

돼지 중간엽 줄기세포 동결에 있어서 동결보호제에 따른 특성 연구

김미경¹ · 박형준¹ · 노규진¹ · 김충희² · 조재현^{1,*}

¹경상대학교 수의과대학 수의학과, ²경남과학기술대학교 동물생명과학과

Study of Effective Cryoprotectants on the Cryopreservation of Porcine Mesenchymal Stem Cells

Mi Kyeong Kim¹, Hyoung Joon Park¹, Gyu-Jin Rho¹, Chung-Hei Kim² and Jae-Hyeon Cho^{1,*}

¹*Institute of Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*

²*Dept. of Animal Science & Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea*

ABSTRACT : The objective of this study was to investigate the effective cryoprotectants for the cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). In order to understand the effectiveness of various cryoprotectants on pMSCs, we studied the most commonly used cryoprotectants; dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), DMSO and EG. pMSCs were isolated from bone marrow matrix of piglet (2 month) and characterized by alkaline phosphatase (AP) activity, colony forming, and differentiation to adipocyte. In slow cooling cryopreservation, the pMSCs were exposed to cell medium containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% DMSO, 1.5M EG and 5% DMSO/0.75M EG, respectively, and frozen to $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from 25°C up to -80°C in a cryo-container. The proportion of viable cells and the growing rates in fresh pMSCs were significantly ($P<0.05$) higher than those of other groups, but did not differ between the cryopreserved groups. The expression of *Sox-2* and *Nanog* gene was increased by extending culture time in cryopreserved groups. The expression of *Bax* gene in cryopreserved groups was similar with fresh pMSCs. Moreover, the gene expression of adipocyte-specific marker as well as chondrogenic/osteogenic factors in cryopreserved groups was similarly to fresh pMSCs. Taken together, our results suggested that all these cryoprotectants of 10% DMSO, 1.5M EG and 5% DMSO/0.75M EG could be used for cryopreservation of the pMSCs.

Key words : Porcine mesenchymal stem cells, Cryopreservation, Dimethyl sulfoxide, Ethylene Glycol, Cell viability, Gene expression

요 약 : 돼지 중간엽 줄기세포를 Dimethyl sulfoxide(DMSO), Ethylene glycol(EG), 그리고 DMSO/EG을 이용하여 세포 동결을 유도한 후 적절한 동결보호제를 알아보았다. 2개월 이내 돼지 골수에서 중간엽 줄기세포를 분리하여 colony 형성 및 alkaline phosphatase(AP) 활성을 확인하고, 지방 세포로의 분화 유도에 의한 줄기세포의 능력을 확인하였다. 이들 중간엽 줄기세포의 완전 동결을 위해, DMEM에 각각 10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG의 동결보호제를 섞은 후 cryovial에 넣고, cryo-containe를 이용하여 25°C 에서 -80°C 까지 $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 속도로 동결하였다. 일주일간 저장 후 세포의 생존률은 미동결 세포는 동결 세포군보다 유의적으로 높음을 확인할 수 있었으나, 동결 처리군 간에는 차이가 없었다. 줄기세포 유지 유전자인 *Sox-2*와 *Nanog* 발현은 동결 후 배양 시간에 따라 발현량이 증가하는 경향을 보였으나, 동결처리군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 세포사 관련 유전자인 *Bax*의 발현은 모든 군에서 비슷하였다. 또한 지방, 연골 및 뼈세포 분화와 관련된 유전자의 발현은 동결 전 세포와 동결 후 세포군에서 비슷한 경향을 보였다. 이러한 결과는 돼지 중간엽 줄기세포 동결함에 있어서 10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG 모두 적절한 동결보호제로 이용할 수 있음을 시사한다.

* 교신저자: 조재현, 경상남도 진주시 가좌동 900번지 경상대학교 수의과대학 해부발생학 연구실. (우) 660-701, (전) 055-772-2358, (팩) 055-772-2349, E-mail: jaecho@gsnu.ac.kr

서 론

줄기세포는 자가 증식과 다양한 조직이나 장기로 분화할 수 있는 특성을 가지고 있으며, 이러한 종류의 세포는 성장 기간뿐만 아니라 성인의 세포 항상성 면에서도 중심적인 역할을 한다(Fehrer & Lepperdinger, 2005). 또한 골수, 혈액, 지방, 근육 등 다양한 조직에서 분리할 수 있고, 특히 체외 정해진 배양액 조건에서 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 예를 들면, 줄기세포는 중배엽인 골세포, 지방세포, 연골세포(Pittenger et al., 1999)로 분화가 가능하며, 신경세포(D'ippolito et al., 2004), 피부(Han et al., 2007), 췌장세포(Chen et al., 2004)로도 분화가 가능하다.

중간엽 줄기세포는 골수뿐만 아니라 지방조직, 태반, 탯줄, 제대혈(Umbilical Cord Blood) (Grove et al., 2004) 등에 존재하며, 특히 제대혈은 얼마나 아기에게 해를 야기시키지 않는 비교적 비침투적인 중간엽 줄기세포 공급원이다. 지방 조직은 골수에 비해 많은 양의 중간엽 줄기세포를 가지고 있으며, 골수 유래 중간엽 줄기세포와 그 특징이 비슷하다(Kern et al., 2006). 지방 유래 줄기세포는 성형 시 지방 흡입술로부터 많은 양의 지방 조직을 얻어 세포를 얻을 수 있다. 이를 바탕으로 중간엽 줄기세포는 조직공학과 세포기반 치료에 있어서 중요한 역할을 하고 있다(Croft & Przyborski, 2004).

중간엽 줄기세포만을 인지하는 표지인자가 부족하기 때문에 골수로부터 순수하게 분리하는 것이 어렵다. 더욱이, 골수로부터 많은 양의 중간엽 줄기세포를 분리하기가 어렵고, 장기간 배양이 쉽지 않다. 이러한 중간엽 줄기세포를 고유의 특성을 유지하면서 장기간 보존하는데 필수적인 방법이 동결이다(Milosevic et al., 2005). 세포 동결에 있어서 중요한 요인으로는 동결속도, 세포와 동결보호제의 종류, 삼투압 등을 들 수 있으며, 특히, 세포에 맞는 적절한 동결보호제를 선택 하는 것이 가장 중요시 되는 점이다(Meryman, 2007). 동결보호제는 종류에 따라 각각 세포막에 대한 다른 침투능력을 가지며, 이는 세포 내 독성뿐만 아니라 세포의 생존률에도 다양한 영향을 미친다. 현재, 일반적으로 사용되는 동결보호제로 DMSO를 들 수 있다. 비록 DMSO는 동결 보호제로서 여러 문제점이 있는데, 동결 후 세포 증식을 억제하거나 (Takase et al., 1992), 10% DMSO로서의 세포 동결 시 생존률을 저하시키는 것으로 보고되었을 뿐만 아니라(Heng et

al., 2006), 이를 배양액에 혼합하였을 때 세포 독성을 유도하거나, 신경세포 분화, 심근세포로의 분화를 야기한다고 보고되었다(Kotobuki et al., 2005). 그러나, DMSO는 세포 독성을 나타내고 있음에도 불구하고 현재까지 가장 광범위하게 사용되고 있는 세포 동결보호제이다.

돼지 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 연구는 극소수의 연구자들에 의하여 연구가 수행되고 있으며, 특히 돼지 중간엽 줄기세포에 대한 동결보호제에 관한 연구는 아주 미비한 실정이다. 본 연구에서는 돼지 골수 유래 중간엽 줄기세포를 분리하여 서로 다른 동결보호제; 10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG를 이용하여 동결 및 해동 후, 동결 전후 세포의 생존률, 세포의 증식률, apoptosis를 조사하였으며, 특히 동결을 전 후한 줄기세포 유지능을 확인하기 위하여 줄기세포 관련 전사인자의 발현 분석 및 조직특이세포로의 분화 관련 유전자들의 발현 양상을 비교함으로써 돼지 골수 유래 줄기세포의 동결보호제를 개발을 위한 연구를 수행하였다.

연구 재료 및 방법

1. 돼지 중간엽 줄기세포의 채취 및 배양

2개월된 돼지의 femur와 tibia로부터 골수를 채취하고, Ficoll-Paque-Plus를 이용하여 세포를 분리하였다. 채취한 골수를 1:1로 Balanced salt solution과 섞고, Ficoll 용액을 천천히 기울여 넣어 층을 만든 후, 원심 분리를 이용하여 단핵 세포만을 분리하였다. 분리된 세포를 Balanced salt solution으로 여러 번 세척하고, 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM(Gibco, USA) 배지로, 5% CO₂, humidified, 37°C 조건에서 배양하였다. 48시간 후, 부착 되지 않은 세포의 제거를 위해 배양액을 교환하였다. 계대 배양은 배양용기에 세포가 80~90% 정도 증식하였을 때, 0.25% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 분리, 배양하였다.

2. Alkaline Phosphatase (AP) 염색

돼지 중간엽 줄기세포를 커버글라스가 들어가 있는 6-well에 5×10^3 /well개씩 접종한 후 2주 동안 배양하였고, 배양액은 3일에 한 번씩 교환해 주었다. AP 염색을 위해, Alkaline Phosphatase chromogen kit(BCIP/NBT, Promega)를 이용

하였다. 간단히 설명하면, 세포에 염색약을 넣고 20분간 실온에서 염색시킨 후 PBS로 2~3회 세척하고, 4% paraformaldehyde를 넣어 20분간 고정시켰다. 광학 현미경을 이용하여 colony의 생성 정도를 확인하였다.

3. 지방 세포 분화 및 염색

중간엽 줄기세포의 지방 분화 유도를 위해 세포를 6-well에 1×10^5 /well 개로 접종한 후, 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배양액에서 5% CO₂, humidified, 37°C 조건에서 배양하였다. 세포의 배양 상태를 확인한 후 지방 분화 유도 배지로 교환하였다. 지방 분화 유도 배지는 DMEM 배양액에 10% FBS, 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin, 1 μM dexamethasone, 100 μM indomethacin, 10 μM insulin, 500 μM 3-isobutyl-1-methyl-zanthine(IBMx)를 첨가한 배지로 3일에 한번씩 배양액을 교환하며 지방분화를 유도하였다. 3주 후, 지방 분화 여부를 확인하기 위해 0.5% Oil Red-O 염색을 하였다. 간단히 설명하면, 60% isopropanol 10 ml에 0.05 g의 Oil Red-O 염색약을 넣고 혼합한 후 지방 분화가 유도된 세포에 15~20분간 염색시킨 후, 광학 현미경으로 관찰하였다.

4. 돼지 유래 중간엽 줄기세포의 동결 및 해동

배양 용기의 80~90% 정도로 자란 2~3번째 계대 배양의 중간엽 줄기세포를 0.25% Trypsin-EDTA를 이용하여 떼어낸 후, 10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG이 첨가된 DMEM에 1×10^6 /ml의 농도로 cryovial에 넣은 후, Cryo-container를 이용하여 25°C에서 -80°C로 분당 -1°C씩 떨어뜨려 동결하였다. 동결한 vial은 액체 질소로 옮겨 일주일간 냉동 보존하였다. 해동을 위해 vial을 37°C water bath에서 녹인 다음, 10% FBS가 포함된 DMEM을 첨가하였다. 이를 원심 분리 하여 상층액을 제거하고, 해동 후 각 그룹 별 세포농도를 확인하기 위하여, 14일간 이들에 한번씩 hemacytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

5. TUNNEL 염색

동결보호제가 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 Vybrant® Apoptosis assay kit #3(Molecular Probes, Inc.)를 이용하여 TUNNEL 염색을 하였다. 동결 전후 세포를 PBS로 2~3번 세척하고 1X annexin-binding 용액을 최종 세포 농도가 1×10^6

cells/ml로 되게 섞는다. 그런 후, FITC annexin V를 5 μl 넣고, PI(100 μg/ml) 염색약을 1 μl 넣어 총 100 μl가 되게 만든다. 실온, 암실에서 15분간 반응시키고 1X annexin-binding 용액을 400 μl 넣어 총 500 μl가 되게 만든 후, Fluorescence activated cell sorter(FACS)를 이용하여 측정한다.

6. Reverse Transcription PCR

동결 전 배양한 돼지 중간엽 줄기세포를 0.25% Trypsin-EDTA를 첨가하여 분리한 다음, PBS로 세척하고, 원심 분리한 후 RNA를 추출하였다. 서로 다른 동결 보호제를 이용하여 동결 한 중간엽 줄기세포는 일주일간 액체질소에 저장 후 해동하고, 각 그룹 별로 5시간, 10시간 배양한 다음, 각 세포를 모아 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 농도를 측정 한 후, 1 μg의 RNA, superscript™ III RT(Invitrogen Corporation, USA)와 oligo-dT primer로 cDNA를 합성하였다. 총 20 μl 반응량 중 1 μl cDNA를 이용하여 Premix(Maxim PCR premix kit i-star Taq, Korea)를 이용하여 93°C에서 3분, 93°C에서 40초, primer에 따라 annealing 온도를 52~62°C, 72°C에서 50초, 72°C에서 5분간 35~37 cycle 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR로 증폭된 산물을 size marker와 함께 1% 아가로스 겔과 1X TAE 용액을 사용하여 100 volt에서 30분 동안 전기영동한 후, Gel Doc(Bio Rad, USA)으로 관찰하였다. 컨트롤 유전자로 GAPDH를 사용하였다.

7. 통계처리

모든 실험 결과는 평균값±표준오차(means±SEM)로 제시하였다. 시험 처리군 간의 평균값 비교는 one-way ANOVA와 Duncan's and Turkey's multiple comparisons test에 의해서 이루어졌으며, 유의적 차이는 $p < 0.05$ 의 수준에서 검증하였다.

결 과

1. 돼지 중간엽 줄기세포의 형태 및 동결 전후 AP 염색

돼지의 femur와 tibia로부터 분리한 줄기세포의 형태와, 14일간 배양하여 형성된 colony를 확인하기 위해 AP 염색을 하였다. 실험 결과, 돼지로부터 채취한 줄기세포는 배양용기에 부착 할 수 있는 능력을 가졌고, 그 형태 또한 섬유아세포와 비슷한 모양을 가지며, 다각형 또는 방추 모양을 보였

다(Fig. 1A-a). 또한 2주간 배양 하였을 때, 배양 용기에 서로 균형이 잡힌 colony들이 많이 형성되었음을 알 수 있었다(Fig. 1A-b). 또한 Fig. 1에서 colony 군집들이 AP 염색에 positive함을 보였다.

돼지 중간엽 줄기세포를 동결하기 위해 10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG 군으로 동결하여, 일주일간 액체 질소에 보관한 후 급속 해동하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM에 14일간 배양하여 각 그룹별 colony 형성과 AP 염색을 확인하였다. 동결에 따른 중간엽 줄기세포의 AP 활성도를 측정된 결과, 미동결 신선한 중간엽 줄기세포에서는 강하게 AP 염색되었으며(Fig. 2B-a), 10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG 동결 세포군에서의 AP 염색 또한 양적으로 나타났다. Fig. 1B(b~d)에서는 각 그룹별로 colony 군집들이 동결 전 세포와 같이 서로 균형적으로 형성됨을 보여 주고 AP 염색에 positive함을 확인할 수 있었다.

2. 지방세포 분화의 형태학적 관찰 및 Oil Red-O 염색

돼지 중간엽 줄기세포로부터 지방세포로의 분화를 유도한 결과, 약 7일째부터 세포질 내에 지질 방울이 형성됨을 보였

고, 15일째가 되었을 때 세포 내 풍부한 지질방울이 형성되어 붉게 염색됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1A-c, d).

3. 동결 보호제에 따른 동결 후 중간엽 줄기세포의 증식을

동결 전 중간엽 줄기세포와 각 그룹별 동결 세포를 24-well 배양 용기에 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 로 접종한 후, 48시간마다 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포증식률은 각 실험군에서 비슷한 양상을 보였으며, 48~96시간 사이 동결 전 세포가 동결보호제를 사용하여 동결시킨 처리 군보다 유의적으로 증식률이 높았으나, 144시간 이후로는 모든 군에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 하지만, 1.5M EG 군이 동결 군 중에서는 동결 전 세포의 증식률과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 2).

4. 동결 보호제에 따른 동결 전후 세포의 생존률 비교 측정

동결 시 동결보호제가 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아 보기 위해 동결 후 일주일간 액체질소에 보관하여 해동한 세포를 Vybrant[®] Apoptosis assay kit로 염색한 후 FACs를 이용하여 실험하였다(Fig. 3). 실험 결과, 동결 전후 생존률

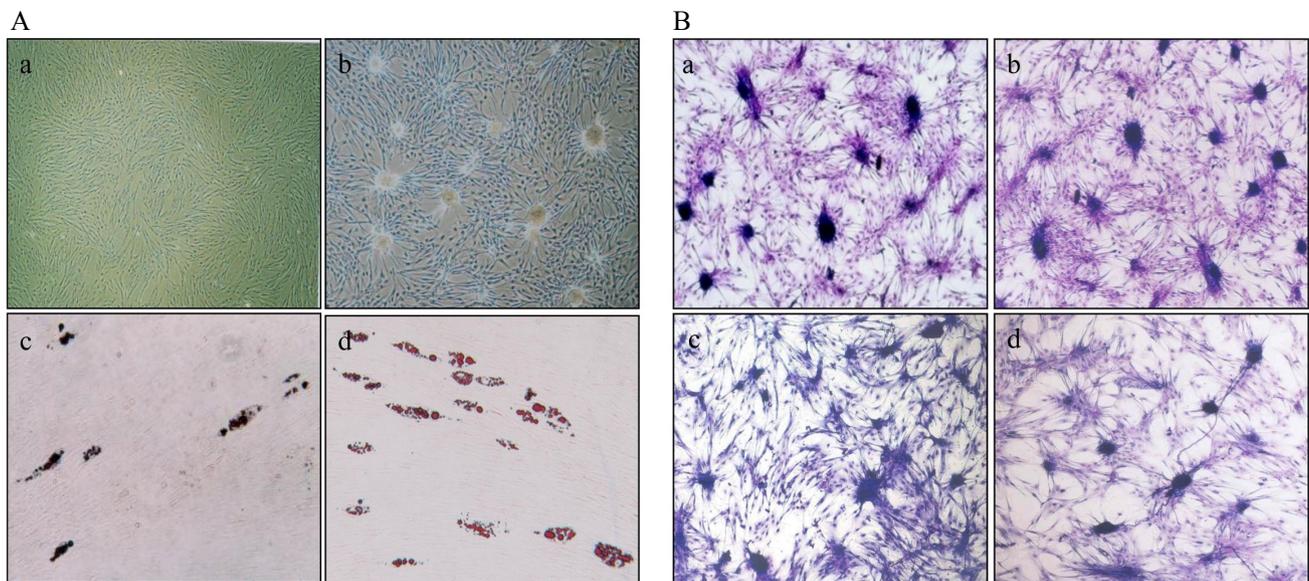


Fig. 1. Isolation and characterization of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). A, pMSCs formed colonies and differentiated into adipocytes (a: phase contrast, b: colony formations, c and d: pMSCs was induced to differentiated into adipocytes in adipogenic medium for day 7 (c) or day 15 (d), respectively, and the derived adipocytes were identified by oil red O staining ($\times 100$)). B, Colony formation and AP staining in pMSCs before or after cryopreservation with different cryoprotectants. (a: AP stain of pMSCs, b: AP stain of post-thawed pMSCs with 10% DMSO, c: AP stain of post-thawed pMSCs with 1.5M EG, d: AP stain of post-thawed pMSCs with 5% DMSO/0.75M EG ($\times 40$)).

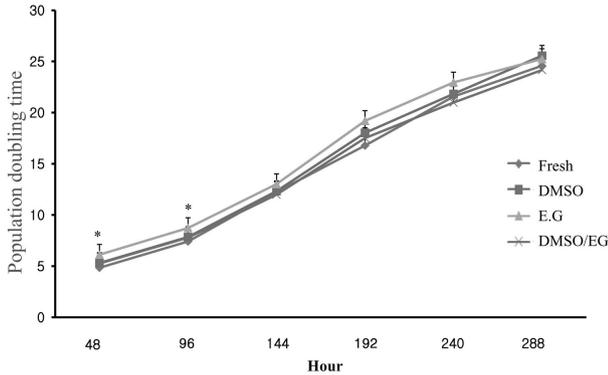


Fig. 2. Doubling time of fresh and post-thawed pMSCs. Cumulative doubling time for fresh and post-thawed pMSCs during the same culture period. All experiments were performed in three independent experiments. (*) $p < 0.05$ versus fresh control cell.

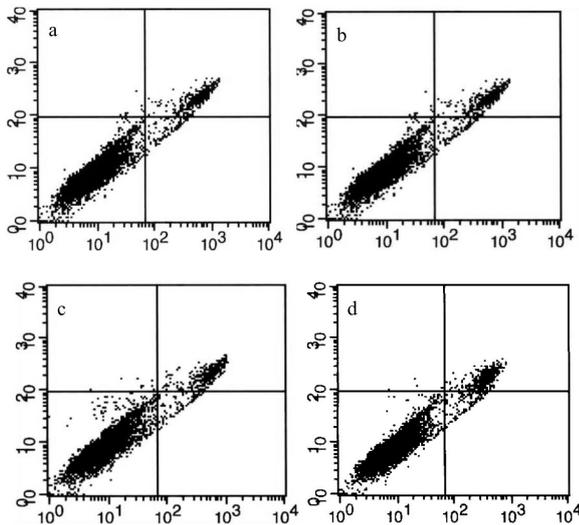


Fig. 3. Cell viability and gene expression before and after cryopreservation with different cryoprotectants. FACS analysis for fresh and post-thawed pMSCs cell viability (a: fresh, b: 10% DMSO, c: 1.5M EG, d: 5% DMSO/0.75M EG). The top quadrant both left and right; necrosis cells, the lower left quadrant; live cells, lower right quadrant; apoptosis cells.

에서는 동결 전 세포(92.3±1.3)가 동결 후 세포(10% DMSO: 72.3±4.3; 1.5M EG: 70.3±4.3; 5% DMSO/0.75M EG: 66.8±2.8)보다 유의적으로 높음을 확인할 수 있었다.

Apoptosis 율에서는 동결 전 세포(5.7±0.7)와 10% DMSO

Table 1. Viability of pMSCs following different treatments

Treatments	Groups	Mean±SEM of		
		Live	Apoptosis	Necrosis
Fresh	-	92.3±1.3 ^a	5.7±0.7	2.0±0.9 ^a
	10% DMSO	72.3±4.3 ^b	3.4±0.6	8.8±0.3 ^b
Frozen	1.5 M EG	70.3±4.3 ^b	3.5±0.9	9.3±0.7 ^b
	5% DMSO/0.75M EG	66.8±2.8 ^b	3.4±0.8	9.4±0.6 ^b

Different superscripts in the same column denote significant difference ($P < 0.05$) and 6 replicates were performed.

(3.4±0.6), 1.5M EG(3.5±0.9), 5% DMSO/0.75M EG(3.4±0.8)에서 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었고, Necrosis 율에서는 동결 전 세포(2.0±0.9)가 10% DMSO(8.8±0.3), 1.5M EG(9.3±0.7), 5% DMSO/0.75M EG(9.4±0.6)보다 유의적으로 낮음을 확인할 수 있었다(Table 1).

5. 동결 전후 중간엽 줄기세포의 RT-PCR

동결이 줄기세포 능에 미치는 영향을 확인하기 위해 동결 전 세포와 동결 보호제로 동결시킨 세포를 일주일간 액체 질소에 저장한 다음, 해동시켜 5시간, 10시간 배양하고 줄기세포 표지인자인 *Sox-2*와 *Nanog*, apoptosis 표지 인자인 *Bax*의 발현 정도를 확인하였다. 또한, 동결이 세포분화 유도에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 분화 관련 유전자인 *ap2*, *PPAR α*, *Collagen type XI*, *Osteonectin*을 RT-PCR로 알아보았다(Table 2).

실험 결과, *Nanog*과 *Sox-2* 유전자 발현의 경우, 서로 다른 동결 보호제로 동결한 후 해동한 처리군에 있어서 동결 전 세포와 비교했을 때, 배양할수록 약간 증가하는 경향을 보였으나, 동결보호제 처리군 간에는 유의적인 차이가 없었다. *Bax*의 경우, 동결 전후 발현량에 차이가 거의 없었고, 배양하였을 때 역시 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A). 줄기세포 분화와 관련된 유전자 발현에서도 지방세포 표지인자인 *ap2*의 경우, 동결 전후, 동결 후 배양하였을 때, 발현량에 차이가 없었고, *PPAR α* 유전자는 모든 처리군에서 발현되지 않았다. 연골세포 표지인자인 *Collagen type XI*의 경우 동결 전후 배양시간에 따라 약간의 발현은 있었으나, 처리군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 골세포 표지인자인 *osteonectin* 역시 모든 처리군에서 아주 약하게 발현되었으나, 모든 처리군 사이에 차이가 없었다(Fig. 4B).

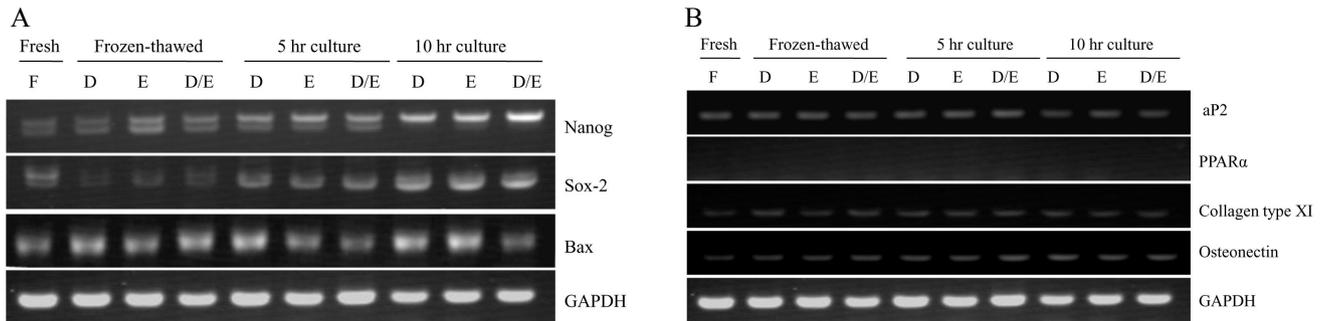


Fig. 4. Gene expression analysis by RT-PCR in fresh and post-thawed pMSCs. A, The expression analysis of genes (*Sox-2*, *Nanog*, or *Bax*) involved in stem cells maintenance or apoptosis was performed using mRNA isolated from fresh and post-thawed pMSCs with different cryoprotectants (F, Fresh; D, 10% DMSO; E, 1.5M EG; D/E, 5% DMSO and 0.75 M EG). The results shown are representative of at least three independent experiments. B, RT-PCR analysis for the expression of adipogenic/chondrogenic/osteogenic genes in fresh and post-thawed pMSCs. The expression levels of stem cell differentiation-related genes were investigated in pMSCs before and after cryopreservation with different cryoprotectants (F, Fresh; D, 10% DMSO; E, 1.5M EG; D/E, 5% DMSO and 0.75 M EG). The results shown are representative of at least three independent experiments.

Table 2. Primer used for the RT-PCR analysis for stem cell specific and differentiation markers

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Accession No.
<i>Nanog</i>	F-ATC CAG CTT GTC CCC AAA	438	AY 596464
	R-ATT TCA TTC GCT GGT TCT GG		
<i>Sox-2</i>	F-GCC TGG GCG CCG AGT GGA	443	NM003106
	R-GGG CGA GCC GTT CAT GTA		
<i>Bax</i>	F-AAG CGC ATT GGA GAT GAA CT	251	AJ 606301
	R-CTG GAC TTC CTT CGA GAT CG		
<i>ap2</i>	F-GGC CAA ACC CAA CCT GA	167	AF 102872
	R-GGG CGC CTC CAT CTA AG		
<i>PPARα</i>	F-TAC GGA GTT CAT GCC TGT GA	209	NM001044526
	R-TTG GCT TTT TCA GAC CTT GG		
<i>Collagen Type xl</i>	F-TGG AAT TAT TTT ATA ATA TG	205	AJ 536287
	R-AGG TCC TGG ATT TCC TTG TT		
<i>Osteonectin</i>	F-TCC GGA TCT TTC CTT TGC TTT CTA	187	AW 436132
	R-CCT TCA CAT CGT GGC AAG AGT TTG		
<i>GAPDH</i>	F-CTG CCC CTT CTG CTG ATG C	151	AF 17079
	R-GAC AAC TTC GGC ATC GTG GA		

고 찰

세포은행 구축을 위한 기술에서, 동결은 재생의학과 조직 공학에서의 임상적 적용을 위한 세포의 중요한 공급원으로 이용된다. 특히, 중간엽 줄기세포의 경우 제한된 세포 공급

때문에 세포은행에서 장기간 저장의 중요성은 더욱더 강조되어 왔다. 만약, 동결된 중간엽 줄기세포를 장기간 보존할 수 있고, 동결 후 높은 생존률과 조직 특이적인 다양한 계통으로 분화가 가능하다면 재생의학에 있어서, 특히 면역 거부 반응을 피하기 위해 자가이식하는 경우 동결은 유용한 세포

공급원이 될 것이다(Kotobuki et al., 2005). 그래서 본 실험에서는 2개의 다른 동결보호제; DMSO와 EG를 단독으로 사용하거나 2개를 조합하여 돼지 중간엽 줄기세포 동결하고, 세포의 생존률, apoptosis를, 세포 증식률, 유전자 발현에 대해 조사하였다. 동결 전, 돼지로부터 직접 분리해낸 세포를 중간엽 줄기세포임을 확인하기 위하여, colony 형성과 AP 활성, 중배엽 유래 지방세포로의 분화를 실험하였다. 실험 결과, 형태학적으로 분리한 돼지 중간엽 줄기세포는 섬유아세포 및 방추사 모양이며, 배양 시 균형적인 colony 형성을 보였다. 또한 colony들은 AP 염색에 positive 함을 나타내었다. 동결 후 해동한 중간엽 줄기세포 역시 colony가 형성되고 AP활성이 높음을 확인할 수 있었다. Buchanan (2004) 등의 보고에 의하면, 사람 조혈모세포(hematopoietic cell)를 동결한 후 해동하였을 때 동결 전후 세포의 형태학적인 변화나, colony 형성에 차이가 없음을 보고하였다. 이는 돼지 중간엽 줄기세포 역시 동결과 동결 보호제가 세포의 모양과 colony 형성에 영향을 미치지 않음을 보였다. Ha(2005) 등에 따르면, 5% DMSO와 10% EG의 조합이 인간 배아줄기세포의 완만동결-급속냉동에 있어서 가장 적절한 동결보호제임을 보고하였다. 하지만 이 실험에서는 대조적으로 동결 전 세포의 생존률(92.3±1.3%)이 동결 해동한 세포의 생존률(10% DMSO: 72.3±4.3; 1.5M EG: 70.3±4.3; 5% DMSO/0.75M EG: 66.8±2.8) 보다 유의적으로 높았으며, 동결 해동한 세포군에서 일반적으로 쓰이는 10% DMSO와 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG를 비교해 보았을 때 유의적인 차이가 없음을 보였다. 이는 흔히 쓰는 10% DMSO 대신 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG를 동결 보호제로 사용해도 생존률에 큰 차이가 없음을 말해준다. 또한, 동결 처리군 간의 apoptosis를 역시 동결 전 세포와 비교했을 때 큰 차이는 없으나, necrosis율에서는 동결 후 세포 군이 동결 전 세포보다 유의적으로 높음을 알 수 있었다. 하지만 Heng(2006) 등의 보고에 따르면 인간 배아줄기세포를 전통적인 방식인 완만동결을 했을 때, apoptosis율이 necrosis율 보다 더 높았다. 인간 배아줄기세포의 세포 증식률을 비교하기 위하여 동결 해동 후 4일간 배양했을 때, 증식률에 있어서 큰 차이가 없음을 보고되었다(Haack-Sorensen et al., 2007). 하지만 본 실험에서는 동결 해동 후 체외 배양 시 48~96시간까지는 동결 전 세포의 증식률이 유의적으로 상당히 높았으나, 96시간 이후로

는 큰 차이가 없었다. 이 결과는 동결 시 세포가 저온 충격과 동결 보호제로부터 피해를 입어 초기 해동 후 회복되기 전까지 시간이 걸리는 것으로 생각된다. 또한 동결 처리군 중 1.5M EG군의 증식률은 동결 전 세포의 증식률과 비슷한 양상을 띠었다.

Apoptosis와 관련된 유전자 발현을 보기 위해 *Bax*를, 줄기세포 표지인자로 *Sox-2*와 *Nanog*을, 분화 관련 유전자 발현으로 *ap2*, *PPAR α*, *Collagen type XI*와 *Osteonectin*을 조사하였다. Apoptosis는 세포사와 관련된 일반적이고 규칙적인 생리 과정이다(Wyllie et al., 1980). 이는 세포질 응축, 핵막과 세포막의 변화 등 세포의 독특한 초 미세구조와 생화학적인 변화를 특징짓는 복잡한 현상이다(Williams & Smith, 1993). *Bax* 유전자 발현은 동결 전후 처리군 간에 큰 차이가 없으며, 5시간 배양, 10시간 배양 후에도 동결보호제를 처리한 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

동결이 줄기세포 능에 영향을 미치지 확인하기 위해 *Nanog*과 *Sox-2* 유전자의 발현을 조사하였다. *Nanog*은 인간배아줄기 세포의 전분화 능력을 유지하는 기능을 가진 homeodomain 유전자이다(Mitsui et al., 2003; Seo & Lee, 2010; Go et al., 2011). Katkov(2006) 등에 의하면 DMSO를 이용하여 인간 배아줄기세포를 완만동결시킨 결과, 전분화능 유전자인 *Oct-4* 유전자의 발현이 감소하였다. 이와 대조적으로 Ha(2005) 등에 의하면, 인간 배아줄기세포를 DMSO와 EG으로 동결하였을 때 *Oct-4*와 *Nanog* 유전자의 경우, 동결 후 유전자의 발현에 큰 차이가 없음을 보고하였다. 본 연구에서는 돼지 중간엽 줄기세포를 동결 후 해동하여 5시간에서 10시간 배양하였을 때, 시간의 경과에 따라 유전자의 발현이 증가하는 경향을 보였다. 이는 동결 후 해동시킴에 따라 세포가 스스로 회복하려는 능력때문에 줄기세포 표지인자인 *Nanog*과 *Oct-4*의 발현이 증가하는 것으로 생각된다. 하지만 동결보호제 처리군 간에는 동결 후나 배양시켰을 때 발현에 있어서 유의적인 차이가 없었다.

중간엽 줄기세포는 일반적인 배양 조건에서도 시간이 지남에 따라 자연적으로 분화 유도가 일어난다. 그래서 동결이 줄기세포의 분화를 유도하는지 확인하기 위하여 동결 후 분화 관련 유전자의 발현을 보았다. 지방 분화와 관련 유전자인 *fatty acid-binding proteins(FABP)*는 세포질내 지방산 사체론으로, 그 이성질체인 *ap2*는 비탄과 글루코오스 대사에 중요한 역할을 한다(Makowski et al., 2005). 본 연구에서 *ap2*

의 발현은 동결 전후, 해동 후 배양시켰을 때 모든 처리군 간에 큰 차이가 없었다. *PPAR α*의 경우 동결 전후 모든 세포군 사이에 발현이 되지 않았다. 연골세포 관련 유전자인 *Collagen type XI*과 골세포 관련 유전자인 *Osteonectin*의 경우 *ap2*와 마찬가지로 동결 전후 약간 발현되는 모습을 보이거나, 동결 후 배양하였을 때 모든 처리군 간에 유의적인 차이는 없었다. 인간 배아줄기세포를 동결 역시, 동결 전후 α -fetoprotein (내배엽), Brachyury(중배엽), PAX-6(외배엽) 등 유전자 발현에 큰 차이가 없음이 보고되었다(Ha et al., 2005). 이를 종합해 볼 때 동결은 줄기세포의 분화에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 요약적으로 본 연구에서 돼지 골수 유래 중간엽 줄기세포는 높은 성장률과 다양한 계통으로 분화되는 능력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 동결 처리군(10% DMSO, 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG) 간의 생존률과 증식률, apoptosis를 간에 차이가 없었으며, 동결 후 모든 처리군에서 colony가 형성되고 AP 염색에 positive 함을 알 수 있었다. Apoptosis, 줄기세포 분화와 관련된 유전자의 발현에 있어서 10% DMSO와 1.5M EG 처리군 간에 차이가 없었으나, 동결 전후 줄기세포 전사인자와 관련된 유전자 발현의 경우 시간이 지남에 따라 약간 발현량이 증가하여 나타났다. 하지만 동결 처리군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 이를 종합해 볼 때, 돼지 중간엽 줄기세포 동결 시 일반적으로 쓰이는 10% DMSO와 1.5M EG, 5% DMSO/0.75M EG 역시 동결보호제로서 사용할 수 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 바이오그린 21 프로젝트, 20070301034041과 PJ 007133201005, Rural Development Administration의 지원으로 이루어졌습니다.

인용문헌

- Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW (2004) Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the methods using a human hematopoietic cell line. *Stem Dev* 13:295-305.
- Chen LB, Jiang XB, Yang L (2004) Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 15:3016-3020.
- Croft AP, Przyborski SA (2004) Mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma; basic biology and potential for cell therapy. *Curr Anaesth Crit Care* 15:410-417.
- D'ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC (2004) Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 15:2971-2981.
- Fehrer C, Lepperdinger G (2005) Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol* 40:926-930.
- Go YE, Kim HJ, Jo J, Lee HJ, Do JT, Ko JJ, Lee DR (2011) Comparative analysis for *in vitro* differentiation potential of induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells, and multipotent spermatogonial stem cells into germ-lineage cells. *Dev Reprod* 15:41-52.
- Grove JE, Bruscia E, Krause DS (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22:487-500.
- Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, Moon SY (2005) Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of programmable freezer. *Hum Reprod* 20:1779-1785.
- Haack-Sorensen M, Bindslev L, Mortensen S, Friis T, Kastrup J (2007) The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. *Cytotherapy* 9: 328-337.
- Han CM, Wang SY, Lai PP, Cen HH (2007) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells *in vitro*. *Differentiation* 75:292-298.
- Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Rufaihah AJ, Yang Z, Bay BH, Ge Z, Ouyang HW, Lee EH, Cao T (2006) Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J Biomed Sci* 13:433-445.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from

- bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24(5):1294-1301.
- Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H (2005) Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 11(5-6):663-673.
- Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS (2005) The fatty acid-binding protein, ap2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. *J Bio Chem* 13:12888-12895.
- Meryman HT (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47(5):935-945.
- Milosevic J, Storch A, Schwarz J (2005) Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells* 23:681-688.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:635-642.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Seok HJ, Kim YE, Park JA, Lee Y (2010) Transcriptional regulation of human Nanog gene by OCT4 and SOX2. *Dev Reprod* 14:123-129.
- Takase K, Sawai M, Yamamoto K, Yata J, Takasaki Y, Teraoka H, Tsukada K (1992) Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: kinetics of the arrest and expression of the cell cycle marker proliferating cell nuclear antigen in Raji cells. *Cell Growth Differ* 3:515-521.
- Williams GT, Smith CA (1993) Molecular regulation of apoptosis: genetic control on cell death. *Cell* 74:777-779.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
-
- (Received 17 August 2011, Received in revised form 24 September 2011, Accepted 26 September 2011)