

## 지방조직 유래 줄기세포의 조골세포로의 분화에 대한 실험적 연구

이의석 · 장현석 · 권종진 · 임재석  
고려대학교 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### A STUDY ON THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF ADIPOSE-DERIVED ADULT STEM CELL

Eui Seok Lee, Hyon Seok Jang, Jong Jin Kwon, Jae Suk Rim  
*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Korea University*

Stem cells have self-renewal capacity, long-term viability, and multilineage potential. Adult bone marrow contains mesenchymal stem cells. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) are progenitors of skeletal tissue components and can differentiate into adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, and myoblasts *in vitro* and undergo differentiation *in vivo*.

However, the clinical use of BMSCs has presented problems, including pain, morbidity, and low cell number upon harvest. Recent studies have identified a putative stem cell population within the adipose tissue. Human adipose tissue contains pluripotent stem cells similar to bone marrow-derived stem cells that can differentiate toward the osteogenic, adipogenic, myogenic, and chondrogenic lineages.

Human adipose tissue-derived stem cells (ATSCs) could be proposed as an alternative source of adult bone marrow stem cells, and could be obtained in large quantities, under local anesthesia, with minimal discomfort. Human adipose tissue obtained by liposuction was processed to obtain ATSCs.

In this study, we compared the osteogenic differentiation of ATSCs in a specific osteogenic induction medium with that in a non-osteogenic medium. ATSCs were incubated in an osteogenic medium for 28 days to induce osteogenesis respectively. Osteogenic differentiation was assessed by von Kossa and alkaline phosphatase staining. Expression of osteocyte specific bone sialoprotein, osteocalcin, collagen type I and alkaline phosphatase, bone morphogenic protein 2, bone morphogenic protein 6 was confirmed by RT-PCR.

ATSCs incubated in the osteogenic medium were stained positively for von Kossa and alkaline phosphatase staining. Expression of osteocyte specific genes was also detected. Since this cell population can be easily identified through fluorescence microscopy, it may be an ideal source of ATSCs for further experiments on stem cell biology and tissue engineering. The present results show that ADSCs have an ability to differentiate into osteoblasts. In the present study, we extend this approach to characterize adipose tissue-derived stem cells.

**Key words:** Adipose tissue-derived stem cells, Stem cells, Adipose tissue

## I. 서 론

낭종, 종양 등의 질환 및 외상으로 인한 골결손부의 치유를 위해서는 골이식 등의 조직 이식이 필요하다. 골이식의 방법으로는 자가골 이식, 동종골 이식, 이종골 이식 등이 있다. 자가골 이식은 성공율이 높은 장점이 있으나, 부가적인 수술이 필요하여 수술 시 동통 및 공여부의 골결손을 초래하는 단점이 있다. 동종골 이식은 장기 기증이 필요 하며, 이식 면역 반응을 없애기 위한 다양한 처리 방법이 요구된다. 또한 이종골 이식은 골유도능이 없고, 이식된 골편의 흡수가 일어나지 않아 자가골로 대체되는데 어려움이 있다. 최근에는 줄기세포 연구를 비롯한 조직공학이 발달하고 있으며, 골결손부의 재생이나 골이식술 및 임플란트의 골 융합(osseointegration)을 증진시키기 위하여 줄기세포의 분화에 연관된 유전자 발현의 연구가 이루어지고 있다.

줄기세포는 근육, 뼈, 피부 등 다양한 기관으로 분화할 수 있는 만능세포(pluripotent cell)로, 장기를 형성하기 이전에 분화를 멈춘 배아 단계의 세포이다. 인간의 줄기세포는 수정란이 처음으로 분열할 때 형성되는 만능 줄기세포와 이 만능 줄기세포들이 계속 분열해 만들어지는 배아 줄기세포 그리고 성숙한 조직과 기관 속에 들어 있는 성체 줄기세포 등으로 분류할 수 있다. 만능·배아 줄기세포는 연구용으로 사용할 경우 윤리적 문제점이 있으며, 성체 줄기세포는 다 기능 줄기세포라고도 하는데, 분열이 상당히 진행되어 노화 단계에 들어선 세포이기 때문에 다양한 세포제로 배양시키는 데는 한계가 있을 수 있다.

골수조직에는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell)와 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)가 있으며, 골수 내에 존재하는 간엽 줄기세포는 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등으로 분화되고 생체 내에서 분화과정을 거쳐 결체조직의 결손부를 치유하는데에 이용될 수 있다<sup>1-6)</sup>. 그러나 골수 간엽 줄기세포를 이용하기 위한 골수조직 채취에는 동통이 따르며, 감염의 위험성이 있고, 그 채취량이 제한되어 있다. 따라서 골수 줄기세포의 대체 채취원으로, 국소마취아래 용이하게 다량으로 채취가 가능한 지방 줄기세포에 대한 연구가 이루어지고 있다. 사람의 피하 지방조직에는 다양한 줄기세포가 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 지방조직에서 유래된 줄기세포는 지방 조직으로 분화할뿐 만 아니라 골수에서 유래한 줄기세포와 유사하게 조골세포로도 분화할 수 있는 것으로 알려지고 있다<sup>9-20)</sup>. 더욱이 지방조직 유래 줄기세포와 골수 줄기세포는 분화 능력, 세포 부착력, 성장 역학, 유전자 형질 도입능에 있어서 특이한 차이점을 보이지 않는다고 하였다<sup>21)</sup>.

본 연구에서는 골수 줄기세포에 비하여 쉽게 채취할 수 있는 성인의 피하 지방조직에서 줄기세포를 추출하여 세포배양을 통하여 골 형성 유도 배양액(osteogenic induction

medium)을 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군간에 alkaline phosphatase(ALP) staining과 von Kossa staining을 시행하고 BMP-2(bone morphogenic protein-2), BMP-6(bone morphogenic protein-6), Osteocalcin, Osteopontin, Bone sialoprotein(Bsp), Collagen I 등의 골 형성 단백질 유전자의 발현을 역전사-중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 통하여 비교·분석하여, 지방세포의 조골세포로의 분화 유도가 가능함을 확인하고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 지방조직 유래 줄기세포의 분리 및 배양

환자의 동의 아래 복부 지방 흡인술을 통하여 채취한 지방 조직에서 줄기세포를 분리하였다. 채취한 지방조직을 Krebs-Ringer액으로 세척하고 collagenase를 이용하여 digestion을 시행하여 Halvorsen 등의 방법에 의하여 줄기세포를 분리하였다. 지방조직과 혈관조직을 원심분리하고 plastic adherence를 이용하여 단핵구 성분을 분리하였다. 분리한 세포를 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS, Gibco)를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium-Ham's nutrient broth F12 (DMEM-F12, 1:1, v/v, Gibco)을 maintenance medium으로 하여, R&D systems(Minneapolis, MN)으로부터 구입한 transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ , 0.25  $\mu$ g/mL), human epidermal growth factor(EGF, 5 $\mu$ g/mL)와 human basic fibroblastic growth factor(bFGF, 1 $\mu$ g/mL)를 이용하여 culture expansion을 시행하였다. 실험군에서는 지방 줄기세포의 조골세포로의 분화를 유도하기 위하여 10% FBS를 포함한 DMEM-F12 배지에 10  $\mu$ M dexamethasone (Sigma), ascorbate 2-phosphate(50  $\mu$ g/mL, Sigma)와 100 mM  $\beta$ -glycerol phosphate(Sigma)를 투여하여 배양을 시행하였으며, 대조군에서는 골형성 유도 배양액을 투여하지 않고 10% FBS를 포함한 DMEM-F12 배지에 배양을 시행하였다.

### 2. Alkaline Phosphatase 및 von Kossa Staining

24 개의 배양용기에 줄기세포를 3주 동안 배양하고, 제 1, 3, 5, 7, 14, 21일째에 cold PBS(Sigma)로 세포층을 2회 세척한 후 배양세포층을 ACP mix (acetone:citrate solution:37% paraformaldehyde=65:25:8)를 이용하여 고정하고 Sigma Diagnostics회사의 ALP staining kit를 이용하여 alkaline phosphatase activity를 측정하였다.

von Kossa staining은 역시 제 1, 3, 5, 7, 14, 21일째에 배양 세포층을 실온에서 60분간 4% paraformaldehyde로 고정하고, 증류수로 세척한 후, 빛을 차단한 상태로 1% (wt/vol) silver nitrite solution에 30분간 고정하고 다시 몇 차례 증류수로 세척한 후 60분간 UV light를 조사하였다. 위와 같은 alkaline phosphatase staining과 von Kossa staining을 시행한 24 개의 배양용기를 digital camera로 촬영하고 염색도를 Scion PC image analysis software를 이용하여 분석하였다.

### 3. 골기질 단백질 유전자의 발현 분석

BMP-2, BMP-6, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein과 collagen I등의 골형성 관련 단백질의 유전자 발현을 역전사-중합효소 연쇄반응으로 분석하였다. 모든 결과는  $\beta$ -actin과 상대 비교를 시행하였으며 이 때 사용한 primer는 table 1에 나타나 있다. Tri-reagent(Sigma)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi의 single-step method에 따라 total RNA를 추출하고 UV spectrophotometry (Pharmacia, Gene Quant, LKB Biochrom, England)로

농도를 측정하고 이중 3.5 $\mu$ g으로 Superscriptreverse transcriptase (Life Technologies Inc.)와 oligo(dT)16 primer를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 100  $\mu$  용액을 제조하고 합성된 cDNA의 1/10을 사용하여 PCR을 시행하였다. BMP-2와 BMP-6는 30 cycle(95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation을 시행하고 cycle을 증가시키면서 95 $^{\circ}$ C에서 45초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간)을 시행하고,  $\beta$ -actin과 collagen I은 40 cycle(94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 denaturation, cycle을 증가시키면서 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분)을, bone sialoprotein은 40 cycle(94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 denaturation, cycle을 증가시키면서 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 56.5 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분), osteocalcin은 40 cycle(94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 denaturation, cycle을 증가시키면서 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분)의 조건으로 PCR을 시행하였다. 이중 10  $\mu$ 를 이용하여 ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel을 UV transillumination으로 관찰하고 digital camera로 촬영하고 Scion image analysis software를 이용하여 분석을 시행하였다.  $\beta$ -actin에 대한 상대적인 intensity를 구하여 RT-PCR 결과를 분석하였다.

**Table 1.** PCR oligonucleotide primer sequences and sizes of expected amplification products

Primer	Sequence	Amplicon size
BMP-2 forward	5' -GAGTTTGAGTTGAGGCTGCTC	442bp
BMP-2 reverse	5' -TGAGTCACTAACCTGGTGTCC	
BMP-6 forward	5' -GCAGAAGGAGATCTTGTCGG	629bp
BMP-6 reverse	5' -GTCTCTGTGCTGATGCTCCT	
Col 1 forward	5' -TGACGAGACCAAGAAGT	599bp
Col 1 reverse	5' -CCATCCAAACCACTGAAACC	
BSP forward	5' -GCTCAGCATTTTGGGAATGGC	614bp
BSP reverse	5' -CTGCATTGGCTCCAGTGACAC	
OC forward	5' -GTCCAAGCAGGAGGGCAG	297bp
OC reverse	5' -TTGAGCTCACACCTCCC	
$\beta$ -actin forward	5' -CCTTCCTGGGCATGGAGTGGTG	202bp
$\beta$ -actin reverse	5' -GGAGCAATGATCTTGATCTTC	

**Table 2.** Reverse transcription polymerase chain reaction

Primer	denaturation	annealing	polymerization	cycle
BMP-6	95 $^{\circ}$ C 1 minute	95 $^{\circ}$ C 45 sec	60 $^{\circ}$ C 45 sec	72 $^{\circ}$ C 2' 30"
BSP	94 $^{\circ}$ C 3 minutes	94 $^{\circ}$ C 1 minute	56.5 $^{\circ}$ C 1 minute	72 $^{\circ}$ C 1' 40"
Col 1	94 $^{\circ}$ C 3 minutes	94 $^{\circ}$ C 1 minute	56.5 $^{\circ}$ C 1 minute	72 $^{\circ}$ C 1' 40"
BMP-2	95 $^{\circ}$ C 1 minutes	95 $^{\circ}$ C 45 sec	60 $^{\circ}$ C 45 sec	72 $^{\circ}$ C 2' 30"
OC	94 $^{\circ}$ C 3 minutes	94 $^{\circ}$ C 1 minute	56.5 $^{\circ}$ C 1 minute	72 $^{\circ}$ C 1' 40"
$\beta$ -actin	94 $^{\circ}$ C 3 minutes	94 $^{\circ}$ C 1 minute	56.5 $^{\circ}$ C 1 minute	72 $^{\circ}$ C 1' 40"

### Ⅲ. 연구 결과

#### 1. 지방조직 유래 줄기세포

지방 조직 유래 줄기세포를 분리, 배양한 결과, 줄기세포의 표지자로 알려진 fat CD105-1, fat SCFR-1의 염색 결과를 확인하여 피하 지방조직에서 Halvorsen 등의 방법에 의하여 추출한 세포가 간엽 줄기세포임을 확인하였다(Fig. 1-2).

#### 2. Alkaline Posphatase 및 von Kossa Staining

지방조직 유래 줄기세포의 골세포의 분화능을 확인할 수 있는 ALP 염색, von Kossa 염색 결과를 보면, 골형성 유도 배양액을 넣고 28일간 배양한 결과, 시간이 지남에 따라 염색도가 현저히 증가됨을 확인하였다. 지방조직 유래 간엽 줄기세포에 골형성 유도 배양액을 넣지 않고 28일간 배양

한 결과, 시간이 지남에 따라 각각의 염색도가 증가되지 않음을 알 수 있다(Fig. 3-4).

#### 3. 골기질 단백 유전자의 발현

BMP-2, BMP-6, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein과 collagen I 등의 골형성 관련 단백질의 유전자 발현을 RT-PCR을 이용하여 분석한 결과는 Fig. 5에 나타나 있다. 모든 결과는  $\beta$ -actin에 대한 상대적인 intensity를 구하여 분석하였으며,  $\beta$ -actin유전자 발현 양상은 실험군과 대조군 모두 전과정에 걸쳐 고루 나타났다(Fig. 6). 실험군에서는 조골세포 분화 배양액을 적용하지 않은 대조군에 비하여 현저한 골기질 단백 유전자의 발현을 보였다.

##### 1) BMP-2 유전자 발현 양상

지방조직 유래 줄기세포를 배양하였을 때, BMP-2의 발현이 7일부터 현저히 높게 관찰되었으며 14일에 가장 높게

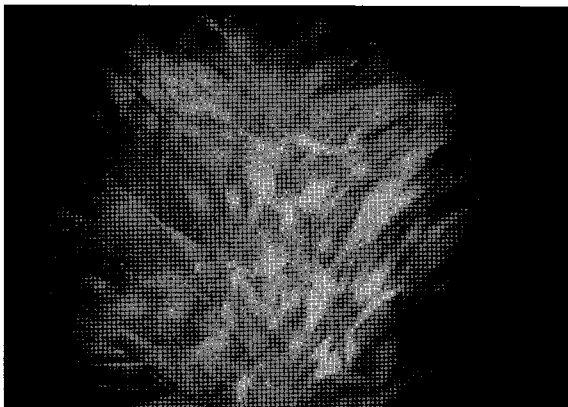


Fig. 1. fat CD105-1.

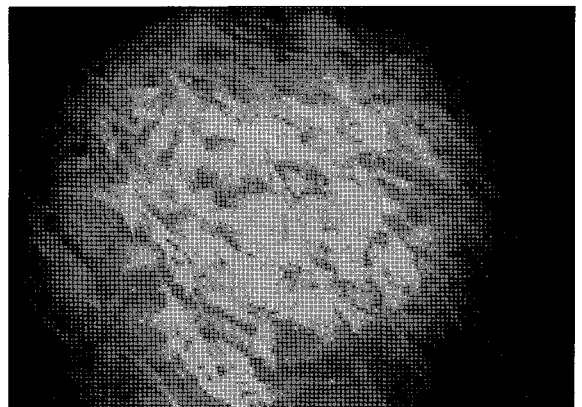


Fig. 2. fat SCFR-1.

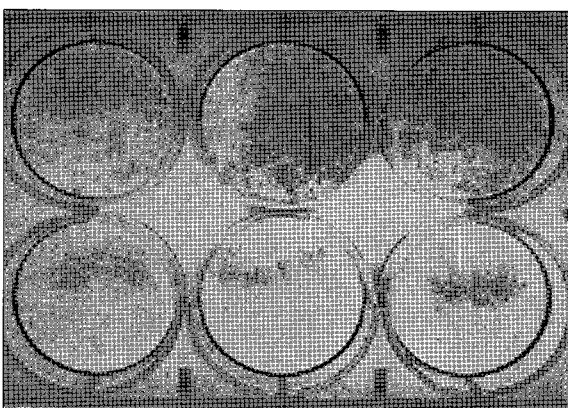


Fig. 3. ALP staining (2 weeks).

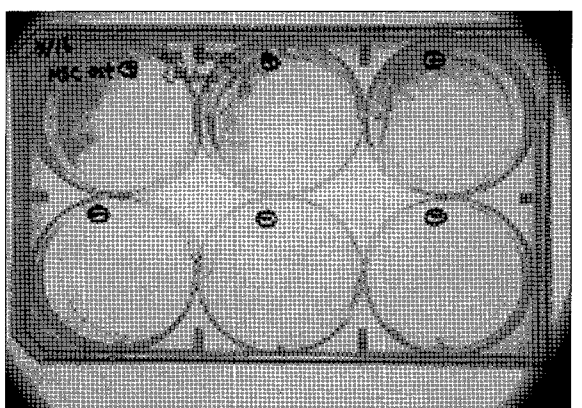


Fig. 4. von Kossa staining (3 weeks).

발현되었다가 21일 이후로 점차 감소하는 양상을 보였다. 골형성 유도 배양액을 넣지 않고 28일간 배양한 대조군의 경우, BMP-2의 발현이 실험군과 유사하게 7일부터 21일 사이에 가장 높게 나타났으나 실험군과 비교하여 상대적으로 발현의 정도가 미약함을 알 수 있었다(Fig. 7).

2) BMP-6 유전자 발현 양상

실험군의 경우 BMP-6는 7일부터 증가하기 시작하여 14일에 가장 현저히 높게 발현 되었으며 이후 점차로 감소하는 양상을 보이고 있으며, 대조군의 경우 21일에 가장 높은 발현을 보이고 있으며 28일까지 발현이 관찰되었다(Fig. 8).

3) Bone Sialoprotein 유전자 발현 양상

bone sialoprotein의 발현은 7일에 관찰되기 시작하여 28일 최대한 발현되기까지 점진적으로 증가되는 양상을 보

이고 있었다. 대조군에서는 실험군과 비슷한 양상을 보이고 있으나, 발현의 정도가 상당히 미약하며 14일부터 28일까지 비슷한 정도로 발현되었다(Fig. 9).

4) Collagen I 유전자 발현 양상

Collagen I의 발현은 배양 전 기간에 걸쳐 일정하였으며, 실험군과 대조군의 차이가 없이 같은 정도의 발현을 보이며 28일에서 가장 높은 발현을 나타 내었다(Fig. 10).

5) Osteocalcin 유전자 발현 양상

실험군에서 Osteocalcin의 발현은 14일에서부터 시작하여 28일까지 현저히 증가되는 양상 이었고 28일에서 가장 높은 발현을 나타내었다. 대조군에서는 실험군과 비교하여 발현의 정도가 상당히 미약하였으며 점차로 증가하여 28일에서 가장 높은 발현을 나타내었다(Fig. 11).

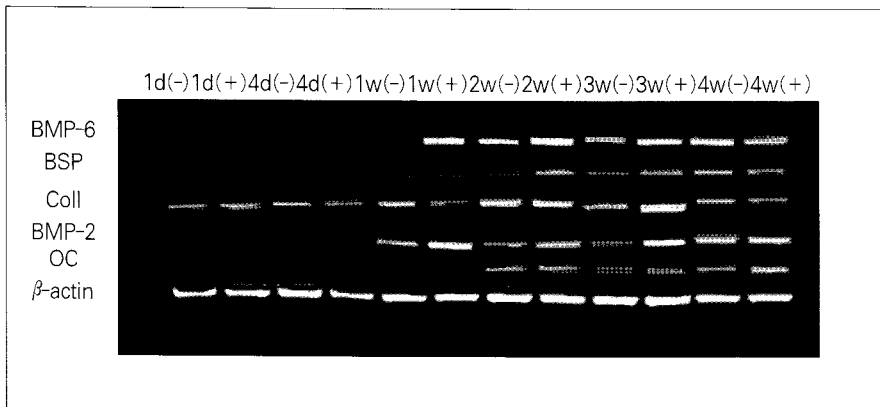


Fig. 5. Osteogenic differentiation of ATSCs(adipose tissue-derived stem cells) in a specific osteogenic induction medium.

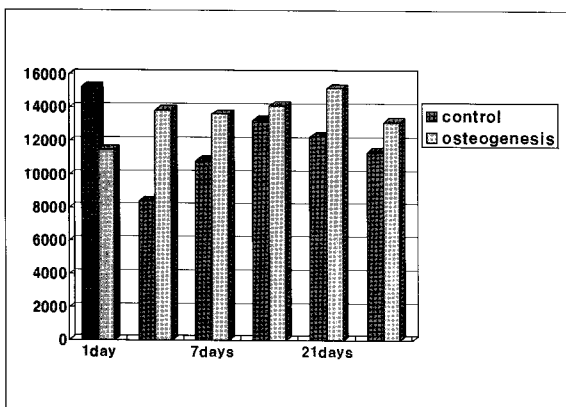


Fig. 6.  $\beta$ -actin expression.

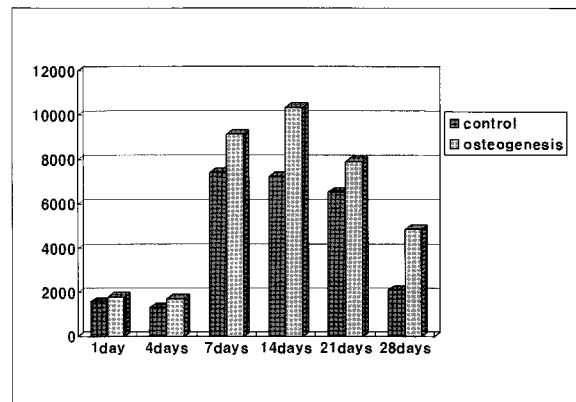


Fig. 7. BMP-2 expression.

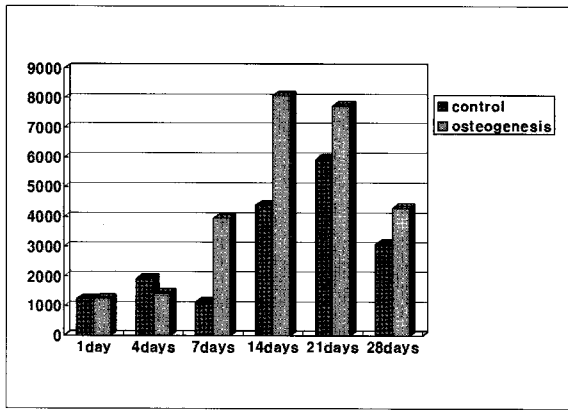


Fig. 8. BMP-6 expression.

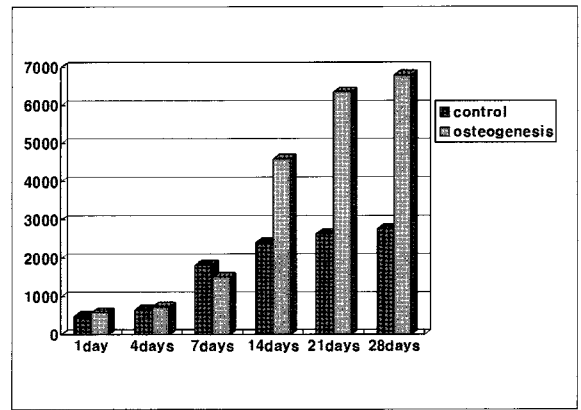


Fig. 9. Bone sialoprotein expression.

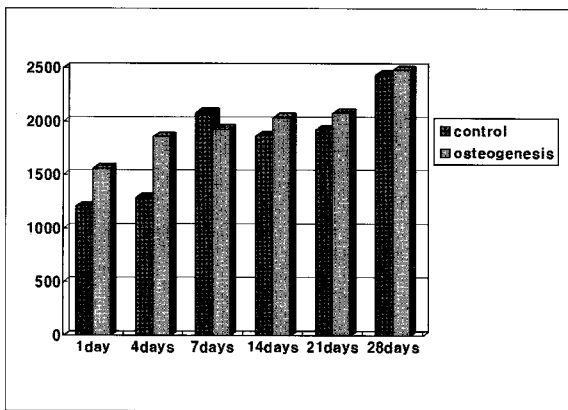


Fig. 10. Collagen 1 expression.

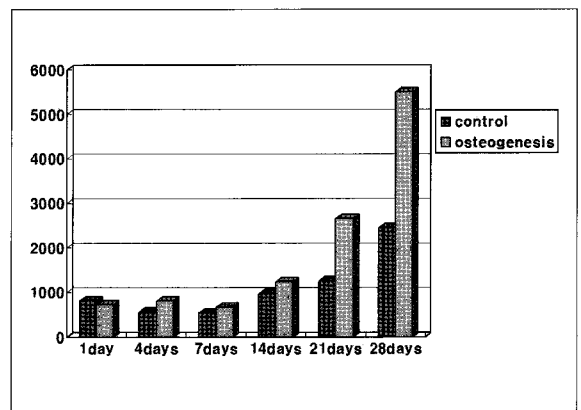


Fig. 11. Osteocalcin expression.

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 지방조직에서 줄기세포를 추출하여 조골세포로의 분화를 확인하여 골 조직 재생을 위한 조골세포 줄기세포의 대체 채취원으로 지방세포를 이용하는 것이 가능한지 알아보려고 하였다. 골수조직 간엽 줄기세포에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 골수 간엽 줄기세포는 실험실 내에서 조골세포로 분화하여 골 형성 과정을 거치는 것으로 알려져 있다<sup>3,6,15,22</sup>. 최근에는 골수 줄기세포의 대체 채취원으로 국소마취아래 용이하게 다량으로 채취가 가능한 지방 줄기세포가 제시되고 많은 연구가 이루어지고 있으며<sup>1,9-21,25,26</sup>, Jaiswal 등<sup>24</sup>, Bennett 등<sup>26</sup>과 은 백서의 골수조직에서 추출된 줄기세포가 조골세포로 분화되었으며, Halvorsen 등<sup>25</sup>의 연구에 의하면, 인간의 지방 유래 줄기세포가 조골세포로 분화됨을 보고 하였다. Huang 등<sup>14</sup>은 백서의 서혜부의 지방 조직세포들이 조골세포 및 조연골세포로 분화 됨을 보고 하였다. Zuk 등은 지방조직에서 유래

한 줄기세포 또한 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다고 보고 하였다<sup>15</sup>. 지방조직 유래 줄기세포는 지방조직으로 분화할뿐 만 아니라 골수에서 유래한 줄기세포와 유사하게 조골세포로도 분화할 수 있는 것으로 알려지고 있으며<sup>9-20</sup>, 지방조직 유래 줄기세포와 골수 줄기세포는 분화 능력, 세포 부착력, 성장역학, 유전자 형질 도입능에 있어서 특이한 차이점을 보이지 않는다고 하였다<sup>21</sup>. 지방 유래 줄기세포가 지방세포 또는 조골세포로 분화함에 있어서 서로 밀접한 관련이 있다는 연구가 보고 되었으며, 지방세포는 골수강의 조골세포가 감소한 자리를 채워 골 밀도 감소를 유발한다고 하였다<sup>27-30</sup>. 간엽 줄기세포로부터 다양한 세포들로 분화함에 있어서 여러 세포들의 교차분화는 그 기전이 명확하게 알려져 있지 않으며, 배양액의 구성분과 성장인자들의 첨가, 역학적 자극, 세포내 신호 전달 인자의 조절에 따라 조골세포와 지방세포간의 교차분화가 일어난다고 하였다<sup>31-38</sup>.

본 연구에서 지방조직 유래 줄기세포의 조골세포로의 분

화를 확인하기 위하여 지방조직 유래 줄기세포를 배양하여 골기질 단백 유전자 발현 양상을 살펴본 결과,  $\beta$ -actin 유전자 발현은 골형성 유도 배양액을 사용한 실험군과 골형성 유도 배양액을 적용하지 않은 대조군 모두 전과정에 걸쳐 고루 나타났으며, 실험군에서는 대조군에 비하여 BMP-2, BMP-6, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein 등의 골기질 단백 유전자의 발현이 현저하게 높게 나타났다. Collagen I의 발현은 배양 전 기간에 걸쳐 일정하였으며, 실험군과 대조군의 차이가 없이 같은 정도의 발현을 보였다.

지방조직 유래 줄기세포를 배양함에 있어서 골형성 유도 배양액으로 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 50  $\mu$ M ascorbate 2-phosphate(50  $\mu$ g/mL)와 100 mM  $\beta$ -glycerol phosphate를 투여하여 골수 줄기세포를 배양한 경우, 골형성 분화 과정이 빠르게 진행되고 조골세포의 형태가 명확하며, ALP와 osteocalcin의 발현이 증가하고 세포외 광화기질이 증가한다고 보고하였다<sup>23,24</sup>. 지방조직 유래 줄기세포를 dexamethasone을 포함하는 골형성 유도 배양액으로 배양하였을 경우 AP의 활성이 증가하고 조직학적으로 배양된 기질의 mineralization이 증가한다고 하였다. 더욱이 proliferation, matrix synthesis, mineralization 각각의 시기마다 dexamethasone을 포함하는 골형성 유도 배양액의 효과가 명확하게 나타난다고 알려져 있다. 중간엽 줄기세포의 분화 양상에 있어서 dexamethasone의 첨가 농도와 첨가 시기가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>37,38</sup>. 그러나, 골형성 유도 배양액에서 dexamethasone과 같은 glucocorticoids의 효과에 대해 다른 결과를 나타내는 연구가 있으며<sup>39</sup>, dexamethasone보다는 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD)를 포함하는 골형성 유도 배양액을 사용한 연구도 있다<sup>40</sup>. VD의 골형성 유도 효과에 따른 골형성 정도를 평가하기 위하여 지방 줄기 세포의 분화 과정에서 AP 효소 활성도와 matrix mineralization 정도를 측정된 결과, VD의 골형성 유도 배양액을 사용한 경우 AP 활성도가 2-3 주 사이에 현저하게 높게 나타났다고 하였다<sup>40</sup>. ALP 활성도는 골수 줄기 세포의 경우에서 1주 먼저 나타나기 시작하였으나 6주 동안 최대한의 발현없이 변화가 없었으며, dexamethasone을 사용한 경우에는 VD를 사용한 경우보다 ALP 활성도가 현저하게 저하되어 나타났다고 하였다<sup>39</sup>. 흥미로운 것은 골수 줄기 세포의 경우에는 dexamethasone을 사용한 경우에서 VD를 사용한 경우보다 ALP 활성도가 증가되었으며, 이는 골수 줄기세포와 지방 줄기세포의 배양 유도 상황에 따른 서로 다른 반응으로 인한 것으로 보인다고 하였다<sup>39</sup>. 또한 줄기세포의 분화 연구에서 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin(IL)-1, retinoic acid 등의 물질들은 조골세포 분화를 촉진 시키고 지방세포 분화를 억제 하며, indome-

thacin, isobutyl-methylxanthin (IBMX), insulin, glucocorticoids, thiazolidinediones(TZD) 등은 지방세포 분화를 촉진시키고 조골세포 분화를 억제한다고 하였다<sup>30,41</sup>. 본 연구에서는 골형성 유도 배양액으로 10% FBS를 포함한 DMEM-F12 배지에 10  $\mu$ M dexamethasone, ascorbate 2-phosphate(50  $\mu$ g/mL)와 100 mM  $\beta$ -glycerol phosphate를 투여하여 배양을 시행하여, 지방조직 유래 줄기세포의 골 세포의 분화능을 확인할 수 있는 ALP 염색, von Kossa 염색 결과를 보면, 골 형성 유도 배양액을 넣고 28일간 배양한 결과, 시간이 지남에 따라 염색도가 현저히 증가됨을 확인하였다. 따라서 골수 줄기세포와 지방 줄기세포에 있어서 dexamethasone과 VD의 세포 분화 유도 능력에 대한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

본 연구의 결과, 지방조직 유래 줄기세포는 조골세포로 분화 되었고, 골형성 유도 배양액을 첨가한 경우 조골세포로의 분화 능력이 높게 나타났으며, 골형성 유도 배양액을 첨가하지 않은 경우보다 골기질 단백 유전자의 발현이 높게 나타났다. 이는 Halvorsen 등<sup>25</sup>, Zuk 등<sup>15</sup>, Huang 등<sup>14</sup>의 연구 결과와 유사한 것으로, 지방조직에서 유래한 줄기세포를 이용하여 조골세포로 분화가 가능함을 나타낸다. 지방조직은 골수에 비하여 양이 풍부하며 쉽게 채취할 수 있는 장점이 있으므로, 골수 줄기세포의 대체 채취원으로 이용할 수 있다는 것을 알 수 있다. 상기 연구 결과와 본 연구 결과를 토대로 하여 지방조직으로부터 유래된 줄기세포는 다양한 세포로 분화가 가능함을 할 수 있고, 조골세포로 분화됨을 확인하였다. 또한 골수줄기세포에 대한 실험과 비교하여 보았을 때, 골기질 단백 유전자의 발현이 골수 줄기세포와 유사한 양상이나 미세하게 지연되어 있었음을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 지방조직 유래 줄기세포를 이용한 골결손부의 치유 및 다양한 조직 재생을 위한 조직 공학의 기법을 적용하여 골결손 부위의 재건을 도모한다면 훌륭한 골 재생 결과를 얻을 수 있는 골이식 재료 및 방법의 개발에 도움이 될 것이라 생각한다. 향후 지방 유래 줄기세포와 다양한 scaffold와의 적용을 통하여 골결손 부위의 치료에 적용하는 연구가 필요하며, 일반적인 골조직 이식 방법과 상호 비교, 분석함이 필요하다고 생각한다.

## V. 결 론

성인의 지방조직에서 유래된 지방 줄기세포가 조골세포로 분화 가능한 지 알아보기 위하여, 지방 흡입술을 통하여 채취한 지방조직에서 Halvorsen 등의 방법에 의하여 지방 줄기세포를 분리하고, 10% FBS를 포함한 DMEM-F12 배지에 10nM dexamethasone, ascorbate 2-phosphate(50  $\mu$ g/mL)와 100 mM  $\beta$ -glycerol phosphate를

투여하여 28일간 배양하여 염색, ALP staining과 von Kossa staining을 시행하고 BMP-2, BMP-6, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, collagen I 등의 골형성 단백질 유전자의 발현을 역전사-중합효소 연쇄반응을 통하여 비교·분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 지방조직으로부터 추출한 성인 중간엽 줄기세포는 조골세포로 분화가 가능하였다.
2. 지방조직 유래 줄기세포는 골형성 유도 배양액을 투여하면 조골세포로 분화되고 시간 경과에 따라 mineralization을 보인다.
3. 골기질 단백질 관련 유전자 발현에서 BMP-2와 BMP-6는 1주 경과 후, BSP는 2주 경과 후, Osteocalcin은 3주 경과 후에 그 발현이 증가되어 있고 Collagen I은 전 기간에서 그 발현이 증가 되어 있었다.

위의 연구 결과를 통하여, 지방조직에서 유래한 줄기세포는 배양 조건의 조절을 통해 조골세포로의 분화가 가능함을 확인할 수 있었으며, 지방조직 유래 줄기세포를 이용한 조직 공학적 기법의 응용이 가능하리라 사료된다.

### 참고문헌

1. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA : The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone* 19 : 421, 1996.
2. Scott PB, Jaiswal N, Nancy SR, Joseph DM, Karl HK, Kadiyala S : Mesenchymal stem cells in Osteobiology and Applied bone regeneration. *Clin Orthop* 355s : s247, 1998.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143, 1999.
4. Seshi B, Kumar S, Sellers D et al : Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 26 : 234, 2000.
5. Minguell JJ, Erices A, Conget P et al : Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med* 226 : 507, 2001.
6. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM et al : Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13 : 81, 1992.
7. Beresford JN, Bennett JH, Devlin PS et al : Evidence for inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102 : 341, 1992.
8. Woodbury DK, Reynolds IB, Black : Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 69 : 908, 2002.
9. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T : Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nippon Med Sch* 71 : 240, 2004.
10. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A et al : Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 313 : 871, 2004.
11. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR et al : Bone induction

- by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21 : 622, 2003.
12. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M et al : Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85 : 740, 2003.
13. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA et al : Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50 : 610, 2003.
14. Huang JI, Beanes SR, Zhu M et al : Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 109 : 1033, discussion 1042, 2002.
15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al : Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 : 211, 2001.
16. Patrick CW Jr, Chauvin PB, Hobbly J et al : Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng* 5 : 139, 1999.
17. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A et al : Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. *Biochem Biophys Res Commun* 319 : 511, 2004.
18. Huang JI, Zuk PA, Jones NF et al : Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 113 : 585, 2004.
19. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS et al : Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 10 : 371, 2004.
20. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM et al : Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop* 412 : 196, 2003.
21. De Ugarte DA, K Morizono, A Elbarbary et al : Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174 : 101, 2003.
22. Ikeuchi MY, Dohi K, Horiuchi H et al : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes osteogenesis within atelopeptide type I collagen solution by combination with rat cultured marrow cells. *J Biomed Mater Res* 60 : 61, 2002.
23. Ohgushi H, Dohi S, Katsuda S et al : In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32 : 333, 1996.
24. Jaiswal N, SE Haynesworth, AI Caplan et al : Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64 : 295, 1997.
25. Halvorsen YC, Franklin AL, Bond DC et al : Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7 : 729, 2001.
26. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT et al : Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Cell Sci* 99 : 131, 1991.
27. Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ et al : Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J Bone Miner Res* 11 : 568, 1996.
28. Canalis E : Mechanisms of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 3441, 1996.
29. Parhami F, Jackson SM, Tintut Y et al : Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14 : 2067, 1999.
30. Nuttall ME, Gimble JM : Is there therapeutic opportunity



- either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis. *Bone* 27 : 177, 2000.
31. Grigoriadis AE, Heersche JNM, Aubin JE et al : Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population : Effect of Dexamethasone. *J Cell Biol* 106 : 2139, 1988.
  32. Kim CH, Cheng SL, Kim GS et al : Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *J Endocrinology* 162 : 371, 1999.
  33. Locklin RM, Williamson MC, Beresford JN et al : In vitro effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells. *Clin Orthop* 313 : 27, 1995.
  34. Schiller PC, Dippolito G, Brambilla R : Inhibition of Gap-Junctional communication induces the transdifferentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype in vitro. *J Biol Chem* 276 : 14133, 2001.
  35. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP et al : Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275 : 9645, 2000.
  36. Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE : Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* 273 : 32111, 1998.
  37. Chen D, Ji X, Harris MA et al : Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142 : 295, 1998.
  38. Altman GH, Horan RL, Martin I et al : Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 16 : 270, 2002.
  39. Cooper MS, Hewison M, Stewart PM : Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol* 163 : 159, 1999.
  40. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al : Human adipose tissue cell Vol. 13, 4279, 2002.
  41. Oreffo RO, Triffitt JT : Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 25(2 Suppl) : 5S, 1999.

**저자 연락처**

우편번호 152-703  
 서울시 구로구 구로동  
 고대구로병원 구강악안면외과  
**이 의 석**

원고 접수일 2007년 10월 4일  
 게재 확정일 2008년 3월 5일

**Reprint Requests**

**Eui-Seok Lee**  
 Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Korea Univ.  
 Guro Hospital, Guro-dong, Seoul, 152-703, Korea  
 Tel: 82-2-2626-3268  
 E-mail: es225@daum.net

Paper received 4 October 2007

Paper accepted 5 March 2008