대한정형외과연구학회지 제 7 권 제 2 호
J. of Korean Orthopaedic Research Society
Volume 7, Number 2, October, 2004

계대 배양에 의한 인간 중간엽 줄기세포의 골 형성능

연세대학교 BK21 의과학사업단, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실*

선현진 · 최연락 · 한수봉* · 이진우

= Abstract =

Osteogenic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells During Serial Subculture

Hyun Jin Sun, Yon Rak Choi, Soo Bong Hahn*, Jin Woo Lee

Brain Korea 21 project for medical science
*Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea**

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells during serial subculture.

Materials and Methods: Human bone marrow-derived MSCs were serially subcultured and then maintained in basal or osteogenic medium for 14 days. Then we performed FAC analysis, RT-PCR, alkaline phosphatase activity and stains.

Results: Human MSCs had different morphologies, immunophenotypes, and growth rates that were correlated with the length of serial subculture. The phenotype changed from small spindle-shaped cells at passage 1 into large cuboidal or flattened cells at passage 7. The osteogenic capacity of human MSCs decreased during serial subculture. Using RT-PCR, the mRNA levels of bone-specific genes, such as cbfa1/runx2 and osteocalcin, decreased with increasing passage number. Strong positive staining was observed for ALP and Alizarin reds in osteogenic medium on day 14, but declined significantly with increasing passage number.

Conclusion: We have shown that osteogenic potential of human MSCs decreased during serial subculture. This result can provide the helpful information to decide the timing of human MSC transplantation during in vitro culture expansion for treatment of bone defects and so on.

Key Words: Mesenchymal stem cell, Subculture, Osteoblast, Differentiation

※ **통신저자: 이 진 우**
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
TEL: 02) 361-5640 FAX: 02) 363-1139 E-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업인 세포응용연구사업단의 연구비 지원(과제번호 SC13142)에 의해 수행되었음.

서 론

성체 줄기세포 (adult stem cell)는 크게 조혈모 줄기세포(hematopoietic stem cell; HSC)와 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)로 나눌 수 있는데, 조혈모 줄기세포는 적혈구, 면역세포, 혈소판 등의 혈구세포로 분화할 수 있는 세포이며, 중간엽 줄기세포는 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등으로 분화 할 수 있는 세포로 알려져 있다[12]. 성체 줄기세포는 자가이식을 통해 면역적인 문제를 줄일 수 있으며, 골수와 같은 이미 성장한 신체조직으로부터 추출한 세포를 이용함으로써 윤리적 논쟁에서 벗어날 수 있다는 장점이 있어 관심의 대상이 되고 있다[2,5]. 성체 줄기세포 중 중간엽 줄기세포는 실제 의학에서 필요로 하는 조직의 재생을 가능하게 할 뿐 아니라 이식된 후 각 조직의 특성에 맞게 분화할 수 있는 능력을 지니고 있으나, 실제 조직 재생이나 치료에 필요한 충분한 양의 중간엽 줄기세포를 확보하는데 어려움이 있어 증식력을 향상시키기 위한 다양한 연구들이 보고되고 있다[8,13].

또한, 중간엽 줄기세포는 연령, 성별, 세포의 농도, 그리고 계대 배양의 정도 등 여러 가지 조건에 의해 증식과 분화 등의 세포 성질들이 영향을 받는다는 몇몇 보고들이 있으나, 아직은 논란의 여지가 많은 상태이다. 공여자의 성별에 따른 세포 성질은 크게 영향을 받지 않는 것으로 보고되었으나, 공여자의 연령에 따른 세포 성질의 차이에 대해서는 상반된 결과가 보고 되었다. 즉, 동물의 경우에는 연령에 따라 성장 동역학(growth kinetics)과 골아 세포로의 분화 등이 영향을 받는다고 보고되었으나, 사람의 경우에는 상반된 결과로 인해 아직 확실한 결론을 맺지 못한 상황이다[1,4,7].

계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 성질 변화에 관한 연구를 살펴보면, 중간엽 줄기세포는 반복적인 계대 배양에 의해 증식률의 감소와 형태적 변화를 관찰할 수 있는데[11], 이는 계대 배양 시 분주한 세포의 농도에 따라서도 영향을 받는다고 한다. Mets와 Verdonk[9]은 저농도 (low density) 분주를 통해 중간엽 줄기세포를 크기가 작고 방추형 형태를 가진 세포와 크고 넓적한 형태를 가진 세포로 나누었으며, 후자보다 전자의 경우에 세포의 증식이 빠르다고 보고하였다. Colter 등[3]은 저 농도 분주를 통해 작고 둥근 형태를 가진 세포를 새롭게 보고하였는데, 이 세포는 Mets와 Verdonk[9]이 보고한 세포 형태보다 더 증식률이 빠를 뿐 아니라 골아세포, 지방세포, 그리고 연골세포로의 분화 능력도 월등하다고 보고하였다. Digirolamo 등[6]은 중간엽 줄기세포를 고농도 (high density)로 분주할 경우, 반복적인 계대 배양에 의해 세포 형태는 동일해지나 (homogeneous), 세포 자체의 다분화 (multilineage) 능력이 떨어진다고 보고하였다. 또한, 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 분화능에 대한 연구에 따르면, Conget 와 Minguell[5]은 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화에서 계대 배양의 영향은 거의 없으나, 지방세포로의 분화에서는 계대 배양이 진행될수록 분화 능력이 감소한다고 보고하였고, Bruder 등[1]은 중간엽 줄기세포의 계대 배양이 골아세포로의 분화에 미치는 영향은 거의 없다고 보고하였다. 이처럼 중간엽 줄기세포의 성질 변화에 영향을 미치는 다양한 인자들이 보고되고 있지만, 이러한 결과는 중간엽 줄기세포 자체의 생물학적 이해가 부족한 상황에서 증식이나 분화 등의 생리학적 변화를 설명하긴 힘들다고 사료된다. 따라서, 중간엽 줄기세포의 증식이나 분화에 영향을 미치는 다양한 인자에 계대 배양이 해당되는지의 여부를 확인한 후, 중간엽 줄기세포의 생물학적 이해를 도울 수 있는 방안을 마련하고자 하였다.

따라서, 본 연구에서는 중간엽 줄기세포를 일정한 기간 동안 계대 배양시킬 때 배양 시간, 세포 농도 등을 동일하게 정한 후, 이미 알려진 최적화된 골아세포로의 분화 조건에서 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능의 변화를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 성인 중간엽 줄기세포의 계대 배양

인간의 중간엽 줄기세포는 정상 성인 (33~67

세, 6명)의 장골로부터 채취한 골수 조직으로부터 Percoll gradient methods (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 얻은 후, 기본 배양액 (10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (DMEM-LG, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA))을 첨가하여 75 cm^2 culture flask에서 10일간 배양시킨 후 90% 이상 바닥에 세포가 자라게 되면 1:3 비율, 즉 5(10^5 cells/flask 정도 되도록 계대 배양시켰다. 계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포는 액체질소에 냉동 보관한 후 동시에 실험을 진행하였다.

계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 특성 변화를 확인하기 위해 7일간 배양한 각 계대별 중간엽 줄기세포는 유세포 분석을 시행하였다. 각 계대별 중간엽 줄기세포들을 PBS로 세척하고, 5 mM EDTA를 이용하여 세포를 떼어낸 다음 PBS에 부유시킨 후 1,200 rpm에서 10 분간 침전시켰다. 5(105 cells/ml의 농도로 세포를 재부유한 다음 각각의 항체 (endoglin (CD105), integrin β1 (CD29), early hematopoietic progenitor cell marker (CD34), monocyte/macrophage marker (CD14)) (Ancell corporation, Bayport, MN, USA)를 20 μl/10^6 cells의 농도로 첨가하여 45 분간 실온에서 반응시켰다. 대조군으로는 같은 농도의 anti-mouse monoclonal (Ancell corporation) 항체들을 사용하였다. 반응시킨 세포들은 FACScan (Becton Dickinson Instrument, San Jose, CA, USA) 상에서 분석하였다.

또한, 계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포의 증식력의 변화를 관찰하기 위해 세포를 24 well plate에 2(104 cells/ml씩 분주한 다음 0, 2, 4, 6일 간격으로 DNA량을 측정하였다. DNA량은 각 날짜 별로 채취한 중간엽 줄기세포를 1X TNE (10 mM Tris base, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA) 완충용액에 부유시켜 세포 균질액을 만든 후 4℃ 12,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 얻은 상층액과 동량의 Hoechst 33258 용액 (25 μg/ μl; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 교반하여 형광 자극 파장 365 nm, 형광 발산 파장442 nm에서 fluorescence microplate reader (Bectone Dickinson, France)를 이용하여 측정하였다.

2. 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능

기본 배양액 (10% 우태아 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액이 함유된 DMEM-LG)과 골아세포 분화 배양액 (10 mM β-glycerophosphate, 100 μM dexamethasone, 50 μg/ml ascorbic acid-2-phosphate (Sigma)가 첨가된 10% DMEM-LG)에 각 계대별 중간엽 줄기세포를 14일간 배양하였다. 배양 후, 계대 배양에 따른 골아세포로의 분화 정도를 확인하기 위해 역전사-중합효소 연쇄반응, alkaline phosphatase (ALP) 활성도 검사, 특이염색 등을 시행하였다. 역전사-중합효소 연쇄반응은 각 계대별 중간엽 줄기세포들로부터 RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 분리한 total RNA 1 μg을 Omniscript kit (QIAGEN)를 이용하여 최종 부피를 20 μl로 맞춘 다음 37℃에서 90분간 반응시킨 후, 95℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA 2 μl에 10 pM의 sense primer와 10 pM의 antisense primer를 첨가한 후 Taq polymerase kit (QIAGEN)의 정해진 용액과 섞어 최종 부피를 50 μl로 하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 골아 세포의 특이 표지자인 osteocalcin, 제 1 교원질, cbfa1/runx2은 Genebank를 통해 염기 서열을 찾아내어 primer를 제작, 각각의 중합효소 연쇄반응 조건을 잡았다. 반응이 끝나면 반응액 중 10 μl를 취하여 1.5% (w/v) agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다. 골아세포로 분화시킨 각 계대별 중간엽 줄기세포의 ALP 활성도 검사를 위해 2X Trypsin-EDTA로 세포를 떼어낸 후, 300 μl의 0.1% triton X-100에 부유시켜 세포 균질액을 만든 다음 4℃ 12,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 얻은 상층액과 ALP 혼합 용액 (Sigma)을 섞어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1 N

NaOH로 반응을 중단시킨 다음 분광 광도계를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard로는 p-nitrophenyl phosphate solution (Sigma)을 사용하였고, 세포와 동일한 방법을 이용해 측정된 p-nitrophenol product의 흡광도 값을 이용해 계산하였다.

특이염색으로는 Alkaline phosphatase (ALP) 염색과 Alizarin red 염색을 실행하였다. 골아세포로 분화시킨 각 계대별 중간엽 줄기세포를 methanol/acetone (1:1) 용액으로 고정시킨 후, Alkaline phosphatase 염색은 Alkaline-Dye mixture (Sigma)를 첨가하여 상온에서 빛을 차단한 채 30분간 반응을 시킨 후 2분간 증류수로 세척한 다음 관찰을 하였고, Alizarin red 염색은 2% Alizarin red 용액 (pH 4.2; Sigma)을 첨가하여 상온에서20분간 반응을 시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 후 관찰하였다. Alizarin red 염색은 10% cetylpyridinium chloride monohydrate solution (Acros Organics, NJ, USA)을 이용해 상온에서 30분간 탈색시킨 후 540 nm에서 ELISA plate reader (Bio-rad, Melville, NY, USA)를 이용하여 측정된 값을 정량화하였다.

결 과

1. 성인 중간엽 줄기세포의 계대 배양

중간엽 줄기세포가 일차 배양 시기로부터 약 8일 정도 지나 flask에 90% 이상 바닥에 자라면 일정한 간격으로 계대 배양을 시켰다. 그 과정 동안 중간엽 줄기세포의 형태적 변화를 관찰한 결과, 배양 초기에는 크기가 작고 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 과립 (granule)이 적지만 계대 배양에 의해 넓적한 형태로 변하면서 크기도 커지고 과립도 많아지는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 유세

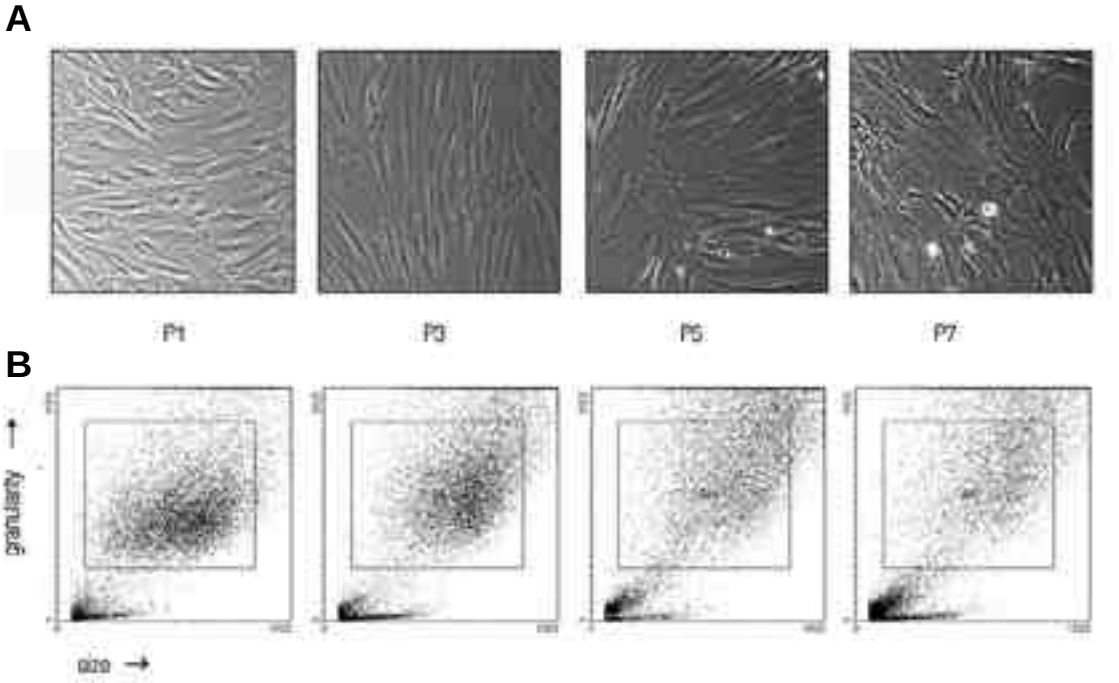

Fig. 1. Phenotypical properties of serially subcultured human mesenchymal stem cells. (**A**) The phenotype changed from small spindle-shaped cells at passage 1 (P1) into large cuboidal or flattened cells at passage 7 (P7). (**B**) In flowcytometry, human MSCs have increased in size and contained a large number of granules in correlation with serial subculture.

포 분석 결과, 중간엽 줄기세포의 양성 표지자로 알려진 CD105 와 CD29는 평균 70% 이상 강하게 염색이 되나 제 5 계대 이후 급격히 감소하고, 음성 표지자인 CD34와 CD14는 평균 1.5% 이하로 염색이 되어 골수에서 추출하여 일차 배양된 중간엽 줄기세포가 계대 배양을 거치면서 특이적 양성 항원들의 발현이 감소한다는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포의 증식력은 Hoechst 33258을 이용해 측정된 DNA량으로 확인하였다. 기본 배양액에 각 계대별로 얻은 중간엽 줄기세포를 6일간 배양한 후 DNA량을 비교한 결과, 배양 6일째 제 1, 3, 5, 7 계대의 DNA량이 1.39±0.02, 1.35±0.04, 1.32±0.04, 1.22±0.09 ㎍/㎕순으로 관찰되었다 (Fig. 3). 중간엽 줄기세포의 DNA량이 통계적으로 유의하게 감소하는 것 (p=0.054) 으로 보아 계대 배양에 의해 중간엽 줄기세포의 증식력이 감소하는 것으로 판단되었다.

2. 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능 확인

계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능의 차이를 확인하기 위해 역전사-중합효소 연쇄반응, ALP 활성도 검사, 특이염색 등을 시행하였다. 역전사-중합효소 연쇄반응을 통해 계대 배양에 따른 골아세포의 특이 표지자의 mRNA발현 양상을 확인한 결과, 분화 14 일째 cbfa1/runx2, osteocalcin 등과 같은 골아세포 특이 표지자의 mRNA발현이 점차 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 분화 14 일째 골아세포의 분화 초기 표지자인 ALP 활성도를 측정한 결과, 제 1, 3, 5, 7 계대의 ALP 활성도가 0.44±0.03, 0.40±0.05, 0.39±0.04, 0.06±0.01 μmol pNP/min/㎍ DNA순으로 관찰되었다 (Fig. 5). 이 결과를 통해 ALP 활성도가 계대 배양에 의해 점차 감소하는 것을 확인하였고, 특

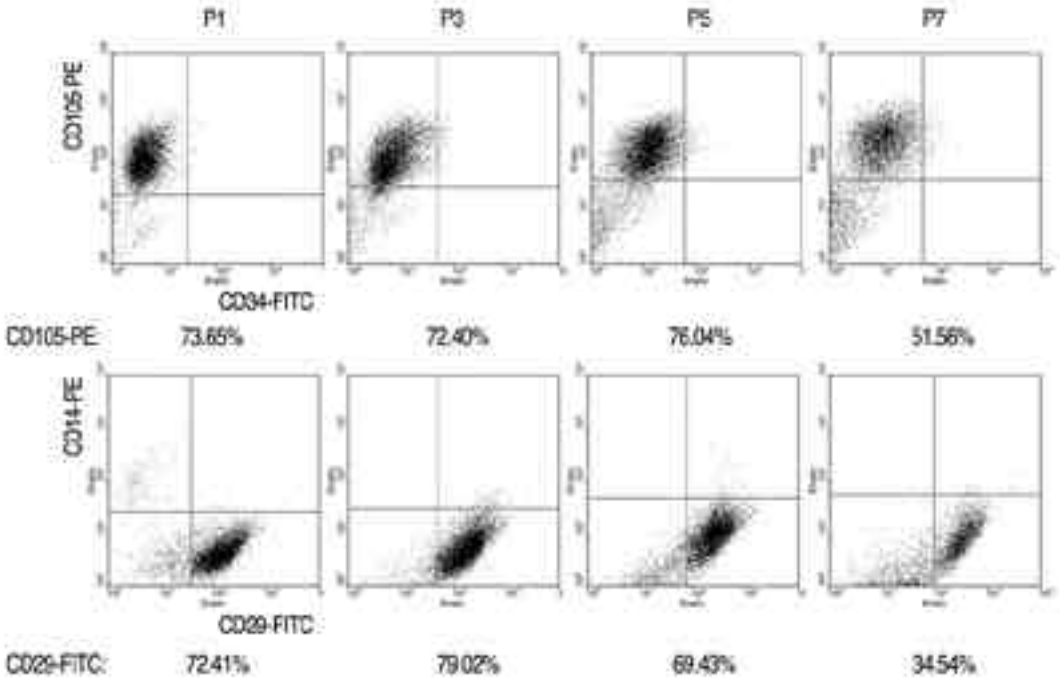

Fig. 2. FACS analysis of serially subcultured human MSCs. In flowcytometry, MSCs were positively stained with CD105 and CD29 (above 70%) and negatively with CD14 and CD34 (below 1.5%). With increasing passage numbers, expression of positive markers, CD105 and CD29, significantly decreased after passage 5.

히 제 7 계대에서 통계적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 (p=0.01). 분화 14 일째 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능을 확인하기 위해 특이염색 (ALP, Alizarin red)을 실시한 결과, 대조군인 중간엽 줄기세포에 비해 골아세포로 분화된 중간엽 줄기세포가 양성으로 강하게 염색이 되었지만, 계대 배양에 의해 그 염색 정도가 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 특히 Alizarin red 염색을 정량화한 결과, 제 5, 7 계대에서 Alizarin red 염색 정도가 통계적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 ($p<0.05$).

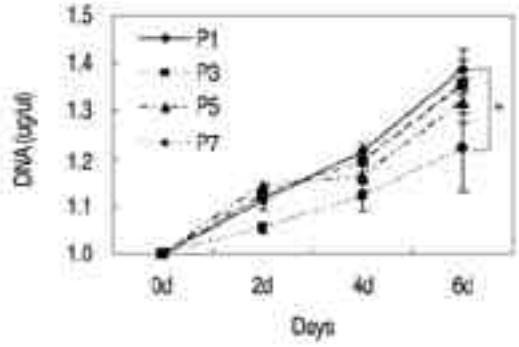

Fig. 3. Growth pattern of serially subcultured human MSC in culture. Cultures were started with 20,000 cells per well. The increase in the number of viable adherent cells was measured by DNA content. Data represent mean DNA content ±SD of three experiments performed in duplicate. DNA contents increased during the culture, but decreased in correlation with serial subculture (*<p=0.054, vs. passage 1).

고 찰

현재, 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화는 골 결손 혹은 골다공증 등의 골질환 치료에 응용될 수 있는 효율적인 방법들을 찾고자 많은 연구들이 진행되고 있다. 하지만, 실제 의학에서 치료에 적용할 만큼 충분한 양의 골아세포를 얻는 데는 여러 가지 문제들이 존재한다. 즉, 충분한 양의 줄기세포를 얻는 문제, 자극이나 항진제 등의 분화 유도 인자들과 같은 배양 조건의 정립 등이 이에 속한다. 본 연구에서 사용된 중간엽 줄기세포는 이미 성장한 신체조직, 즉 골수에서 추출한 것으로 윤리적 논쟁에서 벗어날 수 있고, 자가이

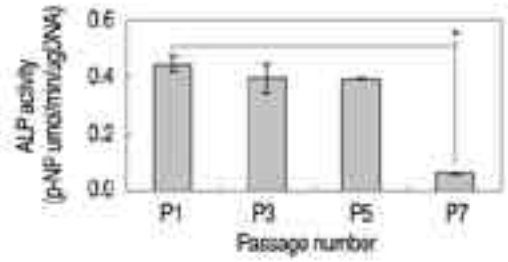

Fig. 5. Analysis of osteogenic MSCs by alkaline phosphatase (ALP) activity. During osteogenic differentiation, ALP acitivity increased with time, but significantly decreased in correlation with serial subculture (*p=0.01, vs. passage 1).

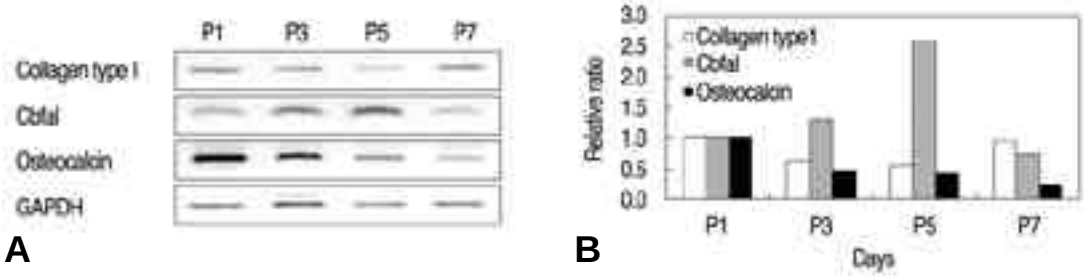

Fig. 4. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of osteogenic MSCs. The serially subcultured human MSCs were cultured in osteogenic medium for 14days. (**A**) Equal aliguots of total RNA were reverse transcribed and amplified with oligonucleotide primers specific for collagen type 1, cbfa1/runx2, and osteocalcin, respectively. (**B**) Based on quantification relative to GAPDH, mRNA levels of the osteoblast gene markers gradually decreased in correlation with serial subculture.

식을 함으로써 면역적인 문제를 줄일 수 있다는 장점이 있어 다양한 분야에서 이용되고 있으나 충분한 양의 세포를 얻는데 어려움이 있다. 또한, 다양한 배양 조건하에서 지속적인 계대 배양을 통해 충분한 양의 세포를 얻을 수 있을지라도 중간엽 줄기세포의 다분화능이 영향을 받을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화에 사용된 많은 방법들을 토대로 하여 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능의 변화를 비교하였다. 기존에 보고된 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화에 관한 연구들과 차별화한 점은 계대 배양 과정, 즉 배양시간, 세포 농도, 배양액 교체 등을 일정하게 유지시킨 다음 계대 배양을 통해 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포를 액체질소에 냉동 보관한 후 동시에 분화 유도 및 분석을 시행하였다는 것이다.

실험 결과, 중간엽 줄기세포가 배양 초기에는 크기가 작고 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 과립이 적지만 계대 배양을 거치면서 크고 넓적한 형태로 변하면서 과립이 많아지는 것을 확인하였고, 증식력 역시 계대 배양에 의해 점차 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능도 차이가 있음을 확인하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 골아세포의 특이 표지자인cbfa1/runx2, osteocalcin등의 mRNA 발현이 계대 배양에 의해 점차 감소하는 것을 확인하였고, ALP 활성도 역시 계대 배양에 의해 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 특이염색 (ALP 나 Alizarin red) 결과에서도 분화가 진행될수록 ALP와 Alizarin red가 강하게 염색이 되는 반면, 계대 배양에 의해 그 염색 정도가 점차 감소하는 것을 확인하였다. 이는 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화에서 계대 배양의 영향을 받지 않는다는 Conget & Minguell의 보고[5]와 계대 배양에 따른 중간엽

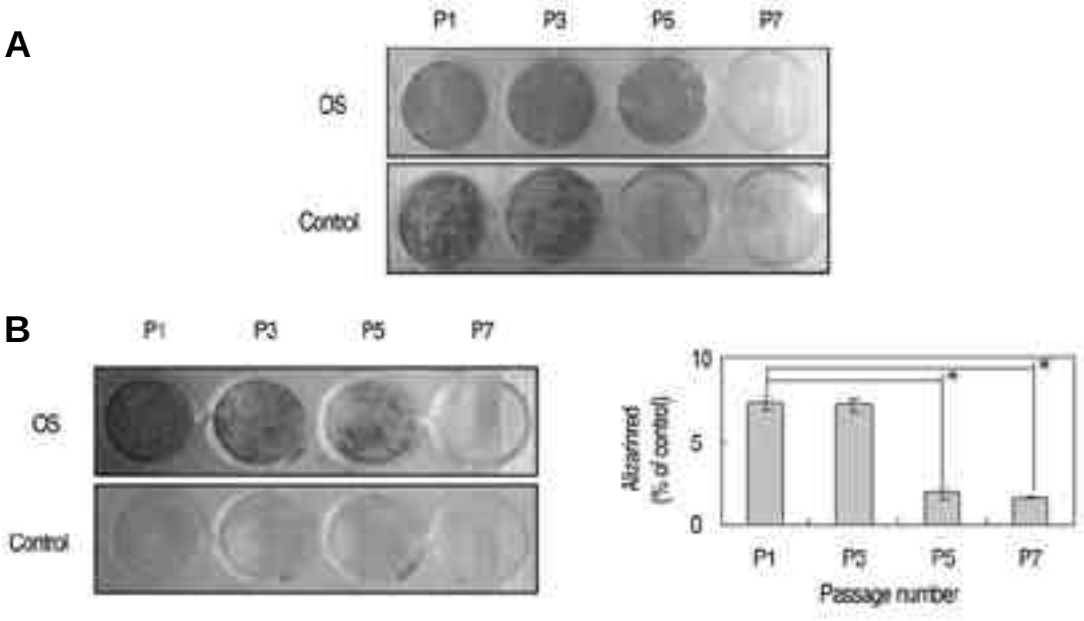

Fig. 6. Analysis of osteogenic MSCs by histochemical staining. The serially subcultured human MSCs were cultured for 14 days in basal medium or osteogenic medium. Fixed cells were stained with ALP or Alizarin red reagents and photographed. During osteogenic differentiation, ALP (**A**) and Alizarin red (**B**) staining were significantly decreased in correlation with serial subculture (*$p<0.05$, vs. passage 1). The intensity of Alizarin red staining was determined by optical density measurement. The fold induction is expressed relative to control cultures (mean ±SD).

줄기세포의 골아세포로의 분화능에는 차이가 거의 없다는 Bruder등의 보고[1]와 일치하지 않는다는 것을 알 수 있다. 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 증식과 분화능은 계대 배양 과정에 관련된 여러 조건에 의해 영향을 받을 것으로 사료되나, 기존에 발표된 연구에서는 계대 배양 과정에 관한 자세한 내용이 언급되지 않아 쉽게 결론을 지을 수 없는 상황이다.

또한, 중간엽 줄기세포가 telomerase 형질 도입[13], 세포외기질[8], 그리고 기타 성장 인자 처리 등의 다양한 방법을 통해 제한된 증식력을 향상시키는게 가능하나, 반복적인 계대 배양에 의해 분화능이 영향을 받는다고 보고되었다. 이는 중간엽 줄기세포 자체의 생물학적 이해가 부족한 상황에서 다양한 방법을 이용하여 충분한 양의 세포를 얻는다 하더라도, 계대 배양에 의해 야기되는 분화능의 감소를 해결하지 못한다는 것을 보여준다.

본 연구에서도 중간엽 줄기세포를 일정한 간격으로 계대 배양시켜 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포의 증식력과 골아세포로의 분화능의 변화를 확인한 결과, 제 5 계대 이후 중간엽 줄기세포의 증식력과 분화능이 점차 감소하는 것을 확인하였다. 앞으로 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능의 감소와 관련된 인자에 대한 연구를 통해 중간엽 줄기세포의 증식 및 분화능에 관한 생물학적 이해를 돕고자 한다.

결 론

일정한 간격으로 계대 배양을 시켜 얻은 각 계대별 중간엽 줄기세포는 제 5 계대 이후 세포 자체의 증식력뿐만 아니라 골아세포로의 분화능이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 계대 배양이 증식과 분화와 같은 중간엽 줄기세포의 성질 변화에 관여하는 다양한 인자들 중 하나라고 사료된다. 나아가 in vitro상에서의 연구나 임상적으로 골 결손등의 치료를 위한 중간엽 줄기세포의 이식 등을 위해 필요한 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화능을 최대로 이끄는데 중요한 정보가 될 것이라 사료된다.

REFERENCES

1) **Bruder SP, Jaiswal N and Haynesworth SE**: Growth kinetics, self-renewal, and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J cell Biochem*, 64:278-294, 1997.

2) **Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM and Kadiyala S**: The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 80(7):985-996, 1998.

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. *Proc Natl Acad Sci*, 98:7841-7845, 2001.

4) **Conget PA and Minguell JJ**: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 181: 67-73, 1999.

5) **Deans RJ, Moseley AB**: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 28:875-884, 2000.

6) **Digirolamo CM, Stokes 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 differentiate. *Br J Haematol*, 107:275-281, 1999.

7) **Huibregtse BA, Johnstone B, Goldberg VM and Caplan AI**: Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Ortho Res*, 18:18-24, 2000.

8) **Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H et al**: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 313:503-508, 2004.

9) **Mets T, Verdonk G**: In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev*, 16:81-89, 1981.
10) **Muschler GF, Nitto H, Boehm CA and Easley KA**: Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Ortho Res*, 19:117-125, 2001.
11) **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*, 75:424-436, 1999.
12) **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al**: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-146, 1999.
13) **Shi S, Gronthos S, Chen S et al**: Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*, 20:587-591, 2002.
14) **Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E. et al**: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 288:413-419, 2001.
15) **Wakitani S, Goto T, Pineda SJ et al**: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 76:579-592, 1994.