

골수의 중간엽 줄기세포에서  
GATA-2의 발현 양상

연세대학교 대학원

의 학 과

황 혜 원

골수의 중간엽 줄기세포에서  
GATA-2 의 발현 양상

지도교수 이 종 인

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2013 년 01 월 11 일

연세대학교 대학원

의 학 과

황 혜 원

# 황혜원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2013 년 01 월 11 일

## 감사의 글

그 동안의 학위 과정과 본 논문이 완성되기까지 모든 면에서 많은 도움과 격려를 주신 이종인 교수님께 감사 드립니다. 또한 부족한 저를 믿어주시고 혈액종양내과에 관심을 가지도록 해주신 김현수 교수님과 심사 때마다 아낌없는 충고와 꼼꼼한 교정을 해주신 어영 교수님께도 감사 드립니다.

논문의 시작부터 마무리까지 저를 도와 주신 공지현 교수님과 실험설계와 및 실험과정에 조언을 주시고 함께 진행해주신 세포치료 및 조직공학센터의 엄영우 교수님과 배성해 학생에게 진심 어린 감사를 드립니다. 4년간의 수련의 과정에서 큰 가르침을 주시고 좋은 경험을 쌓게 해주신 심광용 교수님을 포함한 모든 내과 교수님께 감사 드립니다.

마지막으로 저를 위해서 매일 기도하시는 부모님과 가족, 항상 함께하시는 하나님께 감사합니다.

2013년 1월

저자 씀

# 차 례

그림 차례 .....	iii
표 차례 .....	iv
국문 요약 .....	v
제1장 서론 .....	1
제2장 재료 및 방법 .....	5
1. 환자 .....	5
2. 세포배양 및 세포 수 측정 .....	5
3. 유세포 분석(Flow cytometry) .....	6
4. 중간엽 줄기세포의 지방세포로의 분화 .....	7
5. Oil-red O 염색 및 정량 분석 .....	7
6. RNA의 분리 .....	8
7. Complementary DNA(cDNA)의 합성 .....	9
8. GATA-2, PPAR- $\gamma$ 의 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) .....	9
9. 통계 .....	11
제3장 결과 .....	12
1. 환자 및 임상양상 .....	12

2. 골수유래 중간엽 줄기세포의 확인 .....	14
3. GATA-2 및 PPAR- $\gamma$ .....	18
제4장 고찰 .....	20
참고 문헌 .....	24
영문 요약 .....	27

## 그림 차례

Figure 1. Effects of GATA-2 on preadipocytes .....	4
Figure 2. Adipogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells .....	17
Figure 3. Expression of GATA-2 and PPAR- $\gamma$ in mesenchymal stem cells from aplastic anemia (A-C), normal bone marrow (D-F), and myeloproliferative disease (G-J) .....	19

## 표 차례

Table 1. Primer sequence used in reverse transcription polymerase chain reaction .....	10
Table 2. Clinical characteristics of patients .....	13
Table 3. Results of flow cytometry of bone marrow derived mesenchymal stem cells .....	15



## 국문요약

# 골수의 중간엽 줄기세포에서 GATA-2 의 발현 양상

**배경 및 목적:** 재생불량빈혈은 조혈모세포의 감소와 골수의 지방으로의 대체를 특징으로 한다. GATA-2 는 조혈과 지방형성 모두에 영향을 미치는 전사인자이다. GATA-2 는 조혈모줄기세포를 증식하고 생존하도록 하고 지방전세포에서 PPAR- $\gamma$  를 억제하여 지방세포로의 분화를 억제한다. 본 실험은 골수의 세포충실도에 따라 중간엽 줄기세포에서 GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  의 mRNA 발현을 비교해 보고자 하였다.

**대상과 방법:** 재생불량빈혈 환자 4 명, 정상 골수 군 6 명, 골수증식성질환 환자 6 명의 골수를 채취하여 골수유래 중간엽 줄기세포를 배양 후 중간엽 줄기세포임을 확인하기 위해 유세포분석기를 사용하였다. 중간엽 줄기세포의 지방세포로의 분화 정도를 확인하기 위하여 oil-red O 로 염색한 후, 흡광도를

측정하였다. 중간엽 줄기세포로부터 RNA 를 분리한 후 RT-PCR 을 시행하여 GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  의 mRNA 발현 정도를 확인하였다.

**결과:** 유세포분석으로 본 실험에서 배양된 세포가 중간엽 줄기세포임을 확인하였다. 세 군 중에, 재생불량빈혈 환자 군이 골수 세포충실도가 가장 낮고 골수증식성질환 환자군이 가장 높았다 ( $p=0.007$ ). 그러나 중간엽 줄기세포의 지방세포로의 분화 정도와, GATA-2 및 PPAR- $\gamma$  의 발현은 모두 세 군 간에 차이가 없었다(각각  $p=0.787$ ,  $p=0.361$ ,  $p=0.779$ ).

**결론:** 본 연구에서는 골수의 세포충실도에 따라 지방세포로의 분화 정도 및 GATA-2와 PPAR- $\gamma$  의 mRNA 발현이 차이가 없었다. 추후 중간엽 줄기세포의 배양 조건을 확립하고 표본 수를 증가시키는 등 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

---

핵심 되는 말: 재생불량빈혈, 골수유래 중간엽 줄기세포, GATA-2

# 골수의 중간엽 줄기세포에서 GATA-2 의 발현 양상

지도교수 이 종 인

연세대학교 대학원 의학과

황 혜 원

## 제 1 장 서론

재생불량빈혈은 다양한 원인에 의한 골수 부전증(bone marrow failure syndrome)으로 골수세포의 총실도 감소(hypocellularity) 및 지방으로 가득 찬 골수 소견과 함께 범혈구 감소증(pancytopenia) 즉 빈혈, 백혈구감소증과 혈소판감소증의 혈액학적 소견을 보이는 혈액학적 질환이다[1]. 재생불량빈혈은 후천적으로 방사선, 약물, 벤젠, 바이러스 (거대세포바이러스, 엡스타인바 바이러스, 사람면역결핍바이러스, 제6형 사람헤르페스 바이러스, 간염바이러스), 자가면역질환, 호산구근막염, 임신, 수혈과 관계된 이식편대숙주병, 발작성야간혈색뇨에 의해 유발되거나 일부에서는 성염색체 열성으로 유전될 수도 있으나 대부분에서는 그 원인을 찾을 수 없다[2]. 젊은 환자에서는 조혈모세포이식으로 완치를 바라볼 수

있으나[3], 이식할 수 있는 상황의 환자들은 소수이다. 재생불량빈혈의 원인으로 면역체계의 이상이 관여한다고 하여[4,5] 면역억제제로 치료하기도 하나 모든 환자가 이 치료에 반응하지는 않아[3], 결국 대부분의 환자가 반복적인 감염으로 사망하는 질환이다. 따라서 재생불량빈혈의 정확한 기전을 파악하는 것이 무엇보다도 중요하다.

골수 내 세포총실도는 조혈모세포와 지방세포의 비율이 중요한데 이 두 가지 세포의 증식과 분화에 공통적으로 관련된 인자가 바로 GATA-2 이다. GATA-2 는 징크 핑거 전사인자(zinc finger transcription factors) 중 하나로 조혈모줄기세포(hematopoietic stem cell), 다분화능조혈전구체(multipotent hematopoietic progenitors), 적혈구 전구체(erythroid precursor), 거대핵세포(megakaryocytes), 호산구(eosinophils), 비만세포(mast cells)에 발현하며[6-8], 조혈(hematopoiesis)에서 중요한 역할을 한다[6]. GATA-2 가 감소하면 조혈모줄기세포의 증식과 생존이 감소하게 되는데[9,10], 배아(embryo)의 경우 GATA-2 가 결핍되면 빈혈이 발생하고, 조혈모줄기세포와 적혈구 전구체가 감소하다가 조혈모줄기세포의 증식이 일어나는 배아기 10.5 일에 사망하게 된다[6]. Fukimaki 등[11]은 이러한 GATA-2 의 역할을 고려하여 GATA-2 의 mRNA 를 정량적으로 측정하였고 정상인에 비해 재생불량빈혈 환자에서 GATA-2 의 발현이 현저히 감소되어 있음을 보여줬으며, Gene chip 분석에서도 재생불량빈혈 환자의 골수에서 추출된 CD34 양성 세포에서 GATA-2 유전자의 활성이 감소되어 있다는 것을 알 수 있었다[12]. 따라서 GATA-2 의 이상 발현은 재생불량빈혈의 발병기전의 하나임을 알 수 있다.

골수강 내 많은 부분을 차지하는 지방세포(adipocytes)는 다양한 분화능력을 가지는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)에서 지방전세포(pre-adipocyte)를 거쳐 분화가 된다. GATA-2 는 조혈조직에서 뿐만 아니라 지방전세포에서도 발현이 되는데[13] 지방전세포는 골수강 내 환경을 구성하는 주요소로, GATA-2 는 지방세포로의 분화를 억제하여 지방전세포 단계에 머물러 있게 한다(Figure 1).

지방세포로의 분화를 억제할 때 GATA-2 는 지방세포화 전사인자를 억제하게 되는데 그것 중에 하나가 과산화소체 증식-활성화 수용체-감마(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; PPAR- $\gamma$ )이다. PPAR- $\gamma$  는 중간엽 줄기세포 및 지방전세포 모두에서 발현된다[14]. 따라서 저자는 골수의 세포충실도가 낮은 재생불량빈혈 환자, 세포충실도가 높은 골수증식성질환 (myeloproliferative disease) 환자, 그리고 골수에 질환이 없는 환자의 중간엽 줄기세포에서 GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  의 발현을 비교해 보고자 하였다.

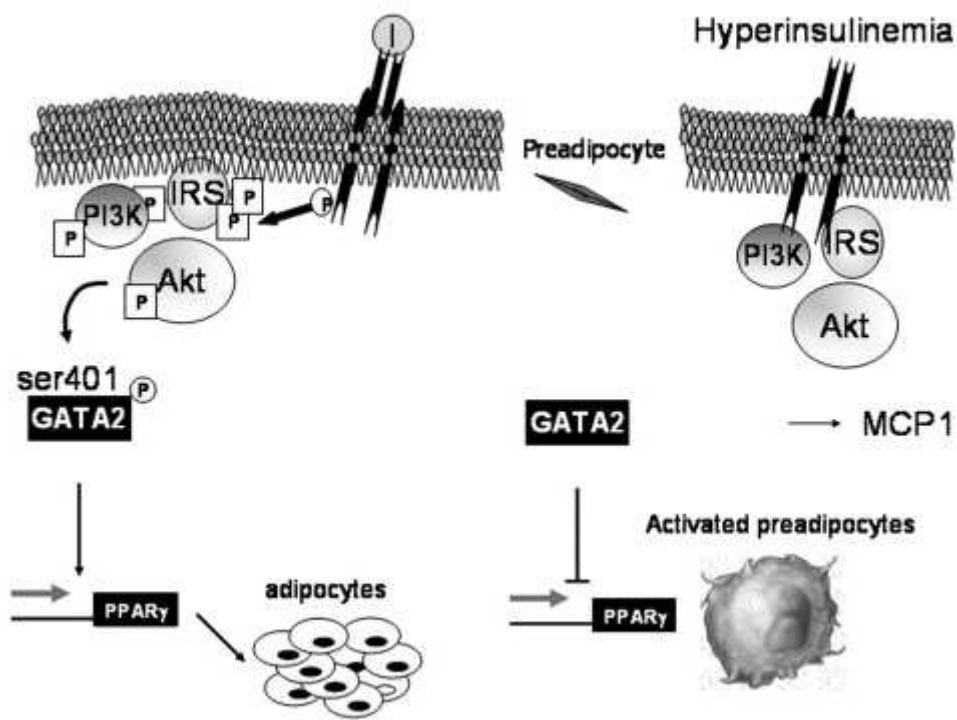


Figure 1. Effects of GATA-2 on preadipocytes[15].

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. 환자

골수유래 중간엽 줄기세포는 2009년 2월부터 2012년 2월까지 연세대학교 원주기독병원 혈액종양내과에서 골수 검사를 시행한 환자 중에서 에프씨비파미셀(주)에 연구용으로 기증, 동의를 받은 것을 사용하였으며, 본 연구와 관련하여 연세대학교 원주의과대학 연구윤리위원회의 승인을 받았다. 기증받은 골수 표본 중에서 재생불량빈혈로 진단된 11명의 환자와 골수에 질환이 없었던 14명의 환자, 그리고 골수증식성질환 즉, 만성골수성백혈병, 진성적혈구증가증과 본태성혈소판증가증을 진단받은 16명의 환자의 골수를 배양하였으며, 이 중 충분한 중간엽 줄기세포가 배양된 16명(재생불량빈혈 4명, 정상 6명, 골수증식성질환 6명)의 재료로 나머지 실험과 분석을 시행하였다.

### 2. 세포배양 및 세포 수 측정

에프씨비파미셀(주)에서 골수 내 단핵세포만 분리된 상태의 세포를 공급받아 일차 배양을 통해 골수유래 중간엽 줄기세포를 얻었다. 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco, NY, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco)이 포함된 LG-DMEM (Gibco)을 배양 배지로 사용하였다. 골수유래 중간엽 줄기세포의 일차 배양은  $1 \times 10^6$  cell/mL 농도로 100 mm dish (Corning, NY, USA)에서 5-7 일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며, 세포의 부착 여부 및 세포군집 (colony)의 생성을 확인한 후 한 번의 배양 배지 교체를 실시하였다. 5-7 일간 배양하여도 세포군집이 뚜렷하게 형성되지 않은 경우 추가로 1-2 일간 배양하였으며, 세포군집 (colony)의 생성 이후 세포가

70-80% 정도 confluence 를 나타낼 때 부착된 골수유래 중간엽 줄기세포의 계대배양을 실시하였다. 이후 계대배양은 중간엽 줄기세포가 배양 용기 면적의 80%의 confluence 를 나타낼 때 실시하였으며, 계대배양 방법은 다음과 같다. 세포 배양액을 제거하고 DPBS (Welgene, Daegu, Korea)로 세척 후, 1 × Trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 세포를 페트리접시에서 분리시켜 새로운 튜브에 옮긴 후, 상온에서 1,800 rpm 으로 5 분간 원심 분리하였다. 소량의 배양 배지를 첨가하여 세포를 잘 부유하고 Trypan blue solution (Gibco)으로 염색 후 Hemacytometer 를 이용하여 총 세포 수를 측정하였다. 총 세포 수가 측정되면 1000 cell/cm<sup>2</sup> 농도로 100 mm 페트리접시 (Coring)에 세포를 seeding 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 3. 유세포 분석 (Flow cytometry)

골수유래 중간엽 줄기세포를 확인하기 위해, 유세포분석 (Flow cytometry; Beckman Coulter, Fullerton, USA)을 통해 세포 표면 항원의 발현을 측정하였다. 항체는 중간엽 줄기세포에서 양성을 나타내는 FITC mouse anti-human CD 105 (BD biosciences, MD, USA), PE mouse anti-human CD 73 (BD biosciences), FITC mouse anti-human HLA-ABC (BD biosciences), PE monoclonal antibody CD 90 (BD biosciences)과 음성을 나타내는 FITC anti-human CD 34 (BD biosciences), FITC anti-human CD 45 (BD biosciences), FITC anti-human CD 80 (BD biosciences), PE anti-human CD 86 (BD biosciences), FITC anti-human CD 14 (BD biosciences) FITC anti-human HLA-DR (BD Biosciences)을 사용하였다. trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 배양한 세포를 페트리접시에서 분리하였으며, DPBS (Welgene)로 세척 후 유세포 분석용 시험관 각 튜브 당 세포농도 2×10<sup>5</sup>, 최종 부피 200 μL 가 되도록 넣었다. 세포가 든 각 튜브에 fluorochrome-conjugated primary antibody 또는



isotype control 을 10  $\mu$ L 씩 넣었으며, FITC mouse IgG1 와 PE mouse IgG1, FITC mouse anti-human CD 105 와 PE anti-human CD 73 는 각각 하나의 튜브에 넣었다. 20 분간 암실에서 반응시키고 DPBS 1 mL 을 첨가해 1,800 rpm 에서 5 분 동안 원심분리하여 세척하였으며, 가라앉은 세포에 DPBS (Welgene) 400  $\mu$ L 를 첨가하여 세포를 잘 부유시킨 후 유세포 분석기 (flow cytometry)로 분석하였다.

#### 4. 중간엽 줄기세포의 지방세포로의 분화

골수유래 중간엽 줄기세포를 6 well plate (Corning)에 5000 cell/cm<sup>2</sup> 농도로 seeding 후, 10% FBS (Gibco)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco)이 포함된 LG-DMEM (Gibco) 배양 배지에서 세포가 100% confluence 를 나타낼 때까지 배양하였다. 3 일간 더 배양한 후, 배양액을 제거하고 DPBS (Welgene)로 세척한 후 10% FBS (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (Gibco)이 첨가된 HG-DMEM (Gibco) 배양 배지에 1  $\mu$ M/mL dexamethasone (Sigma, Aldrich, USA), 0.5 mM/mL IBMX (Sigma), 10  $\mu$ g/mL insulin (Sigma), 100 mM/mL indomethacin (Sigma)을 첨가한 induction medium 으로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3 일간 배양하고, 10% FBS (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (Gibco)이 첨가 된 HG-DMEM (Gibco) 배양 배지에 10  $\mu$ g/mL insulin (Sigma)을 첨가한 maintenance medium 으로 1 일간 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 이를 3 번 반복한 후, 3 일에 한번 maintenance medium 으로 배지를 갈아주면서 7 일간 더 배양하였다. 평균 18 일 동안 세포를 배양하였고, 세포의 형태를 확인한 후 분화 확인 실험을 수행하였다.

#### 5. Oil-red O 염색 및 정량 분석

Passage 3 의 지방세포로 분화된 골수유래 중간엽 줄기세포를 DPBS (Welgene)로 세척하고, 10% formalin (Trisco, Baltimore, USA)으로 5 분 고정 후 새로운 10% formalin (Trisco)으로 3 시간 동안 고정하였다. 3 차 증류수로 2 번 세척 후, oil-red 0 solution (Sigma)을 넣고 2 시간 동안 염색하고 3 차 증류수로 3 번 세척하여 현미경(CK40, Olimpus corporation, Japan)으로 염색된 부분을 관찰하였다. 정량분석을 위해 6 well plate (Coning)에 isopropanol (Junsei Chemical Co., Japan) 400  $\mu$ L 씩 넣어 oil-red 0 용액을 추출하여 6 well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 100  $\mu$ L 씩 넣고 microplate reader (Biotek, Winooski, USA)로 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. RNA 의 분리

Passage 3 의 골수유래 중간엽 줄기세포로부터의 RNA 는 trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 이용해 분리하였다. 배양 후 plate 에서 분리한 세포에 trizol (Invitrogen)을 1 mL 첨가한 후 deep freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ )에 저장하였으며, 샘플이 모두 모이면 얼음물에서 녹인 후 각 튜브에 chloroform (Junsei Chemical) 200  $\mu$ L 를 넣어 섞은 후 상온에서 2-3 분 방치하고  $4^{\circ}\text{C}$  12,000 rpm 에서 15 분간 원심분리하였다. 상청액만 새로운 튜브로 옮기고 isopropanol (Junsei Chemical) 500  $\mu$ L 씩 첨가하여 상온에서 10 분간 방치한 후,  $4^{\circ}\text{C}$  12,000 rpm 에서 10 분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 염을 제거하기 위하여 80% EtOH (Daejung, Gyonggi-do, Korea) 1 mL 첨가하여 섞은 후 상온에서 원심분리하였다. 그 후 상청액을 버리고 침사물은 DEPC water (Welgene)에 녹였다. RNA 농도를 확인하기 위하여 micro-spectrophotometer 를 사용하였으며 A260/280 을 확인 하였다.

## 7. Complementary DNA (cDNA)의 합성

cDNA 합성은 제조회사 (Bioneer, Daejeon, Korea)의 지침에 따라 수행하였다. 1  $\mu\text{g}$  total RNA, 10 pmoles Oligo dT (Promega, Madison, USA), DEPC water (Welgene)로 volume 10  $\mu\text{L}$  가 되게 한 후, 37°C 5 분, 70°C 5 분간 반응시켰다. 얼음물에서 1 분간 방치하고, 5  $\times$  MMLV RTase reaction buffer (Bioneer) 4  $\mu\text{L}$ , 100 mM DDT (Bioneer) 2  $\mu\text{L}$ , dNTP (Bioneer) 2  $\mu\text{L}$ , RNase inhibitor (Promega) 0.5  $\mu\text{L}$ , MMLV RTase (Bioneer) 1  $\mu\text{L}$ , DEPC water (Welgene) 0.5  $\mu\text{L}$  를 첨가하여 42°C에서 1 시간, 95°C 5 분간 반응을 유도하여 Total RNA 의 1  $\mu\text{g}$  로 총 부피 20  $\mu\text{L}$  의 cDNA 를 합성하였다.

## 8. GATA-2, PPAR- $\gamma$ 의 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR )

RT-PCR은 제조회사 (Bioneer)의 지침에 따라 수행하였다. 10  $\times$  reaction buffer 1  $\mu\text{L}$ , 4 pmol/ $\mu\text{L}$  forward primer, 4 pmol/ $\mu\text{L}$  reverse primer 각각 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 mM dNTPs 0.2  $\mu\text{L}$ , Taq DNA polymerase 0.1  $\mu\text{L}$ , 증류수 5.7  $\mu\text{L}$ 를 넣어 총 부피가 10  $\mu\text{L}$ 가 되도록 준비하였다. PCR machine을 이용해 95°C에서 5분간 denaturation 후, 94°C에서 1분, annealing 온도에서 1분, 72°C에서 1분간의 반응을 30 cycle (GAPDH 27 cycle) 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 최종 반응산물은 2% agarose gel (Sigma)에 전기영동을 실시하여 biospectrum 600 imaging system (UVP)을 이용해 밴드와 target size가 일치하는지 확인하였다. mRNA의 발현 정도는 GAPDH 에 대한 상대적인 비율로 나타내었다.

**Table 1. Primer sequence used in reverse transcription polymerase chain reaction.**

<b>Genes</b>	<b>Forward primer (5'→3')</b>	<b>Reverse primer (5'→3')</b>	<b>Size (bp)</b>	<b>Annealing temperature</b>
GATA-2	ACACCACCCCATCCCCACCT	TTTGCACAACAGGTGCCGGC	327 bp	66°C
PPAR- $\gamma$	GCAAAGAGGTGGCCATCCGCA	GCAGTAGCTGCACGTGTTCCGT	540 bp	66°C
GAPDH	CAAGGCTGAGAACGGGAAGC	AGGGGGCAGAGATGATGACC	194 bp	60°C

Abbreviations: bp, basepair; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

## 9. 통계

결과 자료는 3 번의 반복실험 후 표준편차를 구하였으며, Mann-Whitney U test 와 Kruskal-Wallis test 를 이용하여  $p < 0.05$  인 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 제 3장 결과

### 1. 환자 및 임상양상

재생불량빈혈로 진단된 11명의 환자와 골수에 질환이 없었던 14명의 환자, 그리고 골수증식성질환으로 만성골수성백혈병, 진성적혈구증가증, 그리고 본태성혈소판증가증을 진단받은 16명의 환자의 골수를 배양하였으며, 이 중에서 재생불량빈혈 환자 4명, 골수에 질환이 없었던 환자 6명, 그리고 골수증식성질환 환자 6명에서 중간엽 줄기세포를 충분히 확보할 수 있었다. 골수에 질환이 없었던 정상 골수 군은 특발저혈소판자색반병 환자가 2명, 미만성 대세포성 B세포 림프종 3명, 역형성 큰세포 림프종이 1명이었고, 골수증식성질환 환자 군은 만성골수성백혈병 환자가 3명, 진성적혈구증가증 환자가 1명 그리고 본태성혈소판증가증 환자가 2명이었다.

재생불량빈혈과 정상 골수 군 그리고 골수증식성질환 군 환자들의 임상 양상을 비교해 보았을 때, 세 군간의 나이와 성별, 그리고 C-반응성단백은 차이가 없었으나, 예상대로 골수의 세포충실도, 백혈구, 혈소판 그리고 호중구가 재생불량빈혈 군, 정상 골수 군, 골수증식성질환 군의 순서대로 낮았으며, 혈색소는 재생불량빈혈 군에서  $9.8 \pm 7.4$ 로 정상 골수 군이나 골수증식성질환 군보다 낮았다(**Table 2**).

**Table 2. Clinical characteristics of patients.**

	<b>Aplastic anemia (n=4, Mean±SD)</b>	<b>Normal bone marrow (n=6, Mean±SD)</b>	<b>Myeloproliferative disease (n=6, Mean±SD)</b>	<b>p</b>
<b>Age (Year)</b>	56.3±28.2	66.5±14.2	54.2±24.3	0.308
<b>Sex (Male:Female)</b>	2:2	3:3	3:3	1.000
<b>BM cellularity (%)</b>	11.3±6.3	40.0±8.9	64.0±34.4	<b>0.007</b>
<b>Leukocyte count (/μL)</b>	1775±1375	6302±2526	10470±8765	<b>0.006</b>
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	9.8±7.4	12.8±2.4	12.4±2.6	<b>0.044</b>
<b>Platelet count (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	48.8±27.1	214.3±159.0	283.9±315.0	<b>0.001</b>
<b>Neutrophil count (/μL)</b>	545.0±534.9	4240±1571	9174.0±6584	<b>0.000</b>
<b>C-reactive protein (mg/dL)</b>	1.51±1.76	1.03±0.87	0.17±0.14	0.061

## 2. 골수유래 중간엽 줄기세포의 확인

### 1) 유세포 분석

골수유래 중간엽 줄기세포를 확인하기 위하여, 유세포분석을 통해 세포 표면 항원의 발현을 측정하였으며 세 군 모두 CD 105, CD 73, HLA-ABC, CD 90에 양성하였고, human CD 34, CD 45, CD 80, CD 14, HLA-DR, CD 86에 음성을 확인할 수 있었다(Table 3).

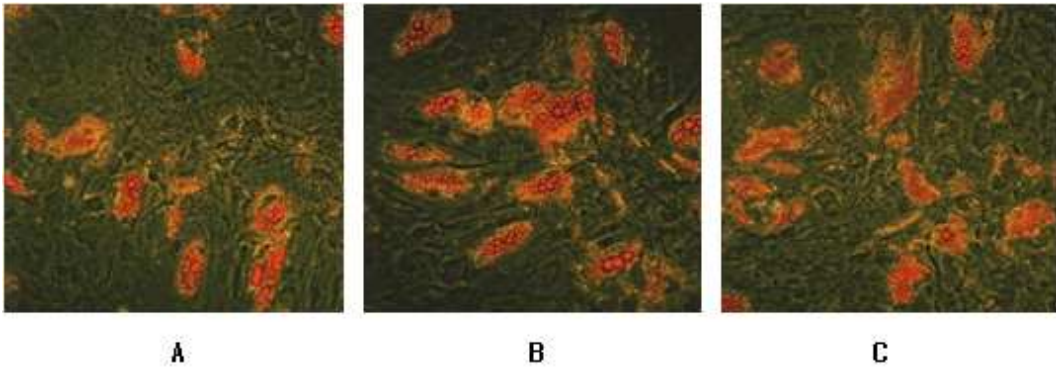


**Table 3. Results of flow cytometry of bone marrow derived mesenchymal stem cells.**

<b>Results of cell markers with positive</b>						
	<b>CD105</b>	<b>CD73</b>	<b>HLA-ABC</b>	<b>CD90</b>		
<b>Aplastic anemia</b>	93.2%	95.7%	81.8%	97.2%		
<b>Normal bone marrow</b>	99.9%	99.3%	99.5%	98.7%		
<b>Myeloproliferative disease</b>	99.2%	99.4%	97.7%	95.2%		
<b>Results of cell markers with negative</b>						
	<b>CD34</b>	<b>CD45</b>	<b>CD80</b>	<b>CD14</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>CD86</b>
<b>Aplastic anemia</b>	1.0%	0.9%	1.2%	1.0%	0.8%	2.2%
<b>Normal bone marrow</b>	1.9%	2.0%	2.5%	1.4%	2.8%	4.9%
<b>Myeloproliferative disease</b>	0.9%	1.0%	1.0%	1.6%	1.0%	1.1%

## 2) Oil-red O 염색 및 정량 분석

세 군의 골수유래 중간엽 줄기세포에서 지방세포로의 분화를 oil-red O 염색으로 확인할 수 있었다(**Figure 2**). 흡광도는 재생불량빈혈 군  $0.252 \pm 0.091$ , 정상 골수 군  $0.255 \pm 0.097$ , 그리고 골수증식성질환 군  $0.326 \pm 0.238$ 이었으며  $p$ 값은 0.787로 세 군간에 유의한 차이는 없었다.



**Figure 2. Adipogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells.** The cells of aplastic anemia (A), normal bone marrow (B), and myeloproliferative disease (C) were stained with oil-red O.

### 3. GATA-2 및 PPAR- $\gamma$

Passage 3의 골수유래 중간엽 줄기세포에서 GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  의 mRNA 정량을 위하여 RT-PCR을 시행하였다(**Figure 3**). GATA-2는 재생불량빈혈 군  $0.3510 \pm 0.08$ , 정상 골수 군  $0.463 \pm 0.17$ , 그리고 골수증식성질환 군에서  $0.3078 \pm 0.18$ 이었으며 PPAR- $\gamma$ 는 재생불량빈혈 군  $1.1043 \pm 0.37$ , 정상 골수 군  $1.0528 \pm 0.48$ , 그리고 골수증식성질환 군에서  $1.2792 \pm 0.65$ 로 GATA-2와 PPAR- $\gamma$  모두 세 군간에 차이가 없었다(각각  $p=0.361$ ,  $p=0.779$ ).

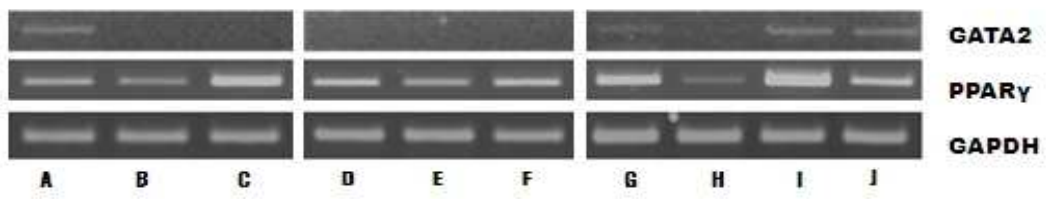


Figure 3. Expression of GATA-2 and PPAR- $\gamma$  in mesenchymal stem cells from aplastic anemia (A-C), normal bone marrow (D-F), and myeloproliferative disease (G-J).

## 제 4 장 고찰

재생불량빈혈에 대한 치료법이 이전에 비하여 나아졌으나 아직 재생불량빈혈의 정확한 발생기전은 알려져 있지 않다. 재생불량빈혈의 발생에 면역체계의 이상이 관여한다고 하여, 조혈모세포이식술을 할 수 없는 재생불량빈혈 환자의 경우 면역억제제로 치료한다. 그리고 실제로 다수의 환자에게서 이 치료는 효과적이다[16]. 그러나 줄기세포에 대한 면역체계 이상효과에 대한 보고는 아직 많지 않다[17]. 단지 몇 가지의 연구에서만 재생불량빈혈에서의 조혈모줄기세포의 병적 특성을 규명하기 위한 시험관 내 실험이 이루어졌을 뿐이다[17]. 이후 2001 년이 되어서야 처음으로 재생불량빈혈 환자의 조혈모줄기세포에 대한 성격을 규명하려는 연구가 이루어졌다[11]. Fujimaki 등[11]은 재생불량빈혈 환자, 특발저혈소판자색반병 환자 그리고 정상인에서 CD34 양성 세포의 GATA-2 mRNA 를 측정하였으며, 특발저혈소판자색반병 환자와 정상인에 비해서 재생불량빈혈 환자의 GATA-2 mRNA 가 현저히 감소되어 있음을 확인하였다. 2004 년에는 재생불량빈혈 환자의 Gene Chip 분석이 이루어졌는데, 이 연구에서는 정상인의 CD 34 양성인 조혈모줄기세포와 비교하여 재생불량빈혈 환자의 조혈모줄기세포는 GATA-2 유전자가 2 배 이하로 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다[12]. 그러나 여전히 재생불량빈혈 환자의 줄기세포에 대한 연구는 미비한 실정이다. 또한 골수강을 차지하고 있는 지방세포에 대한 연구도 아직 부족한 상태이다. 따라서 저자는 재생불량빈혈 환자의 골수유래 중간엽 줄기세포에서 조혈과 지방세포분화에 관여하는 GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  의 발현을 비교하고자 하였다.

서론에서 밝혔듯이 GATA-2 가 부족할 경우에는 조혈이 제대로 일어나지 못하고, 지방전세포에서 지방세포로의 분화가 촉진될 수 있다. 따라서 골수강 내 지방세포가 가장 많은 순서대로, 다시 말하면 골수 세포 충실도가 낮은 순서대로, 즉

재생불량빈혈, 정상골수질환, 그리고 골수증식성질환 환자 순서대로 GATA-2 의 발현이 적고, PPAR- $\gamma$  의 발현이 높을 것을 예상하였다. 환자군을 살펴보면 나이와 성별에 차이 없이 고르게 분포하였다. 감염이 있을 경우 면역학적인 기전에 의해 결과의 해석이 달라질 것을 우려하여, CRP 의 차이도 보았으나 세 군간에 의미 있는 차이는 없는 것을 확인하였다. 예상대로 골수의 세포 충실도와 전혈구검사 수치가 재생불량빈혈 환자 군에서 가장 낮았고, 골수증식성질환 환자 군에서 가장 높았다. 유세포분석을 통해 및 oil-red 0 염색을 통해 본 실험에서 배양한 세포가 골수의 중간엽 줄기세포라는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 예상했던 것과는 다르게 GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  의 발현은 세 군간의 차이가 없었다. 또한 oil-red 0 염색으로 지방을 정량분석하였으나, 재생불량빈혈에서 가장 높을 것으로 예상했던 것과는 달리, 세 군간에 차이가 없었다. 이는 Xu 등[18]이 보고한 결과와 상이하다. 이것은 아마도 다음과 같은 이유에서 기원했을 것으로 추정된다. 첫째, 골수를 기증 받은 이후 바로 실험이 이루어지지 않아서 그랬거나 중간엽 줄기세포의 배양 조건이 맞지 않았을 가능성이 있다. 왜냐하면, 재생불량빈혈 환자 11 명의 표본에서 4 명, 골수에 질환이 없었던 환자의 14 명 중 6 명, 그리고 골수증식성질환 환자 16 명 중 단지 6 명의 표본에서 중간엽 줄기세포가 배양이 되었기 때문이다. 둘째, 환자군 선정에 문제가 있을 수 있다. 정상군으로 분류된 환자들은 골수 자체에 이상이 없다 하더라도, 실제로 혈액학적 질환이 없는 완전한 정상인이 아니라 특발저혈소판자색반병, 미만성 대세포성 B 세포 림프종, 역형성 큰세포 림프종 등의 혈액질환 환자였다. 따라서 정상인과 비교하여 재생불량빈혈 환자에서 GATA-2 의 발현이 감소하고 PPAR- $\gamma$  의 발현이 증가되었다고 보고한 Xu 등[18]의 결과와는 직접 비교가 어려울 것으로 생각된다. 또한 재생불량빈혈 환자와 특발저혈소판자색반병 및 정상인의 CD34 양성 세포에서 GATA-2 mRNA 를 정량하였던 Fujimaki 등[11]의 연구에서도 특발저혈소판자색반병과 정상인의 비율이 50:50 이었으므로 본 연구와 직접 비교는

어려울 것으로 생각되며, 골수의 세포총실도만을 기준으로 나누어, GATA-2 와 PPAR- $\gamma$  발현의 차이를 기대하였던 것과는 달리, 세포총실도가 높은 군 역시 혈액학적 질환을 가지고 있었던 것이므로 골수증식성질환 역시 GATA-2 발현에 이상이 있을 가능성을 배제할 수 없을 것 같다. 셋째로 표본양이 부족하였다. 예상했던 것보다 중간엽 줄기세포가 자란 표본의 수가 너무 적어 결과 분석에 한계가 있을 것으로 생각된다.

따라서 중간엽 줄기세포를 배양하는 조건의 확립과 정상지원자 혹은 림프종 등의 혈액질환을 제외한 환자와 재생불량빈혈 환자의 비교 연구가 이루어져야 할 것이며, 다른 혈액질환에서도 GATA-2 의 역할규명이 이루어져야 할 것으로 생각된다.



**Acknowledgement :**

본 연구는 보령제약의 도움으로 진행되었습니다. (과제번호 2011-8-5288)

## 참고문헌

1. Young NS. Immunosuppressive treatment of acquired aplastic anemia and immune-mediated bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol* 2002;75:129-140.
2. Guinan EC. Diagnosis and management of aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:76-81.
3. Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood* 2012;120:1185-1196.
4. Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997;336:1365-1372.
5. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, et al. A severe and consistent deficit in marrow and circulating primitive hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in acquired aplastic anemia. *Blood* 1996;88:1983-1991.
6. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371:221-226.
7. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89:3636-3643.
8. Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, et al. The mouse GATA-2 gene is expressed in the para-aortic splanchnopleura and aorta-gonads and mesonephros region. *Blood* 1999;93:4196-4207.
9. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, et al. GATA-2 plays two

functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2004;200:871-882.

10. Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, et al. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 2005;106:477-484.

11. Fujimaki S, Harigae H, Sugawara T, et al. Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001;113:52-57.

12. Zeng W, Chen G, Kajigaya S, et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood* 2004;103:325-332.

13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.

14. Janderova L, McNeil M, Murrell AN, et al. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res* 2003;11:65-74.

15. Menghini R, Marchetti V, Cardellini M, et al. Phosphorylation of GATA2 by Akt increases adipose tissue differentiation and reduces adipose tissue-related inflammation: a novel pathway linking obesity to atherosclerosis. *Circulation* 2005;111:1946-1953.

16. Marsh J, Schrezenmeier H, Marin P, et al. Prospective randomized multicenter study comparing cyclosporin alone versus the combination of antithymocyte globulin and cyclosporin for treatment of patients with nonsevere aplastic anemia: a report from the European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Severe Aplastic Anaemia Working Party. *Blood* 1999;93:2191-2195.

17. Nakao S, Takami A, Takamatsu H, et al. Isolation of a T-cell clone

showing HLA-DRB1\*0405-restricted cytotoxicity for hematopoietic cells in a patient with aplastic anemia. *Blood* 1997;89:3691-3699.

18. Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, et al. Downregulation of GATA-2 and overexpression of adipogenic gene-PPARGgamma in mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia. *Exp Hematol* 2009;37:1393-1399.

## Abstract

### GATA-2 expression in mesenchymal stem cells

**Background and Purpose:** Aplastic anemia is characterized by decreased hematopoietic stem cells and fat replacement of bone marrow. The transcription factor GATA-2 affects both hematopoiesis and adipogenesis. GATA-2 is important for proliferation and survival of hematopoietic stem cells and GATA-2 suppresses adipocyte differentiation through inhibition of PPAR- $\gamma$  in preadipocyte. This study investigated the levels of mRNA of GATA-2 and PPAR- $\gamma$  in mesenchymal stem cells depending on marrow cellularity.

**Materials and Methods:** Bone marrows were collected from four aplastic anemia patients, 6 normal marrow subjects and 6 myeloproliferative disease patients. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured and identified using flow cytometry. The mesenchymal stem cells which were differentiated into adipocytes, were stained with oil-red O and were measured absorbance for quantitative analysis. The RNA was extracted from mesenchymal stem cells and the levels of mRNA of GATA-2 and PPAR- $\gamma$  were detected by RT-PCR.

**Results:** The flow cytometry demonstrated that cultured cells in this study were mesenchymal stem cells. Among the three groups, bone marrow cellularity was found to be the lowest from the aplastic anemia patients and to be the highest from the myeloproliferative disease patients ( $p=0.007$ ). But absorbances for

adipocyte quantification and levels of mRNA of GATA-2 and PPAR- $\gamma$  were not significantly different ( $p=0.787$ ,  $p=0.361$ ,  $p=0.779$ ).

**Conclusion:** In this study, differentiation into adipocyte and levels of mRNA of GATA-2 and PPAR- $\gamma$  depending on marrow cellularity were not significantly different among the three groups. Establishing the culture condition and increasing the sample size would be required for further studies.

---

Key Words: aplastic anemia, mesenchymal stem cells, GATA-2