

## 세 종류 줄기세포의 특성 분석과 지방유래 줄기세포의 심근세포로의 분화

박세아 · 강현미 · 김은수 · 김진영 · 김해권<sup>†</sup>

서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과

### Characterization Analysis for Cardiogenic Potential of Three Human Adult Stem Cells

Seah Park, Hyeon Mi Kang, Eun Su Kim, Jinyoung Kim and Haekwon Kim<sup>†</sup>

Dept. of Biotechnology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

**ABSTRACT** : In the present study, we isolated three human adult stem cells including adipose tissue-derived stem cells(HAD), umbilical cord-derived stem cells(HUC), and amnion-derived stem cells(HAM) and analysed their characteristics. And we examined whether HAD could be used as therapeutical cells for the heart diseases.

Both HAM and HUC appeared very similar morphology but HAD was different. Doubling time of HUC was most fast, but total doubling numbers of HUC was same with HAM. Total doubling numbers of HAD was much more than others. Expression patterns of genes and proteins of three human adult stem cells were very similar. Also they were differentiated into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes. In addition, they expressed many cardiomyocyte-related genes. But expression pattern of genes is a little different. When HAD were cultivated in the presence or absence of various combinations of BMP and FGF after 5-azacytidine expose for 24 h, expression of Cmlc-1, and  $\alpha 1c$  genes was significantly increased. However, expression of troponin T, troponin I and Kv4.3 genes was not changed. Based on these observations, it is suggested that HAD, HUC, and HAM might be used as potentially therapeutical cells for clinical application.

**Key words** : Mesenchymal stem cells, Adipose tissue-derived stem cells, Umbilical cord-derived stem cells, Amnion-derived stem cells, Clinical application.

**요 약** : 본 연구에서는 사람의 지방조직(human adipose tissue-derived stem cells, HAD), 탯줄(human umbilical cord-derived stem cells, HUC), 그리고 양막(human amnion-derived stem cells, HAM)유래 줄기세포를 분리하여 세포의 형태 및 성장속도를 비교하고, 역전사 증합효소 연쇄반응과 면역세포화학 염색법을 이용하여 유전자와 단백질 발현을 비교 분석하였다. 또한 지방유래 줄기세포를 이용하여 심장근육세포로의 분화를 유도하였다.

본 연구 결과, 탯줄과 양막유래 줄기세포의 형태는 매우 유사하였으며, 지방유래 줄기세포의 형태는 다른 것으로 나타났다. 분열시간은 탯줄유래 줄기세포가 가장 빨랐으나 총 분열 횟수는 양막유래 줄기세포와 같았으며, 지방유래 줄기세포의 총 분열횟수가 가장 많았다. 세 종류 줄기세포의 유전자와 단백질 발현은 비슷한 양상을 나타냈다. 지방세포, 골세포, 연골세포로의 분화 유도 결과 세 종류의 줄기세포 모두 분화 유도되었다. 또한, 심장세포 특이 유전자의 발현 분석 결과 세 종류의 줄기세포에서 유사한 발현 양상을 나타냈다. 이 중 지방유래 줄기세포를 24시간 동안 10  $\mu$ M 5-azacytidine 처리 후 기본 배양액에서 4주 동안 배양하거나 또는 5-azacytidine 처리 후 bone morphogenic protein-2(BMP-2)와 fibroblast growth factor-10(FGF-10) 또는 BMP-4와 FGF-4 또는 BMP-4와 FGF-8이 첨가된 배양액으로 4주 동안 배양하여 심근세포로의 분화를 유도하였다. 분화 유도 후 심장세포 특이 유전자 발현을 분석 결과 cardiac myosin light chain-1(Cmlc-1)과 L-type calcium channel  $\alpha 1C$  subunit( $\alpha 1C$ ) 유전자의 발현이 증가하였다. 그러나 troponin T(TnT), troponin I(TnI) 그리고 potassium channel Kv4.3 subunit (Kv4.3) 유전자의 발현은 증가하지 않았다.

본 연구 결과, 지방, 탯줄 및 양막유래 줄기세포는 특성이 매우 유사한 것으로 나타났으며, 심장 질환 치료를

<sup>†</sup> 교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126번지, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과, (우) 139-774, (전) +82-2-970-5665, (팩) +82-2-970-5974, E-mail: hwkim@swu.ac.kr

목적으로 하는 세포 치료에 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 적절한 배양조건 하에서 성장인자와 cytokine들을 처리하여 심장세포로의 분화 유도가 이루어진다면 임상적응에 유용한 세포로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 서 론

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)는 사람 골수의 단핵세포(mononuclear cell)에서 분리되며, 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포 등으로 분화가 가능한 복합 분화능을 갖는 세포로 알려져 있다(Prockop, 1997). 이 골수 유래 중간엽 줄기세포는 섬유아세포와 유사한 형태를 가지며, 체외 배양 시 20~30번의 분열 후에도 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 그러나 임상 시술 시 바이러스 전염의 위험이 있고 채취 시 고통이 따르며, 인체의 나이가 들수록 세포의 분열 및 분화 능력이 급격히 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 골수를 대체하는 새로운 중간엽 줄기세포의 공급원을 찾는 연구들이 이루어지고 있다. 유사중간엽 줄기세포의 공급원으로서 최근 다양한 조직들이 보고되고 있는데, 양막(In 't Anker et al., 2003), 태반(Fukuchi et al., 2004), 말초 혈액(Zvaifler et al., 2000), 지방세포(Zuk et al., 2001), 탯줄(Romanov et al., 2003) 등에서 중간엽 줄기세포가 존재한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 지방(human adipose tissue-derived stem cells, HAD), 탯줄(human umbilical cord-derived stem cells, HUC) 및 양막(human amnion-derived stem cells, HAM) 유래 줄기세포를 분리하여 세포의 형태 및 성장 속도를 비교하고, 역전사 중합효소 연쇄반응과 면역세포화학 염색법을 이용하여 유전자와 단백질 발현을 비교 분석하였다.

심근경색 또는 심장근육병으로 인한 심장세포의 손실은 심장 기능 장애를 일으키는 주요인이다. 현재까지 심근경색 또는 심장근육병 등의 심장 질환의 치료는 대부분 심장 이식 방법으로 이루어지고 있다. 그러나 심장 이식은 심장 질환 환자 수에 비해 공급되는 심장이 부족하다는 한계점이 있다. 따라서 이를 대체하기 위해 인공 심장을 만들기 위한 연구 및 줄기세포를 이용한 치료법이 연구되고 있다. 심근경색 및 심장근육병이 발생하였을 때 발생한 심장세포의 손실에 의해 대부분 심장 기능 장애가 발생되기 때문에 줄기세포를 이용하여 손실된 심장세포를 대체하는 치료법을 이용한다면 심장 전체를 대체하는 심장 이식 및 인공 심장 이식보다 치료가 훨씬 쉬워질 것으로 보인다. 현재 골수유래 줄기세포를

심근경색 또는 심장근육병 상태의 심장에 이식하여 심장 기능이 회복되었다는 연구 결과가 보고되었으며(Strauer et al., 2002), 골수유래 줄기세포(Shim et al., 2004; Xu et al., 2004; Balana et al., 2006), 탯줄 정맥유래 줄기세포(Kadivar et al., 2006), 양막유래 줄기세포(Zhao et al., 2005)가 체외 분화 유도를 통해 심근세포 특성을 나타내는 세포로 분화 유도되었고, 심근 특이 유전자의 발현이 증가되었다는 보고가 있다. 본 연구에서는 지방유래 줄기세포를 BMP와 FGF를 처리하여 심근 근육세포로 분화 유도한 후 심근 근육세포 특이 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. HAD, HUC 그리고 HAM의 채취

본 연구에 사용된 양막 및 탯줄은 만삭 정상 산모의 제왕 절개 또는 질식 분만 시 산모의 동의 아래 태아로부터 채취하였다. 지방은 성형 수술 시 채취하였다. 채취한 후 4시간 내에 실험에 사용하였다.

### 2. 줄기세포의 배양

#### 1) HAD의 배양

지방 조직을 잘게 자른 후 0.075% type 1 collagenase (Gibco, Grand Island, NY)가 포함된  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -free Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)에 넣어 37°C에서 30분 동안 교반하여 반응시켰다. 이를 500×g로 3번 세척 후, 세포를 100 U/mL penicillin(Gibco), 0.1  $\mu$ g/mL streptomycin(Gibco), 3.7 mg/mL sodium bicarbonate, 그리고 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, South Logan, UT)이 포함된 low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM-LG, Gibco)에서 37°C, 5%  $CO_2$ 가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양 용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하였고, 1주에 2번 배양액을 교체하였다. 배양 용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin(Gibco)과 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 함유된 Hanks Balanced Salt Solution(HBSS, Gibco)을 3분간 처리

하여 세포를 떼어낸 후,  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도로 세포를 배양하였다.

### 2) HUC의 배양

채취된 탯줄을 100 U/mL의 penicillin과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin이 첨가된  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -free DPBS로 탯줄 외부의 혈액을 제거하였다. 혈액이 제거된 탯줄의 외부 양막을 벗기고 동맥 2개를 제거하였다. 남은 조직을 1  $\text{mm}^3$  크기로 자른 후, 같은 부피의 0.5% crude type collagenase(Gibco)를 첨가하여 37°C에서 overnight 처리하였다. 이 후 DPBS를 40배 첨가하여 실온에서 600 $\times$ g로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 DMEM-LG로 2번 세척하였다. 분리된 세포를 100 U/mL penicillin, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, 3.7 mg/mL sodium bicarbonate, 그리고 10% FBS가 포함된 DMEM-LG에서 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양 용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하였고, 1주에 2번 배양액을 교체하였다. 배양 용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin과 1mM EDTA가 첨가된 HBSS로 3분간 처리하여 세포를 떼어낸 후,  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도로 배양하였다.

### 3) HAM의 배양

양막 조직을 용모막으로부터 분리한 후 DPBS로 세척하였다. 조직을 잘게 자른 후 0.25% trypsin이 함유된 DMEM-LG에 넣어 37°C에서 30분간 교반하여 반응시켰다. 이를 원심분리한 후에 침전물을 얻어 잘게 자른 후, 위의 과정을 한번 더 반복하였다. 얻어진 침전물에 2 mg/mL collagenase A (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland)와 0.05 mg/mL DNase(Roche Diagnostics)가 포함된 DPBS에 넣어 37°C에서 2시간 동안 교반하여 반응시켰다. 이를 500 $\times$ g로 3번 세척 후, 세포를 100 U/mL penicillin, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, 3.7 mg/mL sodium bicarbonate, 그리고 10% FBS가 포함된 DMEM-LG에 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양 용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하였고, 1주에 2번 배양액을 교체하였다. 배양 용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin과 1 mM EDTA가 함유된 HBSS를 3분간 처리하여 세포를 떼어낸 후,  $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도로 세포를 넣어주어 배양하였다.

## 3. 줄기세포의 특성 분석

### 1) 유전자 발현 분석

Cell pellet은  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -free DPBS를 이용하여 세척하고 500  $\mu\text{L}$ 의 Tri-reagent를 첨가한 다음 manufacturer의 instruction에 따라 total RNA를 분리하였다. 5  $\mu\text{g}$ 의 RNA는 reaction buffer, 1 mM NTP mixture, 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  oligo(d) T15, 20 U RNase inhibitor(Takara, Japan), 20 U M-MuLV reverse transcriptase(Fermentas, Burlington, Canada)가 혼합된 20  $\mu\text{L}$  반응 용액에서 역전사(reverse-transcription, RT)시켰다. 반응은 42°C에서 60분간 진행되었다. 얻어진 RT products(cDNAs)는 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1x Taq buffer, 0.25 U Taq polymerase(Fermentas), 10 pM의 sense와 antisense gene-specific primers가 혼합된 10  $\mu\text{L}$  반응 용액으로 PCR을 수행하였다. Amplification은 총 35 cycles 수행하였으며, 각 cycle은 94°C에서 30초간의 denaturation, 30초간의 annealing, 72°C에서 30초간의 extension 과정으로 구성되었다. Annealing 과정의 온도는 Table 1과 2에 표기하였다. 반응 종결 후, PCR 생성물들은 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 40% sucrose가 포함된 6xloading buffer에 혼합한 다음 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하고 ultra-violet light를 이용하여 DNA의 영상을 얻었다.

### 2) 세포면역화학적 특성 분석

양막과 탯줄유래 줄기세포를 8-well slide chamber(Nunc, Rochester, NY)에서 배양한 후 2% paraformaldehyde가 함유된 DPBS 용액을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 고정 후 DPBS로 5분간 3번 세척하였다. 그리고 실온에서 10분 동안 0.5% Triton X-100가 함유된 DPBS를 처리 후 세척한 다음 endogenous peroxidase activities를 제거하기 위하여 3% hydrogen peroxide(Dako, Carpinteria, CA)로 15분간 반응시킨 후 세척하였다. 2% bovine serum albumin을 함유한 DPBS에서 실온으로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 TRA-1-60(1:20), SSEA-3(1:50), SSEA-4(1:50), Thy-1(1:20), Collagen I(1:100), Collagen II(1:20), Collagen III(1:200), Collagen XIII(1:200), Fibronectin(1:700),  $\alpha$ -SMA(1:50), Vimentin(1:100), CK18(1:50), CD44(1:500), CD54(1:40), CD106(1:50), FSP(1:500), vWF(1:200), CD31(1:40),

**Table 1. Primers used for the RT-PCR analysis for stem cell marker**

Gene	Primer sequence	Size(bp)	Annealing temp.(°C)	Accession number
GAPDH	5'-aca act ttg gta tcg tgg aa-3'	456	53	NM_002046
	5'-aaa ttc gtt gtc ata cca gg-3'			
Oct-4	5'-cgt gaa gct gga gaa gga gaa gct g-3'	245	55	AF268617
	5'-caa ggg ccg cag ctc aca cat gtt c-3'			
Rex-1	5'-atg gct atg tgt gct atg agc-3'	449	57	NM_174900
	5'-cct caa ctt cta gtg cat cc-3'			
SCF	5'-cca ttg atg cct tca agg ac-3'	275	55	M59964
	5'-ctt cca gta taa ggc tcc aa-3'			
FGF-5	5'-gct gtg tct cag ggg att gta gga ata-3'	434	55	NM_004464
	5'-tat cca aag cga aac ttg agt ctg ta-3'			
NCAM	5'-gag ggg gaa gat gcc gtg atg tg-3'	269	60	NM_000615
	5'-ata ttc tgc ctg gcc cgg atg gta g-3'			
Nestin	5'-cca gaa act caa gca cca c-3'	398	54	X65964
	5'-ttt tcc act cca gcc atc c-3'			
BMP-4	5'-agc cat gct agt ttg ata cc-3'	383	55	D30751
	5'-tca ggg atg ctg ctg agg tt-3'			
Brachyury	5'-gag ctc acc aat gag atg at-3'	335	57	NM_002052
	5'-ggc tca tac tta tgc aag ga-3'			
aFP	5'-gtg ctg cac ttc ttc ata tgc-3'	218	54	NM_001134
	5'-tga cag cct caa gtt gtt cc-3'			
GATA-4	5'-ttc ctc ttc cct cct caa at-3'	194	60	NM_002052
	5'-tca gcg tgt aaa ggc atc tg-3'			
HNF-4a	5'-gag cag gaa tgg gaa gaa tg-3'	205	62	NM_178849
	5'-ggc tgt cct ttg gga tga ag-3'			
Vimentin	5'-cct tcg tga ata cca cg acct gc-3'	321	56	Z19554
	5'-taa tat atc gcc tgc cac tga g-3'			
BMP-2	5'-ttg cgg ctg ctc agc atg tt-3'	315	55	BC069214
	5'-ttg cga gaa cag atg caa gat g-3'			
CK18	5'-gag atc gag gct ctc aag ga-3'	357	57	NM_00024
	5'-caa gct ggc ctt cag att tc-3'			
HLA ABC	5'-gta ttt ctt cac atc cgt gtc ccg-3'	394	70	L18898
	5'-gtc cgc cgc ggt cca aga gcg cag-3'			
HLA DR	5'-ctg atg agc gct cag gaa tca tgg-3'	220	60	X06079
	5'-gac tta ctt cag ttt gtg gtg agg gaa g-3'			

HLA-ABC(1:200), HLA-DR(1:50) mouse monoclonal antibodies를 4°C에서 17~24시간 동안 처리 후, 세척하였다. 이후 biotinylated goat anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG를 실온에서 20분간 처리하였다. 3번 세척한 다음, horseradish

peroxidase-conjugated streptavidin(Dako)을 20분간 처리하였다. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Dako) 용액으로 발색하였다. 발색이 된 세포는 DPBS로 세척하고, Mayer's Hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학 현미경(LSM

**Table 2. Primers used for the RT-PCR analysis for cardiac related marker**

Gene	Primer sequence	Size(bp)	Annealing temp.(°C)	Accession number
Cmlc1	5'-gag gtc gag ttt gat gct tcc-3' 5'-cga agt cct cat agg tgc ctg-3'	300	63	NM_000258
alc	5'-ctg gac aag aac cag cga cag tgc g-3' 5'-atc acg atc agg agg gcc aca tag gg-3'	562	68	NM_000719563
TnT	5'-ggc agc gga aga gga tgc tga a-3' 5'-gag gca cca agt tgg gca tga acg a-3'	152	57	BC002653
TnI	5'-cct gcg gag agt gag gat ct-3' 5'-tag gca gga agg ctc agc tc-3'	218	57	X54163
Kv4.3	5'-cac ccc aga aga gga gca cat-3' 5'-agt agc tgg cag gtt aga att-3'	322	63	AF048712

410; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

#### 4. 줄기세포 분화 능력 분석

세포들의 분화 능력을 검증하기 위하여 3번째 passage의 세포들을 분화 유도 배양액에서 배양하였다. 배양액은 1주일에 2번 교체하였다.

지방세포 생성(adiopogenic)은 DMEM-LG에 10% FBS, 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.05 mg/L human insulin 그리고 200  $\mu$ M indomethacin이 첨가된 배양액을 이용하였다. 2주 배양 후, oil red O 염색을 시행하여 지질이 축적된 지방세포의 존재 여부를 확인하였다.

골세포 생성(osteogenic)은 DMEM-LG에 10% FBS, 0.1  $\mu$ M Dex, 100 mM  $\beta$ -glycerol phosphate, 50  $\mu$ M ascorbic acid-2-phosphate가 첨가된 배양액을 이용하였다. 2주 배양 후, von Kossa 염색을 시행하여 칼슘이 침착된 세포를 확인하였다.

연골세포 생성(chondrogenesis)은 high-glucose DMEM에 0.1  $\mu$ M Dex, 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid-2-phosphate(Asc), 100  $\mu$ g/mL sodium pyruvate, 40  $\mu$ g/mL proline, 10 ng/mL transforming growth factor- $\beta$ 3(TGF- $\beta$ 3 R&D Systems, Minneapolis, MN), 50 mg/mL ITS puls premix(each 6.25  $\mu$ g/mL insulin, transferrin and selenious acid plus 1.35 mg/mL BSA and 5.35 mg/mL linoleic acid; BD Biosciences Becton Dickinson, CA)가 첨가된 배양액을 이용하였다. 3주 배양 후, alcian blue 염색을 시행하여 분화 여부를 확인하였다.

#### 5. 심장세포로의 분화 유도

배양 접시에  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$  농도의 세포를 넣어준 후 3일 후에 10  $\mu$ M 5-azacytidine을 24시간 처리하였다. 이 후 기본배양액으로 4주간 배양하거나, 기본배양액에 각 10 ng/mL 농도의 BMP-2와 FGF-10, BMP-4와 FGF-4 또는 BMP-4와 FGF-8을 첨가하여 4주간 배양하였다. 이 후 심근세포 관련 유전자를 조사하여 분화 정도를 조사하였다.

## 결 과

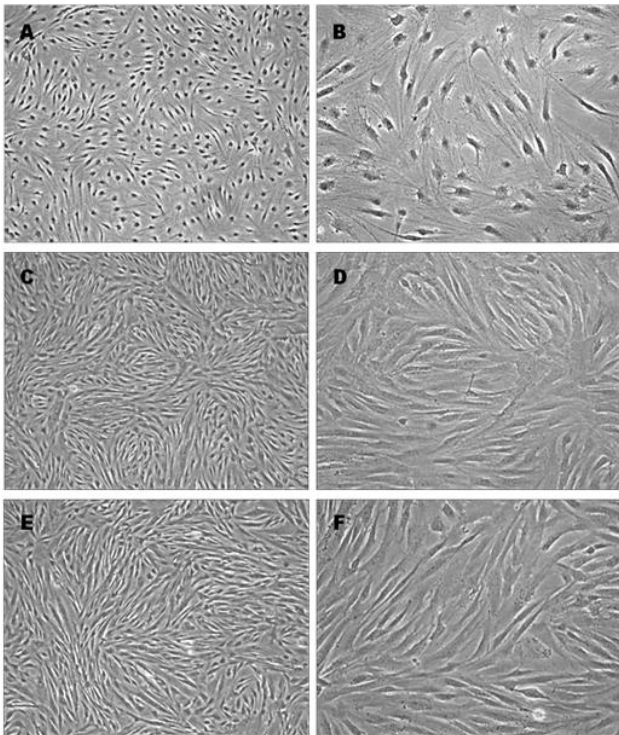
### 1. HAD, HUC 그리고 HAM의 특성 분석

#### 1) 형태학적 분석

HAD, HUC 그리고 HAM 모두 섬유아세포와 유사한 형태를 나타냈으며, 이 중 HUC과 HAM이 매우 유사한 형태를 나타냈다(Fig. 1).

#### 2) 체외 증식력 분석

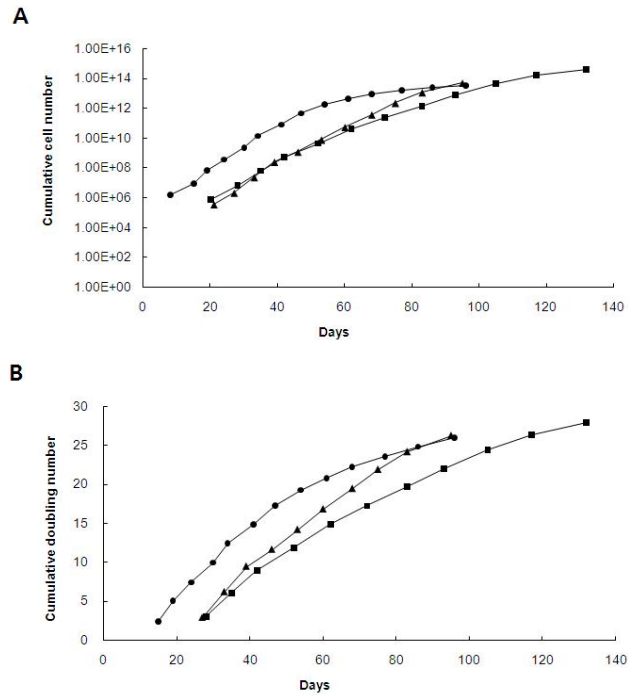
계대배양 동안 분열 속도를 측정된 결과, HAD는 11번의 계대배양 동안 28회 분열하였고, 배양시작 후 132일 만에 분열을 멈추었다. HUC은 10번의 계대배양 동안 26회 분열하였고, 배양시작 후 95일 만에 분열을 멈추었으며, HAM은 13번의 계대배양 동안 26회 분열하였고, 배양시작 후 96일 만에 분열을 멈추었다. Doubling time은 HAD는 3.2일, HUC은 2.7일, HAM은 3.4일로 HUC이 가장 짧았다(Fig. 2).



**Fig. 1. Morphology of HAD, HUC, and HAM.** A, B, HAD at 2nd passage; C, D, HUC at 3rd passage; E, F, HAM 3rd passage. A, C, E: magnification,  $\times 40$ , B, D, F: magnification,  $\times 100$ .

### 3) 유전자 발현 분석

HAD, HUC 그리고 HAM의 유전자 분석 결과, 세 줄기세포 모두 배아 줄기세포와 배아 중양세포에서 발현하는 유전자인 Oct-4, 배아 줄기세포, 배아 중양세포, 조혈모세포, 중간엽 줄기세포에서 발현하는 유전자인 stem cell factor (SCF), 외배엽 세포에서 발현하는 유전자인 neural cell adhesion molecule(NCAM)과 FGF-5, 중배엽 세포에서 발현하는 유전자인 BMP-4, 내배엽 세포에서 발현하는 유전자인 GATA-4, vimentin, cytokeratin18(CK18), 조직 적합성 복합체 유전자인 HLA-ABC와 HLA-DR을 발현하였다. 그러나 배아 줄기세포, 배아 중양세포에서 발현하는 유전자 Rex-1과 내배엽 세포에서 발현하는 유전자 alpha feto protein( $\alpha$ FP)은 HUC에서만 발현하지 않았으며, 중배엽 세포에서 발현하는 유전자 Brachyury와 중배엽 및 내배엽 세포에서 발현하는 BMP-2는 세 줄기세포에서 모두 발현하지 않았다(Table 3).



**Fig. 2. Cumulative cell numbers and cumulative doubling numbers of HAD, HUC, and HAM.** A, cumulative cell numbers; B, cumulative doubling numbers. ■, HAD; ▲, HUC; ●, HAM.

### 4) 면역세포화학적 특성 분석

면역세포화학 분석법을 통하여 특성 분석한 결과, 세 줄기세포 모두 발현하는 단백질은 배아 줄기세포의 표지 물질로 알려진 SSEA-3, SSEA-4, 중간엽 줄기세포 표지 물질인 Thy-1(CD90), 세포간 기질 물질인 collagen type- I, -II, -III, -XII, fibronectin, 세포 골격 물질인 vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA), CK18, 세포 연결 물질인 homing cell adhesion molecule(HCAM, CD44), intracellular cell adhesion molecule(ICAM, CD54), vascular cell adhesion molecule(VCAM, CD106), 그리고 조직적합성 복합체 항원인 HLA-ABC로 나타났다. 배아 줄기세포 표지 물질인 TRA-1-60은 HUC에서만 발현하지 않았고, 내피세포 표지 물질인 von Willebrand factor(vWF)은 HAM에서만 발현하지 않았으며, 내피세포 표지 물질인 platelet endothelial cell adhesion molecule(PECAM, CD31)과 조직적합성복합체 항원인 HLA-DR은 세 줄기세포 모두 발현하지 않았다(Table 4).

**Table 3. Gene expression profiles by HAD, HUC, and HAM**

Marker	Gene	HAD	HUC	HAM
ES, EC	Oct-4	+	+	+
	Rex-1	+	-	+
ES, EC, HSC, MSC	SCF	+	+	+
Ectoderm	NCAM	+	+	+
	FGF-5	+	+	+
Mesoderm	BMP-4	+	+	+
	Brachyury	-	-	-
Endoderm	HNF-4 $\alpha$	+	+	+
	GATA-4	+	+	+
	$\alpha$ FP	+	-	+
Mesoderm	Vimentin	+	+	+
Endoderm	BMP-2	-	-	-
Ectoderm, Endoderm	CK18	+	+	+
MHC	HLA-ABC	+	+	+
	HLA-DR	+	+	+

ES; embryonic stem cells, EC; embryonic carcinoma cells, HSC; hematopoietic stem cells, MSC; mesenchymal stem cells, ECM; extracellular molecule, MHA; major histocompatibility antigen.

5) 분화능력 분석

HAD, HUC 그리고 HAM을 각각 지방세포, 골세포, 연골세포로의 분화 유도 결과, 세 가지 줄기세포 모두 지방세포, 골세포 그리고 연골세포로 분화 유도되었다(Fig. 3).

2. HAD, HUC 그리고 HAM의 심근세포 관련 유전자 발현 분석

HAD, HUC 그리고 HAM에 대하여 심근세포 관련 유전자들의 발현을 조사한 결과 cardiac progenitor marker 유전자인 Islet-1(Isl-1)과 myocyte enhancer factor-2C(MEF-2C)는 세 종류의 줄기세포에서 모두 발현하였으며, NK2 transcription factor related, locus5(Nkx2.5)는 HAD에서만 발현되었다. Thick filament component 유전자인 Cmlc-1은 HAD와 HUC에서만 발현되었으며, atrium myosin light chain-2(MLC-2a)는 HUC과 HAM에서만 발현되었다. 그러나  $\alpha$ -myosin heavy chain( $\alpha$ -MHC)와  $\beta$ -myosin heavy chain( $\beta$ -MHC) 그리고 cardiac ventricular myosin light chain-2(Cvmlc-2)는 세 줄기세포 모두 발현하지 않았다. Thin fila-

**Table 4. Immunocytochemical analysis of proteins expressed by HAD, HUC, and HAM**

Marker	Protein	HAD	HUC	HAM
ES	TRA-1-60	+	-	+
	SSEA-3	+	+	+
	SSEA-4	+	+	+
MSC	Thy-1	+	+	+
	Collagen I	+	+	+
	Collagen II	+	+	+
ECM	Collagen III	+	+	+
	Collagen XII	+	+	+
	Fibronectin	+	+	+
Cytoskeleton	$\alpha$ -SMA	+	+	+
	Vimentin	+	+	+
	CK18	+	+	+
Adhesion molecule	CD44	+	+	+
	CD54	+	+	+
	CD106	-	-	-
Endothelial cell	FSP	+	+	+
	vWF	+	+	-
	CD31	-	-	-
MHA	HLA ABC	+	+	+
	HLA DR	-	-	-

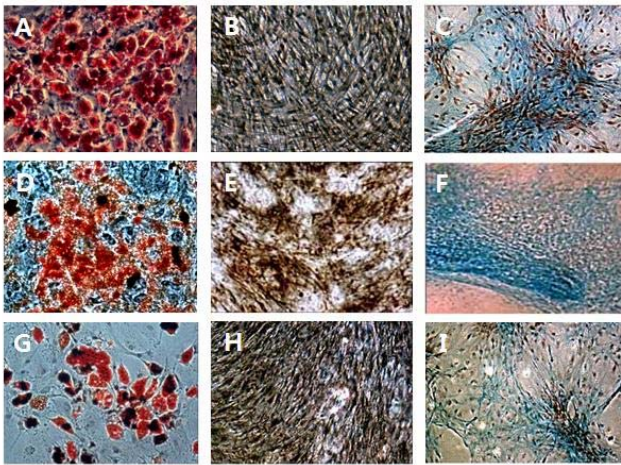
ES; embryonic stem cells, MSC; mesenchymal stem cells, ECM; extracellular molecule, MHA; major histocompatibility antigen.

ment component 유전자인  $\alpha$ -skeletal actin( $\alpha$ -SA)과 TnT는 세 줄기세포 모두 발현하였으며,  $\alpha$ -cardiac actin( $\alpha$ -CA)과 TnI는 HAD와 HUC만 발현하였다. Natriuretic peptide 유전자인 brain natriuretic peptide(BNP)는 HUC에서만 발현하였고, atrial natriuretic peptide(ANP)는 세 줄기세포 모두 발현하지 않았다. Ion channel 유전자 중 potassium channel 유전자인 Kv4.3은 세 줄기세포 모두 발현하였으며, calcium channel 유전자인  $\alpha$ 1C는 HAD와 HUC만 발현하였다(Table 5).

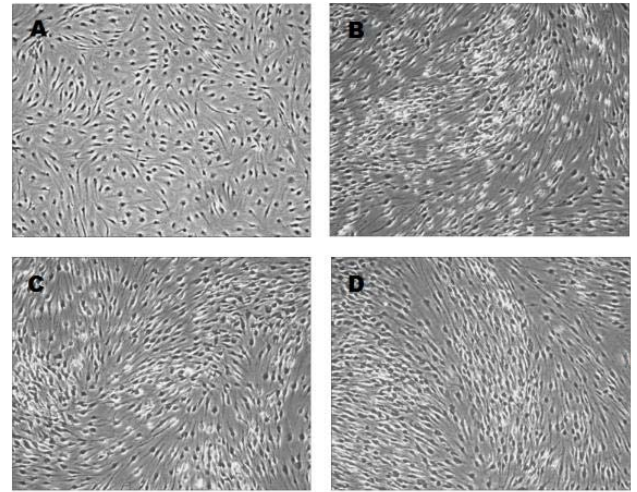
3. HAD의 심근세포로의 분화

1) 형태학적 분석

심근 세포로 분화 유도 후 HAD의 형태 변화는 나타나지



**Fig. 3. Adipogenic, osteogenic, chondrogenic differentiation of three human adult stem cells.** A, B, C, HAD D, E, F, HUC G, H, I, HAM. A, D, H, adipogenic; B, E, F, osteogenic; C, F, I, chondrogenic. Adipogenic, magnification  $\times 100$ ; osteogenic and chondrogenic, magnification  $\times 40$ .



**Fig. 4. Morphology of HAD treated with combinations of BMP and FGF for 4 weeks after induction with 5-azacytidine for 24 h.** A, control; B, HAD treated with BMP-2/FGF-10; C, HAD treated with BMP-4/FGF-4; D, HAD treated with BMP-4/FGF-8. Magnification,  $\times 40$ .

**Table 5. RT-PCR analysis of cardiomyocyte-related genes of HAD, HUC, and HAM**

Marker	Gene	HAD	HUC	HAM
Cardiac progenitor markers	Isl-1	+	+	-
	MEF2C	+	+	+
	Nkx2.5	+	-	-
Thick filament components	$\alpha$ -MHC	-	-	-
	$\beta$ -MHC	-	-	-
	Cmlc1	+	+	-
	Cvmlc2	-	-	-
	MLC-2a	-	+	+
Thin filament components	$\alpha$ -CA	+	+	-
	$\alpha$ -SA	+	+	+
	TnT	+	+	+
	TnI	+	+	-
Natriuretic peptides	ANP	-	-	-
	BNP	-	+	-
Ion channels	Kv4.3	+	+	+
	$\alpha$ 1C	+	+	-

않았다(Fig. 4).

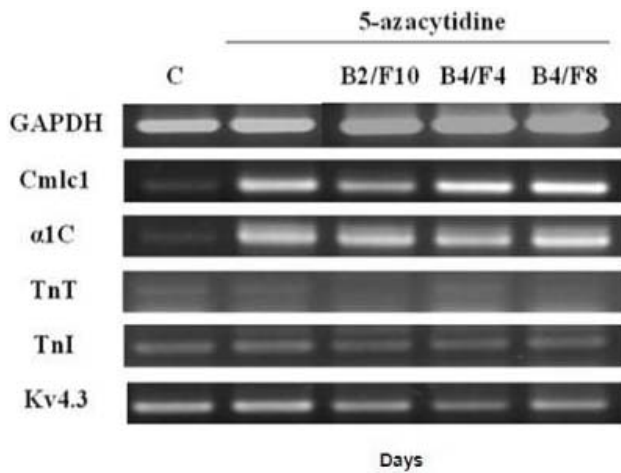
2) 유전자 발현 분석

HAD에 5-azacytidine을 24시간 처리한 후 기본배양액으로 4주간 배양하거나 기본배양액에 BMP-2와 FGF-10, BMP-4와 FGF-4 또는 BMP-4와 FGF-8을 첨가하여 4주간 배양하여 심근세포 관련 유전자의 발현을 조사하여 심근세포로의 분화 정도를 조사하였다. 5-azacytidine을 처리한 후 분화 배양액에 4주 동안 BMP와 FGF의 첨가와 상관없이 모든 실험군에서 Cmlc1과  $\alpha$ 1C 유전자의 발현이 증가되었다. 한편, TnT, TnI, 그리고 Kv4.3의 유전자 발현 양상은 변화가 없었다(Fig. 5). 이로 미루어 심근 분화 유도에 BMP와 FGF의 효과가 없었음을 알 수 있다.

고 찰

현재 성체 줄기세포를 이용한 세포 대체요법이나 이식에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 가장 많이 연구된 성체 줄기세포로는 혈액세포를 생성하는 조혈모세포(hematopoietic stem cells)와 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포 등의 간엽성 세포로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포가 있다(Deans & Moseley, 2000). 최근까지 백혈병 등의 악성 혈액질환 및 유전적 요인에 의한 심각한 혈액 관련 질환의 치료에는 골수의 조혈모세포 이식이 널리 이용되어 왔으나 (Vanichsetakul et al., 2004), 골수 내의 중간엽 줄기세포의





**Fig. 5. RT-PCR analysis of cardiomyocyte-related genes in HAD treated or non-treated with combinations of BMP and FGF after induction with 5-azacytidine for 24 h.** Lane 1, control; lane 2, HAD treated with 5-azacytidine; lane 3, HAD treated with BMP-2/FGF-10; lane 4, HAD treated with BMP-4/FGF-4; Lane 5, HAD treated with BMP-4/FGF-8.

존재가 알려지고, 중간엽 줄기세포의 다분화능을 이용한 세포 생산의 가능성이 제시되면서 중간엽 줄기세포에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Barry & Murphy, 2004). 그러나 골수는 채취하는데 고통이 따르며, 바이러스 감염의 위험성이 있기 때문에 골수 이외의 여러 성체 조직에서 줄기세포의 분리 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 실험에서는 HAD와 HUC 그리고 HAM을 분리하여 각 줄기세포의 형태학적 특성을 관찰하고, 줄기세포 관련 유전자와 단백질 발현 및 분화능을 관찰하여 중간엽 줄기세포의 새로운 공급원으로서의 가능성을 제시하였다.

본 연구 결과 세 줄기세포는 성체 줄기세포로서의 특성을 가진 것으로 나타났으며, 배아 줄기세포 표지유전자 Oct-4와 표지단백질인 SSEA-3, SSEA-4를 발현하는 것으로 미루어 보아 중간엽 줄기세포보다 좀 더 다양한 세포로의 분화능을 가질 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

또한 본 실험에서는 HAD의 심근세포로의 분화를 유도하였다. Cardiac specification은 anterior 측판 중배엽(lateral plate mesoderm)에 세포가 도달하였을 때 발생한다고 알려져 있다. 이 anterior 측판 중배엽의 아래쪽에 위치해 있는 anterior 내배엽이 myocardial induction에 중요한 조절자로 알려져 있다. 이 anterior 내배엽은 다양한 FGF, activin, in-

sulin like growth factor-II(IGF-II)을 분비한다고 보고되고 있다(Lough & Sugi, 2000). 닭의 배아에서는 anterior 내배엽의 BMP-2가 heart inducing activity가 있는 것으로 보고 되었으며(Andrée et al., 1998; Schultheiss et al., 1997), HH stage 4와 5에서 heart-forming region에 인접한 측판 mesoderm에서 BMP-2가 발현된다는 보고도 있다(Andrée et al., 1998). 따라서 BMP-2는 myocardial lineage markers의 발현을 증가시킬 가능성이 있는 것으로 보고되었다(Brand, 2003). 다른 cardiogenic signal로는 zebrafish, 쥐, 닭의 cardiogenic mesoderm에서 FGF-8이 발현되며(Alsans & Schultheiss, 2002), 이 FGF-8은 BMP-2와 함께 cardiac mesoderm을 유도하는 것으로 보고되었다. 또한 extopically 주입된 BMP-2가 FGF-8을 증가시키는 것으로 보아 FGF-8은 BMP-2의 downstream으로 생각되어졌다(Brand, 2003). Posterior mesoderm explants 실험에서는 BMP-2와 FGF-4가 심장 형성을 유도할 수 있으나, 각 한 가지만의 처리로는 유도되지 않은 것으로 보고되었다(Barron et al., 2000).

Signal molecules의 위치에 따른 종류를 보면 splanchnic mesoderm에서는 BMP-2와 FGF-10 그리고 pharyngeal endoderm에서는 shh와 FGF-8이 cardiogenic induction 시기에 나타나는 것으로 알려졌다(Garg et al., 2001; Kelly et al., 2001). 이러한 점으로 미루어 심근 분화를 유도할 때 BMP와 FGF signal이 필요할 것으로 여겨진다.

현재까지 심근세포로의 분화 유도 방법으로 가장 많이 사용되는 것이 demethylation agent인 5-azacytidine을 24시간 처리한 후 기본배양액에서 4주간 배양하는 방법이다(Xu et al., 2004; Balana et al., 2006; Kadivar et al., 2006). 이 외에 FGF-2 또는 activin A를 첨가하여 심근세포의 특성이 나타났다는 보고가 있으며(Zaho et al., 2005), insulin과 transferrin 등의 다양한 물질을 첨가하여 계대배양을 지속하였을 때 계대배양이 지속됨에 따라 성숙한 심근세포로의 분화가 되었다는 보고가 있다(Shim et al., 2004). 본 연구에서는 5-azacytidine을 24시간 처리한 후 기본배양액에서 4주간 배양을 함과 동시에 4주간 배양할 때 BMP와 FGF를 첨가하여 분화 유도하였다.

본 연구 결과, HAD를 5-azacytidine 처리 및 5-azacytidine 처리 후 몇 가지 BMP와 FGF 조합을 처리해 본 결과 BMP와 FGF의 효과는 나타나지 않았다. 두 가지 조건에서 모두 같은 정도의 Cmlc1과  $\alpha 1C$ 의 발현 증가가 일어났으나,

TnT, TnI, 그리고 Kv4.3의 발현 증가는 없었다. 따라서 더 많은 분화 조건을 이용한 실험이 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한 분화 유도하지 않은 세 줄기세포에서 모두 심근세포 관련 유전자들이 발현하는 것으로 보아 HUC과 HAM도 심근세포로의 분화 유도가 가능할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2007학년도 서울여자대학교 바롬학술연구비의 지원을 받았음.

### 인용문헌

- Alsán BH, Schultheiss TM (2002) Regulation of avian cardiogenesis by FGF-8 signaling. *Development* 129:1935-1943.
- Andrée B, Duprez D, Vorbusch B, Arnold HH, Brand T (1998) BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev* 70:119-131.
- Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, Ravens U (2006) 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res* 16:949-960.
- Barron M, Gao M, Lough J (2000) Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev Dyn* 218:383-393.
- Barry FP, Murphy JM (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36:568-584.
- Brand T (2003) Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258:1-19.
- Deans RJ, Moseley AB (2000) Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28:875-884.
- Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K (2004) Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 22:649-658.
- Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriya IS, Yamagishi H, Srivastava D (2001) Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol* 235:62-73.
- In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH (2003) Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102:1548-1549.
- Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M (2006) *In vitro* cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340:639-647.
- Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME (2001) The arterial pole of the mouse heart forms from FGF-10 expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 1:435-440.
- Lough J, Sugi Y (2000) Endoderm and heart development. *Dev Dyn* 217:327-342.
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-77.
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21:105-110.
- Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB (1997) A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 11:4514-4562.
- Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E (2004) *Ex vivo* differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324:481-488.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*

- 106:1913-1918.
- Vanichsetakul P, Wacharaprechanont T, O-Charoen R, Seksarn P, Kupatawintu P (2004) Umbilical cord blood transplantation in children with beta-thalassemia diseases. *J Med Assoc Thai* 87 Suppl 2:S62-67.
- Xu W, Zhang X, Qian H (2004) Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. *Exp Biol Med* 229:623-631.
- Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T (2005) Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 79:528-535.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295.
- Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN (2000) Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2:477-488.