

## 냉동 보존 전후의 사람 탯줄 유래 줄기세포의 특성 분석

강현미 · 박세아 · 윤진아 · 허진영 · 김해권<sup>†</sup>

서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과

## Stem Cell Properties of Human Umbilical Cord-derived Stem Cells after Cryopreservation

Hyun Mi Kang, Seah Park, Jinah Yoon, Jinyeong Heo and Haekwon Kim<sup>†</sup>

Dept. of Biotechnology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University

**ABSTRACT** : For the clinical application, it is needed to keep characteristics of stem cells after storage for a long time. In the present study, we examined stem cell properties of human cord-derived stem cells (HUC) after cryopreservation. Cells were isolated from human umbilical cord and cultured *in vitro*. At passage 2 or 3, HUC were suspended at a concentration of  $1.0 \times 10^6 / \text{ml}$  in cryomedium consisting of DMSO and FBS. After freezing at  $-80^\circ\text{C}$  overnight, HUC were cryopreserved at  $-196^\circ\text{C}$  nitrogen gas. After 6 months, HUC were thawed and cultured *in vitro*. Assessment for the stem cell properties was made upon the morphology, population doubling time, and expression profiles of genes and various proteins. Cryopreserved HUC showed more than 70% viability and maintained fibroblast-like morphology similar to HUC before cryopreservation. Throughout the culture, they underwent average 42.8 doublings and produced  $6.75 \times 10^{18}$  cells. RT-PCR analyses showed that cryopreserved HUC expressed Oct-4, nanog, SCF, NCAM, nestin, GATA-4, BMP4, and HLA-1 genes. They did not express Brachyury and HLA-DR genes. Immunocytochemical studies showed that cryopreserved HUC reacted with antibodies against SSEA-3, -4, Thy-1, vimentin, fibronectin, HCAM, ICAM, HLA-1 proteins. They did not react with antibody against HLA-DR protein. These genes and proteins expression patterns of cryopreserved HUC were similar to those of HUC before cryopreservation. These results suggest that cryopreserved HUC could retain proliferative potential and they expressed various genes and proteins similar to HUC before cryopreservation. Thus, cryopreservation might be useful for HUC for future research and clinical application.

**Key words** : Cryopreserved HUC, Mesenchymal stem cells, RT-PCR, Immunocytochemical study.

요 약 : 줄기세포를 임상에 적용하기 위해서는 체외에서 증식 과정이 필수적이다. 그러나 배아줄기세포와는 달리 성체줄기세포는 체외에서 증식할 경우 일정시간이 지나면 줄기세포의 특성을 잃기 때문에 임상사용에 있어 제한점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 줄기세포의 특성을 잃지 않게 세포를 보존하는 방법이 필요하며, 본 연구에서는 탯줄 유래 줄기세포를 동결 보존한 후 해동시켜 줄기세포의 특성을 분석하였다. 사람의 탯줄 유래 세포를 분리하여 체외에서 배양한 후 2번째 또는 3번째 계대의 세포를 25% FBS와 10% DMSO가 첨가된 냉동배양액에 넣어  $-196^\circ\text{C}$ 에서 동결보존한 후, 6개월 뒤에 해동시켜 세포의 성장 속도와 유전자 및 단백질 발현을 살펴보았다. 냉동 보존한 후 세포를 해동시킨 결과 74%의 생존율을 보였으며, 이 세포를 체외에서 배양하였을 경우, 냉동보존하기 전의 세포와 유사하게 방추사 모양의 섬유아세포의 형태를 나타냈다. 또한, 성장 속도 역시 냉동보존하기 전의 세포와 똑같이 10번째 계대까지 배양되었으며, 42번 분열 능력을 나타냈다. RT-PCR 결과, 냉동 전후 세포 모두에서 Oct-4, nanog, SCF, NCAM, nestin, GATA4, BMP4, HLA-1 유전자는 모두 발현하였으며, Brachyury와 HLA-DR은 발현하지 않았다. 면역세포 화학 염색 결과, 배아줄기세포 단백질로 알려진 SSEA-3, -4, Oct-4 그리고 중간엽줄기세포 단백질인 Thy-1은 모두 발현하였으며, vimentin, fibronectin, HLA-1, HCAM, ICAM 모두 발현하였다. 그러나 SSEA-4과 Thy-1, vimentin, fibronectin, HLA-1는 냉동보존한 후 배양된 탯줄 유래 세포에서 발현량이 증가하는 양상을 보였으며, CD44와 CD54는 감소하는 양상을 나타냈다. 또한, 조직적합성 복합체 항원인 HLA-DR은 냉동보존 전후 탯줄 유래 세포에서 모두 발현하지 않았다. 이와 같이 유전자와 단백

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

질의 발현은 냉동보존하기 전후의 태줄 유래 세포에서 큰 차이가 없었다. 냉동 보존된 태줄 유래 세포는 세포의 분열능력과 유전자 및 단백질의 발현이 냉동 보존 전 세포와 유사한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 냉동보존법이 임상적으로 세포 치료 시 적절한 세포의 수나 시간을 맞추는데 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 서 론

줄기세포는 자가 증식이 가능하며, 아직 운명이 결정되지 않은 세포로 배아의 내세포괴에서 분리하여 체외에서 증식 및 배양된 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESC)와 성체의 여러 조직 및 기관에 존재하는 성체줄기세포(adult stem cells)로 나누어 볼 수 있다. 배아줄기세포는 신경 (Reubinoff et al., 2000), 혈액세포(Kaufman et al., 2001), 췌장(Assay et al., 2001) 등 다양한 세포로 분화할 수 있다는 연구 보고가 있지만, 사람으로 성장할 수 있는 배아로부터 얻어야 하기 때문에 윤리적 문제점이 있다. 따라서 윤리적인 문제를 배제할 수 있을 뿐만 아니라 분리 및 배양이 쉬우며 여러 가지 세포로 분화 가능한 성체줄기세포가 세포치료제의 재료로 각광받고 있다.

성체줄기세포의 경우, 다양한 조직에서 분리할 수 있으며, 가장 잘 알려진 성체줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포이다. 중간엽 줄기세포의 경우 골, 연골과 지방(Pittenger et al., 1999)과 같은 중간엽 기원 세포로 분화가 가능하며, 신경과 같은 외배엽 기원 세포 또는 간세포(Schwartz et al., 2002)와 같은 내배엽 기원 세포로도 분화가 가능하다고 보고된 바 있다. 그러나 골수 유래 중간엽 줄기세포의 경우 세포를 얻기 위해서는 고통이 수반해야 하며, 기증자의 나이에 따라 중간엽 줄기세포의 특징이 다르다는 단점(Mueller & Glowacki 2001; Stenderup et al., 2003)이 있기 때문에 다른 조직에서부터 유사 중간엽 줄기세포를 분리하려는 시도를 하고 있으며, 최근 성체와 태아의 말초 혈액, 간, 비장, 태반, 태줄, 제대혈, 양수, 지방 그리고 양막 등에서 분리할 수 있다는 보고들이 발표되었다(Campagnoli et al., 2001; Zuk et al., 2002; Hu et al., 2003; Romanov et al., 2003; Bilic et al., 2004; Fukuchi et al., 2004).

태줄은 배아 발달 13일째 배아 외의 내배엽에서 기원하며, 콜라겐이 풍부한 기질에서 기질세포를 분리하면서 보고되었다(Takechi et al., 1993). 최근에는 태줄에서 유래한 기질세포가 골수에서 유래된 중간엽 줄기세포의 특징을 가지고 있

다고 보고되었으며(Wang et al., 2004; Fu et al., 2006), Wang 등은 이들을 이용하여 심근세포, 연골세포, 골세포, 그리고 지방세포와 같은 중간엽 기원 세포로 분화를 유도하였다. 또한, Fu 등과 Weiss 등(2006)에서도 태줄에서 유래한 중간엽 줄기세포가 신경세포로 분화 가능하다는 연구를 보고하였다. 이처럼 태줄은 임상적 사용을 위한 줄기세포를 공급할 수 있는 조직으로 기대되며, 나아가 세포치료제로서 사용이 가능할 것으로 보인다.

그러나 배아줄기세포와는 달리 태줄 유래 줄기세포와 같은 성체줄기세포는 체외에서 증식할 경우 일정시간이 지나면 줄기세포의 특성을 잃게 되기 때문에 임상 사용에 있어 제한점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 줄기세포를 보존하는 방법이 필요하며, 그 중 동결보존법은 배아와 세포 보존법으로 보편적으로 사용되어온 방법 중 하나이다.

최근 제대혈(umbilical cord blood) 유래 중간엽 줄기세포를 10% dimethylsulfoxide(DMSO)를 사용하여 냉동보존한 후 녹인 세포가 다양한 세포로 분화 가능하다는 연구 보고가 있으며(Lee et al., 2005), 사람의 골수에서 유래한 중간엽 줄기세포(Bruder et al., 1997)와 사람의 양막에서 유래한 줄기세포(Moon et al., 2008)를 냉동보존한 후 녹인 뒤 연골, 지방, 골 또는 신경세포로 분화하였다는 보고도 있다.

따라서 태줄에서 유래한 줄기세포의 동결보존법에 대한 연구는 앞으로 임상적으로 세포치료제의 사용에 있어서 필수적이라고 생각되며, 본 연구에서는 사람의 태줄 유래 줄기세포를 동결보존한 후 해동시킨 세포의 증식 능력과 유전자 및 단백질의 발현 등을 통해 줄기세포의 특성을 가지고 있는지를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 태줄로부터 줄기세포의 채취

본 연구에 사용된 태줄은 만삭 정상 산모의 제왕절개 또는 질식 분만 시 산모의 동의 하에 태아로부터 채취하였다. 채취한 조직은 24시간 내에 실험에 사용하였다.

## 2. 태줄 유래 세포의 배양

태줄을 100 U/ml의 penicillin과 100 µg/ml의 streptomycin이 첨가된 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS로 태줄 외부의 혈액을 제거한 후 외부 양막을 벗기고 동맥 2개를 제거하였다. 남은 조직을 1 mm 크기로 자른 후 같은 부피의 0.5% crude type collagenase(Gibco)로 37°C에서 20~24시간 처리하였다. 이후 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS를 40배 첨가하여 실온에서 600×g로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 DMEM-LG로 2번 세척하였다. 분리된 세포를 100 U/ml penicillin, 0.1 µg/ml streptomycin, 3.7 mg/ml sodium bicarbonate, 그리고 10% FBS가 포함된 DMEM-LG에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하고, 1주에 2번 배양액을 교체하였다. 배양용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin과 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)가 첨가된 HBSS로 3분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 2×10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>의 농도로 배양하였다.

## 3. 태줄 유래 세포의 냉동 보존 및 해동

배양용기의 70~80% 정도로 자란 2~3번째 계대 배양의 태줄 유래 세포를 0.125% trypsin과 1 mM EDTA가 첨가된 HBSS로 3분간 처리하여 세포를 떼어낸 후 25% FBS와 10% DMSO가 첨가된 DMEM-LG에 1×10<sup>6</sup>/ml의 농도로 cryotube(Nunc)에 넣어준 후 -80°C에서 24시간 냉동 후 -196°C의 액체 질소로 옮겨 냉동 보존하였다. 6개월 후, 냉동 보존된 태줄 유래 세포를 37°C water bath에서 녹인 다음 15 ml tube로 옮긴 후 10% FBS가 포함된 DMEM-LG를 첨가하였다. 이를 300×g로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 다시 DMEM-LG로 2번 세척하였다. 0.4% trypan blue로 생존율을 확인하고 2×10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>의 농도로 배양하였다.

## 4. Total RNA 분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Cell pellet을 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS를 이용하여 세척하고 500 µl의 Tri-reagent(Sigma)를 첨가한 다음 manufacturer의 instruction에 따라 total RNA를 분리하였다. 5 µg의 RNA는 reaction buffer, 1 mM NTP mixture, 0.5 µg/µl oligo (d)T<sup>15</sup>, 20 U RNase inhibitor(Takara, Japan), 20 U M-MuLV reverse transcriptase(Fermentas)가 혼합된 20 µl 반응 용액

에서 역전사시켰다. 반응은 42°C에서 60분간 진행되었다. 얻어진 RT products(cDNAs)는 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Taq buffer, 0.25 U Taq polymerase(Fermentas), 10 pM의 sense와 antisense gene-specific primers가 혼합된 10 µl 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 1에 표기하였다. 반응 종결 후, PCR 생성물들은 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 40% sucrose가 포함된 6×loading buffer에 혼합한 다음 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하고 ultraviolet light를 이용하여 DNA의 영상을 얻었다.

## 5. 면역세포화학적 특성 분석

태줄 유래 세포를 8-well slide chamber(Nunc)에서 배양한 후 2% paraformaldehyde가 함유된 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS 용액을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 고정 후 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS로 5분간 3번 세척하였다. 그리고 실온에서 10분 동안 0.5% Triton X-100가 함유된 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS를 처리 후 세척한 다음 endogenous peroxidase의 활성을 제거하기 위하여 3% hydrogen peroxide(Dako)로 15분간 반응시킨 후 세척하였다. 2% bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 함유한 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS에서 실온으로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 각 SSEA-3(1:50; R&D System), SSEA-4(1:50; Chemicon), Thy-1(1:20; Chemicon), fibronectin(1:200; Novocastra), vimentin(1:100; Novocastra), CD44(1:500; Novocastra), CD54(1:40; Novocastra), vWF(1:200; Novocastra), HLA-1(1:200; Novocastra), HLA-DR(1:50; Novocastra) mouse monoclonal antibody를 4°C에서 17시간 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 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free DPBS로 세척하고 Mayer's Haematoxylin으로 대조 염색한 후 광학 현미경(LSM 410; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

**Table 1. Primer used for the RT-PCR analysis for stem cell specific markers**

Gene	Primer sequence	Size(bp)	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'			
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-4 $\alpha$	5'-gag cag gaa tgg gaa gaa tg -3'	205	62	NM_178849
	5'-ggc tgt cct ttg gga tga ag -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'			
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'			

## 결 과

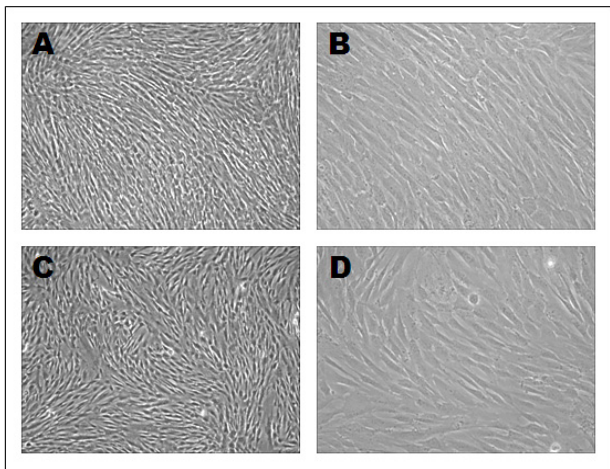
### 1. 냉동 전후 태줄 유래 세포의 형태 및 성장 분석

태줄 유래 세포는 섬유아세포와 유사한 방추사 모양을 나타냈다(Fig. 1 A, B). 계대 3번제의 태줄 유래 세포를 10% DMSO와 25% FBS가 첨가된 냉동 보존액에 넣어 6개월 동안 액체 질소에 보관한 후 해동하였을 때 세포의 모양은 냉동 전과 유사한 형태를 나타냈다(Fig. 1 C, D). 태줄 유래 세포의 냉동 보관 후 생존율은  $74.7 \pm 5.5\%$ 이었다. 냉동 보존 전후의 태줄 유래 세포의 성장 속도를 비교한 결과, 냉동보존

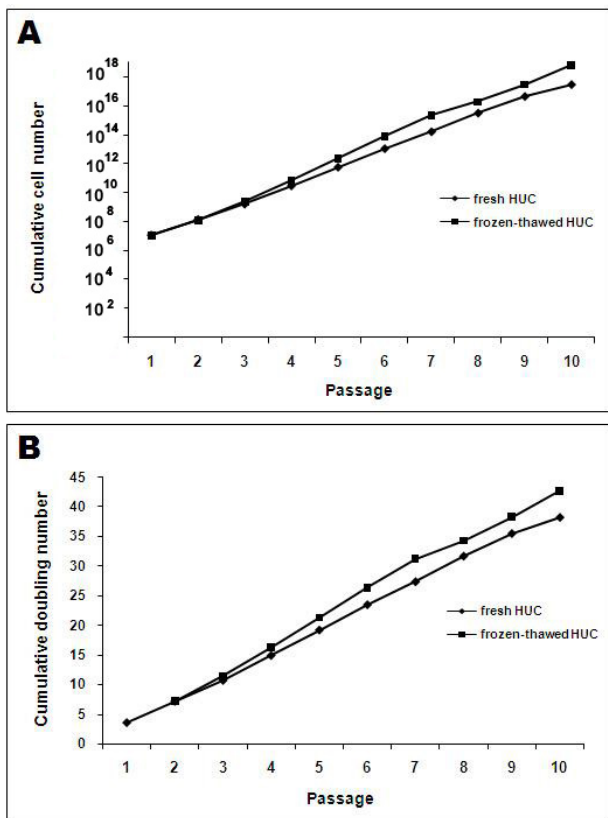
하기 전의 태줄 유래 세포는 체외에서 10번째 계대까지 배양되었으며, 38.2번 분열하여 총  $2.8 \times 10^{17}$ 의 세포를 얻었고, 냉동 후 해동하여 배양된 태줄 유래 세포 역시 체외에서 10번째 계대까지 배양되어 총 42.8번 분열하였으며,  $6.57 \times 10^{18}$ 의 세포를 얻었다(Fig. 2). 이러한 결과로 미루어 보아, 냉동 보존하기 전후 태줄 유래 세포의 형태적인 특성과 성장속도는 큰 차이가 없는 것으로 보인다.

### 2. 냉동 전후 태줄 유래 세포의 유전자 발현 분석

냉동 전후 태줄 유래 세포의 유전자 발현 양상을 살펴보기



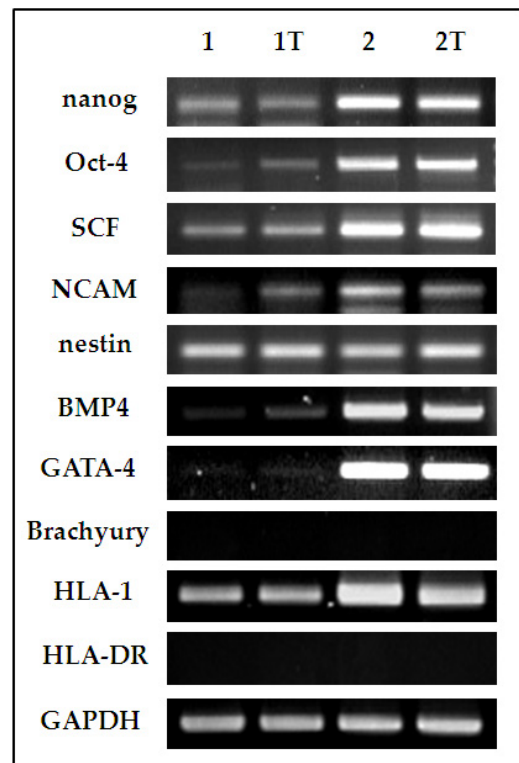
**Fig. 1. Morphology of fresh and frozen-thawed HUC.** A, B, fresh HUC at 3rd passage; C, D, frozen-thawed HUC at 3rd passage. A, C,  $\times 40$ ; B, D,  $\times 100$ .



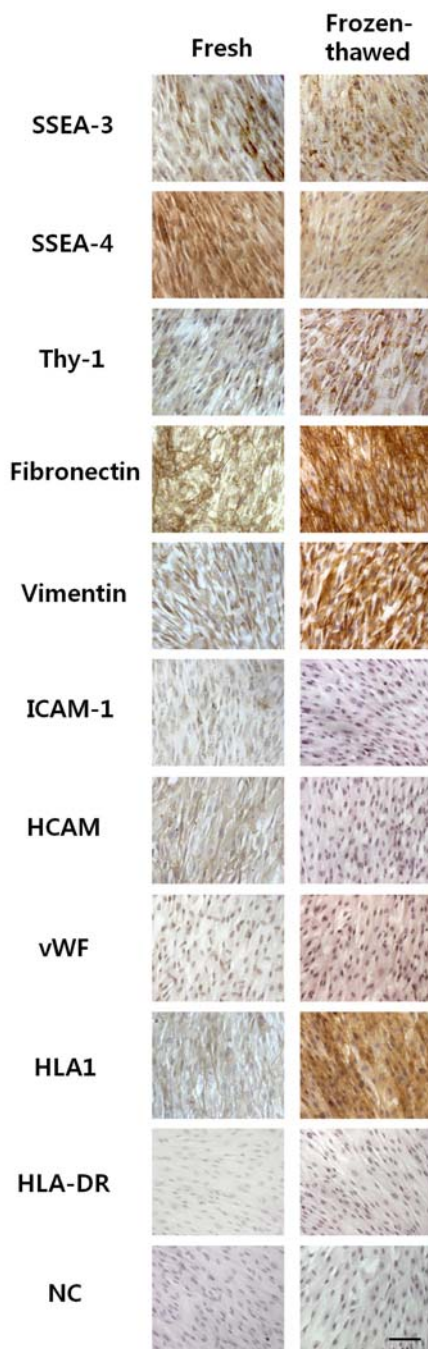
**Fig. 2. Cumulative cell number and doubling numbers of fresh and frozen-thawed HUC.** A, Cumulative cell number for fresh and frozen-thawed HUC throughout *ex vivo* expansion; B, Cumulative doubling numbers for fresh and frozen-thawed HUC during the same culture period.

위해 냉동하기 전 계대 5번째의 탯줄 유래 세포와 냉동 보존 후 계대 5번째 탯줄 유래 세포를 RT-PCR을 수행하였다. 두 개의 다른 탯줄 유래 세포 모두 냉동 전후에 배아줄기세포, 배아중양세포에서 발현하는 유전자인 nanog와 Oct-4, 배아중양세포, 조혈모세포, 중간엽 줄기세포에서 발현하는 유전자인 SCF(stem cell factor), 외배엽 세포에서 발현하는 NCAM (neural cell adhesion molecule)과 nestin, 중배엽 세포에서 발현하는 BMP-4, 내배엽 세포에서 발현하는 GATA-4, 조직 적합성복합체인 HLA-1 유전자를 발현하였다. 그리고 두 종류의 세포 모두 중배엽 marker 유전자인 Brachyury와 조직 적합성 복합체 HLA-DR은 냉동 전후 탯줄 유래 세포 모두에서 발현하지 않았다(Fig. 3).

3. 냉동 전 후 탯줄 유래 세포의 면역세포화학적 특성 분석  
냉동 전후의 탯줄 유래 세포를 면역세포 화학분석법을 통하여 단백질 발현을 분석한 결과, 배아줄기세포의 표지 물질로 알려진 SSEA-3, SSEA-4, 그리고 중간엽 줄기세포 표지



**Fig. 3. RT-PCR analysis of fresh and frozen-thawed HUC at 5th passage.** 1, 2, represent different cell lines; 1T, 2T, frozen-thawed each HUC line.



**Fig. 4. Immunocytochemical analysis of fresh and frozen-thawed HUC at 5th passage.** Fresh and frozen-thawed HUC exhibited immunoreactivity with antibodies against SSEA (stage-specific embryonic antigen)-3,-4, Thy-1(CD90), fibronectin, ICAM-1, HCAM, vWF(von Willebrand factor), and HLA-1. NC(negative control), cultured cells were incubated without primary antibody. Nuclei were stained with haematoxylin.  $\times 100$ .

물질인 Thy-1은 냉동 전 후의 탯줄 유래 세포에서 모두 발현하였다. 그러나 SSEA-4과 Thy-1은 냉동보존 후 배양된 탯줄 유래 세포에서 발현량이 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4). 또한, 세포 외 기질 단백질인 fibronectin과 세포골격 단백질인 vimentin, 조직적합성 복합체 항원인 HLA-1 역시 냉동 보존 전 후의 탯줄 유래 세포에서 모두 발현하였지만, 냉동 보존 후 배양된 탯줄 유래 세포에서 발현량이 증가하였다. 그러나 세포연접 물질인 CD44(homing cell adhesion molecule, HCAM), CD54(intracellular cell adhesion molecule, ICAM-1)은 냉동 보존 후 배양되었을 때 감소되었다. 내피세포에서 발현하는 vWF는 냉동 보존 전과 후 모두 약하게 발현되었으며, 조직적합성 복합체 항원인 HLA-DR은 냉동보존 전 후 탯줄 유래 세포 모두에서 발현하지 않았다.

## 고찰

탯줄은 혈관 및 중간엽 결합 조직과 배아결합조직으로 구성되며(Troyer & Weiss, 2008), 탯줄에서 분리된 줄기세포는 골수나 제대혈에서 유래한 중간엽 줄기세포와 유사한 특성을 가진다. 또한 탯줄 유래 줄기세포는 체외배양 시 골수나 지방 유래 줄기세포보다 population doubling time(PDT)이 짧고 분열능력이 뛰어나, 보다 많은 수의 세포를 얻을 수 있어 지방이나 골수에서 유래된 줄기세포보다 덜 분화된 세포로 여겨지기 때문에 세포치료에 사용하는데 용이할 것으로 기대된다(Bieback et al., 2004, Kern et al., 2006, Baksh et al., 2007, Lund et al., 2007). 그러나 중간엽 줄기세포의 증식률과 분화 능력은 체외에서 계대 배양하는 횟수가 증가할수록 감소하기 때문에 오랜 기간 배양하기 어렵기 때문에(Izadpanah et al., 2008), 임상적으로 사용하기 위해서는 이들을 보존하는 방법이 필요하며, 냉동 보존법은 중요한 방법이 될 수 있다.

조직이나 세포를 냉동 보존하는 방법은 1700년대부터 사용되어 왔으며, 세포를 가사상태(suspended animation)로 보관하였다. 1900년대에 냉동보존법은 점점 발전하였으며, 냉동배양액에 동결방지제를 첨가하는 방법을 개발하였고, 이로 인해 냉동보존법은 정자, 배아, 다양한 조직과 세포를 보관하는 방법으로 보편적으로 사용되고 있다. 세포를 얼리기 전에는 반드시 DMSO나 glycerol과 같은 동결방지제를 처리해야 하며, 이들은 냉동과정에서 세포를 보호하고 세포막 항



상성을 유지하도록 도와준다. 하지만, 이와는 반대로 냉동배양액에 DMSO를 첨가하는 것은 세포독성이 있을 뿐 아니라 신경세포(Chu et al., 2004)나 심근세포(Young et al., 2004)로 분화를 유도한다는 보고도 있다. 다른 연구자들은 줄기세포를 냉동 보존할 때 DMSO 대신에 trehalose와 같은 동결방지제를 첨가하기도 하였다(Buchanan et al., 2004).

본 연구에서는 동결방지제로 DMSO를 첨가하여 탯줄 유래 세포를 동결보존한 후 해동시켜 성장속도와 유전자 및 단백질 발현 변화를 살펴보았다. 25% FBS와 10% DMSO가 첨가된 냉동보존액에 넣어 액체질소에 6개월 동안 보관한 후 해동시킨 결과, 형태 변화 없이 냉동 전의 탯줄 유래 줄기세포와 유사한 형태를 유지하였다. 체외에서 증식을 또한 냉동 전의 탯줄 유래 세포와 같이 계대 10번까지 배양이 가능했고, 분열횟수는 냉동 전후 각각 38번, 42번으로 조금 더 많이 분열한 것을 관찰하였다. RT-PCR을 통해 냉동 보존 전후 유전자 발현을 분석한 결과, 세포 line에 따라 발현량의 변화가 있는 세포도 있긴 하였지만 모두 Oct-4, nanog, SCF를 포함한 배아 줄기세포나 중간엽 줄기세포에서 발현하는 줄기세포 관련 유전자들이 모두 발현하였으며, NCAM, GATA-4, BMP-4, HLA-1 또한 모두 발현하였다. 단백질 발현에서도 SSEA-3, -4, Thy-1를 포함한 줄기세포 표지 단백질이 냉동 전후 세포에서 발현하였지만, 그 발현량의 증가 및 감소를 나타내는 단백질도 있었다. 이처럼 냉동 보존 전 후의 탯줄 유래 세포의 모양과 성장속도, 유전자와 단백질 발현 양상이 유사한 것으로 보아 냉동 보존한 후에도 탯줄 유래 세포는 그들의 고유한 특성을 가지고 있는 것으로 보인다.

GATA-4는 zinc-finger family의 속하는 전사인자 중의 하나로, 심장에서 특이적으로 발현되며(Grepin et al., 1997), nestin은 신경줄기세포와 근육 및 심장근육 등의 세포에서도 발현되는 유전자이다(Sjogerg et al., 1994). BMP-4의 경우 골 형성뿐 아니라 연골의 재생과 생성에 중요한 역할을 한다(Kuroda et al., 2006). 따라서 분화를 시키지 않은 냉동 전후의 제대 유래 줄기세포에서 이들 유전자를 발현한다는 점은 제대 유래 줄기세포가 심근세포를 포함한 중배엽성 기원의 세포와 신경세포로 분화할 수 있는 가능성을 제시한다.

세포 생존율은 냉동보존 후 해동시킨 세포에서 가장 중요한 요소로, 높은 생존율은 세포들이 얼음 크리스탈 형성이나 온도의 급격한 변화와 동결방지제의 세포독성과 같은 냉동 보존 후 발생할 수 있는 세포 내 손상으로부터 보호되었다는

것을 의미한다. 이번 연구에서는 탯줄 유래 세포를 6개월 동안 냉동보존한 후 해동시켜 배양하였을 경우 74%의 생존율을 보였다. 이 수치는 골수 유래 줄기세포(Kotobuki et al., 2005)나 제대혈(Lee et al., 2005)을 냉동보존한 후 얻은 세포의 생존율에 비해 적은 수치이나, 냉동 보존법의 차이에 의한 가능성을 배제할 수 없다. 그럼에도 불구하고, 냉동 보존한 후 세포들의 성장속도가 냉동 보존하기 전의 세포보다 조금 더 빨랐으며, 이들의 유전자 및 단백질 발현 양상에도 큰 변화가 나타나지 않았다. 하지만 제대 유래 줄기세포를 효과적으로 임상 사용을 하기 위해서는 더 높은 생존율을 얻을 수 있는 냉동배양액 및 보존방법의 개발이 필요할 것으로 보이며, 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 본 연구에서는 냉동보존한 후 줄기세포의 분화능력에 대한 조사가 이루어지지 않았기 때문에 냉동보존 전후의 분화능력의 변화에 대한 실험이 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론적으로, 탯줄 유래 세포를 냉동보존하였을 때 세포의 특성 변화 없이 보존되었다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 임상적으로 사용할 수 있는 세포의 수나 시간을 맞추는데 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 2008학년도 서울여자대학교 교내학술특별연구비의 지원을 받아 작성되었습니다.

## 인용문헌

- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50:1691-1697.
- Baksh D, Yao R, Tuan RS (2007) Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25:1384-1392.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22:625-634.
- Bilic G, Ochsencin-Kolble N, Hall H, Huch R, Zimmer-

- mann R (2004) *In vitro* lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Am J Obstet Gynecol* 190:87-92.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294.
- Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW (2004) Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells Dev* 13:295-305.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396-2402.
- Chu Q, Wang Y, Fu X, Zhang S (2004) Mechanism of *in vitro* differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 24:259-261.
- Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, Shih YH, Ko MH, Sung MS (2006) Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: potential therapeutic application of Parkinsonism. *Stem Cells* 24: 115-124.
- 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.
- Grepin C, Nemer G, Nemer M (1997) Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 124:2387-2395.
- Hu Y, Liao L, Wnag Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC (2003) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* 141: 342-349.
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunnell BA (2008) Long-term *in vitro* expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68:4229-4238.
- Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA (2001) Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10716-10721.
- 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* 24:1294-1301.
- Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muriki K, Takakura Y, Ohgushi H (2005) Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Engineering* 11:663-673.
- Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T, Cummins J, Fu FH, Huard J (2006) Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum.* 54:433-442.
- Lee MW, Yang MS, Park JS, Kim HC, Kim YJ, Choi J (2005) Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Int J Hematol* 81:126-130.
- Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK (2007) Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* 25:602-611.
- Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Lim HJ, Kim HK (2008) Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod* 23:1760-1770.
- Mueller SM, Glowacki J (2001) Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 82:583-590.
- 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.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
- 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.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells *J Clin Invest* 109:1291-1302.
- Sjoberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T (1994) Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp Cell Res* 214:447-458.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33:919-926.
- Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M (1993) Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta* 14:235-245.
- Troyer DL, Weiss ML (2008) Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells* 26:591-599.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC (2004) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330-1337.
- Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D (2006) Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 24:781-792.
- Young DA, Gavrilov S, Pennington CJ, Nuttall RK, Edwards DR, Kitsis RN, Clark IM (2004) Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 24:759-765.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, 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.

---

(received 4 October 2008, received in revised form 11 November 2008; accepted 12 November 2008)