

## 저산소 환경에서 배양된 지방유래 줄기세포로부터 얻어진 세크리툼에 의한 간재생 향상 효과

가톨릭대학교 의과대학 대전성모병원 외과학교실

정혜진 · 이상철 · 김옥희 · 정우주 · 김세준

### Liver Regenerating Potential of the Secretome Obtained from Adipose-derived Stem Cells Cultured under the Hypoxic Environment

Hye Jin Jeong<sup>1</sup>, Sang Chul Lee, M.D., Ok-Hee Kim, Woo Joo Jeong and Say-June Kim, M.D.

Department of Surgery, Daejeon St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Daejeon, Korea

**Background:** The stem cell-derived secretome has received considerable attention as an alternative to stem cells for therapeutic applications. However, establishing optimal culture conditions is key to obtaining appropriate secretome contents. Here, the optimal culturing environment for achieving a high-efficiency secretome was determined via hypoxic preconditioning of human adipose-derived stem cells (ASC).

**Methods:** Normoxic conditioned media (NCM) and hypoxic conditioned media (HCM) were obtained after culturing human ASCs under normoxia (20% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>), respectively. Subsequently, both normal and thioacetamide-induced hepatotoxic hepatocytes were treated with NCM or HCM. In addition, partially hepatectomized mice were infused with control saline, NCM, and HCM. The effects on liver regeneration and serum transaminases levels were then compared.

**Results:** Hypoxic preconditioning significantly increased mRNA expression of proinflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) and growth factors (hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor). In both normal and thioacetamide-induced hepatotoxic hepatocyte (alpha mouse liver 12 [AML12]) cell lines, HCM treatment resulted in the highest cell viability (122% and 95%, respectively), followed by NCM (111% and 78%, respectively). In addition, intravenous administration of HCM to partially hepatectomized mice resulted in substantially enhanced liver regeneration compared with the NCM group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** Taken together, the secretome obtained from ASC with hypoxic preconditioning showed potential to alleviate liver damage both *in vitro* and *in vivo*. Hypoxic culture of ASC is expected to play an important role in regenerative medicine by inducing secretome production that is beneficial for improving liver regeneration.

**Key Words:** Adipose-derived stem cell, Conditioned culture media, Hypoxic preconditioning, Liver regeneration, Paracrine effect, Secretome

**중심 단어:** 지방유래 줄기세포, 조건 배양액, 저산소 배양, 간 재생, 주변분비효과, 세크리툼

Received November 18, 2015, Revised February 29, 2016, Accepted March 1, 2016

Corresponding author: Say-June Kim

Department of Surgery, Daejeon St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 64 Daeheung-ro, Jung-gu, Daejeon 34943, Korea

Tel: 82-42-220-9520, Fax: 82-42-220-9565, E-mail: sayjunekim@gmail.com

본 연구는 2014년도 대한이식학회 대한이식학회연구비 지원으로 수행되었음(수혜자: Say-June Kim).

## 서 론

간이식이나 간 절제 후 충분한 용적의 간 이식편(liver graft) 혹은 잔여 간(residual liver)을 가지는 것은 향후 간 기능에 매우 중요하다. Graft recipient weight ratio는 이식편의 무게가 환자의 체중에 비하여 차지하는 비율을 백분율로 표시한 것으로 최소 0.6% 이상이 필요하고 0.8% 이상이면 어느 정도 안전하다고 생각된다(1,2). 더 나아가 잔여 간의 용적 못지않게 중요한 것은 잔여 간의 재생이다. 간 절제 후 충분한 간 재생이 이루어지기 위해선 간 재생에 필요한 제반 여건이 최적화되어야 한다. 최근 줄기세포가 간 재생을 촉진시킨다는 연구 결과가 발표되면서, 줄기세포를 이용한 간 재생 촉진에 대한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다(3,4). 줄기세포원 중 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 태아 및 성인의 결합조직으로부터 얻어지는 줄기세포를 가리킨다. MSC는 자기 재생 능력(self-renewal capacity)이 우수하며 근육, 지방, 간질, 인대, 연골 및 뼈 등 다양한 조직으로의 분화될 수 있다. MSC는 또한 낮은 양의 class I human leukocyte antigen (HLA-I)만을 발현하고 HLA-II는 발현하지 않기 때문에 MSC를 이식했을 때 숙주 세포(host cells)의 거부반응을 일으키는 빈도가 낮다고 알려져 있다(5,6). MSC 중 지방 조직으로부터 유도된 줄기세포를 지방유래 줄기세포(adipose-derived stem cell, ASC)라고 한다. ASC는 (1) 간단한 지방흡입술 등으로 쉽게 얻을 수 있으며, (2) 대표적인 MSC인 골수 유래 MSC에 비해 세포 수득률도 500배 이상으로 높으며, (3) 풍부한 성장인자 및 사이토카인을 포함하고 있다는 면에서 가장 이용가치가 높은 MSC로 생각된다(7).

줄기세포가 지니는 잠재적 이점에도 불구하고, 줄기세포의 임상 적용에는 몇 가지 제한점이 있다. 첫째, 이식된 줄기세포의 비교적 짧은 수명을 지닌다. 즉, 이식된 세포의 대부분은 이식 후 몇 일 이내에 손실된다고 알려져 있다(8,9). 무엇보다도 줄기세포의 임상적용을 방해하는 요인은 줄기세포의 악성 전환(malignant transformation)이 가능하다는 사실이다(10,11). 이러한 줄기세포 치료의 한계를 극복할 수 있는 방법 중의 하나는 줄기세포를 대신하여 줄기세포 분비물인 세크리툼(secretome)을 사용하는 것이다. 세크리툼은 줄기세포에서 분비되는 단백질의 총 집합으로 사이토카인, 호르몬, 및 성장인자 등을 포함한다. 최근 연구에서 세크리툼은 줄기세포의 치료 성분으로 주목을 받고 있는데, 이는 줄기세포가 손상이 발생한 미세환경(microenvironment)에 반응하여 분비하는 다양한 단백질 성분이 손상 받은 장기를 회복시키는 능력을 지닌다는 사

실이 밝혀졌기 때문이다(12,13).

한편, 어떤 조건으로 줄기세포를 배양하느냐에 따라 줄기세포의 치료 효과에 큰 차이를 보인다. 이는 줄기세포의 배양조건에 따라 세크리툼의 분비량과 구성 성분에 차이를 보일 수 있음을 시사한다. 줄기세포를 이용한 통상적인 실험은 항상 정상 산소분압(산소 21%)하에서 이루어진다. 하지만, *in vivo* 환경 즉, 줄기세포가 실제 신체 내에서 작용할 때는 산소분압이 매우 낮은 것으로 알려져 있다(14). Liu 등(15)과 Rosova 등(16)은 *in vivo* 환경과 같이 저산소 환경을 제공하여 줄기세포를 배양했을 때 세포의 성장과 분화 및 신생혈관생성을 유도되었고, 줄기세포의 치료 효과도 상승되었다고 보고하였다. 이에 본 실험에서 우리는 저산소 배양조건(1% O<sub>2</sub>)과 정상 산소 배양조건(20 % O<sub>2</sub>)에서 얻은 세크리툼의 치료 효과를 비교하여 최적의 간 치료 효과를 지니는 배양조건을 발굴하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. ASC의 획득 및 배양

인간 ASC는 Hurim Biocell Co. (Seoul, Korea)로부터 기증받았다. ASC는 MSC 표식자인 CD90 양성이었으며, 조혈모세포(hematopoietic stem cell) 표식자인 CD34와 CD31에 대해 음성이었다(17). ASC를 해동한 뒤 37°C/5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK)에 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum, Thermo Scientific) 및 1% 항생제(amphotericin B, streptomycin 및 penicillin, Thermo Scientific)를 첨가하여 배양하였다.

### 2. ASC의 저산소 배양 및 세크리툼 확보

ASC가 70%~80% 성장치(confluence)에 도달하면, 배양액을 제거하고 1×phosphate buffered saline으로 세포를 세척한 뒤 무혈청 low-glucose DMEM 배지로 교환하였다. 그 후 각각 정상 산소 분압(21% O<sub>2</sub>)과 저산소 분압(1% O<sub>2</sub>)으로 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 저산소배양 환경 조성은 hypoxic chamber (MIC-101, Billups-Rothenberg Inc., San Diego, CA, USA)를 이용했으며 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 및 94% N<sub>2</sub> 혼합가스를 이용하였다. ASC의 conditioned media (CM)은 3-kDa 이하 분자를 제거하는 한외여과장치(ultrafiltration units; Amicon Ultra-PL 3, Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 약 25배 농축하였다. 이때 정상 산소분압 조건에서 얻은 CM을 normoxic conditioned media (NCM), 저산소 분압 조건에서 얻은 CM을 hypoxic

conditioned media (HCM)으로 명명하였다. NCM과 HCM은 4°C 또는 -80°C에서 보관하였다.

### 3. RNA 추출 및 실시간 중합효소 연쇄반응

ASC를 1 mL의 TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 첨가한 후 제조사의 설명에 따라 전체 RNA를 분리하였다. 그 후 1 µg RNA를 reverse transcriptase premix (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA로 합성, 유전자에 특이적인 primer pairs (Bioneer, Daejeon, Korea)와 SYBR Green를 사용하여, 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 수행하였다. 사용한 primer는 아래와 같다: interleukin-6 (*IL-6*) forward 5'-CACACAGACAGCCACT-CACC-3' and reverse 5'-TTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'; tumor necrosis factor-α (*TNF-α*) forward 5'-AACC-TCTCTCTGCCATCAA-3' and reverse 5'-GGAAGACCC-CTCCCAGATAG-3'; vascular endothelial growth factor (*VEGF*) forward 5'-TCTTCAAGCCATCCTGTGTG-3' and reverse 5'-ATCTGCATGGTGTATGTTGGA-3'; hepatocyte growth factor (*HGF*) forward 5'-TGCTGTCTGGATGATTTTG-3' and reverse 5'-AGTGTAGCCCCAGCCATAAA-3'; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' and reverse 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'. qRT-PCR은 실시간 유전자 증폭장치(Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하고, 각각의 유전자 발현은 GAPDH는 표준 유전자(reference gene)로 사용한 비교 역치 사이클방법(comparative threshold cycle method)으로 정량하였다. 각 결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균±표준편차로 나타내었다.

### 4. 세포 생존율 측정(cell viability test)

마우스 간세포주인 alpha mouse liver 12 (AML12; CRL-2254)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. AML12 세포는 DMEM/F-12에 보충물을 첨가하여 37°C/5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 제조사의 지시에 따라 배양하였다. Thioacetamide (TAA, Sigma Aldrich)를 농도별(0~100 mM)로 처리하여 세포 생존율을 측정하였으며, *in vitro* 손상 모델을 구축하기 위해서 최종적으로 TAA 50 mM을 사용하였다. 세포의 생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit (Daeil Lab service Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Western blot

NCM과 HCM을 처리한 AML12 세포와 간 부분절제 마우스에서의 간 조직으로부터 EzRIPA Lysis kit (ATTO Corp., Tokyo, Japan)을 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 1차 항체(1:1,000 희석)를 4°C에서 12시간(overnight), horseradish peroxidase (HRP)-결합된 2차 항체(1:2,000 희석)를 상온에서 1시간 반응시키고, Western blotting plus chemiluminescence reagent (Millipore)를 이용하여 검출하였다. 사용한 항체는 다음과 같다: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), phospho-STAT3, STAT3, β-actin, HRP-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG), 그리고 HRP-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling, Beverly, MA, USA).

### 6. 간 부분절제 마우스에 치료물질의 투여

간 부분절제 동물모델을 만들기 위해 8주령 수컷 BALB/c 마우스(Damool Science, Daejeon, Korea)를 사용하였다. BALB/c 마우스를 Tiletamine-zolazepam (Zoletil 20, Virbac, Nice, France) 30 mg/kg로 복강 주사하여 마취시킨 뒤 70% 간 부분절제술을 수행하였다(18). 간 부분절제는 좌측 간엽(전체 간의 30%) 및 중간 엽(전체 간의 40%)이 하대정맥과 만나는 부위를 silk 4-0으로 결찰(ligation)한 뒤 제거하는 방식을 이용했으며, 제거된 간 무게를 측정하였다.

다음으로는 꼬리정맥을 통해 간 부분절제 마우스에게 치료물질을 투여하였다. 꼬리정맥을 통해 주입한 물질에 따라 다음과 같이 군을 나누었다: control 군(n=25; 0.1 mL low-glucose DMEM 주입), NCM 군(n=25; 정상 산소분압 환경에서 배양한 0.1 mL 5.0×10<sup>5</sup> ASC로부터 얻어진 CM을 25배 농축하여 주입), 그리고 HCM 군(n=25; 저산소분압 환경에서 배양한 0.1 mL 5.0×10<sup>5</sup> ASC로부터 얻어진 CM을 25배 농축하여 주입). 진통제로는 ketoprofen (Unibio Tech Co., Seoul, Korea; 0.1 mg/kg)을 수술 직후와 24시간 후 복강 투여하였다. 각 실험군에서 5마리씩은 혈액 내 간 효소(aspartate transaminase [AST]와 alanine transaminase [ALT])를 측정하기 위한 아군(subgroup)으로 정했으며, 각 실험군에서 나머지 20마리씩은 5마리로 나누어서 정해진 시기(수술 후 1, 2, 3 및 7일)에 희생시켜 조직 및 혈액을 획득하였다.

### 7. Enzyme-linked immunosorbent assay

NCM과 HCM에서의 human IL-6 (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA)의 농도를 비교하였다. 또한, 마찬가지로 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하

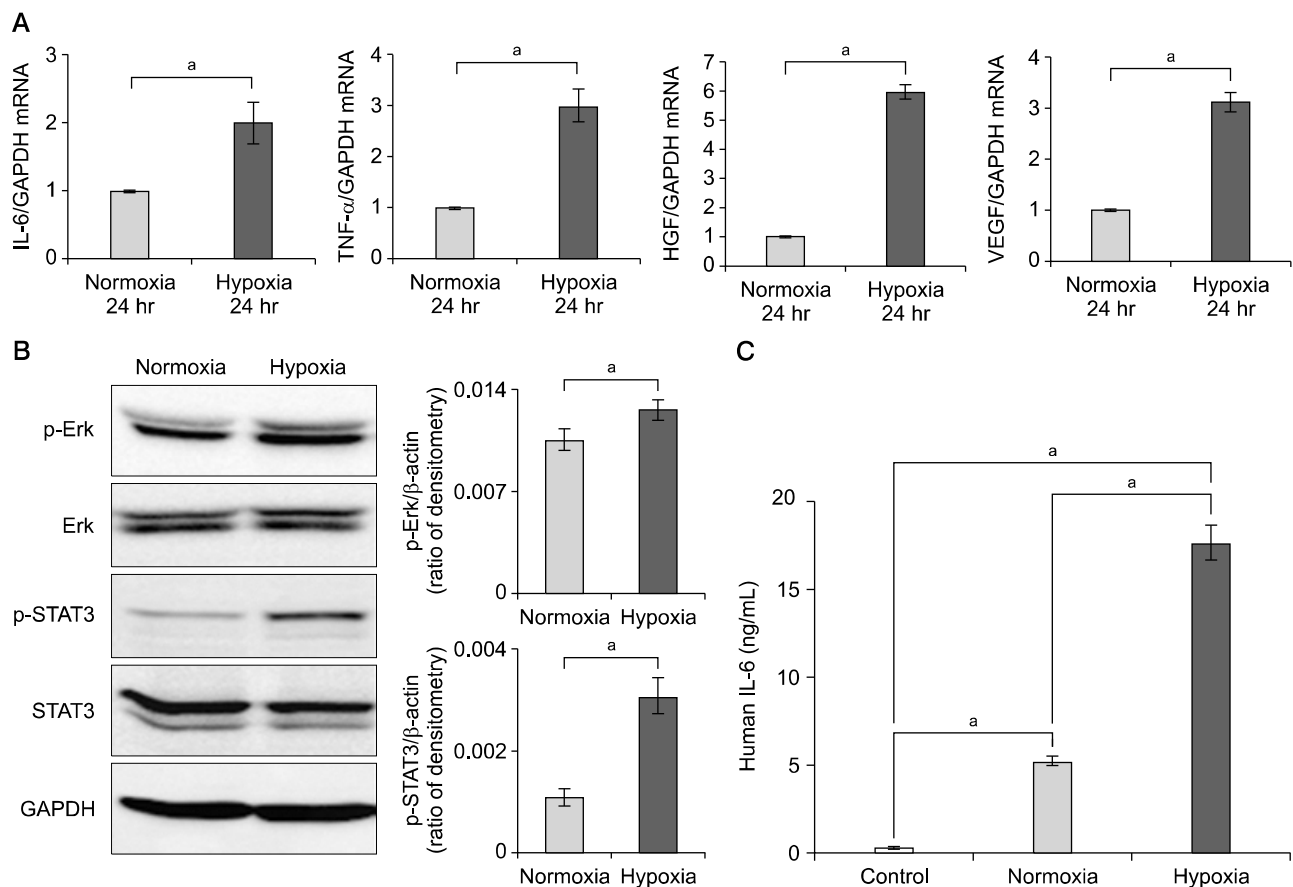
여 NCM 및 HCM을 간 부분절제 마우스에게 주입한 뒤 마우스 혈액에서의 IL-6 (eBioscience Inc.)와 TNF- $\alpha$  (Biolegend Inc.)의 농도를 제조자의 ELISA 사용 지침에 따라 측정하였다.

### 8. Bromodeoxyuridine 처치

간 부분절제 마우스 모델에서 간 재생 정도를 측정하기 위해 증식하는 세포의 DNA를 표적으로 하는 bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma-Aldrich)로 선 처리하였다(19). NCM 및 HCM 주입 후 희생 2시간 전에 생리식염수에 녹인 BrdU를 마우스 복강에 50 mg/kg으로 투여한 뒤, 간 조직을 적출하였다.

### 9. 면역염색

간 부분절제 마우스로부터 얻어진 간 조직에 파라핀(paraffin)을 침투시킨 뒤 4  $\mu$ m 간격으로 절단하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 자일렌과 알코올을 이용하여 탈파라핀화(deparafinization)시킨 뒤, 탈수하였다. 1차 항체 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 뒤, biotin이 결합된 2차 항체를 이용하여 상온에서 30분 반응시켰다. 마지막으로 streptavidin-HRP 시약을 이용하여 면역화학염색을 시행하였다. 1차 항체로는 Ki67 (Abcam, Cambridge, MA, USA)와 BrdU (cell signaling)를 사용하였고, 각 조직의 절편은 무작위로 선정하여  $\times 400$  배율에서 Ki67 또는 BrdU 양성인 세포를 산정하였다.

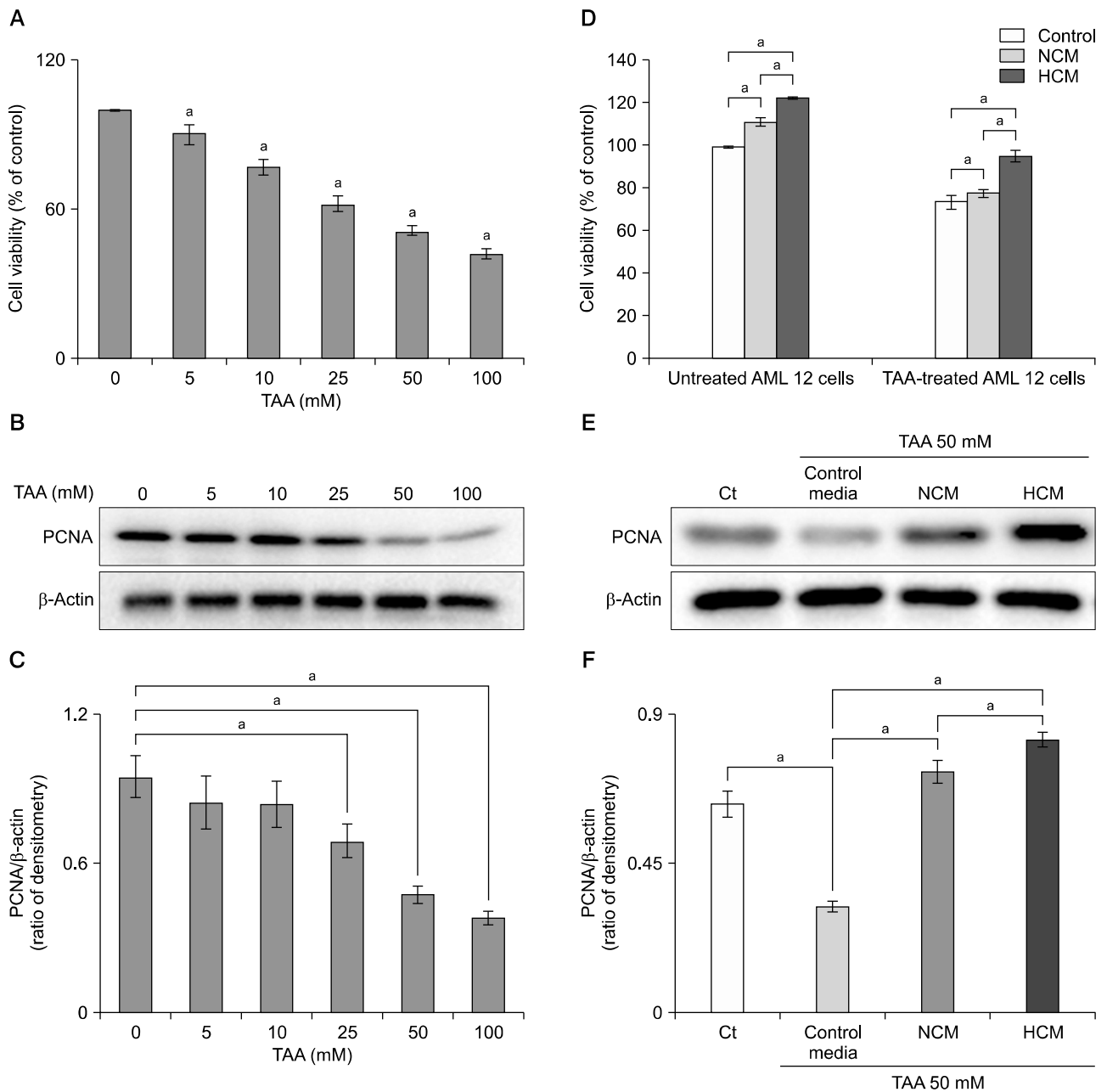


**Fig. 1.** Effect of hypoxia on the expression of cytokines and growth factor in adipose-derived stem cells (ASCs). (A) Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of hypoxia preconditioning ASCs. (B) Western blotting of ASCs under normoxia and hypoxia. (C) Enzyme-linked immunosorbent assay analysis for measure secreted interleukin-6 (IL-6) levels in normoxic and hypoxic condition of ASC. Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; HGF, hepatocyte growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; p-Erk, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase; Erk, extracellular signal-regulated kinase; p-STAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3. <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

### 10. 간 손상 평가

각각의 실험군에서 혈액을 채취하고, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 중 ALT 및 AST의 활성도를 IDEXX VetTest Chemistry Analyzer

(IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA)를 사용하여 측정하였다.



**Fig. 2.** Effect of hypoxic conditioned media (HCM) on mouse hepatocyte (alpha mouse liver 12 [AML12]) cells. (A) Cell viability assay showing dose-dependent effects of the hepatotoxic molecule thioacetamide (TAA) on mouse hepatocyte AML12 proliferation. (B) Western blotting of AML12 cells under series concentration of TAA. (C) Relative densities of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) according to TAA concentrations. (D) Effect of HCM on TAA-treated or untreated AML12 cells viabilities. (E) Effect of HCM on TAA-treated AML12 cells. (F) Relative densities of PCNA in each group. Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Abbreviation: NCM, normoxic conditioned media. <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

## 11. 통계처리

실험결과와 측정치는 “평균±표준편차”로 나타내었다. 자료의 정규성이 입증된 경우에는 unpaired Student t-test를 통계분석에 이용하였고, 비정규분포를 따르는 자료에 대해선 Wilcoxon ran-sum test를 이용하여 검증하였다. 통계 프로그램으로 SPSS ver. 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용했으며,  $P$ 값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 저산소 배양이 ASC의 mRNA 발현 및 단백질 분비에 미치는 효과

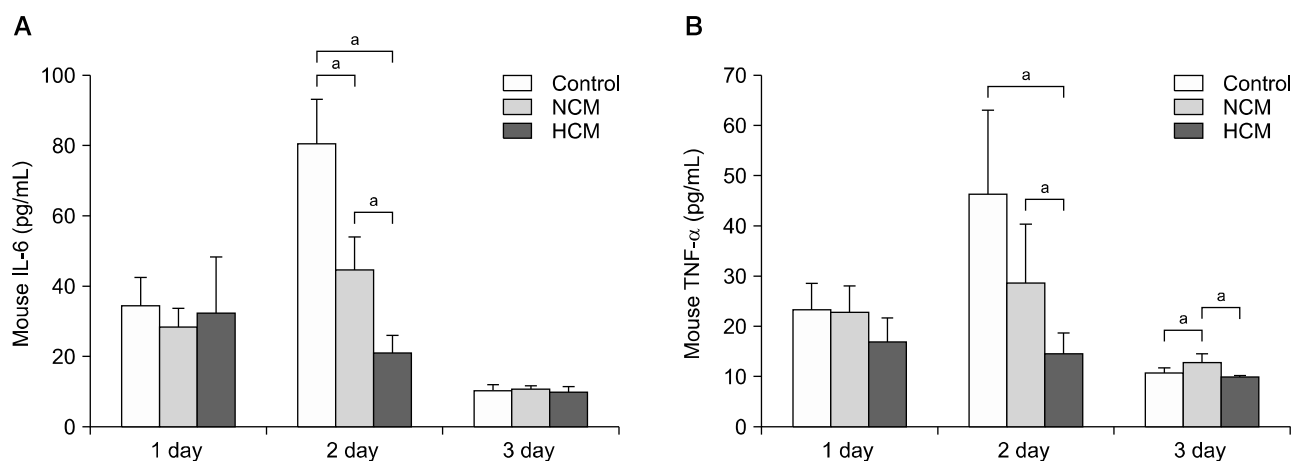
저산소 배양이 ASC에 미치는 영향을 확인하고자 ASC를 저산소 환경에서 24시간 배양한 뒤, 염증유발 사이토카인(IL-6 및 TNF- $\alpha$ )과 성장인자(HGF 및 VEGF)의 mRNA 발현을 qRT-PCR로 확인하였다. ASC를 저산소 분압에서 배양했을 때에 정상 산소 분압에서의 ASC보다 사이토카인과 성장인자의 mRNA 발현이 의미있게 증가하였다( $P < 0.05$ ) (Fig. 1A). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 신호계 및 STAT3 신호계가 세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 한다고 알려져 있기 때문에(20), 이에 우리는 ASC를 저산소 분압에서 배양했을 때에 Erk와 STAT3의 발현을 Western blot으로 확인하였다. ASC의 저산소 배양은 Erk와 STAT3의 인산화를 증가시켰다(Fig. 1B). 다음으로, 저산소 분압으로 ASC를 배양했을 때 ASC로부터 염

증유발 사이토카인인 IL-6의 분비에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. ASC가 분비하는 IL-6의 농도를 확인하기 위해 ELISA를 수행한 결과, ASC의 저산소 분압에서의 배양은 IL-6의 농도를 유의하게 증가시켰다(5.3 ng/mL vs. 17.6 ng/mL,  $P < 0.05$ )을 확인하였다(Fig. 1C).

### 2. HCM 처치가 손상된 간세포주의 세포 생존 및 재생에 미치는 효과

NCM과 HCM가 간세포에 미치는 영향을 알아보기로 정 상 및 손상된 마우스 간세포인 AML12 세포에 각각의 CM을 처리하여 세포 생존율과 재생표지자인 PCNA 단백질 발현을 확인하였다. TAA의 다양한 농도(0~100 mM)로 AML12 세포에 24시간 동안 처리한 뒤 세포의 생존율과 PCNA를 조사하였다. TAA는 농도 의존적으로 AML12 세포의 생존율과 PCNA 단백질 발현을 감소시켰다(Fig. 2A-C). 우리는 AML12 세포의 생존율을 51.4%로 감소시키는 TAA 농도(50 mM)를 향후 손상된 AML12 세포를 만드는데 이용하였다.

다음으로는 TAA 처리한 AML12 세포에서 NCM 및 HCM의 치료 효과의 차이를 비교하였다. TAA 50 mM 처리하여 AML12 세포를 손상시킨 뒤, 각각의 세포 생존율을 비교하였다. 정상상태의 대조군을 100%로 환산하여 세포 생존율을 비교하였을 때, 정상 및 손상세포에서 HCM을 처리한 군이 가장 높은 생존율을 보였으며(각각 122% 및 95%), 다음으로 NCM 처리군(각각 111% and 78%)과 및 대조군(각각 100% and 74%) 순으로 낮은 생존율을 나



**Fig. 3.** Hypoxic conditioned media (HCM) effects on inflammation in the liver of partially hepatectomized mice. (A) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis for the serum levels of interleukin-6 (IL-6) in each group at 1, 2, 3 days after infusion. (B) ELISA analysis for the serum levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in each group at 1, 2, 3 days after infusion. In the experiment presented in (A) and (B), each group included 20 mice at each time point (80 mice in total). Values represent mean  $\pm$  SD. Abbreviation: NCM, normoxic conditioned media. <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

타냈다(Fig. 2D). 다음으로 NCM과 HCM을 처리하여 PCNA 단백 발현을 확인한 결과, HCM 처치군에서 NCM 처치군보다 PCNA 단백 발현이 증가되었다( $P<0.05$ ) (Fig. 2E, F).

### 3. HCM 주입이 간 부분절제 마우스에서의 염증반응에 미치는 효과

간 부분절제 마우스에 주입한 NCM과 HCM이 간 부분절제 후 증가된 염증반응에 어떠한 영향을 미치는지를 IL-6 와 TNF- $\alpha$  혈중 농도 변화를 통해 알아보았다(Fig. 3). NCM 및 HCM 주입군은 대조군보다 간 부분절제 2일째에 IL-6와 TNF- $\alpha$  혈중 농도를 유의하게 감소시켰다( $P<0.05$ ). 또한 간 부분절제 2일째 HCM 주입군은 NCM 주입군보다 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 혈중 농도를 더 의미있게 감소시켰다( $P<0.05$ ). 이러한 차이는 간 부분절제 3일째 사라졌다.

### 4. HCM 주입이 간 부분절제 마우스에서의 간 재생에 미치는 효과

간 부분절제 마우스에서 NCM과 HCM 정맥 주입이 간 재생에 미치는 영향을 아래의 3가지 방법으로 확인하였다: (1) CM 주입 1, 2, 3 및 7일째 획득한 간 조직의 면역염색을 통한 Ki67 또는 BrdU-양성세포 계수, (2) CM 주입 2일째 획득한 간 조직으로부터 PCNA 단백 발현 비교, 그리고 (3) CM 주입 7일째 간 무게 측정(Fig. 4).

먼저 간 조직을 이용하여 Ki67 또는 BrdU 면역염색을 시행하였다. Fig. 4A, B는 CM 주입 2일째 control media, NCM 및 HCM 군에서의 각각 Ki67와 BrdU 면역염색을 비교한 그림으로 모든 군에서 CM 주입 2일째 가장 많은 Ki67와 BrdU 양성세포가 관찰되었으며, 그 후 감소되는 경향을 나타냈다. NCM과 HCM 군에서 Ki67와 BrdU 양성세포가 control media 군보다 더 많이 관찰되었으며, HCM을 주입한 군에서 가장 많은 Ki67와 BrdU 양성세포가 관찰되었다( $P<0.05$ ).

다음으로 간 재생과 높은 상관관계를 갖는 PCNA 단백질 발현의 차이를 CM 주입 2일째에 비교하였다. PCNA 단백질은 HCM 주입군에서 가장 높게 발현되었고, PCNA와 함께 간 재생 신호전달체계에서 중요한 역할을 담당하는 STAT3 단백질의 인산화 역시 HCM 및 NCM 주입 군에서 control media군보다 더 증가되었다(Fig. 4C).

마지막으로 CM 주입 7일째에 간 무게를 측정하여 얻어진 간 재생률(the ratio of liver weight to body weight)을 통해 각 군의 간 재생 정도를 비교하였다. 간 재생률은 마우스의 희생 시 체중과 재생된 간의 무게를 측정하고(재생 간무게/절제된 간의 무게) $\times$ 희생 시 체중 $\times 100$ 으로 산출

하였다. 그 결과, HCM 주입군에서 가장 높은 간 재생률을 보였고, 다음으로 NCM 및 control media 주입군으로 나타났다(HCM, NCM 및 control media 주입군의 간 재생률  $4.74\pm 0.09$ ,  $3.19\pm 0.15$  및  $2.47\pm 0.31$ ;  $P<0.05$ ) (Fig. 4D).

### 5. HCM 주입이 간 부분절제 마우스에서의 간 기능에 미치는 효과

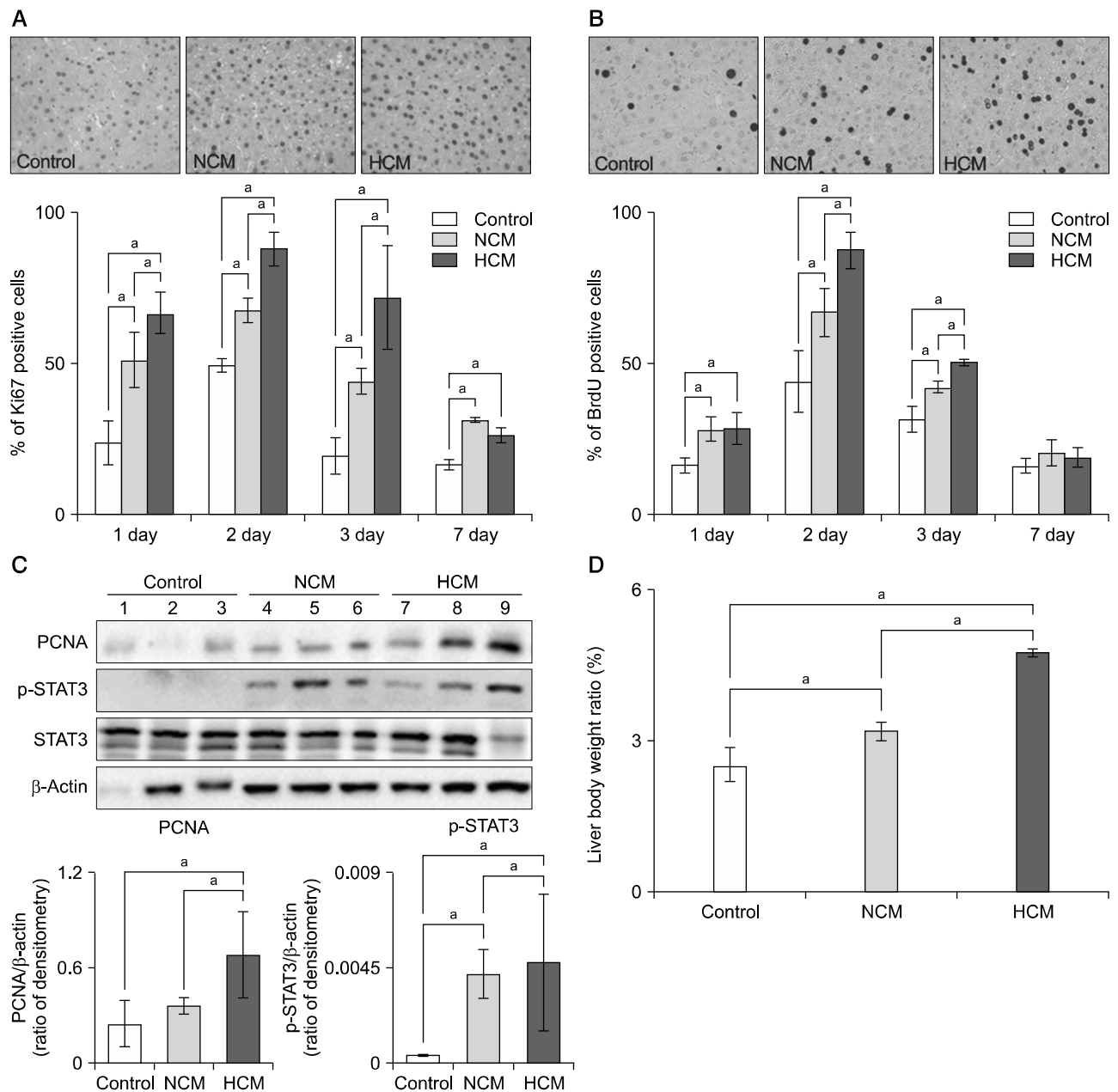
간 부분절제 마우스에서 NCM과 HCM의 정맥 주입이 간 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 CM 주입 후 간세포 효소인 AST와 ALT의 혈중 농도의 변화를 비교하였다. 간 부분절제 후 혈중 AST 및 ALT 농도는 간 부분절제 후 1일째 최고치를 나타내었고, 7일째 정상 수준 근처에 도달하였다(Fig. 5).

NCM 및 HCM 주입군에서는 control media 주입군보다 간 부분절제 후 1, 2, 3일째 혈중 AST 및 ALT 농도가 감소되었다( $P<0.05$ ). HCM 주입군에서 AST 농도는 간 부분절제 후 1일, 2일째 control media 주입군보다 유의하게 감소하였다. 또한, HCM 주입군에서 ALT 농도는 간 부분절제 3일째에 control media 주입군보다 유의하게 낮았다( $P<0.05$ ).

## 고 찰

본 연구에서는 우리는 ASC의 저산소 배양을 통해 얻어진 세크리툼이 손상받은 간의 회복에 어떤 영향을 주는지 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 확인하였다. 먼저, *in vitro* 실험에서는 ASC를 저산소 환경에서의 배양했을 때, ASC로부터 염증관련 사이토카인(IL-6 와 TNF- $\alpha$ ) 및 간세포 성장인자(HGF 및 VEGF)의 발현이 증가되었다. 저산소 환경에서 얻어진 세크리툼(HCM)을 독성손상 마우스 간세포주(AML12 cells)에 처리했을 때 손상받은 마우스 간세포의 회복 및 재생이 촉진되었다. 다음으로, *in vivo* 실험에서는 간 부분절제 마우스 모델에서의 HCM의 치료효과를 알아보았다. 간 부분절제 후 HCM를 마우스의 꼬리정맥으로 주입했을 때, (1) 간 부분절제 후 증가되었던 염증관련 사이토카인(IL-6 와 TNF- $\alpha$ ) 농도가 감소되었고, (2) 간 재생이 증가했으며, (3) 간 부분절제후 증가되었던 간 효소치(ALT와 AST)가 감소되었다. 이상의 결과는 ASC를 저산소 조건에서 배양을 통해 얻어진 세크리툼이 정상 산소배양을 통해 얻어진 세크리툼보다 더 높은 치료효과를 지님을 입증하는 것이다.

일반적으로 세포의 저산소 배양은 세포의 성장 및 재생인자 분비를 촉진시킨다(21,22). 여러 연구결과에서 배양

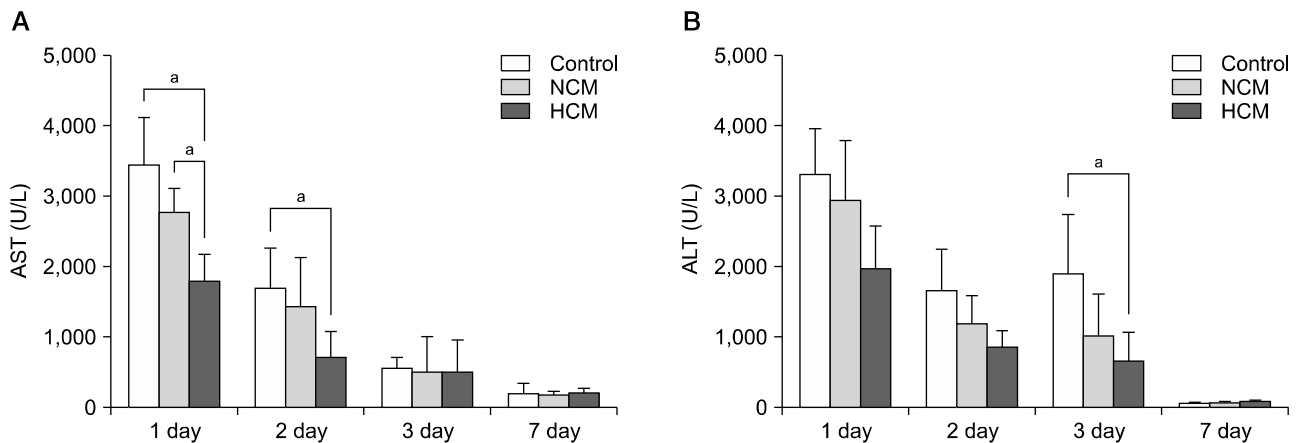


**Fig. 4.** Hypoxic conditioned media (HCM) effects on liver regeneration in partially hepatectomized mice. (A, upper) Immunohistochemical stain of Ki67 (regeneration marker) in the liver specimens of each group at 1 day after infusion. (A, under) Percentage of Ki67 positive cells in each group at 1, 2, 3, and 7 days after infusion. (B, upper) Immunohistochemical stain of bromodeoxyuridine (BrdU; regeneration marker) in the liver specimens of each group at 1 day after infusion. (B, under) Percentage of BrdU positive cells in each group at 1, 2, 3, and 7 days after infusion. (C, upper) Western blotting analysis for expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA; liver regeneration marker) and phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) at 2 days after infusion. (C, under) Relative densities of these markers in each group. (D) Comparison of liver weight to body weight of each group at 7 days after infusion. In the experiment presented in (A) to (D), each group included 20 mice at each time point (80 mice in total). Values represent mean  $\pm$  SD. Abbreviations: NCM, normoxic conditioned media; p-STAT3, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3. <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

과정 중 골수, 지방 등에서 유래된 성체줄기세포의 저산소 상태로 노출은 성체줄기세포의 이동 능력을 개선시키고, fibroblast growth factor 2 (FGF-2), insulin like growth

factor 1, HGF 등 성장인자 생성을 증가시켜 치료효과를 향상시킨다고 보고되었다(15,16,23). 또한, 저산소 상태에 노출된 MSC는 정상산소 상태의 MSC보다 더욱 효과적으





**Fig. 5.** Hypoxic conditioned media (HCM) effects on hepatic function in partially hepatectomized mice. (A) Serology tests of aspartate transaminase (AST) in each group. (B) Serology tests of alanine transaminase (ALT) in each group. In the experiment presented in (A) and (B), in the serologic tests, each group included 5 mice (20 mice in total). Values represent mean  $\pm$  SD. Abbreviation: NCM, normoxic conditioned media. <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

로 허혈성 손상에 의한 신생혈관의 생성을 증가시키고 염증 반응을 완화시킨다고 보고되었다(24).

우리는 본 연구를 통해 ASC의 주변분비 효과(paracrine effect)를 극대화시켜 손상받은 간의 회복 및 재생을 촉진시키는 방법을 찾고자 하였다. 최근의 여러 연구에서 MSC 이식이 손상받은 간 조직의 회복 및 간 재생력 향상에 도움을 준다는 사실을 밝혀냈다(25,26). MSC가 손상받은 간을 회복시키는 기전으로는 (1) 이식된 MSC와 간세포간의 세포 융합(cell fusion)(27), (2) transdifferentiation(28) 및 (3) 주변분비 효과 등이 제시되었다(29,30). 이중 주변분비 효과가 MSC가 치료효과를 나타내는 기전이 될 수 있다는 근거로는 (1) 적은 양의 MSC 주입으로 큰 치료효과를 가져온다는 사실, (2) MSC가 많은 사이토카인 및 성장인자들을 분비한다는 사실, (3) 표적장기에 실제로 도달하는 줄기세포 양이 매우 적다는 사실, 그리고 (4) 표적장기에 도달하는 줄기세포 중 세포 융합 및 transdifferentiation이 확인되는 세포는 더욱 더 적다( $<0.01\%$ )는 사실 등이 해당된다. 따라서, ASC의 치료효과를 높이기 위해선 주변분비 효과를 극대화시키는 방법을 모색해야 한다. ASC의 주변분비 효과를 극대화시키는 방법 중에 하나는 ASC의 배양 조건을 ASC의 세크리토를 가장 잘 생산할 수 있도록 최적화시키는 것이다. 본 연구를 통해 우리는 ASC의 저산소 배양이 주변분비 효과를 향상시킬 수 있으며, 향상된 주변분비 효과는 치료효과의 상승으로 이어질 수 있음을 보였다.

본 실험결과는 향후 세포 치료의 한계점을 극복할 수 있는 세포 프리(cell-free) 치료로서 세크리토를 이용한 치료의 가능성을 보여준다. 세포치료는 필연적으로 (1) 거부

반응의 가능성, (2) 이식된 세포 생존의 제한 및 (3) 악성 전환의 위험성을 지니고 있으므로, 줄기세포 치료의 임상 적용을 위해서는 무엇보다도 이와 같은 위험성을 극복되어 안전성을 확보되어야 한다. 줄기세포의 주된 치료기전이 세크리토를 매개로 이루어지는 주변분비 효과이므로 줄기세포 대신 세크리토를 이용하는 것은 줄기세포치료의 안전성을 확보하는 한가지 좋은 방법이 될 수 있다. 실제로 줄기세포는 손상된 표적장기에 도달하여 transforming growth factor- $\beta$ , IL-6, HGF, VEGF, FGF, platelet-derived growth factor, insulin growth factor, stromal cell-derived factor 1, prostaglandin E2, tryptophan-catabolic enzyme IDO, nitric oxide 등 다양한 종류의 매개물질을 분비한다(31,32). 이러한 물질들은 염증반응을 억제하고, 손상된 세포들의 증식과 분화를 촉진하며, 내피세포와 섬유아세포의 활성을 촉진시켜 세포 손상의 회복에 관여한다고 알려져 있다(33,34). 따라서, 줄기세포의 세크리토를 이용한 치료는 매우 매력적이며 전망이 밝은 줄기세포 치료의 분야가 될 수 있다.

## 결론

본 연구에서는 HCM, 즉 ASC를 저산소 환경으로 배양해서 얻은 세크리토는 손상받은 간의 회복을 촉진시키며 간 재생 또한 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 간 부분절제 마우스에 HCM를 경정맥 투여했을 때 간 재생을 촉진시키고 항염증작용을 지니며, 간 부분절제로 인해 상승된 간 효소를 감소시켰다. 이와 같은 결과는 줄기

세포의 치료 기전이 주변분비 효과에 의한 것임을 확증하며, 더 나아가 향후 줄기세포치료의 한계점을 극복할 수 있는 세크리툼의 치료효과를 극대화시킬 수 있는 길을 제시한 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, et al. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* 1999;67:321-7.
- 2) Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, et al. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:1375-9.
- 3) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 2008;26:2705-12.
- 4) Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008;134:2111-21.
- 5) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890-6.
- 6) Trento C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. *Swiss Med Wkly* 2010;140:w13121.
- 7) Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, König S, Dollinger MM, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2007;313:2875-86.
- 8) Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1222-32.
- 9) Lee TJ, Bhang SH, Yang HS, La WG, Yoon HH, Shin JY, et al. Enhancement of long-term angiogenic efficacy of adipose stem cells by delivery of FGF2. *Microvasc Res* 2012;84:1-8.
- 10) Rubio D, García S, Paz MF, De la Cueva T, Lopez-Fernandez LA, Lloyd AC, et al. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One* 2008;3:e1398.
- 11) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65:3035-9.
- 12) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.
- 13) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10344-9.
- 14) Ivanovic Z, Belloc F, Faucher JL, Cipolleschi MG, Praloran V, Dello Sbarba P. Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol* 2002;30:67-73.
- 15) Liu L, Yu Q, Lin J, Lai X, Cao W, Du K, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev* 2011;20:1961-71.
- 16) Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008;26:2173-82.
- 17) Lee SM, Lee SC, Kim SJ. Contribution of human adipose tissue-derived stem cells and the secretome to the skin allograft survival in mice. *J Surg Res* 2014;188:280-9.
- 18) Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003;16:99-102.
- 19) Lee SK, Lee SC, Kim SJ. A novel cell-free strategy for promoting mouse liver regeneration: utilization of a conditioned medium from adipose-derived stem cells. *Hepatol Int* 2015;9:310-20.
- 20) Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12:9-18.
- 21) Liu L, Gao J, Yuan Y, Chang Q, Liao Y, Lu F. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int* 2013;37:551-60.
- 22) Thangarajah H, Vial IN, Chang E, El-Ftesi S, Januszyk M, Chang EI, et al. IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. *Stem Cells* 2009;27:266-74.
- 23) Yang DC, Yang MH, Tsai CC, Huang TF, Chen YH, Hung SC. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS One* 2011;6:e23965.
- 24) Han KH, Kim AK, Kim MH, Kim DH, Go HN, Kim DI.

- Enhancement of angiogenic effects by hypoxia-preconditioned human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Biol Int* 2016;40:27-35.
- 25) Jin G, Qiu G, Wu D, Hu Y, Qiao P, Fan C, et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats. *Int J Mol Med* 2013;31:1395-401.
  - 26) Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, Negishi K, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One* 2011;6:e19195.
  - 27) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-4.
  - 28) Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem cells for hepatic regeneration: the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5:182-9.
  - 29) Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006;20:661-9.
  - 30) Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585-92.
  - 31) Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci* 2012;15:862-70.
  - 32) Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012;10:244-58.
  - 33) Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol* 2012;3:359.
  - 34) Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834:2380-4.