

척수손상 백서 모델에서 신경분화  
유도된 골수유래 중간엽 줄기세포의  
이식에 따른 신경계 기능회복

연세대학교 대학원

의 학 과

김 용 래

척수손상 백서 모델에서 신경분화  
유도된 골수유래 중간엽 줄기세포의  
이식에 따른 신경계 기능회복

지도교수 박 창 일

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2007년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 용 래

# 김용래의 박사학위논문을 인준함

심사위원 박 창 일 인

심사위원 민 유 홍 인

심사위원 신 지 철 인

심사위원 이 배 환 인

심사위원 임 종 백 인

연세대학교 대학원

2007년 12월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성 할 수 있게 해 주시고 지금까지 인도해 주신 하나님께 감사드립니다. 본 논문을 처음부터 끝까지 격려하시며 지도해 주신 박창일 교수님께 진심으로 감사드리며, 본 연구에 많은 관심을 가지고 각별한 도움과 조언을 아끼지 않으신 민유홍 교수님, 신지철 교수님, 이배환 교수님, 임종백 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 본 연구를 적극적으로 지원해 주신 연세대학교 의과대학 재활의학교실의 여러 교수님, 선배님들과 특히 실험 진행에 조언을 주신 조성래 교수님과 연구팀, 그리고 제가 근무하고 있는 포천중문의대 전세일 교수님을 비롯한 분당차병원의 여러 선생님들께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 제가 연구할 수 있도록 항상 지원해 주시며 항상 바른 의사와 성실한 인간으로서의 길을 인도하시는 아버님과 어머니님, 장인 장모님, 기쁜 마음으로 배려해 주는 사랑하는 아내 소현과 또 웃음을 주며 맑게 자라고 있는 두 자녀인 동연, 동현, 그리고 가족들에게도 고마운 마음을 전합니다.

저자 씀

## <차례>

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 실험동물 모델의 제작 .....	7
2. 줄기세포의 준비 .....	8
가. 줄기세포의 채취 .....	8
나. 중간엽 줄기세포의 배양 .....	8
다. 면역세포화학 검사 .....	9
라. 신경분화 유도된 줄기세포의 배양 .....	10
3. 줄기세포의 이식 .....	10
4. 기능의 평가방법 .....	11
가. Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating score .....	11
나. 전기생리학적 평가 .....	11
(1) 체성 감각 유발 전위 검사 .....	12
(2) 운동 유발 전위 검사 .....	13
다. 면역조직화학 검사 .....	14
5. 통계처리 .....	14
III. 결과 .....	15
1. 면역세포화학 검사 결과 .....	15

가. 중간엽 줄기세포의 배양 검사 결과 .....	15
나. 중간엽 줄기세포의 면역세포화학 검사 결과 .....	16
다. 신경분화 유도 줄기세포의 면역세포화학 검사 결과 .....	17
2. Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating score .....	18
3. 세포이식 이후의 전기생리학적 검사 .....	20
가. 체성 감각 유발 전위 검사 .....	20
(1) 잠시의 비교 .....	20
(2) 진폭의 비교 .....	22
나. 운동 유발 전위 검사 .....	23
(1) 잠시의 비교 .....	23
(2) 진폭의 비교 .....	24
4. 면역조직화학검사 결과 .....	26
IV. 고찰 .....	27
V. 결론 .....	33
참고문헌 .....	34
영문요약 .....	41

## 그림 차례

Figure 1. Neuronal differentiation of mesenchymal stem cells .....	15
Figure 2. Rat mesenchymal stem cells expressed CD 29 and CD 90. ....	16
Figure 3. Expression of NeuN, CNPase, glial fibrillary acidic protein and S100 $\beta$ by differentiating cells .....	17
Figure 4. Checking Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores in each group on the open field .....	18
Figure 5. Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores before & after transplantation in 3 groups .....	19
Figure 6. Distribution of transplanted Bromodeoxyuridine labeled stem cells and glial fibrillary acidic protein .....	26

## 표 차례

Table 1. A comparison of latency in the somatosensory evoked potential study by the transplanted stem cell type .....	21
Table 2. A comparison of amplitude in the somatosensory evoked potential study by the transplanted stem cell type .....	22
Table 3. A comparison of latency in the motor evoked potential study by the transplanted stem cell type .....	23
Table 4. A comparison of amplitude in the motor evoked potential study by the transplanted stem cell type .....	25



## 국문요약

### 척수손상 백서 모델에서 신경분화 유도된 골수유래 중간엽 줄기세포의 이식에 따른 신경계 기능회복

척수손상 후 동반되는 장애는 여러 심각한 합병증을 유발하며 삶의 질의 향상에 제한요소가 된다. 척수손상 후 효과적인 기능회복을 위하여, 여러 방면으로 다양한 연구들이 시도되어 왔으며, 최근에는 줄기세포 이식이 시도되고 있는데, 척수손상 후 발생하는 신경세포의 재생 및 신경 회복에 효과적인 방법의 하나로 가능성이 타진되고 있다. 그러나 기존의 연구들에서는 이식된 각각의 줄기세포의 분화된 특성에 따른 치료 효과의 상호 비교연구, 즉 세포의 종류에 따른 줄기세포 이식치료의 효과에 대한 상호 비교연구 결과에 대하여는 아직 명확하게 알려져 있지 않다.

그러므로 본 연구에서는 척수손상 백서모델을 설정하고, 백서의 골수를 획득하여, 백서 골수유래의 중간엽 줄기세포를 배양하고, 특히 신경분화를 유도하여, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 배양한 후, 척수손상 백서모델에서 중간엽 줄기세포와, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 선별하여 이식하는 방법을 각각 시도하여 그 효과를 상호 비교해 봄으로써, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포가, 대조군 및 중간엽 줄기세포만을 이식한 군 등에 비하여 신경세포 재생 및 신경기능 회복에 미치는 영향에 어떠한 차이가 있는지 척수손상 동물모델을 통하여 객관적인 방법으로 상호 비교 평가하여, 어떤 방법이 가장 효과적인 신경재생을 통한 기

능향상을 이룰 수 있는 방법인지 알아보아 추후 척수손상 환자의 치료에 효과적으로 응용하기 위한 토대를 마련하고자 본 연구를 시행하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scale 로 평가된 행동 검사 결과, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 대조군에 대하여, 중간엽 줄기 세포만을 이식한 군에 비하여 이식 후 약 3주 후부터 의미있는 호전이 확인되었다.

전기생리학적 검사의 하나인 체성 감각 유발 전위 검사 결과, 세포 이식 후 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 대조군 및 중간엽 줄기세포만을 이식한 군에 비하여 잠시가 의미있게 단축되는 등 유의한 호전이 확인되었다.

이상의 결과에서 척수손상 백서모델에서 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 선별하여 이식한 군에서 가장 효과적인 결과를 나타낸 것으로 미루어 보아, 본 연구는 추후 사람에서 보다 효과적인 세포 이식을 위한 세포 선별의 기준을 제시하는 귀중한 자료의 하나가 될 것으로 생각하며, 사람에서 척수손상 환자의 줄기세포 이식을 통한 신경 재생치료의 효율성을 높이고, 치료에 효과적으로 응용하기 위한 기초가 되어, 보다 성공적인 방법을 제시하는데 중요한 토대가 될 수 있을 것으로 생각한다.

---

핵심되는 말 : 척수손상, 신경분화 유도, 중간엽 줄기세포, 세포 이식, 백서

척수손상 백서 모델에서 신경분화 유도된 골수유래  
중간엽 줄기세포의 이식에 따른 신경계 기능회복

<지도교수 박 창 일>

연세대학교 대학원 의학과

김 용 래

## I. 서 론

척수손상 이후에 동반되는 장애는 호흡기계, 비뇨기계, 근골격계 및 심혈관계 등의 여러 분야에 합병증을 초래하며, 심각한 기능장애를 유발하여 삶의 질을 저하시킨다.<sup>1</sup> 중추신경계인 척수의 재생은 쉽지 않은 것으로 알려져 왔으며, 비가역적인 척수손상의 경우 만족할 만한 획기적인 치료에 대하여 현재까지 아직 확실한 방법이 확립되지 않아, 여러 방면으로 연구가 최근까지 시도 중에 있다.<sup>2</sup> 척수손상 후 효과적인 기능회복을 위하여 여러 방면으로 치료 방법의 개발과 연구가 진행되어 왔다. 효과적인 수술 기법이 발달되어 왔고, 손상 초기의 고용량의 스테로이드 제제의 투여 등 신경세포의 이차 손상을 효과적으로 방지하기 위한 연구 및 척수손상 후 동반되는 염증반응을 최소화하기 위한 연구 등이 시도되어 왔으며, 최근에는 줄기세포를 이용한 중추신경계의 재생에 대한 연구가 시도되고 있다.<sup>3,4</sup> 손상된 척수에 줄기세포 이식을 통한 신경 재생 치료는 척수손상의 치료에 한 부분으로서 역할을 담당할 수 있을 것으로 기대되면서 최근에는 다양한 종류의 세포 이식에 관한 연구가 시도되고 있다.<sup>5-7</sup>

줄기세포 이식치료는 척수손상에서 중추신경계 재생능력의 한계를 극복하기 위하여 외부에서 필요한 신경조직 및 세포 등을 척수에 이

식하는 방법이 시도되고 있다.<sup>8</sup> 이식된 세포는 새로운 신경회로를 형성시키며, 축삭의 재생을 도우며, 손상된 신경세포를 보충하고, 궁극적으로는 중추신경계의 재생을 위한 환경을 변화시킬 것으로 기대되고 있다. 이식치료에는 성체줄기세포, 태아신경세포 및 배아줄기세포(embryonic stem cells) 등이 이식치료에 시도되고 있다. 성체줄기세포는 골수조직 등에서 얻을 수 있으며 자가이식이 가능하므로 비교적 안전하게 이식할 수 있으며, 면역 거부반응이 적을 것으로 생각되며, 윤리적인 면에서 문제점이 적다는 등의 장점이 있다. 실제로 성체줄기세포를 이식한 척수손상 동물모델 실험에서 신경 축삭의 재생 및 신경 기능의 호전이 보고되고 있다. 그러나 아직 정확한 기전에 대한 규명이 확실하지 않으며, 줄기세포의 배양과정이 다른 세포들에 비하여 비교적 어려운 것으로 알려져 있다.<sup>9</sup>

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)의 이식치료를 이용하여 척수손상 등의 치료를 위한 가능성이 동물모델에서 최근에 점차적으로 연구되고 있으며, 일부 연구에서는 척수손상 동물모델에서 줄기세포 이식치료가 신경계 기능 회복에 있어서 일부 운동기능 회복에 어느 정도 효과적인 방법임이 동물모델에서 보고되고 있다.<sup>8</sup> 최근의 보고에 의하면 중간엽 줄기세포의 이식치료와 더불어 신경분화를 유도한 세포(neurally induced mesenchymal stem cells, NMSC) 등을 배양하여, 이를 이용한 이식치료의 효과에 대한 연구가 동물모델에서 시도되고 있다. 즉 중간엽 줄기세포에서 보다 신경분화를 유도한 후 이식치료를 시행하였을 때 신경 재생 및 신경회복에 미치는 영향에 대한 연구가 시도되고 있다.<sup>10,11</sup>

그러나 기존의 연구들에서는 각각의 줄기세포의 특성에 따른 치료 효과에 대한 치료 전 후의 효과의 비교 중심으로 연구가 진행되어 왔다고 해도 과언이 아니다. 그런데 객관적으로 이식된 세포의 기능회복에 미치는 영향에 따른 상호간의 비교연구, 즉 어떤 종류의 줄기세포를 이식하였을 경우가 보다 효과적인지, 세포의 차이에 따른 상호

객관적인 비교연구는 아직 명확하게 알려지지 않고 있다.

이에 본 연구에서는 척수손상 백서모델에서, 대조군, 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군 등으로 각각 나누어 신경세포 재생 및 신경 기능 회복에 미치는 영향을 객관적으로 평가함으로써, 어떤 세포를 이식하는 방법이 가장 효과적인 신경 재생을 통한 기능향상을 이룰 수 있는 방법인지 비교하여, 추후 사람 척수손상 환자의 치료에 효과적인 세포이식을 위한 세포선별의 기준을 제시하는 귀중한 자료로 응용하기 위한 토대를 삼고자 하였다. 특히 본 연구에서는 줄기세포를 백서의 골수에서 획득하여 배양 한 후 백서모델로 이식하는 방법을 사용하기로 하였다. 이는 면역 거부반응을 줄여서 이식 후의 효과적인 기능회복을 기대할 수 있으며, 기존의 연구들에서 사람의 줄기세포를 백서에 이식함으로써 대두되는 윤리적인 면, 치료의 효율성에 관한 문제를 극복할 수 있는 장점이 있다고 하겠다. 또한 중간엽 줄기세포를 직접 배양하여 이식치료에 사용할 뿐만 아니라 신경분화 과정도 직접 유도하기로 하였다. 세포의 배양과정에서 줄기세포가 신경계로 분화과정의 잘 이루어지고 있는지 면역염색 등으로 확인하면서,<sup>12,13</sup> 줄기세포의 배양 과정을 진행해 나가기로 하였다. 본 연구에서는 각 군의 치료효과에 대한 평가가 객관적으로 이루어 질 수 있도록 각 군의 이식치료의 효과의 평가에 대하여는 수치화된 객관적인 방법을 사용하기로 하였다. 백서에서의 행동관찰을 비교적 객관적으로 수치화하기 위하여 Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scale (BBB scale)을 주로 사용해 오고 있다. BBB scale은 사지 및 각 관절의 움직임과 관절운동의 협동성, 체중부하의 정도에 따라 0점에서 21점까지 점수화하여 분류하는 방법이다. 전기생리학적 평가방법으로는 체성 감각 유발 전위 (somatosensory evoked potential, SSEP) 검사 및 운동 유발 전위 (motor evoked potential, MEP) 검사 방법 등이 일반적으로 사용된다. 체성 감각 유발 전위 검사는 체성 감각을 자극

하였을 때 그 감각 경로를 따라 일어나는 일련의 전위의 변화를 기록할 수 있으며, 약 100회 이상의 많은 횡수의 자극을 하여 전위를 찾아내는 평균화 기법이 주로 사용되므로, 비교적 객관적인 평가 방법으로 알려져 있으며, 중추신경계의 생리학적 기능의 변화를 판별하는데 매우 유용하게 사용되고 있다. 운동 유발 전위 검사는 중추신경계 운동경로 자극에 의해 척수 등에서 기록되는 전위로 역시 운동 경로의 객관적인 검사를 위해 사용되고 있다. 또한 면역형광 염색법은 객관적인 신경세포의 존재를 확인하는 방법으로 현미경을 사용하여 객관적으로 신경계 세포의 존재여부를 확인할 수 있는 방법이다.<sup>14-17</sup> 본 연구에서는 각 군의 줄기세포 이식의 효과를 객관적으로 평가하고자, BBB scale에 의한 운동기능 평가, 체성 감각 유발 전위 검사 및 운동 유발 전위 검사 등의 전기 생리학적 평가 및 조직학적 방법을 사용하여 각 군을 비교하기로 하였다.

요약하면 본 연구는 척수 좌상을 유도한 백서모델을 설정하고, 줄기세포의 이식 경로로는 척수내로 주입하는 방법을 설정하고, 이식에 사용할 줄기세포의 획득은 백서의 줄기세포에서 획득하며, 세포의 배양과정도 직접 진행하며, 신경분화 과정도 직접 유도해 나가기로 하였다. 세포의 종류에 따른 기능회복의 양상을 각 군에 따라 객관적으로 평가하기로 하였다. 기능회복의 평가는 척수손상 후 약 9주간 매주 BBB 점수를 사용하여 평가 한 후, 전기생리학적인 방법의 평가로 실험동물에서 체성 감각 유발 전위 검사 및 운동 유발 전위 검사 등을 시행하고, 조직학적인 방법으로 신경계 세포의 존재 여부를 확인하기로 하였다.

본 연구를 통하여 이식치료에 가장 적합한 세포를 선별하여, 보다 효율적인 세포 이식 치료의 방법을 동물모델을 통하여 제시함으로써 추후 척수손상 환자의 이식 치료에 응용하여 줄기세포 이식을 통한 신경 재생치료의 효율성을 높이는데 기초자료로 삼고자 본 연구를 계획하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 모델의 제작

척수손상 동물모델은 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 무게가 300 ~ 350 g 범위의 건강한 Sprague-Dawley계 백서를 선별하여 동물모델을 제작하였다. 사육 온도는  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  정도를 유지하였고, 습도는  $50 \pm 10\%$  정도를 유지하도록 하였다.

준비된 백서의 척수손상 유도 과정은 다음과 같았다. 백서의 체중에 따라 1 kg 당 50 mg의 농도에 해당되는 pentobarbital sodium을 복강내로 주입하여 실험동물을 마취시킨 후, 흉 요추부위 피부의 털을 제거한 후, 척추의 정중선을 따라 피부를 절개하고, 제6 흉추부터 제12 흉추까지 척추의 위치를 확인하고, 제9 흉추 부위에 후궁절제술을 시행하였다. 동물을 NYU 충격장치 위에 올려놓고 검자로 척추돌기를 고정한 후 충격장치 가늌자를 떨어뜨리는 방식으로 노출된 척추부위에 척수손상을 발생시켰다. 척수손상 매개변수를 확인하여 높이, 속도, 압축 비율 등이 모두 일정한 범위 내에 해당되도록 선택하였다. 가늌자가 척추의 표면에 닿을 지점을 확인하고 25 mm 지점에 직경 2.5 mm, 무게 10 g 인 가늌자를 위치시킨 후 바늘을 잡아당겨 척수손상을 유도하였다. 결과적으로 척수 좌상에 의한 불완전 척수손상을 유도하였다.

그 후 동물의 절개부위를 봉합하고, 항생제를 주사한 뒤 마취에서 깨어날 때까지 체온을  $36 \sim 37^\circ \text{C}$  로 유지시켰다. 마취에서 깨어난 이후에는 실온이 유지될 수 있는 공간에서 사육시키며, 손상 후에는 신경인성 방광이 발생할 수 있으므로, 효과적인 배뇨 관리를 해주었다. 항생제로 tanamycin sulfate (1 mg/kg)를 규칙적으로 투여하였고, 면역억제제로 cyclosporin A (1 mg/100gm)를 복강내로 투여하였다.

## 2. 줄기세포의 준비

### 가. 줄기세포의 채취

6개월 이상 된 건강한 백서의 대퇴골에서 골수를 채취하여 줄기세포를 준비하였다. 줄기세포의 채취과정은 다음과 같았다. 백서를 안락사시킨 후 에탄올에 담가 세척한 후, 대퇴부의 피부를 노출시킨 다음 대퇴골 부위를 잘라내어서 대퇴골을 획득하였다. 얼음 등으로 찬 온도를 유지하도록 한 Hank's balanced salt solution with Ca, Mg (HBSS; GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA)에 적신 후 70% 에탄올에 세척하였다. 찬 온도로 유지된 HBSS에 보관하고 있다가, 붙어있는 근육 등의 구조물을 깨끗이 제거한 후, 차가운 HBSS에 담가두었다. 그 후 2차례 다시 에탄올로 깨끗이 세척하고 차가운 HBSS에 보관하였다. 대퇴골의 양측을 절단한 후 25 gauge의 바늘을 사용하여 Pen-Strep 및 glutamine 등이 함유된 DC medium을 12 cc 주사기에 넣은 후, 골수를 미리 준비된 용기를 향하여 강한 힘으로 방출시켰다. 원심분리 용기에 넣은 후에 약 5분간 원심분리 시킨 다음, 상층액을 흡인하고 다시 반복하여 원심분리 시켰다. 다시 세척하여 50 ml phosphated buffered saline (PBS; GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA)에 원심분리 시킨 후, 상층액을 흡인하고 배지에 배양하였다.

### 나. 중간엽 줄기세포의 배양

건강한 백서의 대퇴골에서 획득한 백서의 골수 (rat bone marrow cells)에 PBS 10 ml를 첨가한 후 2,000 rpm의 각속도로 약 10분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 제거한 후 PBS 10 ml를 첨가하였다. 다음에는 Histopaque-1077을 넣은 20 ml 튜브에 희석된 물질을 조심스럽게 넣은 후 2000 rpm의 각속도로 25분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 단핵 세포층 (mononuclear cell layer)으로 생각되는 중간층만을 분리하고, 새 튜브로 2,000 rpm의 각속도로 10분간 원심분리 하



였다. 이어서 상층액을 버리고 PBS로 씻어낸 후 1,500 rpm의 각속도로 5분간 2번 원심분리 하였다. 세포의 숫자를 파악하여  $5.0 \times 10^7/\text{ml}$  이상이면 T75  $\text{cm}^2$  배양용기에 파종하였고,  $5.0 \times 10^7/\text{ml}$  이하이면 T25  $\text{cm}^2$  배양용기에 파종하였다. 중간엽 줄기세포는 기초 배양배지 (complete mesenchymal stem cell growth media, MSCGM)를 넣은 T75  $\text{cm}^2$  배양용기 또는 T25  $\text{cm}^2$  배양용기에 살포하였다. 온도는 약 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양기에서 배양하였고, 감염 유무를 확인하였다. 제4일째에 T75  $\text{cm}^2$  배양용기에 5 ml 기초 배양배지를 첨가하였다. 제9일 또는 제10일 째에 부유하는 세포를 제거하고 새로운 기초 배양배지 10 ml를 첨가하였다. 그 이후부터는 중간엽 줄기세포의 부착 상태에 따라 배지를 첨가 또는 제거하였다. 80~90% 융합 (confluency)을 보이면 T25  $\text{cm}^2$  배양용기로 나누어 계대배양 (sub-culture; passage 1) 하였다. 제4~6 계대배양기 (passage 4~6)에서 중간엽 줄기세포의 주입을 실시하였다.

#### 다. 면역세포화학 검사

PBS 내에서 4% paraformaldehyde에 30분간 얼음에서 고정시킨 후, PBS로 3차례 세척하였다. PBS 에서 10분간 얼음에서 0.5% Triton X-100 을 첨가한 후 미세 투과시켰다. 그 후에는 PBS로 3차례 헹구어낸 후 PBS와 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St Louis, MO, USA)으로 1시간 정도 고정시켰다.

PBS에서 30분 동안 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated hamster anti-rat CD29 (Integrin  $\beta 1$  chain) monoclonal antibody, R-Phycoerythrin (R-PE) - conjugated mouse anti-rat CD90 monoclonal antibody 등의 물질과 같이 1:100 비율로 항체를 배양하였다. 이 때 형광 물질은 빛에 민감하므로 호일을 덮어 빛을 차단하였다. 이어서 PBS로 3차례 세척한 후 고정하여 염색하였다.

라. 신경분화 유도된 줄기세포의 배양

제4 계대배양기 단계의 중간엽 줄기세포의 기초 배양배지를 신경 분화 유도하기 위해 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA)과 5ng/mL의 basic fibroblast growth factor (bFGF)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle media (DMEM; GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA)로 바꾸어 24시간 배양하였다. PBS로 씻어낸 후 N<sub>2</sub> supplement, 200 uM butylated hydroxyanisole, 25 mM KCl, 2 mM valproic acid 및 10 μM forskolin 등이 첨가된 DMEM에 16시간정도까지 배양하였다.

배양한 세포가 신경분화 유도 되었는지 확인하기 위하여 NeuN, CNPase, glial fibrillary acidic protein (GFAP) 및 S100β 등으로 면역세포화학 염색 후, 형광 현미경으로 관찰하여 신경분화 유도된 세포의 특성을 지녔는지 확인하였다.

### 3. 줄기세포의 이식

표준화된 척수손상 백서를 대상으로 다음 세 군으로 나누어 세포를 척수내로 이식 (intraspinal transplantation)하였다. 첫 번째 군인 대조군은 줄기세포 대신 PBS 만을 이식하였고 척수손상 대조군이라 명명하였다. 두 번째 군은 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군으로 설정하였고, 세 번째 군은 신경분화 유도된 줄기세포를 이식한 군으로 각각 나누었다. 척수손상 후 1주일째에 pentobarbital 등으로 마취한 뒤, 이미 척수손상을 받은 흉수부위를 노출한 후 손상부위에 25 gauge의 주사기를 이용하여, 대조군에는 줄기세포를 주입하는 대신에 phosphate buffer saline을 주입하였고, 다른 군에는 10 μl당 2.5×10<sup>5</sup>개의 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식하였으며, 또 다른 군에는 10 μl당 2.5×10<sup>5</sup>개의 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 같은 방법으로 이식하였다.

이식할 세포는 이식하기 전에 표식인자로 bromodeoxyuridine

(BrdU; Sigma, St Louis, MO, USA) 을 세포배양 과정에서 첨가함으로써 추후 면역형광염색 등의 표식자로 사용할 수 있게 하였다.

각각의 세포를 주입한 후 근육, 피하조직 및 피부 등을 층을 각각 맞추어 봉합하였다.

실험에 사용되어 이식수술 후까지 생존하여 세포 이식 치료의 효과에 대한 객관적인 평가 및 비교분석 등에 사용된 백서는 PBS 만을 이식한 백서로 구성된 대조군은 13마리, 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군은 16마리, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군은 각각 13마리였다.

#### 4. 기능의 평가방법

##### 가. Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scale (BBB scale)

BBB scale 을 이용하여 모든 실험동물을 주 1회 행동 관찰을 실시하여 평가하였다. 손상 후 1주일에 측정된 BBB 점수를 통하여 각 백서의 손상의 표준화 정도를 평가할 수 있었다. 그 후 주 1회마다 일정한 간격으로 BBB 점수를 측정하여 기록 하였고, 각 군마다 측정된 점수를 통계적 방법으로 비교 분석하였다.

##### 나. 전기생리학적 평가

수상 후 9주째 체성 감각 유발 전위 검사 및 운동 유발 전위 검사 등을 시행하여 유발전위의 잠시 및 진폭을 관찰하고 비교하였다. 오차를 줄임으로써 정확한 평가를 시행하기 위하여 urethan (1.25 g/kg) 을 복강 내로 투여하여 실험동물을 마취하였고, 과다한 분비물 등이 억제되도록 atropine sulfate (0.8 mg/kg) 등을 투여하였다. 또한 근육 이완을 위하여 pancronium bromide (1.0 mg/kg)을 정맥내로 투여하였다. 기관절개술 후에는 인공호흡기 (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)를 이용하였고, 실험동물이 평가도중 잘 고정되도록 하여 측정시의 오차를 최대한으로 줄이도록 하였다.

(1) 체성 감각 유발 전위 검사

실험동물을 마취한 후 좌측 좌골 신경 부위에서 전기자극기 (A365, World Precision Instruments, New Haven, CT, USA)를 이용하여 전기자극을 주었으며, 전기자극의 기록은 개두술을 시행한 후 반대쪽의 전두-두정엽 부위 (frontoparietal area)에서 기록전극 (NE-120, Rhodes Medical Instruments, Distributed by David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)을 이용하여 기록을 측정하였다. 자극의 강도(intensity)는 6 mA 정도로 설정하였고, 자극의 기간 (pulse duration)은 0.1 msec 가 되도록 시행하였고, 약 100회에서 120회 자극하였다. 유발전위의 잠시와 진폭을 관찰하였고 각 군마다 비교하여 기록하였다.

유발전위의 잠시는 각각의 항목을 최초의 반응에 나타나는 잠시 (latency of the onset of the initial rising phase from the baseline; initial latency), 음위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 (latency of the peak of the first negative deflection;  $N_1$  latency) 및 양위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 (latency of the peak of the first positive deflection;  $P_1$  latency) 등으로 정의하고 각 군마다 측정비교 하였다.

유발전위의 진폭은 각각의 항목을 최초로 기록되는 음의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first negative deflection from the baseline ; negative peak amplitude), 최초로 기록되는 양의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first positive deflection from the baseline; positive peak amplitude), 음의 최대 진폭 및 양의 최대 진폭의 절대값의 합 (amplitude between the peak of the first negative and positive deflection; peak to peak amplitude) 등으로 정의하고 각 군마다 측정하여 비교하였다.

## (2) 운동 유발 전위 검사

운동 유발 전위 검사는 대뇌 피질부위에서 자극하여 시행하였다. 운동 유발 전위 검사의 정확한 기록을 위해 제1 요추의 후궁절제술을 시행하고, 전극을 반대편 척수의 회색질 (gray matter of spinal cord near the motor conduction tracts)에 위치시켰다. 운동 유발 전위의 잠시와 진폭을 각 군마다 관찰하여 비교하였다. 자극의 강도 (intensity)는 6mA 정도로 설정하였고, 자극의 기간 (pulse duration)은 0.1 msec 가 되도록 시행하였고, 약 100회에서 120회 자극하였다. 실험동물에서 마취에 의한 오차를 감소시키기 위하여, 마취 후 되도록 빠른 시간 내에 실험이 이루어 질 수 있도록 하였다.

체성 감각 유발 전위 검사 때와 마찬가지로 방법으로 잠시와 진폭을 관찰하였고 각 군마다 비교하여 기록하였다. 유발전위의 잠시는 각각의 항목을 최초의 반응에 나타나는 잠시 (latency of the onset of the initial rising phase from the baseline; initial latency), 음위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 (latency of the peak of the first negative deflection; N<sub>1</sub> latency) 및 양위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 (latency of the peak of the first positive deflection; P<sub>1</sub> latency) 등으로 정의하고 각 군마다 측정비교하였다.

유발전위의 진폭은 각각의 항목을 최초로 기록되는 음의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first negative deflection from the baseline ; negative peak amplitude), 최초로 기록되는 양의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first positive deflection from the baseline; positive peak amplitude), 음의 최대 진폭 및 양의 최대 진폭의 절대값의 합 (amplitude between the peak of the first negative and positive deflection; peak to peak amplitude) 등으로 정의하고 각 군마다 측정하여 비교 하였다.

#### 다. 면역조직화학 검사

이중 면역형광 염색방법을 이용한 검사방법으로 신경세포의 재생 여부를 확인하였다. 면역형광 염색을 위하여 줄기세포 이식치료를 시행한 실험동물을 마취시킨 후 실험동물을 희생시킨 뒤, 척수를 획득하여 조직을 확인하였다.

조직을 10% formalin에 넣어 고정한 뒤 파라핀에 고정된 조직 블록을 5  $\mu\text{m}$ 의 두께로 절편하여 슬라이드에 부착하였다. 면역형광반응은 최초 줄기세포 이식 전 표식인자로 첨가해 놓은 표식자인 bromodeoxyuridine 에 대한 항체와, 중간엽 줄기세포와 신경교 세포의 표식자 중의 하나인 glial fibrillary acidic protein 등에 대한 항체를 반응시킨 후, 이차항체로 반응시킨 후 동반 염색 소견을 현미경으로 검경하였고, 사진화일로 변환시켰다.

#### 5. 통계처리

대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군 들 각각에 대하여 손상 후 시점부터 손상 후 63일까지 BBB 점수를 매주 측정하여 통계학적 검증을 하였다. 각 군별로 치료 후 시간에 따른 행동 기능상의 회복정도는 ANOVA test 등으로 검증하였다.

대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군 들 각각에 대하여, 체성 감각 유발 전위 검사의 잠시와 진폭도 ANOVA test 등으로 비교분석 하였다. 대조군 및 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 신경 분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군 들 각각에 대하여 운동 유발 전위 검사의 잠시와 진폭도 ANOVA test 등으로 비교분석 하였다.

분석의 유의수준은 0.05 미만일 때 의미가 있다고 설정하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 면역세포화학 검사결과

##### 가. 중간엽 줄기세포의 배양 검사결과

획득한 백서의 중간엽 줄기세포를 배양한 결과, 배양된 세포가 줄기세포의 특징을 지닌 모습으로 배양되는 것을 현미경을 통하여 확인할 수 있었다. 시간이 경과할수록 세포체는 수축되고 돌기가 증가되는 양상이 확인되었다. 아래의 그림에서 그림 A는 배양초기 단계의 현미경 소견이며, 그림 B는 4시간이 경과한 이후의 소견을 현미경으로 관찰한 결과이다. 시간이 지날수록 줄기세포의 분화되는 양상을 현미경을 통하여 확인할 수 있었다 (Figure 1).

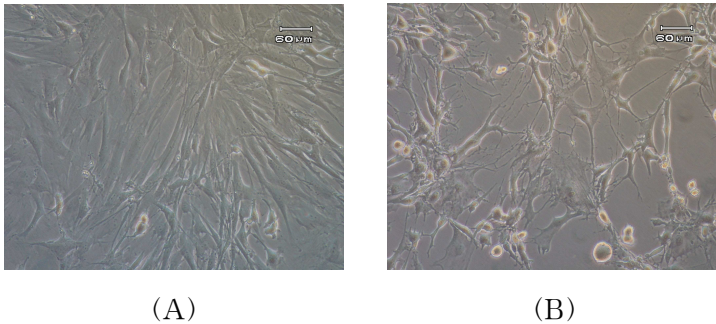
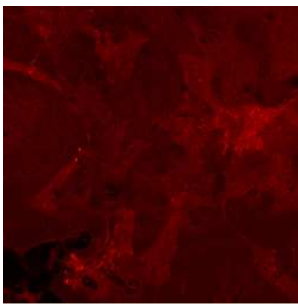


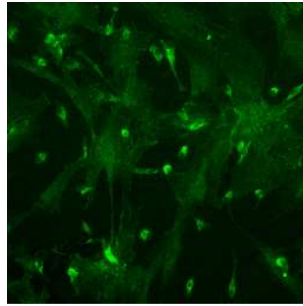
Figure 1. Neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. The neuronal differentiation protocol was initiated at 0 minute and followed for 240 minutes. Retraction of cell body and process elaboration were evident with increasing time. (A) Initially, cytoplasm in the flat mesenchymal stem cells retracted towards the nucleus forming a contracted multipolar, cell body, leaving membranous, process-like extension peripherally. (B) After 240 minutes, processes continued to elaborate, displaying primary and secondary branches, growth cone-like terminal expansions and putative filopodial extensions. Scale bars are 60 $\mu$ m.

나. 중간엽 줄기세포의 면역세포화학 검사 결과

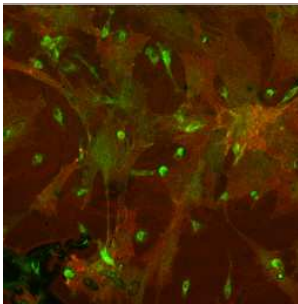
중간엽 줄기세포를 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated hamster anti-rat CD29 (Integrin  $\beta$ 1 chain) monoclonal antibody, R-Phycoerythrin (R-PE) - conjugated mouse anti-rat CD90 monoclonal antibody 등을 이용한 면역형광방법으로 염색한 결과, 아래의 그림과 같은 표식자인 CD 29 및 CD 90에 대해 양성반응을 보였다. 그림 A는 CD 90에 대한 양성반응을 나타낸 소견이며, 그림 B는 CD 29에 대한 양성반응을 나타낸 소견이며, 그림 C는 CD 29 및 90에 대하여 반응을 나타낸 면역 형광 염색 소견이다 (Figure 2).



(A)



(B)



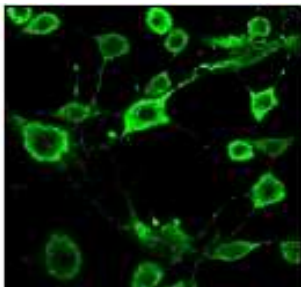
(C)

Figure 2. Rat mesenchymal stem cells expressed CD 29 and CD 90. (A) Rat mesenchymal stem cells expressed CD 90 by immunofluorescent microscopy. (B) Rat mesenchymal stem cells expressed CD 29 by microscopy. (C) Rat mesenchymal stem cells expressed CD 90 and CD 29 by immunofluorescent microscopy.

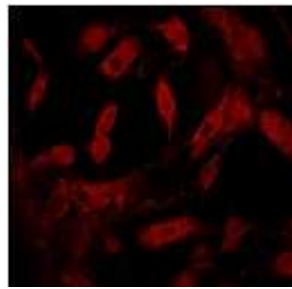


다. 신경분화 유도 줄기세포의 면역세포화학 검사 결과

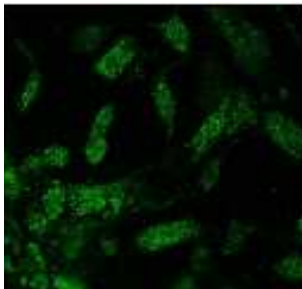
신경분화 유도된 중간엽 줄기세포를 NeuN, CNPase, glial fibrillary acidic protein (GFAP) 및 S100 $\beta$  등에 대하여 면역 형광 염색 검사를 시행한 결과, 아래의 그림과 같이 신경계 세포의 표식자인 NeuN, CNPase, glial fibrillary acidic protein 및 S100 $\beta$  에 대하여 양성반응을 나타내었다 (Figure 3)



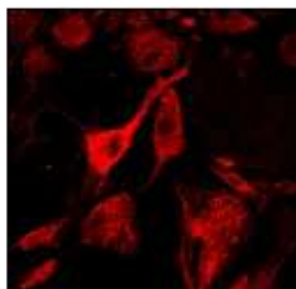
(A) NeuN



(B) CNPase



(C) GFAP



(D) S100 $\beta$

Figure 3. Expression of NeuN, CNPase, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and S100 $\beta$  by differentiating cells. (A) NeuN could be detected in the nucleus and surrounding cytoplasm of neurally induced mesenchymal stem cells by immunofluorescent microscopy. (B) CNPase could be detected by immunofluorescent microscopy. (C) GFAP could be detected in the nucleus and surrounding cytoplasm of neurally induced mesenchymal stem cells by immunofluorescent microscopy. (D) S100 $\beta$  could be detected in the nucleus and surrounding cytoplasm of neurally induced mesenchymal stem cells by immunofluorescent microscopy.

## 2. Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating score

척수손상 백서에서 BBB 점수로 평가된 행동 검사 결과를 관찰 기록하였다. 세 군으로 나누어 기록하였는데, 첫 번째 군은 척수손상 대조군으로서 PBS 만을 주입한 백서로 구성된 군이며, 두 번째 군은 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 그리고 세 번째 군은 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군으로 각각 나누어 비교하여 관찰하였다 (Figure 4).



< A >



< B >



< C >

Figure 4. Checking Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores in each group on the open field.

A; The group injected with phosphated buffer saline

B; The group transplanted with mesenchymal stem cell

C; The group transplanted with neurally induced mesenchymal stem cells

## BBB Score

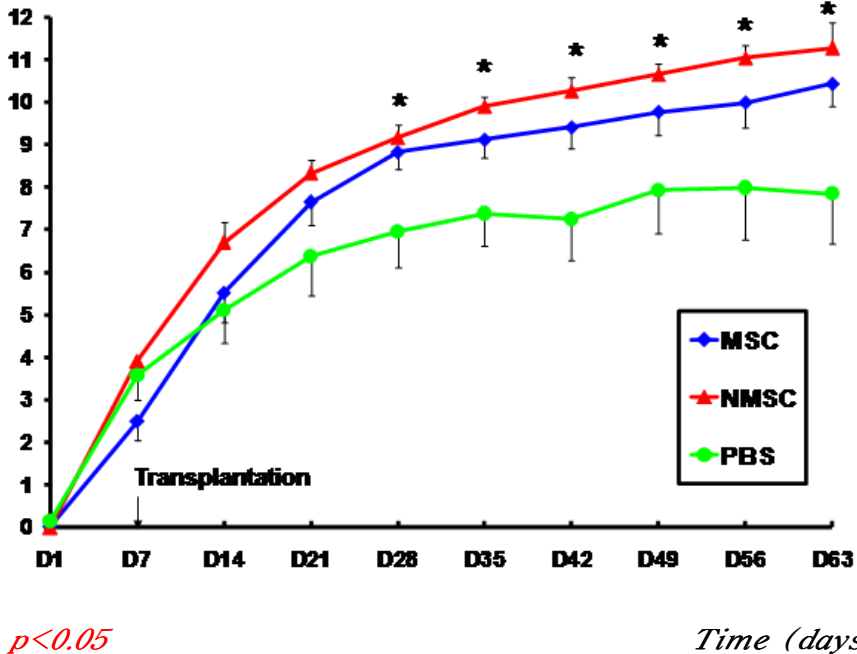


Figure 5. Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores before and after transplantation in 3 groups. The NMSC group significantly improved the hind limb performance in both legs after transplantation (\* $p < 0.05$ )

MSC (n=16); The group transplanted with mesenchymal stem cell

NMSC (n=13); The group transplanted with neurally induced mesenchymal stem cells

PBS (n=13); The group injected with phosphated buffer saline

대조군 및 이식군 각각에 대하여 손상 후 시점부터 손상 후 63일까지 Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating score를 매주 측정하여 통계학적 검증을 한 결과, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서, 대조군에 비하여 이식 3주 후부터 유의하게 BBB 점수가 회복된 소견을 보였다 ( $p < 0.05$ , Figure 5).

한편 백서 골수유래 중간엽 줄기세포 만을 이식한 군은, 대조군을 기준으로 한 BBB 점수의 회복정도를 비교할 때 BBB 점수의 향상이 이식 후 4주부터 비교한 경우에, 통계적으로 유의하게 향상되지는 않는 양상으로 분석되었다 (Figure 5).

상기 BBB 점수의 비교는 PBS 만을 이식한 백서로 구성된 대조군은 13마리, 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군은 16마리, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군은 각각 13마리에서 관찰 되었고 통계 분석된 결과였다.

### 3. 세포 이식 후의 전기생리학적 검사

#### 가. 체성 감각 유발 전위 검사

##### (1) 잠시의 비교

체성 감각 유발 전위 검사는 척수손상 백서 모델 확립 후 9주째 시행하였는데 각 군마다 6마리씩을 각각 비교하여 결과를 확인하였고 통계적으로 분석하였다.

체성 감각 유발 전위 검사 결과, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 두 군들, 즉 PBS 만을 이식한 백서로 구성된 대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군들에 비하여 최초의 반응에 나타나는 잠시 (initial latency)에서 ANOVA test에 의하면, 통계적으로 유의한 호전이 확인되었다.

또한 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 두 군들, 즉 PBS 만을 이식한 백서로 구성된 대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군들에 비하여, 음위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 ( $N_1$  latency) 및 양위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 ( $P_1$  latency) 등의 항목에서 ANOVA test에 의하면 통계적으로 유의한 호전이 확인되었다 ( $p < 0.05$ , Table 1).

Table 1. A comparison of latency in the somatosensory evoked potential study by the transplanted stem cell type

	initial latency <sup>1)</sup>	N <sub>1</sub> latency <sup>2)</sup>	P <sub>1</sub> latency <sup>3)</sup>
PBS <sup>4)</sup> (msec) (n=6)	18.07±5.91	36.35±8.83	71.02±13.06
MSC <sup>5)</sup> (msec) (n=6)	15.38±3.04	29.97±4.41	57.77±16.85
NMSC <sup>6)</sup> (msec) (n=6)	<b>10.93±3.37*</b>	<b>23.20±4.67*</b>	<b>51.55±11.23*</b>

Values are mean±standard deviation (msec).

n ; number of cases

\* p<0.05 by ANOVA test

1. initial latency: latency of the onset of the initial rising phase from the baseline in somatosensory evoked potential study

2. N<sub>1</sub> latency: latency of the peak of the first negative deflection in somatosensory evoked potential study

3. P<sub>1</sub> latency: latency of the peak of the first positive deflection in somatosensory evoked potential study

4. PBS: the group injected with phosphated buffer saline

5. MSC: the group transplanted with mesenchymal stem cells

6. NMSC: the group transplanted with neurally induced mesenchymal stem cells

(2) 진폭의 비교

체성 감각 유발 전위 검사의 진폭의 경우도 각 군마다 6마리씩을 척수 손상 백서 모델 확립 후 9주째 비교하여 결과를 확인하였다. 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군에 비하여 최초로 기록되는 음의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first negative deflection from the baseline ; negative peak amplitude), 최초로 기록되는 양의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first positive deflection from the baseline; positive peak amplitude), 음의 최대 진폭 및 양의 최대 진폭의 절대값의 합 (amplitude between the peak of the first negative and positive deflection; peak to peak amplitude) 등이 증가되는 경향은 보였으나, 통계학적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다 (Table 2).

Table 2. A comparison of amplitude in the somatosensory evoked potential study by the transplanted stem cell type

	negative peak amplitude	positive peak amplitude	peak to peak amplitude
PBS <sup>1)</sup> ( $\mu$ V) (n=6)	3.57 $\pm$ 3.89	5.38 $\pm$ 5.58	8.95 $\pm$ 9.47
MSC <sup>2)</sup> ( $\mu$ V) (n=6)	2.40 $\pm$ 2.77	5.22 $\pm$ 7.17	7.62 $\pm$ 9.93
NMSC <sup>3)</sup> ( $\mu$ V) (n=6)	9.50 $\pm$ 9.79	16.24 $\pm$ 17.98	25.74 $\pm$ 27.71

Values are mean $\pm$ standard deviation ( $\mu$ V).

n ; number of cases

1. PBS: the group injected with phosphated buffer saline
2. MSC: the group transplanted with mesenchymal stem cells
3. NMSC: the group transplanted with neurally induced mesenchymal stem cells

## 나. 운동 유발 전위 검사

### (1) 잠시의 비교

운동 유발 전위 검사는 척수손상 백서 모델 확립 후 9주째 시행하였는데 각 군마다 5마리씩을 비교하여 결과를 확인하였다. 운동 유발 전위 검사 결과 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군들에 비하여 최초의 반응에 나타나는 잠시 (initial latency)가 단축되는 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다 (Table 3).

또한 운동 유발 전위 검사 결과 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군들에 비하여 음위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 ( $N_1$  latency) 및 양위에서 처음으로 가장 큰 편향을 보이는 순간의 잠시 ( $P_1$  latency)도 단축되는 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다 (Table 3).

Table 3. A comparison of latency in motor evoked potential study by the transplanted stem cell type

	initial latency <sup>1)</sup>	$N_1$ latency <sup>2)</sup>	$P_1$ latency <sup>3)</sup>
PBS <sup>4)</sup> (msec) (n=5)	21.32±4.50	35.86±5.71	62.34±8.45
MSC <sup>5)</sup> (msec) (n=5)	21.76±4.43	39.14±4.17	68.16±14.78
NMSC <sup>6)</sup> (msec) (n=5)	15.22±5.65	30.66±7.21	52.68±6.37

Values are mean±standard deviation (msec).

n ; number of cases

1. initial latency: latency of the onset of the initial rising phase from the baseline in somatosensory evoked potential study
2.  $N_1$  latency: latency of the peak of the first negative deflection in somatosensory evoked potential study
3.  $P_1$  latency: latency of the peak of the first positive deflection in somatosensory evoked potential study
4. PBS: the group injected with phosphated buffer saline
5. MSC: the group transplanted with mesenchymal stem cells
6. NMSC: the group transplanted with neurally induced mesenchymal stem cells

## (2) 진폭의 비교

진폭의 경우도 척수손상 백서 모델 확립 후 9주째 비교하였는데, 대조군, 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 그리고 신경분화 유도된 중간엽 줄기세포를 이식한 군마다 5마리씩을 비교하였다.

운동 유발 전위 검사 결과 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군들 즉 대조군 및 중간엽 줄기세포를 이식한 군에 비하여 최초로 기록되는 음의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first negative deflection from the baseline ; negative peak amplitude)이 증가되는 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다 (Table 4).

또한 운동 유발 전위 검사 결과 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군들 즉 대조군 및 중간엽 줄기세포를 이식한 군에 비하여 최초로 기록되는 양의 최대 진폭 (amplitude of the peak the first positive deflection from the baseline; positive peak amplitude)이 증가되는 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다 (Table 4).



그리고 운동 유발 전위 검사 결과 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군들 즉 대조군 및 중간엽 줄기세포를 이식한 군에 비하여 음의 최대 진폭 및 양의 최대 진폭의 절대값의 합 (amplitude between the peak of the first negative and positive deflection; peak to peak amplitude) 에서 진폭이 증가되는 경향을 보였으나, 통계학적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다 (Table 4).

Table 4. A comparison of amplitude in the motor evoked potential study by the transplanted stem cell type

	negative peak amplitude	positive peak amplitude	peak to peak amplitude
PBS <sup>1)</sup> ( $\mu$ V) (n=5)	0.63±0.33	0.90±0.55	1.52±0.84
MSC <sup>2)</sup> ( $\mu$ V) (n=5)	0.42±0.28	0.84±0.62	1.26±0.89
NMSC <sup>3)</sup> ( $\mu$ V) (n=5)	0.91±0.34	1.60±0.81	2.51±1.14

Values are mean±standard deviation ( $\mu$ V).

n ; number of cases

1. PBS: The group injected with phosphated buffer saline
2. MSC: The group transplanted mesenchymal stem cells
3. NMSC: The group transplanted neurally induced mesenchymal stem cells

#### 4. 면역조직화학검사 결과

척수손상 백서 모델에서, 줄기 세포의 이식치료를 시행 받은 후 8주 이후, 줄기세포를 이식한 부위의 척수에서 bromodeoxyuridine와 glial fibrillary acidic protein 를 면역형광 염색하여 현미경으로 관찰한 결과, 아래 그림과 같은 면역 형광 양성세포를 확인할 수 있었다 (Figure 6. A, B).

이와 같은 bromodeoxyuridine와 glial fibrillary acidic protein의 면역 조직 화학 검사 결과를 통하여, 신경계로 분화되었을 것으로 생각되는 세포, 특히 신경교세포의 존재여부를 현미경을 통하여 확인할 수 있었다 (Figure 6).

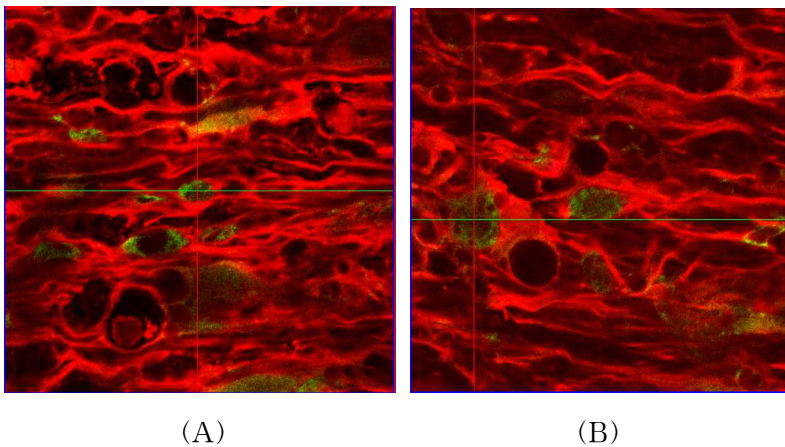


Figure 6. Distribution of transplanted **bromodeoxyuridine** labeled stem cells and **glial fibrillary acidic protein**. (A) Double-color immunofluorescence staining of **glial fibrillary acidic protein** and **bromodeoxyuridine** by confocal microscope 8 weeks after stem cell transplantation. (B) The **bromodeoxyuridine** labeled stem cells survived in spinal cord and were distributed around the transplanted site by immunofluorescent microscopy.

#### IV. 고 찰

척수손상은 최초의 치료에서 부터 재활에 이르는 과정에 걸쳐 자율 신경계, 비노생식계, 소화기계, 호흡기계 및 심혈관계 등에서 심각한 합병증 및 후유증 등이 동반되며, 이에 대한 효과적인 관리와 치료 및 재활을 위하여 많은 경제적 및 사회적 비용이 발생된다. 척수손상의 후유증 및 합병증 등을 최소화하고 삶의 질을 향상시키기 위한 효과적인 관리방법에 대한 연구는 꾸준히 진행되어 왔다. 효과적인 수술 방법이 끊임없이 개발되어 왔으며, 이차적 손상의 기전을 차단하여 손상의 파급과 악화를 방지하는 개념의 치료가 연구되었으며, 손상 후의 신경세포 성장 촉진인자의 투여 시도 등의 치료 방법도 시도되어 왔다. 최근에는 더 나아가 근본적인 치료 방법에 대한 연구가 집중되어 세포이식 등을 통한 중추신경계 재생에 대한 연구가 활발히 모색되고 있다.<sup>18-21</sup> 더불어 손상된 척수신경의 재생을 위한 효과적인 세포내외의 환경의 최적화를 위한 방법으로서 축삭 재생 억제인자의 차단, 신경세포 성장 촉진인자의 투여 등이 세포 이식 수술 등과 더불어 시도되고 있다. 손상된 척수신경의 효과적인 재생을 위하여 최근에는 세포 이식 및 신경세포 성장촉진인자의 사용 등 여러 가지 방법들이 복합되어 시도되고 있다. 현재까지 알려진 주요한 신경성장인자 (neurotrophic factor)로는 fibroblast growth factor, brain derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), glia cell line derived neurotrophic factor (GDNF) 등이 알려져 있다.<sup>22-24</sup>

그런데 최근에는 보다 효과적인 세포를 선별하여 이식하는 치료방법에 대한 연구에 관심이 집중되고 있다. 가장 효율적인 세포를 선별하여 이식치료를 시도할 경우 이식치료의 효과를 극적으로 기대할 수 있으며, 면역반응 등 이식치료에 따르는 각종 부작용 등을 최소화 할 수 있기 때문이다. 최근에는 세포를 선별함에 있어 특히 신경 분화를 유도하여 이식치료에 이용하고자하는 연구가 시도되고 있다.<sup>9,25-28</sup> 본 연구에서도 척수손상 백서모델을 제작하고 신경분화 유도된 세포를

선별하여 이식치료를 시도하였다. 본 연구에서는 신경 분화를 유도하기 위한 특수 배지를 사용하였고, 면역세포화학 염색방법으로 신경계로 분화 유도되는 특징을 가진 세포의 특성을 확인하면서 연구를 진행하였다. 또한 배양한 세포가 신경분화 유도가 이루어 졌는지 확인하기 위하여 NeuN, CNPase, GFAP 및 S100 $\beta$  등으로 면역세포화학 염색 후, 형광 현미경으로 관찰하여 신경분화 유도된 세포의 특성을 지녔는지 확인하였다. 본 연구에서 결과적으로는 척수손상 백서모델에서 신경분화 유도된 중간엽 줄기세포 이식을 시행한 군에서 세포이식 이후에 대조군 등 다른 군에 비하여 객관적인 기능평가에서 유의한 호전을 확인할 수 있어서, 척수손상 백서모델에서 신경분화 유도 중간엽 줄기 세포이식 전 후의 치료 효과를 객관적으로 확인할 수 있었다.

척수손상의 과정은 일반적으로 일차손상 및 이차손상으로 진행된다. 일차손상은 척추 분절의 기계적인 급격한 탈골과 골절편의 전위로 신경이 압박되어 발생되고, 이차손상은 생화학적인 손상에 의하여 진행되는 것으로 알려져 있다. 손상된 척수조직은 부종, 신경축삭의 분절화 및 탈수초화, 핵 파괴와 세포의 허혈성 변화 등이 관찰되고, 출혈성 괴사 및 축삭의 부종 등이 더불어 발생된다. 손상 후에는 다형성 백혈구, 대식세포 및 염증세포의 침윤이 나타나며, 손상된 척수조직 내에는 혈관연축이 발생하게 되어 조직 내 저산소증이 악화되며, 이와 같은 과정을 통하여 이차손상은 더욱 진행된다. 손상된 신경세포는 세포막 이온투과성의 변화를 유발하여 세포 부종, 세포내 산성화 세포내 칼슘이온의 축적 등을 더욱 가속화 시키고, 이러한 세포내 칼슘의 증가는 혈관연축, 세포막의 파괴, 혈소판의 응집 등으로 결국에는 세포의 괴사를 맞이하게 된다.<sup>4,29-33</sup> 본 연구에서는 척수손상 백서모델에서 척수좌상에 의한 불완전 척수손상을 유도하였고 손상 유도 후 약 1주일 후에 줄기세포를 투여하였다. 손상초기 척수조직에는 혈액세포 및 염증세포 등이 침범하여 이때는 손상자체에 의한 세포독성

으로 이식된 세포의 생존율이 감소될 수 있으므로, 적절한 세포이식 시기의 선택이 이식치료의 효과를 위하여 중요한 것으로 알려져 있으며,<sup>34</sup> 본 연구의 백서모델에서는 손상 1주일째에 중간엽 줄기세포 및 신경분화 유도된 중간엽 줄기세포의 이식치료를 시도하였다.

척수손상의 경우 손상의 과정에 따라 치료 과정이 단계적으로 연구 되어 왔다. 심한 척수손상의 경우 수술적 치료방법 및 약물치료 등이 복합하여 사용되는데, 척추가 불안정하여 추가적인 척수손상의 가능성이 있는 경우, 척수의 압박이 계속 잔존하는 경우 및 척추의 전위가 정복이 안 되어 척수 압박이 계속되는 경우 등에 수술적 치료가 필요하다. 약물치료는 이차적 손상기전을 차단하여 손상의 파급과 악화를 방지하는 개념의 치료로서 척수손상 초기에 고용량의 스테로이드 제제의 투여 등이 사용되어 왔다.<sup>7,35-37</sup> 최근 활발히 연구가 진행되는 신경세포 성장촉진인자는 신경세포의 생존을 증가시키고, 신경축삭의 재생을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 신경전달물질의 합성에 관여하는 중요 효소의 합성을 증가시킨다고 알려져 있다. 세포의 이식이 신경기능의 호전을 가져오는 기전에 대하여는 여러 연구가 진행되고 있는데, 척수손상 조직에 이식된 세포가 신경세포 등으로 분화되어 기능 회복을 촉진시키며, 이식된 세포로부터 분비되는 세포의 기질이 축삭 재생을 유발하는 역할을 하며, 축삭의 재생을 촉진시켜 신경기능 회복을 촉진시킨다고 생각되고 있다.<sup>4,8,38-43</sup> 본 연구에서는 세포 이식 후 면역화학검사 등에서 신경세포의 표지자 등을 확인할 수 있어서 이식한 세포가 척수 내에서 축삭 재생을 유발하며 신경계 세포로 분화되었으리라 추론 할 수 있었다.

이식을 위한 이상적인 세포의 특성은 종양 형성의 위험성이 없고, 안전성이 입증되며, 면역 거부반응이 없으며, 충분한 양이 배양될 수 있는 경우가 이식을 위한 이상적인 세포라 할 수 있다. 이식을 위한 적합한 세포를 선별하는 과정은 성공적인 이식치료를 위하여 매우 중요한 과정이다. 이식을 위한 가장 적합하고 효과적인 세포를 선택하

고 배양하는 효과적인 방법들에 대한 중요성이 대두되면서 이에 대한 연구가 최근에 시도되고 있다.<sup>2,44-50</sup> 본 연구에서는 어떠한 세포를 선별하여 이식치료에 이용하는 것이 효과적인지 알아보기 위하여 백서의 골수에서 줄기세포를 획득하여 신경분화를 유도하였다. 기존의 연구들은 사람의 줄기세포를 백서에 이식함으로써 면역 거부반응 등의 부작용, 윤리적인 면 및 치료의 효율성에 관한 문제 등이 있을 수 있으나, 본 연구는 백서의 골수유래 중간엽 줄기세포를 사용하여 백서로 이식하였기에, 이식 후 기능의 평가에서 보다 효과적인 의미있는 결과를 얻었던 것으로 사료된다. 백서의 줄기세포를 사용하였으므로, 면역 거부반응 등의 부작용이 사람의 줄기세포를 이용한 다른 연구에 비하여 크지 않았을 것으로 추정되며, 이식의 효과의 객관적인 평가에서 유의한 호전이 확인되었다.

본 연구에서는 척수손상 동물모델에서 운동기능 회복의 척도로 BBB scale을 사용하여 이식의 효과를 평가하였다. BBB scale은 총 21점으로 구성되어 있으며, 다리에서 발까지의 관절의 움직임 점수화 한 것으로 현재 척수손상 백서의 운동기능에 관한 척도로 일반적으로 사용되고 있다. 평가척도의 항목에는 걸음걸이의 회복여부 및 사지의 조화 및 꼬리의 회복 등까지 속하여 있다. 척수손상을 유도한 후 손상의 정도를 파악하여 점수화하여 일정 점수대의 백서만을 선별하여 실험에 사용할 수 있으므로, 백서의 표준화된 선발에도 도움이 되는 평가 방법이며, 기능 호전의 정도를 평가하는 데에도 효과적인 점수화된 방법이다.<sup>14-16</sup> 본 연구에서는 대조군 및 중간엽 줄기세포를 이식한 군, 신경분화 유도된 줄기세포를 이식한 군 각각에 대하여 손상 후 시점부터 손상 후 63일까지 BBB 점수를 매주 측정하여 통계학적 검증을 한 결과, 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서, 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 호전이 확인되었다. 또한 이식 후 시기별로 각 군 간의 BBB 점수를 평가하였을 때, 이식 3주 후부터 신경 분화 유도된 중간엽 줄기세포를 이식한

군에서 대조군에 비하여 유의하게 BBB 점수가 회복된 소견을 보였다.

이식된 신경줄기세포의 역할에 대하여는 최근 연구가 시도되고 있는데, 신경 영양인자들을 분비하고, 신경손상 후 소실된 신경조직의 대체역할 등을 하는 것으로 알려져 있으며, 수초의 재생에 영향을 주어 척수손상 백서의 신경학적 기능을 회복시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>3,51,52</sup> 본 실험 결과에서 체성 감각 유발 전위 검사 결과, 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군에 비하여 잠시가 유의하게 단축되어 통계적으로 유의한 호전이 확인되었다. 진폭의 경우는 체성 감각 유발 전위 검사 결과, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군에 비하여 진폭이 증가되는 경향을 보였으나, 개체의 수가 적어서 통계적으로 의미 있는 소견을 보이지는 않았다. 추후에 더 많은 개체를 대상으로 실험을 진행한다면 기능의 호전여부를 효과적으로 평가할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다. 운동 유발 전위검사의 경우에도 잠시를 비교하면, 신경분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군에 비하여 잠시가 단축되는 경향을 보였으나, 통계적으로 의미있는 소견을 보이지는 않았다. 역시 추후에 더 많은 개체를 대상으로 실험을 진행한다면 기능의 호전여부를 효과적으로 평가할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다. 진폭의 경우에도 운동 유발 전위 검사 결과 신경 분화 유도된 백서 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 다른 군에 비하여 진폭이 증가되는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의한 소견을 보이지는 않았다. 개체의 수가 적어서 통계학적으로 유의한 소견을 보이지는 않았던 것으로 보이며, 개체의 수가 많았다면 결과 도출에 보다 도움이 되었을 것으로 생각된다. 이식한 척수에서 신경계 세포의 존재 여부를 확인하기 위하여 면역형광 염색 등의 방법이 사용된다.<sup>29,53,54</sup> 본 연구에서는 척수손상 후 세포를 이식한 부위의 척수에서 면역형광 염색을 이

용한 조직검사를 시행한 결과 신경계 세포의 존재여부를 확인할 수 있었다. 이중 면역형광 염색에서 양성으로 나타남으로써, 이식한 세포가 신경계 세포의 일부로 분화하였음을 추정할 수 있었다.

본 연구는 백서모델에서 시도되었는데, 추후 사람을 대상으로 치료에 응용하기 위하여 다음의 과제들이 해결되어야 할 것으로 생각된다. 먼저 적합한 투여시기에 관한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 백서를 대상으로 수상 후 일주일째 이식치료를 시행하였는데, 사람의 경우는 수상 후 언제 이식치료를 시행하는 것이 가장 효과적인가에 대한 연구가 필요하며, 수상 후 오랜 시간이 경과된 척수손상 환자가 현재 대부분인 현실에 비추어 보면, 어느 시기까지의 치료가 효과를 나타내는지에 대한 연구도 중요한 연구과제가 될 수 있겠다. 줄기세포의 효과적인 획득에 관한 연구, 효과적인 배양 및 신경분화 유도방법 등에 대한 문제도 중요한 해결 문제이다. 본 연구에서는 백서의 골수를 획득하여 중간엽 줄기세포의 신경 분화를 유도하여 이식하였는데, 사람의 경우에도 효과적일지에 대한 연구가 진행되어야 하며, 면역반응 및 종양형성 위험성 등에 대한 문제 등을 해결하기 위한 동물모델에서 연구 등이 보다 활발히 이루어 져야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 배양된 세포의 이식경로로 척수내로 직접 주입하는 방법을 선택하였는데, 척수내로 직접 주입하는 방법이 가장 효과적인지에 대하여도 추후 연구가 이루어져야 할 것이다. 한편, 본 연구에서는 불완전 척수손상 동물모델을 대상으로 이식치료를 시행하였는데, 사람의 경우 완전 척수손상 환자가 척수손상 환자에서 차지하는 비율이 높으므로, 백서모델 등에서 완전 척수손상을 유도한 후 이에 대한 이식치료의 효과에 대하여 보다 활발한 기초적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 그리고 본 연구에서는 약 9주까지 BBB 점수를 평가하였는데, 그 이후의 장기적 추적관찰 등이 이루어진다면, 추후 사람의 치료에 응용하는데 보다 효과적인 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.



## V. 결 론

본 연구에서는 척수손상 백서모델에서 신경세포 재생 및 신경기능 회복에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 척수손상 백서모델을 제작하고, 백서의 골수에서 줄기세포를 채취하여 중간엽 줄기세포 및 신경분화 유도된 줄기세포 등을 직접 배양하였고, 각 군으로 나누어 척수내로 이식하였다. 대조군, 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군 및 신경 분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군 등으로 각각 나누어 신경세포 재생 및 신경기능 회복에 미치는 영향을 척수손상 동물모델을 통하여 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

BBB 점수로 평가된 행동검사결과, 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 대조군에 대하여, 중간엽 줄기세포만을 이식한 군에 비하여 이식 후 약 3주 후부터 의미있는 호전이 확인되었다.. 세포 이식 후의 전기 생리학적 검사에서 체성 감각 유발 전위 검사 결과, 신경 분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에 비하여 잠시가 유의하게 단축되어 유의한 호전이 확인되었다.

이상의 결과에서 신경분화 유도된 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 선별하여 이식한 군에서 대조군 및 백서 골수유래 중간엽 줄기세포를 이식한 군에 비하여 가장 효과적인 결과를 나타낸 것으로 미루어 보아, 본 연구는 추후 사람에서 보다 효과적인 세포이식을 위한 세포선별의 기준을 제시하는 귀중한 자료의 하나가 될 것으로 생각되며, 척수손상 환자의 줄기세포 이식을 통한 신경 재생치료의 효율성을 높이고, 치료에 효과적으로 응용하기 위한 토대가 되어, 보다 성공적인 방법을 제시하는데 소중한 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. John FD, David FA, Anthony SB, William HD, Kristofer H, Daniel PL. Special article, a review of the future model spinal cord injury system through the prism of past achievements and current challenges. *J Spinal Cord Med* 2003;26:110-5.
2. Blesch A, Lu P, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, gene therapy and neural stem cell for spinal repair. *Brain Res Bull* 2002;57:833-8.
3. Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol* 1997;148:475-94.
4. Kwon BK, Tetzlaff W. Spinal cord regeneration: from gene to transplants. *Spine* 2001;26:S13-22.
5. Bernstein-Goral H, Bregman BS. Spinal cord transplants support the regeneration of axotomized neurons after spinal cord lesions at birth: a quantitative double labeling study. *Exp Neurol* 1993;123:118-32.
6. Bregman BS, Kunkel BE, Schnell LJ, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995;378:498-501.
7. Woerly S, Doan VD, Evans-Martin F, Paramore cG, Peduzzi JD. Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury. *J Neurosci Res* 2001;66:1187-97.
8. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cell differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-70.

9. Sanchez RJ, Song S, Cordozo PF, Harriz C, Stedeford T, Willing A. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2001;164:247-56.
10. Iwata M, Awaya N, Graf L, Kahl C, Torok-Storb B. Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34+ cells. *Blood* 2004;103:4496-502.
11. Shields LE, Gaur L, Delio P, Gough M, Potter J, Sievekropp A, et al. The use of CD 34(+) mobilized peripheral blood as a donor cell source does not improve chimerism after in utero hematopoietic stem cell transplantation in non-human primates. *J Med Primatol* 2005;34:201-18.
12. Nagaya N, Kangawa K, Itho T, Iwase T, Murakami S, Muiyehara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improve cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128-35.
13. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, Mosna F, et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 2007;40:382-90.
14. Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma* 2002;19:1251-60.
15. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA. MASIS evaluation of open field locomotive scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma* 1996;13:343-59.

16. Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res* 2000;883:165-77.
17. Enomoto M, Wakabayashi Y, Qi ML, Shinomiya K. Present situation and future aspects of spinal cord regeneration. *J Orthop Sci* 2004;9:108-12.
18. Widerstrom-Noga EG, Felipe-Cuervo E, Broton JG, Duncan RC, Yeziarski RPL. Perceived difficulty in dealing with consequences of spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:580-6.
19. Maynard FM Jr, Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF Jr, Donovan WH, Ducker TB, et al. International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. *Spinal Cord* 1997;35:266-74.
20. Goode PS, Allman RM. The prevention and management of pressure ulcers. *Med Clin North Am* 1989;73:1511-24.
21. Berhman AL, Harkema SJ. Locomotor training after human spinal cord injury; a series of case studies. *Phys Ther* 2000;80:688-700.
22. Benak AM, Vocelka CR, Verrier ED. Unique consideration for the spinal cord injured patient undergoing cardiac surgery utilizing cardiopulmonary bypass. *J Extra Corpor Technol* 2003;35:230-7.
23. Dietz V, Harkema SJ. Locomotor activity in spinal cord injured persons. *J Appl Physiol* 2004;96:1954-60.
24. Harkema SJ, Hurley SL, Patel UK, Requejo PS, Dobkin BH, Edgerton VR. Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping. *Neurophysiol* 1997;77:797-811.

25. Chipperfield H, Cool SM, Bedi K, Nurcombe V. Adult CNS explants as a source of neural progenitors. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005;14:146-53.
26. De Leon RD, Roy RR, Edgerton VR. Is the recovery of stepping following spinal cord injury mediated by modifying existing neural pathways or by generating new pathways? A prospective. *Phys Ther* 2001;81:1904-11.
27. Edgerton VR, Leon RD, Harkema SJ, Hodgson JA, London N, Reinkensmeyer DJ, et al. A. Retraining the injured spinal cord. *J Physiol* 2001;533:15-22.
28. Edgerton VR, Roy RR. Invited review; gravitational biology of the neuromotor systems: a perspective to the next era. *J Appl Physiol* 2000;89:1224-31.
29. Faulkner J, Keirstead HS. Human embryonic stem cell derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury. *Transpl Immunol* 2005;15:131-42.
30. Hasegawa K, Chang YW, Li H, Berlin Y, Ikeda O, Kane-Goldsmith N, et al. Embryonic radial glia bridge spinal cord lesions and promote functional recovery following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005;193:394-410.
31. Handriks WT, Eggers R, Ruitenberg MJ, Blits B, Hamers FP, Verhaagen J, et al. Profound differences in spontaneous long term functional recovery after defined spinal tract lesions in the rat. *J Neurotrauma* 2006;23:18-35.
32. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, et al. Human embryonic stem cell derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005;25:4694-705.

33. Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, Endo K, Azuma T, Fujikawa T, et al. New canine spinal cord injury model free from laminectomy. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005;14:171-80.
34. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degeneration axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neurosci* 2001;103:203-18.
35. Kimura H, Yoshikawa M, Matsuda R, Toriumi H, Nishimura F, Hirabayashi H, et al. Transplantation of embryonic stem cell derived neural stem cells for spinal cord injury in adult mice. *Neurol Res* 2005;27:812-9.
36. Klein S, Svendsen CN. Stem cells in the injured spinal cord: reducing the pain and increasing the gain. *Nat Neurosci* 2005;8:259-60.
37. Lepore AC, Bakshi A, Swanger SA, Rao MS, Fischer I. Neural precursor cells can be derived into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. *Brain Res* 2005;1045:206-16.
38. Myckatyn TM, Mackinnon SE, McDonald JW. Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury. *Transpl Immunol* 2004;12:343-58.
39. Ohta S, Iwashita Y, Takada H, Kuno S, Nakamura T. Neuroprotection and enhanced recovery with edaravone after spinal cord injury in rats. *Spine* 2005;30:1154-8.
40. Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ. Stem cells for the treatment of neurologic disease. *Transfus Med* 2003;13:351-61.
41. Roskams AJ, Tetzlaff W. Directing stem cells and progenitor

- cells on the stage of spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005;193:267-72.
42. Zai LJ, Wrathall JR. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 2005;50:247-57.
  43. Anderson TE, Stokes BT. Experimental models for spinal cord injury research: physical and physiological considerations. *J Neurotrauma* 1992;9 Suppl 1:135-42.
  44. Goh EL, Ma D, Ming GL, Song H. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous systems. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:671-9.
  45. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;181:115-129.
  46. Diener PS, Bregman BS. Neurotrophic factors prevent the death of CNS neurons after spinal cord lesions in newborn rats. *Neuroreport* 1994;5:1913-7.
  47. Houle JD, Ye JH. Survival of chronically-induced neurons can be prolonged by treatment with neurotrophic factors. *Neuroscience* 1999;94:929-36.
  48. McDonald JW, Howard MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Prog Brain Res* 2002;137:299-309.
  49. Coumans JV, Lin TT, Dai HN, MacArthur L, McAtee M, Nash C. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci* 2001;21:9334-44.

50. Houle JD, Ye JH. Changes occur in the ability to promote axonal regeneration as the post injury period increases. *Neuroreport* 1997;8:751-5.
51. West NR, Leblanc V, Collins GH. Support of axonal regrowth by endogenous mechanisms following spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology* 2001;21:188-202.
52. Chopp M, Zhang XU, Wang L, Chen J, Lu D. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000;11:3001-5.
53. Kim DH, Gutin PH, Noble LJ, Nathan D, Yu JS, Nockels RP. Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate recovery from traumatic spinal cord injury in the adult rat. *Neuroreport* 1996;2:2221-5.
54. Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* 2000;403:312-6.



## Abstract

Functional recovery after the transplantation of neurally induced mesenchymal stem cells derived from bone marrow in the rat model of spinal cord injury

Yong Rae Kim

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Chang Il Park)

This study was designed to compare the functional outcome of the intraspinal transplantation of neurally induced mesenchymal stem cells and that of mesenchymal stem cells in the rat model of spinal cord injury. Sprague-Dawley rats were anesthetized and subjected to the spinal cord injury model. The rats had undergone the free drop contusion spinal cord injury at a lower thoracic level. An incomplete spinal cord injury was induced using the NYU impactor. Mesenchymal stem cells were obtained from bone marrow of rats. To induce neural differentiation, a basal medium was replaced with Dulbecco's modified eagle medium and fetal bovine serum supplemented with fibroblast growth factor. The rats were randomly assigned into 3 groups. Rats in the control group were injected phosphated buffer saline instead of cell transplantation. Rats in the mesenchymal stem cell

transplanted group were injected mesenchymal stem cells into the spinal cord. Rats in the neurally induced mesenchymal stem cell transplanted group were injected neurally induced mesenchymal stem cells into the spinal cord. Functional outcomes were measured using the Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores and an electrophysiologic study. The Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores were checked every week. A somatosensory evoked potential study and a motor evoked potential study were performed 9 weeks after the spinal cord injury. When the Basso-Beattie-Bresnahan locomotor rating scores were compared among the 3 groups, the neurally induced mesenchymal stem cell transplanted group showed a significant improvement. In the somatosensory evoked potential study, the rats in the neurally induced mesenchymal stem cell transplanted group showed significantly shortened initial latency, N<sub>1</sub> latency and P<sub>1</sub> latency compared with other groups. The neurally induced mesenchymal stem cells transplanted into the rats improved the hind limb performance and shortened latency of a somatosensory evoked potential study. Transplanting neurally induced mesenchymal stem cells may play an effective role in promoting the functional recovery. These results suggest that the proper choice of the stem cells for transplantation could provide the most efficient functional recovery after spinal cord injury.

---

Key Words : spinal cord injury, neurally induced mesenchymal stem cells, cell transplantation, rat model