

제대혈 내피기원세포 및 간엽줄기세포의 분화에 대한 연구

김은석, 김현옥*

충남대학교 의과대학 치과학 교실, *연세대학교 의과대학 진단검사의학 교실

Eun-Seok Kim, Hyun-Ok Kim*

Department of Dentistry, College of Medicine, Chungnam National University,
Daejeon, Korea

*Department of Diagnosis and Laboratory Medicine, College of Medicine, Yonsei
University, Seoul, Korea

저자연락처 :

김은석

대전광역시 중구 대사동 640 충남대학교병원 구강악안면외과

Tel) 042-220-7820, Fax)042-220-7824, e-mail: eskim@cnu.ac.kr

본 연구는 2002년 충남대학교 의과대학 자체연구비의 보조로 이루어졌음.

20부

<ABSTRACT>

**Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal stem cells from Human
Cord Blood**

Stem cell therapy using mesenchymal stem cells(MSCs) transplantation have been paid attention because of their powerful proliferation and pluripotent differentiating ability. Although umbilical cord blood (UCB) is well known to be a rich source of hematopoietic stem cells with practical and ethical advantages, the presence of mesenchymal stem cells (MSCs) in UCB has been controversial and it remains to be validated. In this study, we examine the presence of MSCs in UCB harvests and the prevalence of them is compared to that of endothelial progenitor cells. For this, CD34⁺ and CD34⁻ cells were isolated and cultured under the endothelial cell growth medium and mesenchymal stem cell growth medium respectively. The present study showed that ESC-like cells could be isolated and expanded from preterm UCBs but were not acquired efficiently from full-terms. They expressed CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD105⁺ cell surface marker and could differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. Our results suggest that MSCs are fewer in full-term UCB compared to endothelial progenitor cells.

mesenchymal stem cell, endothelial progenitor cell, umbilical cord, blood

I. 서론

간엽줄기세포는 섬유아세포의 형태를 가지는 세포로, 강한 증식능력을 보이며 조골세포, 연골세포, 지방세포 등의 간엽조직을 이루는 세포들로 분화할 수 있는 세포군을 말한다¹. 이러한 간엽세포로의 분화능력은 *in vitro*하에서 반복적인 계대배양 후에도 유지되는 것으로 알려져 있다². 일부 연구에 의하면 많은 다른 조직에서도 간엽줄기세포를 분리할 수 있다고 알려져 있다^{3,4,5}. 혈액은 다른 조직에 비해 채취가 용이하기 때문에 좋은 치료목적의 세포 공급원이 될 수 있다. 특히 제대혈은 조혈모 세포가 풍부한 조직으로 잘 알려져 있으며, 채취가 용이하고 윤리적인 문제를 피할 수 있기 때문에, 임상치료에 많이 이용되고 있다. 그러나 혈액(제대혈 혹은 말초혈액)내에 간엽줄기세포가 존재여부는 아직 명확하지 않다. 제대혈이나 성인의 말초혈액에는 간엽줄기세포가 없다는 보고도 있으나^{6,7}, Fernandez 등은 항암치료 중인 환자의 한 말초혈액에서 기질세포가 분리됨을 처음 보고하였다⁸. 제대혈의 경우 Wexler 등은 제대혈과 말초혈액에서 간엽줄기세포를 분리할 수 없다고 보고하였으며⁹, 다른 연구에서도 제대혈은 간엽줄기세포를 포함하지 않는다고 보고하였다¹⁰. 그러나 Erices 등¹¹은 제대혈 세포의 배양 시 간엽줄기세포의 표현형을 나타내는 부착세포들이 증식할 수 있음을 보고하였고, Lee 등¹²은 냉동 보관된 제대혈에서도 간엽줄기세포를 얻을 수 있음을 보고하였다. 또한 제대혈로부터 단일 클론으로 증식된 세포들이 골수에서 기원한 간엽줄기세포와 유사한 SH2, SH3 그리고 SH4 등의 표지자를 발현한다는 보고도 있다¹¹. 그러나 이러한 증거에도 불구하고 제대혈 내의 간엽줄기세포의 존재여부는 논쟁의 대상이 되고 있다. 저자 등은 이 연구를 통해서 제대혈에서 간엽줄기세포의 존재유무를

확인하고 및 골세포 및 지방세포로의 분화를 통해서 이의 임상적 사용의 가능성을 알아보고자 하였다. 이를 위해서 신선한 제대혈에서 단핵구를 분리하고, 조혈모세포 표지자로 알려진 CD34 양성세포를 분리하고 배양하여 혈관내피세포의 분화여부를 확인하고 CD34 음성세포를 따로 배양하여 간엽줄기세포를 얻을 수 있는지를 알아보았다.

II. 실험 방법 및 재료

1) 제대혈의 채집

연세대학교 의과대학 임상실험 윤리위원회의 심사 및 산모의 동의 하에 산부인과에서 채집한 제대혈을 사용하였다. 신생아가 분만된 뒤 제대를 이중으로 결찰하고, 소독한 후, 제대를 절단하고 태반이 만출되기 전 제대 정맥에 CPDA-1이 25ml이 들어있는 채혈백 (녹십자, 서울)의 바늘을 주입하여 중력과 자궁 수축에 의해 흘러내리는 제대혈을 채취하였다.

2) 제대혈에서 단핵구의 분리

제대혈을 Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 4배 희석한 후, 희석된 제대혈에 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 동량 넣고 900g의 속도로 실온에서 20분간 원심분리하여 단핵구를 분리하였다. 분리된 단핵구는 HBSS로 2회 반복 세척한 후 hemocytometer를 이용하여 세포 수를 산정 하였으며, 세척이 끝난 단핵구는 0.5% bovine serum albumin(BSA)을 함유하는 phosphate-buffered saline (PBS), pH7.4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 부유시켰다.

3) CD34 양성세포와 음성세포의 분리

조혈모세포군과 간엽줄기세포군을 분리하여 배양하기 위해 CD34 양성세포와 음성세포를 제대혈 단핵구로부터 high-grade magnetic field와 mini-MACS column (Miltenyi Biotech, Auburn,

CA, USA)을 이용하여 분리하였다. 제조사의 지시에 따라 CD34 양성세포를 선택적으로 분획하는 방법을 통해 양성세포와 음성세포를 분리하였고, 순수도의 증가를 위해 모든 분리는 2회 반복하였다.

4)세포배양 및 유지

분리된 CD34 양성세포는 최종 농도 2×10^5 cells/ml로 맞춘 후, 20% fetal calf serum과 VEGF (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) 10ng/ml, IL-1 β (BD, Biosciences) 10ng/ml 및 fibroblast growth factor-basic (FGF-b) (Leinco Tech., St. Louis, MO, USA) 5ng/ml과 stem cell factor (SCF)(Endogen, Woburn, MA, USA) 8ng/ml의 성장인자가 첨가된 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco-BRL) 배양액과 fibronectin 1 μ g/ml로 코팅한 T25 culture flask (Nalgen Nunc)에서 배양하였다. 또한 CD34 음성세포는 T25 culture flask에 3×10^5 cells/cm²의 밀도로 10%의 fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle (LG-DMEM; Gibco-BRL) 배양액에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포를 넣은 후 4일 후에 배양액을 교환하여 비부착세포들을 제거하고, 이후부터는 2 일에 한번씩 배양액을 교환하여 3주간 관찰하였다.

4)CD34 양성세포의 면역염색

CD34 양성세포의 내피세포로의 분화를 여부를 확인하기 위해, 내피세포 표지자로 알려진 CD31, CD144, CD62E, von Willebrand factor (모두 DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) 에

대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 4% paraformaldehyde로 15분간 고정하고, 0.1% Triton X-100으로 permeabilization, 0.1% bovine serum albumin으로 단백질을 차단시킨 후, 1: 60-200의 비율로 희석된 monoclonal 항체들을 실온에서 2시간 반응시키고, 이차항체 및 HRP 발색제 (DakoCytomation)로 발색시켜 광학현미경 하에서 관찰하였다

5) CD34 음성세포의 표지자 분석

간엽줄기세포 기본 배지 하에서 부착되어 증식한 CD34 음성세포의 표지자를 분석하기 위해 이들 세포를 CD14-PE (단핵구 항원)와 CD29-FITC (Integrin β 1 chain), CD44-PE (Pgp-1) 와 CD45-FITC (백혈구 항원), CD34-FITC (HSCs 항원)와 CD105-PE (SH2) (모두 Becton Dickson, San Jose, CA, USA) 염색한 후 유세포분석기 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)로 분석하여 WinMDI (version 2.8)(Scripps research institute, La Jolla, CA, USA)로 비교 분석하였다.

6) 골세포 및 지방세포 분화유도

부착 CD34 음성세포가 50%의 포화도를 보였을 때, 세포를 10% FBS, 0.1 μ M dexamethasone (Sigma), 10mM β -glycerolphosphate (Sigma), 그리고 100 μ M ascorbate-2-phosphate (Sigma)가 포함된 DMEM-LG 배지 하에서 2주간 배양한 하였다. 골세포 분화의 유무는 통법의 von Kossa 염색에 의해 확인하였다. 또한 지방세포로의 분화는 완전 포화를 보였을 때, 10% FBS, 1 μ M dexamethasone, 0.5mM isobutyl methylanthine (Sigma), 100mM

indomethacin (Sigma) 그리고 10 μ g/ml insulin이 포함된 DMEM-LG 배지 하에서 2주간 배양
한 후 통법의 Oil-red O (Sigma)로 염색하여 확인하였다.

III. 결과

1) 배양된 제대혈 기원 부착세포의 형태학적 특징

총 20개의 제대혈이 연구에 사용되어졌다. CD34 양성 및 음성세포 모두 배양 4-7일 후에 부착된 세포들이 관찰되었으며 이들은 원형 및 방추형태가 주를 이루는 다양한 형태의 세포들이었다. 세포의 증식은 서서히 이루어졌으며, 배양 후 3주에서 4주에 confluence를 이루었다. 계대배양을 거치면서 CD34 양성세포는 내피세포와 유사한 입방형태의 단일세포로 바뀌었고, CD34 음성세포는 배양 후 10-14일이 경과한 후 fibroblast colony forming units (CFU-Fs)를 형성하는 것을 관찰할 수 있었고, 섬유아세포와 유사한 형태의 세포로 빠르게 증식되었다. (Fig.1, 2) CD34 음성세포에서 관찰되는 섬유아세포의 형태는 일반적인 골수기원의 간엽줄기세포보다는 크기가 약간 작은 형태를 나타내었다. 그러나 총 20개의 제대혈 중 혈관내피기원세포의 표지자를 띠는 세포로 분화된 것은 12개였고, 간엽줄기세포로 증식된 제대혈은 3개였다.(Table 1) 이들 중 2개는 조산증례에서 수집된 것이었고, 1개만 정상분만의 경우에 채취된 것이었다. 일부의 제대혈에서도 heterogeneous한 부착세포가 관찰되었지만, confluence를 이루기까지 3주 이상의 시간이 소요되었으며, 증식능력도 제한돼 2번째 계대배양세포를 얻을 수 없었다.

2) 부착 증식된 CD34 양성세포의 면역조직화학 소견

CD34 양성세포에서 기원한 부착세포들은 CD34와 KDR에 강한 양성반응을, CD31, CD62E,

vWF와 CD144에 중등도의 양성반응을 보여 혈관내피기원세포로 분화되었음을 알 수 있었다.

(Fig. 3)

3) 부착 증식된 CD34 음성세포의 유세포 분석

CD34 음성세포에서 기원한 부착세포들에 대한 유세포분석 결과 간엽줄기세포의 표지자로 알려진 CD29, CD44, CD105에 양성을 임파구나 단핵구 세포의 표지자로 알려진 CD14, CD34 그리고 CD45에 음성을 나타내어 간엽줄기세포의 표현형을 나타내고 있음을 알 수 있었다.(Fig. 4)

4) 부착 증식된 CD34 음성세포의 분화

부착 증식된 CD34 음성세포가 간엽조직의 세포로 분화할 수 있는지 알아보기 위하여 골 분화 지방분화 배양액 하에서 2주 이상 배양하였다. 무기질 형성을 나타내는 von Kossa 염색과 지방액포 (lipid vacuole)의 형성을 나타내는 oil red 염색에 모두 양성반응을 나타냄으로서 이 세포들이 제대혈 기원의 간엽줄기세포임을 알 수 있었다.(Fig. 5)

IV. 고찰

조직의 재생에서 세포의 이식은 빠른 치유를 위한 효과적인 방법이며, 높은 증식능력과 분화능을 보이는 줄기세포의 이식이야말로 이상적인 임상치료법이 될 수 있다. 그러나 줄기세포를 얻는 과정은 경우에 따라 윤리적인 문제가 될 수 있으며, 방법상 실용적이지 못한 경우가 많다. 인간의 혈액은 그 채취의 용이성 때문에 다양한 줄기세포의 존재여부에 대한 연구가 많이 이루어져왔다³⁵. 특히 인간 제대혈은 많은 조혈모세포를 포함하고 있기 때문에 1988년 이후 임상에 많이 사용되어져 왔다¹³. 또한 새로운 혈관을 생성할 수 있는 혈관내피기원세포 역시 제대혈 내에 많이 존재하며 그 임상적 유용성이 보고된 바 있다¹⁴. 그러나 골 조직의 재생에 사용될 수 있는 간엽줄기세포의 존재는 아직 논란의 대상이 되고 있다. 본 연구에서는 제대혈에서 간엽줄기세포의 유무를 확인하기 위해 단핵구를 분리한 후, 대표적인 혈관내피기원세포 표지자로 알려진 CD34를 이용하여 CD34 양성 및 음성세포를 분리하고 이를 각각 혈관내피세포 분화배지와 간엽줄기세포 증식배지 하에서 배양하여, 각각의 세포를 얻을 수 있는지 유무를 확인하고자 하였다. 이번 실험의 결과에서 CD34 양성 및 음성세포 배양 모두 초기에 다양한 형태의 세포들이 부착됨을 알 수 있었다. 이들 세포의 종류에 대해서는 아직 명확하지는 않지만 조혈모세포, 탐식세포, 파골세포, 간엽줄기세포, 혈관내피기원세포 등으로 구성되어지는 것으로 보고되고 있다¹⁵. 그러나 이러한 다양한 세포의 구성은 계대배양을 통해서 혈관내피기원세포와 간엽줄기세포 단일 군으로 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 다만 작은 방추형의 섬유아세포의 형태를 나타내나 혈관내피기원세포나 간엽줄기세포처럼 빠른 증식속도와 여러 번의 계대배양의 특징을 나타내지 않은 세포들의 종류 및 기원에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

또한 가임 기간에 따른 제대혈 단핵구의 배양형태도 다름을 알 수 있었다. 조산증례에서 채취한 제대혈은 증가된 CFU-F의 형성을 보였다. CFU-F의 형성은 배양 후 10-14 일 후에 확연히 관찰되었으며, 일단 CFU-F가 형성된 후에는 매우 빠른 속도로 증식하는 것을 알 수 있었다. 또한 거의 모든 제대혈에서 혈관내피기원세포 표지자에 양성반응을 얻는 세포를 얻을 수 있었던 반면, 간엽줄기세포는 17개의 정상분만 제대혈에서는 단 1개만이 관찰되었으며, 3개의 조산 제대혈에서는 3개 중 2개에서 관찰되었다. 전체적인 표본의 수 및 제한적인 조산 제대혈로 인해 명확한 결론을 내리기 어렵지만, 본 연구는 Yu¹⁴ 등이 보고한 결과와 유사함을 보이고 있다. 간엽줄기세포의 제대혈 내 존재가 어떻게 가임 기간에 따라 달리 존재하는가에 대해서는 몇 가지 가정들이 제시되었다. 간엽줄기세포는 조혈모세포와 같이 초기 조혈조직에서 골수로 이동할 수 있다. 이 이동은 태아의 출생시 거의 종결되기 때문에, 정상분만 제대혈이나 성인의 말초혈액에는 CFU-F (fibroblast colony forming unit)가 매우 드물다는 것이다. 또한 가임 기간 동안에 성숙해지는 조혈모세포들 특히 임파구나 탐식세포같은 면역세포들, 혹은 이 기간 동안에 순차적으로 나타나는 다른 여러 세포들이 CFU-F의 증식을 억제할 수 있다는 가정이다. 다른 설명으로는 일반적인 배양 방법 하에서는 제대혈 내에서 CFU-F가 증식할 수 없다는 것이다. 그러나 이러한 모든 설명에도 불구하고 정상제대혈과 조산제대혈 사이의 차이를 명확하게 알 수 없는 상태이다. 본 연구에서 모든 제대혈에서 효과적으로 간엽줄기세포를 분리할 수 없었고 하더라도, 비록 골수와 비교하여 그 수는 적지만 모든 혈액 내에는 여러 종류의 줄기세포가 있는 것은 분명하다. 설치류나 인간의 제대혈에서 신경줄기세포와 유사한 세포를 분리하여 neuron이나 glia로 분화시켰다는 보고도 있으며^{16,17}, 신경능 (neural crest) 기원의 단핵구 유사

세포가 인간의 말초혈액 내에 존재하고 이들이 간엽줄기세포와도 유사한 성질을 나타낸다는 연구도 있었다¹⁸. 또한 Zaho 등¹⁹은 CD34⁺CD45⁻의 표지자를 갖는 말초혈액 단핵구들이 상피세포, 내피세포, 신경세포 그리고 간세포 등 비조혈세포로 분화하는 것을 관찰할 수 있었다고 보고하고 있다. 그러나 저자 등의 경험과 대부분의 연구 결과에서의 공통점은 현재 일반적으로 통용되고 있는 배양조건 하에서 혈액 내로부터 다양한 줄기세포들은 재현성 있게 얻는 것은 매우 어렵다는 것이다. 따라서 혈액 내에 적은 수로 존재하는 이들 줄기세포를 효과적으로 분리하고 증식시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 제대혈 내에 혈관내피기원세포 외에도 간엽줄기세포 혹은 그 유사세포가 존재함을 확인하였다. 그러나 제대혈 내의 간엽줄기세포의 수 및 증식 정도는 혈관내피기원세포에 비해 가임 기간에 더 많은 영향을 받는 것을 확인할 수 있었으며, 가임 기간이 짧을수록 혈액 내의 간엽줄기세포의 수가 더 많이 존재함을 예상할 수 있었다.

VI. Reference

1. Owen M: Marrow stromal stem cells J Cell Sci suppl 1998;10:63-76.
2. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation J Cell Biochem 1997;64:278-294.
3. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow Blood 2001;98:2396-2402.
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies Tissue Eng 2001;7:211-228.
5. Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XO, Suda T: Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation J Exp Med 2002;195:1549-1563.
6. Gutierrez-Rodriguez M, Reyes-Maldonado E, Mayani H: Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood Stem Cells 2000;18:46-52.
7. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Caplan AI: Human bone marrow-derived

mesenchymal (stroma) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections J Hematol 1997;6:447-455.

8. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ: Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients Bone Marrow Transplant 2001;7:581-588.

9. Wexler SA, Conaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM: Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not Br J Hematol 2003;121:368-374.

10. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN: Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate Msc-like cells from umbilical cord Stem Cells 2003;21:105-110.

11. Erices A, Conget P, Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord Br J Hematol 2000;109:235-242.

12. Lee MW, Choi J, Y MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, Kim, Kim YJ: Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood Biochem Biophys Res Commun 2004;320:273-278.

13. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM: High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:645-650.

14. Murohara T: Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors *Trends Cardiovasc Med* 2001;11(8):303-7.
15. Yu M, Xiao Z, Shen L, Li: Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not *Br J Hematol* 2004;124:666-675.
16. Torrente Y, Belicchi M, Pisati F, Pagano SF, Fortunato F, Sironi M, D'Angelo MG, Parati EA, Scalato G, Bresolin N: Alternative source of neurons and glia from somatic stem cells *Cell Transplant* 2002;11:25-34.
17. Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K: Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro *J Cell Sci* 2002;115:2131-2138.
18. Zhao Y, Glesne D, Huberman E: A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells *Proc Nat Acad Sci (USA)* 2003;100:2426-2431.

Fig. 1. Phase contrast images of CD34⁻ from human umbilical cord blood(UBC). UBC-derived endothelial progenitor cells at 0-4 days(A), 7-10 days(B), 14-20 days(C) and at 22-27 days (confluency). Scale bar = 50um.

Fig. 2. Phase contrast images of mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord blood. UCB-derived cells at 0-4 days(A), 7-10 days(B), 14-20 days(C) and at 22-27 days (confluency). Scale bar = 50um.

Fig. 3. Immunohistochemistry of UCB-derived endothelial progenitor cells. CD31(A), vWF(B), CD34(C), CD62E(D), CD144(E), KDR(F). Scale bar = 50µm

Fig. 4. Immunophenotyping of CD34⁻-derived MSCs from human UCB. Cells were dual labeled with FITC- or PE-conjugated antibodies and examined by flow cytometry. Over 98% of ex-vivo expanded fibroblast like cells were strongly positive for MSC-specific markers such as CD29, CD44, and CD105.

Fig. 5. Mesenchymal differentiation potential of MSCs from human UCB. After incubation for 2-3 weeks after 2nd sub-culture in respective induction media, UCB-MSCs were stained positively for lipid vacuole with Oil-red O (A) and for mineral matrix with von Kossa staining, indicating adipogenic and osteogenic differentiation, respectively. Scale bar = 50µm.

All experiments were performed in triplicate.

Table. 1. Characteristics of cultured blood adherent cells.

	Sample	EPC	MSC
Term UCB	17	9	1
Preterm UCB	3	3	2
Total number	20	12	3

UCB: umbilical cord blood, EPC: endothelial progenitor cell,
MSC: mesenchymal stem cell