

임산부 혈액으로부터 태아 유핵적혈구를 분리하는데 있어 항감마 헤모글로빈 항체와 CD71 항체들의 비교

, *

이경진·이숙환·이윤정·박희진·전혜선·조주연·정창조
박용원*·김세광*·김재욱*·차동현

Comparison of anti-gamma hemoglobin antibody and CD71 antibodies in isolation of fetal nucleated erythrocytes from maternal blood

Kyoung Jin Lee, M.D., Sook Hwan Lee, M.D., Yoon Jung Lee, M.D., Hee Jin Park, M.D.,
Hye Sun Jun, M.D., Joo Yeon Cho, M.D., Chang Jo Chung, M.D., Yong Won Park, M.D.*,
Sei Kwang Kim, M.D.*, Jae Wook Kim, M.D.*, Dong Hyun Cha, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, CHA Hospital, Pochon CHA University,
College of Medicine, Seoul, Korea,*

**Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective: In an attempt to further maximize the potential of genetic analysis from fetal cells isolation, fetal nucleated red blood cell (FNRBC) recovery with direct anti-gamma hemoglobin staining after density gradient and depletion was compared with three different whole blood magnetic separations (1-step and 2-step ferrofluid, 2-step Dynal beads).

Methods: In model systems such as quantitatively defined spikes of fetal into adult blood, as well as blood samples after surgical termination procedures, fetal cell yield and purity through the results of fluorescence in situ hybridization (FISH), quantitative real time polymerase chain reaction (PCR), and fluorescence-activated cell sorting (FACS) were calculated.

Results: The yield of total number of cells with a XY signal after FISH was the highest on direct anti-gamma hemoglobin staining. After normalizing the results of each experiment to the corresponding result from anti-gamma hemoglobin staining (1), ratio is 0.42 in 1-step ferrofluid, 0.33 in 2-step ferrofluid, and 0.76 in 2-step dynal beads. The fetal cell purity is clearly better in direct anti-gamma hemoglobin staining than those of the magnetic separations from whole blood. The median ratio is 56.3% in anti-gamma hemoglobin staining, 7.7% in 1-step ferrofluid, 6.5% in 2-step ferrofluid, and 31.4% in 2-step dynal beads.

Conclusion: This study shows that the direct anti-gamma staining is the best fetal cell recovery system and it is very useful to isolate fetal nucleated red blood cells as a non-invasive genetic source.

Key Words: Fetal nucleated RBC, Anti-gamma hemoglobin antibody, CD71 antibodies, Real time PCR

접수일 : 2004. 11. 29.

주관책임자 : 차동현

E-mail: chadh001@hanmail.net

* 본 논문은 2003년 8월 연세대학교 의과대학 박사학위 논문임.

* 본 논문은 두뇌한국 21(BK21) 기금으로부터 지원됨.

서론

선천적 유전질환은 신생아의 사망률 및 유병율의 가

장 흔한 원인 중의 하나로,¹ 출생 후 치료는 거의 불가능하여 산전에 이를 조기 진단하여 예방하는 것이 최선의 방법이다.

현재 산전 유전 진단을 위해 흔히 사용되는 용모막 용모검사나 양수천자는 유전 진단에 적합하나 침습적 방법으로, 드물게 태아와 산모에게 치명적인 위험을 초래할 수 있다. 따라서 모체의 말초 혈액으로부터 분리된 순수한 태아 세포를 이용한 비침습적인 산전 유전 진단법이 관심의 대상이 되어 왔다.²⁻⁵ 모체 혈액 내에 존재하는 태아 유핵적혈구 (nucleated red blood cell; nRBC)는 비침습적 산전 유전 분석에 있어 가장 좋은 세포로 알려져 있다.⁶⁻⁸ 즉, 태아 유핵적혈구는 수명이 짧아서 이전 임신에 의한 오진을 배제할 수 있고, 태아의 유전자를 모두 포함하고 있고, 백혈구 세포보다 더 일찍 산모의 혈액에서 발견되기 때문이다.

유핵적혈구 분리를 위해 가장 흔히 사용되어온 방법은 밀도 변화도 (density gradient)를 이용한 분리법,⁹ 자기장 활성화 세포 분리법 (magnetic-activated cell sorting; MACS),¹⁰ 그리고 형광 활성화 세포 분리법 (fluorescence-activated cell sorting; FACS) 등¹¹이다. 밀도 변화도를 이용하여 핵이 없는 세포들 (non-nucleated cells)과 혈장 (plasma)층을 제거하고, 가운데 층의 핵이 있는 세포들 (nucleated cells)을 얻을 수 있다. MACS를 통해 CD14,15 그리고 45와 같은 백혈구에 존재하는 특이 항체를 이용하여 백혈구를 제거할 수 있고 (depletion method), CD71과 같은 항체를 이용하여 유핵적혈구를 분리할 수 있다 (positive selection). 한편, 독자적인 태아 유핵적혈구 표식자로 자주 사용되는 태아 헤모글로빈의 감마 체인 (gamma chain)은 임신 7주 이후 태아 적혈구의 세포질 내 주된 단백질인데, 이것에 대한 항체가 태아 유핵적혈구의 세포질에 직접 결합되는 것을 이용하여 FACS 방법을 적용할 수 있다.¹² CD71은 태아 유핵적혈구를 포함한 대부분의 태아 혈액 세포에서 발현되며, 세포의 표면에 존재하므로 MACS를 이용할 수 있고, 간편하며 비교적 저렴하므로 유핵적혈구 분리를 위해 가장 많이 이용되는 항체인데,

자기장 비드 체계 (magnetic bead system)에 따라 현재 다양한 방법들이 존재한다. 즉, nanometer-scale colloidal ferrofluids에 근거한 방법¹³과 micrometer-scale paramagnetic beads에 근거한 방법 등¹⁴이 있다. 그러나, 현재까지 CD71 항체들 중 가장 좋은 방법은 무엇인지, 혹은 CD71 항체들과 항감마 헤모글로빈 항체를 이용한 방법 중에서 어느 방법이 가장 많은 유핵적혈구를 얻을 수 있는지에 대한 연구는 전혀 없다.

이에 본 연구는 태아 유핵적혈구를 분리하는 방법들 중 분리 세포 수와 순도 면에서 가장 좋은 방법 혹은 항체가 무엇인가를 알아보기 위해서, 태아세포의 유입이 훨씬 증가하는 것으로 알려진 임신 중기 수술적 유산 후 채취된 모체 혈액과 제대 천자 (cordocentesis) 등의 방법을 통해 얻은 태아 혈액을 연구 대상으로 실험 모델을 만들었다. 즉, 항감마 헤모글로빈 항체의 염색에 의해 분리된 태아 유핵적혈구와 세 가지의 다른 자기장 분리 방법 (1단계 & 2단계 ferrofluid, 2단계 Dynal beads)에 의해 얻은 태아 유핵적혈구를 분리 세포수와 순도 면에서 비교, 분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

35세에서 45세 사이이며, 염색체 이상 및 치명적인 태아의 이상으로 인해 임신 12주와 21주 사이에 임신 중절을 경험한 산모의 말초혈액을 임신중절 직후 EDTA로 처리된 시험관에 얻었다. 태아 혈액은 임상적 적응증이 되는 제대천자 혹은 임신 중절 후 제대혈액을 채취하였고, 이러한 방법을 통해 얻은 태아 혈액 0.15 mL에 성인의 혈액 (여성의 말초혈액) 15 mL를 섞어서 이용하였다 (spike experiment). 모든 연구는 Y 염색체를 이용한 검출 방법을 사용하기 위해 남아인 경우를 대상으로 하였다. 혈액은 4°C에서 보관하였고, 채취 후 2-24시간 이내에 실험에 사용하였다. 모든 검체들은 동량씩 4등분하여 각각 실험에 이용하였다 (Fig. 1).

이경진 외 10인. 임산부 혈액으로부터 태아 유핵적혈구를 분리하는데 있어 항감마 헤모글로빈 항체와 CD71 항체들의 비교

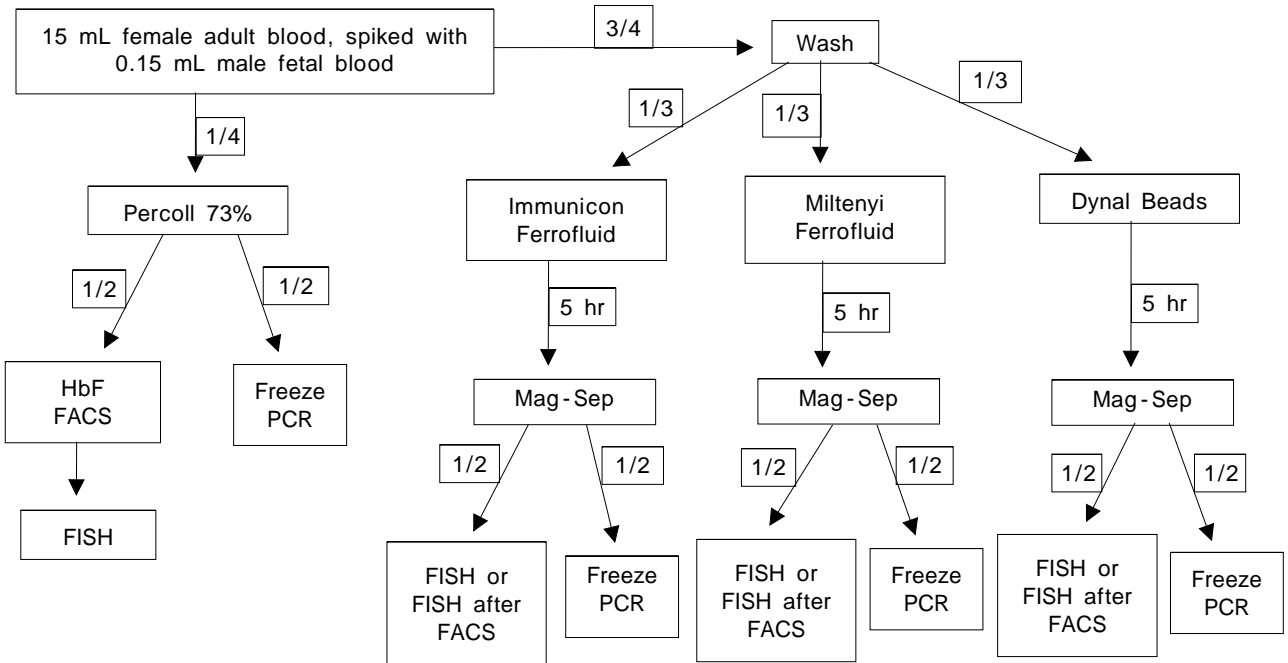


Fig. 1. Spike experimental scheme.

2. 방법

1) 항감마 헤모글로빈 양성 (anti-gamma hemoglobin positive) 세포의 분리

(1) 항감마 헤모글로빈 염색

단핵 세포는 73% Percoll 용액 (Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 말초 혈액으로부터 분리되었다. 혈액 검체는 phosphate buffered saline/ethylenediaminetetraacetic acid (PBS/EDTA)로 한번 수세하고, PBS/bovine serum albumin (BSA)/EDTA로 1:3 비율로 희석한 후 73% Percoll 용액의 위로 섞이지 않도록 천천히 첨가되었다. 이를 400 g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 단핵세포 층을 얻었다. 그 후, CD15/45 magnetic beads (Dynal Biotech, Oslo, Norway)를 처리하여 MACS에 의해 CD15/45 양성 세포를 제거하였다. 분리된 세포는 1 mL의 PBS/0.5% BSA로 현탁하고 37°C에서 1시간 동안 5% 포르말데히드로 고정시킨 후, 항감마 헤모글로빈 항체 염색전에 고정액에서 4°C 상태로 보관하였다. 다시 세

포는 37°C에서 1시간 동안 5% 포르말데히드로 고정시킨 후 실온에서 5분간 100% 메탄올에 처리하고 감마 체인에 대한 phycoerythrin (PE)-cojugated antibody (Cortex Biochem, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 Caltag Fix & Perm kit의 Solution B에 처리하였다. 두 번 수세하고, 1% 포르말데히드와 0.2 µg/mL Hoechst 33342를 포함한 PBS로 현탁시켜, 분석 시까지 4°C에서 보관하였다.

(2) FACS

FACS는 항감마 헤모글로빈 항체 염색 후 24시간 이내에 시행하였다. 감마 헤모글로빈 양성인 유핵적혈구의 분리는 Beckton-Dickinson Vantage flow cytometer/cell sorter with dual, displaced-beam laser excitation (Coherent, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. 완전한 유핵 세포를 분석을 위해 선택하였고, DNA-specific Hoechst fluorescence를 통하여 분류하였다. Flow cytometry에 의한 분석은 DNA-specific Hoechst fluorescence에 의해 Hoechst에 염색이 된, 즉, 핵을 갖고 있는 세포들을 gate를 통

과시킨 후에, 항감마 헤모글로빈 항체에 의해 염색이 된 세포들을 얻었다. 세포를 양전하가 걸린 현미경 슬라이드 (Fisher, Pittsburgh, PA, USA) 위에 준비한 후, fluorescence in situ hybridization (FISH)를 시행하였다.

2) CD71+ 세포의 분리

(1) 1단계 ferrofluid 자기장 방법 (1-step ferrofluid magnetic procedure)

혈액 검체를 항CD71 항체 (gift from Immunicon Corporation, Huntingdon Valley, PA, USA)에 접합시키는 동안 4°C에서 1시간 동안 ferrofluid에 배양하였다. 배양 후 LS 원주 (column)(MACS, Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)에 5 mL/min의 속도로 통과시켰다. PBS/EDTA/BSA로 세정하고 원주를 제거한 후 세포를 분리해냈다.

(2) 2단계 ferrofluid 자기장 방법 (2-step ferrofluid magnetic procedure)

혈액 검체를 4°C에서 1시간 동안 biotinylated 항 CD71 항체를 이용하여 배양하였다. PBS/EDTA/BSA로 3차례 세척하고 streptavidin ferrofluid를 이용하여 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 MACS 원주를 통하여 CD71+ 세포를 분리하였다.

(3) 2단계 Dnal beads 자기장 방법 (2-step Dnal beads magnetic procedure)

혈액 검체를 4°C에서 1시간 동안 biotinylated 항 CD71 항체를 이용하여 배양하였다. PBS/EDTA/BSA로 3차례 세척하고, DNA 접합자 (linker)에 의해 streptavidin과 접합되어 있는 paramagnetic Dnal beads (Dnal Biotech, Oslo, Norway)를 이용하여 4°C에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 적절한 Dnal magnet을 이용하여 CD71+ 세포를 분리하고, 다시 비드와 세포를 분리하기 위해 DNA 접합자를 분리하였다.

3) Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)

FISH는 이전에 기술되어진 방법에 따라 시행하였다.¹⁵ X 염색체에 대한 탐침자 (probe)인 DXZ1과 Y 염색체에 대한 탐침자인 PHY10이 nick 전사 (translation)에 의해 cyanin3-AP3-deoxyuridine triphosphate (red) (Amersham, Piscataway, NJ, USA)와 fluorescen-12-deoxyuridine triphosphate (green) (Boeringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 이용하여 각각 분류 (label)되어졌다. 이때, Genzyme Genetics (Framingham, MA, USA)에서 제공된 순수한 DNA를 이용하였다. 형광 신호는 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

4) 실시간 정량적 증합효소연쇄반응 (real time quantitative polymerase chain reaction; PCR)

모든 냉동된 검체들은 해동된 후, 11,500 g에서 10분 동안 원심 분리하여 잔류 세포들을 제거하였다. 400 µl의 상층액에서 DNA 추출에 이용되었는데, 이는 제조사가 정의한 원안 (protocol)을 이용하여 QIAamp[®] Blood Mini Kit (QIAGEN Inc, Alameda, CA, USA)를 통해 시행하였다. 각 검체에서 총 50 µl의 DNA를 얻었다. 각 검체의 태아 DNA의 농도는 Perkin-Elmer Applied Biosystems 7,700 Sequence Detector (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)를 이용하여 실시간 PCR 기법을 통하여 계산되었다. 각 검체는 3회씩 분석되었다. Y 염색체의 DYS1 sequence가 남성 DNA의 검출 및 정량화에 사용되었다. DYS1 primers (forward: DYS1-F: 5'-TCCTGCTTATCCAAATTCAC CAT-3', reverse: DYS1-R: 5'-ACTTCCCTCTGACATTACCTGATAATTG-3')는 Y 염색체 특수 염기 서열 p49a에서 유래되었다.¹⁶ DYS1 primers와 탐침자는 경험에 근거하여 선택하였다.^{17,18} 이 방법을 사용 중, 고전적 PCR에서 사용되는 표준 증폭 탐침자에 더하여 double-labeled 형광 탐침자가 추가되었다. 형광 DYS1 탐침자 (5'-FAM-AAGTCGCCACTGGATATCAGTTCCCTTGT-TAMRA-3')는 5'의 reporter dye (6-

이경진 외 10인. 임신부 혈액으로부터 태아 유핵적혈구를 분리하는데 있어 항감마 헤모글로빈 항체와 CD71 항체들의 비교

carboxyfluorescein, FAM)와 3'의 quencher dye (6-carboxytetramethylrhodamine)가 결합되어 있다. Taq 중합효소 (polymerase)에 의해 PCR 확장 중 reporter dye는 탐침자와 quencher dye로부터 분리되고, 점진적으로 518 nm에서 형광 발산이 증가하였다. 형광 발산량은 DNA 증폭 과정 중에 지속적으로 측정되었고, 이는 Applied Biosystems Sequence Detection System software, version 1.6.3을 이용하여 컴퓨터에 기록되었다. PCR 증폭 과정은 모체 혈장으로부터 추출된 5 µl의 DNA를 포함한 50 µl의 검체로 실시되었다. 반응 물질 성분들은 100 nM의 DYS1 primers, 50 nM의 DYS1 탐침자, 각각 200 mM의 dATP, dCTP, dGTP와 400 mM의 dUTP를 포함한 20 µl의 Universal MasterMix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), 5.0 mM의 MgCl₂, 8% glycerol, 그리고 1X Taqman Buffer A로 구성되어 있다. 실험 온도 주기는 50°C에서 2분간 배양하고, 첫 변성 (denaturation) 시에 95°C에서 10분간 처리하고, 이후 95°C에서 15초간 그리고 60°C에서 1분간 처리하는 과정을 40회 반복 시행하였다. 각 검체에 DNA가 존재한다는 것을 확인하기 위해 양성 조절 실험으로서 beta-globin 유전자에 대한 탐침자를 사용한 실시간 정량적 PCR이 각 검체에 대해 시행되었다. 산출된 결과의 단위를 genomic equivalents per milliliter (GE/mL)로 전환하기 위해 전환 요소로서 6.6 pg DNA/cell이 이용되었다.

5) 결과를 산출하는 방법

각 항체들의 태아세포 분리 능력을 객관적으로 비교하기 위해서 3가지 방법을 선택하였다.

(1) 전체 태아 세포의 수 산출 (yield)

이것은 FISH를 통해서 계산하였다. 임신 중기에 임신 중절을 한 3개의 샘플과 5개의 제대혈이 대상이 되었고, 제대혈의 경우에는 태아 세포의 수가 매우 많으므

로, 마지막 단계에서 얻어진 샘플 중 일부분으로 FISH 신호 (signal)를 계수한 후에 나머지 용액을 곱하여 계산하여 전체 태아 세포의 수를 산출하였다. 예를 들어 항감마 헤모글로빈 항체나, CD71 항체를 사용한 후에 얻어진 최종산물이 5 mL라면, 약 0.1 mL를 가지고 FISH를 시행하고 신호를 계수한 후에 50배를 곱하는 방법으로 행하였다.

(2) 실시간 정량적 PCR

모든 샘플의 태아세포는 Y-specific 서열을 갖고 있으므로 최종산물에 이 서열을 갖고 있는 세포의 수를 실시간 정량적 PCR로 측정하였다. 임신 중절 2예와 3예의 제대혈에서 실시하였다.

(3) Flow-sorted HbF 양성 세포 집단내의 태아세포 순수도 계산 (purity)

항감마 헤모글로빈 항체와 CD71항체를 이용해 얻은 모든 최종산물 속에 실제로 얼마나 많은 태아세포가 존재하는가를 계산하기 위해, 임신중절한 5예와 3예의 제대혈을 가지고 시행하였다. FACS에서 태아세포로 생각되는 창 (window)에 존재하는 전체 세포 중 실제 남성 FISH signal를 갖고 있는 태아세포의 비율 (purity)를 계산하여 비교하였다. 이 실험을 위해 최종산물을 항감마 헤모글로빈 항체로 염색하여 세포를 분리하였다.

결 과

1) 전체 태아세포의 수 (yield)

FISH 시행 후 XY 신호를 보이는 전체 세포 수 (yield)는 항감마 헤모글로빈 염색에 의한 방법에서 가장 높았다. 또한 자기장 분리 방법들 중에서는 dynal beads에 의한 태아 세포의 농축이 다른 방법보다 더 높았다 (Table 1).

Table 1. Comparison of fetal cell yields with anti-gamma hemoglobin staining and whole blood magnetic isolation procedures

	Anti-gamma hemoglobin staining	1-step ferrofluid	2-step ferrofluid	2-step Dynal beads
PTB	70	28	65	65
PTB	247	101	21	77
PTB	43	9	11	40
Spike	25,000	19,000	7,000	22,000
Spike	44,000	24,800	9,500	42,000
Spike	6,400	1,828	1,751	5,460
Spike	954	475	493	889
Spike	3,956	922	454	1,175
Ratio*	1	0.42	0.33	0.76

PTB: post-termination blood samples

Spike: 1 to 100 mixtures of male fetal blood (12-18 wk) into female adult blood

The total number of fetal cells were determined by XY-FISH.

Absolute fetal cell yields are shown for each experiment.

*: Ratio was calculated after normalizing the results of each experiment to the corresponding result from anti-gamma hemoglobin staining.

Table 2. Comparison of fetal cell yields determined by Y-specific quantitative PCR

	Anti-gamma hemoglobin staining	1-step ferrofluid	2-step ferrofluid	2-step Dynal beads
PTB	13	21	22	35
PTB	10	18	21	7
Spike	98	357	42	423
Spike	745	1,370	1,421	2,113
Spike	879	2,331	2,013	4,489
Ratio*	1	2.31	1.68	2.52

PTB: post-termination blood samples

Spike: 1 to 100 mixtures of male fetal blood (12-18 wk) into female adult blood

*: Ratio was calculated after normalizing the results of each experiment to the corresponding result from anti-gamma hemoglobin staining.

The unit of the fetal cell yields was used for expression of results as genomic equivalents per milliliter (GE/mL)

2) 실시간 정량 PCR에 의한 태아세포의 수 계산 아 유핵적혈구 뿐만 아니라 모든 형태의 태아 세포가 측정될 수 있다. 항감마 헤모글로빈 항체의 경우에는 밀도 이용하여 태아 세포 수를 측정하였는데, 이 경우에는 태 변화도 (density gradient)를 시행하였고, 나머지 자기

이경진 외 10인. 임신부 혈액으로부터 태아 유핵적혈구를 분리하는데 있어 항감마 헤모글로빈 항체와 CD71 항체들의 비교

장 분리 방법들은 전혈 (whole blood)을 사용하였는데, 결과는 역시 전혈을 사용한 자기장 분리 방법들에서 더 많은 태아 세포가 산출되었다 (Table 2).

3) flow-sorted HbF 양성 세포 집단 내의 태아 세포 순수도 비교 (purity)

모든 적혈구 계통의 세포들은 항감마 헤모글로빈 항체에 염색이 되었다. Hoechst에 염색이 된 세포를 DNA+, 항감마 헤모글로빈 항체에 염색이 된 세포를 HbF+로 표시하였다. 태아 세포의 순수도는 HbF+ DNA+인 세포 중에서 FISH의 결과, Y-특이 탐침자를 갖고 있는 세포의 백분율로 계산하였다. 이렇게 한 결과, 항감마 헤모글로빈 염색에 의한 태아 세포 순도 결과가 자기장 분리 방법에 의한 결과보다 월등히 높았다. 자기장 분리 방법들 중에서는 Dynal 2-step에 의한 결과가 가장 좋았다 (Table 3). 위에서 언급된 태아 세

포 순도를 측정하기 위해 flow cytometry profiles를 사용하였는데, 2단계 ferrofluid 방법에 의한 표본에서 많은 수의 HbF+DNA+ 세포가 존재함을 보여주고 있다 (Fig. 2). Flow cytometry profiles를 사용하여 ferrofluid 방법에 의해 분리된 HbF+DNA+ 세포들을 FISH 시행 후 형광 현미경으로 관찰해 보면 대부분 단일 세포가 아닌 집합체 (aggregates)임을 알 수 있었다 (Fig. 3C). 그 집합체는 대부분 HbF+ 망상 적혈구 (reticulocyte)와 HbF-DNA+ 모체 세포로 구성되어 있다. Flow sorter는 적어도 1개의 HbF+ 세포와 1개의 DNA+ 세포를 포함한 집합체를 단일 HbF+DNA+ 세포, 즉 단일 태아 유핵 적혈구로 인식하게 된다. 이러한 집합체는 항감마 헤모글로빈 염색에 의한 방법에서는 거의 보이지 않고 (Fig. 3A), Dynal beads 방법에서는 크게 감소되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3B).

Table 3. Comparison of fetal cell purity in flow-sorted HbF+ fractions, following anti-gamma hemoglobin staining and whole blood magnetic separation+

	Anti-gamma hemoglobin staining (%)	1-step ferrofluid (%)	2-step ferrofluid (%)	2-step Dyanl beads (%)
PTB	45	20	3	16
PTB	33	2.9	8.2	64
PTB	38	3.4	2.8	70
PTB	83	NA	19	25
PTB	74	5.2	3.8	7
Spike	2	5.5	1.2	6.4
Spike	83	NA	5.5	NA
Spike	92	9.2	8.22	NA
Median (%)	56.3	7.7	6.5	31.4

PTB: post-termination blood samples

Spike: 1 to 100 mixtures of male fetal blood (12-18 wk) into female adult blood

Purity (%): the number of fetal cells determined by XY-FISH divided into the total number of flow sorted HbF+ fractions

NA: not available

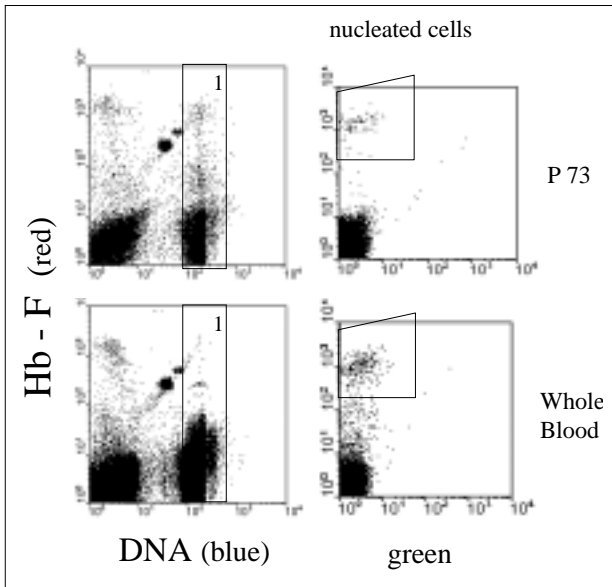


Fig. 2. Flow cytometry profiles for sorting. Left column: Two-parameter profiles of DNA (abscissa) versus HbF level (ordinate). Region 1 depicts the gate for selection of intact nucleated cells. Right columns: Two parameter profiles of auto fluorescence versus HbF level. It is profiles after gating for intact nucleated cells. Region 2 depicts the window for sorting HbF+ cells. Upper row shows the cells recovered with anti-gamma hemoglobin staining and lower row shows the cells recovered by 2-step ferrofluid.

고 찰

현재 이용되는 염색체 이상의 산전 진단 방법들 중 세포 유전학적 방법들인 양수 천자, 융모막 융모 샘플링, 그리고 태아 체대혈액 천자 등은 침습적인 방법으로 잠재적인 태아 손상 및 감염, 태아 사망 등의 위험을 안고 있다는 것과 태아 세포 배양에 시간이 소요된다는 단점이 있다. 이러한 이유에서 신속하고 정확하며 비침습적인 세포 유전학적 검사 방법이 요구되어져 왔으며, 모체의 말초 혈액에 존재하는 태아 세포를 분리하여 이를 이용하는 방법이 연구되었다. 모체에는 림프구, 영양막세포, 유핵 적혈구 등 여러 형태의 태아 세포들이 존재함이 이미 여러 학자들에 의해 알려져 왔다.¹⁹⁻²¹ 이 세포들 중 유핵 적혈구는 수명이 약 25-35일로 짧아서 이전 임신에 의한 오염 가능성이 없고, 성인에는 드물고, 태

아의 유전자를 모두 포함하고 있어 산전 유전 진단에 가장 적당한 세포로 알려져 있다.²² 또한 태아 유핵 적혈구는 산전 유전 분석을 가장 필요로 하는 임신 초, 중기에 가장 풍부하며 임신 중기를 지나면서 오히려 감소하는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 그 빈도는 모체 혈액 세포 10⁵개에 1개 혹은 10⁷개에 1개 등으로 보고^{23,24} 되고 있으므로, 태아 유핵 적혈구를 순수하게 분리, 농축하여 많은 세포를 얻을 수 있는 방법의 개발이 관건이 되고 있다.

지금까지 알려진 각각의 방법들은 장, 단점을 갖고 있는데, 삼단계 밀도 변화도 (triple density gradient)를 이용한 원심 분리법은 세층으로 원심 분리하여 유핵 적혈구를 농축하는 방법으로 약 40배의 농축 정도를 보이며, 영양막세포나 림프구는 상당히 제거될 수 있다.²⁵ 그러나, 단독 사용 시 농축율이 떨어져 FACS 또는 MACS와 같은 추가 과정이 필요하게 된다. FACS는 농축율이 높으며 분리된 세포를 세포 배양 등 다른 실험에 이용할 수 있게 해 주는 장점이 있으나, 장비가 고가이고 전문적인 인력을 필요로 하고 한 번에 한 작업만을 수행하므로 대규모 실험의 경우 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다. MACS는 작업이 간단하고 빨라서 특별한 숙련을 필요로 하지 않고 기계 자체도 저렴하며 세포 오염이 적고 농축 분리한 세포들을 PCR 또는 FISH 등에 직접 적용할 수 있는 장점이 있다.

본 연구는 태아 세포 분리를 통한 유전 분석 능력을 최대화하기 위하여, 가장 좋은 태아 유핵 적혈구 분리법을 찾기 위해 고안되었다. 이를 위해 태아 혈액이 모체 혈액으로 소량 유입되는 수술적 유산 직후 채취된 모체 혈액과 함께 정상 성인 여성 혈액에 남자 태아 혈액을 일정량 혼합한 실험적 모델을 이용하게 되었다. density gradient에 의한 태아 유핵 적혈구 소실을 방지하기 위해 전혈에서 CD71+ 세포를 분리하고자 시도하였고, 이것을 항감마 헤모글로빈 항체에 염색한 표본과 비교하여, 어느 방법이 더 많은 태아 세포를 농축시킬 수 있는지 연구하였다. 그 결과, 다양한 자기장 분리 방법들이 직접 항감마 헤모글로빈 항체를 가지고 염색한 방법보다 태아 유핵 적혈구가 다소 낮음을 알 수 있

이경진 외 10인. 임신부 혈액으로부터 태아 유핵적혈구를 분리하는데 있어 항감마 헤모글로빈 항체와 CD71 항체들의 비교

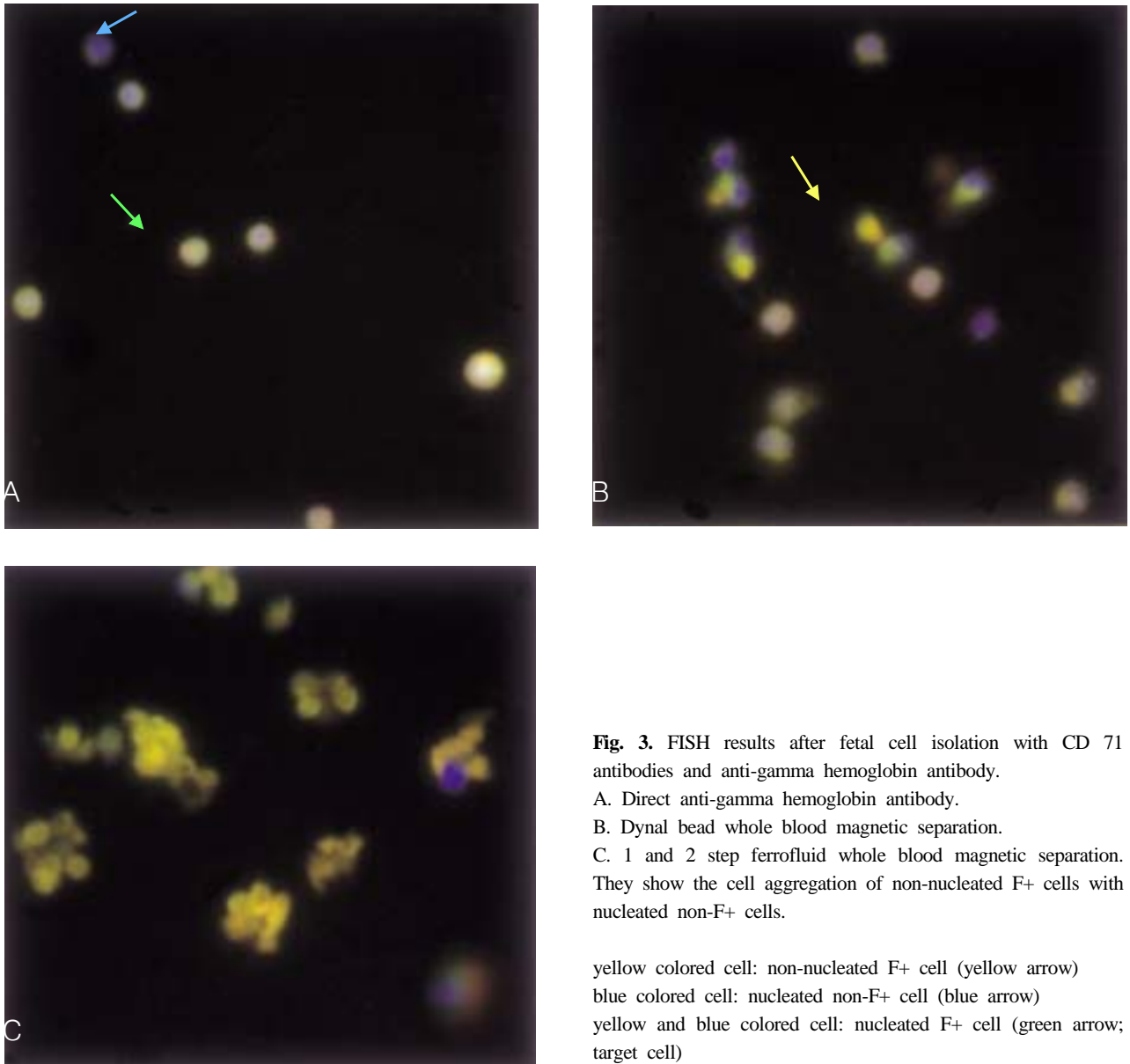


Fig. 3. FISH results after fetal cell isolation with CD 71 antibodies and anti-gamma hemoglobin antibody.
 A. Direct anti-gamma hemoglobin antibody.
 B. Dynal bead whole blood magnetic separation.
 C. 1 and 2 step ferrofluid whole blood magnetic separation.
 They show the cell aggregation of non-nucleated F+ cells with nucleated non-F+ cells.

yellow colored cell: non-nucleated F+ cell (yellow arrow)
 blue colored cell: nucleated non-F+ cell (blue arrow)
 yellow and blue colored cell: nucleated F+ cell (green arrow; target cell)

었다. 이것은 아무리 전혈을 사용한다고 해도 태아 세포의 표면에 존재하는 CD71 양성 세포를 얻는 방법보다는 매우 특이한 식별자 (identifier)로 알려진 감마 헤모글로빈을 이용할 때 더 많은 태아 세포를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 대체로 HbF 직접 염색은 대부분의 태아 유핵 적혈구를 분리해 내는 것으로 여겨진다. 그리고, CD71 항체중에서는 Dynal bead를 이용한 염색 방법이 다른 1단계 ferrofluid나 2단계 ferrofluid 방법보다 더

많은 양의 태아 세포를 얻을 수 있었다 (Table 1).
 실시간 정량 PCR에 의한 Y-특이 서열을 갖는 태아 세포 수를 측정하였다 (Table 2). 이 경우에는 태아 유핵 적혈구뿐만 아니라 모든 형태의 태아 세포가 측정될 수 있다. 이 실험에서는 밀도 변화도를 포함한 항감마 헤모글로빈 염색보다 전혈을 사용한 자기장 분리 방법에 의한 태아 세포 산출 수가 더 높았다. 이는 전혈을 사용한 자기장 분리 방법에 의하여 분리된 태아 세포 중

비적혈구 계열 (non-erythroid) CD71+ 세포가 많은 부분을 차지하고 있다는 사실을 보여준다.

이후 같은 표본에서 많은 수의 다른 CD71+ 세포들로부터 태아 유핵 적혈구를 분리하기 위해 HbF+ flow sorting을 시행하였다. 그리고 모체 세포 오염도는 자기장 분리 방법에서 더 높음을 알 수 있었다. 그 중 ferrofluid 방법에서 오염도가 가장 높았는데, 이는 모체 유핵 세포와 태아 망상 적혈구 사이의 접합 때문임이 밝혀졌다. 즉, 집합체 현상 (aggregates phenomenon)은 분류된 HbF+DNA+ 세포 집단 내에 모체 세포가 다량 오염된 것으로 설명할 수 있을 것이다. 이를 통해 Dynal beads 방법이 집합체 효과를 줄일 수 있고, 또한 전혈에서 태아 유핵 적혈구를 분리해내는데 더 적합한 방법임을 알 수 있었다 (Fig. 3). Flow cytometry profiles의 결과에 의하면, 2단계 ferrofluid 방법에 의한 표본에서 많은 수의 HbF+DNA+ 세포가 존재하며, 이들 세포의 대부분은 단일 세포가 아닌 집합체 (aggregates)임을 알 수 있었다. 그 집합체는 대부분 HbF+ 망상 적혈구와 HbF-DNA+ 모체 세포로 구성되어 있다. 즉, 실제로 우리가 원하는 태아세포의 수는 많지 않음을 알 수 있었다. Flow sorter는 적어도 1개의 HbF+ 세포와 1개의 DNA+ 세포를 포함한 집합체를 단일 HbF+DNA+ 세포, 즉 단일 태아 유핵 적혈구로 인식하게 된다. 이러한 집합체는 항감마 헤모글로빈 염색에서는 거의 보이지 않고, Dynal beads 방법에서는 크게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 즉, 집합체 현상은 분류된 HbF+DNA+ 세포 집단 내에 모체 세포가 다량 오염된 것으로 설명할 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구에서 밝혀진 결과들을 요약정리해보았다. 첫째, 태아 세포 분리 (yield)는 자기장 분리 방법보다 항감마 헤모글로빈 염색에 의한 FACS 방법이 더 좋았다. 둘째, 실시간 정량 PCR방법을 이용하여 Y-특이 서열을 갖는 태아 세포의 수를 측정된 결과, 밀도 변화도를 시행했던 항감마 헤모글로빈 항체 염색법보다는 전혈을 사용한 자기장 분리 방법에 의한 태아 세포 산출 수가 더 높았다. 이것은 전혈을 사용한 자기장 분리 방법에 의하여 분리된 태아 세포 중에는 비적혈구 계

열 CD71+ 세포가 많은 부분을 차지하고 있다는 사실을 보여준다. 셋째, 태아 세포 분리 순도에 있어서 항감마 헤모글로빈 염색법이 가장 좋았고, 다음은 Dynal 2-step, 그리고 ferrofluid 방법의 순서였다. 넷째, Flow cytometry profiles의 결과에 의하면, 2단계 ferrofluid 방법에 의한 표본에서 많은 수의 HbF+DNA+ 세포가 존재하며, 이들 세포의 대부분은 단일 세포가 아닌 집합체 (aggregates)임을 알 수 있었다. 그 집합체는 대부분 HbF+ 망상 적혈구와 HbF-DNA+ 모체 세포로 구성되어 있다. 즉, 실제로 우리가 원하는 태아세포의 수는 많지 않음을 알 수 있었다. Flow sorter는 적어도 1개의 HbF+ 세포와 1개의 DNA+ 세포를 포함한 집합체를 단일 HbF+DNA+ 세포, 즉 단일 태아 유핵 적혈구로 인식하게 된다. 이러한 집합체는 항감마 헤모글로빈 염색에서는 거의 보이지 않고, Dynal beads 방법에서는 크게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 즉, 집합체 현상은 분류된 HbF+DNA+ 세포 집단 내에 모체 세포가 다량 오염된 것으로 설명할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Wachtel, Elias S, Price J, Wachtel G, Phillips O, Shulman L, et al. Fetal cells in the maternal circulation: isolation by multiparameter flowcytometry and confirmation by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 1991; 6(10): 1466-9.
2. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969; 7606: 1119-22.
3. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3279-83.
4. Wessman M, Ylinen K, Knuutila S. Fetal granulocytes in maternal venous blood detected by in situ hybridization. *Prenat Diagn* 1992; 12: 993-1000.
5. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 705-8.
6. Ganshirt-Ahlert D, Burschik M, Garritsen HS, Helmer L, Miny P, Horst J, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1350-5.
7. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood. *Advances in prenatal diagnosis through molecular technology. J Am Med Assoc* 1993; 270: 2357-61.
8. Zheng YL, Carter NP, Price CM, Colman SM, Milton PJ, Hackett

- GA, et al. Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet* 1993; 30: 1051-6.
9. Smits G, Holzgreve W, Hahn S. An examination of different Percoll density gradients and magnetic activated cell sorting (MACS) for the enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 263: 160-3.
10. Ganshirt-Ahlert D, Borjesson-Stoll R, Burschik M, Garritsen HS, Helmer E, Miny P, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am J Reprod Immunol* 1993; 30: 194-201.
11. Wang JY, Zhen DK, Falco VM, Farina A, Zheng YL, Delli-Bovi LC, et al. Fetal nucleated erythrocyte recovery: fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection. *Cytometry* 2000; 39: 224-30.
12. Fantoni A, Farace MG, Gambari R. Embryonic hemoglobins in man and other mammals. *Blood* 1981; 57: 623-33.
13. Martin B, Bruce J, Smith N, Liu D, Durrant L. A magnetic colloid system for isolation of rare cells from blood for fish analysis. *Prenat Diagn* 1997; 17: 1059-66.
14. White S, Taetle R, Seligmann PA, Rutherford M, Trowbridge IS. Combinations of anti-transferrin receptor monoclonal antibodies inhibit human tumor cell growth in vitro and in vivo: Evidence for synergistic antiproliferative effects. *Cancer Research* 1990; 50: 6295-301.
15. Zheng YL, DeMaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW. Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti-fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. *Prenat Diagn* 1995; 15: 897-905.
16. Lucotte G, Fabrice D, Mariotti M. Nucleotide sequence of p49a, a genomic Y-specific probe with potential utilization in sex determination. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 359-63.
17. Bianchi DW, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW. Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 922-6.
18. Lo YMD, Lau TK, Chan LYS, Leung TN, Chang AMZ. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000; 46: 1301-9.
19. Chueh J, Globus MS. Prenatal diagnosis using fetal cells in the maternal circulation. *Perinatol* 1990; 14: 471-82.
20. Simpson JL. Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 1994; 14(13): 1229-42.
21. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 1995; 127(6): 847-56.
22. Ganshirt-Ahlert D, Garritsen H, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995; 7: 103-8.
23. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993; 91: 427-32.
24. Sohda S, Arinami, Hamada H, Nakauchi H, Hamguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn* 1997; 17: 743-52.
25. Bhat NM, Bieber NM, Teng N. One step enrichment of nucleated red blood cells. *J Immunol Methods* 1993; 158: 277-80.

= 국문초록 =

목적: 세 가지 CD71 항체 (1-step from Immunicon and 2-step ferrofluid from Miltenyi, 2-step Dynal beads from Dynal)와 항 감마 헤모글로빈 항체를 이용하여 분리된 태아 유핵 적혈구를 수적 개념 (yield)과 순수도 (purity)에서 비교, 분석하여 태아 유핵 적혈구를 분리해 내는 최적의 항체를 선택하는 것이다.

연구 방법: 태아혈액을 성인의 혈액에 spike한 샘플과 임신을 중절시킨 모체혈액을 샘플로 하여 실험하였다. 항 감마 헤모글로빈 항체와 세 가지 CD71항체를 이용하여 태아 유핵 적혈구를 분리한 후 FISH, 실시간 양적 중합효소연쇄반응, 그리고 FACS 후 FISH 결과를 수적 개념과 순수도에서 비교, 분석하였다.

결과: 항 감마 헤모글로빈 항체를 가지고 FACS로 분류 (sorting)한 후 얻어진 슬라이드와 3가지 다른 CD71 항체를 이용하여 얻어진 샘플을 도말하여 얻어진 슬라이드를 XY 신호 (signal)에 근거하여 FISH를 한 결과, 항 감마 헤모글로빈 항체가 태아 적혈구의 가장 높은 산출 (yield)을 나타내었다. 일부 샘플에서는 Y-특이 탐침자를 가지고, 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 하였는데, MACS를 통하여 분리된 CD71 항체가 유핵 적혈구외에 다른 적혈구의 오염이 많이 됨으로써 오히려 더 높은 분포를 나타내었다. 그러나, 각각의 항체에 의하여 농축된 샘플을 항 감마 헤모글로빈 항체로 염색한 후 FACS를 통하여 cytometry profile과 순도 (분류된 세포 중 태아 유핵 적혈구의 비율)를 비교해 본 결과, 항 감마 헤모글로빈 항체가 다른 CD71 항체보다 높은 순도를 보였다.

결론: 항 감마 헤모글로빈 항체가 태아 유핵 적혈구를 분리해 내는 최적의 항체임을 알 수 있었다.

중심단어: 태아적혈구, 항 감마 헤모글로빈 항체, CD71 항체, 정량적 중합효소 연쇄반응
