

碩士學位論文

관절액이 골수 기원 줄기세포
생존 및 증식에 미치는
영향 분석



濟州大學校大學院

動物資源科學科

申 璇 瀛

2008年 8月

碩士學位論文

관절액이 골수 기원 줄기세포
생존 및 증식에 미치는
영향 분석



濟州大學校大學院

動物資源科學科

申 璇 瀛

2008年 8月

관절액이 골수 기원 줄기세포
생존 및 증식에 미치는
영향 분석

指導教授 鄭棟基

申璇瀛

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

2008年 8月

申璇瀛의 農學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校大學院

2008年 8月

The Effect of Human Joint-Fluid in the Survivorship
and Proliferation of Bone-Marrow Derived Progenitor
Cell

Sun-Young Shin

(Supervised by professor Dong-Kee Jeong)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER
OF AGRICULTURE

2008. 8.

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED.

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT.....	1
I. 서 론.....	2
II. 연구사.....	4
III. 재료 및 방법.....	10
(1) 골수세포 분리	10
(2) 골수 기원 세포 배양.....	10
(3) 실험군의 구분.....	10
(4) 관절 액에 따른 줄기세포 증식효과.....	11
IV. 결 과.....	14
V. 고 찰.....	21
인용문헌.....	26

ABSTRACT

Purpose : The aim of this study is to inspect The effect of human joint-fluid media on the survival and proliferation of bone-marrow derived progenitor cell and to provide the basic data of the intra-articular injection with scaffold-free progenitor cell in advanced degenerative osteoarthritis(OA).

Materials and Methods : We obtained the joint fluid and bone marrow from 15 patients who had total knee arthroplasty due to degenerative OA, and isolated the mesenchymal progenitor cells(MPCs) from bone marrow by washing and ten times subculture. We divided the control and experiment groups according to the addition of joint fluid at various ratios(1/100, 1/10, 1, 10, 100, 1000 μ l), and statistically analyzed the numbers of mesenchymal progenitor cell proliferated according to the culture period.

Results : The experiments using joint fluid without centrifuge showed the increase of MPCs as the culture period was extended and was independent to the existence of fetal bovine serum, the dose dependent pattern in the increase of MPCs in proportion to the of joint fluid, and statistically significant increase MPCs in 10, 100,1000 μ l of serum contained groups, 1000 μ l of serum-free groups (p=0.039, p=0.017, p=0.077, p=0.004). The experiments using joint fluid with centrifuge showed the increase of MPCs as the culture period was extended and was independent of fetal bovine serum, and the dose dependent pattern in the increase of MPCs in proportion to the dose of joint fluid, and statistically significant increase MPCs in 1000 μ l of both serum contained and serum-free groups (p=0.006, p=0.024).

Conclusion : MSCs not only can survive, but also proliferate in human joint fluid. The rate of proliferation is increased faster by the adding of joint fluid than only using common media in cell culture. And the experiment shows the dose dependent pattern in the increase of MPCs in proportion to the dose of joint fluid.

I. 서 론

20세기에 들어와 과학기술이 발전하면서 정치 · 사회 등 모든 분야의 발전이 이루어졌고, 경제 발전과 의료기술이 발달함에 따라 인간의 삶 및 생활수준이 높아지면서 인간의 평균수명도 연장되었다. 고도의 산업발달과 기술 발달로 교통수단의 대형화 및 고속화가 이루어져 인간의 삶은 과거에 비해 훨씬 편리해졌지만 이로 인하여 재해 및 교통사고는 증가하고 있으며 또한 다양한 질병 발병과 각종 성인병 증가, 인간 장애, 골절양상 등이 증가되면서 이제는 사회 문제로까지 대두되고 있다(유, 1980). 이 논문에서는 이러한 다양한 질병 중에서도 만성기능 장애를 일으키는 관절염에 대하여 논하여 보고자한다.

관절염이란 어떤 원인에 의해서든지 관절에 염증이 생긴 것, 관절의 물렁뼈가 없어지는 것을 모두 포함하여 이르는 병명이다. 또한 관절염은 통증을 유발하는 질환으로 관절 액을 만드는 활액막의 만성적 비대 및 반응이 나타나 관절연골과 그 주의 조직을 파괴하는 질환이다(길, 2000). 이 질환은 초기에는 관절의 부종과 통증을 초래하고 점차 진행됨에 따라 특징적인 관절변형 및 강직이 유발되고, 부종, 활동제한, 기능장애 등이 나타난다(대한정형외과학회, 1993).

과거에는 골절된 부분을 고정하기 위하여 비관혈적 용법과 관혈적 요법으로 골절 치료가 이루어졌으며 1932년 Key의 슬관절 고정술의 최초 이용을 시작으로 1949년에는 벨지움의 Dannis가 처음 골절 치료에 co-compression plate를 사용하였고, 현재는 AO그룹의 dynamic compression plate가 사용되고 있다(유, 1980).

관절염에 대한 비수술적 치료법으로 관절주사에는 관절 내에 있는 관절 액을 구성하는 유사한 성분 물질로 관절을 보호하는 역할을 하는 하이알루로닉 주사법 과 스테로이드 주사법이 이용된다. 하이알루로닉 주사법은 마모 및 손상된 연골을 보충하여 관절을 부드럽게 하고, 통증을 완화시켜주는 장점이 있으나, 가격이 비싸고, 주사 시 유지기간이 약 3~6개월 정도이며, 무릎 관절에만 이용할 수 있다는 단점을 가지고 있다. 또한 스테로이드 주사법은 염증을 완화시켜 통증을 억제하는 역할을 하지만 뼈에서 Calcium을 빠져 나가게 하는 단점을 가지고 있어 사용에 제한점이 있고, 다양한 성장인자들과 레이저 제제와 병합하여 관절 내 주사한 후 효과가 좋다는 결과를 보고하는 논문이 발표되었지만(Inoue 등, 2006 ; Miyakoshi 등, 2005), 연골하 골이나 활액막에 전반적으로 영향을 주어 부골의 생성이나 활액막 증식 등의 부작용이 보고되고 있으며, 농도에 따라 부작용 발생

정도가 달라 정확한 농도를 일정하게 유지시켜 주는 약물 조절 시스템이 필요하다는 약점을 가지고 있다(Luyten, 2004). 이러한 문제 해결을 위하여 약물 조절 시스템을 개발하고자 많은 연구들이 진행되고는 있지만 아직까지는 완전한 시스템이 없는 것으로 알려져 있다.

관절염에 대한 수술적 치료 방법에는 환자의 연골세포를 얻은 후, 이를 In vitro 상에서 differentiation 과 proliferation 시켜 연골 덩어리를 만든 후 이를 연골 손상 부에 이식하는 방법이 있다(Baksh 등, 2003 ; Corr 등, 2002 ; Izuta 등, 2005 ; Jones 등, 2002 ; Katayama 등, 2004 ; Oshima 등, 2004 ; Wakitani 등, 2002 ; Yanai 등, 2005). 이 방법은 수술에 따른 환자의 경제적, 정신적 부담 증가, 공여부 이환(donor site morbidity)에 의한 채취 부위의 관절염 진행에 따른 문제가 있고, 연골 덩어리 이식 시 국소적 병소 부분만이 해결되므로 전반적인 관절염 치료에 있어서 한계를 나타낼 수 밖에 없다. 그래서 최근에 대두된 기법이 줄기세포(Stem Cell)를 이용하는 조직공학기법이다.

Bone-Marrow에서 유래된stem-cell 을 in vitro에서 culture하여 대량으로 얻어(Chen 등, 2005 ; Luyten, 2004 ; Neidhart 등, 2003 ; Waktani 등, 2002 ; Yamasaki 등, 2005) 이들의 생존 및 분화율을 높이기 위하여 지지체(scaffold)를 이용하는 조직 공학기법이다(Izuta 등, 2005 ; Jorgensen 등, 2004 ; Oshima 등, 2004 ; Tabata 등, 1995).

관절은 인체에서 가장 많은 스트레스를 받는 부분 중 하나이다. 관절염이 발생하면 관절의 기능이 떨어지고, 관절염이 심해지면 통증 또한 증가하여 생활에 많은 어려움과 제약을 받게 된다. 대부분의 환자들은 관절염이 발병하는 근본적인 원인을 찾아 치료하기 보다는 단지 통증을 없애는데 더 많은 관심을 갖는다.

인간의 골수에는 조혈모세포(골수줄기세포)와 골수기질세포(骨髓基質細胞, stromal cell)인 간엽줄기세포가 있는데 조혈모세포는 혈구세포를 만들고, 골수기질세포는 뼈, 연골, 지방섬유조직을 만든다. 따라서 본 논문에서는 간엽조직을 만드는 골수기원세포의 관절 내 주사 시 이 세포의 생존에 영향을 줄 수 있는 가장 중요한 물질이 관절 액이라 생각하여, 관절 액이 골수 기원 세포의 생존 및 성장에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보하고자 하였다.

II. 연구사

1. 관절염 치료

관절 연골의 손상으로 관절 면이 불규칙하게 되면 관절 기능의 장애 및 동통이 수반되므로 관절연골 손상 시 치유의 특성을 완전히 이해하는 것은 매우 중요하다(편, 1997).

1743년 Hunter는 Hippocrates 시대부터 파괴된 관절 연골은 치유되지 않으며 문제를 일으킨다고 했으며, 일부 학자들은 골수나 활액막 그리고 관절연골 세포로부터 섬유조직이 증식되어 이들이 섬유성 연골로 변성되어 치유된다고 주장하였다(Gurtl, 1853 ; Fisher, 1992 ; Shands, 1931 ; Key, 1931 ; Ito, 1924 ; Benett, 1935 등). 그리고 Calandruccio(1962)는 관절 연골 결손 시 결손 주위의 정상 관절연골로부터 정상연골로 치유되나, 전층의 관절 연골 결손 시는 연골하 골로부터 육아 조직이 성장하여 연골로 치유되며, 약 10%에서 관절 연골인 초자연골로 치유되는 것을 관찰 할 수 있었다고 보고하였다. 하지만 어떤 과정을 거쳐 연골 세포가 형성 되는지는 아직도 논란의 대상이 되고 있다(편, 1997).

관절 연골은 연골 세포와 이를 둘러싸고 있는 수분을 함유한 거대분자(macromolecule)의 연골 간질(chondroid matrix)로 구성되어 있으며 연골 간질은 교원질(collagen), 프로테오글리칸(proteoglycan) 및 비교원성 단백질(noncollagenous protein) 등을 포함하고 있다(Buckwalter 등, 1990).

관절 연골 성분으로는 하이알루로릭(Hyaluronic), 스테로이드(Steroid), 글루코사민(Glucosamin), 콘드로이틴(Chondroitin), 프로테오글리칸(Proteoglycan) 등이 있다. 하이알루로닉 과 스테로이드 성분은 관절을 부드럽게 해주는 역할을 하며, 글루코사민 성분은 연골을 보호하고, 연골 판 생성을 도와준다. 또한 이 성분은 몸을 구성하고 있는 성분 중의 하나로 관절 연골의 형성과 손상된 관절의 회복과 관계가 있다. 콘드로이틴 성분은 연골을 구성하는 또 다른 성분으로 탄수화물로 되어있으며, 연골 생성 및 유지, 연골에 영양을 공급하고, 외부 충격을 방지하며, 이 성분이 연골에 존재하므로 하여 관절에 탄력을 유지하게 해 주는 역할을 한다. 프로테오글리칸 성분은 관절 연골에 영양을 공급하는 역할을 한다.

관절 연골 세포는 사람의 경우 일반적으로 성장이 멈춘 후에는 더 이상 특별한 반응이 없는 조직이다. 그리고 연골에는 혈관이 존재 하지 않는 즉, 혈관 분포가 없어 주변 조직으로부터 영양 공급을 받으며, 한번 손상된 연골은 혈관이 존재하는 다른 조직에 비해 스스로 치유되는 능력이 없기 때문에 치유과정도 다른 것으로 생각되며 확실한 치유과정은 관절 기능에 중요한 역할을 하게 되지만 그 과정은 아직까지 잘 알려져 있지 않다(편, 1997).

토끼의 관절 연골 인공 손상 후 재생 과정을 살펴 본 연구 논문에서는(편, 1997) 수술 후 1주에서는 미분화성 간엽조직(undifferentiated mesenchymal tissue) 과 혈관 등이 확인되었으며, 수술 후 10주에서는 규칙적으로 배열된 연골 세포를 가지는 정상적인 연골 조직과 분화가 잘 된 연골하부 골 조직을 관찰되었으며, 비교적 부드러운 연골 표면을 관찰할 수 있었다고 한다. 이 논문에서 알 수 있듯이 관절 연골 세포는 정상 상태에서는 증식 할 수 있는 능력을 보유하지 않으며 손상된 연골에서 세포 재생능력을 갖고 있다고 사료된다.

관절염이란 관절에 염증이 생긴 것과 관절의 물렁뼈가 없어지는 것을 모두 포함하여 이르는 병명으로 관절염의 종류에는 퇴행성 및 골성 관절염, 류마티스 관절염 등 여러 종류가 있다.

우리가 얘기하는 관절염은 보통 퇴행성관절염으로 이것은 노화, 관절의 과다사용, 과도한 관절 사용을 포함한 스트레스로 인하여 관절연골의 국소적인 퇴행성 변화와 골 조직의 기형 등의 증상을 보인다.

퇴행성관절질환은 관절염 중 가장 흔한 형태이며, 심혈관 질환 다음으로 성인에게 만성 기능장애를 일으키는 원인이 된다(이 등, 2005). 퇴행성관절질환 중 흔히 발생하는 관절은 하지의 슬관절 과 고관절이다.

슬관절은 관절 중에서 가장 활동이 많은 부분으로 슬관절의 무리한 사용은 관절연골의 손상을 일으켜 골관절염을 발생시킨다(장, 1993).

슬 관절의 무리한 사용으로 연골이 마모되고 손상을 입으면 심한 통증을 동반하게 되는데 이러한 통증은 관절끼리 움직이는 마찰 과정에서 진액 부족으로 발생하게 되며 이는 염증물질 등에 따른 노폐물에 의한 것으로 관절운동의 장애를 일으키고, 관절 내 인대(ligament) 상실에 따른 통증, 관절의 굴곡변형 , 관절구축 및 부종 등 임상적이 증상들이 나타나게 되고, 이러한 장애는 일상생활에도 큰 영향을 미치게 된다.

류마티스 관절염은 장기 비특이적인 자가 면역성 질환으로 임상적으로는 대표적인 만성적 다발성 관절염을 일으키게 되며 적절한 치료가 이루어지지 않으면 관절을 손상시켜 기능 장애를 일으키며, 심한 경우 사망에까지 이르게 하는 만성

염증 질환이다(Harrus E, 1998).

슬 개골 연골 연화 증은 슬 개골 관절 연골의 연화 현상(softening)을 일으키는 질환으로 이 질병은 젊은 층에서 대개 발병되며 슬 관절통의 원인이 되고, 슬 개골 후부 동통, 대퇴-슬 개골 관절의 염증 등의 증상을 보인다.

관절염의 치료방법으로는 관절경하 연골성형술이 있으며, 레이저를 이용한 연골성형술도 시행되고 있다. 레이저를 이용한 시술은 관절경하 수술은 조기 동통 완화에 효과가 있고, 기간 단축으로 경제적이며 관절 내 출혈성 삼출 및 반응성 활액막염과 같은 합병증의 빈도도 낮아 우수한 치료 방법이다.

하지만 관절 연골 세포의 laser에 의하여 재생에 있어 의문점이 많으며, 레이저 효과에 대한 논란의 여지 또한 안고 있다(변 등, 2000). 그리고 슬관절내 반월성 연골 판 손상 치료는 연골 판 자체가 관절에 미치는 영향은 적고, 연골 판 절제술이 간단하며 수술 후 치료가 간편하여 연골 판 절제술이 과거에는 많이 이용되었다(김 등, 1993).

활액막 절제술은 골이나 연골의 파괴 없이 관절에 염증이 있을 시 시술하게 되는데 관 혈적 혹은 관절경적 활액막 절제술 모두 좋은 결과들로 보고되고 있다(이 등, 2005). 그리고 골이나 연골 손상으로 인한 관절염에는 인공 슬 관절 치환술이 가장 좋은 방법으로 알려져 있으며, 통증 약화 및 기능 향상을 보이고, 시술한 인공관절은 약 10년 이상의 수명을 가진다(이 등, 2005). 하지만 Johnson 등은 연골판 적출 후 오히려 동통, 퇴행성관절염 및 인대이완 등의 부작용이 높아짐에 따라 젊은 환자에게는 연골 판 절제술을 피해야 한다고 보고하였다(Johnson, 1984).

슬 골관절염의 위험요소로는 연령, 성, 인종, 유전인자, 비만, 관절의 외상 등으로 인한 관절에 미치는 스트레스 등이 있으며 무리한 운동 및 여성의 경우 폐경기 후 에스트로겐 사용으로 슬 골관절염이 발생한다고 알려지고는 있지만 한국에서는 슬 골관절염 환자의 관절 운동에 따른 감소 영향에 미치는 요인에 대한 연구는 거의 없는 실정이다(박 등, 1994).

이미 진행되어 있는 관절염 치료방법으로는 최근 인공관절 치환술, 관절경 수술, 절골술, 자가연골이식술이 이용되고는 있지만 가장 확실한 치료 방법은 인공관절 치환 술이다. 이 시술은 퇴행성관절염 중에서 연골이 모두 닳아 없어진 경우에는 수술이 어렵고, 인공관절의 수명이 평균 약 10년 정도로 일정기간이 지나면 재수술을 받아야하며 감염, 혈전증 및 관절의 강직 등과 같은 합병증을 동반할 수도 있으므로 최후의 수단으로 시술되어야 한다.

골수 기원 세포 이식에 있어서 지지체 없이 세포를 직접 관절 내 주사 형태로 주입하는 것도 상기에 언급한 여러 방법 외에 관절염 치료의 방법이 될 수 있으리라고 생각한다.

2. 줄기세포의 정의 와 분류

인체를 이루고 있는 세포는 사람에 따라 조금씩 다르긴 하지만 일반적으로 약 60조(60kg인 경우)에서 100조 개 정도의 세포로 이루어져 있다(Tsutomn, 2006). 이들 각각의 세포는 동일한 유전자를 가지고 있으며 이들 세포들은 활동하는 유전자가 다르게 존재하기 때문에 인간의 신체를 구성하는 260여 가지 이상의 기관, 장기 등으로 분화 할 수 있다.

줄기세포는 우리 몸을 구성하는 모든 세포들의 기원이 되는 세포로 출생 후부터 극히 소량으로 우리 몸에 존재하면서 생명 유지에 필요한 세포를 생산한다(곽 등, 2003). 우리 몸의 여러 종류의 장기나 기관, 조직으로 분화 할 수 있는 능력을 가진 세포는 '미분화상태'이며(곽 등, 2003 ; 우, 2005) 적절한 조건과 환경에서 배양액과 함께 배양시키면 우리가 원하는 다양한 기관, 조직세포로 분화 시킬 수 있다. 이렇게 분화시킨 세포는 우리 몸의 고장 나거나 손상된 조직, 기관을 치료하거나 재생 시킬 수 있는 즉, 세포를 치료할 수 있게 되는데, 이러한 공학이 생명공학(biotechnology)이다.

줄기세포를 특수한 조건에서 키우면, 파킨슨병이나 당뇨병과 같은 질병에 걸려 손상된 조직을 대체할 수 있으며, 신약과 새 치료법을 개발하는 데에도 쓰일 수 있다(Chrisopher, 2006 ; Tsutomu 등, 2006). 그리고 현대의 의학으로는 치료가 불가능한 암, 헌팅턴 병, 알츠하이머 병 등 또한 줄기세포를 이용하여 치료 할 수 있다(James 등, 2004).

줄기세포는 우리가 흔히 알고 있는 일반 세포와는 다른 차이점을 가지고 있다. 몸을 구성하는 대부분의 세포들은 예를 들어 일반세포 중 간세포는 간세포만을 복제하듯이 자신을 복제하는 일 밖에는 하지 못 한다(James 등, 2004). 하지만 줄기세포는 적절한 환경 및 배양액을 유지시켜주면 분화하여 다양한 세포들을 생산할 수 있다(James 등, 2004).

우리 몸 안에 있는 아직 미분화된 줄기세포는 다음의 3가지 특징을 갖는다. 첫째, 줄기세포는 자가 증식, 재생 능력을 가진다. 둘째, 줄기세포는 미분화 된 세포이다. 셋째, 적절한 조건 및 상태를 유지하면 원하는 특정 기능을 가진 세포로 분화시킬 수 있다(Christopher, 2006). 그리고 줄기세포는 크게 3가지로 분류할 수 있다.

사람의 경우, 수정란이 처음 분열하여 만들어지는 만능줄기세포(정자와 난자가 만나 수정된 후), 만능줄기세포들이 분열을 거듭하여 만들어지는 것이 배아줄기세포(전분화능세포, Pluripotent cell)이며, 성숙한 조직 과 기관에 들어있는 것을 다능줄기세포(성체줄기세포, Multipotent cell)이다(김, 2007 ; 김, 2005).

줄기세포는 세포의 근원과 분화성에 따라 배아줄기세포(Embryonic Stem Cell)와 성체줄기세포(Adult Stem Cell)로 구분할 수 있다. 성체줄기세포는 혈액, 망막, 골수, 뇌, 피부, 척장 등 인간의 몸 안에 있는 모든 세포에 존재하며, 배아줄기세포는 정자와 난자가 만나 수정되고, 수정된 후 약 5~6일 뒤에 내부세포덩어리가 생기며 in vitro에서 계대배양(김, 2007)하면 미분화 상태를 유지하면서 세포덩어리(Embryoid body)를 형성하는데 (곽 등, 2003) 여성의 몸에 착상하기 전의 수정란이나 임신 초기 자궁에서 발생중인 태아의 생식기에서만 만들어진다.

1) 배아줄기세포

배아줄기세포는 만능세포로 엄청난 잠재력을 지니고 있으며, 스스로 분화하는 (James, 2004) 줄기세포는(Christopher, 2006 ; 김, 2007) 지금으로부터 약 20여 년 전 80년대 초 생쥐 실험에서 비롯되어 1998년 미국 위스콘신대학의 Thomason 과 존스홉킨스 대학의 배아생식세포의 존기어 박사 연구를 처음으로 하여 확립되었다(Christopher, 2006 ; 김, 2007). 국내에서는 차병원, 미즈메디병원, 마리아병원 등에서 배아줄기세포를 만드는데 성공하였다(변 등, 2000).

2002년 7월에는 과학기술부 프런티어 사업으로 세포 응용 연구 사업단이 만들어지면서 배아줄기세포주 은행을 운영하고 있으며 2005년 10월 20일 서울대 병원에 문을 연 '세계 줄기세포 허브(WSCH·World Stem Cell Hu'b)'는 전 세계 줄기세포 연구의 center가 되었다(김, 2005).

현재 파킨슨씨 증후군, 당뇨병성 신부전, 탈모, 심장질환, 버거씨병, 아토피성, 피부병 등을 대상으로 세포 치료 할 수 있는 방법에 연구를 집중시키고 있으며, 몇 가지 질병에서는 동물 실험으로 입증된 사례도 있다(박, 2000).

대표적인 예로는 1977년 Andrew Kang 박사 등에 의해 확립된 콜라겐 유도 관절염은 류마티스 관절염 모델 중 가장 널리 쓰이는 대표적인 자가면역성 관절염

모델이다(Trentham, 1977). 이 모델은 처음 쥐(rat)에서 연구된 이래 마우스 및 원숭이 종에서도 성공적으로 연구를 마쳤으며 현재는 주로 마우스에서 실험되고 있다(Jeehee 등, 2005 ; Ji 등, 2002 ; Ji 등, 2002 ; Kim 등, 2004 ; Lee 등, 2002 ; Wipke 등, 2001).

2) 성체줄기세포

성체줄기세포는 이미 성숙된 성인의 몸 안에 자리 잡은 세포로 발생학적으로는 태어나기 전부터 존재하는 어느 정도 분화된 세포이다(Christopher, 2006). 성체줄기세포는 몸의 여러 곳에 존재하며 조직 및 세포가 손상되거나 노화가 되면 새로운 세포로 대체된다(Christopher, 2006).

성체줄기세포는 미분화 상태의 세포이므로 체외에서 어떻게 처리하느냐에 따라 배아줄기세포만큼 다양하진 않지만 그래도 많은 종류의 다른 세포로 분화시킬 수 있으며 자가 증식(self-renewal)능력 과 분화능력을 가지고 있다(김, 2007).

예를 들어보면, 팔에 있는 성체줄기세포를 내가 원하는 방향의 일정한 조건으로 처리하면 신경세포, 근육세포, 지방세포 등으로 분화시킬 수 있다는 것이다. 또한 성체줄기세포를 우리 몸에 이식하여 치료의 목적으로 사용될 경우, 환자 자신의 세포를 이용하여 얻을 수 있으므로 배아줄기세포에 비해 면역 거부 반응이 적으며, 윤리적인 문제도 해결될 수 있다.

성체줄기세포가 존재하는 신체 부위로는 신경줄기세포, 제대혈, 혈액, 근육, 지방조직, 등이 있다(김, 2007). 태아의 중추신경계 및 말초신경계에는 한 개의 세포가 여러 신경세포로 분화할 수 있는 신경줄기세포가 존재하고, 면역기능이 왕성한 성체에서 얻은 혈액줄기세포나 골수에 비해 거부반응을 적게 일으키며, 이로 인하여 이식 치료에 활용될 수 있을 것으로 기대된다(Christopher, 2006 ; 김, 2007).

혈액에 있는 혈액줄기세포는 골수에 존재하며, 이러한 세포들은 골수줄기세포와 같이 백혈병이나 암 및 혈액관련 질병 치료제로 사용된다(김, 2007).

근육에는 근육조직이 있으며 근육이 손상을 입었을 때 치료 및 재생에 관여하며, 근세포 및 근섬유가 손상 받았을 때 치료하는 위성세포(satellite cell : 근육을 둘러싸고 있는 세포), 골수에서 유래한 조혈세포, 근육줄기세포 등이 존재한다.

지방조직은 어른이 된 후에도 세포분화를 통하여 계속해서 새로운 지방세포들을 생성하게 되는데 이러한 지방 전구세포들은 인슐린, 스테로이드 호르몬 등의 자극에 의해 근육, 연골 등과 같은 여러 조직으로 분화할 수 있는데 세포를 골

수에서 얻는 것보다 지방조직에서 얻는 게 더 용이하므로 새로운 공급처로 주목 받고 있다.



III. 재료 및 방법

1. 골수세포 분리

퇴행성관절염으로 슬관절 인공관절 치환 수술을 받은 환자에게서, 수술 과정 중, 슬관절의 관절절개 시 고여 있는 관절액과 대퇴골 및 경골의 골수강 내에서 자연적으로 흘러나오는 골수를 얻어 실험에 이용하였으며, 이 실험에 대해 환자들에게 연구 허용에 대한 조직 기증 동의서를 받았다. 15명의 환자에게서 관절액 및 골수를 50cc 주사기를 이용하여 채취하였고, 환자 1인당 관절액은 5~12ml(평균 8.7ml), 골수는 10~14ml(평균 12.3ml)를 얻었다.

2. 골수 기원 세포의 배양

채취된 골수를 Phosphate buffered saline(PBS)를 이용하여 세척한 후 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO)과 20% fetal bovine serum(FBS, Hyclone) 배지를 사용하여 35T flask에 침전시킨 후 37°C, 90% 습도, 5% CO₂ 상태의 배양기에서 배양하였다. 배양 24시간 후 flask 바닥에 부착되어 군집을 이룬 세포를 PBS로 2번 세척하였다. 이 세포들을 일주일에 한 번씩 계대배양(sub-culture)하였고, 이 과정을 10차례 시행한 후 골수 기원 세포를 얻었다.

3. 실험군의 구분

A 실험(유혈청 실험)은 일반적으로 세포를 배양할 때 사용하는 조건인 DMEM과 FBS의 배지 상태에 관절액을 첨가한 경우에, 골수 기원세포의 생존 및 성장 정도를 알아보기 위한 것으로, DMEM과 FBS 배지 상태에 골수 기원 세포를 배양한 대조군(A-1)과 DMEM과 FBS 배지에 관절액을 첨가한 후 골수 기원 세포의 배양 정도를 알아보는 실험군(A-2)으로 구분하였다.

B실험(무혈청 실험)은 FBS가 없는 단지 DMEM만이 처리되어 있는 배지 상태에

골수 기원 세포를 배양한 대조군(B-1)과 DMEM 처리된 상태에 관절 액을 첨가한 후 골수 기원 세포의 배양 정도를 알아보는 실험군(B-2)으로 구분하였다.

각 실험에 첨가된 관절 액은 $1/100\mu\text{l}$, $1/10\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$, $1000\mu\text{l}$ 정도로 각각 양을 달리하여 첨가하였고, 각각의 배지에 처음에는 hemacytometer를 이용하여 2×10^4 개의 세포를 세어 seeding하였다. 그 후 배양 5일째, 10일째, 15일째, 20일째 particle analyzer (PA-2000[®], ERMA, Japan, Tokyo)를 이용하여 세포 수를 센 후 이를 각 군 간에 비교 분석하였다.

C, D 실험은 A 및 B 실험의 역검증으로, 관절액내에 존재 가능한 지방세포, 조골세포, 연골세포, 골수 기원 세포가 우리가 배양한 골수 기원 세포와의 상호 또는 상승 작용에 의해 A, B 실험에 오류가 발생할 수 있는 문제점을 없애기 위해, 관절 액을 고속 원심분리기를 이용하여 16,000rpm으로 5분간 원심분리 한 후 가라앉은 세포를 제거한 순수 관절 액으로 구성된 상층 액을 사용하여 상기 실험을 다시 한 번 반복하여 각 실험군 간에 비교 분석하였다. 각 실험에 있어서 통계적 분석은 student-t-test를 이용하여 유의 수준 0.05이하에서 검정하였다.

4. 관절 액에 따른 줄기세포 증식효과

각 실험군은 35T flask에 10차례 계대배양을 하여 안정화된 골수 기원 세포를 사용하였고, A실험(유혈청 실험)에서 6-well plate의 각 plate에 DMEM과 10% FBS 3ml씩을 배지로 사용하였다. 6-well plate의 각 plate에 환자 1명에게서 얻은 인간 관절 액을 $1/100\mu\text{l}$, $1/10\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$, $1000\mu\text{l}$ 단위로 첨가하였고, 2×10^4 개의 골수 기원 세포를 DMEM과 10% FBS에 관절 액을 첨가한 배지에 seeding 하여 이 세포의 성장 정도를 확인하였다.

각 plate에 자란 세포의 수를 배양 5일째, 10일째, 15일째, 20일째 particle analyzer를 이용하여 세었고, 같은 실험을 3개의 6-well plate에서 반복 시행하여, 각 plate 당 세포수의 평균값을 얻었다. 이 값은 환자 1명에서 얻어진 값으로 정하고, 상기 실험을 15명의 환자에게서 진행 후 얻어진 각각의 평균값을 비교 분석하였다.

B실험(무혈청 실험)에서는 상기 기술한 방식대로 시행하였으며, 단지 이용된 배지를 DMEM 3ml만 처리한 상태에 상기 기술한 대로 용량별로 관절 액을 첨가한

다음 상기 실험 방식대로 각각의 평균값을 비교 분석하였다.

C, D실험은 상기 A, B실험의 역검정 실험으로 A, B실험과 동일한 방식으로 진행하였으며, 관절 액을 첨가 시 관절 액 내에 있는 다른 세포들에 의한 상호 또는 상승 작용에 의한 오류를 제거하기 위해 관절 액을 원심 분리하여, 관절액 내에 혹시 존재할 수 있는 세포를 제거한 순수 관절 액을 이용하여 실험하였다. 또한 혈청(fetal bovine serum)의 첨가 유무에 따라 관절 액의 첨가 시 세포수의 증가 정도를 확인하기 위해, 각 관절 액의 첨가 정도가 같은 양에서 혈청의 유무에 따라 student t-test를 이용하여 통계적으로 비교 분석하였다.



IV. 결 과

1. A실험(유혈청 실험)에서 골수 기원 세포의 성장 정도

A실험(유혈청실험)은 일반적인 세포 배양 조건인 DMEM+10%FBS 배지 상태에 관절 액을 첨가하여 골수 기원 세포의 생존 및 성장 정도를 알아보기 위한 실험이다. DMEM+10%FBS 배지에 골수기원세포를 첨가하여 배양정도를 알아보는 A-1실험과 DMEM+10%FBS 배지에 관절액과 골수 기원 세포를 첨가하여 배양정도를 알아보는 A-2실험을 실시하였다. DMEM 과 FBS 3ml에서 골수 기원 세포의 성장 정도를 알아 본 대조군(A-1)은 배양 1일 후에는 별 다른 차이를 발견하지 못하였다. 배양 5일째 $0.004 \times 10^7 \pm 0$, 10일째 $0.09 \times 10^7 \pm 0$, 15일째 $0.15 \times 10^7 \pm 0$, 20일째 $0.23 \times 10^7 \pm 0$ 개로 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가하였고, 관절 액을 첨가한 실험군(A-2)은 1일 후 $100 \mu\text{l}$ 와 $1000 \mu\text{l}$ 에서 관절 액이 세포에 부착되어 있음을 확인할 수 있었다.

5일째 $1/10 \mu\text{l}$, $1/100 \mu\text{l}$, $1 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{l}$ 의 경우에는 대조군과 비슷한 양상을 보였으며 $100 \mu\text{l}$ 의 경우 관절 액이 세포에 부착되어 배양되면서 대조군과 비교되었다. $1000 \mu\text{l}$ 의 경우에는 $100 \mu\text{l}$ 보다 대조군과 확연한 차이를 보였으며 10일째 $100 \mu\text{l}$ 와 $1000 \mu\text{l}$ 에서 대조군과 확연한 차이를 보였다.

$1/100 \mu\text{l}$ 에서 5일째 $0.004 \times 10^7 \pm 0$ 에서 20일째 $0.37 \times 10^7 \pm 0$ 개로 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였으며, $1/10 \mu\text{l}$, $1 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{l}$ 에서도 $1/100 \mu\text{l}$ 와 같이 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였다.

$10 \mu\text{l}$ 에서 5일째 $0.14 \times 10^7 \pm 0.02 \times 10^7$ 에서 20일째 $0.09 \times 10^7 \pm 0.06 \times 10^7$ 개, $100 \mu\text{l}$ 에서 5일째 $0.8 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^7$ 에서 20일째 $2.11 \times 10^7 \pm 0.8 \times 10^7$ 개, $1000 \mu\text{l}$ 에서도 5일째 $0.8 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^7$ 에서 20일째 $4.7 \times 10^7 \pm 0.6 \times 10^7$ 개로 대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준으로 세포수가 증가하였고(student t-test, $p=0.039$, $p=0.077$, $p=0.017$), 관절 액의 첨가량에 따라 비례하여(dose dependent) 세포수의 증가를 보였다 (Fig.1).

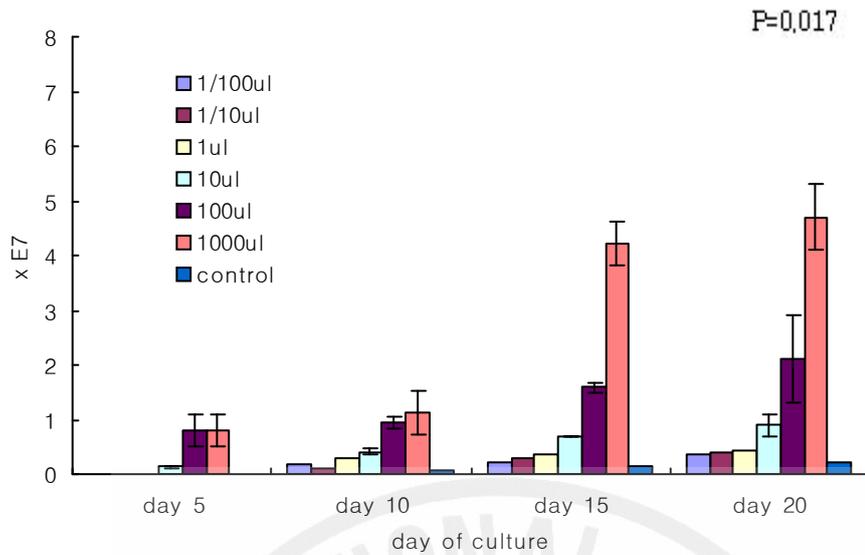


Fig.1. Effect of joint fluid(JF) in human MPCs from degenerative osteoarthritis patients under the fetal bovine serum and DMEM. MPCs which is established from degenerative osteoarthritis patients were treated whole JF without high centrifuge.

2. B실험(무혈청 실험)에서 골수 기원 세포의 성장 정도

B실험(무혈청 실험)으로 pure DMEM 배지에 골수 기원 세포를 첨가하여 배양 정도를 알아보는 B-1실험 과 pure DMEM 배지에 관절액과 골수 기원 세포를 첨가하여 배양 정도를 알아보는 B-2 실험을 실시하였다.

DMEM 3ml에 골수 기원 세포의 성장 정도를 알아 본 대조군(B-1)은 배양 1일 후에는 별 다른 차이를 보이지 않았으며 5일째 $0.004 \times 10^7 \pm 0$, 10일째 $0.02 \times 10^7 \pm 0$, 15일째 $0.48 \times 10^7 \pm 0$, 20일째 $0.52 \times 10^7 \pm 0$ 개로 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가하였고, 관절 액을 첨가한 실험군(B-2)은 1일 후 1/100 μ l, 10 μ l, 100 μ l에서 세포에 관절 액이 부착되어 성장됨이 관찰되었고, 대조군과도 차이를 보였다.

5일째 1/10 μ l, 1/100 μ l, 1 μ l, 10 μ l에서는 대조군과 비슷한 양상을 보였으며, 100 μ l와 1000 μ l에서는 관절 액이 세포에 둘러싸여 자라는 양상을 보이면서 대조군과 차이를 보였다.

1/100 μ l에서 5일째 $0.004 \times 10^7 \pm 0$ 에서 20일째 $1.16 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7$ 개로, 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였다. 관절 액의 첨가량이 증가함에 따라 비례하여 세포수가 증가하였으나, 1 μ l에서만 5일째 $0.004 \times 10^7 \pm 0$ 에서 20일째 $0.79 \times 10^7 \pm 0.2 \times 10^7$ 개를 보여, 1/100 μ l, 1/10 μ l의 관절 액을 첨가한 경우보다 세포수가 적게 나타났다.

관절 액의 첨가량이 가장 많은 1000 μ l에서만 5일째 $0.08 \times 10^7 \pm 0.02 \times 10^7$ 에서 20일째 $6.07 \times 10^7 \pm 1.23 \times 10^7$ 개로 대조군에 비해 유의한 수준(student t-test, p=0.004)의 세포수가 증가하였다(Fig.2).

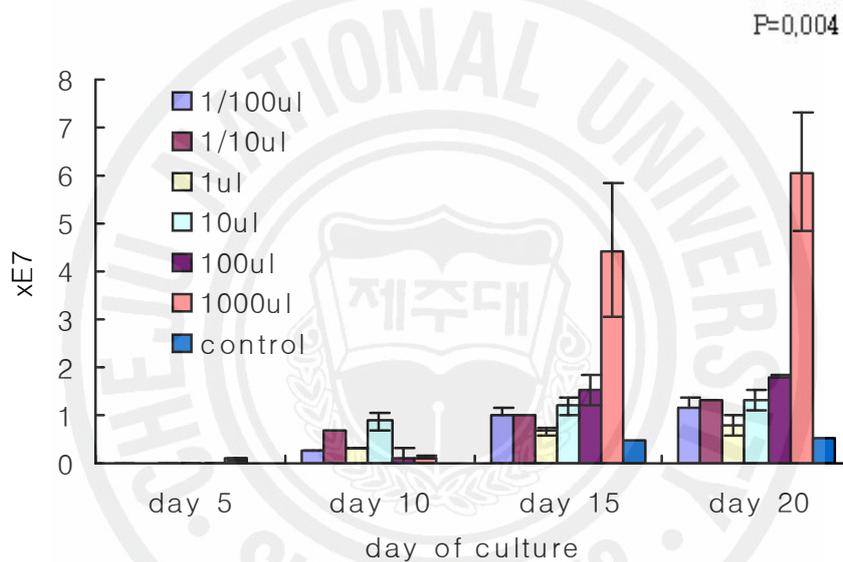


Fig.2. Effect of joint fluid(JF) in human MPCs from degenerative osteoarthritis patients under the DMEM only. MPCs which is established from degenerative osteoarthritis patients were treated whole JF without high centrifuge.

3. C , D실험(역검증 실험)에서 골수 기원 세포의 성장 정도

원심분리를 하여 관절 액 내에 존재 가능한 지방세포, 조골세포, 연골 세포 등

의 다른 세포를 제거한 상태의 유혈청 실험에서 관절 액을 첨가하지 않은 대조군(C-1)은 1일 후에는 별다른 차이를 보이지 않았으며, 5일째 $0.004 \times 10^6 \pm 0$, 10일째 $0.13 \times 10^6 \pm 0$, 15일째 $0.29 \times 10^6 \pm 0$, 20일째 $0.34 \times 10^6 \pm 0$ 개로 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가하였고, 관절 액을 첨가한 실험군(C-2)은 1일 후 $100 \mu\text{l}$, $1000 \mu\text{l}$ 에서 관절 액이 약간 부착되어 있음이 확인되었다.

$1/100 \mu\text{l}$ 에서 5일째 $0.004 \times 10^6 \pm 0$ 에서 20일째 $0.52 \times 10^6 \pm 0$ 로 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였으며, $1/10 \mu\text{l}$, $1 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{l}$ 에서도 $1/100 \mu\text{l}$ 와 같이 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였다.

$1000 \mu\text{l}$ 에서 5일째 $1.35 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$ 에서 20일째 $25 \times 10^6 \pm 4.4 \times 10^6$ 개로 대조군에 비해 유의한 수준의 세포수가 증가하였고(student t-test, $p=0.006$), $10 \mu\text{l}$ 의 세포 수 증가를 제외하곤, 관절 액의 첨가량에 증가함에 따라 비례하여(dose dependent) 세포수의 증가를 보였다(Fig.3).

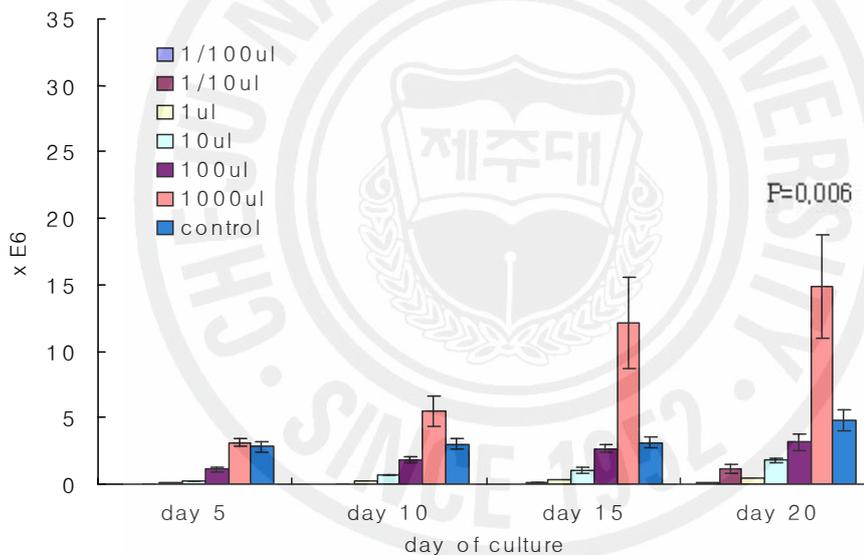


Fig.3. Effect of joint fluid(JF) in human MPCs from degenerative osteoarthritis patients under the fetal bovine serum and DMEM. MPCs which is established from degenerative osteoarthritis patients were treated whole JF after high centrifuge for elimination of artifacts by endogenous progenitor cell or other cells in the JF.

원심분리를 하여 다른 세포를 제거한 상태의 무혈청 실험에서 관절 액을 첨가하지 않은 대조군(D-1)은 5일째 $0.003 \times 10^6 \pm 0$, 10일째 $0.008 \times 10^6 \pm 0$, 15일째 $0.15 \times 10^6 \pm 0$, 20일째 $0.48 \times 10^6 \pm 0$ 개로 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가하였고, 관절 액을 첨가한 실험군(D-2)은 $1/100 \mu\text{l}$ 에서 5일째 $0.001 \times 10^6 \pm 0$ 에서 20일째 $0.1 \times 10^6 \pm 0$ 개로 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였으나, 대조군에 비해 세포 수는 적게 나타났다.

관절 액의 첨가량이 증가함에 따라 비례하여 세포수가 증가하였으나, $1 \mu\text{l}$ 에서만 5일째 $0.09 \times 10^6 \pm 0$ 에서 20일째 $0.43 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$ 개를 보여, $1/10 \mu\text{l}$ 의 관절 액을 첨가한 경우보다 세포수가 적게 나타났다.

관절 액의 첨가량이 가장 많은 $1000 \mu\text{l}$ 에서만 5일째 $3.13 \times 10^6 \pm 0.26 \times 10^6$ 에서 20일째 $14.9 \times 10^6 \pm 3.9 \times 10^6$ 개로 대조군에 비해 유의한 수준(student t-test, $p=0.024$)의 세포수가 증가하였으며 대조군과 확연한 차이를 보였다(Fig.4).

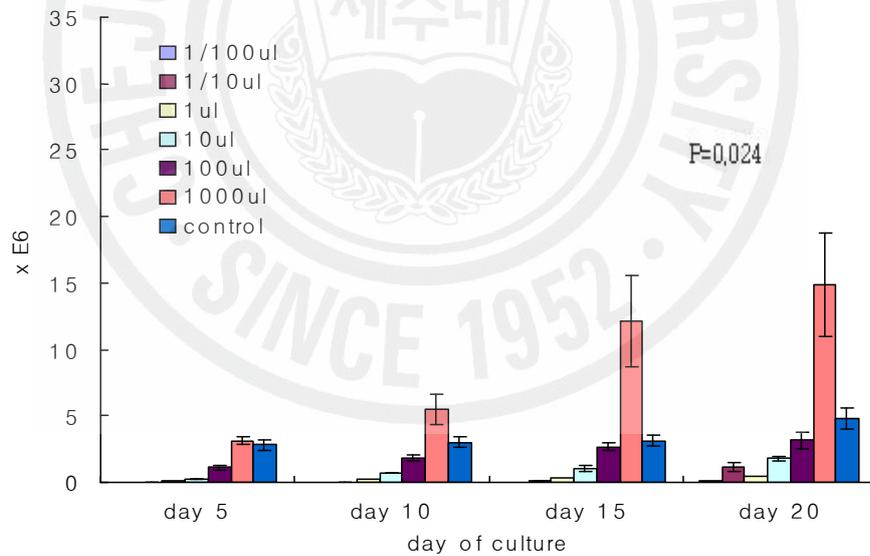


Fig.4. Effect of joint fluid(JF) in human MPCs from degenerative osteoarthritis patients under the DMEM only. MPCs which is established from degenerative osteoarthritis patients were treated whole JF after high centrifuge for elimination of artifacts by endogenous progenitor cell or

other cells in the JF.

4. 혈청(Fetal Bovine Serum)의 유무에 따른 세포수의 증가 정도

원심분리를 하지 않은 경우나 원심분리를 한 경우 모두, 혈청을 첨가했을 때에 비해 혈청을 첨가하지 않았을 때, 관절 액을 각 용량별로 세포수가 증가하는 경향은 있으나, 통계적으로 유의한 수준으로 증가한 경우는 없는 것으로 나타났다 (Table 2). 이러한 이유로는 관절 액을 원심분리하기 전에는 다른 여러 가지 세포들에 의해 세포수를 측정하는 기계(particle analyzer, Japan)에 다른 여러 가지 세포들이 포함되어 측정되었기 때문에 이러한 차이를 보인다고 생각되며 이들의 배양 사진에서 보면 알 수 있듯이 원심분리 전에는 골수기원세포 사이사이에 지방세포나 다른 세포들이 존재하고 이들에 의해 세포수가 원심분리 했을 때보다 높게 측정된 것으로 생각된다(Fig. 5). 이상과 같은 방법을 통하여 얻은 결과를 정리한 표는 다음과 같다(Table 1)

Table 1. The Growth of mesenchymal precursor cells in fetal bovine serum only with-or without centrifuge on day 20period

	without centrifuge						with centrifuge					
μl	1/100	1/10	1	10	100	1000	1/100	1/10	1	10	100	1000
No.of Cell($\times 10^6$)	1.22	1.64	2.42	1.01	3.67	3.24	0.22	1.33	0.89	0.93	1.12	2.77
P values	0.151	0.069	0.183	0.129	0.078	0.952	0.354	0.606	0.297	0.116	0.441	0.111

Elimination of endogenous cells

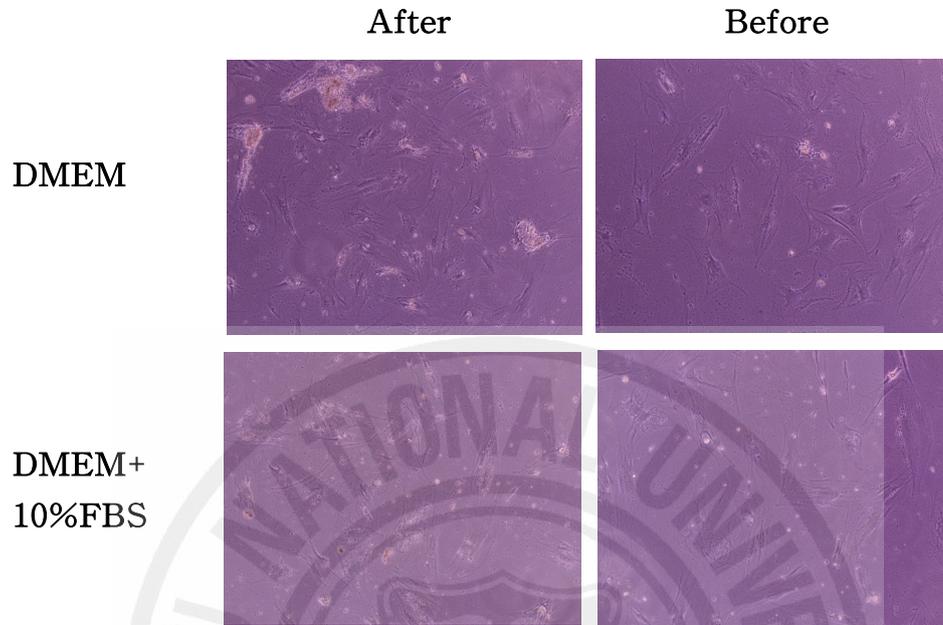


Fig. 5. MPCs proliferation before and after high centrifuge for elimination of artifacts by endogenous stem cell or other cells (arrows) in the JF.

Table. 2. The Stem Cell proliferation effect with the joint fluid

A실험 (유혈청 실험)	
A-1(대조군) : DMEM+10%FBS(3ml) +골수기원세포	배양 1일째 : 별다른 차이가 없다. 배양 5~20일째 : 배양일 증가에 비례하여 세포수가 증가.
A-2 : DMEM+10%FBS(3ml) +골수기원세포+관절액	배양 1일째 : 별다른 차이가 없다. 배양 5~20일째 : 100 μ l, 1000 μ l에서 관절액이 세포에 부착되어 배양되면서 대조군(A-1)과 차이를 보였으며, 관절액 첨가량에 따라 비례하여 세포수가 증가.
B실험 (무혈청 실험)	
B-1(대조군) : Pure DMEM(3ml)+골수기원세포	배양 1일째 : 별다른 차이가 없다. 배양 5~20일째 : 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가.
B-2 : Pure DMEM(3ml) +골수기원세포+관절액	배양 1일째 : 세포에 관절액이 부착되어 성장됨이 관찰되었고, 대조군(B-1)과 차이를 보임. 배양 5~20일째 : 관절액 첨가량이 증가함에 따라 비례하여 세포수가 증가, 관절액첨가(1 μ l)에서만은 (1/10 μ l, 1/100 μ l)의 경우보다 세포수 적게 나타났고, 1000 μ l에서만 대조군에 비해 유의한 수준의 세포 증가 양상을 보임.
C · D 실험 : A, B 실험에 대한 역검증 실험 → 관절액을 원심분리(centrifuge 16,000rpm)하여 관절액내에 존재 가능한 다른 세포를 제거하여 A, B 와 동일한 방법으로 실험을 실시함.	
C실험 (유혈청 실험)	
C-1(대조군) : DMEM+10%FBS(3ml) +골수기원세포	배양 1일째 : 별다른 차이가 없다. 배양 5~20일째 : 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가.
C-2 : DMEM+10%FBS(3ml) +골수기원세포+관절액	배양 1일째 : 관절액 첨가(100 μ l, 1000 μ l)에서 세포에 부착된 양상이 관찰되었으며, 대조군과 차이를 보임. 배양 5~20일째 : 배양일 증가에 따라 세포수 증가, 관절액 첨가(100 μ l)시 대조군(C-1)에 비해 유의한 수준의 세포 수 증가.
D실험 (무혈청 실험)	
D-1(대조군) : Pure DMEM(3ml)+골수기원세포	배양 1일째 : 별다른 차이가 없다. 배양 5~20일째 : 배양일의 증가에 비례하여 세포수가 증가.
D-2 : Pure DMEM(3ml) +골수기원세포 + 관절액	배양 1일째 : 별다른 차이가 없다. 배양 5~20일째 : 배양일의 증가에 따라 세포수에 비례하여 증가하였으나, 관절액 첨가(1/100 μ l)에서는 대조군(D-1)에 비해 세포수는 적게 나타났다. 또한 (1 μ l)에서는 (1/10 μ l)의 관절액을 첨가한 경우보다 세포수가 적게 나타났다. 관절액 첨가(1000 μ l)에서만이 대조군(D-1)과 차이를 보였다.

V. 고 찰

우리 몸을 이루는 관절 중에서도 무릎은 대퇴 와 경골로 이루어져 있는 관절이다. 뼈와 뼈 사이에서 뼈를 보호하고, 뼈에 가해지는 충격을 막거나 완화시켜주는 반달모양의 연골 판이 존재한다. 연골은 충격을 흡수하는 역할을 하며 또한 관절이 원활하게 움직일 수 있게 도와준다. 일반적으로 관절은 연골과 연골이 직접적인 접촉으로 운동이 이루어지므로 연골은 일정량의 두께가 필요하다. 또한 관절 액은 활액막에서 분비되며 관절을 부드럽게 해주는 윤활작용을 도우며, 손상된 관절의 회복을 도와준다(임상 실험에 따르면 히알루론산을 복용하면 이 성분이 관절에서 흡수한다고 밝혀졌다(A.G. 등, 2004)). 관절염의 초기 증상으로는 이러한 연골 두께가 얇아진다는 것이다. 또한 연골과 연골 사이에는 활액이 있는데, 이것은 연골과 연골의 접촉으로 닳는 것을 방지해주는 역할을 한다.

관절 액은 관절 내 활액막에서 만들어지며 항상 일정 양을 만들어 새로운 관절 액과 노폐 된 관절액과의 교환이 이루어진다. 활막에 존재하는 세포는 매우 다양 한데 림프구를 비롯한 대식세포, 단핵구, 섬유모세포, 중성구, NK세포, 비만세포 등 이 있다(Min, 2004). 관절염의 발생은 이런 다양한 세포의 상호 작용에 의해 복잡하게 일어나고, 이것이 관절염의 다양한 증상을 대변 한다(이, 2005). 관절염 이 심해지면 연골이 더 많이 손실됨에 따라 통증도 심해지게 된다.

관절염의 치료 방법으로는 현재 다양한 방법들이 임상적으로 이용되고 있으며 이들 각각의 치료는 상황에 따라 의사는 장·단점을 따져 다양한 선택을 하게 된다. 수술적 치료 시에는 환자에게 심리적 부담 뿐 만 아니라 경제적 부담 또한 주게 되는 단점 때문에 보존적 치료를 선택하는 경우도 적지 않다. 그러나 치료 의 효과 면만 따져 본다면 단연코 수술적 치료가 명확하며, 예측 가능한 결과를 보여 주고 있다. 비수술적 치료는 일종의 수술적 치료까지의 시간을 벌기 위한 치료로 이용되는 경우가 많으며, 이러한 목적에 부합되어, 관절 내 주사 치료가 이용되고 있다.

관절 내 주사 치료에 사용되는 약제나 물질은 다양하며, 과거에는 스테로이드 제제가 사용되었으나, 최근 연골 성분인 하이알루로닉 산을 이용하기도 한다. 그

그러나 치료 효과가 거의 없다고 하는 경우부터 비교적 좋다고 하는 경우까지 다양하게 보고되며 (Inoue 등, 2006 ; Katayama 등, 2004 ; Marinova 등, 2002 ; Miyakoshi 등, 2005 ; Tabata 등, 1995), 이러한 배경 하에 동물 실험에서 다양한 성장인자들을 주사하여 그 치료 결과가 좋음을 보고하는 논문도 많다(Chen 등, 2005 ; James 등, 2004).

그러나 이러한 치료는 많은 양의 성장인자가 필요한 점과 이의 영향으로 다른 세포(활액막이나 활액세포, 골아세포 등)의 성장에도 영향을 주어 관절내의 제한점이 발생한다는 단점도 가지고 있다.

본 연구는 다양한 세포로 분화할 수 있는 골수 기원세포를 관절 내에 주사하여 이 기능에 의해 손상된 연골세포의 회복에 도움이 되리라 기대하였고, 이를 위해 먼저 관절 내 환경 중 가장 중요한 관절 액에서 인위적으로 생성한 골수 기원 세포가 생존할 수 있는가와 생존 가능여부에 따라 증식 속도는 어떠한지를 알아보고자 하였다.

본 연구의 결과에서처럼 골수 기원 세포의 생존 및 증식은 관절 액을 첨가하지 않은 대조군에 비해 관절 액을 많이 첨가할수록 세포수가 증가함이 관찰되었다. 즉 관절 액이 아주 적은 양($1/100\mu\text{l}$)인 경우에는 관절 액이 첨가되지 않은 경우와 비교하였을 때 비슷한 정도의 세포 증식 정도를 보여주었지만, 관절 액 양이 $100\mu\text{l}$, $1000\mu\text{l}$ 로 증가함에 따라 세포의 증식 정도가 매우 증가하였으며, 또한 시간의 흐름에 따라 세포 수 또한 증가함을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 혈청 배지(FBS)가 존재할 때는 관절 액 양이 $10\mu\text{l}$ 에서도 세포의 증식 정도가 의미 있게 증가하나, 혈청 배지(FBS)가 없을 때에는 $1000\mu\text{l}$ 정도의 관절 액이 존재할 때만 세포의 증식 정도가 의미 있게 증가하였다. 관절 액에 따른 줄기세포 증식효과는 Table 1과 같다.

물론 이 경우에 있어서는 혈청의 존재 정도와는 큰 차이가 없었다. 이는 관절 액을 원심분리하기 전에는 다른 여러 가지 세포들에 의해 세포수를 측정하는 기계(particle analyzer, Japan)에 다른 여러 가지 세포들 또한 포함되어 측정되었기에 이러한 차이를 보이는 것으로 생각되며, 이들의 배양 사진에서 보면 알 수 있듯이 원심분리 전에는 골수 기원 세포 사이사이에 지방세포나 다른 세포들이 존재하고 이들에 의해 세포수가 원심분리 했을 때보다 높게 측정된 것으로 생각된다(Fig. 5).

이는 관절 액 내에 포함 된 어떤 물질에 의해 골수 기원 세포의 성장이 영향을 받았다는 것을 의미한다. 골수 기원 세포는 인간 관절 액에서 생존이 가능 할 뿐

만 아니라 성장 및 증식 정도는, 대조군에 비해 20일 배양 시점에서 $1/100\mu\text{l}$ 2배, $1/10\mu\text{l}$ 2.5배, $1\mu\text{l}$ 1배, $10\mu\text{l}$ 3.5배, $100\mu\text{l}$ 7배, $1000\mu\text{l}$ 21배로 증가하여, 관절 액의 용량이 증가할수록 성장 속도가 증가하였다.

Jones 등(Jones, 2005)에 의하면 퇴행성관절염이나 류마티드 관절염 등의 염증성 관절염 환자의 관절 액에 중간엽 전구세포(mesenchymal progenitor cells)가 존재하며, 그 양이 1ml 당 퇴행성관절염 환자의 경우 약 20~30개 정도, 류마티드 관절염 환자의 경우 약 2~4개 정도가 존재하고, 이들의 출처는 아마도 손상된 연골을 통해서 골수 내에 있는 중간엽 세포들이 흘러들어온 것이라고 생각하였다. 관절 액 안에 중간엽 전구세포의 양과 그들의 특성, 다른 세포들과의 상호 관련성들의 생화학적 양상은 아직까지는 정확히 알려져 있지 않다. 또한 중간엽 전구세포가 어떤 경로를 통해 관절 액 안에 존재하는지에 대해서도 의견이 분분하다.

슬개하 지방층을 통해 중간엽 전구세포가 관절 액으로 침투하거나(Whickham, 2003), 연골, 골, 활액막, 골막, 골수 등에서 기원하거나(Baksh 등, 2003 ; Jones 등, 2002 ; Neidhart 등, 2003) 또는 작은 혈관 통로를 통하여 관절 액으로 침투한다고 알려져 있다(Marinova 등, 2002). 이렇듯 다양한 통로를 통해서 관절 액으로 중간엽 전구세포가 유입이 되지만, 이들의 수나 정확한 양을 제시하는 논문은 거의 없는 실정이다.

관절 액에 연골, 골, 지방세포들도 분화할 수 있는 능력을 가진 중간엽 전구세포가 존재함이 보고되었으며, 이들의 영향으로 본 연구에서는 관절 내 생활성 인자의 영향만이 아닌 중간엽 전구세포의 동시 증식 또는 상호 영향에 의해 관절 액의 증가에 비례하여 골수 기원 세포의 증식이 이루어질 수 있다고 생각하였다. 그래서 관절 내에 자연스럽게 존재 할 수 있는 이들 내재된 골수 기원 세포의 영향을 배제하고, 또 실험의 검정을 위해 내재된 골수 기원 세포뿐만 아니라 관절액내의 다른 세포들(활액막 세포, 지방세포, 조혈모세포 등)을 제거하기위해 고속원심분리(Centrifuge 16,000rpm)를 시행하였다.

즉 다른 세포와 골수 기원 세포와의 상호작용에 대한 영향을 완전히 제거하여, 관절액내에 있는 생활성 인자만의 영향이 어느 정도인지 알아보고자 실험(C, D)을 하게 되었다.

본 연구는 결과 (실험 C, D)에서 알 수 있듯이 고속원심분리를 시행하여 내재된 골수 기원 세포를 포함하여 다른 세포들이 완전히 제거된 즉, 원심분리 후 가라 앉은 세포를 제거한 순수 관절 액으로 구성된 상층액을 사용하여 상기 실험

험을 반복한 것으로 원심분리를 하지 않은 상태에서의 실험에 비해 골수 유래 중간엽 줄기세포의 수가 줄어들긴 하였지만, 관절 액을 첨가하지 않고 세포의 증식 정도를 본 대조군에 비하면, 관절 액이 1000 μ l 정도의 양이 되면, 세포의 증식 정도가 의미 있게 증가하였다. 물론 이 경우에 있어서는 혈청의 존재 정도와의 큰 차이가 없었다.

즉 원심분리를 시행하기 전에 비해 원심분리를 시행한 경우에 세포수가 적은 것은 관절액내에 존재하는 다른 여러 세포(지방세포, 조혈모세포 등) 뿐만 아니라 퇴행성관절염으로 인해 손상된 연골 부위에서 자연스럽게 흘러들어온 골수 기원 세포 등에 의해서 우리가 인위적으로 만든 골수 기원 세포의 성장에 상호 연관성을 주었다는 것을 의미하며, 이들의 영향을 배제하기 위해 원심분리를 시행한 실험 C, D 경우의 결과에서도 알 수 있듯이 세포 수는 관절 액을 첨가하지 않은 대조군에 비해 관절 액을 첨가 시 양의 증가에 따라 비례하여 세포의 증식이 있으며, 특히 혈청의 유무에 관계없이 1000 μ l의 양에서 현저히 증가하는 것으로 보아 일정 관절 액의 농도 이상에서 급격히 세포의 증식을 도모하는 생활성 인자(bioactive factors)가 있다고 생각할 수 있었다.

본 연구에서는 다양한 세포로 분화할 수 있는 골수 기원 세포를 관절내 주입 시 이 세포 생존에 영향을 줄 수 있는 가장 중요한 물질이 관절 액이라 생각하였고, 관절 내 환경 중 가장 중요한 관절 액이 골수 기원 세포의 생존 및 증식 가능여부에 따라 증식 속도는 어떠한지를 알아보려고 하였으며, 이러한 연구는 손상된 연골세포 회복에 도움이 되리라 기대하였다.

본 연구는 크게 3가지 범주로 구분하였다.

첫째, A실험(유혈청 실험)에서 골수 기원세포의 생존 및 성장 정도를 알아보는 실험을 수행하였고, 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였으며 관절 액의 첨가량에 따라 비례하여 세포수가 증가하였다.

둘째, B실험(무혈청 실험)에서 골수 기원 세포의 생존 및 성장 정도를 알아보는 실험을 수행하였고, 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였으며 관절 액의 첨가량에 따라 비례하여 세포수가 증가하였다.

셋째, C , D실험(A , B실험의 역 검정)으로 순수 관절 액을 이용하여 골수 기원 세포의 생존 및 성장 정도를 알아보는 실험을 수행하였고, 배양일의 증가에 따라 세포수가 증가하였으며 관절 액의 첨가량에 따라 비례하여 세포수가 증가하였다.

이상의 검증 결과는 다음과 같은 몇 가지 시사점을 내포하고 있다.

첫째, A, B실험 역검정(C, D실험)실험에서 알 수 있듯이 세포 수는 관절 액을 첨가하지 않은 대조군에 비해 관절 액을 첨가 시 양의 증가에 따라 세포 증식이 있었으며 특히 혈청의 유무에 관계없이 $1000\mu\text{l}$ 에서 현저히 증가하는 것으로 보아 일정 관절 액의 농도 이상에서 급격히 세포의 증식을 도모하는 활성 인자(bioactive factors)가 있다고 생각할 수 있었다. 이들 활성 인자의 역할이 중간엽 줄기세포나 내재된 중간엽 전구세포 증식에 어느 정도 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요할 것이다.

둘째, 본 연구의 결과에서 보면 알 수 있듯이 관절 액이 아주 적은 양($1/100\mu\text{l}$)인 경우에는 관절 액이 첨가되지 않은 경우와 비슷한 세포 증식을 보이지만 관절 액이 일정 농도 이상에서 급격히 세포의 증식을 도모하는 활성 인자가 있다고 생각할 수 있는데, 차 후 이 활성 인자를 분자 생물학적인 관점에서 찾아내어야 할 것이다.

셋째, 또한 혈청 배지에 관절 액을 첨가하였을 때에는 관절 액 양이 $10\mu\text{l}$ 에서 세포 증식이 증가하였으며, 혈청 배지가 없을 때에는 $1000\mu\text{l}$ 정도의 관절 액이 존재할 때만 세포 증식이 증가하였다. 이는 관절 액 내의 어떤 물질에 의해 골수 기원 세포의 성장이 영향을 받았다는 것을 의미한다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 아직까지 정확한 원인이 밝혀지지 않은 질환의 유전적 원인을 찾아내어 발병기전을 밝혀내어야 할 것이며, 더 나아가 치료에 이용할 수 있기 위해서 유전체 연구가 반드시 시행되어야 할 것이다(김 등, 2003).

인용문헌

Crawford A., Frazer A., Lippitt J. M., Buttle D. J. and Smith T., A case of chondromatosis indicates a synovial stem cell aetiology, *Rheumatology* 2006;45:1529-1533.

Schauss A. G. et al., *FASEB*, 2004

D. Baksh, Davies JE and Zandstra PW, Adult human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion, *Exp Hematol*, 31: 723-732, 2003.

J. Chen, Wang C, Lu S, et al., In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells, *Cell Tissue Res*, 319: 429-438, 2005.

Christopher TS, *Stem Cell Now*, by HanSeung Publishers, 2006, 3, 25.

Corr M and Zvaifler NJ, Mesenchymal precursor cells. *Ann Rheum Dis*, 61: 3-5, 2002.

De Bari C. Dell Accio F. Tylzanowski P. Luyten FP., Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane, *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.

Harris E, *Rheumatoid arthritis*. 1st ed, WB Saunders Co., Philadelphia, 1997, pp 215-255. Roe; PLCM, Wijnands MJH, Putte LBA: *Evally disease*. In, Klippel JH, Dieppe PA(eds): *Rheumatology*, 2nd ed, Mosby, London, 1998, pp5-14. 1-14. 12.

Miletic Hrvoje. , Fischer Yvonne. , Litwak Sara et al., Bystander killing of Malignant Glima by Bone Marrow–derived Tumar–Infiltrating Progenitor Cells Expressing a Suicide Gene, *Molecular Therapy* 2007:15:7,1373–1381.

Inoue A, Takahashi KA, Arai Y, et al., The thrapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee, *Arthritis Rheum*, 54(1): 264–270, 2006.

Izuta Y, Ochi M, Adachi N, Deie M, Yamasaki T and Shionomiya R, Meniscal repair using bone marrow derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats, *Knee*, 12: 217–223, 2005.

James D. Watson with Andrew Berry , *DNA : The Secret of Life*, by Kachi Publishing, 2004,8,25.

Youn JH , Ph.D , Lessons for the pathogenesis of rheumatoid arthritis acquired from experimental animal models, Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University, *Medical Reviews* Vol.25, No.2,2005 ,P57,62

Ji H, Ohmura K, Mahmood U, et al., Arthritis critically dependent on innate immune system players, *Immunity* 2002; 16: 157–68.

Ji H, A Pettit , Ohmura K, et al. , Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody–induced arthritis, *J Exp Med* 2002; 196:77–85.

Jones EA, English A, Henshaw K, et al., Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis, *Arthritis Rheum*, 50: 817–827, 2004.

Johnson, R.J., Kettlekamp, D.B., Clark, W., and Leaventon, P., Factors affecting late results after meniscectomy, *J. Bone and Joint Surg.*, 56A:719–729, 1974.

Jones EA. English A. Henshaw K, et al., Enumeration and phenotypic characterisation of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis, *Arthritis Rheum* 2004:50:817–27

- Jones EA, Kinsey SE, English A, et al., Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells, *Arthritis Rheum*, 46:3349–3360, 2002.
- Jorgensen C, Gordeladze J and Noel D, Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells, *Curr Opin Biotechnol*, 15: 406–410, 2004.
- Katayama R, Wakintani S, Tsumaki N, et al., Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow, *Rheumatology*, 43: 980–985, 2004.
- Kim HY, Kim HJ, KIM S, Park WS, Park SH, Chung DH , NKT Cells promote Antibody-induced Arthritis by Suppressing TGF-1 Production, *J Exp Med* 2004; 201: 41–7.
- Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB., Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis, *Science* 2002; 297: 1689–92.
- Luyten FP, Mesenchymal stem cell in osteoarthritis, *Curr Opin Rheumatol*, 16(5): 599–603, 2004.
- Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, Maini RN and Zvifler NJ, Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis, *Arthritis Rheum*, 46: 507–513, 2002.
- Min DJ, Cho ML, Lee SH et al., Augmented production of chemokines by the interaction of type II collagen-reactive T cells with rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2004;50:1146–55.
- Miyakoshi N, Kobayashi M, Nozaka K, Okada K, Shimada Y and Itoi E, Effects of intraarticular administration of basic fibroblast growth factor with hyaluronic acid on osteochondral defects of the knee in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*, 125: 683–692, 2005.

- Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gau RE and Gay S , Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo, *Arthritis Rheum*, 48: 1873–1889, 2003.
- Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M and Kubo T, Fate of transplanted bone–marrow–derived mesenchymal cells during osteochondral repair using transgenic rats to simulate autologous transplantation, *Osteoarthritis cartilage*, 12: 811–817, 2004.
- Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M and Kubo T, Behavior of transplanted bone marrow–derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation, *J Histochem Cytochem*, 53(2):207–216, 2005.
- Tabata Y, Nagano A and Ikada Y, Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor, *Tissue Eng*, 5: 127–138, 1995.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH , Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis, *J Exp Med* 1977; 146: 857–68.
- Watanabe Tsutomu/ Aono yuri , *MIKKA DE WAKARU IDENSHI*, by Seoul Cultural Publishers ,2006,1,15.
- Waktani S and Yamamoto T, Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation of cartilage defect, *Microsc Res Tech*, 58(1): 14–18,2002.
- Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N and Yoneda M, Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis cartilage*, 10: 199–206, 2002.
- Whickham MQ, Erickson GR, Gimple JM, Vail TP and Guilak F, Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee, *Clin Orthop*, 412: 196–212, 2003.

Wipke BT, Allen PM , Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis, J Immunol 2001; 167: 1601-8.

Yamasaki T, Deie M, Shionomiya R, et al., Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow, J Biomed Mater Res A, 75(1): 23-30, 2005.

Yanai T, Ishii T, Chang F and Ochiai N, Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit: the effects of joint distraction and autologous bone-marrow-derived mesenchymal cell transplantation, J Bone Joint Surg Br, 87(5):721-729, 2005.

곽만연, 박충구, KWCC 교화와 사회의 기독교 생명윤리 배아복제 대한 윤리학적 고찰, 배아줄기세포연구와 기독교 윤리 토론

김동욱 , 내 품안의 줄기세포, 세포응용연구사업단, 2007,3,31.

김상수, 심대무, 전철홍, 조용원, 이병찬, 김민호 , Treatment of joint-depressive fracture with axial fixation, The Journal of Won Kwang Medical Science. Vol.9. No.1·2, December. 1993.

김정선, 이태용, Factors Impacting on the Decrease of ROM in Knee Osteoarthritis Female Patients: 충남의대잡지(Chungnam Medical Journal), vol.30, No.2, Dec, 2003.

김훈기 , 줄기세포, 생명공학의 위대한 도전 , 동아사이언스, 2005,10,18.

길숙영 , 관절염 관리 효과 측정- 통증, 압통점, 기능적 장애 지수 및 기능적 과제 수행을 중심으로, 류마티스 건강학회지, 2000,07, p.167-173

박래준, 민경옥, 질환별 물리치료. 대학서림, 1994, p.228-34.

박세필 , 체세포를 이용한 생명체 복제기술의 의학적, 의료적 효능, 인간배아복제 14일 집중토론회 자료집, 2000

변기용, 권순태, 정상윤, 이광진, 슬개골 연골 연화증의 진단 및 관절경적 치료 (일일 수술), 충남의대잡지, 제27권, 제2호, 2000년, 12월, issn 0253-6307.

이명철, 한일규 , Surgical management of the knee in rheumatoid arthritis, HANYANG MEDICAL REVIEWS, Vol.25, No.2, 2005.

이상목 외 , 한국인의 생명관 과 배아복제 윤리, 동아대학교 석당문화연구원, 세종출판사, 2005

이상현 , Role of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis, HANYANGMEDICAL REVIEWS, Vol.25, No.2, 2005.

이혜순, Genetics in Rheumatoid Arthritis, HANYANG MEDICAL REVIEWS, Vol.25, No.2, 2005.

우정택 , 당뇨병과 줄기세포 연구, 경의의학, 경희대학교 의과대학 내과학교실 인용, Vol, 21, No. 2, 2005,

유총일 , A Clinical Analysis of the Metallic Failure after Compression Plate Fixation on Fractures of the Long Bone, 부산의대잡지(Journal of Busan Medical College), volume 20, number 2. :December 1980.

임종식 , 생명의 시작과 끝, 서울, 로댐나무, 1999

장준섭, 퇴행성관절염(Degenerative Arthritis), 발병기전 및 퇴행성 슬관절을 중심으로, 대한 슬관절학회지, 1993; 8:3-7.

편영식, 손국진, 권건영, 토끼의 관절연골 인공손상후 재생과정, 계명대학교, 1997,06, p.242-247

황신영 , 톱슨이 들려주는 줄기세포 이야기, 자음과모음, 2005,05,04.

감사의 글

2005년도 제주대학교 생명자원과학대학 동물자원과학과를 졸업하고, 대학원에 진학하였습니다. 새로운 꿈을 안고, 크디 큰 포부를 안고 그렇게 대학원 생활을 시작하였습니다. 대학원생이라는 명찰이 내게는 큰 부담으로 느껴졌고, 그럴수록 나의 어깨는 무거워만 졌습니다. 하지만 지도교수님이신 정동기 교수님께선 그런 나에게 항상 용기를 주셨고, 충고, 격려 또한 아끼지 않으셨습니다. 꾸중을 들을 때면 교수님이 야속하기만 하였습니다. 하지만 대학원(석사) 생활을 마치는 지금, 그 누구보다도 정동기 교수님께 감사드립니다. 내게 시련의 시간도 많았지만 그럴 때 마다 교수님께서는 묵묵히 그런 나를 바라봐 주셨고, 믿어주셨습니다. 교수님의 그러한 지도가 없었다면 지금의 나는 이 자리에 서 있을 수 없었을 것입니다. 앞으로 난 또 다른 희망을 안고, 또 다른 꿈을 안고 달려 나갈 것입니다. 정동기 교수님의 많은 가르침, 많은 지도, 믿음. 난 또 다른 이들에게 그 분의 가르침을 그대로 전해줄 것입니다.

난 아무것도 할 수 없는 사람이라고 생각하였습니다. 하지만 그런 내가 세상에 태어나 처음으로 무언가를 이루었습니다. 바로 이 논문입니다. 나의 땀, 나의 열정, 나의 꿈, 나의 희망, 나의 노력. 이 모든 것들이 이 논문 안에 들어있습니다. 사람은 무언가를 이루었을 때 행복하고, 그 무엇과도 바꿀 수 없는 값진 선물을 얻는다고들 합니다. 내가 무언가를 성취했다는 기분. 그 기분은 아마 이루어 보지 못한 사람이라면 절대 느낄 수 없는 성취감일 것입니다.

논문을 준비하면서 참으로 많이 힘들었습니다. 힘들 때 마다 주저앉고, 포기하고 싶었습니다. 하지만 난 절대 포기할 수 없었습니다. 나를 항상 지켜봐주시고, 응원해주시고, 믿어주셨던 부모님이 계셨기 때문입니다. 늘 우리 손녀가 최고라고, 자랑스럽다고 말씀하셨던 나의 할머니, 내가 힘들 때 마다 내 어깨를 가볍게 두들겨 주셨던 나의 아버지, 우리 딸 사랑한다 라며 늘 말씀해 주셨던 나의 어머니, 우리 언니가 세상에서 가장 부러워, 가장 멋져 라고 말해주던 내 동생 은영이, 그리고 이젠 누나 옆에서 든든한 보디가드가 되어주는 막내 동생 주용이. 그런 가족이 늘 내 옆에 있어주었기에 지금의 나도 이 자리에 있는 것 같습니다. 또한 가족과 더 나은 나의 발전을 위해 앞으로도 열심히 달려 나갈 것입니다.

동물자원과학에 들어와 만났던 많은 교수님. 그 분들 중 나를 많이 아껴주셨고, “요즘은 아프지 않니?” 라고 따뜻한 말 한마디 전해주셨던... 김종계 교수님. 교수님께선 저에게 아랫사람을 사랑하는 법을 가르쳐주셨습니다. 그 많은 학생들에게 항상 웃음으로 인사해 주셨던 교수님. 대학원 생활을 마치는 지금 교수님의 따뜻했던 그 웃음이 너무도 그리웁습니다. 그리고 항상 강하게만 보이시지만 마음은 늘 따뜻하셨던 김규일 교수님. 늘 옆집 아저씨처럼 포근한 웃음을 지으시던 김문철 교수님, 수업시간에 프리마틴에 대해 질문하던 나에게 다음시간까지 조사해서 발표하세요. 라고 과제를 내주셨던 강민수 교수님. 교수님! 전 아직도 프리마틴 절대 잊지 않고 있습니다. 그리고 난생 처음 내 손으로 치즈를 만들게 해주셨던 이현종 교수님. 통계에 대한 폭 넓은 지식을 전해주셨던 양영훈 교수님. 대학원에 진학하여 서울 마리아 병원에 training갔을 때, 너무 아파서 출근도 못하던 나를 직접 찾아와 죽을 전해주셨던 박세필 교수님. 교수님, 전 아직도 그때의 일을 너무도 고맙게 생각하고 있습니다. 그때 베풀어 주셨던 그 은혜 어찌 다 갚아야 할지요. 제가 세상을 살아가면서 꼭 그 은혜 갚겠습니다.

그리고 윤미정 조교선생님 과 김경균 조교선생님께도 감사의 말을 전하며, 대학원 생활을 함께 동고동락하였던 서인석, 강옥득, 강태윤, 강승태, 권태준, 신광운 선배에게도 진심으로 감사의 말을 전합니다. 또한 설문지 작성에 여러모로 도움을 주신 kon tv 신방식 할아버지, 진용문 실장님과 통계자료를 도와주신 노영옥 선생님, 항상 격려해 주셨던 오영익 선배님과 길갈축산 식구들, 그리고 실험실 후배 택혁, 정선에게도 진심으로 감사의 말을 전합니다.

끝으로, 사랑하는 나의 친구들 건수, 나향, 윤정, 윤희, 영도, 인세, 용석, 용섭, 지현, 희정, 현지에게도 감사의 말을 전하며, 논문을 준비하는 동안 여러 자료 수집에 있어 밤새 함께 작업해 주고, 늘 내 옆에서 격려해주고, 힘들어 포기하려고 할 때 내 손을 잡으며, ‘너니까 할 수 있어!’ 라며 용기를 주었던 사랑하는 친구 강성민 군에게도 진심으로 감사의 말을 전하며 이 논문을 받칩니다.

내가 사랑하는 모든 이들에게 이 논문을 받치며, 건강과 행복이 함께하기를 진심으로 기원합니다.

2008년 7월
신선영 올림

