

중간엽줄기세포의 초자화 동결법에 의한 냉동보존

이효종¹ · 강선영* · 박세진 · 이승용 · 이희천 · 고필욱 · 박지권** · 백원영** · 연성찬
경상대학교 수의과대학 동물의학연구소, *경상남도 야생동물센터, **경상대학교 의과대학

(게재승인: 2011년 8월 9일)

Cryopreservation of Mesenchymal Stem Cells by Vitrification

Hyo-jong Lee¹, Sun-young kang*, Se-jin Park, Seung-yong Lee,
Hee-chun Lee, Phil-ok Koh, Ji-kwon Park**, Won-young Paik** and Seong-chan Yeon

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine

**Gyeongnam Wild Life Center*

***School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*

Abstract : Mesenchymal stem cells (MSC) are pluripotent cells that can be found in umbilical cord blood from new borne babies as well as placenta, bone marrow, adipose tissue, amniotic fluid, muscle, *et al.* MSC are capable of renewing themselves without differentiation in long-term culture, also can be differentiated into various tissues under specific condition. Formulating a cryopreservation protocol for the MSC is required because these cells cannot survive for long periods under *in vitro* culture conditions and a new formulation of harmless cryoprotectant is needed for the direct injection of MSC into patients. The undifferentiated MSC were frozen with a vitrification solution of 40% ethylene glycol, 20% Ficoll-70 and 0.3 M sucrose. The survival rate after thawing and their proliferation rate were examined and compared with slow rate cooling methods using dimethylsulfoxide (DMSO). The vitrification method showed high survival rate after thawing and proliferation capacity comparable to DMSO. It can be suggested that ultra-rapid cooling method by vitrification is reliable methods for long term preservation of MSC and the vitrification solution with ethylene glycol, Ficoll-70 and sucrose will be more beneficially used for direct transplantation of MSC into patients than DMSO solution.

Key words : mesenchymal stem cells, cryopreservation, vitrification, human umbilical cord blood.

서 론

줄기세포는 신체 내의 모든 장기와 조직의 근간이 되는 세포로서 자기 재생이 가능하고 적절한 환경 아래 각종 혈구세포와 조직세포 뿐만 아니라 특정한 기관이나 조직으로 분화할 수 있는 능력을 지닌 세포이다. 1998년 Dr. Thomson (19)이 처음으로 사람의 배아세포로부터 줄기세포를 분리하여 내는데 성공한 이래, 이 줄기세포를 이용하여 많은 희귀병이나 난치병들을 치료하려는 연구와 시도가 활발하게 일어나고 있고, 재생불량성 빈혈, 암중, 관절염, 뇌졸중, 백혈병, 악성 자가면역성 질환 등에서도 좋은 치료 결과를 보고하고 있으며, 일부 난치병에서는 상용화 단계에 이르렀다(9,14).

사람과 동물의 태아시기부터 태반, 제대혈, 혈액, 폐, 간, 또는 골수로부터 발생되어 나오는 중간엽줄기세포 (mesenchymal

stem cell; MSC)는 골아세포, 근육, 연골, 건, 및 지방조직으로 발전할 수 있는 능력을 가지고 있음이 입증되었고 (1,5,6,10,13), 이의 분리와 활용에 관하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 또한 이들 중간엽줄기세포는 혈액, 심장근육세포, 간세포 및 신경세포로도 분화가 가능성이 주장되고 있다 (2,3,7,12,16,20).

다능성을 가지고 있는 줄기세포는 제대혈로부터도 다량 획득이 가능하다. 또한 제대혈 유래 줄기세포는 재생능력이 우수하여 증식배양이 잘 되며 제대혈 속의 림프구는 골수나 혈액보다 덜 성숙되어 있어 면역학적 부적합 확률이 낮아 거부 반응이나 감염 위험성이 매우 적은 편이어서 골수기증자를 찾지 못한 환자에게 골수이식 대안으로 떠오르고 있다. 또한 제대혈 이용의 장점은 폐기되는 탯줄에서 중간엽줄기세포와 조혈모세포를 채취하면 되므로 기증자에게 아무런 신체상 고통이 없다.

제대혈 뿐만 아니라 이로부터 분리하여 획득한 조혈줄기세포, 중간엽줄기세포 및 분화된 줄기세포의 장기보존을 위

¹Corresponding author.
E-mail : hjlee@gnu.ac.kr

하여서는 냉동기법의 활용이 필수적이며, 유사시를 대비한 장기보관 뿐만 아니라 제대혈로부터 다량의 줄기세포를 증식하여 확보하고, 필요한 조직 재생을 위한 각종 세포로의 분화 및 치료를 위한 이식 등에서 매우 유용한 것이다.

중전에는 줄기세포를 포함한 각종의 체세포와 수정란, 난자 및 정자와 같은 생식세포, 혈액 등의 냉동보존을 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 같은 물질이 항동제로 널리 사용되어 왔다. 그러나 DMSO는 냉동-융해 후 세포의 생존과 성장을 방해하여 배양액에 혼입되는 것이 바람직하지 않으며, 동결된 줄기세포를 직접 이식하고자 할 경우 생체에 주입되면 세포 독성이 강하여 직접 주입이 회피된다. 그러므로 줄기세포에 독성이 적고 환자의 생체 내에 직접 주입이 가능한 항동제의 개발이 필요하다.

근래에 항동제로 널리 사용되어 오던 glycerol이나 ethylene glycol에 sucrose, maltose, trehalose 등과 같은 이탄당 물질을 혼합하여 수정란이나 줄기세포를 vitrification 방법으로 초급속동결하여 장기보존하는 기술이 개발되고 있다. 그러나 줄기세포를 장기간 효율적으로 보존하며 인체에 무해한 동결보존에 관한 연구보고는 적으며 표준화되어 있지 못하다.

본 연구는 사람의 미분화된 중간엽줄기세포를 효율적으로 냉동보존하기 위하여 인체에 부작용이 적은 ethylene glycol, Ficoll-70 및 sucrose로 이루어진 항동제를 규격화하고 이를 사용하여 vitrification 법으로 초급속으로 냉동시켜 보존하는 기술을 개발하고자 시행되었다.

재료 및 방법

시약과 재료

본 시험에 사용된 시약과 재료 중, low-glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin은 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA) 제품을, DMSO, ethylene glycol, Ficoll-70, sucrose, Periodic acid-Schiff's staining system는 Sigma (St. Louis, MI, USA) 제품을, Ficoll-paque plus는 Amersham Biosciences (Sweden) 제품을, FACScan 기기는 Becton & Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을, freezing chamber는 Nalgene (Rochester, NY, USA) 제품을 사용하였다.

제대혈의 확보

태아의 제대로부터 채취된 제대혈액은 공여자의 허락을 득한 후 사용이 허가된 (IRB) 대학병원으로부터 공급받아 사용하였다.

제대혈로부터 중간엽줄기세포의 분리과 확인

제대혈을 사용하여 Ficol density-gradient centrifugation 방법으로 단핵세포구를 분리하고, 이를 10% FBS, L-glutamine 및 항생제가 첨가된 low-glucose DMEM 배양액으로 37°C/5% CO₂ 배양조건에서 계대배양으로 증식시켰었다. 이 배양된 세포들은 위상차현미경으로 발달과 형태학적 특성을 확인

한 다음, Periodic acid-Schiff's stain (PAS 염색)으로 줄기세포임을 확인하였고 아울러 FACScan을 이용한 flowcytometry로 줄기세포 특이 cytokines 의 발현을 확인하였다.

PAS 염색

Periodic acid-Schiff's staining system을 이용하여 실시하였다. 먼저 dish에서 media를 깨끗이 제거하고 공기 중에서 건조시킨 다음 formaline-ethanol fixative solution (formaline을 ethanol에 10%로 희석함)으로 1분간 고정 후 증류수로 수회 수세하여 고정액을 제거하였다. 고정 후 periodic acid solution으로 실온에서 5분간 반응시킨 후 증류수로 수세하였다. 다음 Schiff's reagent로 실온에서 15분간 반응시켰고 증류수로 수세하였다. 대조염색은 hematoxylin solution으로 90초간 실시하였고 증류수로 수세 한 후 dish를 공기 중에서 완전히 건조시켰다.

Flowcytometry에 의한 중간엽줄기세포의 확인

이 배양된 세포들은 CD13, CD29, CD44, CD73, CD105 (positive control) 및 CD34, CD45 (negative control) 등에 대한 antibodies와 immunolabelling한 다음, FACScan으로 검사하여 중간엽줄기세포임이 확인된 것을 시험에 공시하였다.

DMSO를 이용한 중간엽줄기세포의 완만냉동

분리 배양한 줄기세포를 10% DMSO가 함유된 DMEM 배양액에 1 × 10⁵ cells/ml 농도로 1 ml 씩 cryotube에 담은 다음 freezing chamber에 넣고 -80°C freezer에 넣어 분당 1°C씩 냉각시켜 냉동시켰다. 다음 날 cryotube를 꺼내어 액체질소탱크에 이동 보관시켰다. 동결보존된 줄기세포의 해동은 cryovial 용기로부터 꺼내어 37°C 수조에서 녹인 다음, 이를 DMEM 배양액에 넣고 500 × g에서 5분간 2번 원심분리하여 냉동제를 세척하였다. 줄기세포 수를 혈구계산기로 계산한 다음 DMEM 배양액에 1 × 10⁵ cells/ml 농도로 60 mm dish에 접종하고 5% CO₂ 배양기에 넣어 배양하였다.

초산화동결(vitrification) 방법에 의한 중간엽줄기세포의 급속냉동

완충용액 및 초산화동결액의 조성은 다음과 같다.

완충용액 : PBS 용액에 ethylene glycol이 20% 혼합된 용액
초산화동결용액 : FBS가 20% 함유된 DPBS 용액에 ethylene glycol; 40%, Ficoll-70; 20% 및 sucrose 0.3 M 농도로 혼합된 용액

급속냉동은 중간엽줄기세포를 원심분리하여 pellet을 얻고 50 μl의 완충용액을 혼합하여 5분간 정지한 다음, 초산화동결용액 500 μl를 넣고 40초간 반응시켰다. 다음으로, cryovial에 옮겨 담은 후 즉시 액체질소 통에 넣어 보관하였다.

동결된 중간엽줄기세포의 해동과 생존을 검사

동결보존된 줄기세포의 해동은 액체질소통에 보존된 cryovial 용기로부터 꺼내어 37°C 수조에서 녹인 다음, 이를 0.5 M sucrose/DPBS + 20% FBS 배양액 4.5 ml을 넣고 혼합시킨 다

음 동량(5 ml)의 DPBS+20% FBS를 넣어 혼합시키고(0.25 M sucrose/DPBS + FBS) 400 ×g에서 5분간 원심분리하여 pellet을 취하였다. 줄기세포의 냉동보존 후 생존율은 Trypan blue 염색법으로 확인하였다. 줄기세포 수를 혈구계산기로 계산하여 생존율을 확인하였다.

동결된 중간엽줄기세포의 증식을 조사

동결된 중간엽줄기세포를 해동한 다음 이들을 Low-glucose DMEM 배양액에 1×10^5 /ml의 세포 밀도로 60 mm 배양접시에 접종하고 5% CO₂ 배양기에 넣어 37°C에서 7일간 배양하여 이들의 증식율을 DMSO에 의한 완만동결법과 비교조사하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 측정치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 각 군간의 유의성 검정은 SAS program을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 하였다. 유의성은 5% 수준에서 검증하였다.

결 과

제대혈 유래 중간엽줄기세포의 분리 배양과 확인

Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation 방법으로 제대혈로부터 분리 배양된 단핵세포구를 10% FBS, L-glutammie 및 antibiotics가 첨가된 low-glucose DMEM 배양액으로 37°C/5% CO₂ 배양기에서 증식시켰다. 이 배양된 세포들은 위상차현미경으로 발달과 형태학적 특징을 관찰하였던 바, 그 모양은 방추형으로 가늘고 길게 뻗은 전형적인 중간엽줄기세포의 모양으로 관찰되었다(Fig 1A). 또한, PAS염색을 실시하여 붉은색을 나타내는 줄기세포 양성반응을 확인하였다(Fig 1B).

초자화동결법(vitrification)에 의한 중간엽줄기세포의 동결 보존 후 생존율

분리 배양한 줄기세포를 DMSO를 사용한 완만동결법과 초자화동결법으로 급속냉동 시킨 다음 이들을 용해시키고 줄

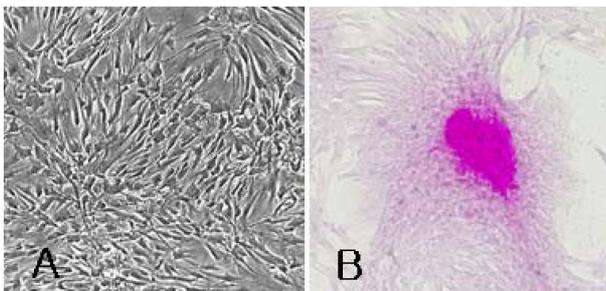


Fig 1. Phase contrast photograph and PAS staining of MSC derived from human umbilical cord blood. The UCB-derived MSC colonies showed dominant growth of bipolar fibroblast-like cells (A) and positive reaction of PAS staining (B). A: × 50, B: × 100.

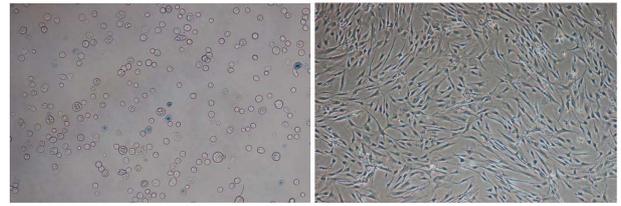


Fig 2. Phase contrast photograph of frozen-thawed MSC stained with Trypan blue (A) following vitrification and developed MSC (B) *in vitro* culture for 7 days.

Table 1. Survival rate of mesenchymal stem cells following cryopreservation with vitrification solution or DMSO (n = 5)

Groups	Mean number of live cells		Survival rate(%) (Mean ± SE)
	Before Freezing	After thawing	
DMSO	1×10^6	0.87×10^5	86.65 ± 3.00
Vitrification	1×10^5	0.83×10^5	83.24 ± 0.80

*No significant difference ($P < 0.05$) was shown between two freezing solutions

기세포 수를 혈구계산기로 계산한 다음 Trypan blue 염색법으로 생존율을 확인하였던 바(Fig 2), Table 1에 나타난 바와 같이 DMSO에 의한 완만동결법에서는 $86.65 \pm 3.0\%$ 의 생존율을 보였으며, 초자화동결법(vitrification)에 의한 급속냉동법에서는 $83.24 \pm 0.80\%$ 의 생존율을 보였다. 초자화동결법에 의한 생존율은 완만동결법에 의한 생존율에 비하여 낮았으나 유의적($P < 0.05$) 차이를 나타내지 않았고, 80% 이상의 높은 생존율을 보였다.

초자화동결법으로 동결보존된 중간엽줄기세포의 증식율

액체질소에서 동결보존된 후 용해된 세포를 low glucose DMEM 배양액에서 7일간 배양하여 증식능력을 확인한 결과, 냉동하지 않았던 줄기세포에서는 3.44 ± 0.39 배의 증식율을 보인 반면, DMSO에 의한 완만동결법에서는 2.21 ± 0.19 배로 증

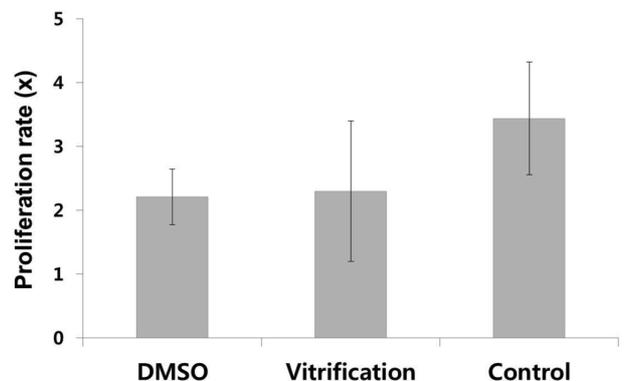


Fig 3. Proliferation rate of mesenchymal stem cells following cryopreservation with vitrification solution or DMSO. No significant difference ($P < 0.05$) was shown between two freezing solutions. Control: non-frozen MSC.

식이 되었고, 초산화동결법에서는 2.30 ± 0.49 배의 증식율을 보였다(Fig 3). 본 초산화동결법으로 냉동된 중간엽줄기세포는 해동 후에도 냉동하지 않은 대조군과 DMSO에 의한 완만동결법에 비하여 증식율에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 초산화동결용액을 이용한 급속냉동기법은 줄기세포의 냉동보존에 충분한 활용성이 있다고 사료된다.

고 찰

종전에는 줄기세포를 포함한 각종의 체세포와 수정란, 난자 및 정자와 같은 생식세포, 혈액 등의 냉동보존을 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 같은 물질이 항동제로 널리 사용되어 왔다(15). DMSO는 5~20% 범위의 농도로 사용되어 왔으며, 이는 세포 표면에서 초산화함으로써 세포막과 단백질을 안정화시킨다. 이와 더불어 glycerol, ethylene glycol, hydroxycellulose, disaccharides sucrose, maltose, 및 trehalose와 같은 물질이 생존을 향상을 위하여 DMSO와 혼합하여 사용되기도 하였다(8). 그러나 DMSO는 냉동-융해 후 세포의 생존과 성장을 방해하여 배양액에 혼입되는 것이 바람직하지 않으며, 동결된 줄기세포를 직접 이식하고자 할 경우 생체에 주입되면 세포 독성이 강하여 직접 주입이 회피된다. 그러므로 줄기세포에 독성이 적고 환자의 생체 내에 직접 주입이 가능한 항동제의 개발이 필요하다고 본다.

근래에 항동제로 널리 사용되어 오던 glycerol이나 ethylene glycol에 sucrose, maltose, trehalose 등과 같은 이탄당 물질을 혼합하여 수정란이나 줄기세포를 장기보존하는 초급속동결기술이 개발되고 있다. 초산화동결(vitrification)에 의한 급속냉동기법은 생체 세포를 항동제에 넣어 초급속으로 동결시킴으로써 세포 내에 얼음 결정의 형성을 방지하여 생존성을 향상시킬 수 있으므로 사람과 동물의 생식세포나 줄기세포의 장기보존에 효과적으로 사용되어 오고 있다(17).

Ethylene glycol은 비교적 세포 독성이 적으며, 난자의 투명대나 세포막 내에 빠르게 확산 침투하여 신속하게 평형을 이루는 장점이 있다. 이러한 사유로 근래에는 줄기세포나 수정란의 장기보존을 위하여 ethylene glycol이 함유된 항동제가 개발되어 오고 있으며, 급속냉동기법이 소개되어 오고 있다.

Ficoll 70은 세포 독성이 적고 용해성이 좋으며 낮은 점도를 가지고 있으며 냉동보존제에 의한 거대분자 물질의 침투를 증진시키는 작용을 한다.

Sucrose나 trehalose 같은 이탄당 ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 물질은 다양한 생물체에 높은 농도로 발견되며 생물체가 건조되더라도 생존하게 하는 기능을 가지고 있다. 이 물질은 세포가 동결되거나 건조될 때에 안정되게 하는 기능을 가지고 있어서 이를 혼합한 용액은 세포의 초산화를 형성하여 냉동보존이나 건조 과정에서 단백질을 보호하며 인지질의 파괴를 방지함으로써 세포막을 보호한다(4). 또한 Rodrigues (17)는 이 물질을 조혈 줄기세포 (hematopoietic stem cell)의 동결보존에 사용하였는데, DMSO와 혼합하여 사용하면 DMSO의 농도를 1/4 수준으로 줄일 수 있었다고 한다. Kasai (11)는 ethylene glycol,

Ficoll 및 sucrose 등을 혼합하여 항동제를 만들고 이를 사용하여 생쥐 수정란을 초산화동결(vitrification) 방법으로 냉동 보존하여 높은 수준의 생존율을 얻었으며 이를 대리모에 이식하여 산자를 얻는데 성공하였다.

제대혈과 이로부터 분화된 중간엽줄기세포는 원하는 시기에 안정되게 공급하기 어려울 뿐만 아니라 장기간 보존이 어렵다. 또한 최근 보고에서 냉동 보관되어 있던 제대혈의 경우 해동시켜 조혈모세포의 활성을 살펴보았을 때 그들의 생리적 생존율이 상당히 낮음을 보고한 바가 있다(18). 앞으로 제대혈, 조혈모세포 및 분화된 줄기세포의 장기간 보존을 위한 기술의 개발이 더 수행되어야 한다고 본다. 또한 ethylene glycol, Ficoll 및 sucrose 등의 혼합으로 조성된 항동제를 사용하여 초산화동결기법으로 냉동된 MSC를 융해 후 직접 생체 내에 이식하고 이들의 생존과 항동제의 생체에 미치는 영향에 관한 연구가 더 필요하다고 본다.

결 론

본 연구는 사람의 미분화된 중간엽줄기세포를 효율적으로 냉동보존하기 위하여 인체에 부작용이 적은 ethylene glycol, Ficoll-70 및 sucrose로 이루어진 항동제를 규격화하고 이를 사용하여 vitrification 법으로 초급속으로 냉동시켜 보존하는 기술을 개발하고자 시행되었다.

제대혈 유래 중간엽줄기세포를 40% ethylene glycol, 20% Ficoll-70 및 0.3 M sucrose의 혼합으로 이루어진 초산화동결용액을 이용한 초급속동결기법으로 냉동보존하고 이를 융해하여 생존율과 7일간 배양하여 증식율을 조사하였던 바, 미분화된 중간엽줄기세포의 냉동보존에 있어서는 이들 물질로 이루어진 초산화동결법과 DMSO 용액을 이용한 완만동결법 간에 유의적 차이 없이 83.24%의 높은 생존율과 2.30배의 증식율을 나타내었다. 그러므로 ethylene glycol, Ficoll-70 및 sucrose의 혼합으로 이루어진 초산화동결용액을 이용한 초급속동결기법은 줄기세포의 안정적이며 장기간 보존에 활용할 수 있을 것이며 또한 이 초산화동결용액은 DMSO 용액보다 적은 부작용이 기대되므로 생체 내에 직접 이식에 활용이 가능할 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 기초연구과제지원사업(KRF-2008-313-E00644)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 아울러 본 연구를 수행하는데 있어서 훌륭하게 기술적 지원을 해준 차윤임 선생에게 감사합니다.

참 고 문 헌

1. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-584.

2. Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 2006; 74: 46-57.
3. Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, Duchi R, Galli C, Lazzari G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 2005; 7: 154-166.
4. Crowe JH, Carpenter JF and Crowe LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*. 1998; 60: 73-103.
5. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-884.
6. Erices A, Conget P and Minguel JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood, *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242.
7. Faast R, Harrison SJ, Beebe LF, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Nottle MB. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 166-173.
8. Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med* 2000; 10: 257-264.
9. Ikehara S. Treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2001; 29: 661-669.
10. Jiang Y, Jahagirda BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Oritz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
11. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990; 89: 91-97.
12. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284.
13. Lee, O.K, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Blood* 2004; 103: 1669-1675.
14. Lennard AL, Jackson GH. Stem cell transplantation. *BMJ* 2000; 321: 433-437.
15. McLellan MR, Day JG. Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Introduction. Methods Mol Biol* 1995; 38: 1-5.
16. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002; 89: 338-351.
17. Rodrigues JP, Paraguassu-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouza LF, Porto LC. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology* 2008; 56: 144-151.
18. Shim JS, Cho B, Kim M, Park GS, Shin JC, Hwang HK, Kim TG, Oh IH. Early apoptosis in CD 34+ cells as a potential heterogeneity in quality of cryopreserved umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2006; 135: 210-213.
19. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
20. Zeng L, Rahrmann E, Hu Q, Lund T, Sandquist L, Felten M, O'Brien TD, Zhang J, Verfaillie C. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells* 2006; 24: 2355-2366.