

지방세포에서 비중을 이용한 지방유래 줄기세포가 풍부한 분획의 분리 방법

김민경 · 박용순 · 박희순¹ · 최정목¹ · 김원준² · 박세은² · 이은정² · 박철영² · 이원영² · 오기원² · 박성우² · 김선우² · 서광식³ · 우정택³

한양대학교 생활과학대학 식품영양학과, 강북삼성병원 당뇨병연구소¹, 성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 내분비내과², 경희대학교 의과대학 내분비대사내과³

Isolation of Density Enrichment Fraction of Adipose-Derived Stem Cells from Stromal Vascular Fraction by Gradient Centrifugation Method

Min Kyung Kim, Yong Soon Park, Hee Soon Park¹, Jung Mook Choi¹, Won Jun Kim², Se Eun Park², Eun Jung Rhee², Cheol-Young Park², Won Young Lee², Ki Won Oh², Sung Woo Park², Sun Woo Kim², Kwang Sik Suh³, Jeong Taek Woo³

Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul, Korea; Diabetes Research Institute¹, Kangbuk Samsung Medical Center, Seoul, Korea; Department of Internal Medicine², Kangbuk Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea; Department of Endocrinology-Metabolism³, College of Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

Background: Adipose tissues include multipotent cells, the same as bone marrow-derived mesenchymal stem cells. The stromal vascular fractions (SVFs) from adipose tissues represent a heterogeneous cell population. The purpose of this study was to isolate and purify adipose-derived stem cells (ASCs) in SVFs by the density gradient method.

Methods: SVFs were extracted from the subcutaneous, epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissue of 8 weeks old male Sprague-Dawley rats (n = 15) and these were separated into 4 layers according to a Nycodenz gradient (Fx-1: < 11%, Fx-2: 11-13%, Fx-3: 13-19% and Fx-4: 19-30%). The post-confluent SVFs were cultured in adipogenic medium for 2 days, in insulin medium for 2 days and in 10% fetal bovine serum medium for 5 days. To observe lipid droplets in SVFs, we performed Oil Red O staining.

Results: The SVFs' cellular fractions (Fx-1, Fx-2, Fx-3 and Fx-4) were isolated by density gradient centrifugation from the adipose tissues of rats. The SVFs extracted to fraction 3 (Fx-3) had the most abundant cells compared to that of the other fractions. However fraction 1 (Fx-1) or 2 (Fx-2) had a superior ability to make lipid droplets. The adipogenic differentiation of Fx-1 or 2 was higher than that of the unfractionated cells. The SVFs extracted from retroperitoneal adipose tissue had the highest efficiency for adipogenic differentiation, whereas the SVFs from mesenteric adipose tissue did not differentiate.

Conclusion: This density gradient fractionated method leads to efficient isolation and purification of cells with the characteristics of ASCs. (*Endocrinol Metab* 25:103-109, 2010)

Key Words: Rat adipose tissue, Adipose-derived stem cell, Stromal vascular fraction, Density gradient, Nycodenz

서론

줄기세포(stem cell)는 적절한 신호에 의한 자기 복제 및 다양한 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 전구세포로서 발생 단계에서부터 인체의 장기를 형성하고 성장 후에는 장기 및 조직의 기능을

복원하는 데 중요한 역할을 한다. 줄기세포는 발생초기 배반포(blastocyst)에서 얻어지는 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 발생과정이 끝난 성체 또는 태반에서 얻어지는 성체줄기세포(adult stem cell)가 있다[1]. 이 두 가지 줄기세포는 서로 다른 특징을 가지고 있는데, 배아줄기세포는 미분화 상태에서 자가 증식 능력이 뛰어나지만 분화 잠재성을 알기 어려워 생체 내 이식을 한 경우 불필요한 세포의 증식 등 암 발생 가능성을 고려해야 한다. 또한 배아줄기세포의 이용은 생명체 이용이라는 점에서 많은 윤리적인 문제를 안고 있어 실질적인 사용에 제한이 따른다. 반면, 성체줄기세포는 생체 내

Received: 12 October 2009, Accepted: 23 December 2009

Corresponding author: Cheol-Young Park

Department of Internal Medicine, Kangbuk Samsung Medical Center, 108 Pyeong-dong, Jongno-gu, Seoul 110-746, Korea

Tel: +82.2-2001-2440, Fax: +82.2-2001-1588, E-mail: cydoctor@chol.com

에 이식된 후 장기 특성에 맞게 분화하는 특이성 및 본래의 세포 특성과는 다른 종류의 세포로 교차 분화할 수 있는 유연성을 가지고 있고, 다양한 세포로 분화될 수 있는 다잠재성이 있음이 밝혀지면서 성체줄기세포를 통한 세포 치료의 가능성은 높아지고 있다[2].

성체줄기세포 중 중간엽 줄기세포를 얻기 위한 연구들은 주로 골수에서 이루어져 왔으며, 골수줄기세포를 이용하여 다양한 조직으로의 분화 등 많은 연구가 이루어져 왔다[3-7]. 그러나 골수에서의 세포 획득은 환자의 고통을 수반하며 임상에 적용하기 위한 충분한 양의 세포를 얻기 위해서는 여러 번 채취해야 하는 부담이 존재한다[8,9]. 골수와 같은 간엽에서 유래하며 다양한 기질 세포들을 포함하고 있는 지방조직은 또 다른 줄기세포의 원천으로 Zuk 등[10,11]은 지방 추출물 안에 줄기세포로 추정되는 세포들이 있으며, 이를 지방 유래 줄기세포(adipose-derived stem cells, ASCs)라고 명명하였다. 지방조직은 많은 양의 조직 채취가 용이하여 줄기세포를 수확하는데 좋은 조건을 가지고 있으며, ASCs는 배양 시 안정적인 성장과 증식을 보여주고 분화를 유도하였을 때 골수줄기세포와 같이 다양한 세포로의 분화가 가능하다는 것이 증명되었다[12].

현재 ASCs는 지방조직의 성숙 지방세포, 적혈구 등을 제거한 나머지 기질세포(stromal vascular fraction, SVF)를 분리 배양하여 얻는다[13]. 그러나 이 SVF에는 지방전구세포, 지방모세포 등의 지방세포의 각 분화 단계에 따른 여러 가지 성분들이 포함되어 있다. 세포막 표면에 존재하는 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 분리하는 방법[10,11]이 개발되어 있지만 고비용으로 인하여 제한적이고 대중적으로 사용하기 어려운 단점이 있다. 인간과 동물의 장기 및 조직에서 생존율과 순도가 높은 세포를 분리하기 위한 방법으로 세포의 크기와 밀도에 기초한 방법들이 활용[14]되고 있는데 밀도차등(density gradient) 원심분리는 죽은 세포와 뒤섞인 상태로 있는 살아있는 세포(live cell)를 분리해낼 수 있는 것으로 알려져 있으며, 주로 간세포의 분리에 이용되고 있다[15]. 밀도차등 원심분리에 사용되는 매질로는 Percoll, metrizamide, Ficoll 400, Nycodenz, stractan 등이 있는데, 비이온성 요오드 화합물인 Nycodenz는 세포 독성, 삼투압 손상 및 응집 반응이 적다고 알려져 있다[14-16].

이에 본 연구에서는 지방조직의 SVF에서 분리한 세포를 표면 항원 분석의 비용적인 측면을 고려한 새로운 방법인 Nycodenz를 이용한 밀도차등 원심분리를 이용하여 생존율과 순도가 높은 분획 및 지방세포로 분화되는 적정 구획을 찾아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. Stromal vascular fraction의 분리

8주령의 수컷 Sprague-Dawley 흰 쥐($n = 15$, 242.7 ± 1.3 g)를 사용하여 subcutaneous adipose tissue (SAT), epididymal adipose tissue (EAT), mesenteric adipose tissue (MAT), retroperitoneal adi-

pose tissue (RAT)를 채취하였다. 각각의 지방조직을 2% bovine serum albumin (BSA, Gibco, USA)을 넣은 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, USA)으로 세척하여 작은 조각으로 분쇄하였다. 분쇄시킨 조직을 0.075% collagenase Type II (Sigma-Aldrich, USA)로 37°C에서 30분 처리한 다음, 10% fetal bovine serum (FBS), 0.2% Fungizone, 1% Penicillin Streptomycin (Gibco, USA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)으로 효소반응을 정지시키고 100 μ m 나일론 여과지(mesh filter, BD bioscience, USA)에 통과시켜 불필요한 조직을 제거하였다. 200 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 상층에 부유된 지질과 지방세포층을 제거한 다음 하부의 모아진 세포를 RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)에 10분간 처리하고 여과 및 원심분리하여 SVF를 모은다.

2. 비중에 따른 세포의 분리

30% wt/vol 위에 19%, 13%, 11%의 농도별 비연속 Nycodenz (Sigma, USA) buffer를 만든 다음 지방조직의 SVF를 11% Nycodenz buffer에 넣어 250 \times g에서 30분 동안 원심분리하였다. 상층액과 각 농도별 경계면(interface)에서 수집한 SVF를 각각 Fx-1 (< 11% Nycodenz), Fx-2 (11-13% Nycodenz interface), Fx-3 (13-19% Nycodenz interface), Fx-4 (19-30% Nycodenz interface)로 명명하였다.

3. 지방세포로의 분화 유도

지방조직별로 수집한 각 분획의 SVF는 10% FBS, 0.2% Fungizone, 1% Penicillin Streptomycin을 함유한 DMEM 배지(Complement medium, CM)에 희석하여 12 well plate에 1×10^5 cell/mL를 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 초기 24시간 후에 부착되지 않은 세포는 phosphate buffered saline (PBS, Gibco, USA)으로 세척하여 제거한 후 2-3일 간격으로 새로운 배지를 교환하면서 포화상태에 이를 때까지 배양하였다. 지방세포로의 분화 유도를 위해 배양액에 520 μ M 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX), 1 μ M dexamethasone, 1 mg/mL insulin을 첨가한 지방세포 분화유도 배지(MDI medium, Adipogenic medium)를 2일간 처리한 다음 1 mg/mL insulin만을 첨가한 배지(Insulin medium)로 다시 2일간 처리하였다. CM으로 6일 동안 배양하면서 지방 방울(lipid vacuole)의 형성 여부를 현미경으로 관찰하였다.

4. 분화도 측정

지방세포의 확인은 세포 내 지방의 축적을 알 수 있는 Oil Red O stain을 이용하였다. 세포를 10% formaldehyde로 30분 고정한 후에 60% isopropanol로 세척한 다음 60% isopropanol에 Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA)를 녹인 Oil red O solution으로 30분 이상 염색하였다. 염색한 세포는 현미경으로 관찰하였으며, 100% isopropanol

nil로 Oil red O de-stain을 하여 ELISA Reader (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. 지방조직의 분포

각 지방조직의 분포는 SAT가 전체 지방의 50.2%로 양이 가장 많고, EAT 22.8%, MAT 15.8%, RAT 11.2%를 차지했으며 전체 지방량은 평균 4.7 ± 0.2 g였다(Fig. 1). 다른 농도의 Nycodenz buffer를 이용하여 원심분리를 한 결과 밀도에 따라 4개의 분획에서 SVF를 얻을 수 있었다.

2. 지방조직별 지방줄기세포의 양과 분화 정도

Trypan blue 염색법으로 지방조직별로 살아있는 세포의 수를 측정한 결과, MAT로부터 분리된 세포(M-SVF)의 수가 가장 많았으며, E-SVF, S-SVF, R-SVF 순서였다(Fig. 2A). S-SVF와 R-SVF는 post confluence에 도달하는 속도가 빨랐으며, M-SVF와 E-SVF는 상대적으로

로 느린 속도를 보였다. 7일 동안 지방세포로 분화시킨 결과는 세포 수를 측정한 결과와는 반대로 R-SVF의 분화가 가장 잘 이루어졌고, S-SVF도 높은 분화율을 보였으나 E-SVF는 상대적으로 분화가 잘 되지 않았고 M-SVF는 분화가 거의 이루어지지 않았다. 분화된 지방세포의 Lipid vacuoles에서도 지방조직에 따른 차이를 관찰하였다. 양은 많지만 크기가 작은 lipid vacuole을 보였던 S-SVF에 비해 E-SVF는 상대적으로 양이 적었지만 커다란 lipid vacuole을 형성하고 있었다. R-SVF는 지방세포의 양이 가장 많았으며 lipid vacuoles 또한 큰 편이었다(Fig. 3).

3. 분획에 따른 지방조직별 기질세포의 양

밀도차등 원심분리를 이용하여 나눈 지방조직의 분획별 생세포 수는 부위에 따른 4 종류의 지방조직에서 비슷한 패턴을 보였다. 세포 수가 가장 적은 분획은 Fx-1이고, Fx-3의 세포 수는 가장 많았다(Fig. 2B). 차이점은 RAT로부터 분리된 세포는 Fx-2가 Fx-4보다 많았지만 다른 지방조직은 Fx-2가 Fx-4보다 세포 수가 적었다. CM으로 2일 정도 배양했을 때 관찰한 세포의 모양은 유래된 지방조직 및 분획에 상관없이 모두 섬유아세포(fibroblast)의 형태로 차이가 없었다.

4. 분획에 따른 지방조직별 지방줄기세포의 분화 정도

분획을 나누지 않은 SVF를 대조군(con)으로 하여 분획을 나누는 SVF를 지방세포로 7일 동안 분화시켜 현미경과 Oil red O stain으로 확인하였다. 분화 7일째 되었을 때 분획에 따라 lipid vacuoles의 크기와 양이 달랐다. S-SVF와 R-SVF는 모든 분획에서 전체적으로 지방세포를 고르게 형성하였다(Fig. 4). 그러나 E-SVF는 부분적으로 분화가 이루어졌으며 분획에 따라 지방세포의 양에 차이가 있음을 현미경으로 관찰하였고, M-SVF는 지방세포를 거의 찾아볼 수 없었다. 축적된 지방을 Oil red O stain을 하여 현미경으로 분화 정도를 확인하였을 때, 분획마다 고른 분화를 보였던 S-SVF와 R-SVF는 대조군과의 차이를 확인하기 어려웠으나 상대적으로 분화율이 떨어지

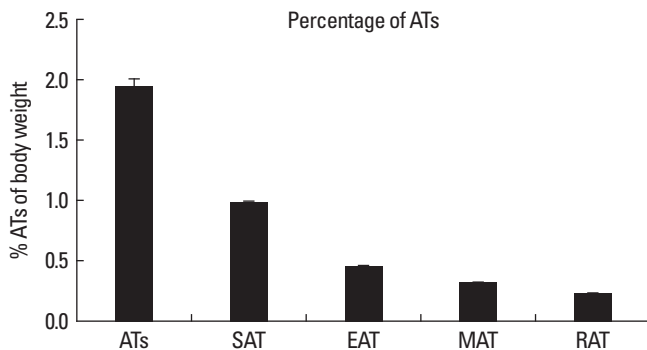


Fig. 1. Amount of adipose tissues is most extensive in subcutaneous, epididymal, mesenteric, and lowest in retroperitoneal adipose tissue. Data is expressed as mean \pm SE.

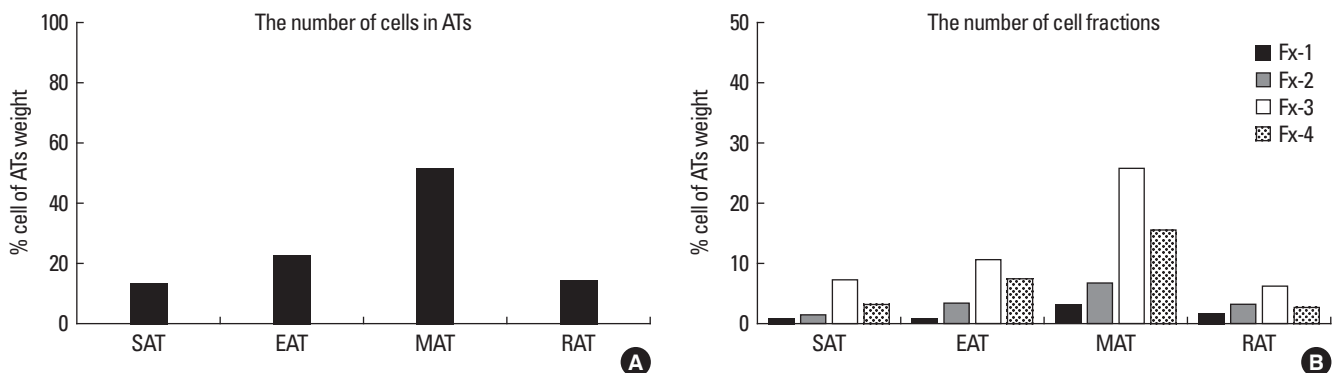


Fig. 2. Cell numbers of undifferentiated SVFs were estimated by trypan blue staining. A. Mesenteric adipose tissue had the most abundant cells than other adipose depots (MAT > EAT > RAT > SAT). B. SVFs extracted to fraction 3 (Fx-3) had highest cell numbers than other fractions.

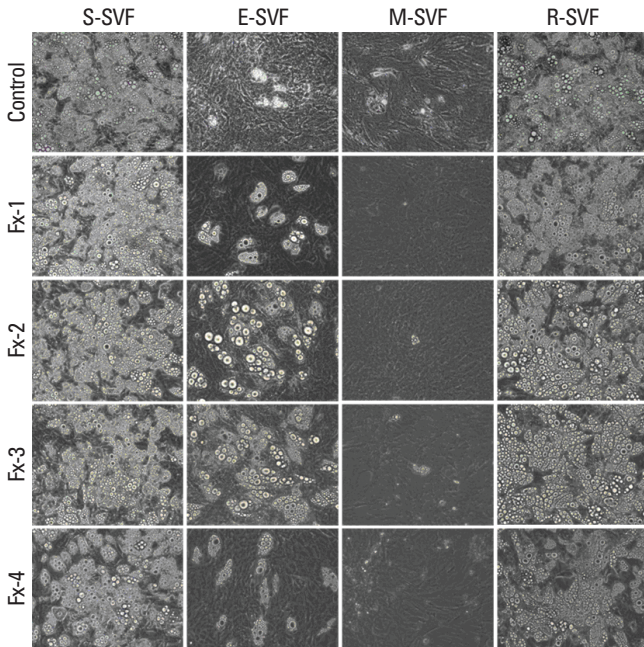


Fig. 3. Post-confluent ASCs were cultured in adipogenic medium. On day 7 of adipogenic induction, lipid vacuoles were observed within the ASCs, and a significant difference was detected in the number, size and distribution patterns of the lipid vacuoles (magnification, $\times 200$).

는 E-SVF는 대조군에 비해 분화를 나누었을 때 분화가 잘 되었다 (Fig. 4). Oil red O de-stain으로 분화율을 정량분석하여 지방조직마다 분화별로 분화 양상을 비교하였다. S-SVF와 R-SVF는 Fx-2의 분화율이 가장 우수한 것으로 나타났으며 S-SVF와 R-SVF보다 각각 2배, 1.5배 유의하게 높은 분화 효율을 보였다 (Fig. 5). E-SVF와 M-SVF는 Fx-1의 분화율이 가장 높았지만 E-SVF는 S-SVF, R-SVF에 비해서 분화율이 전체적으로 크게 떨어지는 수준이었고, M-SVF는 거의 분화가 되지 않았다 (Fig. 5).

고 찰

본 연구는 지방조직으로부터 SVF만을 추출하던 기존의 방식에 기술적인 부분을 보강하여 SD rat에서 채취한 4부위의 지방조직에서 SVF를 분리한 뒤 Nycodenz로 밀도차등원심분리를 하여 생존율과 순도가 높은 지방세포로 분화되는 적정 분획을 찾았다. Nycodenz를 비롯하여 밀도차등원심분리에 이용되는 매질들은 현재 주로 간세포의 분리에 이용되고 있으며 [14,17], Nycodenz를 이용한 밀도차등원심분리는 세포에 대한 안정성이 높고 경제적 측면에서 손쉽게 이용할 수 있는 방법이다 [18,19].

ASCs를 얻기 위해 현재까지 이루어지고 있는 방법은 1960년대 Rodbell에 의해 시작된 방법으로 성숙한 지방세포와 혈구 성분만을 제거한 SVF를 분리하여 배양하기 때문에 섬유아세포, 혈관평활근

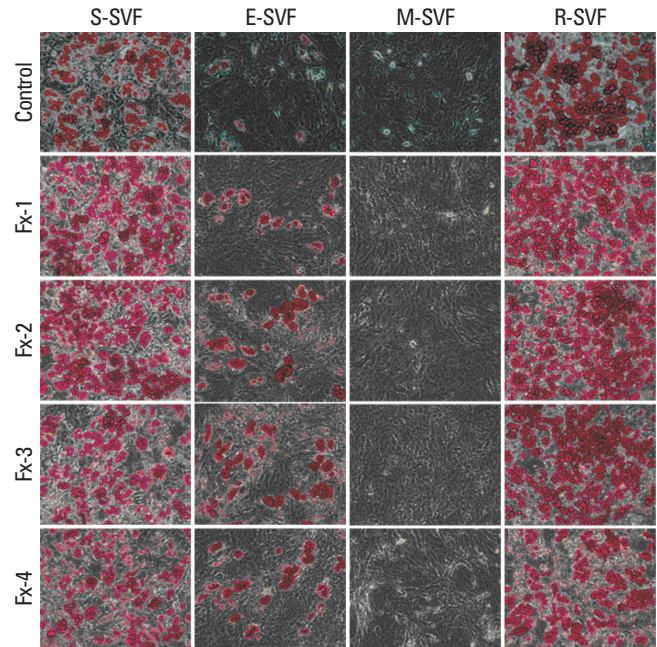


Fig. 4. Comparisons in the differentiation were examined by Oil red O stain for adipogenesis. The retroperitoneal and subcutaneous adipose tissue derived stem cells had the highest efficiency in adipogenic differentiation whereas the mesenteric adipose tissue derived stem cells did not differentiate (magnification, $\times 200$).

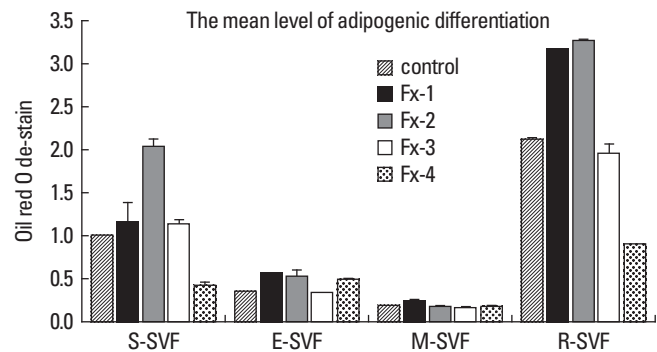


Fig. 5. After Oil red O staining, the optical density of Oil red O-positive cells was assessed by ELISA reader. The retroperitoneal adipose tissue derived stem cells had the highest efficiency in adipogenic differentiation. The adipogenic differentiation of fraction 1 or 2 was higher compared to that of the unfractionated cells (control) and other fractions. Data are expressed as mean \pm SE.

세포, 내피세포, 면역세포, 지방전구세포 등 여러 세포가 혼합되어 있다 [20-23]. 골수 및 조직으로부터 추출된 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cell, MSC)는 일반적인 배양 상태에서 세포부착능력을 가지며, in vitro에서 다분화능을 보이고, 특유의 표면 항원 발현이라는 세 가지 특징을 가지고 있다 [24]. MSC는 형광물질이나 자석이 붙은 항체를 유세포분석기 (FACS) 혹은 자기활성세포분석기 (MACS)로 줄기세포임을 확인한다. 일반적으로 MSC에 사용되는 음성항체는 조혈줄기세포 및 과립구 계통의 항원인 CD34, CD45, CD14 (또는

CD11b), CD79 α (또는 CD19), HLA-DR이며, 양성항체는 CD105, CD73, CD90이다[25]. SVF는 줄기세포 항원인 CD166, CD44, CD29, CD73, CD90, CD105를 가지고 있으며 이들 항원은 passage가 증가함에 따라 증가하고 CD11, CD14, CD45, CD34는 passage가 증가할수록 발현이 감소되거나 없어진다[26-28]. 그러나 사람과 동물의 ASC에서 CD90, CD34, CD106, CD105, Stro-1은 초기 passage에서 더 잘 나타나는 등 발현이 가변적이다. ASC와 bone marrow mesenchymal stem cell (BSC)는 비슷한 항원을 가지고 있지만 이들 사이의 표면 항원의 구분이 명확하지 않다[29,30]. 또한 항체를 이용한 확인에서도 상반된 결과를 보이는 경우들이 있는 데 Zuk 등[10]의 연구에서 분리된 기질세포에서는 조혈계 표면 항원인 CD34의 비율이 매우 낮았다. Planat-Benard 등[31]은 CD34의 비율을 90% 이상이라고 보고했으며 Miranville 등[32]은 부위별로 조금씩 다르지만 약 30-60% 이상 차이하였다고 보고하였다. 이는 순수한 지방줄기세포를 분리하는데 있어 기술적인 어려움이 존재하며 표면항원 분석은 단지 줄기세포의 기원을 확인해 주는 것에 지나지 않음을 뜻한다. 그러나 본 연구에서는 밀도차등 원심분리를 이용하여 얻어진 SVF의 표면항원 분석을 시행하지 않았으므로 지방조직별, 분획별 차이를 규명하는 데 한계가 있으므로 이를 보완하기 위한 향후 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

8주령 수컷 SD rat으로부터 채취한 지방조직은 SAT가 50% 이상을 차지하였고, EAT, MAT, RAT 순이었다. 그러나 각 지방조직으로부터 추출한 SVF의 세포수는 MAT에서 가장 많았으며, 그 다음이 EAT, SAT, RAT 순인 것으로 보아 지방량과 SVF의 세포수가 비례하는 것이 아님을 알 수 있었다. 특히, 50% 이상을 차지했던 SAT의 경우 SVF의 세포수가 적다는 것은 SAT 안에 성숙한 지방세포가 많음을 의미하며 반대로 MAT는 조직량이 적은 만큼 성숙한 지방세포도 적었기 때문에 SVF의 세포수가 많았던 것으로 보인다.

한편, Nycodenz를 이용한 밀도차등 원심분리로 확보된 SVF는 4부위 지방조직에서 모두 3번째 분획이 가장 많았다. 그러나 지방세포로의 분화가 가장 잘 되는 분획은 어떤 부위의 지방조직이나에 따라 다르지만 첫 번째 또는 두 번째 분획에서 분화가 가장 잘 이루어졌다. 즉, 분화가 가장 잘 이루어진 분획은 지방세포로 분화할 수 있는 줄기세포를 가장 homogeneous하게 가지고 있으며, 밀도차등 원심분리를 통해 가장 많은 세포가 모였던 세 번째 분획은 지방줄기세포로서의 heterogeneous함을 의미한다. Density gradient인 percoll을 이용하여 rat의 inguinal tissue의 SVF를 분리한 연구에서도 첫 번째(1.018-1.033), 두 번째(1.033-1.049) 분획이 homogeneous하며, 세 번째(1.049-1.062) 분획은 형태상으로도 heterogeneous하다고 보고하였다[33]. 또한 분획을 나누지 않은 SVF와 비교했을 때 분획을 나누는 SVF의 분화 결과를 비교해보면 첫 번째 또는 두 번째 분획이 분획을 나누지 않은 SVF보다 분화 효율이 우수하였다. 따라서 밀도차등 원심분리가 지방조직으로부터 줄기세포를 수득하는 데 있어 보다

순도가 높은 SVF를 얻을 수 있게 해준다는 것을 증명하였다.

지방조직에 따라 분화율을 비교해보면 R-SVF가 가장 분화가 잘 되었고 그 다음이 S-SVF였으며, E-SVF는 상대적으로 분화율이 떨어지고 M-SVF는 분화가 거의 이루어지지 않았다. MAT로부터 분리한 SVF의 세포수가 가장 많았던 점을 고려하면 MAT에는 줄기세포보다는 내피세포, 섬유아세포 등과 같은 다른 세포들을 더 많이 가지고 있음을 추측할 수 있다. 반면 가장 세포수가 적었던 RAT는 분화 효율이 가장 좋았던 점을 미루어 ASCs가 많으며, SAT도 마찬가지로 다른 조직에 비해 ASCs가 많다는 것을 알 수 있다.

최근에는 ASC를 지방세포뿐만 아니라 근육세포, 연골세포, 골세포, 신경세포 등으로 분화를 시키는 연구들이 이루어지고 있다[10, 11, 34, 35]. 본 연구는 지방세포로의 분화효율이 우수한 분획을 찾았으나 다른 세포로의 분화에 대한 시도는 이루어지지 않은 제한점이 있다. 향후 지방조직으로부터 분리한 SVF의 밀도차등 원심분리를 통해 얻은 각 분획을 지방세포로의 분화뿐만 아니라 골세포, 연골세포, 근육세포로의 분화를 유도하여 분화 효율이 높은 분획을 찾고자 하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

배경: 지방조직은 골수 유래의 중간엽 줄기세포와 같은 다분화 능력을 가진 성체줄기세포를 포함한다. 지방조직으로부터 추출한 지방 유래 줄기세포가 다양한 분화 유도를 통해 지방세포, 골세포, 근육 세포로 분화할 수 있음이 밝혀졌다. 본 연구에서는 지방조직으로부터 얻은 기질세포에서 지방세포로의 탁월한 분화능력을 가지고 있는 순수한 지방유래 줄기세포를 추출해 낼 수 있는 지 알아보았다.

방법: 수컷 Sprague-Dawley 쥐(n = 15)의 4부위 지방조직(피하 지방, 부고환 지방, 장간막 지방, 후복막 지방)에서 불필요한 조직을 제거한 나머지 기질세포만을 얻는다. Nycodenz를 이용하여 기질세포를 밀도차등 원심분리하여 4개의 분획을 얻어 각각을 배양시킨다. 포화 상태에 이른 지방줄기세포를 지방세포로 분화를 유도하여 세포 내 지방 축적 여부를 염색을 통해 확인한다.

결과: 밀도차등 원심분리로 지방조직 기질세포는 4개의 분획(Fx-1, Fx-2, Fx-3, Fx-4)으로 나뉘었으며, 4부위 지방조직 모두 세 번째 분획(Fx-3)의 세포 수가 가장 많았다. 그러나 지방세포로의 분화는 4부위 지방조직 모두 두 번째 분획(Fx-2)에서 탁월했으며 분획을 나누지 않은 것(control)과 비교했을 때 더 나은 분화 능력을 보였다. 지방으로 분화가 가장 잘 되는 지방 조직은 retroperitoneal fat tissue였으며 그 다음이 subcutaneous fat tissue였고, epididymal fat tissue는 상대적으로 분화율이 떨어지는 것을 관찰하였다. Mesenteric fat tissue는 분화가 거의 되지 않았다.

결론: 지방조직별, 밀도별로 지방조직 기질세포를 나누어 분리함으로써 지방조직으로의 분화 능력이 우수한 지방줄기세포를 찾을

수 있었다. 향후 지방줄기세포를 이용한 연구 및 활용에 있어서 지방조직별, 분획별 기질세포의 이용으로 일관된 결과를 얻는 데 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. Jun YJ: Recent Development trend and prospects of adipose-derived stem cells on nerve regeneration. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society 5:51-56, 2008
2. Yang YI, Kim HI, Seo JY, Choi MY: Adult stem cells as cell therapeutics for angiogenesis. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society 4:484-489, 2007
3. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530, 1998
4. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG: Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 97:561-570, 1997
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999
6. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74, 1997
7. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370, 2000
8. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49, 2002
9. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174:101-109, 2003
10. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295, 2002
11. 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* 7:211-228, 2001
12. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH: Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132-141, 2005
13. Grégoire F, Todoroff G, Hauser N, Remacle C: The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipogenesis of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell* 69:215-222, 1990
14. Alpin G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF: Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* 20:494-514, 1994
15. Innes GK, Fuller BJ, Hobbs KE: Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation. *Cryobiology* 25:23-30, 1988
16. Munthe-Kaas AC, Seglen PO: The use of Metrizamide as a gradient medium for isopycnic separation of rat liver cells. *FEBS Lett* 43:252-256, 1974
17. Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S, Shafritz DA: Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7356-7361, 1997
18. Rickwood D, Ford T, Graham J: Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium. *Anal Biochem* 123:23-31, 1982
19. Ford TC, Rickwood D: Formation of isotonic Nycodenz gradients for cell separations. *Anal Biochem* 124:293-298, 1982
20. Rodbell M: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239:375-380, 1964
21. Rodbell M: Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem* 241:130-139, 1966
22. Rodbell M, Jones AB: Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem* 241:140-142, 1966
23. Rodbell M: The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem* 241:3909-3917, 1966
24. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317, 2006
25. Kolf CM, Cho E, Tuan RS: Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9:204, 2007
26. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM: Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63, 2001
27. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM: Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24:376-385, 2006
28. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC: Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23:412-423, 2005
29. Yañez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24:2582-2591, 2006
30. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, Hilkens CM, Collin MP: Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 179:1595-1604, 2007
31. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L: Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656-663, 2004
32. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A: Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110:349-355, 2004
33. Gaben-Cogneville AM, Aron Y, Idriss G, Jahchan T, Pello JY, Swierczewski E: Differentiation under the control of insulin of rat preadipocytes in

- primary culture. Isolation of homogeneous cellular fractions by gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 762:437-444, 1983
34. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE: Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294:371-379, 2002
35. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH: In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111:1922-1931, 2003