

저온 유도된 흰쥐 뇌손상 모델에서  
인간간엽줄기세포의 이식이  
신경기능 회복에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 한 성

저온 유도된 흰쥐 뇌손상 모델에서  
인간간엽줄기세포의 이식이  
신경기능 회복에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 한 성

저온 유도된 흰쥐 뇌손상 모델에서  
인간간엽줄기세포의 이식이  
신경기능 회복에 미치는 영향

지도 박 용 구 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 한 성

# 김한성의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 아낌없는 지도와 격려를 하여 주신 은사 박용구 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

연구 과정 내내 애정과 관심으로 자상한 조언과 자문을 주신 장진우 교수님, 이배환 교수님, 박국인 교수님, 김동욱 교수님께 심심한 감사를 드립니다. 또한 본 논문이 완성될 때까지 실험에 참여하여 큰 도움을 주신 임상의학센터의 조윤희 선생님과 저를 신경외과 의사로 만들어 주신 연세대학교 신경외과교실과 모든 선생님들께 깊이 머리 숙여 감사를 드립니다.

지금 곁에 계신다면 저의 성취를 한없이 자랑스러워하셨을 아버지, 시종일관 사랑으로 보살피 주신 어머니, 저를 항상 지켜보시고 격려해 주신 장인, 장모님께 가슴 깊이 감사드립니다.

끝으로, 묵묵히 믿고 따라주는 사랑하는 아내 영미와 무엇과도 바꿀 수 없는 소중한 두 딸 유진, 유리에게 작은 기쁨이 되기를 바라며 이 영광을 바칩니다. 감사합니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 인간간엽줄기세포의 분리와 배양 .....	7
2. 세포면역염색 .....	8
3. 저온 뇌손상모델 제작 .....	8
가. 실험 동물 .....	8
나. 저온성 대뇌피질 손상 .....	9
다. 뇌손상 평가방법 .....	10
(1) 반대쪽 앞발적응보행검사 .....	10
(2) Symmetry of movement .....	10
(3) Forelimb flexion angle .....	11
(4) Climbing the inclined test board .....	12
라. 실험 그룹 .....	13
4. 인간간엽줄기세포의 이식 .....	13
5. 이식조직의 면역조직화학적 평가 .....	14
6. 자료 분석 .....	15
III. 결과 .....	16
1. 배양된 인간간엽줄기세포의 세포면역염색 .....	16
2. 저온 뇌손상모델의 대뇌피질 특징 .....	17
3. 인간간엽줄기세포 이식과 앞발운동기능회복 정도 .....	19
4. 인간간엽줄기세포 이식 부위의 면역조직화학적 평가 .....	21

IV. 고찰 .....	23
V. 결론 .....	27
참고문헌 .....	28
영문 요약 .....	34

## 그림 차례

그림 1. 저온 뇌손상모델에서 앞발운동피질 위치 .....	9
그림 2. 앞발적응보행검사 .....	11
그림 3. 인간간엽줄기세포 이식부위 .....	14
그림 4. 인간간엽줄기세포의 면역세포화학검사 .....	17
그림 5. 뇌손상모델의 triphenyltetrazolium 염색 .....	18
그림 6. 뇌손상모델의 병변부 hematoxylin-eosin 염색과 cresyl violet 염색 .....	19
그림 7. 인간간엽줄기세포 이식후 신경기능의 변화 .....	20
그림 8. 인간간엽줄기세포 이식후 병변부 면역조직화학검사 .....	22

## 표 차례

표 1. Modified rat stroke motor score .....	12
표 2. 각 그룹간 신경학적 점수의 변화 .....	21



## 국문요약

저온 유도된 흰쥐 뇌손상 모델에서 인간 간엽 줄기세포의 이식이  
신경기능 회복에 미치는 영향

본연구의 목적은 성숙기 흰쥐에 저온유도 뇌손상모델을 만들고, 인간간엽줄기세포를 정위적으로 이식한 후에 행동학적 변화를 관찰하고자 하였다.

액화질소를 이용하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시킨 금속막대를 쥐의 앞발부위 운동중추피질의 경막에 접촉시켜 대뇌피질손상모델을 만들었다. 이 과정으로 실험동물에게 심각한 운동장애를 유발하는 국소병변을 만들 수 있었다.

사람의 골반에서 신선한 인간간엽줄기세포를 얻을 수 있었고, 시험관내 배양하였을 때 신경세포에 특이적 단백질을 이용한 면역염색으로 신경세포의 존재가능성을 간접적으로 확인할 수 있었다. 저온 뇌손상모델을 만든 6일째 인간간엽줄기세포( $3 \times 10^5$  hMSCs)를 이식하였다. 모든 실험동물을 병변을 만든지 7주차에 희생시켜, 뇌를 적출하여 이식된 인간간엽줄기세포를 확인하기 위한 면역염색을 시행하였다.

뇌손상전과 뇌손상후에 정기적으로 앞발적응보행검사와 앞발의 운동기능을 확인하기 위한 여러 가지 신경학적 검사를 시행하여 점수화하였다. 인간간엽줄기세포를 이식한 실험동물군은 대조군에 비하여 행동검사시 더 향상된 결과를 보였다. 또한, 미리 BrdU로 표지한 이식세포를 통해서 뇌손상모델에서 인간간엽줄기세포들이 생체내, 특히 손상부위 주위에 안착된 것을 확인할 수 있었고, 극히 일부에서는 신경세포와 정상세포의 표지자를 확인할 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 골수에서 채취한 인간간엽줄기세포가 뇌손상모델에서 신경기능의 회복을 보였고, 중추신경의 재생에 기여함을 확인하여, 뇌손상에 대한 가능한 치료방법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

---

핵심되는 말 : 인간간엽줄기세포, 뇌손상모델, 저온, 이식

저온 유도된 흰쥐 뇌손상 모델에서 인간 간엽 줄기세포의 이식이  
신경기능 회복에 미치는 영향

< 지도교수 박 용 구 >

연세대학교 대학원 의학과

**김 한 성**

**I. 서 론**

교통수단이 발달하고 사회가 복잡해지면서 다양한 사고에 의한 외상성 뇌손상의 발생빈도가 급격히 증가하고 있다. 아직까지 정확한 국내통계는 보고되고 있지 않아 외국의 통계를 인용하여 외상성 뇌손상 환자의 분포를 추정해보면 미국의 경우 해마다 약 200만례 이상의 외상성 뇌손상 환자가 발생하고 있다.<sup>1</sup> 이중 약 80% 정도는 경도의 두부손상으로 비교적 양호한 예후를 보이고 있으나, 나머지 약 20%의 환자는 중등도 이상의 뇌손상을 보여, 마비, 식물상태, 사망 등의 심각한 후유증을 남기고 있다. 발생하는 성별로는 남성이 여성보다 약 2배정도 빈도가 높으며 연령으로는 젊은 층에서 빈발하고 있다.<sup>2,3</sup> 이는 생산적인 사회활동을 왕성하게 하여야 할 나이에 영구적인 장애를 남기는 뇌손상이 발생함으로 인하여 사회경제적인 부담을 증가시키는 문제점을 야기하고 있다.<sup>4,5</sup> 그러나 외상으로 인한 두부손상의 치료에 있어서 신경외과적 수술을 통한 혈종제거 등의 방법 외에 아직까지 손상 받은 신경을 재생시키거나 회복시킬 수 있는 뚜렷한 의료기술이 개발되지 않고 있어 많은 환자들이 영구적인 장애로 고통을

받고 있는 실정이다. 현재 약물치료나 유전자 치료, 일부의 세포대체법 등의 많은 치료법들이 시도되거나 연구되고 있지만, 아직 신경을 재생시키거나 신경축색성장을 크게 촉진시키지는 못하고 있는 실정이다.

외상성 뇌손상(traumatic brain injury, TBI)은 사람에게 있어서 가장 흔한 후천적 뇌손상으로, 여기에는 기계적, 허혈성(ischemia), 흥분성독성(excitotoxicity)의 요소가 존재하며<sup>6,7</sup>, 이는 사고발생 후 오랫동안 지속되는 운동 및 인지기능의 장애를 초래하게 된다. 최초의 기계적인 손상 후에, 이차적인 반응이 유발되어 허혈성 및 흥분성독성에 의한 손상이 유발된다.<sup>7-9</sup> 중추신경계의 외상은 뇌허혈, 부종, 전해질 불균형, 에너지대사이상, 생화학적 변화 등을 포함하고 있으며, 궁극적으로는 2차적인 신경기능이상과 신경세포사망 등을 초래하게 된다.<sup>10,11</sup> 또한, 이러한 변화들은 손상조직의 주변에 나쁜 환경을 조성하여 최초의 손상에 직접 노출되지 않은 세포들에게도 방관자효과(bystander-effects)를 초래하여 잠재적으로 유해한 상황이 될 수 있다. 외상성 뇌손상의 일차적 치료의 목적은 직접 손상에 따른 파괴과정을 없애는 것으로, 두부 외상에 대한 전통적인 치료법으로는 병변을 외과적으로 제거하는 수술요법과 이차적인 합병증의 예방하는 약물치료로 구성되어 있다. 그러나, 어떠한 치료에도 불구하고, 이러한 외상으로 인한 신경세포의 손실은 피할 수 없으므로, 손상 받은 뇌의 완전한 회복을 위한 가능한 방법으로 중추신경계 내에서 뇌세포와 동화(integration)될 수 있거나, 신경세포로 분화되어, 중추신경계의 기능적 연결성을 회복시킬 수 있는 인간배아 줄기세포(embryonal stem cell), 골수 등에서 얻을 수 있는 간엽세포(marrow-derived stromal cell), 신경줄기세포(neural stem cell), 유전적으로 조작된 세포들을 직접 이식하는 것이 연구되고 있다.<sup>12-15</sup> 이러한 세포들 중의 하나인 성체줄기세포는 골수, 혈액내, 각막, 맥락막, 대뇌, 골격근, 간과 피부 등에 존재하여, 일생동안 지속적으로 스스로를 복원하

고 재생시키고 있다. 그러나, 중추신경계에 존재하는 신경성 줄기세포(neural stem cell)는 새로운 신경세포로 자라는 능력이 미약하여, 손상이나 퇴행성 변화에 의한 신경세포의 소실 후에 신경세포를 대체시키지 못한다. 어떤 줄기세포들은 중추신경계내에서 뇌세포로 분화할 수 있는 능력을 갖고 있기도 하나, 그 기전은 명확하게 밝혀지지 않았다. 그 가능성으로는 전구세포(progenitor cell)들이 뇌로 동화(integration)되어 손상에 의해 파괴된 신경세포나 교세포의 기능을 대신하는 것으로 추측하고 있으며, 다른 가능성으로는 이식된 세포들이 손상받은 세포들을 지지하여 숙주세포(host cell)들을 보호하는 것으로 추정하고 있다.<sup>16</sup>

최근에, 다양한 잠재적 치료법으로 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)에 대한 관심이 높아졌는데, 이러한 간엽줄기세포들은 조혈기능이외에도, 인대세포(tenocyte), 지방세포(adipocyte), 골세포(osteocyte), 연골세포(chondrocyte), 평활근세포(smooth muscle cell)등으로 분화될 수 있다고 한다.<sup>17,18</sup> 또한, 이 간엽줄기세포들은 성장인자들은 분비할 수 있어서<sup>19,20</sup>, 중추신경의 회복에 있어서 그들의 가능성들이 인정되고 있다.<sup>21,22</sup> 성인의 골수(bone marrow)는 상대적으로 쉽게 간엽줄기세포를 얻을 수 있는 곳으로, 현재 광범위한 임상실험이 진행되고 있다. 최근의 연구에서는, 성인 골수에서 얻은 세포들을 in vitro에서 쉽게 증식시킬 수 있고, 배양조건을 조절하여 신경외배엽계 세포들과 연관된 표지자를 갖게 만들 수 있게 되었다.<sup>23-25</sup> 신경 표지자의 발현이 그 가능성을 직접적으로 의미하는 것은 아니지만, 골수에서 얻은 세포들을 일부 뇌경색부위에 직접 이식하거나 정맥으로 주사하였을 때, 신경기능의 회복을 얻을 수 있었다.<sup>26,27</sup> 비슷하게, 설치류 실험에서도 골수세포들을 직접 이식 또는 정주하여 척수에서 재수초화(remyelination)를 유발할 수 있었다.<sup>28</sup> 또 다른 실험에서는, 설치류 골수세포를 방사선을 쬐인 다른 쥐에게 이식하였을 때, 뇌로 이동하여 소교세포

(microglia)나 성상세포(astrocyte)로 분화된 것을 확인 하였다.<sup>18,19</sup> 또한, 쥐의 선조체(striatum)이나 측뇌실(lateral ventricle)에 이식하였을 때도, 배양된 간엽줄기세포들이 뇌로 이동하여 성상세포들로 분화하였다.<sup>20,21</sup>

본 연구에서는, 성인의 골반에서 성체줄기세포를 채취하여, in vitro에서 배양한 후, 외상성 뇌손상을 받은 쥐의 대뇌에 정위적으로 이식하여 신경기능의 회복에 대한 영향을 조사하였다. 본 연구는 외상성 뇌손상의 치료법으로 성체줄기세포의 잠재적 사용가능성의 연구로 발전되기를 기대한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 인간간엽줄기세포의 분리와 배양

정상인의 골반에서 11G 주사기로 10 ml의 골수(bone marrow)를 채취하였다. 각 10 ml의 골수액을 10 ml의 Hank's balanced salt solution(HBSS; Gibco, Invitrogen, NY, USA)로 희석한 후, 골수조직내의 단핵구들을 Ficoll density gradient(Ficoll-Paque, Pharamcia, CA, USA)로 원심분리하였다. 20 ml의 시료내에 있는 약 5 ml의 Ficoll을 실온에서 800 xg로 30분간 원심분리하였다. 단핵구층만을 떼어낸 후 HBSS로 2회 세척하였다. 세포들을 3000rpm으로 5분간 원심분리후 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone, Logan, Utah, USA)와 1% penicillin streptomycin (Gibco, Invitrogen, NY, USA)와 같이 섞었다. 세포들을 25 cm<sup>2</sup>의 배양용기(T-25)에 붙인 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 배양하였다. 24시간 후에 비접착된 세포들은 제거하였다. 접착된 세포들은 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후, 붙어있는 간엽세포들을 떼기 위해 흔들어서 새로운 DMEM 배지를 추가하였다. 배지는 2일 간격으로 새로 바꿔주었고, 세포들은 배양용기의 70-90%를 차지하도록 키웠다. 세포들을 37°C에서 0.05% trypsin-EDTA로 5분간 처리한 후, 세포들을 75cm<sup>2</sup> 배양용기(T-75)로 다시 옮긴후 basic fibroblast growth factor bFGF (10 ng/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 DMEM 배지에서 다시 키웠다. 접시에 붙어있는 인간간엽 줄기세포들을 10일째 분리하였다.

## **2. 세포면역염색**

배양된 세포들을 PBS에서 4% paraformaldehyde로 고착시킨후, 4°C에서 밤새 1차 항체로 숙성시켰다. 1차항체로는 다음과 단클론성항체(monoclonal antibody)들을 사용하였다: anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP dilution 1:200; Sigma, St. Louis, MO, USA), mouse anti-neurofilament protein (NF dilution 1:40; Dako, Denmark), neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1 dilution 1:400; Covance, CA, USA), and Map-2 (dilution 1:200; Sigma, St. Louis, MO, USA). 1차 항체의 확인을 위해서, 형광 표지한 Cy3-conjugated IgG 2차 항체(Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)를 실온에서 2시간 숙성(incubation)시켰다. 세포들을 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 표지한 후, confocal microscope (Zeiss, LSM 510, Stuttgart, Germany)으로 확인하였다.

## **3. 저온 뇌손상모델 제작**

### **가. 실험 모델**

모든 실험과정은 실험동물의 고통과 수를 최소화 하도록 하였다. 실험동물은 몸무게 220-230 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat) 35마리를 이용하였다. 실험동물은 하나의 사육장에 5마리씩 사육하고 먹이와 물을 충분히 공급하였다. 이 사육장은 온도와 습도가 일정하게 조절되고 12시간 간격으로 점등 및 소등하는 방에서 관리하였다.



## 나. 저온성 대뇌피질 손상

흰쥐를 ketamine (75 mg/kg), acepromazine (0.75 mg/kg), rompun (4 mg/kg)가 혼합된 약물을 복강내 주사하여 마취한 후, 설치류용 정위 고정장치를 이용하여 두부를 단단히 수평으로 고정하였다. 두피를 절개하고 우측 측두근을 박리하여 외측으로 견인하였다. 좌측 대뇌 앞발 운동중추 부위 (정중선으로부터 측방으로 3.0 mm, bregma로부터 전후방으로  $\pm 2$  mm 되는 지점)<sup>29</sup>에 전기드릴을 이용하여 직경 4 mm 정도의 두개골 절제술을 시행하였고, 이때 경막은 손상받지 않도록 주의하였다(그림 1). 두개골이 절제된 곳을 통해 자체 제작한 액화질소로 냉각시킨 금속막대 (tip의 직경 3 mm, tip의 온도  $-70^{\circ}\text{C}$ ; 그림 1.)으로 운동중추에 해당하는 부위의 경막과 닿게 한 후, 30초씩 5회를 시행하여 병소를 만들었다.<sup>30</sup> 상처부위를 봉합한 후 충분한 물과 사료를 공급하였다. 흰쥐들은 인간간엽세포 이식 후 6주에 면역조직화학적 분석과 호스트조직내로의 인간간엽줄기세포의 생착을 확인하기 위해 희생시켜 뇌조직을 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색하여 병변을 확인하였다.

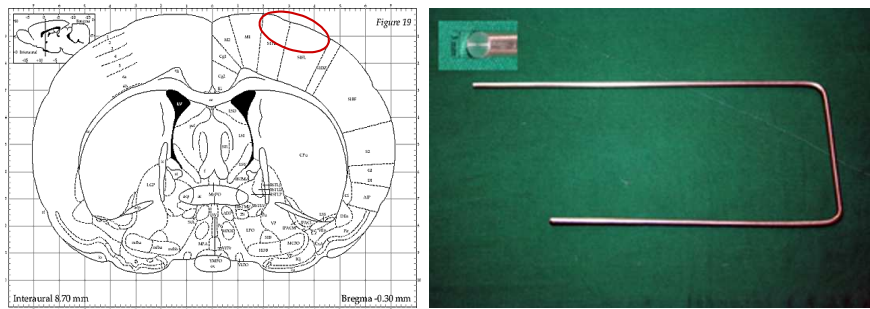


그림 1. 저온 뇌손상모델에서 앞발운동피질 위치. 두개골 절제술을 시행하고 외상성(저온성) 뇌손상을 주기위해 병변을 만드는 좌측 앞발에 대한 운동대뇌피질 부위 (왼쪽), 자체제작한 직경 3 mm의 금속막대 (오른쪽).

## 다. 뇌손상 평가방법

손상된 운동피질을 확인하기 위해서, 병변을 만든 다음날에 쥐들을 테스트하였다. 신경학적 점수화는 전족기능을 특별히 평가하기 위해 변형된 rat stroke motor score(표 1)를 사용하여 평가하였다.<sup>31</sup> 또한, 90cm/12 sec로 움직이는 달차(treadmill)에서 반대쪽 앞발적응보행검사(contralateral forepaw adjusting step)를 시행하였다.<sup>32</sup> 이러한 검사는 세포이식후 2, 4, 6주에서 5회씩 번갈아 시행하였다.

### (1) 반대쪽 앞발적응보행검사

쥐를 90 cm/12 sec 속도로 움직이는 달차(treadmill)위에 올려 놓고, 쥐의 뒷다리가 들리도록 실험자의 손으로 몸통을 들어올려 앞발로만 체중을 지탱하도록 한다(그림 2). 그리고 실험자의 다른 한손으로 쥐의 앞발 중 하나를 잡아 쥐가 한쪽 앞발로만 체중을 지탱하도록 하면, 쥐가 몸의 균형을 잡기 위해 체중을 지탱하고 있는 한쪽 앞발로 보행을 하게 되는데 그 횟수를 측정하였다.

### (2) Symmetry of movement

허공에서 쥐의 꼬리를 잡고 들고서 쥐의 앞발의 움직임이 대칭적인지 관찰하였다. 점수화는 다음과 같이 하였다; 3, 앞발의 움직임이 대칭적; 2, 병변반대쪽 앞발의 움직임이 동측보다 덜 움직이거나 느릴 경우; 1, 병변 반대쪽 앞발의 움직임이 미약할 경우; 0, 병변반대쪽 앞발이 전혀 움직이지 않는 경우.



그림 2. 앞발적응보행검사(stepping test). 좌측앞발에 운동장해를 만든 다음, 90 cm/12 sec 속도로 움직이는 달차(treadmill)에서 쥐가 몸의 균형을 잡기 위해 체중을 지탱하고 있는 좌측앞발로 보행을 하게 하여 그 횟수를 측정.

### (3) Forelimb flexion angle

허공에서 쥐의 꼬리를 잡고 들어 올린후, 바닥에 가까이 다가갈때 앞발이 몸통에서 벌어지는 각도를 측정해서 점수화 하였다. 점수화는 다음과 같다; 3, 앞발이 모두 벌어져(180도) 대칭적으로 걸을 경우; 2, 병변반대쪽 앞발이 동측보다 덜 벌어 질 경우(60도 - 120도); 1, 병변반대쪽 앞발이 약간 벌어질 경우(60도 미만); 0, 병변반대쪽 앞발이 전혀 움직이지 않는 경우.

#### (4) Climbing the inclined test board

쥐를 엠보싱이 있는 고무로 된 경사대에 올려 놓고 경사도를 0도에서 90도까지 다르게 하여 등판시켜 앞발의 접지력과 등판 능력을 관찰하였다. 점수화는 다음과 같다; 3. 60도 이상까지 잘 등판하고 접지력도 단단한 경우; 2. 30도에서 60도까지 등판은 가능하나 병변반대쪽 앞발의 접지력은 동측보다 약할 경우; 1. 30도 이상 등판을 못 할 경우; 0, 전혀 등판하지 못하거나, 제자리만 도는 경우.

표 1. Modified rat stroke motor score. 좌측 앞발의 운동기능을 보기위 해서 rat stroke motor score를 변형하였고, 각 테스트의 점수를 합산하였음.

Test	Score			
	0	1	2	3
Symmetry of movement	Left forepaw: no movement	Left forepaw: slight movement	Left forepaw: move slowly	Left forepaw: move symmetrically
Forelimb flexion angle	Left forepaw: no movement	Left forepaw: slight movement to outreach less than 60°	Left forepaw: move and outreach between 60° and 120°	Left forepaw: symmetrical outreach to 180°
Climbing inclined board	fail to climb	climb up to 30°	climb up to 60°	climb up to 90°

## 라. 실험그룹

실험그룹은 다음의 3개로 나뉘었다; (i) 정상군(n=5), (ii) 대조군: media(DMEM)만 이식한 저온손상군(n=15), (iii) 운동피질에 인간간엽줄기세포를 이식한 저온손상군(n=15). 행동의 회복정도를 평가하기 위해서, 3그룹 모두 간엽줄기세포이식후 2, 4, 6주에 좌측앞발에 대한 운동기능을 테스트하였다. 흰쥐들은 이식후 6주에 면역조직화학적 분석과 호스트조직내로의 인간간엽줄기세포의 생착을 확인하기 위해 희생시켰다.

## 4. 인간간엽줄기세포의 이식

이식할 인간간엽줄기세포들의 확인을 위해서 실험동물에게 이식하기 48시간 전에 10 M의 5-bromodeoxyuridine(BrdU; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 배양 배지에 넣고 표지(label)하였다. 세포들을 37°C에서 0.05% trypsin-EDTA로 단백분해하여, 분리된 세포들은 PBS에 재부유시켰다. 세포부유액에 0.4% trypan blue 염색액을 섞은 후에 혈구계산기(hemocytometer)로 살아있는 세포수를 확인하였다. 해밀턴 미세주사기(Hamilton microsyringe)에 부착된 멸균 소독 바늘(0.3mm O.D.)로, 3  $\mu$ l의 세포부유물 ( $5 \times 10^4$  cells/ $\mu$ l)을 4분에 걸쳐 2곳의 대뇌피질 (AP;  $\pm 1.0$  mm, ML; +1.1 mm, DV; 2.0 mm)에 주사하였다(그림 3). 쥐들은 세포이식 24시간 전부터 희생시킬 때까지 매일 cyclosporin A (10 mg/kg, i.p. Chong Kun Dang Pharm., Seoul, Korea)를 투여하였다.

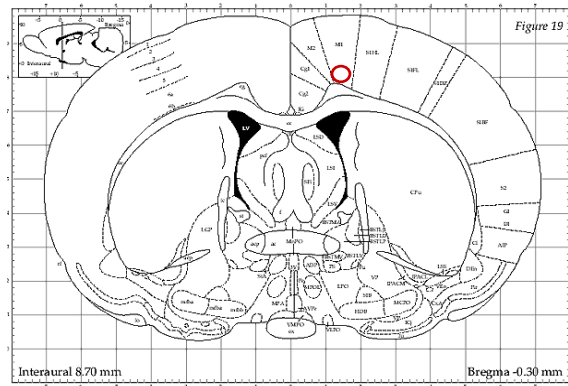


그림 3. 인간간엽줄기세포 이식부위. 대뇌피질 2곳(AP; ±1.0 mm, ML; +1.1 mm, DV; 2.0 mm)에 배양된 줄기세포( $5 \times 10^4$  cells/ $\mu$ l)를 이식.

### 5. 이식조직의 면역조직화학적 평가

6주간의 행동학적 검사를 마친 후에, 실험동물들을 25% urethane (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS로 마취한 후, 125 ml의 식염수를 심장내로 관류한 뒤, 250 ml의 냉각된 4% paraformaldehyde (pH 7.4, PBS)로 관류하였다. 쥐의 뇌를 제거한 후, 실온에서 다음날까지 정착액에서 고착시킨다. 뇌조직들을 30% sucrose PBS에 4 °C에서 48시간 동안 포매시킨후, -20°C의 OCT복합체(optimal cutting temperature gel compound; Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)로 동결시킨 후, 냉동 미세박편기(microtome)로 35  $\mu$ m의 두께로 절단하였다. 조직내의 BrdU를 확인하기 위해서, 절단편들을 염색과정 전에 37°C에서 1시간동안 2 N HCl로 숙성시켰다. BrdU의 이중형광염색을 위해서, 녹색을 띄는 다른 세포특이 표지자로 염색하였다. 일차 항체들로는 다음과 같은 단클론성 항체들을 사용하였다: BrdU-FITC (bromodeoxyuridine-fluorescein

isothiocyanate, dilution 1:200; Serotec, Oxford, UK), neuronal nuclei (NeuN, dilution 1:100; Chemicon, CA, USA), neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1, dilution 1:400; Covance, CA, USA), Map-2 (dilution 1:200; Sigma, St. Louis, MO, USA)와 mouse anti-neurofilament protein (NF, dilution 1:40; Dako, Denmark). 일차항체의 검출을 위해, 형광표지된 Cy3-conjugated IgG 이차항체(Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)로 실온에서 2시간 숙성한 후, confocal microscope (Zeiss, LSM 510, Stuttgart, Germany)으로 확인하였다.

## 6. 자료 분석

통계학적 분석을 위해 SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 각 그룹간의 비교를 위해서 analysis of variace (ANOVA)를 사용하였다. 각 그룹간의 결과 비교를 위해서 Kruskal-Wallis one-way ANOVA와 Mann-Whitney U-test를 사용하였다. 통계학적 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. 배양된 인간간엽줄기세포의 세포면역염색

인간간엽줄기세포의 성장을 관찰하고, 실험실에서 증식시키기 위해서, 성인의 골반뼈에서 골수를 채취하였다. 방법론에서 설명한 바와 같이, 인간간엽줄기세포들은 37℃, 5% 이산화탄소에서 배양하여, bFGF가 있는 DMEM에서 7-10일간 증식시킨 후 고착시켰다. GFAP (그림 4-A; glial fibrillary acidic protein in astrocyte), Tuj1 (그림 4-B; neuron specific beta III isoform of tubulin), MAP-2 (그림 4-C; microtubule associated protein-2 confined to neuronal cell bodies and dendrites), NF (그림 4-D; neurofilament)의 1차 항체로 적색으로 염색되었다. 세포핵은 DAPI에 의해 파란색으로 보인다. confocal microscope사진에서 세포질내에 면역활성 세사구조의 긴 돌기들을 관찰할 수 있었다. MAP-2와 NF에 양성인 세포수가 GFAP와 Tuj1 양성 세포수 보다는 적게 관찰되었다.



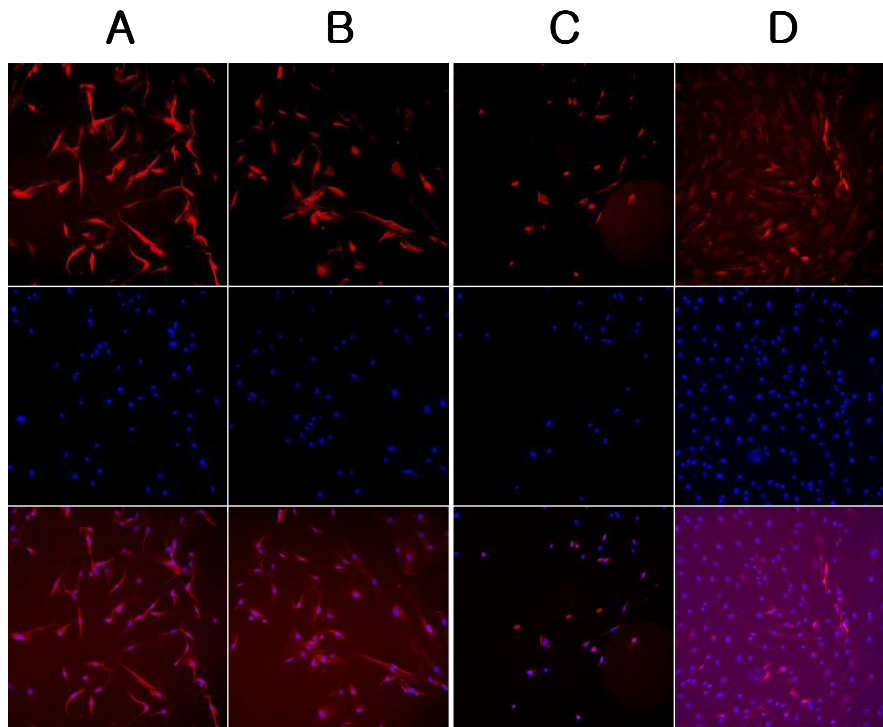


그림 4. 인간간엽줄기세포의 면역세포화학검사. 실험실에서 배양한 인간간엽줄기세포를 다음의 항체로 염색한 confocal 현미경사진. (A) GFAP, (B) TuJ1, (C) MAP-2, (D) NF (붉은색). 푸른색은 DAPI로 염색된 세포핵.

## 2. 저온 뇌손상모델의 대뇌피질 특징

-70°C의 액화질소로 냉각된 금속막대로 실험동물의 대뇌피질의 전층을 관통하는 썬기 모양의 병변을 만들 수 있었다. 이러한 병변은 흰쥐의 우측 앞발의 운동피질에 영향을 주었고, 결과적으로 좌측 앞발의 운동장해를 유발하였다. 뇌손상 병변의 위치와 깊이는 TTC로 염색된 절단면으로 결정하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이, 저온(-70°C)으로 냉각시킨 금속막대를

경막에 접착시킴으로서 접착면의 운동피질에 주로 국한된 일정한 형태의 괴사를 형성할 수 있었고, Hematoxylin-Eosin 염색과 Nissle 염색(그림 6)에서 보는 바와 같이 병변의 신경세포가 없이 염증세포들과 교세포들로 대체되어 비가역적인 병변이 만들어진 것을 확인할 수 있었다.



그림 5. 뇌손상모델의 triphenyltetrazolium 염색. 살아있는 세포는 tetrazole을 수용성 적색의 formazan으로 바꾸는 성질을 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별하기 위해 사용. 쥐 앞발운동피질 부위에 썰기모양의 괴사가 생성됨.

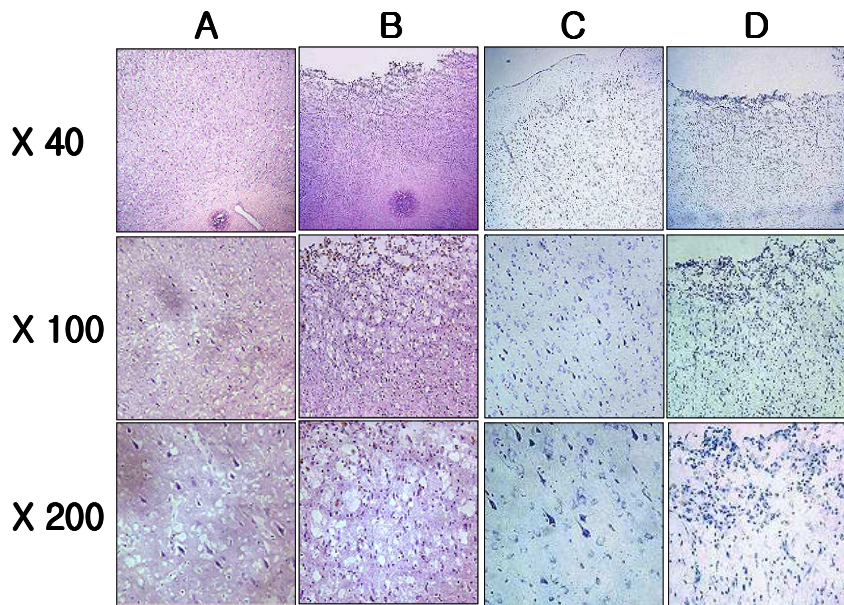


그림 6. 뇌손상모델의 병변부 hematoxylin-eosin(A:control, B:cold injury group), cresyl violet 염색(C:control, D:cold injury group). 병변부의 신경세포를 확인하기 위해서 시행한 염색에서 저온 손상받은 피질에는 신경세포체가 없어지고 염증세포와 공포들(vacuoles)이 형성되어 비가역성 손상이 형성되었음.

### 3. 인간간엽줄기세포 이식과 앞발운동기능회복 정도

냉온 병변을 만든 다음날, 흰쥐운동피질손상모델을 확인하기 위해 검사하였다. 흰쥐들은 운동피질에 병변을 만들고 난 다음날에는 행동검사에서도 모두 비슷한 정도의 장애를 보였다. 이러한 신경행동검사는 인간간엽줄기세포를 이식한후 2주, 4주, 6주에 시행하였다. 신경학적 점수는, Garcia등<sup>31</sup>이 기술한, symmetry movement, forelimb flexion angle, climbing score의 합산으로 하였다.

인간간엽줄기세포를 이식한 실험군에서는 앞발적응보행의 횟수가 손상 2 주후에 유의하게 증가하였다 (control group:  $4.03 \pm 2.1$ , grafted group:  $10.67 \pm 3.8$ , \*  $p < 0.05$ ). (그림 7-A). 또한, 이식군에서는 이식 2주후부터 신경학적 점수도 유의하게 증가하였다(control group:  $4.2 \pm 0.46$ , grafted group:  $6.83 \pm 0.74$ , \*  $p < 0.05$ ). (그림 7-B). symmetry movement와 forelimb flexion angle 점수도 이식 후 2주에 유의하게 증가하였으나, climbing score는 호전이 없었다(표 2).

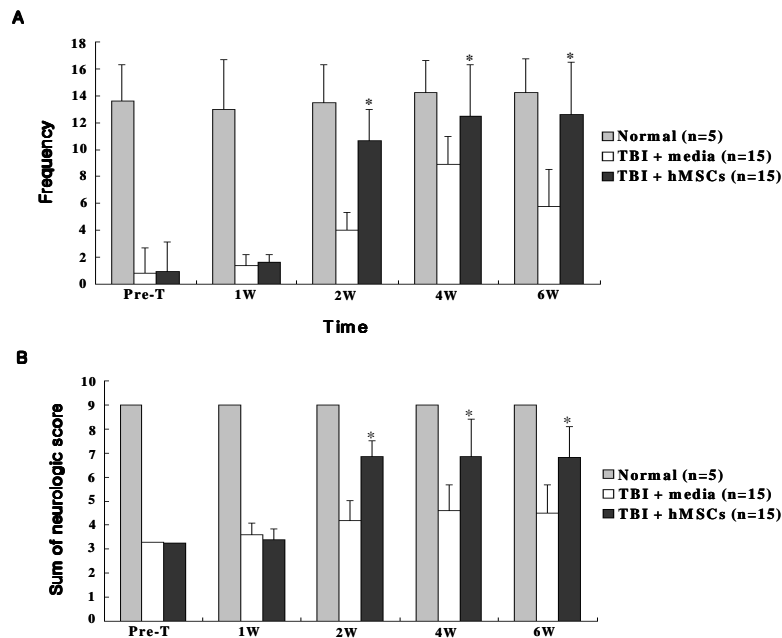


그림 7. 인간간엽줄기세포의 이식 후 신경기능의 변화. (A) 앞발적응보행검사. 뇌손상모델을 만들기 전과 후에, 세포이식 후 1, 2, 4, 6 주에 검사를 시행하였음. 줄기세포를 이식한 군에서 이식후 2, 4, 6주에서 기능이 유의하게 호전되었음. (B) 신경학적 검사 합산점수. 앞발운동기능만을 평가하기위해 뇌졸중쥐모델에서 사용하는 운동기능검사<sup>31</sup>를 변형하였음. 줄기세포 이식후 2, 4, 6주에서 유의하게 호전되었음. (\* $p < 0.05$ ).

표 2. 각 그룹간 신경학적 점수의 변화. 앞발운동기능만을 평가하기 위해 뇌졸중쥐모델에서 사용하는 운동기능검사<sup>31</sup>를 변형하였음. 줄기세포 이식 후 2, 4, 6주에서 유의하게 호전된 것이 확인됨. (\*p < 0.05).

	Pre-model	Model	1week after graft	2week after graft	4week after graft	6week after graft
Symmetry movement score						
Normal(n=5)	3	3	3	3	3	3
Control(n=15)	3	1	1.1±0.32	1.2±0.42	1.3±0.48	1.4±0.52
hMSCs(n=15)	3	1	1	2.17±0.83*	2.42±0.51*	2.58±0.51*
Forelimb flexion angle score						
Normal(n=5)	3	3	3	3	3	3
Control(n=15)	3	1	1	1.3±0.48	1.5±0.53	1.4±0.52
hMSCs(n=15)	3	1	1.08±0.28	2.5±0.67*	2.5±0.67*	2.42±0.67*
Climb score						
Normal(n=5)	3	3	3	3	3	3
Control(n=15)	3	1.3±0.48	1.5±0.52	1.7±0.48	1.8±0.63	1.7±0.67
hMSCs(n=15)	3	1.25±0.45	1.3±0.49	2.16±0.71	1.9±0.51	1.8±0.57

#### 4. 인간간엽줄기세포 이식부위의 면역조직화학적 평가

BrdU로 미리 표지한 인간간엽줄기세포가 이식 후 6주에 직접 이식한 부위와 손상주위부에서 관찰되었다. BrdU에 양성인 세포들은 그림 8.에서 보는 바와 같이, 몇가지 신경특이 표지자에 대해서 면역반응을 보였다 (A; GFAP, B; MAP-2, C; NeuN, and D; NF). 이러한 결과들은 BrdU로 미리 표지하여 이식한 인간간엽줄기세포들이, 비록 적은 양이지만 in vivo상에서, 병변에 성공적으로 이식되었고, 숙주의 뇌에서 생착되어, 신경계 세포들(neurons and astrocytes)로 분화 되었음을 보여준다 하겠다.

그림 8. 인간간엽줄기세포 이식후 병변부 면역조직화학검사. 뇌손상후에 줄기세포를 이식한 후 신경특이 표지자로 염색한 운동피질의 confocal microscopy 사진(조직두께 35 $\mu$ m). 면역조직화학염색과 항체는 다음과 같다 (양성: 적색); (A) GFAP, (B) MAP-2, (C) NeuN, (D) NF. 푸른색은 BrdU 양성 세포. Scale bar: 50 $\mu$ m.

## IV. 고 찰

외상성 뇌손상은 중추신경계내에 여러 가지 유리기(free radicals)생성, 촉진성 독성(excitotoxicity), 칼슘 과부하, cytokine 분비, 성장인자 활성화나 억제, 그 외에도 다른 여러 가지 해로운 반응들을 유발하게 된다.<sup>33,34</sup> 이러한 변화들은 유해한 환경을 만들어, 초기 손상에는 노출되지 않았던 세포들에게도 방관자 효과 (bystander effect)을 끼쳐 잠재적으로 해롭게 된다. 새롭게 대두되는 재생의학에서는 손상된 조직의 회복에 있어서, 기존의 전통적인 약물치료에 보다 새로운 대안을 제공하고 있다. 그 중에서도 최근에는 간엽줄기세포를 in vitro에서 연구하고, in vivo로 중추신경계 질환이나 다른 장기의 질환의 치료에 있어서 근본 세포로 사용하고 있다.<sup>21,23,35,36</sup> 이러한 것이 가능한 것은 줄기세포들이 비중배엽계 세포로 지속적으로 분화할 수 있는 능력과 다양한 질환에서 유전자 치료나 자가이식의 수단으로 사용가능하기 때문일 것이다.

본 연구에서는 인간간엽줄기세포가 실험실에서의 배양과정에서 다양한 신경특이 표지자를 발현하였으며, 이것은 신경계 세포로 분화할 수 있는 가능성이 있으며, 또한 이러한 세포들을 운동피질에 손상을 입은 흰쥐 모델에 이식하였을 때, 기능 회복에 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다. 이식된 인간간엽줄기세포들은 생체조직내에서 몇가지 신경특이 표지자들(GFAP, MAP-2, NeuN, NF)을 보였으나, 그 수는 정량적으로 분석하기에는 매우 제한적이었다. 그러나, 앞발적응보행검사와 신경학적 검사에서 보듯이, 인간간엽줄기세포들을 이식한 군에서 신경기능 회복정도가 배지만을 이식한 쥐들보다 유의하게 증가되었다. 이러한 결과들은 간엽줄기세포들이 어느 정도 다분화 능력을 가지고 있다는 것을 보여준다 하겠다.

최근까지도 성체줄기세포들은 그 출처가 매우 제한되어 있고, 혈액,

근육, 간과 피부같은 조직에서만 손상을 회복시키는 것으로 알려져 왔었다. 그러나, 성체줄기세포들이 이핵공존체 (heterokaryon)을 갖고 있는 세포들과 융합되면 다른 3가지 모든 다른 분화된 세포형들 (중배엽, 내배엽, 외배엽)의 특징적인 유전자가 표현되도록 재조정될 수 있다는 것이 밝혀졌다.<sup>37</sup>

본 연구에서는 액화질소를 이용하여 저온(-70℃)으로 냉각시킨 금속막대를 이용하여 쥐의 우측 대뇌운동피질에 일정한 형태의 비가역적인 뇌손상을 유발하여, 좌측 앞발의 운동장애를 유발시킬수 있었다. 이러한 뇌손상 주변부에 인간간엽세포를 이식한 후에, 확실히 운동기능의 회복이 증가한 것을 확인하였고, 이러한 기능성취의 증가는 시간이 지나면서 더욱 좋아지는 것을 관찰 하였다. 본 연구에서는 이식된 세포의 표지자로서 BrdU를 사용하였는데, 이 BrdU는 thymidine계 물질로서 복제되는 세포의 deoxyribonucleic acid내로 결합하게 된다. 이렇게 BrdU로 표지한 인간간엽줄기세포를 뇌에 이식하였을 때, 이 세포들이 뇌로 이동하고 증식하게 되면, BrdU에 양성으로 염색되게 된다. 인간간엽줄기세포를 이식받은 흰쥐의 뇌단면을 신경특이성 항체와 BrdU 면역염색으로 이중염색하였다. 줄기세포를 이식한 군에서 비록 기능회복은 유의하게 증가된 반면에, 신경원 표지자와 BrdU에 모두 양성인 세포들은 그 수가 매우 적었다. 이식된 세포들의 일부는 신경원과 성상돌기세포의 특징도 보였지만, 그 수가 매우 작아서 그들이 실제의 신경회로에 융합되었을 가능성은 적은 것으로 판단되었다. 아마도 인간간엽줄기세포 이식의 결과로서 얻어진 실제적인 이득은 신경영양 성장인자(neurotrophic growth factors)의 생성 때문일 것으로 추정된다. 인간간엽줄기세포를 이식받은 실험군에서 기능이 회복되는 것은 이식물과 숙주간에 새로운 신경회로가 생겼다고 하기보다는, 아마도 이식된 인간간엽줄기세포에서 나오는 물질들이 숙주의 뇌에서 뇌 가소성(brain



plasticity)를 증대시켰다고 생각된다.

신경성 성장인자들은 신경세포의 성숙과 증식에 반드시 필요한 물질로서, 인간간엽줄기세포들은 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 성장인자를 생산할 수 있다고 알려져 있다.<sup>7,17</sup> Mahmood등<sup>38</sup>이 보고한 바와 같이, 인간간엽세포들은 동정 배양되면, 정상적으로 brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor와 hepatocyte growth factor들을 분비한다. 그러나 이러한 분비는 배양배지에 흰쥐 뇌의 TBI 추출물을 첨가해줄었을 때, 유의하게 향진된다고 한다. Li등<sup>22</sup>은 인간간엽줄기세포를 정주하여 허혈성 뇌졸중 흰쥐모형을 치료했는데, 인간간엽줄기세포에 의한 brain-derived neurotrophic factor와 nerve growth factor가 *in vivo* 생성되고, functional outcome의 호전과 관계가 있는 것을 발견하였다. 최근의 자료들은 brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor같은 성장인자들이 신경생성(neurogenesis)를 향진시킨다고 밝혀졌다.<sup>39-42</sup> 이러한 성장인자들은 세포내 뿐만 아니라, 세포외 기질로도 분비되어, 특별한 세포표면의 수용체들과 반응하게 되면, 그에 따라 신호 전달 (signal transduction)이 2차 전달자 시스템을 활성화시켜, 새로운 세포기능을 초래하는 유전자 발현 (gene expression)을 유발할 것으로 보고 있다.

본 실험에서는 실험군에서 인간세포에 대한 면역거부반응에 주시했지만, *in vivo*상에서 인간간엽줄기세포에 대한 유의할 만한 면역반응은 없었던 것으로 생각되었다. 뇌졸중을 유발한 흰쥐모형 실험에서도 인간간엽줄기세포를 정맥 주사하였을 때, 인간간엽줄기세포에 감작되지 않는 것이 발견되었다.<sup>17</sup> 이것은 인간간엽줄기세포가 비록 항원성이 낮다고 하나, 매개체를 분비하여 이종이식 거부에 대한 면역반응을 억제시킬 가능성도 있을

것으로 보인다.<sup>6</sup> 또한, 향후에 진행될 실험에서는 이식한 hMSCs가 뇌신경 세포의 완전한 재생을 위한 수초화 과정에서 반드시 필요한 희돌기교세포(oligodendrocyte)로 분화하는지를 확인할 필요성이 있으며, 이것의 기능적 확인을 위한 전기생리학적 평가가 필요할 것으로 생각된다.

본 실험을 통해서 명백하게 인간간엽줄기세포의 이식이 외상성 뇌손상에서 기능 회복을 위한 잠재적 치료법이 될 수 있는 것을 보여주었다. 결론적으로, 인간간엽줄기세포는 사람의 골수로부터 비교적 쉽게 얻을 수 있고, 배양을 통해서 그 수를 증식시킬 수 있으며, 외상으로 인한 뇌손상에서 이식치료의 한가지 재료로 사용될 수 있겠다고 하겠다. 이러한 인간간엽줄기세포의 이식에 외상성 뇌손상을 성공적으로 치료할 수 있다면, 궁극적으로 다른 여러 광범위한 뇌신경 질환의 치료에도 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

본 연구자는 성체줄기세포가 외상으로 인한 뇌손상의 잠재적 치료법이 될 수 있는지 확인하기 위해서, 정상 성인의 골반에서 인간간엽세포를 채취하여 in vitro 증식시킨 후, 운동장애를 유발한 외상성 뇌손상 모델을 제작해 직접 이식하였다. 줄기세포 이식 후 외상성 뇌손상모델의 운동기능의 회복정도를 1주, 2주, 4주, 6주에 측정한 후, 실험동물의 뇌를 적출하여 이식한 줄기세포의 생착 정도를 보기위한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 액화질소를 이용하여 저온(-70℃)으로 냉각시킨 금속막대를 이용하여 쥐의 우측 대뇌운동피질에 일정한 형태의 비가역적인 뇌손상을 유발하여, 좌측 앞발에 심각한 운동장애를 유발시킬 수 있었다

2. 정상성인의 골반에서 인간간엽줄기세포를 쉽게 얻을 수 있었고, 실험관 내 배양하였을 때 신경세포와 관련된 유전자(GFAP, Tuj1, MAP-2, NF)의 발현이 증가함을 확인하였다.

3. 뇌손상 주변부에 인간간엽세포를 직접 이식한 후에, 실험동물의 앞발 운동기능이 대조군에 비해서 유의하게 향상되었고, 이러한 기능성취의 증가는 시간이 지나면서 더욱 좋아지는 것을 관찰 하였다.

4. BrdU로 미리 표지한 인간간엽줄기세포를 통해서 뇌손상모델에 이식된 세포가 비록 매우 적은 수이기는 하지만, 신경세포와 연관된 유전자가 발현된 세포가 생체 내로 안착된 것을 확인하였다.

이상의 결과로 보아, 아직 풀어야 할 숙제가 많지만, 인간간엽줄기세포의 이식이 외상성 뇌손상에서 기능 회복을 위한 잠재적 치료법이 될 수 있을 것으로 보이며, 실제로 임상에 사용하기 위해서는 보다 다양한 인간간엽줄기세포에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. Waxweiler RJ, Thurman D, Sniezek J, Sosin D, O'Neal J. Monitoring the impact of traumatic brain injury: a review and update. *J Neurotrauma* 1995;12:509-516.
2. Mason F, Thicoipe M, Aye P, Mokni T, Senjean P, Schmitt V, Dessalles PH, et al. Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study. *J Trauma* 2001;51:481-489.
3. Thornhill S, Teasdale GM, Murray GD, McEwen J, Roy CW, Penny KI. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *BMJ* 2000;320:1631-1635.
4. Livingston DH, Lavery RF, Mosenthal AC, Knudson MM, Lee S, Morabito D, et al. Recovery at one year following isolated traumatic brain injury: a western trauma association prospective multicenter trial. *J Trauma* 2005;59:1298-1304.
5. Berg J. Economic evidence in trauma: a review. *Eur J Health Econ* 2004;5:S84-91.
6. McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Lab Invest* 1996;74:315-342.
7. Kawamata T, Katayama Y, Hovda DA, Yoshino A, Becker DP. Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids. *Brain Res* 1995; 674:196-204.

8. Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 1997;765:283-290.
9. Xiong Y, Gu Q, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1997;14:23-34.
10. Anderson DK, Hall ED. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993; 22:987-992.
11. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991;75:15-26.
12. Kesslak JP, Brown L, Steichen C, Cotman CW. Adult and embryonic frontal cortex transplants after frontal cortex ablation enhance recovery on a reinforced alternation task. *Exp Neurol* 1986; 94:615-626.
13. Kesslak JP, Nieto-Sampedro M, Globus J, Cotman CW. Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Exp Neurol* 1986;92:377-390.
14. Muir JK, Raghupathi R, Saatman KE, Wilson CA, Lee VM, Trojanowski JQ, et al. Terminally differentiated human neurons survive and integrate following transplantation into the traumatically injured rat brain. *J Neurotrauma* 1999;16:403-414.
15. Netto CA, Hodges H, Sinden JD, LePeillet E, Kershaw T, Sowinski P, et al. Foetal grafts from hippocampal regio superior alleviate

- ischaemic-induced behavioural deficits. *Behav Brain Res* 1993;58:107-112.
16. Stein DG, Palatucci C, Kahn D, Labbe R. Temporal factors influence recovery of function after embryonic brain tissue transplants in adult rats with frontal cortex lesions. *Behav Neurosci* 1988;102:260-267, 325-326.
  17. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3:537-544.
  18. Theele DP, Streit WJ. A chronicle of microglial ontogeny. *Glia* 1993;7:5-8.
  19. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4080-4085.
  20. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3908-3913.
  21. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711-10716.
  22. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514-523.
  23. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR.

- Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.
24. 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.
  25. Bonilla S, Alarcon P, Villaverde R, Aparicio P, Silva A, Martinez S. Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur J Neurosci* 2002;15:575-582.
  26. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174:11-20.
  27. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001;32:1005-1011.
  28. Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 2002;39:229-236.
  29. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego(CA): Academic Press; 1998.
  30. Hortobagyi T, Hortobagyi S, Gorlach C, Harkany T, Benyo Z, Gorogh T, et al. A novel brain trauma model in the mouse: effects of dexamethasone treatment. *Pflugers Arch* 2000;441:409-415.
  31. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and

- extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995;26:627-634, discussion 635.
32. Chang JW, Wachtel SR, Young D, Kang UJ. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience* 1999;88:617-628.
33. Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J Neurosurg* 2000;92:108-120.
34. McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R, Graham DI, Smith DH, Lee VM, et al. The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:251-267.
35. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100:II247-256.
36. Park KW, Eglitis MA, Mouradian MM. Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. *Neurosci Res* 2001;40:315-323.
37. Spear BT, Tilghman SM. Role of alpha-fetoprotein regulatory elements in transcriptional activation in transient heterokaryons. *Mol Cell Biol* 1990;10:5047-5054.
38. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain



- injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003;53:697-702, discussion 702-703.
39. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11946-11950.
40. Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 2002;82:1367-1375.
41. Menard C, Hein P, Paquin A, Savelson A, Yang XM, Lederfein D, et al. An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 2002;36:597-610.
42. Tao Y, Black IB, DiCicco-Bloom E. Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF). *J Comp Neurol* 1996;376:653-663.

## **Abstract**

Effect of transplantation of human mesenchymal stem cells on the neurological recovery of cold-induced brain injury model in rat

Han Sung Kim

*Department of Medicine*

*The Graduate school, Yonsei University*

(Directed by Professor Yong Gou Park)

The purpose of this study was to investigate the effect of the human mesenchymal stem cells (hMSCs) that were transplanted stereotaxically on behavioral change after traumatic cold brain injury in adult rats. Cortical lesion (n=30) was induced by touching a metal stamp, cooled with liquid nitrogen ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), to the dura over the forelimb motor cortex of adult rats. The procedure produced a localized lesion and the animals showed significant motor deficits of the contralateral forepaw. The hMSCs were freshly isolated from human iliac bone and cultured in tissue culture flasks with 10 ml Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin streptomycin, and basic fibroblast growth factor. The animals received hMSC grafts ( $3 \times 10^5$  hMSCs) 6 days after cold lesion (n=15). All rats were sacrificed 6 weeks after cold injury, and

immunohistochemical staining was performed on brain sections to identify donor hMSCs. Neurological evaluations were performed with the forepaw adjusting step test and modified neurological score. Treatment with  $3 \times 10^5$  hMSCs improved the rat's neurological functions. The transplanted BrdU-prelabeled hMSCs were found around injury site and expressed the neuronal cell markers (GFAP, Tuj1, MAP-2, NF).

These results suggest that hMSCs may be a potential therapeutic tool for brain injuries.

---

Key Words : human mesenchymal stem cell, brain injury model, cold injury, transplantation