

검사방법에 따른 냉동보관 제대혈 내 CD34+세포의 생존력의 차이

¹아주대학교 의과대학 중앙혈액내과학교실, ²라이프코드 부설 생의학 연구실

안미선^{1, #} · 엄영우^{2, #} · 박준성¹ · 최진혁¹ · 강석윤¹ · 이현우¹ · 양말숙²
김효은² · 장인근² · 이종은² · 김영진² · 김효철¹ · 정성현¹

Difference in Viability of CD34+ Cells in Cryopreserved Cord Blood According to Evaluation Methods

Mi Sun Ahn, M.D.^{1, #}, Young-woo Eom, Ph.D.^{2, #}, Joon Seong Park, M.D.¹, Jin-Hyuk Choi, M.D., Ph.D.¹,
Seok Yun Kang, M.D.¹, Hyun Woo Lee, M.D.¹, Mal Sook Yang, M.S.², Hyo Eun Kim, M.S.²,
In Keun Jang, M.S.², Jong Eun Lee, M.S.², Young Jin Kim, M.D.²,
Hugh Chul Kim, M.D.¹ and Seong Hyun Jeong, M.D.¹

¹Department of Hematology-Oncology, Ajou University School of Medicine, ²Biomedical Research Institute, LifeCord Inc., Suwon, Korea

Background: On performing umbilical cord blood (UCB) transplantation, faster engraftment may lead better clinical outcome. Because transplanted viable cell count in UCB is related to the engraftment, accurate evaluation of viability of CD34+ cells in cryopreserved UCB has clinical implication. We examined the difference in viability of cells in cryopreserved UCB according to the duration of cryopreservation and different methods.

Methods: A total of 60 UCB samples which were cryopreserved for 1 to 4 years were used in this study. Viability of cryopreserved cells were examined with trypan blue exclusion assay, DNA contents analysis, caspase-3 activation test, intracellular esterase activity and Annexin-V/PI staining.

Results: After thawing the cryopreserved UCB, 89% of the total MNCs and 84% of CD34+ cells were viable as identified by trypan blue exclusion assay. In the CD34+ cell population, the cell death rate was found to be 47% by Annexin-V/PI staining and less than 5% by DNA contents analysis. However, caspase-3 activity failed to document apoptosis. The intracellular esterase activity test also showed a cell death rate of about 10~20% at 2, 4, and 6 hours after thawing.

Conclusion: Viable cells in UCB should be measured by several compensatory techniques rather than a single method. Discordance among Annexin-V/PI staining versus trypan blue exclusion, DNA contents analysis, and the caspase-3 activation test or intracellular esterase activity should be clarified in order to apply these techniques for actual cord blood transplantation. (*Korean J Hematol 2009;44:92-99.*)

Key Words: Umbilical cord blood, Apoptosis, Viability

접수 : 2008년 12월 23일, 수정 : 2009년 5월 26일

승인 : 2009년 5월 29일

교신저자 : 정성현, 경기도 수원시 영동구 원천동 산 5번지

☎ 443-721, 아주대학교 의과대학 부속병원 중앙
혈액내과학교실

Tel: 031-219-5989, Fax: 031-219-5983

E-mail: medjeong@lycos.co.kr

#공동 제1저자임.

Correspondence to : Seong Hyun Jeong, M.D.

Department of Hematology-Oncology, Ajou University Hospital,
Ajou University School of Medicine

San 5, Wonchon-dong, Youngtong-gu, Suwon 443-721, Korea

Tel: +82-31-219-5989, Fax: +82-31-219-5983

E-mail: medjeong@lycos.co.kr

서 론

제대혈(Umbilical Cord blood, UCB) 이식은 조직적 합성합원이 일치하는 형제나 기증자가 없을 경우 동종 이식을 하는 대안으로서 조혈모세포(Hematopoietic stem cell, HSC)의 공여원으로 인정되고 있다.^{1,2)} 제대혈 이식이 골수이식보다 급, 만성 이식편대숙주질환(Graft versus Host Disease, GvHD)의 발생빈도가 낮기 때문에 조직적합성항원(human leukocyte antigen, HLA) 부적합 이식에 적용될 수 있다. 이식 가능한 조혈모세포의 공여원으로 제대혈을 사용하자는 이론은 1983년에 처음 소개되었고,³⁾ 1984년에 동물실험이 행해졌으며⁴⁾ 1988년에 Fanconi 빈혈 환자를 치료하는 임상실험에서 성공을 거두었다.⁵⁾ 첫 제대혈 이식이 성공을 거둔 이후 지금까지 전 세계적으로 8,000건 이상의 제대혈 이식이 시행되었다.⁶⁾

HLA가 일치하거나 2개의 항원 불일치까지 허용했을 때 공여자에게서 추출하여 냉동보관된 제대혈은 조혈모세포이식시 생착 가능성이 높고 불응성 급성 중증 이식편대숙주질환이 발생할 위험성은 낮는데, 이는 소아뿐 아니라 성인 환자에게도 적용된다.^{7,8)} 제대혈 이식에서 이식되는 세포의 양은 조직의 생착 그리고 이식 관련 사망률 및 생존율에 영향을 미치는 가장 중요한 요소 중의 하나이다.⁹⁾ 그러나 해동된 제대혈의 세포생존능은 적용된 방식에 따라 매우 광범위하다고 알려져 있다.^{10,11)}

본 연구에서는 실제적인 조혈모세포이식 시의 정확한 세포생존능을 확인하기 위해, trypan blue 배제 분석, DNA 함량 분석, caspase 활성화 실험, 세포 내 esterase 활성화 실험 및 세포사멸에 가장 보편적으로 사용하는 annexin-V/PI (propidium ididie) staining 등의 다양한 세포생물학 방법을 이용하였고, 조사 방법에 따른 세포생존능에 차이가 있는지를 평가하였으며, 또한, 냉동보관 기간에 따라 세포생존능이 감소하는지를 분석하였다.

대상 및 방법

1. 제대혈 수집과 CD34 양성 세포의 분리

본 연구는 기관연구윤리심의위원회의 심의를 거쳤으며, 60명의 만기 분만 산모에게 고지 후 동의서를 받아 60예의 제대혈을 확보하였다. 밀도 차(<1.077) 원심 분리하여 단핵 세포를 모으고 10%의 dimethylsulf-

oxide (DMSO)를 첨가 후 액화 질소에 냉동 보관하여 사용 시점까지 철저히 관리하였다. CD34 양성세포는 CD34 전구세포 분리 시스템(progenitor selection system)인 Dynal Biotech (Oslo, Norway)을 사용하여 해동된 제대혈 단핵세포로부터 분리하였다. 60예의 제대혈 검체 중 32예는 냉동보관 기간이 1년 미만이었고 28예의 검체는 1년부터 4년 사이의 냉동보관기간을 가지고 있었다.

2. 세포생존능 분석

60예의 제대혈 검체의 단핵세포에 대해 trypan blue 염색으로 생존능 분석을 시행하였고, 10개의 무작위 추출 표본에서 CD34 양성세포의 생존능을 보기 위하여 DNA 염색, Annexin-V/PI 염색법, DNA 함량 분석, caspase 활성화 실험, 세포 내 esterase 활성화 실험을 시행하였다.

1) Trypan blue 염색

서로 다른 기간 동안 냉동보관 되었던 제대혈로부터 해동된 단핵세포는 trypan blue 용액과 1:1로 희석 후 trypan blue로 염색되지 않은 세포들을 살아있는 세포로 계수하였다.

2) DNA 염색

DNA 염색은 분리된 CD34 양성세포를 15분 동안 항 CD34-FITC 항체(BD Sciences, San Jose, CA, USA)와 Hoechst 33,258 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 염색하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

3) Annexin-V/PI 염색

Annexin-V/PI 염색은, CD34 양성세포의 세포막 외층에 표출되어 있는 phosphatidyl serine (PS)과 DNA는 각각 annexin-V-fluorescein과 HEPES 완충액(10 mmol/L HEPES/NaOH, PH7.4, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂)의 PI (1 μg/mL) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 표지하여 15분 동안 암실에 두었으며, 염색된 세포는 최상의 결과를 얻기 위해서 한 시간 이내에 유세포분석기(회사)로 측정하였다.

4) DNA 함량 분석

DNA 함량 분석은 세포막을 투과 가능하게 만든 후 CycleTEST PLUS DNA reagents (Becton Dickinson Inc., San Jose, CA, USA)를 사용하여 125 μg/mL PI로 표지 후 FACS Vantage 유세포 분석기(Becton Dickinson Inc., San Jose, CA, USA)로 분석하였다. 세포주기 분포는 CellFit software (Becton Dickinson Inc., San Jose, CA., USA)로 결정하였다.

5) Caspase 활성 분석

Caspase 활성 실험은 면역블로팅 표준 방식으로 시행 되었다. Polyvinylidene difluoride (PVDF)막을 각각 500 : 1로 희석한 caspase-3 또는 cleaved-caspase-3 항체(Stressgen Biotechnologies Co., Victoria, BC, CANADA)와 함께 차단 완충액에서 배양하였다. 결합된 1차 항체들이 horseradish peroxidase (HPR) 결합 이차 항체와 함께 검출 되었으며 화학 발광제(Amersham Biosciences, Arlington heights, IL, USA)로 발광 시켰다.

6) Esterase 활성 분석

세포 내 esterase 활성 실험으로는 1 μM calcein-AM 과 2 μM EthD-1의 Molecular Probes (Inc. Eugene, OR, USA)으로 분리된 CD34 양성세포를 표지한 후 형광

현미경(Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. Calcein 양성세포는 생존한 것으로 EthD-1 양성 세포는 사멸한 것으로 간주하였다. 초기 세포사를 확인하기 위하여 분리된 CD34 양성세포를 RPMI1640배지로 0, 2, 4, 6시간 동안 배양하였고, 각 배양 시간 후 세포를 회수하여 esterase의 활성을 조사하였다.

3. 통계

냉동보관 기간 및 검사방법에 따른 단핵세포의 생존을 차이를 비교하기 위하여 independent sample t-test 를 시행하였고 프로그램은 SPSS 12.0을 사용하였다.

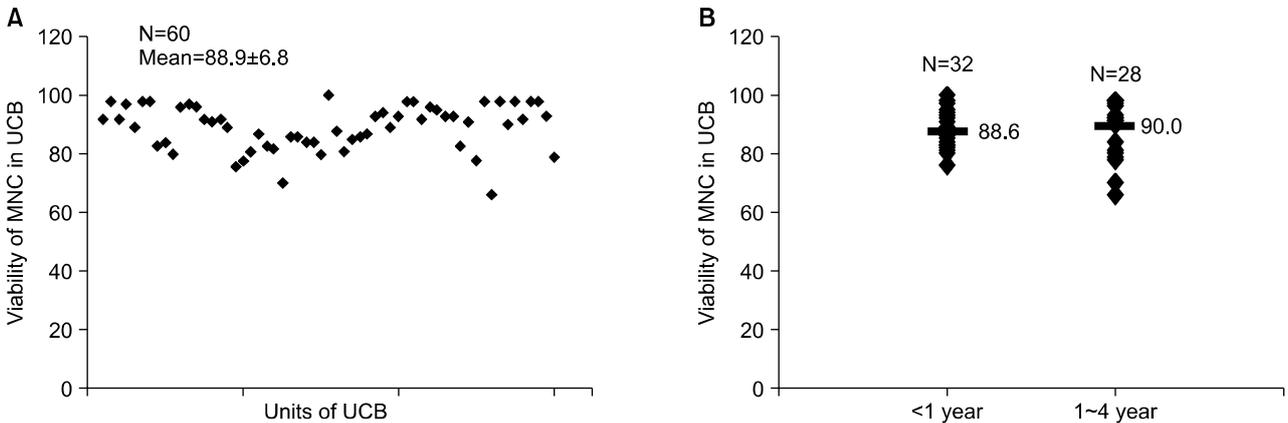


Fig. 1. Mononuclear cell (MNC) viabilities of cryopreserved umbilical cord blood (UCB) samples after thawing. The mean and standard deviation value of viable cell percents from 60 umbilical cord blood (UCB) samples was 88.9±6.8 by trypan blue staining (A). The result was not affected by the duration of cryopreservation (B).

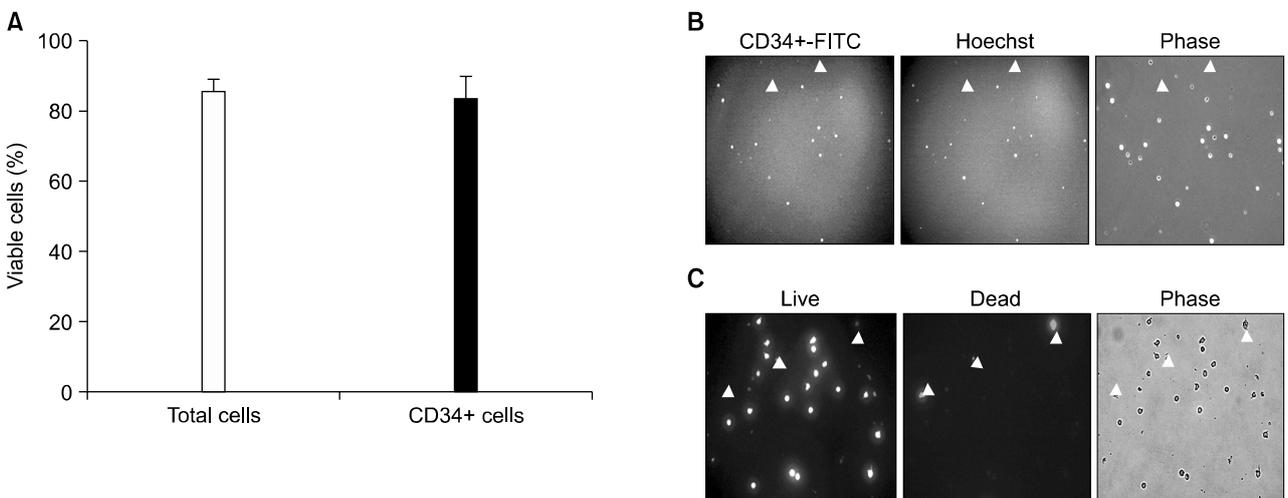


Fig. 2. Successfully isolated CD34+ cells (purity of 83%) showed 83.9% of viability similar to MNC viability (A, B). Live cells and dead cells were detected by esterase activity and EthD-1, respectively (C).

결 과

60예의 제대혈을 대상으로 trypan blue 배제분석으로 단핵세포의 생존율을 확인한 결과 검체에서 나온 생존 단핵세포 비율의 평균 표준 편차 값은 $88.9 \pm 6.82\%$ 이었으며 이것은 trypan blue 배제 분석으로 확인하였다 (Fig. 1A). 냉동보관 기간(1년 미만과 1~4년 비교)에 따른 세포생존능에는 별다른 차이가 없었다(Fig. 1B). CD34 전구세포 selection system (Miltenyi Biotec, Germany)을 사용하여 해동된 제대혈로부터 $82.8 \pm 4.60\%$ 의 순도로 CD34 양성세포를 분리하였고, trypan blue 배제 분석법으로 확인 한 CD34 양성세포의 생존능은

83.9% 이었다(Fig. 2A). 또한, DNA 염색법(Hoechst 33258)과 esterase 활성 분석법(Live/Dead assay)에 의한 CD34 양성세포의 생존능은 Fig. 2A의 trypan blue 배제 분석법에서의 결과와 차이가 없었다(Fig. 2).

CD34 양성세포의 생존능을 정량화하기 위하여 무작위로 뽑은 10예의 제대혈 검체에서 Annexin-V/PI 염색과 DNA 함량 분석 실험을 수행하였다. Annexin-V/PI 염색 실험에서는 초기 세포사멸(early apoptosis)은 $33.1 \pm 9.9\%$ [Annexin-V/PI (+/-)]이었고, 후기 세포사멸은 $16.5 \pm 9.3\%$ [Annexin-V/PI (+/+)]이었다(Fig. 3A). 그러나 DNA 함량 분석에서는 대부분의 세포가 정상적으로 2N의 DNA 함량을 갖고 있었고, 5% 미만에서만 2N 미만의 DNA 함량을 갖고 있었다(Fig. 3B, C). 많은

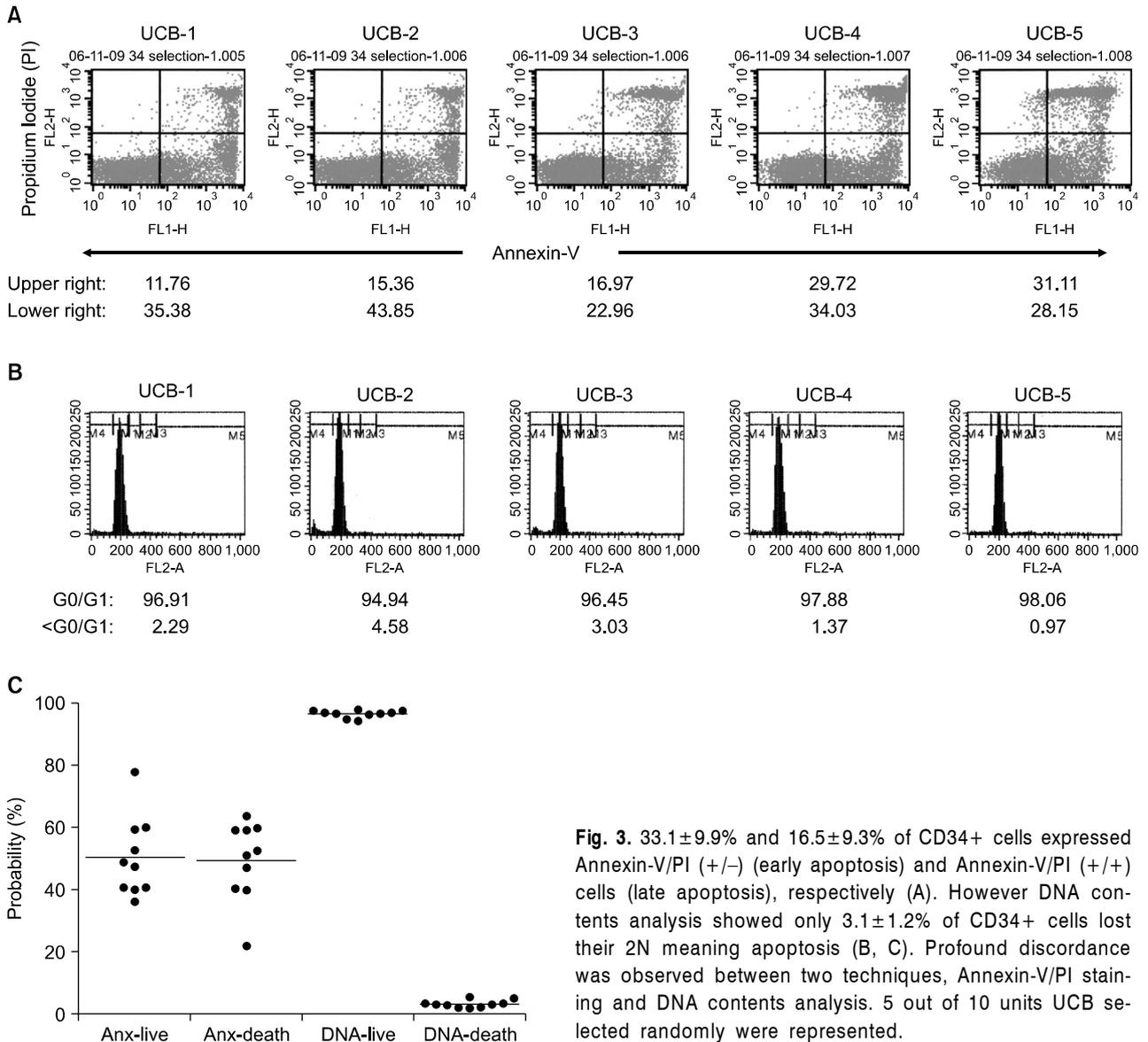


Fig. 3. $33.1 \pm 9.9\%$ and $16.5 \pm 9.3\%$ of CD34+ cells expressed Annexin-V/PI (+/-) (early apoptosis) and Annexin-V/PI (+/+) cells (late apoptosis), respectively (A). However DNA contents analysis showed only $3.1 \pm 1.2\%$ of CD34+ cells lost their 2N meaning apoptosis (B, C). Profound discordance was observed between two techniques, Annexin-V/PI staining and DNA contents analysis. 5 out of 10 units UCB selected randomly were represented.

CD34 양성세포들이 죽은 것으로 확인된 Annexin-V/PI 염색 실험 결과는 Fig. 1과 2 및 DNA 함량 분석 결과와 매우 상이하였기 때문에, 실제로 냉동보관되었던 제대혈로부터 해동 후 분리된 CD34 양성세포의 상당 수가 세포사멸이 진행되고 있는 것이 아닌지를 조사하기 위하여, 세포사멸이 유도되었을 때 나타나는 활성을 지닌 caspase-3 (cleaved-caspase-3)의 양이 증가하는지를 면역블로팅으로 확인하였다. 무작위로 선택한 10예의 검체 중에서 오직 하나에서만(UCB #3), 50%의 세포사멸이 유도된 종양 세포들(apoptosis-induced tumor cell line)과 비교하여 비교적 열은 띠(cleaved-caspase-3)가 나타났고 Annexin-V/PI 염색법에서 후기 세포사멸이 30% 정도 관찰되었던 UCB #4와 UCB #5에서조차도 caspase-3의 활성은 관찰되지 않았다(Fig. 4). 또한 Annexin-V/PI 염색 결과(Fig. 3A)에서만 세포사멸이 많이 일어난 것으로 관찰되었기 때문에, Annexin-V/PI 염색을 시키는 과정 동안 세포사멸이 진행되는지를 확인하기 위하여 분리된 CD34 양성세포를 4등분하여 Annexin-V, PI, Annexin-V/PI로 각각 염색 후에 caspase-3가 활성화 되었는지를 조사하였으나 Annexin-V/PI 염색과정에 의해서는 전혀 caspase-3의 활성이 진행되지는 않았다(Fig. 4C).

한편, Annexin-V/PI 염색 결과(Fig. 3A)에서처럼 냉동보관되었던 제대혈로부터 분리된 CD34 양성세포의

초기 세포사멸이 실제로 $33.1 \pm 9.9\%$ 정도 진행되었는지를 확인하기 위하여, CD34 양성세포를 RPMI1640 배지로 6시간 동안 배양을 한 후 esterase의 활성이 증가하는지를 조사하였으나, 해동 후 각 0, 2, 4, 6시간 경과 시의 세포 내 esterase 활성을 가지고 있는 CD34 양성세포의 비율은 83% 이상의 높은 수준으로 계속 유지 되었다(Fig. 5).

고 찰

세포사멸이 진행되면 세포의 모양, DNA의 구조 및 함량, 생리활성, 막투과성 및 세포막 인지질의 변화가 발생하게 되며 다양한 생화학 내지 세포생물학적 방법을 통해 세포사멸 여부를 판단할 수 있다.^{12,13} 세포의 모양 변화는 광학현미경이나 전자현미경으로 관찰할 수 있고, DNA의 구조 및 함량변화는 DNA 염색시약(Hoechst, propidium iodide, Syto 16 등)에 의한 염색 여부, DNA의 전기연동, TUNEL(Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase-Mdiated dUTP Nick End Labeling) 분석, DNA 함량 분석을 통해 세포사멸 여부를 평가하게 된다. 세포의 생리활성의 변화는 caspase, nuclease, esterase 등의 효소 활성도를 측정하거나 면역블로팅 방법을 이용하여 세포사멸 신호전달이 가동되고 있는지를 평가하여 세포사멸 여부를 판단할 수 있다.

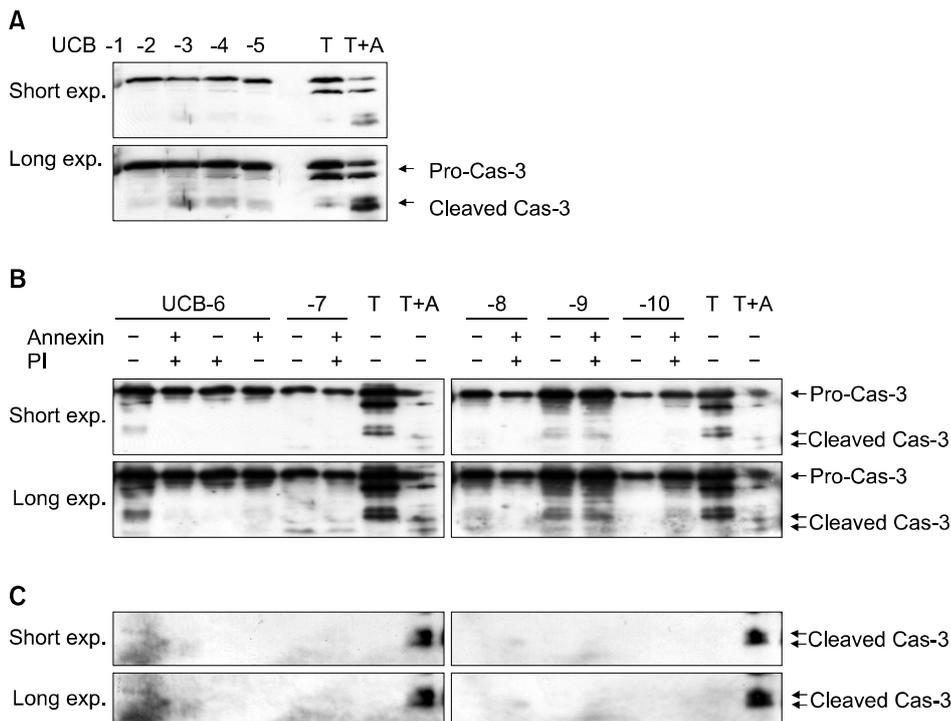


Fig. 4. Caspase-3 activity test for CD34+ cells from randomly selected 10 samples. UCB #3 sample showed faint caspase-3 activity compared with apoptosis-induced tumor cell line (A). CD34+ UCB cells did not express active or cleaved form of caspase-3 regardless of Annexin-V or Propidium Iodide (PI) positivity (B). Actual activity of caspase-3 should be examined by cleaved fraction which was not detected at any sample (C). T, tumor cell line (neuroblastoma); T+A, apoptosis-induced tumor cell line.

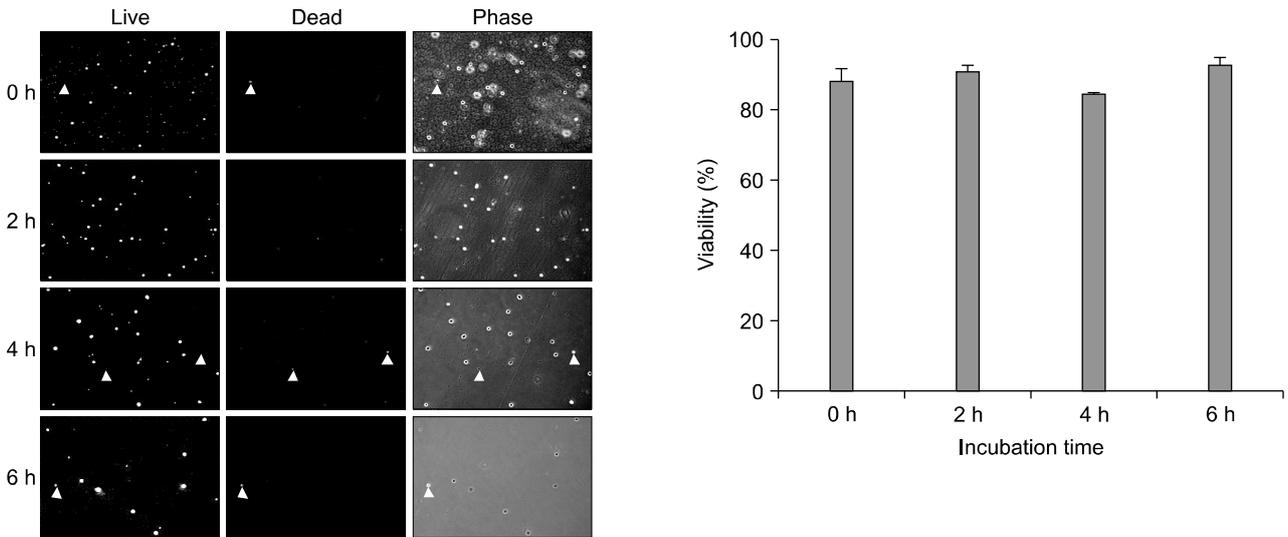


Fig. 5. Result of intracellular esterase activity test for CD34+ cells. Randomly selected one sample was checked its intracellular esterase activity at 0, 2, 4, 6 hours after thawing. The cells were incubated in RPMI,640 media at CO₂ incubator. There was no decrement of esterase activity which means CD34+ UCB cells do not die at least within 6 hours.

세포사멸 시 일어나는 막투과성의 변화는 DNA 염색 시약들의 막투과 여부 및 미토콘드리아 막투과성(mitochondrial membrane potential)의 소실 및 이로 인한 cytochrome c가 세포질내로 방출되는 것을 분석함으로써 세포사멸이 진행되고 있는지를 평가할 수 있다. 또한, 세포사멸이 진행되는 초기단계부터 세포막을 구성하는 인지질중 하나인 phosphatidyl serine (PS)의 위치가 변화하게 되는데, PS에 달라 붙을 수 있는 Annexin-v를 이용하여 세포사멸 여부 및 세포사멸의 정량화를 할 수 있다.

냉동보관된 제대혈의 해동 후 단핵세포와 CD34 양성 세포의 생존비율이 trypan blue 염색법으로 확인 하였을 때 각각 89, 83%라는 것과 그러한 생존비율이 냉동 보관 기간(1년 미만, 1~4년)에 따라 차이가 나지 않는다는 것은 최근의 냉동보관 된 제대혈(CD34 양성세포)을 해동하면 많은 초기 세포사멸이 관찰된다는 보고^{10,14-16)}와 차이가 있는 결과이었다. CD34 양성세포에서 Annexin-V/PI(+/-) 세포나 Annexin-V/PI(+/+) 세포의 비율은 약 50% 이었으나, 이 세포들은 DNA 함량 분석이나 caspase-3 활성 실험에서 단정적인 세포사멸 증거를 찾을 수 없었다. 이런 결과의 불일치가 의미하는 것은 모든 Annexin-V/PI(+/-) 세포가 죽은 세포로 간주 될 수 없다는 것이며 그 역도 같다는 것이다. 이론상으로 Annexin-V/PI(+/-) 세포가 초기 세포사멸이 예정대로 진행되고 있다면 RPMI-1640 배지 안에서 세포사멸이 더욱 진행되어 궁극적으로 Annexin-V/PI(+/-)

+) 세포가 된다. 그러나 본 실험의 결과로는 Annexin-V/PI(+/+) 세포, 즉, 후기 사멸세포의 비율이 배양한 후에도 증가하지 않았다는 것이다. 따라서 냉동보관된 살아있는 제대혈 세포는 Annexin-V와 반응할 가능성이 있다. 세포를 냉동보관하는 과정에 의하여 세포막의 내층(inner leaflet)에 있는 PS가 외층(outer leaflet)으로 이동할 수가 있다.¹⁷⁾ PS의 외층으로 이동은 이미노 인지질 효소(amino-phospholipid translocase)와 관련된 칼슘 의존성 인지질(calcium-dependent phospholipid scramblase)의 활동에 의해 조절된다는 이론이 정립되어 있지만 이러한 과정이 세포사멸을 유도하는 방식에 의해 촉발되고 조절된다는 것을 보여주는 증거는 없다.¹⁸⁾ 따라서 Annexin-V/PI(+/-)을 보이는 제대혈 세포가 죽은 세포 혹은 죽어가는 세포로 간주 되는 것이 무리가 있어 보이는 것은 DNA 함량 분석이나 세포내 esterase 활성 실험에서 세포사멸의 증거가 발견되지 않았기 때문이다.^{19,20)} 다른 한편, 손상되지 않은 세포 속의 이미노 인지질 효소가 해동 후에 활동이 현저히 감소하기 때문에 냉동보관 된 제대혈은 이 효소의 활동 감소에 노출될 가능성이 있다.²¹⁾

Annexin-V/PI 염색과 Syto 16 (thiazole orange derivative)염색 방법을 이용한 최근 결과에 의하면, 냉동 보관 된 제대혈(CD34 양성세포)을 해동하면 많은 초기 세포사멸이 관찰된다는 보고가 있었다.^{10,14-16)} 손상되지 않은 DNA/RNA에 결합하면 Syto 16은 강하고 집중적인 형광을 발하지만, 세포사멸 단계에서 DNA의

응축이 진행되면 Syto 16은 DNA/RNA와의 결합력이 약화되어 형광 강도가 저하됨으로써 초기 세포사멸을 탐지할 수 있다. 반면에, 정상 세포의 막 투과성이 없는 PI (propidium iodide)나 7-AAD (7-amino actinomycin D)는 막 투과성이 증가하는 세포사멸 또는 괴사의 마지막 단계에서 핵에 침투하여 DNA/RNA에 결합함으로써 후기 세포사멸을 탐지할 수 있게 된다. 이러한 핵산 염색 시약의 막 투과성을 이용하여 초기 혹은 후기 세포사멸을 구분할 수 있다.

그러나 Syto 16/PI (low/-) 세포군(초기 세포사멸)과 Syto16/PI (low/+) 세포군(후기 세포사멸 또는 괴사)에서 2N 미만의 DNA 함량과 DNA 분절화는 큰 차이 없이 거의 유사한 양상으로 관찰된다.^{22,23)}

본 연구결과에서는 DNA 함량 분석, caspase-3 활성 실험, trypan blue 배제 분석, 세포 내 esterase 활성 실험 모두에서 냉동보관되었던 제대혈을 해동한 후의 단핵세포나 CD34 양성세포에서의 세포사멸 수치는 낮게 나오는 반면에, 세포사멸을 조사할 때 일반적으로 사용되는 방법중의 하나인 Annexin-V/PI 염색 방법에서는 상당히 많은 세포들이 초기 혹은 후기 세포사멸 상태에 있는 것으로 조사되었다. 또한, RPMI1640 배지로 해동 후 세포를 배양한 결과에서처럼, 분리된 CD34 양성세포의 esterase 활성은 높은 수준으로 지속적으로 유지되었기 때문에 Annexin-V/PI 염색 결과처럼 냉동보관되었던 제대혈로부터 분리된 CD34 양성세포에서 초기 세포사멸이 진행되고 있다고 해석하는 것은 정확한 사실을 간과할 수 있을 것이다.

결론적으로, 세포사멸 검사는 단일 방식으로는 해동 후 냉동보관된 제대혈 내의 생존 세포 수치를 잘못 해석할 가능성이 있다. 따라서 저자 등은 냉동보관된 제대혈 내 세포 생존능을 알아보는 데에 Annexin-V/PI 착색 실험 외에도 상호 보완적인 방법이 필요하다고 주장하는 바이다. 다양한 방법의 생존세포 측정을 통해 냉동보관된 제대혈의 생존세포를 적절하게 정량화하고 포괄적인 해석을 한다면, 보다 정확한 방법에 의해 적정 세포 수를 이식함으로써 이식 후의 생착을 향상시키고 궁극적으로 생존을 향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

배경: 제대혈 이식에 있어서 신속한 생착이 더 나은 임상 결과를 가져온다. 제대혈 내의 이식된 생존세포의 수는 생착과 관계가 있으므로 냉동 보관된 제대혈

에서 CD34+ 세포의 생존능을 정확히 평가하는 것은 임상적으로 중요하다. 저자 등은 냉동보관된 제대혈에서 냉동보관기간과 측정방법에 따른 세포생존능을 측정하였다.

방법: 본 연구에서는 1~4년간 냉동보관되었던 60예의 제대혈을 사용하였다. Trypan blue, DNA 함량 분석, caspase-3 활성 조사, 세포내 esterase 활성도, annexin-V/PI 염색을 통해 냉동 보관되었던 제대혈 내 생존세포를 조사하였다.

결과: Trypan blue 배제 분석을 통해 확인된 바로는 해동 후에 89%의 MNC와 84%의 CD34 양성세포가 생존하였다. CD34 양성세포 중에서는 세포 사멸율이 annexin-V/PI 염색에서는 47%, DNA 함량 분석에서는 5% 미만이었다. Caspase-3 활성도가 거의 관찰되지 않았고, 세포내 esterase 활성도 측정에서 해동 후 2, 4, 6시간에 약 10~20%의 세포사멸을 보여주었다.

결론: 제대혈 내의 생존세포의 측정은 하나의 방법보다는 몇 개의 상호보완적인 방법들로 측정되어야 한다. Annexin-V/PI 염색과 trypan blue, DNA 함량 분석, caspase-3 활성 조사, 세포내 esterase 활성도 간의 검사 결과의 불일치를 볼 때 추후 제대혈 이식의 임상결과들과의 상호분석이 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an hla-identical sibling. Eurocord and international bone marrow transplant registry working committee on alternative donor and stem cell sources. *N Engl J Med* 2000;342:1846-54.
- 2) Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998; 339:1565-77.
- 3) Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-32.
- 4) Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991;17:313-29.
- 5) Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from

- an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-78.
- 6) Kamani N, Spellman S, Hurley CK, et al. State of the art review: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1-6.
 - 7) Lister J, Gryn JF, McQueen KL, Harris DT, Rossetti JM, Shadduck RK. Multiple unit HLA-unmatched sex-mismatched umbilical cord blood transplantation for advanced hematological malignancy. *Stem Cells Dev* 2007;16:177-86.
 - 8) Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996;88:795-802.
 - 9) Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-8.
 - 10) Shim JS, Cho B, Kim M, et al. Early apoptosis in CD34+ cells as a potential heterogeneity in quality of cryopreserved umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2006;135:210-3.
 - 11) Theunissen K, Verfaillie CM. A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. *Exp Hematol* 2005;33:165-72.
 - 12) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
 - 13) Mesner PW Jr, Kaufmann SH. Methods utilized in the study of apoptosis. *Adv Pharmacol* 1997;41:57-87.
 - 14) de Boer F, Dräger AM, Pinedo HM, et al. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34+ cells in frozen-thawed stem cell grafts. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:951-63.
 - 15) Mastino A, Favalli C, Camilli AR, Malerba C, Grelli S, Caluqi A. Umbilical cord blood: the role of apoptosis in the control of CD34+ cell counts. *Placenta* 2003;24:113-5.
 - 16) Schuurhuis GJ, Muijen MM, Oberink JW, de Boer F, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ. Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34-positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:487-98.
 - 17) Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin v to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999;5:109-15.
 - 18) Balasubramanian K, Mirnikjoo B, Schroit AJ. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:18357-64.
 - 19) Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril* 2001;75:263-8.
 - 20) Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 2001;22:646-51.
 - 21) Muller K, Pomorski T, Muller P, Herrmann A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci* 1999;112:11-20.
 - 22) Westers TM, Houtenbos I, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Quantification of T-cell-mediated apoptosis in heterogeneous leukemia populations using four-color multiparameter flow cytometry. *Cytometry A* 2005;66:71-7.
 - 23) Wlodkowic D, Skommer J, Pelkonen J. Towards an understanding of apoptosis detection by SYTO dyes. *Cytometry A* 2007;71:61-72.