

being vigorously researched. This approach could guide us towards a fundamental cure for many diseases requiring tissue or organ replacements. Among the potential cell sources, human embryonic stem cells (hESC) could play a necessary part for the therapy as a cell source, especially due to efficient control of development in vitro. The differentiation of hESC into insulin-producing cell (IPC) clusters has been extensively studied for possible treatment of diabetes. But unfortunately, the clusters have yet to show proper function. We focused on long-term exposure of cells to high glucose concentrations affecting the IPC's glucose responsiveness. We believe that this exposure to high glucose levels, common in hESC media, may hinder IPC clusters to secrete insulin upon glucose stimulation. Prior to hESC culture in low glucose conditions, we tested whether that milieu properly maintained hESC characteristics such as pluripotency and self-renewal over prolonged passages.

**Method:** SNUhES3, a hESC line established in our laboratory, was gradually adapted into low glucose conditions (5.0 mM) from high glucose conditions (17.5 mM) over 4~5 weeks. The cells cultured in either low or high glucose levels were compared by various methods. Growth pattern and growth rate were checked under microscopy and immunocytochemistry for the protein markers verifying undifferentiated state of the cells. For the differentiated cells, their genetic expression indicating embryonic 3-germ layers were also performed.

**Results:** Here, we report that SNUhES3 in low glucose concentrations around 8 mM showed normal hESC characteristics as well as karyotype. Furthermore, the cells in lower glucose medium showed higher growth rate by 2-fold and increased production of cystic embryoid bodies amounting to 70% of the population. We believe that these qualities may be merits for the further cell differentiation.

**Conclusions:** The results suggest that hESC culture in low glucose concentrations would be a practical and effective step in inducing functional IPC clusters.

---

**Acknowledgement:** This research was supported by a grant (SC11011) from Stem Cell Research Center of the 21st Century Frontier Research Program funded by the Ministry of Science and Technology, Republic of Korea.

## P-25    Gamma-Irradiation과 Mitomycin C처리된 영양세포가           인간 배아줄기세포 배양에 미치는 영향

김은희<sup>1</sup> · 지애리<sup>1</sup> · 안희진<sup>1</sup> · 오선경<sup>1,2</sup> · 백선하<sup>3</sup> · 문신용<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 의과대학 의학연구원 인구의학연구소, <sup>2</sup>산부인과학교실, <sup>3</sup>신경외과학교실

**Background & Objectives:** Irradiation은 세포의 성장을 억제하는데 지금까지 널리 사용되어온 방법 중의 하나이다. 그러나 기기사용자가 방사선에 피폭될 가능성이 있기 때문에 안전관리와 사용을 위해 특정한 교육을 받아야 한다는 단점이 있다. Mitomycin C는 항암제의 하나으로써 DNA 합성을 차단하여 세포성장을 억제시킨다. 배양기간 동안 배아줄기세포가 미분화된 상태를 유지하기 위해 필요한 영양세포의 성장을 억제시키는 이들 두가지 방법이 인간 배아줄기세포 배양에 미치는 영향을 비교 분석하였다.

**Method:** 영양세포는 STO (CRL-1503, ATCC)를 사용하였으며, 인간 배아줄기세포는 SNUhES3을 이용하였다. STO 세포의 성장억제를 위해 40 Gy (Gray)의 gamma-irradiation을 하거나 mitomycin C (0, 5 mg/ml)를 2시간반 동안 처리해 주었다. 인간 배아줄기세포의 성장을 측정하기 위해서는 세포군집의 면적을 비교하였으며, 그들의 미분화상태를 확인하기 위해 Oct-4, TRA 1-60, SSEA-3 그리고 SSEA-4에 각각 해당하는 항체로 면역염색을 하였다. 면역형광의 강도와 비율분석에는 confocal laser scanning microscope과 flow cytometer가 사용되었다.

**Results:** 인간 배아줄기세포의 형상은 두 군간에 차이를 보이지 않았다. 군집의 면적변화를 이용해 성장비율을 분석한 결과 인간 배아줄기세포들을 새로운 배양접시로 옮기는 7일째 되는 날에는 두 군 모두에서 3일째된 날과 비교해 같은 면적 증가비율을 나타냈다. 또한 Oct-4, TRA 1-60, SSEA-3, SSEA-4 등 배아줄기세포에서 발견되는 여러가지 미분화 인자들의 발현을 분석한 결과 두 군 모두에서 전사인자인 Oct-4가 핵과 일치하는 위치에 다량 발현되는 것을 관찰하였다. 또 다른 배아줄기세포 특유의 인자인 SSEA-3, SSEA-4와 TRA 1-60도 역시 강하게 발현되는 것을 두 군 모두에서 확인할 수 있었다. 또한 flow cytometer를 이용해 위와 같은 인자들의 발현 정도를 분석한 결과 Oct-4, TRA 1-60, SSEA-3 그리고 SSEA-4가 confocal laser scanning microscope에서 관찰된 결과와 유사한 정도를 나타내고 있음을 확인하였다.

**Conclusions:** SNUhES3는 Mitomycin C를 처리해준 STO 세포와 gamma-irradiation된 STO 세포위에서 모두 같은 성장 정도를 나타냈으며 배아줄기세포 특유의 인자들이 모두 같은 발현양상을 보여 인간 배아줄기세포가 배양기간 동안 미분화된 상태로 유지되는 것을 보여줄 수 있었다. 따라서 번거로운 irradiation 과정을 거치지 않고 수행될 수 있는 Mitomycin C처리 방법이 영양세포의 성장을 적절히 억제시키고 인간 배아줄기세포의 지지역할을 할 수 있는 적합한 방법임을 확인할 수 있었다.

**Acknowledgement:** 위 연구는 과학기술부 21세기프론티어 연구개발사업단인 세포융용연구사업단의 연구비 지원 (SC11040, SC11011)에 의해 수행되었습니다.

## P-26 Proliferation Rate and Differentiation Potential During Extended Culture of Human Embryonic Stem Cells

Park YB<sup>1,2</sup>, Huh WJ<sup>2</sup>, Seol HW<sup>2</sup>, Kwon HJ<sup>2</sup>, Kim HS<sup>2,3</sup>,  
Oh SK<sup>2,3</sup>, Chung SG<sup>1</sup>, Moon SY<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute, Sam Jin Pharm. Co. LTD., <sup>2</sup>Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, <sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University

**Background & Objectives:** Many studies demonstrated human embryonic stem cells as a promising target for novel strategies in the cell therapy because of its pluripotentiality and infinite proliferative ability. But we encountered changes in proliferation rate and differentiation potential during extended culture of hESC. Thus, we investigated proliferation rate and differentiation potential of successively subcultured hESC.

**Method:** The hES cell line (SNUhES3) established at Seoul National University was used to determine