



**2001 6**

---

---

---

---

---

, 가

,

,

.

.

가

가

,

,

,

.

	.....	1
I.	.....	3
II.	.....	5
1.	.....	5
2.	.....	5
3. 034	.....	5
4.	.....	6
5. 034	.....	6
6.	.....	7
7.	.....	7
III.	.....	8
1.	034 .....	8
2.	.....	9
3.	034 .....	10
4.	가 .....	11
5. 3	2 .....	14
6. TPO	.....	15
7.	.....	16
8.	.....	16
IV.	.....	18
V.	.....	22
	.....	24
	.....	28

Fig. 1. FACS analysis of mononuclear cells isolated from cord blood .....	10
Fig. 2. FACS analysis of CD34+ cells isolated from cord blood .....	11
Fig. 3. Mean numbers of suspension cells after 6 day expansion of CD34+ cells under the conditions of various cytokine combinations .....	12
Fig. 4. Mean numbers of adherent cells obtained from primary culture ....	13
Fig. 5. Mean numbers of suspension cells obtained from the culture with or without TPO in the presence of VEGF, IL-1 $\beta$ , FGF-b, SCF and FL in 24 well microplate .....	16
Fig. 6. FACS analysis of endothelial cells cultured from CD34+ cells for 4 weeks .....	17
Fig. 7. The morphology of cord blood derived adherent cells at the day of 0(A), 7(B), and 28(C) of <i>in vitro</i> culture .....	17

Table 1. Numbers of total mononuclear cells and CD34+ cells isolated from cord blood .....	8
Table 2. Expression of surface markers on total mononuclear cells and CD34+ fraction isolated from cord blood .....	9
Table 3. Numbers of suspension cells in 96 well microplate after 6 day expansion of CD34+ cells under the conditions of various cytokine combinations .....	12
Table 4. Numbers of adherent cells obtained from primary culture .....	13
Table 5. Numbers of adherent cells obtained from secondary culture .....	14
Table 6. Comparison of cell counts obtained from the culture with or without TPO in 24 well microplate .....	15

“ ”

가

,

endothelial growth factor(VEGF), vascular endothelial growth factor-basic(FGF-b) interleukin- 1β(IL- 1β) fibroblast growth factor, thrombopoietin(TPO)

18 Ficoll-Hypaque MACS system(Miltenyl Biotech, Auburn, CA, USA) CD34 CD34

0.32% 84.04% . CD34

CD38 0.05%, CD34 7.44% , AC133

Flk- 1/KDR 0.15%, CD34 1.73%

. CD34 가 ,

VEGF, IL- 1β, FGF-b stem cell factor flt3-ligand TPO 가

가 가 가 ,

TPO 가 가 TPO 가

TPO가

(p<0.05, Wilcoxon rank sum test). 3

가

, 3 가 (repopulation)

. CD34 4

KDR CD31 CD62E CD34 CD117 CXCR-4

가

cord-like structure cobblestone



, 가 .  
CD34

, TPO가 .

---

: , , , thrombopoietin

< >

I.

“ ”

가

(endothelial progenitor cell)

<sup>1-3</sup>

(angiogenesis)

(vasculo- genesis)

가 ,

(hematopoietic stem

cell) CD34 fetal liver kinase-1(Flk-1)/KDR, Tie-1, Tie-2

<sup>4-6</sup>

1-3%

0.001-0.1%

,<sup>7,8</sup>

1%

1997 Asahara <sup>4</sup>

가

가



## II.

1.

2000 5 12 18

가

CPDA-1 25 mL ( , )

2.

Hank's balanced salt solution(HBSS)(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 4 , Ficoll-Hypaque(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 900 x g 20

HBSS 2 hemocyto- meter

0.5% bovine serum albumin(BSA) phosphate- buffered saline(PBS), pH 7.4(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO USA)

3. CD34

CD34 high-grade magnetic field mini-MACS column(Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) superparamagnetic microbead

0.5% BSA-PBS, 5 mM EDTA 300  $\mu$ L  $10^8$

,  $10^8$  100  $\mu$ L Fc (

) 가 15 PBS, 5 mM EDTA 1

$10^8$  100  $\mu$ L 가 -CD34 가 15

MACS column

, PBS, 5mMEDTA 1 PBS, 0.5% BSA 1  
500  $\mu$ L PBS, 0.5% BSA 30  $\mu$ m

가

CD34

CD34

1 mM PBS, 5 mM EDTA 가

2

4.

MACS column

CD34

CD34-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

CD38-PE (Becton Dickinson), CD34-FITC CD117-PE (Pharmingen, San Diego, CA, USA) (Becton Dickinson),

KDR-FITC (Sigma Chemical Co.) AC133-PE (Miltenyi Biotec), CD31-FITC (Pharmingen) CD62E-PE (Pharmingen), CD34-FITC CXCR4-PE (Pharmingen)

IgM IgG IgG<sub>a</sub>

WnMDI (version 2.8) (Scripps

research institute, La Jolla, CA, USA)

5. CD34

CD34

$2 \times 10^5/\text{mL}$

, 20% fetal calf serum

가 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)

가 24 well 1 mL 96 well microplate 100  $\mu\text{L}$ ,

microplate fibronectin 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  20°C 2

VEGF (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 10 ng/mL, IL-1 $\beta$  (BD Biosciences) 10 ng/mL fibroblast growth factor-basic (FGF-b) (Leinco Tech., St. Louis, MO, USA) 5 ng/mL, stem cell factor (SCF) (Endogen, Woburn, MA, USA) 10 ng/mL, flt3-ligand (FL) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) 10 ng/mL thrombopoietin (TPO) (PeproTech Inc.) 5 ng/mL

가 가  
3  
1 fibro- nectin microplate

6.  
Fibronectin 20°C 2 24-well microplate VEGF 10 ng/mL,  
IL-1β 10 units/mL, FGF-b 5 ng/mL, SCF 10 ng/mL FL 10 ng/mL TPO 가  
3  
fibronectin microplate ,  
가 3 가

6  
VEGF 10 ng/mL, IL-1β 10 units/mL, FGF-b 5 ng/mL

3  
, 12 PBS 1 mm<sup>2</sup>  
80%  
0.25% trypsin, EDTA (Gibco-BRL) 가  
1 6 well  
75 cm<sup>2</sup>  
4 PBS, 5 mM

EDTA 15-20 ,

(inverted microscope)(Olympus Optical Co., LTD., Tokyo, Japan)

7.

SPSS for windows release 8.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

Wilcoxon rank sum test , p 0.05

### III.

1. CD34  
 $1.34(\pm 0.43) \times 10^8$  , MCS system  
 CD34  $4.22(\pm 2.46) \times 10^5$  0.32% (Table 1).

Table 1. Numbers of total mononuclear cells and CD34+ cells isolated from cord bloods

Cord blood	MNCs <sup>1</sup> (x 10 <sup>8</sup> )	CD34+ cells (x 10 <sup>5</sup> )
1	2.2	4.6
2	1.4	5.6
3	1.0	2.8
4	1.3	3.6
5	1.0	2.2
6	1.0	6.5
7	1.3	2.4
8	1.0	2.7
9	1.7	1.0
10	2.3	4.1
11	1.1	8.0
12	0.9	2.0
13	1.8	1.0
14	1.3	5.5
15	1.5	4.2
16	1.6	9.4
17	0.9	2.6
18	0.9	7.8
Mean ± SD	1.34 ± 0.43	4.22 ± 2.46

<sup>1</sup>: mononuclear cells

2.

CD84 0.65% , CD84  
 CD88 (primitive stem cell) 0.05% .  
 AC133 0.61% CD84  
 AC133 KDR 0.15% (Table 2, Fig. 1).

Table 2. Expressions of surface markers on total mononuclear cells and CD34+ fraction isolated from cord bloods (n=7)

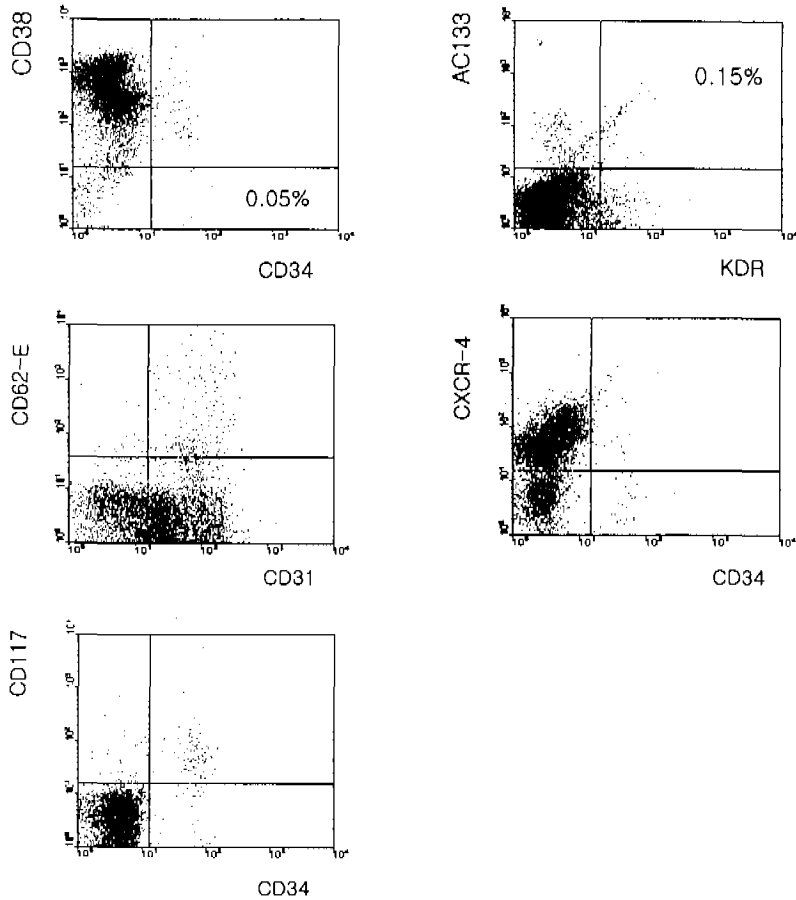
Surface markers	% of positivity (Mean ± SD)	
	mononuclear cells	CD34 selected cells <sup>3</sup>
CD34+	0.65 ± 0.19	84.04 ± 6.89
CD38+	95.20 ± 1.94	89.65 ± 4.66
CD34+, CD38+	0.63 ± 0.35	76.60 ± 7.49
CD34+, CD38 <sup>-1</sup>	0.05 ± 0.05	7.44 ± 0.73
CXCR4+	4.10 ± 2.38	4.55 ± 1.95
CD31+	70.99 ± 12.7	88.37 ± 4.81
CD62E+	2.69 ± 1.73	35.18 ± 3.82
CD117+	4.34 ± 1.78	47.26 ± 14.9
AC133+	0.61 ± 0.25	82.27 ± 10.8
KDR+	0.18 ± 0.06	2.02 ± 1.55
AC133+, KDR <sup>+2</sup>	0.15 ± 0.08	1.73 ± 0.70

<sup>1</sup>: surface markers for primitive stem cells.

<sup>2</sup>: surface markers for endothelial progenitor cells.

<sup>3</sup>: CD34+ fraction isolated by MACS system

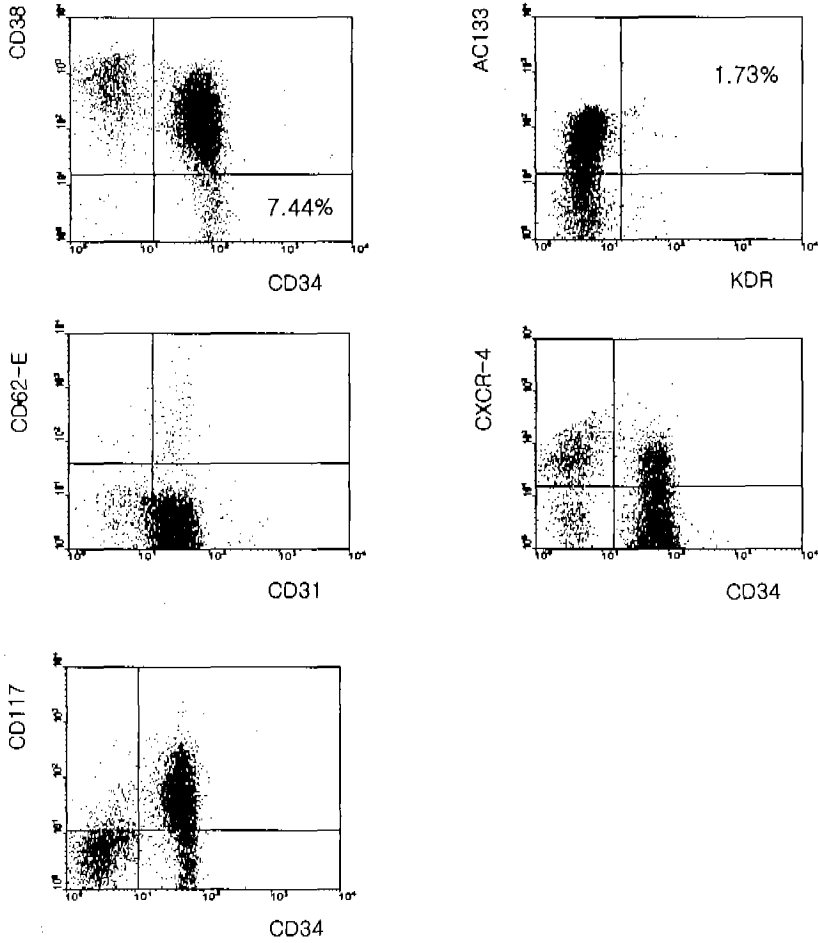




**Fig. 1.** FACS analysis of mononuclear cells isolated from cord bloods. Mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation method using Ficoll-Hypaque. Percentage of positive cells were analyzed by two-color flow cytometry and compared to isotype control. CD34+/CD38- and AC133+/KDR+ cells, considered as primitive stem cells and endothelial progenitor cells, were 0.05% and 0.15% of mononuclear cells, respectively.

### 3. 제대혈에서 분리한 CD34 양성 세포의 순수도 및 표지자 분석

MACS system을 통하여 분리된 CD34 양성 세포의 순수도는 평균 84.04%이었으며, 이 중 CD34 양성이면서 CD38 음성인 원시조혈모세포는 평균 7.44%이었다. AC133 양성 세포는 평균 82.27%로 CD34 양성 세포의 비율과 비슷하였다. AC133과 KDR 모두 양성인 내피기원세포는 평균 1.73%이었다(Table 2, Fig. 2).



**Fig. 2.** FACS analysis of CD34+ cells isolated from cord bloods. CD34+ cells were isolated from cord blood MNCs using MACS system. Percentage of positive cells were analyzed by two-color flow cytometry and compared to isotype control. CD34+/CD38- and AC133+/KDR+ cells, considered as primitive stem cells and endothelial progenitor cells, were 7.44% and 1.73% of CD34+ cells, respectively.

#### 4. 다양한 사이토카인 조합에서 부유 세포 및 부착 세포 증가 비교

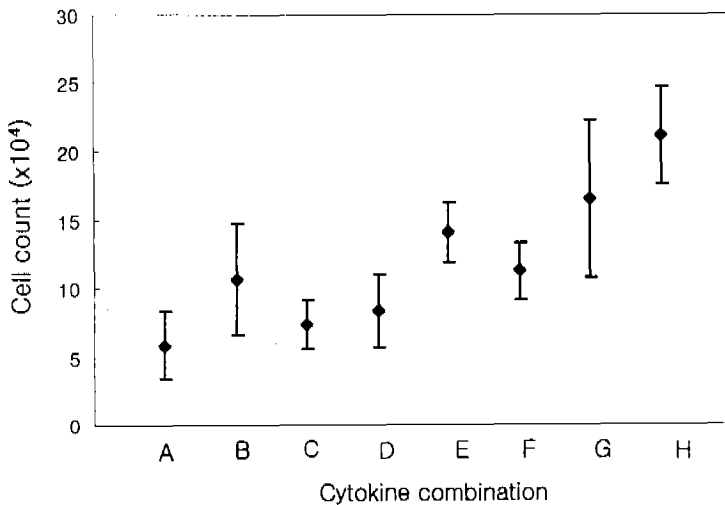
기본 사이토카인 조합인 VEGF, IL-1 $\beta$ , FGF-b만 첨가하여 6일간 배양하였을 때 부유 세포수는  $5.9 \times 10^4$ 개로 배양 전  $2 \times 10^4$ 개보다 2.9배 증폭되었으며, 기본 조합에 SCF를 첨가한 경우에는  $10.7 \times 10^4$ 개로 5.4배, FL은 3.7배, TPO는 4.2배 증폭되었다. SCF와 FL 두가지를 첨가한 경우에는 7.1배, FL와 TPO는 5.7배, SCF와 TPO는 8.3배 증폭되었고, SCF와 FL 및 TPO를 모두 첨가한 경우에는 배양 전보다 10.6배까지 증폭되었다(Table 3, Fig. 3).

**Table 3.** Numbers of suspension cells in 96 well microplate after 6 day expansion of CD34+ cells under the conditions of various cytokine combinations

No	Cytokine combinations							
	Basic(B) <sup>1</sup>	B+SCF	B+FL	B+TPO	B+SCF, FL	B+SCF, TPO	B+FL, TPO	B+SCF, TPO, FL
1	4.0 <sup>2</sup>	8.7	8.5	8.7	16.3	10.0	27.5	19.0
2	6.0	16.0	8.0	12.0	14.9	13.0	18.0	26.5
3	5.3	11.0	10.0	6.0	13.7	11.2	12.0	17.2
4	3.7	8.0	5.8	12.0	11.3	8.8	10.5	24.2
5	8.0	15.0	4.9	6.5	13.8	10.4	13.0	19.3
6	10.2	12.0	8.5	8.3	17.2	15.0	16.7	23.8
7	3.8	4.3	6.1	5.6	11.5	10.9	17.5	18.0
Mean	5.9	10.7	7.4	8.4	14.1	11.3	16.5	21.1
SD	2.5	4.1	1.8	2.7	2.2	2.1	5.7	3.6

<sup>1</sup>: VEGF + IL-1 $\beta$  + FGF-b.

<sup>2</sup>: total cell number ( $\times 10^4$ ).



**Fig. 3.** Mean numbers of suspension cells after 6 day expansion of CD34+ cells under the conditions of various cytokine combinations in 96 well microplate(n=7). Each dot and line represent mean cell count and standard deviation, respectively. A, cell count when culture was performed with the basic cytokine combination (VEGF+IL-1 $\beta$  + FGF-b); B, cell count with the basic(B)+SCF; C, cell count with B+FL; D, cell count with B+TPO; E, cell count with B+SCF and FL; F, cell count with B+SCF and TPO; G, cell count with B+FL and TPO; H, cell count with B+SCF, FL and TPO.

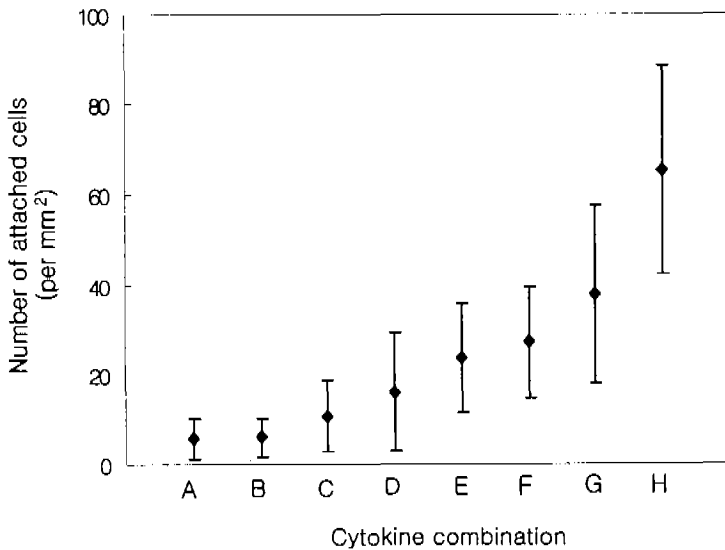
**Table 4.** Numbers of adherent cells obtained from primary culture<sup>1</sup>

No	Cytokine combinations							
	Basic(B) <sup>2</sup>	B+SCF	B+FL	B+TPO	B+ SCF, FL	B+ SCF, TPO	B+ FL, TPO	B+ SCF, TPO, FL
1	11.0 <sup>3</sup>	15.0	10.0	17.0	15.0	36.0	33.0	75.0
2	9.0	4.0	26.0	15.0	17.0	15.0	55.0	75.0
3	11.0	5.0	15.0	4.0	10.0	24.0	30.0	40.0
4	2.0	2.0	8.0	22.0	15.0	17.0	15.0	30.0
5	3.0	6.0	3.0	41.0	37.0	40.0	70.0	95.0
6	1.0	4.0	9.0	2.0	31.0	15.0	17.0	63.0
7	2.0	6.0	4.0	10.0	40.0	43.0	50.0	80.0
Mean	5.6	6.0	10.7	15.9	23.6	27.1	37.9	65.4
SD	4.5	4.2	7.8	13.2	12.1	12.3	19.9	23.1

<sup>1</sup>: adherent cells were counted at the 12th day of culture.

<sup>2</sup>: VEGF + IL-1 $\beta$  + FGF-b.

<sup>3</sup>: cell number per mm<sup>2</sup>.



**Fig. 4.** Mean numbers of adherent cells obtained from primary culture. Each dot and line represent mean cell count and standard deviation, respectively. A, cell count when culture was performed with the basic cytokine combination (VEGF+IL-1 $\beta$ +FGF-b); B, cell count with the basic (B)+SCF; C, cell count with B+FL; D, cell count with B+TPO; E, cell count with B+SCF and FL; F, cell count with B+SCF and TPO; G, cell count with B+FL and TPO; H, cell count with B+SCF, FL and TPO.

부착 세포의 경우 기본 조합에서는 mm<sup>2</sup> 당 5.6개가 관찰되었으며, SCF를 첨가한 경우에는 6.0개, FL은 10.7개, TPO는 15.9개였고, SCF와 FL을 첨가한 경우에는 23.6개, FL과 TPO는 27.1개, SCF와 TPO는 37.9개였다. SCF와 FL 및 TPO를 모두 첨가한 경우에는 65.4개로 기본 조합에 SCF와 TPO 및 FL을 모두 첨가하였을 때 내피세포의 특징을 가지는 부착 세포가 가장 많이 관찰되었다(Table 4, Fig. 4).

### 5. 3일간 배양된 조혈모세포로부터 2차 배양된 세포의 증식은

3일간 배양된 비부착 세포 중 내피기원세포가 잔존하였거나 자기 갱신에 의해 증폭되었을 가능성을 조사하기 위하여 비부착 세포를 회수하여 1차 배양과 동일한 조건으로 3일간 배양을 실시한 결과 이들로부터 다시 부착 세포가 형성되는 것을 확인하였으며(Table 5), 회수된 세포수는 1차 배양 때보다는 적었지만 그 양상은 유사하였다. 즉, VEGF, IL-1 $\beta$  및 FGF-b의 기본 조합으로만 배양한 경우 회수된 부착 세포수 1로 하였을 때, 기본 조합에 SCF를 더 첨가한 경우 1.2, FL은 3.0, TPO는 2.2이었으며, SCF와 FL을 첨가한 경우에는 3.1, FL과 TPO는 4.7, SCF와 TPO는 4.3이었다. SCF와 FL 및 TPO를 모두 첨가한 경우에는

Table 5. Numbers of adherent cells obtained from secondary culture<sup>1</sup>

No	Cytokine combinations							
	Basic(B) <sup>2</sup>	B+SCF	B+FL	B+TPO	B+SCF, FL	B+SCF, TPO	B+FL, TPO	B+SCF, TPO, FL
1	8.0 <sup>3</sup>	12.0	4.0	7.0	6.0	13.0	21.0	52.0
2	1.0	4.0	7.0	3.0	10.0	32.0	30.0	46.0
3	6.0	3.0	11.0	4.0	17.0	15.0	5.0	22.0
4	3.0	4.0	24.0	15.0	17.0	15.0	22.0	29.0
5	6.0	5.0	15.0	4.0	10.0	24.0	15.0	19.0
6	1.0	3.0	15.0	6.0	11.0	16.0	13.0	31.0
7	3.0	2.0	8.0	22.0	15.0	17.0	15.0	33.0
Mean	4.0	4.7	12.0	8.7	12.3	18.9	17.3	33.1
SD	2.7	3.4	6.7	7.1	4.2	6.8	7.9	12.0

<sup>1</sup>: after 1st 3-day culture, collected and recultured the suspension cells in the presence of indicated cytokine combinations for additional 3 days.

<sup>2</sup>: VEGF + IL-1 $\beta$  + FGF-b.

<sup>3</sup>: cell number per mm<sup>2</sup>.

8.3으로 역시 기본 조합에 SCF와 TPO 및 FL을 모두 첨가하였을 때 부착 세포가 가장 많이 회수되었다.

### 6. TPO에 의한 내피기원세포 증식 효과

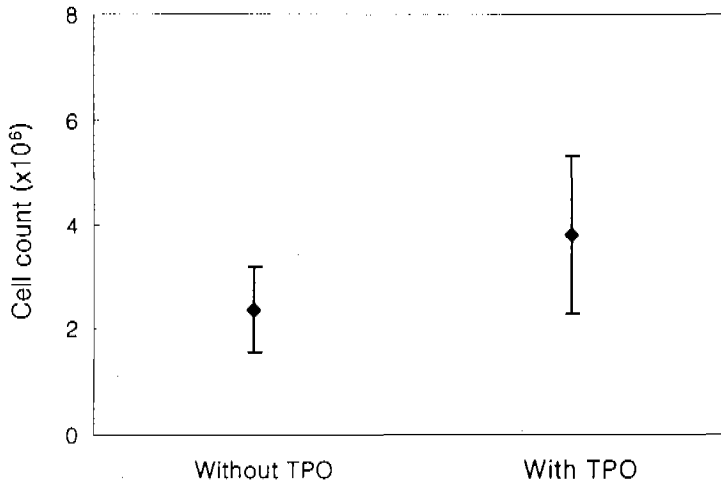
VEGF와 IL-1 $\beta$ , FL, SCF 및 FGF-b이 모두 존재하는 상태에서 TPO 첨가 여부에 따른 내피기원세포의 증식 효과를 관찰하기 위해  $2 \times 10^5$ 개의 CD34 양성 세포를 24 well microplate에서 6일간 배양한 후 증식된 세포수를 비교한 결과, TPO를 첨가하였을 때 증식된 부유 세포수가 통계적으로 유의하게 높았다( $p=0.0341$ , Wilcoxon rank sum test)(Table 6, Fig. 5).

**Table 6.** Comparison of cell counts obtained from the culture with or without TPO in 24 well microplate<sup>1</sup>

No	Without TPO	With TPO
1	3.69 <sup>2</sup>	6.12
2	1.65	3.54
3	1.47	1.80
4	2.00	2.42
5	3.44	4.76
6	1.55	3.48
7	2.51	5.97
8	2.15	2.90
9	2.76	3.00
Mean	2.36	3.78
SD	0.81	1.52

<sup>1</sup>: to evaluate the effect of TPO, CD34+ cells were cultured for 6 days with or without TPO in the presence of VEGF, IL-1 $\beta$ , FGF-b, SCF and FL.

<sup>2</sup>: cell number ( $\times 10^6$ ).



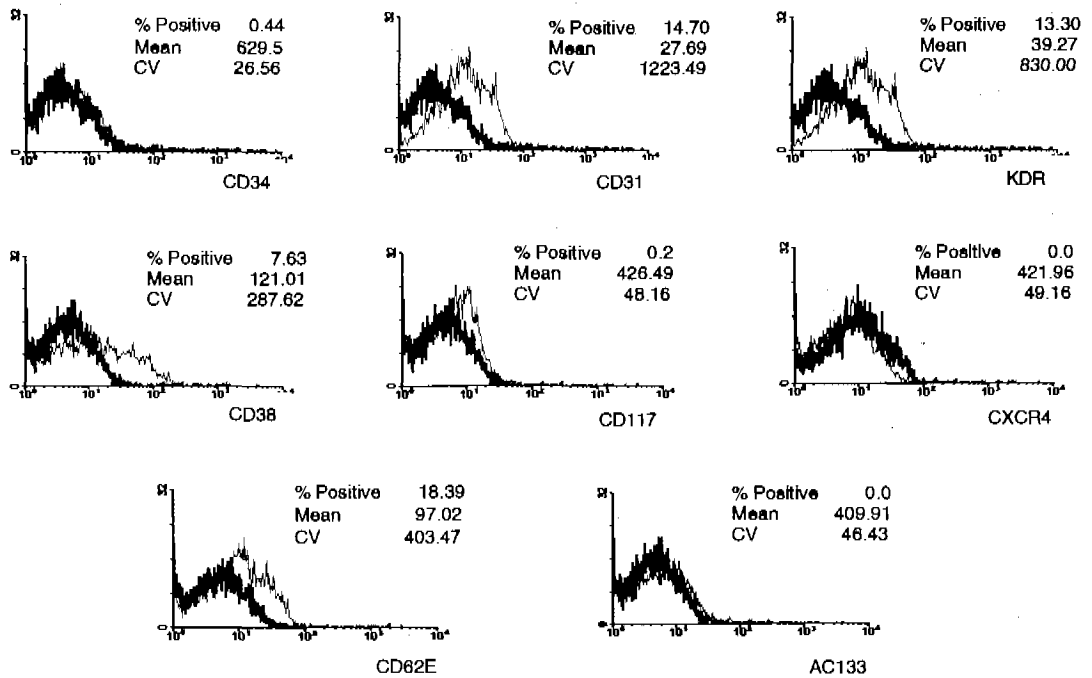
**Fig. 5.** Mean numbers of suspension cells obtained from the culture with or without TPO in the presence of VEGF, IL-1 $\beta$ , FGF-b, SCF and FL in 24 well microplate(n=9). Each dot and line represent mean cell count and standard deviation, respectively. The addition of TPO significantly increased the numbers of suspension cells ( $p < 0.05$ , Wilcoxon rank sum test).

### 7. 내피기원세포로부터 분화된 내피세포의 표지자 분석

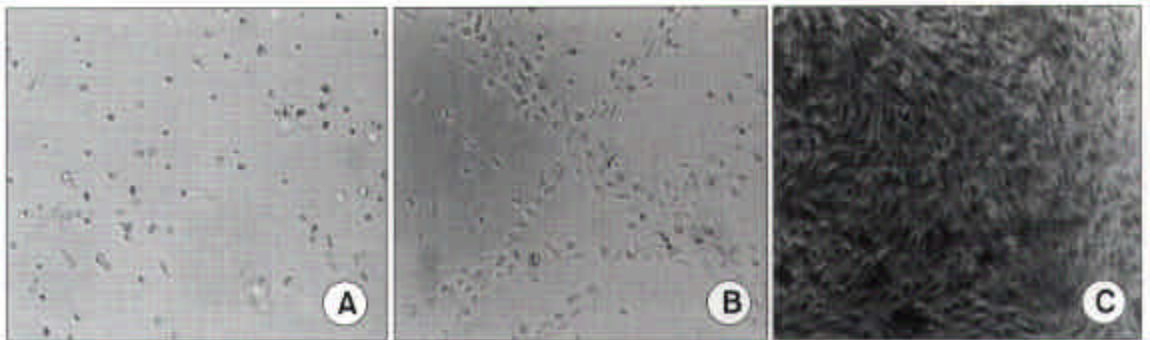
CD34 양성 세포로부터 4주간 배양된 부착 세포 중 유세포분석기로 분석이 가능하였던 1예의 표지자 분석 결과, KDR은 배양 전 2.2%에서 배양 후 13.3%로 발현 정도가 증가되었으나, CD31은 88.4%에서 14.7%로 감소되었다. 조혈모세포 표지 인자인 CD34와 AC133의 경우 배양 전 각각 84.0%와 82.3%이었으나, 4주 배양 후 0.4%와 0.0%로 거의 발현되지 않았다. CD62E는 35.2%에서 18.4%로 감소되었으며, CXCR4는 4.6%에서 0.0%로 감소되었다(Fig. 6).

### 8. 배양 시기에 따른 부착 세포의 형태 변화

CD34 양성 세포 배양 24시간 이내에 방추형의 부착 세포가 관찰되었으며, 배양 3일경에는 이러한 세포들이 작은 군집을 형성하였다. 배양 1주부터는 초기 맥관형성 과정에서 관찰되는 형태와 비슷한 cord-like structure를 이루면서 증식하였고 배양 4주경에는 내피세포의 특징적인 형태인 cobblestone 모양을 보였다(Fig. 7).



**Fig. 6.** FACS analysis of endothelial cells cultured from CD34+ cells for 4 weeks. The black line identifies the cells labeled with isotype control and the red line identifies cells labeled with antibody for the surface marker indicated below each graph. Cultured cells were positive for KDR, CD31 and CD62E, but negative for CD34, AC133 and CXCR4 (cut off, 10%).



**Fig. 7.** The morphology of cord blood derived adherent cells at the day of 0(A), 7(B), and 28(C) of *in vitro* culture. A, small, round cells at the time of seeding; B, cord-like structure resembling the first stages of vasculogenesis; C, characteristic endothelial cobblestone colonies (Unstained; magnification,  $\times 100$ ).



## IV. 고 찰

종양 발생이 혈관형성과 밀접한 관련이 있음이 밝혀지고,<sup>10</sup> 죽상경화성 심장질환 및 다른 허혈성질환 치료에 혈관성장인자를 이용하려는 노력이 시도되면서 혈관신생의 개념이 여러 질병의 병인 기전 이해 및 치료에 활발히 적용되기 시작하였다.<sup>3,11-13</sup>

혈관신생(neovascularization)은 기존의 미세혈관으로부터 새로운 모세혈관이 생성되는 과정으로 혈관형성과 맥관형성을 모두 포함한다. 이 중 혈관형성은 기존의 혈관으로부터 유래된 내피세포가 증식하고 이동한 후 재배열되어 맥관을 형성하는 과정을, 맥관형성은 내피기원세포로부터 태아 혈관이 형성되는 과정을 의미한다.<sup>14,15</sup>

내피기원세포는 혈관신생의 기본이 되는 세포로서 내피세포와 KDR, Tie-1, Tie-2, VE-cadherin 등의 항원을 공유하며, 조혈모세포와는 VEGFR-1, CD34, CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM), Tie-1, Tie-2, von Willebrand factor 등의 항원을 공유하는 것으로 알려져 있다.<sup>16-21</sup> 또한 말초혈액 등 순환 혈액 내에도 극소수이긴 하나 내피기원세포가 존재한다는 것이 밝혀져 있다.<sup>22-25</sup> 그러나 아직까지 내피기원세포를 조혈모세포 및 성숙된 내피세포와 확실히 구별할 수 있는 세포특이표지자나 기능적 검사법이 없기 때문에 혈액으로부터 이를 분리하여 그 성상을 규명하는데 어려움이 있다.<sup>5</sup>

Asahara 등<sup>4</sup>은 CD34와 KDR을 이용하여 말초혈액으로부터 처음으로 내피기원세포를 분리하였으며, 말초혈액 중  $10.8 \pm 0.9\%$ 가 CD34 양성, KDR 양성인 내피기원세포라고 하였다. 본 연구에서는 제대혈에서 AC133과 KDR을 이용하여 내피기원세포를 분리하였는데, AC133과 KDR 모두 양성인 내피기원세포가  $1.73 \pm 0.7\%$ 로 나타나 Asahara 등<sup>4</sup>의 결과보다 현저히 낮은 값을 보였다. 그러나 본 연구에서는 KDR의 세포외영역(extracellular domain)에 대한 단클론성항체를 사용한 반면, Asahara 등<sup>4</sup>은 KDR의 세포내영역(intracellular domain)에 대한 다클론성항체를 사용하였기 때문에 실제보다 KDR 양성 세포군이 높게 측정되었을 가능성을 배제할 수 없을 것으로 생각되었다. 한편 Peichev 등<sup>5</sup>은 제대혈과 태아간 및 과립구집락자극인자(granulocyte-colony stimulating factor)로 가동화된 말초혈액으로부터 분리된 CD34 양성 세포에서 AC133과 KDR을 이용하여 내피기원세포를 확인하였으며, 그 결과 제

대혈의  $1.4 \pm 0.5\%$ , 태아간의  $1.2 \pm 0.3\%$ , 가동화된 말초혈액의  $2.0 \pm 0.5\%$ 가 AC133 양성, KDR 양성인 내피기원세포라고 하여 본 연구에서와 비슷한 결과를 보였다.

AC133은 새로운 조혈모세포 표지 인자로서, 5-transmembrane domain을 포함하는 분자량 120 kDa의 당단백이다. 기능은 아직 정확히 알려져 있지 않지만, AC133 양성 세포의 경우 자가재생성 능력을 가지며, 분화된 조혈세포나 내피세포에서는 이 표지자가 발현되지 않기 때문에 조혈모세포 뿐 아니라 내피기원세포의 표지 인자로서도 유용한 것으로 생각되고 있다.<sup>26-29</sup> Peichev 등<sup>5</sup>도 AC133과 VEGFR-2를 발현하는 CD34 양성 세포를 VEGF와 FGF-b를 첨가한 배지에서 배양한 결과 AC133 음성, VEGFR-2 양성인 부착 세포로 증식 및 분화됨을 확인하였다.

본 연구에서 MACS system을 이용하여 분리된 CD34 양성 세포는  $4.22 \times 10^5$ 개로 총 단핵구의 0.32%였는데, 이는 일반적으로 보고된 제대혈의 CD34 양성 세포 비율인 0.6%<sup>30-32</sup>의 53%에 불과한 것으로 제대혈 처리 과정 및 CD34 양성 세포 분리 과정에서의 세포 손실과 함께 비교적 불안정한 조혈모세포들이 분리 과정에서 사멸되었기 때문으로 생각되었다.

내피기원세포는 CD34 양성 세포의 1.73%인  $7.3 \times 10^3$ 개 정도로 추정되었는데, 유세포분석기를 이용하여 세포 표지자를 분석하기 위해서는 최소한  $1 \times 10^6$ 개의 세포가 필요하기 때문에<sup>33</sup> 배양 전 내피기원세포만을 따로 분리하여 분석하는 것은 불가능하였다. 따라서 내피세포 성장인자인 VEGF, IL-1 $\beta$ , FGF-b를 기본으로 하여 여기에 조혈모세포 체외 증폭에 필수적인 성장인자인 SCF, FL, TPO를 여러 가지 조합으로 첨가하여 내피기원세포의 체외 증폭 및 분화를 유도함과 동시에 이를 위한 최적의 사이토카인 조건을 분석하였으며, 배양 6일째 기본 조합에 SCF, FL 및 TPO를 모두 첨가하여 배양하였을 때 부유 세포수가 가장 많이 증폭되는 것을 확인하였다. 그러나 6일 배양 후에는 CD34 및 KDR을 발현하는 세포를 유세포분석기로 검출할 수 없었기 때문에 증폭된 내피기원세포 자체를 직접 확인하지는 못하였다. 이는 내피기원세포를 포함하는 조혈모세포가 이미 각 계열로 분화되기 시작하였고 특히 본 연구에서는 배양시 여러 가지 사이토카인을 사용하였기 때문에 그 분화 속도가 더욱 촉진되었기 때문으로 생각되었다.

따라서 본 연구에서는 내피기원세포가 내피세포로 분화할 수 있는 최적의 사이토카인 조건을 찾기 위해 내피세포의 특징인 부착성을 이용하였으며, 기본 조합에 SCF, FL 및 TPO를 모두 첨가하였을 때 부착 세포가 가장 많이 관찰되었다. 또한 CD34 양성 세포를 3일간 배양한 후 비 부착 세포를 회수하여 동일한 조건으로 다시 배양한 결과 이들로부터 다시 부착 세포가 형성되었는데, 이는 1차 배양에서 분화하지 않은 비 부착 내피기원세포가 2차 배양에서 내피세포로 분화한 것이 아니라 1차 배양 과정에서 어느 정도 자가재생성에 의해 증폭된 내피기원세포가 부착 내피세포로의 분화를 시작한 것임을 간접적으로 증명하는 것으로 생각되었다.

TPO는 기질세포와 조혈모세포 및 계열세포에 작용하여 내피세포 분열촉진인자인 VEGF의 분비를 유발하는 것으로 보고되어 있다.<sup>34</sup> 따라서 본 연구에서는 TPO가 내피기원세포의 자가재생성 및 분화에 직접 또는 간접적으로 기여하는지 여부를 확인하기 위해 배양시 이를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우를 비교하였으며, TPO를 첨가하였을 때의 세포 증식 정도가 통계적으로 유의하게 높았다.

Asahara 등<sup>4</sup>은 말초혈액으로부터 분리된 CD34 양성 세포(MB<sup>CD34+</sup>)와 이 세포로부터 배양된 부착 세포(AT<sup>CD34+</sup>)를 유세포분석기로 분석하여 비교하였는데, 그 결과 MB<sup>CD34+</sup>는 CD34 15.7%, CD45 94.1%, CD31 51.3%, KDR 27.6%, Tie-2 30.3%, CD62E 0.6%이었고, ATCD34+는 CD34 32.8%, CD45 27.2%, CD31 71.5%, KDR 35.8%, Tie-2 54.6%, CD62E 9.0%이었다. Peichev 등<sup>5</sup>은 내피기원세포와 내피세포 및 IL-1 $\beta$ 로 활성화시킨 내피세포에서 각각의 세포표지자 발현 정도를 비교하였으며, 내피기원세포의 경우 AC133, KDR, VE-cadherin, CD31 및 CD117은 양성, CD62E는 음성이었고, 내피세포는 KDR, VE-cadherin, CD31 및 CD117 양성, AC133과 CD62E는 음성이었다. IL-1 $\beta$ 로 활성화된 내피세포의 세포표지자 발현 정도는 내피세포와 비슷하였으나 CD62E가 양성이었다. 본 연구에서도 배양된 부착 세포에서 내피세포 표지자 발현 정도를 확인하기 위해 CD34 양성 세포를 4주간 배양한 후 유세포분석기로 분석하였는데, 내피세포 특이표지자인 KDR, CD31 및 CD62E는 양성이었으나 CD34, CD117 및 CXCR4는 거의 발현되지 않았다. 이와 같이 일부 세포 표지자의 발현이 억제된 이유는 정확히 알 수 없었으나 배양에 사용한 사이토카인의 영향일

가능성이 있으며, 배양된 부착 세포를 cell scraper로 떼어내는 과정에서 세포 표면 항원이 손상되었을 가능성도 배제할 수 없었다.

세포 배양 과정에서 나타난 형태 변화를 보면, 배양 시작 후 24시간 이내에 방추형의 부착성 세포가 관찰되었고 배양 3일째에는 이러한 부착 세포들이 군집을 형성하였다. 이때 형성된 부착 세포들은 그 형태가 섬유아세포와 유사하였으나, 섬유아세포의 경우 내피세포와는 달리 CD31을 발현하지 않는 것으로 보고되어 있어<sup>35-37</sup> 배양된 세포가 섬유아세포일 가능성은 배제할 수 있었다. 배양 1주째부터는 세포들이 cord-like structure를 이루면서 증식하기 시작하였는데, 이는 맥관형성 초기 단계에서 보이는 형태와 유사한 구조로서 내피세포 배양 과정에서 나타나는 특징적인 형태이며,<sup>6</sup> 배양 4주경에는 이와 같이 증식된 세포가 역시 내피세포의 특징인 cobblestone 모양을 보였다.<sup>4,5</sup> 따라서 본 연구에서는 세포 표지자 분석과 함께 특징적인 내피세포의 형태를 관찰함으로써, 제대혈 CD34 양성 세포의 체외 배양을 통하여 형성된 부착 세포가 내피세포임을 확인하였다.

이상의 실험으로 본 연구에서는 제대혈에서 분리된 CD34 양성 세포에서 내피기원세포의 성상을 규명할 수 있었으며,  $10^3$ 개 정도밖에 되지 않는 내피기원세포로부터 체외 배양을 통하여 내피세포로의 분화를 유도하는 과정에 TPO가 기여함을 증명함으로써, 제대혈 단핵구 중 극소수에 불과한 내피기원세포의 수적인 한계를 극복할 수 있는 실험적인 조건을 제시하였다.

## V. 결 론

본 연구에서는 제대혈로부터 내피기원세포를 분리하여 그 성상을 규명하고, 배양 과정에서 VEGF와 IL-1 $\beta$  및 FGF-b을 포함한 여러 가지 사이토카인, 특히 TPO가 내피기원세포 증식에 미치는 효과를 관찰함으로써, 제외 대량 배양법을 제시하고 이를 내피기원세포를 이용한 치료의 기술적, 이론적 배경 확립에 적용하고자 하였다. 18개의 제대혈로부터 CD34 양성 세포를 분리한 후 다양한 조합의 사이토카인을 첨가하여 배양하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 제대혈에서 분리된 단핵구 중 CD34 양성 세포수는  $4.22 \times 10^5$ 개로 총 단핵구의 0.32%이었으며, MACS system을 이용하여 분리된 CD34 양성 세포의 순수도는 84.04%이었다.

2. 제대혈에서 CD34 양성이면서 CD38 음성인 원시조혈모세포는 단핵구 중 0.05%, CD34 양성 세포 중 7.44%였으며, AC133과 KDR 모두 양성인 내피기원세포는 단핵구 중 0.15%, CD34 양성 세포 중 1.73%이었다.

3. CD34 양성 세포를 VEGF와 IL- $\beta$  및 FGF-b을 기본으로 SCF, FL, TPO를 첨가하는 다양한 사이토카인 조합에서 6일간 배양한 결과, 기본 조합에 SCF와 FL 및 TPO를 모두 첨가하였을 때 부유 및 부착 세포수가 가장 많이 증가되었다

4. VEGF와 IL-1 $\beta$ , FL, SCF 및 FGF-b이 모두 존재하는 상태에서 TPO 첨가 여부에 따른 세포 증식 효과를 관찰한 결과, TPO를 첨가하였을 때 세포의 증식 정도가 통계적으로 유의하게 높았다( $p < 0.05$ , Wilcoxon rank sum test).

5. 내피기원세포로부터 분화된 내피세포의 표지자 분석 결과, 내피세포 특이표지자인 KDR과 CD31 및 CD62E는 양성이었으나, CD34와 CD117 및 CXCR-4는 거의 발현되지 않았다.

6. 배양 시작 후 24시간 이내에 방추형의 부착성 세포가 관찰되었고 배양 3일째에는 이러한 부착성 세포들이 군집을 형성하였다. 배양 1주부터는 세포들이 cord-like structure를 이루면서 증식하기 시작하였으며, 배양 4주경에는 이와 같이 증식된 세포가 cobblestone 모양을 보였다. 따라서 본 연구에서는 세포 표지자 분석과 함께 특징적인 내피세포의 형태를

관찰함으로써, 제대혈 CD34 양성 세포의 체외 배양을 통하여 형성된 부착 세포가 내피세포임을 확인하였다.

이상의 실험에서 제대혈에서 증폭된 내피기원세포 자체를 직접 확인하지는 못하였으나, 체외 배양을 통하여 제대혈 단핵구 중 극소수에 불과한 내피기원세포로부터 내피세포로의 분화를 유도하였고, 이 과정에 TPO가 기여함을 증명함으로써 내피기원세포의 수적인 한계를 극복할 수 있는 실험적인 조건을 제시하였다.

## 참 고 문 헌

1. Denekamp J. The current status of targeting tumor vasculature as a means of cancer therapy: an overview. *Int J Radiat Biol* 1991;60:401-8.
2. Kim KJ, Li B, Winer J. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-4.
3. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-6.
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
5. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952-8.
6. Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, Falk J, Reitz-Vick D, Trevor KT, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vasc Surg* 2000;31:181-9.
7. Davey FR, Hutchison RE. Hematopoiesis. In: Henry JB, Davey FR, editors. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 20th ed. Philadelphia: W.B. Saunders company; 2001. p.520-41.
8. Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989;74:1905-14.
9. Topyoaki M, Hisao I, Junli D, Satoshi S, Ken-ichiro S, Hiroyuki E, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000;105:1527-36.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
11. Folkman J. Diagnosis and therapeutic applications of angiogenesis research. *C R Acad Sci*

III 1993;316:909-18.

12. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Keamey M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis: a single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest* 1994;93:662-70.
13. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nat Med* 1997;3:158-64.
14. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
15. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
16. Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol* 1995;169:699-712.
17. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376:70-4.
18. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, et al. Embryonic stem cells differentiation in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 1996;88:3424-31.
19. Ali J, Liao F, Martens E, Muller WA. Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation* 1997;4:267-77.
20. Coffin JD, Harrison J, Schwartz S, Heimark R. Angioblast differentiation and morphogenesis of the vascular endothelium in the mouse embryo. *Dev Biol* 1991;148:51-62.
21. Robert B, St. John PL, Hyink DP, Abrahamson DR. Evidence that embryonic kidney cells expressing flk-1 are intrinsic, vasculogenic angioblasts. *Am J Physiol* 1996;271:F744-53.
22. Stump MM, Jordan GL Jr, Debakey ME, Halpert B. Endothelium grown from circulating blood on isolated intravascular Dacron. *Am J Pathol* 1963;43:361-7.
23. Scott SM, Barth MG, Gaddy LR, Ahl ET. The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1994;19:585-93.
24. Shi Q, Wu MH, Hayashida N, Wechezak AR, Clowes A, Sauvage LR. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg* 1994;20:546-57.



25. Shi Q, Wu MH, Fujita Y, Ishida A, Wijelath ES, Hammond WP. Genetic tracing of arterial graft flow surface endothelialization in allogeneic marrow transplanted dogs. *Cariovasc Surg* 1999;7:98-105.
26. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane haematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013-21.
27. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary A, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-12.
28. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998;16:387-96.
29. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106-12.
30. Harris DT. Cord blood transplantation: Implications for graft vs. host disease and graft vs. leukemia blood cells. *Blood Cells* 1994;20:560-4.
31. Almicci C, Carlo-Stella C, Wagner JE, Mangoni L, Garau D, Rizzoli V. Biologic and phenotypic analysis of early haematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Leukemia* 1997;11:2143-9.
32. Todaro AM, Pafumi C, Pernicone G, Munda S, Pilastro MR, Russo A, et al. Haematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood Purif* 2000;18:144-7.
33. Feldkamp CS, Carey JL. Standardization of immunoassay methodologies. In: Rose NR, de Macario EC, editors. *Manual of clinical laboratory immunology*. 5th ed. Washington D.C.: Am Soc Microbiol; 1997. p.1168-79.
34. Bobik R, Hong Y, Breier G, Martin JF, Erusalimsky JD. Thrombopoietin stimulates VEGF release from c-Mpl-expressing cell lines and haematopoietic progenitors. *FEBS Letters* 1998;423:10-4.
35. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125:725-32.

36. Newman PJ. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann NY Acad Sci* 1994; 714:165-74.
37. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 1984;99: 2034-40.

## Abstract

### Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by *ex vivo* expansion

Jeong Won Shin

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associate Professor Hyun Ok Kim)

The concept of “neovascularization”, which was first applied to understand the pathogenesis of some immunologic diseases such as diabetic retinopathy or rheumatoid arthritis, has been extended to other fields of study such as myocardial ischemia and tumorigenesis. In addition, endothelial progenitor cells (EPCs) have been reported to have the capacity to colonize vascular grafts. In this study, EPCs were isolated from cord blood and cultured to observe the effect of various cytokines, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-1  $\beta$ , fibroblast growth factor-basic (FGF-b), stem cell factor (SCF), flt3-ligand (FL), and thrombopoietin (TPO) for the development of endothelial cells (ECs) as a source of cells for antineoplastic therapy or treatment of regional ischemia.

The cord blood was collected in sterile blood bags containing CPDA-1 from 18 normal full-term deliveries. Mononuclear cells (MNCs) were isolated using Ficoll-Hypaque, and CD34+ cells were isolated by MACS system (Miltenyl Biotech, Auburn, CA, USA). CD34+ cells were 0.32% of total MNCs and the recovery rate by MACS system was 84.04%. CD34+/CD38- cells, considered as primitive stem cells, were 0.05% of MNCs and 7.44% of CD34+ cells. AC133+/KDR+ cells, considered as EPCs, were 0.15% of MNCs and 1.73% of CD34+ cells. To evaluate the effect of various cytokines, especially TPO, CD34+ cells were cultured under the conditions of various cytokine combinations with VEGF, IL-1  $\beta$  and FGF-b as the basic. The numbers of suspension and adherent cells were the highest when supplemented with SCF, FL and TPO. The addition of TPO in the presence of the other cytokines significantly increased the numbers of suspension and adherent cells ( $p < 0.05$ , Wilcoxon rank sum test). After three days of culture, non-adherent cells were recovered and recultured under the same conditions for additional three days. As a result, adherent cells were reformed, therefore it was considered

hematopoietic cells were repopulating to EPCs during the first three days. After four weeks of culture, adherent cells were analyzed for endothelial markers by two-color flow cytometry. Cultured adherent cells expressed the endothelial specific markers, such as KDR, CD31, and CD62E, but did not express CD34, CD117 and CXCR4. Typical morphology of endothelial cells were observed, such as cord-like structure and cobblestone appearance during culture period, which suggested that the adherent cells were consistent with endothelial cells.

In conclusion, we characterized the EPCs in CD34+ cells isolated from cord blood and confirmed that TPO plays a major role in the differentiation from EPCs to endothelial cells. Finally, we suggested experimental condition in which can provide large volume endothelial cells for the potential use of therapeutic neovascularization.

---

Key Words: cord blood, endothelial progenitor cells, *ex vivo* expansion, thrombopoietin