

협부지방에서 성체 줄기세포의 분리와 골모 세포로의 분화

표성운 · 박장우* · 이일규** · 김창현

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, *가톨릭대학교 임상치과학 대학원 임프란트학과
**가톨릭대학교 대학원 통합의학전공

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:524-529)

DIFFERENTIATION OF ADULT STEM CELL DERIVED FROM BUCCAL FAT PAD INTO OSTEOBLAST

Sung-Woon Pyo, Jang-Woo Park*, Il-Kyu Lee**, Chang-Hyen Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea

**Department of Implantology, Graduate School of Clinical Dental Science, The Catholic University of Korea*

***Department of Integrative Medicine, Graduate school, The Catholic University of Korea*

For the repairing of bone defect, autogenous or allogenic bone grafting remains the standard. However, these methods have numerous disadvantages including limited amount, donor site morbidity and spread of diseases. Tissue engineering technique by culturing stem cells may allow for a smart solution for this problem. Adipose tissue contains mesenchymal stem cells that can be differentiate into bone, cartilage, fat or muscle by exposing them to specific growth conditions. In this study, the authors procured the stem cell from buccal fat pad and differentiate them into osteoblast and are to examine the bone induction capacity.

Buccal fat-derived cells (BFDC) were obtained from human buccal fat pad and cultured. BFDC were analyzed for presence of stem cell by immunofluorescent staining against CD-34, CD-105 and STRO-1. After BFDC were differentiated in osteogenic medium for three passages, their ability to differentiate into osteogenic pathway were checked by alkaline phosphatase (ALP) staining, Alizarin red staining and RT-PCR for osteocalcin (OC) gene expression. Immunofluorescent and biochemical assays demonstrated that BFDC might be a distinguished stem cells and mineralization was accompanied by increased activity or expression of ALP and OC. And calcium phosphate deposition was also detected in their extracellular matrix.

The current study supports the presence of stem cells within the buccal fat pad and the potential implications for human bone tissue engineering for maxillofacial reconstruction.

Key words: Tissue engineering, Stem cell, Buccal fat pad, Buccal fat derived cell, Osteoblast

I. 서 론

현대 사회는 사고 또는 재해로 인한 골조직의 손상이나 질병으로 인한 골결손이 많이 발생하게 되므로 이를 효과적으로 재생할 방법들이 요구된다. 골결손을 치료하기 위한 방법으로 자가골 이식과 동종골 또는 이종골 이식이 쓰이고 있다. 그러나 자가골의 사용은 골형성 측면에서는 효과적이나 공급에 한

계가 있고 채취 부위의 손상을 가져오며, 타가골의 사용은 질병의 전염, 감염과 제한된 골유도 잠재력을 갖고 있다¹⁾. 최근 세포배양 기술의 발전은 이러한 자가골과 타가골 사용시 제한을 극복할 해결책을 제시하고 있다. 즉 골재생을 촉진하기 위하여 조직공학적 치료기술의 사용에 관심이 증대되고 있다. 골조직을 재생하는 조직공학적 방법은 골절부 비유합의 처치, 골신장술과 안면 기형의 재건 등 구강외과, 정형외과 및 악안면 성형외과 등 다양한 분야의 임상에 적용할 수 있다. 임상적으로 사용 가능한 골을 형성하는 조직공학적 치료기술의 개발에는 줄기세포, 골형성 신호, 매트릭스(matrix)와 혈액공급이 필요하다²⁾.

따라서 골조직 재생공학에 이용할 수 있는 가장 적절한 줄기세포(stem cell)들을 찾는 것이 중요한 문제인데, 이런 줄기세포들은 면역 거부반응이나 이식 숙주반응이 없어야 하며 종양발

김 창 현

137-701 서울시 서초구 반포동 505

가톨릭대학교 강남성모병원 구강악안면외과

Chang-Hyen Kim

Dept. of OMFS, Kangnam St. Mary's Hospital, The Catholic Univ. of Korea

505 Banpo-dong, Seocho-ku Seoul, Korea, 137-701

Tel: +82-2-590-2602 Fax: +82-2-537-2374

E-mail: omfskim1@nate.com

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술 진흥사업 기능성 세포 치료제 개발(0405-DB01-0104-0006)지원에 의하여 이루어졌음.

생의 위험성이 없고, 필요한 때에 필요한 만큼 쉽게 이용할 수 있어야 한다². 예를 들어 인간 골수세포 (bone marrow cell)는 적당한 자극이 있을 때, 골, 연골, 근육과 건등 다수의 세포군으로 분화될 수 있는 간엽 줄기세포의 기원으로 잘 알려져 있다^{3,7}. 이러한 골수 기원의 간엽 줄기세포는 조직공학 분야에서 1차적인 선택이지만, 채취시 동통과 손상을 유발하고, 사용하기에는 너무 적은 수의 세포가 채취되는 임상적으로 사용에 문제가 있으며, 이를 극복하기 위해 때에 따라서는 배양을 통한 세포수의 확대가 필요하다. 이러한 이유로 연구자들은 다른 대안을 찾고자 노력하고 있다.

지방 조직은 골수와 같이 간엽 조직으로부터 기원 하며, 쉽게 분리되는 지지 간질조직(supporting stroma)을 함유하고 있다. Zuk 등은 지방 흡입술에서 얻어진 지방조직 내에서 줄기 세포의 가능성이 있는 세포군 (Processed lipo-aspirated cell)을 분리 배양하여 확인하였으며⁸, 이들은 다시 PLA세포를 계통 특이적 배지 (lineage specific media)를 이용하여 조골모 세포로 분화시켰다⁹. 그리고 Halvorsen 등은 사람의 지방 조직에서 얻어진 세포를 배양하여 지방 조직으로 분화할 수 있는 표지자 (marker)와 골조직으로 분화할 때 보이는 표지자와 경조직의 형성을 확인하였으며¹⁰, 또한 지방 조직에서 유래된 줄기세포를 이용하여 구개골 결손을 수복하는 실험도 성공적으로 수행되었다¹¹. 이러한 사실에 기초할 때, 지방 조직은 여러 분야에서 유용하게 사용될 줄기세포의 기원으로 생각할 수 있다.

협부지방은 턱얼굴의 발생과 더불어 생성되며, 무게가 9.3 g 정도, 평균적인 양은 9.6 ml로 일생에 걸쳐 일정하게 유지된다¹². 협부 지방은 구강내를 통한 채취가 용이하고 혈행 공급이 풍부하며, 결손부 형태에 맞게 쉽게 변형이 가능해 구강내 결손부 수복을 위한 조직 공여부로서의 가치가 높다. 또한 채취 후에도 안모 변형을 최소화할 수 있어 턱얼굴 영역의 결손부 재건에 자주 이용되어왔다^{13,14}.

신체의 다양한 조직에서 성체 줄기세포의 취득할 때에는, 최소의 불편감, 최소의 반흔과 부작용, 채득의 용이성 등이 필수적인 요건으로 간주되며, 따라서 협부지방은 성체 줄기세포를 이용한 조직공학에 있어 줄기세포의 훌륭한 공급원이라 하겠다. 이에 저자들은 협부지방 조직으로부터 줄기세포를 추출하고, 이를 골모 세포로 분화시켜 구강 및 악안면 골결손부의 재건을 위한 골재생 조직공학의 기반을 닦고자 이 연구를 시행하였다.

II. 방 법

본 연구에서 수행된 절차는, 가톨릭대학교 의과대학원의 IRB 승인을 얻었고, 세포 제공자에게 연구 목적이 고지된 동의서를 취득한 후 연구를 시행하였다.

1. 세포의 분리 및 배양

수술실에서 분리된 협부 지방조직을 1% antibiotic & antimy-

cotic (Gibco BRL, Grand Island, USA)이 포함된 PBS (Gibco BRL)에 담아 무균 상태를 유지하며 실험실로 운반하였다. 협부 지방조직을 항진균, 항세균제가 포함된 PBS로 세척하고 잘게 자르고 0.06% collagenase (Type I; Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)로 처리하여 37°C, 5% CO₂가 함유된 배양기 (Forma Scientific Inc, Marietta, USA)에서 12시간동안 진탕한 후, 1000 RPM으로 10분간 원심분리하고 침전물을 10% FBS (Hyclone, Logan, USA)과 1% P/S (Penicillin/Streptomycin; Gibco BRL)가 함유된 α -MEM (Minimum Essential Medium α ; Hyclone)에 부유시키고, 70 μ m cell strainer (BD Bioscience, Bedford, USA)로 걸러 협부 지방세포가 아닌 조직을 걸러내고 필터를 빠져 나온 용액을 배양기에서 배양하였다. 이후 매일 형태학적 특성을 도립현미경 하에서 관찰하였으며, 2일에 1회씩 배양액을 교환해 주었다. 세포가 90% 포화상태에 이르면 Trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 세포를 분리시킨 후, 3차례 계대배양 하여 협부 지방세포군 (BFDC; Buccal fat-derived cell)을 얻었다.

2. Investigation of cell marker by immunofluorescent staining

BFDC가 간엽 조직에서 비롯하는 성체 줄기세포로서의 역할 가능성이 있는 세포인지를 확인하기 위하여, hematopoietic stem cell marker인 CD34와 mesenchymal stromal cell을 선택하기 위해 사용되는 세포 표면항원인 CD105, STRO-1에 대한 면역 형광 염색을 수행하였다.

3회 계대배양 된 BFDC를 0.25% trypsin/ EDTA (Gibco BRL)로 분리하여 1 × 10⁵개씩 4-well chamber slide에 분주하고, 세포를 PBS로 3번 세척한 후, 3.7% paraformaldehyde solution (Merck-Schuchardt, Germany)으로 세포를 37°C 항온 배양기에서 30분 동안 고정시켰다. 고정액을 흡인하고 PBS로 두 번 세척하고, 비특이적 반응을 차단하기 위하여 1% blocking buffer를 넣고 37°C 항온 배양기에서 30분 동안 부란하였다. 1차 항체로 Anti-human CD34 (BD bio-science), Anti-human CD105 (Serotec Ltd, Oxford, UK)와 Anti-human STRO-1 (R&D system, USA)를 10 ug/ml의 농도로 가한 후, 1시간 동안 실온에서 부란하였다. 다시 PBS로 3번 세척하고 2차 항체 (Goat anti-mouse IgG-FITC; KPL, USA)를 1ug/ml의 농도로 가한 후, 실온에서 1시간 동안 부란하고, PBS로 3번 세척하고 형광현미경으로 세포를 관찰하였다.

3. 골분화 배지에서 골분화유도

3회 계대 배양된 세포를 osteogenic pathway로 가는 능력을 알고자 실험에 사용하였다. 분화를 유도하기 위해, BFDC를 12 well plate에 well당 2 × 10⁵개씩 분주하고 24시간 후에 기존의 배양액을 골분화 유도 배양액으로 교환하였다. 골분화 유도 배양액의 조성은 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% FBS, 0.1 uM Dexamethasone (Sigma), 10 mM glycerol phosphate

(Sigma), 50 uM L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma)이었다. 이 배양액을 3일에 1회씩 교환해주며 90%의 세포 포화도를 보일 때까지 배양하면서 도립현미경 하에서 형태학적 특성을 관찰하였다. 대조군 (일반 배지)과 실험군 (골분화 배지)로 각각을 나눠 배양하였다.

4. 조직화학적 염색

A. Alkaline phosphatase assay

골분화 표지자인 세포내 alkaline phosphatase 활성도를 염색법을 이용하여 분석하기 위하여 골형성 분화 배지에서 5×10^4 의 세포를 chamber slide에서 7, 14, 21일간 각각 배양하고, 멸균 3차 증류수로 세척한 후, ALP staining kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)을 사용하여 염색하였다. Citrate-Acetone-Formaldehyde 고정액에 30초간 담가 고정하고 탈이온수로 세척하였다. 슬라이드를 alkaline dye mixture에서 실온에서 15분간 부란하고 다시 세척한 후 Neutral Red solution으로 대조 염색하였다.

B. Alizarin red 염색

배양된 BFDC의 골형성 분화가 유도되어, 골이 형성되었는지 확인하기 위하여 세포외 기질의 석회화를 나타내는 Alizarin red 염색을 시행하였다. 골형성 분화 배지에서 5×10^4 의 세포를 chamber slide에서 7, 14, 21일간 각각 배양하고, 실온에서 10% formalin으로 30분간 고정하고, 멸균 3차 증류수로 세척한 후 2% alizarin red (Sigma-Aldrich)로 실온에서 30분간 염색하고 다시 멸균 3차 증류수로 세척하고 도립현미경으로 관찰하였다.

5. RNA/gene expression by RT-PCR

골형성 분화 배지에서 7, 14, 21일간 각각 배양하고 PBS (Gibco BRL)로 세척한 후 cell scraper (Sarsted, Inc, Newton, USA)를 이용하여 수확하고, QIAGEN RNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 RNA를 분리한 후 RT-PCR premix (Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 분리한 total RNA 5 μ g을 42°C에서 60분간 M-MuLV 역전사 효소를 이용하여 cDNA로 역전사한 후, primer쌍을 이용하여 증폭하였다. 사용한 primer의 서열은 forward 5'-ctg cat tct gcc tct ctg ac-3'와 reverse 5'-cta ttc acc acc tta ctg ccc-3'이며, 내부 내조군은 GAPDH를 사용하였다. PCR의 반응 조건은 94°C에서 5분간 변성한 후, 94°C 1분, 55°C 1분 30초, 72°C 1분간 30주기 실시하고 마지막 주기에서 72°C 5분간 연장하였다. 반응 산물은 2% agarose gel에서 전기영동 후 Ethidium bromide로 염색하여 UV lamp에서 확인하였다.

III. 결 과

1. 면역 형광염색 (Immunofluorescent staining)

BFDC의 특성을 파악하기 위해 CD marker의 profile을 검사하였다. BFDC의 표면에서 FITC-conjugated CD-34, CD-105, STRO-1 항체를 이용하여 염색한 후 각각의 발현 유무를 확인한 결과, CD-34의 발현은 나타나지 않았으나, 세포 표면에서 CD-105 및 STRO-1이 발현되는 양상을 보였다 (Fig. 1). 이것으로 BFDC가 줄기 세포로서의 가능성을 갖고 있는 것으로 생각할 수 있었다.

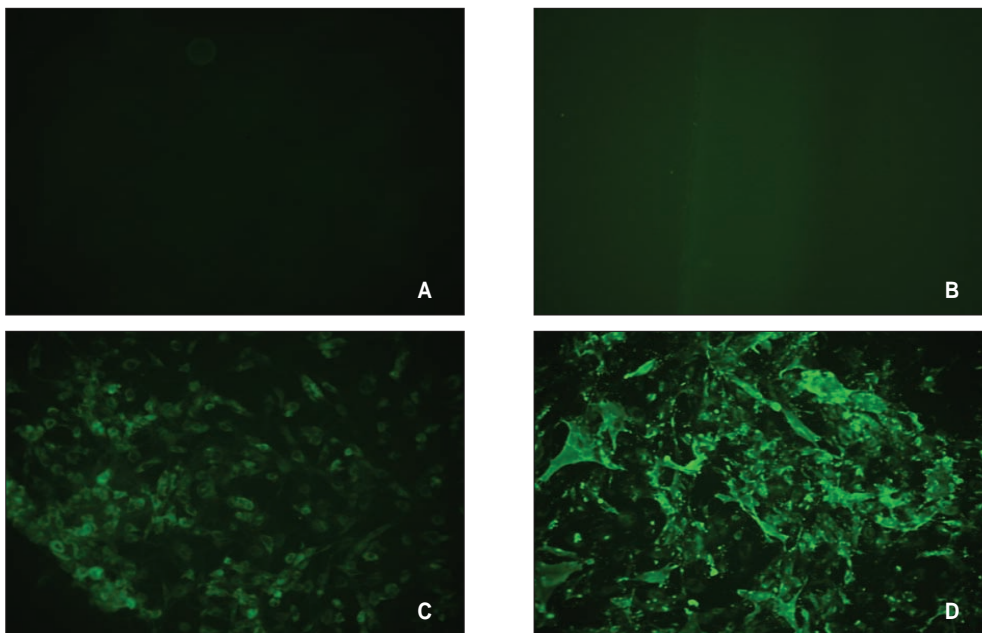


Fig. 1. Immunofluorescent staining of hematopoietic and mesenchymal stem cell markers expression in buccal fat pad driven stem cell ($\times 100$). A: No treat; B: Treatment of CD34 antibody; C: Treatment of CD105 antibody; D: Treatment of STRO-1 antibody.

2. Alkaline Phosphatase 염색

BFDC를 골형성 분화배지에서 배양하여 7, 14, 21일 경과 후 Alkaline phosphatase의 염색도를 파악한 결과, 14일째부터 뚜렷하게 염색되는 것을 확인하였으며 21일후에는 염색된 영역이 늘어나있으며, 염색의 정도가 진해졌음을 확인하였다 (Fig. 2). 따라서 alkaline phosphatase의 활성도가 있음을 확인할 수 있었으며, osteogenic pathway에서 골형성 가능성을 보였다.

3. Alizarin red 염색

골형성 분화 배지에서 배양한 BFDC는, 14일째부터 세포외 기질에서 석회화 기질의 발현 양상을 보이기 시작하였으며, 21일째에서 확연한 발현 양상을 보여, BFDC가 골유도 형성배지에서 골모 세포로 유도 분화되어 세포외 기질을 생산하고 이를 석회화하는 것이 확인되었다 (Fig. 3).

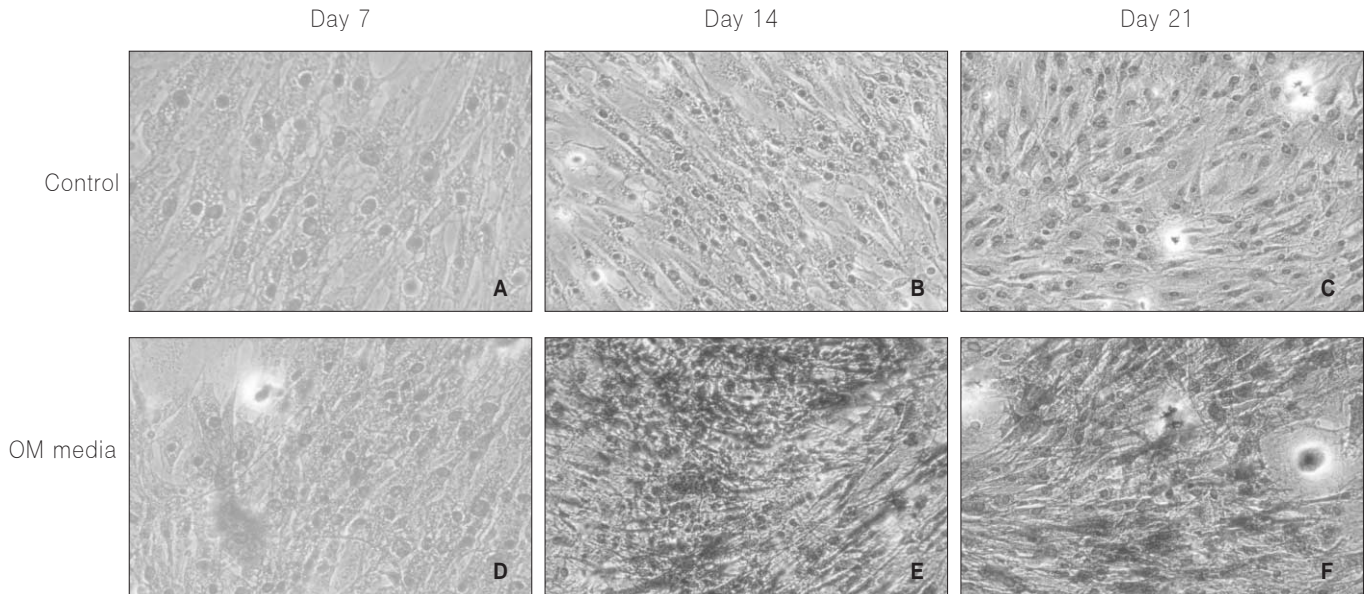


Fig. 2. Alkaline phosphatase staining result of buccal fat-derived cell ($\times 200$). A, B, C: control group, cultured in universal media after 7, 14, 21 days respectively. D, E, F: experimental group, cultured in osteogenic media after 7, 14, 21 days respectively.

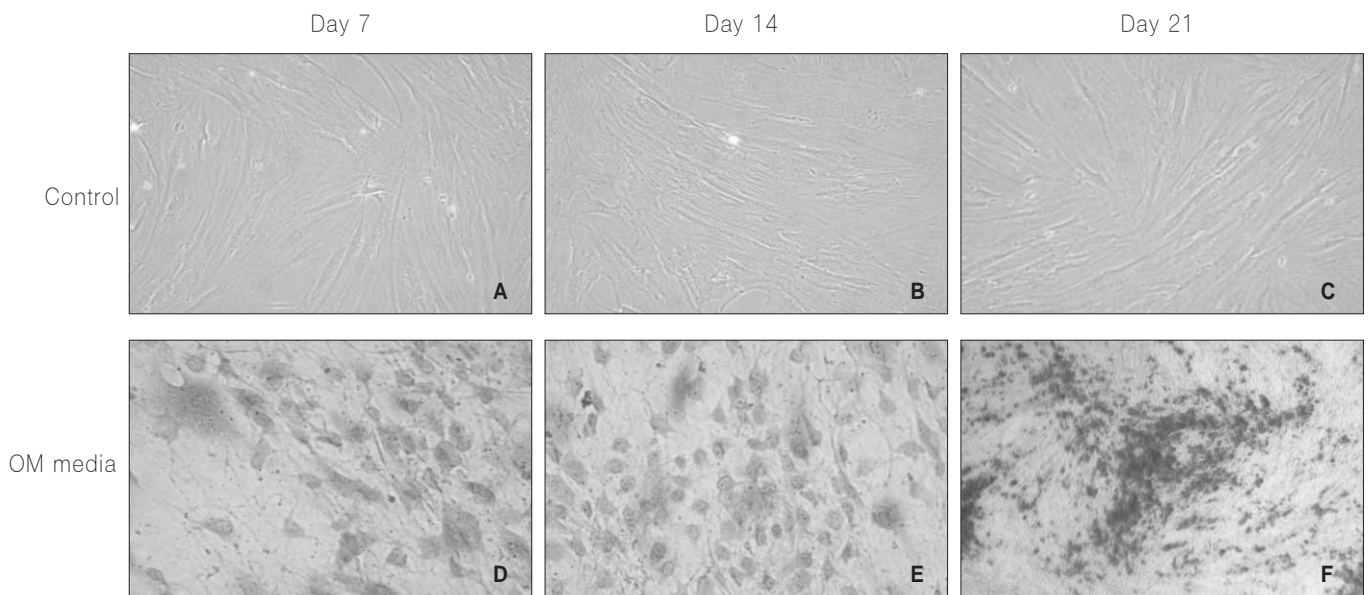


Fig. 3. Alizarin red staining result of buccal fat-derived cell ($\times 200$). A, B, C: control group, cultured in universal media after 7, 14, 21 days respectively. D, E, F: experimental group, cultured in osteogenic media after 7, 14, 21 days respectively.

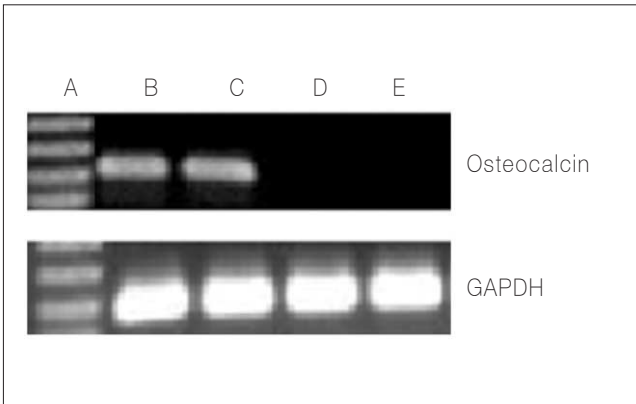


Fig. 4. Expression of osteocalcin (303kb) in buccal fat-derived cells after 21 days of culture in osteogenic media. Lane A: 1Kb Size marker; B and C: cultured in osteogenic media, D and E: cultured in universal media.

4. Osteocalcin 발현유무 확인

골형성 분화 배지에서 배양한 BFDC를 21일째에 수확하고 RNA를 분리하여 RT-PCR을 시행하여 유전자의 발현을 확인한 결과, osteocalcin을 encoding하는 많은 양의 유전자가 발현됨이 관찰되어, 골형성이 유도되고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

IV. 고 찰

인체 내에는 줄기 세포가 존재하고 이들은 적당한 환경의 영향아래에서 각기 다른 장기 및 조직으로 분화가 가능하며, 조직에 손상을 입었을 경우 반복 분열 및 자가 재생산을 통해 손상 부위를 복구하는 기능을 가지고 있다. 성체 간엽 줄기세포의 경우 적당한 자극을 통해 골, 근육, 연골 등으로의 분화가 가능하다^{8,15}. 최근의 연구에 의하면 지방세포에도 이러한 줄기 세포가 존재하며 지방으로의 분화뿐 아니라 뼈, 연골, 근육, 심장, 혈관 및 신경조직으로의 분화가 가능함이 보고되었다^{10,16}.

이번 연구에서는 협부지방에서 추출한 BFDC에서 간엽 줄기 세포의 표지자로 알려진 STRO-1에서 양성반응을 보여 BFDC 내에도 줄기세포가 존재하고 있음을 알 수 있었으며, 반면 조혈모세포의 표지자로 알려진 CD34에서는 음성반응을 보인 것으로 보아 조혈모세포계 줄기세포가 아닌 간엽 줄기세포계통의 줄기세포임을 확인하였다(미발표 결과).

또한 협부지방에서 비롯된 줄기세포들이 적당한 배양 조건에서 골모 세포로 분화하여 세포의 기질을 석회화할 수 있음을 보여주었다. 간엽 줄기세포가 분화하여 골모 세포로의 표현 형질을 보이는 것은 dexamethasone, ascorbic acid 와 P-glycerol phosphate를 함유한 성장 배지에서 유도될 수 있다¹⁷. 이번 연구의 결과는 BFDC를 골형성 유도 배지에서의 배양을 통해 골모 세포 표현 형질의 표지자인 alkaline phosphatase (ALP)의 활성도가 나타남을 보여 주었고, 골 생성 과정 중에서 분비되는 단백

질인 osteocalcin (OC)의 발현을 RT-PCR을 통해서 관찰할 수 있었다.

골의 생성과정은 기질이 분비되는 증식, 기질의 성숙, 기질의 석회화의 세단계로 이루어지며⁴, 각 단계에 따라 다른 유전자가 표현된다. 첫 번째 단계인 증식에서는 세포의 복제, 성장, 성숙, 세포의 기질의 발생 등이 일어나며, 골유도시에 가장 먼저 생성되는 제 1형 교원질(type I collagen)이 나타난다. 제 1형 교원질은 미래의 석회화가 일어날 세포의 기질의 토대가 된다. 두 번째 단계인 기질의 성숙에서는 ALP, Osteopontin (OP)과 Osteonectin (ON)등의 골형성 표지자가 나타난다. ALP는 세포막에 붙어있는 효소로서 골형성의 초기에 풍부하게 나타난다¹⁷. 저자들은 골형성의 증거로 ALP staining을 사용했고, 골분화 유도 배지에서 배양 14일차에서 염색이 나타나기 시작했으며, 21일차에는 염색된 영역이 확대되었으며 시간이 지날수록 짙은 염색이 나타났다. 또한 이 실험에서 Alizarin red로 칼슘을 염색하여 세포의 기질의 석회화를 파악했으며, Alizarin red로 염색하였을 때 21일차부터 발현되기 시작하였다.

마지막 단계인 기질의 석회화에서는 원시 세포가 골화의 단계로 들어서게 된다. Von Kossa 염색, Sulfobromophthalein (BSP), OC 등의 많은 표지자들이 이 단계에서 특징적으로 나타난다. Von Kossa 염색은 석회화된 세포의 기질에 특징적으로 나타난다¹⁹. BSP는 석회화 세포에서만 생성되는 골 표지이며, 교원질에 결합하는 것으로 나타났다. 또 BSP는 실험실에서 nucleate hydroxyapatite를 형성하며, 제 1형 교원질을 활발히 석회화시키는 세포에서만 나타났다²⁰. OC는 골모 세포에서 분비되는 표지자이며, 최종 골모 세포분화의 신호이다²¹. RNA를 분리하여 RT-PCR을 시행하여 유전자의 발현을 확인한 결과, OC를 encoding하는 많은 양의 유전자가 발현됨을 확인하여 골형성이 유도되고 있음을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과에서 볼 때 세포의 기질의 석회화는 골수 줄기세포에만 국한되는 것은 아니며, 이번 실험에서 사용된 BFDC에서도 가능하며, vascular pericyte에서도 가능하다²². 그러나 이 연구를 통해 저자들은 협부 지방조직에서 지지조직으로부터 지방을 분리하고 줄기세포의 추출할 때, 혈관, 혈액과 결합조직의 혼합될 수 있으며, 이런 조직들로부터 줄기세포가 같이 추출될 가능성이 있으므로 이를 최소화하거나 세포 분류 (cell sorting)와 같이 정제하는 작업이 필요하다고 생각되었다.

전술한 바와 같이 이미 여러 문헌에서 지방 조직에서 줄기세포를 유도하여 이를 분화시켰다^{8,10}. 본 연구는 지방 조직 중 구강 및 턱얼굴 분야에서 익숙한 협부 지방을 줄기세포의 자원으로 사용하였다. 향후 임상적으로 직접적으로 적용하기 위해서는 *in vivo* 동물 모델에서 사용에 대한 연구와 이종 세포의 사용에 대한 연구가 필요할 것이다. 동물 모델의 사용은 가변성과 임상 적용에 적합하지 않을 수 있다는 비판을 받을 수 있다. 그러나 논리적인 실험과정의 전개와 배경을 적용한다면 임상 적용에 더 상응하는 가치가 있을 것이다²³.

현재까지 이종 기원의 세포 (allogenic cell source)의 사용에 관한 연구는 거의 없다. Nathan 등은 비록 골막세포를 사용하였으

나, 이종 기원 세포의 사용에서 거부반응이 발현되는 경우가 매우 낮아 항원성을 거의 발견치 못하였다고 보고한 바 있다²⁴. 이종 기원의 줄기세포의 사용이 자가 기원의 줄기세포의 사용보다 채취시의 비용, 채취부위의 준비등 여러 가지 면에서 매우 유용함은 분명하다²⁵. 따라서 이에 필요한 연구도 준비해야 할 것이다.

V. 결 론

이 연구를 통하여 협부 지방조직은 손상된 골의 재생을 위한 줄기세포 공급원으로서 사용이 가능함을 확인하였다. 또한 골형성 분화배지는 BFDC이 골모 세포로의 분화에 있어 중요한 작용을 하는 것으로 밝혀졌다. 향후 조골모 세포로의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있는 골형성 단백질과 다른 인자의 처리를 통하여 골분화 능력의 가속 가능성과 그 결과를 확인하는 연구가 더 진행되어야 할 것이라 생각하며, 협부지방과 타 지방세포와의 차이점에 대한 연구도 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Goldberg V, Stevenson S, and Shaffer J: Biology of autografts and allografts. In: G. E. Friedlaender and V. M. Goldberg (Eds.). Bone and Cartilage Allografts: Biology and Clinical Applications. Park Ridge 1991:3-12.
2. Jason L, Dragoo J, Choi Y, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, et al: Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 2003;21:622-629.
3. Wakitani S, Saito T, Caplan AI: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18:1417.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
5. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295.
6. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC: Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am Surg* 1995;61:231.
7. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG: Bone formation in vivo: Comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997;63:1059.
8. Zuk PA, Zhu M: Multi-lineage cells from human adipose tissue:

implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.

9. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
10. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM: Adipose-derived stromal cell-their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:41-44.
11. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, et al: Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:857.
12. Stuzin JM, Wagstrom L, Kawamoto HK, Baker TJ, Wolfe SA: The anatomy and clinical applications of the buccal fat pad. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:29-37.
13. Dean A, Alamillos F, Garcia-Lopez A, Sanchez J, Penalba M: The buccal fat pad flap in oral reconstruction. *Head Neck* 2001;23:383-388.
14. 이동수, 김진수, 이상한, 장현중, 최재갑, 기우천: 구강점막 결손 재건시 유경 협지방대 이식술의 임상적 적용. *대한약성외지* 20:185-192, 1998.
15. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101-109.
16. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F: Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:763-769.
17. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-430.
18. Ljunghall S, Lindh E: Assessment of bone turnover with biochemical markers. *J Intern Med* 1989;225:219-220.
19. Puchtler H, Meloan SN: Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry* 1978;56:177-185.
20. Chen J, Shapiro HS, Sodek J: Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res* 1992;7:987-997.
21. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE: Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555-572.
22. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE: vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1998;13:828-38.
23. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Goh J, Lee EH: Cell-based therapy in the repair of osteochondral defect: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* 2003;9:733-44.
24. Hu, JHP, Chen F, Chan J, Chong SW, Nathan S, Lee EH: A comparative study of efficacy of cultured periosteum-derived mesenchymal stem cells, chondrocytes, osteochondral autograft, fat-derived mesenchymal stem cells on the repair of full thickness defects in articular cartilage. *Proc Br Orthop Res Soc Meeting, Leeds, April 8, 2002.*
25. 원영준: 성인 간엽 줄기세포를 이용한 골조직공학. *대내분비지* 20:425-433, 2005.