

S-Allyl Cysteine(SAC)이 제대혈 유래 중간엽 줄기세포 증식에 미치는 영향

[†]박 란 숙

승의여자대학 식품영양과

Effect of S-Allyl Cysteine(SAC) on the Proliferation of Umbilical Cord Blood(UCB)-derived Mesenchymal Stem Cells(MSCs)

[†]Ran-Sook Park

Dept. of Foods & Nutrition, Soong Eui Women's College, Seoul 100-751, Korea

Abstract

To improve the growth of human mesenchymal stem cells(hMSCs) under general cell culture conditions(20% O₂ and 5% CO₂), we examined the effect of s-allylcysteine(SAC), which is known as an antioxidant and the main component of aged-garlic extract, on hydrogen peroxide-induced cellular stress in hMSCs. We found that SAC blocked hydrogen peroxide-induced cell death and cellular apoptosis, but that SAC did not improve the growth of hMSCs during short-term culture. To evaluate the protective effect of SAC, we examined the endogenous expression of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase(SOD), and glutathione peroxidase(Gpx) in hMSCs. Hydrogen peroxide was found to down-regulate the expression of CAT, SOD, and Gpx at the protein level. However, in the pre-treatment group of SAC, SAC inhibited the hydrogen peroxide-induced down-regulation of CAT, SOD, and Gpx. Unfortunately, treatment with SAC alone did not induce the up-regulation of antioxidant enzymes and the cell proliferation of hMSCs. Surprisingly, SAC improved cell growth in a single cell level culture of hMSCs. These results indicate that SAC may be involved in the preservation of the self-renewal capacity of hMSCs. Taken together, SAC improves the proliferation of hMSCs via inhibition of oxidative-stress-induced cell apoptosis through regulation of antioxidant enzymes. In conclusion, SAC may be an indispensable component in an *in vitro* culture system of human MSCs for maintaining self-renewal and multipotent characterization of human MSCs.

Key words: aged garlic extract, mesenchymal stem cell, s-allyl cysteine, oxidative stress, anti-oxidant.

서 론

성체 줄기세포란 자기 복제 능력(self-renewal capacity)과 분화능(differentiation)을 가진 세포로서 인체에서는 제대혈과 골수에서 쉽게 찾아볼 수 있으며, 제대혈내 줄기세포를 이용한 소아 백혈병의 치료는 이미 20년 전부터 임상에서 사용하고 있으며, 최근 제대혈 줄기세포 또는 골수 줄기세포 등의 성체 줄기세포를 여타의 질환치료로 사용하려는 시도가 많은 분

야에서 활발한 연구가 진행되고 있다(Zwaginga & Doevendans 2003). 특히 제대혈에서 유래된 중간엽 줄기세포의 면역관용성과 윤리적인 문제를 해결할 수 있는 줄기세포 공급원으로 각광을 받고 있다. 이러한 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 임상에 적용하기 위해서는 줄기세포를 순수하게 분리하여 치료에 필요한 세포 수를 증식시키는 것이 중요한 문제로 대두되고 있다. 또한, 이식 줄기세포의 생존율, 생착률과 세포기능이 매우 낮기 때문에(Kim 등 2009), 시험관내에서 배양 시

[†] Corresponding author: Ran-Sook Park, Dept. of Foods & Nutrition, Soong Eui Women's College, Seoul 100-751, Korea. Tel: +82-2-3708-9119, Fax: +82-2-3708-9121, E-mail: ransook@sewc.ac.kr

줄기세포의 자가 복제 능력 및 분화능을 온전하게 갖춘 세포를 증식시키는 게 필수적이다. 배양 세포층내 줄기세포의 수를 증식시키고, 줄기세포의 변성과 고사(apoptosis)를 억제하며, 산소 자유기 등 유해 라디칼 등을 최소화할 수 있는 배양 첨가물의 첨가가 필수적이다.

마늘(*Allium sativum* L.)은 각종 질병 치료와 예방 효과가 알려졌으며(Block E 1985), 최근에는 혈중 지질 감소, 동맥 경화 방지, 혈당 저하, 항응고제, 항고혈압제, 항암제 등의 의약품 및 건강보조식품으로 사용되고 있다(Agarwal KC 1996, Augusti KT 1996). 마늘의 처리 방법에 따라서 생물학적 유용성을 나타내는 지표물질 및 기능이 다른 형태로 존재하게 된다. 이 중 aged garlic extract(AGE)는 S-allylcysteine(SAC)을 포함하고 있으며, SAC은 라디칼을 제거(scavenger)하는 작용을 하므로 과산화수소에 의한 세포 손상과 지질 과산화 등을 감소시킨다(Amagase 등 2001). 과산화 음이온, 과산화 수소, 지질 과산화물, 라디칼 등은 세포에 존재하는 거대분자들과의 결합 반응을 통해서 세포에 손상을 줄 수 있다. 최근 산화 스트레스가 줄기세포 배양에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 줄기세포를 저산소 상태에서 배양하는 방법들이 활발하게 연구되고 있으며(Kim 등 2008), 허혈성 질환 모델에서의 산화 스트레스와 이식 줄기세포의 생존률 및 생착률과의 연관성이 보고되었다(Zhu 등 2006).

본 연구는 세포배양 시 일반적으로 이용되는 20% 산소가 점차적으로 세포 내 산화 스트레스를 유발함으로써 줄기세포의 증식과 고사에 영향을 미칠 가능성이 높다는 점에 착안하여, 항산화 효과가 알려진 SAC 첨가가 세포 손상 유발 물질인 과산화수소 등의 라디칼 제거 능력과 줄기세포의 증식 능력과 세포 사멸(apoptosis)의 초기 및 만기에 미치는 영향, 그리고 항산화 효소인 catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase의 증가 여부를 단백질 발현을 통하여 연구하였다.

연구 방법

1. 실험재료

S-allylcysteine($C_6H_{11}NO_2S$, 동경화성공업주식회사, 일본), hydrogen peroxide(Calbiochem, San Diego, CA)를 구입하였으며, 세포 배양과 관련한 실험재료인 DPBS, 0.25% trypsin-EDTA(WelGene, Daegu, Korea), DMEM/low glucose(Hyclone, Laboratories, Inc., Logan, Utah), antibiotics(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 구입하였다. 항산화 효소의 발현을 검사하기 위한 1차 항체인 CAT, Gpx, SOD(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하였다.

2. 제대혈에서 줄기세포 분리

제대혈(umbilical cord blood, UCB) 80 ml를 실온 상태의 DPBS 80 ml와 동량 희석하고 15 ml conical tuber에 비중이 1.077인 Ficoll-Paque™ Plus 6 ml를 분주한 후 동량 희석액 9 ml를 첨층하고 750×g, 30분 동안 상온에서 원심 분리하여 단핵세포층을 분리하였다. 분리된 단핵세포를 시험관 당 1×10^7 세포들을 분주하여 1주일간 배양하고 비부착세포는 제거하고 새로운 배지를 첨가하여 배양하였다. 부착성 세포가 배양된 시험관에서 colony가 확인되면 0.25%-EDTA를 처리하여 T-25 flask로 옮겨 증식시키고 70%의 균집을 이루면 다시 T-75 flask로 옮겨 증식시킨 후 freezing media에 부유하여 액체 질소 탱크에 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 줄기세포 면역 표식자 분석

분리한 세포가 중간엽 줄기세포임을 증명하기 위해서 부착성 세포들을 0.25% EDTA를 이용하여 배양용기로부터 떼어낸 후 2% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하여 조혈 줄기세포 및 중간엽 줄기세포 표면 항원에 대한 anti-human 항체(BD Science, USA)를 가지고 세포표면 항원을 표지하여 분석하였다. 세포표면 항원을 표지한 후 FACS caliber를 이용하여 세포 분포를 분석하였다.

4. 중간엽 줄기세포 증식과 S-allylcysteine(SAC) 효과

중간엽 줄기세포를 시험관 당 2×10^4 세포들을 분주하고 24시간 배양하여 안정화 하였다. 중간엽 줄기세포를 이용한 실험은 중간엽 줄기세포의 균집이 70%인 exponential 구간에 수행하였다. 중간엽 줄기세포의 증식에 SAC의 효과를 관찰하기 위해서 대조군은 24시간 간격으로 교환하면서 정상 배양하였고, SAC 투여군은 SAC을 0.1 mmol/l를 첨가한 배지에서 24시간 간격으로 교환하면서 배양하였다. 산화적 스트레스 요인 중 과산화수소(H_2O_2)에 의해 유도되는 세포 스트레스가 줄기세포 증식 및 SAC의 영향을 관찰하기 위해서 SAC 전 처리 군과 후 처리 군으로 나누어 실험을 진행하였다. SAC 전 처리 군은 SAC을 포함한 배지에 줄기세포 46시간 배양한 후 2시간 동안 H_2O_2 (0.05 mmol/l)를 처리하였으며, 이에 대조군으로 SAC을 제외한 일반세포 배양배지에 줄기세포를 46시간 배양한 후 2시간 동안 H_2O_2 (0.05 mmol/l)를 처리하였다. 각 군의 해당하는 세포의 총 배양시간은 72시간이었다. 세포 수의 변화는 automatic cell counter(Microchip type, Nano EnTek Inc., Korea)로 세포의 수 및 생존율을 확인하였다. 또한, 중간엽 줄기세포의 자가 복제 능력에 SAC이 미치는 영향을 알아보기 위해서 중간엽 줄기세포로 확인된 줄기세포를 limit dilution으로 단일세포 수준으로 분주하여 96 well plate에 배양하였다. 7일 간격으로 배지를 교체하였으며, 4주 후에 증식된 세포를 Diff-Quick stain을 이용하여

세포를 관찰하였다.

5. 세포 사멸(Apoptosis) 검사

실험군의 0.5 ml 세포 현탁액을 microcentrifuge tube로 옮겨 1,000×g로 5분간 상온에서 원심분리하여 배양액을 제거하였다. 차가운 DPBS로 세포를 부유한 후 1,000×g로 5분간 상온에서 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포를 annexin V-FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA)와 propidium iodide(BD Pharmingen, San Jose, CA)를 첨가하여 형광 염색한 후 Cytospin(Shandon Co, USA)에서 slide 위에 원침하여 형광현미경으로 관찰하였다.

6. 단백질 발현 분석(Immunoblot Assay)

각 실험군의 세포에서 RIPA buffer를 이용하여 단백질을 추출한 후 BAC(bicinchoninic acid) 방법으로 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 loading한 후 120 voltage에서 1시간 동안 전기영동을 실행하였다. 전기영동한 단백질을 methanol로 활성화된 PVDF membrane으로 transfer한 후 항산화 효소인 catalase(CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GpX)에 대한 1차 항체를 이용하여 표지하였다. 1차에 항체에 대한 2차 항체를 표지한 후 ECL solution을 이용하여 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

7. 장기간 단일세포 분리 배양법(Limiting Dilution Cell Culture)

SAC 처치가 세포 증식에 미치는 영향을 10,000 이상의 세포를 사용하는 배양용기내에서 분석한 결과, 대조군과 세포 증식에서는 차이가 없었음을 위의 중간엽 줄기세포 증식과 SAC 효과의 실험에서 확인한 바 있었다. 그러나 10,000의 세포중에는 줄기세포, 분화된 세포, 변성 또는 세포 사멸에 빠진 세포들도 함께 존재하고 있으므로 단일세포 수준으로 세포를 96 well 배양판의 각 well 에 분주한 다음 SAC를 처치하

고, 4주간 배양한 후 도립현미경으로 세포 증식의 colony를 검정하였다. 관찰의 편이를 위하여 Diff-Quick 염색을 시행하였다.

통 계

각 군 사이의 세포의 감소 및 증가가 통계적 유의성을 가지는지를 분석하기 위해서 SigmaSTAT 통계 소프트웨어를 통하여 one-way ANOVA를 이용하였으며, 사후검정으로 Holm-Sidak method를 사용하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 판정하였다.

실험 결과

1. 중간엽 줄기세포 면역표식자 분석

본 연구에서 이용한 제대혈 유래 줄기세포가 중간엽 줄기세포인지를 확인하기 위해서 중간엽 줄기세포 면역표식자를 이용하여 분석하였다. 조혈 줄기세포 표식자인 CD14, CD34, CD45 및 CD117은 발현하지 않았으며, 중간엽 줄기세포 표식자인 CD29, CD44, CD90, CD105 및 CD166은 발현하였다(Fig. 1). 본 연구에서 사용하는 줄기세포가 중간엽 줄기세포임을 확인하였다.

2. H₂O₂에 의해 유도되는 세포생존율에서 SAC 효과

본 연구에서는 산화적 스트레스에 의한 세포 손상으로 중간엽 줄기세포의 증식과 SAC의 영향을 관찰하기 위해서 H₂O₂를 이용하여 산화 스트레스를 유도하였다(Fig. 2). 대조군과 SAC만을 처치한 군과 비교 시, 총 72시간 내의 실험에서는 SAC이 줄기세포의 증식에는 영향을 미치지 않았다. 대조군과 비교 시 H₂O₂에 의해서 유도된 산화 스트레스에 의해서 세포 생존율이 38%가 감소하였다($P < 0.001$). 반면 S-allylcysteine을 전 처치한 실험군은 H₂O₂에 의해서 유도된 산화 스트레스에 의해 세포 생존율이 20% 감소하였다($P < 0.001$). SAC 전 처

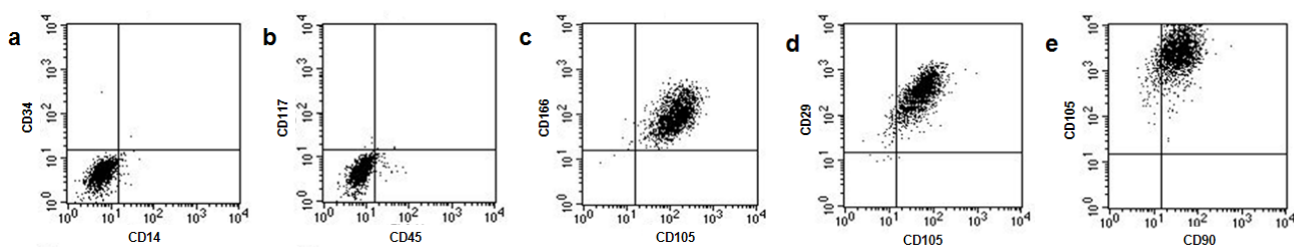


Fig. 1. Characterization of mesenchymal stem cells(MSCs). Fig(a and b) CD markers of human hematopoietic stem cells(HSCs). On the MSCs, we has not detected CD 14, CD 34, CD 45, and CD 117 marker of hematopoietic stem cells. Fig(c, d, and e) CD markers of human MSCs. The purified MSCs expressed CD 29, CD 44, CD 90, CD 105, and CD 166 on the surface of cells.

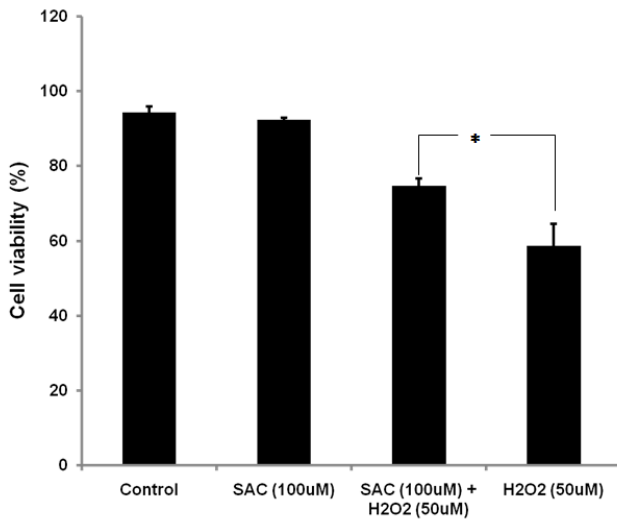


Fig. 2. Effect of s-allylcysteine(SAC) on H₂O₂-induced cellular stress in human MSCs. Control: no SAC(100 μ m) and H₂O₂(50 μ m), samples: SAC groups(100 μ m), H₂O₂(50 μ m), and SAC groups (100 μ m)+H₂O₂(50 μ m). After stabilization of MSCs for 24 hrs, SAC groups were treated at 100 μ m concentration for 48 hours and H₂O₂ groups were incubated in DMEM/10% FBS media for 46 hours and were treated at 50 μ m concentration for 2 hours. SAC+H₂O₂ groups were pretreated with SAC(100 μ m) for 46 hours and were treated at 50 μ m concentration for 2 hours. Each bar represents the mean(%) \pm S.D(n=3) and bars with asteric mark is significantly different at $p<0.05$.

치군과 H₂O₂ 처치군 비교 시 SAC 전 처치군은 세포 생존을 감소를 유의하게 방지하였다($P<0.001$).

3. H₂O₂에 의해 유도되는 세포 사멸에서 SAC 효과 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸에서 SAC의 영향을 관

찰하기 위해서 H₂O₂를 이용하여 산화 스트레스를 유도하였다(Fig. 3). 대조군과 SAC만을 처치한 군 비교 시 세포 사멸 초기 단계와 후기 단계의 세포가 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3a, 3b). H₂O₂을 처치한 군의 경우 대부분의 세포에서 세포 사멸 후기 단계인 propidium iodide이 양성으로 관찰되었으나, SAC를 전 처치한 군은 H₂O₂에 의해 유도되는 세포 사멸이 대부분의 세포에서 음성으로 관찰되었다(Fig. 3c, 3d).

4. 항산화 효소 CAT, SOD, Gpx 단백질 발현

H₂O₂에 대한 SAC의 세포 보호 효과가 항산화 효소와 연관성이 있는지를 분석하기 위해서 항산화 효소인 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(Gpx)의 단백질 발현을 조사하였다. 대조군과 비교 시 SAC이 세포 내의 항산화 효소 CAT, SOD, Gpx의 단백질 발현 자체에는 영향을 미치지 않았다. 반면 H₂O₂를 처치한 군은 대조군과 비교 시 CAT의 단백질 발현을 감소시켰으며, SOD 및 Gpx의 단백질 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 4). SAC을 전 처치한 군은 catalase의 경우 단백질 발현을 대조군과 비교할 수 있는 수준으로 발현이 유지되었으며, SOD 및 Gpx의 경우 단백질 발현은 감소하였으나 H₂O₂를 처치한 군과 비교 시 유의하게 단백질이 발현되었다(Fig. 4).

5. 중간엽 줄기세포의 Long-term Culture에서 SAC의 효과

본 연구는 위의 연구를 통해서 SAC이 중간엽 줄기세포의 계속된 배양으로 유발될 수 있는 산화 스트레스에 세포 보호 효과가 있음을 증명하였고, 이 SAC의 효과가 장기간 배양 시 중간엽 줄기세포 증식에 미치는 영향을 연구하였다. 중간엽 줄기세포로 확인된 세포를 limit dilution을 통해 단일세포로 분리한 후 4주간 배양 후 세포를 관찰하였다. 대조군과 비교 시 SAC을 포함한 배지는 줄기세포의 증식능력을 향상시킴을 확인하였다(Fig. 5).

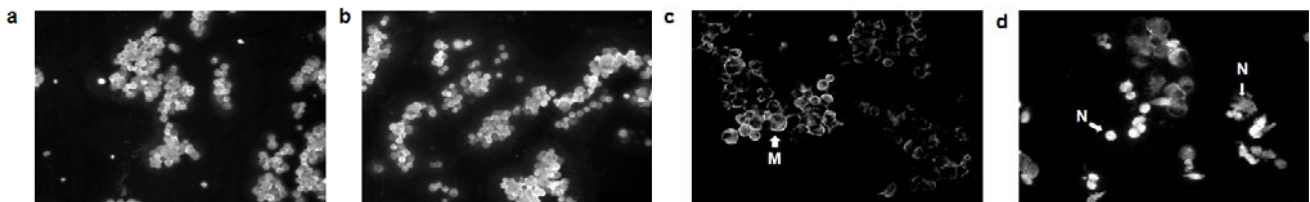


Fig. 3. Effect of s-allylcysteine(SAC) on H₂O₂-induced apoptosis in human MSCs. (a) no SAC(100 μ m) and H₂O₂ (50 μ m), (b) SAC groups(100 μ m), (c) SAC(100 μ m)+H₂O₂(50 μ m), and (d) H₂O₂(50 μ m). To observe H₂O₂-induced apoptosis, we stained cell surface(annexin V, early phase of apoptosis) and nucleus(propidium iodide, late phase of apoptosis). Annexin V positive showed green color with filter for FITC with Olympus fluorescent microscope.

Arrows of M and N indicate cell surface(annexin V, positive signal of apoptosis) and nucleus(propidium iodide), positive signal of apoptosis, respectively.

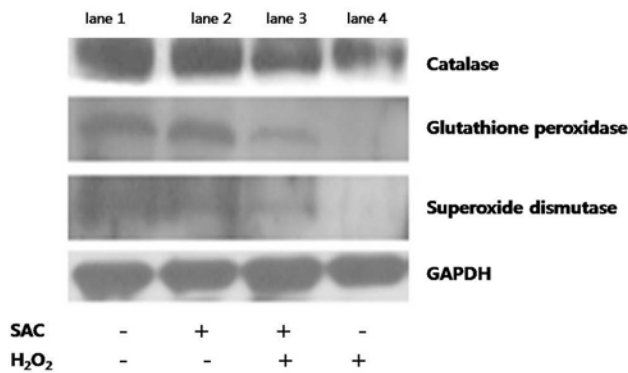


Fig. 4. S-allylcysteine(SAC) blocks H₂O₂-induced down-regulation of antioxidant enzymes. (lane 1) no SAC(100 μ m) and H₂O₂(50 μ m), (lane 2) SAC groups(100 μ m), (lane 3) SAC(100 μ m)+H₂O₂(50 μ m), and (lane 4) H₂O₂(50uM). The SAC groups were treated at 100uM concentration for 48 hours and H₂O₂ groups were incubated in DMEM/10% FBS media for 46 hours and were treated at 50 μ m concentration for 2 hours. SAC+H₂O₂ groups were pretreated with SAC(100 μ m) for 46 hours and were treated at 50 μ m concentration for 2 hours. Protein expression was observed by immunoblotting with antibodies to the antioxidants. These results came from western protein blotting that were done in triplicated experiment. In case of H₂O₂ treatment, it represented scanty amount of antioxidants due to cell damage in early. H₂O₂ treatment group revealed no visible superoxide dismutase and glutathione peroxidase, with vague amount of catalase.

고찰

본 연구는 SAC가 중간엽 줄기세포의 증식을 유도하는지 여부와 시험관내 배양으로 인한 산화적 스트레스에 의한 세

포 손상 즉 H₂O₂에 의한 산화 스트레스를 억제하는 세포 수준의 메커니즘을 규명하였다. 대조군과 SAC만을 처치한 군과 비교 시 총 72시간 내의 실험에서는 SAC이 줄기세포의 증식에는 영향을 미치지 않았다. 72시간 처치한 실험에서는 SAC에 의한 세포의 증식은 유의하지 않았으며, Kang 등(2004)이 보고한 제대혈 유래 간엽 줄기세포의 증식속도가 느리다는 결과와 일치하는 바이다. 그러나 SAC를 2~4주 동안 지속적으로 처치했을 때 세포 증식 효과의 유무는 향후 추구되어야 할 과제이다. 세포유식기를 통하여 표면 항원의 발현이 높은 고순도의 중간엽 줄기세포를 분리하였으나 배양과정을 거치면서 휴지기의 줄기세포, 분화된 세포, 또는 세포 사멸 단계의 세포를 상당수 포함하고 있을 것으로 사료되며, 이들로 인하여 SAC가 짧은 시간 내에 자가 복제 능력 및 분화능을 온전하게 가지는 중간엽 줄기세포의 증식에 영향을 미치기 어려웠을 것으로 추측하였다.

그러나 SAC이 H₂O₂에 의해 유도되는 세포 사멸을 억제하고 있음을 확인할 수 있었다. 대조군과 SAC만을 처치한 군 비교 시 세포 사멸 초기 단계와 후기 단계의 세포가 거의 관찰되지 않았다. H₂O₂을 처치한 군의 경우 대부분의 세포에서 세포 사멸 후기 단계인 propidium iodide이 양성으로 관찰되었으나, SAC를 전 처치한 군은 H₂O₂에 의해 유도되는 세포 사멸을 관찰할 수 없었다. 본 연구의 결과는 지속적인 시험관내 배양 시 대부분의 줄기세포가 산화 스트레스에 노출됨으로써 세포 사멸 단계로 진전됨을 짐작할 수 있다. 그러므로 이 결과는 SAC이 중간엽 줄기세포 배양 시 산화 스트레스에 의해서 세포 사멸 단계로 진전하는 과정을 방지할 수 있음을 알 수 있다. Li 등(2005)은 aged garlic extract(AGE)가 상피세포의 세포 사멸을 억제한다고 보고한 바 있는데, 본 연구는 AGE 중에서도 SAC가 세포 사멸을 억제하고 있음을 확인하였다.

SAC가 H₂O₂에 의한 세포내 산화 스트레스를 억제하는지

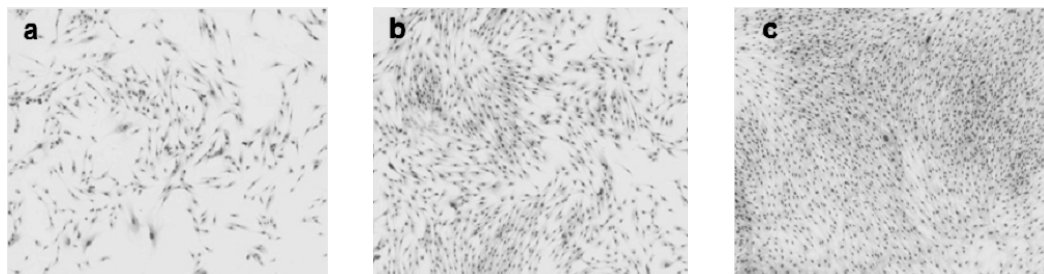


Fig. 5. Effect of s-allylcysteine(SAC) on long-term cultures of limiting diluted-human MSCs. (a) no SAC(100 μ m) and 20% O₂, (b) SAC groups(100 μ m) and 20% O₂, (c) no SAC and 5% O₂. After 4 weeks, each group were stained by Diff-Quick solution. The mesenchymal stem cells, incubated at 5% O₂ concentration, were used as positive control. Briefly we tried to seed one cell per well of 96 well culture plate, but sometimes it showed not more than five cells at starting day of long term culture. When the plates were examined on inverted microscope, the seeded cell showed proliferation of MSCs. The limiting dilution culture method appeared more fine tool than colony assay method.

대한 연구로 Shin & Ihm(2008)은 스트렙토조토신으로 유발한 당뇨병 백서의 간에서 glutathione을 정량하고 실시간 RT-PCR에서 항산화 효소들의 mRNA 발현을 보고하였으며, Nagatoshi 등(2001)은 정량적으로 hydrogen peroxide 의 scavenging assay를 실시하였다. 본 연구에서는 이들의 연구들보다 더욱 직접적으로 SAC에 의한 항산화 단백질의 변동 여부를 확인하기 위하여 항산화 효소인 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(Gpx)의 항체를 이용하여 확인한 결과, H₂O₂를 처치한 군은 대조군과 비교 시 CAT의 단백질 발현을 감소시켰으며, SOD 및 Gpx의 단백질 발현을 관찰할 수 없었다. SAC을 전 처치한 군은 catalase의 경우 단백질 발현을 대조군과 비교할 수 있는 수준으로 발현이 유지되었으며, SOD 및 Gpx의 경우 단백질 발현은 감소하였으나 H₂O₂를 처치한 군과 비교 시 육안으로 확인할 수 있는 정도의 단백질을 확인하였다.

본 연구가 비록 SAC의 중간엽 줄기세포의 세포보호 효과에 대한 자세한 기전을 밝히지는 못하였지만 세포 내에 존재하는 항산화 효소의 수준을 유지시킴으로써 세포를 보호함을 알 수 있었다. 간접적으로 SAC의 효과가 장기간 배양 시 중간엽 줄기세포의 자기 복제 능력을 향상시킬 수 있는지를 관찰한 결과, 중간엽 줄기세포로 확인된 세포를 limiting dilution (one cell/well of 96 well plate)을 통해 단일세포 수준으로 분주한 다음, 4주간 배양하였을 때, 대조군과 비교 시 SAC을 포함한 배지는 확실하게 중간엽 줄기세포의 증식을 유도하였음을 알 수 있었고, 저산소농도인 5% O₂의 배양군과 비견할 수준 만큼 줄기세포의 증식능력을 향상시킴을 확인하였다. 아직까지 SAC가 줄기세포의 limiting dilution culture에 미치는 영향에 대한 다른 연구자들의 보고가 없어서 비교할 수는 없지만, SAC의 항산화 능력을 입증할 수 있는 single cell level의 연구라고 생각하고 있으며, 향후 다른 antioxidant 또는 항산화 천연물이 줄기세포의 증식에 미치는 영향을 연구할 수 있는 또 하나의 도구로 개발할 수 있다고 본다.

요약 및 결론

본 연구는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포의 배양의 최적화를 위해서는 시험관내 배양 시 이용되는 배양 조건에서 20% 산소가 점차적으로 세포 내 산화 스트레스를 유발함으로써 줄기세포의 증식에 영향을 미칠 것으로 생각되었다. 그리하여 항산화 효과를 가지고 있는 물질을 세포배양액에 첨가함으로써 줄기세포의 증식능력을 향상시킬 것으로 기대하였다. 본 연구결과에서 SAC이 H₂O₂에 의해 유도되는 세포 손상을 방지함을 확인할 수 있었으며, 세포 사멸 실험에서 SAC이 중간엽 줄기세포 배양 시 산화 스트레스에 의해서 세포 사멸 단

계로 진전하는 과정을 방지함을 알 수 있었다. H₂O₂에 대한 SAC의 세포 보호 효과가 항산화 효소와 항산화 효소인 catalase (CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(Gpx)의 단백질 발현실험에서 SAC은 catalase의 경우 단백질 발현을 대조군과 비교할 수 있는 수준으로 발현이 유지되었으며, SOD 및 Gpx의 경우 단백질 발현은 감소하였으나 H₂O₂를 처치한 군과 비교 시 유의하게 단백질이 발현되었다. 본 연구의 저자들은 위의 연구를 통해서 SAC의 중간엽 줄기세포의 세포 보호 효과에 대한 자세한 기전을 밝히지는 못하였지만 세포 내에 존재하는 항산화 효소의 발현을 유지시킴으로써 세포를 보호함을 알 수 있었다. SAC이 장기간 배양 시 중간엽 줄기세포의 자기 복제 능력을 향상시킬 수 있는지를 관찰한 실험에서 SAC은 지속된 배양에도 불구하고, 중간엽 줄기세포의 증식능력의 유지 및 증식속도가 증진하였다.

결론적으로, 본 연구에서는 산화 스트레스로 야기되는 세포 생존율 감소, 세포 사멸 증가, 항산화 효소에 결핍을 SAC이 방지함으로써 중간엽 줄기세포의 증식능력을 향상시키는 작용이 있음을 관찰하였다. 이러한 결과는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포뿐만 아니라 다양한 조직에서 유래된 중간엽 줄기세포를 배양하는데 있어 줄기세포의 능력을 보존하는데 있어 유익할 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 숭의여자대학 학술연구비로 수행되었으므로 감사드립니다.

참고문헌

- Agarwal KC. 1996. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 16:111-124
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 131:955S-962S
- Augusti KT. 1996. Therapeutic values of onion(*Allium cepa* L.) and garlic(*Allium sativum* L.). *Indian J Exp Biol* 34:634-640
- Block E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 252:114-119
- Kim SS, Lee SG, Moon SH, Kim JM, Lee SH, Chung HM. 2008. Developmental pattern of human embryonic stem cells in optimized hypoxic culture condition. *Tissue Eng Regen Med* 5:474-481
- Kim YS, Park IK, Kwon JS, Jeong MH, Ahn YK. 2009. Approaches for optimization of stem cells for therapy of car-

- diovascular diseases. *Tissue Eng Regen Med* 6:186-191
- Kang TJ, Yeom JE, Lee HJ, Rho SH, Han H, Chae GT. 2004. Growth kinetics of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord blood. *Acta Haematol* 112:230-233
- Li T, Ito K, Sumi S-i, Fuwa T, Horie T. 2005. Antiapoptosis action of aged garlic extract(AGE) protects epithelial cells from methotrexate induced injury. *Gut* 54:1819-1820
- Nagatoshi I, Benjamin L. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kB activation. *J Nutr* 131:1020S-1026S
- Shin CH, Ihm JH. 2008. Effects of s-allylcysteine on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Endocrinol* 23:129-136
- Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. 2006. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:416-425
- Zwaginga JJ, Doevendans P. 2003. Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: Possible therapies for tissue repair and tissue engineering. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:900-908
-
- (2009년 5월 20일 접수; 2009년 6월 15일 채택)