

산소 농도의 변화와 물리적 손상이 제대혈 중간엽 줄기세포의 증식에 미치는 영향

[†]박 란 숙

승의여자대학교 식품영양과

Effect of Oxygen Concentration, Physical Trauma on Proliferation of Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells

[†]Ran-Sook Park

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

Abstract

Human umbilical Mesenchymal Stem Cell(uMSC) has been known as one of major component to regenerate connective tissues such as bone, cartilage, fat and others. The effect of low(5%), normotensive(20%) oxygen and freezing-thawing damage on proliferation of uMSC were investigated. low oxygen concentration culture of uMSC resulted in enhanced proliferation significantly($p<0.05$) than 20% of oxygen culture. After the freezing-thawing injury to uMSC, 5% oxygen culture showed marked proliferation of uMSC than that of 20% oxygen($p<0.05$) in the 5th passage of uMSC. Expression of antioxidant enzymes such as superoxide anion 1 and glutathione peroxidase 1 appeared marked in 20% oxygen cultured uMSC, which suggest oxidative stress could induce less proliferation of uMSC. Above findings would suggest proliferation of uMSC in 5% of oxygen will give more yields.

Key words: MSC, low oxygen(hypoxia), freezing-thawing, oxidative stress

서 론

살아있는 인간은 태생기부터 성체에 이르기까지 모태나 외부 음식을 통하여 영양을 공급받으며, 호흡을 통하여 산소를 섭취하고 탄산가스를 배출하면서 성장한다. 영양분의 공급이 중단된 상태, 금식기간에도 생명을 유지할 수 있지만, 산소가 없는 상태에서는 보통 사람은 1분 이내에 의식을 잃고 5분이 지나면 더 이상 생존할 수 없다. 지구의 대기는 질소 78%, 산소 21%, 아르곤, 탄산가스, 기타 가스가 1%로 되어 있다. 일반적 세포 배양에서는 20%의 산소, 75%의 질소, 5%의 탄산가스를 사용하여 왔다. 생체 내에서는 산소 농도가 이보다 낮아 동맥혈의 산소 농도가 12%이고, 신체부위에 따라 차이가 있지만 조직내 산소 농도는 약 3%이며, 자궁내 배

아(embryo)의 산소 농도는 이보다 더 낮다고 한다(Csete M 2005).

성체 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 성체내의 골수, 장기, 조직 등에서 찾아볼 수 있으며, 평소에는 세포분열이나 분화가 없는 휴지기에 있으나 조직이 손상을 받으면 동일한 세포와 조직으로 손상을 수복할 수 있는 자기 재생능력이 있다(Pittenger 등 1999). 예를 들면, 골수에 줄기세포가 있기 때문에 백혈병을 치료할 때, 건강한 골수를 이식하면 백혈구, 적혈구 등 새로운 세포를 만들 수 있으며, 탯줄 줄기세포를 이식하여 소아 백혈병을 치료하기 시작한지도 23년이 지났다(Gluckman 1989). 피부와 모낭에도 줄기세포가 있어 기저세포층에서 자라나와 약 4주간의 시간이 지나면 수명을 다한 각질세포가 때와 함께 탈락하고, 모발이 빠져도 새로 나오는 일이 끊임없이 지속되는 것은 줄기세포가 있기 때문에

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

가능한 것 일이다.

줄기세포를 원하는 수만큼 증식시키는 방법의 개발이나 배양 도중에 발생할 수 있는 줄기세포 손상에 관한 분자생물학적 기전의 연구는 줄기세포의 영양, 증식, 분화 등과 밀접한 관계에 있다. 저자는 영양학적 면에서 볼 때, 우리가 많이 먹는 마늘의 성분인 S-allyl cysteine(SAC)가 사람 제대혈 유래 중간엽줄기세포의 증식을 유도하는 작용이 있음을 단일세포 수준의 배양에서 입증하여 보고한 바 있었다(박란속 2009). 높은 농도의 산소나 산화-환원 과정에서 발생할 수 있는 산화성 스트레스도 세포손상과 관계가 깊다. 이와는 대조적으로 산소 농도를 낮추어 조혈모줄기세포를 배양하면 더 많은 증식이 관찰되었다고 한다(Koller 등 1992).

본 연구는 사람 제대혈 중간엽줄기세포(umbilical Mesenchymal Stem Cell, 이하 uMSC)의 저농도(5%) 산소, 일반농도(20%) 산소 배양에서의 증식 특성을 관찰하였다. 아울러 세포배양에 영향을 주는 인자들 즉 동결-해동의 물리적 손상과, 일반(20%) 및 낮은(5%) 산소 농도, 산화적 스트레스(oxidative stress) 등이 증식에 미치는 영향을 규명하였다.

연구방법

1. 제대혈에서 uMSC의 분리

서울 시내의 제대혈은행이 산모로부터 서면 동의를 얻어 보관 중인 공여 제대혈을 연구용으로 공급받아 사용하였다. 제대혈을 실온에서 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 동량 희석하고 15 ml comical tube에 비중이 1.077인 Ficoll-Paque™ Plus 6 ml를 분주한 후 동량 희석액 9 ml를 튜브 바닥에서부터 주입하고 750 g, 30분 동안 상온에서 원심분리하여 단핵세포층을 분리하였다. 10% DMEM-FBS(Hyclone, USA) 배지에 분리한 단핵세포를 6 well에 well당 1×10^7 세포로 분주하여 1주일간 배양하고, 비 부착세포는 제거하고 새로운 배지를 첨가하여 배양하였다. 부착 세포가 배양된 well에서 세포들이 모여서 증식하는 MSC colony가 확인되면 0.25% Trypsin-EDTA를 처리하여 25 cm²-cell culture flask로 옮기고 70~80% confluence를 이루면 5 ml를 75 cm² flask에 옮겨 충분한 양을 증식하였다. 또한 세포에 물리적 스트레스에 대한 세포 증식을 확인하기 위하여 1×10^6 cell/ml의 세포를 freezing media(10% DMSO in FBS)로 부유하고 액체질소탱크에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

Colony 상태에서 분리한 uMSC를 flask 넣어서 증식시켜 70~80% confluence가 되었을 때를 1계대(passage)라고 하였고, 그 다음을 각각 2, 3계대로 하였으며, 동결-해동의 물리적 손상을 실험하기 위하여 3계대를 액체질소에 보관한 후 실험에서는 4계대와 5계대를 사용하였다.

중간엽줄기세포(MSC) 임을 확인하기 위한 과정은 Park 의 논문에서와 같은 방법을 사용하여 면역표식자를 확인한 결과, CD29, 44, 90, 105 및 106 양성으로 uMSC임을 관찰하였다(Park RS 2009).

2. 산소 농도에 따른 uMSC의 증식

위의 방법으로 분리한 제대혈 단핵세포를 flask에 분주하여 20% 산소 5% CO₂ 배양기에 분주하거나 5% 산소 5% CO₂ 배양기(HERA cell 150, Thermo Scientific, USA)에 분주하고, 약 14일(20% 산소 배양기) 또는 20일(5% 산소 배양기) 후에 확인한 중간엽 줄기세포를 *in vitro* 상태로 배양하였다. 각각의 배양 조건에서 증식된 세포는 propidium iodide를 포함한 Accucchip kit와 automatic cell counter(ADAM-MC Digital-bio, Korea)를 이용하여 세포수와 생존율을 측정하였다.

3. 배양기 산소 농도에 따라 발현되는 산화적 스트레스 단백질의 Western Immunoblot 비교

1계대의 uMSC와 3계대 후 동결-해동의 물리적 손상을 가한 다음의 5 계대 uMSC와 저농도(5%) 및 일반농도(20%) 산소 상태에서 자란 uMSC를 RIPA buffer로 단백질을 추출한 후 BCA(Bicinchoninic acid) standard solution을 이용하여 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질을 10% SDS-PAGE gel에 loading한 후 120 voltage에서 1시간 동안 전기 영동을 실행하였다. 전기 영동 한 단백질을 methanol로 활성화된 PVDF membrane으로 transfer한 후 항산화 효소인 catalase(CAT), glutathione peroxidase 1(GpX1), superoxide dismutase 1(SOD1)에 대한 1차 항체를 이용하여 표지하였다. 1차 항체에 대한 2차 항체를 표지한 후 ECL solution을 이용하여 단백질의 발현 변화를 관찰하였다.

4. 실험군 및 통계분석

실험 1은 3명의 산모(donor 1, 2, 3)에서 얻은 제대혈의 1계대를 각각 5%, 20% 산소 배양기에서 배양한 후 uMSC 증식 양상을 비교하였다. 실험 2는 동결-해동 손상 실험으로 1계대에서부터 3계대까지 산소 농도에 따른 uMSC의 증식이 차이가 없었던 산모 1명(donor 4)의 3계대를 동결-해동시킨 후, 배양하여 5계대에서 각각의 산소 농도에 따른 증식을 비교하였다. 실험 3은 각 산소 농도에서 산화성 스트레스 단백질의 발현을 분석하였다. 분석을 위하여 세포배양 flask는 3 배수로 하였으며, ANOVA로 유의수준을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 산소 5%, 20% 배양기에서 uMSC의 증식 비교

3개의 제대혈에서 위와 같은 방법으로 분리후 uMSC의 증식을 비교한 결과, Fig. 1, Table 1에서와 같이 3개의 제대혈 모두 저농도(5%)에서 일반농도인 20%에서 보다 유의하게 증식하고 있음을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 1). Koller 등은 5%의 저산소가 제대혈과 골수의 조혈모세포와 전구세포들의 증식을 유도하였다고 한다. 이는 10%의 저산소가 사람세포의 시험관내 증식 수명을 25% 증가시켰다는 결과와 일치한다(Packer & Fuehr, 1977). 사람의 골수내 산소 농도는 위치에 따라 1~7%인데, 이 농도에서 자가재생능력과 다분화능(Stemness)을 유지하고 있다고 한다. 여기서 분리한 marrow-isolated adult multilineage inducible(MIAMI) cell은 3% 산소에서 일반 대기에서 배양시킨 것보다 3배 이상 증식하였다고 한다(D'Ippolito 등 2006). 이들은 MIAMI cell이 골수내 산소분압이 낮은 곳에서는 Stemness를 유지하다가 혈관주위나 산소분압이 높은 곳에 위치하게 되면 골모세포로 분화하는 경향이 있음을 지적하였다.

낮은 산소 농도는 반응성 산소종(reactive oxygen species) 생산을 의미하며, 배양세포에 스트레스나 손상을 거의 주지 않는 것으로 추정된다. 저농도의 산소는 세포가 증식주기(cell cycle)나 분화로 들어가지 않고, 휴지기 상태를 유지할 수 있도록 해준다고 한다(Holzwarth 등 2010).

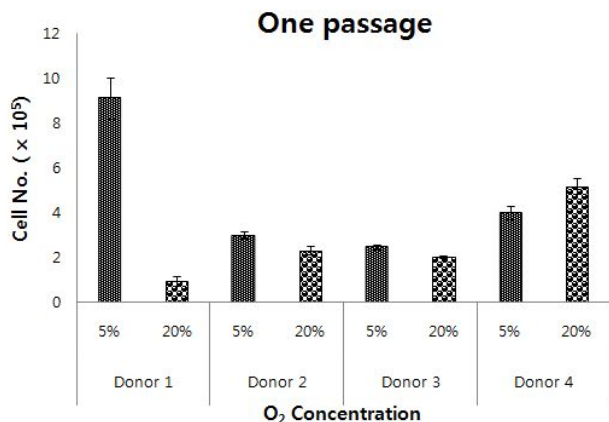


Fig. 1. Result of numbers of uMSC from donors in different oxygen concentration. Donor 1 to 3 showed more proliferation of uMSC significantly($p < 0.05$) except donor 4.

2. 동결-해동 손상 후 5%, 20% 산소 농도에서의 uMSC 증식의 차이

uMSC에 물리적 손상을 가한 후 각각의 산소 농도에 배양하였을 때, 증식의 차이를 관찰하였다. 계대 1, 2, 3에서 산소 농도에 따른 차이를 보이지 않았던 donor 4의 계대 3을 액체 질소 탱크에 동결보관한 후 해동시키는 손상을 가하였다. 계대 4에서는 유의한 차이가 없었지만, 계대 5에서는 20%에 비하여 5%에서 세포증식이 유의하게 증가되었다(Fig. 2).

실험 2의 결과로 실험 1에서 보았던 1계대에서 5% 산소에서 유의한 증식을 보였던 이유는 물리적 손상이나 20% 산소상태의 배양에서 산화성 스트레스를 비롯한 어떤 형태의 세포 손상이 있었기 때문에 증식에 차이가 발생한 것이라고 추정할 수 있다. 다시 말하면, 세포손상이 발생하여도 5% 산소 농도에서는 세포 손상을 억제할 수 있는 기능이 있다고 추측할 수 있다.

동결-해동은 동결과정에서 세포의 얼음결정, 탈수, 세포내 얼음 등이 발생할 수 있어서 세포의 기능과 생존율을 감소시킨다. 계대 5의 실험에서 보듯 5% 산소 농도는 이와 같은 조건에서 세포를 유지하는 환경으로 작용하였다고 추측할 수 있다. 높은 산소 농도에서 배양한 골수유래 대식세포는 골수

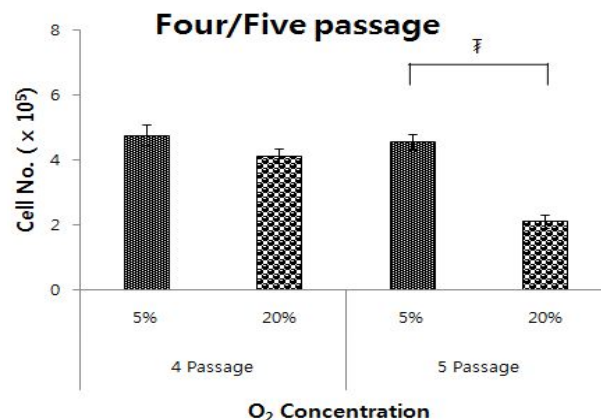


Fig 2. Freezing-thawing injury caused different proliferation pattern between 5% oxygen culture and 20% oxygen culture. Low oxygen culture showed significant proliferation than that of 20% of oxygen($p < 0.05$) in the 5th passage.

Table 1. Number of uMSC from four donors in 5, 20% oxygen and 5% CO₂ incubator

	Passage 1							
	Donor 1		Donor 2		Donor 3		Donor 4	
	5%	20%	5%	20%	5%	20%	5%	20%
Cell No.	8.12	1.18	3.18	2.32	2.54	1.99	3.74	5.52
($\times 10^5$)	9.88	0.8	2.88	2.5	2.53	2.00	3.97	4.83
	9.44	0.8	2.96	2.14	2.36	2.08	4.34	5.19

Table 2. Cell number of uMSC following freezing-thawing damage, 5% oxygen culture appeared more proliferation in the 4th passage and significant increment in the 5th passage($p<0.05$)

	4 Passage		5 Passage	
	5%	20%	5%	20%
Cell No	5.12	3.86	4.76	2.05
($\times 10^5$)	4.59	4.26	4.30	1.93
	4.56	4.27	4.64	2.35

유래 대식세포는 낮은 농도에서 배양한 세포에 비하여 세포 내 산화기능이 높았고, glutathione disulfide/glutathione(GSH) ratio도 더 높았다는 보고(Pfau 등 2004)가 이를 뒷받침하고 있다.

3. 배양기 산소 농도에 따라 발현되는 산화적 스트레스 단백질의 Western Immunoblot 비교

5% 산소 농도에서 더 높은 증식을 보이는 원인이나 동결-해동 손상과정 후에 5% 산소 배양 쪽이 더 많은 증식을 보이는 원인이 산화적 스트레스 단백질의 양과 관련이 있는지 여부를 조사하였다. 3 passage의 5%와 20% oxygen culture를 비교하면, oxidative stress가 많을 때 이를 제거하기 위하여 생산되는 항산화단백질 glutathione peroxidase 1, superoxide dismutase 1가 20% oxygen 배양에서 더 많이 발현함을 알 수 있었다(Fig 3, 4). 즉, 세포증식이 적은 경우에 산화적 스트레스 단백질의 발현이 더 많음을 알 수 있다.

세포내 반응성 산소기(reactive oxygen species)는 세포의 노화와 관련이 있음은 잘 알려진 바 있다. 반응성 carbonyl intermediates인 AGE(advanced glycoxidation end product)는 세포의 노화와 관련이 있고, 산소분압이 높은 상태의 MSC는 AGE 형성이 높다고 하며, CFU(colony forming unit)의 감소, 세포 증식의 감소와 일치한다고 한다(Fehrer 등 2007). 최근에는

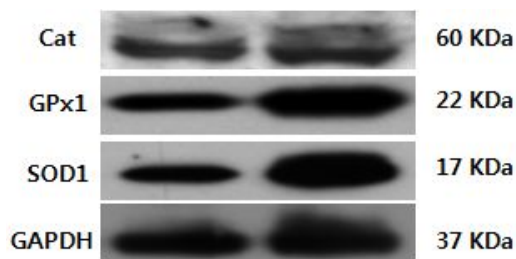


Fig 3. Expression of antioxidant proteins in western blotting in the 3rd passage of uMSC 5%(left), 20%(right) of oxygen culture. 20% of oxygen culture showed more broad band of protein suggesting more amount of proteins.

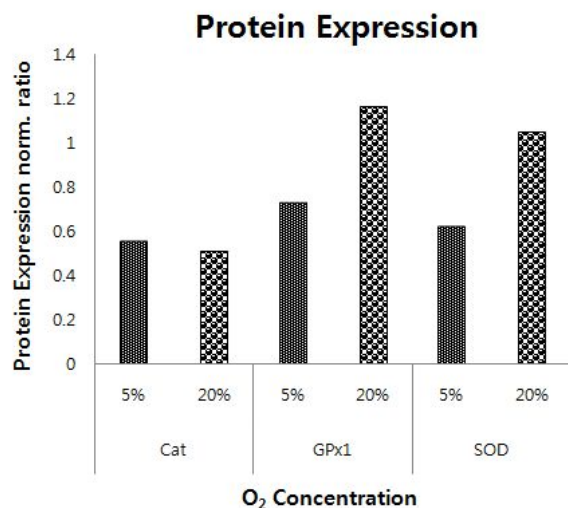


Fig 4. Normalization of western blot protein bands with control of GAPDH protein, which suggested that high oxygen culture appear relation with more production of GPX1(glutathione peroxidase 1) and SOD(superoxide dismutase 1). There was no marked changes in CAT(catalase).

산화스트레스가 MSC의 노화를 유발한다는 보고도 있었다 (Brandl 등 2011).

요약 및 결론

사람 제대혈 중간엽줄기세포(uMSC)의 저농도(5%) 산소, 일 반농도(20%) 산소 배양에서의 증식 특성을 관찰하였다. 아울러 세포배양에 영향을 주는 인자들 즉 동결-해동의 물리적 손상과, 산소 농도와 산화적 스트레스(oxidative stress) 등이 증식에 미치는 영향을 규명하였다. 산소 농도가 낮을수록 중간엽줄기세포(uMSC)의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5%, 20%의 산소 농도, 5%의 CO₂ 존재하에 세포배양을 하였다. 5% 산소에서 배양한 uMSC의 증식이 유의하게 증가 되었다. uMSC에 동결-해동의 손상을 가한 후 5, 20% 산소 배양기에서 배양하면 5% 쪽에서 유의하게 증가하였다. uMSC가 어떤 형태의 손상을 받으면 산소 농도에 따른 증식의 차이를 보이는 점으로 볼 때, 손상된 uMSC는 5%의 산소배양기에서 더 증식이 좋은 점을 알 수 있다. 산화성 스트레스를 제거하기 위한 항산화효소인 Superoxide dismutase 1, catalase, glutathione peroxidase 1 등은 5% 산소 배양조건에서 발현이 미약하였으며, 20% 산소 배양에서 유의하게 발현이 증가하여 uMSC의 산화성 스트레스 정도가 세포증식에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 uMSC의 증식을 높이려면 20% 산소배양에서 CFU를 확인하여 분리한 후, 5% 산소배양을 하는 편이 일반

대기 중인 20% 산소 배양에서 보다 더 많은 세포증식을 시킬 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M, Angele P. 2011. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 317:1541-1547
- Csete M. 2005. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1049:1-8.
- D'Ippolito G, Diabria S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Blood* 39:513-522.
- Fehrer C, Gaunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingger S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperdinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolong their lifespan. *Aging Cell* 6:745-757.
- Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with *Fanconi anemia* by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Eng J Med* 321:1174-1178.
- Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Muller I. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biology* 11:1-11.
- Koller MR, Bender JG, Papoputsakis ET, Miller WM. 1992. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* 80:403-411.
- Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papotsakis ET. 1992. Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. *Exp Hematol* 20:264-270.
- Packer L, Fuehr K. 1977. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267:423-425.
- Park RS. 2009. Effect of S-allyl cysteine(SAC) on the proliferation of umbilical cord blood(UCB)-derived mesenchymal stem cells(MSCs). *Korean J Food & Nutr* 2:313-319.
- Pfau JC, Schneider JC, Archer AJ, Sentissi J, Levva FJ, Granton J. 2004. Environmental oxygen tension affects phenotype in cultured bone marrow-derived macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L354-362.
- 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.

접 수 : 2011년 11월 28일
 최종수정 : 2011년 12월 13일
 채 택 : 2011년 12월 25일