



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

말 관절염 치료를 위한 말 성체줄기세포
배양 및 규명에 관한 연구



濟州大學校 産業大學院

農業生命科學科

動物資源學 專攻

秦 南 一

2010年 8月

碩士學位論文

말 관절염 치료를 위한 말 성체줄기세포
배양 및 규명에 관한 연구

指導教授 鄭棟基

濟州大學校 産業大學院

農業生命科學科

秦南一

2010年 8月

말 관절염 치료를 위한 말 성체줄기세포 배양 및 규명에 관한 연구

指導教授 鄭棟基

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

2010年 8月

濟州大學校 産業大學院

農業生命科學科 動物資源學 專攻

秦南一

秦南一の 農學 碩士學位 論文을 認准함.

2010年 8月

委員長

印

委員

印

委員

印

The study on the investigation and equine adult stem cell culture in therapy for equine arthritis

Nam-il Jin

(Supervised by professor Dong-Keo Jeong)

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

2010. 8.

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL LIFE SCIENCE
GRADUATE SCHOOL OF INDUSTRY
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	1
I. 서론	4
II. 연구사	7
III. 재료 및 방법	13
1. 실험동물	13
2. 줄기세포 분리 및 배양	13
3. 세포증식을 측정	14
4. 분화능 관찰	14
5. RT-PCR	15
6. GFP 유전자 전이 및 생체내 이식	18
7. 관절염 유발 및 줄기세포 이식	18
IV. 결과	20
V. 고찰	29
VI. 요약	32
참고문헌	34

ABSTRACT

The study on the investigation and equine adult stem cell culture in therapy for equine arthritis

Nam-il Jin

(Supervised by professor Dong-Kee Jeong)

Purpose: The horse is already established as an animal model for focal cartilage injuries and osteoarthritis. Advantage of horse joint model compared with those of other animals are their sheer size, which allows for easy manipulation and exploration, and their cartilage thickness and composition, which most closely resemble those of human articular cartilage among the current animal models. There are many similarities between the weight-bearing tendons of the horse and those of the human achilles tendon in their hierarchical structure and matrix composition, their function and the nature of the injury sustained. This research was based on isolation stem cells from bone marrow of horse which had many advantage as an arthritis treatment model, and checking a expression of the specific gene of cartilage cells and testing a effectiveness of cartilage repair treatment using stem cells by injecting with horse bone marrow stem cells(BMSCs) into the mouse which was induced arthritis.

Materials and Methods: The horse bone marrow was brought from Jeju livestock institute for this research. Mono nuclear cells were isolated from the horse bone marrow using centrifuge and cultured cells. Bone marrow stem cells(BMSCs) which is gotten after first subculture was counted using haemocytometer and then measured rate of cell multiplication using MTT assay. The cells that Oil red-O and H&E staining was done for checking a differentiation potential culturing stem cells

were observed through an optical microscope and RT-PCR was carried out for observing a distribution volume of collagen I, collagen II, PPAR γ 1 and Oct4 gene using stem cells which was cultured in medium with differentiation inducers. In addition RT-PCR was carried out for observing a expression as time duration of TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3 and MMP2 gene using a nearby cells of a part of ligament and tendon of the mouse which was induced arthritis and injected the horse bone marrow derived stem cells. The horse bone marrow derived stem cells which is transfected with GFP vector are injected into mouse which was injected with immunosuppressive agents and then observed through a fluorescence microscope for checking the injected stem cells whether or not move to various organs, and it was checked to influence recovery of arthritis when the horse bone marrow derived stem cells were injected into the mouse which was induced arthritis. The recovery rate of the mouse which was induced arthritis was compared injecting a horse bone marrow derived stem cells with immunosuppressive agents group and a horse bone marrow stem cells with no immunosuppressive agents group with the control group when the mouse was induced arthritis.

Results: The isolated mono nuclear cells in this research grew with colony formation on surface of a bottom of flask, and after three days the cells were come into sight fibroblast-like shape of spindle-shaped. Doubling time of the horse bone marrow derived stem cells was highest from day 4 to day 5 as five times, and after that a multiplication rate was went down and the multiplication rate kept relatively consistent speed. In a gene expression test through RT-PCR, the expression of collagen I was early differentiation and the expression of collagen II was high after early differentiation and the expression of PPAR γ 1 was very low with no difference as time duration and Oct4 was expressed on stem cells which is cultured in normal medium and Oct4 was not expressed on stem cells which is cultured in medium with differentiation inducers though. Therefore stem cells which is cultured in medium with differentiation inducers were well differentiated. The result of observing a expression as time duration of TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3 and MMP2 gene using a nearby cells of a part of ligament and tendon of the mouse which was induced

arthritis and injected the horse bone marrow derived stem cells, a expression of TGF- β (transforming growth factor beta, TGF- β 1, 2, 3) which is important gene for differentiation of cartilage cells was different as time duration. TGF β -1 was important effect early cartilage differentiation because the expression of TGF β -1 was high after one month, and TGF β -2 and TGF β -3 were important effect after early cartilage differentiation because the expression of TGF β -2 and TGF β -3 were high after three months. The expression of MMP2 was very low with no difference as time duration. The result of observing with the unaided eye after injecting the horse bone marrow derived stem cells into the mouse which was induced arthritis, both injecting a horse bone marrow derived stem cells with immunosuppressive agents group and a horse bone marrow derived stem cells with no immunosuppressive agents group were noticeable in a recovery rate compared the control group when the mouse was induced arthritis. But it was no noticeable difference between injecting a horse bone marrow derived stem cells with immunosuppressive agents group and a horse bone marrow derived stem cells with no immunosuppressive agents group in a recovery rate.

Conclusion: In this research, the result of observing after injecting the horse bone marrow derived stem cells into the mouse which was induced arthritis, the injecting a horse bone marrow derived stem cell group was noticeable in a recovery rate compared the control group which is not injected a horse bone marrow derived stem cells. But it was no noticeable difference between injecting a horse bone marrow derived stem cells with immunosuppressive agents group and a horse bone marrow derived stem cells with no immunosuppressive agents group in a recovery rate. As the result of an experiment, it is possible to use heterogeneity stem cells for stem cell therapy. But it was limited as accuracy because of observing with the unaided eye, therefore it is need to analyze with scientific exactitude in the future.

I. 서론

최근 들어 의학은 생명과학, 전자공학 등의 발달로 인하여 많은 질병을 완치할 수 있는 단계에까지 이르고 있다. 전 세계의 과학자들은 21세기의 의학에서 새로운 개념의 재생의학이 질병의 부분적 치료가 아닌 근원적 치료를 가능케 할 것이며, 여기에 유전자 치료까지 연계된다면 인류는 질병 없는 행복한 삶을 영위할 수 있을 것이라고 한다. 이와 같이 무병장수하고 건강한 삶을 실현하기 위해서 가장 중요한 연구재료가 바로 줄기세포(stem cell)인데, 이는 그 무한한 잠재능력으로 인하여 연구의 역사가 짧음에도 불구하고 전 세계적으로 치열한 경쟁을 벌이고 있는 연구분야이다(문, 2003).

과도한 운동이나 노화로 인해 발생하는 관절연골 손상은 연골조직의 세포분포가 소수이고 혈관분포가 없다는 조직학적 특성으로 인해 그 재생과 치유가 매우 제한적이며 한번 손상이 되면 자기 스스로 재생이 되는데 한계가 있다. 또한 일차적인 관절 연골의 손상이 적절히 치료되지 못할 경우 이차적인 관절의 퇴행과 함께 만성적인 관절의 통증을 유발 시킬 수 있다. 손상된 관절을 치유하기 위한 방법으로 진통제요법, 약물요법, 물리치료요법, 수술방법 등이 있지만 이러한 치료들은 이미 진행된 연골의 손상을 원상태로 회복시키는데 어려움이 있다(Black 등, 2007; Murphy 등 2003).

줄기세포치료는 손상된 조직의 재생을 가능하게 할 것이라는 확신 때문에 동물을 소유하고 있는 사람들에게 상당한 관심을 유발하고 있다. 특히 수의학 분야에서 외과적 손상을 치유하기 위한 줄기세포 사용에 많은 관심을 가지고 있으며, 가장 진보된 응용에 말을 이용하고 있다(Richardson 등, 2007). 이에 혈통이 좋은 고가의 경주마가 불운한 퇴장 대신에 재기에 성공할 수 있도록 마주와 조교사들은 비싼 비용에도 불구하고 줄기세포 치료에 눈을 돌리고 있다. 한국 경마계에 줄기세포치료가 소개된 것은 서울경마공원의 경주마 ‘백광’이 국내 최초로 줄기세포 치료에 성공하면서부터이다. 2006년 연달아 큰 경주에서 우승을 차지하면서 주목을 받았던 ‘백광’은 2008년 인대염이 악화되어 출주 정지를 받았다가 2009년 줄기세포 치료를 이용해 인대손상을 완치하고 재기에 성공하였다. 경주마에 대한 줄기세포 치료는 아직 초기단계로서 완치를 장담할 수는 없지만 ‘백광’처럼 경주마 치료에 성과를 보일 경우 경주마의 능력향상 및 관절염 치료를 위한 줄기세포 치료가 빠른 시일 내에 정착할 것으로 보인다.

말을 대상으로 하는 줄기세포 치료에는 오직 골수유래 성체 중간엽줄기세포만이 사용되고 있다고 한다(Crovace 등, 2007; Guest 등, 2008; Smith 등, 2003). 이러한 줄기세포 치료의 효능은 드물게 보고되고 있으나, 줄기세포 치료가 골수상층액, 자가혈청 또는 혈소판풍부혈장과 같은 다른 생물학적 요인과 연관되어 있기 때문에 그 효능은 측정하기가 어렵다. 현재 골수유래 자가 중간엽줄기세포는 인대와 힘줄 손상의 치료를 위해 상업적으로 제공되고 있다. 하지만 치료 양상의 효율을 측정하기 위한 통제된 임상실험에서의 데이터는 훌륭한 핵심줄장애 모델을 개발하는데 필요한 기술적 어려움과 이러한 연구에 값비싼 말을 사용하는데 대한 마주의 거부로 인해 임상 이용에 뒤쳐지고 있다(Koch 등, 2009).

1998년 미국 존스 홉킨스 대학의 존 기어하트와 위스콘신 대학의 제임스 톰슨 박사 연구팀이 사람의 줄기세포를 배양하는데 성공한 이후 많은 과학자들이 줄기세포 분야에서 연구를 수행하고 있으며(정, 2008), 21세기의 새로운 세포치료제로 각광을 받고 있는 줄기세포 치료를 위해 이를 의학적으로 응용하는데 필요한 줄기세포의 분리, 배양기술 및 이식방법과 그 특성과 분화에 관련된 유전자 발현 조절 및 유전자의 기능 이해에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 최근 이러한 연구를 기초로 배아줄기세포와 성체줄기세포를 이용하여 특정 조직이나 기관으로 분화시킴으로서 장기이식 및 세포 치료의 가능성이 제기되어 난치병 치료의 혁명을 기대하고 있다.

2008년 「세계일보」의 보고에 따르면 박세필 박사팀이 난자 없이 피부세포만으로도 다기능 줄기세포를 생산하는데 성공했다고 발표했고, 「매일경제」의 보고에 따르면 같은 해 9월에는 서울대병원 심혈관센터 조현재, 김효수 교수팀이 난자 없이 피부세포만으로도 맞춤형 다기능 줄기세포를 만들 수 있는 새로운 방법을 생쥐 실험을 통해 찾아냈다고 한다. 과거의 줄기세포 연구에서 다양한 조직세포로의 분화는 배아줄기세포를 중심으로 진행되어 왔지만(Perderson, 1999), 최근에 각종 성체조직에서 다양한 성체줄기세포가 발견됨에 따라 이에 대한 기초 및 응용연구가 활발히 진행되고 있다(Ghazizadeh 과 Taichman, 2001).

성체줄기세포에는 골수에서 유래한 기능이 서로 다른 다분화능 줄기세포인 조혈모줄기세포와 중간엽줄기세포가 가장 널리 알려져 있는데, 조혈모줄기세포는 급성 백혈병과 같은 혈액질환 치료에 널리 사용되고 있으며(Bruce 와 Bergsagel, 1968; Thomas 와 Clift, 1999), 중간엽줄기세포는 조혈모세포의 조혈작용을 보조하거나 연골세포, 골모세포, 지방세포, 근육세포 등의 증배엽 관련 조직세포로의 분화 연구에 많이 이용되고 있다(Pittenger 등, 1999).

본 논문에서는 제주마의 골수유래 줄기세포를 분리하여 연골세포 특이 유전자의 발현양을 확인하고, 관절염을 유발시킨 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수 줄기세포를 주사하여 줄기세포의 연골재생 치료 효과를 알아보고자 실험을 실시하였다.



II. 연구사

1. 제주마

1) 동물분류학상 말의 위치

척추동물문(脊椎動物門, Vertebrata)

포유동물강(哺乳動物綱, Mammalia)

유제목(有蹄目, Ungulata)

기제아목(奇蹄亞目, Perissodactyla) 말, 코뿔소, 물소

마과(馬科, Equidae) 말, 나귀, 얼룩말

마속(馬屬, Eguus) 말

말(種, Eguus Przewalsky) 더러브렛, 제주마

말은 마과(馬科)에 속하는 모든 포유류 동물을 총칭하며, 말의 품종은 승마용 104종, 만용종 36종, 재래종 67종 등 3가지로 구분하고 있다(제주도, 2002).

2) 제주마의 유래

제주도에 본격적으로 말이 사육되기 시작한 것은 고려 충렬왕 2년(1276년)에 몽고마 160두가 제주도에 들어오면서 부터이다. 이후 몽골은 말관리 전문가인 목호들을 파견하여 목장을 경영하였고, 조선시대에 이르러서는 한라산을 중심으로 해발 200m~600m 지대를 10개의 권역으로 나누어 10소장(57개자목장)을 설치하고 군마(군용으로 사용되는 말), 어승마(임금이 타는 말), 역마(교통과 통신에 쓰이던 말) 등에 사용할 말을 제주도에서 충당하기도 하였다(제주도, 2008).

조선시대 이후 제주마 사육은 군마(軍馬)로 사용하기 위한 품종 개량 등으로 사육 필수가 늘어났으나, 1960년대 이후 농업 기계화의 발달로 인하여 말의 경제적 가치가 저하되면서 사육 두수가 급감하였고, 1980년대에는 한때 멸종위기에 처하기도 하였다. 이에 정부는 제주도민과 함께 생활해온 제주마를 보호하고 유전자원을 보존하기 위해 1986년 2월 8일 천연

기념물 제 347호로 지정하였다. 또한 제주도 축산진흥원에서는 제주마를 사육하여 매년 생산된 망아지를 양축 농가에 분양하고 있으며, 2002년도에는 혈통이 등록된 세계 최초의 재래종(Pony종) 경마인 제주마 경주가 제주경마공원에서 시작되어 도민과 관광객들에게 관람 스포츠로서 각광 받고 있다(제주도, 2002).

3) 제주마의 특성

제주마는 농경문화의 발달과 더불어 사육되기 시작하여 오랜 세월동안 제주지역의 기후와 풍토에 적응하면서 자연적으로 선발·도태되어 현재의 제주마만 남게 되었다. 비록 제주마의 체구는 왜소하여 불품없어 보이지만 성질이 온순하고 영리하며 무는 버릇이나 차는 버릇이 거의 없고, 체질이 강건하여 병에 대한 저항력과 생존력이 강하다. 특히 굽이 튼튼하여 제철을 하지 않아도 험한 길을 잘 보행하며, 지구력과 갈증에도 강하다(제주도, 2002).

제주마의 외모적 특징은 머리가 체구에 비하여 크고 눈이 둥글고 크며, 목은 체구에 비해 굵고 어깨는 부드러운 경사를 이루고 있다. 등은 폭이 넓고 곧으며 네다리는 튼튼하게 발달하였다. 모색은 다양한 편이지만 갈색계통이 가장 많고 회색, 흑색 등도 있다. 체고는 120cm, 체중은 160kg 정도로서 질병에 대한 저항력이 강하여 거친 사양관리 하에서도 잘 견딘다(조, 2008).

2. 줄기세포 연구를 위한 동물모델로서의 말

사람과 말의 아킬레스건과 같은 체중부하힘줄 사이에는 계층구조, 기질구성, 기능 그리고 지속되는 손상의 본질에 있어서 비슷한 점이 많다. 체중부하힘줄은 서로 다른 걸음걸이 형태로 걸어가는 동안 탄력을 주고 충격을 흡수하며, 탄성에너지를 발산하여 운동능력의 효율을 높이고 충격흡수장치와 같이 움직일 수 있도록 한다(Wilson 등, 2001). 이러한 작용은 사람과 말에서 모두 일어나지만, 특히 말은 이러한 잠재력을 최대로 가지고 있어서 말이 전속력으로 질주할 때는 100% 이상의 운동효율을 나타낸다(Minetti 등, 1999).

말 관절 모델은 인간의 관절 연골과 가장 비슷한 연골 두께와 구성을 가지고 있어 다른 동

물모델과 비교해서 조작과 연구가 용이하여 연골손상과 골관절염에 초점을 둔 동물 모델로 자리잡고 있다(Frisbie 등, 2006; Goodrich 등, 2007). 그리고 말에서 보이는 자발성 손상은 사람의 자발성 손상과 유사하여 힘줄이나 인대손상의 동물모델로도 적합하다(Smith 와 Webbon, 2005).

말 외과 분야에서 중간엽줄기세포는 연골하 골낭종, 골절복구(Kraus 와 Kirker-Head, 2006), 연골복구(Wilke 등, 2007)의 수술적 치료에 제한적으로 사용되고 있으며, 특히 말 힘줄의 손상을 치유하는데 많이 사용되고 있다(Richardson 등, 2007). 인간 중간엽줄기세포 연구에서는 임상실습이 주류를 이루고 있지 못하지만, 세포치료에 사용되는 동물모델의 실험을 통한 문헌은 많고, 중간엽줄기세포를 이용한 세포기반 치료는 점점 더 마의학에서 보고되고 있다. 하지만 줄기세포를 기반으로 하는 치료법의 유효성과 대부분의 조직공학 개념은 말을 이용한 의학적 실습에 있어서 증거에 기반을 둔 의학으로 간주될 만큼 충분히 입증되지 않았기 때문에 말을 이용한 줄기세포치료의 적용은 신중하게 이루어져야 한다(Koch 등, 2009). 그리고 동물장애에 대한 효과가 입증된다면 여러 가지 측면에서 줄기세포의 가능성은 확대될 것이다(Fiester 등, 2004).

현재로서는 정확하게 세포집단을 특징짓기 위해 필요한 말 특이 분자지표의 지식부족으로 인하여 줄기세포치료를 위한 동물모델로서의 말의 사용은 문제가 없지 않지만, 이러한 단기적인 제한은 말을 이용한 더 많은 연구의 시간적 투자가 해결해줄 것이고, 그 결과 말은 줄기세포치료 연구를 위한 가장 적합한 동물모델로서 중요한 위치를 차지하게 될 것이다. 따라서 현재에 있어서는 말 줄기세포 생물학, 생물활성인자, 스캐폴드와 말을 이용한 치료의 가능성에 대한 기본적인 이해가 가장 필요하다고 할 수 있다(Koch 등, 2009). 더불어 이와 같이 말을 대상으로 하는 줄기세포 및 조직공학 연구가 순조롭게 잘 이루어진다면 말과 사람 모두의 건강에 유익한 결과를 가져다 줄 것이다.

3. 줄기세포의 정의

줄기세포(Stem Cell)란 인체 내의 각 조직이나 기관으로 분화할 수 있는 다분화능력과 끊임없이 스스로 증식하는 자가 재생(self-renewal)능력을 가지고 있어 우리 몸을 구성하는 모

든 세포조직이나 기관을 만들어 내는데 근간이 되는 “미분화 세포”를 말한다(Odorico 등, 2001; Thomson 등, 1998). 이러한 줄기세포는 피부세포나 신경세포와 같이 특징적인 모양과 특정한 기능을 가진 성숙된 세포로 발전할 수 있는 능력을 가지고 있으며(Chandross 와 Mezey, 2001), 그 세포의 원천과 분화하는 성질에 따라 크게 성체줄기세포(adult stem cell)와 배아줄기세포(embryonic stem cell)로 분류된다.

성체줄기세포(adult stem cell)는 분화되지 않은 세포로서 골수, 혈액, 이의 치수, 간, 피부 등의 특성화된 조직에서 발견되나 존재의 빈도가 낮다. 성체줄기세포의 기능은 상처 또는 질병으로 인해 죽은 세포를 대체하거나 세포의 항상성을 유지하는 등(Leblond, 1964) 오랜 기간 동안 자신과 동일한 세포를 만들어 낼 수 있는 장기 자가 신생 능력과 특정한 형태와 기능을 가진 성숙한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다.

배아줄기세포(embryonic stem cell)는 배아가 자궁벽에 착상되기 이전에 거치는 발달단계의 하나인 배아의 포배기에서 얻어진다. 배아줄기세포는 자기 복제가 가능할 뿐만 아니라 미분화 상태로 대칭적 분열을 통해 무한 증식이 가능하며, 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 만능분화능(pluripotency)을 가지고 있다. 만능분화능이라는 것은 배아줄기세포만이 가지는 고유한 성질로서 초기 배엽층(내배엽, 중배엽, 외배엽)에서 유래되는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 능력을 말한다.

4. 중간엽줄기세포의 특성

골수줄기세포(bone marrow stem cells), 골격줄기세포(skeletal stem cells) 그리고 다분화성(multipotent) 중간엽기질세포(mesenchymal stromal cells)로 알려진 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)는 성체조직으로부터 분리되는 비조혈모세포(nonhematopoietic progenitor cells)를 말한다. 중간엽줄기세포는 연골세포(chondrocyte), 골아세포(osteoblast), 지방세포(adipocyte)를 포함하는 중간엽 유래의 다양한 계열로 분화하기 위한 잠재력과 강력한 증식 능력을 가지고 있는 것이 특징이다. 다양한 성체 조직에서 발견되는 중간엽줄기세포는 세포의 분리가 비교적 간단하고 많은 양을 얻을 수 있으며, 탁월한 증식능력을 가지고 있어 치료에 사용하기 알맞다. 특히 다양한 관절염 손상에서 대체된 조직을 재생시키

고 손상된 조직을 복구하기 위한 가장 이상적인 세포로서 골관절염이나 류마티스관절염과 같은 퇴행성 관절의 치료에 응용될 수 있다. 최근 중간엽줄기세포의 뛰어난 재생능력과 강한 면역억제력 및 항염증 효과에 대한 연구 보고가 있었다(Chen 과 Tuan, 2008).

중간엽줄기세포는 세포의 추출이 상대적으로 간편하면서도 윤리적 문제점이 적고, 탁월한 증식능력과 광범위한 분화능력을 보유하고 있으며, 장기간 냉동보관이 가능하고, 유전자 조작이 수월하여 다른 줄기세포에 비해 세포치료제로서의 여러 가지 장점을 가지고 있다 (Tocci 와 Forte, 2003; Minguell 등, 2001). 이러한 장점을 가지고 있는 중간엽줄기세포는 각종 사고와 질병으로 손상된 조직과 세포를 재생할 수 있는 세포치료제로서, 배아줄기세포에 버금가는 새로운 세포치료제로 각광 받고 있다. 하지만 이들의 발생학적 기원, 본질 및 생체 내에서의 정확한 기능에 대해서는 알려진 바가 거의 없어 이를 위한 세포생물학 및 분자생물학의 선행 연구가 활발하게 진행되고 있다(Bianco 등, 2001).

5. 줄기세포 치료

21세기는 생명공학의 시대로 불리어질 만큼 줄기세포를 이용하는 재생의학 (regenerative medicine) 연구가 활발히 진행되고 있어 지금까지 의학으로는 해결할 수 없었던 수많은 퇴행성 질환이나 난치병을 앓고 있는 환자들에게 희망을 안겨 줄 것이다. 실제로 줄기세포에 관한 연구가 활성화되면서 이를 당뇨병, 순환계 질환, 신경계질환 등 각종 난치병의 치료제로 개발하려는 시도가 급속도로 늘어가고 있다. 이미 전 세계적으로 동물을 대상으로 한 많은 실험들이 수행되고 있으며, 줄기세포를 상업화하기 위한 기업들도 생겨나고 있다(식품의약품안전청, 2003). 2000년 「사이언스」의 보고에 따르면, 전 세계에서 줄기세포 치료가 필요한 환자의 수가 1억2천8백만 명으로 이들에 대한 치료 규모는 연간 3000억 달러를 웃돌고 있다고 한다.

세계적으로 줄기세포를 이용한 세포치료제 및 신약개발 응용기술에 대한 시장 규모가 빠르게 확대되는 추세로 줄기세포 관련 세계 시장규모는 2005년 69억달러에서 연평균 24.6%의 높은 성장률로 성장하여 2012년경에는 324억달러를 형성할 것으로 기대되고 있다(한, 2008). 미 주간지 유에스 뉴스 앤 월드 리포트가 2009년 줄기세포를 이용해 치료할 수 있는

열 가지 난치병을 선정해 보았다. 이에 따르면 줄기세포 연구는 척수 손상을 비롯해 당뇨병, 심장병, 파킨슨병, 알츠하이머(치매), 루게릭병, 폐질환, 관절염, 적혈구성 빈혈, 장기 손상 등의 치료에 도움을 줄 수 있을 것이라고 한다. 물론 일각에선 줄기세포 치료가 오히려 암(癌)을 유발하는 등 부작용도 만만찮을 것으로 우려하고 있다.



Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험적 관절염유발 및 관절염유발 동물에 줄기세포를 이식하는 실험을 실시하기 위하여 약 9주된 체중 200g-250g의 수컷 ICR 마우스 50마리를 사용하였다. 실험동물은 일정한 온도 ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$)를 유지하는 동물 사육실에서 고형사료(천호제일, 한국)와 물을 충분히 공급하였으며, 각 cage당 3-4마리씩 사육하였다.

2. 줄기세포 분리 및 배양

제주축산진흥원으로부터 분양받은 제주마 골수를 50 ml centrifuge tube에 넣고, DMEM 배지를 30 ml 정도 넣은 후 좌우로 잘 흔들어 충분히 섞은 후 2000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 골수세포를 채취하였다. 채취한 골수세포는 DMEM 배지로 골수를 희석한 후 15 ml centrifuge tube에 5 ml의 분리배지 Histopaque-1077(Sigma)을 넣고 그 위에 5 ml의 희석한 골수를 서서히 흘려 1:1 양으로 혼합한 후 2000 rpm에서 30분간 원심 분리 하였다. 원심분리한 tube를 확인한 결과 액체가 네 개 층으로 분리된 것을 볼 수 있었다. 원심분리된 tube 내의 맨 위층은 혈장과 DMEM이고, 중간층은 단핵세포(Mono Nuclear Cell, MNC) 층과 Histopaque-1077 분리액 층이고 맨 아래층은 적혈구이다. 맨 위층의 혈장과 DMEM을 조심히 따라낸 다음 중간층의 단핵세포층을 흡인기를 이용하여 천천히 흡인하여 새로운 50 ml centrifuge tube에 넣고 DMEM 배지로 두 번 세척을 하였다. 분리된 단핵세포는 35T flask에 1 ml씩 넣고 미리 제조한 배양액(DMEM, 10% FBS, 1% penicillin) 10 ml를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 , 100% 포화습도의 조건의 배양기에서 배양하였다. 최초의 배지 교환은 24 시간이 경과한 후 배양용기에 달라붙지 않은 floating cell을 제거하여 새로운 배지로 교환하였으며, 이후 세포의 배양은 매 3일마다 새로운 배지로 바꾸어 주면서 동일한 조건에서 12주 동안 배양하였다. 계대배양은 매 5-6일 마다 세포가 배양용기에 80~90% 차게 되면 1x Trypsin-EDTA를 이용하여 배양용기에서 떼어낸 후, 새로운 배양용

기에 옮겨 배양하였다. 나머지 세포는 10% DMSO가 포함된 배양액에 분주하여 -80 °C 냉동고에서 서서히 냉동시키고, 24 시간 후 액체질소에 냉동 보관하였다.

3. 세포 증식률 측정

MTT(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium)를 이용하여 세포 증식률을 측정하였다. 첫 번째 계대배양 후 얻어진 골수유래 줄기세포를 haemocytometer를 사용하여 counting한 다음 96-well plates에 1×10^4 /well이 되도록 분주하고 배양액(DMEM, 10% FBS, 1% penicillin)을 넣어준 후 24 시간 동안 CO₂ 세포배양기 안에서 배양하여 세포가 배양용기에 잘 붙도록 안정화시켰다. 24 시간 배양 후 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT: 0.5 mg/ml, Sigma chemicals)를 각 well 마다 20 ul씩 첨가하여 차광시키고 37 °C CO₂ 세포배양기에서 4 시간 동안 배양하였다. Formazan이 형성되기 시작하면, 1500 rpm에서 20분간 원심분리하여 media를 제거하고 여기에 DMSO를 200 ul씩 넣었다. 피펫팅으로 잘 섞어 formazan을 다 녹인 후, 15분간 진탕기로 잘 흔들어 주고 570 nm 파장에서 ELISA reader를 사용하여(ELX800(Biotek, HP, WV) 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 살아있는 세포수와 비례한다.

4. 분화능 관찰

1) Oil red-O staining & Hematoxylin and Eosin (H&E) staining

분리, 배양된 골수유래 줄기세포의 background staining을 위하여 H&E staining을 실시하였다. 우선 slide glass 위에 골수유래 줄기세포를 도말한 후 hematoxylin 염색을 3분간 하였다. 1분간 흐르는 물에 슬라이드 뒷면을 대고 세척한 후 70% Etoh을 20초 정도 분주하였다. 5분간 흐르는 물에 슬라이드 뒷면을 대고 세척하고, Eosin Y staining을 3분간 하였다. 10초간 흐르는 물에 슬라이드 뒷면을 대고 세척한 후 탈수를 하기 위해 70% Etoh을 뿌리고

2분간 방치하였다. 계속해서 농도를 높여가며 80% Etoh, 90% Etoh, 95% Etoh, 100% Etoh을 뿌리고 각각 2분씩 방치하였다.

분리, 배양된 골수유래 줄기세포의 지방세포로의 분화여부를 확인하기 위하여 oil red-O에 의한 지질염색법을 수행하였다. 지방세포 형성능을 관찰하기 위하여 2×10^4 세포를 6 well plates에서 4주간 배양된 세포에 4% paraformaldehyde (in PBS)를 첨가하여 4 시간 동안 고정시킨 후 60% isopropanol (in PBS)로 세척하였다. 60% oil red-O(Sigma, USA) solution (in PBS)으로 약 40분간 염색을 시행하였고, 증류수로 세척한 후 100% isopropanol로 다시 세척하고 Mayer's hematoxylin 용액으로 세포핵을 염색하여 광학현미경 하에서 세포의 분화 양상을 관찰하였다.

5. RT-PCR

골형성 관련 단백질의 유전자 발현을 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction)으로 분석하였다. 골수로부터 분리, 배양한 균질성의 섬유세포 형태의 세포들을 배양하면서 배양 5, 10일째 골세포 관련 인자인 type I collagen, 지방세포 관련 인자인 PPAR γ 1, 연골세포 관련 인자인 type II collagen, 배아줄기세포 단계에서 활성화되는 인자인 Oct4에 관해 역전사 중합효소 반응을 시행하였다. 모든 결과는 β -actin과 상대 비교를 시행하였으며 이 때 사용한 primer는 Table 2에 나타나 있다.

1) Total RNA 분리

분리, 배양한 골수유래 줄기세포를 원심분리기를 이용하여 모은 후 TRI reagent 1 ml를 첨가하여 실온에서 5분간 방치하고, chloroform 200 μ l 첨가하여 40초간 강하게 흔들어서 섞었다. 혼합된 용액은 실온에서 2-3분간 방치 후 1.5 ml centrifuge tube에 담아 4 °C에서 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 1.5 ml tube에 상층액을 옮긴 후 isopropanol 500 μ l을 첨가하여 위 아래로 가볍게 흔들어서 상온에서 10분간 방치하고, 4 °C에서 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리된 상층액을 제거한 후 RNA pellet에 DEPC 처리한 75% Etoh 1 ml을 넣고 가볍게 흔들어서 4 °C에서 12,000 rpm으로 5

분간 원심분리 하였다. 원심분리된 상층액은 버리고 RNA pellet은 상온에서 10분간 건조시킨 후, RNA pellet을 0.1% DEPC-water를 넣어 녹이고 농도를 측정하여 -80 °C에 보관하였다.

2) cDNA 합성

RNA 500 ng에 1 μ l oligo DT, 1 μ l 10 mM dNTP를 첨가하여 65 °C에서 5분간 배양하고 바로 아이스에 넣어 보관하였다. 4 μ l 5 \times First-strand buffer, 2 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l RNase out(40 unit/ μ l)을 첨가하고 42 °C에 2분간 배양 하였다. SUPERSCRIPT II mix(200 unit) 1 μ l 첨가 후 다시 42 °C에 50분 동안 배양 시킨 후, 70 °C에서 15분간 배양 시키고 -20 °C에 보관하였다.

분리된 total RNA는 DNase를 처리한 후 cyclescript RT preMix(dT20, Bioneer Inc.)에 RNA 1 μ g을 넣어준 후 Table 1의 cycle을 15회 수행하여 cDNA를 합성하였다.

Table 1. cDNA synthesis cycle

Step	Reaction	Temp.	Time
step 1	primer annealing	37°C	30 sec
step 2	cDNA synthesis	48°C	4 min
step 3	melting secondary structure & cDNA synthesis	55°C	30 sec

3) RT-PCR

합성된 각각의 cDNA를 주형으로 PCR premix(Bioneer Inc.)를 이용하여 Table 2의 primer로 PCR을 수행하였으며, PCR running process는 Table 3과 같다.

Table 2. PCR oligonucleotide primer sequences and sizes of expected amplification products

Primer	Sequence(5'→3')
Collagen I	F 5'-TGCCATCAAAGTCTTCTGCAA-3'
	R 5'-CGCCATACTCGAACTGGAATC-3'
Collagen II	F 5'-GGACTTTTCTCCCCTCTCT-3'
	R 5'-GACCCGAAGGTCTTACAGGA-3'
PPAR γ 1	F 5'-GGGTCAGCTCTTGTGAATGG-3'
	R 5'-CTGATGCACTGCCTATGAGC-3'
Oct 4	F 5'-CCCCCACTTCACCACACTC-3'
	R 5'-GCATCACTGAGCTTCTTTCCC-3'
TGF β -1	F 5'-CCCCGAGGGCGGCATG-3'
	R 5'-CATGCCGCCCTCGGGG-3'
TGF β -2	F 5'-CACACAGTAGTGCATG-3'
	R 5'-CATGCACTACTGTGTG-3'
TGF β -3	F 5'-CCTTTGCAAGTGCATC-3'
	R 5'-GATGCACTTGCAAAGG-3'
MMP2	F 5'-GGCCCTGTCACTCCTGAGAT-3'
	R 5'-GGCATCCAGGTTATCGGGGA-3'
β -actin	F 5'-TGCGTGACATCAAGGAGAAG-3'
	R 5'-ACAGGTCCTTACGGATGTCG-3'

Table 3. PCR running process

Step	Temp(°C)	Time(min)
1	94	5
2	94	1
3	62	1
4	72	1
5	Go to 2, 35 cycles	
6	72	10
7	4	Hold

4) 전기영동

PCR에 의해 합성 되어진 DNA 절편은 1% agarose gel을 사용하여 1x TBE buffer 상에서 100V의 전압으로 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 U.V illuminator (ETX-20.M, EEC)를 이용하여 관찰하였다.

6. GFP 유전자 전이 및 생체내 이식

Retrovirus로 GFP 유전자를 세포내로 전이시켜 GFP vector를 이용하여 transfection을 확인하고, GFP 유전자가 전이된 골수유래 줄기세포를 마우스로 이식하여 다른 세포 조직으로의 전이성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. GFP로 tagging된 pcDNA 3.1 vector를 liposome reagent를 이용하여 transfection mixture를 제조하였다. 제조된 transfection mixture를 배양한 골수유래 줄기세포에 처리하여 transfection 하였다. GFP 유전자가 전이된 줄기세포는 24 시간 배양 후 형광현미경 하에서 GFP 발현을 관찰하고, FACS를 통하여 분포범위를 알아보았다.

GFP vector가 삽입된 말 골수유래 줄기세포를 면역억제제인 싸이클로스포린(cyclosporine, Neoral, Cipol A)을 주사한 마우스의 꼬리 혈관으로 주사를 통하여 이식하였다. 이식 두 달 후 GFP vector가 이식된 마우스를 해부하여 정소, 인대와 건 주위의 세포, 뇌, 간을 채취하여 세포를 추출한 후 각 조직에서 GFP 유전자가 발현되는지 형광현미경 하에서 관찰하였다.

7. 관절염 유발 및 줄기세포 이식

실험적 관절염을 유발시키기 위해 kaolin을 증류수에 녹여 최종 농도가 4%가 되게 하고 뒷다리 무릎 관절강 내에 0.1 ml 주입하여 관절을 굽힘과 펴운동을 시킨 후, 2% carrageenan 용액(Carrageenan lamda, Sigma, ST.Louis, MP, USA) 0.1 ml를 무릎관절강으로 주

입한 다음 다시 5분간 관절의 굽힘과 폼운동을 시켰다. 24 시간 후 관절염을 유발시킨 마우스의 무릎을 조사하여 열과 부종, 압통 반응의 유무를 확인하여 관절염 유발을 판정하였다.

관절염이 유발된 20 마리의 마우스는 관절염 유발 판정 2 일 후 10마리는 면역억제제인 싸이클로스포린(cyclosporine, Neoral, Cipol A)을 처리한 후 제주마 골수유래 줄기세포를 투여하고 10마리는 면역억제제를 처리하지 않은 상태로 투여하였다. 줄기세포가 투여된 관절염 유발 마우스는 세 달 동안 정기적으로 움직임을 관찰하여 마우스의 관절염 회복에 미치는 영향을 알아보았다.

마우스의 관절염 회복률은 면역억제제를 처리한 관절염 유발 마우스에 제주마 골수 줄기세포를 투여한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 관절염 유발 마우스에 제주마 골수 줄기세포를 투여한 군을 관절염을 유발시키지 않은 정상 대조군의 움직임과 비교하여 평가하였다. 회복률 평가는 육안관찰 시 평가 기준으로 삼기 위해 만든 Table 4의 회복률 색인(Recovery index)에 준하여 평가하였다.

Table 4. Recovery index

rate(%)	specific character
0	뒷다리를 심하게 끌면서 움직이며, 정지 시 하복부가 바닥에 밀착되고 뒷다리가 심하게 뒤로 쳐져 있음. 움직임이 아주 둔함.
20	뒷다리를 약간 끌면서 움직이며, 정지 시 하복부가 바닥에 밀착되고 뒷다리가 약간 뒤로 쳐져 있음.
40	뒷다리를 끌면서 움직이기 보다는 절면서 움직이며, 정지 시 하복부가 약간 바닥에 닿음.
60	뒷다리를 절면서 움직이나, 정지 시 하복부가 바닥에 닿지 않음.
80	뒷다리는 거의 절지 않고 움직이나, 정상적인 걸음걸이와 비교했을 때 뒷다리의 움직임이 부자연스러움. 정지 시 하복부가 바닥에 닿지 않음.
100	뒷다리를 절지 않고 걸으며, 정지 시 하복부가 바닥에 닿지 않고 움직임이 활발함.

IV. 결과

1. 줄기세포 배양

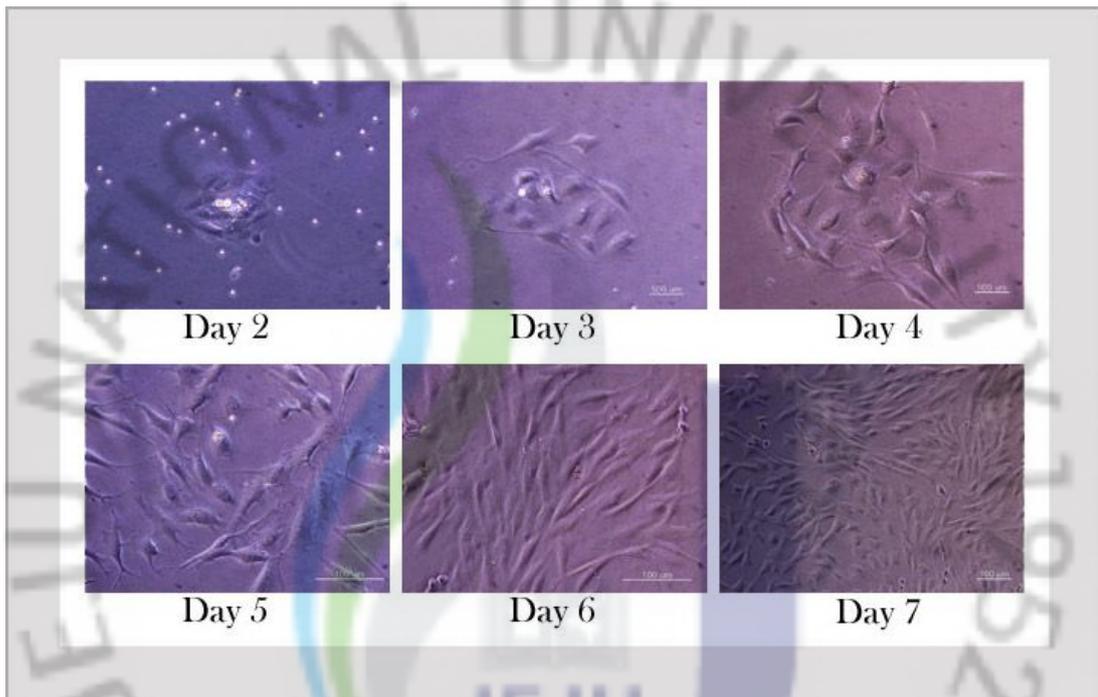


Fig.1. Cell Culture from separate Bone marrow.

The cell growth to pluripotent stem cell from one or two cell in short time.

줄기세포에서 특징적으로 보이는 자가증식을 확인하기 위하여 집락 형성능을 관찰하였다. 분양받은 골수로부터 분리된 단핵세포는 배양접시 바닥에 부착되어 집락을 형성하며 성장하였으며, 배양 후 3일부터 방추형의 긴 모양인 섬유아세포의 형태를 보이는 것을 광학현미경으로 확인할 수 있었다. 시간이 경과할수록 세포체는 길게 수축되고 둘기가 증가하여 여러 방향으로 뻗어나가는 양상이 관찰되었고, 5~7일간 배양을 계속한 결과 형태가 균일한 전형적인 섬유모양세포가 가득 차게 되었다(Fig.1). 이후 줄기세포 유무를 검증하기 위하여 계속적인 계대배양을 실시하였으며 줄기세포 특성을 파악하기 위해서 분화실험을 실시하였다. 수행된 세포군 중에서 가장 줄기세포 특성을 보이는 세포군을 본 연구에 이용하였다.

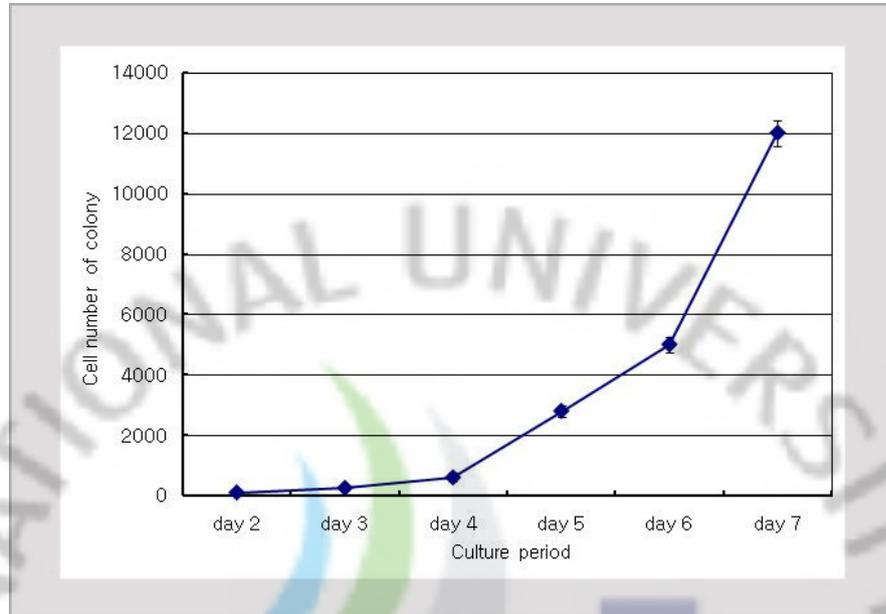


Fig.2. A growth curve of equin bone marrow derived stem cells.

Cell Proliferation speed is remarkable.

제주마 골수 줄기세포를 배양하는 동안 변화하는 증식속도를 발견할 수 있었다. 초기 2~3일 간에는 미세한 변화로 인지되었으나 관찰을 통해 확인한 결과, 제주마 골수 줄기세포 분리 후 초기 7일간의 배양기간 동안 하루 평균 2~3배로 증식하던 세포가 day 4일부터 day 5일 사이에는 약 5배의 높은 증식률을 보였으며, 그 이후에는 평균 증식속도를 유지하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig.2).



Fig.3. Analysis for checking proliferation ability of stem cells.

This graph showed characteristic of stem cells that hard to be watched in somatic cell as is often the view with proliferation efficiency in fifteenth subculture.

초기 세포 배양에서 확인된 세포는 세포주 확립 및 in vivo 실험에 사용하기 위하여 계속적으로 계대배양을 실시하였다. 배양기간에 따라 중간엽 줄기세포의 증식능력에 변화가 있음이 관찰되었다. 첫 번째 계대배양 시는 세포의 수가 2배로 증가하는데 약 7일이 걸렸으나, 두 번째 계대배양 시는 세포의 수가 2배로 증가하는데 약 13일이 걸렸다. 하지만 세 번째 계대배양 부터는 세포의 수가 2배로 증가하는데 걸리는 시간이 빨라지기 시작하여 네 번째 계대배양 이후부터는 비교적 일정하게 첫 번째 계대배양 시와 비슷한 증식률을 보였다 (Fig.3).

2. 세포 분화능 관찰

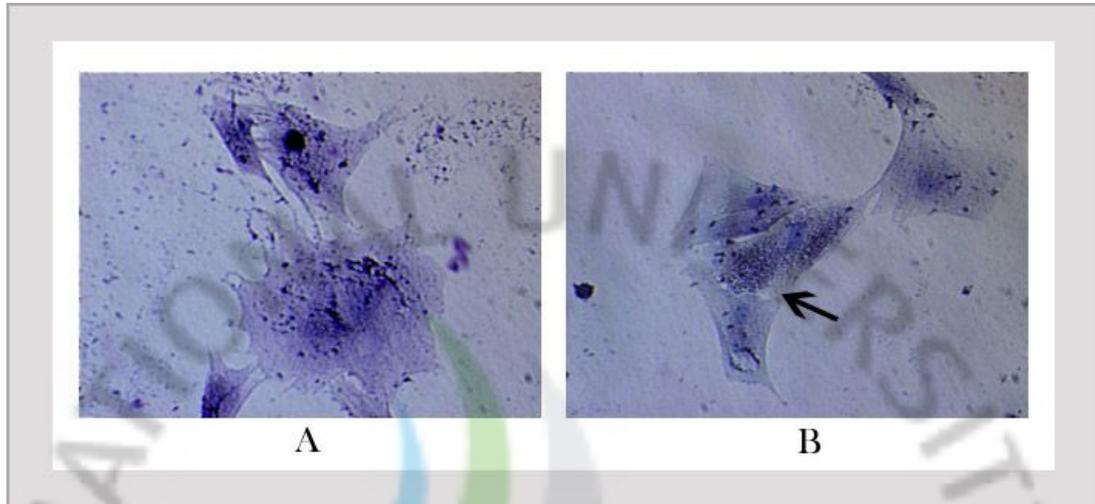


Fig.4. Mesenchymal stem cell from separate equine bone marrow.

This picture indicate clearly different stem cells shape from cell aging. (A) is figure that the result of Oil-red O and H&E Staining. (b) is picture that the part of indicate of arrow is a adipocyte.

Oil red-O 염색을 통하여 분리 배양한 말 골수유래 줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 관찰하였다. 배양된 말 골수유래 줄기세포를 21일간 지방세포 분화유도용 배지에서 배양하여 Oil red-O로 염색한 결과 염색된 지방이 축적되어 짙게 염색되는 것을 볼 수 있었고, 사방으로 퍼져나가며 분화하는 모양의 세포가 관찰되었다(Fig.4).

3. RT-PCR 결과

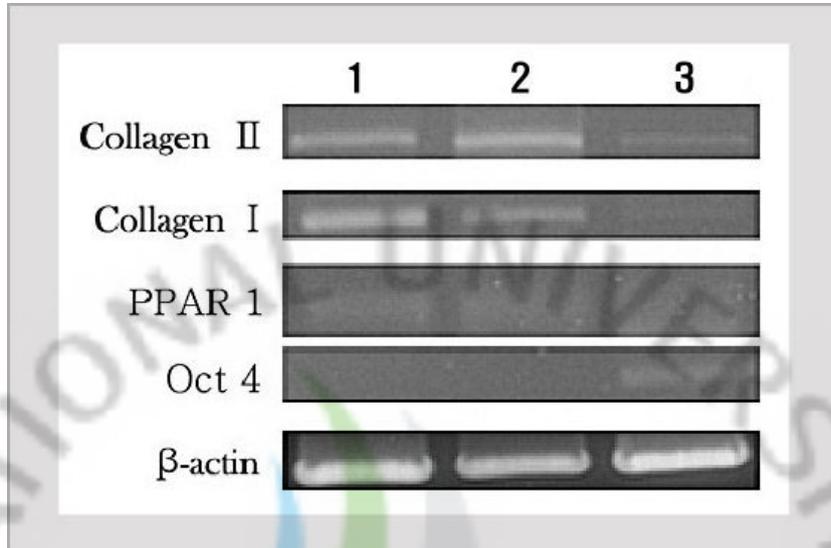


Fig.5. The result of RT-PCR for equin bone marrow derived stem cells which were induced differentiation. (1) after 5 days, (2) after 10 days, (3) the control.

분화유도 배지에서 배양한 줄기세포를 실험군으로 하고 일반배지에서 배양한 줄기세포를 대조군으로 하여 연골세포의 특이적인 발현 유전자인 제2형 교원질(collagen type II), 골세포의 특이적 발현 유전자인 제1형 교원질(collagen type I), 지방세포의 특이적 발현 유전자인 PPAR γ 1, 줄기세포의 특이적 발현 유전자인 Oct4의 발현 정도를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Collagen I의 발현은 5일령에는 현저히 높게 관찰되었으나, 10일령에는 점차 감소하는 양상을 보였다. 즉, 말 골수유래 줄기세포에서의 조골세포 분화 유도인자인 collagen I은 골세포 분화 초기에 발현율이 높은 것을 확인하였으며, 이러한 결과로 볼 때 말 골수유래 줄기세포에서 collagen I은 분화를 유도함에 있어 조골세포 분화 초기에 중요한 작용을 하는 것으로 보인다. Collagen II의 발현은 5일령에서 관찰되었고, 10일령에서는 더욱 높게 관찰되었다. 즉, 말 골수유래 줄기세포에서의 연골세포 분화 유도 인자인 collagen II는 연골세포 분화 초기 이후에 발현율이 높은 것을 확인하였으며, 이러한 결과로 볼 때 말 골수유래 줄기세포에서 collagen II는 분화를 유도함에 있어 조골세포 분화 초기 이후에 중요한 작용을 하는 것으로 보인다. PPAR γ 1의 발현은 비교적 일정하였으나, 발현의 정도가 아주 미약함을 알 수 있었다. Oct 4의 발현은 실험군에서는 배양 전 기간에 걸쳐 관찰

되지 않았으나 대조군에서는 관찰되었다(Fig.5). 즉, 말 골수유래 줄기세포에서의 줄기세포 유도 인자인 Oct 4는 분화유도 배지에서 배양한 줄기세포에서는 발현이 되지 않았고, 일반 배지에서 배양한 줄기세포에서는 발현이 되는 것을 확인하였으며, 이러한 결과로 볼 때 분화 유도 배지에서 배양한 줄기세포는 분화가 잘되었다고 볼 수 있으며, 일반 배지에서 배양한 줄기세포는 분화가 유도되지 않았음을 알 수 있다. Oct 4는 줄기세포에서 반드시 나타나는 유전자 중 하나로서 분화가 유도되면 발현이 억제된다.

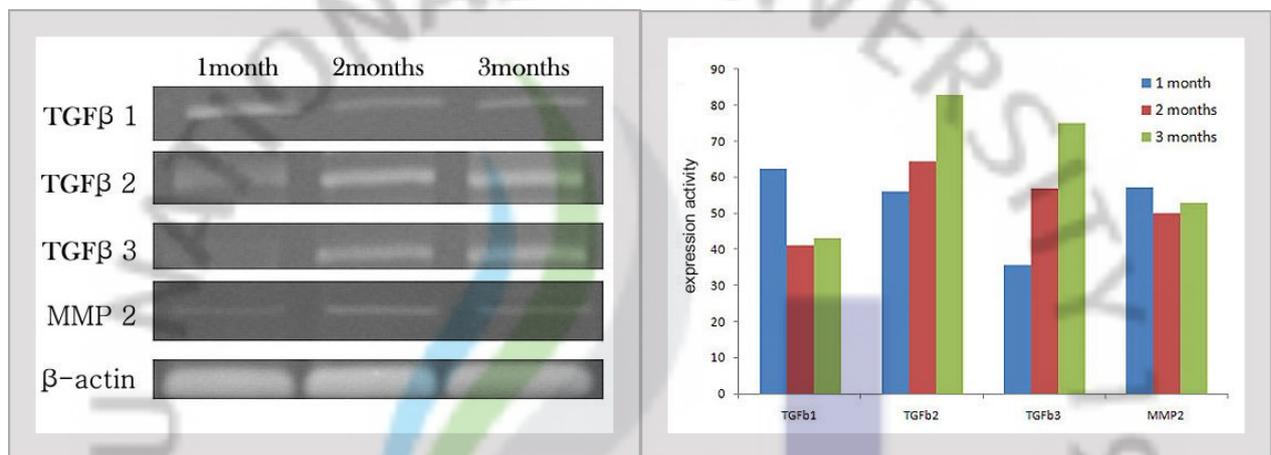


Fig.6. The result of RT-PCR for nearby cells of ligament and tendon in each stage.

Expression rate of TGFβ1 has a opposite influence on TGFβ2 and TGFβ3 during 3 months routing period. It could understand that TGFβ lineage gene influenced a change to differentiation of stem cells and injury parts, and MMP2(matrix metalloproteinase 2; gelatinase A) influenced also some degree.

관절염이 유발된 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수유래 줄기세포를 주입하고, 한달에서 세달 사이에 인대와 건 주위의 세포를 추출하여 TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, MMP2의 발현 정도를 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다.

TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3는 연골재생을 위한 매우 중요한 유전자로서 TGFβ1은 첫 번째 달에 가장 높은 발현양을 보여 연골세포 분화 초기에 중요한 작용을 하는 것으로 나타났고, TGFβ2와 TGFβ3는 시간의 경과에 따라 높은 발현율을 보여 연골세포 분화 초기 이후에 중요한 작용을 하는 것으로 나타났다. MMP2는 연골기질 분해 효소로서 발현양이 미약하여 일

정부분 작용을 하는 것으로 보이거나 시간의 경과에 따른 유의적인 변화는 없었다(Fig.6).

4. 줄기세포 유전자 전이 및 이식

1) GFP vector를 이용하여 transfection 확인

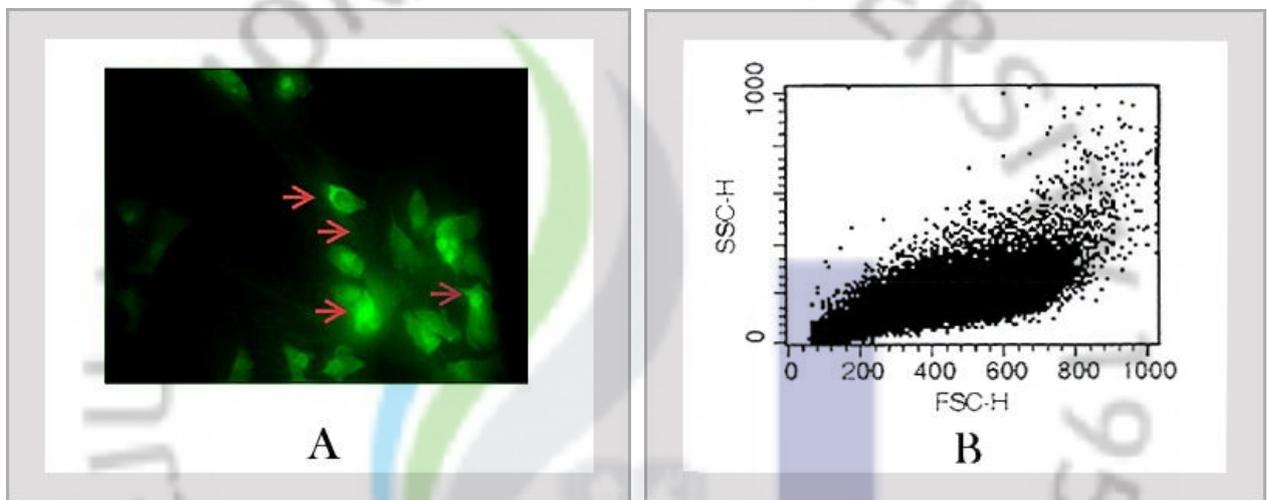


Fig.7. The result of GFP transfection and FACS.

This figure showed GFP expression in the Jeju horse stem cell which was transfected GFP gene for the production of transfected cells. This result indicate stem cell can use as a vector for the gene therapy and cell therapy of specific protein expression in the body.

Retrovirus를 이용하여 제주마 골수 줄기세포에 GFP 유전자를 transfection 시켜 24 시간 배양 후 광학현미경으로 관찰해 본 결과 대부분의 세포에서 Fig.7(A)와 같이 GFP 유전자가 발현되는 것을 관찰하였고, FACS 결과 Fig.7(B)와 같은 분포를 보였다. 이러한 결과는 생체 내의 특이 단백질 발현에 줄기세포가 유전자 및 세포 치료를 위한 벡터로서 사용될 수 있음을 보여준다.

2) 줄기세포를 마우스에 이식한 후 전이 확인

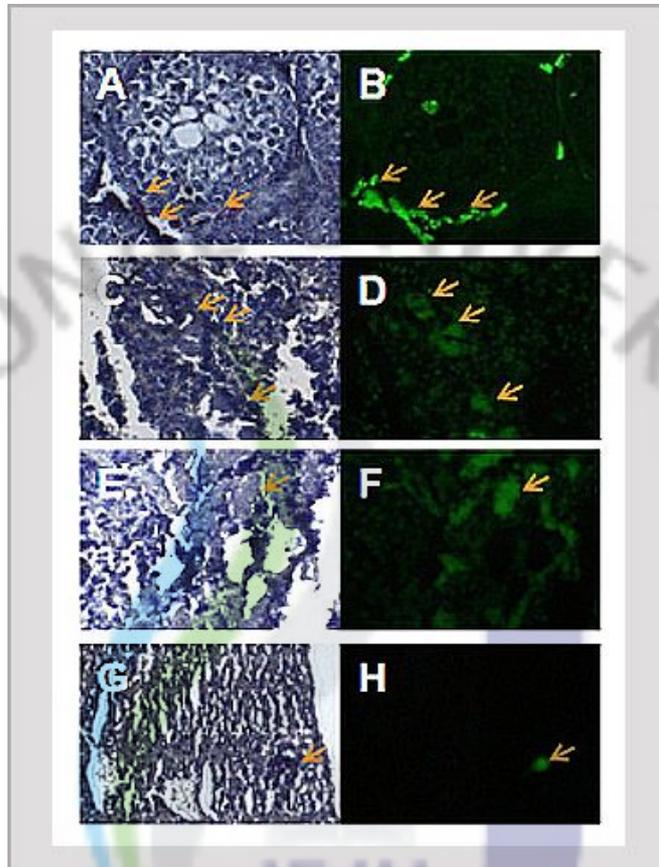


Fig.9. Expression of stem cell which injected to mouse.

(A, B) Testis, (C, D) Ligament and cells of nearby tendon, (E, F) Brain, (G, H) Liver. Many cells concentrated nearby ligament and tendon, and it was observed that cells move to another organs.

GFP 유전자가 transfection 된 제주마 골수 줄기세포를 면역억제제를 주사한 마우스의 꼬리 혈관에 이식하고 두 달 후 해부하여 정소, 인대와 건주위의 세포, 뇌, 간 조직을 채취하고 추출한 세포를 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 각 기관에서의 발현양의 차이는 있었지만 채취한 모든 부위에서 GFP 유전자가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 마우스의 꼬리 혈관으로 주사된 제주마 골수 줄기세포는 각 기관으로 이동하여 착상한 것으로 보인다.

3) 관절염 유발 마우스로의 줄기세포 이식 및 회복률

Table 5. Recovery rate of mouse which was induced arthritis

Recover rate (%)	20	40	80	100
Treatment group A (10)	4	2	1	0
Treatment group B (10)	3	1	1	0
Control group (10)	3	1	0	0

Group A: "A group" mouse was injected immunosuppressant drug before injecting stem cells.

Group B: "B group" mouse was not injected immunosuppressant drug before injecting stem cells.

관절염 유발 마우스의 뒷다리 무릎 관절강 내로 줄기세포를 이식하고, 두 달 후 관절염을 유발시켰을 때의 뒷다리 움직임과 비교하여 본 결과, 관절염을 유발시켰을 때에는 관절염을 유발시킨 무릎 관절이 손상되어 뒷다리를 뒤로 끌면서 움직이고 정지 시 하복부가 바닥에 밀착되었던 반면, 줄기세포 이식 두 달 후 마우스의 움직임은 관절염을 유발시켰을 때와는 달리 뒷다리의 움직임이 현저히 완화된 것이 관찰되었다.

면역억제제를 처리한 마우스에 제주마 골수 줄기세포를 투여한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 마우스에 제주마 골수 줄기세포를 투여한 군을 정상 대조군과 비교하여 보았다. 면역억제제를 처리한 마우스에서는 10마리 중 3마리가 40% 이상의 회복률을 보였고, 면역억제제를 처리하지 않은 마우스에서는 10마리 중 2마리가 40% 이상의 회복률을 보여 줄기세포를 투여하지 않은 대조군과 비교 시 높은 회복률을 보였다. 하지만 면역억제제를 처리한 군과 처리하지 않은 군 사이에는 별다른 차이를 보이지 않았다(Table 5).

V. 고찰

성체줄기세포는 생체 내에 이식된 후 장기의 특성에 맞게 분화하는 장기 특이적 분화성을 갖고 있으며, 본래의 세포 특성과 다른 종류의 장기 세포로 교차 분화 할 수 있는 유연성 및 다분화능을 갖고 있는 것으로 밝혀지면서 윤리적 문제가 적은 성체줄기세포를 이용한 세포치료의 가능성이 높아지고 있다(오, 2004). 중간엽 줄기세포(MSCs)는 골막이나 골수에 있는 적은 수(0.01% to 0.001%)의 미분화 세포로서 실험실내 특정 조건 하에서 광범위하게 확장 가능하며 뼈, 연골, 건, 근육, 신경 등 다양한 계통으로 분화할 수 있는 능력을 가졌다(Wakitani 와 Yamamoto, 2002; Prockop, 1997; Bianco 와 Gehron, 2000). 중간엽 줄기세포는 여러 조직의 세포로 분화하기 위해 성장인자들을 포함한 배양액의 구성성분과 역학적 자극, 그리고 세포내 신호 전달 인자의 조절에 따라 교차 분화가 일어난다고 하지만, 여러 세포들의 교차분화는 아직 그 기전이 명확하게 밝혀지지 않고 있다(Grigoriadis 등, 1988).

전 세계 인구의 급격한 노령화로 인하여 관절염이 심각한 사회적 질환으로 문제시 되고 있다. 60세 이상 인구의 80% 이상이 관절염에 걸린 상태이며, 그 중 절반이 관절염 증상을 나타내고 있다(Reginster, 2002). 골관절염(osteoarthritis)이란 활막관절에 발생하는 퇴행성 비염증성 질환으로서 현재까지 정확한 병인은 밝혀지지 않았지만 관절연골에 대한 물리적 손상과 노령화에 따른 연골조직의 퇴행적 변화 등 다양한 인자가 관여한다고 한다(Moskowitz 등, 1984).

관절연골은 혈관과 신경이 없는 조직으로 대부분이 수분으로 구성되어 있으며, 주 구성 물질로 제 2형 콜라겐(type II collagen)이 10~20%, 프로테오글리칸(proteoglycan)이 5~10%, 제 2형 콜라겐과 프로테오글리칸과 같은 세포외 기질(extracellular matrix; ECM)을 생산하는 연골세포가 1~5%를 차지한다(Hardingham 와 Fosang, 1992). 관절연골에는 다섯 종류의 콜라겐(제 2, 6, 9, 10, 11형)이 존재하며 그 중에서도 연골의 틀을 이루는 제 2형 콜라겐이 90~95%를 차지한다. 연골의 주요 구성 물질인 제 2형 콜라겐은 연골에만 있는 특이적인 고분자로 관절 연골에 가해지는 다양한 압력에 대항하여 연골의 형태를 유지한다. 연골세포는 연골의 정상적인 구조와 기능을 유지하는 역할을 하며, 연골조직의 붕괴를 막는다. 그러나 그 항상성이 깨어지면 세포외 기질(ECM)의 생산이 억제되고 세포외 기질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)가 다량 분비되어 연골조직의 붕괴를 일으키게 된

다.

연골세포는 제 2형 콜라겐을 포함한 많은 세포외 기질(ECM)을 분비하는데, 제 2형 콜라겐의 생성을 촉진하는 물질은 insulin-like growth factor- I (IGF- I)과 transforming growth factor- β (TGF- β)와 같은 생체 내에서 분비되는 성장호르몬으로(Fukumoto 등, 2003; Qi 와 Scully, 1998) 대부분의 세포분화는 성장인자(growth factor)에 의존하고 있으며, TGF- β 는 조골세포 분화를 촉진 시키고 지방세포 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다(Nuttall 와 Gimble, 2000). 연골세포의 분화에 관여하는 인자는 많지만 비교적 확정적인 유도인자로는 TGF- β (transforming growth factor beta, TGF- β 1, 2, 3)와 골형성단백(bone morpho-genetic protein, BMP-2, 6, 9, 13) 등이 있다. 간엽 줄기세포의 성장과 분화를 촉진하는 TGF- β 는 주로 연골분화의 초기단계에 작용하며, smad 신호전달을 활발하게 하고 연골의 특이한 세포외기질 유전자의 전사를 개시하여 Collagen II의 발현과 합성을 촉진한다(Worster 등, 2001). 그 중에서 TGF- β 1은 가장 중요한 연골분화 유도인자이며(Barry 등, 2001; Johnstone 등, 1998) 연골세포의 분화는 TGF- β 에 의해 전적으로 분화되는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 결과 말 골수유래 중간엽 줄기세포(BMSCs)의 분리 및 배양을 통하여 집락을 형성하는 자가증식성을 가진 세포의 존재를 확인할 수 있었다. 분리된 단핵세포는 배양접시 바닥에 부착되어 집락을 형성하며 성장하였으며, 배양 후 3일부터 방추형의 긴 모양인 섬유아세포의 형태를 보였다. 말 골수유래 줄기세포의 증식속도는 day 4일부터 day 5일 사이에 약 5배로 증식하여 배양 기간 중 가장 높은 증식률을 보였으며, 그 이후에는 세포증식률이 서서히 낮아져 1차 계대배양 때와 비슷한 증식률을 보였다. RT-PCR을 통한 유전자의 발현 양 검사에서 Collagen I의 발현은 5일령에는 현저히 높게 관찰되었으나, 10일령에는 점차 감소하는 양상을 보였고, Collagen II의 발현은 5일령에서 관찰되었으나, 10일령에서는 더욱 높게 관찰되었고, PPAR γ 1의 발현은 비교적 일정하였으나, 발현의 정도가 아주 미약함을 알 수 있었고, Oct 4의 발현은 실험군에서는 배양 전 기간에 걸쳐 관찰되지 않았으나 대조군에서는 관찰되어 분화 유도 배지에서 배양한 줄기세포가 잘 분화되었음을 알 수 있었다. 관절염이 유발된 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수유래 줄기세포를 주입한 두 달 후 인대와 건 주위의 세포를 추출하여 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MMP2 유전자의 시간에 따른 발현양을 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 연골세포 분화의 중요한 유전자인 TGF- β (transforming growth factor beta, TGF- β 1, 2, 3)는 시간의 경과에 따른 발현양이

다르게 나타났는데, TGF- β 1은 첫째 달에 높은 발현율을 보여 연골분화 초기에 중요한 작용을 하는 것으로 나타났고, TGF- β 2와 TGF- β 3는 셋째 달에 높은 발현율을 보여 연골분화 초기 이후에 중요한 작용하는 것으로 나타났다. MMP2의 경우는 시간의 경과에 따른 유의적 차이는 없었으며, 발현의 정도는 아주 미약한 것으로 나타났다. 관절염이 유발된 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수유래 줄기세포를 이식하여 육안으로 관찰한 결과 면역억제를 처리한 줄기세포를 투여한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 줄기세포를 투여한 군 모두에서 관절염을 유발시켰을 때보다 뒷다리의 움직임이 현저히 완화되어 높은 회복률을 보였다. 하지만 면역억제제를 처리한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 군 사이에서의 움직임에는 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과로 볼 때 줄기세포 치료를 위해 이종의 줄기세포를 이용하여도 치료의 효과가 나타날 수 있음이 사료된다. 하지만 육안 관찰을 통한 회복률 측정으로 인하여 정확성에 한계가 있으므로 차후 좀 더 과학적인 방법으로 분석하는 과정이 필요하다고 하겠다.

현재 중간엽 줄기세포(MSCs)는 난치병의 세포치료제로서 많은 관심의 대상이 되고 있으며, 연골재생을 위한 많은 조직공학 기술이 시도되고, 관심을 끌면서 연골조직 치료를 위한 가장 좋은 후보자로 여겨지고 있다(Minguell 등, 2001). 관절연골 손상의 복구는 매우 제한적이며, 손상을 입은 연골은 관절 표면의 모든 기능을 저하시키기 때문에 전층 연골 및 부분층 연골 결손을 복구하지 못한다. 또한 치료하지 않은 관절연골의 조직은 초자연골(hyaline cartilage)이 아닌 섬유성 연골로 대체되어 퇴행성관절염의 발생을 막을 수 없다. 경주마에서 자주 발생하는 굴건염을 치료함에 있어 자가 골수에서 채취한 골수 기질세포를 시험관에서 배양하여 환마에게 이식함으로써 외상에 의한 자가 연골조직의 재생 및 골관절계 질환을 치료할 수 있을 것이라 생각된다. 또한 본 연구를 통하여 자가 골수유래 줄기세포의 이용과 함께 조직재생을 위한 조직공학의 기법을 적용하여 연골재생을 도모한다면 훌륭한 연골재생 결과를 얻을 수 있는 연골이식 재료의 개발에 도움이 될 것이라 생각된다.

중간엽 줄기세포는 여러 가지 장점을 바탕으로 배아줄기세포에 버금가는 새로운 세포치료제로 각광을 받고 있지만, 이에 상응하는 기초 연구의 성과는 거의 없다. 향후 중간엽 줄기세포의 골, 지방 및 연골세포로의 분화 기전을 규명하여, 이와 관련된 유전체 및 단백질의 기능을 해석함으로써 각종 근골격계 질환에 활용할 수 있는 세포치료법을 개발하고, 중간엽 줄기세포의 다양한 연골과의 적용을 통하여 연골손상의 치료가 하루속히 상용화되기를 기대해 본다.

VI. 요약

배경: 말은 이미 연골손상과 골관절염에 초점을 둔 동물모델로 자리 잡고 있다. 다른 동물과 비교했을 때 말 관절모델의 장점은 조작과 탐구에 유리한 관절의 크기와 현재의 동물모델들 사이에서 인간의 관절연골과 가장 닮은 연골두께와 구성에 있다. 사람과 말의 아킬레스건 (Achilles tendon)과 같은 체중부하힘줄(weight-bearing tendon) 사이에는 계층구조, 기질구성, 기능 그리고 지속되는 손상의 본질에 있어서 비슷한 점이 많다. 본 연구에서는 이와 같이 관절염 치료 모델로서의 많은 장점을 가지고 있는 말의 골수유래 줄기세포를 분리하여 연골세포 특이 유전자의 발현양을 확인하고 관절염을 유발시킨 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수 줄기세포를 주사하여 줄기세포의 연골재생 치료 효과를 알아보고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법: 본 연구에서는 제주축산진흥원으로부터 말 골수를 분양받아 실험에 사용하였다. 분양받은 골수는 원심분리하여 단핵세포를 분리 배양하였고, 첫 번째 계대배양 후 얻어진 골수유래 줄기세포는 haemocytometer를 사용하여 counting한 다음 MTT 검사법을 이용하여 세포 증식률을 측정하였다. 배양중인 줄기세포의 분화능을 확인하기 위해 Oil red-O staining과 H&E staining을 실시한 후 광학현미경 하에서 관찰하였으며, RT-PCR을 실시하여 분화유도 배지에서 배양한 줄기세포의 collagen I, collagen II, PPAR γ 1, Oct4 유전자에 대한 발현 양상을 관찰하고자 하였다. 또한 관절염이 유발된 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수유래 줄기세포를 투여한 후 인대와 건 주위의 세포를 추출하여 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MMP2 유전자의 시간에 따른 발현양을 RT-PCR로 관찰하였다. GFP 유전자로 전이된 말 골수유래 줄기세포를 면역억제제를 주사한 마우스의 생체 내로 투여하여 생체내 여러 기관으로 전이되는지 형광현미경 하에서 관찰하였으며, 관절염이 유발된 마우스에 말 골수유래 줄기세포를 투여 했을 때 마우스의 관절염 회복에 미치는 영향에 관해서 알아보하고자 하였다. 관절염 유발 마우스의 회복률은 면역억제제를 처리한 마우스 군과 면역억제제를 처리하지 않은 마우스 군으로 나누어 말 골수유래 줄기세포를 투여한 후 관절염을 유발시켰을 때 마우스의 움직임과 비교하여 분석 하였다.

결과: 본 연구에서 분리된 단핵세포는 배양접시 바닥에 부착되어 집락을 형성하며 성장하였으며, 배양 후 3일부터 방추형의 긴 모양인 섬유아세포의 형태를 보였다. 말 골수유래 줄기세포의 증식속도는 day 4일부터 day 5일 사이에 약 5배로 증식하여 배양 기간 중 가장 높

은 증식률을 보였으며, 그 이후에는 세포증식률이 낮아져 비교적 일정한 속도로 증식하는 것을 알 수 있었다. RT-PCR을 통한 유전자의 발현양 검사에서 collagen I의 발현은 분화 초기에 높게 나타났으며, collagen II의 발현은 초기 이후에 높게 나타났다. PPAR γ 1의 발현은 시간의 경과에 따른 유의적인 차이 없이 아주 미약하였고, Oct4의 발현은 일반 배지에서 배양한 줄기세포에서는 발현되었으나, 분화유도 배지에서 배양한 줄기세포에서는 발현되지 않아 분화가 잘 되었음을 알 수 있었다. 관절염이 유발된 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수유래 줄기세포를 투여한 후 마우스의 인대와 건주위의 세포를 추출하여 RT-PCR을 통하여 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MMP2 유전자의 시간에 따른 발현양을 관찰하였다. 그 결과 연골세포의 분화에 중요한 유전자인 TGF- β (transforming growth factor beta, TGF- β 1, 2, 3)는 시간의 경과에 따라 발현양이 다르게 나타났는데, TGF- β 1은 첫째 달에 높은 발현율을 보여 연골분화 초기에 중요한 작용을 하는 것으로 나타났고, TGF- β 2와 TGF- β 3는 셋째 달에 높은 발현율을 보여 연골분화 초기 이후에 중요한 작용하는 것으로 나타났다. 연골기질 분해 효소인 MMP2의 경우는 시간의 경과에 따른 유의적 차이는 없었으며 발현의 정도는 아주 미약한 것으로 나타났다. 관절염이 유발된 마우스의 무릎 관절강 내로 말 골수유래 줄기세포를 이식하여 육안으로 관찰한 결과 면역억제를 처리한 마우스에 줄기세포를 투여한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 마우스에 줄기세포를 투여한 군 모두에서 관절염을 유발시켰을 때보다 뒷다리의 움직임이 현저히 완화된 높은 회복률을 보였다. 하지만 면역억제제를 처리한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 군 사이에서의 움직임에는 별다른 차이가 없었다.

결론: 본 연구에서는 마우스에 관절염을 유발시켜 말 골수유래 줄기세포를 주입한 결과 줄기세포를 주입한 실험군은 줄기세포를 주입하지 않은 대조군에 비하여 높은 회복률을 보였다. 하지만 면역억제제를 처리한 마우스에 줄기세포를 주입한 군과 면역억제제를 처리하지 않은 마우스에 줄기세포를 주입한 군 사이에서는 별다른 차이가 없었다. 이러한 결과로 볼 때 줄기세포 치료를 위해 이종의 줄기세포를 이용하여도 치료의 효과가 나타날 수 있음이 사료된다. 하지만 육안관찰을 통하여 회복률을 평가하였기에 정확성에 한계가 있으므로 차후 좀 더 과학적인 장비를 이용하여 분석하는 과정이 필요하다고 하겠다.

참고문헌

- Barry F, Boynton RE, Liu BS and Murphy JM. 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268: 189-200.
- Bianco P, Gehron BP. 2000. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-192.
- Black LL, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R. 2007. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics* 8(4): 272-284.
- Bruce WR, Bergsagel DE. 1968. On the application of results from a model system to the treatment of leukemia in man. *Cancer Research* 27: 501-511.
- Chandross KJ, Mezey E. 2001. Plasticity of adult bone marrow stem cells. Mattson MP and Van Zant G eds. Elsevier Science B.V. 73-95.
- Chen FH, Tuan RS. 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 10(5): 223-234.
- Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E. 2007. Cell therapy for tendon repair in horses: An experimental study. *Vet Res Commun* 31: 281-283.
- Fiester A, Scholer H, Caplan A. 2004. Stem cell therapies: Time to talk to the animals. *Cloning Stem Cells* 6: 3-4.

- Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. 2006. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19: 142-146.
- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Convert CA, O'Driscoll SW. 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 11: 55-64.
- Ghazizadeh S, Taichman LB. 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *Embo J* 20: 1215-1222.
- Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans DH, Nixon AJ. 2007. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhance cartilage healing in an equin model. *J Bone Joint Surg Br* 89: 672-685.
- Grigoriadis AE, Heersche JNM, Aubin JE et al. 1988. 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.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR. 2008. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine Vet J* 40: 178-181.
- Hardingham TE, Fosang AJ. 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6: 861-870.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238: 265-272.
- Koch TG, Berg LC, Betts DH. 2009. Current and future regenerative medicine -

Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J* 50(2): 155-165.

Kraus KH, Kirker-Head C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 35: 232-242.

Leblond CP. 1964. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *National Cancer Institute* 14: 119-150.

Minetti AE, Ardigo LP, Reinach E, Saibene F. 1999. The relationship between mechanical work and energy expenditure of locomotion in horse. *J Exp Biol* 202: 2329-2338.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226(6): 507-520.

Moskowitz RW et al. 1984. Osteoarthritis: diagnosis and management. Philadelphia, WB Saunders 129-146.

Murphy JM, Fink DJ, Hurziker EB, Barry FP. 2003. Stem cell therapy in a carpine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48: 3464-3474.

Nuttall ME, Gimble JM. 2000. Is there therapeutic opportunity either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis. *Bone* 27: 177.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19: 193-204.

Perderson RA. 1999. Embryonic stem cells for medicine. *Sci Am* 280: 68-73.

Pittenger MF, McKay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult and human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

- Prockop DJ. 1997. Marrow stromal cell as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71.
- Qi WN, Scully SP. 1998. Effect of type II collagen on chondrocyte response to TGF- β 1 regulation. *Exp Cell Res* 241: 142-150.
- Reginster JY. 2002. The prevalence and burden of osteoarthritis. *Rheumatology* 41: 3-6.
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. 2007. Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol* 25(9): 409-416.
- Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35: 99-102.
- Smith RK, Webbon PM. 2005. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn. *Br J Sports Med* 39: 582-584.
- Thomas ED, Clift RA. 1999. Allogenic transplantation for chronic myeloid leukemia. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ eds. *Blackwell Sci* 807-815.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Tocci A, Forte L. 2003. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *J Hematol* 4: 92-96.
- Wakitani S, and Yamamoto T. 2002. Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. *Microscopy and Technique* 58: 14.

Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equin model. J Orthop Res 25(7); 913-925.

Wilson AM, McGuigan MP, Su A, van Den Bogert AJ. 2001. Horses damp the spring in their step. Nature 414: 895-899.

Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA et al. 2001. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-1 in a threedimensional matrix. J Orthop Res 19:738-749.

문신용. 2003. 21세기 의학혁명 줄기세포란 무엇인가? 세포응용사업단.

오일환. 2004. 조혈계 줄기세포 치료의 추세와 전망. 대한의학협회지 47(10): 948-956.

정동기. 2008. 줄기세포학의 이해. 아열대생물산업 및 친환경농업생명산업 인력양성사업단.

제주도. 2002. 제주도 제주마. 26-59.

제주도. 2008. 제주문화상징. 118-121.

조길재. 2008. 제주마 유용유전자 발굴 및 유전자원 보존기술 개발. 경북대학교 수의과대학, 22-26.

한용만. 2008. 국내외 줄기세포 연구역량 조사분석 및 기술개발 로드맵 수립사업. 한국과학기술원.