

중간엽줄기세포 장기배양에서 dexamethasone의 세포증식효과

송인환, 김성용¹

영남대학교 의과대학 해부학교실, ¹생화학·분자생물학교실

간추림 : 인체의 항상성은 세포의 재생, 분화 그리고 사멸의 균형 속에 유지된다. Dexamethasone은 중간엽줄기세포의 분화유도제로 오랫동안 사용되어 왔음에도 불구하고 이 세포의 증식과 세포자멸사에 대한 연구는 빈약한 실정이다.

중간엽줄기세포의 증식, 분화, 그리고 자멸사 사이의 균형에 미치는 dexamethasone의 영향을 알아보고자 세포를 dexamethasone을 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 3주간 배양하였다. 이 기간 동안 매주마다 세포수, DNA양, 분열세포수 자멸사세포수 그리고 alkaline phosphatase 검사를 하였다.

초기에는 dexamethasone을 처리한 군에서 DNA와 세포수가 낮았으나 3주째는 역전되었다. 세포분열은 두 군에서 차이를 보이지 않았음에도 불구하고 세포자멸사는 dexamethasone을 첨가한 군에서 유의하게 낮았다.

결론적으로 중간엽줄기세포의 장기적인 고밀도배양에 있어서 dexamethasone은 세포자멸사를 억제하여 세포증식에 영향을 미친다고 할 수 있다.

찾아보기 낱말 : 중간엽줄기세포, dexamethasone, 세포증식, 세포자멸사

서론

인체구조의 항상성은 세포재생과 분화 그리고 세포사멸의 균형 속에 유지되며 세포재생은 줄기세포에서 기원한다. 줄기세포는 인체 전반에 존재하는 것으로 알려져 있으며 골수, 제대혈, 지방조직, 태반 등에서 분리배양이 가능한 것으로 보고되고 있다 (Moore와 Sheridan 1979, Dennis 등 1999, Feldmann 등 2005, Miao 등 2006, Oedayrajsingh-Varma 등 2006). 골수기원 중간엽줄기세포는 골수의 구조적지지를 담당하는 간질세포의 일부로 시험관 내에서 뼈모세포, 연골세포, 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다 (Friedenstein 1976, Dennis 등 1992,

Bianco와 Gheron Robey 2000, Caplan 2005, Yin과 Li 2006).

중간엽줄기세포는 시험관 내에서의 빠른 증식능력과 더불어 시험관 내에서 뿐만 아니라 생체 내에 이식된 후에도 이식부위에 따라 여러 종류의 세포로 분화될 수 있는 능력을 가지고 있다. 손상된 부위에 투여하였을 때 손상조직의 세포로 분화되며 인체기능을 향진시키는 것이 보고되어 (Liechty 등 2000, Fuchs 등 2001, Chopp과 Li 2002, Shake 등 2002) 많은 관심을 받고 있다. 하지만 최근의 연구결과들은 이식된 세포가 손상된 세포로 분화되어 기능을 향진하기보다는 cytokine 분비 등으로 손상부위의 신생혈관 형성 촉진, 세포자멸사 억제 등이 그 기능 보전에 더 큰 기여를 한다는 보고들이 많다 (Tang 등 2004, Mazhari와 Hare 2007, Yang 등 2007). 이런 연구결과들은 손상된 인체부위의 재생치료에 중간엽줄기세포를 이용한 세포치료의 가능성을 높여주

*이 논문은 한국과학재단의 지원을 받아(R13-2005-005-01004-0, R01-2005-000-10803-0) 수행된 연구임.

교신저자 : 송인환 (영남대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편 : ihsong@med.yu.ac.kr

고 있다. 실제 중간엽줄기세포를 이용한 세포치료에
서의 관건은 시험관 내에서 줄기세포의 특성을 유
지한 세포증식과 더불어 필요에 따라 원하는 세포
로의 분화를 유도하는 것이다.

Dexamethasone은 중간엽줄기세포 분화유도에 중
요한 역할을 하고 있으며 시험관 내에서 뼈모세포,
연골세포, 지방세포로의 분화유도에 핵심적 역할을
한다(Leboy 등 1991, Beresford 등 1992, Herbertson
과 Aubin 1995). Dexamethasone은 강력한 면역억제
기능으로 염증성질환의 치료에 이용되고 있는 합성
glucocorticoid로서 일부 세포에서 세포종류에 따라
세포사망이나 생존에 영향을 미치며 세포사망은 세
포자멸사의 조절에 의한 것으로 보고되었다(Martin
과 Green 1995).

세포자멸사는 생리적 세포죽음으로 원하지 않는
세포의 제거과정이다(Soto 등 1997). 신장섬유화와
같은 일부 질병의 경우 과다한 세포자멸사의 항진
에 의해 초래되는 결과이고(Thomas 등 1998), 류마
치스관절염 등의 자가면역질환에서는 이와 반대로
세포자멸사의 저하로 발생한다(Firestein 등 1995,
Ando 등 2001). 이 같은 기전을 볼 때 새로운 세포
의 탄생과 죽음 사이에서 발생하는 불필요한 세포
또한 세포자멸사에 의해 제거될 수 있으리라 생각
된다. 그럼에도 불구하고 줄기세포의 세포자멸사에
대한 보고는 찾아보기 힘들다. 뿐만 아니라 중간엽
기세포의 분화와 관련된 dexamethasone의 효과에
관한 많은 연구가 오랜 기간에 걸쳐 이어져 왔음에
도 불구하고 시험관 내에서 줄기세포의 증식과 세
포자멸사와 연관된 dexamethasone의 영향에 관한
연구 또한 찾아보기 힘들다. 증식과 관련된 많은 연
구에서 dexamethasone이 고농도에서 줄기세포의 증
식을 억제한다고 보고하고 있으나(Walsh 등 2001)
이와 상반된 연구 보고도 있다(Jaiswal 등 1997).

본 연구자는 일련의 연구과정에서 골수기원 중간
엽줄기세포의 장기간 배양에서 세포자멸사 양상을
관찰하였고 dexamethasone이 세포증식을 항진하는
경향을 파악하였다. 이에 본 실험에서는 중간엽줄기
세포의 배양에서 세포증식과 세포자멸사에 미치는
dexamethasone의 효과를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 중간엽줄기세포배양

중간엽줄기세포는 미국 케이스웨스턴대학에 기증
된 17세에서 58세 사이 기증자의 골수를 IRB 기준
하에 배양하여 사용하였다. 채취한 골수에 뼈형성
실험을 통해 선택한(Lennon 등 1995) Fetal Bovine
Serum (FBS; Gibco-BRL, Rokville, MD, USA)이
10%로 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium
(DMEM; Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가하여 원
심분리하였다. 상층액을 제거하고 DMEM을 첨가하
여 적당한 농도의 단핵구세포를 포함한 세포부유액
을 만들어 밀도 1.08의 Percoll (Sigma) 혼탁액 위에
세포부유액 5 mL씩을 얹은 다음 450 g으로 15분간
원심분리하였다. 줄기세포가 있는 저밀도 상층을 모
아서 DMEM에 희석한 후 배양접시에 심었다. 실험
에는 세포를 증식시킨 2계대의 세포를 이용하였다.

2. Tunnel 염색

DAPI 염색에서 자멸사세포의 핵모양을 보이는 세
포의 확인을 위해 Tunnel 염색을 하였다. Tunnel 염
색은 세포를 R & D system (Minneapolis, MN, USA)
의 TdT-Fluorescein TACS In situ Kit를 이용하였다.
Coverglass 위에 키운 세포를 4% formaldehyde (Sig
ma)로 고정 후 cytonin으로 침투시킨 다음 DNA 절
단부위를 biotinylated TdT로 표지하였다. 여기에
fluorescein을 결합시킨 streptavidin을 붙였다. 세포
의 핵은 PBS에 DAPI (Sigma)를 100 nM 농도로 만
든 용액으로 대조염색하였다.

3. BrdU표지 및 면역염색

세포분열 정도에 미치는 dexamethasone의 영향을
알아보고자 세포를 배양하면서 BrdU를 표지시켜
분열하는 세포의 양을 비교하였다. 세포를 3×10^3 /
 cm^2 농도로 심고 DMEM으로 배양하는 군(Con)과
 10^{-7} M dexamethasone (Sigma)을 첨가하여 배양하는
군(Dex)으로 나누어 각각의 배양액으로 3주간 배양

하였다. 각 실험군은 3주 동안 매주 마다 세포분열 정도를 분석하였는데 표본을 채취하기 전 BrdU가 10 μM 농도로 첨가된 배양액으로 72시간 배양하였다. 채취한 세포는 Tyroid solution으로 세척 후 methanol로 5분간 고정하였다. 1 N HCl에 30분 처리 후 1% BSA에 30분 담근 후 1:100으로 희석한 anti-BrdU 항체 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)에 실온에서 30분간 처리하였다. 세척 후 FITC conjugated antimouse goat serum (Sigma)으로 30분 처리 후 100 nM DAPI (Sigma) 용액으로 5분간 핵을 대조 염색하였다.

각 표본마다 아홉개의 임의의 영역을 정하여 동일한 영역에서 200배 배율로 형광현미경의 필터를 blue filter (490 nm/525 nm)와 UV filter (365 nm/400 nm)로 바꾸면서 BrdU가 표지된 분열세포의 핵과 DAPI로 표지된 전체세포의 핵을 각각 촬영하였다. 이미지 분석 프로그램 (*iSolution*TM, *iMTechnology*)을 이용하여 BrdU와 DAPI로 염색된 핵의 수를 각각 세어서 분열기에 있는 세포수의 백분율을 구하였다.

4. DNA분석

세포 증식 정도를 알아보기 위하여 각 표본에서 DNA의 양을 측정하였다. 세포를 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 농도로 12 well plate에 각 실험군당 4 well씩 심고 Con과 Dex 군으로 나누어 각각의 배양액으로 3주간 배양하였다. 매주마다 표본을 채취하여 PBS로 세척 후 -70°C 에 보관 하였다.

모든 표본이 모이면 상온에서 표본을 녹인 후 500 μL 의 0.1 M NaOH를 각 well에 첨가한 후 다시 동량의 중성화용액 (5 M NaCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 0.1 N HCl)을 첨가하였다. 혼합액을 96 well plate에 각 well 당 100 μL 씩 4 well을 분주하고 여기에 다시 1 μM Hoechst dye (Sigma)를 동량 첨가하였다. Tecan 사 (Durham, NC, USA)의 Geniospro fluorescence measurement plate reader로 360 nm excitation, 460 nm emission에서 형광을 측정하였으며 동시에 측정된 Amersham Bioscience사 (Piscataway, NJ, US)의 calf thymus DNA standard로 작성한

표준그래프를 이용해 각 well 당 DNA 양을 계산하였다.

5. Alkaline phosphatase 측정

Dexamethasone처리에 따른 뼈모세포로의 분화 정도를 확인하기 위하여 alkaline phosphatase (APase) 분석을 하였다. 세포를 12 well plate에 심어 분석하였는데 각 표본당 4 well을 사용하였다. 매주마다 표본을 꺼내어 PBS로 2회 세척 후 pH를 10.5로 조절한 50 mM glycerin, 1 mM MgCl_2 용액에 p-nitrophenol phosphatase를 5 mM 농도로 녹인 용액 0.5 mL를 첨가하여 4~12분 반응시켰다. 동량의 0.1 M NaOH를 혼합하고 이 용액을 96 well plate에 분주하여 405 nm에서 plate reader (Tecan US, Durham, NC, USA)로 그 흡광도를 측정하였다. 같이 측정한 p-nitrophenol standard (Sigma)로 표준곡선을 만들어 절대량을 계산하였다. 분석이 끝난 세포는 PBS로 3회 세척한 후 -70°C 에 보관하였다가 DNA 양을 측정하였다. 분석이 모두 끝나면 APase 측정결과를 각각의 DNA 측정 수치로 나누어 세포당 APase로 계산하여 mM pNP/min/DNA로 표시하였다 (Fig. 3).

6. 전체세포 및 자멸사세포 수 분석

Coverglass 위에 세포를 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 로 심고 DMEM으로 배양하는 군과 10^{-7} M dexamethasone을 첨가하여 배양하는 군으로 나누어 각각의 배양액으로 3주간 배양하였다. 매주마다 표본을 채취하여 10% formaline에 30분 고정 후 100 nM DAPI 용액으로 5분간 염색하였다. 각 표본당 아홉개의 임의적 영역을 정하여 200배의 배율에서 세포자멸사 양상을 보이는 핵의 수를 세고 사진을 찍었다. 사진을 영상분석을 통해 전체 세포 수를 헤아렸고 이에 대한 자멸사세포의 백분율을 구하였다.

7. 자료분석

DNA 분석, 전체세포수 및 자멸사세포수 조사, APase 측정, 그리고 BrdU 표지세포 분석의 결과는 평균값 \pm 표준편차 혹은 평균값 \pm 표준오차로 표시하

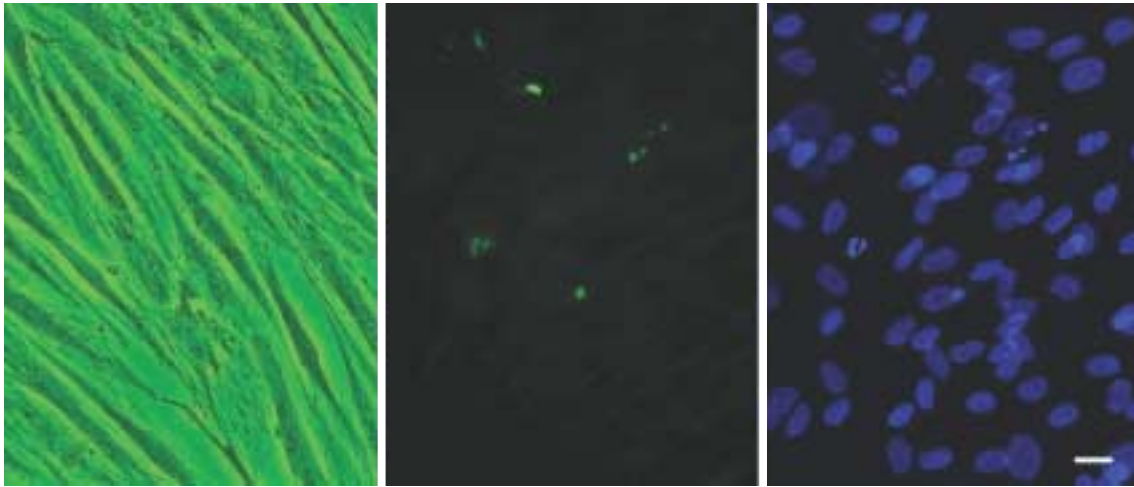


Fig. 1. Micrographs of primary cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. Phasecontrast view (left). Tunnel stain for apoptosis (middle) and DAPI counterstain for nuclei (right) on same field. Condensed and fragmented nuclei in DAPI stain showed positive reaction in Tunnel stain. Bar represent 25 μ m.

였고 통계적 검정은 SPSS 12.0을 이용하였다. 실험 군간의 비교는 Independent t-test와 General Linear Model을 이용하여 통계학적으로 검정하였다.

결 과

1. 세포배양 및 Tunnel 염색

계대배양된 중간엽줄기세포는 $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도로 심었을 경우 많은 세포질 돌기를 가지는 섬유모세포와 같은 형태를 보이며 증식하여 1주일 경에 배양접시를 덮으면서 인접한 세포에 밀려 길쭉한 방추형의 모양으로 변해갔다. Dexamethasone을 투여한 군에서는 세포모양이 둥근 다각형의 형태로 변하였다.

핵의 모양이 세포자멸사의 형태를 취하는 세포는 세포밀도가 높은 세포중첩지역에서 많이 관찰되었다. DAPI염색에서 다양한 형태의 핵농축과 핵분절양상을 보였는데 Tunnel 염색 후 DAPI 대조염색 결과와 비교한 결과 이러한 양상을 보이던 핵들은 모두 Tunnel 염색에 양성반응을 보였다(Fig. 1).

2. 세포증식

시간의 경과에 따라 세포증식에 미치는 dexamethasone의 영향을 알아보기 위하여 배양접시 내의 전체 DNA 양을 측정하는 방법과 핵을 염색하여 그 수를 세는 방법으로 증식 정도를 분석하였다. DNA양의 변화는 1주에 Con군과 Dex군에서 well 당 2.6 mg과 1.7 mg으로 Dex군이 Con군의 65%이었으나 2주에는 그 간격이 78%로 좁혀졌고 3주에는 3.1 mg과 4.1 mg으로 132% 증가하였다($p < 0.05$).

세포수의 변화는 세포수가 1주에 Con군과 Dex군에서 200배 시야 당 평균 171개와 156개로 Dex군이 Con군의 91%이었으며 2주에는 같은 수치를 보였으나 3주에는 241개와 276개로 114% 증가하였다. 하지만 두 군간의 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 2).

3. APase 분석

APase 활성도는 dexamethasone을 처리할 경우 대조군에 비해 높은 수치를 보이며 증가하였다. DNA 분석을 통한 세포증식 정도는 실험군 간에 다소의 차이는 있었지만 배양기간에 비례해 증가하였다. APase 활성도를 DNA 양으로 나눈, 세포당 활성도에

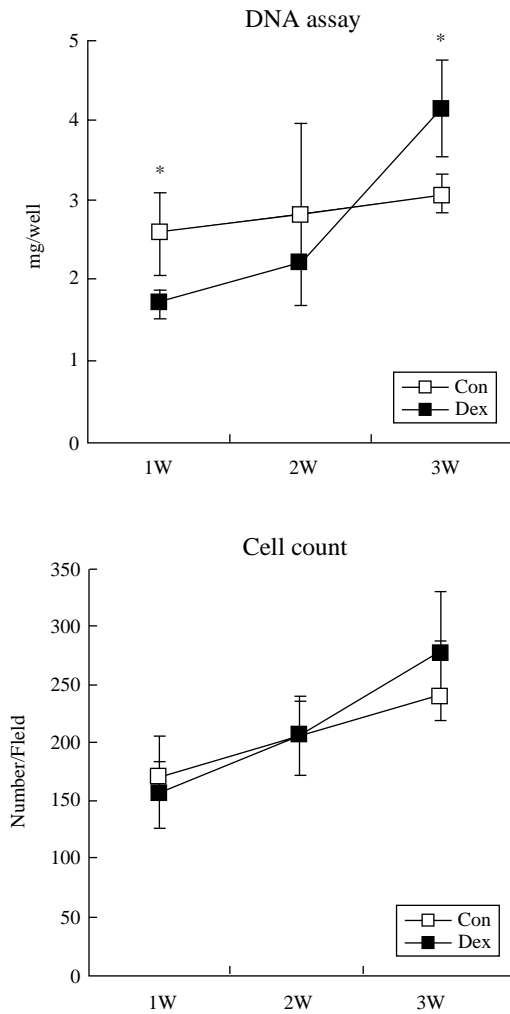


Fig. 2. Proliferation of MSCs cultured with (Dex) or without (Con) dexamethasone. Fluorometric measurement of DNA content with Hoechst dye in each well (upper) and number of nuclei per fields (lower). Bars represent mean \pm SD, $p < 0.05$ (*).

서 Dex군은 2주에 최고치를 보였고 3주째에 다소 감소하였으나 Con군에 비해 월등히 높은 수치를 보여 주었다 ($p=0.000$) (Fig. 3).

4. 세포분열

시간경과에 따른 세포분열 정도에 미치는 dexa-

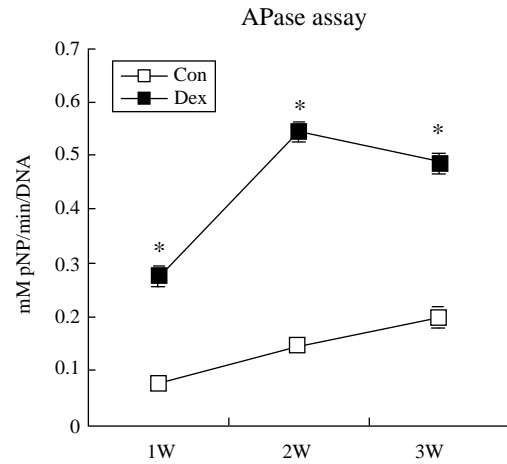


Fig. 3. APase assay of MSCs cultured with (Dex) or without (Con) dexamethasone. Values were expressed by activity per cells by dividing APase activity with corresponding DNA content of each well. Bars represent mean \pm SD, $p = 0.000$ (*).

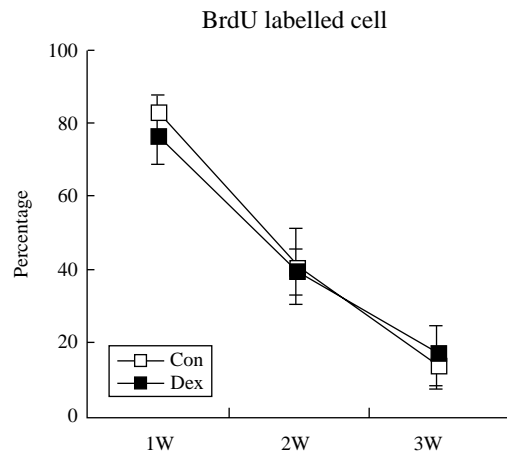


Fig. 4. Percentage of BrdU labeled MSCs after cultured with (Dex) or without (Con) dexamethasone and exposed to 10 μ M BrdU for 72 hr. Bars represent mean \pm SD.

methasone의 영향을 알아보려고 일정 시간 내에 BrdU를 표지한 핵의 비율을 분석하였다. 첫주에 Con군과 Dex군에서 83%와 76%의 핵이 BrdU에 표지되어 Dex군이 Con군의 91%이었으나 2주에는 그

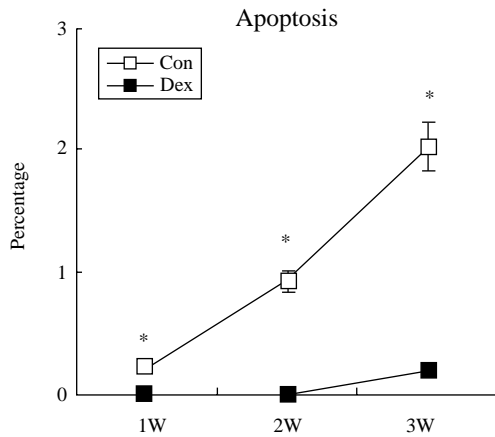


Fig. 5. Percentage of MSCs apoptosis cultured with (Dex) or without (Con) dexamethasone. Bars represent mean \pm SE, $p < 0.05$ (*).

간격이 95%로 좁혀졌고 3주에는 13%와 16%로 역전되어 123% 증가하였다. 하지만 두 군간에는 각 시간 및 전체 분열정도에 대한 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 4).

5. 세포자멸사

시간경과에 따른 세포자멸사에 미치는 dexamethasone의 영향을 알아보기로 자멸사세포수의 변화를 조사하였다. Con군에서는 1주에 0.2%의 세포자멸사 양상을 보였고 2주와 3주에 0.9%와 2.0%로 증가하였으나 Dex군에서 1주와 2주에는 자멸사세포가 보이지 않다가 3주에 이르러 0.2%의 세포자멸사세포의 양상을 보였다. 두 군간의 차이는 모든 주에서 유의성이 인정되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 5).

고찰

생명체의 항상성은 세포손실과 줄기세포의 재생사이의 균형으로 유지되며 골수는 줄기세포의 주된 저장고 중의 하나이다. 중간엽줄기세포 증식조절기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않지만 세포자멸사가 그 조절에 관여하리라 생각된다. 면역반응을 조

절하는 기능으로 항염증제로 널리 쓰이고 있는 dexamethasone은 일부 세포에서 세포특이적으로 세포자멸사를 조절하여 세포의 생존과 사망에 관여하는 것으로 밝혀졌다. Dexamethasone을 투여하면 흉선 세포 (Ivanov와 Nikolic-Zugic 1998, Cifone 등 1999), 림프구 (Migliorati 등 1994, Brunetti 등 1995, Planey와 Litwack 2000), 일부 암세포 (Kofler 2000, Flynn 등 2006)에서는 세포자멸사가 항진되지만 배양된 간세포 (Oh 등 2006), 호중성백혈구 (Kato 등 1995, Li 등 2004), 그리고 일부 암 (Ni Chonghaile 등 2006, Petrella 등 2006)에서는 세포자멸사가 억제된다.

Dexamethasone은 중간엽줄기세포 분화에 중요한 역할을 하며 10^{-8} M 이상의 농도에서 뼈모세포로의 분화를 유도한다 (Leboy 등 1991, Herbertson과 Aubin 1995). Dexamethasone의 중간엽줄기세포의 증식에 미치는 영향은 농도와 세포성숙도에 영향을 받는다. 배양초기의 중간엽줄기세포에서는 증식을 촉진하나 시간이 경과하면서 억제하는 경향이 높고 또 고농도에서 억제효과가 높다 (Peter 등 1998, Walsh 등 2001, Atmani 등 2002). 세포증식을 알아본 본 실험 결과에서 1주와 2주에는 Con군에 비해 Dex군의 세포수가 적다. 그러나 그 차이가 좁아지며 3주에 이르러서는 역전되어 Dex군의 세포수가 Con군을 능가하고 있다. 세포를 세어서 분석한 결과에서 그 유의성이 인정되지는 않았지만 증가하는 경향을 보였다. DNA 양을 측정된 실험에서는 1주에 Con군의 세포수가 유의하게 많았지만 3주에는 Dex군이 유의하게 많았다. 뿐만 아니라 분화의 측도로 측정된 APase 결과에서는 Dex군의 수치가 월등히 높았다. 이 결과는 고농도 dexamethasone을 첨가한 DMEM 배양액으로 수주에 이르는 장기배양을 할 경우 일반적으로 알려진 dexamethasone의 분화에 의한 증식억제 효과에도 불구하고 그 세포수는 증가하였다. 그렇다면 이런 불균형에 대한 원인은 무엇일까?

세포수는 세포분열과 세포사망에 의해 결정된다. 세포분열정도는 두 군이 비슷한 경과와 수치를 보였으며 각 시점별 그리고 전체적으로도 유의성이 인정되지 않았다. 그렇다면 세포수를 결정하는 다른 축인 세포사망에 의해 그 수가 결정되리라 예상된다. Con군에서는 낮은 수치이기는 하지만 1주째부

터 자멸사세포가 발견되기 시작하여 큰 폭으로 증가하였다. 본 실험실에서의 표준 배양방법에 의하면 제대배양 후 세포수가 증가하여 일주일 경에 배양 접시를 모두 덮으며 세포 증척이 일어나기 시작한다. 이전의 연구에서 밝혔듯이(Song 등 2007) 이 시기가 이웃세포와의 접촉에 의해 세포사멸이 시작되는 시점이다. 반면 Dex군에서는 2주째까지 자멸사세포가 관찰되지 않다가 3주째에 소수가 관찰되기 시작하였다. 이 차이는 이전의 연구(Song 등 2007)에서 밝혔듯이 dexamethasone에 의한 세포자멸사 억제효과에 의한 것이며 두 실험군 간에는 모든 시점에서 유의성있는 차이를 보이고 있다.

결론적으로 중간엽줄기세포의 배양에 있어서 dexamethasone이 세포증식에 미치는 영향은 분화 혹은 세포분열 등에 의한 영향 이외에도 세포증척이 유도된 이후의 장기배양에서는 세포자멸사에 의한 영향이 중요한 요인으로 작용한다고 볼 수 있다. 이 결과는 농도도 dexamethasone이 포함된 배양액으로 배양된 중간엽줄기세포가 더 빠른 증식을 유도했다는 다른 연구자의 결과(Jaiswal 등 1997)를 설명할 수 있게 되었으며 분화유도 없이 수주에 달하는 장기배양 실험에서는 본 실험결과를 염두에 두어야 할 것이다.

참고 문헌

- Ando T, Usa T, Ide A, Abe Y, Sera N, Tominaga T, Ejima E, Ashizawa K, Nakata K, Eguchi K : Pulmonary nocardiosis associated with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Intern Med* 40: 246-249, 2001.
- Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF : Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 85: 640-650, 2002.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME : Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102(Pt 2): 341-351, 1992.
- Bianco P, Gehron Robey P : Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105: 1663-1668, 2000.
- Brunetti M, Martelli N, Colasante A, Piantelli M, Musiani P, Aiello FB : Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood* 86: 4199-4205, 1995.
- Caplan AI : Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11: 1198-1211, 2005.
- Chopp M, Li Y : Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 1: 92-100, 2002.
- Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, Riccardi C : Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* 93: 2282-2296, 1999.
- Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI : Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1: 23-32, 1992.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI : A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 14: 700-709, 1999.
- Feldmann RE Jr, Bieback K, Maurer MH, Kalenka A, Burgers HF, Gross B, Hunzinger C, Kluter H, Kuschinsky W, Eichler H : Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis* 26: 2749-2758, 2005.
- Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ : Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 96: 1631-1638, 1995.
- Flynn G, Chung I, Yu WD, Romano M, Modzelewski RA, Johnson CS, Trump DL : Calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) selectively inhibits proliferation of freshly isolated tumor-derived endothelial cells and induces apoptosis. *Oncology* 70: 447-457, 2006.
- Friedenstein AJ : Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47: 327-359, 1976.
- Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R : Transcatheterial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll*

- Cardiol 37: 1726-1732, 2001.
- Herbertson A, Aubin JE : Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. J Bone Miner Res 10: 285-294, 1995.
- Ivanov VN, Nikolic-Zugic J : Biochemical and kinetic characterization of the glucocorticoid-induced apoptosis of immature CD4+CD8+ thymocytes. Int Immunol 10: 1807-1817, 1998.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP : Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cell Biochem 64: 295-312, 1997.
- Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F : Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis *in vitro*. Nat Immun 14: 198-208, 1995.
- Kofler R : The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. Histochem Cell Biol 114: 1-7, 2000.
- Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME : Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Physiol 146: 370-378, 1991.
- Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI : A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 219: 211-222, 1995.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW : Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. Nat Med 6: 1282-1286, 2000.
- Li HP, Li X, He GJ, Yi XH, Kaplan AP : The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Respirology 9: 25-32, 2004.
- Martin SJ, Green DR : Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. Crit Rev Oncol Hematol 18: 137-153, 1995.
- Mazhari R, Hare JM : Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 4 Suppl 1: S21-26, 2007.
- Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X : Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biol Int 30: 681-687, 2006.
- Migliorati G, Nicoletti I, D'Adamio F, Spreca A, Pagliacci C, Riccardi C : Dexamethasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. Immunology 81: 21-26, 1994.
- Moore MA, Sheridan AP : Pluripotential stem cell replication in continuous human, prosimian, and murine bone marrow culture. Blood Cells 5: 297-311, 1979.
- Ni Chonghaile T, Concannon CG, Szegezdi E, Gorman AM, Samali A : Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. Apoptosis 11: 1247-1255, 2006.
- Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ : Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. Cytotherapy 8: 166-177, 2006.
- Oh HY, Namkoong S, Lee SJ, Por E, Kim CK, Billiar TR, Han JA, Ha KS, Chung HT, Kwon YG, Lee H, Kim YM : Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. Cell Death Differ 13: 512-523, 2006.
- Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG : Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. J Cell Biochem 71: 55-62, 1998.
- Petrella A, Ercolino SF, Festa M, Gentilella A, Tosco A, Conzen SD, Parente L : Dexamethasone inhibits TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells via Bcl-xL induction. Eur J Cancer 42: 3287-3293, 2006.
- Planey SL, Litwack G : Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun 279: 307-312, 2000.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ : Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. Ann Thorac Surg 73: 1919-1925; discussion 1926, 2002.
- Song IH, Caplan AI, Dennis JE : Confluence induces apoptosis in human mesenchymal stem cells *in vitro* and is inhibited by dexamethasone. Case Orthopedic Journal, 2007, in press.
- Soto H, Mosquera J, Rodriguez-Iturbe B, Henriquez La Ro-

- che C, Pinto A : Apoptosis in proliferative glomerulonephritis: decreased apoptosis expression in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 12: 273-280, 1997.
- Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI : Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept* 117: 3-10, 2004.
- Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM : Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 13: 2216-2226, 1998.
- Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN : High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro*: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 40: 74-83, 2001.
- Yang J, Zhou W, Zheng W, Ma Y, Lin L, Tang T, Liu J, Yu J, Zhou X, Hu J : Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology* 107: 17-29, 2007.
- Yin T, Li L : The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116: 1195-1201, 2006.

Abstract

Effects of Dexamethasone on Proliferation of Mesenchymal Stem Cells in Long Term Culture

In-Hwan Song, Seong-Yong Kim¹

*Department of Anatomy, ¹Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine,
Yeungnam University*

Homeostasis of the body is maintained by balance of cell renewal, differentiation, and death. Dexamethasone has been used long time in field of MSCs research as differentiation inducer while, in contrast, there has been little work on the effect of dexamethasone on apoptosis and proliferation of MSCs.

To determine the effect of dexamethasone on apoptosis and proliferation, MSCs were cultivated with (Dex) or without (Con) dexamethasone for 3 weeks. During this period weekly cell count, DNA assay, mitosis, apoptosis as well as alkaline phosphatase assay observation were recorded.

DNA and cell number of Dex group was lower than Con group in early period but exceed at 3th week. There is no significant difference in mitosis between both groups whereas apoptosis frequency in Dex group was lower than that of in Con group.

These results indicate that dexamethasone influences cell proliferation of MSCs in long term confluent culture by suppression of apoptosis.

Key words : Mesenchymal stem cells, Dexamethasone, Proliferation, Apoptosis