

## CD34 양성 세포로부터 내피기원세포 분화 유도 실험

김현옥, 박광일, 신정원\*, 김문정\*\*, 서동희\*\*

연세대학교 의과대학 진단검사의학과학교실, 순천향대학교 서울병원 진단검사의학과\*, 대한적십자사 혈액사업본부\*\*

= Abstract =

### Experimental culture condition for endothelial and their progenitor cells from CD34+ hematopoietic stem cells

Hyun Ok Kim, Kwang-Il Park, Jeong Won Shin\*, Moon Jeong Kim\*\*, Dong-hee Seo\*\*

*Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyung University Hospital\*, Blood Services Bureau\*\*, Korean Red Cross, Seoul Korea*

**Background :** The concept of "neovascularization", which was first applied to describe the pathogenesis of diseases such as diabetic retinopathy or rheumatoid arthritis, has been extended to other fields of study such as myocardial ischemia and tumorigenesis. Endothelial progenitor cells (EPCs), play a critical role in neovascularization and have been reported to also be capable of colonizing vascular grafts. In this study, EPCs were isolated from cord blood, peripheral blood and bone marrow, and then cultured. Various cytokines, such as vascular endothelial growth factor(VEGF), Insulin growth factor(IGF), endothelial growth factor(EGF) fibroblast growth factor-basic(FGF-b), stem cell factor(SCF), flt3-ligand(FL), and thrombopoietin(TPO) were added to the cultures and observed for their effects on endothelial cells for their potential use in antineoplastic therapy or treatment of regional ischemia.

**Methods :** The mononuclear cells (MNCs) were isolated from cord blood, peripheral blood buffy coat, and bone marrow. They were collected from healthy donors using Ficoll-Hypaque. CD34+ cells were isolated by MACS system. To evaluate the effect of various cytokines, purified CD34+ cells were cultured under conditions of various cytokine combinations including SCF, Fl, TPO, VEGF, EGF, IGF, and FGF-b. After four weeks of culture, umbilical cord blood and bone-marrow derived adherent cells were analyzed for endothelial markers by immunohistochemical stain.

**Results :** Cultured adherent cells expressed the endothelial specific markers, such as KDR, CD34, CD31, CD62E, and CD cadherin but did not express vWF antigen. Typical morphology of endothelial cells was observed, such as the cord-like structure and cobblestone appearance during the culture period, which suggested that the adherent cells were consistent with endothelial cells.

**Conclusion :** We described the experimental conditions in which endothelial progenitors were differentiated from CD34+ cells isolated from three hematopoietic stem cell sources: bone marrow, peripheral blood and cord blood. (**Korean J Blood Transfusion 15(2) : 220~230, 2004**)

**Key words:** cord blood, bone marrow cells, peripheral blood, endothelial progenitor cells, differentiation, CD34+ cells

책임저자 : 김 현 옥 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교 의과대학 진단검사의학과학교실  
TEL:02)361-5864, FAX:02)313-0956, E-mail:hyunok1019@yumc.yonsei.ac.kr

\* 본 논문은 1999년도 연세대학교 학술연구비 (1999-1-0093)지원에 의하여 이루어졌음.

## 서 론

조혈모세포를 이용한 신생혈관 형성에 관한 연구는 허혈성 질환의 개선과, 손상된 혈관의 치유, 암 전이 등의 연구에 그 적용 분야가 넓어지고 있다.<sup>1-3)</sup> 또한 혈관형성(angiogenesis)과 맥관형성(vasculogenesis)을 유도하는 내피기원세포는 CD34 항원과 vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2), fetal liver kinase-1 (Flk-1/KDR), Tie-1, Tie-2 등의 항원을 발현하고 있어 배아혈관모세포로부터 분화 과정 중 조혈모세포와 서로 깊은 연관성이 있을 것으로 추측되고 있다.<sup>4,6)</sup> 그러나 조혈모세포는 정상 골수의 1~3%, 정상 말초혈액의 0.001~0.1%에 불과하고,<sup>7,8)</sup> 내피기원세포는 이런 조혈모세포의 1% 내외이므로 치료에 이용하기 위한 충분한 양의 내피기원세포를 얻기 위해서는 이 세포를 분리하고 배양하는 기술의 개발이 선행되어야 한다. 즉, 내피기원세포의 대량 공급을 위한 체외 배양법이 확립된다면 허혈성 질환에서 새로운 신생혈관치료법을 제시할 수 있으며, 중앙, 혈관중, 건선, 증식성 망막당증, 또는 면역질환에서의 병적인 신생혈관증 치료에 신생혈관 형성 억제제를 유도하거나 또는 이를 위한 약제 개발에 의학적인 이론과 기술을 제공할 수 있어 임상적 적용 범위는 더욱 확대될 수 있을 것이다.

조혈모세포원으로 최근 가장 많이 이용되어 온 것은 골수이다. 그러나 1997년 Asahara 등<sup>4)</sup>이 말초혈액으로부터 내피기원세포를 분리, 배양하는 방법을 처음 소개한 후 최근에는 말초혈액이나 제대혈로부터 내피기원세포를 분리하여 내피세포 분화를 유도하는 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 말초혈액이나 제대혈 내에는 내피기원세포의 수가 워낙 적어 배양에 한계가 있기 때문에 연구자마다 그 결과에 많은 차이를 보이고 있다.<sup>5,6)</sup> 제대혈에는 말초혈액보다 조혈전구세포의 수가 약 20배 정도 많은 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 이에 본

연구에서는 제대혈, 골수, 말초혈액에서 추출한 조혈모세포에서 단클론항체를 이용하여 CD34 양성 세포를 분리한 후 이를 조혈 인자를 첨가한 배지에서 증폭시키고 여기에 혈관 조성인자를 첨가하여 최적의 내피기원세포 분리 및 증폭을 유도하는 배양 방법을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

자연 분만한 산모로부터 신생아가 분만된 뒤 제대를 이중으로 결찰하고 소독한 후 제대를 절단하고 태반이 만출되기 전 제대 정맥에 CPDA-1이 25 mL 포함된 제대혈 채집백(녹십자, 서울)의 바늘을 주입하여 중력과 자궁수축에 의해 흘러내리는 제대혈을 채취하였다(n=20). 말초혈액은 건강한 헌혈자로부터 400 mL 전혈을 헌혈받은 후 원침하여 혈소판 풍부혈장을 다른 빈 백으로 옮기고 백혈구 연층(buffy coat) 부분의 10~15 mL를 다른 빈 백으로 옮겨 백혈구 농축액을 제조하여 실험하였다(n=10). 골수 농축액은 동종 골수이식을 위한 건강한 골수 농축액 공여자로부터 채취한 골수 중 그 일부를 얻어 사용하였다(n=5).

### 2. 단핵구 분리

채취 후 6시간 내에 조혈모세포 농축액을 Hank's balanced salt solution (HBSS) (Bio-Whittaker, Grand Island, NY)으로 2배 희석한 후, 희석된 조혈모세포 농축액에 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 동량 넣고 900 x g로 실온에서 20분간 원심 분리하여 단핵구를 분리하였다. 분리된 단핵구는 50 mL HBSS로 2회 세척한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다. 세척이 끝난 단핵구는 0.5% bovine serum albumin (BSA)을 함유하는

phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)에 부유하였다. 골수인 경우 단핵구를 분리한 후 HBSS로 두차례 세척 후  $5 \times 10^8$ 의 유핵 세포를 10% FCS, 1000 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin과 2 mM L-glutamine을 함유하는 M199 배양액에 부유시키고, 이를 petridish에서 overnight 배양하여 부착성 세포를 제거한 후 단핵구를 체외 배양에 사용하였으며, 말초혈액과 제대혈은 단핵구를 그대로 체외배양에 사용하였다.

### 3. CD34 양성세포 분리 및 유세포 분석기를 이용한 세포 순수도 측정

High-grade magnetic field와 mini-MACS column (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)을 사용하여 CD34 양성 세포를 분리하였다. 즉, Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 분리한 단핵구를 HBSS로 3회 세척하고 MACS buffer (PBS/0.5% BSA, 5 mM EDTA) 300  $\mu$ L에 세포수를  $1 \times 10^8$ 으로 맞추어 부유시킨 후, human IgG (blocking antibody)와 MACS microbead가 붙어있는 변형된 anti-CD34 단세포군 항체(mouse IgG<sub>1</sub>)(Miltenyi Biotec, Bergish-Gladbach, Germany)를 각각 100  $\mu$ L 씩 첨가하여 냉장 온도에서 30분간 반응시킨 후 20 mL의 MACS 세척 완충액(PBS/5mM EDTA)을 첨가하고 원침하여 세척하였다. 단, 말초혈액에서는 anti-CD34 단세포군 항체를  $1 \times 10^8$  세포수 당 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 세척 후  $1 \times 10^8$ 개의 세포를 MACS buffer 500  $\mu$ L에 재부유하고 이를 미리 준비한 magnetic sorting system (MiniMACS™, Miltenyi Biotec)의 column 에 투입한 후 MACS 세척 완충액 1~2 mL를 천천히 추가하면서 통과시켜 세척하였고, magnetic field에서 떼어 낸 column에 1 mL의 세척액을 첨가하고 피스톤으로 압력을 가해 분리된 세포를 회수한 후 이를 다

시 새로운 column에 투과시켜 분리 작업을 1회 더 반복하였다. 이렇게 분리된 세포의 일부는 순수도를 측정하기 위해 CD34-FITC 및 CD38-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA)로 염색하여 유세포분석기를 이용하여 세포 순수도를 분석하였으며 나머지 세포로는 세포 배양을 시작하였다.

### 4. 내피기원세포로의 분화유도

Fibronectin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)으로 20°C에서 2시간 코팅한 48-well 플레이트에서 일단 CD34 양성세포를 증폭시키기 위해 stem cell factor (SCF) (Endogen, Woburn, MA, USA) 10 ng/mL, FLT-3 ligand (FL) (PeproTEch Inc., Rocky Hill, NJ, USA) 10 ng/mL 및 thrombopoietin (TPO) (PeproTEch Inc.) 5 ng/mL에 내피기원세포 유도 싸이토카인인 vascular endothelial growth factor (VEGF) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 10 ng/mL, fibroblast growth factor-basic (FGF-b) (Leinco Tech., St Louis, MO, USA) 5 ng/mL, insulin growth factor (IGF) 10 ng/mL, endothelial growth factor (EGF, 2 ng/mL)를 기본 조합으로 하여 세포 분화를 유도하였다. 배양 3일째 비 부착 세포를 회수하여 다시 fibronectin으로 코팅된 microplate에 위와 동일한 방법으로 배양하였고, 남겨진 부착 세포는 동일한 싸이토카인을 함유하는 배지를 새로 추가하여 3일간 추가 배양하였다. 배양 6일째부터는 모든 비부착 세포를 배양액과 함께 제거하고 남겨진 부착 세포를 VEGF 10 ng/mL, FGF-b 5 ng/mL, IGF 10 ng/mL, EGF 2 ng/mL 만을 함유하는 새로운 배지로 배양하였다. 배지는 매 3일 간격으로 이들 싸이토카인을 함유하는 배지로 완전 교체하였다. 배양 용기의 표면이 내피세포로 80% 이상 채워지면 배지를 제거하고 0.25% trypsin-EDTA (Gibco-BRL)을 첨가하여 세포를 플레이트 표면으로부터 유리시킨 다

음 회수하여 1회 세척한 후 세포 수를 측정하고 다시 6 well 플레이트 또는 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에서 배양하였다. 배양된 세포의 형태 및 상태는 위상차현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였다.

## 6. 면역조직화학염색

배양된 세포의 표지자 분석을 위해서는 2주 배양 후 trypsin 처리로 세포를 플레이트 표면으로부터 유리시켜 회수된 세포를 chamber slide에 옮겨 1-2일 배양 후 면역조직화학염색을 하였다. 4℃로 차게 한 acetone과 methanol을 1:1로 동량 섞어 만든 용액에 10분간 처리하여 함수시키고 PBS로 세척하였다. 세포 내에 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 peroxidase blocking reagent (Dako LSAB<sup>®</sup>2 System, Dako Co., Carpinteria, CA, USA)에 슬라이드를 10분간 방치 후 3회 세척 후 protein block serum-free reagent (Dako)에 5분 방치하였다. 배양된 내피기원세포를 확인하기 위하여 anti-CD34, anti-KDR, anti-vWF, anti-CD62E, anti-cadherin, anti-CD31 단클론 항체를 사용하였다. 각각 일차항체 희석액에 실온에서 30분간 또는 냉장 온도에서 하룻밤을 반응시킨 후, 상품화된 시약(Dako)을 사용하여 biotin-labelled 면역글로불린(Link antibody)을 20분, streptavidin이 결합된 HRP (horseradish peroxidase)를 각각 20분간 반응시킨 후 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Dako Co., Carpinteria, CA)로 발색시킨 후 Meyer's hematoxylin으로 대조염색하고 광학현미경으로 관찰하였다. 염색의 판독은 세포질내나 세포막의 항원에 염색이 된 경우에 양성으로 판독하였다.

## 결 과

### 1. 골수, 제대혈, 가동화된 말초조혈모세포에서의 CD34 양성 세포수와 회수율

제대혈에서 분리된 단핵구수는  $2.25 \times 10^8$  (0.85~5.36 x 10<sup>8</sup>)개이었으며, MACS system에서 회수된 CD34 양성 세포수는  $1.17 \times 10^5$  개 (0.16~5.51 x 10<sup>5</sup>)로 총 단핵구의 평균 0.59% (0.1~2.62%)이었다. CD34+ 양성세포의 순수도는 80~85% 내외였다. 말초조혈모세포에서의 MACS system에서의 회수율은 총 유허 세포수의 0.1~0.15% 범위였으며 순수도는 65% 내외였고, 골수에서의 회수율은 4%, 순수도는 70% 내외였다.

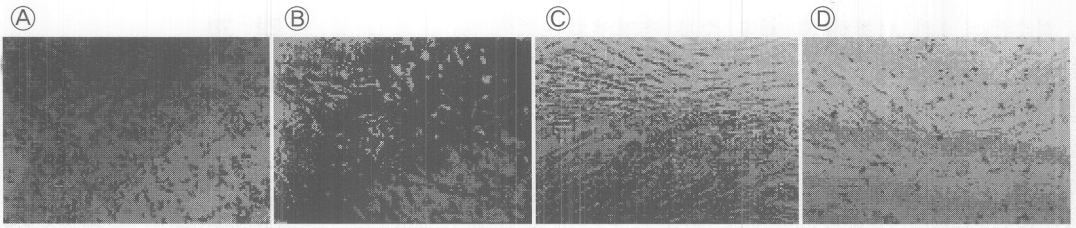
### 2. 내피기원세포의 배양 조건 확립

CD34 양성 조혈모세포의 증폭을 위해 1차 배양에서 시도한 TPO, SCF, FLT-3 ligand 첨가가 내피기원세포의 수를 증폭시키는 효과는 관찰되지 않았으며 최적의 내피기원세포의 배양시 싸이토카인으로는 VEGF, EGF, FGF-b, IGF-1 첨가배지에서 가장 잘 증식하였다. 배양 매디아는 M199 배지에 싸이토카인을 첨가하여 사용하는 배지가 구입한 EBM (Clonetics, USA) 배지보다 배양이 더 잘되는 양상이 관찰되어 최종 연구에는 기본 배지로 M199 배지를 사용하였다.

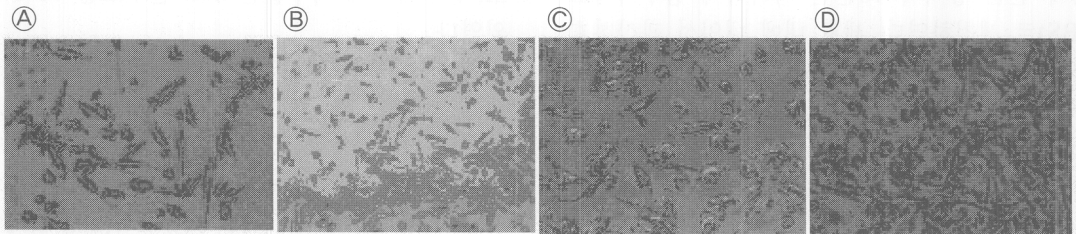
### 3. 내피기원세포의 배양결과

#### 1) 골수 농축액

CD34 양성 세포를 분리하여 단독 배양한 경우 세포 배양 2-3일부터 방추형의 부착세포가 관찰되었으며 일차배양시기로부터 약 1주일 정도 지나면 50~60% 세포가 바닥에 붙어 채워지기 시작하였다. 세포 모양은 섬유모세포와 유사한 방추형



**Fig. 1.** Phase contrast microscopy images that demonstrated different characteristics in cultured CD34+ bone marrow stem cells (A, B) and cocultured CD34+ stem cells with CD34- bone marrow mononuclear cells. (A) After 3 days in primary culture, the spindle shape adherent cells were occasionally founded. (B) After 14 days in culture, about 60-70% of adhesion cells were observed in spindle shape in culture plate. (C) Coculture of bone marrow CD34+ cells and CD34- mononuclear cells in 1:1 ratio. After 7days in culture, the spindle shaped adherent cells are all covered in culture plate. (D) The characteristic images of endothelial progenitor like cells after 14 days in culture (unstained x 100).

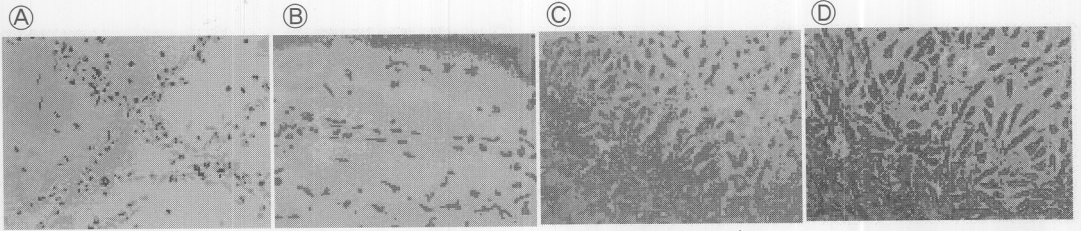


**Fig. 2.** Phase contrast microscopy images that demonstrated different characteristics in cultured CD34+ peripheral blood stem cells (A,B) and cocultured CD34+ peripheral stem cells with CD34- peripheral monocytes (C,D). The figure shows after 7 days (A, C), 14 days in culture (B, D) (unstained, x 100).

이지만 그보다는 크기가 크고 길쭉한 형태의 세포가 관찰되었다(Fig. 1, A, B). 그러나 골수로부터 얻은 단핵구를 1일간 fibronectin이 없는 플레이트에서 하룻밤 배양한 후 바닥에 붙지 않은 상층의 단핵구와 CD34 양성 세포를 1:1 동량으로 섞어 같이 배양하면 약 1주일 이내에 길쭉한 모양의 방추형의 세포가 더 빨리 증폭되어 바닥에 80~90%이상 채워지기 시작하였으며, 2주 경에는 cobblestone 모양의 내피기원세포와 유사한 형태의 세포가 현저히 증가하였다(Fig. 1, C, D).

## 2) 말초혈액

CD34 양성 세포의 배양 1주일까지는 방추형 모양의 부착성 내피기원 세포가 증가됨이 확인되지만 그 이후에는 더 이상 세포수가 증가하지 않고 세포들은 점차로 소실되는 양상이 관찰되었다(n=10). 그러나 말초혈액 유래 CD34양성 세포와 단핵구(CD34- 세포)와 1:1 공배양하면 세포의 형태는 다양한 모양으로 관찰되지만 시간이 지남에 따라 세포수가 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).



**Fig. 3.** Phase contrast microscopy images that demonstrated different characteristics of CD34+ cord blood stem cells. After 7-10 days, cord like structure resembling the first stages of vasculogenesis were occurred in vitro culture (A, B). Typical characteristics of endothelial cobblestone appearance were founded after 28 days in culture (C, D).

### 3) 제대혈

CD34+ 세포의 배양 결과 골수농축액이나 말초혈액에서 추출한 세포와 비교하여 배양 초기에는 둥근 모양의 세포들이 작은 군집을 형성하고 배양 1주일 이상이 지나야 길쭉한 모양의 부착 세포가 관찰되기 시작하였다. 일차배양 1주 후 몇 개의 검체에서 초기 맥관 형성에서 관찰되는 형태와 비슷한 cord-like structure를 이루면서 증식하였고 배양 4주경에는 내피세포의 특징적인 형태인 cobblestone 모양을 보였다. 그러나 제대혈은 검체에 따라 세포집락 형성이 다양하였으며 4주까지 배양하여 cobblestone 모양의 전형적인 내피 세포 형태를 관찰할 수 있었던 경우는 1예로서 제대혈로부터 내피기원세포로 추정되는 부착세포를 관찰할 수 있었다. 초기 제대혈 배양시 관찰되는 작은 군집수와 line formation, cobblestone 모양으로의 변화에는 4주 배양 후 부착세포로의 분화와는 서로 상관 관계를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

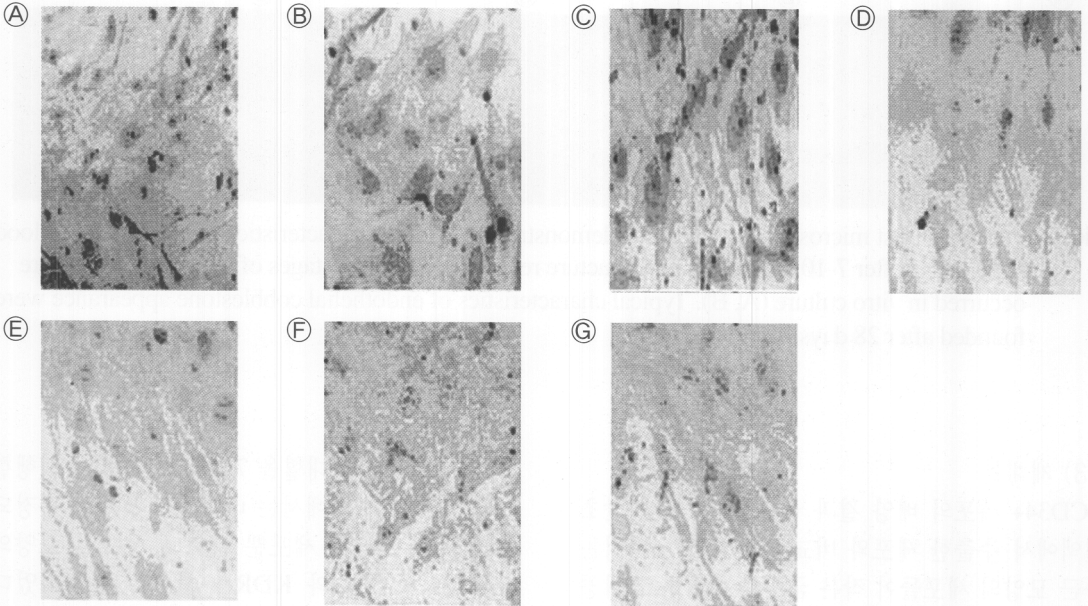
### 4. 면역조직화학염색 결과

골수농축액을 7일간 배양한 후 시행한 면역조직화학염색에서는 CD34 항원과 KDR에는 강한 양성 반응을 보였으며 CD62E, CD31, CD144 (cadherin)에는 약양성, vWF에서는 음성 반응을

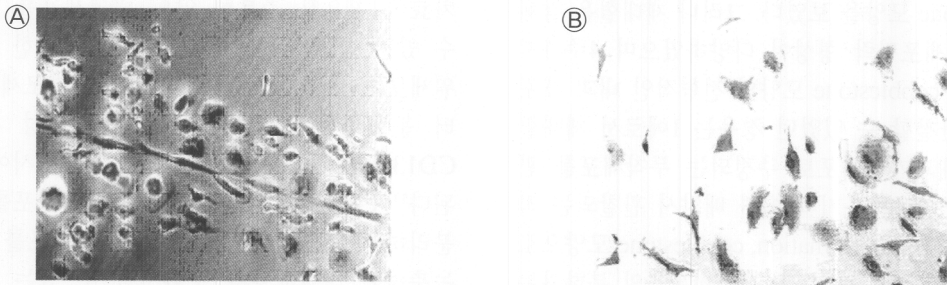
보였다(Fig. 4). 제대혈을 7일간 배양한 후 시행한 면역조직화학염색에서는 내피기원 세포로 추정되는 방추형 모양의 세포뿐 아니라, 둥그런 모양의 단핵구도 CD34 와 KDR 양성으로 염색되었다(Fig. 5).

### 고 찰

본 연구의 목적은 사람의 조혈모세포원으로부터 내피기원세포를 유도하여 혈관재생이나 세포 치료에 필요한 충분한 양의 내피세포를 공급할 수 있는 방법을 개발하는데 있었다. 또한 내피기원세포가 조혈모세포와 같은 배아혈관모세포로부터 분화한다는 보고<sup>10)</sup>와 CD34 양성 세포와 CD133 양성 세포가 80% 이상에서 동시에 발현된다<sup>5,11)</sup>는 보고에 따라 CD34 양성 세포를 순수 분리하여 배양하는 경우 내피기원세포를 좀 더 농축하여 내피세포로 분화시킬 수 있는 확률이 높을 것이라는 가정 하에 연구를 진행하였다. 골수를 배양하는 경우 배양 초기부터 3-5일 내에 길쭉한 모양의 방추형의 부착세포를 관찰할 수 있었으며, 말초혈액에서는 약 1주일 경부터, 제대혈은 초기에는 작은 군집을 형성하다가 그 이후 배양 세포의 약 10% 내외에서 초기 맥관형성 과정에서 관찰되는 형태와 비슷한 cord-like structure를 형성하면서 자라는 모양을 관찰할 수 있었다.



**Fig. 4.** Immunohistochemical staining of cultured CD34+ bone marrow stem cells after 7 days in vitro culture. DAKO DAB with biotinylated secondary antibody showed those spindle shape adherent cells which were strong immunoreactive to CD34 (B), KDR (C), and weak reactive to CD62 (D), CD31 (E), CD144 (Cadherin, F) and von Willebrand factor(G). Control is (A).



**Fig. 5.** Immunohistochemical staining of cultured cord blood cells after 7 days in vitro culture. DAKO DAB with biotinylated secondary antibody showed those elongated adherent cells which were immunoreactive to CD34(A) and KDR(B).

그러나 말초혈액 유래 CD34 양성세포는 2주 이상 체외배양이 되지 않았으며, 제대혈 유래 CD34 양성세포도 초기에 관찰된 부착세포에서 체외 배

양 4주까지 계속 증식하여 내피기원세포로 추정되는 부착세포를 관찰할 수 있던 것은 1예 뿐이었다. 위의 결과는 혈액 질환에서 골수 이식술시

조혈모세포원으로 골수나 G-CSF로 가동화한 말초조혈모세포로 이식하는 경우보다 제대혈을 사용하는 경우 골수 생착이 늦게 나타나는 것처럼<sup>12)</sup> 제대혈에 좀더 미성숙한 조혈모세포가 있어 분화 과정이 더 길기 때문일 것으로 생각되었고 또한 말초혈액과 제대혈내에는 극히 소량의 내피기원세포가 존재하기 때문에 내피세포로의 분리, 분화 유도가 쉽지 않음을 다시 확인할 수 있는 결과로 해석되었다. 내피세포로 분화되면서 초기에 나타나는 내피세포의 receptor는 VEGF receptor-1, -2, vascular endothelial cadherin, CD31, tie-1, tie-2 와 CD34이다.<sup>13)</sup> 본 연구에서도 방추형 모양의 부착세포들이 CD34와 VEGFR-2 (KDR) 염색에 강한 양성반응을 보이면서 cadherin, CD31 단클론항체 염색에서는 약한 양성을 보여 골수의 기질세포(stromal cell)의 성상은 보이지 않았으며 내피세포보다는 내피기원세포임을 확인할 수 있었고 특히 골수에서 쉽게 볼 수 있는 기질세포(stromal cell)의 혼입부분에 대해서도 배제할 수 있었다. 특히 배양 세포들이 VEGFR-2 (KDR)에 강한 양성을 보인 것은 더욱 맥관형성을 형성하는 과정의 미성숙 내피세포임을 뒷받침하는 증거로 추정할 수 있었다. 그러나 내피세포의 표지자인 von Willebrand factor에 대해서는 전반적으로 +/-의 양상을 보였다. 이는 내피기원세포에서 내피세포로 분화하는 과정 중에 발현이 강해져야 하나 2주 이상 세포가 배양되는 경우 세포의 상태가 나빠지면서 일부의 세포에서 항원이 소실되는 현상을 보였기 때문에, factor VIII에 대한 약한 반응을 세포의 노화에 따른 소실로 해석하였다.<sup>14,15)</sup> 세포 배양 과정 중 부착세포를 형성한 골수농축액인 경우 세포수가 증가하였으나 말초혈액에서 나타난 부착세포는 1주일 이 지나면서 그 수가 증가하지 않다가 2주경부터는 세포의 주변이 불규칙해지면서 소멸되어 가는 양상으로 관찰되었다. 이는 말초혈액 내의 조혈모세포 유래 세포는 골수에 비해 좀 더 분화된 경우이므로 외부

에서 넣어준 사이토카인에 민감하게 반응하여 빠르게 내피세포로 변형을 보이지만, 2주 후부터는 급격히 세포소멸이 관찰되어 본 연구에서 사용한 조건은 장기 배양에 적합하지 않은 것으로 생각되었다. 따라서 장기배양을 위해서는 특별한 유도 물질의 첨가나 조혈미세환경 조성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 제대혈에서의 부착세포 발현은 상당히 늦어 일차배양 후 약 2주가 지나야 일부 제대혈 검체에서 일렬로 세포가 늘어 서서 자라는 형태를 관찰할 수 있었다. 또한 많은 제대혈 검체에서 부착세포가 자라는 비율이 훨씬 적었다. 이는 제대혈에 따른 성상의 차이로 생각되며 제대혈 내에 포함된 내피기원세포 수가 큰 영향을 미칠 것으로 추정되어 제대혈 채취 시기 및 분만 주수와 깊은 연관이 있을 것으로 생각되며, 제대혈로부터 내피세포 군집 형성에 대해서는 골수나 말초혈액과는 다른 배양 조건 수립이 필요할 것으로 생각되었다.

최근 CD34 항원 발현 자체가 배양시 내피세포로의 분화에 down-regulation 한다는 것이 알려지면서<sup>16)</sup> 본 연구 진행 중에 CD34 양성 세포가 제거된 단핵구와 같이 공배양하는 조건도 같이 시행하게 되었다. 그 결과 단핵구로부터 나오는 성분이 CD34 양성 세포의 성장을 촉진시키는 것을 관찰할 수 있었으며 오히려 단독으로 CD34 양성 세포가 제거된 단핵구를 배양하는 경우 부착세포의 배양율이 높아 세포 배양에 있어서의 주변 기질 세포의 역할이 중요함을 간접적으로 확인할 수 있었다. 내피전구세포가 말초혈액에 있을 것이라는 추정은 일찍이 Stump 등<sup>17)</sup>에 의해 처음 동물 실험에 의해 제시되었으며 Asahara 등<sup>4)</sup>이 말초혈액에서 내피전구세포를 magnetic bead 방법으로 증명함으로써 인체내에 내피기원세포가 존재한다는 것이 틀림없는 사실로 받아들여지고 있다. 그러나 본 연구 결과 위의 연구자와 동일한 조건하에서 말초혈액이나 제대혈에서 부착 내피기원세포를 분리하는 것은 쉽지 않았다. 이는

최근에 제대혈인 경우 말초혈액에 비해 미분화 줄기세포가 약 20배 정도 많지만<sup>9)</sup> 이 수자도 제대혈내에 포함된 미분화 줄기세포 수(clone forming unit)가 약  $10^8$  단핵구 당 0.7~0.2개 정도로 추정되는 것으로 확인되면서<sup>18)</sup> 본 연구에서 내피기원세포의 존재를 확인하는 것 외에는 조직 재생을 위한 대량 배양에는 성공할 수 없었던 이유는 내피기원세포가 워낙 소량으로 존재하기 때문일 것으로 추정되었다.

결론적으로 본 연구에서는 내피기원세포 유도는 골수 농축액에서 유래한 CD34 양성 세포에서 가장 빨리 그리고 많이 볼 수 있었으며, 또한 말초혈액과 제대혈내에서도 내피기원세포가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 제대혈에서는 같은 조건하에서도 적어도 2주 정도 지나야 내피기원세포와 유사한 모양인 방추형의 세포를 확인할 수 있었고 이 역시 장기간 배양에는 실패율이 높아 내피기원세포의 가장 좋은 조혈모세포원은 골수 농축액으로 생각되었다. 또한 세포 배양시 CD34 음성 단핵구와 같이 배양하는 경우 세 조혈모세포원 모두 세포수의 증가와 부착형 세포 형태의 수가 현저히 더 증가함을 관찰할 수 있어 내피기원세포 배양시 세포와 세포의 접촉 효과 뿐 아니라 배양세포의 미세 환경이 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

## 요 약

**배경 :** 내피기원세포의 대량 공급을 위한 체외 배양법이 확립된다면 허혈성 질환에서 새로운 신생혈관치료법을 제시할 수 있으며, 중앙, 혈관중, 건선, 증식성 망막당증, 또는 면역질환에서의 병적인 신생혈관증 치료에 신생혈관 형성 억제를 유도하거나 또는 이를 위한 약제 개발에 의학적인 이론과 기술을 제공할 수 있어 임상적 적용 범위는 더욱 확대될 수 있을 것이다. 이에 내피기원세포가 조혈모세포와 같은 배아혈관모세포로부터

분화한다는 보고에 따라 제대혈, 골수, 말초혈액에서 CD34 양성 세포를 분리한 후 이를 조혈 인자를 첨가한 배지에서 증폭시키고 여기에 혈관조성인자를 첨가하여 최적의 내피기원세포 분리 및 증폭을 유도하는 배양 방법을 확립하고자 하였다.

**방법 :** 자연 분만한 산모로부터 신생아가 분만된 뒤 제대혈 (n=20)을 건강 헌혈자로부터 받은 헌혈혈액 (n=10) 및 건강한 골수 농축액 공여자로부터 채취한 골수 (n=5)를 사용하였으며 CD34 양성 세포는 단클론 항체와 magnetic bead를 사용하여 분리하였다. 내피기원세포로의 분화유도를 위해 stem cell factor, FLT-3 ligand, thrombopoietin, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, insulin growth factor 및 endothelial growth factor를 첨가한 M199 배지를 사용하였다. 배양한 내피기원세포의 성상은 CD34, KDR, CD62E, vWF, cadherin, CD31 항혈청을 사용하여 면역조직화학염색법으로 확인하였다.

**결과 :** 골수 농축액으로부터 분리된 CD34+ 양성 세포는 배양 2~3일부터 방추형의 부착세포가 관찰되었으며 일차배양 시기로부터 약 1주일 정도 지나면 50~60% 세포가 바닥에 붙어 채워지기 시작하였다. 세포 모양은 섬유모세포와 유사한 방추형이지만 그보다는 크기가 크고 길쭉한 형태의 세포가 관찰되었다. 말초혈액 CD34+ 세포의 배양 1주일까지는 방추형 모양의 부착성 내피기원세포가 증가됨이 확인되지만 그 이후에는 더 이상 세포수가 증가하지 않고 세포들은 점차로 소실되는 양상이 관찰되었다. 제대혈 유래 CD34+ 세포는 배양 초기에는 둥근 모양의 세포들이 작은 군집을 형성하고 검체에 따라 세포집락 형성이 다양하였으며 내피 세포형태를 관찰할 수 있는 경우는 20개의 제대혈 배양에서 1 검체에서만 분화유도를 관찰 할 수 있었다. 7일간 배양된 세포는 면역조직화학염색에서는 CD34 항원과



13. Garlanda C, Dejana E, Heterogeneity of endothelial cells : specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1193-202
14. Gehling UM, Erguin 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
15. Johnson TE, Umbenhaue DR, Hill R. Karyotypic and phenotypic changes during in vitro aging of human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992;150:17-27
16. Fina L, Molgaard HV, Robertson D et al Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417-26
17. Stump MM, Jorda GL, Jr, Debakey ME, Halpert B. Endothelium grown from circulating blood on isolated intravascular Dacron. *Am J Pathol* 1963;43:361-7
- 18 Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells* 2004;22:625-34