

척수손상 백서에서 인간 중간엽
성체줄기세포이식이 신경회복에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

오 성 한

척수손상 백서에서 인간 중간엽
성체줄기세포이식이 신경회복에
미치는 영향

지도 윤도흠 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

오 성 한

오성한의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 윤도흠 인

심사위원 서활 인

심사위원 조용은 인

심사위원 이배환 인

심사위원 신지철 인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어서 아낌없는 지도와 격려를 하여 주신 윤도흠 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

아울러 본 연구 계획과 결과에 대해 조언을 아끼지 않으신 서활 교수님, 조용은 교수님, 이배환 교수님, 신지철 교수님께도 감사를 드립니다.

연구의 실험을 위하여 많은 시간과 아낌없는 도움을 주신 이경희 박사님, 오민희 선생님과 하운 교수님께도 감사를 드립니다.

항상 사랑과 관심으로 지켜보아 주신 부모님과 가족들에게도 감사를 드립니다.

개인적으로 본 연구를 통해서 얻어진 것은 줄기세포의 의학적인 유용 가능성뿐만 아니라 보다 중요하게는 사물을 객관적으로 철저히 관찰하는 습관을 얻을 수 있었던 사실입니다.

끝으로 저와 관련 있었던 모든 분들에게도 깊은 감사를 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 중간엽 성체줄기세포의 배양	7
2. 실험모델 제작	8
3. 세포이식 및 신경성장인자의 투여	9
4. 행동검사	10
5. 조직검사	10
가. 척수손상 후 공동의 크기 및 괴사 정도 측정	10
나. 이중면역 염색방법	11
6. 통계처리	11
III. 결과	12
1. 세포배양 검사결과	12
2. 행동검사 결과	13
3. 조직검사 결과	17
가. 척수손상 후 공동의 크기 및 괴사정도	17
나. 면역염색 결과	20
IV. 고찰	23

V. 결론	27
참고문헌	29
영문요약	33

그림 차례

- 그림 1. Characteristic feature of human mesenchymal stem cells treated with basic fibroblast growth factor 12
- 그림 2. Immunocytochemistry for neurofilament 13
- 그림 3. Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scores in each group 15
- 그림 4. Cavity sizes in each group in 8 weeks after treatment 18
- 그림 5. Luxol fast blue-cresyl violet staining of spinal cord 19
- 그림 6. Immunohistochemical staining for bromodeoxyuridine 20

그림 7. Double-color immunohistochemical staining
for human mitochondrial antibody and glial
fibrillary acidic protein 21

그림 8. Confocal image of double-color
immunohistochemical staining for
bromodeoxyuridine and neurofilament . . .
. 22

그림 9. Two confocal images of double-color
immunohistochemical staining for
bromodeoxyuridine and microtubule
associated protein-2
. 23

표 차례

표 1. Means, standard deviations, median, and range of Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scores for all groups over time	14
표 2. Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scores for all groups at post-injury 1 day	15
표 3. ANOVA summary for all groups by Time	17

국문요약

척수손상 백서에서 인간 중간엽 성체줄기세포 이식이 신경회복에 미치는 영향

골수기질 세포는 정상적으로 골, 연골 및 중간엽 세포로 분화한다. 최근 골수기질세포를 실험실내에서 배양한 결과 신경세포로 분화할 수 있는 유연성이 발견되었다. 실험자들은 이러한 세포들을 손상된 신경조직에 이식하여 이들 세포들에서 성장인자들이 발현되거나 내적 줄기세포들을 활성화시켜 조직의 재생과 기능회복에 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있다. 우리는 중등도의 척수손상 백서에서 손상 1주째에 이미 배양된 인간 중간엽 성체줄기세포를 척수 손상부위에 이식하고 섬유모세포 성장인자를 7일간 척수강 내로 매일 투여하여 이식 후 8주 동안 신경기능의 회복과 이식한 세포가 신경세포로 발현되는 여부를 조직검사를 통하여 관찰함으로써, 인간 중간엽 줄기세포 이식과 섬유모세포 성장인자 투여에 따른 기능회복과 조직학적 소견을 규명하고자 하였다. 그 결과 세포이식 5주 이후부터 인간 중간엽 성체줄기세포 이식과 섬유모세포 성장인자를 투여한 실험동물 군이 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식한 군 및 대조 손상 군에 비해서 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) locomotor rating scale상 현격한 행동기능의 개선을 볼 수 있었고, 그리고 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식한 군에서는 대조 손상 군에 비해 행동기능이 더 회복되는 경향을 알 수 있었다. 조직염색으로 human mitochondrial antibody, BrdU(bromodeoxyuridine) 와 GFAP(glial fibrillary acidic protein), NF(neurofilament) 및 MAP-2(microtubule associated protein-2)를 이용한 이중 면역염색결과 손상된 백서의 척수조직의 이식된 부위에서 인간 중간엽 성체줄기세포가 생존하여 신경세포로 표현됨을 확인

척수손상 백서에서 인간 중간엽 성체줄기세포 이식이 신경회복에 미치는 영향

<지도교수 윤도흠>

연세대학교 대학원 의학과

오성환

I. 서론

척수손상은 심각한 육체적, 정신적인 기능장애를 유발하는 매우 파괴적인 손상이다. 이런 척수손상은 대부분이 교통사고 또는 추락사고에 의하며, 활동력이 매우 왕성한 청장년층의 남성에 주로 많이 일어난다.¹ 척수손상 후의 기능장애는 주로 영구적으로 나타나게 되는데 그로 인한 경제적인 손실은 매우 심각하다.¹² 척수 손상의 병태생리는 물리적인 요소에 의한 일차적인 손상과, 이에 따르는 이차적인 손상으로 : 혈액학적인 변화(vaso-motor system의 변화로 인한 혈류변화, 산소분압 및 자가 조절기능의 장애), 전해질의 변화, 생화학적인 변화 (free radical의 형성), 부종, energy 대사 장애, 신경원(neuron)과 신경교(glia)의 괴사 등이 복합적으로 작용한다고 알려져 있다.^{3,4,5} 기계적인 충격에는 척수조직의 직접적인 충격 손상이나 파열 및 계속적인 압박 등이 포함된다. 이러한 기계적 손상이 척수 손상에서 가장 먼저 일어나는 기전이다. 실험적 척수손상 후 조직학적 변화는 손상 후 최초 2~3시간동안에 척수의 회백질(gray matter)부위에 괴사가 일어나기 시작하고, 그 후 점차로 백질(white matter)로 퍼져 3~4시간 후에

야 손상된 척수 조직을 식별할 수 있게 된다. 척수 부종은 24~48시간에 최고도로 심해지고 점차적인 탈수와 축삭의 손실(axonal loss)이 진행되어 종국에는 척수조직의 완전파괴가 일어나는데 이러한 과정은 인체에서는 약 5일간 지속될 때도 있다.²⁴⁶⁷ 이와 같이 척수손상의 병태생리가 밝혀지고, 또한 손상 당시 손상 정도가 결정되는 일차손상의 경우 적절한 치료방법이 개발되고 있는 가운데,⁵⁷⁸⁹ 이차손상 시기의 중재적인 치료 목표는 축삭을 보존하여 그 기능을 최대화하고 신경원과 신경교의 사멸을 최소화 하는 것이며, 그 이후의 목표로는 손상된 축삭의 재생과 끊긴 supraspinal connection을 회복하는 것이다. 축삭의 성장을 자극하는 데는 여러 단계가 필요하나, 최근의 많은 연구결과는 일부 supraspinal projection과 부분적인 기능 회복을 보여주고,¹⁰⁻¹⁹ 구체적으로

- 1) 성장 억제 인자(growth inhibitory molecules)의 중화^{12,19}
 - 2) 축삭의 신장을 돕는 세포나 조직의 이식^{17,20}
 - 3) 축삭의 성장을 증진시키는 신경성장인자의 투여^{15,18}
- 에 초점이 맞추어지고 있다.

인체에 존재하는 세포 및 조직은 생리학적 소실이나 손상에 대해 스스로 재생할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이와 같은 재생능력은 배아줄기세포(embryonic stem cell) 뿐만 아니라, 성인 조직에 존재하고 있는 성체줄기세포(adult stem cell)에서도 기인되고 있으며 현재까지 줄기세포를 포함하고 있는 것으로 알려진 성체 조직들은 골수(bone marrow), 탯줄 혈액(cord blood), 말초혈액(peripheral blood), 뇌(brain), 치수(dental pulp), 혈관(blood vessel), 골격근(skeletal muscle), 피부(skin), 소화관(gastro-intestinal tract), 각막(cornea), 망막(retina), 간(liver) 그리고 췌장(pancreas) 등이며, 이들 이외의 다른 조직에서도 그 존재가 증명되고 있다. 이들 성체 줄기세포들은 그 유래가 확실한 배아줄기세포(embryonic stem cell)와는 다르게 어떤 세포에서 기원하였으며, 또한 인체의 발생 또는 성장의 어

면 시기에서부터 존재하였는지 확실히 규명되어 있지 않다. 그러나 줄기세포의 필수적 요건인 1) 자신과 동일한 세포를 세포 증식을 통해 오랜 시간 만들어낼 수 있고(long-term self-renewal) 2) 특정한 세포형태(morphology)와 특이적 기능을 갖는 성숙한 세포를 만들 수 있다는 것이 증명되었다.

줄기세포는 중간 세포인 전구(조상)세포(precursor, progenitor cell)의 상태로 존재하여 대개 완전히 분화된 상태(terminally differentiated state)가 되기 이전의 중간 단계인 세포 종류(intermediate cell type)를 만들어 외배엽, 내배엽에서 유래하는 세포들까지 분화 할 수 있는 능력(pluripotential differentiation)인 유연성(unorthodox plasticity)이 최근 2~3년 간 in vivo 또는 in vitro 방법으로 증명되어 왔다.⁶²¹⁻²⁴²⁶ 그러나 줄기세포의 채취에 있어서 배아 줄기세포를 얻기에는 아직까지 윤리, 법적인 문제가 있다. 반면에 성체줄기세포(adult stem cell)중 중간엽 성체줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 골수에서 조혈모세포와 함께 발견되는 줄기세포로 일반적으로 조혈작용을 돕는 지지세포(stroma)로 알려져 있으며, 주로 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포로 분화하는 능력이 있다.²³ 그 외에도 간, 심장근, 골격근세포, 신경세포로 분화하는 가소성이 알려지면서 심근경색, 간질환, 근위축, 뇌질환 및 신경손상 등의 세포치료를 위한 가능성이 모색되고 있다.²⁴ 이와 같이 중간엽 성체줄기세포는 줄기세포의 두 가지 특성을 갖고 있으면서 채취가 쉽고, 자가이식이 가능하여 배아줄기세포를 얻는데 따르는 윤리적, 면역학적인 문제가 없으며 또한 성체줄기세포로서 현재까지 그 기능 및 분화능력이 가장 많이 보고 되어 있다.²⁵ 즉, 성인의 골수에 존재하는 중간엽 성체줄기세포는 정상적인 골조직의 유지나 생성에는 크게 관여하지는 않지만 골조직에 위급한 상황이 발생시 중요한 비축적인 역할을 하므로, 중간엽 줄기세포의 수, 증식 및 분화능력은 골질환 뿐만 아니라 신경조직, 심장근, 혈관 내피세포 손상

질환의 치료에도 관심이 집중되고 있다. Chopp 등¹³은 척수손상 동물 실험에서 중간엽 성체줄기세포를 손상부위에 이식하여 신경기능의 회복을 보고하였다.

한편 현재까지 알려진 신경 성장인자(neurotrophic factor)로는 fibroblast growth factor(FGF), nerve growth factor(NGF), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), neurotrophin-3(NT-3), neurotrophin-4/5(NT-4/5), glia cell line-derived neurotrophic factor(GDNF), leukemia inhibitory factor(LIF) 등이 있는데, 이러한 신경성장인자는 척수손상의 재생을 촉진시키는데 매우 중요하며 또한 성인 신경계에 적어도 어느 정도의 신경 유연성(neural plasticity)을 가지고 있을 것으로 추정된다. 실험적으로 손상된 척수조직에 신경성장인자인 NT-3를 투여 하였을 때 손상된 피질-척수 축삭(cortico-spinal axon)의 성장과 부분적이지만 신경기능의 회복을 볼 수 있었고,¹⁰⁻¹⁹ 또한 손상된 피질-척수로(cortico-spinal tract)에 투여한 BDNF와 GDNF로 피질-척수로 주변의 감각-운동 피질(sensory-motor cortex)에 과표현(over-expression)되어 있는 것이 발견되었고 또한 axonal sprouting을 볼 수 있었다.^{8,14} Sanchez 등²⁴은 성인 골수세포에 EGF와 BDNF를 투여하여 신경세포로의 발현을 관찰하였다.

이와 같이 신경성장인자의 투여가 중추신경계의 손상의 경우 치료의 한 방향을 담당할 수 있을 것으로 시사되어 왔으며,⁸ 섬유 모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF;FGF2) 와 epidermal growth factor(EGF)는 줄기세포에 작용하여 증식을 유도하는 mitogen으로서의 기능이 보고 되었다.²⁷ Bianchi 등²²은 실험적으로 건강한 골수 세포에서 신경성장인자의 하나로 알려진 섬유 모세포 성장인자를 투여한 결과 선택적으로 중간엽 성체줄기세포에 작용하여 세포수의 증폭과 성장을 보고하였다. 그러나 이러한 신경성장인자의 반감기는 매우 짧기 때문에 지속적인 효과를 얻기 위하여 신경성

장 인자 유전자를 섬유모세포(fibroblast)에 삽입하여 신경부위에 이식하는 방법이 고안되고 있다.^{28,29}

위와 같은 여러 실험의 결과 중간엽 성체줄기세포와 신경성장인자의 하나인 섬유 모세포 성장인자의 투여는 척수 손상의 치료에 중요한 역할을 담당할 수 있을 것으로 보인다. 이번 연구에서는 백서의 척수손상부위에 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식하고 섬유모세포 성장인자를 투여하여 운동 기능의 개선여부와 인간 중간엽 성체줄기세포로부터 신경 세포의 표현을 관찰함으로써 향후 척수손상 환자에 임상적으로 적용하는데 하나의 실험적인 모델을 제시하고자 하였다.

II. 재 료 및 방 법

1. 중 간 엽 성 체 줄 기 세 포 의 배 양

건강한 인간 골반골에서 혈액의 응고를 막기 위해 약 6,000U heparin이 포함된 주사기를 이용하여 골수를 채취한 후 부피가 1:1이 되도록 Hank's buffered saline solution(HBSS)에 희석하여 Ficoll-Paque(Amsterdam Biosciences, Sweden)로 800g(2000rpm)에서 30분 동안 원심 분리하여 단일핵 세포들을 모아 세포수를 세고, 약 2×10^5 개의 세포를 10% fetal bovine serum(FBS; GIBCO BRL, Carlsbad, CA), 100 U/ml penicillin 및 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle media(DMEM, GIBCO BRL, Carlsbad, CA)가 담겨있는 T25cm² 배양용기에 1ml당 약 2×10^5 개의 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 일주일 후 세포를 현미경을 통해 형태학적으로 관찰하였고, 중간엽 성체줄기세포의 배양 특성인 플라스틱 접시바닥에 붙어서 자라는 것을 확인하였으며, 세포들을 25% trypsin으로 처리하여 4회 까지 계대 배양하였

다. 계대 배양하는 동안에는 세포의 증식을 위해 섬유모세포 성장인자 10ml(1ng/ml)를 투여하였다. 그리고 중간엽 성체줄기세포의 표식인자로 thymidine analog이며 새로 합성된 DNA 표식자인 bromodeoxyuridine(BrdU; 3 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO)을 이식 7일 전 첨가하였다.³⁰

2. 실험모델 제작

척수손상 실험동물로는 300~350g의 수컷 Sprague-Dawley계 백서 40마리(A : 대조 손상 군으로 척수 손상 부위에 배지를 주입한 군 10마리, B : 척수 손상 부위에 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식한 군 22마리, C : 척수 손상 부위에 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식하고 척수강 내에 섬유모세포 성장인자를 매일 7일간 투여한 군 8마리)를 사용하였다. 실험동물에 pentobarbital sodium(50mg/kg)을 복강 내로 주입하여 마취시키고 30 \times 20cm² 아크릴 판에 올려놓은 뒤, 흉요추부위 피부의 털을 전기면도기로 완전히 제거하였다. 척추의 정중선을 따라 피부를 절개하고 제8, 9 흉추의 척추 후궁 절제술을 시행하였다. 제6 흉추부터 제12 흉추까지의 척추 돌기를 확인하고, impactor(NYU Spinal cord dropping device, USA)를 떨어뜨릴 위치인 제 8, 9 흉추 부위의 경막이 완전한 상태로 노출시켰다. 그 후 동물을 impactor에 올려놓고 clamp로 척추돌기를 고정한 뒤, impactor rod를 천천히 내려서 rod가 척추의 표면에 닿은 지점 (0점)을 확인하고 25mm지점에 직경 3.0mm, 무게 10g인 rod를 위치시킨 뒤, rod를 떨어뜨려 손상을 준 후 PC Monitor 상에 나타나는 척수손상 매개 변수들(spinal cord compression parameter)을 확인하여 높이, 속도, 압축비율(compression rate-dD/dt)이 모두 일정 범위에 해당한 것만을 선택하였다. 그 후 동물의 창상을 봉합하고 항생제인 kanamycin(0.6ml/kg)을 근육 주사한 후 온도조절 장치가 부착된 heating pad(homeothermic

blanket, Harvard, MA, USA)에 올려놓고 마취에서 깨 때까지 체온을 36~37°C로 유지하였다. 마취에서 깨어난 이후에는 22±2°C의 chamber에서 사육시키며, 손상 후 신기능이 회복될 때까지 매일 3차례씩 방광을 손으로 짜주었다. 척수손상 후 신경학적 기능 회복의 척도로는 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) locomotor rating scale를 사용하였다.¹⁵ 손상의 표준화는 손상 후 1일에 BBB locomotor score가 0~2점 이었다가, 손상 후 1주일에 5~7점으로 호전된 중등도로 손상된 백서만을 연구대상으로 하였으며, 손상 후 1일에 측정된 좌, 우측 양 하지의 BBB locomotor score가 2점 이상 차이가 있는 경우는 연구대상에서 제외하였다.

3. 세포이식 및 신경성장인자의 투여

표준화된 척수손상 백서만을 대상으로, 대조 손상 군(A)에서는 척수 손상 후 1주일째에 다시 halothan 으로 마취한 뒤 이미 척수손상을 받은 제8, 9 흉추부위를 조심스럽게 다시 노출한 후 손상부위에 배지인 Dulbecco's modified eagle media(DMEM, GIBCO BRL, Carlsbad, CA) 5 μ l를 micro-pipet를 이용하여 주입하였고, 이식 군(B)에서는 1×10⁴cells/ μ l 정도로 배양된 인간 중간엽 성체줄기세포 5 μ l를 손상 부위에 조심스럽게 주입한 후 근육, 피하조직 및 피부를 층을 맞추어 봉합하였다. 이식될 세포는 이식하기 7일 전에 중간엽 성체줄기세포의 표식인자인 bromodeoxyuridine(BrdU; 3 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO)을 세포배양 배지에 첨가함으로써 증식하는 중간엽 성체줄기세포를 먼저 tagging하였으며, 이식 시 중간엽 성체 줄기 세포수가 1×10⁴cells/ μ l 이상인 것으로 세포 이식 전 trypan blue exclusion assay 방법으로 cell viability를 측정하여 90% 이상인 세포를 사용하였다. 이식 군(C)에서는 (B)군에서와 같은 방법으로 손상부위에 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식하였고 동시에 섬유 모세포 성장인자 5 μ l

(0.36 μ g/ μ l)를 척수강 내로 7일 동안 투여하였다. 섬유 모세포 성장인자의 투여는 백서의 후두골 절골술 후 매우 가는 polyethylene tube(PE50; I.D. 0.58 mm / O.D. 0.965 mm, PE10; I.D. 0.11 mm / O.D. 0.61 mm, cley adams, USA)를 손상 받은 흉추8~9번의 위치까지 조심스럽게 척수강 내로 삽입한 후 hamilton syringe를 이용하여 tube를 통해 섬유모세포 성장인자를 주입하였다. Tube의 고정은 후두골주변 부위에 bone cement(methyl-methacrylate)로 하였다. 대조 손상 군(A) 및 이식 군(B)에서도 위와 같은 수술을 시행한 후 척수강 내로는 phosphate buffered saline(PBS; GIBCO BRL) 5 μ l를 7일간 매일 투여하였다. 대조 손상 군을 포함하여 치료 군들에서 중간엽성체줄기세포 이식 후 면역거부 반응을 억제하기 위하여 세포이식 2일 전부터 실험이 종료되는 척수 손상 후 9주까지 cyclosporin A(1mg/100gm)를 매일 복강 내로 투여하였다.

4. 행동검사

표준화된 척수손상의 백서만을 대상으로 BBB locomotor score를 측정하였다.¹⁵ 측정시점은 수술자체 또는 치료약물에 의한 화학적인 변화로 인해 치료 효과의 측정에 잘못된 평가를 할 수 있으므로 치료 1일 째부터 시작하였으며,³¹ 이식 후 8주(손상 후 9주) 까지 1주 간격으로 동물들의 좌, 우측 양쪽 다리의 행동을 측정하여 신경학적 기능의 회복 정도를 관찰하였다. 또한 측정에 있어서는 실험자의 치료에 대한 편견을 배제하기 위해 서로 다른 두 사람이 각기 측정한 평균치를 사용하였다.

5. 조직검사

가. 척수손상 후 공동의 크기 및 괴사정도 측정

손상 후 9주(이식 후 8주)째에 백서에서 30% urethane(3ml/kg, Sigma, USA)을 복강 내에 주입한 후 심장에 생리식염수 및 4% paraformaldehyde를 관류시켜 실험동물을 희생시킨 후 척수손상부위를 조심스럽게 적출하고, 조직을 10% formalin에 넣어 고정한 뒤 paraffin에 포맷된 조직 block을 5 μ m의 두께로 절편하여 coating slide에 부착하였다. 보존된 척수조직의 측정은 Image Pro Express software를 이용하여 매 4번째 시상면 분절의 2.5mm 길이 안의 총 pixel 수에서 손상된 조직의 pixel 수를 감하여 측정하였다. 척수조직의 괴사정도는 Luxol fast blue-cresyl violet을 이용하여 비교하였다.

나. 이중면역 염색방법

Human mitochondrial antibody와 신경세포의 표식자인 glial fibrillary acidic protein(GFAP), 그리고 인간 세포의 표식자인 BrdU에 대한 항체(sheep poly-Ab, 1:100; Biodesign, Saco, Maine)와 신경세포의 표식자인 neurofilament(DAKO, Carpinteria, CA, USA) 또는 microtubule associated protein-2(MAP-2, mAb, 1:100;Sigma, St. Louis, MO)를 반응시킨 후 이차항체로 Texas red가 결합되어있는 anti-sheep antibodies(anti-sheep poly-Ab, 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA)와 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합되어 있는 anti-mouse antibodies(1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 반응 후 confocal microscope(LSM 510, ZEISS, Germany)으로 검경하였다.

6. 통계처리

대조 손상 군 및 이식 군들 각각에 대하여 손상 후 1일째를 포함하여 세포이식 시점부터 손상 후 9주(이식 후 8주)까지 BBB locomotor

score를 매주 측정하여 통계학적 검증을 하였다. 손상 1일째 각 군 간의 좌측 및 우측 다리에 차이가 있는지 알아보기 위해 평균차 검정을 paired t-test로 실시하였다. 각 군별로 치료 후 시간에 따른 행동기능상의 회복정도는 paired t-test로 검증하였고, Bonferoni 방법으로 p-value를 보정하였다. 또한 시점별로 각 군 간의 차이가 존재하는 경우 Duncan 방법으로 다중비교를 하였다. 모든 분석의 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 결과

1. 세포배양 검사결과

채취한 인간 골수 기질세포를 원심분리한 후 섬유모세포 성장인자가 포함된 배지에 배양한 결과 배양된 세포가 중간엽 성체줄기세포의 특성이 배지 바닥에 붙어서 자라는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

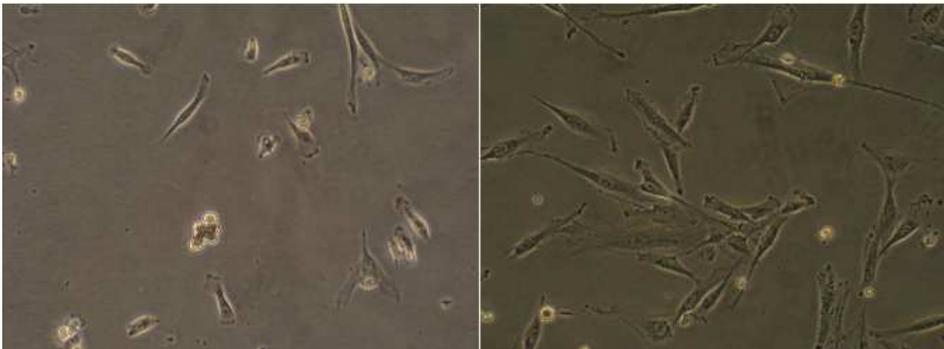


Fig. 1. Characteristic feature of human mesenchymal stem cells treated with basic fibroblast growth factor. The cells were tightly adhered to plastic dishes (left x100, right x200).

또한 신경세포의 표식자인 neurofilament(NF)에 대해 양성반응을 보였다(Fig. 2).

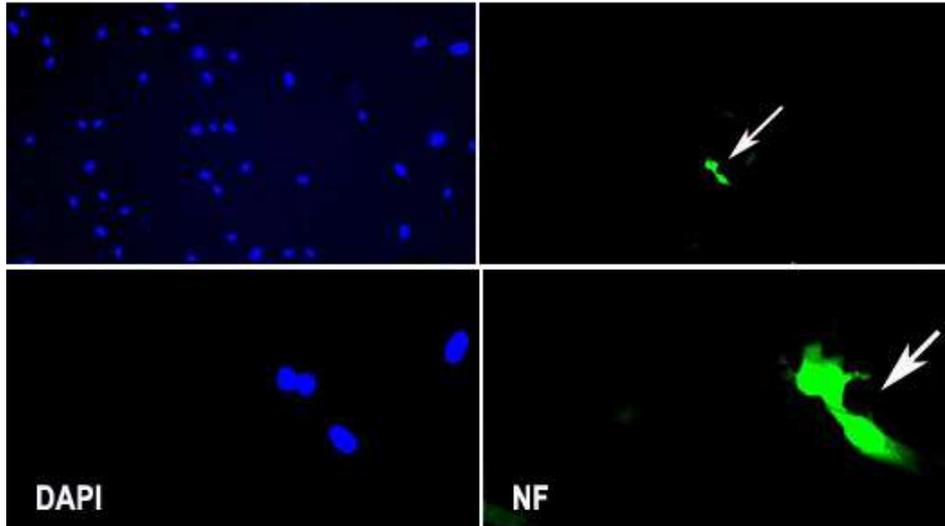


Fig. 2. Immunocytochemistry for neurofilament(NF). Cultured human mesenchymal stem cells stained for expression of NF that exhibits neuronal phenotype (green color, white arrow).

DAPI=DNA-specific fluorochrome 4'-6-diamidino-2-phenylindole

2. 행동검사 결과

척수 손상 백서에서 손상 1일째, 이식당일(손상 후 1주일) 그리고 그 후 1주 간격으로 8주(손상 후 9주) 동안 실험 군 모두에서 좌측 및 우측 다리의 BBB locomotor score를 측정하였다(Table 1)(Fig. 3). 손상 전 모든 실험동물에서 측정된 점수는 21점으로 일관적인 몸통의 안정성과 꼬리 끝이 항상 위쪽으로 향하는 형태를 보였다. 척수 손상 후 1일째에 측정된 좌, 우측 뒷발이 동일한 정도로 손상을 받았음을 확인하였다(Table 2).

Table 1. Means, standard deviations, median, and range of Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scores for all groups¹ over time

		Time (week)									
Treatment	Injury	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Group A											
N	10	10	10	10	10	10	7	7	7	6	
Mean	0.70	5.75	8.10	9.15	9.65	10.25	9.86	10.00	9.93	10.00	
Standard deviation	0.63	0.63	0.57	0.41	0.47	0.98	0.85	0.76	1.13	0.84	
Median	0.75	6.00	8.00	9.00	10.00	11.00	9.50	10.00	9.50	9.75	
Range(min-max)	2(0-2)	2(5-7)	2(7.5-9.5)		1(9-10)	2(9-11)	2(9-11)	3(9-12)		2(9-11)	
Group B											
N	22	22	22	22	22	22	18	18	18	13	
Mean	0.68	5.55	7.84	8.95	9.34	9.64	10.06	10.69	11.03	11.27	
Standard deviation	0.42	0.51	0.81	0.55	0.71	0.82	0.92	1.10	1.24	1.49	
Median	0.75	5.50	7.50	9.00	9.00	9.50	9.50	10.25	11.00	11.00	
Range(min-max)	1.5(1-1.5)	2(5-7)	3(6.5-9.5)		3(8-11)	3(9-12)	3(9-12)	3.5(9.5-13)		4.5(9.5-14)	
Group C											
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Mean	0.63	5.69	8.63	9.19	9.56	9.94	10.94	11.63	11.81	12.69	
Standard deviation	0.58	0.59	1.16	0.37	0.42	0.56	0.56	0.92	1.00	1.25	
Median	0.50	6.00	8.50	9.25	9.50	9.75	10.75	11.50	12.00	12.75	
Range(min-max)	1.5(0-1.5)	1.5(5-6.5)	3(7-10)		1(9-10)	1.5(9.5-11)	1.5(10.5-12)		3(10-13)		
			1(8.5-9.5)				2.5(10.5-13)	4(10-14)			

¹ Media infusion in Group A(Control), Mesenchymal stem cells transplantation in Group B, and Mesenchymal stem cells transplantation and basic fibroblast growth factor infusion into CSF in Group C

Table 2. Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scores¹ for all groups² at post-injury 1 day

Group	Case	Left	Right	Difference	p-value*
A	10	0.70±0.82	0.70±0.67	0.00±0.82	1.00
B	22	0.64±0.58	0.73±0.55	-0.09±0.75	0.58
C	8	0.63±0.52	0.63±0.92	0.00±0.93	1.00

¹ mean ± SD.

² Media infusion in Group A(Control), Mesenchymal stem cells transplantation in group B, and Mesenchymal stem cells transplantation and basic fibroblast growth factor infusion into CSF in Group C

* Paired t-test

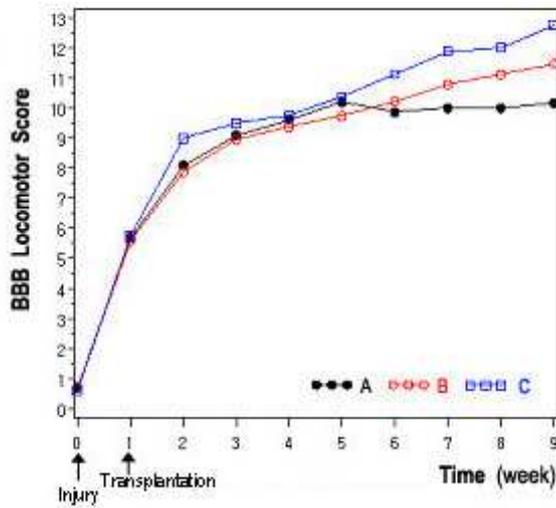


Fig. 3. Basso, Beattie and Bresnahan locomotor scores in each group. A=Media infusion(control, black color), B=Mesenchymal stem cells transplantation(red), C=Mesenchymal stem cells transplantation and basic fibroblast growth factor infusion into CSF(blue).

시간의 흐름에 따라 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식한 군과 섬유모세포 성장인자를 함께 투여한 군의 경우 시간이 지남에 따라 치료 효과가 좋아지는 경향을 보였다. 즉, 대조 손상 군의 경우 손상 후 약 4주(이식 후 3주)까지는 유의한 신경기능의 회복을 보였으나($p < 0.05$), 그 이후 실험 종료시점인 9주(이식 후 8주)까지는 더 이상의 회복 없이 고정된 형태를 보였다. 반면에 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식한 군에서는 손상 후 약 5주(이식 후 4주)까지 그리고 6주(이식 후 5주)에서 7주(이식 후 6주)까지 유의한 신경기능의 회복을 볼 수 있었고($p < 0.05$), 5주(이식 후 4주)에서 6주(이식 후 7주) 그리고 7주(이식 후 6주)에서 9주(이식 후 8주)까지는 유의한 변화를 볼 수 없었으나 계속 증가 추세를 보였다. 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식하고 섬유모세포 성장인자를 함께 투여한 군의 경우 손상 후 약 2주(이식 후 1주)까지 그리고 약 5주(이식 후 4주)에 비해 6주(이식 후 5주)에서 9주(이식 후 8주)까지 유의한 변화를 보였고($p < 0.05$), 유의한 변화는 아니지만 9주(이식 후 8주)까지 지속적인 증가 추세를 보였다(Fig. 3, paired t-test, Bonferroni p-value Correction).

시점별로 각 군간의 행동기능상의 회복정도는 손상 후 1일부터 5주(이식 후 4주)까지 각 군간에 유의한 차이가 없었으나, 손상 후 6주(이식 후 5주)에서 치료 종료 시점인 손상 후 9주(이식 후 8주) 까지 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식하고 섬유모세포 성장인자를 함께 투여한 군이 대조 손상 군에 비해 그리고 손상 후 6주(이식 후 5주) 및 9주(이식 후 8주)에서 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식하고 섬유모세포 성장인자를 함께 투여한 군이 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식한 군에 비해 유의한 차이를 보였다(Table 3).

Table 3. ANOVA summary for all groups¹ by Time

Time(week)	Source	Num df	Den df	F value	Pr>F	Multiple comparison* (Ducan's method)
Injury	Group	2	37	0.05	0.95	
1	Group	2	37	0.52	0.59	
2	Group	2	37	2.58	0.09	
3	Group	2	37	0.93	0.40	
4	Group	2	37	1.00	0.37	
5	Group	2	37	1.98	0.15	
6	Group	2	37	3.94	0.03	A/C*, B/C*
7	Group	2	37	5.06	0.01	A/C*
8	Group	2	37	4.88	0.01	A/C*
9	Group	2	37	7.34	0.003	A/C*, B/C*

¹ Media infusion in Group A(Control), Mesenchymal stem cells transplantation in group B, and Mesenchymal stem cells transplantation and basic fibroblast growth factor infusion into CSF in group C

* p<0.05

3. 조직검사 결과

가. 척수손상 후 공동의 크기 및 괴사정도

척수 손상 후 발생하는 형태학적 변화인 공동의 크기를 손상 후 9주 (이식 후 8주)에 비교 관찰하였는데, 대조 손상 군에 비해 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식한 군과 섬유모세포 성장인자를 함께 투여한 군에서 유의 있게 척수 공동의 크기가 줄어들었다. 그러나 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식한 군과 동시에 섬유모세포 성장인자를 함께 투여한 군 간에 의미 있는 차이를 보이지는 않았다(Fig. 4).

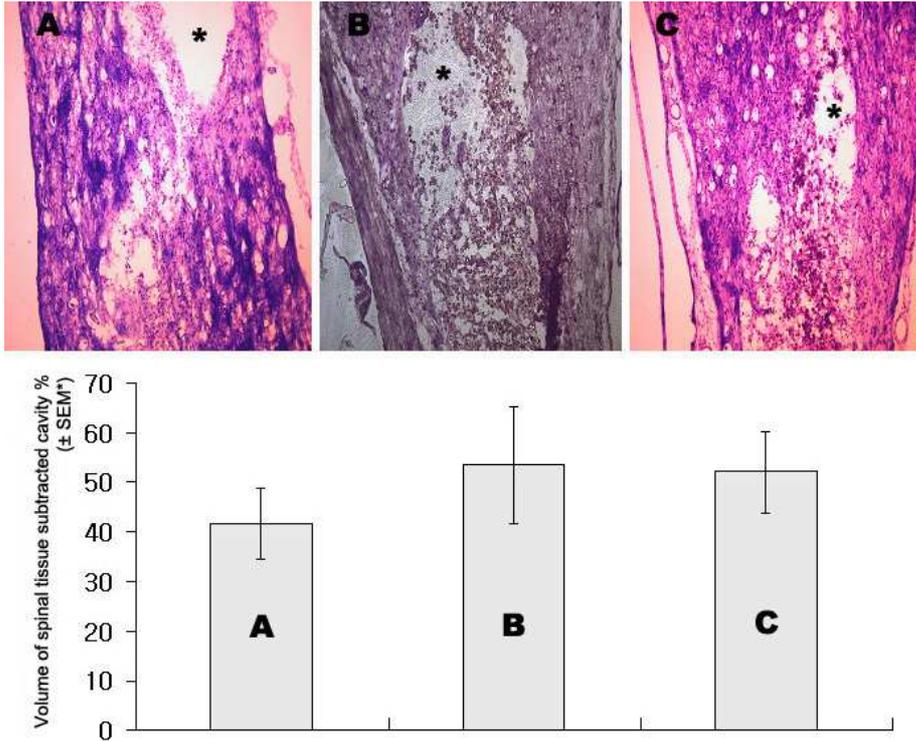


Fig. 4. Cavity sizes in each group in 8 weeks after treatment *Upper*; Cavities(star, *) in each group after 8 weeks treatment(Cresyl-Violet stain, x100, MetaMorph). *Lower*; Estimated volume of spared spinal tissue % of uninjured cord in each group after 8 weeks treatment. The spared volume in control group was significantly smaller than human mesenchymal stem cells transplantation, and human mesenchymal stem cells transplantation group with basic fibroblast growth factor infusion into CSF ($p < 0.05$), but there was no significant difference between human mesenchymal stem cells transplantation group and human mesenchymal stem cells transplantation group with basic fibroblast growth factor infusion into CSF (One-way ANOVA test).

A=Media infusion group(N=4), B=human Mesenchymal stem cells transplantation group(N=4), C=human Mesenchymal stem cells transplantation group with basic fibroblast growth factor infusion into CSF(N=4).

SEM=standard error of the mean

손상 후 대조 손상 군과 중간엽 성체줄기세포 이식 군과의 척수 조직의 양상을 Luxol fast blue-cresyl violet 염색을 통해 관찰한 결과 대조 손상 군에 비해 세포 이식 군에서 괴사, glial scar 형성 및 탈수초화 현상이 훨씬 더 약하게 관찰되었다(그림 5).

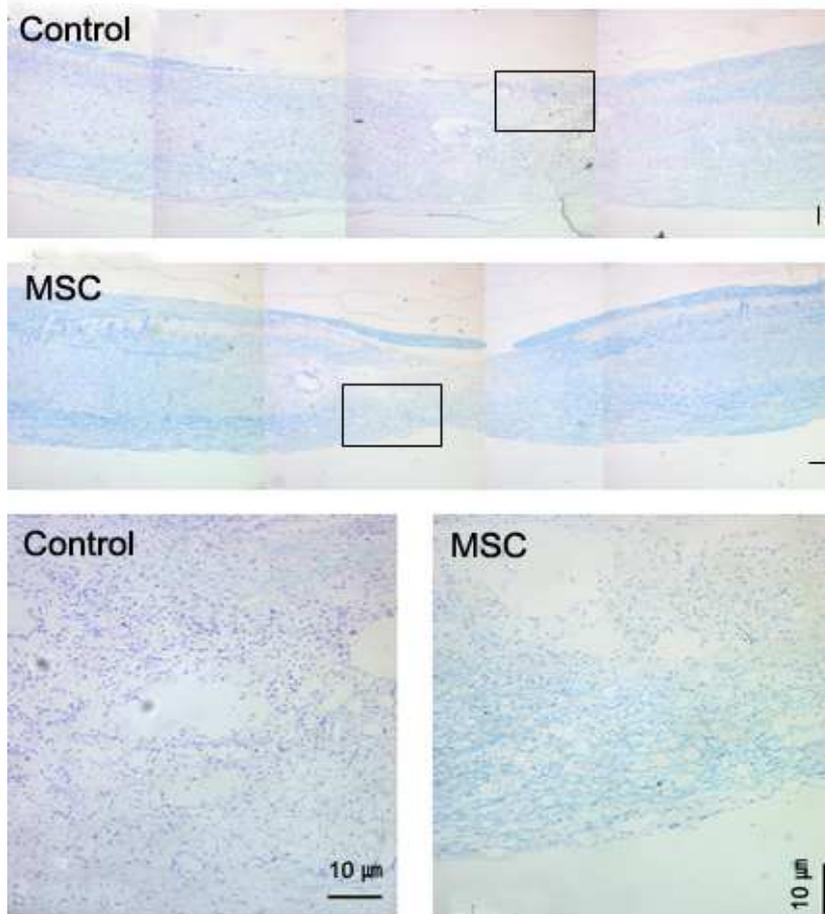


Fig. 5. Luxol fast blue-cresyl violet staining of spinal cord in control and human mesenchymal stem cells transplantation groups. The spinal cord of the control group showed extensive necrosis, glial scar formation and demyelination. However those were attenuated in human mesenchymal stem cells transplantation group.

MSC=mesenchymal stem cells transplantation group, Scale bars=10 μ m.

다. 면역염색 결과

척수손상 후 인간 중간엽 성체줄기 세포 이식과 섬유모세포 성장인자를 매일 척수강 내로 투여하고 8주가 지난 후(척수 손상 9주째)에 척수손상분절을 포함한 상하 2개 척수분절의 척수를 대조 염색한 결과 인간 골수세포의 표식자인 BrdU에 양성인 세포가 손상된 척수의 공동 주변에서 관찰 되었다(Fig. 6).

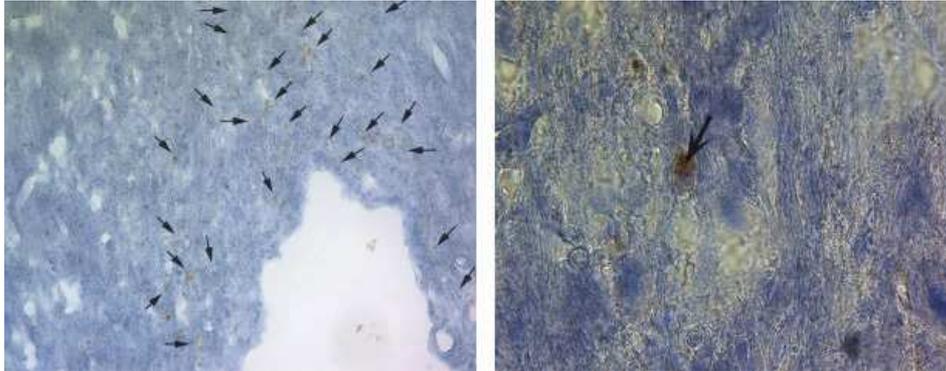


Fig. 6. Immunohistochemical staining for BrdU¹. Human mesenchymal stem cells were labelled in spinal cord injured rat section 8 weeks after transplantation. Human mesenchymal stem cells transplantation group with basic fibroblast growth factor infusion into CSF stained for expression of BrdU(black arrows) around the cavity, that exhibits positive human mesenchymal stem cell marker and survive in spinal cord injured rat(Hematoxylin counterstaining, left x100, right x400).

¹BrdU=bromodeoxyuridine

척수손상 백서에 이식한 인간 중간엽 성체줄기 세포로부터 신경계 세포로의 분화가능성 여부를 확인하기 위해서 human mitochondrial antibody 및 인간 골수세포의 표식자인 BrdU와 신경세포의 표식자인 GFAP, NF 및 MAP-2를 이용하여 이중 면역 염색을 한 결과 양성인 세포를 관찰 할 수 있었고 이것은 이식된 인간 중간엽 성체줄기세포가 손상된 백서의 척수 조직에서 생존하여 신경 분화의 발현 가능

성이 제시되었다(Fig. 7, 8, 9).

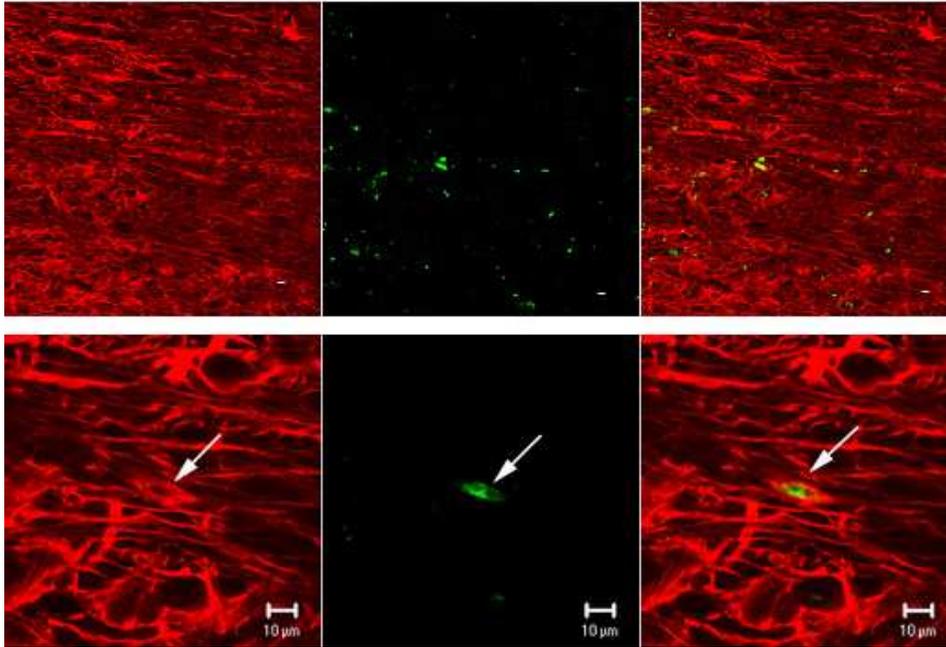


Fig. 7. Double-color immunohistochemical staining for human mitochondrial antibody and GFAP¹ in human mesenchymal stem cells transplantation group. The cells can be identified by double color labelling of red color for GFAP and green for human mitochondrial antibody, which exhibits transplanted human mesenchymal cells survive and have potential to neuronal differentiation in spinal cord injured rat (white arrow).

¹GFAP=glial fibrillary acidic protein

Scale bars=10 μ m

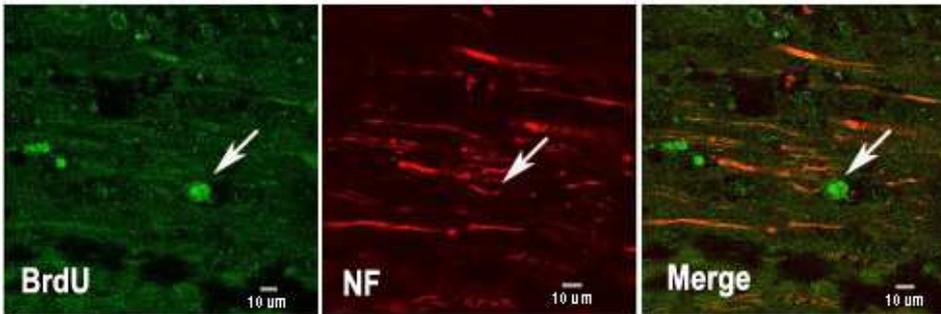


Fig. 8. Confocal image of double-color immunohistochemical staining for BrdU¹ and NF² in human mesenchymal stem cells transplantation group with basic fibroblast growth factor infusion into CSF. The cells can be identified by double color labelling of green color for BrdU in their nucleus and red for NF in their filament that exhibits transplanted human mesenchymal stem cells survive and have potential to neuronal differentiation in spinal cord injured rat(white arrow).

¹BrdU=bomodeoxyuridine, ²NF=neurofilament

Scale bars=10μm

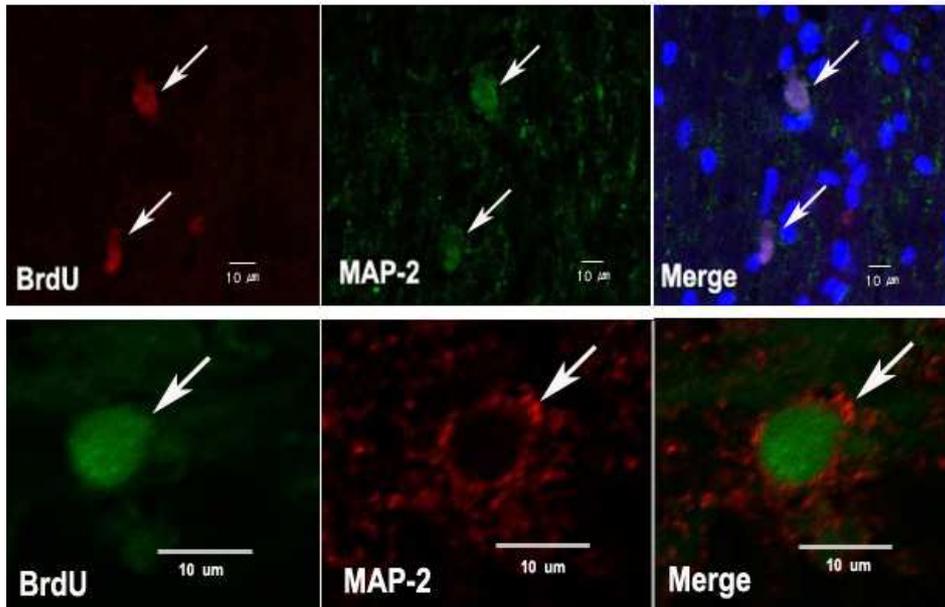


Fig 9. Two confocal images of double-color immunohistochemical staining for BrdU¹ and MAP-2² in human mesenchymal stem cells transplantation group with basic fibroblast infusion into CSF. *Upper*, the cells can be identified by double color labelling of red color for BrdU in their nucleus and green for MAP-2. *Lower*, on the contrary, green for BrdU and red for MAP-2, which exhibit transplanted human mesenchymal stem cells survive and exhibit neural phenotype in spinal cord injured rat.

¹BrdU=bromodeoxyuridine, ² MAP-2=microtubule associated protein-2

Scale bars=10 μ m

IV. 고찰

우리는 인간의 골수 기질세포에 있는 중간엽 성체줄기세포를 섬유모

세포 성장인자가 포함된 배지에 배양하여 실험 백서에서 척수 손상 후 1주째에 이러한 세포들을 이식하거나 동시에 섬유모세포 성장인자를 척수강 내로 주입한 결과 대조 손상 군에 비해 신경기능의 개선을 관찰할 수 있었다. 그리고 척수손상 백서에 이식된 인간 중간엽 성체줄기 세포로부터 신경계 세포가 표현되는지의 여부를 확인하기 위해 이식 8주(척수 손상 9주)째에 척수손상분절을 포함한 상하 2개 척수 분절의 척수를 인간세포의 표식자인 human mitochondrial antibody와 BrdU 그리고 신경세포의 표식자인 GFAP, NF 및 MAP-2를 이용한 이중 면역 염색을 하였으며 그 결과 양성인 세포들이 척수손상 부위에서 관찰되어 척수손상 백서의 척수조직에 이식된 중간엽 성체줄기 세포로부터 신경세포의 발현 가능성을 제시할 수 있었다.

척수 손상 후 발생하게 되는 형태학적 변화인 공동의 크기를 비교한 결과 대조 손상 군에 비해 인간 중간엽 성체줄기 세포를 이식한 군과 섬유모세포 성장인자를 척수강내로 함께 투여한 군에서 척수 공동의 크기가 줄어들었으며, 대조 손상군의 경우 세포 이식 군에 비해 괴사, glial scar 및 demyelination 정도가 더 심한 것을 관찰할 수 있었다.

손상 초기 척수조직에는 혈액세포 및 염증세포들이 침범하므로 이때에 세포를 이식하는 것은 손상자체에 의한 세포독성으로 이식된 세포의 생존율을 감소시킬 수 있으며, 또한 caspase-3의 유리와 p75 death receptor pathway의 활성화로 이식된 세포가 apoptosis-inducing molecule에 노출될 위험성이 있어 손상 1주일째에 세포이식과 신경 성장인자를 주입하였다^{32,33}.

행동기능 검사에서 세포이식 5주 이후부터 신경기능이 향상된 이유는 아마도 이식한 중간엽 성체줄기세포와 투여한 섬유 모세포 성장인자의 지속적인 상호작용으로 신경학적기능이 더 호전 되었을 것으로 생각된다. 인간 중간엽 성체줄기 세포와 함께 투여한 성장인자가 척수손상 후 어떠한 기전으로 행동 기능의 개선을 가져 올 수 있었는지에 대한 하나의 설명으로 이식된 세포가 손상된 조직의 신경세포를

대치하였을 가능성이 있다. 그러나 우리는 손상된 척수 내에서 이식된 세포로부터 신경세포 표식인자에 표현되는 것을 관찰할 수 있었지만, 과연 이 세포들이 실질적으로 신경세포로 분화하여 신경계 기능을 담당하였을 지에 대해서는 명확히 증명할 수 없었다. 더욱 합리적인 설명은 이렇게 이식된 세포들이 손상된 조직 내에서 어떠한 인자들인, cytokine 또는 성장인자들을 발현하여 활발한 조직 재생이나 손상된 조직 내의 내적(endogeneous) 줄기세포의 기능을 활성화 하였을 가능성이 있고, 이번 연구에서 이식한 중간엽 성체줄기세포와 투여한 섬유모세포 성장인자가 그러한 역할을 하였을 것으로 생각된다.

Ramer 등³⁴은 실험동물에서 척수 후근 절단술(dorsal rhizotomy) 후에 신경성장인자인 NGF, NT-3, GDNF로 처리한 경우 척수 감각신경 축삭의 기능적 재생을 관찰할 수 있었으나, BDNF로 처리한 경우는 그러한 변화를 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 특별한 신경성장인자들이 손상된 신경기능을 개선할 수 있음을 의미한다.

우리가 이식한 세포가 정확히 신경골수 기질세포의 줄기세포(stem-like)인지 또는 전구(조상)세포(progenitor-like)의 부분집단인지 아니면 이식 후 신경기능의 회복이 그 두 세포집단의 상승 작용에 의한 것인지 알 수는 없으나 배지 바닥에 붙어서 자라는 골수 기질세포들을 손상된 조직에 이식 시 다양한 성장인자들을 생산하는 것으로 생각된다. 즉, 손상된 조직자체가 미분화 세포인 줄기세포와 전구(조상)세포(progenitor cell) 이식에 도움이 되는 어떠한 환경을 제공할 것으로 생각된다. 몇몇 문헌들의 뇌 손상 동물 실험에서 뇌손상 후에 배아 또는 발생단계의 유전자와 단백질들이 발현됨을 밝혀냈다.³⁵⁻³⁸

Cramer 등³⁹은 뇌손상 실험동물에서 특히 손상된 중추신경주변에서 발생 초기의 단백질이 발현되고, 뇌경색 후 운동기능의 회복과정이 정상적인 발생과 유사하며, 뇌경색 후 성인 뇌의 mapping 형태가 소아의 것과 흡사한 것으로 보아 성인에서 중추신경이 손상되면 발생단계의 상태로 변형될 수 있음을 시사하였다.

우리의 이번 실험은 Woodbury 등,²¹ Bianchi 등²² 과 Sanchez 등²⁴의 실험에서 섬유모세포 성장인자가 중간엽 성체 줄기세포의 증식을 증가시키며, 또한 이러한 세포들에서 신경세포가 표현되었고, Li¹⁸ 등과 Gritt²⁷ 등이 동물실험에서 보여준 섬유모세포 성장인자가 유사분열을 조절하고, 적색척수로 축삭의 재생을 촉진하였다는 선행 연구자들의 연구배경을 근거로 섬유모세포 성장인자를 투여하여 동물실험을 하였다. 그 결과 섬유모세포 성장인자 투여 후 중간엽 성체 줄기세포로부터 신경세포가 표현되는 것을 확인할 수 있었지만, 척수 손상 후 신경기능의 회복에 있어서 다른 어떠한 신경성장인자들이 발현되고 또한 섬유모세포 성장인자가 어떠한 기전으로 작용하는가에 대해서는 더 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이번 실험에서 손상 부위에 중간엽 성체 줄기 세포 이식 후 섬유모세포 성장인자를 척수강 내로 투여한 군이 중간엽 성체 줄기 세포들을 이식한 군 보다 손상 후 6주(이식 후 5주) 및 실험 종료 시점인 손상 후 9주(이식 후 8주)에 신경기능회복이 현격히 개선된 것은 척수손상 시 섬유모세포 성장인자가 신경기능의 회복에 중요한 역할을 하는 인자라고 생각된다.

중간엽 성체줄기세포로부터 신경세포로의 발현을 이중면역 염색인 human mitochondrial antibody, BrdU와 GFAP, NF 및 MAP-2를 이용하여 확인해 보았고, 그 결과 척수손상 백서에 이식된 중간엽 성체 줄기세포로부터 신경세포의 발현 가능성을 제시할 수 있었으나, 표현되는 세포 수 자체는 현미경 시야에서 많지는 않았다. 그러나 세포이식 군 또는 섬유모세포 성장인자를 투여한 군에서 척수손상 백서의 신경기능이 회복된 이유는 세포 수 자체보다는 이렇게 이식된 세포들 자체 또는 투여한 섬유모세포 성장인자에 의하여 활발한 조직 재생이나 손상된 조직 내의 내적(endogenous) 줄기세포의 기능을 활성화하였을 것으로 생각된다. 하지만 중간엽 성체 줄기세포에서 얼마나 많은 세포들이 구체적으로 어떠한 신경세포로 발현되고, 그 세포들이 과연 기능을 하였는지, 또한 어떠한 기전으로 신경기능이 개선되었는

지에 대해서는 더 연구가 필요하리라 생각된다.

앞으로 중간엽 성체 줄기세포가 다른 줄기세포에 비해 가지고 있는 장점들을 활용하여 신경질환에 임상적으로 적용하기 위해서는 중간엽 성체 줄기세포의 생존과 분화의 조절이라는 중대한 문제를 해결하여야 할 것으로 생각된다. 구체적으로, 1) 중간엽 성체줄기세포를 분리하고 정제하는 중간엽 성체줄기세포 특이 인자, 2) 중간엽 성체줄기세포를 이식하여도 줄기세포의 성질을 유지하면서 많은 수로 증식할 수 있는 성체줄기세포 배양, 3) 중간엽 성체줄기세포로부터 여러 종류의 각 lineage로의 분화 시 나타나는 인자, 4) 유연성(unorthodox plasticity) 및 안정성에 대한 문제로 우리가 목적하는 세포로만 분화하는 직접적인 분화, 그리고 5) 중간엽 성체줄기세포 채취 시 공여자의 통증, 수여자에 있어서는 병의 이환 및 면역 억제제의 투여 등의 문제에 대한 연구가 매우 중요할 것으로 생각된다.

V. 결론

우리는 중등도의 척수손상 백서에서 손상 1주째에 배양된 인간 중간엽 성체줄기세포들을 손상된 척수에 이식 또는 섬유모세포 성장인자를 척수강 내로 투여한 뒤 약 8주 동안 행동기능의 회복 정도를 BBB locomotor rating scale로 확인하고, 이식한 세포로부터 신경세포의 표현여부를 조직검사를 통하여 관찰하였다. 그 결과 인간 중간엽 성체줄기세포 이식과 섬유모세포 성장인자를 투여한 군에서 인간 중간엽 성체줄기세포를 이식한 군과 대조 손상 군에 비해 뚜렷한 행동기능의 개선을 볼 수 있었고, 인간 중간엽 성체줄기세포 이식 군의 경우 대조 손상 군에 비해 신경기능이 더 회복되는 경향을 알 수 있었다. 그리고 이식된 세포의 생존과 신경세포로의 표현을 human

mitochondrial antibody와 GFAP, 그리고 BrdU와 NF 및 MAP-2를 이용한 이중 염색으로 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 골수의 성체줄기세포가 다른 줄기세포에 비해 가지고 있는 장점과 더불어 골수로부터 추출된 중간엽 성체줄기세포와 섬유모세포 성장인자가 앞으로 척수 손상의 치료적 중재 역할을 하는 연구를 정당화할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 척수손상을 포함한 신경질환에 임상적으로 적용되기 위해서는 중간엽 성체 줄기세포의 생존과 분화의 조절이라는 중대한 문제를 해결하여야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 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.
2. John FD, David FA, Anthony SB, William HD, Kristofer H, Daniel PL, et al. 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;26:110-115.
3. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome section. *Anat Rec* 1946;94:239-247.
4. Chin DG. Cell death in acute spinal cord injury. Yonsei Graduate Univ.; 1999.
5. Zhang HY. Alteration of apoptosis in acute spinal cord injured rat with methylprednisolone treatment. Yonsei Graduate Univ.; 2000.
6. Christopher DS, Sahail KM. Epidemiology of traumatic spinal cord injury. *Spine* 1999;13:401-409.
7. Sanchez CK. Special section. Model SCI system clinical activities of the model spinal cord injury system. *J Spinal Cord Med* 2002;25:339-344.
8. 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.
9. Yoon DH, Kim YS, Weiss Y. Pre-injury treatment of methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Korean Neurosurg* 1996;25:1568-1575.
10. Armin B, Paul L, Mark HT. Neurotrophic factors, gene therapy and neural stem cells for spinal cord repair. *Brain Res Bull* 2002;57(6):833-838.
11. Blesch A, Uy HS, Grill RJ, Cheng JG, Patterson PH, Tuszynski MH.

- LIF augments corticospinal axon growth and neurotrophin expression after adult CNS injury. *J Neurosci Res* 1999;59:3556-3566.
12. Bradbury EJ, King VR, Simmons LJ, Priestley JV, McMahon SB. NT-3, but not BDNF, prevents atrophy and death of axotomized spinal cord projection neurons. *Eur J Neurosci* 1998;10:3058-3068.
 13. Chopp M, Zhang XU, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, et al. Spinal cord injury in rat : treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000;11:3001-3005.
 14. Zhou L, Baumgartner BJ, Hill-Felberg SJ, McGowen LR, Shine HD. Neurotrophin-3 expressed in situ induces axonal platicity in the adult injured spinal cord. *J Neurosci* 2003;15:1424-1431.
 15. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12:1-21.
 16. Grill R, Murai K, Blesch A, Gage FH, Tuazynski MH. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17:5560-5572.
 17. Li Y, Field M, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 1997;277:2000-2002.
 18. Li Y, Kim D, Himmes BT, Chow SY, Schallert T, Murray M, et al. Transplants of fibroblast genetically modified to express brain-derived neurotrophic factor promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J Neurosci* 1999;19:4370-4387.
 19. Z'Graggen WJ, Metz GA, Kartje GL, Thlmair M, Schwab ME. Functional recovery and enhanced corticofugal plasticity after unilateral pyramidal tract lesion and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors in adult rats. *J Neurosci* 1998;18:4744-4757.
 20. Ramon CA, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avilla J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 2000;25:425-435.

21. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-370.
22. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal stem cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 2003;287:98-105.
23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiwal RK, Douglis R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
24. Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247-256.
25. Kim YH. Neuronal stem cell : Role of neurotrophic factors on survival and differentiation of neuronal stem cell. *Exp Mol Med* 2002(suppl Mar);34:79-91.
26. Park SR. Mesenchymal stem cell. *Exp Mol Med* 2002;34(suppl Mar):103-118.
27. Gritt A, Frolichsthal SP, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, et al. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 1999;19:3287-3297.
28. Prockop DJ. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J Cell Biol* 2003;160:807-809.
29. Kim DH, Gutin PH, Noble LJ, Nathan D, YU JS, Nockels RP, et al. Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate recovery from traumatic spinal cord injury in the adult rat. *Neuroreport* 1996;2:2221-2225.
30. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication.

- Science 1982;218:474-475.
31. Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analysing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma* 2002;19:1251-1260.
 32. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neurosci* 2001;103:203-218.
 33. Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, Qin F, Malladi S, Ameenussin S, et al. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol* 2000;166:213-226 .
 34. Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* 2000;403:312-316.
 35. Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Immunoreactivity of cyclin D1/cdk4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Metab* 1997;17:846-856.
 36. Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M, Jiang N. Immunoreactivity of cyclin D1/cdk4 in neurons and oligodendrocytes after focal cerebral ischemiss in rat. *J Cereb Blood Metab* 1997;17:846-856.
 37. Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein-2, growth-associated protein-43, and cyclin-D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998;29:1972-1980.
 38. Sahin Kaya S, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Chopp M. Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain. *Brain Res* 1999;840:153-157.
 39. Cramer SC, Chopp M. Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 2000;23:265-271.

Abstract

Effects of human mesenchymal stem cells transplantation in repair of spinal cord injured rats

Sung Han Oh

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Do Heum Yoon)

Bone marrow stromal cells normally give rise to bone, cartilage, and mesenchymal cells. Recently, bone marrow stromal cells have been shown to have the capacity to differentiate into neural cells under experimental cell culture conditions. Some investigators suppose that these cells when placed into an environment of injury, express factors that promote repair or active compensatory mechanisms and endogeneous stem cells within the injured tissue, but there are few preclinical studies on the use of human bone marrow stromal cells in the spinal cord injury model. Rats were subjected to a weight driven implant spinal cord injury. After 1 week, the rats were treated with cultured human mesenchymal stem cells(hMSCs) transplantation and/or basic fibroblast growth factor(bFGF) infusion into the CSF space. Functional outcome measurements using the Basso-Beattie-Bresnahan score were performed weekly to 8 weeks post-injury. Sections of tissue were analyzed by double-labeled immunohistochemistry for human mesenchymal stem cells identification and neural differentiation. These data showed significant functional outcome in the group treated with MSCs transplantation and bFGF administration

compared with the group with MSCs transplantation and control, which means bFGF might take an important role to improve functional outcome. The MSCs transplantation group had a tendency to improve compared with control group. Immunohistostaining for human mitochondrial antibody and GFAP(glial fibrillary acidic protein), and BrdU(bromodeoxyuridine) and NF(neurofilament) or MAP-2(microtubule associated protein-2) were positive in scattered cells derived from MSCs, which exhibited transplanted hMSCs survived and had potential to neuronal differentiation in spinal cord injured rat. For clinical application, it is vital to solve the problems of stem cells survival and control of its differentiation. In this study, we have not demonstrated intrinsic mechanism of neurotrophic factor affecting neural repair. However, our experiment is consistent with a growing literature that MSCs and neurotrophic factor promote tissue repair and functional recovery after spinal cord injury and suggest that MSCs transplantation and bFGF warrants investigation as a therapeutic intervention after spinal cord injury.



Key Words : spinal cord injury, rat, human mesenchymal stem cells, basic fibroblast growth factor, neuronal differentiation