

인간 조혈모 줄기세포의 냉동보존에 미치는 항산화제의 영향

김응배 · 홍순갑 · 도병록¹ · 김경숙² · 이준영[†]

충북대학교 생명과학부, ¹휴림바이오셀 생명공학연구소, ²코어스템

Effects of Antioxidants Treatment on the Cryopreservation of Human Hematopoietic Stem Cells

Eung Bae Kim, Soon Gab Hong, Byung-Rok Do¹, Kyung Suk Kim² and Joon Yeong Lee[†]

Dept. of Life Science, Chungbuk National University, ChoengJu 361-763, Korea

¹Bioengineering Institute, Hurim Biocell Inc., Seoul 153-023, Korea

²Corestem Inc., Cheongwon-gun 363-792, Korea

ABSTRACT : Oxidative damage resulted from reactive oxygen species (ROS) is one of the main causes for the decrease of the viability during *in vitro* culture and cryopreservation process. This experiment was performed to determine the effects of antioxidants on the human hematopoietic stem cell (HSC) during cryopreservation procedure. HSCs cultured *in vitro* with or without antioxidants were frozen and then examined for stem cell potential after thawing. The cell viability of thawed HSC was increased in α -tocopherol and ascorbic acid treatment group compared to control group (62.7±8.0%) and it was higher in 150 μ M α -tocopherol treatment group (70.5±7.0%). No significant difference was observed in the membrane integrity in all groups. In auto-differentiation rate, no significant difference was appeared in all groups, but was lower in 150 μ M α -tocopherol (7.3±2.6%) compared to control group (10.1±1.6%). These results demonstrate that treatment of antioxidants improves the efficiency of cryopreservation for HSC and α -tocopherol may be considered effective antioxidant for the protective effect on HSC.

Key words : HSC, Antioxidant, ROS, Ascorbic acid, α -tocopherol, Viability.

요 약 : Reactive oxygen species (ROS)에 의한 산화적 손상은 냉동보존 과정과 체외 배양과정 중 세포 생존률 감소의 주된 요인 중 하나이며, 특히 줄기세포의 경우 냉동보존 후 쉽게 분화하거나 사멸하는 경향이 있음이 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구는 체외 배양된 인간 조혈모 줄기세포의 냉동보존 시 선별된 항산화제를 처리하여 항산화제가 줄기세포의 생존 및 자동분화에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 해동 후 세포의 생존률은 α -tocopherol과 ascorbic acid 처리군이 대조군(62.7±8.0%)에 비해 높은 생존률을 보였고, 그 중 150 μ M α -tocopherol 처리군(70.5±7.0%)이 가장 높은 생존률을 보였다. 세포막 손상은 대조군 및 실험군 모두에서 나타나지 않았다. 자동분화율에 있어서는 모든 실험군에서 대조군(10.1±1.6%)과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 150 μ M α -tocopherol (7.3±2.6%) 처리군에서 가장 낮은 자동분화율을 나타내었다. 본 실험의 결과, 항산화제는 인간 조혈모 줄기세포 냉동보존 시 생존율을 향상시키며, 특히 α -tocopherol은 인간 조혈모 줄기세포의 냉동보존 과정 동안 효과적인 항산화제로 작용할 것이라 생각된다.

서 론

냉동보존 기술은 세포, 조직 및 기관을 안전하게 보관하기 위한 목적뿐만 아니라 멸종 위기에 있는 동·식물의 생식세포

및 세포의 보관 등 다양한 목적으로 사용되고 있다. 그러나 냉동보존은 세포막에 산화적 스트레스, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 또는 자유라디칼(free radical)에 의한 물리화학적 스트레스를 야기한다. 냉동보존 후 해동에 따른 막손상 및 단백질 구조변형은 과도한 ROS 발생으로부터 일어난다고 보고되었다(Fujino et al., 2000; Okamoto et al., 2004; Asha et al., 2005). 줄기세포는 냉동보존이 쉽지 않아,

[†] 교신저자: 충북 청주시 흥덕구 개신동 산48, 충북대학교 자연과학대학 생명과학부, (우) 361-763, (전) +82-43-261-2294, E-mail: leejy@chungbuk.ac.kr

해동 후 쉽게 죽거나 계대배양과정 동안 줄기세포의 특성을 잃고 분화되는 경향을 나타낸다.

세포의 항산화적 방어기작은 glutathion peroxidase, catalase, superoxide dismutase와 같은 효소성 항산화제와 glutathione, cysteamine 등의 thiol 화합물, selenium, 비타민, polyphenol 등과 같은 비효소성 항산화제 등의 작용을 통해 이루어진다. 가장 보편적으로 사용되고 있는 비효소성 항산화제에는 비타민 A, C, E 등이 있다. 비타민 A의 복강 내 투여는 포배의 체외 발생능력을 향상시킬 뿐 아니라, 적어도 체외배양 2일 동안에 냉동보존의 해로운 영향을 감소시킬 수 있음이 보고되었다(Babaei et al., 2006). 소 난자의 체외성숙 배양액에 retinol의 첨가는 heat-stress나 O₂-stress로부터 난자를 보호하여 포배로의 발달을 향상시키는데, 이것은 세포 외 환경에서 발생하는 유해한 환경요인으로부터 난자를 보호하기 위한 retinol의 항산화적 작용이 일어남을 시사하고 있다(Lawrence et al., 2004; Livingston et al., 2004). 제초제인 paraquat는 동·식물에서 모두 전자전달계를 교란하여 ROS 생성을 야기하고 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 생쥐 배아줄기세포의 체외배양 시 전자전달계 교란물질인 paraquat의 처리는 미분화 줄기세포 표지인 alkaline phosphatase 활성의 변화를 일으키진 않지만 세포의 생존률 감소와 ROS 생성을 2배로 증가시킴이 보고되었고, ascorbic acid를 함께 처리할 경우 배아줄기세포의 생존률과 ROS 생성도가 대조군과 유사한 값으로 회복됨이 보고되었다(Perla et al., 2008). 냉동보존액에 α -tocopherol의 첨가는 산화적 손상으로부터 정자 세포막을 보호하고 생존 및 운동성을 향상시킴이 보고되었다(Satorre et al., 2007). 토끼에게 일상적으로 항산화제인 α -tocopherol과 ascorbate를 투여한 후 정액을 수집하여 24시간 5°C의 저온에서 저장한 경우, α -tocopherol 투여군에서 정액 내 비타민 E의 함량이 증가하였다. 그러나 단일 ascorbate 투여군에서는 비타민 E의 함량이 감소하였으나, α -tocopherol과 ascorbate 혼합 투여군에서는 α -tocopherol 투여군에서보다 정액 내 비타민 E 함량이 더욱 많이 증가되었다. 이러한 혼합투여군의 공동 상승작용은 정자의 생존, 운동성, 번식력 증가로 나타났다(Castellini et al., 2000).

냉동보존에 있어서도 항산화제가 첨가된 냉동보존액의 사용이 정자의 세포막 보호 및 운동력, 수정능력 향상을 유도함이 보고되어 있으며(O'Flaherty et al., 1997; Breininger et

al., 2005), 항산화제가 투여된 생쥐의 포배는 냉동보존 후 체외배양 동안 포배의 발생능력이 향상되고 냉동보존에 따른 해로운 영향이 극복됨을 보고하였다(Babaei et al., 2006). 또한, 체외배양 과정은 과도한 산소와 빛에 노출되므로 다량의 ROS 생성을 유발한다고 알려졌다(Nakayama et al., 1994; Luvoni et al., 1996). 그러므로 배양액에 항산화제의 첨가는 배아의 발생능력이거나 줄기세포의 생존력, 증식력을 향상시키기 위한 선행조건이 되고 있다.

따라서 본 실험은 알려진 4종의 항산화제의 처리가 조혈모 줄기세포의 계대배양 및 냉동보존에 어떤 영향을 미치는지 확인하고 줄기세포의 최적 배양 및 냉동보존에 가장 효과적인 항산화제를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포

코어스텝(주)으로부터 공급받은 인간 조혈모 줄기세포를 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

세포배양은 75 mL 플라스크 배양용기에 2×10^5 개의 세포를 접종하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 습윤한 배양기에서 배양하였다. 배양액은 10% FBS (Gibco), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin이 첨가된 DMEM-L (Gibco)을 사용하였으며, 배양용기에 세포가 80~90% 정도 증식하였을 때 계대배양을 시행하였다. 계대배양은 배양중인 세포를 Ca²⁺-free Hank's bicarbonate solution (HBS, Gibco)로 세척한 후 2 mL TrepLe (Gibco)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 습윤한 배양기에서 2분간 처리하였고, 배양용기 바닥으로부터 세포가 90% 이상 분리된 것을 현미경을 통해 확인한 후 10 mL의 배양액을 첨가하여 400 g로 5분간 원심 분리 하였다. 상층액 제거 후 1 mL의 배양액을 첨가하여 현탁시켜 세포수를 측정하고, 75 mL 배양용기 당 2×10^5 개의 세포를 접종하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 습윤한 배양기에서 배양하였다.

3. 항산화제(Antioxidant) 처리

항산화제는 4종(ascorbic acid, coumarine, sodium selenite, α -tocopherol)을 선정하였으며, 줄기세포의 배양 및 냉동보

존에 가장 효과적인 항산화제와 최적농도를 조사하고자 하였다. 실험에 사용된 각 항산화제의 처리농도는 0.1~1 mM ascorbic acid (Sigma), 10~100 uM coumarine (Sigma), 1~20 uM sodium selenite (Sigma), 10~300 uM α -tocopherol (Sigma)를 사용하였다. 줄기세포는 각각의 항산화제가 함유된 DMEM-L 배양액에서 12시간 체외배양한 후 냉동보존하였다.

4. 냉동보존 및 해동

항산화제가 처리된 세포의 냉동보존은 DMEM-L에 5% DMSO, 10% FBS가 함유된 냉동보존액을 사용하여 실시하였다. 회수된 줄기세포는 냉동보존액 첨가 후 현탁시켜 10분간 방치하였고, 2 mL의 cryovial당 5×10^5 /mL개의 세포를 넣어 isopropyl alcohol이 채워진 cryogenic container (Nalgene)에 옮긴 후 -80°C 초저온 냉동고에 넣어 2시간 동안 방치하였고, 이후 -196°C 액체질소가 담긴 저장탱크로 옮겨 보관하였다. 냉동보존된 줄기세포의 해동은 37°C 항온수조에 급속 해동하였다. 해동된 줄기세포는 400 g에서 5분간 원심분리하여 냉동보존액을 제거한 후 1 mL의 배양액을 첨가하여 다음 실험을 위해 배양기 속에 보관하거나, 10% FBS (Gibco), 100 U/mL penicilin, 100 mg/mL streptomycin를 첨가한 DMEM-L 배양액을 사용하여 배양용기 당 2×10^5 개의 세포를 접종하여 37°C , 5% CO_2 가 공급되는 습윤한 배양기에 배양하였다.

5. 세포생존률 측정

냉동보존된 줄기세포의 생존률은 0.4% Trypan Blue (Gibco)를 사용하여 측정하였다. 냉동보존된 줄기세포를 해동 후 원심분리하여 냉동보존액을 제거하고 배양액 1 mL를 첨가하였다. 줄기세포 현탁액은 trypan blue 용액과 1:4의 비율로 혼합하여 5분 동안 방치한 후 hemocytometer를 이용하여 줄기세포의 생존률을 측정하였다. 줄기세포의 생존률은 총 8회 이상의 반복측정하였다.

6. 세포의 형태 및 세포막 손상측정

세포의 형태 및 세포막 손상은 LIVE/DEAD assay kit (Molecular Probe)를 사용하여 관찰하였다. 냉동보존 후 해동된 줄기세포는 2 uL/cm^2 의 cell adhesive solution (BD, Cell-Tak)으로 코팅된 커버글라스가 바닥에 부착된 배양접시(SPL)에

2.5×10^3 개의 줄기세포로 접종하여 배양하였다. 배양 12시간 이내에 배양액을 제거하고 0.5 ug/mL calcein/AM, 2 uL/mL ethidium homodimer, 2 ug/mL Hoechst 33342 (Sigma)을 DMEM-L 배양액에 첨가하여 37°C , 5% CO_2 가 공급되는 습윤한 배양기에서 30~45분간 염색하였다. 염색 후 PBS로 2~3회 세척된 세포에 2.5% glutaraldehyde가 첨가된 PBS를 첨가하여 빛이 차단된 5°C 냉장실에서 30분간 고정한 후 상층액을 제거하였고 glycerol과 PBS를 1:1 비율로 혼합한 액체를 커버글라스가 충분히 잠기도록 첨가한 뒤 공초점 현미경(Leica, TCS SP@ AOBS)으로 검정하였다.

7. 세포 자동분화율 측정

해동 후 세포의 자동분화율 측정을 위해 배양 중인 세포가 배양접시내 80% 정도 증식하였을 때 배양접시의 상층액을 제거하고 Diff-Quik stain kit (Sysmex)을 사용하여 염색하였다. 상층액이 제거된 배양접시에 고정액을 1 mL 첨가하여 15초간 고정시킨 후 Diff-Quik solution I 과 II 1 mL를 각각 1분 30초간 처리하여 염색한 후 수세하여 광학현미경으로 세포를 관찰하였다. 현미경 시야에서 관찰되는 실험은 3회이상 반복하여 측정하였다. 총 세포수와 형태적으로 변형된 세포수를 각각 계수하여 분화율을 계산하였다.

8. 통계처리

실험결과와 통계적 유의성은 Student *t*-test를 사용하여 검정하였다.

결 과

1. 항산화제 처리에 따른 줄기세포의 생존률

항산화제의 처리가 줄기세포의 생존률에 미치는 영향은 다음과 같았다(Table 1). Ascorbic acid는 모든 처리농도에서 항산화제를 처리하지 않은 대조군($61.0 \pm 5.0\%$)에 비해 높은 생존률을 보였으며, 특히 0.1 mM 처리군에서 $69.2 \pm 19.0\%$ 로 가장 높은 생존률을 보였다. 또한, coumarine을 처리한 실험군의 경우 10 uM 처리군에서 $67.9 \pm 16.0\%$ 의 생존률을 보여 대조군에 비해 높은 생존률을 나타내었다. 그러나 50 uM 처리군에서는 $51.9 \pm 13.0\%$ 의 생존률을 나타내어 대조군에 비해 낮은 생존률을 보였다. Sodium selenite 처리군의 경우, 1 uM 처리군에서만 $66.6 \pm 10.0\%$ 의 생존률을 보여 대조군

Table 1. Viability of huamn hematopoietic stem cell treated with antioxidant and cryopreserved for more than 50 hours

Antioxidants	Concentrations	Viability (%) after thawing
Control		61.0± 5.0%
Coumarine	10 uM	67.9±16.0%
	50 uM	51.9±13.0%
	100 uM	58.2±19.0%
α -tocopherol	10 uM	68.3± 6.0%
	150 uM	72.1± 5.0%
	300 uM	67.8± 4.0%
Ascorbic acid	0.1 mM	69.2±19.0%
	0.5 mM	62.5±15.0%
	1 mM	66.5±13.0%
Sodium selenite	1 uM	66.6±10.0%
	5 uM	56.9± 6.0%
	20 uM	60.3± 9.0%

Data are presented as the mean±SD and eight replications were done.

보다 높은 생존률을 보였으며, 5 uM과 20 uM 처리군에서는 각각 56.9±6.0%와 60.3±9.0%의 생존률을 보여 대조군에 비해 낮은 생존률을 보였다. α -tocopherol 처리군은 모든 처리군에서 대조군보다 높은 생존률을 나타냈으며, 특히 150 uM의 농도에서 72.1±5.0%의 생존율을 보여 항산화제 처리군 중에서 가장 높은 생존률을 보였다.

2. 줄기세포의 생존률 향상을 위한 최적의 항산화제 농도 측정

각 항산화제의 농도별 처리결과를 바탕으로 줄기세포의 생존에 미치는 항산화제의 최적 처리농도를 찾기 위하여 1차 결과에서 확인한 각각의 항산화제에서 가장 높은 생존률을 나타낸 농도를 다시 각각 세 개의 농도로 세분화하여 연구를 진행하였다. Ascorbic acid 처리군은 33.3 uM, 100 uM, 250 uM 처리군으로, coumarine 처리군은 3.3 uM, 10 uM, 25 uM 처리군으로, sodium selenite 처리군은 0.33 uM, 1 uM, 3.3 uM 처리군으로, α -tocopherol 처리군의 경우에는 75 uM, 150 uM, 225 uM 처리군으로 각각 나누어 줄기세포의 생존률을 측정하여 항동해제를 처리하지 않은 대조군과 비교분석하였다(Table 2). Coumarine 3.3 uM 처리군과 ascorbic acid 100 uM 처리군에서 각각 61.4±6.0%와 60.5±7.0%의

Table 2. Viability of huamn hematopoietic stem cell treated with antioxidant and cryopreserved for more than 50 hours.

Antioxidants	Final concentration	Viability (%) after thawing
Control		62.7± 8.0%
Coumarine	3.3 uM	61.4± 6.0%
	10 uM	65.2± 7.0%
	25 uM	65.8± 9.0%
α -tocopherol	75 uM	65.0±10.0%
	150 uM	70.5± 7.0%*
	225 uM	68.0± 8.0%
Ascorbic acid	33.3 uM	68.8± 6.0%
	100 uM	60.5± 7.0%
	250 uM	64.7± 4.0%
Sodium selenite	0.33 uM	65.9± 9.0%
	1 uM	66.2± 8.0%
	3.3 uM	65.1±10.0%

Data are presented as the mean±SD and eight replications were done.

*Significantly different from the control group, $p<0.05$.

생존률을 보여 62.7±8.0%의 생존률을 보인 대조군에 비해 약간 낮은 생존률을 보였으나, α -tocopherol 225 uM 처리군과 ascorbic acid 33.3 uM 처리군에서는 각각 68±8.0%와 68.8±6.0%의 생존률을 보여 대조군에 비해 높은 생존률을 보였다. 특히 α -tocopherol 150 uM 처리군에서 70.5±7.0%의 생존율을 보여 항산화제 중에서 가장 높은 결과를 보였다 ($p<0.05$).

3 냉동보존에 따른 줄기세포의 세포막 손상

줄기세포의 형태 및 세포막 손상 정도를 확인하기 위하여 항산화제 처리 후 동결시킨 줄기세포를 해동하고 배양하여 LIVE/DEAD assay kit로 염색하여 공초점 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1). 관찰된 모든 세포의 세포질에서 esterase 활성을 나타내는 녹색 형광을 확인할 수 있어 살아있는 세포로 판단되었다. 해동 후 세포의 형태적 변화를 비교한 결과, coumarine 10 uM과 α -tocopherol 75 uM, ascorbic acid 250 uM, sodium selenite 3.3 uM을 각각 처리한 그룹들에서 냉동보존하지 않은 대조군의 경우와 비슷한 형태의 세포질이 양극으로 가진 섬유아세포의 형태를 보인 반면 coumarine 3.3

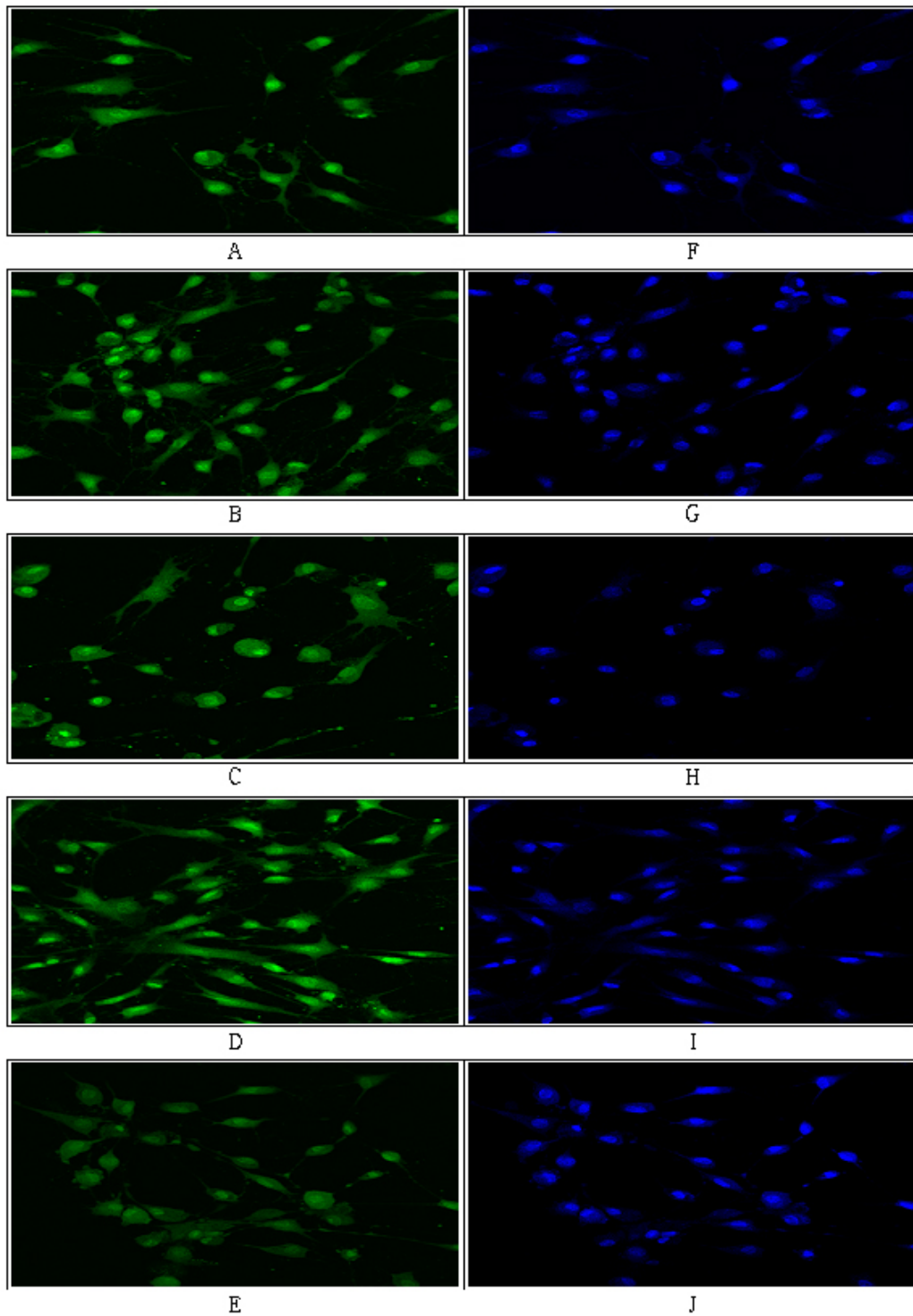


Fig 1. Confocal laser scanning microscopy image of frozen-thawed human hematopoietic stem cells treated with antioxidants. Calcein/AM and Hoechst 33342 was used to stain living cell (A~E) and nucleus (F~J). (A, F) Fresh HSCs, (B, G) 10 uM coumarine, (C, H) 150 uM α -tocopherol, (D, I) 250 uM ascorbic acid, (E, J) 0.33 uM sodium selenite. Most cells stained live (green). Magnification, $\times 100$.

uM 및 25 uM 처리군과 α -tocopherol 150 uM 및 225 uM 처리군, 그리고 sodium selenite 0.33 uM 처리군에서는 모두 대조군과는 다른 등근형태의 세포가 관찰되어 세포의 형태가 변화한 것으로 확인되었다.

4. 냉동보존에 따른 자동분화율

항산화제 처리 후 냉동보존, 해동된 줄기세포를 배양하여 Diff-Quik 염색법을 이용하여 분화율을 측정하였다(Fig. 2). 냉동보존 후 해동된 대조군의 분화율은 $10.1 \pm 1.6\%$ 를 나타냈다(Table 3). Sodium selenite 처리군의 경우, 모든 농도의 처리군에서 대조군보다 높은 자동분화율을 보였고 ascorbic acid 처리군의 경우에는 대조군과 비슷한 자동분화율을 나타내었다. 그러나 α -tocopherol과 coumarine 처리군의 경우, 모든 농도에서 대조군에 비해 낮은 분화율을 보였으며, 특히 α -tocopherol 150 uM 처리군에서는 모든 처리군 중에서 가장 낮은 평균 $7.3 \pm 2.6\%$ 의 자동분화율을 보였다.

고찰

생명체는 자유라디칼(free radical)의 해로운 영향으로부터 보호할 수 있는 복잡한 항산화 시스템을 가지고 있다. 비효소성 항산화제로는 α -tocopherol, ascorbic acid, glutathione, flavonoid, coumarine, selenium 등이 사용되고 있다. Selenium은 selenocystine과 selenomethionone과 같은 특수한 아미노산 형태로 다양한 항산화제 효소로 기능하는 selenoprotein을 구성하는 필수성분이다(Brenneisen et al., 2005). α -tocopherol과 ascorbic acid는 ROS scavenger로 잘 알려져 있다. α -tocopherol은 세포막의 지질산화를 막아 세포막 손상을 억제하는 항산화제로 알려졌다(Droge, 2002), 수용성 비타민인 ascorbic acid는 세포외액내의 가장 효과적인 항산화제이며 비타민 E의 재생에 관계해 α -tocopherol과 공동상승 작용을 일으킨다(Chow, 1991). Selenium과 비타민 E는 지질산화물을 억제하고 항산화제 활성화에 있어 시너지 효과를 나타낸다고 알려졌다(Sahin et al., 2002).

본 실험결과(Table 1, 2), 선별된 항산화제를 처리 후 냉동보존된 조혈모 줄기세포의 생존률은 ascorbic acid와 α -tocopherol 처리군에서 대조군에 비해 향상된 생존률을 나타내었으나, coumarine과 sodium selenite 처리군에서는 대조군과 거의 비슷하게 나타났다. 이는 생쥐 배아줄기세포의 체외

배양 시 paraquat의 처리는 줄기세포의 생존률을 감소 시키고 ROS 생성을 2배로 증가시켰으나, ascorbic acid를 함께 처리할 경우 배아줄기세포의 생존률과 ROS 생성정도가 대조군과 유사한 값으로 회복됨을 관찰한 Perla 등(2008)의 보고와 유사한 결과를 보였다. 또한, 체외수정이나 체세포 핵치환 방법으로 파생된 돼지배아의 체외발생 능력은 배양액에 100 uM α -tocopherol이나 100 uM L-ascorbic acid를 첨가하여 배양하였을 때 개선되었으며, 100 uM α -tocopherol이 함유된 돼지배아 배양액을 추천하고 있다(Jeong et al., 2006). 본 실험의 결과에서는 Jeong 등(2006)의 연구결과와 같이 α -tocopherol과 ascorbic acid 처리군이 대조군에 비해 10~20% 정도의 줄기세포 생존률 향상의 효과를 나타내었고, α -tocopherol 처리군이 ascorbic acid 처리군에 비해 높은 생존률을 보였다. Ascorbic acid의 경우, 항산화제 기능뿐만 아니라 α -tocopherol, glutathione, β -carotene과 같은 작은 분자량의 항산화제로 재생될 수 있는 항산화제의 역할뿐만 아니라 줄기세포의 분화를 조절할 수 있는 필수 조절요인으로 작용한다고 알려졌다(Tsuneto et al., 2005; Sato et al., 2006). 그러나 본 실험결과에서 ascorbic acid 처리군은 자동분화율이 좋지 않은 결과(Table 3)를 나타낸 것으로 보아 줄기세포의 배양 및 냉동보존시에 ascorbic acid를 항산화제로 사용하는 것에 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다.

Selenium은 세포대사 동안에 생성되어 산화적 스트레스를 야기하는 활성산소종이나 자유라디칼(free radical)의 scavenger로 작용하며 배양환경의 개선을 일으키고(Roy & Treacy, 1993), 난포의 체외 배양 시 난포의 생존을 개선시킨다(Silva et al., 2004). 그러나 본 실험결과, selenium 처리군의 생존률은 대조군에 비해 약간 높게 나타났으나 거의 차이가 없는 것으로 사료된다. 이러한 결과로 보아 selenium의 자체 항산화 활성보다는 selenoprotein을 통한 항산화 작용이 일어나는 것으로 생각된다. 닭에게 selenium과 비타민 E의 혼합투여는 유기인산계 살충제인 말라티온 노출에 따라 일어나는 지질 산화를 막는 ROS scavenger로 작용하여 해로운 영향을 극복할 수 있는 항산화적 시너지 효과를 보인다고 하였다(Sodhi et al., 2008). 그러므로 본 실험결과와 위의 보고들로 보아 selenium은 비타민 E와 혼합 사용하는 것이 보다 향상된 항산화제 효과를 보일 것으로 사료된다.

냉동보존 후 해동된 조혈모 줄기세포의 세포막 손상 유무 확인 결과, 대조군을 포함한 모든 실험군에서 약간의 형태적

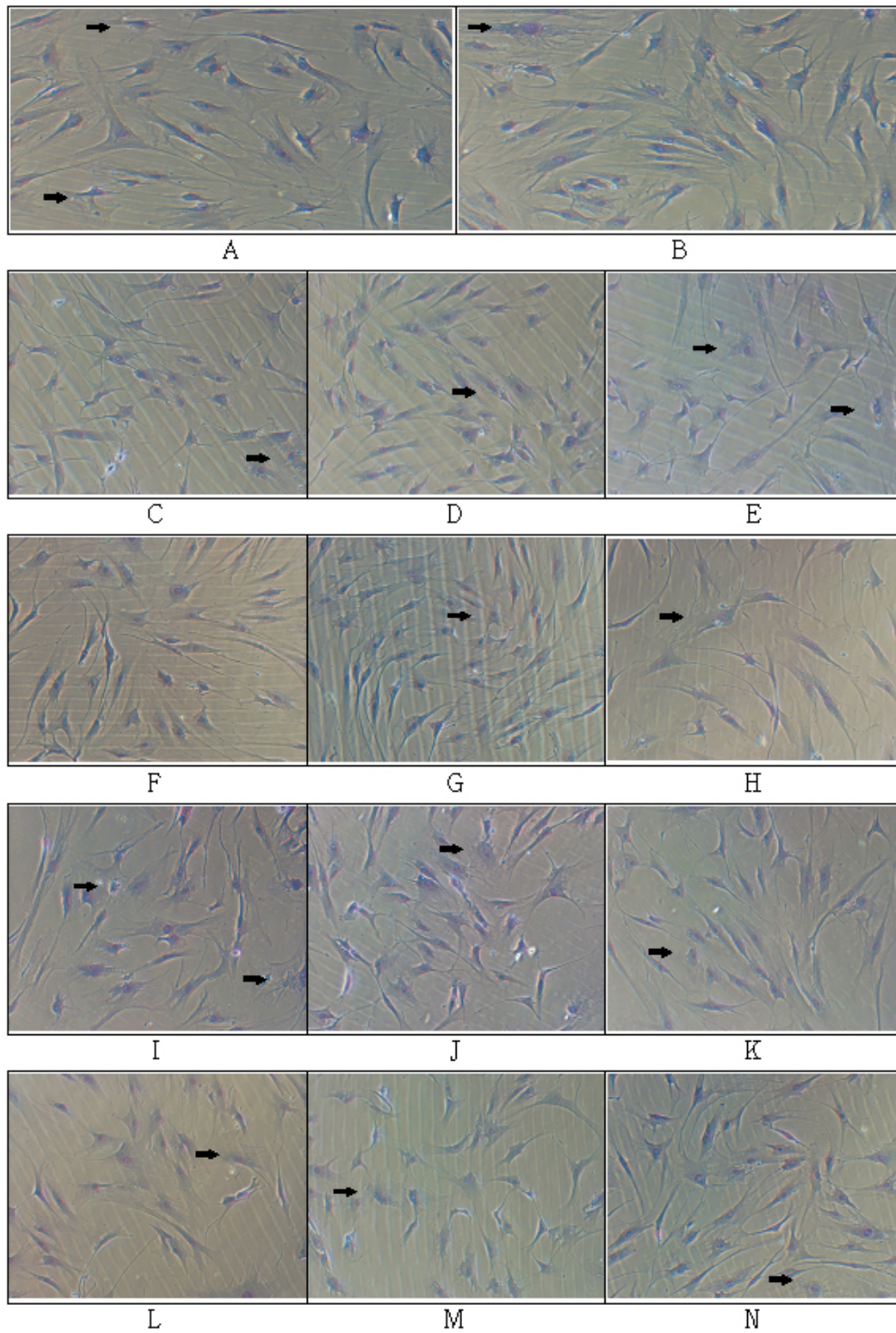


Fig. 2. Photomicrographs of frozen-thawed human hematopoietic stem cells treated with antioxidants. Diff-Quik stain were used for auto-differentiation rate measurement. (A, B) : Fresh HSCs. (C~E) : 3.3 (C), 10 (D), 25 μ M (E) coumarine. (F~H) : 75 (F), 150 (G), 225 μ M (H) α -tocopherol. (I~K) : 33.3 (I), 100 (J), 250 μ M (K) ascorbic acid. (L~N) : 0.33 (L), 1 (M), 3.3 μ M (N) sodium selenite. Arrow(\rightarrow) refer to auto-differentiated stem cells. magnification, $\times 100$.

Table 3. Auto-differentiation rate after thawing of huamn hematopoietic stem cell treated with antioxidant and cryopreserved for more than 50 hours

Antioxidants	Concentrations	Auto-differentiation rate (%) after thawing
Control		10.1±1.6%
Coumarine	3.3 uM	9.9±1.9%
	10 uM	8.8±0.9%
	25 uM	7.6±2.8%
α -tocopherol	75 uM	9.4±2.1%
	150 uM	7.3±2.6%
	225 uM	8.9±2.3%
Ascorbic acid	33.3 uM	10.6±2.1%
	100 uM	10.2±3.0%
	250 uM	12.1±3.4%
Sodium selenite	0.33 uM	11.1±4.2%
	1 uM	10.6±1.8%
	3.3 uM	11.2±3.9%

Data are presented as the mean±SD and four replications were done.

차이는 관찰되었으나(Fig. 1), 세포막 손상의 표지자인 ethidium homidiner에 염색되지 않은 것으로 보아 대조군 및 항산화제 처리군 모두에서 세포막 손상은 일어나지 않은 것으로 관찰되었다. 그러나 손상이 관찰되지 않은 이유가 항동해제 처리에 따른 해동 초기 냉동보존에 의한 손상들이 회복이 된 결과인지 회복 불가능한 세포들이 배양되는 동안 사멸하여 없어진 결과인지는 추후 실험을 통해 확인할 필요가 있다고 생각된다. 해동 후 배양된 세포의 형태는 3.3 uM과 25 uM coumarine 처리군과 150 uM과 225 uM α -tocopherol 처리군에서 부분적으로 변형된 둥근 형태를 보였다. 이러한 형태는 표본제작 과정과 검경과정에서 배양용기로부터 세포가 분리될 때나 또는 커버글라스에 세포를 부착시키기 위해 사용된 cell adhesive solution이 세포의 형태에 영향을 미친 것으로 생각된다. 그러나 상기 현상이 일시적인 결과인지 줄기세포의 형태 및 향후 증식배양에 심각한 영향을 줄 것인지에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

냉동보존 후 해동된 조혈모 줄기세포의 자동분화를 측정 결과(Table 3)에서 모든 α -tocopherol 처리군에서 대조군보다 낮은 분화율을 보였다. 이 결과는 일반적으로 냉동보존제

에 흔히 쓰이는 DMSO가 신경분화인자로 작용함이 잘 알려져 있으며, ethylene glycol 등의 항동해제가 동물 난자의 성숙과정에서 세포의 분열과도 밀접한 연관이 있는 액틴 필라멘트의 중합 및 탈중합에 심각한 영향을 준다는 보고(Rojas et al., 2004; Le Gal et al., 2000) 등에 비추어볼 때 냉동보존의 결과 손상된 미세소관이나 미세섬유의 회복 또는 사멸억제의 기작과 연관되어 항산화제가 세포에 영향을 준 것으로 생각되나, 향후 이와 연관된 정밀한 실험을 통한 확인이 필요할 것으로 사료된다.

본 실험에서 얻어진 결과들은 통계적 유의성을 나타내질 못하였다. 실험에 사용된 조혈모 줄기세포는 병원환자에게서 골수검사용으로 채취한 골수세포의 일부가 제공되어 원활한 실험을 할 수가 없었다. 부득이 오랜 계대배양을 통해 필요한 세포를 얻을 수밖에 없었고, 상태가 좋지 않은 세포를 가지고 계속된 계대배양을 하다 보니 세포의 노화가 진행된 세포를 가지고 실험을 하여 만족할 만한 결과를 얻지 못한 것으로 사료된다. 또한 개개의 환자로 인한 개체변이도 한 원인으로 생각된다.

본 실험결과를 종합하면, 조혈모 줄기세포의 냉동보존에는 150 uM의 α -tocopherol의 사용이 조혈모 줄기세포의 냉동보존 면에서 항산화제로서의 역할과 냉동보존의 효율향상에 많은 역할을 할 것으로 생각되며, 향후 냉동보존의 첨가제로서의 α -tocopherol의 효능 및 해동 후 배양과정에서의 항산화적 영향 평가 연구가 지속적으로 수행되어 냉동보존 시 항산화제의 역할이 정확히 규명된다면 보다 효율적인 줄기세포의 냉동보존 프로토콜 정립이 가능하게 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 충북대학교 학술연구지원사업(2007년) 및 산업자원부의 지역산업기술 개발사업(2005~2007년, 관리번호: 10022042)의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

인용문헌

Asha DS, Subramanyam MVV, Vani Jeevaratnam K (2005) Adaptations of the antioxidant system in erythrocytes of trained adult rats: Impact of intermittent hypo-

- baric-hypoxia at two altitudes. *Comp Biochem Physiol Part C* 140:59-67.
- Babaei H, Nematollahi-Mahani SN, Kheradmand A (2006) The effects of vitamin A administration on the development of vitrified-warmed mouse blastocyst. *Ani Reprod Sci* 95:125-133.
- Breining E, Beorlegui N, O'Flaherty C, Beconi M (2005) Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Therio* 63:2126-2135.
- Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H (2005) Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* 26:256-267.
- Castellini C, Lattaioli P, Bernardini M, Bosco D (2000) Effect of dietary α -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen at 5°C. *Therio* 54:523-533.
- Chow CK (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free radical Biol Med* 11:215-232.
- Droge W (2002) Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Fujino T, Watanabe K, Beppu M, Kikugawa K, Yasuda H (2000) Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1478:102-112.
- Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, Lee SH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2006) Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Therio* 66:2104-2112.
- Lawrence JL, Payton RR, Godkin JD, Saxton AM, Schrick FN, Edwards JL (2004) Retinol improves development in bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J Dairy Sci* 87:2449-2454.
- Le Gal F, De Roover R, Verhaeghe B, Etienne D, Massip A (2000) Development of vitrified matured cattle oocytes after thawing and culture *in vitro*. *Vet Rec* 146:469-471.
- Livingston T, Eberhardt D, Lannett Edwards J, Godkin J (2004) Retinol improves bovine embryonic development *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 2:83-89.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, Breackett BG (1996) Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione containing culture media. *Mol Reprod Dev* 43:437-443.
- Nakayama T, Noda Y, Goto Y, Mori T (1994) Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Therio* 41:499-510.
- O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi M (1997) Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Androl* 29:269-275.
- Okamoto K, Maruyama T, Kaji Y, Harada M, Mawatari S, Fujino T, Uyesaka N (2004) Verapamil prevents impairment in filter ability of human erythrocytes exposed to oxidative stress. *Jpn J Physiol* 54:39-46.
- Perla V, Perrin NA, Greenlee AR (2008) Paraquat toxicity in a mouse embryonic stem cell model. *Toxicol In Vitro* 22:515-524.
- Rojas C, Palomo MJ, Albarracin JL, Mogas T (2004) Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiol* 49:211-220.
- Roy SK, Treacy BJ (1993) The isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fert Steril* 59:783-790.
- Sahin K, Sahin N, Yaralioglu S, Onderci M (2002) Protective role of supplemental vitamin E and selenium on lipid peroxidation, vitamin E, vitamin A, and some mineral concentrations of Japanese quails reared under heat stress. *Biol Trace Elem Res* 85:57-70.
- Sato H, Takahashi M, Ise H, Yamada A, Hirose S, Tagawa Y, Morimoto H, Izawa A, Ikeda U (2006) Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem and Biophys Res Commun* 342:107-112.

- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Becorlegui NB (2007) α -tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Therio* 68:958-965.
- Silva JRV, van den Hura R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lodo RNB, Figueiredo JR (2004) Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci* 81:273-286.
- Sodhi S, Sharma A, Brar APS, Brar RS (2008) Effect of α -tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chick. *Pesticide Biochem Physiol* 90:81-86.
- Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T, Hayashi S (2005) Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 335:1239-1246.