

7-AAD/annexin V 동시 염색법을 이용한 제대혈의 세포생존율 평가

Assessment of Cell Viability in Umbilical Cord Blood by Using 7-AAD/annexin V Dual Staining

김경미¹ · 허지영¹ · 강명서¹ · 정상희²

Kyeong Mi Kim, M.D.¹, Ji Young Huh, M.D.¹, Myung Seo Kang, M.D.¹, Sang Hee Jung, M.D.²

차의과학대학교 분당차병원 진단검사의학과¹, 산부인과²

Departments of Laboratory Medicine¹, Obstetrics & Gynecology², CHA Bundang Medical Center, CHA University, Seongnam, Korea

Background: The quality of cord blood largely depends on cell viability. Viability assessments using trypan blue or 7-aminoactinomycin (7-AAD) staining, which are commonly used methods, may not reflect early apoptosis of cord blood cells. We aimed to investigate early apoptosis in cord blood cells following elapsed time after collection using double staining with annexin V and 7-AAD and to compare the result with that of viability evaluation using trypan blue or 7-AAD staining.

Methods: Umbilical cord blood samples were obtained from 30 pregnant women at the time of delivery between July 2012 and March 2013. Viability of cord blood cells was determined at 0 (T0), 24, and 48 hr after collection by using trypan blue exclusion assay, 7-AAD staining, and 7-AAD/annexin V staining.

Results: Viabilities defined by 7-AAD/annexin V staining at T0, 24, and 48 hr after collection were respectively as follows: total nucleated cells, $92.8 \pm 4.5\%$, $78.4 \pm 7.8\%$, and $65.5 \pm 8.1\%$; mononuclear cells, $94.4 \pm 1.7\%$, $90.8 \pm 4.2\%$, and $84.2 \pm 6.7\%$; and CD34-positive cells, $92.4 \pm 3.0\%$, $90.7 \pm 4.7\%$, and $89.3 \pm 7.0\%$. The viability using trypan blue was more than 90% until 48 hr after collection.

Conclusions: The mean viability of total nucleated cells using 7-AAD/annexin V staining decreased to less than 80% at 24 hr after collection; however, the viability of CD34-positive cells was more than 85% until 48 hr. Our study's data will provide useful information for the assessing the quality of cord blood products.

Key Words: Cord blood, Viability, Trypan blue, 7-aminoactinomycin, Annexin V

서 론

제대혈(umbilical cord blood)은 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)가 풍부하게 포함되어 조혈모세포 이식의 공급원 중 하나

Corresponding author: Myung Seo Kang

Department of Laboratory Medicine, CHA Bundang Medical Center,
59 Yatap-ro, Bundang-gu, Seongnam 463-712, Korea
Tel: +82-31-780-5384, Fax: +82-31-780-5476, E-mail: olive@chamc.co.kr

Received: December 14, 2012

Revision received: May 28, 2013

Accepted: May 28, 2013

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2014, Laboratory Medicine Online

© 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.

나로 널리 사용되고 있다[1-3]. 이식 성적을 향상시키기 위해서는 제대혈에 대한 엄격한 품질 관리가 필요하다.

제대혈 품질에 관련된 여러 가지 요소 중 세포생존율은 제대혈 이식의 생착과 예후에 중요한 요소이며, 제대혈 채취 후 공정까지 소요되는 시간은 세포생존율에 가장 큰 영향을 미친다[4, 5]. 따라서 제대혈의 품질 관리를 위해 미국 및 유럽의 경우 채취 후 보관 처리 전까지의 시간이나 세포생존율을 제대혈 보관 여부를 결정하는 기준에 포함시켜 제시하고 있다. Cord Blood Transplantation Study (COBLT)와 NetCord-Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT)에서는 제대혈 채취부터 동결 저장까지의 시간을 48시간 이내로, 세포생존율을 90% 이상으로 규정하고 있다[6, 7]. 최근 시행된 국내의 “제대혈 관리 및 연구에 관한 법률”에서는 채취 후 36시간 이내에 보관 처리를 시행하고, 80% 이상의 세포생존율을 보관 기준으로 명시하고 있다[8]. 세포생존율을 측정

하는 방법에 대해서는 구체적으로 제시되어 있지 않지만, 일반적으로 제대혈은행에서는 trypan blue법으로 총유핵세포의 생존율을 검사하여 저장 전 제대혈 보관의 적합 유무를 판정하고 있다. 최근에는 유세포분석기를 이용하여 CD34 양성세포수 측정과 7-aminoactinomycin (7-AAD) 생존율을 동시에 시행하는 방법이 상용화되어 있다. 그러나 trypan blue나 7-AAD를 이용한 세포생존율 측정은 진행된 세포사멸 단계를 검출하며, 초기세포사멸은 반영하지 못한다[9, 10]. 즉, 제대혈의 세포생존율이 기존의 방법으로 높은 결과를 보였더라도 초기세포사멸이 진행된 세포가 상당수 있을 수 있고, 이는 조혈모세포 이식의 성적에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다[11]. 따라서, 조혈모세포 이식의 성적을 보다 정확하게 예측하고 향상시키기 위해서는 초기세포사멸이 일어난 세포를 배제하여 정확한 세포생존율을 측정하는 것이 필요하다.

현재 국내에서는 초기세포사멸을 검출할 수 있는 민감한 방법을 이용한 제대혈의 세포생존율 측정에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 이에 저자들은 7-AAD에 초기세포사멸을 검출할 수 있는 annexin V를 추가하여 제대혈 채취 후 시간 경과에 따른 세포생존율을 측정하고 이를 기존의 trypan blue 및 7-AAD 만을 이용한 생존율과 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2012년 7월부터 2013년 3월까지 분당차병원에서 만삭에 분만한 산모 30명에서 채취한 제대혈을 대상으로 하였다. 본 연구는 분당차병원 의학연구윤리심의위원회의 심의를 통과하였으며(BD2012-096D), 모든 대상 산모들에게 연구 참가 동의를 받은 후 시행되었다.

2. 방법

1) 검체 수집

태아 만출 직후 제대를 결찰하고 EDTA 채혈관에 제대혈 3 mL를 채취하였다. 채취된 제대혈은 즉시 검사실로 운반하였고, 검사 전까지 실온 보관하였다.

2) 세포생존율 측정

제대혈은 채취 후 6시간 이내에 trypan blue, 7-AAD 단독 및 7-AAD/annexin V를 이용하여 각각 세포생존율을 측정하고(T0), 이후 24 및 48시간 경과 시점에서 세포생존율을 반복 측정하였다.

(1) Trypan blue 염색법

생리식염수로 1:10 비율로 희석한 제대혈 10 μ L를 trypan blue

(0.4%, Gibco, Grand Island, NY, USA) 10 μ L와 혼합 후 100개의 세포를 계수하여 푸르게 염색된 세포를 사멸이 일어난 것으로 판정하여 백분율로 나타내었다.

(2) 유세포분석기를 이용한 7-AAD/annexin V 염색법

상품화된 Stem-Kit Reagents (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)에 annexin V-allophycocyanin (APC; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)을 추가하여 CD34양성세포수와 7-AAD/annexin V를 이용하여 세포생존율을 동시에 측정하였다[12]. 유세포분석기는 FACSCalibur (BD Biosciences)를 사용하였고 CellQuest Pro (BD Biosciences) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

제대혈 100 μ L에 CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC)/CD34-phycoerythrin (PE) 시약 20 μ L를 넣고 실온에서 20분간 반응시켰다. NH₄Cl lysing solution 2 mL를 첨가하여 실온에서 10분 동안 적혈구를 용혈시킨 후 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. Annexin V 염색을 위하여 annexin V binding buffer (BD Biosciences) 500 μ L를 넣어 만든 부유액에 annexin V-APC 10 μ L와 7-AAD 10 μ L를 첨가한 후 잘 혼합하여 15분간 실온에서 반응시켰다. 유세포분석 전 Stem-Count Fluorosphere 100 μ L를 첨가하여 5초간 혼합한 후 분석하였다.

세포생존율 분석을 위해서 총유핵세포, 단핵구 및 CD34 양성세포 구역을 7-AAD/annexin V plot에서 분석하였다. 7-AAD 생존율은 각 구역의 세포 중 7-AAD 음성인 세포의 분획을 퍼센트로 나타내었다. 7-AAD/annexin V 생존율은 각 구역의 세포 중 7-AAD와 annexin V에서 동시에 음성을 보이는 세포의 분획을 퍼센트로 나타내었다. 분석시 Stem-Kit Reagents (Beckman Coulter)를 이용해 CD34 양성세포 측정만 시행하고 7-AAD 및 annexin V로는 염색하지 않은 시험관을 음성대조로 하여 각 세포군별 양성률과 음성을 구분하는 cut-off를 결정하였다(Fig. 1).

3) 통계 분석

총유핵세포, 단핵구 및 CD34 양성세포 분획들 간의 생존율 비교 및 각 염색법에 따른 생존율 비교를 위해 일원분산분석(one-way ANOVA)를 사용하였고, Tukey 방법으로 사후검정을 하였으며 *P*-value가 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 통계 프로그램으로는 SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

결 과

Trypan blue, 7-AAD 및 7-AAD/annexin V를 이용해 측정한 시간 경과에 따른 제대혈의 세포생존율은 Table 1에 제시하였다. 모

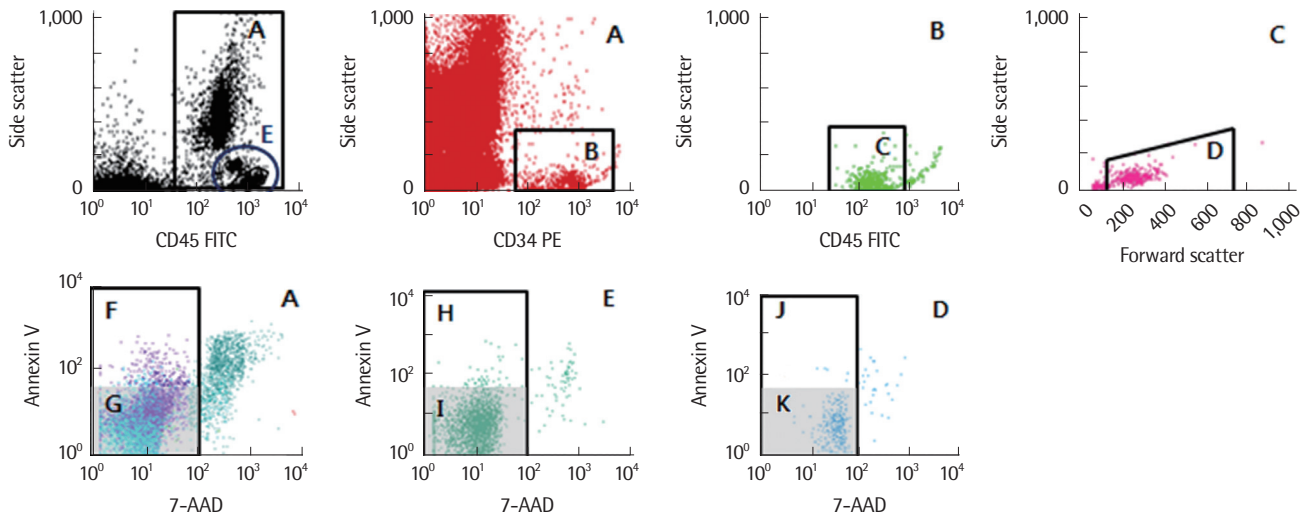


Fig. 1. Flow cytometric analysis results in determining the viabilities of total nucleated cells (TNC), mononuclear cells (MNC), and CD34+ cells. The 7-aminoactinomycin D (7-AAD) viabilities (%) of TNC (A), MNC (E), and CD34+ cells (D) are 100×viable TNC (F+G)/TNC (A), viable MNC (H+I)/MNC (E), and viable CD34+ cells (J+K)/CD34+ cells (D), respectively. The 7-AAD/annexin V viabilities (%) of TNC, MNC, and CD34+ cells are 100×viable TNC (G)/TNC (A), viable MNC (I)/MNC (E), and viable CD34+ cells (K)/CD34+ cells (D), respectively.

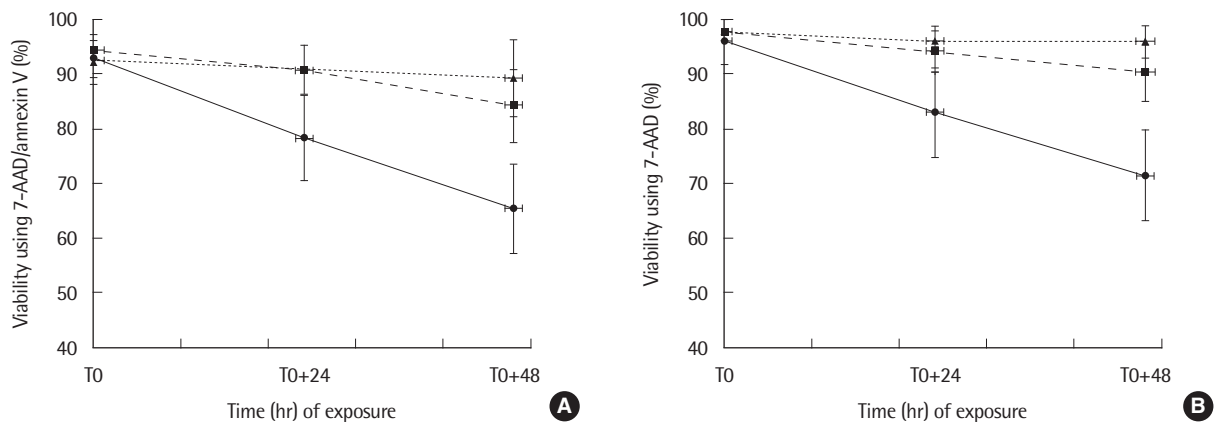


Fig. 2. Time-dependent alterations in the viability of total nucleated cells (TNCs) (●), mononuclear cells (MNCs) (■), CD34+ cells (▲). Data shown in this figure were obtained using flow cytometric analysis with 7-aminoactinomycin D (7-AAD)/annexin V (A) and 7-AAD (B) and analyzed at T0, T0+24, and T0+48 hr. T0 represents data obtained immediately after receipt in the laboratory, which was within 6 hr after collection. The "+" sign indicates the additional time of incubation (hr) at room temperature after receipt in the laboratory. Error bars represent SD.

든 측정 시점에서 총유핵세포의 생존율은 통계학적으로 유의하게 trypan blue 염색법이 가장 높았고, 7-AAD, 7-AAD/annexin V 순이었으며, 단핵구 및 CD34 양성세포의 생존율은 7-AAD법이 7-AAD/annexin V법 보다 유의하게 높았다($P < 0.001$).

7-AAD/annexin V를 이용해 측정한 총유핵세포의 생존율은 채취 직후, 24 및 48시간 경과 시점에서 각각 $92.8 \pm 4.5\%$, $78.4 \pm 7.8\%$, $65.5 \pm 8.1\%$ 로 24시간 경과 시점 이후부터 평균 80% 이하를 나타내었다. 단핵구의 시간 경과에 따른 세포생존율은 각각 $94.4 \pm 1.7\%$, $90.8 \pm 4.2\%$, $84.2 \pm 6.7\%$ 로 48시간 경과 시점까지 평균 80% 이상을 유지하였다. CD34 양성세포의 생존율은 측정 시간 순서대로 각각 $92.4 \pm 3.0\%$, $90.7 \pm 4.7\%$, $89.3 \pm 7.0\%$ 로 48시간 경과 시점에도

평균 85% 이상의 생존율을 보였다. 채취 직후에는 총유핵세포, 단핵구 및 CD34 양성세포의 생존율이 유의한 차이를 보이지 않았으나, 24시간 경과 시점부터는 CD34 양성세포와 단핵구가 총유핵세포보다 높은 세포생존율을 보였고, 48시간 경과 시점부터는 CD34 양성세포, 단핵구, 총유핵세포 순으로 통계학적으로 유의하게 높은 세포생존율을 보였다(Fig. 2A).

7-AAD를 이용해 측정한 세포생존율도 7-AAD/annexin V를 이용한 결과와 유사하게 시간 경과에 따라 감소하였으며, 각 시점에서 총유핵세포, 단핵구 및 CD34 양성세포의 생존율 차이도 7-AAD/annexin V와 동일한 양상을 보였다(Fig. 2B). 초기세포사멸 단계의 세포(7-AAD 음성, annexin V 양성)의 분획은 2.5-6.4%였고, 시간경

Table 1. Comparison of cell viabilities (%) measured using the trypan blue, 7-AAD, and 7-AAD/annexin V methods following elapsed time after collection

Elapsed time		Trypan blue	7-AAD	7-AAD/annexin V	Early apoptosis (7-AAD-/annexin V+)
T0*	TNC	99.6 ± 0.9	95.8 ± 4.2	92.8 ± 4.5	2.9 ± 1.3
	MNC	NA	97.3 ± 1.0	94.4 ± 1.7	2.5 ± 1.2
	CD34+ cell	NA	97.2 ± 1.1	92.4 ± 3.0	4.8 ± 2.4 ^{†,‡}
	P	NA	0.051	0.058	<0.001
T0+24 hr	TNC	95.5 ± 5.3	82.8 ± 8.1	78.4 ± 7.8	4.2 ± 1.2
	MNC	NA	94.1 ± 3.7 [†]	90.8 ± 4.2 [†]	3.7 ± 1.4
	CD34+ cell	NA	95.8 ± 2.6 [†]	90.7 ± 4.7 [†]	5.1 ± 2.9 [†]
	P	NA	<0.001	<0.001	0.021
T0+48 hr	TNC	90.1 ± 8.6	71.5 ± 8.2	65.5 ± 8.1	5.9 ± 1.5
	MNC	NA	90.1 ± 5.3 [†]	84.2 ± 6.7 [†]	5.3 ± 2.3
	CD34+ cell	NA	95.6 ± 2.9 ^{†,‡}	89.3 ± 7.0 ^{†,‡}	6.4 ± 4.4
	P	NA	<0.001	<0.001	0.326

*T0 represents data obtained immediately after receipt in the laboratory, which was within 6 hr after collection. Statistical comparisons were made by one-way ANOVA techniques with post hoc analysis by the Tukey's method. [†] $P < 0.05$ vs TNC at each time; [‡] $P < 0.05$ vs MNC at each time.

Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; TNC, total nucleated cells; MNC, mononuclear cell; NA, not applicable.

과에 따라 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

Trypan blue로 측정된 총유헤세포의 생존율은 채취 직후에 99.6%, 24시간에 95.5%이었으며, 48시간 경과 시점까지 90.1%의 높은 생존율을 유지하였다.

고 찰

성공적인 제대혈이식을 위해서는 제대혈에 포함된 조혈모세포 수도 중요하지만 제대혈 세포의 기능적 생존율(functional viability)을 반영하는 집락형성단위(Colony forming unit, CFU)가 이식 성적을 더 정확하게 예측한다고 알려져 있다[13, 14]. 그러나 집락 형성단위의 측정은 2주 이상의 기간이 소요되고 표준화가 어려워 실제 임상에서 사용하기 어려우므로 이를 대체할 정확한 세포생존율의 측정이 필요하다.

세포생존율은 제대혈의 품질과 관련된 중요한 지표이지만, 검사 방법에 따라 민감도의 차이가 있어 상당한 생존율의 차이를 보일 수 있다. 통상적으로 대부분의 제대혈은행에서는 신속하고 간편한 trypan blue법을 사용하여 총유헤세포의 생존율을 측정하고 있다. 그러나 trypan blue법은 검사자 간에 주관적인 오차가 있을 수 있고, 적은 수를 세므로 정확도가 낮으며, 염색 후 짧은 시간 경과에도 결과의 차이를 보이고, 세포 사멸이 완전히 일어난 세포만이 염색되므로 초기단계를 검출하지 못하는 단점이 있다. 더구나 총유헤세포의 생존율을 측정하므로 실제 골수이식의 생착과 예후에 중요한 CD34 양성 조혈모세포의 생존율은 정확하게 반영되지 않을 가능성이 있다[10, 15]. 7-AAD를 이용해 유세포 분석을 시행할 경우 trypan blue보다 민감하게 세포사멸을 검출할 수 있고, CD34

양성세포 측정과 7-AAD 염색을 같이 시행할 경우 총유헤세포, 단핵구 및 CD34 양성세포 군에 따른 각각의 생존율을 알 수 있는 장점이 있다[4]. 그러나 세포사멸은 세포막의 변화, 세포질과 핵의 응축, DNA 분절 등의 순서로 진행되는데[16, 17], 7-AAD는 핵산염색 물질이므로 초기 세포막의 변화를 검출하지는 못한다. 초기세포사멸 단계의 세포를 검출하기 위해서는 Syto16이나 annexin V 등의 표지자가 흔히 이용되는데 Syto16이 annexin V 보다 민감도가 높은 것으로 알려져 있다[18, 19]. 여러 연구자들에 의하면 진행된 세포사멸을 검출하는 7-AAD나 propidium iodide로 염색되지 않는 조혈모세포 중에 상당수가 초기세포사멸을 검출하는 Syto16 혹은 annexin V에 염색이 되며, 초기세포사멸이 진행된 세포는 골수 생착력 및 집락형성능이 현저히 감소된다고 보고하였다[11, 19, 20]. 따라서, 제대혈 품질관리 중 세포생존율의 기준은 측정 방법에 따른 특성을 고려할 필요가 있으며, 이를 위해서는 각 방법에 대해 제대혈 채취 후 시간 경과에 따른 생존율 자료가 필요하다.

본 연구에서는 기존에 사용되던 trypan blue 및 7-AAD 생존율을 초기세포사멸을 반영한 7-AAD/annexin V 생존율과 비교하였으며, 채취 후 시간 경과에 따라 세포군별 생존율의 변화를 검토하였다. 가장 낮은 민감도를 보이는 trypan blue의 경우 모든 측정시간에서 가장 높은 세포생존율을 나타내었는데, 채취 직후에는 99.6%였고, 48시간 경과시점에는 평균 90.1%로 90% 이상의 생존율을 유지하였다. 이는 Solomon 등이 보고한 결과보다 높았으나 [4], 이 등의 결과와는 유사하였다[21].

7-AAD 및 7-AAD/annexin V 생존율의 경우 초기세포사멸정도를 반영한 7-AAD/annexin V법이 7-AAD법에 비해 모든 세포군들 및 측정시간에서 2.5-6.4% 정도 낮은 생존율을 보였다. 두 방법 모

두 채취 직후에는 총유핵세포, 단핵구 및 CD34 양성세포군 사이에 차이를 보이지 않았으나, 시간의 흐름에 따라 세포군 별로 생존율 차이를 보였는데 그 중 총유핵세포의 생존율 감소가 가장 빠르게, CD34 양성세포의 생존율 감소가 가장 느리게 나타났고 이런 경향은 이전의 연구 보고와 일치하였다[4]. 48시간 경과시점에서 총유핵세포의 평균 세포생존율은 71.5% (7-AAD법) 및 65.5% (7-AAD/annexin V법)로 80% 이하였으나, CD34 양성세포군은 95.6% (7-AAD법) 및 89.3% (7-AAD/annexin V법)로 비교적 높은 생존율을 유지하였다. 총유핵세포의 생존율 감소가 가장 빠른 것은 제대혈의 40-70%를 구성하는 과립구에서 채혈 후 12-24시간 이내에 가장 빨리 세포사멸이 시작되기 때문으로 생각되었다[22-24]. CD34 양성세포 군은 시간경과 후에도 다른 세포군 보다 높은 생존율을 유지하였는데 같은 환경에 노출되었을 때 다른 단핵구들에 비해 항세포사멸(anti-apoptosis) 유전자인 *Bcl-2*와 *Bcl-x*가 높게 발현되고 세포사멸의 표지자인 caspase-3의 활성이 낮기 때문으로 추정되고 있다[10].

7-AAD/annexin V법으로 제대혈의 세포생존율을 측정한 결과 기존의 trypan blue 또는 7-AAD법보다 낮은 세포 생존율을 보였으나, 48시간 경과시점에서 단핵구 및 CD34 양성세포군의 생존율은 각각 평균 84.2%와 89.3%였고, 36시간 경과시점에서의 세포생존율을 유추해 본 결과 각각 87.5%와 90.0%였다. 따라서 현재 시행되고 있는 국내 제대혈 관리법의 80% 세포생존율 기준 및 채취 후 보관처리 전까지의 36시간 기준을 충분히 충족시킬 수 있을 것으로 추정된다. 또한, 국내 제대혈 관리법은 미국이나 유럽 등에서 제시하는 채취 후 보관처리 전까지 48시간, 세포생존율 기준 90%에 비해 더 짧은 시간과 낮은 세포 생존율을 기준으로 하고 있는데 통상적으로 제대혈은행에서 시행하고 있는 trypan blue법을 사용하여 세포생존율을 측정한다고 가정하였을 때 외국의 경우와 같이 보관처리까지의 시간을 48시간으로 연장하거나, 세포생존율 기준을 90%로 설정하여도 품질 기준을 충족시킬 것으로 판단된다.

현재 국내 제대혈은행에서는 통상적으로 보관 전 제대혈의 세포 생존율 측정을 위해 trypan blue법을 사용하고 있는데 상용화된 제품을 이용해 CD34 양성세포수와 7-AAD법에 의한 세포생존율을 동시에 측정할 경우 trypan blue법보다 민감하게 세포생존율을 측정할 수 있고, 제대혈의 품질에 중요한 단핵구 및 CD34 양성세포의 생존율을 따로 구할 수 있어 제대혈의 품질관리에 도움이 될 것으로 판단된다. 또한 제대혈 이식을 위해 보관 제대혈을 사용하는 경우에는 제대혈 이식의 성적 예측 및 냉동 보관 된 제대혈의 품질평가를 위해 초기세포사멸을 반영할 수 있는 7-AAD/annexin V법으로 세포생존율을 측정하는 것이 보다 유용할 것으로 생각되며, 이때 본 연구 결과에서 제시하는 보관 전 제대혈의 세포생존율 자료가 냉동보관 제대혈의 품질을 평가하는데 이용될 수 있을 것

으로 기대한다.

본 연구는 제대혈 채취시 일반적으로 사용하는 CPDA-1 항응고제가 포함된 채취백 대신에 EDTA 시험관을 사용하였으며, 보관처리를 위한 공정을 실시하지 않았으므로 실제 제대혈 보관 전 세포 생존율을 측정하는 검체의 조건과는 일부 차이가 있다. 이에 저자들은 항응고제 종류에 따른 세포생존율의 차이를 확인하기 위해 추가로 10예의 제대혈을 CPDA-1 항응고제백에 채취하여 세포생존율을 측정한 후 본 연구에서 얻은 EDTA 시험관 결과와 비교하였다. Trypan blue법으로 측정한 총유핵세포와 7-AAD 및 7-AAD/annexin V법에 의한 단핵구 및 CD34 양성세포의 세포생존율은 모든 측정 시점에서 항응고제 종류에 따른 차이는 관찰되지 않았다. 단, 7-AAD 및 7-AAD/annexin V법으로 측정한 총유핵세포의 생존율은 채취 직후에는 차이가 없었으나, 시간 경과에 따라 EDTA 항응고제를 사용한 경우에서 CPDA-1 보다 8.2-11.9% 낮게 측정되어 본 연구 결과를 해석할 때 고려되어야 할 것으로 생각된다.

저자들은 본 연구에서 7-AAD와 초기세포사멸을 검출 할 수 있는 annexin V를 이용하여 제대혈 채취 후 시간 경과에 따른 세포 생존율을 측정하고 이를 기존의 trypan blue 및 7-AAD 염색만을 이용한 생존율과 비교하였다. 7-AAD/annexin V법으로 측정한 세포생존율은 모든 측정 시점 및 세포군별 비교에서 기존의 검사법들에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보였으나, 제대혈 채취 후 48시간 경과 시점까지 CD34 양성세포의 생존율은 평균 85% 이상을 유지하였다. 7-AAD/annexin V법의 경우 기존의 검사법들에 비해 제대혈 이식시 생착에 가장 중요한 CD34 양성세포의 세포생존율을 따로 구할 수 있고, 초기세포사멸 정도를 측정하여 냉동 보관 된 제대혈의 품질 평가에 이용할 뿐 아니라 이식의 성적을 보다 정확하게 예측할 수 있는 장점이 있다. 저자들은 본 연구 결과가 향후 제대혈의 품질을 평가하는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

배경: 세포생존율은 제대혈의 품질을 결정하는 중요한 지표이다. 제대혈의 세포생존율을 측정하기 위해 trypan blue나 7-amino-actinomycin (7-AAD)를 이용한 방법이 일반적으로 사용되고 있으나, 이들 방법은 초기세포사멸은 검출할 수 없다. 저자들은 7-AAD와 초기세포사멸을 반영하는 annexin V를 동시에 이용하여 제대혈 채취 후 시간 경과에 따른 세포생존율을 측정하고, 기존의 trypan blue 및 7-AAD를 이용한 방법과 비교하고자 하였다.

방법: 2012년 7월부터 2013년 3월까지 분당차병원에서 출산한 산모 30명에서 채취한 제대혈을 대상으로 하였다. 제대혈은 채취 직후, 24, 48시간이 경과한 시점에서 trypan blue, 7-AAD, 7-AAD/an-

nexin V를 이용하여 세포생존율을 반복 측정하였다.

결과: 7-AAD/annexin V를 이용하여 제대혈 채취 직후, 24, 48시간 경과 후에 측정한 총유헤세포의 생존율은 측정시간 순서대로 각각 $92.8 \pm 4.5\%$, $78.4 \pm 7.8\%$, $65.5 \pm 8.1\%$, 단핵구는 $94.4 \pm 1.7\%$, $90.8 \pm 4.2\%$, $84.2 \pm 6.7\%$, CD34 양성세포군은 $92.4 \pm 3.0\%$, $90.7 \pm 4.7\%$, $89.3 \pm 7.0\%$ 였다. Trypan blue법으로 측정한 세포생존율은 48시간까지 90% 이상을 보였다.

결론: 7-AAD/annexin V를 이용해 측정한 제대혈의 세포생존율은 총유헤세포의 경우 24시간 경과 시점부터 평균 80% 이하였으나, 제대혈이식에서 생착에 가장 중요한 CD34 양성세포의 생존율은 48시간 경과 시점까지 85% 이상을 유지하였다. 저자들은 본 연구 결과가 향후 제대혈의 품질을 평가하는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

REFERENCES

1. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-8.
2. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2265-75.
3. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2276-85.
4. Solomon M, Wofford J, Johnson C, Regan D, Creer MH. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion* 2010;50:820-30.
5. Louis I, Wagner E, Dieng MM, Morin H, Champagne MA, Haddad E. Impact of storage temperature and processing delays on cord blood quality: discrepancy between functional in vitro and in vivo assays. *Transfusion* 2012;52:2401-5.
6. COBLT. Cord Blood Bank Standard Operating Procedures. <https://web.emm.es.com/study/cord/sop.htm> (Updated on Dec 2000).
7. FACT and NetCord. NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration. <http://www.factweb sit e.org> (Updated on Jan 2010).
8. Ministry of Health and Welfare. The Umbilical Cord Blood Management and Research Act. <http://www.mohw.go.kr> (Updated on Aug 2012).
9. Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol* 1994;41:15-38.
10. Xiao M and Dooley DC. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:115-22.
11. Shim JS, Cho B, Kim M, Park GS, Shin JC, Hwang HK, et al. Early apoptosis in CD34+ cells as a potential heterogeneity in quality of cryopreserved umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2006;135:210-3.
12. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, Fry LJ, Gibson DA, Horton RB, et al. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion* 2012;52:549-59.
13. Prasad VK, Mendizabal A, Parikh SH, Szabolcs P, Driscoll TA, Page K, et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. *Blood* 2008;112:2979-89.
14. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, et al. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1362-74.
15. Yi DY, Huh JY, Kang MS. Assessment of cell viability in umbilical cord blood before cryopreservation. *Korean J Blood Transfus* 2010;21:140-7.
16. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267-93.
17. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
18. Sparrow RL and Tippet E. Discrimination of live and early apoptotic mononuclear cells by the fluorescent SYTO 16 vital dye. *J Immunol Methods* 2005;305:173-87.
19. Schuurhuis GJ, Muijen MM, Oberink JW, de Boer F, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ. Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34-positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:487-98.
20. de Boer F, Dräger AM, Pinedo HM, Kessler FL, Monnee-van Muijen M, Weijers G, et al. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34+ cells in frozen-thawed stem cell grafts. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:951-63.
21. Lee HR, Roh EY, Yoon JH, Han KS, Kim BJ, Hwang KR, et al. Analysis

- of maternal and neonatal factors affecting hematopoietic parameters of cord blood. *Korean J Blood Transfus* 2009;20:1-13.
22. Colotta F, Re F, Mantovani A. Granulocyte transfusions from granulocyte colony-stimulating factor-treated donors: also a question of cell survival? *Blood* 1993;82:2258.
 23. Dale DC, Liles WC, Price TH. Renewed interest in granulocyte transfusion therapy. *Br J Haematol* 1997;98:497-501.
 24. Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S. Granulocyte colony-stimulating factor-role and relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995;172:1061-75.