

제대혈 유래 CD34 양성세포로부터 적혈구 분화유도와 Microarray를 이용한 유전자 프로파일 분석

김창기 · 이지혁¹, 박광일 · 김현숙 · 유철주² · 라선영³ · 김현옥

연세대학교 의과대학 진단검사의학과, 내과 소아과², 암전이 연구센터³

Ex Vivo Generation of RBCs from CD34+ Cells in Human Umbilical Cord Blood and Expression Profile Analysis Using Microarray

Chang Ki Kim, M.D., Jihyuk Rhee, M.D.¹, Kwang-il Park, M.D., Hyon Suk Kim, M.D., Chuhl Joo Lyu, M.D.², Sun Young Rha, M.D.³, and Hyun Ok Kim, M.D.,

Departments of Laboratory Medicine, Internal Medicine¹, Pediatrics² and Cancer Metastasis Research Center³, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : In this study, we attempted to generate RBCs from CD34+ cells in cord blood using a 3-step culture protocol and also evaluated a change in immunophenotypic characteristics and expression profile according to erythropoietin (EPO) concentrations and culture duration.

Methods : 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 a specific combination of growth factors for 21 days. [1st step: Flt3-ligand (Flt3-L), thrombopoietin and stem cell factor (SCF); 2nd step: IGF-1, SCF and EPO; and 3rd step: IGF-1 and EPO] To evaluate the effect of EPO on proliferation and differentiation, cells were cultured with different EPO concentrations (0, 3, 10 & 20 U/mL). Cell count and morphology were monitored during the culture. For phenotyping, antibodies to CD34, CD38, CD45 and glycophorin A (GPA) were used. The expression profile of cultured cells was analyzed by 17,000-gene microarray analysis.

Results : As EPO concentration increased, cell expansion was also increased, showing a maximum expansion at 20 U/mL. The cell population showed a gradual decrease in expression of CD34 and CD45, whereas the expression of GPA was not prominent in any conditions. However, we observed increased expression in some genes associated with erythropoiesis (e.g. glycophorin A, rhesus blood group CcEe antigens).

Conclusions : This study shows that erythropoietin enhances the proliferation of hematopoietic progenitor cells. Our culture system did not achieve pure production of RBCs, but induced expression changes that indicated erythroid differentiation. (*Korean J Lab Med* 2005; 25: 457-64)

Key Words : Cord blood, CD34+ cells, Erythropoietin, RBCs

서론

의료기술의 발달로 장기이식술의 보편화, 노령화 인구 증가, 교통사고 증가 등 혈액에 대한 수요가 급격히 증가하고 있다[1]. 그러나 안전한 혈액을 공급하려는 노력에도 불구하고 수혈을 통한 B형 간염, C형 간염, HIV 감염 사례가 사회적으로 큰 파장을 준 바 있다[2-4]. 또한 West Nile virus, variant Creutzfeldt-

접 수 : 2005년 7월 18일 접수번호 : KJLM1869
수정본접수 : 2005년 11월 7일
교신저자 : 김현옥
우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
전화 : 02-2228-2444, Fax : 02-364-1583
E-mail : hyunok1019@yumc.yonsei.ac.kr

*본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포응용 연구 사업단의 연구비 지원(과제관리번호SC13051)에 의해 수행되었음.

Jakob disease 등의 새로운 병원체로 인한 수혈 전파성 감염이 보고되고 있다[5, 6]. 따라서 감염의 위험이 없으며 안정적으로 혈액을 공급하기 위한 노력이 모색되어 왔으며, 그 중 하나로 조혈모세포를 배양하여 새로운 혈액의 공급원으로 이용하려는 연구가 시도되었다[7-12].

조혈모세포에 대한 개념이 부족하였던 과거에는 성인의 골수나 말초혈액에서 분리한 단핵구를 바로 배양에 이용하였다[13-15]. 그러나 조혈모세포의 표지 인자인 CD34 단클론성항체를 이용하여 순수한 조혈모세포 분리가 가능하게 되면서 CD34 양성세포를 분리하여 조혈모세포 분화연구에 많이 사용하게 되었다[16-18]. 조혈모세포원으로 가장 많이 쓰이는 것은 골수이지만 최근 제대혈의 이용이 늘고 있다[19]. 골수에 비해서 제대혈은 비교적 구하기 쉽고 조혈모세포의 농도가 높으며[20, 21], 조혈모세포가 보다 더 미성숙하고 증식 능력이 우수하여 배양시간이 짧은 장점이 있어 이를 이용한 세포배양이 활발히 진행되고 있다[20, 22, 23].

조혈모세포로부터 적혈구 분화는 초기 CD34 양성세포의 증폭 배양과정과 erythropoietin (EPO)에 의한 적혈구 분화를 유도하는 두 단계로 나누어 진다. 이는 초기 배양에 필요한 성장 인자와 적혈구 분화를 유도하는 성장 인자가 다르기 때문이다[24]. 초기 배양에 첨가되는 Flt3-ligand (Flt3-L), stem cell factor (SCF) 그리고 thrombopoietin (TPO) 등의 성장인자는 다양한 분화능력을 가진 혈액 줄기 세포의 성장과 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다[7]. 이들 중 SCF는 조혈모세포의 초기 성장뿐 아니라 특정 세포의 분화와 성숙을 유지하는데 도움을 준다[9]. 반면 EPO는 적혈구 모세포에 대해서 mitogen의 역할과 성장인자로서 작용하여 적혈구 모세포의 증식과 적혈구로의 분화를 촉진한다[7]. 특히 적혈구계열이 아닌 다른 혈구들의 분화를 억제하기 위해서는 EPO의 자극이 가장 중요한 것으로 알려져 있다[7, 23].

기존의 적혈구 분화 유도 연구에서는 배양 방법을 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 대한 보고는 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 제대혈로부터 CD34 양성세포를 분리하여 세분화된 배양조건에서 적혈구 분화를 유도하였고 배양 초기부터 다양한 농도의 EPO를 첨가하는 실험을 병행하여 적혈구 분화 과정에 미치는 EPO의 효과를 규명하고자 하였다. 또한 적혈구 분화 과정 중 유전자 발현을 high-density microarray 방법을 이용하여 측정함으로써 적혈구 분화유도에 따른 유전자 발현양상의 변화를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 제대혈의 채집

세브란스 병원 분만실에서 정상 분만한 산모로부터 동의를 구

한 후 제대혈을 채집하였다. 분만 후 제대를 이중으로 결찰하고 소독한 후 제대를 절단하였으며, 태반이 만출되기 전 제대정맥에서 25 mL의 항응고제 CPDA-1이 포함된 채혈백(녹십자, 서울, 한국)을 사용하여 제대혈을 채취하였다.

2. 조혈모세포 분리

제대혈을 Ficoll-Hypaque (비중 1.077, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 단핵구층을 분리하였다. CD34 양성세포는 분리된 단핵구로부터 high-grade magnetic field와 mini-MACS column (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)을 이용한 superparamagnetic microbead 방법으로 분리하였다.

3. 배양

기본배지는 X-Vivo 10 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)에 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iron-saturated human transferrin, 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ferric nitrate, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soybean lecithin, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cholesterol 그리고 10^{-6} M hydrocortisone을 첨가하여 제조하였다.

배양은 3주(21일) 동안 진행하였다. 첫 1주는 조혈모세포의 증식을 유도하기 위해 CD34 양성세포를 $10^4/\text{mL}$ 농도로 기본배지에 부유시키고, 50 ng/mL Flt3-L (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA), 100 ng/mL TPO (PeproTech Inc.) 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-1 (IGF-1, PeproTech Inc.)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. 조건 별로 3개씩 총 12개의 배양을 시행하였다.

37°C의 온도와 5%의 CO₂ 대기 조건에서 배양을 시행하였으며, 배지는 3-4일마다 교체하였다. 배양 세포의 증식 정도는 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며, 새로 분주하는 세포수를 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 로 조정하였다. 또한 세포의 형태 변화를 분석하기 위하여 슬라이드 도말표본을 만들어 Wright-Giemsa 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

4. 유세포 분석

면역표현형 분석을 위하여 CD45, CD34, CD38, GPA (Immunotech, Marseille, France)에 대한 단클론성 항체를 사용하였다. Mini-MACS column을 통해 분리된 세포는 배양 직전에 CD45와 CD34의 표현을 측정하여 순수도를 구하였고, 배양 7일, 14일, 21일째 배양세포에 대해 CD45, CD34, CD38, GPA의 표현을 측정하였다. 유세포 분석은 EPICS XL (Beckman-Coulter Inc.,

Miami, FL, USA)을 사용하였다.

5. 배양 세포의 유전자 microarray 분석

1) RNA 추출 및 증폭

세포를 1×10^6 정도 취하여 TRIzol LS Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)와 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 분리, 정제하였다. 4 μ g의 총 RNA를 template로 하여 oligo-dT₂₄/T7 primer와 SuperScript II RT (Invitrogen Corp.)를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 첫 번째 반응이 끝난 혼합물에 dNTP mix와 DNA ligase, DNA polymerase I, RNase H 2U를 가하고 16°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 T4 DNA polymerase를 가하고 16°C에서 5분간 반응시킨 후 double stranded cDNA를 추출하였고, T7 MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 double stranded cDNA로부터 mRNA를 전사했다.

2) RNA labeling과 교잡반응

증폭된 mRNA 4 μ g의 역전사 반응에 Cyanine 3-dUTP (NEN Co., Boston, MA, USA) 혹은 Cyanine 5-dUTP (NEN)를 가하여 표지하였다. 대조군인 CD34 양성세포 RNA는 Cyanine 3로 배양 세포의 RNA는 Cyanine 5로 표지하여 표식자를 만들었다. 표식자는 QIAquick PCR Purification kit (Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 최종적으로 표식자는 Microcon YM-30 column (Millipore, Bedford, MA, USA)로 적당한 용적을 맞추었으며, 100°C에서 2분간 denaturation시켰다.

Microarray는 17,000개의 인간 유전자를 포함한 cDNA chip (GenomicTree Co., Daejon, Korea)를 사용하였다. 교잡반응을 시행하기 전에 3.5X SSC, 0.1% SDS, 10 mg/mL bovine serum albumin을 가하여 42°C에서 1시간 동안 prehybridization을 시켰

다. 배양세포 및 제대혈 조혈모세포의 증폭된 RNA로부터 만들어진 표식자 4 μ g을 25% formaldehyde, 5X SSC, 0.1% SDS와 함께 62°C에서 습도를 유지하면서 하룻밤 동안 반응시켰다. 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, 500 g에서 원심 분리하였다.

3) 이미지 스캔 및 자료 분석

Array는 GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City, CA, USA)로 스캔하였으며, GenePix Pro 4.0 (Axon Instruments)으로 background signal을 제거한 후 형광 신호를 계산하였다. 배양하지 않은 CD34 양성세포를 대조군으로 하여 배양 7일과 14일 세포의 유전자 발현의 상대적인 증가 혹은 감소를 측정하였다. 배양 세포의 결과 분석은 within-print tip Lowess function을 이용하여 normalization을 시행한 후 계층군집분석을 하였고, SAM (Significant Analysis of Microarray)를 이용하여 배양 7일에 비해 배양 14일에 발현이 변화한 유전자를 찾았다. 또한 적혈구 생성과 관련이 있는 유전자에 대해서는 개별적으로 검증하였다.

결 과

1. 제대혈에서의 CD34 양성세포수와 회수율

산모로부터 채집한 제대혈은 평균 50 ± 22 mL이었다. 제대로부터 얻은 단핵구수는 $2.4 \pm 1.1 \times 10^6$ 이었다. MACS 분리 후 얻은 CD34 양성세포는 평균 $1.2 \pm 1.1 \times 10^6$ 로 회수율은 총 유헤세포의 $0.5 \pm 0.4\%$ 이었다. 유세포 분석 결과 제대혈에서 분리된 CD34 양성세포의 순수도는 90% 이상이었다(Fig. 1).

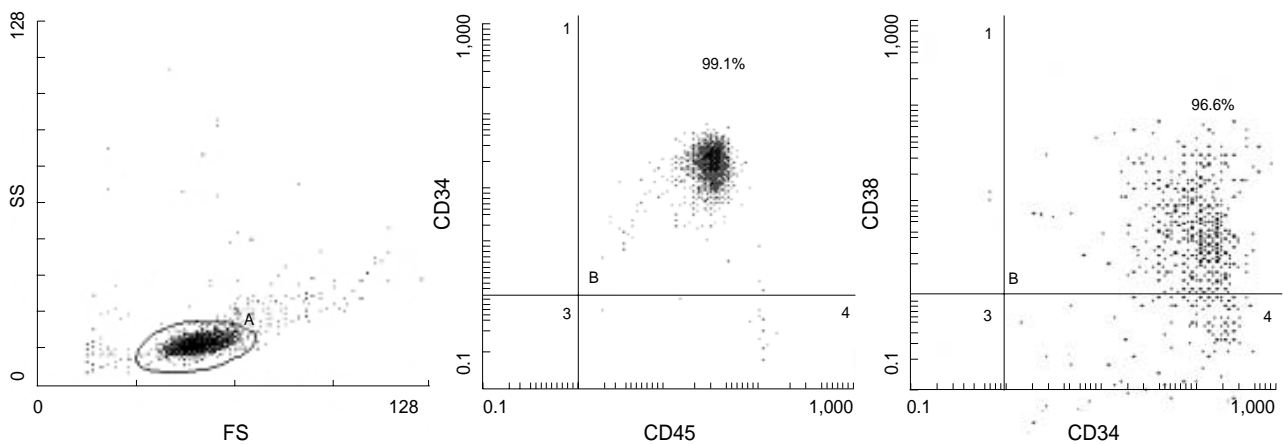


Fig. 1. Phenotypic characteristics of isolated hematopoietic progenitor cells from cord blood using Mini-MACS. Isolated cells were showing homogenous population with low side scatter and forward scatter. These cells were also expressing high CD34, CD45 and CD38. (CD34+/CD45+: 99.1%, CD34+/CD38+: 96.6%).

2. 적혈구 분화유도배양에 있어서의 EPO의 효과

EPO를 배양 처음부터 첨가한 군과 배양 1주일부터 첨가한 군에서 모두 2주까지 세포수가 증가하다가 그 이후 감소하는 양상이 관찰되었다(Fig. 2). 또한 첨가한 EPO의 농도가 높아 질수록 세포 증식이 증가되는 양상을 보였으며, EPO를 20 U/mL 농도로 배양 시작부터 첨가한 경우에서 가장 높은 세포 증식(n=3, 14일, 평균 233배)을 관찰할 수 있었다. 대조군으로 EPO를 첨가하지 않고 배양한 경우에는 모두 증식을 유지할 수 없어 실험을 중단하였다.

3. 배양세포의 형태 분석

체대혈에서 바로 분리한 CD34 양성세포는 무과립의 크기가 큰 단핵구였다. 배양이 진행되면서 호산구성 과립이 관찰되었고 세포의 모양이 불규칙해지며 세포질 내에 공포(vacuole)와 과립이 많은 백혈구계열의 세포가 많이 관찰되었다(Fig. 3). 배양조건에 따른 차이는 없었다.

4. 면역 표현형의 변화

배양이 진행되면서 CD34의 표현은 배양 7일에 모든 조건에서

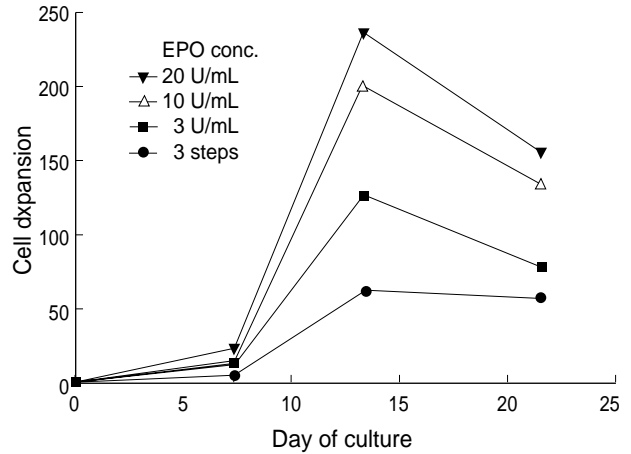


Fig. 2. The mean cell expansion according to culture days and conditions. All cells were showing maximum cell expansion at Day 14. As EPO concentration increased, cell expansion also increased. 3 Step cultures resulted in lowest cell expansion.

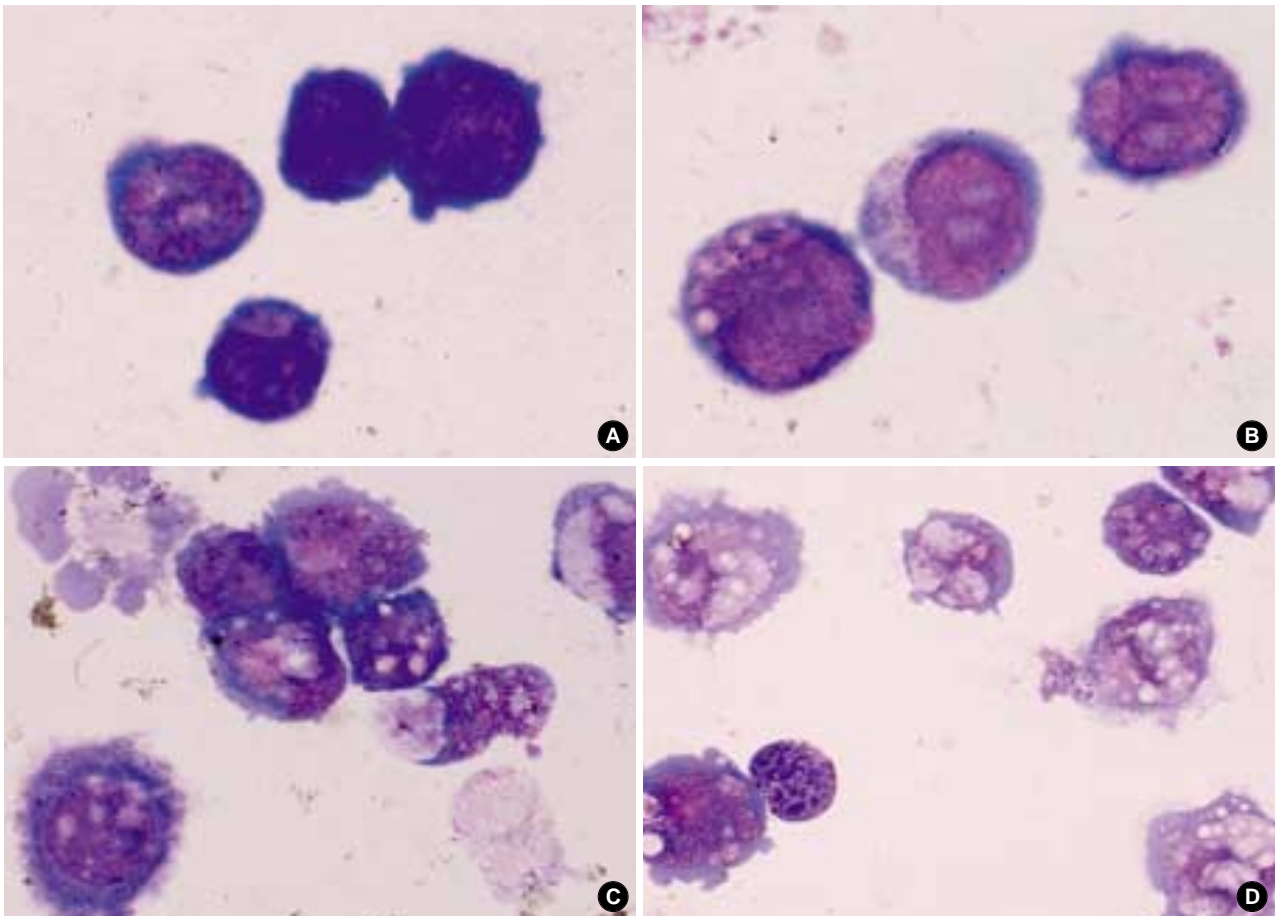


Fig. 3. Photographs of the cells on day 0 (A), day 7 (B), day 14 (C) and day 21 (D). (Wright-Giemsa stain, × 1,000).

15%를 넘지 않을 정도로 급속하게 감소하였고, CD45 항원은 그에 비해 비교적 높게 표현되는 양상이었지만 배양 21일에는 20.2-33.9% 정도로 뚜렷하게 감소하였다. 기본 배양 조건인 세 단계 배양에서만 배양 7일에 CD34의 표현이 EPO를 처음부터 넣어준 군보다 높게 표현되어 EPO를 배양초기에 첨가할 경우 조혈모세포가 더 빨리 CD34의 표현이 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 모든 조건에서 시간이 경과함에 따라 적혈구의 표지자인 GPA의 표현은 3% 이하였고, 배양기간 동안 발현의 변화를 보이지 않았다(Table 1).

5. 배양세포의 유전자 프로파일의 분석

17,000개의 유전자를 normalization 한 후 10,986개의 유전자가 남았고, 이 중에서 배양 7일에 비해 배양 14일에서 유의한 유전자 발현의 차이를 보이는 유전자를 Significant Analysis of Microarray (SAM)을 이용하여 검색하였다. 그 결과 False discovery

Table 1. Immunophenotype analyses of cultured CD34+ cord blood cells

Culture condition	Culture day	Expression (%)				
		CD34	CD38	CD45	GPA	
3 steps* (n=3)	day 7	13.6	63.8	99.0	1.0	
	day 14	0.3	4.9	NT	0.5	
	day 21	1.0	0.6	33.9	1.3	
3 U/mL (n=3)	day 7	6.0	43.3	81.8	1.9	
	day 14	0.8	2.8	32.3	2.0	
	day 21	0.4	0.5	25.4	1.8	
EPO conc. (n=3)	10 U/mL	day 7	5.9	34.7	77.2	1.9
		day 14	0.2	2.2	22.7	2.1
		day 21	0.3	0.3	21.2	2.3
	20 U/mL	day 7	5.9	34.0	81.9	1.7
		day 14	0.1	1.8	22.0	1.5
		day 21	0.2	0.2	20.2	2.2

*EPO를 배양 2단계에서 첨가한 기본적인 배양조건임. Abbreviations: NT, not tested; GPA, glycophorin A.

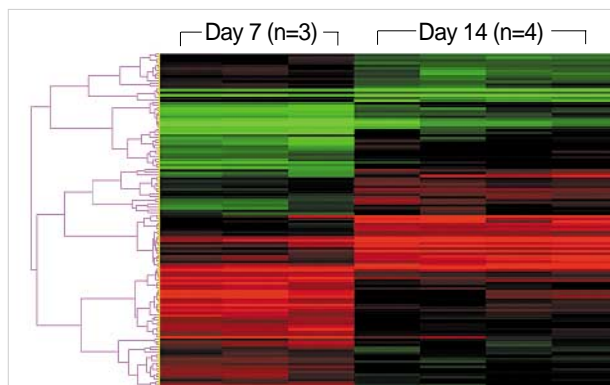


Fig. 4. Hierarchical clustering with selected 125 genes using two-class SAM (FDR 0.74%).

rate (FDR)가 0.74%로 유의한 유전자를 125개 선정하였고, 선정된 유전자군을 이용한 hierarchical clustering에서 배양 7일과 14일군이 구분됨을 확인하였다(Fig. 4). 125개 유전자 중에서 17개의 유전자가 7일 배양세포에 비해 14일 배양 세포에서 3배 이상 발현이 증가하였으나, 기능적으로 적혈구 분화와 관련성은 높지 않았다(Table 2). SAM 분석에서는 유의한 변화를 보이지 않았으나 형광신호의 평균을 비교하였을 경우 적혈구 생성과 관련이 있는 glycophorin A, Rhesus blood group, CcEe antigens, ery-

Table 2. Among 125 genes differently expressed based on culture duration, 17 up-regulated genes (more than 3-fold)

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	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

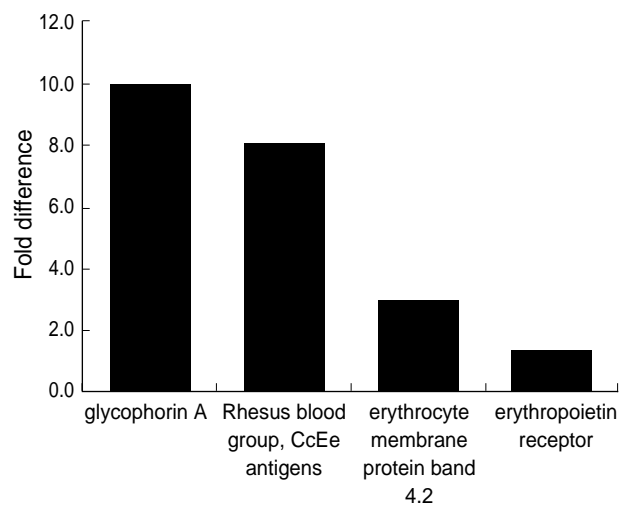


Fig. 5. The change of mean expression in genes related to erythropoiesis. Expression of glycophorin A, rhesus blood group, CcEe antigens, erythrocyte membrane protein band 4.2, erythropoietin receptor genes increased 10, 8.3, 3.0 & 1.5 fold approximately.

thocyte membrane protein band 4.2 그리고 erythropoietin receptor 유전자 발현 정도가 7일 세포에 비해 14일 세포에서 증가해 있어 적혈구 항원의 발현은 초기에 일어나고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

적혈구 생성은 매우 복잡한 과정이며 다양한 성장인자와 사이토카인, 조혈모세포 그리고 골수 미세 환경의 상호작용에 의해서 조절된다[21]. EPO는 적혈구 모세포에 표현된 EPO receptor (EPOR)에 작용하여 적혈구로의 분화와 증식을 촉진하는 역할을 하는 적혈구 생성의 핵심 성장인자이다[10, 12-16, 18, 22-25]. Wu 등[26]은 EPO와 EPOR이 knockout된 쥐들에 심한 빈혈이 발생되어 결국 사망에 이르는 것을 관찰하여 적혈구 생성에 EPO와 EPOR의 상호작용이 적혈구 생성에 필수적임을 증명하였다. SCF는 처음에는 분화되지 않은 혈구모세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려졌지만 이미 계열이 정해진 혈구세포의 성장을 돕는 기능이 있는 것으로 밝혀졌다[10]. 적혈구 생성에 있어서 EPO와 SCF의 상승작용이 여러 연구에서 증명되었고, 대부분의 적혈구 생성 실험에서 이 두 성장인자를 사용하였다[8, 10, 16, 22, 25, 27, 28]. 골수의 조혈모세포에서 성숙한 적혈구로 분화하는 과정은 여러 단계로 구성되며, 크게 EPO가 필요 없는 초기 단계와 EPO 의존적인 후기 단계로 구분된다. 즉 EPO의 자극이 필요 없는 단계에서는 SCF나 TPO 같은 성장인자를 첨가하여 조혈 모세포를 증식시키고 그 뒤에 적혈구로의 최종 분화를 유도하기 위하여 EPO를 첨가하였다. Neildz-Nguyen 등[7]은 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. 본 연구에서는 모든 배양 조건에서 14일까지 급속하게 세포가 증식하였으나 배양 3단계에서는 세포수가 약간 감소하는 양상을 보였다. 이는 기존 연구와 유사한 결과였으며[7], 3단계 배양에는 조혈모세포의 증식을 촉진하는 SCF 등의 성장인자가 첨가되지 않았기 때문으로 생각된다.

여러 연구에서 체외 적혈구 생성에 있어서 EPO의 중요성에 대해 강조하였으나 실험마다 EPO 농도에 차이가 있었다. 정상인의 혈중 EPO 농도는 50 mU/mL 정도이지만[15], 기존 연구에서 사용한 EPO의 농도는 1 U/mL에서 4 U/mL로 다양하였다. 또한 적혈구 생성에 있어서 적절한 EPO 농도와 EPO 농도 증가와 첨가시기에 따른 변화에 대해서는 알려진 내용이 적는데, 본 연구에서는 EPO 농도가 증가하면서 세포 증식이 증가하였고 가장 높은 농도인 20 U/mL에서 다른 조건에 비해 월등한 세포 증식을 관찰할 수 있었다. 따라서 EPO의 농도와 세포증식 간에는 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 반면 대조군으로 EPO를 첨가하지 않은 경우 배양 14일까지 세포 형태는 유지하였지만 세포수

가 증식하지 못하고 결국 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 등[9]의 보고와 일치하는 소견이었다. 또한 Sui 등은 EPO가 조혈모세포의 apoptosis를 억제하는 기전을 규명하였다[28]. 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 있었고[7], 본 실험에서도 배양 세포의 형태와 표현형 결과를 통해 조혈모세포로부터 증식된 세포가 적혈구 계열로의 분화가 충분하게 진행되지 못한 것으로 해석하였다.

배양 세포의 유전자 발현단계에서의 변화를 알기 위해 microarray를 시행하였다. 125개 유전자가 배양에 따라 통계적으로 의미 있는 발현변화를 보였고 3배 이상의 발현증가를 보인 유전자는 17개였다. 지금까지 밝혀진 이들 유전자의 기능은 적혈구 분화와 연관성이 분명하지 않으나 SAM을 이용하여 통계적 차이를 보인 유전자이므로 적혈구 분화에서의 역할이 규명되어야 할 것으로 생각된다. SAM을 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. 본 연구에서 적혈구 분화에 있어서 EPO의 농도와 첨가시기의 영향을 분석하였다. EPO 농도가 증가하면서 세포의 증식이 촉진되는 것을 확인하였으나 유전자 단계의 변화가 표현형의 변화로 연결되지 못하였다. 본 연구에서 사용한 배양 조건이 적혈구 분화를 위한 최적 조건이 아닌 것으로 생각되며 EPO 첨가 외에 다른 첨가물의 농도 변화를 통해 해결할 수 있을 것이다.

지금까지 조혈모세포로부터 혈구 세포를 얻으려는 많은 노력이 있어왔다. 그러나 적혈구의 경우 대부분의 연구에서 충분한 수의 성숙한 세포를 얻는데 실패하였다. 또한 지금까지의 연구 성과에도 불구하고 체외에서 호산성 적혈모구로부터 핵을 추출시켜 성숙한 적혈구를 얻는 과정은 분화에 있어서 가장 큰 걸림돌로 판단되

고 있다. 그 원인은 골수의 미세환경과 다른 세포와의 상호작용을 체외 배양에서 구현할 수 없기 때문으로 알려져 있다[9, 23]. 배양세포를 쥐에 투여하거나 배양 중에 DMSO를 첨가하여 핵의 유출을 유도하는 방법이 소개되었으나[7, 23], 임상적으로 이용되기에는 어려운 모델이다. 그러나 최근 골수의 기질세포와 조혈모세포의 동시 배양을 통하여 대규모의 적혈구 생성에 성공한 연구보고가 있어[9] 희귀 혈액형의 적혈구 생산과 혈액소병증 치료 등의 임상적 활용이 가능할 것으로 생각된다. 앞으로 체외에서 생성된 적혈구를 환자 치료에 사용하기 위해서는 대량 배양법이 도입되어야 하며, 적혈구 분화의 최적 조건을 찾는 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

요 약

배경 : 본 연구에서는 제대혈의 CD34 양성세포를 분리하여 erythropoietin (EPO) 등의 자극을 통하여 적혈구로 분화를 시도하였다. 또한 EPO 농도와 첨가시기가 배양에 미치는 영향을 규명하기 위하여 유세포검사를 통해 면역표현형을, microarray를 이용하여 유전자 발현의 변화를 알아보려고 하였다.

방법 : 제대혈의 CD34 양성세포를 다양한 성장인자를 첨가한 배지에서 3주간 배양하였고, EPO의 농도와 첨가시기를 달리하여 배양하였다. 배양에 따른 세포의 형태와 면역표현형 그리고 유전자 발현의 변화를 분석하였다.

결과 : 배양세포는 모든 조건에서 14일에 가장 높은 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 glycophorin A (GPA)의 표현이 두드러지지 않았다. Microarray 분석 결과 배양이 진행되면서 적혈구생성과 관련이 깊은 유전자들의 발현이 증가하였다.

결론 : 배양이 진행되면서 적혈구 생성과 관련된 여러 유전자의 발현 증가를 관찰할 수 있었으나, 이런 변화가 배양 세포의 형태와 면역 표현형의 변화로 이어지지 못하는 못하였다. 따라서 생체내의 조건과 좀 더 유사한 배양 조건을 규명하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Sullivan MT and Wallace EL. Blood collection and transfusion in the United States in 1999. *Transfusion* 2005; 45: 141-8.
2. 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: 343-8.

3. 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: 171-8.
4. 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: 210-4.
5. Pincock S. Government confirms second case of vCJD transmitted by blood transfusion. *BMJ* 2004; 329: 251.
6. 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: 1695-9.
7. 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: 467-72.
8. 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: 837-45.
9. 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.
10. 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: 3658-68.
11. 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: 2664-71.
12. Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood* 1989; 73: 100-3.
13. Eliason JF, Testa NG, Dexter TM. Erythropoietin-stimulated erythropoiesis in long-term bone marrow culture. *Nature* 1979; 281: 382-4.
14. 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.
15. 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: 184-8.
16. 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: 263-70.
17. Wojda U, Noel P, Miller JL. Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood* 2002; 99: 3005-13.

18. Miller JL, Njoroge JM, Gubin AN, Rodgers GP. Prospective identification of erythroid elements in cultured peripheral blood. *Exp Hematol* 1999; 27: 624-9.
19. 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.
20. 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: 123-35.
21. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood* 1999; 93: 4425-35.
22. 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: 912-22.
23. 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: 350-6.
24. Lee R, Kertesz N, Joseph SB, Jegalian A, Wu H. Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis. *Blood* 2001; 98: 1408-15.
25. 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.
26. 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.
27. 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: 1142-9.
28. 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.