

# 3 차원 Co-culture 시스템을 통한 BMSC의 NP-like Cell로의 분화

김동화<sup>1,2</sup>, 김수향<sup>2</sup>, 허수진<sup>1</sup>, 신지원<sup>1</sup>, 김영직<sup>3</sup>, 박소희<sup>1,2</sup>, 전재우<sup>1,2</sup>, 신정욱<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 의용공학과, <sup>2</sup>인제대학교 의용공학과 BK21 사업단 / FIRST 연구단, <sup>3</sup>부산가톨릭대학교 치기공학과

## The Differentiation of bone Marrow Stromal Cells into NP-like Cells through 3-Dimensional Co-culture System

D.H. Kim<sup>1,2</sup>, S.H. Kim<sup>2</sup>, S.J. Heo<sup>1</sup>, J.W. Shin<sup>1</sup>, Y.J. Kim<sup>3</sup>, S.H. Park<sup>1,2</sup>, J.W. Jun<sup>1,2</sup>, J.W. Shin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Engineering, Inje University

<sup>2</sup>Team of BK21 / First Research Team, Institute of Biomedical Engineering, Inje University

<sup>3</sup>Dept. of Dental Lab. Science, Catholic University of Pusan

(Received August 6, 2007. Accepted March 13, 2008)

### Abstract

The goal of this study is to investigate the effect and potential of three-dimensional Co-culture of BMSCs (bone marrow stromal Cells) and NP (nucleus pulposus) Cells on the differentiation of BMSCs into NP-like Cells.

The NP Cells and BMSCs were isolated and cultured from New Zealand White rabbits. The isolated NP Cells and BMSCs were prepared in different alginate beads. Those two types of beads were separated by a track-etched membrane of 3 μm pore in a 6-well culture plate. No growth factors were used. In addition to these, NP and BMSC were cultured in the beads independently for control. The number of Cells in Co-culturing system was half of those in two control groups. Proliferation and production of glycosaminoglycan (GAG) were evaluated along with histological observation.

The GAG production rate(GAG contents/Cell) of Co-cultured BMSCs were much higher than that of BMSCs cultured alone. The total amounts of GAG produced by BMSCs in Co-culturing system were larger than those produced by BMSCs in control group and were comparable with those produced by NP alone even the number of each Cell was half of BMSCs in Co-culturing system.

This study showed the potential of differentiation of BMSCs into NP-like Cells through three-dimensional Co-culture system even without any chemical agents.

**Key words :** bone marrow stromal cell(BMSCs), np-like cell, 3-dimensional co-culture

### 1. 서론

퇴행성 추간판 질환은 추간판 내의 단백당 (proteoglycan)의 점진적인 감소로 인해 추간판 내의 수분압이 저하되고 전체 부피가 감소되어, 추간판의 탈출등과 같은 구조적인 변화를 일으켜 본래의 기능을 저하시키고 궁극적으로 통증을 유발하는 것으로 설명되고 있다[1,2].

이와 같이 발생된 퇴행성 추간판 질환은 정상생활에 심각한 장애를 초래하고 치료를 위한 비용과 시간은 사회, 경제적인 면에서 큰 손실을 유발하고 있다. 퇴행성 추간판 질환을 치료하기 위해서

는 수핵 제거술, 추간판 제거술 등의 방법과 질병의 진행정도에 따라서 최근 각광을 받고 있는 조직공학 기반의 방법, 즉 체외에서 배양된 자가 디스크 세포를 이식하여 추간판을 회복, 재생시키는 방법 등이 시도되고 있다[3]. 하지만 자가 세포를 이식하기 위해서는 추간판에서 얻을 수 있는 세포보다 일반적으로 더 많은 양의 세포가 요구된다. 즉, 정상인 NP (nucleus pulposus) 내의 세포 농도 ( $4.0 \times 10^6$  Cells/ml)보다 많은 세포의 수가 필요하다[4,5]. 따라서, 이러한 기초적인 문제의 해결을 위해서는 *in-vitro* 상에서 충분한 수의 세포 확보를 위한 안정적인 기술 확립이 선행 되어야 한다[6].

하지만, 단순한 세포의 증식을 통한 것은 여러 가지 문제를 유발시킬 가능성이 있다. 세포를 단층 배양할 경우 3 주 이상이 경과되면 세포의 증식 속도가 느려질 뿐만 아니라 표현형이 소실되는 탈분화 (dedifferentiation) 과정이 발생된다. 이를 극복하기 위한 대

본 연구는 2007년도 한국과학재단사업 R01-2004-000-10164-0 (2006)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

Corresponding Author : 신정욱

621-749 김해시 어방동 607 인제대학교 의용공학과

Tel : +82-55-320-3317 / Fax : +82-55-327-3292

E-mail : sjw@bme.inje.ac.kr

안으로 줄기세포의 응용이 인체 여러 조직의 재생에 관한 연구에서 제시되고 있다. 최근 그 응용이 가시화되고 있는 줄기세포로는 배아줄기세포, 성체줄기세포가 있으나 배아 줄기세포의 경우 아직 그 분화 단계 및 응용에 많은 연구가 추가로 필요한 것으로 알려져 있음은 주지의 사실이다. 한편 성체줄기세포의 경우 그 분화 능력이 다소 낮을 수는 있으나, 최근의 연구에서 그 응용범위가 확대되고 있는 실정이다. 성체 줄기세포 중 BMSCs (bone marrow stromal Cells)는 채취가 비교적 용이할 뿐만 아니라, 그 분화 능력과 제어도 최근의 다양한 연구에 힘입어 많은 발전을 이루어 이를 이용한 연구가 활발한 상황이다. 최근의 연구 결과에서는 BMSC가 연골, 뼈, 근육 등 여러 계열의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가졌을 뿐만 아니라 단백질 (proteoglycan)이 풍부하고 세포의 기질을 합성할 수 있는 수핵 세포와 유사하게 분화할 수 있는 능력이 있으며, 이러한 BMSCs를 이용한 치료는 퇴행성 디스크 내에서의 증식의 장애를 극복한다면, 퇴행성 디스크의 진행을 늦추거나 재생할 수 있는 가능성을 제시한다고 알려져 있다[7,8].

BMSCs를 이용하여 진행 중인 연구에서는 2 차원으로 BMSCs와 NP 세포를 Co-culture 하여 분비되는 기질들에 의해 BMSCs를 NP-like 세포로 분화 유도시키거나, 여러 가지 성장인자를 첨가함으로써 *in-vitro* 상에서 자가 세포 이식을 위한 NP 세포를 확보하려는 연구가 소개되고 있다[9,10]. 하지만 NP 세포는 3 차원 배양 혹은 조직 배양일 때 고유의 표현형질을 발현하기 때문에 alginate bead, agarose gel, collagen gel 등을 이용하여, 생체와 유사한 환경인 3 차원 배양 조건을 유지하여야 하는 것으로 알려져 있다[11-15].

따라서 본 연구는 표현형 소실의 문제점을 극복하고 충분한 양의 NP 세포 확보를 위해 생분해성 고분자인 알긴산을 이용하여 토끼의 중간엽 줄기세포와 중간판 수핵 세포의 3 차원 Co-culture를 통해 BMSCs를 NP-like 세포로 유도, 검증하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. 세포의 분리 및 배양

8 주된 New Zealand white rabbit (≈1.2kg)을 적정량의 ketamine hydrochloride를 투여하여 희생시킨 후, 척추에서 추간판 조직을 분리하였다. 분리한 추간판을 완전히 절개하여 젤 상태의 수핵을 포셉으로 채취한 다음, 0.2% pronase (Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 37°C에서 1시간 동안 효소 반응 시켰다. Hams F-12 medium and Dulbecco's Modified Eagle Medium

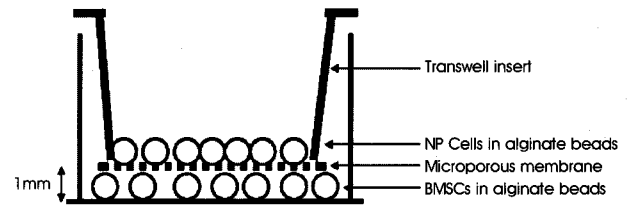


그림 1. 본 연구에 적용된 3 차원 공배양 시스템의 개략도. 다른 세포를 포함한 비드는 투과성 미세구조막으로 분리됨.

Fig. 1. Schematic drawing for 3-D Co-culture system adopted in this study. Note that the beads containing different Cell were separated by permeable microporous membrane.

(F12/DMEM, Sigma)으로 세척한 후 상기의 효소 용액을 제 2의 효소용액 0.02% collagenase type II (Gibco, Grand Island, USA)로 대체시킨 후 37°C에서 4 시간 동안 소화 시켰다. 분리된 NP 세포는 F12/DMEM으로 세척 후 nylon 여과지 (pore size 75 μm)를 사용하여 부유 조직을 제거하고 10% FBS (Hyclone, USA), antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, Gibco), 50 μg/ml L-ascorbic acid (Sigma)를 함유한 F12/DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하며 2~3 일에 한번씩 배지를 교체 하였다.

한편 동일한 rabbit에서 femur와 tibia를 적출하여 ficoll gradient centrifugation을 통하여 BMSCs를 분리하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM-LG, Gibco)에 10% FBS, antibiotics를 첨가한 기본배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하며 2~3 일에 한번씩 배지를 교체 하였다.

### B. 3 차원 Co-culture 시스템

0.15 M NaCl 용액에 1.2%의 low viscosity alginate gel (Sigma)를 상온에서 서서히 녹인 후, 2회 계대배양 된 BMSCs와 NP 세포를 trypsin-EDTA solution을 이용하여 떼어내고 alginate gel과 균등히 교반하였다. 혼합한 세포들은 102 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 26 gauge 주사바늘을 이용하여 한 방울씩 떨어뜨려 젤(gel)화 시켰다. 이 때 세포와 alginate가 고루 혼합되어 beads를 형성할 수 있도록 15 분 동안 교반 상태를 유지 시켜 주고 bead가 응고되면 CaCl<sub>2</sub> 용액을 제거한 후 배양배지 F12/DMEM로 3번 세척하였다. BMSCs가 있는 alginate beads는 6-well culture plate 바닥에 깔고 3 μm polyethylene terephthalate track-etched membrane을 이용하여[10] NP 세포가 있는 alginate beads를 상층에 넣고 3

표 1. 실험 그룹의 분류. 그룹 III의 세포 수는 다른 그룹 세포의 절반임.

Table 1. Classification of experimental groups. Note that the number of Cells in Group III were half of that in other groups.

Groups	NP Cells concentration	BMSCs concentration
I BMSC control	-	10 <sup>5</sup> Cells/ml
II NP control	10 <sup>5</sup> Cells/ml	-
III NP-MSC	5×10 <sup>4</sup> Cells/ml	5×10 <sup>4</sup> Cells/ml

차원 Co-culture 시스템을 마련하였다[그림 1]. 실험군은 표 1 과 같이 분류하였다. 즉 BMSCs와 NP 세포 control 그룹인 I, II는  $10^5$  Cells/ml로 파종 하였고, Co-culture 그룹 III은 NP 세포와 BMSC를 각각 I, II 그룹의 반인  $5 \times 10^4$  Cells/ml로 파종 하였다. 모든 실험군은 F12/DMEM 배양액에 7 일 동안 배양 하였다.

**C. Biochemical analyses**

*GAG (glycosaminoglycan)*

세포 외기질 형성 정도를 평가하기 위해 GAG 정량 키트 (Blyscan Glycosaminoglycan Assay, Biocolor Ltd., N. Ireland)를 이용하였다. Bead는 55 mM sodium citrate, 150 mM NaCl을 첨가하여 37°C에서 20 분간 반응시켜 녹였다. 단, Co-culture 그룹 III은 insert에 포함된 NP 세포를 제외하고 바닥에 배양된 BMSC만 분석하였다. 분리된 세포를 papain 용액을 이용하여 용해시킨 후 200 µl의 상층액에 1 ml의 Blyscan dye reagent를 첨가한 후 30분간 반응시켰다. 원심 분리를 실시한 후 상층액을 제거하고 200 µl의 dissociation reagent를 첨가한 후 Multiskan EX Microplate Reader (Thermo Electron Corporation, Inc., Finland)를 이용하여 650 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

*DNA 정량*

세포의 증식 정도를 측정하기 위하여 DNA 정량 키트 (PicoGreen dsDNA Quantitation Kit, Molecular Probes, Eugene, USA)를 이용 하였다. 세포 배양 후 7 일째에 GAG assay 할 때와 동일한 방법으로 bead 안의 세포를 분리하였고, Co-culture 그룹 III은 insert에 포함된 NP 세포를 제외하고 바닥에 배양된 BMSC만 분석하였다. 분리된 세포에 0.1% Triton X-100을 300 µl 첨가 후, 30 분 동안 lysis 시켜 세포 추출액에 PicoGreen reagent를 넣고 빛을 차단시킨 상태에서 5 분 동안 실온에서 반응 시킨 뒤 Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., USA)를 이용하여 480 nm ~ 520 nm 파장에서 형광도를 측

정하였다. 표준용액은 λDNA (Bioneer, Korea)를 사용하였다.

**D. In vitro 상에서 배양된 bead의 histological 평가**

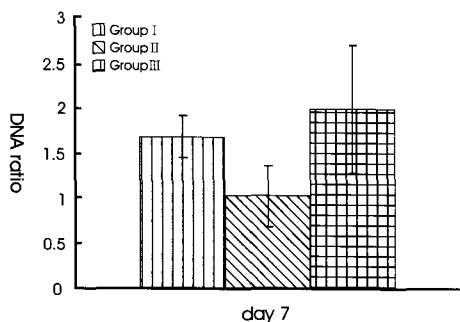
7 일간 배양된 alginate beads를 일회용 조직 embedding cassette에 넣고 OCT (optimal cutting temperature) compound (Tissue-Tek, Sakura, Finetechnical Co., Ltd., Japan)로 포매한 후 질소를 이용하여 순간 동결하였다. 동결한 시편은 절편기 안에 넣고 10 분 이상 충분한 시간을 두어 온도를 맞춘 후, 냉동박편제작기를 사용하여 10 µm 두께로 박절하여 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 박편 시료가 붙은 슬라이드를 상온에서 건조시킨 후, 증류수를 이용하여 슬라이드에 남아있는 OCT compound를 제거한 후, Alcian blue 염색을 하였다.

**E. 통계처리**

각 군 간의 다중비교(multiple comparison)를 위해 SPSS 10.0 (Ver. 10.0, Standard Software Package Inc., USA)을 이용하여 Fisher's LSD 방법으로 처리하였고, 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 통계적 유의 수준 여부를 판단하였다.

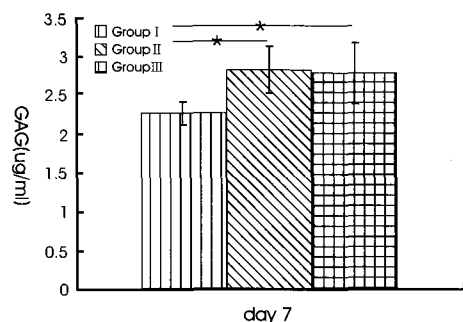
**III. 결과 및 고찰**

퇴행성 추간판 질환을 치료하기 위하여 자가 추간판 세포의 확보는 필요하며 이에 대한 연구는 많이 이루어지고 있다. 즉, 인간 성체줄기세포를 추간판 세포로의 분화에 필요한 유도 인자 중 하나인 TGF-β를 첨가함으로써 추간판 세포로의 분화를 관찰한 연구[7]와 SOX-9을 이용하여 분화를 관찰한 연구[16] 등이 있다. 그러나 본 연구에서는 유도인자를 첨가하지 않고도 BMSCs와 NP 세포 사이의 기질 반응만으로 BMSCs가 NP 세포로 유도됨을 보고자 3 차원 배양법을 이용하여 Co-culture 한 후 이들을 관찰하였다.



**그림 2.** 7일 배양 후 DNA contents. 그룹 I, III는 비슷한비율을 나타냄. 실험시 그룹 III의 세포 수는 그룹 I, II의 세포 수의 절반임. (n=5, \*  $p < 0.05$ )

**Fig. 2.** DNA contents after 7 day culture were shown. Similar rate was observed between Group I and III. Note that the number of Cells in Group III in the beginning of experiment was half of that in Group I and II. (n=5, \*  $p < 0.05$ )



**그림 3.** 배양 7일 후 총 sulfated GAG 양. 실험시 세포 수가 다름에도 불구하고 그룹 II 와 III 의 GAG 양이 비슷해짐.

**Fig. 3.** Total sulfated GAG contents after 7 day of culture is shown. Similar amounts of GAG were measured between Group II and III, even they started with different number of Cells. (n=5, \*  $p < 0.05$ )

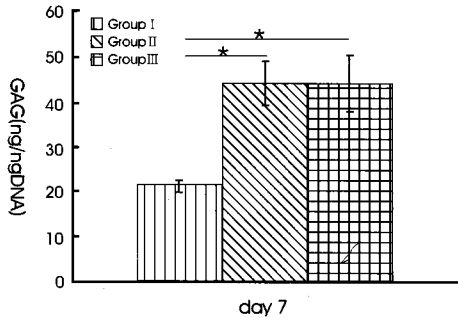


그림 4. DNA contents로 정량화된 각 그룹의 GAG 생성 비율. 그룹 III은 그룹 I 보다 많은 생성 비율을 나타냄. (n=5, \* p < 0.05)

Fig. 4. The production rates of GAG in each group are shown by normalizing DNA contents. Group III shows higher production rate than Group I. (n=5, \* p < 0.05)

배양 기간 동안 세포의 증식을 확인하기 위하여 DNA contents를 분석한 결과, Co-culture한 BMSCs (Group III)는 과중된 세포의 수가 다른 군에 비하여 절반임에도 불구하고 NP 세포만 배양한 (Group II) 경우 보다 원활한 증식을 보였다 (그림 2).

그림 3은 NP 세포가 가지는 고유의 특성을 확인하기 위하여 total sulfated GAG의 양을 측정 한 결과이다. 7 일 동안 Co-culture한 BMSCs (Group III)의 경우, 단독으로 배양한 BMSCs (Group I)보다 큰 GAG 값을 나타내었으며, 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다 (p < 0.05). 또한 단독으로 배양한 NP (Group II)와의 비교에서도 과중된 세포의 수가 절반이었음에도 불구하고 GAG의 값이 유사함을 알 수 있었다. 측정된 sulfated GAG의 양을 그림 2의 DNA contents로 정량화 시킨 결과 Group III 은 Group I 과 비교하여 단위 세포 당 분비하는 GAG의 값이 크다는 것을 알 수 있었으며 (p < 0.05), 기존의 NP 세포 (Group II)가 가지는 GAG의 양과 유사해짐을 알 수 있었다 (그림 4). 따라서, Co-culture 에서는 BMSCs와 NP 세포 사이의 기질간의 상호 작용이 활발하며, 세포 외 기질을 형성을 위한 좋은 환경이 제공된 것으로 사료된다. 이는, Stephen [6]등의 연구 결과에서도 human

NP 세포와 MSCs를 contact과 noncontact 방법을 이용하여 단층 배양으로 Co-culture 실시한 경우 기질 생성 반응이 촉진됨을 확인한 바 있다.

또한, BMSCs의 NP 세포로의 분화를 확인하기 위하여, NP 세포의 기능 분화의 지표로 사용되는 GAG와 proteoglycan을 alcian blue 염색으로 확인하였다. 그림 5에서 보듯이 7 일 동안 Co-culture한 BMSCs (Group III)는 그렇지 않은 BMSCs (Group I)의 경우 보다 GAG의 생성이 활발함을 알 수 있었으며, 이를 통해 BMSCs가 NP 세포로의 분화가 활발하게 진행되고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한 NP 세포로만 이루어진 Group II의 경우와의 비교에서도 확인할 수 있었으며 이를 통하여 본 연구에서 새롭게 제안된 alginate 비드를 이용한 3차원 Co-culture 시스템을 통하여 부수적인 growth factor를 사용하지 않은 상태에서도 BMSCs를 NP-like 세포로의 분화 유도가 가능함을 확인할 수 있었다.

#### IV. 결론

본 연구는 일반적인 분화촉진 media 혹은 성장, 분화 인자를 배제한 상황에서 단순히 3차원 Co-culture를 통한 BMSCs의 NP 세포의 분화 가능성을 검토하였다.

3 차원 Co-culture 시스템을 통한 BMSCs의 NP-like 세포로의 분화에 관한 연구 결과를 요약하면 다음과 같다. 알긴산을 이용하여 3 차원 Co-culture한 BMSCs는 효율적인 기질 생성 반응을 보였으며 높은 증식률, GAG 함량을 보이면서 NP-like 세포로 분화되는 가능성을 보였다. 따라서 3 차원 Co-culture 시스템은 BMSCs가 NP-like 세포로 분화하는데 효과적인 환경을 확인할 수 있었다.

비록 짧은 기간이기는 하나, 본 연구를 통해 그 가능성을 충분히 확인하였으며, 추후 다양한 분석과 물리적 환경의 변화에 따른 BMSCs의 NP-like 세포로의 변화에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

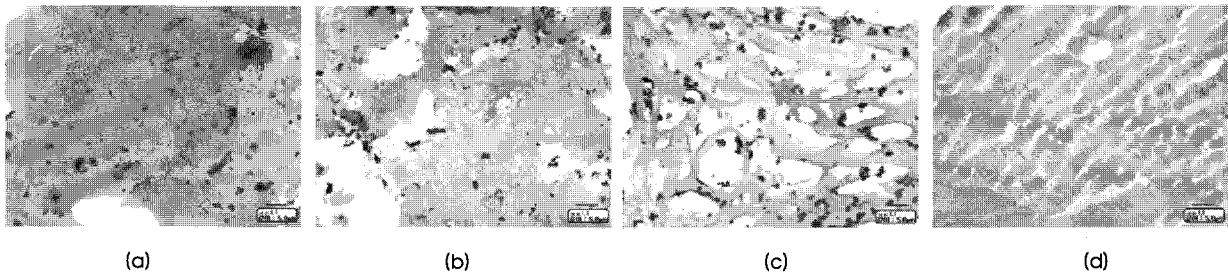


그림 5. Alcian blue 염색에서 그룹 III은 더 많은 GAG의 양을 보임.

(a) 그룹 I : BMSCs control 그룹 (b) 그룹 II : NP 세포 control 그룹 (c) 그룹 III : 공배양된 BMSCs (d): 알지네이트 control

Fig. 5. Alcian blue staining shows higher GAG contents in Group III.

(a) Group I : BMSCs in control group (b) Group II : NP Cells in control group (c) Group III : Co-cultured BMSCs. (d): Alginate control

## 참고문헌

- [1] Butler D, Trafimow JH, and Andersson GB, "Disc degenerate before facets," *Spine*, vol. 15, pp.111-113, 1990.
- [2] Lipson SJ and Muir H, "Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration," *Spine*, vol. 6, pp.194-210, 1981.
- [3] Gruber HE, Johnson TL, and Leslie K, "Autologous intervertebral disc Cell implantation: a model using *Psammomys obesus*, the sand rat," *Spine*, vol. 27, pp.1626-1633, 2002.
- [4] Mizuno H, Roy AK, and Vacanti CA, "Tissue-engineered composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement," *Spine*, vol. 29, pp.1290-1297, 2004.
- [5] Maroudas A, Stockwell RA, and Nachemson A, "Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: Cellularity and diffusion of glucose in vitro," *J Anat.*, vol. 120, pp.113-130, 1975.
- [6] Stephen M, Richardson, and Rachael V, "Intervertebral Disc Cell-Mediated Mesenchymal Stem Cell Differentiation," *Stem cells*, vol. 24, pp.707-716, 2006.
- [7] Steck E, Bertram H, and Abel R, "Induction of Intervertebral Disc-Like Cells From Adult Mesenchymal Stem Cells," *Stem cells*, vol. 23, pp.403-411, 2005.
- [8] Risbud MV, Albert TJ, and Guttapalli A, "Differentiation of mesenchymal stem Cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: Implications for Cell-based transplantation therapy," *Spine*, vol. 29, pp.2627-2632, 2004.
- [9] Aguiar DJ, Johnson SL, and Oegema TR, "Notochordal Cells Interact with Nucleus Pulposus Cells: Regulation of Proteoglycan Synthesis," *Exp Cell Res.*, vol. 246, pp.129-137, 1999.
- [10] Yamamoto Y, Mochida J, and Sakai D, "Upregulation of the Viability of Nucleus Pulposus Cells by Bone Marrow-Derived Stromal Cells. Significance of Direct Cell-to-Cell Contact in Coculture System," *Spine*, vol. 29, pp.1508-1514, 2004.
- [11] Aulthous AL, Beck M, and Griffey E, "Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro," *In Vitro Cell Dev Biol.*, vol. 25, pp.659-668, 1989.
- [12] Archer CW, McDowell J, and Bayliss MT, "Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes in vitro," *J Cell Sci.*, vol. 97, pp.361-371, 1990.
- [13] Kimura T, Yasui N, and Ohsawa S, "Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures," *Clin Orthop.*, vol. 186, pp.231-239, 1984.
- [14] Bassleer C, Gysen P, and Foidart JM, "Human chondrocytes in tridimensional culture," *In Vitro Cell Dev Biol.*, vol. 22, pp. 113-119, 1986.
- [15] Beekman B, Verzij N, and Bank RA, "Synthesis of collagen by bovine chondrocytes cultured in alginate; posttranslational modifications and Cell-matrix interaction," *Exp Cell Res.*, vol. 237, pp.135-141, 1997.
- [16] Richardson SM, Curran JM, and Chen R, "The differentiation of bone marrow mesenchymal stem Cells into chondrocyte-like Cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds," *Biomaterials.*, vol. 27, pp.4069-4078, 2006.