시는 Falcon (CA, USA) 제품을 사용하였다. T-25 배양 플라스크는 NUNC(NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 발현 측정에 사용된 TRIzol™은 Invitrogen (CA, USA)으로부터 구입하였으며, RT-PreMix™ kit는 바

이오니아(한국)로부터 구입하였다. 실험에 사용된 완충액 및 시약은 모두 증류수를 사용하여 제조하였으며, 증류수는 Milli-Q (Millipore Co., USA)를 통과시켜 제조하였다. Polymerase chain reaction(PCR)은 MJ research사의 Peltier Thermal Cycler(PTC-100)를 사용하여 수행하였으며, 발현 분석의 정량화 작업에는 Gel Doc image analyzer(Vilber Loumat, France) 및 Bio 1D 이미지 분석 프로그램을 이용하였다.

### 골수 세포(Bone Marrow Cell)의 분리

골수 세포를 분리하기 위해서, 6주된 암컷 ICR mice를 경추 탈골로 죽인 다음 대퇴부와 경골뼈 부분을 분리하였다. 뼈의 끝 부분을 제거하고 26 게이지의 바늘을 가진 3 ml 주사기에 인산 완충액을 3 ml 채운 후 뼈 속에 완충액을 주입하여 골수를 밀어내어 골수를 채취하였다. 채취된 골수는 26 게이지의 바늘을 가진 주사기에 통과시켜 잘 분산시켜 단일 세포로 회석하였다. 분리한 단일 세포를 준비한 배지에 넣고 배양하였다.

### 골수 기질 유래 스트로말 줄기 세포(Bone Marrow-derived Stromal Stem Cell)의 배양

골수 기질 유래 줄기 세포의 배양 조건을 확립하기 위하여 세포 배양 시 DMEM, RPMI, MesenCult™ 배지 5-10 ml을 사용하였다. 세포 배양액의 다양한 조성은 Table I에 나타내었다. 각 배지에 사용한 DMEM과 RPMI-1640 배지는 1% penicillin, streptomycin을 첨가한 것을 사용하였다. 골수로부터 분리한 골수세포들은  $1-4 \times 10^7$  cell/ml로 10 ml 배지가 담긴 100 mm petri dish(Falcon)에, 그리고 5 ml 배지가 담긴 T-25 flask(NUNC)에 넣은 후 2-3주 배양하였다. 배양 후 계대 배양을 위해 트립신-EDTA와 세포 탈착용액을 각각 2 ml씩을 사용하였다. RT-PCR에 이용한 세포는 MesenCult™ 배지 5 ml에  $5-30 \times 10^6$  cell/ml로 각각 3, 7, 14, 21일 동안 배양하였다. 배양 후 계대 배양을 위해 트립신-EDTA와 세포 탈착용액을 각각 2 ml씩을 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere에서 배양하였으며 배양 한 후 3, 7, 14일째 위상차 현미경(Nikon H-III)을 이용하여 100배 배율에서 관찰하였다.

### Semiquantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

세포의 RNA는 TRIzol™(Invitrogen) 시약을 이용하여 골수 세포를 뽑은 직후, 또는 배양 후 3, 7, 14, 21일째 되는 날에  $5-30 \times 10^6$  세포로부터 추출하였다. cDNA합성에는

**Table I**—Culture Medium Conditions Used for Cultivation of Bone Marrow-Derived Stromal Stem Cells

Conditions	Plasticware	Cell confluency	Cell growth	Subculture
DMEM + 10% 열불활성화 우혈청	100 mm culture dish	0	–	No
RPMI1640 + 15% 열불활성화 우혈청	100 mm culture dish	<1%	+	No
DMEM + 15% 열불활성화 우혈청	100 mm culture dish	<1%	+	No
DMEM + 20% 열불활성화 우혈청	100 mm culture dish	<10%	+	No
DMEM + 10% 열불활성화 우혈청 + 10% 열불활성화 마혈청	100 mm culture dish	10%	+	No
DMEM + 10% 열불활성화 우혈청 + 10% 열불활성화 마혈청	T-25 culture flask	15%	+	No
DMEM + 10% 열불활성화 우혈청 + 10% 열불활성화 마혈청 + 베타-머캅토에탄올 (50 μM)	T-25 culture flask	30%	++	No
MesenCult +20% Mesenchymal stem cell stimulatory supplements	T-25 culture flask	70%	+++	Yes

**Table II**—The Sequences of Oligonucleotide Primers Used for PCR Amplification

	Primers	Oligonucleotide sequences	Size (bp)
CCR1	sense	5'-AGCCTACCCACAACACTACAGAA-3'	547
	antisense	5'-CTTGTAGGGGAAATGAGGGCAA-3'	
CCR2	sense	5'-GTATCCAAGAGCTTGTATGAAGGG-3'	532
	antisense	5'-GTGTAATGGTGTATCATCTTGTGGGA-3'	
CCR3	sense	5'-TGGGCAACATGATGGTTGTG-3'	383
	antisense	5'-GCTGTCTTGAGACTCATGGA-3'	
CCR4	sense	5'-TTGAAGGCAAGGACCCTGAC-3'	490
	antisense	5'-CCCCGAGAAAGAAGTAAATGACG-3'	
CCR5	sense	5'-GCTGAAGAGCGTGACTGATA-3'	360
	antisense	5'-GAGGACTGCATGTATAATGA-3'	
CXCR2	sense	5'-AACAGTTATGCTGTGGTTGTA-3'	483
	antisense	5'-CAAACGGGATGTATTGTTACC-3'	
CXCR4	sense	5'-GGCTGTAGAGCGGTTGC-3'	390
	antisense	5'-GTAGAGGTTGACAGTGTAGAT-3'	
GAPDH	sense	5'-ATCACCATCTCCAGGAGC-3'	360
	antisense	5'-AGAGGGGCCATCCcGTCTTC-3'	

RNA 1 μg을 이용하였으며 RT-PreMix kit(바이오니아, 한국)를 사용하였다. PCR 반응은 cDNA 1 μl, sense 및 antisense primer 각각 1 μl (10 pmol), Taq polymerase 7.5 U, dNTP 2 μl(각 dNTP 2.5 mM), 10×reaction buffer로 전체 반응용량을 25 μl로 하여 수행하였다. PCR에 사용한 primer는 Table II와 같으며 94°C 45초; 55°C 45초; 72°C 45초의 조건으로 30 cycle을 증폭하여 PCR을 수행하였다.<sup>8)</sup> 대조군으로는 house-keeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다.<sup>9)</sup> PCR 반응물은 2% agarose gel에서 전기영동하였으며 Gel Doc Video Gel Documentation System, Bio 1D로 젤 밀도를 측정(densitometry)하여 정량화해 비교 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**골수 유래 기질 줄기 세포의 배양**

본 연구에서는 골수 유래 기질 줄기 세포(bone marrow-derived stromal stem cell) 배양 조건을 잡기 위해 세포 배양 시 여러 가지 다른 조성의 배지를 사용하고 세포의 농도를 다르게 하여 배양해 보았다. 골수 유래 기질 줄기 세포를 배양할 때는 골수세포(bone marrow cell) 중 기질세포만이 부착해서 자라는 특성을 이용해 배양 접시에서의 부착여부로 골수 기질세포와 그렇지 않은 세포를 구별하였다. 보통 1×10<sup>7</sup> cell/ml 농도의 세포에 5–10 ml의 배지를 사용하여 2–3주 정도 배양하였다. 그리고 일주일마다 50%의 배지를

같이주었다.

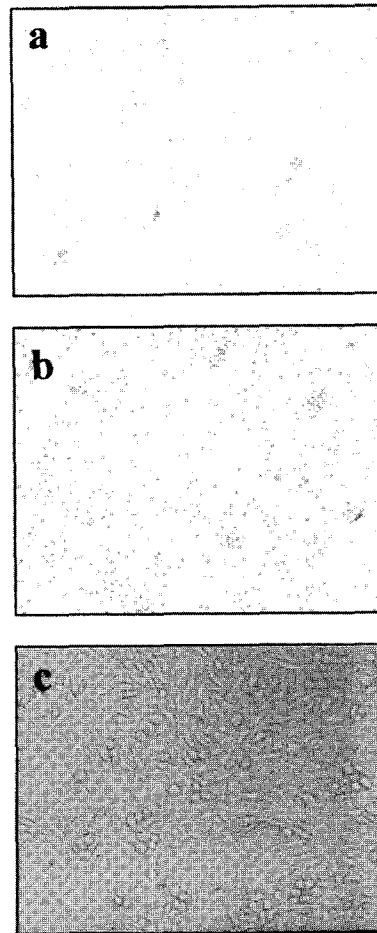
여러 가지 배양 조건하에서 세포의 부착성 및 배양 2주후의 성장 정도는 Table I에 나타내었다. 각종 배양 조건 중 DMEM+10% 마혈청+10% 우혈청 배지에 베타-머캅토에탄올(50 μM)을 넣어 2-4×10<sup>7</sup> cell/ml 농도로 세포를 배양한 경우 처음 일주일 정도에 30% 정도 부착세포가 관찰되다가 2주를 넘기면 급격히 수가 증가하고 세포가 크게 성장하는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나, 이 조건에서 배양한 기질 세포는 트립신-EDTA 처리 시 민감하여 잘 죽거나, 세포 탈착 용액 처리 시 잘 떨어지지 않아서 계대 배양이 용이하지 않았다. 가장 효과적인 세포 성장은 MesenCult™ 배지 5 ml을 1-4×10<sup>7</sup> cell/ml로 사용한 경우 관찰되었으며, 이 경우 배양 1일 후에 70-80% 정도의 부착세포가 관찰되었다. 배양 3일 정도 후면 90% 정도의 confluency로 자라며 트립신이나 세포 탈착 용액을 사용하여 1:2로 계대 배양이 가능하였다.

배양조건 결과를 종합해보면 혈청의 농도가 높을수록, 베타-머캅토에탄올을 첨할수록, 마혈청을 일부 첨가한 것이 그렇지 않은 것에 비해 부착 세포가 더 많이 관찰되었으며, 100 mm 배양접시보다는 T-25 플라스크에서 배양했을 때, 세포의 농도가 높을수록 더 많은 양의 골수 기질세포가 효율적으로 부착하는 것이 관찰되었다. 부착세포끼리 더 가까이 있을수록 더 잘 자라는 것으로 관찰되었는데 이는 기질 줄기 세포가 자라는데 세포 사이의 communication이 중요하기 때문인 것으로 추정된다.

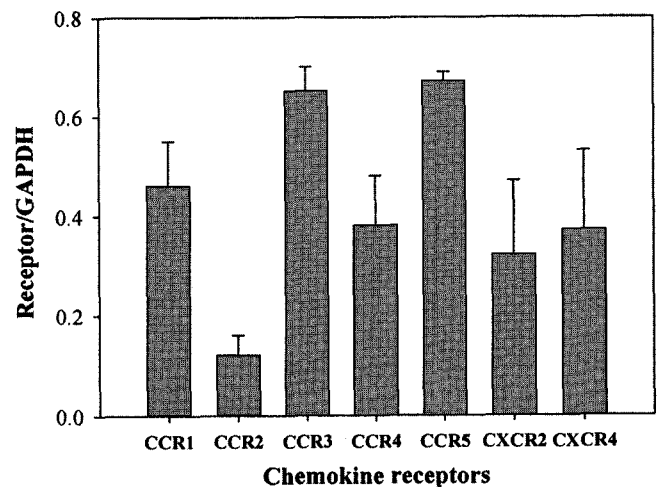
본 연구에서는 수용체 발현을 평가하기 위한 골수 유래 기질 줄기 세포의 배양 배지로서 최종적으로 MesenCult™ 배지를 사용하여 지속적인 배양을 수행하였다. Figure 1은 골수 기질 세포가 배양 3일째 부착된 상태를 보여주며 (Figure 1a), 배양 7일째 증식이 지속되고(Figure 1b), 배양 21일에는 세포 크기 및 세포수가 증가한 것을 보여준다 (Figure 1c).

**골수 세포에서의 케모카인 수용체 발현**

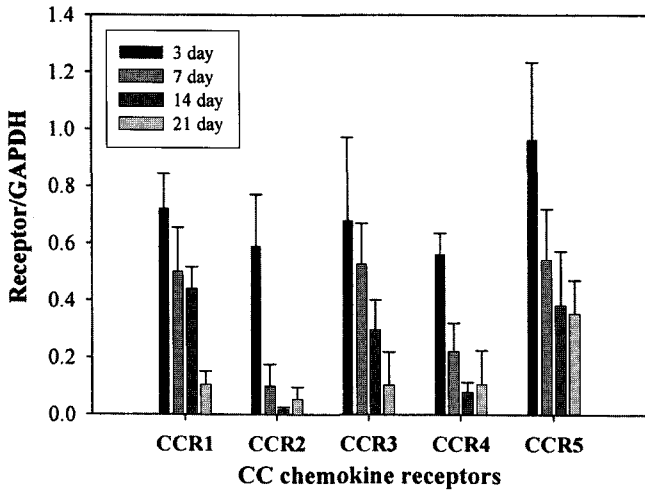
골수 유래 기질 줄기 세포에서 케모카인 수용체의 발현을 관찰하기 위한 전 단계로서 골수세포에서 케모카인 수용체의 발현 정도를 1차적으로 측정하였다. *In vivo*에서 분리된 직후의 골수 세포에서는 케모카인 수용체군 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR4 모두가 발현되었다 (Figure 2). 케모카인 수용체 발현양을 비교해 보면 CCR1, CCR3, CCR5의 발현양이 비교적 다른 수용체보다 많음을 알 수 있으며 CXCR2 및 CXCR4는 CCR1, CCR4와 유사한 정도의 발현양을 나타내었다.



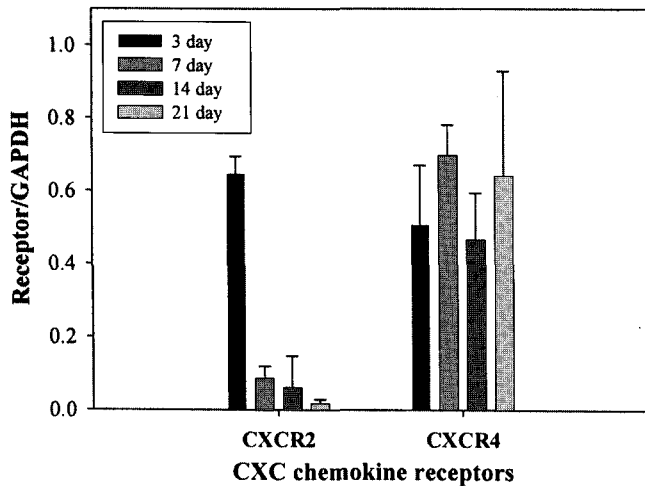
**Figure 1**—Morphology of bone marrow-derived stromal stem cells. Phase contrast pictures of bone marrow-derived stromal stem cells cultured *in vitro* at day 3 (a), day 7 (b) and day 21 (c).



**Figure 2**—Chemokine receptor expression pattern of fresh bone marrow cells. The relative expression levels of each chemokine receptor were normalized by the levels of GAPDH.



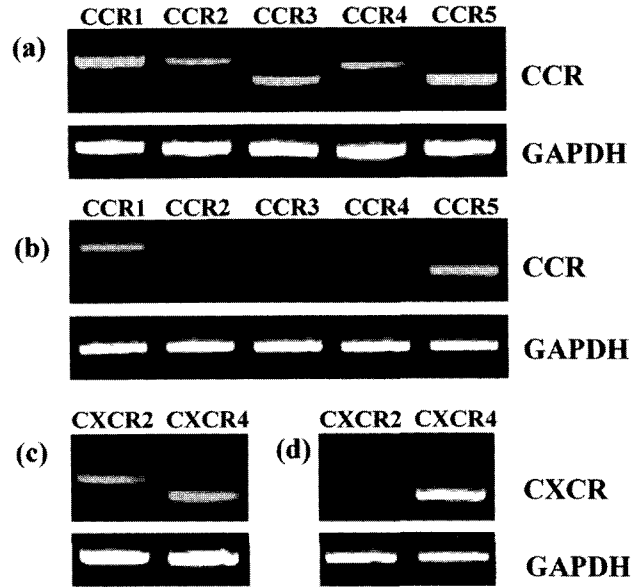
**Figure 3**—CC chemokine receptor (CCR) expression of bone marrow-derived stromal stem cells. At various time points, the relative expression levels of various CCR were measured using GAPDH as a control. The results are expressed as the mean±SD (n=4).



**Figure 4**—CXC chemokine receptor expression of bone marrow-derived stromal stem cells. At various time points, the relative expression levels of CXCR2 and CXCR4 were measured using GAPDH as a control. The results are expressed as the mean±SD (n=4).

**골수 유래 기질 줄기세포에서의 케모카인 수용체 발현**

골수 유래 기질 줄기 세포는 배양 초기에 골수 세포와 유사한 케모카인 수용체 발현 패턴을 나타내었다. 골수세포에서 관찰된 것과 유사하게 기질세포에서도 다른 케모카인 수용체에 비해 CCR1, CCR3, CCR5의 발현양이 비교적 높았다(Figure 3). 그러나 전체적인 케모카인 수용체의 발현양은 기질세포가 골수세포보다 더 높은 것으로 보인다. 기질세포에서의 케모카인 수용체로는 CCR5, CXCR4의 발현양이 가장 많았으며 CCR1, CCR3가 중간정도의 발현양을 보였으며 CCR2와 CXCR2의 발현양이 가장 적었다(Figure 4).



**Figure 5**—Representative pictures of chemokine receptor expression in marrow stromal stem cells. Representative picture of CCR expression at day 3 (a) and day 21 (b) are presented. Representative picture of CXCR expression at day 3 (c) and day 21 (d) are presented.

기질 줄기 세포에서의 케모카인 수용체 발현양은 전반적으로 시간이 지날수록 감소하였다. 그러나 CCR5와 CXCR4는 예외적으로 지속적인 발현 양상을 보였다 (Figures 4,5). 발현양이 초기부터 CXCR4 수용체에 비하여 소량이었던 CXCR2는 시간이 지남에 따라 급격히 발현양이 줄었으며 21일째에는 거의 발현이 되지 않았다.

본 연구의 목적은 기질 줄기 세포에 유전자를 전달할 때 세포내로의 전달 효율을 높이고자 골수 기질세포에 존재하는 수용체중 receptor-mediated endocytosis 작용에 관련된 탐식작용 매개성 수용체를 찾는 것이었다. Receptor-mediated endocytosis에 관련된 수용체의 발현 정도 및 발현 지속성 여부를 다른 케모카인 수용체들과 비교하여 1차적으로 탐색한 다음 상기 수용체에 대한 리간드를 수식한 전달체를 유전자 송달에 이용하면 수용체 매개성 탐식작용에 의해 유전자가 골수 기질 유래 줄기 세포로 잘 전달이 될 것이라는 가설아래 케모카인 수용체군의 발현을 탐색하였다. 본 연구 결과는 후보 케모카인 수용체로서 CC 케모카인의 수용체인 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, 그리고 CXCR 케모카인의 수용체인 CXCR2, CXCR4가 골수기질세포에서 발현되고 기질세포의 배양기간에 따라 발현량에 수용체 별로 변화를 나타내는 것을 보여준다.

골수 기질 세포에서의 발현되는 케모카인 수용체중 주목되는 수용체는 CXCR4이다. CXCR4는 기질세포가 분비하는 SDF-1과의 상호작용으로 조혈모 줄기 세포가 골수로 표

적화 (homing)하는 데에 작용하는 것으로 알려져 있으며<sup>10)</sup> 기질세포에서 CXCR4가 발현되는 것으로 보아 기질세포도 조혈모 줄기 세포와 유사하게 골수에 표적화 기작을 갖고 있는 것으로 보인다. 기질세포에서 발현되는 케모카인 수용체 중 수용체 매개 탐식 작용 특징을 보이는 CCR5와 CXCR4의 발현이 높은 수준으로 오래 유지되는 것으로 보이므로 이들 수용체를 표적 수용체로 하는 RANTES 등의 케모카인 리간드를 표지화한 줄기세포용 유전자 전달체에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(과제번호 R01-2002-000-00024-0)지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) D.G. Phinney, G. Kopen, R.L. Isaacson and D.J. Prockop, Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation, *J. Cell Biochem.*, **72**, 570-585 (1999).
- 2) W.J. Rombouts and R.E. Ploemacher, Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture, *Leukemia*, **17**, 160-170 (2003).
- 3) P.D. Robbins and S.C. Ghivizzani, Viral vectors for gene therapy, *Pharmacol. Ther.*, **80**, 35-47 (1998).
- 4) T. Niidome and L. Huang, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene Ther.*, **9**, 1647-1652 (2002).
- 5) N.W. Lukacs, A.L. Miller and Hogaboam CM, Chemokine receptors in asthma: searching for the correct immune targets, *J. Immunol.*, **171**, 11-15 (2003).
- 6) K. Kedzierska, S.M. Crowe, S. Turville and A.L. Cunningham, The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages, *Rev. Med. Virol.*, **13**, 39-56 (2003).
- 7) S. Venkatesan, J.J. Rose, R. Lodge, P.M. Murphy and J.F. Foley, Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3305-3324 (2003).
- 8) F.R. Fischer, L. Santambrogio, Y. Luo, M.A. Berman, W.W. Hancock and M.E. Dorf, Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression, *J. Neuroimmunol.*, **110**, 195-208 (2000).
- 9) Y.K. Oh, J.P. Kim, H. Yoon, J.M. Kim, J.S. Yang and C.K. Kim, Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes, *Gene Ther.*, **8**, 1587-1592 (2001).
- 10) D.E. Wright, E.P. Bowman, A.J. Wagers, E.C. Butcher and I.L. Weissman, Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines, *J. Exp. Med.*, **195**, 1145-1154 (2002).