

제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적
혈구 분화유도와 microarray를 이용한
유전자 발현변화 분석

연세대학교 대학원

의 학 과

김창기

제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적
혈구 분화유도와 microarray를 이용한
유전자 발현변화 분석

지도교수 김 현 옥

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
김창기

김창기의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김현옥 인

심사위원 김현숙 인

심사위원 유철주 인

연세대학교 대학원

2005 년 6 월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어서 많은 지도편달과 가르침을 주신 김현옥 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 microarray를 본 연구에 적용할 수 있도록 도움을 주신 라선영 조교수님과 세포배양을 도와준 이민선 연구원에게 심심한 사의를 전합니다.

항상 애정 어린 관심과 지도를 주신 김현숙 교수님과 진료와 교육으로 바쁘신 와중에도 도움 말씀을 주신 소아과 유철주 부교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 끝으로 언제나 힘이 되어준 부모님께도 감사의 마음을 전합니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	4
1. 제대혈 채집	4
2. 조혈모세포 분리	4
3. 배양	5
4. 유세포 분석	6
5. 배양세포의 유전자 microarray 분석	6
가. RNA 추출	6
나. RNA 증폭	6
(1) 첫 번째 cDNA strand 합성	6
(2) 두 번째 CDNA strand 합성	7
(3) 체외전사	7
다. RNA labeling과 교잡반응	8
라. 이미지 스캔 및 자료 분석	8
III. 결과	8
1. 제대혈 조혈모세포 분리 및 배양	8
가. CD34 양성세포의 순수분리 결과	8
나. 적혈구 분화유도배양에 있어서 EPO의 효과	9
2. 면역표현형의 변화	11
3. 배양세포의 유전자 프로파일 분석	12
IV. 고찰	15
V. 결론	17
참고문헌	19
영문요약	22

그림 차례

그림 1. Mini-MACS를 이용하여 분리한 제대혈 유래 CD34 양성세포의 면역표현형	11
그림 2. 배양 조건에 따른 제대혈 CD34 양성세포의 증식정도 비교.....	12
그림 3. 배양 기간에 따른 배양 세포의 형태적 변화 ...	13
그림 4. 배양 7일 세포와 배양 14일 세포에서 차이를 보이는 125개 유전자의 hierarchical clustering	15
그림 5. 적혈구 생성과 관련이 있는 유전자 항목들에 대한 개별분석	17

표 차례

표 1. 배양된 제대혈 유래 CD34 양성세포의 면역표현형의 변화	14
표 2. 통계적 분석 후 배양 7일에 비해 14일 세포에서 발현이 증가한 유전자 항목 리스트	16

국문요약

제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적혈구 분화유도와 microarray를 이용한 유전자 프로파일 분석

적혈구는 골수의 조혈모세포에서 여러 단계를 거쳐 생성되며, erythropoietin (EPO)은 적혈구 생성에서 가장 중요한 성장인자로 알려져 있다. 대부분의 적혈구 분화를 위한 시험관내 배양은 EPO를 첨가하지 않고 조혈모세포의 증식을 촉진하는 단계와 EPO의 자극을 통해 적혈구 분화를 유도하는 단계로 구성된다. 따라서 본 연구에서는 제대혈 유래 조혈모세포로부터 적혈구로 분화시키는 과정에서 EPO를 첨가하는 시기와 농도를 달리하여 첨가하는 방법을 통해 RBC 분화에 미치는 EPO의 효과를 평가하였으며, 연구의 최종목표는 제대혈 유래 CD34 양성 세포로부터 적혈구 분화를 유도하고자 하였다.

건강한 산모의 제대혈에서 Ficoll-Hypaque 및 MACS system을 이용하여 CD34 양성세포를 분리하였으며, 배양은 여러 성장인자의 조합을 달리하여 세 단계로 총 21일간 진행하였다. 배양 첫 1주간은 stem cell factor, Flt-3 ligand, thrombopoietin을 첨가한 배지에서 CD34 양성세포의 증폭을 유도하였으며, EPO는 배양 8일부터 21까지 3 U/mL의 농도로 첨가하였다. 또한 EPO의 농도에 따른 효과를 알아보기 위하여 배양 초기부터 EPO를 0, 3, 10 그리고 20 U/mL의 농도로 첨가하여 배양을 진행하였다. 배양기간 동안 세포의 수와 형태를 관찰하였고 유세포분석기를 이용하여 CD34, CD38, CD45, glycophorin A (GPA)의 표현변화를 측정하였다. 또한 분화과정에서 유전자의 변화를 알아보기 위해서 high density microarray 방법을 이용하여 유전자의 발현 정도를 분석하였다.

세포증식은 모든 배양 조건에서 배양 14일에 가장 높았고 그 이후 감소하기 시작하였다. EPO 농도에 따른 배양 효과를 비교하였을 때, EPO를 20 U/mL 농도로 첨가한 경우에서 세포수가 가장 많이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 3주 배양 시 유헥 적혈구 및 적혈구의 전형적인 세포는 거의 관찰되지 않았으며 유헥세포에서의 GPA의 표현도 낮게 측정되었다. Microarray 분석에서 false discovery rate (FDR)이 0.74%인 유전자는 총 125개였다. 이중 배양 7일에 비해 14일에서 그 발현이 3배 이상 증가한 유전자가 17개 있었으나, 적혈구 분화와는 상관성이 낮은 유전자였다. 그러나 적혈구 분화와 관련이 높은 유전자 항목을 개별적으로 분석한 결과 glycophorin A, Rhesus blood group CcEe antigens, erythrocyte membrane protein band 4.2 그리고 erythropoietin receptor 유전자의 발현이 배양이 진행되면서 증가함을 알 수 있었다.

결론적으로 조혈모세포로부터 적혈구를 생산하고자 할 경우 EPO의 농도와 세포 증식간에는 양의 상관성이 있었다. 또한 배양 초기부터 EPO를 첨가하

는 경우에서 더 많은 세포수가 증가하여 EPO를 후기 배양에 첨가하는 기존 방법보다 우수한 것으로 생각되었다. 그러나 3주 배양이 진행되는 과정에서 적혈구 분화에 관련된 유전자들의 발현은 증가하였으나 배양세포의 형태나 표현형 분석 결과 적혈구 계열 세포보다는 다른 계열 세포로의 분화가 더 많이 관찰되었다. 따라서 적혈구 분화배양의 순수도를 높이기 위하여 성장 인자 조합 외에도 미세 환경 조성과 조혈모세포와 보급세포와의 상호작용 등 적혈구 분화에 미치는 요소에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말: 제대혈, 조혈모세포, CD34 양성세포, erythropoietin, 적혈구

제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적혈구 분화유도와 microarray를 이용한 유전자 프로파일 분석

<지도교수 김현욱>

연세대학교 대학원 의학과

김창기

I. 서론

적혈구는 골수의 조혈모세포로부터 생성되며, 하루 평균 2×10^{11} 의 적혈구가 인체내에서 생성된다.¹ 적혈구는 수혈과 관련하여 가장 많이 사용되고 있는 혈액제제로서 급성출혈, 수술 등 실혈이 있는 경우와 다양한 빈혈의 치료에 이용되고 있다. 그러나 제한된 적혈구의 공급에 비해 혈액에 대한 수요가 증가하고 있고, 수혈로 인한 감염증을 예방하기 위해 헌혈자 문진 강화로 헌혈자 감소하면서 전 세계적으로 혈액 부족사태가 빈번히 발생하고 있다.^{2,3} 그러나 안전한 혈액을 공급하려는 노력에도 불구하고 최근 수혈을 통한 B형 간염, C형 간염, HIV 감염 사례가 사회적으로 큰 파장을 준 바 있다.⁴⁻⁶ 또한 West Nile virus, variant Creutzfeldt-Jakob disease 등의 새로운 병원체로 인한 수혈 전파성 감염이 보고 되고 있다.⁷⁻¹⁰ 따라서 감염의 위험이 없으며 안정적으로 혈액을 공급하기 위한 노력이 모색되어 왔으며, 그 중 하나로 조혈모세포를 배양하여 새로운 혈액의 공급원으로 이용하려는 연구가 시도되었다.^{1,11-21}

조혈모세포에 대한 개념이 부족하였던 과거에는 성인의 골수나 말초혈액에서 분리한 단핵구를 바로 배양에 이용하였다.^{14,19,22} 그러나 조혈모세포의 표지 인자인 CD34에 대한 단클론성 항체가 소개된 후 이를 이용하여 순수한 조혈모세포 분리가 가능하게 되었다.^{12,21,23} 또한 조혈모세포원으로 가장 많이 쓰이는 것은 골수이지만 최근 제대혈의 이용이 늘고 있다.^{24,25} 골수에 비해서 제대혈은 비교적 구하기 쉽고 조혈모세포의 농도가 높으며,^{26,27} 조혈모세포가 보다 더 미성숙하고 증식 능력이 우수하여 배양시간이 짧은 장점이 있어 이를 이용한 세포배양이 활발히 진행되고 있다.^{11,26,28}

적혈구 분화를 위한 조혈모세포의 배양과정은 보통 두 단계로 나누어 진다. 이는 초기 배양에 필요한 성장 인자와 적혈구 분화를 유도하는 성장 인자가 다르기 때문이다.²⁹ Flt3-ligand (Flt3-L), stem cell factor (SCF) 그리고 thrombopoietin (TPO) 등의 성장인자는 다양한 분화능력을 가진 혈액 줄기세포의 성장과 증식을 촉진한다.¹ 이들 중 SCF는 조혈모세포의 초기 성장뿐

아니라 특정 세포의 분화와 성숙을 유지하는데 도움을 준다.¹⁵ 반면 erythropoietin (EPO)은 적혈구 모세포에 대해서 mitogen 의 역할과 성장인자로서 작용하여 적혈구 모세포의 증식과 적혈구로의 분화를 촉진한다.¹ 특히 적혈구 계열이 아닌 다른 혈구들의 분화를 억제하기 위해서는 EPO의 자극이 가장 중요한 것으로 알려져 있다.^{1,11} Sato 등은 조혈모세포배양 중에 다량의 anti-EPO monoclonal antibody를 첨가하여 EPO를 중화시키면 적혈구로의 분화가 억제된다고 보고하였다.¹²

조혈모세포는 다양한 성장인자와 EPO에 의해 적혈구로 분화하게 되고 표현항원에 변화가 발생하게 된다. 적혈구로 분화해가면서 CD34 항원이나 CD45 항원의 표현은 감소하는 양상을 보이며 glycophorin A (GPA)등의 항원은 그 표현이 증가하게 된다.²³ GPA는 적혈구 특이 표지인자이며 분화초기에 급격히 증가해서 후반기까지 계속 유지된다.²³ 따라서 유세포 기법을 이용하여 위의 표지인자를 측정하면 조혈모세포로부터 적혈구 계열의 세포로 분화되는 과정을 분석할 수 있다.

기존의 연구에서는 적혈구 생성을 유도하기 위해 다양한 배양 방법을 이용하였다. 대부분의 경우 배양과정을 EPO에 독립적인 초기와 EPO를 통해 최종 적혈구 분화를 유도하는 후기의 두 단계로 구분하는 유사점이 있다. 그러나 적혈구 분화를 위한 적정 EPO 농도와 배양 초기에 EPO가 미치는 영향에 대해서는 아직 더 연구되어야 할 점이 많다. 따라서 본 연구에서는 제대혈 유래 조혈모세포인 CD34 양성세포를 분리하여 세분화된 배양조건에서 배양하여 적혈구 분화를 유도하고 또한 배양 초기부터 다양한 농도의 EPO를 첨가하는 실험을 병행한 후 유세포 분석과 high-density microarray를 이용하여 배양에 따른 변화를 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 제대혈의 채집

세브란스 병원 분만실에서 정상 분만한 산모로부터 제대혈을 채집하였다. 분만 후 제대를 이중으로 결찰하고 소독한 후 제대를 절단하였으며, 태반이 만출되기 전 제대정맥에서 항응고제 CPDA-1이 25 mL이 포함된 채혈백 (녹십자, 서울, 한국)을 사용하여 제대혈을 채취하였다.

2. 조혈모세포 분리

제대혈백에 있는 제대혈을 50 mL tube에 옮긴 후, Ficoll-Hypaque (비중 1.077, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 density gradient

centrifugation (2500 rpm, 20분)을 통해 단핵구층을 분리하였다. 분리된 단핵구는 phosphate buffered saline (PBS)으로 세 번 세척한 후 PBE (50 mM EDTA와 1% FBS를 포함하는 pH 7.4의 phosphate-buffered saline)에 부유하였다. CD34 양성세포는 분리된 단핵구로부터 high-grade magnetic field 와 mini-MACS column (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)을 이용한 superparamagnetic microbead 방법으로 다음과 같이 분리하였다. 단핵구를 PBE 300 μ L 당 10^8 개로 조절하여 부유시킨 다음, 세포 10^8 개당 100 μ L의 Fc 수용체 차단 시약 (사람면역글로불린)과 100 μ L의 자석 입자가 부착된 항CD34항체를 첨가하여 30분간 냉장 온도에서 반응시킨 후 세척하였다.

세포를 배양하는 중에 MACS 원주를 다음과 같이 준비하였다. 금속판에 자석 입자를 부착한 다음 원주를 부착하고, 이를 PBS로 1회 세척한 다음 사용하였다. 500 μ L의 단핵구는 잘 부유 시켜서, 30 μ m 여과장치 (Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)가 부착된 원주에 투과시켜 죽은 세포와 불순물을 제거하였다. 이후 원주로부터 배출된 CD34 음성 분획은 버리고 원주 내에 잔류하는 CD34 양성 분획을 회수하였다. 경우에 따라서는 새로운 원주로 세포 분리를 반복하였다. 잔류 세포의 분리는 원주에 500 μ L 의 PBE를 첨가한 후 자석 입자로부터 원주를 분리시키고 플런저로 밀어서 방출시키는 과정을 2회 반복하여 방출되는 모든 세포 분획을 회수하였다. 분리된 세포는 Neubauer chamber (Neubauer Improved, Marienfeld, Germany)를 이용하여 세포 농도를 측정하였다.

3. 배양

분리한 CD34 양성세포를 배양하기 위해 50 μ g/mL iron-saturated human transferrin, 90 μ g/mL ferric nitrate, 100 μ g/mL insulin, 30 μ g/mL soybean lecithin, 7.5 μ g/mL cholesterol 그리고 10^{-6} M hydrocortisone 을 X-Vivo 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)에 첨가하여 기본 배지를 만들었다.

배양은 3주 (21일) 동안 진행하였고 세 단계로 구성하였다. 첫 1주는 조혈 모세포의 증식을 유도하는 단계로서 CD34 양성세포를 10^4 /mL 농도로 기본배지에 부유시키고, 50 ng/mL Flt3-L (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA), 100 ng/mL TPO (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) 그리고 100 ng/mL SCF (Endogen, Woburn, MA, USA)의 농도로 배지에 첨가하였다. 2주째에는 적혈구 모세포의 증식을 위해 50 ng/mL SCF, 3 U/mL EPO 그리고 50 ng/mL Insulin like growth factor (IGF-1, PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)이 첨가된 배지에서 세포를 배양하였다. 마지막 3주에는 적혈구 모세포의 최종분화를 유도하기 위해 3 U/mL EPO와 50 ng/mL IGF-1이 첨가된 배지에서 배양을 시행하였다.

37°C의 온도와 5%의 CO₂ 대기 조건에서 배양을 시행하였으며, 적절한 세포 증식을 위해서 3~4일마다 배지를 교체하였다. 배양 세포의 증식 정도는 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며, 새로 분주하는 세포수를 1 x 10⁵ 개로 조정하였다. 또한 세포의 형태 변화를 분석하기 위하여 슬라이드 도말 표본을 만들어 Wright-Giemsa 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 조건 별로 3 개씩 총 12개의 배양을 시행하였다.

4. 유세포 분석

제대혈 단핵구에서 Mini-MACS column을 통해 분리된 세포를 배양하기 직전에 CD45와 CD34에 대한 단클론성 항체를 이용하여 분리 순수도를 측정하였다. 배양 7일, 14일, 21일 배양세포에 대해 각각 CD45, CD34, CD38, GPA의 표현을 측정하였다. 유세포 분석은 EPICS XL (Beckman-Coulter Inc., Miami, FL, USA)을 사용하였다.

5. 배양 세포의 유전자 Microarray 분석

가. RNA 추출

제대혈에서 분리한 신선 CD34 양성세포와 7일, 14일 그리고 21일째 배양한 세포를 1 x 10⁵정도 취하여 TRIzol LS Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)와 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 분리, 정제하였다. Total RNA의 양과 질을 분광광도계, 전기영동 및 BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 결정하였다.

나. RNA 증폭

(1) 첫 번째 cDNA strand 합성

4 µg의 총 RNA를 사용하여 첫 번째 증폭에 사용하였다. RNA template와 2 µg의 oligo-dT₂₄/T7 primer (5'-GGCCAGTGAA TTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-3')를 9 µL의 RNase-free water에 넣었다. RNA/primer 혼합물을 65°C에서 10분간 denaturation 시킨 후 얼음에서 5분간 냉각시켰다. RNA 용액에 5X first strand buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 4 µL,

0.1M DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 2 μ L, SuperScript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 2 μ L, 10 mM dNTP mix 2 μ L, 그리고 RNAsin 1 μ L를 가하고, 혼합액을 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

(2) 두 번째 cDNA strand 합성

첫 번째 반응이 끝난 혼합물에 RNase-free water 91 μ L, 5X second strand buffer 30 μ L, 10 mM dNTP mix 3 μ L, DNA ligase 10U, DNA polymerase I 4U, RNase H 2U를 가하고 16°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 T4 DNA polymerase를 가하고 16°C에서 5분간 반응시키고, 1M NaOH 10 μ L와 0.5M EDTA 10 μ L를 가하여 반응을 중단시켰다. 65°C에서 10분간 둔 뒤 Tris-HCl (pH 7.5) 25 μ L를 가하여 중화시켰다. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)을 이용하여 이중 cDNA를 추출하고 1 μ L의 Linear acrylamide (0.1 μ g/ μ L)의 존재 하에 에탄올로 침전시켰고, 건조된 침전물은 9 μ L의 RNase-free water에 부유시켰다.

(3) 체외 전사

T7 MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 double stranded cDNA로부터 mRNA를 전사했다. 75mM NTP 각 2 μ L, enzyme mix, 10X reaction buffer를 8 μ L의 cDNA에 가하고 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 증폭된 mRNA는 RNeasy mini kit를 사용하여 정제하였다. RNA의 양은 분광광도계로 OD260을 읽어 측정하였으며, 질은 agarose gel 전기영동을 이용하여 결정했다. 배양 21일째 세포에서는 충분한 RNA를 증폭하지 못하여 microarray를 진행하지 못하였다.

다. RNA labeling과 교잡반응

증폭된 mRNA 4 μ g의 역전사 반응에 Cyanine 3-dUTP 혹은 Cyanine 5-dUTP를 가하여 labeling을 시행하였다. RNA에 6 μ g의 random primer (oligo-dT primer)를 가하고, 65°C에서 10분간 반응시켰다. RNA 용액에 5X first strand buffer 8 μ L, 100mM DTT 4 μ L, SuperScript II RT 2 μ L, 20X low-dT/dNTP mix 2 μ L, RNAsin 1 μ L를 가하고 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 남은 RNA를 가수분해하기 위하여 0.1M NaOH 15 μ L를 가하고 65°C에서 30분간 반응시킨 후 5 μ L의 HCl을 가하여 중화시켰다. Cyanine3 및 Cyanine5로 표지된 표식자는 QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 정제하였으며, 20 μ g의 사람 COT-1 DNA, 20 μ g의 효모 tRNA 및 20 μ g의 poly(A) RNA와 혼합하였다. 최종적으로 표

식자는 Microcon YM-30 column (Millipore, Bedford, MA, USA)로 적당한 용적을 맞추었으며, 100°C에서 2분간 denaturation시켰다. 17,000개의 인간 유전자를 포함한 cDNA chip (GenomicTree, 대전, 한국)에 3.5X SSC, 0.1% SDS, 10 mg/mL BSA를 가하여 42°C에서 1시간 동안 prehybridization을 시켰다. 배양세포 및 제대혈 조혈모세포의 증폭된 RNA로부터 만들어진 표식자 4 µg을 25% formaldehyde, 5X SSC, 0.1% SDS와 함께 62°C에서 습도를 유지하면서 하룻밤 동안 반응시켰다. 분석 디자인은 배양 전 CD34 양성세포/배양1주 세포, 배양 전 CD34 양성세포/배양2주 세포 조합으로 각각 시행하였다. 교잡반응이 끝난 다음 array는 2X SSC와 0.1% SDS, 1X SSC와 0.1% SDS, 0.2X SSC 및 0.05X SSC로 순서대로 각 2분간 세척하였고, 500g에서 원심 분리하였다.

라. 이미지 스캔 및 자료 분석

Array는 GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City, CA, USA)로 스캔하였으며, GenePix Pro 4.0으로 background signal을 제거한 후 형광 신호를 계산하였다. 결과 분석은 within-print tip Lowess function을 이용하여 normalization을 시행한 후 계층군집분석을 하였고, SAM (Significant Analysis of Microarray) 기법으로 유의한 유전자를 찾았다. 또한 통계 분석 후 유의한 유전자로 선택되지 않았으나 적혈구 생성과 관련이 있는 유전자에 대해서는 형광 신호의 평균값을 통해 개별적으로 비교하였다.

III. 결과

1. 제대혈 조혈모세포 분리 및 배양

가. CD34 양성세포의 순수분리 결과

산모로부터 채집한 제대혈은 평균 71 mL (항응고제 25 mL 포함)이었다. 제대혈의 단핵구를 비중을 이용하여 분리하였고 2회의 MACS분리 후 얻은 CD34+ 세포는 평균 5.5×10^5 이었다. 유세포 분석기로 측정한 결과 제대혈에서 분리된 세포 중에서 CD45+/CD34+인 세포군이 92% 이상이었고, 동시에 CD38도 90%이상 높게 표현하고 있었다(그림 1).

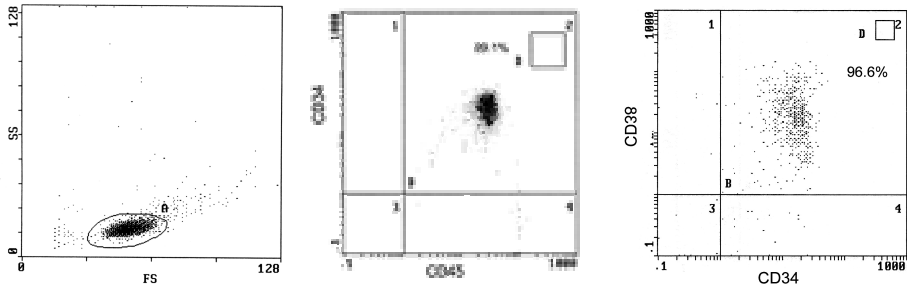


그림 1. Mini-MACS를 이용하여 분리한 제대혈 유래 CD34 양성세포의 면역표현형. Low side scatter와 low forward scatter를 보이는 homogenous한 세포군집이 관찰되었다. 분리된 세포는 CD34, CD45와 CD38을 모두 90%이상 높게 표현하고 있다.

나. 적혈구 분화 유도배양에 있어서의 EPO의 효과

EPO를 8일부터 3 U/mL 농도로 첨가하여 세 단계로 배양한 경우와 EPO가 배양 초기에 미치는 역할을 규명하기 위하여 배양 시작부터 EPO의 농도를 달리 하여 배양한 경우 모두에서 2주까지 세포수가 증가하다가 그 이후 감소하였다(그림 2). EPO의 농도가 높아 질수록 세포수가 증가되는 양상이 관찰되었으며, EPO를 20 U/mL 농도로 배양 시작부터 첨가한 경우에서 가장 많이 세포가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(n=3, 14일, 평균 233배). 대조군으로 EPO를 첨가하지 않고 배양한 경우에는 모두 증식을 유지할 수 없어 실험을 중단하였다.

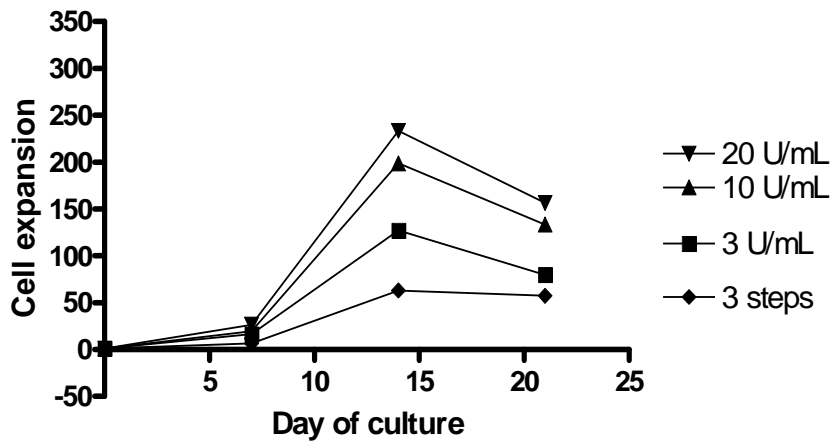
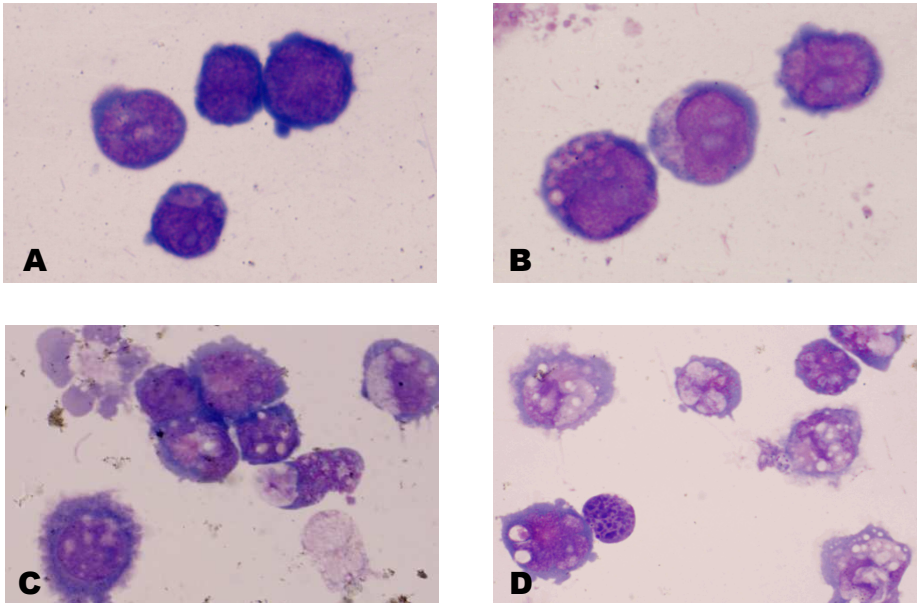


그림 2. 배양 조건에 따른 제대혈 CD34 양성세포의 증식정도 비교. 모든 배양에서 14일에 세포수가 가장 많이 증식하였다. EPO를 20 U/mL로 배양 처음부터 첨가한 경우 평균 233배로 증식하였고 10 U/mL에서는 평균 199배, 3 U/mL에서는 127배 증식하였다. EPO를 배양 8일부터 주는 세 단계 배양에서 평균 63배 증식하여 가장 낮은 배양성적을 보였다.

배양 세포는 각 시기별로 염색하여 그 형태를 관찰하였다(그림 3). 제대혈에서 바로 분리한 CD34 양성세포는 크기가 큰 단핵구의 형태이며 세포질 내에 과립이 관찰되지 않았다. 그러나 배양 7일째부터 세포질 내에 호산구성 과립이 많이 관찰되기 시작했다. 전반적으로 배양이 진행되면서 호염기성인 세포질을 가지는 적혈구 모세포의 형태적 특징을 보이는 세포보다는 세포의 모양이 불규칙해지고 세포질 내에 공포 (vacuole)와 과립이 많은 백혈구 계열의 세포가 대부분 관찰되었다.



(Wright-Giemsa stain, x 1000)

그림 3. 배양 기간에 따른 배양 세포의 형태적 변화. A는 배양하기 전의 CD34 양성세포이다. B는 7일, 그림 C는 14일 그리고 D는 21일 배양 세포의 사진이다. 배양이 진행되면서 모양이 불규칙해지고 과립과 공포가 증가하는 모습을 보이고 있다.

2. 면역 표현형의 변화

체대혈로부터 분리한 CD34 양성세포를 배양 직전에 측정할 경우 CD34, CD45 그리고 CD38 항원의 표현율은 90%이상 높게 측정되었다. 배양이 진행되면서 CD34와 CD45항원 표현이 감소하였다. CD34의 경우 배양 7일에는 어떠한 조건에서도 15%를 넘지 않을 정도로 급속하게 감소하였고, CD45는 그에 비해 비교적 높게 표현되는 양상이었지만 배양 21일에는 20.2~33.9% 정도로 뚜렷하게 감소하였다. 기본적인 배양 조건인 세 단계 배양에서만 배양 7일에 CD34가 EPO를 처음부터 넣어준 배양보다 높게 표현되어 EPO를 배양초기에 첨가할 경우 조혈모세포가 더 빨리 CD34의 표현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 모든 조건에서 시간이 경과함에 따라 CD34와 CD45가 뚜렷하게 감소하였지만 적혈구의 대표적인 표지자인 glycophorin A의 표현은 3%이하였고, 배양기간 동안 표현의 변화를 보이지 않았다(표 1).

표 1. 배양된 제대혈 유래 CD34 양성세포의 면역표현형의 변화

EPO	Culture day	CD34	CD38	CD45	GPA*
3 steps [†] (n=3)	day7	13.6	63.8	99.0	1.0
	day14	0.3	4.9	NT [‡]	0.5
	day21	1.0	0.6	33.9	1.3
3 U/mL (n=3)	day7	6.0	43.3	81.8	1.9
	day14	0.8	2.8	32.3	2.0
	day21	0.4	0.5	25.4	1.8
EPO conc. 10 U/ml (n=3)	day7	5.9	34.7	77.2	1.9
	day14	0.2	2.2	22.7	2.1
	day21	0.3	0.3	21.2	2.3
20 U/mL (n=3)	day7	5.9	34.0	81.9	1.7
	day14	0.1	1.8	22.0	1.5
	day21	0.2	0.2	20.2	2.2

* glycophorin A

[†] EPO를 배양 2단계부터 첨가한 기본적인 배양조건임.

[‡] Not tested

3. 배양세포의 유전자 프로파일의 분석

제대혈로부터 분리한 신선 CD34 양성세포를 대조군으로 하여 배양 7일, 14일 그리고 21일 세포에서 유전자 표현의 변화를 측정하였다. 그러나 배양 21일째 세포에서는 충분한 RNA를 얻지 못하여 microarray를 진행하지 못하였다. 17,000개의 유전자 중에서 normalization과 filtering을 시행하여 10,986개 유전자를 선택하였다. 10,986개의 유전자중에서 배양 7일에 비해 배양 14일에서 유의한 유전자 발현의 차이를 보이는 유전자를 SAM (Significant Analysis of Microarray)을 이용하여 검색하였다. 그 결과 False discovery rate (FDR)가 0.74%인 유의한 125개의 유전자를 선정하였고, 선정된 유전자군을 이용한 hierarchical clustering결과 배양 7일과 14일 군의 분류를 확인하였다(그림 4). 이들 유전자 중에서 17개의 유전자가 7일 배양세포에 비해 14배양 세포에서 3배 이상 발현이 증가하였으나 적혈구 분화와 관련된 유전자의 변화는 관찰할 수 없었다(표 2).

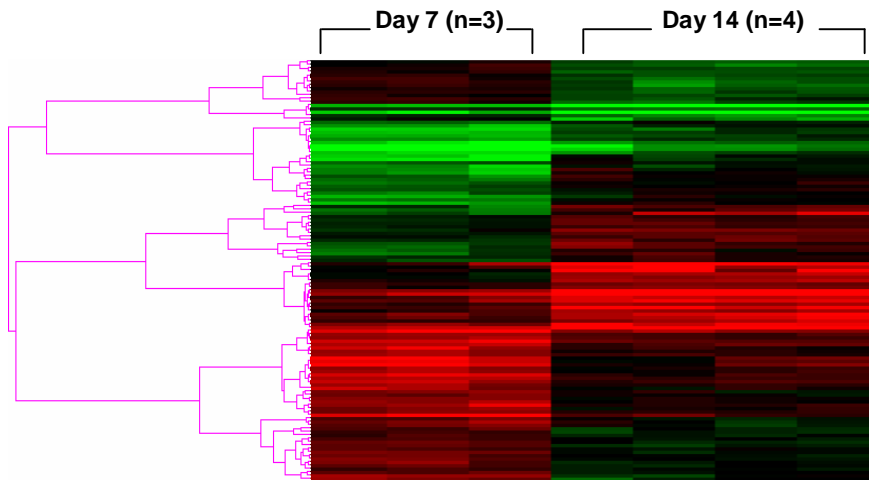


그림 4. 배양 7일 세포와 배양 14일 세포에서 차이를 보이는 125개 유전자의 hierarchical clustering. SAM (significant analysis of microarray)을 이용하여 배양 진행되면서 발현에 차이를 보이는 유전자를 검색하였고, 그 중에서 False discovery rate (FDR)가 0.74%로 유의한 유전자 125항목을 선택하였다. 배양 7일군과 14일 군이 구분됨을 확인할 수 있다.

표 2. 통계적 분석 후 배양 7일에 비해 14일 세포에서 발현이 증가한 유전자 항목 리스트

Annotation	Fold difference*
Solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 9	5.6
Small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b)	5.4
Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	4.8
EST (gene ID: AA953113)	4.8
Dual specificity phosphatase 1	4.5
Cyclin I	3.7
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	3.6
Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	3.6
H2A histone family, member L	3.6
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	3.6
Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	3.4
Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4	3.3
Human mRNA for SB classII histocompatibility antigen alpha-chain	3.2
Brain-specific angiogenesis inhibitor 3	3.2
Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2, late infantile (Jansky-Bielschowsky disease)	3.1
Putative translation initiation factor	3.1
HSPC022 protein	3.1

* 배양 7일 세포에 비해 14일에서 유전자 발현이 3배 이상 증가한 경우를 유의한 증가로 판단하였다.

SAM 분석에서는 유의한 차이를 보이지 않았으나 glycophorin A, Rhesus blood group, CcEe antigens erythrocyte membrane protein band 4.2 그리고 erythropoietin receptor 유전자의 경우 7일 세포에 비해 14일 세포에서 발현 정도가 증가해 있었다 (그림 5).

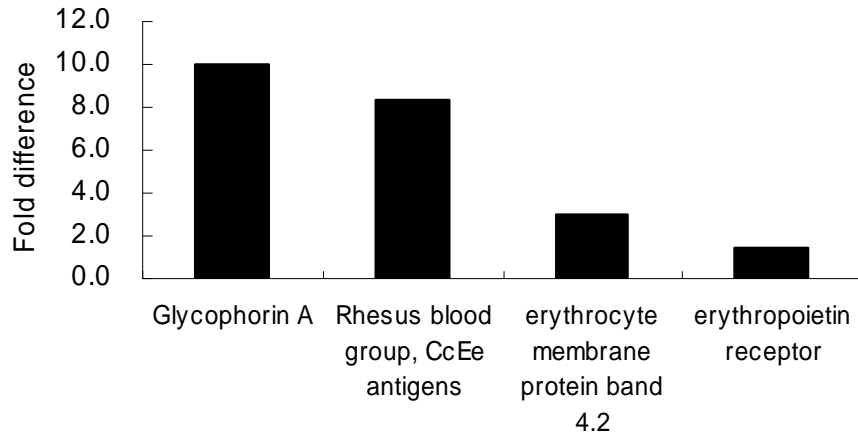


그림 5. 적혈구 생성과 관련이 있는 유전자 항목들에 대한 개별분석. 배양 7일에 비해 배양 14일에서 glycophorin A는 10배, rhesus blood group, CcEe antigens는 8.3배, erythrocyte membrane protein band 4.2는 3.0배 그리고 erythropoietin receptor는 1.5 배 발현이 증가하였다.

IV. 고찰

적혈구 생성은 매우 복잡한 과정이며 다양한 성장인자와 사이토카인, 조혈 모세포 그리고 골수 미세 환경의 상호작용에 의해서 조절된다.²⁷ EPO는 38 kDa의 α -globulin으로 신장에서 생성되며, 적혈구 모세포에 표현된 EPO receptor (EPOR)에 작용하여 적혈구로의 분화와 증식을 촉진하는 역할을 하는 적혈구 생성의 핵심 성장인자이다.^{11,12,14,16,17,19-22,28,29} Wu 등은 EPO와 EPOR이 knockout된 쥐들에 심한 빈혈이 발생되어 결국 사망에 이르는 것을 관찰하여 적혈구 생성에 EPO와 EPOR의 상호작용이 적혈구 생성에 필수적임을 증명하였다.³⁰ SCF는 처음에는 분화되지 않은 혈구모세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려졌지만 이미 계열이 정해진 혈구세포의 성장을 돕는 기능이 있는 것으로 밝혀졌다.¹⁶ 적혈구 생성에 있어서 EPO와 SCF의 상승작용이 여러 연구에서 증명되었고, 대부분의 적혈구 생성 실험에서 이 두 성장인자를 사용하고 있다.^{12,13,16,17,28,31,32} 골수의 조혈모세포에서 성숙한 적혈구로 분화하는 과정은 여러 단계로 구성되며, 크게 EPO가 필요 없는 초기 단계와 EPO 의존적인 후기 단계로 나뉜다. 많은 체외 적혈구 생성 연구에서도 실제 생체에서의 조건과 유사하게 하기 위하여 배양 과정을 두 단계로 나누었다. 즉 EPO의 자극이 필요 없는 단계에서는 SCF나 TPO 같은 성장인자를 첨가하여 조혈 모세포를 증식시키고 그 뒤에 적혈구로의 최종 분화를 유도

하기 위하여 EPO를 첨가하였다. 2002년 Neildez-Nguyen 등은 배양 조건을 조혈모세포가 증식하는 단계, 적혈구 모세포의 증식과 분화를 촉진하는 단계 그리고 적혈구의 최종 분화를 유도하는 단계로 기존 연구에 비해 배양 조건을 더욱 세분하여 높은 순수도의 적혈구 계열 세포를 생성하였음을 보고 하였다.¹ 따라서 본 연구에서도 적혈구 생성에 가장 중요한 성장인자인 EPO와 SCF를 첨가하여 배양을 진행하였고, 배양 조건은 EPO가 첨가되지 않는 1단계와 EPO가 첨가된 2, 3단계로 구성되며 총 21일간 배양을 시행하였다. 그러나 여러 연구에서 적혈구 생성에 있어서 EPO의 중요성에 대해 강조하였으나 실험마다 EPO 농도에 차이가 있었다. 일반적으로 정상인의 혈중 EPO 농도는 50 mU/mL 정도이지만,²² 기존 연구에서 사용한 EPO의 농도는 1 U/mL에서 4 U/mL로 다양하였다. 또한 적혈구 생성에 있어서 적절한 EPO 농도와 EPO 농도를 증가시켰을 때의 변화에 대한 내용에 대해서는 알려진 내용이 적었다. 본 실험에서는 기본적으로 단계별 배양을 진행하는 한편 배양 시작부터 EPO의 농도를 0 U/mL에서 20 U/mL로 다양하게 하여 그 영향을 비교하였다.

조혈모세포 배양 결과 모든 배양 조건에서 14일까지 급속하게 세포수가 증식하였으나 배양 3단계에서는 세포수가 약간 감소하는 양상을 보였다. 이는 기존 연구와 유사한 결과였다.¹ 또한 EPO농도가 증가하면서 세포 증식이 증가하는 경향을 관찰할 수 있었고 가장 높은 농도인 20 U/mL에서 다른 조건에 비해 월등한 세포 증식을 관찰할 수 있었다. 따라서 EPO의 농도와 세포 증식 간에는 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 반면 대조군으로 EPO를 첨가하지 않은 경우 배양 14일까지 세포 형태는 유지하였지만 세포수가 증식하지 못하고 그대로 사멸하였다. EPO를 1주 배양 후 첨가한 세 단계 배양의 경우 EPO를 처음부터 첨가한 배양보다 세포가 더 적게 증식하였는데 이는 EPO를 배양초기부터 첨가하여 좋은 배양 성적을 얻었다는 Giarratana 등의 보고와 일치하는 소견이었다.¹⁵ 따라서 EPO의 첨가 유무로 배양과정을 구분하는 것은 적혈구 생성에 큰 의미가 없을 것으로 판단된다. 그러나 EPO의 자극으로 세포의 증식이 증가되는 반면 대부분의 배양 세포의 형태는 적혈구 계열의 세포와는 차이가 있었다. 대부분의 배양 세포에서 세포질내 과립과 공포를 흔히 관찰할 수 있었고 배양이 진행되면서 그 양이 증가하였다.

배양세포의 면역표현형 분석결과 배양이 진행되면서 CD34와 CD45의 표현이 감소하였다. CD34의 경우 모든 배양에서 배양 7일에 15%이하로 급속히 감소하였고, EPO를 처음부터 첨가하지 않은 경우가 첨가한 배양에 비해 더 높은 CD34 표현을 보였다. 따라서 EPO를 배양초기에 첨가할 경우 조혈모세포의 분화를 촉진하는 것으로 생각되었다. 그러나 CD45와 CD34가 감소하는데 비하여 모든 배양 조건에서 GPA의 표현은 매우 낮았다. Liquid culture를 통한 적혈구 생성의 경우 배양 세포가 여러 계열의 세포로 분화되어 낮은 순수도를 보이는 것이 문제점으로 지적된 바 있고,¹ 본 실험에서도 배양 세포의 형태와 표현형 결과를 통해 조혈모세포로부터 증식된 세포가 적혈구 계

열로의 분화가 충분하게 진행되지 못한 것으로 해석하였다.

배양 세포의 형태나 표현형 분석뿐 아니라 유전자의 발현단계에서의 변화를 알기 위해 17,000 유전자에 대한 microarray를 시행하여 배양 7일 세포와 14일 세포의 유전자 발현을 비교하였다. SAM 분석을 통하여 7일과 14일 세포에서 발현이 유의한 변화를 보이며 FDR이 0.74%로 유의한 유전자는 125개였다. 7일에 비해 14일에 3배 이상 발현이 증가한 유전자는 17개였지만 적혈구 분화와 관련성이 알려진 유전자는 아니었다. 그러나 SAM를 이용하지 않고 적혈구 생성과 관련성이 높은 유전자들을 개별적으로 분석하였을 경우 glycophorin A, Rhesus blood group, CcEe antigens erythrocyte membrane protein band 4.2 그리고 erythropoietin receptor 유전자의 발현이 증가해 있었다. 따라서 본 실험의 배양 조건을 통해 배양세포의 형태나 표현형은 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 관련 유전자의 발현이 증가했음을 알 수 있었다. 그러나 유전자 단계의 변화가 표현형의 변화로 연결되지 못한 정확한 원인을 규명하지 못하였다.

지금까지 조혈모세포로부터 적혈구 세포를 얻으려는 많은 노력이 있어왔다. 그러나 적혈구의 경우 대부분의 연구에서 충분한 수의 성숙한 세포를 얻는데 실패하였다. 또한 지금까지의 연구 성과에도 불구하고 체외에서 호산성 적혈모구(orthochromic normoblast)로부터 핵을 유출시켜 성숙한 적혈구를 얻는 과정은 분화에 있어서 가장 큰 걸림돌로 판단되고 있다. 그 원인은 골수의 미세환경과 다른 세포와의 상호작용을 체외 배양에서 구현할 수 없기 때문으로 알려져 있다.^{11,15} 배양세포를 쥐에 투여하거나 배양 중에 DMSO를 첨가하여 핵의 유출을 유도하는 방법이 소개되었으나,^{1,11} 임상적으로 이용되기에는 어려운 모델이다. 그러나 최근 골수의 기질세포와 조혈모세포의 동시 배양을 통하여 대규모의 적혈구 생성에 성공한 연구보고가 있어¹⁵ 희귀 혈액형의 적혈구 생산과 혈액소병증 치료 등의 임상적 활용이 가능할 것으로 생각된다. 앞으로 체외에서 생성된 적혈구를 환자 치료에 사용하기 위해서는 적혈구 분화를 위한 최적 조건을 찾는 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 제대혈의 CD34 양성세포를 분리하여 EPO등의 자극을 통하여 적혈구로 분화를 시도하였다. 또한 EPO 농도와 첨가시기가 배양에 미치는 영향을 규명하기 위하여 유세포검사를 통해 면역표현형을, microarray를 이용하여 유전자 발현의 변화를 알아보고자 하였다.

제대혈의 CD34 양성세포를 다양한 성장인자를 첨가한 배지에서 3주간 배양하였고, EPO의 농도와 첨가시기를 달리하여 결과를 비교하였다. 배양세포는 모든 조건에서 14일에 가장 높은 세포수의 증식을 보였으며 EPO의 농도가

높을수록 처음부터 첨가할수록 좋은 증식을 보였다. CD34와 CD45는 초기에 90%이상 높게 표현하였고 배양이 진행되면서 그 표현이 감소하였다. 그러나 적혈구에 특이적인 항원인 GPA의 표현이 두드러지지 않았다. 배양세포가 높은 순수도를 가지는 적혈구 세포는 아니었지만 microarray 분석을 통해 배양이 진행되면서 erythropoiesis와 관련이 깊은 유전자들의 발현이 증가하는 변화를 관찰할 수 있었다.

이에 따라 조혈모세포를 배양할 경우 적혈구 분화를 유도하는 것으로 알려진 EPO가 농도에 따라서 세포증식을 촉진하는 사실을 확인하였다. 또한 EPO 첨가하는 시기로 세분화하는 기존의 배양 방법보다 배양 초기부터 EPO를 첨가하는 것이 세포증식에 더 유리하였다. 유전자 단계에서는 적혈구와 관련된 여러 유전자의 발현이 증가하였으나 표현형의 변화가 미흡하였다. 따라서 생체내의 조건과 좀 더 유사한 배양 조건을 규명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2002;20:467-472.
2. Sullivan MT, Wallace EL. Blood collection and transfusion in the United States in 1999. *Transfusion* 2005;45:141-148.
3. Hupfer ME, Taylor DW, Letwin JA. Understanding Canadian student motivations and beliefs about giving blood. *Transfusion* 2005;45:149-161.
4. Lefrere JJ, Girot R, Lefrere F, Guillaume N, Lerable J, Le Marrec N, et al. Complete or partial seroreversion in immunocompetent individuals after self-limited HCV infection: consequences for transfusion. *Transfusion* 2004;44:343-348.
5. Delwart EL, Kalmin ND, Jones TS, Ladd DJ, Foley B, Tobler LH, et al. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation. *Vox Sang* 2004;86:171-177.
6. Ling AE, Robbins KE, Brown TM, Dunmire V, Thoe SY, Wong SY, et al. Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with preseroconversion blood components during the infectious window period. *JAMA* 2000;284:210-214.
7. Pincock S. Government confirms second case of vCJD transmitted by blood transfusion. *BMJ* 2004;329:251.
8. Sibbald B. UK patient first to contract vCJD via blood transfusion. *CMAJ* 2004;170:1087.
9. Update: West Nile virus screening of blood donations and transfusion-associated transmission--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53:281-284.
10. Macedo de Oliveira A, Beecham BD, Montgomery SP, Lanciotti RS, Linnen JM, Giachetti C, et al. West Nile virus blood transfusion-related infection despite nucleic acid testing. *Transfusion* 2004;44:1695-1699.
11. Maggakis-Kelemen C, Bork M, Kayser P, Biselli M, Artmann GM. Biological and mechanical quality of red blood cells cultured from human umbilical cord blood stem cells. *Med Biol Eng Comput* 2003;41:350-356.
12. Sato T, Maekawa T, Watanabe S, Tsuji K, Nakahata T. Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. *J Clin Invest* 2000;106:263-270.
13. Sui X, Tsuji K, Tajima S, Tanaka R, Muraoka K, Ebihara Y, et al. Erythropoietin-independent erythrocyte production: signals through gp130 and c-kit dramatically promote erythropoiesis from human CD34+ cells. *J Exp Med* 1996;183:837-845.
14. Eliason JF, Testa NG, Dexter TM. Erythropoietin-stimulated

- erythropoiesis in long-term bone marrow culture. *Nature* 1979;281:382-384.
15. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69-74.
 16. Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 1998;92:3658-3668.
 17. Fibach E, Manor D, Treves A, Rachmilewitz EA. Growth of human normal erythroid progenitors in liquid culture: a comparison with colony growth in semisolid culture. *Int J Cell Cloning* 1991;9:57-64.
 18. Malik P, Fisher TC, Barsky LL, Zeng L, Izadi P, Hiti AL, et al. An in vitro model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998;91:2664-2671.
 19. Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick E. Molecular and cell biologic aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1981;58:699-707.
 20. Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood* 1989;73:100-103.
 21. Miller JL, Njoroge JM, Gubin AN, Rodgers GP. Prospective identification of erythroid elements in cultured peripheral blood. *Exp Hematol* 1999;27:624-629.
 22. Fibach E, Rachmilewitz EA. Stimulation of erythroid progenitors by high concentrations of erythropoietin results in normoblasts arrested in G2 phase of the cell cycle. *Exp Hematol* 1993;21:184-188.
 23. Wojda U, Noel P, Miller JL. Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood* 2002;99:3005-3013.
 24. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A, Douglas GW, Friedman H, Cooper S, et al. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning* 1990;8 Suppl 1:76-89; discussion 89-91.
 25. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3828-3832.
 26. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-135.
 27. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood* 1999;93:4425-4435.

28. Freyssinier JM, Lecoq-Lafon C, Amsellem S, Picard F, Ducrocq R, Mayeux P, et al. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol* 1999;106:912-922.
29. Lee R, Kertesz N, Joseph SB, Jegalian A, Wu H. Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis. *Blood* 2001;98:1408-1415.
30. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995;83:59-67.
31. Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 1998;92:1142-1149.
32. Sui X, Krantz SB, Zhao ZJ. Stem cell factor and erythropoietin inhibit apoptosis of human erythroid progenitor cells through different signalling pathways. *Br J Haematol* 2000;110:63-70.

Abstract

Ex vivo generation of RBCs from CD34+ cells in human umbilical cord blood and expression profile analysis using microarray.

Chang Ki Kim

*Department of Medicine
The Graduate school, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyun Ok Kim)

RBCs are produced by erythropoiesis in the bone marrow with a help of erythropoietin (EPO), which is a key factor for RBCs production. For Ex vivo generation of RBCs, a lot of studies used sequential culture protocols, which were consisted of the expansion period without EPO and the differentiation period with EPO. In this study, we have tried to generate RBCs from CD34+ cells in cord blood using 3 steps culture protocol and also evaluated the changes in immunophenotypic characteristics and genetic profiles according to EPO concentration and culture duration.

Using mini-MACS columns, CD34+ cells were isolated from cord blood. The culture procedure comprised three steps. For each step, cells were cultured sequentially for 7 days in a serum free liquid medium with specific combinations of growth factors for 21 days. [1st step: Flt3-ligand (Flt3-L), thombopoietin (TPO) and stem cell factor (SCF); 2nd step: IGF-1, SCF, EPO; 3rd step: IGF-1, EPO] To evaluate the EPO effect on proliferation and differentiation, cells were cultured with three different EPO concentrations (0, 3, 10 & 20 U/mL). Cell count and morphology were monitored during this period. For phenotyping, antibodies to CD34, CD38, CD45 and glycophorin A (GPA) were used and phenotype analyses were performed on an EPICS XL. The genetic profile of cultured cells was analyzed by 17,000-gene microarray analysis.

As erythropoietin concentration increased, cell expansion was also increased, showing a maximum expansion at 20 U/ml (233-fold amplification). The cell population showed a gradual decrease in expression of CD34 and CD45 whereas the expression of GPA was not prominent in any conditions (less than 3%). Through the SAM (significant analysis of microarray), 125 genes that showed

significant results were selected. When we analyzed genes associated with erythropoiesis, we observed increased expression in glycophorin A, rhesus blood group, CcEe antigens, erythrocyte membrane protein band 4.2 and erythropoietin receptor gene as cultures progressed.

Our study shows that erythropoietin enhance a proliferation of hematopoietic progenitor cells as well as a differentiation to erythroid lineage. Our culture system did not achieve pure production of RBCs, but induced genetic changes that indicated erythroid differentiation.

Key words: cord blood, CD34+ cells, erythropoietin, RBCs