

## 성인 중간엽 줄기세포부터 분리된 clone간의 세포증식능력 및 분화능의 다양성 분석

연세대학교 의과대학 정형외과학교실\*, BK 21†

정호선\* · 김윤희\*† · 심인혜\*† · 한승환\* · 이진우\*†

= Abstract =

### Clonal Heterogeneity of Human Bone Marrow-Derived Stromal Cells

Ho Sun Jung, M.D.\*, Yun Hee Kim, M.S.\*†, In Hye Shim, M.S.\*†,  
Seung Hwan Han, M.D.\*, Jin Woo Lee, Ph.D.\*†

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea\*  
Brain Korea 21 Project for Medical, Yonsei University, Seoul, Korea†

**Purpose:** The isolated human bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) were expanded and showed multipotentiality for differentiation to both adipocytes and osteoblasts. We selected the multiple clones and characterized their proliferation potentials, surface markers and differentiation potentials.

**Materials and Methods:** BMSCs were isolated from bone marrow. After forming colonies, colonies were selected and cultured. We performed MTT assay and FACS. Cultured colonies were differentiated into adipocyte and osteoblast.

**Results:** BMSCs were isolated and plated in tissue-culture dishes. The number of clones was about 30. Clones were divided into three groups. Group I was round and small in size, and showed rapid proliferation. Group II showed similar pattern in cell size and proliferation with group I clones during early passage. But, after 4 passages, the clones became flat and larger cells and showed slower proliferation. Finally, group III clones were flat and large cells and replicated slowly in early passage. Group I was fibroblastic in morphology, but Group II changed to flat and larger cells after passage 4. FACS and proliferation assay were performed at passage 5. Group I and Group II cells differed in their expression of the cell-surface epitopes, CD29 and CD105. Group I cells were differentiated into adipocytes better than Group II cells.

**Conclusion:** In this study, these results indicated that cell surface markers were expressed differently for clones having different differentiation properties. These clonal BMSCs may also be used for the identification of lineage-determining factors.

**Key Words:** Bone marrow-derived stromal cells, Adipogenesis, Osteogenesis, Cell proliferation, Cell clone

---

※ 통신저자: 이진우

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL: 02) 2228-2190 FAX: 02) 363-1139 E-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

\* 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC3040)에 의해 수행되었음.

## 서 론

## 대상 및 방법

골수 내에 존재하는 줄기세포는 크게 조혈 줄기 세포와 중간엽 줄기세포로 나뉠 수 있다. 조혈 줄기세포는 여러 가지 혈구세포를 생산하는 세포인 반면에, 중간엽 줄기세포는 자가 재생뿐만 아니라 다양한 결체 조직으로의 분화가 가능하여 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등으로 분화할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>7,10</sup>. 따라서 중간엽 줄기세포는 특정 질병 치료를 목적으로 하는 세포 치료제로써의 중요성을 띠고 있다. 그러나 이러한 특성을 가진 중간엽 줄기세포의 배양은 세포 증식력의 저하 및 서로 다른 분화 능력 등으로 어려움을 겪고 있다. 또한 각 세포간의 서로 다른 특성으로 인하여 임상적 연구에 어려움이 있다.

초기에 연구들은 성인 중간엽 줄기세포의 개체간의 분화력 차이가 성별의 차이나 연령의 차이를 따르지 않는다고 알려졌으나, 분화력의 차이는 개체간의 차이라고 보고 되어있다<sup>9</sup>. 그러나 중간엽 줄기세포는 동일한 배양 방법에서 배양하여도 그들의 세포 증식력과, 분화력이 시간경과에 따라 상실되어 버리기 때문에 in vitro 상에서 단기간에 대량 증식하는데 많은 애로점이 있다. 또한 중간엽 줄기세포는 세포자체가 동일한 모양과 특성을 가지는 것이 아니라 여러 가지 서로 다른 세포 모양을 가지고 있으며 그들의 특성이 서로 다른 것으로 알려져 있다<sup>2,4</sup>. 실제로 mouse에서 연구 실험결과 각 mouse종에 따라 중간엽 줄기세포의 표지 유전자 발현과 세포 증식력 및 분화능력이 서로 다르다는 결과가 발표 되었다<sup>8</sup>. 골수로부터 분리된 성인 중간엽 줄기세포는 세포 모양의 다양성을 가지며 크게 두 가지의 서로 다른 세포모양을 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>12</sup>. 하나는 작고 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태를 띠며, 또 다른 하나는 크고 납적한 세포모양을 띠고 있는 것으로 보고되어 있다<sup>1,3,11</sup>. 그러나 한 개체 안에서 서로 다른 중간엽 줄기세포의 clone간의 증식력과 분화력의 차이 비교는 연구되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 중간엽 줄기세포의 분리 및 세포배양을 통하여 서로 다른 clone간의 세포 증식력, 분화력, 표지 유전자 등의 발현 특성을 알아보고자 하였다.

## 1. 성인 중간엽 줄기 세포의 일차 배양 및 clone의 분리배양

성인 공여자(남자3명: 28세, 44세, 35세, 여자 2명: 19세, 34세)의 장골로부터 얻은 골수 조직으로부터 Percoll gradient methods를 이용하여 성인 중간엽 줄기 세포들을 추출한 후 기본 배양액 (10% 우태 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 Dulbeccos modified eagles medium-low glucose (DMEM-LG) (Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 일차 배양을 시킨 뒤 75 cm<sup>2</sup> culture flask에 90% 이상이 차게 되면 계대 배양시켰다. 세포 배양액을 3일에 한번씩 갈아주었다.

## 2. 성인 중간엽 줄기세포 clone의 분리배양 및 분석

1차 배양된 중간엽 줄기세포 1,000개를 10 cm<sup>2</sup> culture flask에 7일 동안 배양하여 colony를 형성시킨 후 20% crystal violet으로 염색하여 colony형성을 관찰하였다. 또한 cloning cylinder (Bellco Glass, Vineland, NJ, USA)를 이용하여 clone을 분리하여 12well plate에서 일주일간 배양한 후 계대 배양하였다. 계대 배양 30일 후 각각의 clone들의 유세포 분석을 시행하였다. 유세포 분석 방법은 EDTA를 첨가하여 떼어낸 세포들을 5×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 Phosphate buffered saline에 부유하고 중간엽 줄기세포에 양성과 음성을 보이는 각각의 항체 [endoglin (CD105),  $\beta$ 1 integrin (CD29), the early hematopoietic progenitor cell marker (CD34), the monocyte/macrophage marker (CD14)] (Ansell, Bayport, MN, USA)를 첨가하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 대조군으로 anti-mouse monoclonal (Ansell) 항체를 5×10<sup>5</sup> cells/ml 농도의 세포에 더하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 세포들은 FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 상에서 분석하였다.

### 3. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리된 clone의 지방세포 및 골아세포로의 분화 유도

배양된 clone 세포들을 지방세포로 분화유도하기 위하여 clone 세포들이 plate에 꼭 찬 후 이틀 뒤 지방세포 분화 배양액 [10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액 (Gibco), 0.5 mM isobutyl-methylxanthin (Sigma, ST. LOUIS, MO, USA), 1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma), 5  $\mu$ g/ml insulin (Gibco), 200  $\mu$ M indomethasin (Sigma)을 첨가한 DMEM-LG]을 첨가한 후 14일간 배양하였으며 3일 간격으로 분화 배양액을 교체하였다. 또한 성인 중간엽 줄기세포에서 분리된 각 clone 세포들을 골아세포로 분화 유도하기 위하여 골아 세포 분화 배양액 [10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액, 100 nM dexamethasone (Sigma), 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma), 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid-2-phosphate (Gibco)를 첨가한 DMEM-LG]을 첨가하여 14일간 배양하였다. 배양 후, Oil red O, Alizarin red S, Von kossa 염색을 수행하였다. 염색 후 Oil red O의 염색은 100% isopropanol을 20분간 처리하며, Alizarin red S 염색은 10% cetylpyridinium chloride monohydrate를 30분간 처리하여 탈색한 후 500

nm와 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

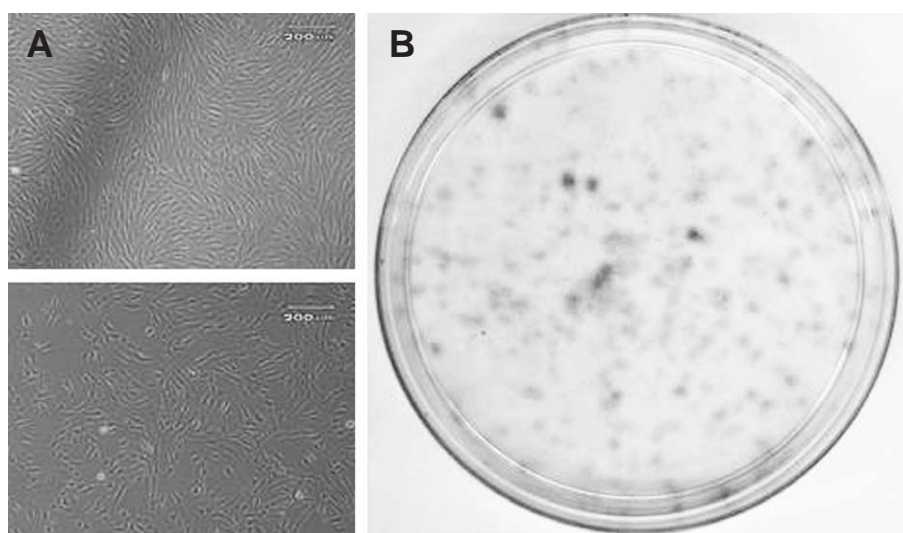
### 4. MTT assay

각 배양된 중간엽 줄기세포의 clones을  $2 \times 10^3$  cells/well로 24 well plate에 세포를 분주 후 배양하였다. 세포 배양액은 3일 간격으로 교체하였다. 세포가 분주 된 지 1일, 3일, 6일 9일째에 세포의 배지를 모두 버리고 1X PBS로 씻어준 후 세포 배양액을 400  $\mu$ l를 첨가 후 1 X MTT solution (Amresco, Solon, Ohio, USA)을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 반응 후 상층액을 모두 버리고 1X PBS로 2회 씻어준 후 DMSO (Sigma)원액을 400  $\mu$ l 첨가하였다. 보라색으로 발색하면 파이펫팅 한 후 96 well plate에 상층액을 넣은 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### 1. 성인 중간엽 줄기 세포의 일차배양 및 clone 분리

성인 공여자의 장골로부터 얻은 골수 조직으로부터 percoll gradient methods를 이용하여 중



**Fig. 1.** Formation of colony of human bone marrow-derived stromal cells. Cultured human BMSCs are shown (A). Formed colonies were stained by crystal violet at 7 days of culture (B).

간엽 줄기 세포들을 추출한 후 기본 배양액을 첨가하여 75 cm<sup>2</sup> flask에 세포들을 일차 배양시켰다. 성인 중간엽 줄기 세포는 일차 배양한 시기로부터 약 7일정도 지나면 flask에 붙기 시작하며, 세포의 모양은 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 관찰되었다. 중간엽 줄기세포를 5×10<sup>2</sup> cells/10 cm<sup>2</sup> cell plate에 세포를 분주한 후 1주일 뒤 crystal violet 염색을 이용하여 colony 형성을 관찰하였으며, 형성된 colony를 clone cylinder를 이용하여 약 30개의 clone을 분리한 후 12 well plate에서 계대 배양하였다(Fig. 1).

2. 성인 중간엽 줄기세포로부터 분리 배양된 clone의 세포 증식력 및 세포 모양 관찰

서로 다른 군에서 clone들의 세포 증식력을 관찰하기 위하여 5번째 계대 배양에서 MTT assay를 수행하였다. MTT assay결과에서 세포 증식력이 7배 이상인 clone들은 제 1군으로, 4~6배의 세포 증식력을 보이는 clone들은 제 2군으로, 마지막으로 1~3배의 세포 증식력을 보이는 clone들은 제 3군으로 분류하였다(Fig. 2A).

분리 배양된 각 군의 clone을 배양한 후 세포의 모양을 관찰하였다. 관찰된 clone들은 서로 다른

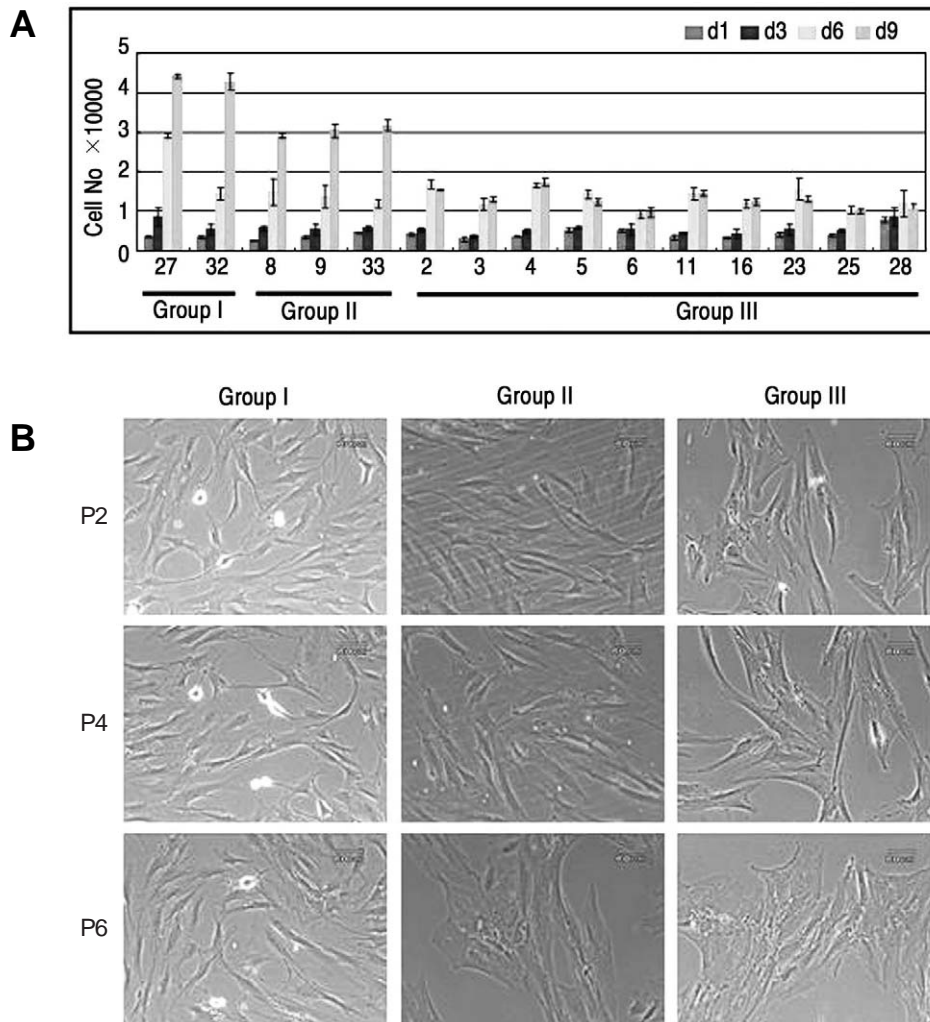


Fig. 2. Results of proliferation assay by MTT method (A) and the morphology change of the cloned cells (B) are shown. Clones were grouped dependent on proliferation rate.

유형의 세포 모양을 띠고 있었다. 각 군의 clone을 계대 배양하여 관찰한 결과 제 1군 clone들은 크기가 작고 섬유모세포와 같은 길쭉한 세포모양을 띠고 있었으며, 제 2군 clone들은 4번째 계대 배양까지는 제 1군 clone들과 유사한 세포 모양을 보였으나 그 이후의 계대 배양부터 세포의 크기가 커지며 넓적한 모양이 관찰되었다. 마지막 제 3군 clone들은 크기가 크며 넓적한 정상모양이나 크기가 큰 섬유모세포와 같은 세포 모양이 관찰되었다(Fig. 2B).

### 3. 각 clone의 유세포 분석 결과

분리 배양된 각 그룹의 clone들을 중간엽 줄기세포의 양성 표지자로 알려진 CD105, CD29와 음성 표지자로 알려진 CD34, CD14에서 염색하여 관찰하였다. 제 1군 clone들에서 CD105에 90.62%, CD29에 83.4%가 발현하며, 제 2군 clone들은 CD105에 58.2%, CD29에 35.6%가 발현하였으며, 모든 군의 clone들에서 음성표지자인 CD34, CD14는 거의 발현하지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 3A). 또한 각군에서 세포의 크기와 과립을 FACScan에서 관찰한 결과 세포의 크기가 크며 과립이 많이 형성된 세포들이 제 1군 clone에서 4%와 15.9% 임에 반해 제 2군 clone에서는 43.5%와 50.2%를 나타내었다(Fig.

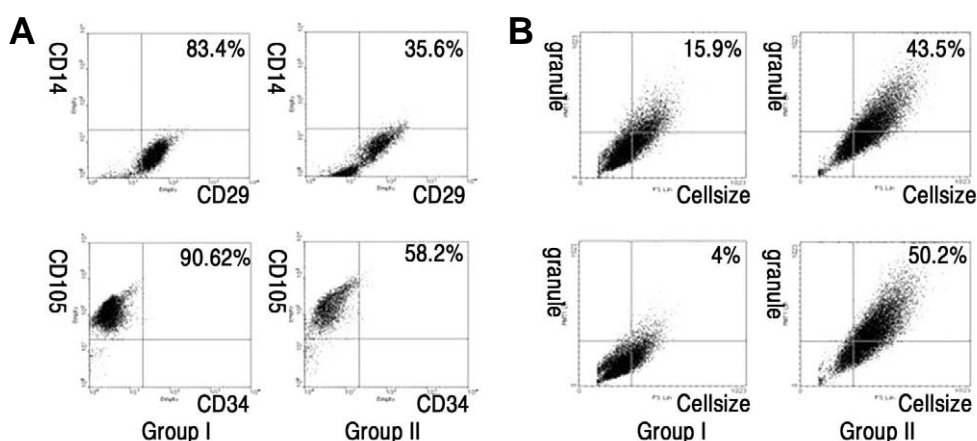
3B). 이것은 제 1군 clone들이 제 2군 clone들보다 세포의 크기가 작으며 과립 또한 적은 것을 의미한다.

### 4. 각 군의 clone간 세포 분화력 관찰

서로 다른 군의 clone들에서 세포 분화력을 알아보기 위하여, 각군의 clone들을 5번째 계대에서 지방세포와 골아세포로 분화를 유도하였다. 지방세포로 분화 유도 시 제 1군 clone들은 제 2군 clone들보다 더 많은 lipid droplet들이 형성된 것을 관찰하였으며, Oil red O 염색에서도 동일한 결과를 관찰하였다. 또한 골아세포로 분화 유도 시 골아세포로의 특이적인 Alizarin red S 염색이 약하게 염색 되는 것을 관찰하였다(Fig 4A). 흡광도 측정결과, 염색의 결과와 동일한 결과를 관찰하였다(Fig. 4B).

## 고 찰

비록 긴 기간 동안 중간엽 줄기세포에 대한 연구가 진행되었으나, 아직까지 중간엽 줄기세포의 특성에 대해서는 정확하게 밝혀진 것이 없다. 또한 여러 연구자들에서 조금씩 다른 결과들이 보고 되기도 하였다. 일부의 연구자들은 중간엽 줄기세포는 특정 표지 유전자를 발현하고 여러 가지

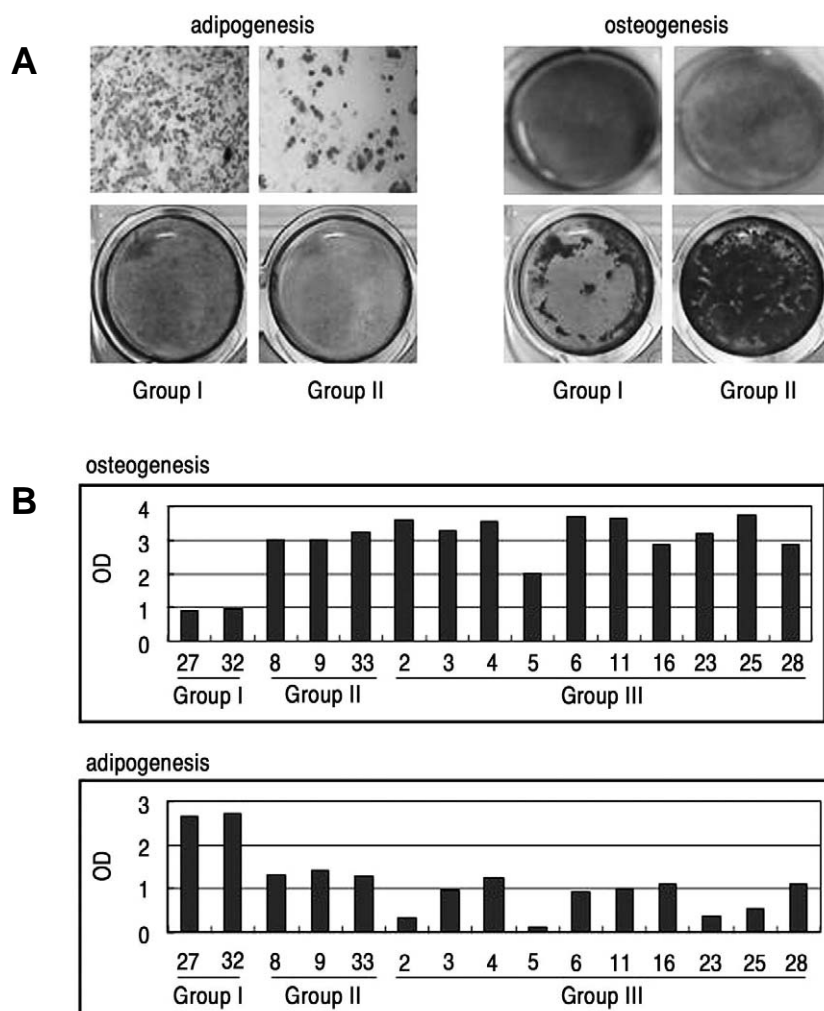


**Fig. 3.** FACS analysis was done for the cell of each group. (A). Dual-color flow cytometric analysis of CD105/CD34 and CD29/14. Passage 5 cells of each clone were incubated with antibodies of CD105, CD29, CD34, or CD14 and assayed by FACS. (B). Granule (Y axis) and cell size (X axis) were compared between group I and II.

lineage로 분화하는 것을 관찰하였다<sup>10)</sup>. 그러나 또 다른 보고에서 중간엽 줄기세포는 초기에는 동일한 모양을 가지나 계대 배양이 진행됨에 따라 몇몇에서는 중간엽 줄기세포의 여러 lineage로 분화하는 분화력을 잃어버리기도 한다고 하였다.<sup>11)</sup> 실제로 성인 중간엽 줄기세포는 한 개체 내에서 크게 두 가지 세포 그룹으로 나눌 수 있는 것으로 보고 되었다<sup>3)</sup>. 한 군의 세포는 세포 증식력이 빠르며 세포 모양이 작고, 골아세포, 지방세포, 연골세포로 잘 분화되는 것을 관찰하였으며, 또

다른 군의 세포는 세포 모양이 크며 납적한 모양을 띠고 분화는 하나 첫번째 군에 비해 분화력이 떨어지는 것을 관찰하였다. 이것은 한 개체 내에서 중간엽 줄기세포를 두 가지의 군으로만 나누었으나 기본적으로 중간엽 줄기세포는 굉장히 다양한 세포로 알려져 있으며 아직까지 중간엽 줄기세포를 특징 지을 수 있는 특성이 없으므로 본 실험에서는 한 개체 내에서의 각각의 세포 하나로부터 배양된 각 세포들의 특성을 분석하였다.

우리의 결과에서 세포 모양이 작으며, 길쭉한



**Fig. 4.** Differentiation of isolated clones is shown. (A). Adipogenesis and osteogenesis. Each clone were incubated until confluency in culture medium and then transferred to adipogenic or osteogenic medium for 14 days. Isolated clones were stained by Oil red O, Alizarin red S, and Von kossa solution. (B). The degree of differentiation was determined by destaining.

형상을 한 clone들은 세포 증식력이 빠르며, 세포의 크기가 크고 넓적한 모양을 띤 clone들은 세포 증식력이 떨어지는 것을 관찰하였다. 이것은 기존의 성인 중간엽 줄기세포가 크게 두 가지 종류의 세포로 나뉘는데 하나는 사이즈가 작은 recycling stem (RS) 세포와 사이즈가 큰 mature 중간엽 줄기세포로 나뉘지며, RS 세포는 mature 중간엽 줄기세포보다 세포 증식력이 빠르다는 보고와 동일한 결과이다<sup>2,4)</sup>.

중간엽 줄기세포는 아직까지 정확한 표지 유전자가 밝혀져 있지 않으며 여러 가지 표지유전자들이 발현한다고 한다. 그 중 CD105와 29는 중간엽 줄기세포의 표지 발현 유전자로 알려져 있으며, 대부분의 조직 유래 골수유래의 중간엽 줄기세포는 이 두 표지유전자를 발현하여야 한다. 그러나 아직까지 어느 정도의 수준으로 발현하여야 하는지는 보고되어 있지 않으며, 개체 상에서의 발현양의 차이는 관찰되지 않았다. 본 실험에서는 한 개체 내에서 각 clone간의 발현양의 차이를 관찰하였으며 이러한 발현양의 차이가 분화력 차이와 연결 되는 것으로 관찰하였다. 동일한 세포 표지 유전자의 발현은 아니지만, 다른 연구에서 성인 중간엽 줄기세포중 D7-FIB라는 특정 세포 표지 유전자가 발현되는 세포가 전체의 약 0.01%로 존재하며, D7-FIB가 발현하는 세포는 여러 가지 중간엽 줄기세포의 양성표면 인자가 발현되고, 3가지 lineage로 분화하는 것을 관찰하였으나, D7-FIB가 발현되지 않는 세포들은 중간엽 줄기세포와 유사한 세포 모양을 가지나 3가지 lineage로의 분화력이 떨어졌으며 여러 가지 양성표 인자가 발현되지 않는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 이것은 세포 표지 유전자의 발현 정도가 세포의 분화력에 영향을 미칠 수 있음을 암시한다.

본 실험에서 각 군별로 세포의 크기가 다르며, 이에 따라 분화력의 차이를 보이고 있었다. 실제로 작은 크기의 세포들은 지방세포로의 분화가 잘 유도되었으며, 세포의 크기가 큰 세포들은 골아세포로의 분화가 더 진행됨을 관찰하였다. 이것은 골수에서 뽑은 중간엽 줄기세포에서 크기가 작은 것은 지방세포로의 분화가 잘 일어나며, 세포 크기가 큰 것은 골아세포로의 분화가 잘 이루어진다는 연구와 유사한 결과를 나타내었다<sup>6)</sup>. 또한 본

실험에서 세포 크기가 작은 세포는 중간엽 줄기세포의 표지 유전자의 발현과 세포 증식력이 모두 높게 관찰된 것으로 보아 크기가 작은 세포가 좀더 미분화성을 가지고 있을 것으로 예상되며, recycling stem (RS) 세포와 연계 지어 생각할 수 있을 것이다<sup>2,4)</sup>.

중간엽 줄기세포는 골아세포, 지방세포, 연골세포로 모두 분화가능 하여야 한다. 하지만 본 결과에서 중간엽 줄기세포의 표지 유전자인 CD105/29의 발현양의 차이가 분화력의 차이에 영향을 미칠 수 있음을 보여주었다. 이것은 저자들이 배양한 중간엽 줄기세포라고 하는 기존의 세포들 중에 실제로 stemness를 유지하는 줄기세포는 굉장히 적은 수이며 대부분이 줄기세포의 특징을 어느 정도 가진 각 lineage의 전구세포라는 것을 추측할 수 있다. 또한 여러 가지의 중간엽 줄기세포의 표지유전자의 발현만으로는 stemness를 지닌 중간엽 줄기세포를 확인할 수 없다는 한계점을 보이고 있다. 앞으로 중간엽 줄기세포의 더 정확한 표지 유전자의 개발이 필요하며, 중간엽 줄기세포와 각 lineage의 전구세포를 구별할 수 있는 방법에 대한 분자생물학적 연구들이 수행되어야 할 것이다.

## 결 론

본 연구에서는 성인 중간엽 줄기세포의 서로 다른 세포의 증식력과 분화능력 등을 관찰하였다. 제 1군은 CD29, 105에서 높게 발현하였으나, 제 2군은 제 1군보다 CD29와 CD105의 발현양이 낮은 것을 관찰하였다. 또한 제 1군과 제 2군은 서로 다른 분화능이 관찰되었다. 이 결과는 CD29와 CD105에서 서로 다르게 발현하는 클론은 서로 다른 분화능력을 가진다는 것을 보여주며, 특정세포로의 분화에 관여하는 인자를 파악함에 응용 되어질 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Bruder SP, Jaiswal N and Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem

- cells during extensive subcultivation and following crypreservation. *J. Cell. Biochem.*, 64:278-294, 1997.
- 2) **Colter DC, Class R, Digirolamo CM and Prockop DJ.** Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS*, 97:3213-3218, 2000.
  - 3) **Colter DC, Sekiya I and Prockop DJ:** Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *PNAS*, 98:7841-7845, 2001.
  - 4) **Digirolamo CM, Stoles D, Colter D, Phinney DG, Class R, and 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 differentiation. *Br. J. Haematol*, 107:275-281, 1999.
  - 5) **Jones EA, Kinsey SE, English A et al.** Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis & Rheumatism*, 46:3349-3360, 2002.
  - 6) **Mcbeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadri-  
raju K and Chen CS.** Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell*, 6:483-495, 2004.
  - 7) **Minguell JJ, Erices A and Conget P:** Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 226:5070520, 2001.
  - 8) **Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF and Prockop DJ.** Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103:1662-1668, 2004.
  - 9) **Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N and Prockop DJ.:** Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J cell Biochem.*, 75:424-435, 1999.
  - 10) **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al.:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-146, 1999.
  - 11) **Sergei AK, Paul HK, Kazuhito S et al.:** Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *JBMR*, 12:1335-1347, 1997.
  - 12) **Takeshi O, Tomoki A, Tomitaka N et al.:** Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *BBRC*, 295:354-361, 2002.