

in vitro. Treatments of FGF2 and BMP2 had increased the expression level of cardiac specific markers in cells compared to that of untreated cells.

Conclusions: In this study, we demonstrate that hESC can differentiate into cardiomyocytes in vitro. They differentiate into beating cells and express cardiomyocyte specific genes. Also, treatment with growth factors appear to increase expression level of cardiac specific genes.

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

P-29 다양한 인간 배아줄기세포주에서 미분화 및 분화 관련 유전자 발현의 특이성

신현상¹ · 조재원¹ · 임천규¹ · 신미라¹ · 방경희¹ · 윤현수³ · 궁미경² · 전진현¹

¹성균관의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실,

²산부인과, ³미즈메디병원 의학연구소

Background & Objectives: 인간 배아줄기세포는 유전적 요소, 미분화 유지 조건에 따라 미분화 상태를 유지하는 능력 (stemness)과 분화능력 (differentiation potential)에 있어 각각의 세포주마다 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 서로 다른 인간 배아줄기세포주의 특이성을 확인하기 위해 배아줄기세포의 미분화 및 분화 표지유전자의 발현양상을 살펴보았다.

Method: 다섯가지 종류의 인간 배아줄기세포주 (SCH-1, SCH-2, Miz-1, Miz-4, Miz-6)를 MEF 또는 STO feeder layer와 공배양하여 미분화 colony, 분화된 colony, 8일간 부유 배양한 배아체 (embryoid body)로부터 RNA를 추출하여 역전사중합효소반응법 (RT-PCR)으로 cDNA를 합성한 후 실시간 중합반응법 (real-time PCR)을 수행하였다. 표지유전자로는 Oct4, Nanog, Sox2, EBAF (LeftyA), Thy1, FGF4, Rex1 등과 같은 미분화 유지 유전자와 Enolase (mesoderm), Alpha-fetoprotein (endoderm), Nestin (ectoderm) 등 삼배엽 분화 유전자를 선정하여 GAPDH에 대한 상대정량법으로 발현 양상을 분석하였다.

Results: 미분화 또는 분화과정에서 대표적인 미분화 표지 유전자인 Oct4와 Nanog 발현양상은 모든 세포주에서 유사하였지만, Sox2, EBAF, FGF4는 각각의 세포주에서 상이하게 발현되었다. 두 종류의 줄기세포주에서는 미분화 유전자로 알려진 Thy1과 Rex1 유전자의 발현이 분화과정에서 증가하는 양상을 나타내었다. 삼배엽성 유전자 중 Nestin은 미분화 colony, 분화 colony, 배아체 모두에서 유사하게 발현되었으며, Alpha-fetoprotein은 배아체 형성 후에 그 양이 유의하게 증가하였다 ($p<0.01$). 중배엽성 유전자인 Enolase는 세 종류 세포주의 분화 colony와 배아체 형성과정에서 발현양이 유의하게 증가됨을 관찰하였다 ($p<0.05$).

Conclusions: 이상의 연구결과로 보아 미분화상을 유지하고 분화능에 관련된 유전자의 발현은 각각의 인간 배아줄기세포주마다 다소 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 차이는 유전적 요소와 줄기세포의 확립 과정 및 배양 조건이 각 세포주마다 차이가 있기 때문으로 사료된다. 따라서, 보다 최적화되고 표준화된 인간 배아줄기세포의 체외배양법이 지속적으로 개발되어야 하며, 각각의 배아줄

기세포주의 분화 특성에 맞는 유도 분화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Acknowledgment: 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC12022)으로 수행되었습니다.

P-30 인간 배아줄기 세포로부터 분화된 세포에서 MACS를 이용하여 분리한 세포주의 특성에 대한 연구

조재원 · 신현상¹ · 임천규¹ · 신미라¹ · 방경희¹
윤현수³ · 궁미경² · 전진현¹

¹성균관의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실,

²산부인과, ³미즈메디병원 의학연구소

Background & Objectives: 인간 배아줄기세포는 내배엽, 중배엽, 외배엽을 포함하는 삼배엽성의 배아체를 형성할 수 있으며, 이러한 삼배엽성 배아체는 growth factor나 cytokine, 유전자 발현 조절에 의해서 특정한 세포로 분화 유도될 수 있다. 본 연구에서는 분화된 인간 배아줄기세포를 magnetic cell sorting (MACS) system을 이용하여 분리한 후 RT-PCR 방법을 통하여 분리 배양된 세포의 특성을 규명하고자 하였다.

Method: 인간 배아줄기세포 (Miz-hESC4 cell line)는 mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder cell 위에서 DMEM/F12 배양액을 기본 배지로 사용하여 배양하였다. 배아줄기세포의 분화를 유도하기 위하여 부유배양법을 이용하여 삼배엽성의 배아체 형성을 유도하였다. 배아체는 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액에서 4주간 분화 유도되었으며, CD34 (hematopoietic progenitor), HEA (human epithelial antigen), fibroblast 등에 대한 항체를 이용한 MACS 방법으로 분리하였다. 분리된 세포는 각각 항체에 대한 양성과 음성 세포로 구분하여 4주 동안 DMEM-10%FBS 배양액에서 분화를 유도하였다. 분리 배양된 세포에서 분화 특이성 유전자들에 대한 RT-PCR 분석을 통해 그들의 특성을 규명하였으며, phase contrast image를 통해 형태학적인 변화를 관찰하였다.

Results: 분리된 세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과 CD34 양성 세포는 배양 초기에는 작은 구형이었으나, 배양 후기에는 그 크기가 커지고 편평한 형태의 세포로 관찰되었다. HEA 양성 세포는 크고 넓적한 형태로 나타났으며, fibroblast 양성 세포는 길고 길쭉한 방추체 형태를 띠는 것으로 관찰되었다. 또한, RT-PCR 결과 CD34 양성 세포는 배양 초기에는 α -fetoprotein, flk1, enolase, renin 유전자가 발현되었으며, 배양기간이 길어짐에 따라 gata4, lmo2, flk1, enolase, renin 유전자가 발현되는 것으로 나타났다. CD34 양성 세포의 배양기간에 따른 유전자 발현 양상의 변화는 hematopoietic lineage 세포의 변화와 유사한 것으로 생각된다. Fibroblast 양성 세포는 α -fetoprotein, lmo2, gata2, enolase 유전자가 발현되어 이들이 내배엽 및 중배엽 유래의 세포라는 것을 간접적으로 확인하였다. HEA 양성 세포는 특이하게도 내배엽 표지 유전자인 albumin이 발현되었으며, 외배엽 유래의 nestin, NF68kd 가 발현되는 것을 확인함으로서 분리 배양된 HEA 양성 세포가 내배엽과 외배엽 유래의 세포라는 것을 확인하였다.

Conclusions: 본 연구의 결과를 통해, MACS system을 이용하여 분리된 세포는 각각의 분리 항체에