



자기 활성 세포 분리법과 군체 분리법으로 분리된 건 줄기세포의 자가 재생 능력 및 분화능 효율 비교

이모세^{*,a}, 최유림^{*,†,a}, 윤동석^{*,†}, 이진우^{*,†}, 윤길성^{*}, 최우진^{*}, 한승환^{*}

^{*}연세대학교 의과대학 정형외과학교실, [†]연세대학교 BK21 플러스 의학사업단

Comparison of Efficiency of Self-renewal and Differentiation Potential in Tendon-derived Mesenchymal Stem Cells Isolated by Magnetic- activated Cell Sorting Method or Colony Picking Method

Moses Lee^{*,a}, Yoorim Choi^{*,†,a}, Dong Suk Yoon^{*,†}, Jin Woo Lee^{*,†}, Gil Sung Yoon^{*},
Woo Jin Choi^{*}, Seung Hwan Han^{*}

^{*}Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine,

[†]Brain Korea 21 PLUS Project for Medical Science, Yonsei University, Seoul, Korea

Purpose: The purpose of this study is to evaluate the efficacy of mesenchymal stem cell (MSC) isolation by the magnetic-activated cell sorting (MACS) method in tendon tissue-derived cells compared to the colony picking method for isolation of MSCs by picking colony-forming cells.

Materials and Methods: Human tendon-derived cells were isolated by enzyme digestion using normal tendon tissues from three donors. We used the magnetic kit and well-known MSC markers (CD90 or CD105) to isolate MSCs in tendon-derived cells using MACS. Cloning cylinders were used to isolate colony-forming cells having MSC characteristics in tendon-derived cells. Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay was used to evaluate the self-renewal capacity of cells isolated using the colony picking method or MACS. For comparison of differentiation potentials into osteogenic or adipogenic lineage between two groups, alizarin red S and oil red O staining were performed at 14 days after induction of differentiation in vitro.

Results: Flow cytometry results showed that early passage tendon-derived cells expressed CD44 in 99.13%, CD90 in 56.51%, and CD105 in 86.19%. In the CFU-F assay, CD90+ or CD105+ cells isolated with MACS showed larger colony formation in size than cells isolated using the colony picking method. We also observed that CD90+ or CD105+ cells were constantly differentiated into both osteogenic and adipogenic lineages in cells from all donors, whereas cells isolated using the colony picking method were heterogeneous in differentiation potentials to the osteogenic and adipogenic lineages.

Conclusion: CD90+ or CD105+ cells isolated using MACS showed superior MSC characteristics in the self-renewal and multi-differentiation capacities compared with cells isolated using the colony picking method.

Key Words: Tendons, Mesenchymal stem cells, Magnetic-activated cell sorting, Colony picking method

Received June 30, 2014 Revised August 13, 2014 Accepted August 13, 2014

Corresponding Author: Seung Hwan Han

Department of Orthopaedic Surgery, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea
Tel: 82-2-2019-3416, Fax: 82-2-573-5393, E-mail: OSMEDIC@yuhs.ac

^aThese authors contributed equally to this study.

Financial support: This study was supported by the grant from Yonsei University College of Medicine (6-2013-0103).

Conflict of interest: None.

Copyright ©2014 Korean Foot and Ankle Society. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

건(tendon)은 근육을 뼈에 부착시키는 조직으로써 강한 장력에 견디도록 인대와 매우 비슷한 구조로 되어있으며 뛰어난 유연성을 지닌 조직이다. 이러한 건의 부상은 외상 또는 직업병으로 인한 과민한 운동에 의하여 과도한 긴장, 건인이 가해져서 발생하게 되는데, 다른 조직과 달리 치유가 매우 느리기 때문에 그 문제가 심각하다.¹⁻³⁾ 건의 치료를 위해 건에 소량으로 존재하는 건세포를 이용하려 하지만, 건세포는 초기 계대 배양 기간에도 건세포 형질(phenotype)을 소실하기 쉽다는 배양 특성으로 인해 연구가 제한적이었다.⁴⁾ 이를 극복하기 위해 최근 10여 년 전부터 줄기세포를 건 재생 공학에 적용하기 시작하였고, 그 중에서도 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 건 재생 연구가 활발히 진행되고 있으나^{5,6)} 건 부상을 가진 동물 모델에서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식하였을 때 건으로 재생되지 않고 이소성의 골 형성을 초래한 것을 발견하였다.⁷⁾ 그러던 중, Bi 등⁸⁾은 건에서도 줄기세포가 존재한다는 발견과 함께 건 조직에서 줄기세포의 분리 배양을 성공하였고, 이후 다양한 실험으로 건 줄기세포의 존재가 규명되었다. 최근 Tan 등⁹⁾은 건 줄기세포와 골수 유래 줄기세포에서 일반적인 줄기세포 특징을 비교하였고, 그 결과 골수 유래 줄기세포보다 건 줄기세포의 다분화능 및 자가 증식력이 훨씬 높은 것을 증명하였다. 특히 건 줄기세포는 건으로 분화할 수 있는 능력이 다른 줄기세포보다 높으며, 이를 이식하였을 때 이소성의 골 형성될 위험도 매우 적다.^{7,10)} 따라서 건 줄기세포만이 건 조직 재생에 가장 적합한 세포 원천이 될 수 있으며 현재 이를 이용한 건 조직 재생 공학과 건 줄기세포와 연관된 건증(tendinosis) 기전 연구 등이 활발히 진행되고 있다. 그러나 건은 대부분 세포 외 기질로 구성되어 있고, 건세포가 구성되는 비율이 매우 적은 조직의 특성 때문에 건 줄기세포만을 분리하는 방법이 아직까지 명확하게 제기되지 않았고, 때문에 임상에 적용하는 데 어려움을 겪고 있다.¹¹⁾ 최근 이를 극복하고자 Zhang과 Wang^{12,13)}은 건 조직에서 줄기세포만을 분리하는 방법으로, 일차 배양에서 형성된 세포 군체(colony)를 육안으로만 구분하고 이를 수집하여 배양하는 방법을 사용하였다. 하지만 세포 군체와 줄기세포를 육안으로만 구별하는 한계로 인해 분리 과정 중 일반 건세포의 오염이 가능하며, 다양한 분화 과정에 있는 줄기세포가 포함되어 일관된 줄기세포의 성질을 실험에 유지하기 어려운 문제점이 내포되어 왔다.⁸⁾ 최근 줄기세포 연구에서는 줄기세포에 특징적으로 나타나는 세포 표면 항원을 이용하여 골수, 제대혈, 지방 등 여러 조직에서 줄기세포만을 분리하고, 표면 항원 발현에 따른 줄기세포의 분화 단계와 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 소량의 건 조직으로부터 세포 표면 항원과 자기 활성화 세포 분리법(magnetic-activated cell sorting)을 이용하여 줄기세포를 건 조직으로부터 분리하는 방법을 확립하고자 하였고, 세포 표면 항원을 이용하여 분리한 방법과 군체 분리법(colony

picking method)을 줄기세포 특성에 따라 비교 분석하였다. 이를 통해 세포 표면 항원을 이용한 자기 활성화 세포 분리법이 줄기세포 특성인 자가 재생 및 다분화능 측면에서 더 효율적인 건 줄기세포 분리법임을 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 건으로부터 유래한 세포의 일차 배양

건 이진술 및 기타 자가 건을 이용한 수술에서 수술적 조작 후 폐기 예정인 정상 건 조직 일부(장 족지 굴곡건, 장 족무지 굴곡건)를 이용하였으며, 강남세브란스병원 연구심의위원회(Institutional Review Board) 승인 및 3명의 환자 동의하에 실험을 실시하였다. 먼저, 정상 건 조직을 1 mm 이하로 절단한 후 0.3% collagenase type I (Gibco Life Technologies, Seoul, Korea)과 4 mg/mL dispase I (Roche, Penzberg, Germany)을 사용하여 2시간 동안 37°C에서 배양하여 분해시킨다. 이후 분해된 용액을 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 10% 우태 혈청(fetal bovine serum), 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 Dulbecco's modified Eagles medium-low glucose (DMEM-LG) 배양액을 이용하여 부유한 후, 10 cm² 배양 용기에 깔아 7일간 배양하였다.

2. 군체 분리법

건 조직으로부터 일차 배양된 세포가 70%~80% 정도 차면 0.05% trypsin/EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 처리한 후 10 cm² 배양 용기에 100개를 세어 깔아준 다음, 20% 우태 혈청이 포함된 DMEM-LG 배양액으로 군체가 형성될 때까지 14일간 배양한다. 이후, 0.5% trypsin/EDTA와 클로닝 실린더(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용해 세포 하나에서 유래된 군체를 분리하여 각각을 따로 6 well 배양액에 키운다.

3. 자기 활성화 세포 분리법

건 조직으로부터 분리 배양된 세포를 0.05% trypsin/EDTA로 처리한 후 원심 분리하여 상층액을 제거하고, round-bottom 튜브에 DMEM-LG 배양액 100 μ L로 부유한다. 이후, EasySep magnetic kit (StemCell Technologies, Cologne, Germany)를 이용하여 세포를 분리하였다. 먼저, 종 특이적인 FcR blocking antibody (StemCell Technologies)를 100 μ L/mL 첨가한 후, 각각 분리하고자 하는 세포 표면 항체인 PE-anti-CD44 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA), FITC-anti-CD90 (Miltenyi Biotec Inc.), APC-anti-CD105 (Miltenyi Biotec Inc.)를 2 μ L씩 넣고 15분 기다린다. 15분 뒤, 각각의 형광에 따라 EasySep selection cocktail (StemCell Technologies)을 100 μ L/mL 넣고 15분 기다린다. 이후, nanoparticles (StemCell Technologies)를 10 μ L/mL 넣고 10분간 기다린다. 10분 뒤 2.5 mL가 되도록 배양액을 첨가한 후, EasySep magnet (StemCell Tech-

nologies)에 올려놓고 5분간 기다린 뒤 씻어놓은 상태에서 배양액을 버린다. 그 다음으로 세포가 남아있는 튜브에 새 배양액을 넣어 부유한 후, 10 cm² 배양 용기에서 배양한다.

4. Flow cytometry

분리된 세포를 확인하기 위해 fluorescence-activated cell sorting (FACS)을 시행하였다. 건 조직으로부터 분리 배양된 세포를 0.05% trypsin/EDTA로 처리한 후 각각 1×10^4 씩 분주하고, FACS buffer (1% 우태 혈청과 0.05% sodium azide가 포함된 phosphate-buffered saline [PBS])로 부유한 다음 PE-anti-CD44 (Miltenyi Biotec Inc.), FITC-anti-CD90 (Miltenyi Biotec Inc.), APC-anti-CD105 (Miltenyi Biotec Inc.)를 2 μ L씩 넣어 30분간 4°C에서 염색하였다. 이후, 염색된 세포를 FACS buffer 500 μ L에 부유하여 FACS analysis (BD FACSverse flow cytometer; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 수행하였고, BD FACSuite software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

5. Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay

세포 1×10^3 을 10 cm² 배양 용기에 갈아준 다음, 20% 우태 혈청이 포함된 DMEM-LG 배양액으로 12일간 배양한다. 12일 후, 세포 군체가 형성되면 PBS로 세척한 다음 메탄올과 아세톤을 2:3으

로 섞은 고정액으로 고정시킨 후, 20% crystal violet (Merck, Darmstadt, Germany)으로 10분간 염색한다. 염색된 세포 군체의 개수는 크기가 2.5 mm 이상인 것을 선별하여 분석하였다.¹⁵⁾

6. 골아세포 및 지방세포로의 분화유도

골아세포 분화를 위해 분리 배양된 건 줄기세포를 3~4세대 배양시킨 후, 6 well 배양 용기에 계대 배양하여 골아세포 분화배지 (10% 우태 혈청, 1 M β -glycerophosphate, 1 mM dexamethasone and 50 mg ascorbic acid [Sigma])가 포함된 DMEM-LG 배양액)로 배양하였다. 골아세포로 유도되었는지 확인하기 위해, 7일 후 alkaline phosphatase (ALP) 염색을 수행하였고, 14일 후에 alizarin red S 염색을 수행하였다. ALP 염색을 하기 위해 PBS로 세척한 후 citrate working solution과 acetone을 2:3 비율로 섞은 고정 용액으로 1분 30초간 고정한 다음, diazonium salt 용액(Sigma)에 naphthol AS-MX phosphate alkaline 용액(Sigma)을 넣은 alkaline 염색 혼합물로 30분간 반응시킨다. 이후, Hematoxylin (Sigma)으로 5분간 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. Alizarin red S 염색을 하기 위해 70% 에탄올로 30분간 고정한 후, 2% alizarin red S solution (pH 4.1; Sigma)으로 30분간 염색한다. 이를 정량하기 위해 10% cetylpyridinium chloride (Sigma)로 탈염색 후, 595 nm의 흡광도에서 측정하였다. 지방세포 분화를 위해 지방세포분화배지(10%

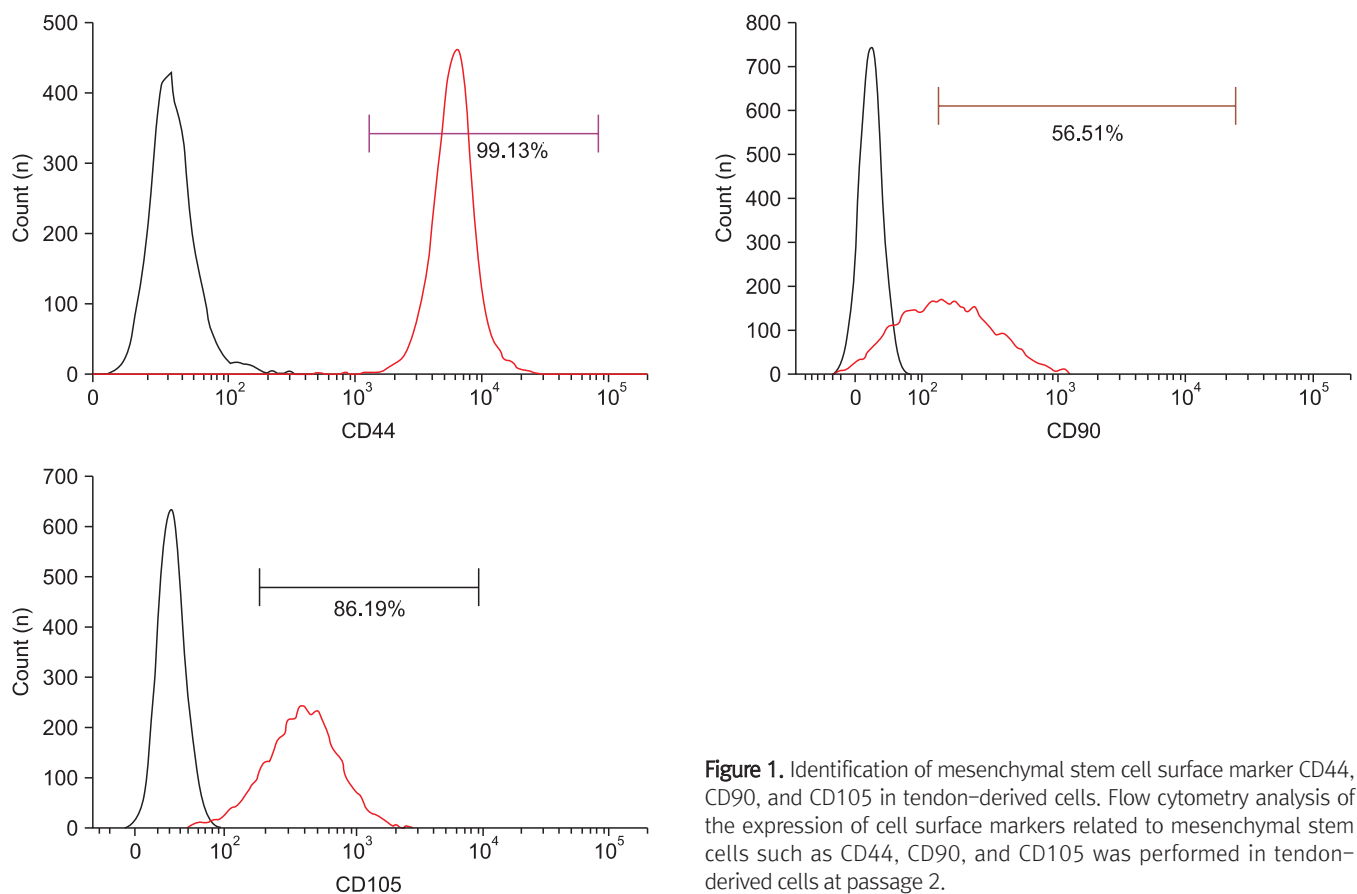


Figure 1. Identification of mesenchymal stem cell surface marker CD44, CD90, and CD105 in tendon-derived cells. Flow cytometry analysis of the expression of cell surface markers related to mesenchymal stem cells such as CD44, CD90, and CD105 was performed in tendon-derived cells at passage 2.

FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine [Sigma], 1 μ M dexamethasone, 5 μ M insulin and 200 μ M indomethacin [Sigma]을 포함한 DMEM-LG 배양액)를 넣어 14일간 배양한다. 14일 후, 지방 소립을 확인하기 위해 oil red O 염색을 수행하였다. 먼저 PBS로 세척한 후 3.7% 포르말데히드(Duksan, Ansan, Korea)를 넣고 30분간 고정한다. 30분 뒤, 0.18% oil red O (Sigma)를 넣고 30분간 염색한다. 이를 정량하기 위해 아이소프로판올(Duksan)로 30분간 탈

염색 후, 흡광도를 500 nm에서 측정하였다.

결 과

1. 초기 계대의 건 유래의 세포에서 줄기세포의 표면 항원 분포도

건 조직에서 일차 분리 배양된 세포에서 세포 표면 항원을 이용

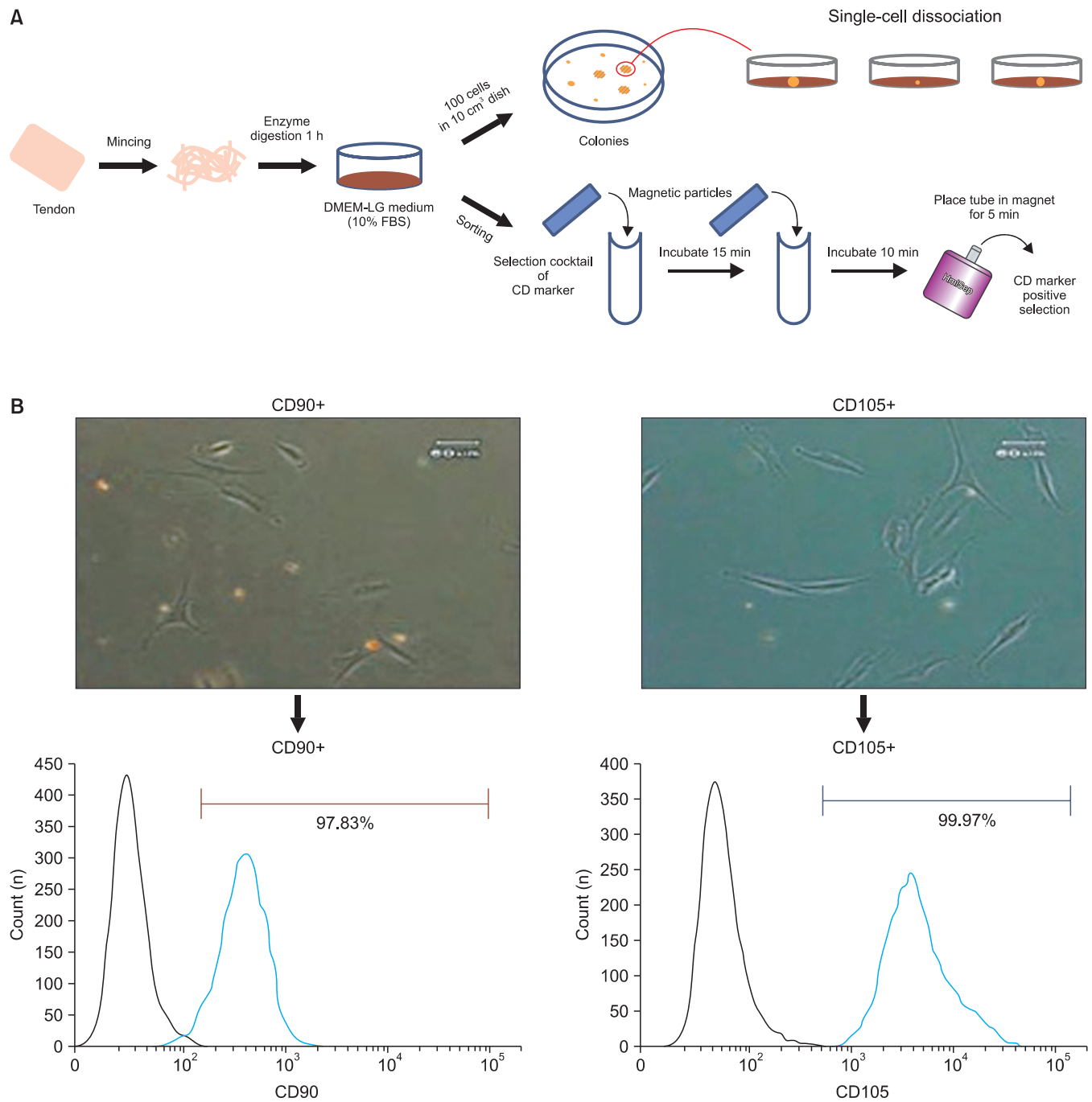


Figure 2. Isolation methods for tendon-derived mesenchymal stem cells. (A) The cell colonies were dissociated by cloning cylinder and each colony was cultured in growth medium (upper). The isolation method using mesenchymal stem cell surface markers CD90 and CD105 was performed by magnetic kit (bottom). (B) The cells isolated by magnetic-activated cell sorting using CD90 and CD105 were analyzed by flow cytometry.

하여 줄기세포만을 분리하기 위해 중간엽 줄기세포 표면 항원을 조사하였고, 이를 바탕으로 초기 passage에서 건 줄기세포를 분리하기 위해 일반적인 중간엽 줄기세포 표면 항원인 CD44, CD90, CD105를 이용하여 flow cytometry를 통해 분포를 분석하였다.^{16,17)} 그 결과, CD44는 초기에도 99% 이상 발현하고 있었으나 CD90은 평균 56% 정도 존재하였고, CD105는 86%가 존재하였다(Fig. 1). 이 결과를 통해 CD44만으로는 초기 passage에서 줄기세포만을 분리할 수 없다는 결과를 얻었고 이후, 중간엽 줄기세포 표면 항원으로 CD90과 CD105만을 이용하였다.

2. 건 줄기세포 분리 방법

건으로부터 줄기세포를 분리하기 위한 방법으로 기존에 사용되었던 군체 분리법과 줄기세포 항원을 이용한 면역 자기 세포 분리법을 비교하기 위해, 먼저 세포를 분리하는 방법을 간략한 모식으로 표현하였다(Fig. 2A). CD90 또는 CD105를 이용한 면역 자기 세포 분리법으로 분리된 세포가 실제로 잘 분리되었는지 확인하기 위해, 분리된 세포를 다시 flow cytometry를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 면역 자기 세포 분리법으로 분리된 CD90+ 세포는 97.83%였고, CD105+ 세포는 99.97%인 것으로 나타났다(Fig. 2B).

3. 군체 형성 능력(colony forming capacity) 비교

줄기세포의 특징 중 하나인 자가 재생 능력을 비교하기 위해 CFU-F 분석을 수행하였다. 군체의 크기와 밀도는 군체의 증식력에서 큰 차이를 보이는데, 크기가 작은 군체는 낮은 증식력을 나타내고 크기가 큰 군체는 높은 증식력을 나타낸다. Gothard 등¹⁵⁾은 골수 유래 중간엽 줄기세포의 군체 간 증식력을 비교하기 위해 직경 2.5 mm를 기준으로 군체를 크기에 따라 분류하였고, 세포 수가 높아 세포 간 접촉이 많은 군체와 적은 군체를 구분하여 밀도에 따라 분류하였다. CFU-F assay 결과, 전체 군체 수에서 큰 차이는 없었으나 직경이 2.5 mm 이상인 세포 군체는 CD90과 CD105를 이용한 면역 자기 분리법으로 분리된 세포에서 15% 이상이었고, 반면에 군체 분리법으로 분리된 세포에서는 5% 미만이었으며 군체마다 차이가 있었다(Figs. 3, 4). 이러한 결과를 통해 세포 표면 항원을 이용한 면역 자기 분리법이 군체 분리법보다 군체 형성 효율과

증식력이 더 높은 것으로 나타났다.

4. 골아세포 분화능 비교

각 분리법을 이용하여 분리된 세포의 골아세포 분화능을 비교하기 위해 골아세포 분화배지로 배양하여 7일 후, ALP를 염색하였다. 그 결과, CD90, CD105로 분리된 세포에서 ALP activity가 매우 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 이후, 14일째 미네랄화 정도를 비교하기 위해 alizarin red S 염색을 수행하였다(Fig. 5B). 이를 정량한 결과, 군체 분리법으로 분리된 세포에서 optical density (OD) 값이 각각 0.03, 0.13, 0.01이었고, CD90으로 분리된 세포에서는 0.42, CD105로 분리된 세포에서는 0.35의 값을 얻었다. 즉, 군체 분리법으로 분리된 세포와 비교하였을 때, CD90 또는 CD105로 분리된 세포에서 2배 이상 증가한 것을 확인하였고, 군체 간에는 골아세포 분화능이 차이가 다양한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5C).

5. 지방세포 분화능 비교

지방세포 분화능을 비교하기 위해, 14일 동안 지방세포 분화배지를 사용하여 분화를 유도한 후, 지방 소립 형성을 확인하기 위해 oil red O 염색을 수행하였다(Fig. 6A). 그 결과, 군체 분리법으로 분리된 세포보다 CD90과 CD105로 분리된 세포에서 더 많은 지방

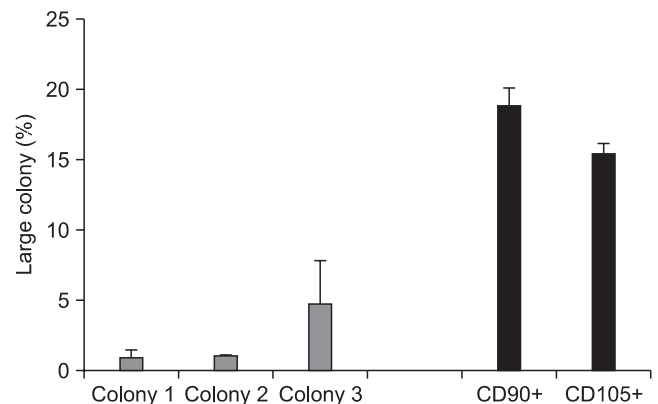


Figure 4. Quantification of colony-forming units. The number of large colonies was counted and the percentage of large colonies was measured.

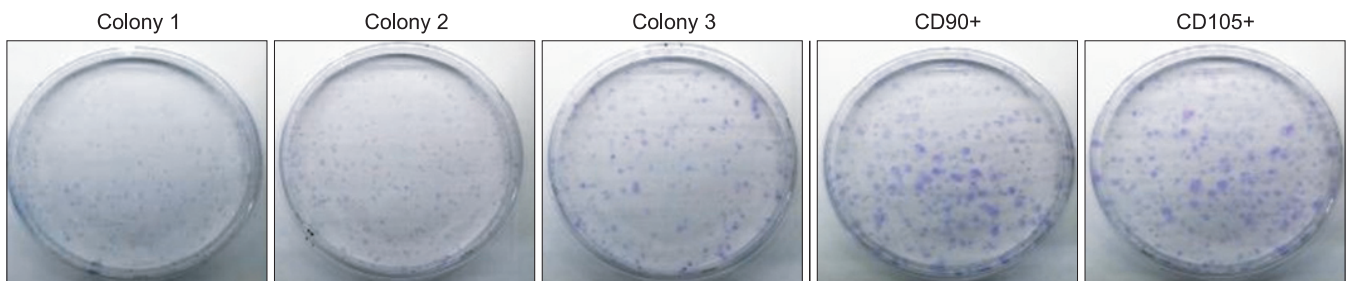


Figure 3. Colony forming capacity. Total colonies were stained with crystal violet at 12 days.

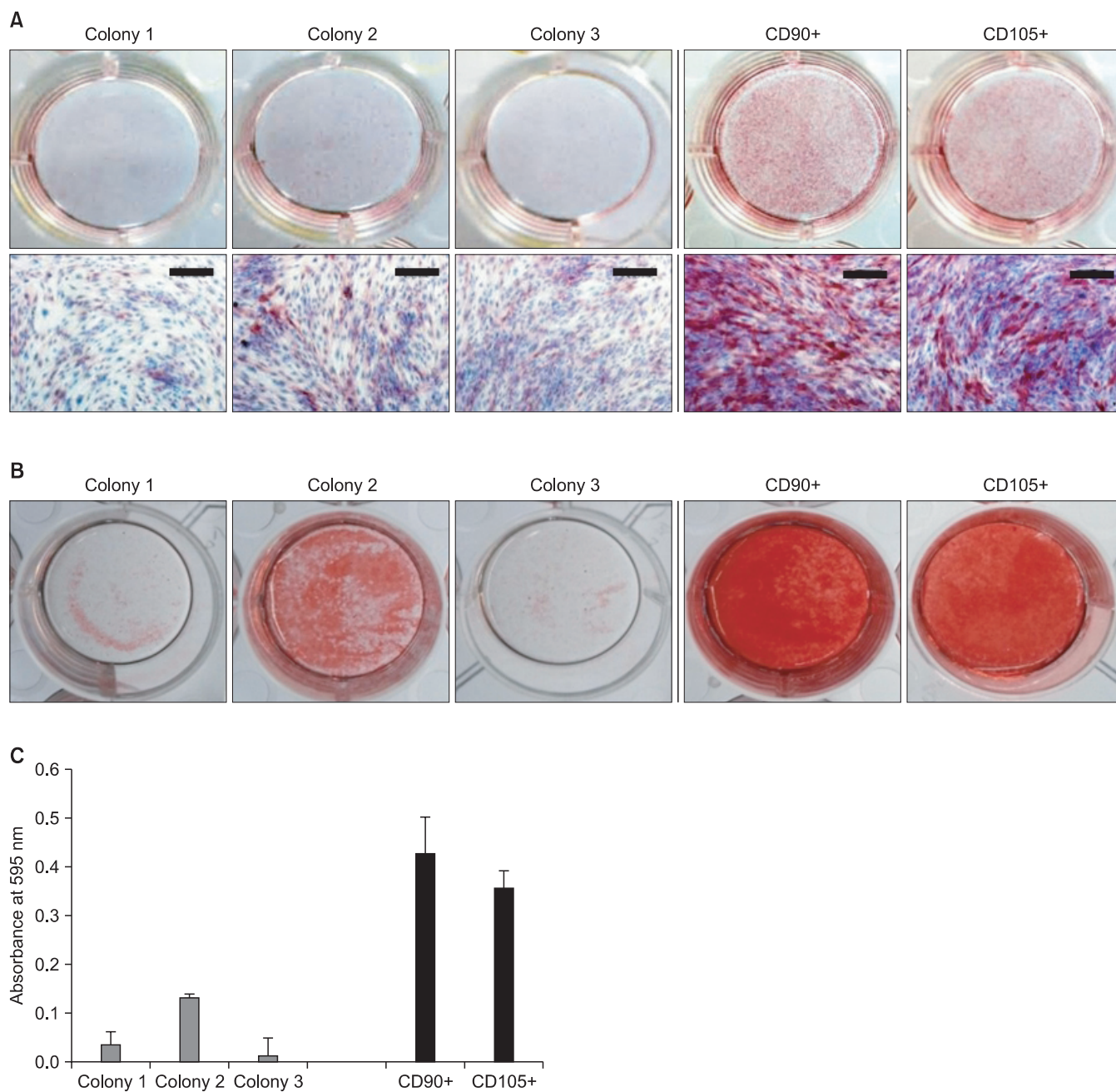


Figure 5. Osteogenic differentiation capacity. Each cell was seeded on 12-well plates and differentiated for 14 days. (A) The cells isolated by each method were determined by alkaline phosphatase staining at 7 days. Scale bars=200 μ m. (B) After induction of osteogenic differentiation for 14 days, alizarin red S staining was performed. (C) Absorbance at 595 nm was measured with a spectrophotometer for quantitative analysis of the stained mineralized nodules.

소립을 발견하였고 이를 정량화하였을 때, 군체 분리법으로 분리된 세포에서 OD값이 평균 0.19로 나타났고 CD90으로 분리된 세포는 0.587, CD105로 분리된 세포는 0.585로 나타났으며, CD90 또는 CD105를 이용하여 분리된 세포와 군체 분리법으로 분리된 세포와 비교하였을 때 그 차이가 약 3배인 것으로 나타났다(Fig. 6B).

고 찰

기존 연구에서 중간엽 줄기세포가 다양한 세포로 분화될 수 있는 다분화능이 알려져 건과 관련된 질환의 치료 가능성이 보고되고 있으며 이를 이용한 많은 연구들이 진행되고 있던 중, 건 줄기세포가 존재한다는 것이 밝혀지면서 건 조직 재생 공학에 이를 이용하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다.^{5,6,8)} 그러나 건은 대부분이 세포 외 기질로 구성되어 있으며, 세포 수가 매우 적고, 건세

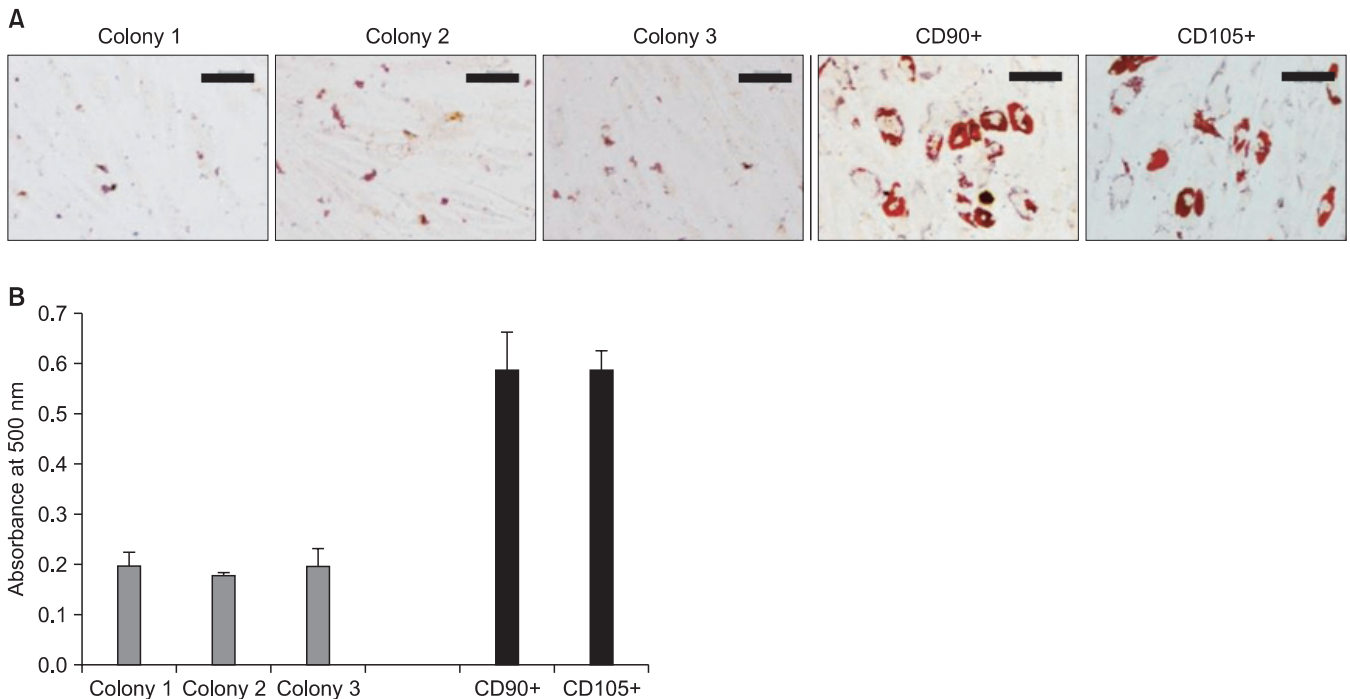


Figure 6. Adipogenic differentiation capacity. (A) After induction of adipogenic differentiation for 14 days, lipid droplets were detected by oil red O staining. Scale bars=200 μm. (B) For quantification of the stained lipid droplets, absorbance at 500 nm was measured with a spectrophotometer.

포가 섞여있어 건으로부터 줄기세포만을 얻는 데 어려움이 내포되어 왔다.¹¹⁾ 실제로, 건에서 세포를 일차 배양했을 때 특징적인 줄기세포 표면 항원을 가진 세포의 수는 절반 정도에 지나지 않았던 것을 확인하였다. 이를 극복하고자 최근 줄기세포의 특성인 군체 형성 능력을 이용한 방법으로 군체가 형성되었을 때 이것만을 분리하여 건 줄기세포를 분리해낸 방법이 제시되었으나^{12,13)} 수취율이 적고, 분리과정 중 건세포의 오염에 대한 문제점들이 제기되었다. 따라서 본 연구에서 건 줄기세포만을 얻기 위해 잘 알려진 줄기세포 표면 항원을 이용하여 분리해내는 방법을 고안해 냈고, 실험을 진행하였다. 기존에 제시되었던 군체 형성을 통해 건 줄기세포를 분리해내는 방법과 비교한 결과, 줄기세포 표면 항원인 CD90 또는 CD105로 분리된 세포에서 자가 재생이 높은 것을 관찰하였다. 또한 다분화능을 관찰하기 위해 골아세포와 지방세포로 분화를 유도하여 두 방법을 비교해 보았다. 골아세포로 분화를 유도하였을 때 군체 형성 방법으로 분리된 세포는 골아세포로의 분화 정도가 매우 다양하였는데, 분화가 유도되지 않은 군체도 발견되었다. 반면, 줄기세포 표면 항원을 이용하여 분리된 세포에서는 모두 골아세포로 분화가 유도된 것을 ALP와 alizarin red S 염색으로 확인하였다. 지방세포로 분화를 유도한 후 14일째 oil red O 염색을 수행하였을 때, 군체 분리 방법으로 분리된 세포에서는 지방 소립이 거의 관찰되지 않았지만 CD90 또는 CD105를 이용하여 세포를 분리한 그룹에서는 많은 지방 소립이 관찰되었다. 군체 형성 방법으로 세포를 분리하였을 때 초기에 얻을 수 있는 세포 수가 제한적이었으며 분화능이 거의 없는 세포들이 나타난 것으로 보아 기존의 군

체 분리 방법으로 분리하면 줄기세포뿐만 아니라 분화능을 가지지 않는 섬유아세포(fibroblast) 등이 섞여 분리되는 것으로 관찰되었다. 그에 반해 건으로부터 분리된 세포를 초기에 세포 표면 항원을 이용하여 분리해 내면 초기에 더 많은 수취율을 얻을 수 있었으며, 자가 형성 능력과 분화능이 더 높은 세포를 얻을 수 있었다. 자기 활성 세포 분리법으로 세포를 분리할 때 특징적인 줄기세포 표면 항원인 CD44와 CD90, CD105를 이용하였으나 건으로부터 분리된 세포의 초기 passage에서 그 분포도를 비교해 보았을 때 CD44는 99% 이상 존재하는 것으로 나타났다. CD44는 세포와 세포 간 상호작용, 세포의 부착과 이동에 관여하는 세포 표면 항원으로 잘 알려져 있고, 섬유아세포 역시 CD44를 포함하고 있어 줄기세포 특유의 세포 표면 항원이라고는 말하기 어렵다.^{18,19)} 따라서 CD90 또는 CD105를 이용한 자기 활성 세포 분리법을 통해 건 줄기세포를 분리하면 보다 많은 수취율과 자가 재생 및 분화 효율이 높은 줄기세포만을 분리할 수 있으며 이를 이용하여 건 재생 조직 공학 및 건 증기전에 관여하는 줄기세포 특성 연구에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

자기 활성 세포 분리법을 통해 줄기세포 표면 항원인 CD90 또는 CD105를 발현하는 세포를 분리하였을 때, 군체 분리법으로 분리된 세포보다 자가 재생 능력과 다분화능이 우수하였다. 이러한 결과를 통해 볼 때 CD90 또는 CD105를 이용한 자기 활성 세포 분

리법은 우수한 군체 형성능력과 다분화능을 가지는 건 줄기세포를 분리할 수 있는 효율적인 방법일 것이다.

REFERENCES

1. Butler DL, Juncosa N, Dressler MR. Functional efficacy of tendon repair processes. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:303-29.
2. Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:508-21.
3. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43:131-42.
4. Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue Eng.* 2006;12:1843-9.
5. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res.* 2003;21:420-31.
6. Chen X, Song XH, Yin Z, Zou XH, Wang LL, Hu H, et al. Stepwise differentiation of human embryonic stem cells promotes tendon regeneration by secreting fetal tendon matrix and differentiation factors. *Stem Cells.* 2009;27:1276-87.
7. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ. Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *J Orthop Res.* 2004;22:998-1003.
8. Bi Y, Ehrichtiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.* 2007;13:1219-27.
9. Tan Q, Lui PP, Rui YF, Wong YM. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:840-51.
10. Zhang J, Li B, Wang JH. The role of engineered tendon matrix in the stemness of tendon stem cells in vitro and the promotion of tendon-like tissue formation in vivo. *Biomaterials.* 2011;32:6972-81.
11. Lui PP, Wong OT. Tendon stem cells: experimental and clinical perspectives in tendon and tendon-bone junction repair. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2012;2:163-8.
12. Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:10.
13. Zhang J, Wang JH. Human tendon stem cells better maintain their stemness in hypoxic culture conditions. *PLoS One.* 2013;8:e61424.
14. Bähring HJ, Battula VL, Tremel S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:262-71.
15. Gothard D, Dawson JJ, Oreffo RO. Assessing the potential of colony morphology for dissecting the CFU-F population from human bone marrow stromal cells. *Cell Tissue Res.* 2013;352:237-47.
16. Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev.* 2010;19:423-38.
17. Liu F, Akiyama Y, Tai S, Maruyama K, Kawaguchi Y, Muramatsu K, et al. Changes in the expression of CD106, osteogenic genes, and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Metab.* 2008;26:312-20.
18. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006;24:928-35.
19. Quintanilla RH Jr, Asprey JS, Vaz C, Tanavde V, Lakshminpathy U. CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming. *PLoS One.* 2014;9:e85419.