

사람의 골수와 제대정맥에서 유래된 중간엽 줄기세포에서 TREK1 통로의 기능적 발현

박경선¹, 김양미^{2*}

¹한양대학교 분자생명과학부, ²충북대학교 의과대학 생리학교실

Functional expression of TREK1 channel in human bone marrow and human umbilical cord vein-derived mesenchymal stem cells

Kyoung Sun Park¹, Yangmi Kim^{2*}

¹Division of Molecular and Life Sciences, Hanyang University

²Department of Physiology, College of Medicine, Chungbuk National University

요약 사람의 골수 또는 제대정맥에서 유래된 중간엽 줄기 세포 (hBM-MSC 또는 hUC-MSC)는 임상적 치료 적용에 매우 유용한 세포유형으로 알려져 왔다. 우리는 이러한 세포에서 two-pore 도메인 포타슘 (K2P) 채널을 조사하였다. K2P 채널은 다양한 세포유형들에서 안정막 전위를 형성하는데 중요한 역할을 한다. 그들 중 TREK1은 수소, 저산소증, 다불포화 지방산, 항우울제 및 신경전달물질들의 표적이다. 우리는 RT-PCR 분석과 패치고정기법을 이용하여 hBM-MSCs와 hUC-MSC가 기능적인 TREK1 채널을 발현하는지 조사했다. hBM-MSCs와 hUC-MSCs에서 100 pS 단일 채널 전도도를 가진 포타슘 채널이 발견되었고, 그 채널은 세포막 신전 (-5 mmHg ~ -15 mmHg), 아라키도닉산 (10 μM), 세포내 산성화 (pH 6.0)에 의해 활성화 되었다. 이러한 전기생리학적 성질은 TREK1과 유사하였다. 우리의 결과는 안정막 전위에 기여하는 TREK1 채널이 hBM-MSC와 hUC-MSC에 기능적으로 존재하고 있음을 제시한다.

Abstract Human bone marrow or human umbilical cord vein derived-mesenchymal stem cells (hBM-MSCs or hUC-MSCs) have known as a potentially useful cell type for clinical therapeutic applications. We investigated two-pore domain potassium (K2P) channels in these cells. K2P channels play a major role in setting the resting membrane potential in many cell types. Among them, TREK1 is targets of hydrogen, hypoxia, polyunsaturated fatty acids, antidepressant, and neurotransmitters. We investigated whether hBM-MSCs and hUC-MSCs express functional TREK1 channel using RT-PCR analysis and patch clamp technique. Potassium channel with a single channel conductance of 100 pS was found in hUC-MSCs and BM-MSCs and the channel was activated by membrane stretch (-5 mmHg ~ -15 mmHg), arachidonic acid (10 μM) and intracellular acidosis (pH 6.0). These electrophysiological properties were similar to those of TREK1. Our results suggest that TREK1 is functionally present in hBM-MSCs and hUC-MSCs, where they contribute to its resting membrane potential.

Key Words : human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, human umbilical cord vein-derived mesenchymal stem cells, K2P channel, single channel recording, TREK1

1. 서론

포타슘 채널 (K⁺ channel)의 발현 및 조절은 안정막전

위 (resting membrane potential)에 영향을 주고, 세포의 증식, 성장, 분화에 기여하는 세포주기에 영향을 미치며, 신경, 심장, 암세포 등에서 각각 신경 활동도 조절, 심장

본 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업 연구비지원에 의하여 수행되었음.

*Corresponding Author : Yangmi Kim(Chungbuk National University)

Tel: +82-43-261-2855 email: yangmik@chungbuk.ac.kr

Received February 16, 2015

Revised March 4, 2015

Accepted March 12, 2015

Published March 31, 2015

의 흥분성 조절, 세포의 증식 등에 다양한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다[1]. K^+ 채널의 종류는 막전압에 조절되는 K^+ 채널 (Voltage-gated K^+ channel, K_V), 칼슘에 의해 활성화되는 K^+ 채널 (Ca^{2+} activated K^+ channel, K_{Ca}), ATP에 민감한 K^+ 채널 (ATP-sensitive K^+ channel, K_{ATP}), 안정막 전압 근처에서 더 잘 열린다는 inward rectifying K^+ 채널 (inward rectifying K^+ channel, K_{ir}) 등이 있고, 본 논문에서 연구될 채널인 이온이 이동하는 구멍 (pore)이 2개이고 4개의 transmembrane을 가진 two-pore 도메인 포타슘 채널 (two-pore domain potassium channel, K2P) 등이 있다[1]. 이 채널들은 K^+ 채널이지만 특이하게도 K^+ 채널 억제제인 TEA에 억제되지 않아 백그라운드 포타슘 채널 (background K^+ channel)이라고도 불린다[1]. 이 채널은 TWIK, TASK, TREK, TRAAK, TRESK, TALK, THIK 등이 밝혀져 있다[1]. 이들 중 TREK1은 허혈시 나타나는 세포내 생리학적 변화, 즉 세포내 pH의 산성화, 불포화 지방산의 증가, 세포의 부피증가 등에 반응하여 안정막전위를 조절한다[2]. 뿐만 아니라 신경세포에서는 TREK1이 신경전달물질에 의해 신경 활동도를 조절하고 마취제, 항우울제등에 의해서도 조절된다[2]. TREK1이 허혈시 신경세포를 매우 취약하게 만든다는 것이 증명되면서 이 채널의 생리학적 역할의 중요성이 제시되고 있다[2]. 그러나 줄기세포에서는 TREK1의 기능적 발현에 대한 보고는 없다.

중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)는 골수 (bone marrow), 제대 (umbilical cord), 제대정맥 (umbilical cord vein)에서 분리할 수 있고 다양한 세포로 분화할 수 있는 분화 능력 가지고 있어 임상적으로 사용할 수 있다[3]. 중간엽 줄기세포는 자가 이식, 유전자 치료 등 임상적으로 응용되기도 하며, 근골격계질환, 심장질환, 간질환, 자가면역질환, 류마티스 관절염, 루프스 질환, 제 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 근위축성 척삭 경화증, 파킨슨병, 치매 등 다양한 질환치료에 시도되고 있다[4]. 또한 허혈성 신장 질환 [5], 급성 호흡 곤란 증후군 [6], 조직재생 [7]에도 응용되고 있다. 이러한 질환에 중간엽 줄기세포를 사용하기 위해서는 세포수가 많이 필요하고 그러기 위해서는 세포수를 세포외 (*in vitro*)에서 늘려야 하므로 이 과정중에 분화력을 상실할 수 있는 세포의 노화가 진행될 수 있다[8]. 그래서 세포의 항상성을 조절하는 이온 채널 연구가 시도되고 있다[9-16]. 이온 채널은 세포주기

동안 세포막 전압의 변화 등을 통해 세포의 증식을 조절하여 생리적 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다[13].

이러한 관점에서 줄기세포의 계대 과정에서 이온 채널의 역할에 관심을 가질 필요가 있다. 여러 연구팀에서 중간엽 줄기세포에서 세포막전위 변화를 유발하는 다양한 이온채널 (K_{Ca} , Na^+ , Ca^{2+} 채널 등)의 존재를 보고 하였다[9-16]. 최근 우리도 미분화 hUC-MSCs와 hBM-MSC에서 K_{Ca} 통로, Na^+ 통로 등이 기능적으로 발현되고 [10, 14]. 사람의 제대정맥에서 분리된 hUC-MSC에 존재하는 K_{Ca} 는 플라보노이드인 케르세틴에 의해 활성화됨을 확인 하였다[15]. 또한 hBM-MSC에서 K_{Ca} 와 포타슘 채널 중의 하나인 hEAG1 채널이 세포의 증식과 분화를 조절한다고 보고 되었다[16]. 미분화 hUC-MSC에서는 아직까지 이온 채널에 대한 연구는 많이 되지 않았으며, 이 두 줄기세포에서 K2P 채널에 대한 보고는 없다. 그러므로 본 연구에서는 hBM-MSC와 hUC-MSC에서 TREK1이 기능적으로 발현되는지 콤팩트 클램프 기법 및 RT-PCR을 적용하여 조사 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 줄기세포의 배양

2.1.1 골수유래 중간엽 줄기세포 배양

골수유래 중간엽 줄기세포는 이전 논문에서 보고된 방법으로 시행하였다[14]. 장골로부터 얻어진 골수는 밀도차 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, density 1.077g/mL)를 이용하여 단핵 세포 (mononuclear cells MNCs)로 분리하고 2번 세척한 후, 10% Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, South Logan, UT, USA)가 포함된 MSCGM에 2×10^5 개 세포를 깔고, 5% CO_2 , 37°C에서 배양하였다. 3일 후 배양접시에 부착되지 않은 세포는 제거하고, 10 ~ 12일 후 트립신 (trypsin)을 이용하여 떼어낸 후 계대 배양하였다. 전기생리학적 실험에 사용된 hBM-MSC는 3계대 (passage) ~ 9계대 세포를 사용하였다.

2.1.2 제대정맥 유래 중간엽 줄기세포 배양

제대정맥에서 유래된 중간엽 줄기세포는 이전 논문에서도 보고 한대로 분리하였다[10]. 제대정맥을 PBS (phosphate buffered saline)로 씻어 혈관 내로 0.5% collagenase (Life technology, Calsbad, CA, USA)를 넣고 37°C에서

5시간 동안 방치하였다. 혈관을 부드럽게 마사지 하여 떨어져 나온 세포를 수집하여 1000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (DMEM, Life technology, Calsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% FBS (Life technology, Calsbad, CA, USA)와 섞어 75 cm² 배양플라스크에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2일마다 바꾸어 주고 전기생리화학적 실험에 사용하였다. 전기생리학적 실험에 사용된 hUC-MSc는 3세대~ 12세대 세포를 사용하였다.

2.2 TREK1 과발현 세포의 준비

TREK1 채널을 기록하기 위해서는 CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포에 TREK1 (Accession No: AF385402)을 과발현하여 사용하였다[17]. 전기생리화학적 기록을 하기 위해서 세포는 0.25% trypsin으로 처리하여 Poly-D-lysine (Sigma, St Louis, MO, USA)이 처리된 12 mm 유리글래스로 실험에 사용하였고 세포는 과발현 후 48 ~ 72 시간 안에 사용하였다. 트립신 처리전과 후의 단일채널역학 (single channel kinetics)은 변화는 없었다.

2.3 전기생리화학적 방법

실험에 사용할 용액 중 유리전극 (pipette)과 챔버 (bath) 용액은 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA로 구성하였고 pH는 7.2로 적정하여 사용하였고 경우에 따라서 다른 종류의 K⁺ 채널을 억제하기 위해 K⁺ 채널 억제제인 tetraethylammonium (TEA)을 넣고 기록하였다. 단일채널전류 (single channel current)는 막전압 고정법 (voltage clamp technique) 중의 하나인 패치 고정법 (patch clamp technique)을 이용하였고[18], 전류는 패치 고정 증폭기 (patch clamp amplifier, Axopatch 200B, Axon Instruments, Union City, CA, USA)로 GΩ seal 이상의 패치 이상의 것만 기록하였다. 전류는 10 kHz의 샘플링 비율로 digidata interface (Digidata 1322A, Axon instrument, Union City, CA, USA)를 이용하여 컴퓨터에 저장하였다.

2.4 cDNA 합성 및 역전사 중합 효소 연쇄 반응 [reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)]

Total RNA는 배양된 hBM-MSc 또는 hUC-MSc 세

포에서 MN NucleoSpin RNAII Kit (Macherey-Nagel, Germany)를 사용하여 제조사의 방법대로 분리하였다. cDNA 합성은 iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. cDNA 합성을 위해 total RNA 1 µg을 사용하였다. RT-PCR 은 @ HotStart PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) kit를 사용하여 94°C (15초), 57°C (30초), 72°C (40초)에서 30 cycle (Bioneer, Daejeon, Korea) 조건으로 시행하였고, ethidium bromide가 첨가된 2% agarose-gel에 100V, 30분간 전기영동한 후 자외선으로 관찰하여 확인하였다. 이 방법은 이전 논문에서 보고 되었다[19]. 프라이머는 서열은 Table 1에 나열하였다.

[Table 1] Primer sequences of K2P channels

Name	Sequences (5' to 3')	Size(bp)
TWIK1	F ccaactgtcctctctctcgatcac	400
	R agcctctctctgcacctga	
TWIK2	F cctgtcactgctgctgactc	215
	R ccgatgggtggacagagagat	
TREK1	F ggatttggaaacatctcaccacgcaca	355
	R gatccacctgcaacgtagtc	
TREK2	F cagccctttgagagcagcc	481
	R aagatgacagcagggatgctc	
GAPDH	F aggtcggagtcaacggatttg	258
	R gtgatggcatggactgtggt	

2.5 데이터 분석

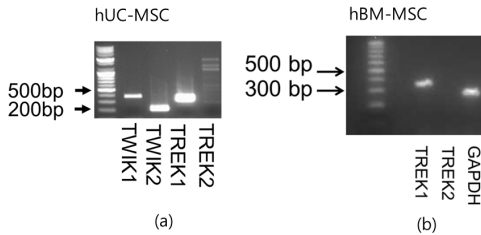
모든 데이터는 pCLAMP 프로그램 (version 9.02, Axon instrument, Union City, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 데이터는 전류의 크기 (amplitude, pA), 채널의 평균 열린 시간 (dwell time 또는 mean open time, ms), 이온채널 활성화도 (NP_o; N은 이온통로의 수, P_o는 활성을 가진 채널의 열릴 확률)을 분석하였다. 수치는 평균 ± S.E.M으로 나타내었다.

3. 결과

3.1 사람 골수 유래 중간엽 줄기세포 (hBM-MSc)와 제대장막 중간엽 줄기세포 (hUC-MSc)에서 TREK1 통로의 발현 비교

TREK 채널 mRNA의 분포를 조사하기 위해 RT-PCR 분석을 사용하여 hBM-MSc와 hUC-MSc에서 TREK 채널 발현 패턴을 관찰하였다. hUC-MSc에서는 TWIK1,

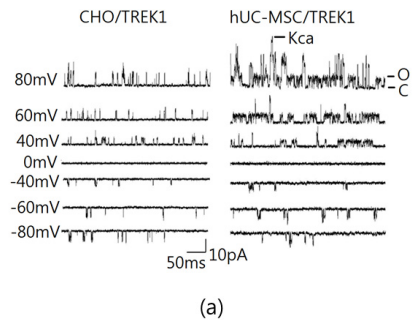
TWIK2, TREK1과 같은 K₂P 채널이 발현되었으나 TREK2는 발현되지 않았다. hBM-MSC에서도 TREK1만 발현되고 TREK2는 발현되지 않았다. 대조군으로 GAPDH를 이용하였다 (Fig. 1).



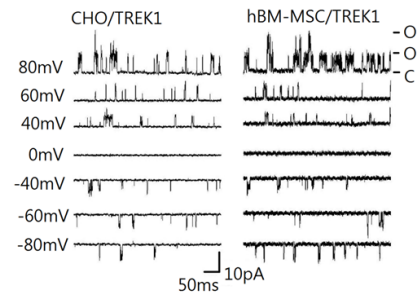
[Fig. 1] Comparison of messenger RNA (mRNA) expression of TREK1 and TREK2 channels in hUC-MSCs and hBM-MSCs. Messenger RNA of K₂P related to the functional ionic currents in hUC-MSCs and hBM-MSCs was amplified by RT-PCR. GAPDH was used as the control.

3.2 hUC-MSC와 hBM-MSC에서 TREK1의 단일통로의 성상

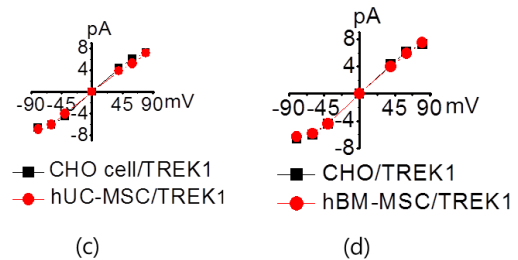
hUC-MSC (n=387) 와 hBM-MSC (n=498) 에서 TREK1의 단일 채널 전류 (single channel current)는 팻취클램프 기법을 이용하여 기록하였다. TREK1은 150 mM KCl 용액을 사용하여 세포내 (bath) 용액과 세포밖 (pipette) 용액을 동일하게 구성하여 excised inside-out patch 모드 상태에서 기록하였다. Fig.2는 CHO 세포에 과발현된 TREK1 채널의 단일 채널양상과 hUC-MSC와 hBM-MSC에서 기록된 TREK1 채널을 비교한 것이다. CHO 세포에 과발현된 TREK1 채널과 hUC-MSC와 hBM-MSC에서 기록된 TREK1 채널이 유사한 채널 역학을 보이고 있음을 알 수 있다 (Fig. 2a와 2b). 60 mV에서 hUC-MSC의 전류 크기는 6.0 pA (6.0 ± 0.2 , n=3) 였고 hBM-MSC의 전류의 크기는 5.9 pA (5.9 ± 0.4 pA n=3)로 약 100 pS (picosimen)의 전도도를 보이는 전류가 기록되었다. 사람의 UC-MSC에서는 K_{Ca}가 빈번하게 같이 기록되었으나 단일 채널 전류의 크기와 채널 역학이 다르기 때문에 구분할 수 있었다 (Fig. 2a). 막전위 변화에 따라 전류-전압곡선은 과발현된 TREK1과 유사하게 선형 모양 (linear shape)을 보였다 (Fig. 2c). hBM-MSC에서 기록된 채널은 CHO 세포에 과발현된 TREK1 채널과 전류의 크기가 유사하였다 (Fig. 2b와 2d).



(a)



(b)



(c)

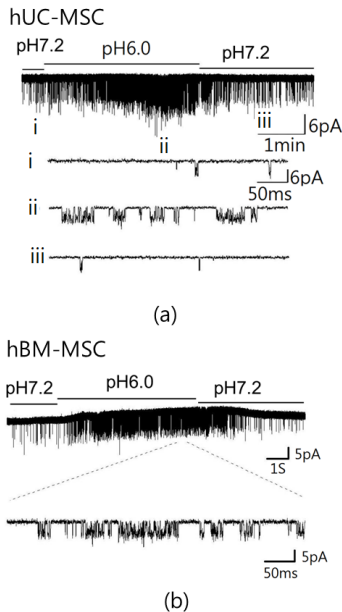
(d)

[Fig. 2] Single channel properties of TREK1 using single channel recording in hUC-MSCs and hBM-MSCs. (a and b) Channel openings at various membrane potentials from an inside-out patch are shown in hUC-MSCs/or hBM-MSCs and TREK1-transfected CHO cells. The letter “C” represents the closed-channel level and the letter “O” represents the open-channel level. (c and d) Current-voltage relationships are shown linear shape in hUC-MSCs/or hBM-MSC and TREK1-transfected CHO cells. Current amplitudes from the first open level were determined and plotted to obtain the current -voltage relationships for MSCs (filled circle) and TREK1-transfected CHO cells. (filled square). The pipette and bath solution contained 150 mM KCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂.

3.3 hUC-MSC와 hBM-MSC와 기록된 TREK1

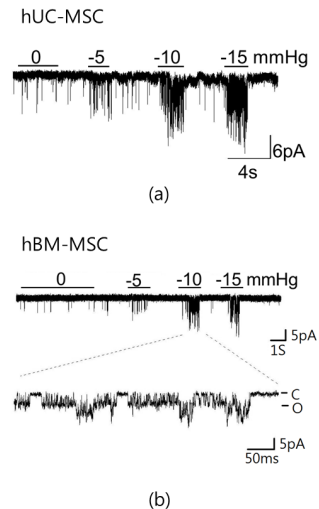
유사채널에 대한 세포내 생리학적 물질의 효과

기록된 채널은 전류전압 곡선이나 전류의 크기가 K2P 중 TREK1과 유사하였다. 그래서 우리는 hUC-MSC와 hBM-MSC에서 TREK1에 대한 생리학적 성질에 대해 조사했다. 즉 TREK1은 세포안의 pH가 떨어지면 채널이 활성화 된다고 알려져 있으므로 [20], 줄기세포에서 기록된 채널에서 세포내 산성 pH 효과를 관찰하였다. hUC-MSC와 hBM-MSC 두 세포에서 기록된 채널 모두 세포내 pH를 7.2에서 6.0으로 낮추어 주면 pH 7.2에 비해 상대적 채널 활성 (relative channel activity 또는 relative NP_o) 이 각각 39배 (39.2 ± 4.8, n=3), 9.6배 (9.6 ± 0.6, n=3) 이상 증가되었고 다시 pH 7.2 로 바꾸어 주면 회복됨이 관찰되었다(Fig. 3).



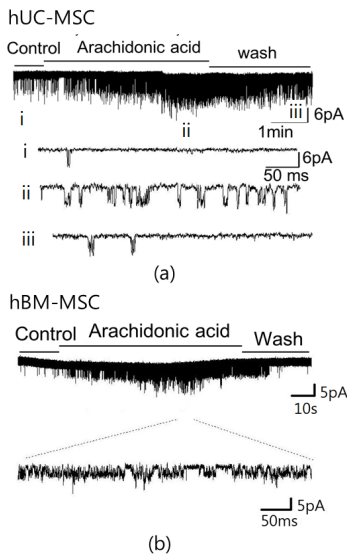
[Fig. 3] The effects of the pH on TREK1 in inside-out patch configurations in hUC-MSC and hBM-MSC. (a) Low pH solution (pH 6.0) was applied to the cytoplasmic side of the inside-out patch in hUC-MSCs. Below panels(i, ii and iii) show the single channel on an expanded time scale in hUC-MSCs. The cell membrane potential was held at -60 mV. (b) The figure shows the general single channel activity with acidic pH in hBM-MSCs. The cell membrane potential was held at -40mV. The bath solution contained 5 mM TEA. Below panel shows the single channel on an expanded time scale in hBM-MSCs.

또 TREK1 채널의 특징 중의 하나는 세포막 신전에 의한 채널의 활성화이다. hUC-MSC와 hBM-MSC에서 기록된 K⁺ 채널 또한 세포막 신전에 의해 활성화 되는지 조사하였다. 세포막 신전이 증가될수록 이 채널의 활성이 증가함을 확인하였다 (Fig. 4). hUC-MSC는 인위적으로 -5 mmHg, -10 mmHg, -15 mmHg로 점진적인 음압을 가하면 음압을 가하지 않았을 때 보다 상대적 채널 활성도가 각각 22배 (22.4 ± 1.2, n=3), 127배 (127.4 ± 2.0, n=3), 160배 (160.0 ± 6.0, n=3)까지 증가하였다. hBM-MSC는 -5 mmHg, -10 mmHg, -15 mmHg, 점진적으로 신전 시켜주면 음압을 주지 않았을 때 보다 상대적 채널 활성이 각각 37배 (37.2 ± 2.8 n=3), 176배 (175.6 ± 8.1, n=3), 306배 (305.6 ± 13.5, n=3) 까지 증가하였다 (Fig. 4). -15 mmHg에서는 거의 최대값에 도달하였다. 또한 세포막 신전이 없어지면 채널 활성이 사라짐을 관찰하였다.



[Fig. 4] The effects of membrane stretch on TREK1 in inside-out patch configurations in hUC-MSCs and hBM-MSCs. (a) The channel activity increased in the presence of membrane stretch with mechanical negative pressure (5 mmHg, 10 mmHg and 15 mmHg) in hUC-MSCs. The cell membrane potential was held at -60 mV. (b) The figure shows the general single channel activity with mechanical membrane stretch in hBM-MSCs. Below panel shows the single channel on an expanded time scale in hBM-MSC. The letter "C" represents the closed-channel level and the letter "O" represents the open-channel level. The cell membrane potential was held at -40 mV. The bath solution contained 5 mM TEA.

TREK1의 또 하나의 특징이 세포내 불포화 지방산에 의한 활성화이다[2]. 그래서 hUC-MSC와 hBM-MSC에서 불포화 지방산의 효과를 조사하였다. 예상했던 대로 세포내 불포화 지방산 중 하나인 arachidonic acid (10 μ M)에 의해 이 채널은 상대적 채널 활성이 각각 10배 (10.4 ± 0.8 , n=3), 24배 (24.4 ± 1.0 , n=3) 활성화 되었고 arachidonic acid를 제거하면 서서히 회복됨이 관찰되었다 (Fig. 5). 이러한 결과는 hUC-MSC와 hBM-MSC에서 TREK1이 잘 발현되고 생리학적으로 기능하고 있음을 보여준다.



[Fig. 5] The effects of the arachidonic acid on TREK1 in inside-out patch configurations in hUC-MSCs and hBM-MSCs. (a) Arachidonic acid (10 μ M) was applied to the cytoplasmic side of the inside-out patch in hUC-MSC. The channel activity increased in the presence of arachidonic acid. Below panels (i, ii and iii) show the single channel on an expanded time scale in hUC-MSCs. The holding potential held at -60 mV. (b) Arachidonic acid (10 μ M) was applied to the cytoplasmic side of the inside-out patch in hBM-MSCs. The holding potential held at -40 mV. Below panel shows the single channel on an expanded time scale in hBM-MSCs.

4. 고찰

본 연구에서 우리는 골수와 제대에서 유래된 줄기세

포에서 K2P 채널 중 하나인 TREK1 채널이 기능적으로 발현됨을 처음으로 확인하였다. TREK1은 세포가 저산소증 등과 같은 위험한 상황이 되었을 때 유리되는 생리학적인 유해 물질(수소, 불포화 지방산, 세포의 부피증가)에 의해 조절되고 막전압을 조절하여 세포 보호 작용을 하며 신경세포의 보호, 우울증 치료, 통증의 조절 등에 기여하고 암세포에서 발현되어 암세포의 치료 표적으로 알려져있다[21-23]. 또한 TREK1과 유사한 성질을 가진 TREK2도 방광암 세포에서 세포의 증식에 기여하고 세포주기 조절에 기여한다[19]. 이러한 TREK1의 기능적 역할을 감안할 때 줄기세포에서도 이 채널의 기능적 발현은 hBM-MSC와 hUC-MSC에서 발현된 TREK1이 세포주기 조절에도 관여할 수 있고 줄기세포의 분화 및 증식에 기여할 가능성이 있음을 제시한다. 본 연구에서 기록된 TREK1은 mRNA 수준에서는 발현되었지만 다른 채널의 기록 빈도수와 비교할 때 전기생리학적으로는 기록빈도수는 매우 낮았다[10, 14]. 즉 hUC-MSC에서는 1.5% (387패취 중의 6번), hBM-MSC에서는 1% (498 패취 중의 4번)만 기록되었다. TREK1이 hBM-MSC나 hUC-MSC에서 TREK1 채널 밀도가 낮은 이유를 추측하자면 TREK1이 mRNA 수준에서 존재하지만 알려지지 않은 인자에 의해 세포막으로 이동하지 못하였기 때문일 수도 있고 기술적인 문제일 수도 있다. 하지만 이렇게 낮은 밀도로 존재함에도 불구하고 TREK1 채널이 저산소증에 상황에 벌어지는 모든 상황 즉 불포화 지방산의 증가, 세포 부피의 증가, 세포내 pH의 산성화 등에 의해 활성화되기 때문에 미분화 줄기세포에서 채널의 중요성을 배제할 수는 없다. 본 연구에서 TREK1과 유사한 채널인 TREK2는 mRNA 수준에서 조차 발현되지 않았다. TREK2는 TREK1과 매우 유사하지만 전류-전압곡선이 음성 전압에서 더 크게 나타나는 inward rectifying 모양을 보여 채널 역학적으로 TREK1과 쉽게 구별된다 [24, 25]. 또한 종종 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 240 pS 정도의 크기를 가진 K_{Ca} 가 관찰되었다(Fig. 2a)[15]. 그러므로 본 연구에서 관찰된 TEA 저항성을 가진 K^+ 채널은 TREK1과 유사하였다. 중간엽 줄기세포의 경우, 사람의 몸에서 분리시 적은 세포수 때문에 임상적 적용을 위해서는 세포수를 늘려야 사용 가능하고 세포수를 늘려가는 동안 잠재적으로 자신의 세포의 분화능에 손상을 줄 가능성도 있고 세포의 노화가 일어 날 수도 있다[8]. 그러므로 줄기세포의 다계열 계통분화능 (multilineage

differentiation potential)의 손실 원인을 찾는 것은 매우 중요한 일이다. 세포수를 늘려 가는 동안 중간엽 줄기세포의 전기생리학적 특성을 비교하는 것도 가치가 있다. 우리는 지난 연구에서 hBM-MSC를 체외에서 계대가 진행되는 동안 Na^+ 채널 발현이 증가함을 확인하였다[14]. 이는 계대 과정에서 이온채널이 중요하게 작용할 수 있음을 제시한다. 우리가 본 연구에 사용한 중간엽 줄기세포들에 대한 형태, 분화 능력, 및 표면 단백질과 유전자들에 대한 보고와 더불어 이온 채널 발현에 대하여 이전 보고에서 검증하였다[10, 14]. 즉 미분화 hUC-MSC에서 전기생리학적 기록물로 볼 때 K_{r} 은 4.8%, Na^+ 전류는 28.8%, 일과성 외향 K^+ 전류 (transient outward K^+ current, I_{to})는 52% 정도로 기능적 발현이 확인되었고, K_{Ca} 는 거의 항상 기록되었다 [10]. 또한 hBM-MSC에서도 I_{to} 전류는 3.6%로 존재하고 Na^+ 전류가 11.5%, K_{r} 전류가 4.3%, K_{Ca} 전류가 K_{DR} (delayed rectifier K^+ current)과 동시에 97.1% 가 존재함을 확인하였다[14]. 이온 채널의 발현 분포나 변화는 세포주기 (cell-cycle)동안 세포막 전압을 조절하고 항상성을 조절하여 세포증식과 분화에 영향을 주며, 이러한 결과는 줄기세포 분화조절에 다양한 이온 채널이 연관되어 있을 가능성을 제시한다. 하지만 hBM-MSC와 hUC-MSC에서 TREK1의 발현이 줄기세포의 증식 및 분화능에 얼마나 기여할 수 있을지는 미지수다. 그럼에도 불구하고 다른 종류의 채널처럼 중간엽 줄기세포의 분화능에 영향을 줄 수 있는 한 가지 인자로서의 가능성도 배제할 수 없어 지속적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

[1] S. Sandhiya, S. A. Dkhar, "Potassium channels in health, disease & development of channel modulators". *Indian J Med Res*, Vol. 129, No. 3, pp.223-32, Mar.2009.

[2] A. Dedman, R. Sharif-Naeini, J. H. Folgering, F. Duprat, A. Patel, E. Honore, "The mechano-gated $\text{K}(\text{2P})$ channel TREK-1". *Eur Biophys J*, Vol. 38, No. 3, pp.293-303, Mar.2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-008-0318-8>

[3] D. Baksh, R. Yao, R. S. Tuan, "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow". *Stem Cells*, Vol. 25, No. 6, pp.1384-92, Jun.2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>

[4] A. Farini, C. Sitzia, S. Erratico, M. Meregalli, Y. Torrente, "Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases". *Stem Cells Int*, Vol. 2014, No. pp.306573.2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/306573>

[5] B. Altun, R. Yilmaz, T. Aki, H. Akoglu, D. Zeybek, S. Piskinpasa, D. Uckan, N. Purali, P. Korkusuz, C. Turgan, "Use of mesenchymal stem cells and darbepoetin improve ischemia-induced acute kidney injury outcomes". *Am J Nephrol*, Vol. 35, No. 6, pp.531-9.2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000339167>

[6] J. G. Wilson, K. D. Liu, H. Zhuo, L. Caballero, M. McMillan, X. Fang, K. Cosgrove, R. Vojnik, C. S. Calfee, J. W. Lee, A. J. Rogers, J. Levitt, J. Wiener-Kronish, E. K. Bajwa, A. Leavitt, D. McKenna, B. T. Thompson, M. A. Matthay, "Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial". *Lancet Respir Med*, Vol. 3, No. 1, pp.24-32, Jan.2015.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70291-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70291-7)

[7] A. Aldahmash, W. Zaher, M. Al-Nbaheen, M. Kassem, "Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration". *Ann Saudi Med*, Vol. 32, No. 1, pp.68-77, Jan-Feb.2012.

[8] M. M. Bonab, K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh, B. Nikbin, "Aging of mesenchymal stem cell in vitro". *BMC Cell Biol*, Vol. 7, No. pp.14.2006.

[9] G. R. Li, X. L. Deng, H. Sun, S. S. Chung, H. F. Tse, C. P. Lau, "Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow". *Stem Cells*, Vol. 24, No. 6, pp.1519-28, Jun.2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0307>

[10] K. S. Park, K. H. Jung, S. H. Kim, K. S. Kim, M. R. Choi, Y. Kim, Y. G. Chai, "Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein". *Stem Cells*, Vol. 25, No. 8, pp.2044-52, Aug.2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2006-0735>

[11] R. Tao, C. P. Lau, H. F. Tse, G. R. Li, "Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells". *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 293, No. 5, pp.C1561-7, Nov.2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00240.2007>

[12] X. L. Deng, H. Y. Sun, C. P. Lau, G. R. Li, "Properties of ion channels in rabbit mesenchymal stem cells from bone marrow". *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 348, No. 1, pp.301-9, Sep 15.2006.

[13] X. L. Deng, C. P. Lau, K. Lai, K. F. Cheung, G. K. Lau, G. R. Li, "Cell cycle-dependent expression of potassium

- channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow". *Cell Prolif*, Vol. 40, No. 5, pp.656-70, Oct.2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00458.x>
- [14] K. S. Park, M. R. Choi, K. H. Jung, S. Kim, H. Y. Kim, K. S. Kim, E. J. Cha, Y. Kim, Y. G. Chai, "Diversity of ion channels in human bone marrow mesenchymal stem cells from amyotrophic lateral sclerosis patients". *Korean J Physiol Pharmacol*, Vol. 12, No. 6, pp.337-42, Dec.2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2008.12.6.337>
- [15] K. S. Park, Y. Kim, "The Effect of quercetin on the BK_{Ca} in umbilical cord vein-derived Mesenchymal Stem Cells". *Laboratory Animal Research*, Vol. 26, No. 2, pp.203-209.2010.
- [16] Y. Y. Zhang, J. Yue, H. Che, H. Y. Sun, H. F. Tse, G. R. Li, "BKCa and hEag1 channels regulate cell proliferation and differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells". *J Cell Physiol*, Vol. 229, No. 2, pp.202-12, Feb.2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24435>
- [17] K. A. Kim, Y. Kim, "The effect of flavonoids on the TREK-1 channel". *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol. 12, No. 6, pp.2660-2667, June.2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2011.12.6.2660>
- [18] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflügers Arch*, Vol. 391, No. 2, pp.85-100, Aug.1981.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00656997>
- [19] K. S. Park, M. H. Han, H. K. Jang, K. A. Kim, E. J. Cha, W. J. Kim, Y. H. Choi, Y. Kim, "The TREK2 channel is involved in the proliferation of 253J cell, a human bladder carcinoma cell". *Korean J Physiol Pharmacol*, Vol. 17, No. 6, pp.511-6, Dec.2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2013.17.6.511>
- [20] P. Miller, C. Peers, P. J. Kemp, "Polymodal regulation of hTREK1 by pH, arachidonic acid, and hypoxia: physiological impact in acidosis and alkalosis". *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 286, No. 2, pp.C272-82, Feb.2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2003>
- [21] A. Cohen, R. Sagron, E. Somech, Y. Segal-Hayoun, N. Zilberberg, "Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K(2P)2.1 channel". *Mol Cell Neurosci*, Vol. 40, No. 3, pp.382-9, Mar.2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2008.12.004>
- [22] D. A. Bayliss, P. Q. Barrett, "Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact". *Trends Pharmacol Sci*, Vol. 29, No. 11, pp.566-75, Nov.2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.013>
- [23] I. Voloshyna, A. Besana, M. Castillo, T. Matos, I. B. Weinstein, M. Mansukhani, R. B. Robinson, C. Cordon-Cardo, S. J. Feinmark, "TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer". *Cancer Res*, Vol. 68, No. 4, pp.1197-203, Feb 15.2008.
- [24] K. S. Park, Y. Kim, "Functional expression of mechanosensitive two-pore domain potassium channel in human bladder carcinoma cells". *J Biomed Res*, Vol. 14, No. 2, pp.71-76, June.2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.12729/jbr.2013.14.2.71>
- [25] K. S. Park, H. Bang, E. Y. Shin, C. H. Kim, Y. Kim, "The inhibition of TREK2 channel by an oxidizing agent, 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), via interaction with the C-terminus distal to the 353rd amino acid". *Korean J Physiol Pharmacol*, Vol. 12, No. 4, pp.211-6, Aug.2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4196/kjpp.2008.12.4.211>

박 경 선(Kyoung Sun Park)

[정회원]



- 2011년 9월 ~ 2014년 2월 : 포항공과대학교
- 2014년 3월 : 한양대학교 분자생명과학부

<관심분야>
전기생리학, 세포 생리학

김 양 미(Yangmi Kim)

[정회원]



- 1997년 12월 ~ 2000년 6월 : Chicago Medical School 박사후 연수
- 2000년 9월 ~ 2003년 2월 : 서울대학교 의과대학 생리학교실
- 2003년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 생리학교실

<관심분야>
전기 생리학, 막수송 생리학