

# Human Mesenchymal Stem Cell의 지방 세포로의 분화시 유전자 발현해석(1)

## -DNA chip을 이용한 해석-

Mesenchymal Stem Cell(MSC)은 골수 중에 존재하는 미분화 세포로 자기 증식능력을 가지며, 중배엽계의 다양한 세포(골아세포, 연골세포, 지방세포, 골격근, 심근, 인대, 건 등)로 분화능을 갖는다. 현재 human Mesenchymal Stem Cell(hMSC)을 재생의료(장기 재생이나 세포 이식 등)에 응용하는 연구가 주목 받고 있으며, 지방세포형성의 초기과정인 중배엽계 간세포에서 지방전구세포로 분화하는 과정을 연구하는데 사용되고 있다.

### ■ Human Mesenchymal Stem Cell의 지방세포로의 분화

BioWhittaker사의 "Human Mesenchymal Stem Cell-Instruction For Use"에 따라 조작 하였다. Human Mesenchymal Stem Cell 전용 배지 kit을 이용하여 hMSC를 배양하고 지방세포용 분화배지 kit을 이용하여 IBMX(3-isobutyl-1-methyl xanthine), Dexamethasone, h-Insulin, Indomethacin 존재하에 지방세포로 분화를 유도하였다.

Mesenchymal Stem Cell Growth Medium(MSCGM)을 함유하는 6 cm plate에 hMSC를  $2.6 \times 10^5$  cells/plate의 밀도로 접종하여 4일간 배양한 후, Adipogenic Induction Medium(AIM)에 배지를 교환하여 6시간, 2일간 배양 후 세포를 회수하였다(시료 1 및 2). AIM에서 3일간 배양한 후 Adipogenic Maintenance Medium(AMM)으로 교환하여 3일간 배양하고 세포를 회수하였다(시료 3). 또 AIM에서 3일간 배양하고 AMM에서 2일간 2회 반복 배양하여 지방세포로 분화시켜 세포를 회수하였다(시료 4). 형태비교를 위한 대조군으로 hMSC를 MSCGM에서 배양하여 분화세포와 형태를 비교하였다(그림 1-A). 발현해석을 위한 대조군으로 AIM으로 배양하기 전 세포를 회수하였다(시료 C).

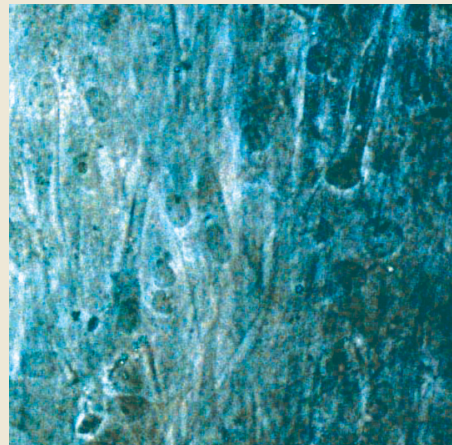
Trizol을 이용하여 각 시료에서 total RNA를 추출, 회수하였다.

### ■ 분화의 확인

분화는 현미경으로 형태변화 관찰, Oil Red O로 지방염색, RT-PCR로 분화 marker 유전자(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR $\gamma$  2; fatty acid binding protein aP2)의 증폭 등을 통하여 알 수 있다.

그림 1은 시료 4의 Oil Red O로 지방 염색한 사진으로 지방입자를 포함하는 세포를 확인할 수 있었다. 표 1은 각 시료에 해당하는 RT-PCR 결과를 나타내고 있다. 증폭 대조군으로 3종류의 housekeeping 유전자(ribosomal protein S5, G3PDH,  $\beta$ -actin)의 RT-PCR도 동시에 실시하였다. 표의 "+"는 단편의 증폭 정도를 나타내고, "-"는 증폭이 되지 않음을 나타낸다. 시료 2~4는 2개의 분화 marker 유전자(PPAR $\gamma$ 2, aP2)의

(A)



(B)

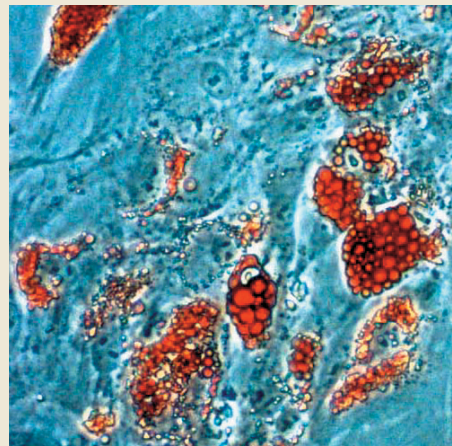


그림 1 Oil Red O로 지방세포 염색사진

(A) 분화 유도 없음

(B) 분화 유도 있음(지방세포로의 분화 자극 후 16일째의 세포, 시료 4)

증폭을 확인하였다.

이 결과에서 시료 2~4는 지방세포로 분화한 세포를 포함하고 있을 가능성을 시사하고 있다.

표 1 각 시료에서 분화 유전자 marker의 RT-PCR 결과

대상유전자명	역전사반응 유무	시료 1 (분화유도 6시간 후)	시료 2 (분화유도 2일 후)	시료 3 (분화유도 6일 후)	시료 4 (분화유도 16일 후)	시료 C (분화유도 전)
PPAR $\gamma$ 2	RT-	-	-	-	-	-
	RT+	-	++	+	+++	-
aP2	RT-	-	-	-	-	-
	RT+	-	++	+	++	-
(Housekeeping 유전자) ribosomal protein S5	RT-	-	-	-	-	-
	RT+	+++	+++	+++	+++	+++
G3PDH	RT-	-	-	-	-	-
	RT+	+++	+++	+++	+++	+++
$\beta$ -actin	RT-	-	-	-	-	-
	RT+	+++	+++	+++	+++	+++

RT-: 역전사 반응 없이 PCR만 한 것 ; RT+: 역전사 반응 후 PCR 한 것 ; +, ++, +++는 증폭량의 정도를 나타내고 -는 증폭되지 않음을 나타낸다.

■ DNA chip을 이용한 해석

시료 C(미분화 대조)의 RNA를 Cy3<sup>TM</sup>로, 시료 1~4의 RNA를 Cy5<sup>TM</sup>로 형광표식하고 각각을 혼합하여 4종류의 probe 용액을 제작하였다. 각 probe 용액을 Intelligene<sup>®</sup> Human CHIP 1K Set I Version 1.0 으로 competitive hybridization한 후, Affymetrix<sup>®</sup> 428<sup>TM</sup> ArrayScanner로 스캐닝하여, 해석 소프트웨어 ImaGene<sup>TM</sup>을 이용하여 각 spot의 형광 signal을 정량하였다.

스캐닝 화상의 일례를 그림 2에, Scatter Plot의 일례를 그림 3에 나타내고 있다. 또 4종류의 probe 용액으로 hybridization한 실험 결과를 clustering 소프트웨어 GeneSight<sup>TM</sup>로 해석한 결과를 그림 4에, 발현량에 변화가 있는 유전자의 수를 표 2에 나타내었다. 각 spot의 Cy3<sup>TM</sup>, Cy5<sup>TM</sup>중에서 형광 signal의 평균치(Mean)가 background의 Mean치+2×SD보

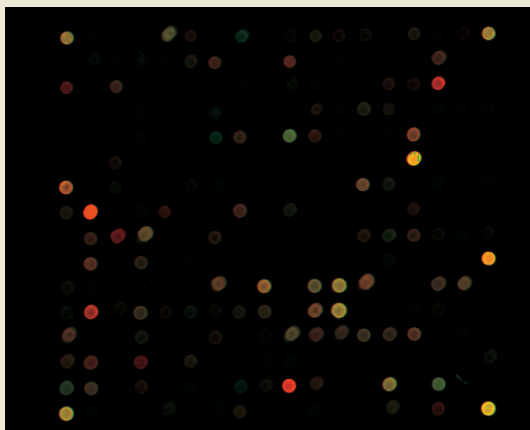


그림 2 Hybridization 화상의 일례  
시료 C와 시료 4의 probe 용액을 이용하여 hybridization 할 때 화상의 일부를 나타낸다. 녹색 spot은 시료 C(분화유도 없음)에, 적색 spot은 시료 4(분화 유도 16일 후)에 유래한 것이며, 그 강도는 대응하는 유전자의 발현량을 나타낸다.

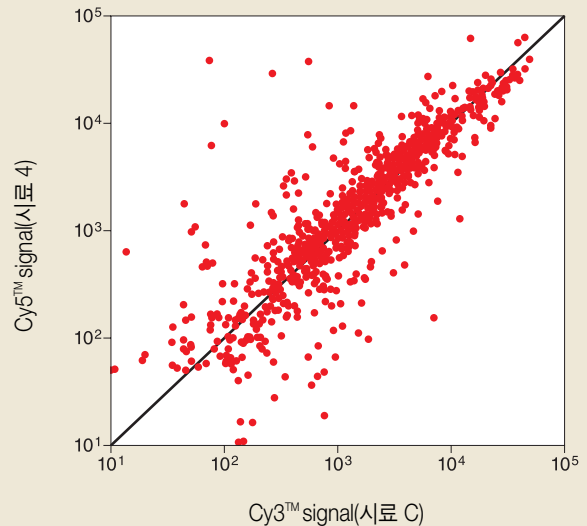


그림 3 Scatter Plot의 일례  
X축은 시료 C(분화 유도 없음), Y축은 시료 4(분화유도 16일 후)를 나타낸다.

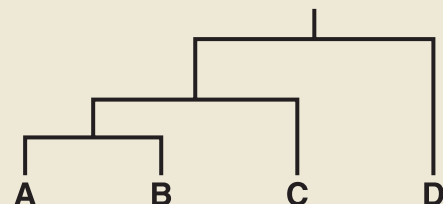


그림 4 지방세포로의 분화 자극 후 6시간, 2일, 6일 및 16일째 세포의 유전자에서 발현 변동을 DNA chip으로 조사하고, GeneSight<sup>TM</sup>를 이용하여 해석한 시료의 clustering 결과  
A: 시료 1(분화유도 6시간 후) ; B: 시료 2(분화유도 2일 후)  
C: 시료 3(분화유도 6일후) ; D: 시료 4(분화유도 16일 후)

표 2 지방세포로의 분화 자극 후 6시간, 2일, 6일, 16일 후 세포의 발현량에 변화를 나타내는 유전자 수

발현변동 유전자 수	시료 1 (분화유도 6시간 후)	시료 2 (분화유도 2일 후)	시료 3 (분화유도 6일 후)	시료 4 (분화유도 16일 후)
41				
58				
14				
14				
23				
5				
4				
14				
11				
10				
10				
7				
7				
39				
41				

\*: 표의 제일 왼쪽은 발현량의 변화가 있는 유전자의 수를 나타내고, 그 오른쪽의 4개는 그 유전자의 발현량의 변화가 나타난 시기를 나타낸다. 예를 들면 제일 아래쪽의 행은 모든 시기(모든 시료)에서 발현변동을 나타낸 유전자가 41종이었음을 나타내고 있다. 단, 본 표는 발현 변동의 증감 표시는 하지 않았다.

다 크고, Cy5<sup>TM</sup>/Cy3<sup>TM</sup>의 비율이 1/2 이하 또는 2배 이상인 유전자를 발현량에 변화가 있는 유전자로 해석하였다(표 2). 표의 제일 왼쪽은 발현량의 변화가 있는 유전자의 수를 나타내고, 그 오른쪽 4개는 그 유전자의 발현량의 변화가 나타난 시기를 나타낸다. 분화유도 6시간, 2일 후의 시료에서 특이적으로 발현량에 변화가 있는 유전자를 많이 발견할 수 있었다.

### ■ 결론

DNA chip을 이용한 해석에서 분화유도 6시간, 2일 후의 시료에서 특이적으로 발현량에 변화가 있는 유전자를 많이 발견할 수 있었다. 이는 분화 초기 단계에서 분화를 결정하는 특이적인 유전자가 발현하고 있다는 것을 시사한다. 따라서 보다 자세하고 종합적인 유전자 발현 해석을 위하여, 현재

TaKaRa에서는 시료 C(미분화 대조)와 분화유도 초기 시료(시료 1과 시료 2)의 total RNA에서 Megacolon<sup>TM</sup>을 하여 DNA Microbeads를 제작하고 있다(DNA Microbeads 기술에 관해서는 Life Science & Biotechnology 19~23호를 참조). 제작한 Megacolon<sup>TM</sup> DNA Microbeads를 이용하여 각 시료간에 Megasort<sup>TM</sup>하여 발현량의 차이가 있는 유전자만을 선별할 수 있다. Megacolon<sup>TM</sup> 및 Megasort<sup>TM</sup> 기술을 이용한 분화 유도에 관여하는 유전자 해석에 대해서는 다음호에 소개할 예정이다.

### 【참고문헌】

1) M. F. Pittenger., et al.(1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cell. *Science*, **284**, 143.

### 【관련제품】

제품명	TaKaRa Code	포장량
<b>RT-PCR 관련</b>		
TaKaRa RNA LA PCR <sup>TM</sup> kit(AMV) Ver.1,1	RR012A	50회
TaKaRa RNA PCR <sup>TM</sup> kit(AMV) Ver.2,1	R019A	50회
<b>DNA chip 관련</b>		
TaKaRa DNA chip [IntelliGene <sup>®</sup> ] 시리즈		
RNA Fluorescence Labeling Core Kit(M-MLV Version)Ver. 2,0	TX810	10 반응분
λpolyA <sup>+</sup> RNA-A	TX802	10 μl
5× Competitor I (Human)	TX808	20 μl
DNA chip용 coverglass TaKaRa Spaced Cover Glass S	TX702	25매
TaKaRa Hybridization Chamber	TX710	1개
Affymetrix <sup>®</sup> 428 <sup>TM</sup> ArrayScanner	GM211	1대
발현 데이터 해석 software Imagene <sup>TM</sup> Ver.4,1	BD001	별도 문의
Clustering software GeneSight <sup>TM</sup> Ver.2,1	BD003	별도 문의