

사람의 제대 및 양막유래 줄기세포의 간세포로의 분화

서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과¹, 수원제일산부인과²,
연세대학교 의과대학 외과학교실³, 연세대학교 의과대학 산부인과학교실⁴

김지영¹ · 이윤정² · 박세아¹ · 강현미¹ · 김경식³ · 조동제⁴ · 김해권^{1*}

Hepatogenic Potential of Umbilical Cord Derived-Stem Cells and Human Amnion Derived-Stem Cells

Jiyoung Kim¹, Yoon Jung Lee², Seah Park¹, Hyun Mi Kang¹, Kyung Sik Kim³,
Dong Jae Cho⁴, Haekwon Kim^{1*}

¹Department of Biotechnology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul, Korea,
²Suwonjeil Women's Hospital, Suwon, Korea, ³Department of Surgery, College of Medicine, Yonsei University
Seoul, Korea, ⁴Department of OB/GYN, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Objectives: Many types of liver diseases can damage regenerative potential of mature hepatocytes, hepatic progenitor cells or oval cells. In such cases, a stem cell-based therapy can be an alternative therapeutic option. We examined whether human amnion-derived mesenchymal stem cells (HAM) and human umbilical cord-derived stem cells (HUC) could differentiate into hepatocyte-like cells as therapeutic cells for the liver diseases.

Methods: HAM and HUC were isolated from the amnion and umbilical cord of the volunteers after a caesarean section with informed consent. In order to differentiate these cells into hepatocyte-like cells, cells were cultivated in hepatogenic medium using culture plates coated with fibronectin. Effects of hepatocyte growth factor, L-ascorbic acid 2-phosphate, insulin premixture fibroblast growth factor 4, dimethylsulfoxide, oncostatin M and/or dexamethasone were examined on the hepatic differentiation. After differentiation, the cells were analyzed by RT-PCR, immunocytochemistry, immunoblotting, albumin ELISA, urea assay and periodic acid-schiff's staining.

Results: Initial fibroblast-like appearance of HAM and HUC changed to a round shape during culture in the hepatogenic medium. However, in all hepatogenic conditions examined, HUC secreted more amounts of albumin or urea into medium than HAM. Expression of some of hepatocyte-specific genes increased and expression of new genes were observed in HUC following cultivation in hepatogenic medium. Results of immunocytochemistry and immunoblotting analyses demonstrated that HUC secreted albumin into the culture medium. PAS staining further demonstrated that HUC could store glycogen inside of the cells.

Conclusions: Both HUC and HAM could differentiate into albumin-secreting, hepatocyte-like cells. Under the same hepatogenic conditions examined, HUC more efficiently differentiated into hepatocyte-like cells compared with the HAM. The results suggest that HUC and HAM could be used as sources of stem cells for the cell-based therapeutics such as in liver diseases.

[Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(4): 247-265.]

Key Words: Umbilical cord, Amnion, Stem cells, Hepatocyte, Differentiation

주관책임자: 김해권, 우) 139-774 서울특별시 공릉2동 126번지, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과
Tel: (02) 970-5665, Fax: (02) 970-5974, e-mail: hwkim@swu.ac.kr

*이 논문은 2008학년도 서울여자대학교 교내학술특별연구비의 지원을 받았음.

간은 인간 체중의 3% 정도를 차지하며, 중요한 기능을 수행하는 장기로서 간을 이루는 핵심세포인 간세포는 글리코젠, 단백질, 지질, 핵산, 비타민류 등의 생합성 및 분해의 기능과 독성이 있는 물질을 해독하는 기능을 갖고 있다. 그러나 이런 정상적인 역할을 갖지 못하는 간질환 환자의 대부분은 간 조직 손상으로 인해 간세포의 재생능력이 감소되어 있다.¹ 이 경우 간세포의 소실은 불가역적이고 간 기능의 감소를 초래하기 때문에 간 조직 대신 배양된 간세포 이식이 간질환을 치료하는 혁신적인 방법으로 대두되고 있다.²

줄기세포에 대한 연구가 활발해지면서, 이들을 이용한 세포치료 방법이 주목을 받고 있다. 줄기세포란 아직 운명이 결정되지 않은 미숙한 세포로서 인체를 구성하는 신경, 간, 췌장, 혈관 등, 각종 장기를 이루는 세포로 분화할 수 있어 만능세포라고 불리며 발생초기 포배 내막에서 유래한 배아줄기세포 (embryonic stem cells)와 성숙한 조직과 기관 내에 존재하는 다기능 성체줄기세포 (multipotent adult stem cells)가 있다. 그러나 배아줄기세포는 사람으로 성장할 수 있는 배아로부터 얻는다는 점에서 생명윤리와 직결되어 수많은 논쟁을 야기하고 있는 반면, 성체줄기세포는 줄기세포의 성질을 쉽게 상실한다는 단점이 있지만 생명윤리 논쟁을 피할 수 있어 줄기세포를 이용한 새로운 치료법에 있어 최선의 대안으로 부각되고 있다.

성체줄기세포 중 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSC)는 세포표면분자들에서 독특한 표현 양식을 나타내며, 높은 증식력을 가진 밀착성이 있는 섬유아세포들로서, 뼈, 연골, 근육, 인대, 지방, 기질과 같은 중간엽 조직들을 재생하고 골수의 미세환경 내 조혈모세포 (hematopoietic stem cells, HSC)의 분화와 성장을 지지하는 중요한 역할을 한다.³ 이러한 특성으로 인해 중간엽 줄기세포는 여러 질병들의 세포 기초치료와 조직생성 촉진의 개념에서 매력적인 도구로 인식되어져 왔다. 현재 골수는 실험적, 임상적 연구들에서 MSC의 주요 공급원으로 알려져 있다. 하지만 골수에서 유래한 MSC는

나이가 많아질수록 증식분화능력이 현저히 감소하고 바이러스 감염이 높은 빈도로 나타나서,⁴ 현재 유용하게 사용할 수 없는 것이 현실이다. 따라서 자가적 (autogenic), 동종적 (allogenic)으로 사용할 수 있으면서, 골수보다 좀 더 높은 세포증식력과 분화능력을 가지고, 또한 바이러스 감염율이 낮은 성체 줄기세포의 공급원의 개발이 시급하다.

최근 태아의 말초혈액, 태아 간, 태아 비장, 태반, 제대, 제대혈액, 양수, 양막 그리고 다양한 성체조직으로부터 MSC를 분리할 수 있다는 보고들이 발표되었다.⁵⁻¹⁰ 이들 중 제대혈은 말초혈액 또는 골수에 비하여 증식력이 뛰어난 조혈모세포가 많이 포함되어 있는 것으로 확인되었고 다양한 조직으로의 분화가 가능성이 증명되면서 성체줄기세포의 새로운 공급원으로 각광을 받고 있다.¹⁰ 또한 제대혈에서 분리, 배양한 MSC가 골수에서 분리한 MSC와 유사한 분화 특성을 보이며 중배엽성세포로의 분화뿐만 아니라 간세포, 신경세포로도 분화가 가능하다고 보고되었으나¹ 제대혈 내 MSC에 대해서는 연구자마다 다르게 보고하고 있다. Wexler 등¹¹은 제대혈에서 MSC를 분리하지 못하였다고 보고하였으나, Lee 등¹⁰은 제대혈 내에도 골아세포, 지방세포 그리고 신경세포 등으로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포를 분리하였다고 보고하였다. 또한 임신 중기 양수에서도 MSC를 분리하였다는 보고가 있으나 임신 말기의 양수에서는 MSC를 분리하기 어렵다.⁸ 이처럼 그 존재에 대하여 의견이 다른 것은 제대혈 내의 MSC의 수가 적어서 분리 자체가 어렵고 분화기술 방법이 아직 미흡하기 때문이다. 제대혈과 마찬가지로 분만 시 쉽게 채취할 수 있는 양막⁹이나 제대¹는 배아줄기세포 표지인자인 Oct-4 유전자가 발현되고 골수보다 분화력이 뛰어나며, 냉동보관이 가능하고 제대혈에 비해 비교적 쉽게 MSC를 분리할 수 있다는 장점이 있다.

인간배아 줄기세포도 간세포로 분화하나² 이의 사용은 윤리적 문제와 발암, 면역거부반응의 문제를 피할 수 없다. 지금까지 양막¹²과 제대²⁵에서 분리한 세포들도 체외에서 간세포로 분화한다고 보

고된 바 있으나 가장 중요한 간세포의 기능인 알부민의 분비가 효과적으로 이루어진 예는 알려져 있지 않다.

본 논문에서는 사람의 양막 및 제대로부터 세포를 분리하여 줄기세포로서의 특성을 조사하고, 이들 세포의 지방세포, 연골세포, 골아세포로의 분화능력을 확인하였다. 나아가서 간세포로의 분화 배양조건을 확립하여 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포의 기능적인 간세포로의 분화 여부를 검증하였다.

연구대상 및 방법

1. 제대와 양막 채취와 줄기세포 분리

본 연구에 사용된 제대 및 양막은 만삭 정상 산모에서 제왕절개 또는 질식 분만 후 산모의 동의하에 채취하였고 채취한 후 4시간 내에 실험을 진행하였다.

1) 제대유래 줄기세포 분리 및 배양

채취된 제대를 100 U/mL penicilin (Gibco, Grand Island, NY)과 0.1 µg/mL streptomycin (Gibco)이 첨가된 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Dubecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco)로 탯줄 외부의 혈액을 제거한 후, 동맥 2개를 제거하였다. 남은 조직을 1 mm³ 크기로 자른 후, 같은 부피의 0.5% crude type collagenase (Gibco)를 첨가하여 37°C에서 20시간 동안 처리하였다. 이 후 DPBS를 첨가하여 실온에서 600 ×g로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LG, Gibco)로 2번 세척하고, 분리된 세포를 100 U/mL penicilin과 0.1 µg/mL streptomycin 그리고 3.7 mg/mL sodium bicarbonate 그리고 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, South Logan, UT)가 포함된 DMEM-LG으로 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하였고, 1주에 2번씩 배양액을 교체하였다. 배양용기의 70~80%로 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin과 1 mM ethylenedia-

mine tetraacetic acid (EDTA)가 첨가된 Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)로 3분간 처리하여 세포를 떼어낸 후, 75-cm² culture flask (Nunc, Rochester, MN)에 3×10⁵/cm²의 농도의 세포를 넣어주어 배양하였다.

2) 양막유래 줄기세포 및 배양

양막조직으로부터 유래한 줄기세포는 Kim 등의 논문의 방법을 이용하여 분리하였다.⁹ 간단히 살펴보면, 먼저 양막조직을 용모막으로부터 분리한 후 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free DPBS로 세척하였다. 0.25% trypsin (Gibco)이 함유된 DMEM-LG에 넣어 반응시킨 후, 침전물을 얻어 2 mg/mL collagenase A (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzzlerland)와 0.05 mg/mL DNase (Roche Diagnostics)가 포함된 DPBS에 넣어 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이와 같은 방법으로 얻어진 세포를 100 U/mL penicilin, 0.1 µg/mL streptomycin, 3.7 mg/mL sodium bicarbonate 그리고 10% FBS가 포함된 DMEM-LG에서 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin과 1 mM EDTA가 함유된 HBSS를 3분간 처리하여 다시 제대 배양하였다.

2. 줄기세포 분화능력 분석

제대와 양막에서 분리한 세포의 분화능력을 검증하기 위하여 네 번째 계대의 세포들을 각각의 분화 배양액에서 배양하였다. 지방세포의 생성은 DMEM-LG에 10% FBS, 1 µM dezamethasone (Dex), 0.5 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.05 mg/mL human insulin과 200 µM indomethacin이 첨가된 배양액을 이용하였다. 2주 배양 후, oil red O 염색을 시행하여 지질이 축적된 지방세포를 확인하였다. 골세포 생성은 DMEM-LG에 10% FBS, 0.1 µM DEX, 100 mM β-glycerol phosphate, 50 µM ascorbic acid-2-phosphate가 첨가된 배양액을 이용하였다. 2주 배양 후, von Kossa 염색을 시행하여 칼슘이 침착된 골세포로의 분화를 확인하였다. 연골세포 생성은 high-glucose DMEM 배양액에 0.1 µM Dex, 50 µg/mL

ascorbic acid-2-phosphate (Asc), 100 µg/mL sodium pyruvate, 40 µg/mL proline, 10 ng/mL transforming growth factor-β3 (TGF-β3, R&D System, Minneapolis, MN), 50 mg/mL ITS premix (insulin, transferrin and selenous acid at 6.25 µg/mL each, 1.35 mg/mL bovine serum albumin and 5.35 mg/mL linoleic acid; Becton Dickinson, San Jose, CA)가 첨가된 배양액을 이용하였다. 3주 배양 후, alcian blue 염색을 시행하여 분화를 확인하고 Mayor's haematoxylin을 이용하여 counterstaining 하였다.

3. 간세포로의 분화 유도

간세포로 분화 유도 시 모든 배양접시는 10 µg/mL human fibronectin 용액으로 37°C에서 12시간 도포하여 사용하였다. Fibronectin이 도포된 24-well culture plate (Nunc)에 제대 및 양막유래 줄기세포를 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도의 세포를 넣어준 후 3일 후에 4가지 분화 방법을 이용하여 각각 3주 동안 배양하였다.

분화 방법 1

DMEM-LG에 10% FBS, 1 × ITS premix, 10^{-4} M Asc, 40 ng/mL hepatocyte growth factor (HGF; Peprotech, Princeton, NJ), 20 ng/mL oncostatin M (OSM), 1 µM Dex, 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF; Peprotech)가 첨가된 배양액에 7일간 배양한 후, 동일 배양액에 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), 20 ng/mL fibroblast growth factor-4 (FGF4; Peprotech), 또는 20 ng/mL FGF2 (Peprotech)를 첨가하여 14일 동안 더 배양하였다.

분화 방법 2

DMEM-LG에 10% FBS, 1 × ITS premix, 10^{-4} M Asc, 40 ng/mL HGF, 20 ng/mL FGF4가 첨가된 배양액에 7일간 배양한 후, 동일 배양액에 1% DMSO, 20 ng/mL OSM 그리고 1 µM Dex을 넣고 20 ng/mL FGF4를 첨가하거나 첨가하지 않고 14일 동안 더 배양하였다.

분화 방법 3

DMEM-LG에 10% FBS, 1 × ITS premix, 40 ng/mL

HGF, 20 ng/mL OSM 그리고 1 µM Dex가 첨가된 배양액에 7일 동안 배양한 후, 동일 배양액에 1% DMSO, 20 ng/mL FGF4 또는 20 ng/mL FGF2를 첨가하여 14일 동안 더 배양하였다.

분화 방법 4

DMEM-LG에 10% FBS, 1 × ITS, 10^{-4} M Asc가 첨가된 배양액을 기본 배양액 (BM)으로 하였다. 첫 번째 단계는 제대유래 줄기세포 BM에 10 ng/mL EGF와 10 ng/mL FGF4를 첨가하여 3일간 배양하였다. 두 번째 단계로는 BM에 20 ng/mL HGF, 20 ng/mL FGF4와 0.1% DMSO가 첨가된 배양액에 7일간 더 배양한 후, 다시 세 번째 단계로 BM에 20 ng/mL OSM과 1 µM Dex를 넣고, 20 ng/mL HGF를 첨가하거나 (DM1) 첨가하지 않고 (DM2) 14일 동안 더 배양하였다. 또한 위 배양액 조건 두 번째 단계에서 1% DMSO가 첨가하고 세 번째 단계로 BM에 20 ng/mL OSM과 1 µM Dex를 넣고, 20 ng/mL HGF를 첨가하거나 (DM3) 첨가하지 않고 (DM4) 14일 동안 더 배양하였다. 대조군으로는 10% FBS가 첨가된 DMEM-LG에서 세포를 같은 기간 동안 배양하였다.

4. Total RNA 분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

Cell pellet은 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free DPBS을 이용하여 세척하고 500 µL의 Tri-reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 첨가한 다음 manufacturer's instruction에 따라 total RNA를 분리하였다. 5 µg의 RNA는 reaction buffer, 1 mM NTP mixture, 0.5 µg/µL oligo(d)T¹⁵, 20 U RNase inhibitor (Takara, Japan), 20 U MuLV reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, Canada)가 혼합된 20 µL 반응 용액에서 역전사 시켰다. 반응은 42°C에서 60분간 진행되었다. 얻어진 RT products (cDNAs)는 2 mM MgCl_2 , 1 × Taq buffer, 0.25 U Taq polymerase (Fermentas), 10 pM의 sense와 anti-sense gene-specific primers가 혼합된 10 µL 반응 용액으로 PCR을 수행하였다. Amplification은 총 35

Table 1. cDNA primer pairs for stem cell markers

Genes	Primer sequence	Accession number	Size (bp)	Annealing temperature
GAPDH	5'-aca act ttg gta tgc tgg aa-3'	NM_002046	456	55
	5'-aaa ttc gtt gtc ata cca gg-3'			
Oct-4	5'-cgt gaa gct gga gaa gga gaa gct g-3'	AF268617	245	55
	5'-caa ggg ccg cag ctc aca cat gtt c-3'			
Rex-1	5'-atg gct atg tgt gct atg agc-3'	NM_174900	449	57
	5'-cct caa ctt cta gtg cat cc-3'			
SCF	5'-cca ttg atg cct tca agg ac-3'	M59964	275	55
	5'-ctt cca gta taa ggc tcc aa-3'			
FGF-5	5'-gct gtg tct cag ggg att gta gga ata-3'	NM_004464	434	55
	5'-tat cca aag cga aac ttg agt ctg ta-3'			
Nestin	5'-cca gaa act caa gca cca c-3'	X65964	398	54
	5'-ttt tcc act cca gcc atc c-3'			
BMP-4	5'-agc cat gct agt ttg ata cc-3'	D30751	383	55
	5'-tca ggg atg ctg ctg agg tt-3'			
GATA-4	5'-ttc ctc ttc cct cct caa at-3'	NM_002052	194	60
	5'-tca gcg tgt aaa ggc atc tg-3'			
NCAM	5'-gag ggg gaa gat gcc gtg atg tg-3'	NM181315	269	60
	5'-ata ttc tgc ctg gcc cgg atg g-3'			
BMP-4	5'-agc cat gct agt ttg ata cc-3'	NM130851	384	55
	5'-tca ggg atg ctg ctg agg tt-3'			
CK18	5'-gag atc gag gct ctc aag ga-3'	NM000224	357	57
	5'-caa gct ggc ctt cag att tc-3'			
CK19	5'-cga acc aag ttt gag acg gaa ca-3'	NM002276	600	62
	5'-ccg ctg gta ctc ctg att ctg c-3'			
HNF-4 α	5'-gag cag gaa tgg gaa gga tg-3'	NM178849	205	57
	5'-ggc tgt cct ttg gga tga ag-3'			
α FP	5'-ttt tgg gac ccg aac ttt cc-3'	NM001134	451	57
	5'-ctc ctg gta tcc ttt agc aac tct-3'			
α 1-AT	5'-act gtc aac ttc ggg gac ac-3'	NM000295	517	62
	5'-ccc cat tgc tga aga cct ta-3'			
TTR	5'-aac cag tga gtc tgg aga gc-3'	NM000371	358	55
	5'-tgc ctg gac ttctaa cat agc-3'			
GS	5'-gtc aag att gcg ggg act aa-3'	BC031964	397	55
	5'-tac gat tgg cta cac cac ca-3'			

Table 1. Continued

Genes	Primer sequence	Accession number	Size (bp)	Annealing temperature
CPS-1	5'-caa gat tcc ttg gtg tgg c-3'	NM001875	158	57
	5'-tct gat tta aga gag gct gg-3'			
PEPCK	5'-aac gcc atg gct aca atc c-3'	NM004563	752	60
	5'-agg tag ctc cga atg tca cg-3'			
TDO	5'-agg tca atg ata gca tct gcc-3'	NM005651	471	53
	5'-tgt cat cgt ctc cag aat gg-3'			
CYP3A4	5'-tgt atg aac tgg cca ctc acc-3'	NM017460	244	56
	5'-tag ctt gga atc atc acc acc-3'			
HNF-1a	5'-cag tct tct tac ttg gaa ctg aa-3'	NM000545	444	54
	5'-ctt ggg aac aaa tac agg aa-3'			
c-MET	5'-caa tgt gag atg tct cca gc-3'	NM000245	560	55
	5'-cct tgt aga ttg cag gca ga-3'			
CX32	5'-ggc gtg aac cgg cat tct ac-3'	NM000166	400	61
	5'-aca aca gcc gga aca cca cg-3'			
Transferrin	5'-gtg gcc ttt gtc aag ca-3'	NM001013	577	52
	5'-ctc cat cca agc tca tg-3'			
Albumin	5'-ttg gga gaa gaa aat ttc aa-3'	NM001875	445	49
	5'-tat acc ttt tag caa aga aaa gga-3'			
HLA ABC	5'-gta ttt ctt cac atc cgt gtc ccg-3'	L18898	394	70
	5'-gtc cgc cgc ggt cca aga gcg cag-3'			
HLA DR	5'-ctg atg agc gct cag gaa tca tgg-3'	X06079	220	60
	5'-gac tta ctt cag ttt gtg gtg agg gaa g-3'			

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SCF, stem cell factor; FGF-5, fibroblast growth factor-5; BMP-4, bone morphogenetic factor-4; NCAM, neural cell adhesion molecule; CK18, cytokeratin 18; HNF-4 α , human nuclear factor-4 α ; α -FP, α -fetoprotein; α 1-AT, α 1-antitrypsin; TTR, transthyretin; GS, glutamine synthase; CPS-1, carbamoyl phosphate synthetase-1; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; c-MET, hepatocyte growth factor receptor; CX32, connexin 32.

cycles 수행하였으며, 각 cycle은 94°C에서 30초간의 denaturation, 30초간의 annealing, 72°C에서 30초간의 extension 과정으로 구성되었다. Annealing 과정의 온도는 Table 1에 표기하였다. 반응 종결 후, PCR 생성물들은 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 40% sucrose가 포함된 6 × loading buffer에 혼합한 다음 2% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염

색하고 ultraviolet light를 이용하여 DNA의 영상을 얻었다.

5. 세포면역화학적 분석

줄기세포를 8-well slide chamber (Nunc)에서 배양한 후 2% paraformaldehyde가 함유된 DPBS 용액을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 고정 후 DPBS로 5분간 3번 세척하였다. 그리고 실온에서

10분 동안 0.5% Triton X-100가 함유된 DPBS를 처리 후 세척한 다음 endogenous peroxidase activity를 제거하기 위하여 3% hydrogen peroxide (Dako, Carpinteria, CA)로 15분간 반응시킨 후 세척하였다. 2% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 DPBS에서 실온으로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 각 TRA-1-60 (1:20; Chemicon), SSEA-3 (stage-specific embryonic antigen-3, 1:50; R&D System), SSEA-4 (1:50; Chemicon), Thy-1 (1:20; Chemicon), alpha-smooth muscle actin (α -SMA, 1:50; Novo Castra, Newcastle, UK), vimentin (1:100; Novo Castra), desmin (1:50; Dako Cytomation) CD44 (homing cell adhesion molecule, HCAM, 1:500; Novo Castra), CD54 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1, 1:40; Novo Castra), CD106 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1, 1:50; Novo Castra), fibroblast surface protein (FSP, 1:500; Abcam, Cambridge, UK), von Willebrand factor (vWF, 1:200; Novo Castra), CD31 (platelet/endothelial adhesion molecule-1, PECAM-1, 1:40; Dako Cytomation), HLA ABC (1:200; Novo Castra), HLA DR (1:50; Novo Castra), albumin (1:100) mouse monoclonal antibody를 4°C에서 17시간 동안 처리 후, 세척하였다. 이 후 biotinylated goat anti-mouse IgG (Dako Cytomation)와 anti-rabbit IgG (Dako Cytomation)를 실온에서 20분간 처리하였다. 3번 세척한 다음, horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Dako Cytomation)을 20분간 처리하였다. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako Cytomation)용액으로 발색하였다. 발색이 된 세포는 DPBS로 세척하고 Mayer's Haematoxylin (Sigma, St. Louis, MO)으로 대조 염색한 후 광학 현미경 (LSM-410; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)하에서 관찰하였다.

6. 간세포로의 분화 확인

1) Immunoblotting을 이용한 간세포 배양액에서 알부민 확인

3주간 분화 유도 후, serum-free DMEM-LG로 20시간 동안 배양한 배양액을 얻었다. 이 배양액에

동량의 sample buffer (0.125M Tris-HCl, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, pH 6.8)를 섞어주고, 95°C에서 3분간 끓였다. 준비된 시료는 8% SDS-polyacrylamide gel에서 pre-stained protein molecular marker와 함께 전기영동법으로 분리하였다. 전기영동 후 gel은 25 mM Tris (pH 8.4), 192 mM glycine, 10% methanol이 포함된 transfer buffer에서 30분간 전 처리하였다. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore)은 absolute methanol에서 15분, distilled water (D.W.)에서 2분, transfer buffer에서 5분간 equilibration시켰다. Gel 상의 단백질들은 4°C에서 60분 동안 100 V의 전류를 주어 PVDF membrane으로 electrotransfer 하였다. Non-specific binding sites를 saturation 시키기 위해서 membrane을 5% BSA가 첨가된 washing buffer (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.14% Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0.02% KH₂PO₄, 0.2% Tween 20, 0.1% BSA and 10 mM sodium azide)에서 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 이 후 1% normal goat serum과 1 µg/mL mouse monoclonal anti-human albumin antibody가 포함된 washing buffer에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 여러 번 세척한 다음, 1:100으로 희석된 gold-labeled goat anti-mouse IgG가 첨가된 washing buffer에 1시간 동안 반응시켰다. 사람의 알부민은 IntenSE BL kit (Amersham, Buckinghamshire, England)를 이용하여 확인하였다.

2) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용한 간세포 배양액에서 알부민 확인

3주간 분화 유도 후, serum-free DMEM-LG로 20시간 동안 처리한 배양액을 얻었다. 배양액 내로 분리된 사람의 알부민 단백질 농도를 human albumin ELISA kit (Philadelphia, PA)를 이용하여 확인하였다.

3) Periodic acid-schiffs (PAS) staining

제대유래 줄기세포를 slide chamber에서 3주간 분화 배양한 후, 2% paraformaldehyde가 함유된 DPBS 용액을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 고정하였다.

0.1% Triton X-100가 함유된 DPBS를 10분간 처리하고 여러 번 세척한 후 1% periodic acid로 실온에서 10분간 산화시키고, D.W.로 3번 세척하였다. 실온에서 30분간 schiff's reagent로 처리한 다음 Mayer's Haematoxylin로 대조 염색하고 광학 현미경 시야에서 확인하였다.

4) 요소 합성 측정

3주간 분화 유도 후, 5 mM NH₄Cl가 첨가된 serum-free DMEM-LG로 20시간 동안 처리한 배양액을 얻었다. 배양액 내로 합성되어 분비된 요소의 농도를 colormetric assay kit (Hayward, CA)를 이용하여 측정하였다.

7. 통계적 분석

통계학적 분석은 SPSS 12.0 프로그램을 이용하였다. 각 그룹의 데이터는 평균값과 표준오차 (mean ± SEM)로 나타내었고 그룹간의 평균값의 비교는 ANOVA (one - way analysis of variance)를 사용하였다. P 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 제대와 양막유래 줄기세포의 특성 분석

1) 형태학적 분석

두 종류의 세포 모두에서 배양 시작 1주일 후에 많은 섬유아세포들과 형태적으로 유사한 세포들이 관찰되었다. 이들은 군집을 형성한 채로 확장하여 3주째에는 이 세포들이 플라스크 전체를 차지하였다. 각 종류의 세포들을 1주일마다 계대 배양한 결과 제대유래 줄기세포는 10회 정도의 계대 배양이 가능하였으며, 그 이후에는 세포들의 모양이 커지고 편평해지면서 세포분열을 멈추었다 (Figure 1). 양막유래 줄기세포는 세포 성장과 증식능력이 제대유래 줄기세포 보다 현저하게 증가하여 13회 정도의 계대 배양이 가능하였고 이후의 변화는 제대유래 줄기세포와 유사하였다 (Figure 1).

2) 유전자 발현 분석

각각 세 번째 계대의 제대유래 줄기세포와 양막유래 줄기세포의 유전자 발현 양상을 조사하였다. Oct-4, SCF, FGF-5, NCAM, nestin, vimentin, CK18, GATA-4, BMP-4, HLA ABC 그리고 HLA DR 유전자는 양막 및 제대유래 줄기세포 모두 발현하였고, Brachyury와 BMP-2 유전자는 모두 발현하지 않았다. 배아줄기세포 표지인자인 Rex-1 유전자는 양막유래 줄기세포에서, Pax-6 유전자는 제대유래 줄기세포에서만 발현되었다. 두 종류의 줄기세포에서 간세포 특이 유전자 발현 특성을 조사한 결과, CK-19, HNF-4 α , CYP3A4 그리고 α 1-AT 유전자는 두 줄기세포 모두에서 발현되었으며 HNF-1 α , PEPCK, c-MET, transferrin 그리고 GS 유전자는 제대유래 줄기세포에서만 발현되었다. CPS-1, TDO, TTR, CX32, α FP 그리고 albumin 유전자는 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포 모두에서 발현되지 않았다. 이러한 결과들은 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 간세포로의 분화 가능성이 더 많다는 것을 보여 준다 (Figure 1C).

3) 면역세포화학 분석

세 번째 계대의 제대유래 줄기세포와 네 번째 계대의 양막유래 줄기세포에서 단백질 발현 양상을 조사하였다. 제대유래 줄기세포는 TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4, Thy-1, α -SMA, vimentin, desmin, CD44, CD54, vWF, FSP 그리고 HLA ABC의 단백질을 발현하였다. 특히 SSEA-3, α -SMA, vimentin, CD44 그리고 HLA ABC 단백질이 강하게 발현되었다. CD31 그리고 HLA DR 단백질은 발현되지 않았다. 양막유래 줄기세포는 CD44, CD54, α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, FSP 그리고 HLA ABC 단백질을 발현하였는데 특히 α -SMA, FSP 그리고 HLA ABC 단백질을 강하게 발현하였고 CD106, CD-31, vWF 그리고 HLA DR 단백질은 발현하지 않았다 (Figure 1D, Table 2). 그러나 분리, 증식된 줄기세포가 각각의 특정 단백질을 모두 발현하는 것은 아니므로 더 정확한 줄기세포의 순수도를 알아보고자 한다면 유세포분리기 (fluorescence activated

cell sorting, FACS)와 같은 실험 방법을 이용하여야 할 것이다.

4) 체외분화능력

체대유래 줄기세포와 양막유래 줄기세포의 지방

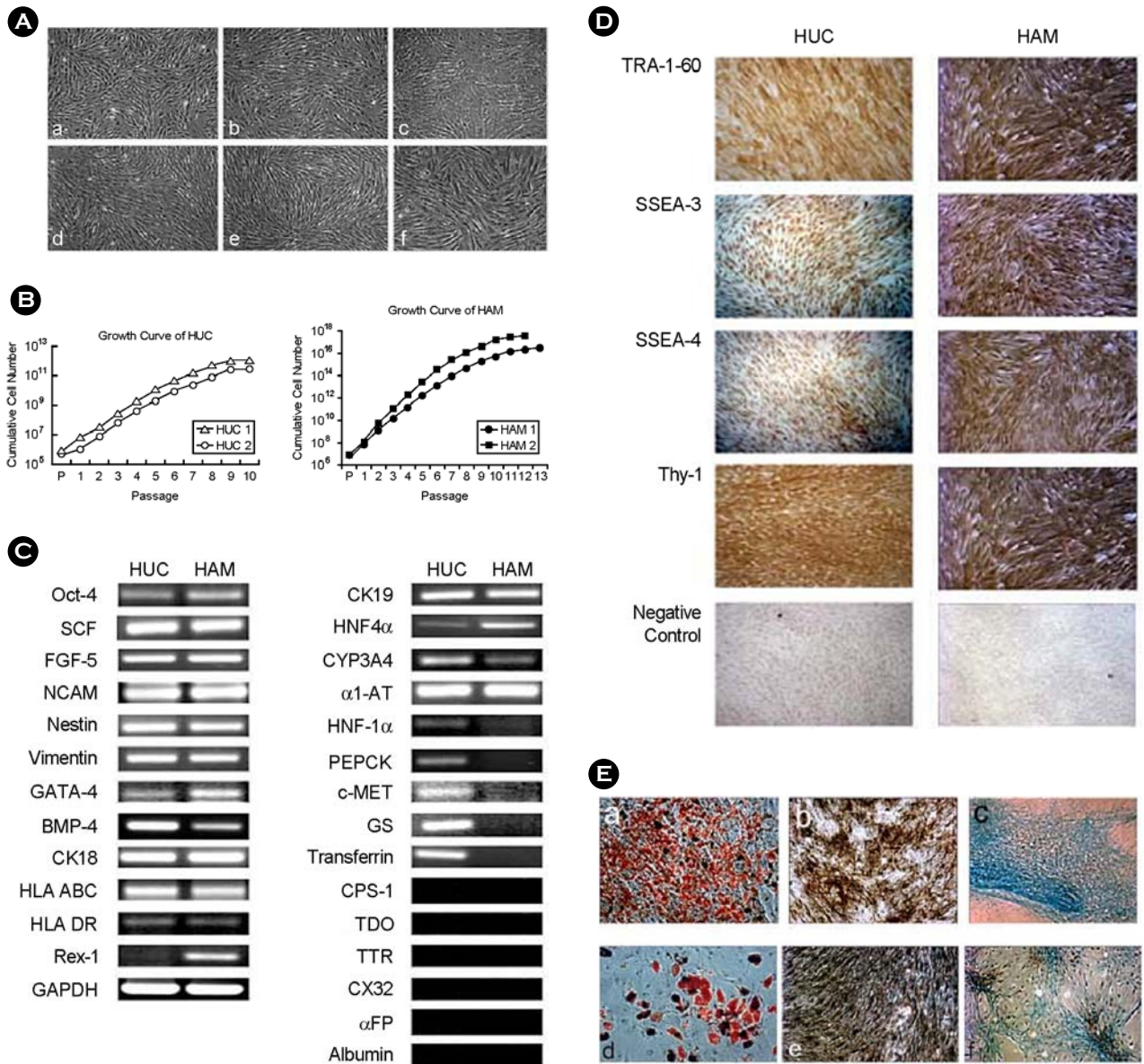


Figure 1. Characterization of human umbilical cord-derived stem cells (HUC) and human amnion-derived mesenchymal stem cells (HAM). **A**, Morphology of HUC and HAM during *ex vivo* expansion. a, 25 days after initiation of the culture for HUC (1st passage); b, 40 days from the culture for HUC (4th passage); c, 87 days from the culture for HUC (10th passage); d, 32 days after initiation of the culture for HAM (1st passage); e, 53 days from the culture for HAM (4th passage); f, 109 days from the culture for HAM (10th passage). Magnification, $\times 40$. **B**, Growth curve of HUC and HAM. **C**, Expression patterns of stem cell specific genes and hepatocyte-related genes in HUC and HAM at 3rd passage. **D**, Immunocytochemical analysis of HUC and HAM. Cells showed strong immunoreactivity with antibodies against TRA-1-60, SSEA-3, -4, Thy-1. Nuclei were counterstained with haematoxylin. Magnification: 40. **E**, Differentiation potential of HUC and HAM. HUC (a, b and c) and HAM (d, e and f) at the 4th passage were incubated in adipogenic (a, c), osteogenic (b, e), or chondrogenic (c, f) medium. Specific differentiation capability was assessed by oil red O, von kossa and alcian blue staining. Magnification, $\times 40$.

Table 2. Immunocytochemical analysis of proteins expressed by HUC and HAM

Proteins	HUC 3rd	HAM 4th	
Cytoskeletal markers	α -SMA	++	++
	Vimentin	++	+
	Desmin	+	+
Surface antigens	CD44	++	+
	CD54	+	+
	CD106	+	-
	FSP	+	++
Endothelial cell markers	vWF	+	-
	CD31	-	-
HLA	HLA ABC	++	++
	HLA DR	-	-

세포, 골아세포 그리고 연골세포로의 분화능력을 분석하였다. 제대와 양막에서 얻은 각각 4번째 계대의 세포를 지방세포 분화 배양액에서 2주간 배양 후, oil red O 염색을 시행한 결과 두 종류의 세포 모두 지방이 축적된 지방세포를 보여 주었고, 골세포 분화 배양액에서 2주간 배양 후, von Kossa 염색을 시행한 결과 칼슘이 침착된 골아세포가 관찰되었다. 또한 3주간 연골세포 분화 배양액에서 배양한 후 염색한 결과 두 종류의 세포 모두 alcian blue에 대해 강하게 염색되었다 (Figure 1E).

2. 다양한 분화 배양액을 이용한 제대와 양막유래 줄기세포의 hepatocyte-like cells로의 분화 유도

제대와 양막유래 줄기세포를 '재료 및 방법'에서 설명한 바와 같은 세 가지 분화 배양 방법으로 각각 3주 동안 배양한 후 배양액을 얻어, 배양액 내로 분비된 사람 알부민 단백질의 농도를 측정하고 또한 합성된 요소의 농도를 측정하였다.

분화 방법 1의 경우, 제대유래 줄기세포는 $0.29 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ 의 알부민 단백질을 BMDF4 분화조건에

서 배양액 내로 분비하였고 동일 조건에서 양막유래 줄기세포는 $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 의 알부민을 분비하였다 (Figure 2A). 또한 배양액 내 요소의 농도를 측정한 결과, BMDF4 분화조건에서 제대유래 줄기세포는 $6.7 \pm 0.5 \text{ mg/dL}$, 양막유래 줄기세포는 $4.7 \pm 0.35 \text{ mg/dL}$ 의 요소를 합성하였다 (Figure 2D). 분화 방법 2의 경우, HIAF4OD 분화조건에서 각각 제대유래 줄기세포는 $0.35 \pm 0.023 \mu\text{g/mL}$, 양막유래 줄기세포는 $0.16 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 알부민을 분비하였으며 요소는 각각 제대유래 줄기세포가 $8.4 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$ 그리고 양막유래 줄기세포가 $4.8 \pm 0.04 \text{ mg/dL}$ 의 농도로 합성하였다 (Figure 2B, E). 분화 방법 3의 경우 BMDF4 분화조건에서 제대유래 줄기세포는 $0.66 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, 양막유래 줄기세포는 $0.22 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 알부민을 분비하였고 합성된 요소의 농도는 제대유래 줄기세포가 $9.7 \pm 1.9 \text{ mg/dL}$, 양막유래 줄기세포는 $5.1 \pm 0.6 \text{ mg/dL}$ 이었다 (Figure 2C, F).

세 가지 분화 방법에 상관없이 모든 동일 조건에서 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 알부민과 요소를 더 많이 배양액 내로 분비 혹은 합성하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 위 분화 조건에서는 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 간세포로의 분화능력이 더 뛰어난 것을 의미한다.

3. 제대유래 줄기세포의 hepatocyte-like cells로의 분화 시 최적의 분화 방법과 분화 검증

제대유래 줄기세포를 hepatocyte-like cells로 분화시키는 데 있어 더 많은 알부민을 합성 분비할 수 있는 최적의 분화조건을 찾기 위하여 분화 방법 4를 시행하였다. 분화 방법 4는 DMEM-LG에 10% FBS, $1 \times \text{ITS premix}$ 그리고 10^{-4} M Asc 가 첨가된 배양액을 기본분화 배양액 (BM)으로 하였다. BM에 10 ng/mL EGF와 10 ng/mL FGF4를 첨가한 배양액에 3일간 배양하고 이후 기본분화 배양액에 20 ng/mL HGF, 20 ng/mL FGF4와 0.1% 또는 1% DMSO를 첨가한 배양액에서 7일간 더 배양한 후, 다시 기본분

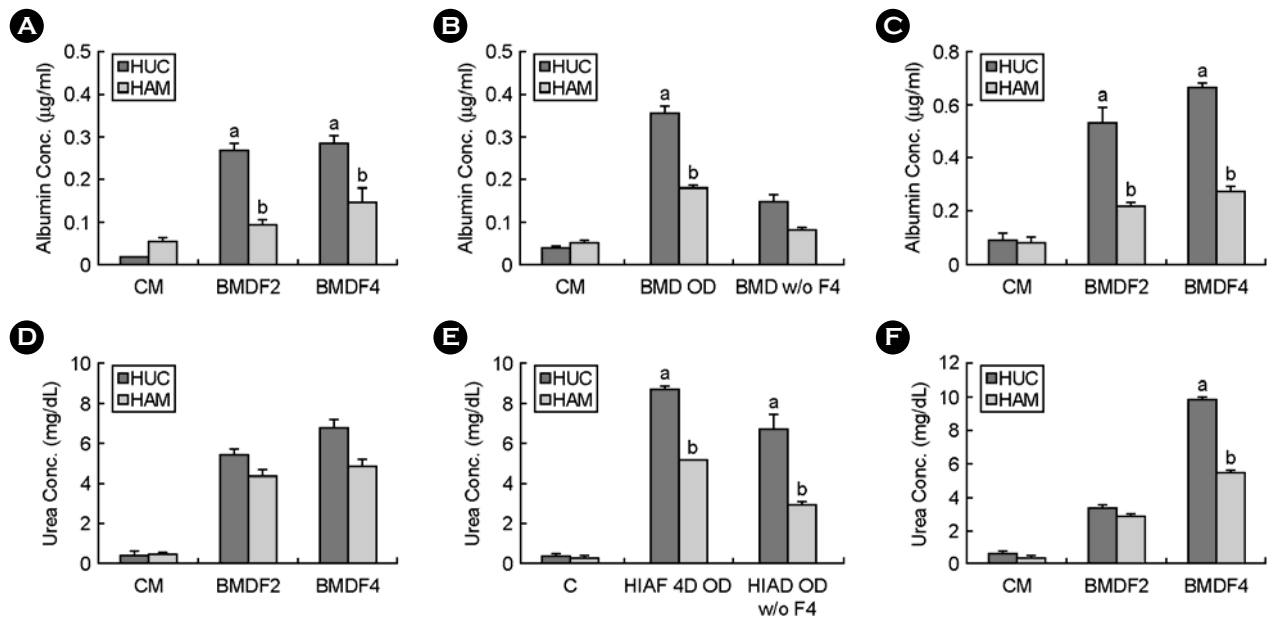


Figure 2. Comparison of differentiation in HUC- and HAM-derived hepatocytes. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks *in vitro*. HUC and HAM were cultured in three types of hepatogenic medium. As a control, HUC and HAM were cultured in DMEM-LG containing 10% FBS alone (control medium, CM). **A, B, C,** After culture for 3 weeks, all groups of HUC and HAM were starved for 20 h in serum free DMEM-LG. The conditioned medium was used for human albumin ELISA. **D, E, F,** After culture for 3 weeks, all groups of HUC and HAM were stimulated overnight in DMEM-LG with 5 mM NH₄Cl. The conditioned medium was used for urea secretion assay. Data are means ± SEM of two independent experiments. Letters above bars denote a statistically significant difference. P<0.05.

화 배양액에 20 ng/mL OSM과 1 µM Dex를 넣고, 20 ng/mL HGF를 첨가하거나 첨가하지 않고 14일 동안 더 배양하였다.

1) Hepatocyte-like cells로의 분화 과정 동안의 제대유래 줄기세포의 모양 변화

분화 10일째에 각 배양조건의 세포를 관찰한 결과, 대조군의 세포는 섬유아세포와 유사한 형태를 유지하고 있었다. 그러나 같은 시기에 DMSO를 첨가하여 배양한 세포는 다각형 (polygonal) 혹은 둥근형 (round)으로 모양이 변화하였다. 특히 0.1% DMSO보다 1% DMSO를 첨가한 실험군의 모양이 더 많이 변화하였다. 분화 21일째에는 대조군의 세포는 여전히 섬유세포의 형태를 유지한 반면, 모든 실험군의 세포의 형태는 대부분 다각형 모양이나 둥근 모양이었고 대신 실험군에서는 3주 후 세포의 수가 크게 증가하였다. 각 실험군 사이의 차이점은 없었다 (Figure 3A).

2) 간세포 특이 유전자 발현

분화 방법 4를 이용하여 배양한 세포에서 간세포 특이 유전자 발현 양상을 살펴 본 결과, CK19, GS, α1-AT, HNF-4α, HNF-1α, PEPCK, CYP3A4, transferrin 그리고 c-MET 유전자는 분화를 유도하지 않은 세포와 분화를 유도한 세포에서 모두 발현되었다. 이들 중 HNF-1α, PEPCK, CYP3A4, transferrin 그리고 c-MET 유전자의 경우 분화를 유도하였을 때 발현량이 증가하였으며, 특히 transferrin과 c-MET 유전자는 DM4 조건에서 발현량이 현저하게 증가하였다. CPS-1, TDO, TTR 그리고 αFP 유전자의 경우는 분화를 유도하지 않은 세포에서는 발현되지 않았으나, 분화를 유도한 세포에서는 발현되었다. CPS-1과 TDO 유전자는 분화조건에 상관없이 발현량이 비슷하게 증가하였으나, TTR 유전자는 DM3 분화조건의 세포에서 발현량이 현저히 증가하였고, αFP 유전자는 다른 분화조건보다 DM3와 DM4 분화조

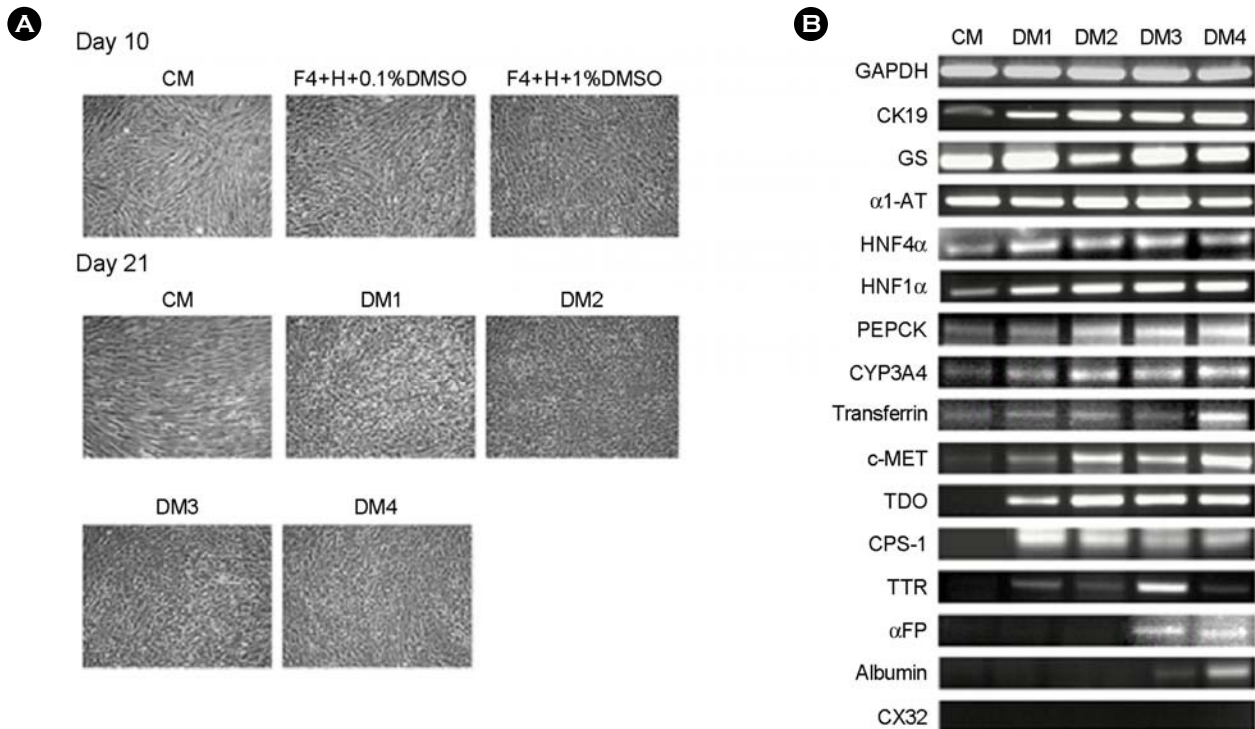


Figure 3. Analyses of HUC-derived hepatocytes. HUC were cultured on optimal medium for hepatic differentiation. The 1st step, HUC were cultured in basal medium (BM) (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd step, HUC were cultured again BM supplemented with FGF4, HGF, and 0.1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (differentiation medium (DM) 1) or supplemented with OSM and DEX (DM2) for more 14 days. HUC were cultured again following the above the two steps with 1% DMSO instead of 0.1% DMSO. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM3) and supplemented with OSM and DEX (DM4) for more 14 days. **A**, Change of morphology of HUC during induction into hepatocytes for 3 weeks in vitro. Magnification, $\times 40$. **B**, Hepatocyte-related specific gene expression by HUC after differentiation for 3 weeks in vitro. These experiments were confirmed with two independent experiments.

건에서 현저하게 증가하였다. 알부민 유전자의 경우 DM3 분화조건에서 약하게 발현되었고, DM4 분화조건에서 강하게 발현되는 것으로 나타났다 (Figure 3B).

3) Hepatocyte-like cells로의 분화 유도 후 알부민 합성 및 분비

제대유래 줄기세포를 DM1, DM2, DM3 그리고 DM4의 분화 배양액에 3주 동안 분화를 유도하고 알부민의 분비량을 조사하였다. 분화 배양이 끝난 세포를 serum-free DMEM-LG에서 20시간 동안 배양한 후 이 때의 배양액을 얻어 ELISA, 단백질 전기영동, 면역블로팅 방법으로 알부민의 정량 및 정성 분석을 실시하였다.

ELISA 분석 결과, DMEM-LG에 10% FBS만 첨가하여 3주 동안 배양한 세포들은 $0.14 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 의 알부민을 분비하였다. 각각의 분화조건, DM1에서는 $0.30 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$, DM2에서는 $0.46 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$, DM3에서는 $0.68 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ 그리고 DM4에서는 $1.2 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ 의 알부민을 분비하였다 (Figure 4A).

또한 SDS-전기영동의 결과, 분화를 유도하지 않은 세포의 배양액에서는 알부민이 검출되지 않았으나, 분화를 유도한 세포에서는 66 kDa의 분자량을 갖는 알부민이 관찰되었으며, 특히 DM4 분화조건으로 배양된 세포들의 배양액에서 상대적으로 가장 많은 양의 알부민이 검출되었다 (Figure 4B).

면역블로팅의 결과 이 단백질들은 사람 알부민인 것으로 나타났다 (Figure 4C). 알부민 분비에 가장 효과적인 DM4 분화조건에서 분화 배양된 세포를 세포면역화학염색 방법을 이용하여 분석한 분화를 유도하지 않은 대조군의 세포는 알부민 염색을 거의 보이지 않았지만, DM4 분화조건에서 배양된 세포들은 매우 강하게 염색되었다 (Figure 4D).

이러한 결과들은 DM4 분화조건이 제대유래 줄기세포를 알부민을 분비하는 간세포로 분화시키는데 가장 효과적인 방법인 것을 보여 준다.

4) 분화를 유도한 제대유래 줄기세포의 간세포 기능 검사

Hepatocyte-like cells로 분화 유도된 세포가 간세포 기능 중의 하나인 요소 합성을 할 수 있는지를

알아보기 위하여, DM1, DM2, DM3 그리고 DM4의 분화조건에서 3주간 배양한 후, 5 mM NH₄Cl가 첨가된 serum-free DMEM-LG로 20시간 동안 처리하고 배양액을 얻었다. 그 결과 DMEM-LG에 10% FBS만 첨가하여 3주 동안 배양한 세포들은 0.63±0.2 mg/dL의 요소를 합성, 배양액 내로 분비한 반면, DM1에서는 3.2±0.4 mg/dL, DM2에서는 4.83±0.5 mg/dL, DM3에서는 7.23±1.0 mg/dL 그리고 DM4에서는 8.9±1.2 mg/dL의 농도로 요소를 합성하였다 (Figure 5A). 앞에서의 알부민 분비 분석 결과와 함께 고려해 볼 때 이 결과는 DM4 분화조건이 제대유래 줄기세포를 알부민을 분비하는 간세포로 분화시키는데 가장 효과적인 방법인 것을 보여 준다.

한편 간세포의 기능 중의 하나인 글리코젠 저장

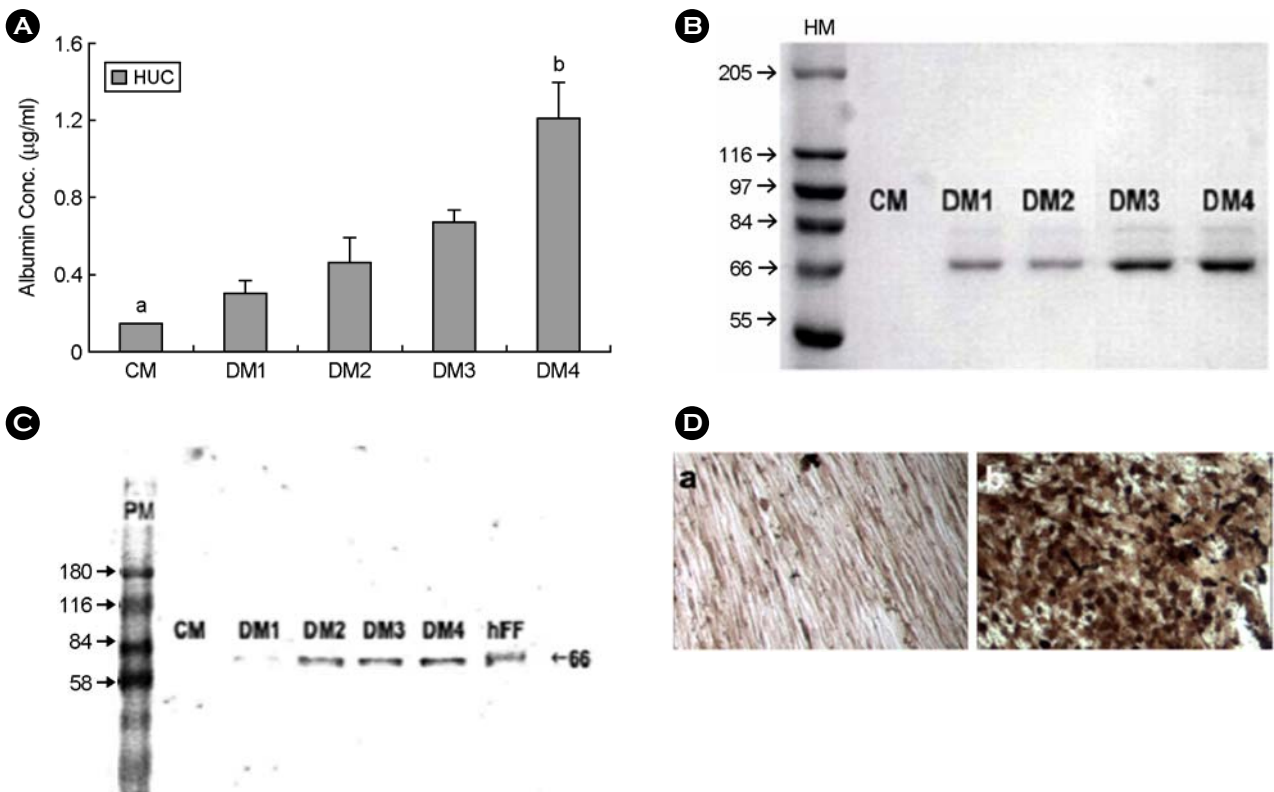


Figure 4. Secretion of albumin by HUC-derived hepatocytes was assayed with ELISA, comassie staining, immunoblotting and immunocytochemistry. HUC were cultured in hepatogenic medium for 3 weeks and then starved for 20 h in serum free DMEM-LG. The conditioned medium was used for assay for human albumin. **A**, ELISA assay of human albumin. Letters above bars denote a statistically significant difference. P<0.05. **B**, Comassie staining. **C**, Immunoblotting analysis by mouse monoclonal anti-human antibodies. HM, high molecular markers; PM, prestained markers; CM, control medium. **D**, Immunocytochemical analysis. Immunoreactivities were assessed using monoclonal anti-human antibodies. As a control, HUC were cultured in DMEM-LG containing 10% FBS alone (CM).

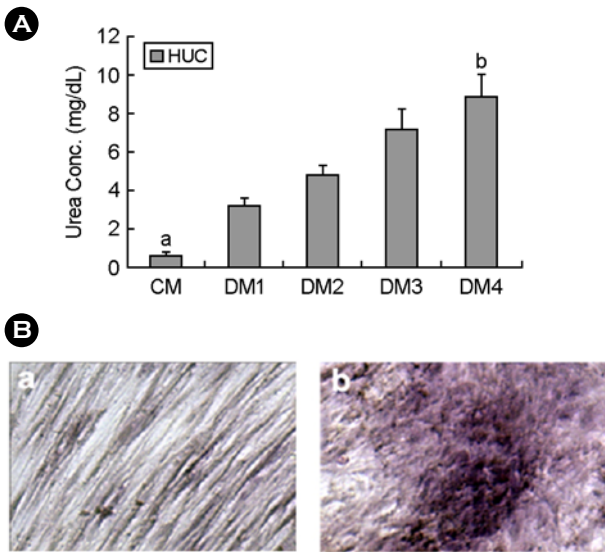


Figure 5. Functional test of HUC. **A**, HUC were stimulated overnight in serum-free DMEM-LG with 5 mM NH₄Cl after culture in hepatogenic medium. The conditioned medium was used for urea secretion assay. Data are means \pm SEM of three independent experiments. Letters above bars denote a statistically significant difference. $P < 0.05$. **B**, HUC cultured in hepatogenic medium for 3 weeks showed the cytoplasmic glycogen deposition stained with PAS staining (b). However, HUC cultured in medium without hepatogenic supplements did not display a positive reaction PAS staining (a). Magnification, $\times 40$.

능력을 알아보기 위하여 DM4 조건에서 배양한 세포를 PAS 염색을 이용하여 확인하였다. 분화를 유도하지 않은 세포는 PAS 염색에 대한 반응을 거의 나타내지 않았으나, DM4 분화조건으로 분화를 유도한 경우, 제대유래 줄기세포는 뚜렷한 염색을 나타냄으로써 글리코젠을 저장하는 것을 관찰하였다 (Figure 5B).

고찰

줄기세포는 재생의학과 조직, 기관 대체 면에서 임상적으로 대단한 가능성이 있는 분야로서 줄기세포를 활용하는 장기 복원 기술은 앞으로의 기존 장기이식의 제한점을 극복할 수 있을 것으로 전망된다. 성체 중간엽 줄기세포의 장점으로는 쉽게 분리할 수 있고 임상적 적용을 위해 비교적 쉽게 양

을 늘릴 수 있고, 자신의 중간엽 줄기세포를 사용할 수 있기 때문에 거부반응의 위험이 없다.

최근 연구 결과에 의하면 사람 제대의 혈관들을 둘러싸는 결합조직 기질인 wharton's jelly로부터 중간엽 줄기세포를 분리, 배양할 수 있으며, 이들 세포는 지방세포, 골아세포, 연골세포, 심장근육세포, skeletal myocyte, neuronal/glia precursor, dopaminergic 신경세포 그리고 혈관내피세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 보여준다.^{13,14} 한편 양막은 수정 후 8 일 내 배아의 상배엽에서 유래된 조직으로 이로부터 분리된 세포들은 배양조건에 따라 acetylcholine, norepinephrine, dopamine과 같은 신경전달물질을 분비하는 성숙한 신경세포로 분화할 수 있으며, 또한 심장근육세포, 지방세포, 연골세포, 골아세포와 같은 중배엽세포로도 분화할 수 있는 능력을 갖고 있다.⁸ 본 연구에서도 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포가 지방세포, 골아세포 그리고 연골세포로 분화되는 것을 확인하였다. 제대유래 줄기세포와 양막유래 줄기세포는 골수유래 중간엽 줄기세포에서는 발현되지 않는 BMP-4, GATA-4, HNF-4 α , nestin 그리고 NCAM 유전자를 발현하였다. 이 중 BMP-4는 연골 형성, 관절 복구, 뼈 형성에 관여하는 것으로 알려져 있고,¹⁵ GATA-4는 심장 유전자 발현의 중요한 조절 기능을 가지며 배아발달과 심장근육세포로의 분화를 조절한다.^{16,17} Nestin은 신경줄기세포의 특이 표지자로서 심장근육세포들에서도 발현된다.¹⁸ 또한 양막유래 줄기세포는 배아줄기세포의 표지자인 Oct-4와 Rex-1 유전자를 발현하였으며, 제대유래 줄기세포는 Oct-4 유전자만 발현하였다. Covas 등은¹⁹ 제대 정맥의 내피와 내피하세포 유래 중간엽 줄기세포를 조사한 결과가 이 세포들은 CD29, CD13, CD44, CD49, CD54, CD90 그리고 HLA ABC 단백질을 발현하고 CD45, CD14, glycophorin A, HLA DR, CD51/61, CD106과 CD49d 단백질은 발현하지 않았다고 보고하였다. Karahuseyinoglu 등²⁰ 역시 유세포분석기를 통해 분석된 제대유래 줄기세포에서 CD105, CD73 그리고 CD44가 발현되었고 CD45, CD34, CD14 그리고

HLA DR은 발현되지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서의 제대와 양막유래 줄기세포는 세포골격단백질인 α -SMA, vimentin, desmin과 세포표면항원인 CD44 (HCAM), CD54 (ICAM-1), FSP를 발현하였다. 면역적합성과 관련된 HLA ABC의 경우, 골수와^{21,22} 제대혈과²³ 마찬가지로 제대와 양막유래 줄기세포에서 강하게 발현되었지만 HLA DR은 발현되지 않았다. 한편 골수에서는 발현되지 않는 배아암세포와 배아줄기세포의 전형적인 표지자인 TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4 그리고 중배엽 줄기세포 표지자인 Thy-1 (CD90)이 발현되었는데 이 결과로 미루어 제대와 양막유래 줄기세포는 골수나 제대혈 등 다른 성체줄기세포와 비교하여 볼 때, 배아줄기세포와 더 유사성을 가지는 것으로 보이며 더불어 골수유래 중간엽 줄기세포를 대체하여 세포치료제로서 사용될 수 있을 것으로 기대되어진다.

간 경화로 인한 간 부전의 가장 좋은 치료 방법은 공여자가 있는 경우 동종 간 이식이지만 공여자가 절대적으로 부족한 현실이다. 줄기세포에서 유도된 간세포의 이식은 말기 간 기능 장애를 가진 환자를 치료하는 데 있어서 간 이식보다 훨씬 안전하고 유용하며 쉽다. 근래의 연구에 의하면 인간의 배아줄기세포는 간세포로 분화할 수 있고,^{24,25} 미분화 배아줄기세포를 간질환 쥐에 이식했을 경우 배아줄기세포는 체외에서와 같이 간세포로 분화할 수 있다.²⁶ 성체줄기세포인 골수유래 중간엽 줄기세포나²⁶ 지방유래 줄기세포도²⁷ 간세포로 분화가 가능한데²⁵ 최근에 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포를 이용하여 체외에서 간세포 유사세포로 분화를 유도했다는 보고가 있다.^{12,28}

본 연구에서 제대와 양막유래 줄기세포에서 간세포 특이 유전자의 발현을 조사하였다. 그 결과 간세포로의 분화에 중요하다고 알려진 HNF-4 α 와 HNF-1 α , 내배엽 계열 특이 유전자 중 하나로 간세포 분화의 표지자인 CK19, CYP3A4, α 1-AT 유전자가 두 종류의 세포 모두에서 발현되었다. 그러나 HNF-1 α , PEPCCK, c-MET, GS, CPS-1 등의 간세포 특이 유전자는 제대유래 줄기세포에서만 발현되었다.

이러한 결과로 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 간세포로의 분화 가능성이 더 높은 것으로 사료된다.

줄기세포의 간세포로의 분화 과정에는 다양한 성장인자와 cytokines이 관여하여 단계별로 진행되는 것으로 알려져 있다.²⁹ Dexamethason은 합성 glucocorticoid로서 간세포 배양 시에 알부민 분비를 안정화 시키고 tyrosine aminotransferase 분비를 유도하는 등 간세포로의 성숙에 필수적이다.³⁰ Oncostatin M은 조혈모세포에 의해 생성된 interleukin-6 계열의 cytokine 중 하나로 태아의 조혈작용과 간 분화에 관여하며 간세포의 체외 배양 시 세포의 크기를 증강시키고 성숙을 유도한다.^{31,32} 특히 dexamethason과 함께 작용하여 간세포로의 분화를 증진시킨다.^{31,32} 그러나 이러한 첨가물 외에도 간세포로의 최종적 분화를 이루기 위해서는 부가적인 물질들이 필요하다. Collogen이나 fibronectin과 같은 ECM 단백질은 분화 유도 시 알부민, α FP 그리고 HNF-4 α 의 발현을 증가시킨다.³³ 본 연구에서 제대 및 양막유래 줄기세포를 간세포로 분화시키기 위하여 세포 배양접시를 fibronectin으로 도포하고 세 가지의 분화 배양 방법을 사용하였다. 그 결과 모든 조건에서 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 알부민을 더 많이 합성 분비하는 것으로 나타났고 이러한 분화 유도에는 HGF, FGF4, OSM, Dex 그리고 DMSO의 첨가가 중요한 것으로 나타났다. HGF는 EGF보다 배양에서 인간 간세포를 증식시키는 훨씬 강력한 인자로서 간 발달과 재생에 중요한 역할을 한다.^{34,35} FGF4는 골수유래 줄기세포의 배양 시 HGF만을 처리한 경우들보다 간세포로의 분화를 훨씬 더 증가시킨다.³⁶ 또한 지방유래 줄기세포의 경우 DMSO는 알부민 생성과 세포 내 글리코겐 함량을 증가시킨다.²⁷ FGF4는 초기에 내배엽을 형성하고 설계하는 데 중요한 역할을 담당하고, FGF4 단독 혹은 HGF와 함께 사용 시 체외에서 간세포로의 분화를 유도한다.³⁷ 본 연구의 경우에도 제대와 양막유래 줄기세포를 간세포로 분화 유도 시, 배양액에 DMSO와 FGF4를 첨가한 분화조건에서 알부

민 합성과 요소 합성이 증가되는 양상을 나타냈다. 제대유래 줄기세포를 이용하여 알부민을 더 많이 분비할 수 있는 최적의 분화조건을 확립하기 위하여 DMEM-LG에 ITS 그리고 Asc가 첨가된 배양액을 기본 배양액으로 하여 EGF와 FGF4를 첨가한 배양액에서 3일, HGF와 FGF4와 DMSO를 첨가한 배양액에서 7일, 마지막으로 OSM과 Dex를 첨가한 배양액에서 14일 동안 더 배양하였다. 그 결과 후기 간세포 유도 단계에서는 HGF를 첨가하지 않고 OSM과 Dex만 첨가한 배양액이 알부민이 더 많이 분비되는 것이 관찰되었다. 알부민은 간세포에 의해 합성되는 주요 단백질로서 간 발생 시 초기 시기부터 합성되며 성체의 간에서 가장 많이 만들어진다. 특히 알부민 분비는 배양액 내에 첨가된 성장인자와 호르몬 등에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다.³⁸ 따라서 줄기세포의 간세포로의 분화를 증명하기 위해서는 알부민의 분비량을 검사하는 것이 중요하다. 최근의 연구 결과에 의하면 사람의 지방유래 줄기세포를 간유사세포로 분화시킨 후 얻은 배양액에서 2 ng/mL/100,000 cells/3 days의 알부민을 얻었으며,³⁹ 배아줄기세포를 간유사세포로 분화시킨 후 얻은 배양액에서도 100 ng/mL/4 h의 알부민을 얻었다.²⁵ 본 연구의 결과도 제대유래 줄기세포를 분화시킨 후 얻은 배양액에서 1.2 ± 0.8 µg/mL/300000 cells/20 h의 알부민을 얻을 수 있었는데 이는 다른 논문 결과와 정확한 비교는 되지 않지만 훨씬 더 많은 양이다. 이제까지의 다른 연구들은 분화 배양액 내의 알부민을 ELISA 방법으로만 확인을 하였지만 본 연구에서는 ELISA 방법 이외에 추가적으로 SDS-PAGE 전기영동으로 배양액 내의 알부민을 확인하고 사람 알부민에 대한 특이 항체를 이용하여 실험 결과를 검증하였다. 또한 분화 후 간세포 특이 유전자의 발현을 조사한 결과 HNF-1α, PEPCK, CYP3A4, transferrin 그리고 c-MET 유전자는 분화를 유도하였을 때 발현양이 더 증가하였으며 TDO, CPS-1, TTR, αFP 그리고 알부민 유전자의 경우는 분화를 유도하지 않은 세포에서는 발현되지 않았고 분화를 유도한 세포에서

만 발현되었다. Talens-Visconti 등에⁴⁰ 의하면 지방세포 유래 줄기세포에서 알부민은 간세포의 분화가 진행될수록 발현이 증가하였고 CYP 계열 역시 분화한 간세포에서 분화 전 세포에 비해 의미 있게 발현이 증가하였다고 보고하였다.

간세포의 또다른 특징은 글리코젠의 저장과 요소의 합성이다. Chien 등은³⁷ 간세포로 분화 유도된 태반유래 줄기세포에서는 PAS 염색을 관찰하였으나 간세포로 분화하지 않은 태반유래 줄기세포에서는 관찰할 수 없었다고 보고하였다. 본 논문에서도 간세포로 분화된 제대유래 줄기세포의 기능 검증으로 PAS 염색을 실시하여 세포 내에 글리코젠을 축적되는 것을 관찰하였다. 최근 결과를 살펴보면 간유사세포로 분화시킨 후, 사람의 골수유래 중간엽 줄기세포에서는 2.4±0.5 mM /30,000/24,²⁶ umbilical cord matrix stem cell (UCMSC)에서는 0.75 mM /10,000/24 h,²⁸의 요소합성능력을 관찰하였다. 본 연구의 제대유래 줄기세포에서는 8.9±1.2 mg/dL/300,000 cells/20 h의 요소를 합성, 분비하였다.

줄기세포를 특정한 기능을 가지는 세포로 유도하는 연구에 있어서는 분화의 효율성도 중요하다. 최적의 분화조건에서 분화를 유도한다 하더라도 배양하는 줄기세포 모두가 간세포로 만들어 지는 것은 아니다. 위에서 언급한 알부민의 양과 요소의 합성량은 모두 배양액 내로 분비되어진 것을 측정 한 것이므로 주어진 줄기세포가 과연 얼마나 간세포로 분화했는지에 대한 직접적인 증거는 아니다. 세포를 PAS 염색을 하여 현미경하에서 염색된 세포와 아닌 세포의 수를 비교한다 하더라도 실제 완전히 신뢰할 수 있는 것은 아니다. 따라서 추가적인 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

인간의 제대와 양막은 분만 후 흔히 폐기 처리되는 조직이다. 본 연구에서는 제대와 양막을 얻어 줄기세포를 분리, 배양하고, 줄기세포로서의 특성을 확인하였고 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 간세포로의 분화 가능성이 높음을 관찰하였다. 여러 분화 방법을 이용하여 간세포로의 분화를 유도하여 제대유래 줄기세포에서 가장 간

세포 분화 유도가 잘되는 배양조건을 제시할 수 있었다. 이러한 연구가 줄기세포치료에 도움이 되고 향후 간질환 환자의 간세포 이식 치료를 향상시킬 수 있으리라 생각된다. 앞으로 양막, 제대에서 줄기세포를 확립하고 양막유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포에서 최적의 간세포 분화조건을 확립하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하며 또한 양막과 제대유래 줄기세포에서 분화 유도된 간유사세포가 실제 생체 내에서도 기능을 할 수 있는지를 간질환 동물을 이용하여 검증하는 등의 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-61.
- Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004; 72: 230-8.
- Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 2003; 4: 92-6.
- Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 713-34.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-402.
- Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 342-9.
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21: 105-10.
- Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation* 2007; 40: 75-90.
- Kim J, Kang HM, Kim H, Kim MR, Kwon HC, Gye MC, et al. *Ex Vivo* characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning and Stem Cells* 2007; 9: 581-95.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-75.
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-74.
- Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell* 2007; 20: 77-84.
- Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; 83: 733-8.
- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26: 591-9.
- Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T, et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 433-42.
- Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997; 11: 1048-60.
- Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 1061-72.
- Sjöberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T. Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp Cell Res* 1994; 214: 447-58.
- Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1179-83.
- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and *in vitro* surveys. *Stem Cells* 2007; 25: 319-31.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-25.
- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible

- (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117: 2971-81.
23. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-75.
 24. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriguen A, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development *in vivo*. *Stem Cells* 2008; 26: 894-902.
 25. Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo* stem cells. *Stem cells* 2007; 25: 3058-68.
 26. Lysy PA, Smets F, Najimi M, Sokal EM. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2008; Jun 13. [Epub ahead of print]
 27. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-64.
 28. Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 878-81.
 29. Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592: 303-12.
 30. Tong JZ, Bernard O, Alvarez F. Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Exp Cell Res* 1999; 189: 87-92.
 31. Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T, Sakai Y, Miyajima A. Maturation of fetal hepatocytes *in vitro* by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology* 2002; 35: 1351-9.
 32. Sakai Y, Jiang J, Kojima N, Kinoshita T, Miyajima A. Enhanced *in vitro* maturation of fetal mouse liver cells with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Cell Transplant* 2002; 11: 435-41.
 33. Sánchez A, Alvarez AM, Pagan R, Roncero C, Vilaró S, Benito M, et al. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J Hepatol* 2000; 32: 242-50.
 34. Strain AJ, Ismail T, Tsubouchi H, Arakaki N, Hishida T, Kitamura N, et al. Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1991; 87: 1853-7.
 35. Gómez-Lechón MJ, Castelli J, Guillén I, O'Connor E, Nakamura T, Fabra R, et al. Effects of hepatocyte growth factor on the growth and metabolism of human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 1995; 21: 1248-54.
 36. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
 37. Chien CC, Yen BL, Lee FK, Lai TH, Chen YC, Chan SH, et al. *In vitro* differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1759-68.
 38. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-4.
 39. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol and Hepatol* 2008; Jun 25. [Epub ahead of print].
 40. Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5834-45.

= 국문초록 =

목적: 사람의 제대유래 줄기세포 (HUC)와 양막유래 줄기세포 (HAM)를 간유사세포로 분화 시키고자 하였다.

연구방법: 산모의 동의아래 만삭 정상 산모로부터 양막 및 제대를 얻고 줄기세포를 분리, 배양하였다. 분리된 세포의 줄기세포로서의 특성을 규명하기 위하여 RT-PCR, 세포면역화학 분석 그리고 중배엽성세포로의 분화능 실험을 하였다. 또한 이들 줄기세포를 분화 배양액에서 간유사세포로 분화 유도 후, 간세포 특이 유전자 발현, 알부민 ELISA, 알부민에 대한 면역블로팅 및 세포면역화학염색 그리고 PAS 염색을 시행하였다.

결과: 사람의 양막 및 제대로부터 세포를 분리하여 줄기세포로서의 특성을 조사하고, 이들 세포의 지방세포, 연골세포, 골아세포로의 분화능력을 확인하였다. 동일한 분화 배양액에서 HUC과 HAM을 간유사세포로 분화시킨 결과 HUC이 모든 조건에서 HAM보다 알부민과 요소를 더 많이 합성 분비하였다. 간유사세포로의 분화능력이 더 좋은 것으로 나타난 HUC을 가지고 최적의 분화를 유도한 결과 $1.2 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ 의 알부민을 합성 분비하였고, $8.9 \pm 1.2 \text{ mg/dL}$ 의 요소를 합성 분비하였다.

결론: HUC과 HAM 모두 알부민을 분비하는 간유사세포로 분화할 수 있었으며, HUC이 더 잘 유도되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로써 HUC과 HAM을 간질환 환자의 간세포 이식 치료에 필요한 세포치료제로써 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

중심단어: 제대유래 줄기세포, 양막유래 줄기세포, 분화, 간유사세포