

양막을 이용한 각막 간질세포의 배양과 증배엽 줄기세포의 분화유도

박수현 · 전연숙 · 김재찬

중앙대학교 의과대학 안과학교실

목적: 생체 외 배양 조건에 따른 토끼 각막 간질세포의 특징을 분석하고, 각막 간질세포 조건배지를 이용한 증배엽 줄기세포의 간질세포로의 분화여부를 확인하고자 하였다.

대상과 방법: 토끼 각막 간질세포를 양막의 간질층과 배양접시에 각각 접종하여 증식시킨 후 형태학적 변화를 관찰하였다. 토끼 증배엽 줄기세포를 양막에 접종하여 α -MEM과 각막 간질세포 조건배지를 혼합하여 배양하였으며, 각막 간질세포 표지유전자(keratocan, lumican, aldehyde dehydrogenase family, member A1 (ALDH1A1))의 발현양상을 분석하였다.

결과: 양막에 배양된 간질세포는 수직상이었고 느린 증식속도를 나타낸 반면, 접시에서는 빨리 증식하였으며 방사상이었다. 양막에 배양한 경우 표지유전자 모두 발현이 잘 유지된 반면 접시에서는 점차 감소하였다. 또한, 증배엽 줄기세포를 양막에서 각막 간질세포 조건배지로 배양하면 keratocan과 ALDH1A1의 발현이 유도되었다.

결론: 각막 간질세포를 양막을 매개로 배양하면 그 형태와 표지유전자의 발현이 유지되었으며, 조건배지와 양막을 이용해 증배엽 줄기세포의 각막 간질세포로의 분화 가능성을 확인하였다.

〈대한안과학회지 2010;51(12):1652-1658〉

각막 간질세포는 *in vitro*에서 배양할 경우, *in vivo*상의 특징을 잃어버리고 섬유아세포로 분화된다고 알려져 있다.^{1,2} 이에 이들의 특징을 잃지 않도록 하는 다양한 배양법이 연구되어 왔고, 무혈청 배양액을 이용하거나 세포부착에 관련된 미세환경 조건을 바꾸어 주는 방법을 이용하여 간질세포의 세포형태 및 관련 유전자와 단백질의 발현을 유지할 수 있다는 결과가 보고 되었다.³⁻⁵

골수로부터 유래된 증배엽 줄기세포는 *in vitro*에서 다양한 세포의 형태로 분화되며, 골수, 뼈, 연골, 결합조직을 형성할 뿐만 아니라,⁶⁻⁸ 안구조직을 비롯한 다양한 조직으로의 교차분화할 수 있는 능력을 가진다.⁹ 또한 손상된 각막에 이식된 증배엽 줄기세포가 증식, 분화, 및 조혈 줄기세포의 합성을 통해 각막 상피 창상을 치유할 수 있다는 보고가 된 바 있으며,¹⁰⁻¹³ 줄기세포가 각막 상피의 재생의 근원이 될 수 있다는 가능성을 통해 줄기세포를 이용한 치료법에

대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.^{14,15}

따라서, 다양한 잠재적 분화능을 갖는 줄기세포가 간질세포로의 분화도 가능할 것으로 생각되며, 각막의 간질과 내피세포는 모두 신경능선(neural crest)에서 기원한 조직이고, 신경능선은 증배엽에서 기원하므로 이론적으로는 증배엽 줄기세포를 이용하여 각막 간질과 각막 내피세포로 분화시킬 수 있다고 생각된다.

본 연구에서는 양막에 포함된 TGF- β 가 정상 섬유아세포를 근섬유아세포로 분화되는 것을 막아주며,¹⁶ 각종 성장인자(epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor)들이 세포 배양에 많은 도움을 준다는 점에¹⁷ 착안하여 각막 간질세포를 양막 간질층에 배양한 경우와 배양접시에서 배양한 경우, 그 세포 특징 및 유전자 발현 정도를 비교하고자 하였다. 또한, 간질세포를 배양한 조건배지(keratocyte conditioned medium, KCM)에 이들이 분비한 다양한 사이토카인이나 성장인자가 포함되어 있을 것이라는 가설 하에, 이들이 분비한 요소들에 의해 증배엽 줄기세포의 각막 간질세포로의 분화가 유도되는지 확인하고자 하였다.

대상과 방법

1. 토끼의 각막 간질세포 및 증배엽 줄기세포의 준비

■ 접수 일: 2010년 5월 26일 ■ 심사통과일: 2010년 11월 3일

■ 책임저자 김재찬

서울시 용산구 한강로 3가 65-207
중앙대학교 부속 용산병원 안과
Tel: 02-748-9838, Fax: 02-792-6295
E-mail: jck50ey@kornet.net

* 본 논문의 요지는 2009년 대한안과학회 제102회 학술대회에서 포스터로 발표되었음.

* 본 연구는 보건복지가족부 보건료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A084721).

토끼의 각막 조직으로부터 포셉을 이용하여 각막 내피세포를 제거하고, 37°C에서 2시간 동안 1.2 U dispase II를 처리한 후, 수술용 칼을 이용하여 각막 상피세포를 분리했다. 상피세포를 분리해 낸 각막 조직을 작은 조각으로 잘라준 후, 2시간 동안 0.1% collagenase type I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 진탕 배양기에서 처리하였다. 조직의 간질층에서 세포가 빠져나올 수 있도록 피펫을 이용하여 강하게 현탁해 준 후, 70 µm 나일론 망을 이용하여 조직을 여과해 내고 원심분리를 통해 각막 간질세포만 분리해 내었다.

토끼에서 대퇴골을 적출하여 뼈의 양끝부분을 절단한 후, 실린지를 이용하여 phosphate buffered saline (PBS) 을 골강에 여러 번 통과시킴으로써 골수를 분리해내었다. 분리된 골수는 피펫을 이용하여 현탁해 주고 0.035% collagenase type I을 30분간 처리한 후, 70 µm 나일론 망을 이용하여 중배엽 줄기세포를 여과하여 분리하였다.

2. 배양 매개체인 양막 준비

냉동보호제에 넣어 동결한 인간양막(AmniSiteCornea (CA), Bioland, Korea)을 녹인 후, 5% 항생제(Penicillin/Streptomycin)가 섞인 PBS를 이용하여 양막을 소독한다. Trypsin/EDTA 와 versene을 1:1로 혼합한 용액을 양막의 상피층에 처리하고 37°C CO₂ 배양기에 30분간 넣어둔 후, 스크래퍼로 긁어서 양막의 상피세포를 제거한다. 다시 5% 항생제가 섞인 PBS를 이용하여 양막을 소독하고 세포 배양용 배지로 중화시켜 준 다음, 니트로셀룰로오스 종이에서 양막을 분리하여 간질층이 위를 향하게 하여 스테인리스 스틸 그물망 위에 위치시킨다.

3. 배양조건 및 조건배지 준비

분리된 1×10⁵개의 각막 간질세포를 200 µl의 F-배지(DMEM/F12 [1:1 혼합], 10% FBS, 10 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin medium)에 현탁하여 2.5×2.5 cm 크기의 양막 간질층에 고르게 접종한 후, 세포가 양막에 부착될 수 있도록 37°C CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양한다. 배양액으로 인하여 그물망에 위치시킨 양막이 부유하거나 모양이 흐트러지지 않도록 양막 위쪽에 다시 스테인리스 스틸 그물망을 덮어서 고정시킨 다음, 양막과 접촉된 세포가 모두 잠기도록 F-배지를 첨가하여 주고, 배지를 3일에 한 번 교체하며 15일간 액체배양을 시행한다. 동시에 분리된 각막 간질세포를 배양접시에도 접종하여 6일간 액체배양을 시행한다.

분리된 토끼의 중배엽 줄기세포는 α-MEM (10% FBS, 10 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin medium) 배지에서 초대배양하였으며, 계대배양 시에 간질세포로 유도하기 위한 실험군은 양막을 이용한 간질세포 배양과 동일한 방법으로 시행하였으며, 1×10⁵개의 세포를 접종하였다. 세포를 접종한지 24시간 후, 양막 위에 세포가 안정적으로 부착되고 나면 각막 간질세포를 배양했던 조건배지(KCM)를 전체 배양액의 10% 비율로 혼합(9:1)하여 준다. 이를 간격으로 배양액을 교환하여 주며, 배양액을 교환해줄 때마다 α-MEM 배지에 KCM의 농도를 점차 높여가며 첨가해주어 최종농도를 6:4 (α-MEM:KCM)로 맞추어 2주간 배양하였으며, 분화를 유도시키지 않은 대조군은 배양접시에서 α-MEM 배지로 배양하였다.

4. RT-PCR

각각의 조건에서 배양한 초대배양 세포들에 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 수확하고, TRI reagent (Molecular Research Center Inc.) 1 ml을 가하여 세포를 분해시킨다. TRI reagent 1 ml당 chloroform 200 µl를 가한 후 실온에서 5분간 방치하고, 이를 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 따낸다. 여기에 동일 부피의 isopropanol을 가한 뒤 실온에서 다시 10분간 방치한 후, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 RNA를 침전시킨다. 침전된 pellet을 확인하고 75% ethanol 1 ml을 넣고 pellet을 풀어 준다. 세척을 위해 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음, 상층액을 버리고 건조시킨 뒤, RNase free water 20 µl로 녹인다. 정량 후 cDNA kit (Takara)을 이용하여 reverse transcription 과정을 실시하였다. cDNA 합성 후 다시 각각 인자에 대한 primer (Table 1)를 이용하여 PCR을 수행하고, 이를 1% agarose gel에서 확인하였다.

결 과

1. 양막에서 키운 간질세포와 배양접시에서 키운 간질세포의 형태학적 차이

각각 간질세포를 각각 양막의 간질층과 배양접시에 배양하였을 때, 세포증식 속도에서 현저한 차이가 났다. 또한 각각의 세포를 현미경으로 관찰한 결과 서로 다른 세포형태를 나타냄을 확인할 수 있었다. 양막에서 키우는 경우 세포의 증식속도는 떨어졌으나 간질세포의 특징적인 형태인 수지상이 유지된 반면, 배양접시에서 키운 경우는 섬유아세포의 형태인 방사상을 보였으며 빠른 증식속도를 나타내었다.

Table 1. Sequence of RT-PCR primer

Genes	Primer sequence	Product size (bp)
Lumican		
Sense	5'-CTGCAGTGGCTCATTCAT-3'	576
Antisense	5'-GACCTCCAGGTAATAGTT-3'	
Keratocan		
Sense	5'-GAAACATGCCACCAAGACTG-3'	261
Antisense	5'-TGTGATCAAGGTGAAGGTGC-3'	
ALDH1A1		
Sense	5'-AATGCCGATGGATGGAGAC-3'	476
Antisense	5'-AACACTGGCCCTGATGGTAG-3'	
K3		
Sense	5'-CAGGAGCTCATGAACGTGAA-3'	535
Antisense	5'-GAGGAGCCAGTTGAGGACAG-3'	
K12		
Sense	5'-CACCGAGCGCCAGAACAT-3'	542
Antisense	5'-TCCAGGCCACCAGAAGAAAG-3'	
β-actin		
Sense	5'-GGACCTGACCGACTACCTCA-3'	180
Antisense	5'-GGCAGCTCGTAGCTCTTCTC-3'	

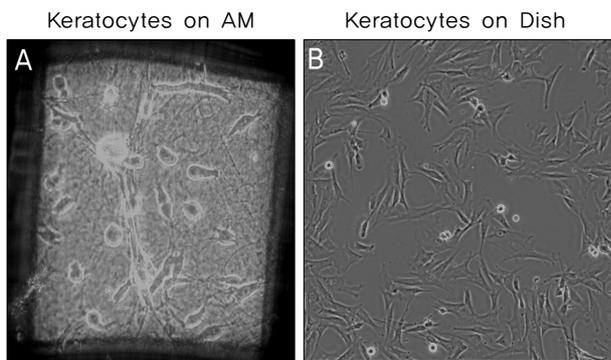


Figure 1. Morphologic difference between primary cells cultured on amniotic membrane (AM) or plastic dish. (A) Cells were dendritic when cultured on AM stroma. (B) In contrast, cells cultured on plastic were stellate shaped. Cells grew more rapidly on plastic than on AM. Times to confluence were compared. After reaching 40% confluence, the cells were observed. Cells on AM reached 40% confluence at 7 days after culture, but cells on dish at 2 days after culture. D7, 7 days of culture; D2, 2 days of culture. Magnification: ×200.

세포가 30~40%의 합류를 나타내는 데 필요한 배양기간은, 양막에서는 세포를 접종한 지 7일 정도였고, 배양접시에서는 접종 후 2일이었다. 계대 배양을 위해 세포가 90% 이상 증식하기까지 2.5×2.5 cm 크기의 양막에서는 15일이 소요되었으나, 10 cm 배양접시의 경우는 6일이었다(Fig. 1).

2. 배양방법에 따른 각막 간질세포의 유전자 발현양상

각막 간질세포를 양막에서 키운 경우는 각막 간질세포의 표지유전자로 알려져 있는 keratocan, lumican, ALDH1A1

의 발현이 잘 유지되었으나, 배양접시에서 키운 경우에는 이들의 발현이 감소하였다. 배양이 진행되는 동안 keratocan의 경우는 급격히 감소하였고, lumican과 ALDH1A1은 서서히 감소하는 양상을 나타냈다. 조직에서 분리된 간질세포가 다른 유형의 각막세포와 혼합되지 않고 배양된 것을 확인함과 동시에 표지 유전자가 간질세포에서 특징적으로 발현되는 것을 확인하기 위하여 비교군으로 각막 상피세포를 이용하여 각막 상피 표지 유전자도 함께 분석하였다(Fig. 2). 그 결과, 배양된 간질세포에서 상피세포 표지 유전자로 알려진 K3와 K12는 발현되지 않았으나 배양된 상피세포에서만 특징적으로 발현되었다. 또한 간질세포의 표지인자 중 lumican과 keratocan은 간질세포에서만 국한적으로 발현되었으나 ALDH1A1은 각막상피세포에서도 발현되는 것이 관찰되었다.

3. 각막 간질세포 배양배지를 이용하여 양막에서 배양한 중배엽 줄기세포의 형태

각막 간질세포가 분비한 인자들이 포함되어 있어 중배엽 줄기세포 분화에 영향을 미칠 것으로 기대되는, 간질세포를 양막의 간질층에서 배양한 조건배지(KCM)를 일반적으로 사용하는 중배엽 줄기세포 배양액인 α-MEM과 혼합하여, 중배엽 줄기세포를 배양하여 각막 간질세포로의 분화를 유도하였다. 변화된 배양환경에 세포가 서서히 적응할 수 있도록 조건배지의 비율을 서서히 높여 주며 진행하였고, 최종 농도는 6:4로 하였다. 일반적으로 조건배지를 1:1로 혼합하여 많이 이용하나,¹⁸⁻²⁰ 본 연구에서는 이와 같은 조건

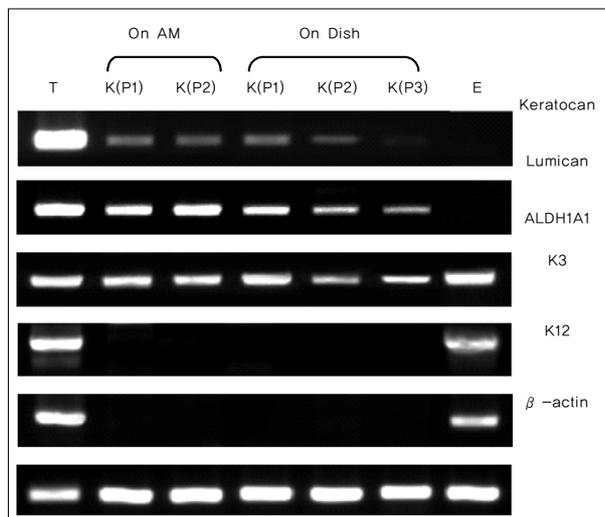


Figure 2. RT-PCR analysis of expression of specific marker transcripts in rabbit keratocytes. Compared with β -actin as a loading control, keratocyte marker transcripts was expressed in all AM cultures but keratocan was largely lost when subcultured on dish, lumican and ALDH transcripts was lost steadily in dish cultures. K3 and K12, cornea epithelium markers, were regarded as negative markers for keratocytes. Corneal epithelium cells were used to confirm the specificity of keratocytes markers. AM = amniotic membrane; T = cornea tissue; K = keratocyte; E = epithelium cell; P = passage.

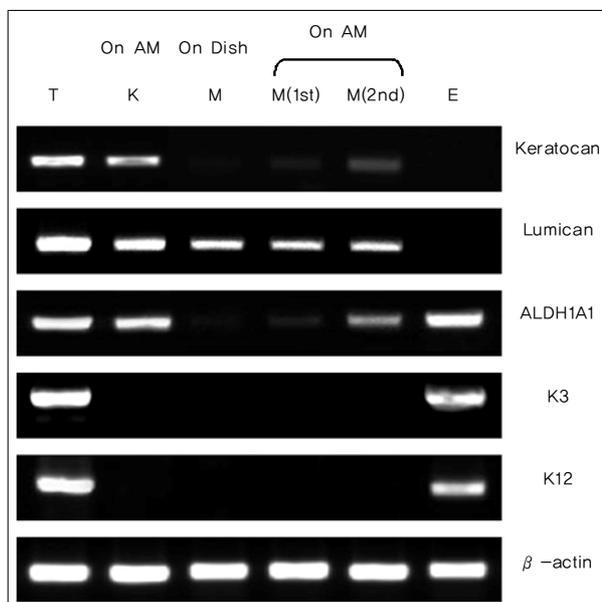


Figure 4. Mesenchymal stem cells induced expression of keratocyte marker when cultured in α -MEM medium containing KCM. The expression of keratocan and ALDH transcripts were readily detected by RT-PCR after incubation with KCM. But lumican was represented no expressional change. K3 and K12, cornea epithelium markers, were regarded as negative markers for keratocytes. Corneal epithelium cells were used to confirm the specificity of keratocytes markers. AM, amniotic membrane; T = cornea tissue; K = keratocyte; M = mesenchymal stem cell; 1st = first passage after exposure to KCM; 2nd = second passage after exposure to KCM; E = epithelium cell.

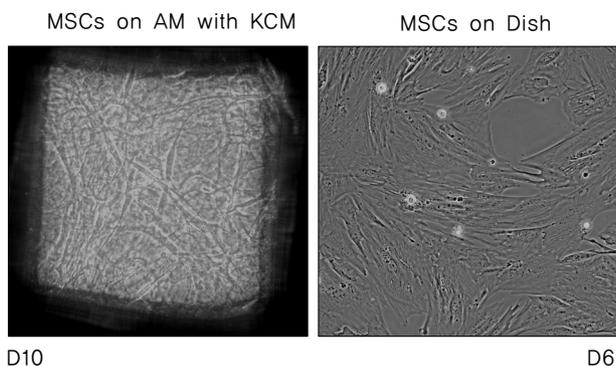


Figure 3. Mesenchymal stem cells (MSCs) grown on dish were continuously subcultured on amniotic membrane (AM). MSCs were cultured in α -MEM, and the medium was switched to containing keratocyte conditioned medium (KCM). Cells reached confluence faster on plastic than on AM. Cells on AM reached 50% confluence after 10 days but cells on dish grown to 90% confluence at 6 days. D10 = 10 days of culture; D6 = 6 days of culture. Magnification: $\times 200$.

에서 세포의 성장 속도가 많이 감소되는 것이 관찰되어 조건배지의 비율을 낮추어 진행하였다. 또한, 간질세포를 양막을 이용하여 배양할 시에 그 특징이 잘 유지되었으며 배양접시에서 배양 시에 간질세포의 특성을 빨리 잃어버리는 양상을 보였으므로 세포를 배양하는 매개체가 세포의 분화에 영향을 미칠 것으로 생각되어, 중배엽 줄기세포의 성공적

인 분화를 위하여 각막 간질층과 유사한 환경을 조성해 주곤 하였다. 이를 위해 각막 간질세포 형태 및 특성을 유지하는데 효과적이었던 배양법과 동일하게 양막을 매개체로 이용하여 중배엽 줄기세포를 배양하였다. 배양접시에서 α -MEM으로 배양한 것은 세포의 형태가 섬유아세포와 유사한 형태인 방사상인 데 반해, 양막을 매개체로 사용하고 α -MEM에 KCM을 혼합하여 배양한 중배엽 줄기세포에서는 수지상을 나타내었다. 또한, 간질세포를 배양했을 때와 유사하게 세포가 자라는 속도에서 차이가 났다. 양막에서는 50% 가량 증식하는 데 10일이 소요되었으나, 배양접시의 경우는 6일 배양 시 90% 이상 증식하였다(Fig. 3).

4. 각막 간질세포 배양배지 처리 시 중배엽 줄기세포의 유전자 발현양상 변화

각막 간질세포를 배양한 조건배지와 중배엽 줄기세포 배양액을 혼합하여 배양하는 방법을 이용하여 키운 중배엽 줄기세포에서 각각의 표지 유전자 발현양상을 확인하였다. 그 결과, 중배엽 줄기세포에서 각막 간질 세포의 표지 유전

자인 keratocan과 ALDH1A1의 발현이 유도되었으며, 계대 배양 시 발현량이 증가하는 것도 확인할 수 있었다. 이는, 중배엽 줄기세포가 각막 간질세포로 분화될 수 있는 가능성을 제시하여 준다. 그러나 lumican의 경우는 발현이 유도되는 것을 확인할 수 없었다(Fig. 4).

고 찰

줄기세포는 자가재생능력을 갖는 세포로 비제한적인 세포분열이 평생 가능하고, 비대칭적인 세포분열 양상을 보이며, 분화과정은 비가역적이어서 일단 분화과정으로 들어간 배아세포는 다시 줄기세포로 전환될 수 없고, 성숙세포에 비해 느린 세포주기를 갖는 등 일반적인 미분화세포의 특징을 가지고 있다.^{21,22} 중배엽 줄기세포는 조직에 있는 특정한 세포로만 분화되는 제한적 분화능으로부터 탈피하여 다양한 종류의 세포로 분화가 가능한 다능성을 가진다는 점에서 세포 치료에 있어서 강한 잠재력을 가지고 있다.²³ 다양한 기원의 줄기세포 중 골수에서 분리된 중배엽 줄기세포는 다양한 계통으로의 잠재적 분화능을 가지고 있고, 섬유아세포와 유사한 모양을 지니고 있으며, 각막의 창상 부위에 이식된 중배엽 줄기세포는 α -smooth muscle actin을 발현하였으며, 각막 간질에서는 vimentin이 발현되었다. 이것은 중배엽 줄기세포가 섬유아세포의 많은 특성을 공유하고 있음을 보여주며,^{24,25} 이식된 중배엽 줄기세포가 각막 창상 치유에 중요한 근섬유세포로 분화 가능함을 제시한다.²⁶

주변 미세환경변화에 의해 중배엽 줄기세포의 분화가 다양하게 유도될 수 있다는 사실이 보고되어 있다.^{27,28} 손상 받은 각막 상피세포와 공동 배양한 중배엽 줄기세포가 각막 상피로 특성 변화가 유도되는 것이 확인되었으며, 손상 각막 상피세포 조건배지에서 중배엽 줄기세포를 배양하였을 때도 유사한 결과가 나타났다.²⁹ 이는 중배엽 줄기세포를 다른 기원의 세포와 공동배양을 하는 방법뿐 아니라, 각막 상피세포에서 분리된 요소들이 포함된 조건배지에 배양하는 방법에 의해서도 분화가 유도될 수 있음을 보여준다. 또한 중배엽 줄기세포에서 특이적인 단백질 발현이 각막 간질세포에서도 관찰되었고, 지방세포 배지 및 조골세포 배지에서 각막 간질세포를 배양 시에 이들 세포로의 분화가 가능한 분화능을 가진 것이 확인되었다.³⁰ 따라서 중배엽 줄기세포가 각막 상피세포로의 교차분화가 가능하며 각막 간질세포가 중배엽 줄기세포와 유사한 단백질 발현 양상을 가지며 분화능에서 유사한 능력을 지니므로, 중배엽 줄기세포의 각막 간질세포로의 분화도 가능할 것이라는 가정하여 각막 간질세포 조건배지를 이용하여 각막 간질세포에서 분리되는 다양한 cytokine과 성장 요소들에 의해 중배엽 줄기

세포의 분화를 유도해 보기로 한 것이다.

본 연구에서는 양막에서 키우는 방법을 이용하여 각막 간질세포의 생체 외 배양 시 진행되는 섬유아세포로의 분화 속도를 늦출 수 있음을 세포형태 관찰과 함께 RT-PCR을 통하여 각막 간질세포 표지유전자의 발현 양상이 유지되는 것을 확인하였다. 중배엽 줄기세포의 간질세포로의 분화를 유도하기 위하여 각막 간질세포 고유의 특성을 잃지 않는 조건으로 확인된 방법인 간질세포를 양막 위에서 배양한 배양액(KCM, 조건배지)과 중배엽 줄기세포 배양액(α -MEM)을 혼합하여 줄기세포를 배양하였고, RT-PCR을 이용하여 각막 간질세포 표지유전자의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 중배엽 줄기세포에서 각막 간질세포에서 특이적으로 발현된다고 알려져 있는 표지유전자인 keratocan과 ALDH1A1의 발현이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 본 연구를 통해 간질세포 조건배지와 양막을 매개체로 배양하는 방법으로 중배엽 줄기세포의 각막 간질 세포로의 특성 변화가 유도됨을 확인하였다.

중배엽 줄기세포의 분화 유도 시 각막 간질세포를 배양한 조건배지를 이용하게 되면 그 안에 포함되어 있는 다양한 각막세포유래 mRNA가 오염되어 keratocan, ALDH1A1 등이 발현될 가능성에 대한 문제를 제기할 수 있으나, 배양된 중배엽 세포에서 mRNA를 추출하는 과정상 배양 시에 첨가된 배양액은 PBS로 여러 번 세척되어 medium에 포함되어 있는 것이 발현될 확률은 적을 것으로 판단된다. mRNA의 경우 세포 내에 존재하는 molecule로서 세포 외부로 유출되어 배지에 존재하기 힘들며 일부 세포 외부로 나오는 인자들이 있을 수도 있으나, 세포 내에 존재하는 것과 구분되는 것으로 알려져 있다. 또한 오염에 의해 나타났다고 하기에는 RT-PCR의 밴드의 강도가 확연히 증가하였다. 그러므로 각막간질 조건배지 내에는 사이토키린이나 성장인자 등 단백질이 포함되어 있어, 중배엽 줄기세포의 분화에 영향을 미쳤을 것으로 생각한다.

각막 간질세포 배양 시에 양막과 배양접시를 매개로 한 경우에 표지 인자들의 발현양상이 다르게 나타났으므로, 양막이 중배엽 줄기세포의 분화 시에도 중요한 요건으로 작용할 것으로 생각된다. 그러나 본 연구의 결과에 제시된 바와 같이 양막을 매개로 한 배양은 배양접시와 비교하여 세포의 성장속도에서 확연한 차이를 보인다. 이는 다량의 세포를 확보할 수 있는 줄기세포의 장점을 활용하기에 어려운 조건이므로, 양막을 매개체로 사용하지 않고 배양접시에서 조건배지만으로도 분화가 유도될 수 있는지 확인해 보아야 할 것이다. 또한, 본 연구에서는 mRNA 수준에서 확인된 결과로서 발현 유도된 mRNA가 단백질로도 발현되는지 확인하여야 할 것이다. 현재 인간에서 유래한 세포를 재료

로 mRNA 발현 및 단백질 발현양상을 확인하기 위한 실험을 진행 중에 있으며, 조건배지를 이용한 중배엽 줄기세포 배양 시에 배양접시와 양막을 매개체로 이용한 두 개의 실험군으로 나누어서 각막 간질세포 표지인자들의 발현 양상을 비교할 계획이다.

생체 외 배양 시 섬유아세포로의 분화가 진행되어 간질세포 고유의 특성을 잃기 쉬우며, 잃은 특성은 역행할 수 없을 뿐 아니라 조직에서 분리되는 세포의 양이 적은 각막 간질 세포는 조직공학적으로 활용하기 까다로운 재료이다. 반면, 세포를 다량 확보할 수 있으며, 간질세포로의 분화가 가능하며, 세포수명이 상대적으로 긴 줄기세포의 장점을 지닌 중배엽 줄기세포를 이용한다면 훨씬 효율적인 재료가 될 수 있을 것이다. 적당한 분화 조건을 유지해 주면 중배엽 줄기세포를 각막 간질세포로 분화시킬 수 있으며, 생체 외에서 이렇게 분화된 세포의 배양이 가능하다면 조직공학적인 인공 각막의 구축에 대한 기초가 확립될 것이고, 이는 각막이 손상된 환자의 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 1) Beales MP, Funderburgh JL, Jester JV, Hassell JR. Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1658-63.
- 2) Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Petroll WM. Induction of α -smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* 1996;15:505-16.
- 3) Espana EM, He H, Kawakita T, et al. Human keratocytes cultured on amniotic membrane stroma preserve morphology and express keratocan. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5136-41.
- 4) Funderburgh ML, Mann MM, Funderburgh JL. Keratocyte phenotype is enhanced in the absence of attachment to the substratum. *Mol Vis* 2008;14:308-17.
- 5) Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, et al. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1653-8.
- 6) Galmiche MC, Kotliansky VE, Brière J, et al. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993;82:66-76.
- 7) Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4857-61.
- 8) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
- 9) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418:41-9.
- 10) Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye* 2006;20:482-90.
- 11) Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128:5181-8.
- 12) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
- 13) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002;8:1011-7.
- 14) Wei ZG, Wu RL, Lavker RM, Sun T. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:1814-28.
- 15) Chung E, Bukusoglu G, Zieske JD. Localization of corneal epithelial stem cells in the developing rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2199-206.
- 16) Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325-35.
- 17) Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173-7.
- 18) Wong HC, Boulton M, Marshall J, Clark P. Growth of retinal capillary endothelia using pericyte conditioned medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1767-75.
- 19) Razin E, Cordon-Cardo C, Good RA. Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:2559-61.
- 20) Gho YS, Kim PN, Li HC, et al. Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 2001; 61:4253-7.
- 21) Hall PA, Watt FM. The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619-33.
- 22) Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation* 1979;14:23-34.
- 23) Kacic A, Shen W, Rakoczy PE. The potential of marrow stromal cells in stem cell therapy. *Eye* 2001;15:695-707.
- 24) Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-92.
- 25) Ishizaki M, Wakamatsu K, Matsunami T, et al. Dynamics of the expression of cytoskeleton components and adhesion molecules by fibroblastic cells in alkali-burned and lacerated corneas. *Exp Eye Res* 1994;59:537-49.
- 26) Nakamura K, Kurosaka D, Yoshino M, et al. Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2603-8.
- 27) Djouad F, Delorme B, Maurice M, et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R33.
- 28) Metallo CM, Mohr JC, Detzel CJ, et al. Engineering the stem cell microenvironment. *Biotechnol Prog* 2007;23:18-23.
- 29) Shin MS, Hong HS, Son YS, Kim JC. Effects of Damaged Human Corneal Epithelial Cells on Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell. *J Korean Ophthalmol Soc* 2007;48:423-30.
- 30) Choong PF, Mok PL, Cheong SK, Then KY. Mesenchymal stromal cell-like characteristics of corneal keratocytes. *Cytherapy* 2007; 9:252-8.

=ABSTRACT=

Effective Keratocyte Culture Using Amniotic Membrane Matrix and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells

Soo Hyun Park, MS, Yeoun Sook Chun, MD, PhD, Jae Chan Kim, MD, PhD

Department of Ophthalmology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To investigate the characteristics of cultured rabbit corneal keratocytes in vitro and evaluate the possibility of differentiation of mesenchymal stem cells to keratocytes using the keratocyte conditioned medium (KCM).

Methods: Isolated keratocytes were seeded on the stromal side of amniotic membranes (AM) or plastic dishes, and morphologic changes were evaluated. Rabbit mesenchymal stem cells were cultured on AM with α -MEM (minimum essential medium alpha) and KCM. The gene expression patterns of specific keratocyte markers (keratocan, lumican, and aldehyde dehydrogenase family, member A1 (ALDH1A1)) of cultured cells were evaluated by RT-PCR.

Results: Keratocytes on AM showed dendritic morphology with slow proliferation in contrast, cells on dishes were stellate in shape with fast proliferation. Cultured keratocytes on AM maintained the expression of keratocan, lumican and ALDH1A1 while keratocytes on plastic dishes steadily lost their keratocyte marker gene expression. Additionally, mesenchymal stem cells cultured with KCM on AM induced expression of keratocan and ALDH1A1.

Conclusions: Keratocytes cultured on AM stromal matrix maintained their characteristic morphology and marker gene expression. Morphology changes and marker gene expressions of mesenchymal stem cells suggest an ability to differentiate into keratocytes when grown on AM with KCM.

J Korean Ophthalmol Soc 2010;51(12):1652-1658

Key Words: Aldehyde dehydrogenase family member A1, Amniotic membrane, Keratocan, Keratocytes, Mesenchymal stem cells

Address reprint requests to **Jae Chan Kim, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Chung-Ang University Yongsan Hospital
#65-207 Hangangro 3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea
Tel: 82-2-748-9838, Fax: 82-2-792-6295, E-mail: jck50ey@kornet.net