

태반추출물이 인간 연골세포의 증식과 분화에 미치는 영향

허 준¹ · 서만수¹ · 박세정¹ · 임영국¹ · 신준호² · 정호윤³ · 조병채³ · 박재우³

대구파티마병원 성형외과¹, 신준호 성형외과², 경북대학교병원 의과대학 성형외과학교실³

The Effect of Placenta Extract on Proliferation and Differentiation of Human Chondrocytes

Jun Huh, M.D.¹, Man Soo Suh, M.D.¹,
Sae Jung Park, M.D.¹, Yeung Kook Lim, M.D.¹,
Jun Ho Shin, M.D.², Ho Yun Chung, M.D.³,
Byung Chae Cho, M.D.³, Jae Woo Park, M.D.³

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Daegu Fatima Hospital, Daegu, Korea,

²ShinJunHo Plastic Clinic, Seoul, Korea,

³Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyungpook National University College of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: The isolated human chondrocytes for cartilage reconstruction and transplantation presents a major problem as these cells would change biologically in vitro. For more effective applications of these cells in the clinical field, it is necessary to get a large amount of cells in a short period without affecting their function and phenotype.

Methods: This study reports the effects of placenta extract on chondrocytes in vitro. We initiated this study on the basis of the hypothesis that placenta extract can influence both the proliferation of chondrocytes and their biologic functions(for example, to express cell specific gene or to produce their own extracellular matrix). Chondrocytes in monolayer culture with or without placenta extract were collected and analyzed by MTT assay, ECM assay, and RT-PCR.

Results: Placenta extract stimulated the proliferation of chondrocytes in monolayer culture. The phenotype of chondrocytes was well maintained during the expansion in monolayers. Chondrocytes expanded in the presence of placenta extract produced ECM, glycosaminoglycan, abundantly. Compared to chondrocyte expanded in culture medium only, chondrocytes expanded with placenta extract demonstrated higher COL2A1 expression that

was biochemically comparable to primary chondrocytes. This study provides an evidence that placenta extract is helpful to expand chondrocytes during tissue cultivation, to maintain their differentiated phenotype and to promote their function.

Conclusion: These results suggest that placenta extract during cultivation play an important role in controlling cell behaviors. Furthermore, these results provide a biologic basis for cartilage tissue engineering.

Key Words: Placenta extract, Human chondrocyte

1. 서론

과거 우리 조상들은 태반 속에 생명의 근원이 있다고 믿었고, 출산 후 태반이나 탯줄을 말려 보관함으로써 자녀들의 무병장수를 기원하기도 했고, 태반에 치유의 효력이 있다고 믿어 민간요법으로 만성질환을 앓고 있는 환자에게 사용하기도 하였다. 최근 우리나라에서도 태반을 이용한 치료법이 유행하고 있으며 현대 의학을 기초로 하는 서구의 몇몇 소수 과학자들에 의해 태반내의 자연물질들에 관한 연구가 행해지고 있다. 이전의 연구에서 태반 추출물(placenta extract) 내에는 생물학적 활성과 다양한 치료 효과를 가진 많은 성분을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 호르몬, 단백질, 지질, 핵산, 글리코사아미노글리칸, 아미노산, 비타민, 미네랄 등이 확인되었고, 아직까지 밝혀지지 않은 다양한 미지의 성분도 포함되어 있는 것으로 생각되며, 이로 인한 항염증작용, 항돌연변이 작용, 항과민작용, 항산화작용 등을 보인다고 알려져 있다.¹ 그러나 태반 추출물에 대한 세포생물학적 접근방법의 연구는 아직 미흡한 상황이며 이를 통한 현대 의학적 규명이 요구된다.

본 연구에서 이용된 조직인 연골은 연골세포와 연골세포에 의해 합성되는 세포외기질(extracellular matrix)로 이루어져 있고 세포외기질은 대부분 제 2형 교원질섬유(type II collagen), 탄성섬유(elastic fiber), proteoglycan, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, keratan sulfate와 같은 glycosaminoglycan(GAG)으로 이루어져 있다. 연골은 외력에 의해 변형되면 원래 형태로 돌아가려는 성질을 가

Received April 3, 2006

Revised June 13, 2006

Address Correspondence: Ho Yun Chung, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Kyungpook National University, 50 Samduck-dong, 2ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea, Tel: 053) 420-5681 / Fax: 053) 425-3879 / E-mail: hy-chung@mail.knu.ac.kr

집과 동시에, 지속적인 스트레스시 그에 따른 새로운 형태로 리모델링되는 성질을 가지며, 직접적인 혈액공급이 없어도 생착할 수 있어, 미용적 목적 혹은 선천성 기형이나 외상으로 인한 연골의 손상 혹은 결손시 환자 본인의 연골 조직 자체를 이식하는 방법으로 임상적인 적용이 많아 되었다.² 그러나, 자가연골을 이식할 경우 공여부의 양에 한계가 있으며, 연골이식 시 정교한 모양의 이식편을 얻기 힘들며, 공여부에 반흔이 남는 문제점이 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 조직에서 분리한 연골세포로부터 새로운 연골을 생성하려는 조직공학적 연구들이 많이 진행되었다.^{2,3} 그런데 배양을 통한 새로운 연골생성의 과정에서 여러 가지 생물학적 변화가 나타나 임상적용에 어려움이 있어 이에 대한 다양한 연구가 요구되고 있다.

본 연구는 태반 추출물을 연골세포의 배양에 적용시켜 태반추출물이 연골세포의 증식과 배양시 나타날 수 있는 형질(phenotype)의 변화에 미치는 영향을 살펴봄으로써 연골조직공학(cartilage tissue engineering)을 임상적으로 응용할 수 있는 생물학적 기초를 마련하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 세포배양

20세 이하 환자 of 비중격에서 초자 연골을 채취하여 Klagsbrun⁴의 방법에 따라 연골세포를 분리하였다. 채취된 조직은 PBS(pH 7.4) 용액으로 수 차례 씻고, 0.2% type II collagenase 용액으로 완전히 용해시켰다. 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 침전시키고, 이 세포를 25 µg/mL L-ascorbic acid, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin sulfate(Sigma, USA), 10% fetal bovine serum(Gibco/BRL, USA)가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco/BRL, USA)에 부유시켰다. 100 mm 배양접시에 담아 37°C, 5% CO₂ 환경에서 일차 배양하였다. 일차배양으로 연골세포가 배양접시 바닥을 70-80% 정도 덮으면 trypsin-EDTA용액으로 처리하여 날개의 세포로 분리시킨 뒤 1×10^5 /mL의 농도로 6-well plate에 주입하고, 최소 12시간 이상 혈청 기아(serum starvation) 상태를 유지시킨 후 태반 추출물(Melsmon[®], Japan) 0.1%, 0.5%, 1%의 농도로 투여하여 2일 동안 배양한 후 각각의 분석 방법을 시행하였다.

나. 세포증식 검사(Cell proliferation test)

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium(MTT, Sigma, USA) assay 방법을 이용하여 세포의 증식률을 조사하였다.⁵ 연골세포를 1×10^4 개의 농도로 96-well plate에 주입하고 2일 동안 태반 추출물을 처리하지 않은

대조군과 0.1%, 0.5%, 1%를 처리한 실험군을 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 96-well plate에 50 µl의 MTT 용액을 첨가하여 세포와 함께 4시간 배양한 후, 100 µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, USA)를 첨가하여 570 nm의 파장에서 ELISA photometer로 흡광도를 측정하여 각 대조군과 실험군 간을 비교하였다. 측정된 값들은 계대 배양 횟수에 따른 각 실험군 간의 상호비교로 분산분석법(ANOVA test)과 쉐퍼법(Scheffe's test)을 이용하였다.

다. mRNA 분석

연골세포의 mRNA 발현양상을 분석하기 위해 역전사 폴리메라아제 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하였다. 각각의 조건에 따라 배양된 연골세포에서 RNA isolation kit(Fluka, USA)를 이용하여 RNA를 분리하고, 각각 2 µg의 RNA를 취하여 먼저 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 각각의 RNA들을 complementary DNA(cDNA)로 역전사시켰다. 역전사된 cDNA는 PCR kit(GeneAmp RNA PCR kit, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 폴리메라아제 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였고 본 실험에서 RT-PCR로 증폭 발현시킨 유전자는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), collagen type II gene(COL2A1)이며 GAPDH는 모든 샘플에서 발현되므로 폴리메라아제 연쇄반응의 적합도를 나타내는 측도로 이용하였다. GAPDH 유전자 증폭을 위해서는 5'-GGGCTGCTTTAACTCTGGT-3'을 forward primer로 5'-TGGCAGGT TTTTCTAGACGG-3'을 backward primer로 이용하였고, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 순서를 35회 반복하여 증폭시킨 후 마지막으로 72°C에서 7분간 안정화하였다. COL2A1 유전자증폭은 forward primer로 5'-CCAGGACCAAAGGGCAGAAAG-3'을 이용했고 backward primer로 5'-TTCACCAGGTTTACCAGGATTG-3'을 이용하여 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간의 순서로 35회 반복하여 증폭시켰으며 72°C에서 7분간 안정화하였다.⁶ RT-PCR 결과로 얻은 생산물은 1.5% 아가로스 겔 전기영동을 통해 분리하였고, ethidium bromide(Sigma, USA)로 염색한 후 자외선하에 사진을 찍어 각각의 유전자 발현 정도를 관찰하였다.

라. GAG의 정량

Dimethylmethylene Blue Assay(Blyscan kit, Accurate chemical & scientific Corp, USA)를 이용하여 연골세포가 분비하는 세포의 기질물질인 GAG을 정량하였다. 먼저 각각의 sample을 200 µl papain을 첨가한 0.5 M 아세트산 용액에 10시간 가량 두어 녹인 후 DMMB(1.9 Dimethylme-

thylene blue chloride) 50 µl를 첨가하고 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.⁷

III. 결 과

가. 연골세포의 증식

태반 추출물을 투여한 실험군과 태반추출물이나 다른 성장인자를 투여하지 않은 대조군의 증식률을 비교한 결과 대조군에 비해 실험군들에서 약 2배 이상의 증가된 증식률을 보였고, 실험군들과 대조군들 간의 증식률의 차이는 통계학적으로 유의하였다($p < 0.05$). 각각 다른 농도의 태반추출물을 이용한 실험군간의 비교에서는 0.1% 농도의 태반추출물을 이용한 실험군에서 약 2.5배 증가된 증식률을 보여 가장 높게 나타났으며, 1%에서 가장 낮게 나타났으나, 실험군들간의 차이에 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$)(Fig. 1).

나. 연골세포의 분화와 기능

배양 중 연골세포의 분화와 기능에 영향을 미치는 태반추출물의 영향은 형질발현 유전자 중 collagen type II 유전자인 COL2A1의 RT-PCR을 통한 mRNA 발현정도와 세포가 합성하는 세포외 기질인 GAG 정량을 통하여 비교 분석하였다.

태반추출물이나 다른 성장인자를 투여하지 않은 대조군과 태반추출물을 투여한 실험군 모두에서 COL2A1의 발현을 관찰할 수 있었으나 그 발현정도가 대조군에서 가장 낮았고, 농도의 증가에 따라 발현정도가 점차 증가되는 양상을 보여주었다(Fig. 2). 세포외 기질인 GAG의 함량 비교에서도, 대조군에 비해 농도의 증가에 따라 그 양이 증가되는 양상을 보여 주었으며, 특히 1%에서 가장 증가된 양상을 보였고 이는 대조군 및 다른 0.1%, 0.5% 실험군과 통

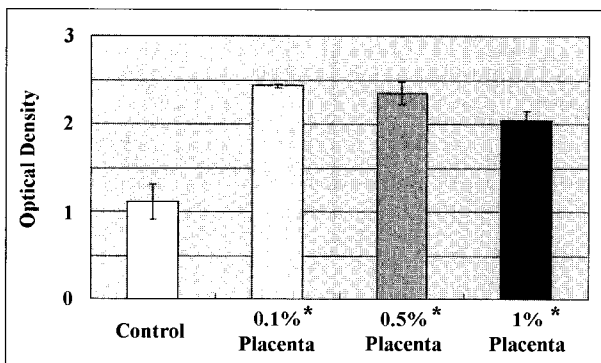


Fig. 1. Proliferation of human chondrocytes. Human primary chondrocytes were treated with placenta extract or without any growth factors(control) for 2 days. Cell proliferation was measured by MTT assay. *: $p < 0.05$.

계적 유의성을 가지는 차이를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 3). 즉, 태반추출물을 배양에 첨가하므로 연골세포의 분화와 기능이 향상되는 양상을 보였으며, 이러한 분화와 기능의 향상은 첨가된 태반추출물의 농도에 비례하여 증가되는 것으로 나타났다.

IV. 고 찰

연골세포배양의 궁극적 목표는 미용적 목적 혹은 선천성 기형이나 외상, 노화로 인한 연골의 손상이나 결손시 적절한 양의 연골조직으로 충분한 양의 연골을 얻기 위함이다. 이러한 목적으로 연골세포배양이 1960년대부터 시작되었으며, 초기에는 단층 배양법이 주로 이루어졌다. 이후 1990년대에 접어들면서 조직으로부터 분리한 세포와 생체 재료를 이용하여 조직을 재건하는 조직공학관련 연구가 급속도로 진행되어, 연골조직을 인공적으로 생산하는 것

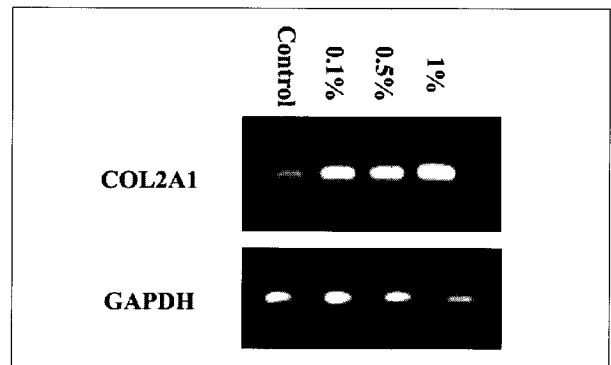


Fig. 2. RT-PCR analyses in monolayer culture. RT-PCR products indicate specific mRNA in the chondrocytes from serum free medium culture(Control), placenta extract treated medium culture(0.1%, 0.5%, 1%). COL2A1: collagen type II gene, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

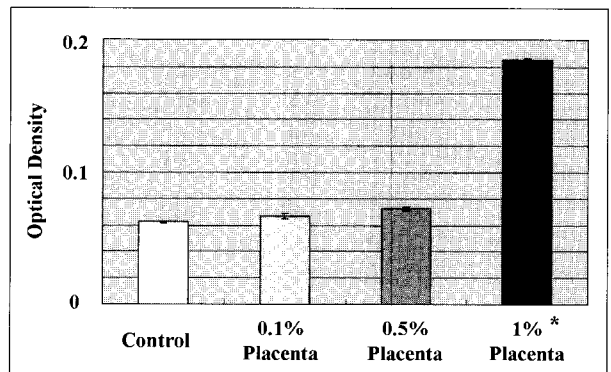


Fig. 3. Extracellular matrix production of human chondrocytes. Human primary chondrocytes were treated with placenta extract or without any growth factors(control) for 2 days. Glycosaminoglycan was measured by Dimethylmethylene Blue Assay. *: $p < 0.05$.

을 가능하게 하였다.

연골세포는 분화된 세포로서 조직 내에서는 세포분열이 왕성하지 않지만, 분리 후 체외에서 단층배양 시에는 증식이 촉진되어 많은 수의 연골세포를 얻을 수 있다. 그러나 사람의 연골세포는 단층배양 시 증식하는 동안 원래의 분화된 특성을 소실하여 빠르게 탈분화(de-differentiation)되고, 탈분화된 연골세포는 연골세포 고유의 제 II형 교원질 섬유를 분비하는 능력을 잃어버리는 문제점을 가지고 있다. 이전의 연구에서 단층배양을 하는 연골세포는 탈분화되어 모양이 섬유아세포처럼 변화하고 표현형을 잃는 것으로 보고되었다.^{8,9} 이와 같은 체외에서의 연골의 형질의 변화는 연구목적 뿐 아니라 세포치료나 조직공학과 같은 생체의학에서 배양을 통한 세포조작의 문제점으로 제기되어 원래의 형질을 유지하기 위한 연구들이 시도되어 왔다. 대표적인 방법으로, 성장인자를 첨가하여 고유의 형질을 유지할 수 있도록 하는 방법과 체내에서의와 같은 삼차원적 공간의 환경을 통한 배양방법 등이 이 같은 문제점의 해결을 위해 많이 이용되었다.^{9,10} 그러나 Alginate, agarose, collagen gel 등을 이용한 삼차원적 배양방법은 배양기간 중 연골세포의 표현형 유지에는 매우 효과적이지만, 세포 수의 증식은 크게 일어나지 않기 때문에 연골조직 이식을 위한 배양법으로는 적당하지 못하다. 이에 본 연구에서는 연골세포배양 시 성장인자로서의 태반추출물을 첨가하여, 태반추출물이 연골의 배양과 형질에 어떠한 영향을 주는 지에 관해 알아보았다.

단층배양법의 경우 세포증식은 여러 가지 조건에 의해 영향을 받는다. 예를 들면, 주입된 세포 수에 밀접한 관계가 있어 세포수가 적은 경우 증식이 증가하지만 세포수가 많고 밀도가 높은 경우 증식은 상대적으로 감소되고, 기질의 분비 촉진 작용도 세포의 성숙 정도에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며, 계대배양이 진행됨에 따라 세포의 증식률은 현저히 감소된다고 알려져 있다. 또한 여러 성장인자에 의해서도 영향을 받는다.¹¹ 본 연구에서 연골세포의 증식률은 단층 배양에서 태반추출물을 투여한 연골세포군이 대조군에 비해 더 높은 것으로 나타나 태반추출물이 인간 연골세포의 증식에 크게 기여함을 확인할 수 있었다.

인간의 태반은 수정 후 약 5주째 만들어지고, 13주경에 완성되어진다. 태아는 태반을 통해 모체로부터 영양을 공급받고, 물질교환을 한다. 분만 후 체외로 나온 태반은 생물학적 활성을 가진 다양한 성분을 포함하고 있는 것으로 알려져 있으며, 각각의 성분들은 여러 가지 질병의 치료에서 다른 생화학적으로 활성을 가진 물질들을 조절하여 질병의 치유에 영향을 준다고 생각되어지고 있다.

태반추출물 내에는 VEGF, PDGF, bFGF, TGF- α , TGF- β ,

HGF, TNF- α 등과 같은 다양한 성장인자들이 포함되어 있으며, 더불어 아직 밝혀지지 않은 미지의 성분도 포함하고 있는 것으로 생각되어지며, 이런 다양한 성분들에 의해 항염증작용, 항돌연변이작용, 항과민작용, 항산화작용, 진통효과 등을 보인다고 알려져 있다.¹ 태반추출물 내의 여러 가지 성장인자들에 대해 살펴보면, VEGF는 혈관생성에 관여하는 성장인자로 내피세포의 이동과 성장을 선택적으로 자극하고, 미세혈관의 투과성을 증가시킴으로써, 신생혈관 생성의 조절과 형태를 보존하는 기능을 한다. 혈관 증식과 투과성의 증가는 상처재생과 조직재건 과정에서 관찰되는 중요한 특징 중의 하나이므로, VEGF가 상처재생과 조직재건 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 추측할 수 있다. 또한, VEGF는 체내에서 직접적으로 연골세포의 증식과 분화에 작용을 하고, 연골세포에 VEGF가 발현됨으로 인하여 VEGF mRNA가 존재함이 보고되었다.¹² PDGF는 세포증식, 혈관형성, 조직손상과 재생에 중요한 역할을 하는 성장인자로 혈관 내피세포와 섬유모세포(fibroblast)에 대한 유사분열 물질임과 동시에 섬유모세포로 하여금 교원질 생산을 자극하게 하여 창상의 섬유화를 증가시켜 상처가 치유되도록 도와주는 기능을 한다. bFGF는 체외에서 매우 강력한 연골세포의 분열원질(mitogen)로 연골세포의 증식기능을 촉진시키고, 단층배양에서 세포의 기질의 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, bFGF에 의한 세포의 증식 작용은 세포 수와 세포의 성숙 정도에 따라 다르게 나타나는 것으로 보고되었다. 그러나, bFGF는 단층배양에서 연골세포의 증식을 촉진시키는 작용은 하지만, 연골세포의 분화를 억제하여 형질을 유지하는 효과는 미비하다.¹³ TGF- β 는 거의 모든 세포계열의 증식 및 분화에 큰 영향을 미치는 성장인자로, 여타의 성장인자들의 합성을 자극하며, PDGF와는 서로 상승작용을 나타내어, 결과적으로 교원질 합성을 자극하여 교원질 축적에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁴ 연골세포배양에 미치는 영향에 대해서는 배양의 종류에 따라, 연골세포의 분화정도, 세포주기에 따라 다양한 결과를 보이지만, 많은 경우에서 연골세포의 증식을 촉진시킨 연구결과가 보고되고 있다.¹¹ TNF- α 는 interleukins, TGF- β , Interferon- γ , PDGF 등 다른 cytokine들의 섬유아세포에 대한 반응을 변화시켜 창상치유에 관여한다. 창상치유의 초기단계에서 섬유아세포의 EGF 수용체를 증가시키고, Interferon- β 의 생산을 자극하여 섬유아세포의 증식을 유도하여 창상치유를 촉진한다. HGF는 간세포에 미치는 영향 외에 혈관내피세포의 분화와 이동을 촉진하여 창상치유를 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구를 통하여 체외에서 태반 추출물이 연골세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 살펴보았다. 태반추출물 내

에 포함된 다양한 성장인자들이 연골세포의 증식에 미치는 영향에 대한 기전을 정확하게 설명할 수는 없지만, 앞서 살펴본 각각의 성장인자들이 가지는 창상치유 및 조직 재건의 효과들이 상호보완적으로 서로 상승작용을 나타내면서 아주 복잡하게 얽혀 연골증식 과정에 영향을 미치는 것으로 생각되며, 이는 기존의 단일 성장인자의 투여에 의한 연골세포배양에 비해 더 좋은 결과를 보일 것으로 생각된다. 앞으로 태반추출물내의 다양한 성장인자의 규명과의 작용에 대한 정확한 기전의 해석이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

이 연구를 통하여 태반 추출물을 연골세포의 배양액에 첨가시켜 연골세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴봄으로서 생체공학의 응용에 기초를 마련하고자 하였다.

태반추출물이 연골세포의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, 연골세포에 태반 추출물을 투여한 실험군에서 투여하지 않은 대조군의 세포보다 증식률이 높게 나타났다. 그리고 연골세포의 분화와 기능에 미치는 영향을 확인하기 위하여 형질발현 유전자중 COL2A1의 PCR을 통한 유전자 발현정도와 세포외기질인 GAG의 정량을 통하여 비교 분석하였는데, 태반추출물을 투여한 실험군에서 그 발현의 증가가 현저함을 나타내었다. 이러한 결과들로 미루어 태반추출물이 연골배양에 크게 영향을 미칠 수 있는 한 요인으로 작용함을 알 수 있었고, 또한 본 연구에서 나타난 결과로 볼 때 저농도에서 증식을 촉진시키고 고농도에서 분화와 기능을 향상시키는 역할을 하는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 생명공학이나 의학분야에서 연골세포를 이용한 치료나 연구에 기초를 마련해 주며 나아가 세포치료나 조직공학과 같은 응용분야에 적용하여 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Sim CU: *The Placenta Therapy*. 1st ed, Seoul, MD World, 2005, p 31
2. Randolph MA, Anseth K, Yaremchuk MJ: Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg* 30: 519, 2003
3. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS: Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 18: 64, 2006
4. Klagsbrun M: Large scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol* 58: 560, 1979
5. Parikh AB, Lee GM, Tchivilev IV, Graff RD: A neocartilage ideal for extracellular matrix macromolecule immunolocalization. *Histochem Cell Biol* 120: 427, 2003
6. Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH: Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* 64: 273, 2003
7. French MM, Rose S, Canseco J, Athanasiou KA: Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts. *Ann Biomed Eng* 32: 50, 2004
8. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J: Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 62, 2002
9. Schulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas Castrejon H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M: Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 308: 371, 2002
10. Matsusaki M, Ochi M, Uchio Y, Shu N, Kurioka H, Kawasaki K, Adachi N: Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and phenotype expression of chondrocytes embedded in collagen gel. *Gen Pharmacol* 31: 759, 1998
11. van Osch GJ, van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HL: In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 107: 433, 2001
12. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F: Vascular endothelial growth factor(VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 113: 59, 2000
13. Kato Y, Iwamoto M: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 265: 5903, 1990
14. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB: Purification and initial characterization of a type β transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3676, 1983

1. Sim CU: *The Placenta Therapy*. 1st ed, Seoul, MD World,