



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

간암 세포 주에서 암 줄기세포 특성을
유지하기 위한 최적의 구체 형성 배양 조건



연세대학교 대학원
나노과학기술협동과정
민 선 옥

간암 세포 주에서 암 줄기세포 특성을
유지하기 위한 최적의 구체 형성 배양 조건

지도교수 김 경 식



이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2015년 6월

연세대학교 대학원
나노과학협동과정
민 선 욱

민선옥의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 경식 인

심사위원 윤 미진 인

심사위원 박 승우 인

연세대학교 대학원

2015년 6월 일

감사의 글

가장 먼저, 석사 과정을 할 수 있게 기회를 주시고 학문과 인생에 있어서 스스로 깨울 수 있도록 아낌없는 가르침을 주시고 연구를 정확한 방향으로 이끌어 주신 김경식 교수님, 그리고 논문에 대한 관심과 조언을 아끼지 않고 지도해주신 서활 교수님, 올바른 논문이 될 수 있도록 세밀하게 논문을 검토해 주신 박승우 교수님, 윤미진 교수님께 머리 숙여 진심으로 감사의 말씀을 올립니다.

이외에도 감사의 인사를 드려야 할 분들이 너무나 많습니다. 공부를 시작할 수 있게끔 전적으로 독려해 주시고 많은 가르침을 주신 이상우 선생님, 늘 말없이 뒤에서 격려해 주시고 도와주신 박선영 선생님, 이해선 선생님

항상 묵묵히 열심히 하는 우수만 선생님, 함께 한 시간이 얼마 되지 않아 아쉬운 김동희, 윤계진 선생님. 저와 연구실 추억을 공유해 주셔서 이 자리를 빌어 감사 드립니다.

마지막으로, 늘 한결같이 제 곁에서 응원해 주고 아낌없는 격려를 보내주시던 사랑하는 우리 가족 부모님, 동생에게 가장 큰 감사를 드립니다. 긴 시간의 석사과정은 저에게 참 특별했던 시간이었습니다. 오랜 기간 한 공부이었던 만큼 절대로 헛되지 않게 어디에서 어떤 일을 하던 잊지 않겠습니다. 감사합니다.

2015년 6월 민 선욱 드림

목차

국문 요약.....	1
I. 서론.....	4
1. 암 줄기세포(Cancer stem cells)	4
2. 간세포성 간암(Hepatocellular carcinoma).....	5
3. 구체 형성 배양(Sphere-forming culture).....	5
4. 연구목적(Purpose).....	8
II. 재료 및 방법.....	9
1. 세포 배양(cell culture).....	9
가. 단층 배양(monolayer culture)	9
나. 구체 형성 배양(sphere-forming culture)	9
2. 세포 형태 관찰(cell morphology)	10
3. 세포 증식 검사(cell proliferation assay).....	10
4. 역전위 중합 효소 연쇄 반응(Reverse transcription polymerase chain reaction)	10
5. 면역세포염색(Immunocytochemistry).....	11
6. 흐름세포 측정법(Flow cytometry)	12
7. 분석 방법(Statistical Analysis).....	13
III. 결 과.....	14
1. 간암 세포 주 구체 형성 배양(Sphere-forming culture of liver cancer cell line).....	14
2. 구체 형성 간암 세포 주 증식 비교 분석(Self-renewal capacity of sphere-forming cells	16
3. 구체 형성 간암 세포주의 암 줄기세포 유전자 발현(Expression of Cancer stem cell markers in sphere-forming cells).....	18

4. 구체 형성 간암 세포 주에서 암 줄기세포 표면 단백질의 발현(Expression of Cancer stem cell surface markers in sphere-forming cells)	20
5. 구체 형성 간암 세포 주에서 발현하는 암 줄기세포 표지자 발현 (Expression of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma cell line).....	23
IV. 논 의.....	28
V. 결 론.....	33
VI. 참고문헌.....	35
VII. 영문요약(Abstract).....	38



그림 목차

[Figure 1.] Hepatocellular carcinoma cells formed the anchorage-independent, self-renewing spheres at 3, 7, 15 and 20 days on sphere forming cultivation.....	15
[Figure 2.] Proliferation analysis of sphere-forming cells.....	17
[Figure 3.] Expression of stemness genes and cancer stem cell genes in sphere-forming cells	19
[Figure 4.] . Immunofluorescence staining showed that Cancer stem cells markers were highly expressed in sphere forming cells.....	22
[Figure 5.] Expression of stemness markers in sphere- forming cells.	25
[Figure 6.] Expression of cancer stem cells markers in sphere- forming cells.	27

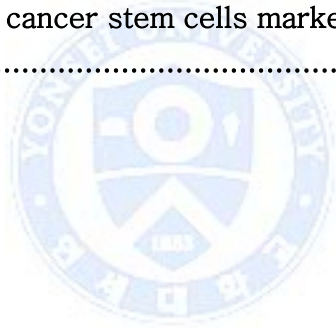


표 목 차

[Table 1.] Primer list for RT-PCR.....	11
--	----

국문요약

간암 세포 주에서 암 줄기세포 특성을 위한

최적의 구체 형성 배양 조건

<지도교수 김 경 식>

연세대학교 대학원 나노과학기술협동과정



민 선 옥

전이와 재발이 높은 간암에서 암 줄기세포를 얻기 위하여 배양 시 환경은 매우 중요하다. 구성 형성 배양은 암 줄기세포가 세포배양 접시에 부착하지 않고도 잘 자란다는 줄기세포적 특징을 이용한 방법으로서 많이 사용되고 있다. 본 실험에서는 간암 세포 주를 이용하여 세가지 종류의 배양액에서 구체 형성 배양의 효율을 비교 하였다.

간암 세포 주 Huh7, HepG2를 이용하여 각각 다른 배양액에 구성 형성 배양을 하였다. 각 군의 구체 형성 세포의 줄기세포적 특징을 분석하기 위하여 세포 증식률을 비교 하였으며, 역전위 중합 효소 연쇄 반응으로 줄기세포성 유전자

Oct4, *Nanog*, *Sox2*와 간암줄기세포에서 많이 발현된다는 *EpCAM* 간암의 전이와 증식에 관련 된 *Connexin32*, *Connexin43*의 발현을 확인하였다. 또한 면역세포 염색법으로 암 줄기세포에서 많이 발현되는 표지자들 CD90, CD133, E-cadherin, β -catenin, 을 확인하였다. 발현되는 세포의 측정을 위하여 흐름 세포 측정법을 사용하여 줄기세포 표지자들 *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*와 CD133, *Connexin32*의 발현을 확인하였다.

구체 형성 배양 초기에는 control 배양액의 세포의 증식률이 DMEM(+)*FBS*, DMEM(-)*FBS* 배양액의 세포와 비교했을 때 높은 것을 알 수 있었다. 하지만 15 일 이후부터 DMEM(+)*FBS* 배양액의 세포의 증식률이 높았으며 control 배양액의 세포는 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다. DMEM(-)*FBS* 배양액의 세포는 구체 형성을 하지 못하였으며 세포가 사멸 된 것을 볼 수 있었다. control, DMEM(+)*FBS* 군의 세포들은 유전자의 발현과 표지자의 발현이 유사하게 발현되는 것을 알 수 있었다.

위의 결과들로 보아 control, DMEM(+)*FBS* 배양액의 구체 형성 세포들은 유사한 특징을 갖고 있었으며, 성장인자를 넣어주지 않고 혈청이 포함된 배양액에서도 구체 형성을 하며, 증식이 가능하고 암 줄기세포의 특징을 갖고 있는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구는 구체 형성 배양 시 성장인자의 첨가 없이 암 줄기세포의 구체 형성 배양이 가능하다면 더 간단한 방법으로 암 줄기세포의

배양이 가능할 것이며 비용적인 면에서 절감할 수 있을 것이라고 생각한다.

핵심 되는 말: 암 줄기세포, 간암세포 주, 줄기세포성, 구체 형성 배양, 배양액, 성장인자.



간암 세포 주에서 암 줄기세포 특성을 유지하기 위한

최적의 구체 형성 배양 조건

민 선 옥

연세대학교 대학원 나노과학기술협동과정

<지도교수 김 경 식>

1 서 론

1. 암 줄기세포(Cancer stem cells)

암 줄기세포(Cancer stem cells, CSCs) 이론에 따르면, 악성종양은 암 줄기세포에 의해 형성(formation), 진행(progression) 되어, 항암제에 대한 내성 획득과 암의 재발에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹ 암 줄기세포는 암 조직에 약 1~2% 정도로 굉장히 적은 부분이지만, 특이하게 항암제, 방사선 치료에 대한 내성이 있어서 죽지 않고 잠재되어 있다가 다시 암세포로 분화되어 다른 곳으로의 전이를 일으키며 무한증식이 가능하다. 줄기세포에서 암이 생성될 것이라는 가능성은 1875년 cohnheim에 의해서 이미 제안되었지만² 다시 가능성을 제시 하면서 연구가 되어 지식이 축적됨에 따라 더욱 체계화 되었다.³ 특히 고형 암에서는 유방암에서 최초로 암 줄기세포가 입증되면서 점차

다른 암 종류로 연구가 확대되었다. ⁴

2. 간세포성 간암(Hepatocellular carcinoma)

간세포성 간암(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 세계에서 다섯 번째로 흔한 암이며, 암에 의한 사망률 3위를 차지하는 악성 종양이다.⁵ Barcelona Clinic Liver Cancer(BCLC) staging system에서 조사 한 바에 따르면, 간세포성 간암은 간 절제 간이식 방사선 치료 등의 치료법이 있지만 치료율이 낮으며 이러한 치료법도 초기 간세포 암에 제한적이다. 많은 간암세포 환자들은 암이 어느 정도 진행 된 경우가 많기 때문에⁶ 높은 재발율을 줄이기 위한 노력으로 간암에서 암 줄기세포의 연관성에 대해 많은 연구자들이 연구를 진행하고 있으나 정확한 표지자와 분리 방법에 대해서는 논란의 여지가 있는 실정이다. 암 재발에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 암 줄기세포를 겨냥한 약물 치료 등의 표적 치료를 시행한다면 보다 효율적인 암 치료가 될 것이며 이러한 이유 때문에 간암세포 주를 이용하여 암 줄기세포의 특성을 확인하는 시도가 계속되고 있다.⁷

3. 구체 형성 배양(Sphere-forming culture)

실제 환자에게서 얻은 암세포로부터 암 줄기세포를 효율적으로 체외배양 할

수 있는 방법이 확립되어야 하는데 그러기 위해서 효율적이고 적절한 배양 환경이 필요하다.

구체 형성 배양법(Sphere-forming culture)은 암 줄기세포를 배양하는 방법으로서 Reynold and Weiss 등이 최초로 인간의 뇌에서 얻은 줄기세포를 분리할 때 시도한 이래로 널리 적용되고 있다.⁸ 세포는 세포 외 기질(Extracellular matrix, ECM)에 부착되어 세포 외 기질을 통해 세포의 성장, 증식, 분화에 영향을 받는다. 세포가 세포 외 기질에 부착되지 못하고 부유상태로 자라게 되면 아노이키스(anoikis)를 통해 세포가 죽게 된다.^{3,9} 하지만 줄기세포의 성질을 갖는 세포들은 세포 외 기질의 영향을 받지 않고도 세포간의 부착을 통해 상호작용만으로 세포가 증식하며 자라게 된다. 이러한 특징을 이용하여 앞에서 언급한 바와 같이 최초로 인간의 뇌에서 얻은 줄기세포에 유리부유구체(free floating sphere) 배양을 시도하였으며 이것을 신경구체(neurosphere)라고 불렀다.⁸ 암 줄기세포 역시 암세포로 분화가 된다는 점과 줄기세포에서 발현되는 CD133, CD44, CD90등 표지자(surface marker)들이 암 줄기세포에서도 발현이 된다는 점 때문에 줄기세포와 그 특징이 유사할 것이라고 생각되었다. 그래서 구체 형성(sphere-forming) 조건에서 자라나는 세포는 암 줄기세포의 특징을 갖고 있을 것이며, 생존력이 굉장히 강한 세포일 것이라는 이론적 근거로 유방암, 난소 암 등의 악성 고형 암에서도 암 줄기세포의 구체 형성 배양법(sphere-forming culture) 방법이 사용되어 왔다.⁴ 실제로 부착된

상태에서 단층(monolayer) 형태로 자란 암세포 보다 구체 형성(sphere-forming)으로 자란 암세포의 생존율이 더 높았으며, 줄기세포에서 나타나는 *Oct4*, *ov6*, *CD133* 등의 여러 가지 표지자들이 더 잘 발현되었고, 더 적은 수의 구체 형성 배양(sphere-forming culture)법으로 얻은 세포를 마우스에 이식 하였을 때 같은 수의 단층 배양 세포(monolayer cells)보다 암 형성이 더 잘 되었다.¹⁰

구체 형성 배양(Sphere-forming culture)에 있어서 가장 중요한 환경 중 하나는 배양액(culture media)이다. 단층 배양(monolayer culture)에서 사용하는 배양액과 구체 형성 배양(sphere-forming culture)에서 사용하는 배양액은 서로 다르다. 구체 형성 배양(sphere-forming culture)은 혈청이 없는 배양액 (serum-free media)을 기본으로 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자 (basic fibroblast growth factor, bFGF), b27 첨가제(b27 supplement)의 여러 가지 성장인자를 첨가한다. 첨가되는 성장인자들의 농도는 세포 종류에 따라 조금씩 다르며, 각각의 성장인자가 세포에 미치는 영향 또한 다르다. 상피세포 성장인자(EGF)에 의한 신호전달(signaling)은 상피세포성장인자 수용체(EGF receptor)을 통하여 활성화(activation)되며, 신경교종 줄기세포에서 줄기세포성(stemness)을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹¹ 섬유아세포배양인자(FGF)는 신경교종 줄기세포에서 종양 구체 (tumor sphere)의 형성과 면집단(side population)의 증가에 중요

한 역할을 한다고 알려져 있다.¹² B27 역시 종양 구체(tumor sphere) 형성과 계대 배양 시 구체 형성 세포(sphere-forming cells)의 성격을 유지시켜 주는 역할을 한다고 한다.¹³

하지만 성장인자의 첨가 없이도 암 줄기세포의 구체 형성(sphere-forming) 성장이 가능한 암세포도 있다. 아교모세포종(glioblastoma) 줄기세포(stem cells)의 경우에는 외부 성장인자를 넣어 주지 않아도 자가분비인자 (autocrine factors)만으로도 증식되고 성장된다고 알려져 있다.¹⁴

4. 연구목적(Purpose)

본 연구자 역시 성장인자를 넣지 않고도 혈청(serum)만을 첨가한 배양액(media)에서 간암세포주의 구체 형성(sphere forming)이 가능한 것을 관찰 할 수 있었으며 이것을 간암세포 주에 적용하여 성장인자를 넣은 배양액에서 구체 형성 세포(sphere-forming cells)와 성장인자를 넣지 않고 혈청(serum)만을 첨가한 배양액에서의 구체 형성 세포(sphere-forming cells) 간의 암 줄기 세포(CSCs)로서의 성상을 비교해 보았으며 암 줄기세포로서 특징을 유지하면서 최적의 구성형성을 하는 배양 조건을 설정하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양(Cell culture)

가. 단층배양(monolayer culture)

간암 세포주인 Huh7, HepG2 세포 주(cell line)를 일반 배양 접시(culture plate)에 1×10^4 cells/cm² 밀도로 10% 소 태아혈청(fetal bovine serum)과 1X antibiotic-antimycotics가 첨가된 DMEM-High glucose (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 배양액에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 단층 배양 하였다.

나. 구체형성배양(Sphere-forming culture)

융합(confluence) 정도가 80% 가 되면 1x trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 떼 후 24-well ultra-low attachment plate (Corning, USA)에 1×10^4 cells/ml의 밀도로 임의로 명명한 세 종류의 배양액

Control(1X supplement b27, 20ng/ml Epidermal growth factor(EGF), basic fibroblast growth factor(bFGF, Invitrogen, CA)의 성장인자들이 첨가 된 DMEM/F12, 1X Antiniotic-Antimycotic (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)), DMEM(+)-FBS(10% 소 태아혈청(FBS)이 첨가 된 DMEM-High glucose, 1X Antiniotic-Antimycotic(GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)), DMEM(-)-FBS(소 태아혈청(FBS)이 첨가 되지 않은 DMEM-High glucose, 1X Antiniotic-

Antimycotic(GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)) 에서 구체 형성 배양하였다.

2. 세포 형태 관찰(Cell morphology)

구체 형성 배양(sphere-forming culture)후 배양액 균을 각 각 3, 7, 15, 20일 후 도립 현미경(inverted microscope)으로 세포의 형태를 관찰하였다.

3. 세포 증식 검사(cell proliferation assay)

구체 형성 배양(sphere-forming culture) 후 각 배양액 별로 3, 7, 15, 20일째 증식 속도를 Cell counting kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 흡광도 450nm에서 효소결합 면역흡착 측정법 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) 판독기(reader)로 측정하였다.

4. 역전위 중합 효소 연쇄 반응(Reverse transcription polymerase chain reaction)

구체 형성 배양(sphere-forming culture) 후 각 배양액 별로 3, 7, 15, 20일째 세포를 회수하여 트리졸(trizol(Invitrogen, CA)) 방법을 이용하여 추출한 리보핵산(ribonucleic acid, RNA) 2 μ g를 통해 역전위 중합 효소 연쇄반응

(RT-PCR)을 하여 얻은 cDNA를 PCR을 한 후 1.6% 우무겔 전기이동(agarose gel electrophoresis)를 사용하여 유전자발현의 유무를 확인하였다. 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR) primer sequence 는 표 1과 같다.

Gene name		Primer sequence	Size	Accession No.	A.T.	cycle
OCT 4	S	5'-CGT GAA GCT GGA GAA GGA GAA GCT-3'	245	AF268617	60	34
	A	5'-CAA GGG CCG CAG CTC ACA CAT GTT C-3'				
NANOG	S	5'-CAA AGG CAA ACA ACC CAC TT-3'	394	NM_024865	60	34
	A	5'-ATT GTT CCA GGT CTG GTT GC-3'				
SOX2	S	5'-AAC CCC AAG ATG CAC AAC TC-3'	100	BC13923.2	60	34
	A	5'-CGG GGC CGG TAT TTA TAA TC-3'				
EpCAM	S	5'-CTG GCC GTA AAC TGC TTT GT-3'	182	BC014785.1	60	34
	A	5'-AGC CCA TCA TTG TTC TGG AG-3'				
CONNEXIN32	S	5'-GTT TGA GGC CGT CTT CAT GT-3'	188	BC039198.1	60	34
	A	5'-CCA CAT TGA GGA TGA TGC AG-3'				
CONNEXIN43	S	5'-GGA CAT GCA CTT GAA GCA GA-3'	103	BC026329.1	60	34
	A	5'-GAT GAT GTA GGT TCG CAG CA-3'				
GAPDH	S	5'-TCC ATG ACA ACT TTG TGA TC-3'	452	NM_002046	55	34
	A	5'-TGT AGC CAA ATT CGT TGT TA-3'				

Table 1. Primer list for RT-PCR

5. 면역세포염색(Immunocytochemistry)

구체 형성 배양 후 각 배양액 별로 7, 15, 20일째 세포를 회수하였다. 회수된 구체 형성 세포들을 PBS 수세 후 바로 10% 포르말데히드 용액(formaldehyde solution)에 30분 간 고정 하고, 세포원심분리법(cytospin) 한 다음 같은 방법으로 고정하였다. 각각의 세포들은 CD133(abcam, messachusetts, USA) CD90, E-cadherin, β -catenin등의 일차항체(primary

antibody (Santa cruz, Texas, USA))를 붙이고 24시간 후 (Anti-rabbit IgG HRL-F(ab)₂-PE, Anti-goat IgG - FITC (Santa cruz, Texas, USA)등의 이차항체(secondary antibody)를 붙인다. 면역염색 된 세포들을 형광 현미경을 통하여 관찰하였다.(OLYMPUS, Tokyo, Japan)

6. 흐름세포 측정법(Flow cytometry)

1x Trypsin-EDTA를 사용하여 구체 형성 세포(sphere-forming cells)를 단일세포(single cells)로 분리하여 원심 분리하여 세포를 침전 시킨 후 완충액(buffer: 0.5% BSA and 2mM EDTA in PBS)으로 수세한다. 줄기세포성(Stemness) 표지자 *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*를 BD Human pluripotent stem cell transcription factor analysis kit (BD bioscience, California, USA)를 사용하여 흐름 세포 측정법으로 측정한다.

암 줄기세포 표지자 CD133 발현 세포를 측정하기 위하여 위의 방법으로 세포 분리 후 PE-conjugated antihuman CD133/2 monoclonal antibody (mAb) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 첨가한 후 1시간 동안 실온 방치 후 완충액(buffer)을 이용하여 수세 후 흐름세포 측정법(flow cytometry)으로 측정한다. 위와 동일한 방법으로 세포 침전물(pellet)을 획득한 후, 일차항체(primary antibody) connexin32 (abcam, Massachusetts, USA)

를 4℃에서 1시간 방치 후 이차항체(secondary antibody)로 donkey anti goat IgG-FITC(Santa Cruz, Texas, USA) 1시간 실온 방치 후 흐름 세포 측정법 (flow cytometry)으로 측정한다.

7. 분석 방법(Statistical Analysis)

세포 증식과 image j를 통한 수치 분석은 Graphpad prism 5(GraphPad Software, Inc., USA) 통계패키지가 이용되었다.



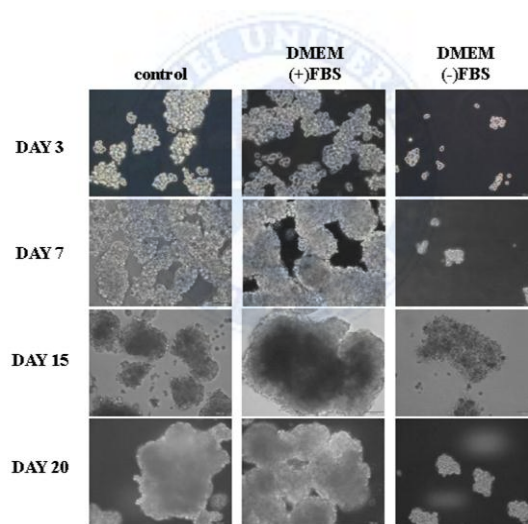
Ⅲ. 결과

1. 간암 세포 주 구체 형성(sphere-forming culture of liver cancer cell line)

세 가지 타입의 배양액(media) control, DMEM(+)FBS, DMEM(-)FBS 를 사용하여 구체 형성(sphere-forming)을 유도하였다. Huh7, HepG2 세포 주에서 Control, DMEM(+)FBS 의 구체 (sphere)의 크기는 비슷하였다. 구체 형성 세포(sphere-forming cells)는 서로 붙는 성질이 강하기 때문에 서로 부착되기 시작하였으며 15일 후부터 control 의 구체(sphere)들은 형태가 변하기 시작하였다. 반면에 DMEM(+)FBS 의 구체 형성 세포(sphere-forming cells)는 크기의 증가와 함께 형태가 유지되는 것을 관찰 할 수 있었다. 두 세포 주 모두 DMEM(-)FBS 세포는 구체 형성(sphere-forming)이 되지 않았다. (Fig 1.)



A



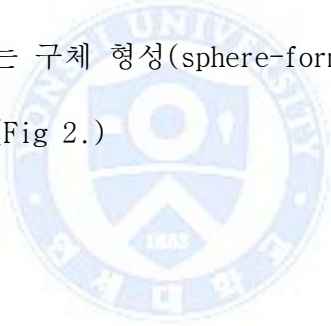
B

Fig 1. Hepatocellular carcinoma cells formed the anchorage-independent, self-renewing spheres at 3, 7, 15 and 20 days on sphere forming cultivation.

Hepatocellular carcinoma cell lines, including (A) Huh7 and (B) HepG2, could form the spheres in control and DMEM(+)FBS medium. Scale bar: 100 μ m

2. 구체 형성 간암 세포 주 증식 비교 분석(Self-renewal capacity of sphere-forming cells)

자가증식 비교를 위하여 증식률 비교를 하였다. Huh7과 HepG2 구체 형성 세포는 DMEM(+)-FBS 배양액에서 7일까지 눈에 띄는 증가는 볼 수 없었으며 control 배양액 세포의 증식속도가 증가하였다. 배양 15일 후 control 배양액 세포의 증식속도는 줄어들었으며, Huh7과 HepG2 구체 형성 세포는 DMEM(+)-FBS 배양액 세포의 증식속도가 증가하였고 control 배양액에서는 감소하였다. 20일에는 DMEM(+)-FBS 배양액의 세포 증식률이 높은 것을 알 수 있었다. DMEM(-)-FBS 배양액의 세포는 구체 형성(sphere-forming)이 일어나지 않았으며, 세포증식이 되지 않았다. (Fig 2.)



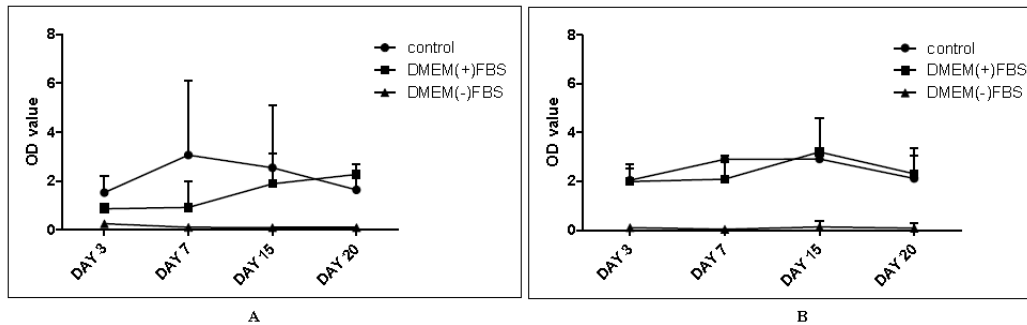


Fig 2. Proliferation analysis of sphere-forming cells

Cells proliferation rate were performed at day 3, 7, 15 and 20. (A) The Huh7 sphere-forming cells showed a cell proliferation. Cells in DMEM(+)-FBS media were increased on 3 to 20 days. However, cells in control media were decreased from 7 days. Cells in DMEM(-)-FBS media did not increased. (B) The HepG2 sphere-forming cells showed a cell proliferation. Cells in DMEM(+)-FBS media were increased for 15 days and in control media decreased from 7days.

3. 구체 형성 간암 세포주의 암 줄기세포 유전자 발현(Expression of cancer stem cell markers in sphere-forming cells)

줄기세포 유전자(stemness genes) 와 암 줄기세포(CSC)의 유전자(gene) 발현을 역전위 중합 효소 연쇄반응(RT-PCR)을 시행하여 확인하고 image j (National Institutes of Health, Maryland, USA) 프로그램을 통해서 발현을 수치화 하여 비교하였다. 줄기세포 유전자들의 발현은 배양 초기에는 Huh7, HepG2 모두 control 배양액의 구체 형성 세포에서 높았으나 Huh7 세포 주는 15일부터 눈에 띄는 차이를 보이지 않았으며 배양기간이 길어지면서 증가하였다. HepG2는 7일부터 비슷한 발현 양을 보였다. 암 줄기세포에서 발현하는 대표적인 유전자(gene)로 알려져 있는 상피세포 부착분자(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)의 발현량은 Huh7, HepG2 모두 두 군이 비슷한 것을 볼 수 있었고 눈에 띄는 확연한 차이는 보이지 않았다. 간암에서 증식과 성장, 전이에 관여하는 Connexin32(Cx32), Connexin43(Cx43) 모두 큰 차이를 보이지 않았다. (Fig 3.)

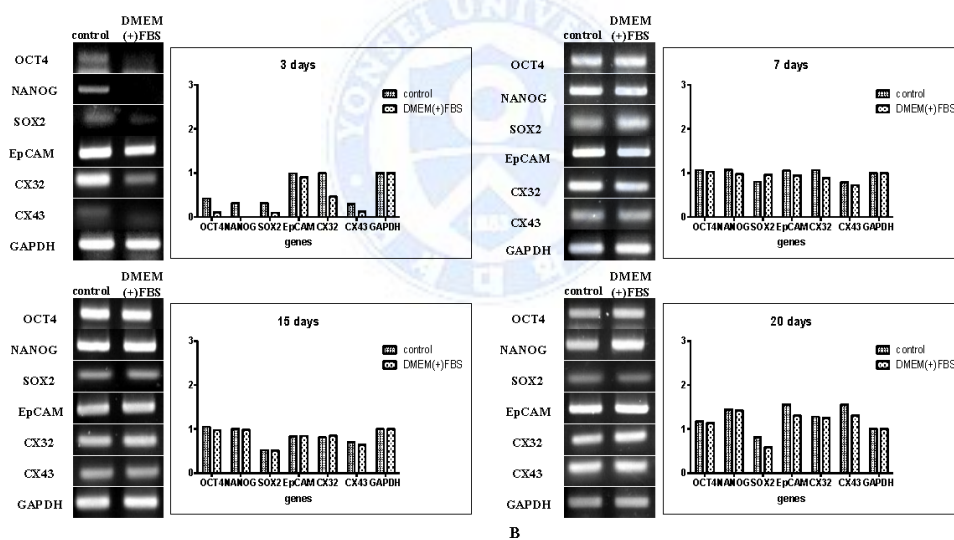
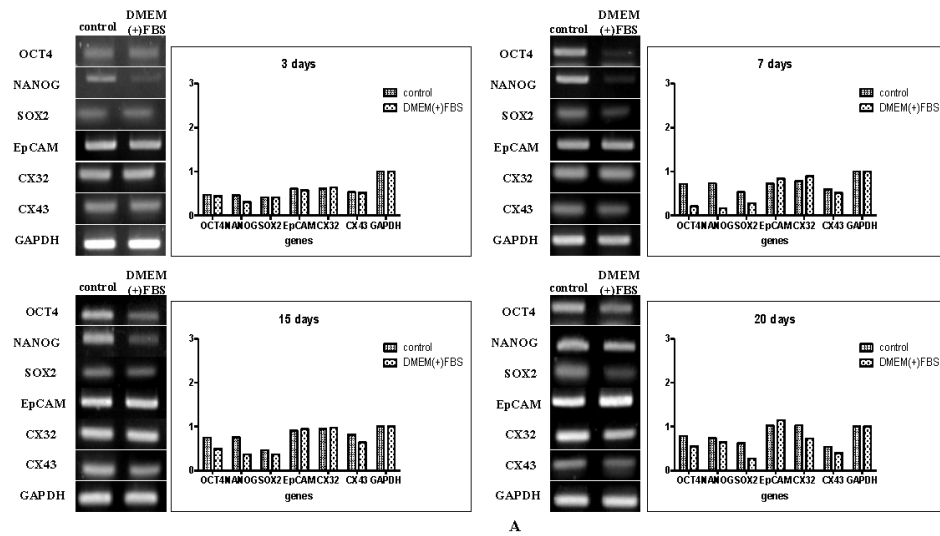
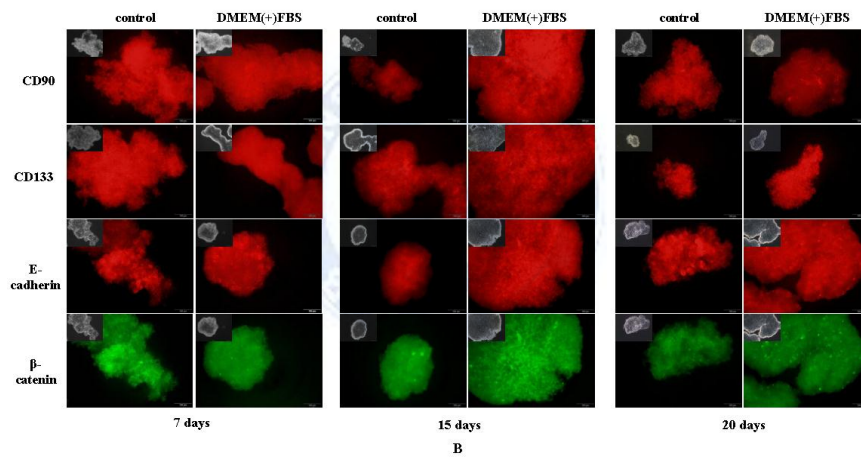
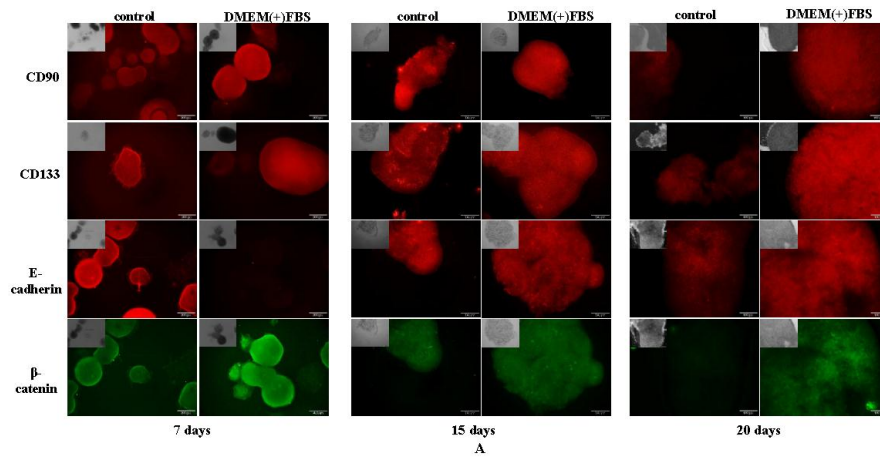


Fig 3. Expression of stemness genes and cancer stem cell genes in sphere-forming cells. RT-PCR analysis with stemness (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*), cancer stem cell genes (*EpCAM*, *Cx32*, *Cx43*) in (A) Huh7 sphere-forming cells and (B) HepG2 sphere-forming cells. Expression of gene levels were measured by image j

4. 구체 형성 간암 세포 주에서 암 줄기세포 표면 단백질의 발현(Expression of Cancer stem cell surface markers in sphere-forming cells)

암 줄기세포 표면 표지자로서 사용되는 CD90, CD133은 Huh7, HepG2 모두 발현되었다. 세포간 결합과 증식에 관여하는 E-cadherin은 7일에 DMEM(+)FBS 배양액 세포에서는 거의 발현 되지 않았지만 15, 20일에는 두 군에서 모두 발현되었다. 암 줄기세포의 증식을 알 수 있는 베타 카테닌(β -catenin)은 Huh7 세포 주에서 7, 15일에는 모두 발현 되었으나 20일에는 DMEM(+)FBS 배양액의 세포가 상대적으로 더 발현 되는 것을 볼 수 있었다. HepG2 세포 주 역시 표지자 모두 발현 되는 것을 관찰 할 수 있었다. 두 세포주의 구체 형성 세포는 암 줄기세포의 특징을 모두 갖고 있으며, 성장인자의 유무는 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 사료 되었다.(Fig 4.)



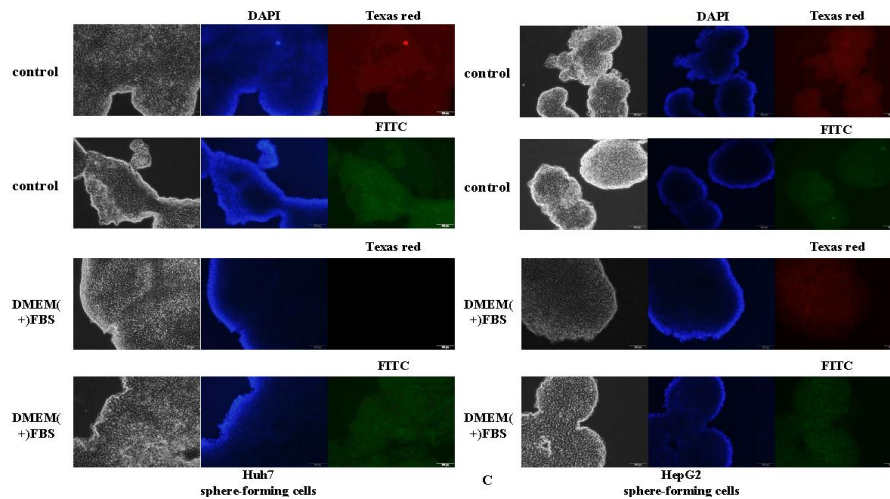


Fig 4. Immunofluorescence staining showed that Cancer stem cells markers were highly expressed in sphere forming cells. (A) Huh7 sphere-forming cells and (B) HepG2 sphere-forming cells expressed the CSC markers, as observed under fluorescence microscope. Sphere-forming cells showed they were positive for cancer stem cells markers of CD90(red), CD133(red), E-cadherin(red), beta-catenin(green). (C) Negative control staining of Huh7 and HepG2 sphere-forming cells. Scale bar: 100µm

5. 구체 형성 간암 세포 주에서 발현하는 암 줄기세포 표지자 발현 (Expression of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma cell line)

줄기세포성(stemness) 표지자(markers)로서 Oct4, Nanog, Sox2의 발현을 확인하였다. Huh7 세포 주에서 7일째 control 배양액 세포에서 Oct4+ 0.09%, Nanog+ 19.14%, Sox2+ 48.02% 이며, DMEM(+)-FBS 배양액 세포에서 Oct4+ 세포는 12.04%, Nanog+ 11.04%, Sox2+ 31.65% 로서 두 배양액의 구체형성 세포에서 각 표지자들의 비율은 유사하게 보였다. 15일 후 control 배양액에서 Oct4+ 10.04%, Nanog+ 72.84%, Sox2+ 49.44% 였으며, DMEM(+)-FBS 배양액의 세포에서는 Oct4+ 40.66%, Nanog+ 59.89%, Sox2+ 42.24% 였다. 20일 후 control 배양액에서는 Oct4+ 71.83%, Nanog+ 72.08%, Sox2+ 51.13% 의 비율을 보였으며, DMEM(+)-FBS 배양액 군에서는 Oct4+ 57.14%, Nanog+ 80.48%, Sox2+ 55.51%로서 배양기간이 길어질수록 각 표지자를 발현하는 세포의 비율이 증가 되는 것을 확인할 수 있었다. HepG2 세포 주에서는 7일째 control 배양액 세포에서 Oct4+ 0.66%, Nanog+ 40.1%, Sox2+ 12.93% 이며, DMEM(+)-FBS 배양액 세포에서 Oct4+ 세포는 4.44%, Nanog+ 14.74%, Sox2+ 5.25% 의 발현세포 비율을 확인할 수 있었으며, 15일 후 control 배양액에서 Oct4+ 25.79%, Nanog+ 42.61%, Sox2+ 17.85% 였으며, DMEM(+)-FBS 배양액의 세포에서는 Oct4+ 14.50%, Nanog+ 27.40%, Sox2+ 6.56% 였다. 20일 후 control 배양액에서는 Oct4+ 8.39%,

Nanog+ 55.14%, Sox2+ 63.58% 의 비율을 보였으며, DMEM(+)FBS 배양액 군에서는 Oct4+ 4.72%, Nanog+ 49.03%, Sox2+ 65.02%로서 각 세포 주에서 control, DMEM(+)FBS 배양액의 구체 형성 세포에서 발현되는 표지자의 양상은 유사했으며, 배양 기간이 길어질 수록 각 표지자를 발현하는 세포의 비율은 증가하였다. Huh7과 HepG2 세포 주에서 발현되는 표지자의 양상은 서로 다른 것을 알 수 있었다. (Fig 5.)



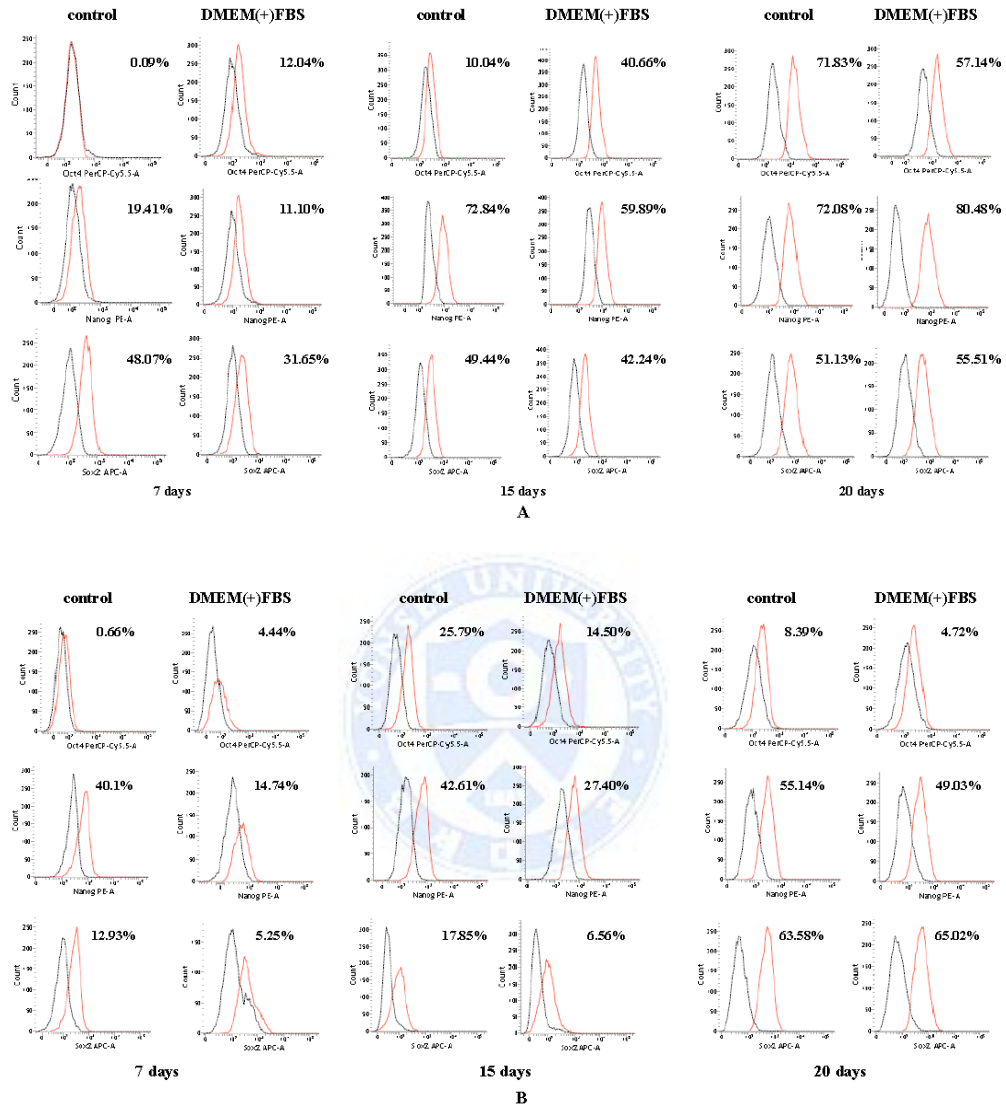


Fig 5. Expression of stemness markers in sphere- forming cells. Flow cytometry assays for pluripotency markers. Oct4, Nanog, Sox2 were increased similar to the number of sphere-forming cells in both media. (A) Huh7 sphere-forming cells (B) HepG2 sphere-forming cells

Connexin32(Cx32)의 발현량을 흐름세포 측정법(Flow cytometry)을 통해서 확인하였다. Huh7 세포 주는 control, DMEM(+)FBS 군 세포 모두 큰 차이는 없었으며, 두 그룹 모두 시간이 지날수록 Cx32가 발현되는 세포가 적어지는 것을 알 수 있었다. HepG2 세포주의 경우 control 배양액에서는 배양기간이 길어지면서 발현되는 세포의 양이 증가되기는 하였으나 5% 이내였다. 하지만 DMEM(+)FBS 배양액 세포에서 7일째 40%이내 발현하였고, 15일째 감소하였고 20일째 다소 증가하였다. 두 배양액의 발현 양상은 유사한 것을 알 수 있었다. 암 줄기세포의 대표적 표지자로서 CD133을 흐름세포 측정법(Flow cytometry)를 통하여 발현량을 측정하였다. Huh7 세포 주는 구체 형성(Sphere-forming) 배양 7일째와 15일째 측정한 결과 큰 차이 없는 것을 알 수 있었으며, 20일째 두 그룹 모두 CD133을 발현하는 세포의 양이 감소하였다.(Fig 6.)

두 배양액의 구체 형성 세포에서 표지자의 발현 차이가 없는 것으로 보였다.

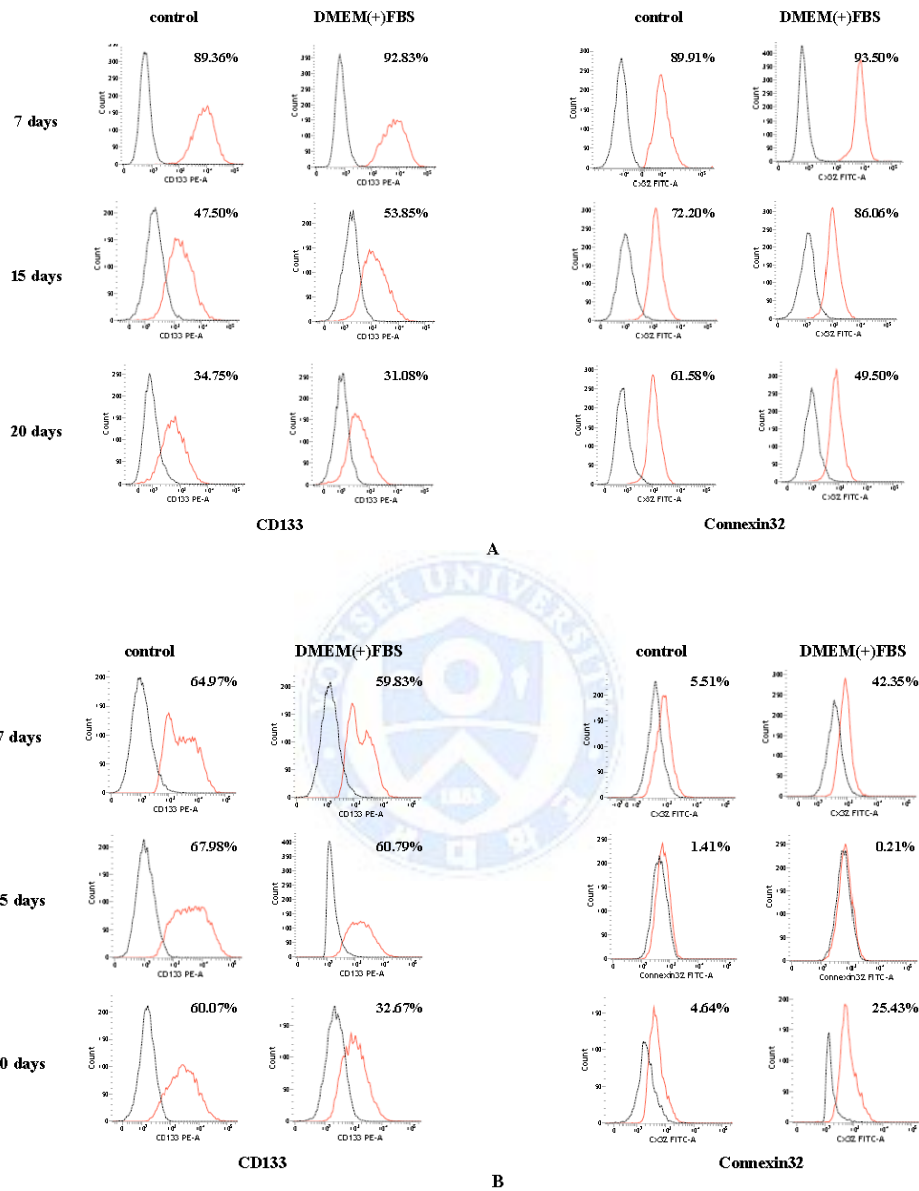


Fig 6. Expression of cancer stem cells markers in sphere- forming cells. (A) Huh7 sphere-forming cells were positive for CD133, Connexin32. (B) HepG2 sphere-forming cells were positive for CD133 and Connexin32

IV. 논의

세포 배양 시 세포 배양 접시(cell culture plate)에 부착되지 않고 부유 상태로 배양되는 구체 형성 배양법(sphere-forming culture)은 신경, 전립선(prostate), 유방(mammary) 등의 성체줄기세포(adult stem cell)에서 사용되어 왔다.^{15,16} 이러한 고휘 암 조직의 암 줄기세포의 구체 형성 배양 시 사용되는 배양액은 혈청(serum)을 첨가하지 않고 성장인자 (Epidermal growth factor(EGF), basic fibroblast growth factor(bFGF))를 첨가하여 증식 시킨다고 알려져 있다.^{4,10} 하지만 유방암세포주인 MCF7과 폐암세포주인 A549에서는 이러한 성장인자가 포함되지 않은 배양액에서 상피성장인자(EGF)의 자가분비(autocrine)가 오히려 증가되며 그에 따른 상피성장인자 수용체(EGFR)가 활성화 되어 암 줄기세포의 구체 형성이 촉진되고 증가된다고 한다. 하지만 기본 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF)의 분비는 억제되었을 때 구체 형성(sphere formation)이 증가 되었으며 반대로 이것이 증가 되었을 때에는 암 줄기세포의 구체 형성을 억제시킨다고 한다.⁴

본 실험에서는 배양액에 성장인자를 첨가하지 않고 혈청만 첨가하여 구체 형성을 비교하였다. 성장인자의 유무와 관계 없이 구체 형성이 모두 잘 되었으며, 암 줄기세포 특징도 눈에 띄는 차이를 보이지 않았다. 성장인자(growth factors)와 혈청(serum) 모두 첨가 되지 않은 DMEM(-)FBS 배양액의 세포는 구

체 형성(sphere-forming)이 되지 않았으며 증식하지 못하고 대부분 사멸되는 것을 관찰 할 수 있었다. 그래서 이후 실험에서는 DMEM(-)FBS 배양액의 세포는 제외하였다.

구체 형성(sphere-forming)은 세포간의 활성화에 의해 자가증식(self-renewal)을 하면서 구체(sphere) 형태로 증식하기 때문에 두 배양액의 세포 증식률 비교 실험을 진행 하였고 배양 후 7일까지 control 배양액의 세포들의 증식률이 증가했으며 이것은 성장인자의 영향으로 세포가 급격하게 증식하는 것 같다. 15일 후 두 배양액 군의 눈에 띄는 차이는 없었으며 초반에 성장인자가 증식률에 영향을 끼치지만 배양 기간이 길어지면 큰 영향을 끼치지 않는 것 같다. 두 군 모두 배양기간이 길어지면서 증식률이 감소하였다. 암 줄기세포는 앞서 언급한 바와 같이 암세포로 분화 할 수 있으며 자가증식이 가능하다는 점에서 줄기세포와 비슷한 특징을 갖고 있기 때문에 다능성 줄기세포에서 발현하는 주요 전사인자인 Oct4, Nanog, Sox2의 발현을 비교하였다. Huh7 구체 형성 세포에서 DMEM(+)FBS 배양액의 세포와 비교했을 때 약하게 발현하였으나 15일 이후부터 DMEM(+)FBS, control 배양액의 세포들 모두 발현 되었고 큰 차이가 없었다. HepG2 구체 형성 세포는 DMEM(+)FBS 배양액에서 3일째 Oct4가 약하게 발현 하였으나 7일 이후부터 DMEM(+)FBS, control 배양액에서 모두 발현하였다. 결과로 도출 할 수 있는 것은 증식률과 마찬가지로 성장인자 첨가의 유무는 배양 기간이 길어지면 세포의 줄기세포성(stemness)에 큰 영향을 끼치지

않는 것 같다. 표지자 단백질의 발현을 비교 시 Huh7 세포 주는 배양 초기에는 거의 발현되지 않았으나 배양 기간이 지날수록 표지자의 발현이 증가하였다. 두 군 모두 발현하는 세포의 양상이 비슷한 것으로 보아 두 배양액의 큰 차이는 없는 것으로 보였다. HepG2 세포 주에서는 7일과 15일 Nanog 발현 세포의 비율이 높았으며 20일째에는 Sox2 발현 세포의 비율이 증가하였다. 이것은 배양 후 15일까지 증식률이 증가 했으나 그 이후 감소했던 결과를 뒷받침해 줄 수 있는데 Nanog 의 발현량이 증가되는 세포에서 암 줄기세포의 증식률이 증가하기 때문이다. 세포주간의 차이는 있었으나 배양액 그룹간의 차이는 없었다. 줄기세포 표지자간의 상호작용과 신호체계에 대한 연구가 필요 할 것으로 생각한다. 암에서의 암 줄기세포의 대표적인 표지자인 CD133 발현 역시 이 세포들이 암 줄기세포로서의 특징을 가지고 있음을 설명해 주고 있다.

간세포 암(HCC)의 악성(premalignant)의 예후 인자이며 초기간세포 암(early HCC)의 생물학적 지표(biomarker)로서 사용되고 암개시세포(tumor-initiating cells) 또는 줄기세포의 특성을 갖고 있는 간암세포에서 확인되는 상피세포 부착분자(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)은¹⁷ 두 그룹 모두 강하게 발현하는 것으로 보아 암 줄기세포로서의 특징을 갖고 있다는 것을 의미한다. 유전자 발현과 함께 암 줄기세포의 표면인자로 확인되는 표지자(marker)들을 확인할 필요가 있었다. E-cadherin은 암, 식도암에서 종양세포의 악성분화도와 침윤, 전이와 관련 있다고 보고되었다.¹⁸⁻²⁰ E-cadherin의 발현 감소

는 actin cytoskeleton과의 연결을 매개하는 β -catenin의 발현도 감소시키며 β -catenin 자체의 이상에 의해서도 세포막의 β -catenin의 발현이 감소하게 된다. 이러한 E-cadherin, β -catenin의 감소가 종양의 침윤과 전이와 상관관계가 있다고 알려져 있다.²¹ 본 연구의 결과 HepG2는 구체 형성 세포 배양 기간 동안 모두 발현이 되었고 Huh7의 경우 배양 7일에 DMEM(+)-FBS 세포 균은 E-cadherin은 거의 발현 되지 않았으나 β -catenin은 발현 되었다. 20일에는 E-cadherin은 발현 되었으나 β -catenin은 약하게 발현하였다. 구체 형성 세포의 생존률 결과와 비교했을 때 E-cadherin과 β -catenin의 상관관계는 구체 형성 세포의 생존율과는 크게 연관이 없는 것으로 생각된다. β -catenin은 Wnt/ β -catenin signaling과도 관련이 있는데 이것은 간섬유아세포(Hepatoblast)의 증식과 분화에 관여 한다고 알려져 있는 표지자로서 β -catenin의 발현증가를 유도하게 되면 간섬유아세포암(hepatoblastoma), 간세포암(hepatocellular carcinoma)의 증식과 성장을 증가시킨다고 한다.²² 실험 결과 두 세포주의 control, DMEM(+)-FBS 배양액 두 군 모두 발현 되었으며 이것은 세포가 증식과 성장을 하고 있다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 세포막에서의 발현만을 관찰하였으나 암 줄기세포의 전이 및 생존율의 관계성을 밝히기 위해서는 핵 내 또는 세포질의 β -catenin 발현에 대한 연구를 같이 시행 하는 것이 필요할 것으로 사료된다. 간을 포함한 뇌, 췌장 등 많은 암 조직으로부터 암 줄기세포로 동정되는 중요한 표지자로서 많이 이용되고 있는

CD133이 발현되는 세포의 증가는 암의 전이성과 암 줄기세포의 팽창 (expansion), 자가증식(self-renewal)이 활성화 되었다는 것을 의미한다.^{23,24} Huh7 세포주는 두 군 모두 Connexin32(Cx32) 유전자의 발현을 관찰 할 수 있었고 Cx32를 발현하는 세포의 비율은 유사했으며 CD133을 발현하는 control, DMEM(+)FBS 배양액의 구체형성세포(sphere-forming cells)의 비율도 큰 차이가 없었다. 하지만 HepG2 세포 주 에서 Cx32를 발현하는 세포의 비율이 상대적으로 적은 세포 비율을 보였다. Cx32는 간에서 간극결합(gap junction)의 주요 구성 단백질이라고 알려져 있으며²⁵ 악성 간암 세포 에서는 이러한 간극결합(gap junction)이 정상 간 세포와 비교 했을 때 상대적으로 소실 되어 있기 때문에 connexin family의 발현이 감소하거나 정상적으로 발현되지 않는다고 한다. 그래서 Cx32는 마우스에서 간암 발생 동안 초기에 감소 된다는 보고가 있다.²⁶ HepG2 세포 주는 비 부착(anchorage-independent) 환경에서 악성 간암 세포로 성장한다고 알려져 있기 때문에²⁷ 부유 상태에서 배양하는 본 연구와 같은 환경에서 성장하는 것이므로 Huh7 구체 형성 세포와 비교하였을 때 HepG2에서 발현되는 세포의 비율이 상대적으로 적은 것으로 생각된다. Huh7 세포 주는 Cx32 발현 세포의 비율이 20일째 감소하였다. 두 세포 주 에서 모두 CD133의 발현 세포 비율이 20일째 많이 감소하였다. 이것은 CD133 발현 세포가 줄기세포의 특징인 분화성(differentiation)을 갖고 있으며 성장인자와 혈청(serum)의 지속적인 첨가로 인하여 CD133 발현 세포들이 CD133이 발현되

지 않는 세포로 분화되었다고 볼 수 있다. 실제로 간암세포 주에서 CD133, EpCAM 발현 세포들이 배양 기간이 길어지면서 CD133, EpCAM이 발현되지 않는 세포로 분화 되었다는 논문이 발표된 바 있다.²⁸ 간암줄기세포에서 발현되지는 CD90은 두 그룹 모두 발현 되었으며 암 발생을 일으키는 암 줄기세포의 특징을 갖고 있다고 볼 수 있다. 앞의 결과들을 바탕으로 간암세포의 단층배양에서 사용하는 혈청이 포함된 배양액에서도 암 줄기세포의 구체 형성 배양이 가능하다는 것을 알 수 있었으며, 암 줄기세포의 특징을 갖고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 구체 형성(sphere-forming) 시 배양 초반에는 성장인자가 첨가 된 배양액이 암 줄기세포 배양 시 효율적이라고 볼 수 있었다. 하지만 성장인자의 첨가 유무는 장기적인 배양을 봤을 때 큰 차이가 없을 것으로 생각한다. 외부의 성장인자 첨가 없이도 배양 기간이 길어짐에 따라 스스로 분비되는 인자(factors)에 의하여 성장과 증식이 되는 것으로 생각된다. 이러한 결과로 더 나아가 세포에 영향을 끼치는 자가분비인자(autocrine factors)의 분석이 필요할 것이다.

V. 결론

성장인자를 넣어주지 않은 것과 큰 차이가 없는 것으로 보아 성장인자를 넣지 않고도 암 줄기세포의 구체 형성(sphere-forming) 배양을 할 수 있다면 환자의 비용적인 부담이 적어질 것으로 생각된다. 암 줄기세포를 장기간 배양하게

되면 성장인자 또는 혈청에 의하여 세포의 특징을 변화시킬 수 있으므로 분화 표지자 등의 발현 유무의 확인이 필요하다. 또한 암 줄기세포의 암세포의 분화를 확인하기 위하여 구체 형성 배양세포(sphere-forming cells)를 동물 모델로의 이식을 통하여 종양형성(tumorigenesis)의 확인 및 비교가 필요할 것으로 사료된다. 그리고 세포 주에서 발현되는 표지자들의 발현양상이 다른 것으로 보아 환자 개개인의 암 조직에서 분리 되는 암 줄기세포 역시 그 특징이 다를 것으로 생각된다. 더 나아가 환자에게 적용하기 위해서는 세포 주 이외에 환자에게서 얻은 암 줄기세포에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.



참고문헌

1. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* 2012;21:283-96.
2. Cohnheim J. Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1875;65:64-9.
3. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994;77:477-8.
4. Kim J, Jung J, Lee SJ, Lee JS, Park MJ. Cancer stem-like cells persist in established cell lines through autocrine activation of EGFR signaling. *Oncol Lett* 2012;3:607-12.
5. el-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001;5:87-107, vi.
6. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current Strategy for Staging and Treatment: The BCLC Update and Future Prospects. *Seminars in Liver Disease* 2010;30:61-74.
7. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;132:2542-56.
8. Reynolds BA, Weiss S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central-Nervous-System. *Science* 1992;255:1707-10.
9. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-26.
10. Cao L, Zhou YM, Zhai BB, Liao J, Xu W, Zhang RX, et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *Bmc Gastroenterology* 2011;11.
11. Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura SI, et al. Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:10958-66.
12. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:781-6.
13. Yiben Gu, Jie Fu, Pang-Kuo Lo, Shunqi Wang, Qian Wang, Chen H.

- The effect of B27 supplement on promoting in vitro propagation of Her2/neu-transformed mammary tumorspheres. *Journal of Biotech Research* 2011;12:7-18.
14. Li GH, Chen ZT, Hu YD, Wei H, Li DZ, Ji H, et al. Autocrine factors sustain glioblastoma stem cell self-renewal. *Oncology Reports* 2009;21:419-24.
 15. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development* 2003;17:1253-70.
 16. Suzuki A, Oyama K, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Establishment of clonal colony-forming assay system for pancreatic stem/progenitor cells. *Cell Transplantation* 2002;11:451-3.
 17. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 2007;67:10831-9.
 18. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Tahara H, Tamura S, Miyata M, et al. Immunohistochemical Evaluation of E-Cadherin Adhesion Molecule Expression in Human Gastric-Cancer. *Virchows Archiv a-Pathological Anatomy and Histopathology* 1992;421:149-56.
 19. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, et al. Expression of E-Cadherin Cell-Adhesion Molecules in Human Breast-Cancer Tissues and Its Relationship to Metastasis. *Cancer Research* 1993;53:1696-701.
 20. Doki Y, Shiozaki H, Tahara H, Inoue M, Oka H, Iihara K, et al. Correlation between E-Cadherin Expression and Invasiveness in-Vitro in a Human Esophageal Cancer Cell-Line. *Cancer Research* 1993;53:3421-6.
 21. Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM. Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: Implications for cell adhesion and signaling. *European Journal of Cancer* 1999;35:60-5.
 22. Ochiai A, Akimoto S, Kanai Y, Shibata T, Oyama T, Hirohashi S. c-erbB-2 gene product associates with catenins in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:73-8.

23. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:15178-83.
24. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research* 2003;63:5821-8.
25. Zhang JT, Nicholson BJ. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J Cell Biol* 1989;109:3391-401.
26. Sakamoto H, Oyamada M, Enomoto K, Mori M. Differential changes in expression of gap junction proteins connexin 26 and 32 during hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:1210-5.
27. Carloni V, Romanelli RG, Mercurio AM, Pinzani M, Laffi G, Cotrozzi G, et al. Knockout of alpha6 beta1-integrin expression reverses the transformed phenotype of hepatocarcinoma cells. *Gastroenterology* 1998;115:433-42.
28. Chen Y, Yu DK, Zhang H, He HW, Zhang CX, Zhao WL, et al. CD133(+)/EpCAM(+) Phenotype Possesses More Characteristics of Tumor Initiating Cells in Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells. *International Journal of Biological Sciences* 2012;8:992-1004.

Abstract

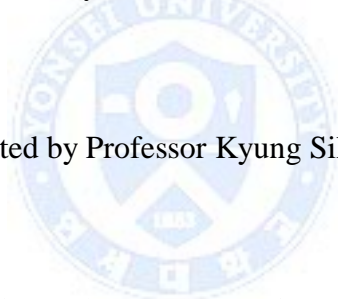
Ideal sphere-forming conditions for stemness in hepatocellular carcinoma cell line

Seon Ok Min

The Graduate Program of Nano Science and Technology

Yonsei University, Seoul 120-752, South Korea

(Directed by Professor Kyung Sik Kim)



Cancer stem cells are one of the biggest causes of tumor metastasis and recurrence. Culture environments are very important to obtain the cancer stem cells in vitro. Sphere formation is a culture method for cancer stem cells. In this study, we validated to optimal culture condition for sphere formation of hepatocellular carcinoma cell line using three different types of culture media.

Huh7 and HepG2 cells were plated in different culture media allowed for sphere formation. To confirm the stemness characteristics of sphere cells, the proliferation, and expression of stem cell markers of Huh7 sphere-forming cells were checked. And we

evaluated the gene expression of cancer stem cells by RT-PCR analysis with EpCAM, Connexin32 and Connexin43 primers and Immunocytochemistry assay with CD90, CD133, E-cadherin, β -catenin, antibodies on sphere-forming cells. Flow cytometry was provided to confirm stem cell markers and Connexin32, CD133.

Huh7 and HepG2 sphere-forming Cells in control media showed higher level of cell proliferation than in DMEM(+)-FBS or DMEM(-)-FBS media cells on 7 days, while DMEM(+)-FBS media cells exhibited higher level than others on post 20 days. Proliferation of DMEM(-)-FBS media cells did not improve; consequently, it was impossible to obtain sufficient amount of cell for further analysis. DMEM(+)-FBS and control media cells had similar tendency on expression of cell surface markers. In results of flow cytometry, there were no significant differences between two groups.

In conclusion, results showed that sphere-forming cells in DMEM(+)-FBS and control media had similar character. So, it is assumed that a growth factor-free medium is adaptable or efficient tool for in vitro cultivation of cancer stem cells, because the tool shall be reduced expense for experiments without the adding of growth factors.

Key words: cancer stem cells, Hepatocellular carcinoma cell line, Sphere-forming culture
Stemness, Media, Growth factors