

의 학 연 구 논 문

인간 지방유래 줄기세포의 특성 분석
및 연골전구세포의 분화능 확인

Analysis of characteristics of human
adipose derived stem cell(hASC) and
confirmation of differentiation capacity
of mouse chondroprogenitor(CP) cells

2017년 12월

서울대학교 의과대학

의학과 김 윤 명

지도교수 허 찬 영

초록 (Abstracts)

Adipose derived stem cell called as ASC is a kind of adult stem cell which can be isolated and cultured in the laboratory easily. Besides adipose tissue is quite abundant in the human body and ASCs can differentiate along multiple mesenchymal cell lineages. Owing to these favorable properties, the application of ASCs for clinical use is increasing steadily.

First of all, we isolated ASCs from the human adipose tissue by two times. And we characterized each cell lines by confirming mesenchymal stem cell surface markers and stemness genes expression via flowcytometry and real-time PCR techniques. After then, we isolated chondroprogenitor cells from mouse embryo and quantified the degree of chondrogenic differentiation of those cells in different culture conditions by Alcian blue staining and glycosaminoglycan assay.

This article shows that improving chondrogenic differentiation of mouse chondroprogenitor cells is available by coculturing with human adipose derived stem cells or only adding the media in which human adipose derived stem cells have been cultured. This result shows that interaction between two kinds of cells, which can be figured out upon the concept of paracrine effects, could increase the efficiency of chondrogenesis in vitro. Furthermore, the possibility of stem cell therapy in incurable cartilage

disease can be opened up by examining and applying the conclusion that we suggest via various follow-up studies.

Keywords: Adipose derived stem cell, Stem cell therapy, Surface marker, Stemness gene, Paracrine effects, Chondroprogenitor cell, Chondrogenic differentiation.

Table of Contents

I. INTRODUCTION

I-1. Basic Concepts of Stem Cell Sciences --- 1

I-2. Current Research on Stem Cell Therapy --- 3

I-3. Characteristics of Chondroprogenitor Cells --- 5

II. MATERIALS AND METHODS

II-1. Isolation and Culture of human Adipose derived Stem Cells(hASCs) --- 7

II-2. Flowcytometry(MSC surface markers) --- 11

II-3. Real-time PCR(Stemness genes) --- 12

II-4. Isolation of mouse Chondroprogenitor(CP) Cells --- 16

II-5. Coculture of hASCs on CP cells --- 18

II-6. Alcian blue staining & GAG assay --- 19

III. RESULTS

III-1. Isolation and Culture of human Adipose derived Stem Cells(hASCs) --- 24

III-2. Characterization of Adipose derived Stem Cells: Flowcytometry --- 27

III-3. Characterization of Adipose derived Stem Cells: Real-time PCR --- 33

III-4. Chondrogenic differentiation of CP cells mediated by paracrine pathway --- 36

IV. DISCUSSION --- 42

V. REFERENCES --- 47

LIST OF TABLES

<Table 1> Primer sequence designed for real-time PCR

<Table 2> Real-time PCR cycling conditions.

<Table 3> The method of preparing standard solution for GAG assay

LIST OF FIGURES

<Figure 1> hASC culture on 100/150mm plate with DMEM(10% FBS, 1% P/S) media observed daily with light microscopy at 40× magnitude

<Figure 2> Confirmation of MSC surface markers(CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR) of two different hASC cell lines(hASC new, hASC isolation) by flowcytometry

<Figure 3> Analysis of stemness gene(hOct4, hc-Myc, hKlf4, hNanog, hSox2) expression in two different hASC cell lines(hASC new, hASC isolation) by real-time PCR

<Figure 4> Alcian blue staining of mouse CP cells grown in three different conditions(CP only, CP+hASC, CP+media) for 7 days

<Figure 5> The amount of glycosaminoglycans of mouse CP cells grown in three different conditions(CP only, CP+hASC, CP+media) for 7 days

I. Introduction

I-1. Basic Concepts of Stem Cell Sciences

줄기세포(stem cell)란 어떤 조직의 세포로 분화할지 아직 정해지지 않은 미분화 세포로서, 스스로 재생하고(self renewal) 다른 세포로의 분화능력을 갖는(differentiation) 세포로서 정의된다. 줄기세포 그 기원에 따라 크게 배아줄기세포(ESC; Embryonic Stem Cell), 성체줄기세포(Adult Stem Cell), 유도만능줄기세포(iPSC; induced Pluripotent Stem Cell)로 나누는데, 그 외에도 유산된 태아의 세포로부터 분리해내는 태아줄기세포(Fetal Stem Cell)와 출산 직후 제대혈, Warton' s jelly 등의 조직에서 분리해내는 유아줄기세포(Infant Stem Cell) 등이 있다. 각각의 줄기세포는 여러 측면에서 장점과 단점이 있지만, 줄기세포 치료에 있어 ‘분화능’ 과 ‘윤리적 문제’ 가 가장 중요한 두가지 요소로 손꼽힌다.

분화능(differenciatio n capacity)은 줄기세포가 얼마나 다양한 계통(lineage)의 세포로 분화할 수 있는지를 일컫는 용어이다. 분화 가능한 계통의 수에 따라 전능성(omnipotency), 만능성(pluripotency), 다능성

(multipotency) 등으로 표현하며, 일반적으로 발생 초기의 세포일수록 더 높은 분화능을 갖는다. 다시 말해 배아줄기세포가 성체줄기세포보다 상대적으로 많은 계통의 조직으로의 분화가 가능한 것이다. 그러나 분화능이 높을수록 생체에 주입했을 때 종양 유발 등 부작용의 가능성이 높고, 필연적으로 윤리적 문제가 뒤따르기 때문에 분화능은 마치 양날의 검 같은 특성이라고 할 수 있다. 이와 같은 딜레마를 해결하기 위해 최근 체세포를 줄기세포로 전환시키는 역분화 기술인 iPSC가 주목받고 있으며, 상대적으로 윤리적 문제에서 자유로운 성체줄기세포가 현재 임상 현장에서 적극적으로 적용되고 있는 실정이다.

대부분의 인체조직에는 여러 원인으로 조직에 손상이 가해졌을 때 이를 적절히 재생하기 위한 줄기세포가 존재한다. 이것이 바로 성체줄기세포이다. 성체줄기세포는 다른 세포들과 혼재되어 존재하기 때문에, 이를 선택적으로 분리하고 in vitro에서 배양하는 기술이 임상적 적용에 있어 가장 기본이 된다. 성체줄기세포는 기원 조직에 따라 골수유래줄기세포(BMSC; Bone Marrow derived Stem Cell), 지방유래줄기세포(ASC; Adipose derived Stem Cell) 등이 있으며 각각을 분리, 배양, 저장하는

방법에 있어 조금씩 차이가 있다.

본 연구는 중배엽줄기세포(mesenchymal stem cell)의 일종인 ASC에 주목하여 인간의 지방조직으로부터 ASC를 분리, 배양, 저장하고 flowcytometry와 real time PCR 기법을 통해 인간지방유래줄기세포(hASC; human Adipose derived Stem Cell)의 특이적 표면항원(surface marker) 및 유전자 발현(gene expression)을 확인하고자 한다. 이를 통해 후속 연구에 사용할 수 있는 줄기세포성이 검증된 hASC stock을 확보할 수 있다.

I-2. Current Research on Stem Cell Therapy

줄기세포의 치료효과는 지금 이순간에도 수많은 연구를 통해 다방면으로 검증되고 있다. 단순 피부 상처는 물론 심근, 신경, 연골 등 기존에는 재생이 불가능하다고 여겨졌던 조직에서도 줄기세포가 유의미한 치료효과를 갖는다는 사실이 보고되고 있으며, 치료 방법도 단순히 세포를 주입하는 방식을 넘어, 얇은 층으로 배양해 부착하거나 세포가 분비하는

물질을 주입하는 등 여러가지 방식으로 시도되고 있다.

여기서 또 하나의 핵심적인 개념이 나오는데, 바로 줄기세포의 치료효과가 줄기세포의 분화 및 증식 자체만이 아니라 그들이 분비하는 물질에 의해 나타난다는 주장이다. 이를 주변분비효과(paracrine effect)라고 하며 줄기세포가 성장인자, 항산화물질, 항세포사멸물질, 혈관신생인자, 항섬유화인자, 항염증물질, 면역억제물질 등을 분비하고, 반대로 세포사멸 촉진물질, 염증물질 등을 소비함으로써 치료 효과를 나타낸다는 이론이다. 쉽게 말하면 주입된 줄기세포가 앞서 언급된 작용을 통해 손상조직의 세포사멸과 염증반응을 억제해 섬유화를 막고, 나아가 세포분열을 촉진하고 혈류를 증가시킴으로써 정상조직으로의 재생에 기여한다는 개념이다. 최근에는 실제로 줄기세포가 조직에 주입되었을 때 평균적인 생존기간은 길지 않은 편이며, 오히려 이들이 분비하는 물질이 원래 조직에 존재하던 세포를 자극해 조직 재생을 돕는, 즉 주변분비효과의 중요성이 더욱 크다는 결과가 보고되고 있다.

I-3. Characteristics of Chondroprogenitor Cells

연골전구세포(CP cell; Chondroprogenitor cell)는 일종의 전구세포로서 연골세포로의 분화가 가능하며, limb bud와 같은 미성숙 연골조직에서 분리할 수 있다. 연골세포는 초기에는 높은 세포 밀집도와 높은 대사량을 보이지만, 성숙할수록 대사량, 기질 합성량, 분화능 등이 점차 감소하여 결국 나중에는 더이상 분열하지 않고 연골 유지에 필요한 기질만을 합성하게 된다.

특히 퇴행성관절염(osteoarthritis)을 비롯한 연골관련질환은 일단 손상이 가해지면 자체적으로 재생이 거의 이루어지지 않기 때문에 만성적인 경과를 갖는 경우가 많다. 따라서 기존에는 보존요법을 중심으로 하되, 연골에 물리적으로 구멍을 내어 재생을 촉진하는 미세천공술(microfracture) 등이 시도되었으나 뚜렷한 치료 효과를 보이지 못하였다. 그러던 중 2012년 메디포스트의 줄기세포 치료제인 카티스템(cartistem)이 식약처의 승인을 받아 현재 임상에서 적용되고 있으며, 연골결손질환에서 점차 줄기세포 치료의 적용이 늘어나고 있고 추후 전망도 밝은 편이다.

따라서 본 연구는 hASC의 주변분비효과를 검증하기 위해, 먼저 mouse의 연골 조직으로부터 CP cell을 분리 배양하고 이를 앞서 분리해 낸 hASC 공배양할 것이다. 나아가 in vitro에서 hASC의 분비체 (secretome)가 CP cell의 연골세포 분화(chondrogenic differentiation)에 미치는 영향을 분석하기 위해 Alcian blue staining 및 Glycosaminoglycan(GAG) assay를 통해 CP cell의 분화도를 정량화할 것이다.

II. Materials and methods

II-1. Isolation and Culture of human Adipose derived Stem Cells(hASCs)

아래의 전과정은 클린벤치에서 수행하였다. 분리(Isolation)는 공여받은 지방조직의 상태에 따라 실험방법이 다르다. [2017.11.22 진행] 절제조직(excision sample)의 경우 먼저 매스를 사용해 피부조직과 지방조직을 깔끔히 분리하였다. 이때 섬유조직을 지방으로부터 최대한 제거하여야 한다. 다음으로 150mm plate에 PBS with 1% P/S를 붓고 이곳에 지방조직을 담가 핏기가 사라질 때까지 반복해서 씻어냈다. 그리고 조직을 적절히 잘라 50ml conical tube에 옮겨 담고 죽상이 될 때까지 가위로 반복하여 잘랐다.

[2017.10.25 진행] 흡입조직(suction sample)의 경우 앞서 언급한 washing, chopping 단계를 생략해도 무방하므로 다음의 단계부터 수행하였다. 미리 collagenase powder를 정량하여 0.1% collagenase solution(in

PBS with 1% P/S)을 만들어두고, 죽상이 된 조직과 1:1 비율로 혼합하여 37℃ water bath에서 1시간 incubation하였다. 이때 10분에 한번씩 inverting하여 조직과 collagenase가 잘 반응할 수 있도록 한다. 육안으로 보아 섬유조직이 충분히 제거되었으면 1300rpm, 25℃에서 3분간 원심 분리하였다. 그러면 지방조직이 3개의 층으로 분리되는데 위부터 차례로 기름층(oil layer), 지방층(fat cake layer), 침전층(pellet layer)이라고 부른다. 여기서 기름층과 지방층의 ½을 파이펫으로 따서 버리고 나머지를 새로운 50ml tube에 옮겼다. 이후 media라고 지칭할 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) solution(20% FBS, 1% P/S)과 1:1 비율로 잘 혼합한 다음 1300rpm, 25℃에서 3분간 원심분리하였다. 마찬가지로 기름층과 지방층의 ½을 파이펫으로 따서 버리고 나머지를 새로운 50ml tube에 옮긴다. 이 때 100µm strainer를 사용해 미세하게 남아 있는 섬유조직을 마저 걸러주어야 한다. 마지막으로 media과 1:1 비율로 혼합하고 다시 1300rpm, 25℃에서 3분간 원심분리한 다음 pellet만 남기고 상층액을 모두 제거하였다. 확보한 pellet을 적당량의 media에 resuspension한 다음 100mm plate에 접종하고 현미경으로 관찰하였다.

배양(culture)은 크게 배양액 교체(media change), 계대배양(subculture)로 나눌 수 있다. 먼저 배양액 교체는 계대배양 다음 날, 그리고 정기적으로 3일에 1번씩 수행하였다. suction tip에 micropipette tip을 낀 다음 기존 media를 suction하여 제거하고 새로운 media를 100mm plate의 경우 10ml씩, 150mm plate의 경우 20ml씩 가해주었다. 이때 media를 plate의 바닥이 아닌 벽면에 닿도록 하여 세포가 떨어지지 않도록 하였다.

계대배양은 기존 plate에 세포가 충분히 자랐을 때 세포를 여러 plate로 분할하여 배양을 이어나가는 것이다. 먼저 각 plate에서 media를 suction하고 trypsin 0.1% solution을 2ml 가해 37℃ 5% CO₂ 조건에서 1분간 incubation하였다. 그리고 plate의 측면을 손으로 가볍게 치면서 세포가 바닥에서 충분히 떨어졌는지 현미경으로 확인하였다. 다음으로 media 3ml를 가하여 trypsin의 작용을 중화하고 해당 용액을 15ml 또는 50ml conical tube에 옮겨 담았다. 이 때 pipet으로 plate 바닥 면에 몇 차례 media를 뿌려주어 가능한 모든 세포를 수확할 수 있도록 한다. 이제 모든 tube를 1300rpm, 25℃에서 3분간 원심분리하고 상층액을 suction

한 다음 새로운 pellet을 적절한 volume의 media에 resuspension하였다. 이 용액을 20 μ l 취하고 2-10배로 희석한 다음 nucleocounter를 이용해 세포 농도를 측정하였다. 마지막으로 각 plate 당 세포의 수가 2×10^5 cells(100mm plate) 또는 4.5×10^5 cells(150mm plate)가 되도록 세포 용액을 뿌리고 최종 volume이 10ml(100mm plate) 또는 20ml(150mm plate)가 되도록 media를 추가적으로 넣어주었다.

저장(freezing)은 세포가 충분히 자랐을 때 이를 영구적으로 보관하기 위한 방법이다. 일반적으로 100mm plate 하나당 cryotube 1개, 150mm plate 하나당 cryotube 2개를 만든다. 먼저 계대배양과 동일한 방법으로 세포를 harvest한 다음 cryotube 하나당 FBS 900 μ l 혹은 FBS 450 μ l, media 450 μ l 조성의 용액에 pellet을 resuspension하였다. 마지막으로 DMSO 용액 100 μ l을 가하고 몇차례 pipetting한 후 cryotube를 -에 담아 -80 $^{\circ}$ C deep freezer에서 overnight하였다. 다음 날 cryotube를 액체질소 냉동고에 옮겨 담았다.

II-2. Flowcytometry(MSC surface markers)

Flowcytometry를 통해 분리배양한 hASC가 이에 합당한 표면항원 발현 양상을 보임을 검증하고자 한다. 먼저 표면항원 8종류, control 3종류, unstain 1종류로 총 12개의 FACS sample을 준비하였다. 분석을 위한 최소 조건은 표면항원 하나당 10^4 cells 이상의 세포이지만, 분석의 정확성을 위하여 10^5 cells을 기본으로 세포를 배양하였다.

먼저 계대배양과 동일한 방법으로 세포를 harvest한 다음 pellet을 PBS 6ml에 resuspension하였다. 필요에 따라 nucleocounter로 세포 수를 측정할 수 있다. 세포 용액을 FACS tube 하나당 500 μ l씩 넣어주고 뚜껑을 열어 항체를 4 μ l씩 가하였다. 이 때 반드시 labeling을 하고 control 별로 해당하는 sample을 정렬해두었다. 다음으로 샘플을 호일로 감싸 상온에서 1시간동안 incubation하였다. 이때 1시간을 초과할 경우 -20°C 냉장고에 옮겨서 보관하였다. 마지막으로 샘플을 얼음에 박아 FACS 기기로 이동해 촬영을 진행하였다.

II-3. Real-time PCR(Stemness genes)

<Table 1> Primer sequence designed for real-time PCR. The sequence is written from 5' to 3'.

Type	Gene	forward seq.	backward seq.
control	Human β - actin	GCGAGAAGATGACCC AGGATC	CCAGTGGTACGGCCA GAGG
stemness genes	Human c-myc	CGTCTCCACACATCA GCACAA	TCTTGGCAGCAGGAT AGTCCTT
	Human Klf4	CGCTCCATTACCAAG AGCTCAT	CGATCGTCTTCCCTC TTTG
	Human Nanog	CCAAAGGCAAACAAC CCTT	TCTTGACCGGGACCTT GTCT
	Human Oct4	CGACCATCTGCCGCTT TG	GCAAGGGCCGCAGCT TA
	Human Sox2	TGCGAGCGCTGCACA T	GCAGCGTGTACTTAT CCTTCTTCA

Real-time PCR을 통해 분리배양한 hASC의 stemness gene 발현 패턴을 확인하고자 한다. Yalvac, M. E., et al (2010)을 참고하여 위와 같이 house keeping gene인 β -actin과 stemness gene인 c-myc, Klf4, Nanog, Oct4, Sox2의 primer design을 하였고 (주)제노텍에서 주문하였

다.

먼저 유전자 발현 양상을 확인하려 하는 cell line으로부터 RNA isolation을 하였다. 기본적으로 10^6 cells 이상의 세포를 사용하여야 한다. 우선 media를 suction하고 얼음에 박아둔 PBS buffer로 한차례 washing 하였다. PBS buffer를 suction하고 plate 당 1ml trizol을 가한 후, cell scraper로 plate 바닥을 긁어서 1.5ml tube에 모아 상온에서 5분간 incubation하였다. 세포가 충분히 파괴되었으면 250 μ l chloroform을 가해 15초간 세게 흔든 다음 상온에서 10분간 incubation하고 1200rpm 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하였다. 이때 cell lysate가 3층으로 분리되는데 상층은 clear, aqueous phase로 RNA를 포함하며 중간층은 white phase로 DNA가 침전되어 있는 층이다. 마지막으로 하층은 pink phase로 organic material이 존재한다. 따라서 micropipet으로 중간층이 팔려오지 않게 주의하며 상층을 따서 새로운 1.5ml tube로 옮겼다. 이제 550 μ l isopropanol을 가하고 부드럽게 섞은 후 상온에서 10분간 incubation하고 1200rpm 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하였다. 이 때부터 아래 쪽에 pellet이 관찰되며 샘플을 얼음에 꽂아놓고 실험을 진행하였다. pellet을 주의

하며 상층액을 따라 버리고 75% ethanol in DEPC treated water 1ml를 가해 부드럽게 섞은 후 1200rpm 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 마지막으로 상층액을 따라 버리고 pellet을 공기중에서 말렸다. pellet의 크기를 확인하고 이에 맞추어 DEPC treated water 15-25μl를 넣고 dilution 하였다. 최종적으로 nanodrop을 사용해 RNA의 quality와 concentration을 측정한 후 -80℃ deep freezer에서 보관하였다.

RNA isolation을 완료했으면 이제 cDNA를 합성해야 한다. Thermo Scientific사의 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit를 사용하였다. 먼저 합성한 RNA를 얼음에 꽂아놓고 천천히 녹였다. 다음으로 1.5ml tube에 template RNA 3μg, oligo dT 1μl, 그리고 nuclease free water를 12μl가 될 때까지 넣었다. 그리고 5x reaction buffer 4μl, RiboLock RNase inhibitor 1μl, 10mM dNTP mix 2μl, RevertAid reverse transcriptase 1μl을 순서대로 넣고 총 20μl의 샘플이 만들어졌는지 확인하였다. 이제 샘플이 잘 섞이도록 골고루 흔든 다음 42℃ heat block에서 60분간, 70℃ heat block에서 5분간 incubation하였다. 각각은 cDNA 합성이 이루어지고 효소의 반응 종결시키는 단계이다. cDNA 합성이 완

료되었으므로 일주일 이내에 사용할 경우 -20℃, 그 이상 보관할 경우 -80℃ deep freezer에 보관하였다.

<Table 2> Real-time PCR cycling conditions. The condition is optimized referring to the protocol used in the laboratory.

Real-time PCR run method			
Number of cycles=45, Starting cycle=1			
Stage	Step	Temperature	Time
Hold stage	1	50℃	2min
	2	95℃	10min
PCR stage	1	95℃	15s
	2	64℃	40s
Melt curve stage	1	95℃	1min
	2	70℃	30s
	3	95℃	30s
	4	60℃	15s

합성한 cDNA와 앞서 주문한 primer를 사용해서 real-time PCR을 수행하였다. TAKARA 사의 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 키트와 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Instrument System, ViiATM 7 Real-Time PCR 기기를 사용하였다. 먼저 96 well

PCR plate에 다음의 구성에 따라 샘플을 로딩하였다. 각 well 마다 SYBR premix Ex Taq2 5 μ l, PCR forward primer 1.75 μ l, PCR reverse primer 1.75 μ l, template cDNA 1.5 μ l, ROX reference dye 0.4 μ l로 총 10.4 μ l의 샘플을 로딩하였다. 이때 cDNA를 제외한 시약을 우선 혼합해 master mix로 만들어두고 cDNA를 추가하는 방식으로 실험을 진행하였으며 모든 과정은 얼음에 쫓아 진행하였다. 샘플을 모두 로딩한 다음 PCR plate를 밀봉하고 real-time PCR machine에 넣었다. 다음으로 <Table 2>에 제시된 cycling condition에 맞추어 PCR이 진행되었고, delta delta Ct method를 기반으로 결과를 분석하였다.

II-4. Isolation of mouse Chondroprogenitor(CP) Cells

본 실험에는 오리엔트 사에서 주문한 11.5D mouse를 사용하였다. 먼저 고압증기멸균을 마친 포셉과 수술가위를 준비하고 PBS, HBSS, media, 70% ethanol을 50ml conical tube에 aliquot 해두었다. 더하여 HBSS 800 μ l + 1% trypsin 100 μ l + 0.1% collagenase 용액을 미리 만들

어두웠다.

전임상센터로 이동하여 mouse를 CO2 chamber에서 안락사시킨 후, mouse의 배 가죽을 70% ethanol로 소독하고 수술가위로 갈라, 핀셋으로 mouse embryo를 꺼내 PBS buffer에 담가두었다. 사용한 수술도구는 70% ethanol에 담가서 보관하였다. 클린벤치로 돌아와서 mouse embryo를 PBS가 담긴 50ml conical tube에서 2번, HBSS가 담긴 150mm dish에서 핏기가 모두 사라질 때까지 washing하였다. 수술가위를 사용해 mouse embryo를 2개 단위로 자르고 막을 제거해 embryo를 꺼내서 새로운 150mm plate로 옮겼다. 그리고 각 embryo의 limb bud의 끝 1/3을 잘라서 HBSS가 담긴 새로운 100mm plate에 모았다. 모든 embryo에 대해 작업이 끝나면 1ml micropipet을 사용해 limb bud를 새로운 50ml conical tube에 모으고 조직이 가라앉을 때까지 기다린 다음 상층액을 제거하였다. 그리고 HBSS를 2ml를 넣고 가볍게 흔들어 washing한 후 상층액을 다시 제거하는 과정을 3회 수행하였다.

이제 만들어진 HBSS 800 μ l, 1% trypsin 100 μ l, 0.1% collagenase 용액을 filtering하여 limb bud가 담긴 50ml conical tube에 넣어주고 37 $^{\circ}$ C

워터베이스에서 10분 incubation하였다. 세포가 충분히 녹으면 media를 넣고 pipetting하여 collagenase inactivation을 한 다음, 1200rpm 25℃에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 그리고 tube 끝을 3-4회 tapping하고 mouse 한마리당 media를 100μl씩 넣어 천천히 pipetting한 다음 4μm filter에 한차례 걸렀다. 더하여 nucleocounter로 세포 수를 측정하여 1.4×10^7 cells/ml 농도가 되도록 dilution하고 콜로니 당 18μl씩 접종하였다. 콜로니는 12 inserts/24 well plate(SPL사의 SPLInsert™ Hanging 37024)의 insert가 없는 12 well에 1 콜로니씩, 2개의 60mm plate에 각 6 콜로니씩 총 24개 콜로니를 만들었다. 마지막으로 37℃에서 4시간 동안 incubation한 다음 media 500μl씩 넣어 바닥에 부착된 세포가 있는지 현미경으로 확인하였다.

II-5. Coculture of hASCs on CP cells

[2017.11.27 진행] 계대배양과 동일한 방법으로 배양 중인 hASC(hASC isolation P5)를 harvest하고 media 500μl를 가해

resuspension하였다. 그리고 20 μ l를 취해 10배 dilution하여 nucleocounter로 세포 수를 측정하였다. 그리고 insert의 면적을 고려해 insert 하나당 5×10^3 cells과 250 μ l media가 들어가도록 실험군(CP+hASC, CP+media)에 해당하는 8개의 inserts에 접종하였다.

[2017.11.28 진행] 다음날 II-4에 제시한 방법에 따라 mouse embryo로부터 CP cell을 분리하여 12개의 well에 접종하였다. 대조군(CP only)에 해당하는 4개의 well에는 fresh media를 250 μ l씩 넣어주었다. 그리고 실험군 1(CP+hASC)에 해당하는 4개의 well의 경우 hASC가 자라고 있는 insert를 CP cell이 접종된 well의 위로 옮겨주었다. 마지막으로 실험군 2(CP+media)에 해당하는 4개의 well에는 hASC가 자라고 있는 insert에서 media를 250 μ l 취해서 넣어주었다.

II-6. Alcian blue staining & GAG assay

II-4, II-5의 과정을 마치고 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 조건에서 일주일간 (2017.11.28-2017.12.4) 배양하였다. 대조군(CP only) 4 well, 실험

군 1(CP+hASC) 4 well, 실험군 2(CP+media) 4 well을 확보하였으며 2 well 씩 나누어 각각 Alcian blue staining과 GAG(glycosaminoglycan) assay를 진행하였다. 전과정에 걸쳐서 콜로니가 바닥에서 떨어지지 않도록 주의하면서 진행하였다.

Alcian blue staining의 경우 각 well의 media를 suction하고 PBS 500 μ l씩 넣어 2차례 washing하였다. 그리고 4% paraformaldehyde solution 500 μ l를 넣어 상온에서 10분간 fixation을 수행한 다음, paraformaldehyde를 suction하고 다시 PBS 500 μ l를 넣어 2차례 washing 하였다. 다음으로 Alcian blue solution 300 μ l를 넣고 3시간 동안 상온에서 incubation하고 0.1N HCL 1ml를 넣어 nonspecific stain을 제거하였다. 이제 0.1N HCL을 깨끗이 제거한 다음 4M guanidine solution 300 μ l를 넣고 광학현미경을 사용해 40배 배율에서 nodule 형성 정도를 관찰하였다. 마지막으로 shaker를 이용해 상온에서 overnight하면서 destaining을 진행하였다. 다음날 콜로니를 PBS 180 μ l에 resuspension하여 96 well plate에 옮기고 microplate reader로 600nm 흡광도를 측정하였다.

GAG assay는 기존에 준비해놓은 시약을 사용하였다. 0.2M sodium phosphate buffer 100ml + 800mg sodium acetate + 400mg EDTA + 80mg L-cysteinine HCL을 혼합한 용액 1ml에 papain crystallized solution 5μl를 첨가하여 준비해두었다. 각 well에서 media를 제거하고 앞서 준비한 용액을 150μl씩 넣은 다음 콜로니를 완벽하게 resuspension하여 1.5ml tube에 옮겨담았다. 그리고 파라필름으로 감아 65℃ dry oven에서 3시간 incubation하였다. 그리고 10000g에서 10분간 원심분리하고 상층액만 취해서 새로운 1.5ml tube에 옮겨 -20℃에서 보관하였다.

<Table 3> The method of preparing standard solution for GAG assay.

Gene	DW	Stock(100μg/ml)
blank	200μl	0μl
1μg	180μl	20μl
2μg	160μl	40μl
3μg	140μl	60μl
4μg	120μl	80μl
5μg	100μl	100μl

다음으로 위의 표에 따라 증류수와 100μg/ml glycosaminoglycan stock

을 혼합하여 표준용액을 만들었다. 다음으로 샘플과 표준용액을 각 50 μ l씩 취해 1.5ml tube에 옮겨담았다. 여기에 Blyscan dye reagent를 1ml씩 넣고 shaker에서 30분간 반응시켰다. 이제 12000g에서 10분간 원심분리하고 pellet을 주의하면서 상층액을 최대한 제거하였다. 그리고 dye dissociation reagent를 500 μ l씩 넣고 pellet이 완전히 녹을 때까지 vortexing하였다. 12000g에서 5분간 원심분리하고 샘플과 표준용액을 200 μ l씩 취해 96 well plate에 옮기고 microplate reader로 656nm 흡광도를 측정하였다.

III. Results

III-1. Isolation and Culture of human Adipose derived Stem Cells(hASCs)

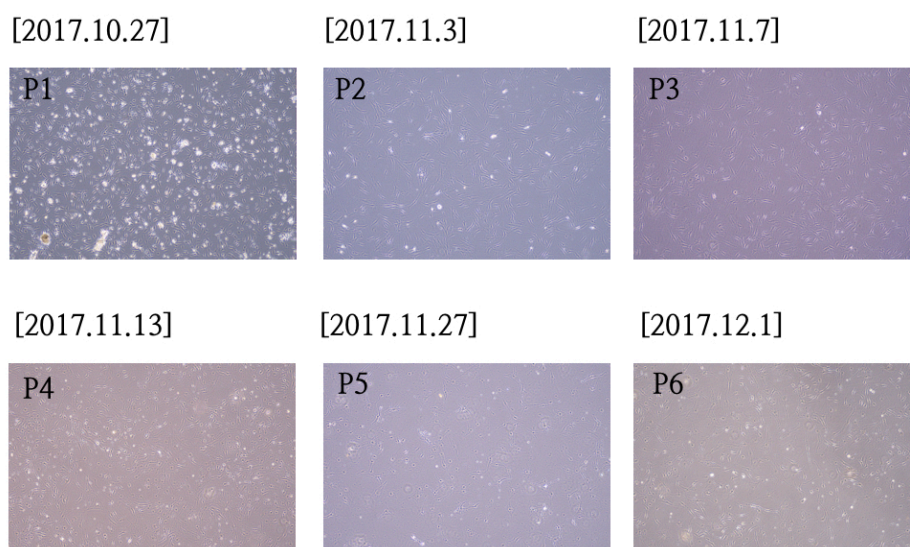
수술을 통해 인간의 지방 조직을 공여받아 2017년 10월 25일, 11월 22일 진행 두차례에 걸쳐 hASC를 분리하였다. 이어서 세포를 배양해나가며 하루 단위로 광학현미경을 사용해 40배 배율로 관찰 및 촬영을 수행하였다. 세포가 충분히 자라나면 cell counting을 하여 계대배양을 하거나 -80℃ deep freezer에 동결하여 stock을 확보하였다. 10월 25일에 분리한 cell line을 hASC isolation, 11월 22일에 분리한 cell line을 hASC new로 명명하였으며 각 cell line에 대해 flowcytometry와 real-time PCR을 수행하여 줄기세포성을 검증하였다. hASC는 뾰족하게 돌기를 뻗는, 일종의 별모양의 세포로서 특징적인 형태를 갖는다. 배양 시 plate 바닥에 붙어서 자라기 때문에 harvest할 때 trypsin을 처리하고 물리적인 충격을 가해 모든 cell이 떨어졌는지 꼭 확인해야만 한다. 10주간의 관찰 결과 일반적으로 passage를 거듭할수록 세포의 특징적 형태가

소실되고 두꺼워지며 증식 속도가 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 흡입조직으로부터 분리한 hASC isolation과 절제조직으로부터 분리한 hASC new cell line 사이에 특징적인 차이는 관찰되지 않았으며 이는 flowcytometry와 real-time PCR에서도 마찬가지였다.

<Figure 1> hASC culture on 100/150mm plate with DMEM(10% FBS, 1% P/S) media observed daily with light microscopy at 40× magnitude.

(A) Culture of 'hASC isolation' cell line from passage number 1 to 6.

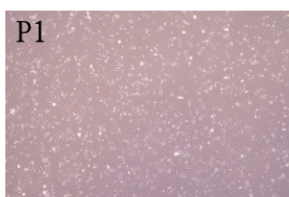
hASC isolation



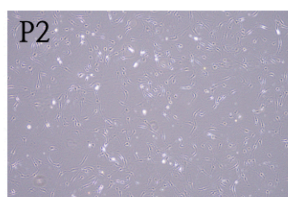
(B) Culture of 'hASC new' cell line from passage number
1 to 5.

hASC new

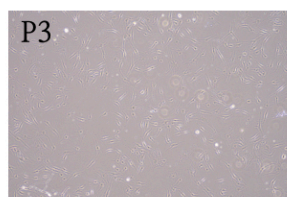
[2017.11.27]



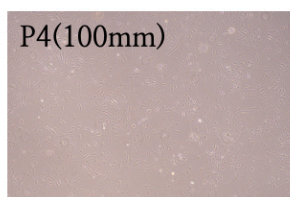
[2017.12.1]



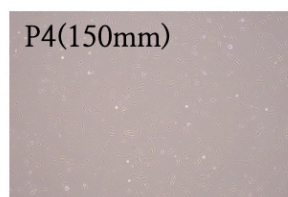
[2017.12.7]



[2017.12.11]



[2017.12.11]



III-2. Characterization of Adipose derived Stem Cells:

Flowcytometry

인간지방조직에서 분리해낸 두 종류의 cell line(hASC isolation, hASC new)에 대해서 flowcytometry를 통해 8종의 MSC surface marker(CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR)의 발현 여부를 확인하였다. 이때 항체를 넣지 않은 Unstain과 Ig-G1(CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 control), Ig-G2a(HLA-DR control), Ig-G2b(CD44 control)를 control로서 사용하였다. 항체의 주문 일정에 맞춰 hASC isolation은 두차례에 나누어 hASC new는 한번에 실험을 수행하였으며 실험 결과를 <Figure 2>에 정리하였다.

실험 결과 hASC isolation은 CD44(95.52%), CD73(70.27%), CD90(98.69%), CD105(94.76%)에 대해서 positive, CD19(0.05%), CD34(0.06%), CD45(0.20%), HLA-DR(0.15%)에 대해서 negative였다. 다음으로 hASC new는 CD44(65.02%), CD73(50.00%), CD90(96.80%), CD105(83.44%)에 대해서 positive, CD19(0.02%),

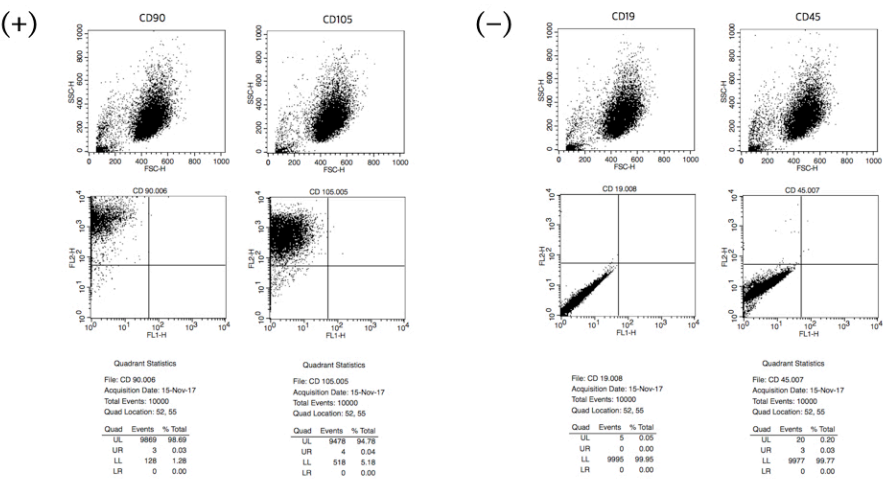
CD34(0.06%), CD45(0.19%), HLA-DR(0.14%)에 대해서 negative였다. 두 cell line 모두 선행연구에서 제시된 MSC의 표면항원 발현 양상과 일치하는 결과를 보였으며, 특히 hASC new에서 surface marker의 발현율이 상대적으로 낮게 나타났다. 이는 줄기세포를 임상에서 활용할 때 flowcytometry를 통해 세포를 선별하여 사용할 필요가 있음을 시사하는 결과이다.

<Figure 2> Confirmation of MSC surface markers of two different hASC cell lines by flowcytometry.

(A) Analysis of CD19, CD45, CD90, CD105 expression on hASC isolation(P4). hASCs were stained with anti-IgG1 and antibodies binding to four surface markers mentioned above.

hASC isolation

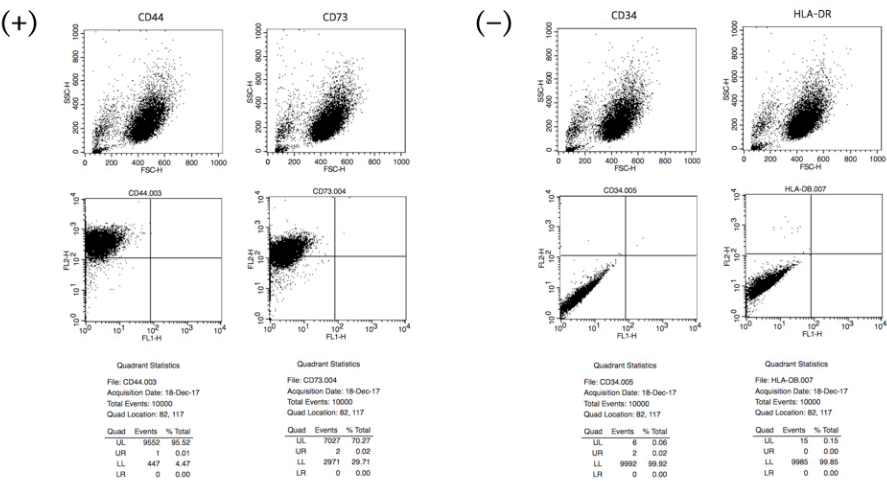
[2017. 11. 15] Passage number 4



(B) Analysis of CD34, CD44, CD73, HLA-DR expression on hASC isolation(P3). hASCs were stained with anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b and antibodies binding to four surface markers mentioned above.

hASC isolation

[2017. 12. 18] Passage number 3

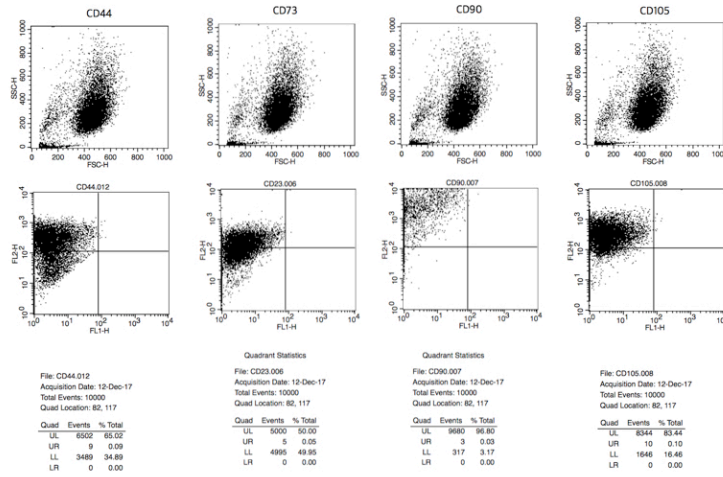


(C) Analysis of CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR expression on hASC new(P4). hASCs were stained with anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b and antibodies binding to eight surface markers mentioned above.

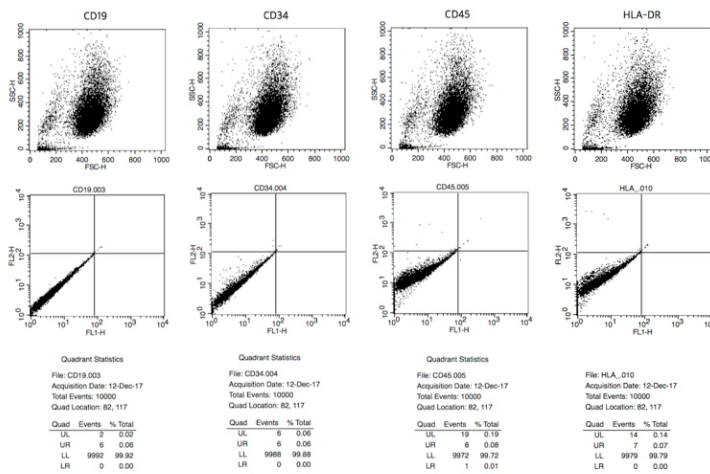
hASC new

[2017. 12. 12] Passage number 4

(+)



(-)



(D) Summarization of flowcytometry data

Flowcytomtery

Group/Surfae marker	CD44	CD73	CD90	CD105	CD19	CD34	CD45	HLA-DR
hASC new(P4)	65.02%	50.00%	96.80%	83.44%	0.02%	0.06%	0.19%	0.14%
hASC isolation(P3/4)	95.52%	70.27%	98.69%	94.76%	0.05%	0.06%	0.20%	0.15%

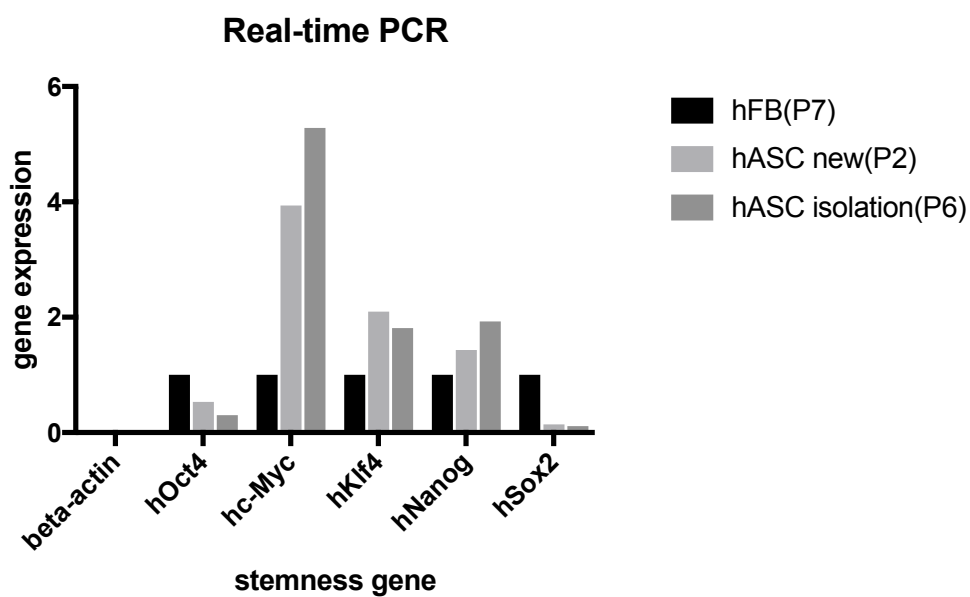
III-3. Characterization of Adipose derived Stem Cells: Real-time PCR

인간지방조직에서 분리해낸 두 종류의 cell line(hASC isolation, hASC new)에 대해서 real-time PCR을 통해 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 대표적인 유전자 5종인 Oct4, c-Myc, Klf4, Nanog, Sox2의 발현 양상을 확인하였다. 각 유전자의 상대적인 발현량을 계산하기 위하여 house keeping gene인 β -actin을 internal control로 삼았고, 일반세포와 발현 양상의 차이를 확인하기 위해 human fibroblast를 negative control로 채택하였다. 모든 primer는 human genome을 기준으로 Yalvac, M. E., et al (2010)을 참고하여 design하였고, 모든 샘플은 duplication하여 과실오차를 방지하였다. 여러 real-time PCR의 기법 중에서 SYBR Green을 통해 증폭 양상을 실시간으로 측정하였으며, 측정된 값은 delta delta Ct method를 기반으로 계산 및 분석하여 <Figure 3>로 가시화하였다.

먼저 hASC isolation의 경우 hFB에 비해 Oct4(0.301배), c-Myc(5.282배), Klf4(1.814배), Nanog(1.928배), Sox2(0.110배) 발

현하며, hASC new는 hFB에 비해 Oct4(0.534배), c-Myc(3.938배), Klf4(2.095배), Nanog(1.434배), Sox2(0.142배) 발현하는 것으로 측정되었다. 결론적으로 두 cell line(hASC isolation, hASC new) 모두 hFB와 비교했을 때 c-Myc, Klf4, Nanog의 발현량이 상대적으로 높고 Oct4, Sox2의 발현량은 상대적으로 낮은 것이며, 이는 기존에 stemness gene으로 분류된 유전자라고 하더라도 hASC가 특징적으로 많이 발현하지 않을 수 있음을 보여준다. 더하여 hASC의 줄기세포성을 판단할 때 Oct4, Sox2 보다는 c-Myc, Klf4, Nanog을 기준으로 분석하면 보다 쉽게 결론을 얻을 수 있을 것이다.

<Figure 3> Analysis of stemness gene(hOct4, hc-Myc, hKlf4, hNanog, hSox2) expression in two different hASC cell lines(hASC new, hASC isolation) by real-time PCR. Internal control(house keeping gene) is β - actin and negative control is human fibroblast(hFB).



Real-time PCR

Group/Gene	hOct4	hc-Myc	hKlf4	hNanog	hSox2
hFB(P7)	1	1	1	1	1
hASC new(P2)	0.534	3.938	2.095	1.434	0.142
hASC isolation(P6)	0.301	5.282	1.814	1.928	0.110

III-4. Chondrogenic differentiation of CP cells mediated by paracrine pathway

세가지 다른 배양 조건(CP only, CP+hASC, CP+media) 하에서 mouse embryo로부터 분리한 CP cell의 연골세포 분화도가 어떠한 차이를 보이는지 분석하고자 한다. 연골세포 분화도를 정량화하기 위해 Alcian blue staining, GAG assay 두가지 기법을 채택하였고, CP cell의 배양은 동일하게 진행하되 모든 샘플을 duplication하여 과실오차를 방지하였다.

Alcian blue staining 결과 대조군(CP only), 실험군 1(CP+hASC), 실험군 2(CP+media)에서 600nm 흡광도가 각각 0.352, 0.479, 2.109로 측정되었다. 이는 Alcian blue staining을 기준으로 CP cell의 연골세포 분화가 hASC와 공배양했을 때 1.361배, hASC를 배양한 media를 첨가해주었을 때 5.991배 증가함을 의미한다.

GAG assay 결과 대조군(CP only), 실험군 1(CP+hASC), 실험군 2(CP+media)에서 GAG의 양이 각각 5.762, 5.782, 9.907로 계산되었다. 이는 GAG assay를 기준으로 CP cell의 연골세포 분화가 hASC와 공

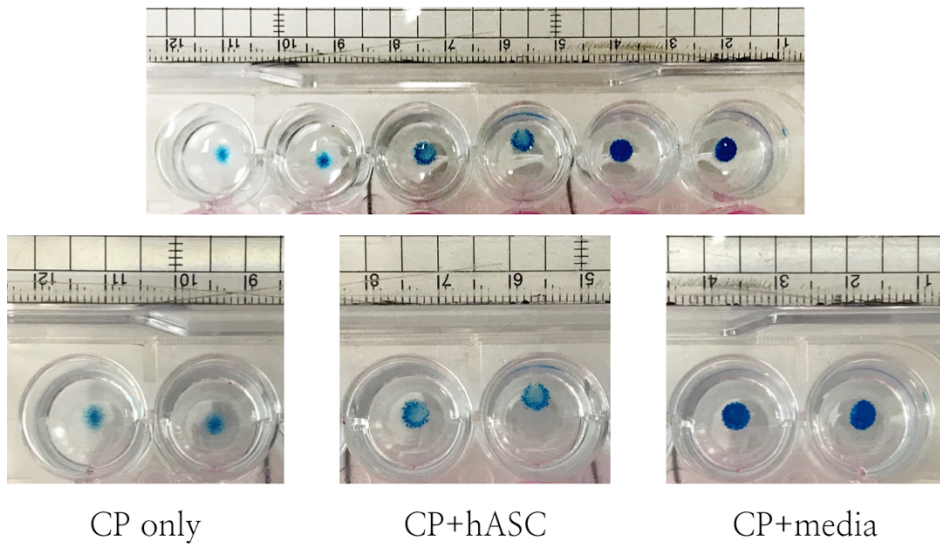
배양했을 때 1.003배, hASC를 배양한 media를 첨가해주었을 때 1.719배 증가함을 의미한다. Alcian blue staining과는 달리 실험군 1의 경우 대조군에 비해 통계적으로 유의미한 차이를 갖지는 않았다.

결론적으로 Alcian blue staining, GAG assay 두가지 기법을 활용해 CP cell의 연골세포 분화도를 측정한 결과, CP cell을 배양할 때 hASC를 배양한 media를 첨가하면 연골세포 분화가 유의미하게 촉진됨을 확인하였다. 반면 CP cell과 hASC를 공배양하는 것은 Alcian blue staining에서는 그 효과가 확인되었지만, GAG assay에서는 확인할 수 없었다. 따라서 두 실험결과를 종합하였을 때 hASC의 주변분비효과를 통해 CP cell의 연골세포 분화가 촉진될 수 있음을 분명히 확인하였으며, 그 효과는 hASC 배양액을 첨가할 때 더욱 뚜렷하게 나타나는 것으로 보인다.

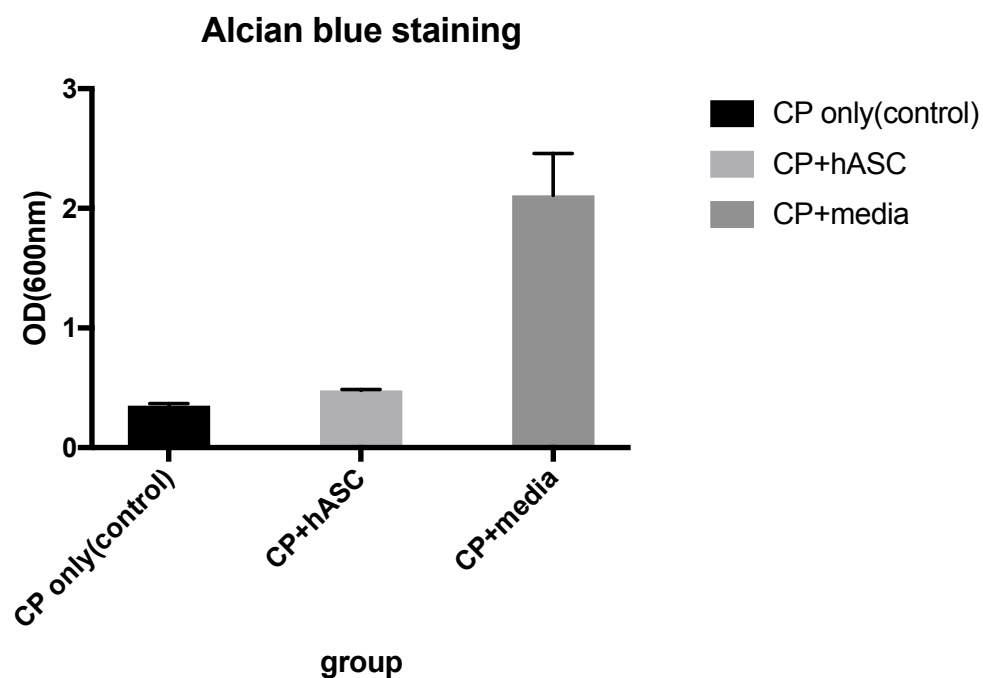
<Figure 4> Alcian blue staining of mouse CP cells grown in three different conditions(CP only, CP+hASC, CP+media) for 7 days(2017.11.28-2017.12.4).

(A) Visual observation after staining

Alcian Blue Staining



(B) Quantification of chondrogenesis was determined by measuring the absorbance of bound Alcian blue at 600 nm

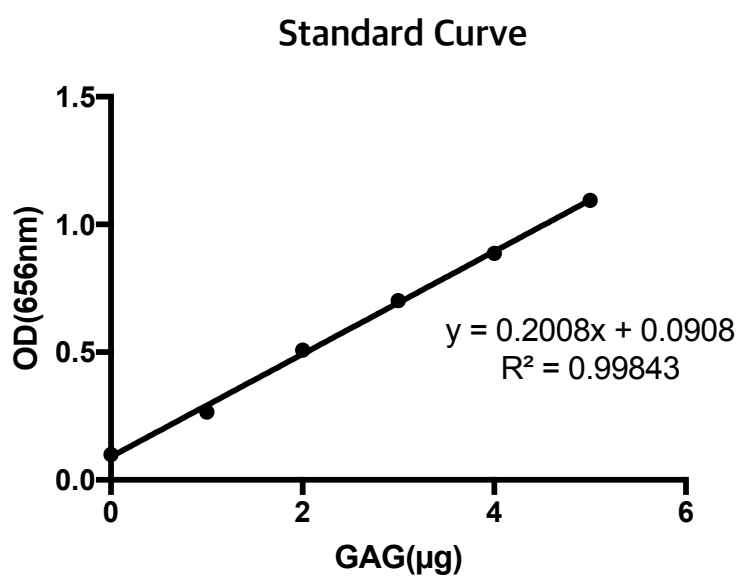


Alcian blue staining

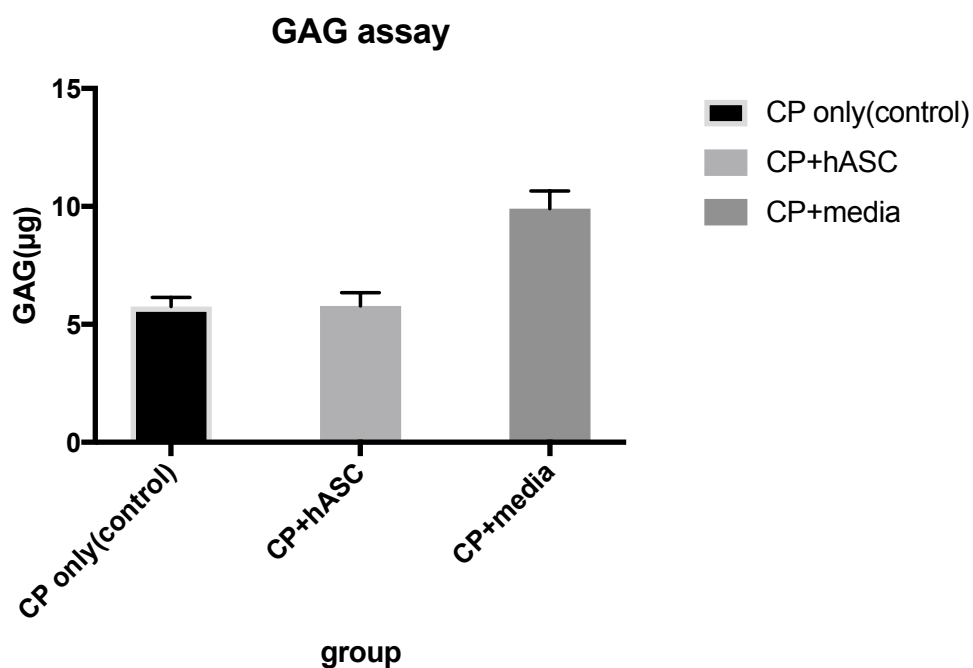
Group	CP only		CP+hASC		CP+media	
Sample	1	2	1	2	1	2
OD(600nm)	0.341	0.363	0.474	0.484	1.861	2.357
OD(600nm) average	0.352		0.479		2.109	

<Figure 5> The amount of glycosaminoglycans of mouse CP cells grown in three different conditions(CP only, CP+hASC, CP+media) for 7 days(2017.11.28-2017.12.4).

(A) Plotting the standard curve using glycosaminoglycan solution as a standard.



(B) Quantification of chondrogenesis was determined by measuring the absorbance of dye-binding glycosaminoglycans at 656 nm and calculating the relative quantity based on the standard curve.



GAG assay

Group	CP only		CP+hASC		CP+media	
Sample	1	2	1	2	1	2
GAG(µg)	6.034	5.490	5.383	6.180	9.375	10.440
GAG(µg) average	5.762		5.7815		9.9075	

IV. Discussion

10주동안 hASC를 배양하면서 hASC를 분리, 배양, 저장하는 기법을 익힐 수 있었다. 실험 결과 지방조직을 얻는 방법에 따른 cell line의 차이는 확인되지 않았으며, passage number가 높아질수록 hASC의 특징적인 형태가 소실되고 증식 속도가 늦어지는 점을 확인하였다. 그러나 본 연구에서는 형태 소실과 증식 지연이라는 두가지 특성을 정량화하지 않았으며, 이를 정확히 검증하기 위해서는 두가지 특성을 반영할 수 있는 지표를 설정하고 이에 따라 촬영해둔 사진을 분석해야 할 것이다.

다음으로 <Figure 2>에서 두가지 cell line(hASC isolation, hASC new) 모두 선행연구에서 제시된 것과 동일한 MSC surface marker 발현양상을 보였다. 다만 hASC isolation의 경우 antibody 주문의 문제로 두 차례에 나누어 수행하였기에 각각의 시점과 passage number가 다르다는 점을 지적할 수 있고, hASC new는 positive surface marker의 발현율이 전체적으로 높지 않게 나타났는데 이는 샘플을 준비하는 단계에서부터 세포의 형태와 viability가 좋지 않았기 때문으로 생각된다. 결론적으로

본 연구에서 분리 배양한 두가지 hASC cell line 모두 CD44, CD73, CD90, CD105에 대해서 positive, CD19, CD34, CD45, HLA-DR에 대해서 negative인 발현 양상을 보이며, 배양 상태에 따라 MSC surface marker의 발현율이 크게 차이나기 때문에 임상 적용에 앞서 flowcytometry를 통한 검증이 요구될 것이다.

<Figure 3>에서 두가지 cell line(hASC isolation, hASC new) 모두 negative control인 hFB에 비해 stemness gene인 c-Myc, Klf4, Nanog의 발현이 높게 나타났다. 다만 Oct4, Sox2의 경우 발현율이 오히려 낮게 측정되었고, 이는 hASC의 passage number가 각각 2, 6으로 배양이 어느정도 진행된 시점이기에 Oct4, Sox2의 발현이 감소했기 때문이거나, hFB가 Oct4, Sox2을 어느정도 발현하기 때문으로 생각된다. 후자의 경우 hFB가 negative control로 적합하지 않은 것이고 분화가 완료된 지방세포를 control로 삼는 것이 이상적이다. 더하여 β -actin을 비롯해 다수의 샘플에서 Ct 값이 25 이상으로 높게 나왔기 때문에, cDNA 양을 늘리거나 primer을 새로 디자인함으로써 Ct 값을 낮추면 보다 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있을 것이다.

<Figure 4>와 <Figure 5>의 실험을 통해 hASC의 paracrine effect가 CP cell의 연골세포 분화를 촉진하는 것을 확인하였으며, 그 효과는 hASC 공배양 보다 배양액 첨가에서 더 크게 나타났다. 이는 공배양 조건에서 insert의 membrane이 hASC가 분비하는 유효 성분을 충분히 투과하지 못했거나, 배양액 첨가시 media 자체의 양이 많아지기 때문으로 생각된다. 따라서 membrane의 pore size를 늘려보거나, media 양에 차이가 없도록 hASC가 분비한 물질을 분리 정제해서 첨가하는 방식으로 후속실험을 진행할 필요가 있다. 한편 Alcian blue staining이 GAG assay에 비해 전체적으로 그 값이 과장되는 경향을 확인할 수 있는데, 이는 단순히 시약에 의해 염색된 정도를 측정하는 Alcian blue staining의 특성상 unspecific binding의 가능성이 존재하기 때문에 것으로 생각된다.

성체줄기세포의 일종인 지방유래줄기세포는 지방조직에서 쉽게 분리가 가능하고, 실험실에서 배양할 수 있으며, 장기적으로 보관하는 것도 어렵지 않다. 그리고 지방은 인체에서 가장 풍부한 조직 중 하나이기 때문에 임상현장에서 어렵지 않게 구할 수 있고, 이미 지방조직은 물론 뼈, 연골, 근육, 신경조직 등으로 분화할 수 있음이 선행연구를 통해 확인되

었다. 이처럼 줄기세포 치료의 도입에 있어 지방유래줄기세포의 전망은 매우 밝은 편이다.

다만 지방유래줄기세포를 임상에 적용함에 있어 어떻게 하면 치료 효과를 높이고 부작용을 최소화할 수 있을지에 대한 고민이 필요하다. 본 연구는 flowcytometry, real-time PCR, Alcian blue staining, GAG assay 등 다양한 실험기법을 활용해 다음의 결론을 제안한다. 먼저 hASC의 줄기세포성을 반영하는 MSC surface marker, stemness gene expression에 상당한 variation이 존재하며, 이는 공여자 차이, 세포배양 환경, passage number 등 다양한 요소에 기원할 것이다. 따라서 줄기세포 치료 목적으로 hASC를 사용하기 앞서 flowcytometry, real-time PCR 등의 방법을 통해 줄기세포성이 높은 세포를 선별하여 사용한다면 보다 치료 효과를 높이는데 분명히 도움이 될 것이다.

더하여 기존에 효과적인 치료법이 없던 연골질환에 있어 줄기세포 치료의 전망이 밝다는 사실을 다시금 확인하였다. hASC의 paracrine effect가 CP cell의 연골세포 분화를 뚜렷이 촉진한다는 사실을 Alcian blue staining, GAG assay를 통해 확인하였으며, 특히 CP cell을 배양할

때 hASC media를 첨가해주는 경우 Alcian blue staining을 기준으로 5.991배, GAG assay를 기준으로 1.719배까지 연골세포 분화가 증가하였다. 이는 줄기세포 치료의 패러다임에 새로운 관점을 제안하는 결과이다. 직접 줄기세포를 주입하지 않더라도 그 배양액을 가함으로써 연골세포의 분화를 촉진할 수 있다면, 기존 줄기세포 치료제에 비해 생산하기 쉽고 안정성도 높은 줄기세포 배양액을 치료제로 개발할 수 있을 것이다. 나아가 줄기세포 배양액으로부터 유효 성분을 분리 정제해낸 다음 다양한 질병에 적용해보는 연구도 추후 시도해볼 수 있을 것이다. 줄기세포의 주변분비효과는 최근에 보고된 개념이며 현재도 활발히 연구가 활발히 진행되고 있는 분야이다. 본 연구를 비롯해 앞으로 줄기세포의 주변분비효과에 대한 다양한 연구가 진행된다면, 임상현장에서 보다 다양한 줄기세포 치료제가 개발되고 적용될 수 있을 것이다.

V. References

1. 김재화, 안창수. 관절 연골에 대한 기초 과학. 대한관절경학회지 2009;13(3):189-92.
2. 윤형문, 김석중, 김태균. 줄기 세포를 이용한 관절 연골 손상의 치료. Journal of Rheumatic Diseases 2012;19(3).
3. 조혜경. 인간 지방조직에서 분리된 줄기세포의 표면항원 및 다분화능 확인. 대한임상검사과학회지(Korean Journal of Clinical Laboratory Science) 2008;40(2):106-12.
4. 황슬기, 차현명, 임진혁, 이지희, 심혜은, 김동일. 연골세포와 중간엽 줄기세포의 3차원 Co-culture 를 통한 연골화 향상. KSBB Journal 2016;31(2):120-25.
5. Baraniak PR, Mcdevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. Regenerative Medicine 2010;5(1):121 - 43.
6. Bunnell B, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. Methods 2008;45(2):115 - 20.
7. Bhattacharyya S, Kotlo K, Shukla S, Danziger RS, Tobacman JK.

Distinct Effects of N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase and Galactose-6-sulfatase Expression on Chondroitin Sulfates. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283(15):9523 – 30.

8. Choi S, Cho T-J, Kwon S-K, Lee G, Cho J. Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor- β 3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. *International Journal of Oral Science* 2013;5(1):7 – 13.

9. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 2007;100(9):1249 – 60.

10. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology* 2001;189(1):54-63.

11. Kim E-H. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World Journal of Stem Cells* 2014;6(1):65.

12. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The Pharmacogenomics Journal* 2009;10(2):105 – 13.

13. Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(9):1852.