

Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells 배양 시 효율적인 Extracellular Matrix의 증명

The Extracellular Matrix Affected Proliferation and Cell Adhesion of Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*

Purpose: Human mesenchymal stem cells (hMSCs) have the potency for self-renewal and differentiation into various kinds of cells. The hMSCs are obtained from the various tissues, including adipose tissue, bone marrow and cord blood. The extracellular matrix (ECM) is an important factor that affects cell adherence, growth, migration, apoptosis and differentiation both *in vitro* and *vivo*. The adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) have CD29 (integrin) on the cell surface, which is the receptor for fibronectin. The aim of this study is to validate the efficacy of ECM, and especially fibronectin, for cell expansion.

Methods: The AD-MSCs were obtained from the abdominal fat of humans. These cells were seeded onto culture plates coated with fibronectin-Human (FN) and plates without ECM (control). The cells were incubated for 3 passages and the cellular morphology was simultaneously observed with microscopy. CCK-8 assay was performed to compare the proliferation ability in each condition at the same passage. Immunocytochemistry staining for integrin-beta1 was performed to observe the cell to cell interaction.

Results: The hAD-MSCs in the FN-coated and non-coated plates exhibited cytoplasm staining for integrin-beta1. In all the cultures, extended fibroblastic-shaped cells that turned into rhomboid cells were most frequently observed. The cell growth rates for the non coated culture plate were lower than those for the FN coated plates. After 72 hour culture under the different coated concentrations of FN and the non coated condition (control), the control group had a lower growth rate. In the culture with a FN coated plate, a significant change was observed as compared with that of the control group. We observed an increase in cell proliferation, with a maximum of 140%, on the FN coated plate by performing CCK-8 assay. In comparison, integrin $\beta 1$ on the cells was more expressed in the FN-coated plates than that in the non-coated plates.

Conclusion: The cell morphology can be changed faster in the FN coated culture plates than that in the non coated culture plates. Because proliferation and adhesion with FN can enhance the expansion, the culture within a FN coated plate is needed to encourage hAD-MSCs to proliferate *in vitro*.

Key Words : Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs), Extracellular matrix, Fibronectin

중심단어 : 지방유래간엽줄기세포, 세포 외 기질, Fibronectin

민선옥¹, 이상우^{1,2}, 최세별³, 김경식^{1,4}

연세대학교 의과대학 ¹외과학교실, ²연세대학교 대학원 나노과학 기술 협동과정, ³고려대학교 의과대학 외과학교실, ⁴연세대학교 의과대학 세브란스병원 세포치료센터

Seon Ok Min, B.S.¹, Sang Woo Lee, B.S.^{1,2}, Sae Byeol Choi, M.D., Ph.D.³, Kyung Sik Kim, M.D., Ph.D.^{1,4}

¹Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, ²Graduate Program of Nano Science and Technology Graduate School of Yonsei University, ³Department of Surgery, Korea University College of Medicine, ⁴Cell Therapy Center, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine

책임저자

김 경 식
서울시 서대문구 성산로 250번지
연세대학교 의과대학 외과학교실
우편번호 120-752
Tel: 02-2228-2125, 2100
Fax: 02-313-8289
E-mail: kskim88@yuhs.ac

Received: 2009. 9. 2

Accepted: 2009. 12. 9

서 론

인체 지방 유래 간엽줄기 세포(Human adipose tissue-deri-

ved Mesenchymal stem cells, hADSCs)는 다능성의 줄기세포 (multi-potent stem cells)로서 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*)에서 뼈, 지방, 연골, 간세포 등의 다른 세포로 분화가 가능하다.¹ 이런 특성을 이용하여 조직 공학적으로 활용하거나 다른 조직의 세포로 분화를 시켜 이식을 함으로써 질병 치료에 각광 받고 있다.¹ 하지만 지방유래 간엽 줄기 세포 역시

인체에서 대량으로 세포를 얻기가 쉽지 않고, 수명도 제한적이기 때문에 단 시간 내에 보다 많은 세포를 얻는 것이 중요하다. 그러므로 간엽줄기세포를 임상적으로 적용하기 전에 효율적인 증식 조건을 연구하는 것이 우선 해결해야 할 과제이다.²

이로 인해 간엽줄기세포의 배양 방법이 중요시 되고 있는데, 배양 시 가장 기본적인 방법인 배양 용기에 대한 세포기질의 도포는 체외에서 세포의 초기 퍼짐이나 형태, 증식 및 분화에 영향을 미치는 것으로 생각된다.³ 특히 이에 관여하는 Integrin family는 세포와 세포 또는 세포와 세포외기질 결합 모두에 관여하는 세포 수용체이다.⁴ 적혈구를 제외한 모든 세포는 한 종류의 인테그린(integrin)을 갖고 있고, 세포외기질에 관한 정보는 세포 표면 수용체를 통해서 세포 내로 이송하게 된다. 인테그린은 알파 아단위(α -subunit)와 베타 아단위(β -subunit)로 구성되어 있는데 각각의 아단위(subunit)에 따라서 리간드(ligand)가 조금씩 달라진다(Table 1).⁴

세포의 기질을 구성하는 피브로넥틴(Fibronectin), 라미닌(Laminin)의 짧은 단백질 서열에 부착하는데, 인테그린은 세포외 기질의 아르지닌-글라이신-아스파라진(arg-gly-asp, RGD) 서열 부위에 부착한다.⁵ 이러한 세포외기질 단백질의 수용체로 대표적인 것이 콜라겐과 피브로넥틴이 있다. 콜라겐은 조직의 구조 단백질로, 여러 형태가 존재하는데, 대부분 다량체형 원섬유이며, 주로 인테그린과 직접 상호작용한다. 피브로넥틴은 회전타원체(spheroid)의 형태로 거의 모든 조직에 존재하는 단백질로서, 결합조직의 주된 부착단백질로 조직에서는 거의 모든 세포가 피브로넥틴과 상호작용한다. 대부분의 조직 유래 세포들은 점착하는 위치에 의존하며, 생존과 성장을 위해서는 세포간질 표면에 붙어야 한다. 세포의 퍼짐, 정착 및 이동은 각각 세포외기질과의 상호작용과 연관되어 있다.⁶

지방 유래 간엽 줄기 세포 역시 간엽 줄기세포로서, 정착성 세포이므로 이러한 세포외 기질과의 영향을 받을 것으로 생각된다. 기존의 간엽 줄기세포의 배양 도포 방법으로 콜라겐과 피브로넥틴 등을 많이 이용하여 도포하고 있지만 간엽 줄기세포의 배양 시 좀 더 효율적인 도포 방법과 그 영향에 대한 연구는 많이 시행되고 있지 않다. 그러므로 지방 간엽줄기세포를 다른 종류의 세포로 분화시키기 위한 초기 배양 시 세포외기질의 효능성을 알아보려고 하였다.

Table 1. Integrin and receptors

Integrin	Receptor for
Integrin $\alpha 5 \beta 1$	Fibronectin
Integrin $\alpha 4 \beta 1$	ACAM, fibronectin
Integrin $\alpha 6 \beta 1$ and $\alpha 7 \beta 1$	Laminin
Integrin $\alpha 1 \beta 1$	Collagen, laminin, tenascin
Integrin $\alpha 2 \beta 1$	Laminin, collagen
Integrin $\alpha v \beta 5$	Osteoponin

방 법

1. 지방 유래 간엽줄기세포의 분리

건강한 성인의 복부로부터 지방을 채취한 후 혈액을 제거하기 위해 3번 정도 PBS로 세정한다. 지방 조직에 붙어 있는 혈관, 림프구 등을 제거한 후 collagenase (Wako, Japan)가 녹아 있는 PBS에 지방조직을 넣은 후 37°C에서 shaking, 1시간 정도 둔다. 1시간 후 효소 불활성을 위해서 10% FBS 들어간 DMEM을 첨가하고, 4°C, 1,200 G에서 10분간 원심분리 한다. 상층의 지방 덩어리와 상층액을 버리고 pellet에 RBC lysis buffer 10 mL을 넣고 상온에서 5분 방치 한 후 4°C, 350 G에서 5분 원심분리 후 3 mL 배지를 넣고 세포 수 측정한다. 6 well culture plate (corning Incorporated, USA)에 5,000 cells/cm² 분주 후 37°C 5% CO₂에서 배양한다. 분리된 세포의 증식을 위해 다음과 같은 배지 60% DMEM-LG (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 40% MCDB-201 (Sigma), 1X insulin transferrin-selenium (ITS) (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 10-9M dexamethasone (Sigma), 10-4M ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), 10 ng/mL rhEGF (Daewoong Pharmaceuticals, Korea), antibiotic/antimycotic fibronectin (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 및 10% FBS (Wel-GENE, Daegu, Korea)를 사용하여 1주에 두 번 증식배지를 교환하였다. 초대배양(Primary culture)후 집락(confluence)이 80%정도 되었을 때 1X Trypsin-EDTA (Invitrogen, USA) 사용하여 계대 배양 해준다. 첫 번째 계대 배양 시 각각의 도말 배양용기(coated plate)에 분주한다.

2. 세포 배양 도포(Cell culture plate coating)

세포와 세포외기질과의 결합에 관여하는 integrin family와 이와 결합하는 수용체인 피브로넥틴(BD, England)을 사용시

MSCs culture의 효율성을 증명하기 위해 fibronectin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)을 도포한 후, 3차례 계대 배양한 지방 간엽 줄기세포를 분주 했으며, 이에 대조군으로 도포 하지 않은 것을 사용하였다. 피브로넥틴 도포한 배양용기와 도포 하지 않은 배양용기의 표면 상태를 비교하기 위하여 주사 현미경(Scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 배양 용기의 표면을 촬영하였다.

3. 증식 분석

72시간 배양한 3번째 계대 배양된 간엽 줄기세포를 72시간 배양한 뒤 96 well plate (NUNCLON, DENMARK)에 5,000 cells/well 분주하여 37°C , 5% CO_2 조건에서 72시간 배양한다. 72시간 후 cell counting kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, JAPAN)을 각 well 당 $10 \mu\text{L}$ 씩 분주한다. 1~4시간 정도 보육(incubation)한 뒤 450 nm microplate reader로 측정한다.

4. CD29-integrin beta 1에 대한 면역 세포 화학 염색

각 도말 조건에서 지방유래 간엽 줄기세포의 증식의 차이를 확인하기 위해서 integrin- $\beta 1$ 을 면역세포화학법을 이용하여 검출하였다.

Chamber slide (Nunc Lab Tek, USA)에 각각 도포 후 간엽 줄기세포 배양한다. 25% 집락(confluence) 되었을 시 4% para-formaldehyde를 이용해 30분 동안 37°C 에서 고정한다. 고정

후 0.2% Triton X-100이 포함된 PBS로 37°C , 30분 동안 처리 후 1% Bovine serum albumin에서 1시간 반응시킨다. 그 후 1 : 250으로 희석된 primary antibody integrin $\beta 1$ (rabbit anti human integrin $\beta 1$), (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)로 4°C overnight 처리 후 PBS로 수세한다. 다음 1 : 250으로 희석된 secondary antibody integrin $\beta 1$ (goat anti-rabbit IgG conjugated Texas Red), (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)으로 45분 처리한다. 핵을 염색하기 위한 DAPI 염색 후, permount를 사용해 mounting 후 cover slide로 덮은 후 형광 현미경으로 확인한다.

결 과

1. 세포 외 기질-도포(ECM-coated): 피브로넥틴 도포된 배양 용기의 주사현미경 소견

도말하지 않은 배양 용기의 주사 현미경 사진에서 볼 수 있는 L-lysine의 물질들이 피브로넥틴에 의해 덮히므로 편평한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A, B).

1) 지방유래 간엽줄기세포의 형태학적 변화

피브로넥틴 도포 배양 용기의 지방유래 간엽줄기세포(hAD-SCs)의 변화가 빠르게 일어났으며, 퍼짐(spreading) 역시 육안으로 더 빠른 것을 관찰할 수 있었으며, 그 모양 또한 방추모양에서 지방유래 간엽줄기세포의 형태인 장사방형(rhomboid)의 모양으로 대부분 변했으나, 비도포배양용기에서는 대부분이 방추형의 형태인 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A, B).

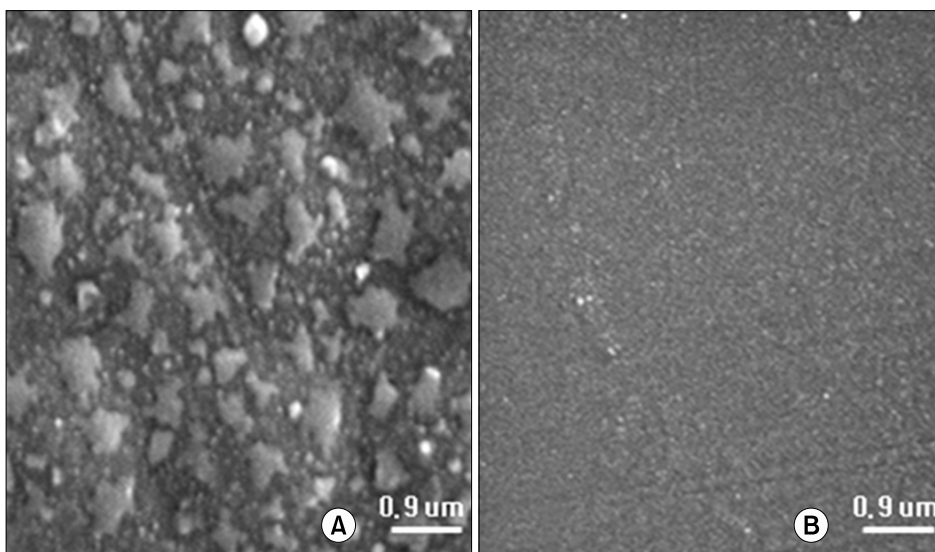


Fig. 1. The surface of cell culture plate by SEM ($\times 20,000$). (A) Non-coated, (B) FN coated.

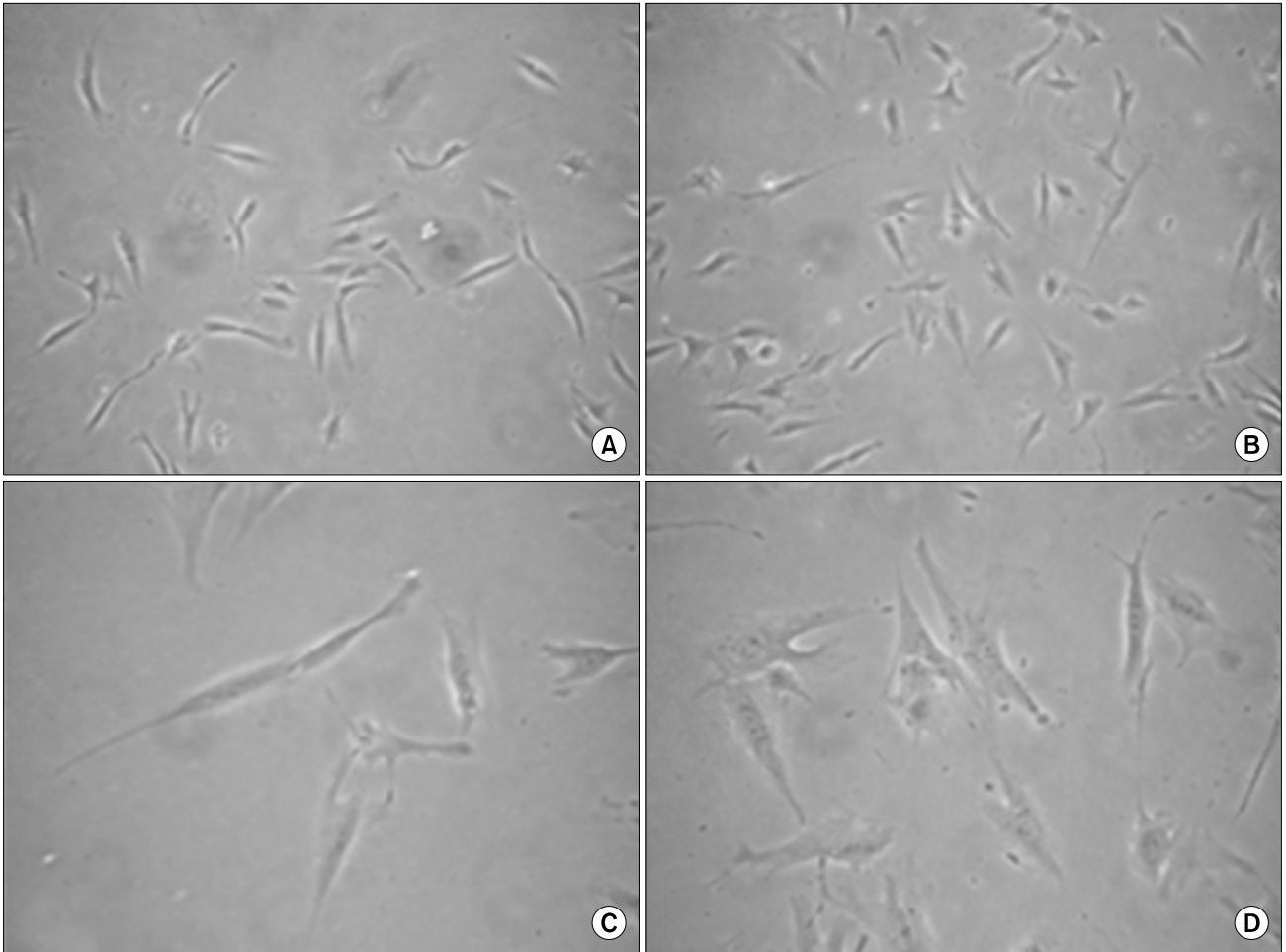


Fig. 2. The morphology of mesenchymal stem cells by inverted microscope. (A, C) Non-coated plate (A: $\times 40$) (C: $\times 100$) & (B, D) FN-coated plate (B: $\times 40$) (D: $\times 100$).

2) 세포 증식

세포외기질으로서 피브로넥틴-도말의 증식을 비교하기 위하여 지방유래 간엽줄기세포 #3의 배양 후 3일 째 CCK-8 assay를 통해 실험하였으며, 흡광도는 450 nm에서 96-well micro test spectrophotometer를 이용해 측정하였다. 피브로넥틴의 농도는 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 도포하였다. 세포 증식은 피브로넥틴 도포군이 비도포군보다 수치가 더 높은 것을 볼 수 있었다(Fig. 3).

3) 인테그린 베타-1의 활성화

면역세포형광분석 결과를 hADSC #3 배양 후 3일 촬영한 사진이다. 피브로넥틴($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 도포되었다(Fig. 4A~C). non-coating 지방유래 간엽줄기세포사진이다(Fig. 4D~F). Blue color는 핵이 염색된 것이며(Fig. 4A, D), Red color는 세포

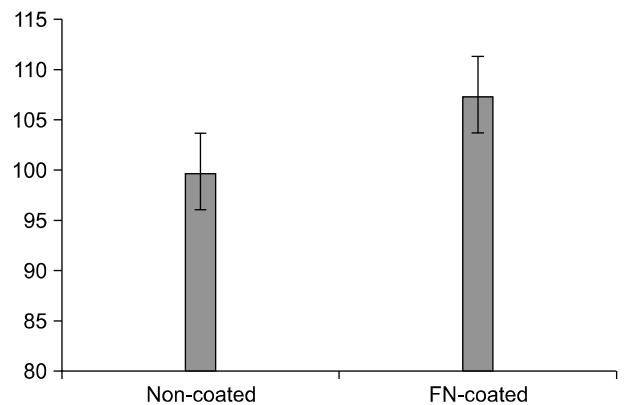


Fig. 3. Cell proliferation assay on non-coated and FN-coated plates.

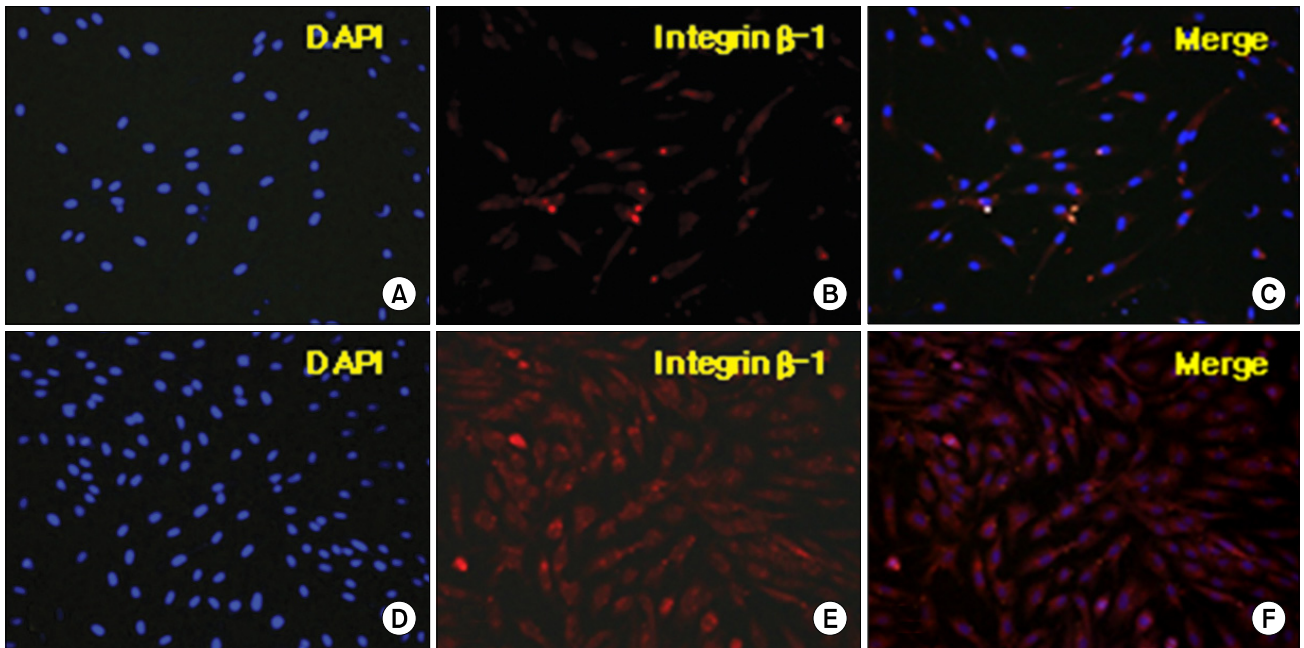


Fig. 4. The nuclei and the integrin beta-1 expression of mesenchymal stem cells 3 days by immunocytochemistry assay. (A~C) Non-coated plate (×200) & (D~F) FN-coated plate (×200).

표면 표지자인 인테그린 베타-1의 발현을 나타낸 것이다(Fig. 4B, E). 두 개의 color가 혼합된 사진은 핵과 인테그린 베타-1의 발현을 merge한 그림이다(Fig. 4C, F). 피브로넥틴 도포를 한 실험군의 지방유래 간엽 줄기세포에서 인테그린 베타-1의 발현(Red color)이 비도포군에서의 발현 정도에 비해 훨씬 많이 발현 한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4B, C, E, F).

고 찰

줄기 세포를 이용한 질병 치료는 보다 근본적인 치료의 가능성이 있으며, 그 중에서도 성체 간엽 줄기세포는 배아 줄기세포에서 문제 되고 있는 윤리적인 문제가 그다지 크지 않고 여러 장기에서 얻기가 용이하다는 장점이 있다.⁷ 간엽 줄기세포는 자가 증식을 하며,⁸ 다른 장기의 세포로의 분화가 가능하다는 특징을 갖고 있다.^{9,10} 이런 특징을 이용하여 조직공학이나 유전자 치료를 하기도 한다.¹¹ 이런 치료 방법들은 자신의 간엽줄기세포를 이용한 자가 이식을 통해 면역거부반응을 줄이거나 거의 일어나지 않게 할 수 있을 가능성을 갖고 있다.¹² 우리는 복부에서 지방조직을 떼어내 간엽줄기세포를 얻었는데,^{7,13} 이유는 지방으로부터 얻은 간엽 줄기세포는 다른 장기로부터 얻은 것에 비해 가장 긴 세포 주기를 갖고 있고 증식을

비교하였을 때 가장 좋은 결과를 보여주기 때문이다.¹⁴ 그러나 간엽 줄기세포를 생체 외(*in vitro*)에서 배양하여 다른 세포로의 분화 등의 실험을 시행하기 위해서는 최적의 배양 조건이 필요하다. 이런 조건은 간엽줄기세포의 모양과 간엽줄기세포가 분화하는 세포의 전형적 단백질 발현에 큰 영향을 끼친다.¹⁵

기존의 연구에서는 피브로넥틴으로 도포된 배양용기의 간엽줄기세포와 콜라겐, 그리고 도포되지 않은 배양용기에서의 간엽줄기세포를 비교한 결과 피브로넥틴으로 도포된 배양용기에서 간엽줄기세포가 가장 잘 부착된다는 것 이외에는 세포 증식의 비교에서는 거의 차이가 없었다고 하였다.² 하지만 우리는 앞의 결과에서 언급된 바와 같이 피브로넥틴으로 도포된 배양용기에서의 간엽줄기세포가 도포되지 않은 용기의 세포에 비해 성장이나 증식에서 더 효과적인 결과를 얻을 수 있어서 세포 외 기질과 간엽줄기세포간의 상호작용을 통해 부착과 증식에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 비도포군의 배양용기에서 자란 간엽줄기세포는 증식 능력이 도포된 배양용기의 세포에 비해 낮은 수준을 보였으며, 세포 모양 또한 느리게 변화되는 것을 볼 수 있었다.

세포 외 기질과 세포의 결합에 관여하는 세포의 표면에 있는 인테그린 베타-1와 같은 수용체의 발현 정도를 비교하여

보았는데 피브로넥틴도포된 배양용기의 세포에서 인테그린 베타-1 수용체가 더 많이 발현된 것을 볼 수 있었다. 이것은 세포 외 기질과 이와 결합하는 세포 표면의 수용체인 인테그린을 통한 결합이 활성화되면서 세포수가 빠른 시간에 증식되며, 이로 인해 세포와 세포간 상호작용이 활발해 짐을 의미한다. 간엽줄기세포는 세포 팽창 중에는 다분화성이 줄어든다고 하며, 반대로 분화 중에는 세포의 팽창이 줄어든다는 연구도 발표된 바 있다.¹⁶⁻¹⁸ 간엽줄기세포의 빠른 성장과 증식은 짧은 시간 내에 효과적으로 번식 또는 분화하여 임상적용을 할 수 있다는 강점이 있다.¹² 그러므로 이러한 세포 외 기질(ECM)을 이용하면 아마 생체 외에서 간엽줄기세포 배양 시 세포 증식을 빠르게 증가시키는 역할을 할 것이다.

세포 부착에 관여하는 세포 표면 수용체로 알려져 있는 Integrin family의 한 종류인 인테그린 베타-1은 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌 등 세포외 기질 단백질에 수용체로서 작용한다. 이것은 세포와 세포외 기질 간의 부착을 증대하는 물질로서, 세포 신호 기작이나 세포의 모양, 이동, 그리고 세포 주기 등을 조절한다고 알려져 있다. 그 구조는 α 와 β unit으로 구성되어 있으며, 두 아단위의 결합으로 작용한다.¹⁹ α -subunit은 18개가 존재하며 β -subunit은 8개가 존재한다. 이 중에서 세포 외 기질과의 결합에 관여하는 대표적인 것은 인테그린 베타-1이다. 이러한 Integrin family와 세포 외 기질이 부착을 이루어 세포의 신호 기작 등에 관여하여 세포 죽음, 이동, 부착, 분화 등을 조절하게 되는 것이다.¹⁹

본 연구 결과에서 이 수용체의 발현 정도를 비교하여 지방유래 간엽줄기세포와 피브로넥틴과의 부착 정도를 알아볼 수 있었다. 지방유래 간엽줄기세포에서 피브로넥틴 도포는 세포 성장과 증식을 좀 더 활성화 시키는 역할을 하는 것으로 생각된다. 특히 피브로넥틴 도포에서 인간수반세포의 생체외 배양 시 눈에 띄게 증식의 증가를 볼 수 있었다는 연구도 발표된 바 있다.²⁰

세포 외 기질 단백질의 종류로서 피브로넥틴 이외에도 콜라겐이나 피브릴린(fibrillin), 비트로넥틴(vitronectin) 등이 존재하는데 이러한 단백질 역시 간엽줄기세포의 증식이나, 신호 기작, 분화에 관여한다.² 실제로 collagen type I은 osteogenic 분화를 개시하고 좀 더 빠른 속도로 일어난다고 알려져 있다.²¹ 그러므로 좀 더 효율적인 지방유래 간엽세포의 증식, 분화, 이동을 유도하기 위해서 다양한 세포 외 기질을 이용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A084120).

참 고 문 헌

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science* 1999;284:143-147.
2. Song GB, Ju Y, Soyama H. *Growth and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells affected by type I collagen, fibronectin and bFGF*. *Materials Science & Engineering CB* 2008;28:1467-1471.
3. Hutchings H, Ortega N, Plouët J. *Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation*. *FASEB J* 2003;17:1520-1522.
4. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, et al. *Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation*. *Int J Mol Med* 2008;21:271-279.
5. Hynes RO. *Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines*. *Cell* 2002;110:673-687.
6. Flaim CJ, Chien S, Bhatia SN. *An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation*. *Nat Methods* 2005;2:119-125.
7. Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, et al. *Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage*. *Toxicology in vitro* 2007;21:324-329.
8. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. *Mesenchymal stromal cells, Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther* 2007;9:204.
9. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. *Circ Res* 2007;100:1249-1260.
10. Prockop DJ. *Marrow stromal cells as stem cells for continual renewal of nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene therapy*. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:284-285.
11. Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG. *Expression profiling and functional analysis of Wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells*. *Stem Cells* 2004;22:849-860.
12. Qian L, Saltzman WM. *Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification*. *Biomaterials* 2004;25:1331-1337.
13. Choi FJ, Kwon JY, Kim Ho, Kim SH, Choi YJ, Cho JA. *The characterization of the mesenchymal stem cells derived from*

- fat, cord blood, placenta tissues. Korean J HBP Surgery 2006; 10:1-6.*
14. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 2006; 24:1294-1301.*
 15. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. *in vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. Biochem Biophys Res Commun 2001;282:148-152.*
 16. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. *Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. Exp Hematol 2000; 28:707-715.*
 17. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. *Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999;107:275-281.*
 18. Conget PA, Minguell JJ. *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J Cell Physiol 1999;181:67-73.*
 19. Hynes RO. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 1992;69:11-25.*
 20. Harnett EM, Alderman J, Wood T. *The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. Colloids Surf B-Biointerfaces 2007;55:90-97.*
 21. Salasnyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE. *Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Biomed Biotechnol 2004;2004:24-34.*