

## 지방기질유래 줄기세포의 골 분화 시 성장인자의 효과

김옥규 · 최연식 · 정진섭\*

부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, \*부산대학교 의과대학 생리학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:327-333)

## THE EFFECT OF GROWTH FACTORS ON OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS

Uk-Kyu Kim, Yeon-Sik Choi, Jin-Sup Jung\*

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry,**\*Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University*

Future cell-based therapies such as tissue engineering will benefit from a source of autogenous pluripotent stem cells. There are embryonic stem cells (ESC) and autologous adult stem cells, two general types of stem cells potentially useful for these applications. But practical use of ESC is limited due to potential problems of cell regulation and ethical considerations. To get bone marrow stem cells is relatively burden to patients because of pain, anesthesia requirement. The ideal stem cells are required of such as the following advantages: easy to obtain, minimal patient discomfort and a capability of yielding enough cell numbers. Adipose autologous tissue taken from intraoral fatty pad or abdomen may represent such a source. Our study designed to demonstrate the ability of human adipose tissue-derived stromal cells (hATSC) from human abdominal adipose tissue differentiating into osteocyte and adipocyte under culture in vitro conditions. As a result of experiment, we identified stromal cell derived adipose tissue has the multilineage potentiality under appropriate culture conditions. And the adipose stromal cells expressed several mesenchymal stem cell related antigen (CD29, CD44) reactions. Secondary, we compared the culture results of a group of hATSC stimulated with TGF- $\beta$ 1, bFGF with a hATSC group without growth factors to confirm whether cytokines have a important role of the proliferation in osteogenic differentiation. The role of cytokines such as TGF- $\beta$ 1, bFGF increased hATSC's osteogenic differentiation especially when TGF- $\beta$ 1 and bFGF were used together. These results suggest that adipose stromal cells with growth factors could be efficiently available for cell-based bone regeneration.

**Key words:** Human adipose tissue-derived stromal cells (hATSC), Stem cell, Osteogenic differentiation, Growth factors

## I. 서 론

질환이나 외상으로 인한 골결손부를 이전의 상태로 완전하게 치유하기 위한 많은 시도가 이루어져 왔으며, 이러한 방법의 이상적인 목표는 자가조직의 재생(regeneration)이다. 현재까지 알려진 방법들은 주로 자신의 신체 타 부위에서 골을 채취하여 이식하는 자가골이식술과 동종이나 이종에서 채취된 골을 이식 거부반응이 없도록 처리하여 이식하는 이종골이식

술 및 인조골이식술 등이 발달되어 왔다. 하지만 이러한 방법들은 공여부의 골결손이나, 이식골의 흡수경향, 이식골의 생착률 저하 등의 문제점을 안고 있다.

이러한 문제점들을 해결하기 위해서 골유도단백질과 성장인자들을 사용하여 이러한 단점들을 보완하기 위한 연구가 이루어지고 있다. 최근에는 환자의 유전자 특성에 맞고 이식시 거부반응이 없으며 공여부결손등의 단점이 없는 자가줄기세포를 이용한 조직재생법이 획기적인 대안으로 연구되고 있다. 줄기세포는 다양한 세포조직으로 발달할 수 있는 분화능 및 증식능력을 가지고 있어서, 이를 이용해 결손부나 질환 등에 줄기세포를 이용한 조직공학의 가능성은 무한하다.

자가줄기세포는 크게 태아줄기세포(embryonic stem cell)와 성체줄기세포(adult stem cell)가 있다. 태아줄기세포는 뛰어난 분화능과 무한한 증식능력을 가지나 세포의 조절과 윤리적인 문제점으로 인해서 실질적인 사용이 제한된다.

**김 옥 규**602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10 번지  
부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실**Uk-Kyu Kim**Dept. of OMS, School of Dentistry, Pusan National University  
1-10, Amidong, Seogu, Busan, 602-739, Korea  
Tel: 82-51-240-7803 Fax: 82-51-244-8334  
E-mail: kuksjs@pusan.ac.kr

\* 본 연구는 2005년도 부산대학교 자유과제 연구 학술지원금으로 이루어졌음.

성체줄기세포 중 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 얻기 위한 연구들은 지금까지 주로 골수에서 이루어져 왔으며, 골수는 조혈줄기세포와 이를 지지하는 중배엽 기질세포로 구성되어 있다<sup>1,2)</sup>. 이러한 골수기질세포가 적절한 실험조건하에서 골, 연골, 지방조직 등의 다양한 세포로 분화될 수 있는 것이 밝혀졌다<sup>3)</sup>. 하지만 실제적으로 골수에서 줄기세포를 얻는 것은 환자에게 통증이 심하게 유발할 수 있으며, 채취량의 제한이 있다는 단점이 있다<sup>4,5)</sup>. 최근의 연구에서 쉽게 접근가능하고 많은 양의 조직채취가 용이한 지방조직을 이용할 경우 골수와 같은 중배엽 기원이며 다양한 기질세포군을 포함하고<sup>6,8)</sup>, 이 지방기원 기질세포에는 중배엽 줄기세포가 존재하는 것이 밝혀졌다<sup>9,10)</sup>.

그러나 이들 세포의 임상적 적용을 위해서는 중배엽줄기세포의 증식과 분화를 위한 필수요소가 여전히 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 요소들에 대한 집중적인 연구가 이루어지고 있다.

중간엽 줄기세포의 분화와 증식에 관련하는 조절인자로는 내인성 요소와 세포와 기질, 호르몬, 성장인자, 사이토카인 등에 의한 외인성 요소 등이 있지만 이에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

이에 본 연구는 인간의 성체지방조직의 기질세포에서 분리 배양한 세포에서 골 모세포, 지방세포 등으로 분화 능을 지니는 중배엽 줄기세포가 존재하는지를 확인하고, 이들 중간엽줄기세포의 분화와 증식에 관련하는 조절인자의 영향을 알아보기 위해서 골형성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 성장인자인 TGF- $\beta$ 1과 bFGF를 이용하여 세포 분화시 적용시켜 이들이 골세포의 형성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 줄기세포의 분리와 배양-지방조직기질세포

부산대학교병원에서 복부성형술(abdominoplasty)를 시행한 환자에서 동의를 구한 후 지방조직이 얻어졌고 부산대병원 임상시험위원회(IRB)의 심사 및 허락 하에서 실험이 진행되었다. 인간의 지방조직기질세포(hATSC)를 분리시키기 위해서, 지방조직은 동량의 phosphate-buffered saline(PBS(Life technologies))으로 광범위하게 세척 후 0.075% collagenase와 같이 37°C에서 30 분 동안 처리하였다. 효소의 활동은 10% FBS(Life Technologies)가 첨가된  $\alpha$ -modified Eagle's medium( $\alpha$ -MEM(Gibco))으로 중화되었고, pellet으로 만들기 위해서 1200  $\times$  g로 10분 동안 원심분리 하였다. 세포성 잔사를 제거하기 위해서 100- $\mu$ m 나이론 여과지로 거르고 control medium( $\alpha$ -MEM, 20% FBS, 1000units/ml penicillin/streptomycin(Sigma), 2 mM L-Glutamine(Life Technologies))에서 37°C/5% CO<sub>2</sub> 하에서 하루밤 동안 배양하였다. 배양 후, Plate에 부착되지 않은 잔여 red blood cell을 제거하기 위해서 PBS로 세척하였다. 남아있는 세포들은 control medium에서 37°C/5% CO<sub>2</sub> 하에서 유지하면서 배양하였

다. 분리한 세포가 confluent state에 도달하면 trypsin-EDTA(Life Technologies)로 세포를 분리하여 계대배양하였다. 계대배양 후는 FBS농도를 10%로 낮추어 배양하였다.

### Flow cytometry

지방기질세포를 분석하기 전에 control medium에서 3 일 동안 배양하고 FACScan argon laser cytometer(Becton Dickson, San Jose, CA)로 실시하였다. 세포를 0.25% trypsin/EDTA로 분리한 후 ice-cold 2% formaldehyde에서 30 분간 고정하였다. 고정한 후 Flow cytometry buffer (FCB; 13 PBS, 2% FBS, 0.2% Tween-20)으로 세척하고 세포를 CD34, CD14 항체를 포함한 FCB용액에서 반응시킨 후 분석하였다. 양성세포의 비율은 flow cytometer를 이용하여 전체세포 수에 대한 M1 gate에 포함된 세포수의 백분율로서 계산하였다.

### Immunofluorescence of hATSC

hATSC을 glass chamber slide 위에 놓은 후 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)가 포함된 4% paraformaldehyde에서 15 분간 고정한다. 세포를 PBS에 100 mM glycine이 포함된 용액에서 10 분간 세척한다. 5% bovine serum albumin (BSA), 10% FBS, 1X PBS, 0.1% Triton X-100이 포함된 immunofluorescent blocking buffer (IBB)에 1시간 동안 block 한다. ASO2가 포함된 IBB에서 1 시간 동안 배양한다. 세포를 PBS/glycine에 세척한 후 fluoroisothiocyanate (FITC), phycoerytherin(PE) antibody가 포함된 IBB에 1시간 동안 배양한다. PBS/glycine에 세척한 후 핵을 관찰하기 위해 DAPI가 포함된 용액으로 mount한다.

### 골분화 유도

10% FCS, 0.1 $\mu$ M dexamethasone, 50 $\mu$ M ascorbate-2-phosphate, 10mM  $\beta$ -glycerophosphate를 포함한 DMEM(OM배지)에서 2 주간 배양하였다. 배지는 이들에 한번씩 교체하였다. 골분화 유도는 Alzarin red stain으로 extracellular matrix calcification을 확인하였다. 2% alzarin red 용액을 증류수에서 NaOH로 PH가 4.2가 되도록 조절한 후 0.22- $\mu$ m filter로 여과하였다. plate는 150mM NaCl로 세 번 수세 후, ice cold 70% ethanol로 고정하고 증류수로 수세하였다. 그 후 30  $\mu$ L의 alizarin red로 10 분간 염색하였다. 세포는 증류수로 여러 번 세척하고 자외선에 60 분 동안 현상시킨다. 마지막으로, 세포는 에탄올에서 0.1% eosin으로 대조염색을 시행하였다.

### 지방분화 유도

10% FCS, 0.5mM isobutyl-methylxanthine(IBMx), 1 $\mu$ M dexamethasone, 10 $\mu$ M insuline, 200 $\mu$ M indomethacin을 포함한 DMEM (AM)에서 2주간 배양하였다. 지방세포의 확인은 세포내 지방

의 축적을 알 수 있는 Oil Red O stain을 이용하였다. 세포를 4% formaldehyde/1% calcium용액으로 고정하고 70% ethanol 세척 후, 증류수로 세척하여 현미경으로 관찰하였다.

골분화 유도에서의 성장인자의 영향

첫번째 passage1의 hATSC을 10 mL 배지에서 HBSS로 두 번 세척 후 trypsin-EDTA로 분리 하였다. 10 mL tube에 세포를 수거한 후 1100rpm으로 4분간 원심분리 후 가라앉은 세포들을 suspension하여 12 well에 일정한 수의 세포들을 plating 하였다. 이틀 후 세포가 배지에 가득 찬 것을 확인 후 배지를 OM 배지로 교체하고 성장인자를 첨가하였다. 성장인자로는 TGF-β1(R&D system, USA)와 bFGF(R&D system, USA)를 사용하였고 적정농도로는 각각 1ng/ml, 10ng/ml로 하였다. 각각 3 well에 TGF-β1, bFGF, 그리고 두 성장인자 모두를 첨가하였으며 3 well은 대조군으로 사용하여 아무런 처리를 하지 않았다. 배지는 이틀에

한번씩 교체하였으며 성장인자는 이틀에 한번씩 첨가하였다. 2주와 4주 후 고정하여 염색 후 관찰하였다.

III. 결 과

줄기세포의 분리와 배양

인간의 지방조직기질세포로부터 얻어진 중배엽줄기세포가 배양되었다. 이들 세포들은 생체외에서 쉽게 증대되었고 섬유모세포 같은 형태를 나타내었다. 표준 상태(i.e., 10% FBS)에서 중배엽줄기세포들이 배양되었을 때, 평균 population doubling time이 2.3일 이었다. 이들 세포들의 냉동보존이 성장과 형태에는 영향을 미치지 않는 않았다(Fig. 1).

Flow cytometry & Immunofluorescence

이들 배양된 세포에서 다양한 세포로의 분화능이 지방조직체취시의 혈액에 의한 오염으로 인한 조혈줄기세포의 존재 여부 때문인지를 구분하기 위해서 flow cytometry를 이용하여 분석하였고, 표면항원의 발현이 현재까지 보고된 중간엽줄기세포와 유사한지를 밝히기 위하여 immunofluorescence를 시행하였다. Flow cytometry에서 조혈모세포의 표면항원인 CD34와 단핵구와 대식세포의 표면항원인 CD14에 양성반응인 세포는 전체 세포수의 5% 미만으로 대조군과 비교하면 무시할 수준이었다. 이는 분리 배양된 세포들이 혈액세포에 오염되지 않은 순수한 지방조직 기질세포임을 나타낸다. 또, 중간엽줄기세포의 표면항원으로 알려진 CD44와 CD29를 사용한 immunofluorescence에서, CD44는 FITC를 항체로 사용하여 거의 모든 세포에서 푸르게 관찰되었고 CD29는 PE를 항체로 사용하여 대부분의 세포에서 붉게 관찰되었다. 이는 분리 배양한 세포들의

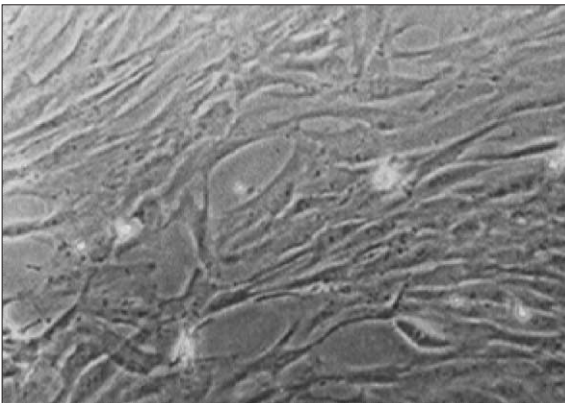


Fig. 1. Morphology of human adipose tissue stromal cells(ATSC) under phase contrast microscopy.

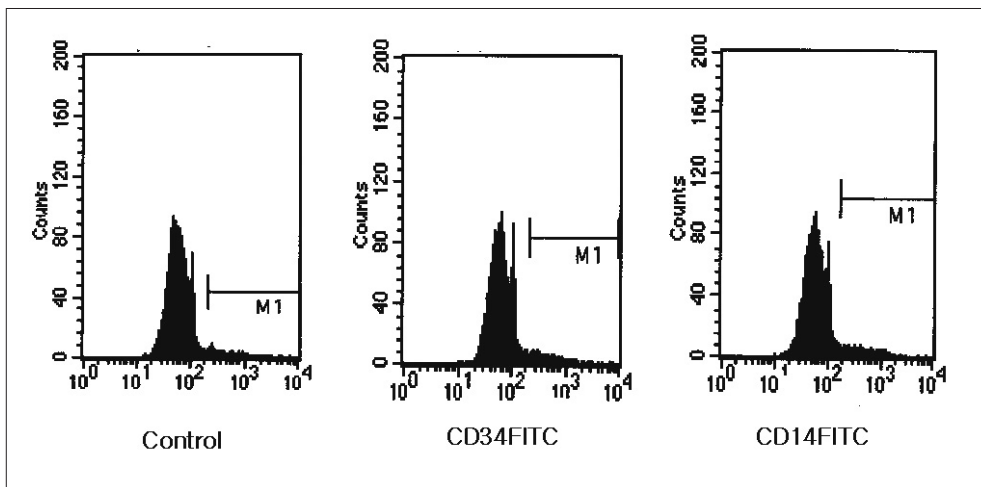


Fig. 2. Flow cytometry of hATSCs using CD 34, CD 14 hematopoietic progenitor markers (Left: Control; Center: CD 34 FITC; Right: CD 14 FITC).



표면항원의 발현이 중간엽줄기세포와 같음을 나타내어 중간엽줄기세포임을 알 수 있다(Fig. 2-4, Table 1).

중간엽줄기세포의 골세포와 지방세포로의 분화

복부의 지방조직 기질세포에서 분리한 세포가 중간엽줄기세포의 특성을 가지는지 확인하기 위하여 이들 세포를 조골세포

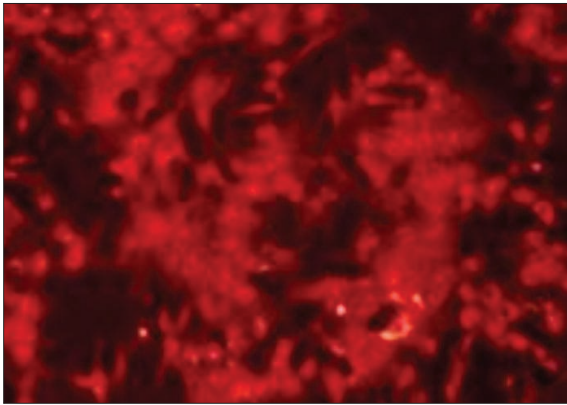


Fig. 3. Immunofluorescence ATSC CD 29-PE cells with red color demonstrate ATSCs.

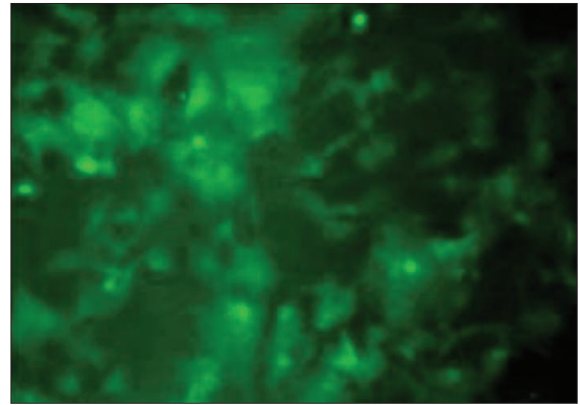


Fig. 4. Immunofluorescence ATSC CD44-FITC Cells with green color demonstrate ATSCs.

Table 1. Immunophenotype of cultured BMSC and ATSC

Antigody Name	CD34	CD14	CD29	CD44
ATSC	X	X	O	O
BMSC	X	X	O	O

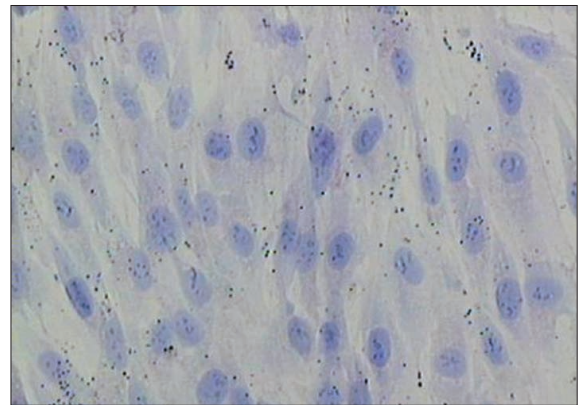


Fig. 5. Adipose Tissue Stromal Cells(contrast) ATSCs prior to stem cell differentiation can be seen.

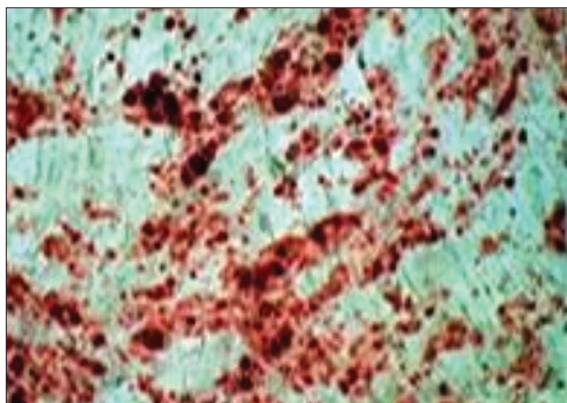


Fig. 6. Osteogenic differentiation of ATSCs (Alzarlan red stain) Osteogenic stem cells from ATSCs demonstrate mineralization of ECM as dark red color spots.

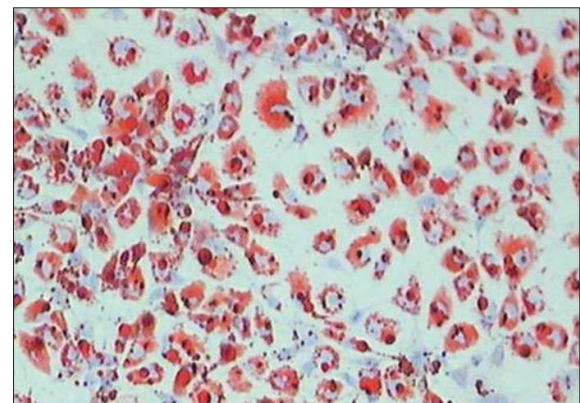


Fig. 7. Adipogenic differentiation of ATSCs (Oil Red O. stain) Adipogenic stem cells from ATSCs demonstrate lipid droplet as light red color spots.

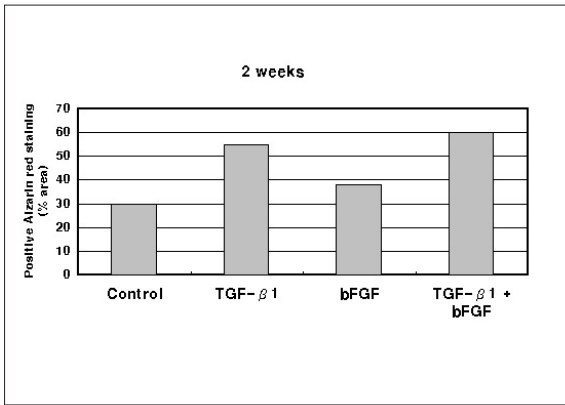


Fig. 8. Osteogenic differentiation of hATSCs (2 weeks).

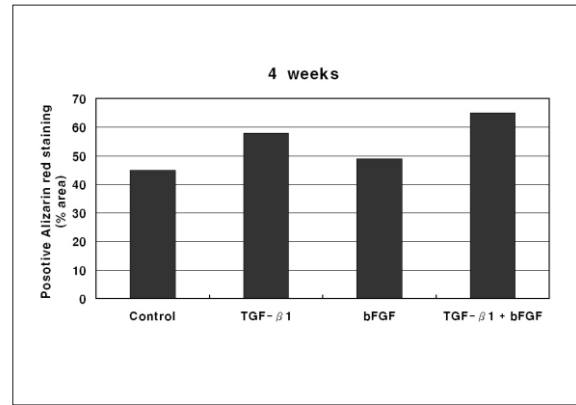


Fig. 9. Osteogenic differentiation of hATSCs (4 weeks).

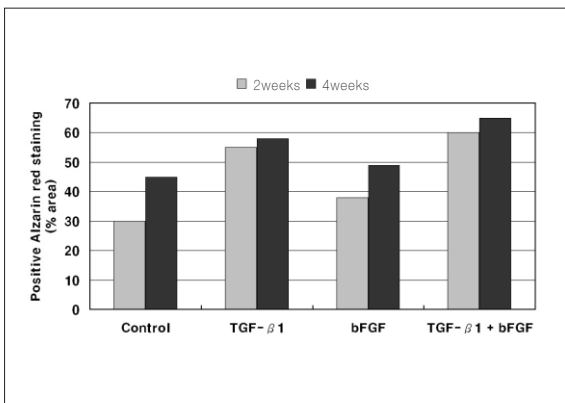


Fig. 10. Comparison of osteogenic differentiation of hATSCs on 2 weeks with that on 4 weeks.

포 및 지방세포로 분화를 유도하였다. 조골세포로의 분화는 생체외에서 낮은 농도의 ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, 그리고 dexamethasone으로 세포를 배양하여 유도하였다. 성숙한 조골세포는 분화 후기에 석회화되는 collagen I-rich extracellular matrix(ECM)를 분비한다. 그러므로, 골형성 분화를 확인하기 위하여, Alzarin red 염색으로 중배엽줄기세포에서 ECM의 석회화를 측정하였다. 석회화 부위는 세포의 단일층(monolayer)내에서 붉게 나타난다. 골형성을 나타내는 석회화된 ECM의 붉은 부위가 OM에서 2주간 배양된 hATSC에서 관찰되었다. 석회화된 ECM의 생산은 이들 세포들이 osteogenic lineage로 유도될 수 있다는 것을 강하게 나타낸다.

지방세포로의 분화는 dexamethasone, insulin, isobutyl-methylxanthine, indomethacin으로 세포를 배양하여 유도하였다. Oil Red-O 염색으로 세포내 lipid droplet을 가지는 확대된 형태를 관찰하여 성숙한 지방세포를 확인하였다.

이로써 분리 배양한 지방조각기질세포가 다양한 세포로의 분화능을 가지는 중간엽줄기세포임을 확인할 수 있었다(Fig. 5-7).

#### 골분화 유도에서의 성장인자의 영향

12 well에 OM배지를 사용하여 실험군으로 3 well 씩 각각 TGF- $\beta$ 1군, bFGF군, 그리고 두 성장인자 모두를 첨가한 군, 나머지 3 well은 대조군으로 사용하여 골분화에 성장인자가 미치는 영향을 알아보려고 하였다. TGF- $\beta$ 1은 1ng/ml, bFGF는 10ng/ml의 비율로 첨가하고 2주와 4주간 배양 후 고정하여 관찰하였다. 2주와 4주 모두 대조군에 비해 성장인자를 첨가한 실험군에서 골분화도가 증가되었다. 특히 TGF- $\beta$ 1을 첨가한 군이 bFGF를 첨가한 군보다 더 큰 골분화도를 보였고 두 성장인자 모두 첨가한 실험군에서 가장 큰 골분화도를 나타내었다. 4주간 배양 후 고정한 경우 2주 배양한 군보다 골분화도가 전체적으로 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8-10).

#### IV. 고 찰

최근 줄기세포를 이용한 조직공학에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 현재의 수술적 재건을 대신할 수 있는 방법으로 조직공학을 이용한 골조직재생법이 향후 재생, 재건술의 한 분야로서 중요한 자리를 차지할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 연구의 일환으로 가장 많이 연구되어 온 것이 골수의 중간엽줄기세포이다. 인간의 골수는 중배엽에서 기시하였으며 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)와 중배엽기질세포(mesencymal stroma)가 존재한다. 조혈줄기세포의 증식과 분화에 대해서는 잘 알려져 왔지만 이 중간엽 기질세포에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

골수의 기질에는 중간엽줄기세포라고 불리는 줄기세포군을 포함한 다양한 세포군으로 구성되어 있다<sup>12</sup>. 골수에서 채취한 중간엽줄기세포에서 지방세포,<sup>9</sup> 연골세포,<sup>11-12</sup> 근육모세포,<sup>13,14</sup> 조골세포<sup>5,11,15</sup> 등으로 분화되는 것이 증명되었으며, 최근에는 골격근,<sup>14,16</sup> 심근,<sup>17,18</sup> 또는 간<sup>19,21</sup>과 같은 다른 중배엽 기원의 세포로 분화될 수 있고 심지어 신경조직과 같은 다른 배엽의 조직으로도 분화될 수 있는 것이 밝혀지고 있다<sup>22,23</sup>. 그러나 골수

에서 줄기세포를 얻는 것은 전신 또는 국소마취가 필요하며 채취 시 통증이 동반되고 중배엽 줄기세포의 수가 적다는 단점이 있다<sup>45</sup>. 또한 많은 양의 중배엽 줄기세포를 얻기 위해 많은 시간과 경비가 필요하며, 반복하여 시행하는 경우 오염의 가능성이 증가한다. 따라서 자가줄기세포를 비교적 쉽게 얻을 수 있고, 환자에게 손상이 적게 주면서 충분한 양을 얻을 수 있는 방법을 찾아왔다.

이를 위해 골수와 같은 중배엽 기원으로 많은 heterogenous stromal cell population을 가지는 지방조직의 연구가 시작되게 되었다. 지방조직은 보다 적은 침습성을 가지고 얻을 수 있으며 인체에 많은 양이 존재한다. 인간의 지방조직에서 지방세포, 연골세포, 근육모세포, 골모세포 등으로 분화되는 중배엽 줄기세포가 존재하는 것이 증명되었으며 지방조직기질에서 얻은 중배엽 줄기세포의 증식능과 분화능이 골수기질세포에서 얻은 중배엽 줄기세포의 것보다 떨어지지 않았다는 보고가 있었다<sup>24</sup>.

본 실험에서는 인간의 복부 지방조직에서 분리 배양한 기질 세포로 조골세포와 지방세포로 분화시킬 수 있었으며 이들 세포가 골수에서 분리한 것과 같은 표면항원군을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 조혈모세포 등의 혈액세포의 오염이 없음을 확인하여 다양한 세포로 분화될 수 있는 중간엽줄기세포가 존재함을 확인하였다. 이 세포는 생체외에서 계대배양이 가능하였으며 냉동보관한 세포를 해동 후 다시 배양하였을 때 동일한 형태의 세포성장이 관찰되었다. 이러한 결과는 골수 등 다른조직에서 보고된 바와 같이 장시간 증식과 보존이 가능한 중간엽줄기세포의 특성을 가지고 있음이 증명되었다.

그러나 이러한 중배엽줄기세포의 임상 적용시에 그 분화효율이 낮고 분화능유지를 위한 배양조건이 까다로워 세포선별 기술과 분화유도기술이 여전히 문제가 되고 있기도 하다.

이에 본 실험에서는 중간엽줄기세포의 골세포로의 분화와 증식에 관련하는 성장인자로 TGF- $\beta$ 1과 bFGF의 부가시 그 영향을 알아보고자 하였다. TGF- $\beta$ 1은 골조직, 결합조직, 그리고 면역학적 시스템 등의 다양한 범위에 다양한 생물학적 효과를 가지는 폴리펩타이드 성장인자의 일원으로서 골과 결합조직에서 다양한 기능과 활성을 가지고 골형성과 조골세포의 증식을 유도한다. 또한 다른 성장인자의 존재유무에 따라 세포 분화를 자극하거나 억제한다고 알려져 있다. TGF- $\beta$ 1은 현재까지 확인된 fibroblast collagen stimulator들 중 가장 강력하며 osteopontin, osteonectin, 여러 종류의 콜라겐 등과 같은 다양한 골과 연골 요소들의 생산도 촉진한다. Loklin은 골수기질세포에서 골세포로 분화시 TGF- $\beta$ 1이 성숙한 조골세포의 표지자로 고려되는 ALP activity를 증가시킨다는 사실을 확인하였다<sup>25</sup>. 또한 TGF- $\beta$ 1은 세포내 또는 세포간의 신호를 통해서 세포의 골형성을 자극하고 골형성 능력을 향상시키는 적절한 미세환경을 유도한다고 알려졌다<sup>26,27</sup>.

bFGF는 중배엽과 신경외배엽 기원의 세포들의 분화에 영향을 미치는 조절인자로 알려져 있다. bFGF는 조골세포의 증식에도 주요한 영향을 미치며 골의 콜라겐을 합성하는 세포의

수를 증가시킴으로 골형성을 증가시킨다. 골수의 중배엽줄기세포에 bFGF 첨가시 그 증식능과 골형성능이 증가하였고 bFGF는 TGF- $\beta$ 1와는 상가 작용이 있어 세포를 현저히 증식시킨다고 보고 되었다<sup>28,29</sup>.

TGF- $\beta$ 1과 bFGF가 중배엽줄기세포를 조골세포로 분화되는 것을 증가시키는 기전은 아직 정확히 알려져 있지 않다.

bFGF는 골수기질세포의 골세포로의 분화시 분화능을 증가시키고 배지에 포함되어 있는 조골세포로의 분화시 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 dexametasone과의 배양시 세포의 glucocorticoid receptor의 수를 증가시켜 dexametasone과의 반응을 증가시킨다고 보고가 있었다<sup>30,31</sup>.

이에 본 실험에서 TGF- $\beta$ 1과 bFGF가 골수기질세포에서와 같이 지방조직기질세포에서 조골세포로의 분화시 첨가했을 때 그 분화능을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었고 단독 첨가시 TGF- $\beta$ 1에서 bFGF보다 더 증가하였다. 이들 성장인자의 동시 첨가시 그 상가효과를 관찰할 수 있었다. 또한 2주와 4주군의 비교 관찰시 이들 성장인자들이 조골세포로의 분화시기를 앞당기는 것을 관찰할 수 있었다.

본 실험의 결과들은 향후 지방조직기질세포가 성체줄기치료의 유용한 세포로서의 가능성을 제시하였으며 또한 성장인자들이 병용 되었을 시 조골세포로의 분화를 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

## V. 결 론

본 연구에서 저자는 인간의 복부에서 채취한 지방조직기질 세포에 다양한 세포로의 분화능을 가지는 중배엽줄기세포가 존재하는지를 확인하고 조골세포로의 분화시 성장인자인 TGF- $\beta$ 1과 bFGF를 첨가하여 그 분화능을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 지방조직에서 분리 배양한 지방조직기질세포들이 조골세포, 지방세포로의 분화능을 가지는 중배엽줄기세포임을 확인하였다.
2. 지방조직기질세포를 조골세포로 분화시 TGF- $\beta$ 1과 bFGF의 첨가시 그 분화능이 증가하였으며 두 성장인자의 동시 적용 시 상가효과를 관찰할 수 있었다.

상기 결과로 볼 때, 향후 지방조직기질세포가 골 결손부의 재생에 유용한 세포치료의 재료로 사용될 수 있으며 이들 성장인자의 첨가로 그 효용성이 증가할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP: Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation 1968;6:230-247.
2. Dexter TM: Stromal cell-associated hematopoiesis. J Cell Physiol 1982;1:87-94.
3. Owen M: Marrow stromal stem cells. J Cell Sci Suppl 1988;10:63-76.
4. 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.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
  6. Hausman GJ, Campion DR: Histology of the stroma in developing rat subcutaneous adipose tissue. *J Anim Sci* 1982;55:1336-1343.
  7. Pettersson P, Cigolini M, Sjoestroem L, Smith U, Bjornorp P: Cells in human adipose tissue developing into adipocytes. *Acta Med Scand* 1984;215:447-451.
  8. Pettersson P, Van R, Karlsson M, Bjornorp P: Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. *Metabolism* 1985; 34:808-812.
  9. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
  10. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al.: Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001;7(6):729-41.
  11. Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-650.
  12. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Joo JU: In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-272.
  13. Wakitani S, Saito T, Caplan AI: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18:1417-1426.
  14. Ferrari G, Cusella-De Angelis, Coletta M, Coletta M, Paolucci E, Stomaiuolo A, et al.: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
  15. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-74.
  16. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al.: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-394.
  17. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al.: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-436.
  18. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk J, Anderson SM, Li B, et al.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.
  19. Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, et al.: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
  20. Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
  21. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al.: Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
  22. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM: From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-1779.
  23. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKecher SR: Turning blood into brain : cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1770-1782.
  24. Choi IS: Isolation of multilineage mesenchymal stem cells from human adipose tissue and proximal femur. Pusan National University, College of Medicine, Postgraduate School, 2002.
  25. Locklin RM, Williamson MC, Beresford JN, Triffitt JT, Owen ME: In vitro effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cell. *Clin Orthop* 1995;313:27.
  26. Quatela VC, Sherris DA, Rosier RN: The human auricular chondrocyte. Responses to growth factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119(1):32-7.
  27. YI chengqing, ZHENG Qixin, GUO Xiaodong: Osteogenic Potential of Cultured Bone Marrow Stromal Cells Transfected with Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Gene in vitro. *Journal of Tongji Medical University* 2001;21(2):130-133.
  28. M Mastrogiacomo, R Cancedda, R Quarto: Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001;9:S36-S40.
  29. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME: A Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 Fusion Protein with Collagen-binding Domain Promotes Migration, Growth, and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Cells. *Experimental Cell Research* 1999;250:485-498.
  30. Kotev-Emeth S, Savion N, Prichen S, Pitaru S: Effect of Maturation on the Osteogenic Response of Cultured Stromal Bone Marrow Cells to Basic Fibroblast Growth Factor. *Bone* 2000; 27(6):777-783.
  31. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, et al.: Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;288:413-419.