

배양된 사람 골수 중간엽 줄기 세포가
배부 신경절 신경세포의 성장 및
생존에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

이 상 원

배양된 사람 골수 중간엽 줄기 세포가
배부 신경절 신경세포의 성장 및
생존에 미치는 영향

지도교수 조 용 은

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 상 원

이상원의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

본 저자가 현재 까지 척추 신경 외과학을 배우는데 있어 아낌없는 격려와 끊임없는 지도 편달을 해주신 조용은 교수님, 윤도흠 교수님께 충심어린 감사를 드립니다.

그리고 본 연구와 논문을 완성하기 까지 많은 가르침과 세심한 배려를 해주신 김동욱 교수님, 민유흥 교수님, 김궁년 교수님, 이경희 선생님께 감사를 드립니다. 또한 신경 외과학 교실 모든 교수님과 의국 동문들과도 이 결실의 기쁨을 함께하고 싶습니다.

마지막으로 현재의 제가 있기까지 사랑과 격려로 지켜봐 주신 부모님, 아내, 서정리와 새로 태어난 둘째 딸 그리고 하느님께 감사를 드립니다.

저자 씀

< 차 례 >

그림 차례	II
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 사람 골수에서 간엽 줄기 세포의 분리 및 배양	6
2. 골수 세포 배양액의 채취 및 골수세포의 표지	6
3. 백서 배아 채취, 배부 신경절 배양	7
4. 대조군과 실험군의 신경절, 신경세포의 배양 과 면역염색	7
5. 신경세포 돌기의 측정 및 생존 세포수의 비교	7
6. 골수 간엽 세포에서 분비되는 단백 물질의 분석	8
7. 통계 처리	9
III. 결과	10
1. 사람 골수 간엽 줄기 세포의 특성	10
2. 사람 골수 간엽 줄기 세포가 배부 신경절 신경세포의 생존에 미치는 영향	11
3. 사람 골수 간엽 줄기 세포가 배부 신경절 신경세포의 신경돌기 성장에 미치는 영향	12
4. 사람 골수 간엽 줄기 세포에서 분비되는 단백질의 분석결과	14
5. 사람 골수 간엽 줄기 세포에서 분비되는 단백질의 골수 공여자에 따른 변이	15
6. 사람 골수 간엽 줄기 세포 와 태아 백서 신경절 신경세포간의 기질적 상호작용	16
IV. 고찰	18
V. 결론	21
참고문헌	22
영문요약	26

그림 차례

Fig. 1. Process of RayBio human cytokine assay kit	9
Fig. 2. Characteristics of third passage BMSC	10
Fig. 3. Analysis of human BMSC surface marker	11
Fig. 4. Immunostaining of dissociated DRG culture with SMI-33	12
Fig. 5. Bar graph of mean numbers of neurons with neurites	12
Fig. 6. Immunostaining of fetal DRG explants with SMI-33	13
Fig. 7. The relative area covered by neurites and mean length of neurites	14
Fig. 8. Cytokine assays results	15
Fig. 9. Donor dependent variation of cytokines released from . human BMSC	16
Fig. 10. The pattern of neurite outgrowth with or without BMSC	17

배양된 사람 골수 중간엽 줄기 세포가 배부 신경절 신경세포의 성장 및 생존에 미치는 영향

척수 손상과 뇌 손상에서 신경 재생을 위한 치료법 중 줄기 세포의 이식은 신경 손상 환자들에게 새로운 희망을 주고 있다. 여러 종류의 줄기 세포 중 골수 간엽 세포는 성체 줄기 세포의 하나로 현 단계에서 임상적 사용이 가능한 세포로 많은 연구가 되고 있다. 그 이유는 첫째 이 세포가 조혈세포, 신경세포, 상피세포, 간엽세포, 배아세포 등으로 분화할 수 있는 유연성을 가지고 있다는 것, 둘째로 분리가 쉽고 자가이식이 가능하다는 것, 셋째로 현재까지 신경 질환을 제외한 많은 다양한 질환에서 치료 목적으로 사용된 경험이 축적되어 있다는 것 등을 들 수 있다. 특히 척수 손상 모델에서 골수 간엽 세포(Bone marrow stromal cell, BMSC) 이식이 손상된 척수 신경 기능의 호전을 가져온다는 연구 결과가 보고되었는데 이식된 줄기 세포가 어떤 기전을 통해 이식 효과를 나타내는지 확립되어 있지 않은 상태이다. 특히 척수 내에서의 줄기 세포의 생존과 신경세포로의 분화는 어려운 것으로 더 많이 보고되었고 이식된 간엽 줄기 세포가 신경세포로 분화되어 손상된 신경 세포를 대체해서 신경 기능의 호전을 보일 가능성에 대해서는 회의적이다. 골수 간엽 세포는 여러 종류의 단백물질을 분비한다고 알려져 있는데 이들 단백질 중 신경 성장 촉진 인자가 포함되어 있으며 이로 인해 손상된 축삭의 재생이나 신경세포의 성장을 촉진시켜 신경학적 증상을 호전시킬 가능성이 있다. 하지만 가능성만 있을 뿐 이를 증명하는 연구는 아직까지 거의 없는 상태이다. 본 연구는 이를 증명하기 위하여 사람 골수 간엽 세포와 태아 백서 배부 신경절(Dorsal root ganglion, DRG) 신경세포를 함께 배양하여 그 효과를 분석하고 또한 사람 골수 간엽 세포 배양액으로 태아 백서 배부 신경절 신경세포를 배양하여 그 효과를 분석하였다. 그리고 실제로 사람 골수 간엽 세포에서 분비된 단백질(cytokine)을 검출하는 시도를 하였다. 7일 배양후 신경돌기를 면역 염색하여 신경돌기의 수와 길이, 생존 세포의 수를 측정 하였다. 태아 백서의 배부 신경절 신경세포의 dissociated culture시 생존한 신경세포 수와 explant culture에서 측정한 신경돌기 수와 길이 모두는 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포 동시 배양

군이 대조군 보다 의미 있게 많았고 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포
동시 배양군 사이에는 의미 있는 차이가 없었다. 사람 골수 간엽 줄기 세포
배양액에서 검출된 단백질은 IL-6, IL-8, IGFBP-2, GM-CSF, RANTES,
MCP-1, TIMP-1, TIMP-2, u-PAR, 와 VEGF였고 이러한 단백질중
IL-6, VEGF, 와 GM-CSF는 생체 내에서 모두 신경 영양 효과를 가지는
것으로 알려져 있다. 이상의 결과로 골수 간엽 줄기 세포에서 신경 성장 촉
진 물질이 분비 되고 이것이 신경돌기의 성장과 신경 세포 생존에 영향을
미친다는 것을 알 수 있었고 앞으로 검출된 단백질이 단일 혹은 복합적으
로 신경 세포 생존 및 성장에 어떤 영향을 미치는 지 그리고 척수 손상 동
물 모델에서 생체 내 실험을 통하여 사람 골수 간엽 줄기 세포 이식후 단백
질 분비에 어떤 변화가 있는 가에 대한 연구가 중요할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : 사람 골수 간엽 줄기 세포, 백서, 배부 신경절, 신경돌기 성
장, 신경세포 생존, Cytokine

배양된 사람 골수 중간엽 줄기 세포가 배부 신경절 신경세포의 성장 및 생존에 미치는 영향

<지도교수 조용은>

연세대학교 대학원 의학과

이 상 원

I. 서 론

척수 손상과 뇌 손상에서 신경 재생을 위한 치료법 중 줄기 세포의 이식은 신경 손상 환자들에게 새로운 희망을 주고 있다. 여러 신경 손상 동물 모델에서 줄기 세포의 이식으로 손상된 신경 기능이 호전된다는 많은 보고가 있어왔다.^{3,6,7,8,9,12,15,23,25,36} 여러 종류의 줄기 세포 중 골수 간엽 세포는 성체 줄기 세포의 하나로 현 단계에서 임상적 사용이 가능한 세포로 많은 연구가 되고 있다.^{7,9,36} 그 이유는 첫째 이 세포가 조혈세포, 신경세포, 상피세포, 간엽세포, 배아세포 등으로 분화할 수 있는 유연성을 가지고 있다는 것, 둘째로 분리가 쉽고 자가이식이 가능하다는 것, 셋째로 현재까지 신경 질환을 제외한 많은 다양한 질환에서 치료 목적으로 사용된 경험이 축적되어 있다는 것 등을 들 수 있다. 특히 척수 손상 모델에서 골수 간엽 세포(Bone marrow stromal cell, BMSC) 이식이 손상된 척수 신경 기능의 호전을 가

저온다는 연구 결과가 보고되었는데 Hofstetter 등은 이런 행동검사 결과와 더불어 그 기전으로 골수 간엽 세포가 축삭의 성장을 지지하고 안내하는 역할을 하며, 일부 이기는 하지만 골수 간엽 세포가 실제로 신경세포로 분화된다는 것을 증명하였고¹⁵, Ohta 등은 척수 신경 기능의 호전을 가져오는 행동검사 결과와 더불어 대조군에 비해 척수 신경의 이차적 손상의 정도를 감소시킴을 증명하였다.²⁵ 이런 연구 결과들은 이 세포의 임상적 사용 가능성을 매우 높이고 있으며 이미 일부 나라에서는 임상 실험이 이루어지고 있다.^{7,9,36} 그러나 아직 이 세포는 몇 가지 해결되는 않은 문제점을 가지고 있다. 첫째는 세포의 정확한 특성이 불분명하다는 것이다. 골수 간엽 세포에는 간엽세포, 혈관 내피 세포, 줄기 세포가 포함 되어 있으며 이들의 정확한 분리 배양에 어려움이 있다.^{9,18} 둘째는 이들 세포를 이식하였을 때 신경학적 호전을 일으키는 기전으로 다양한 가설들이 거론되고 있지만 그 정확한 기전은 아직 규명되어 있지 않다는 것이다. 가능성이 있는 기전으로는 위에 언급했듯이 이 세포가 이식 환경에서 신경계 세포로 분화되어 손상된 신경 세포를 대체하는 것이다. 다른 하나는 이 세포에서 신경 성장 촉진 인자를 분비함으로써 이 인자에 의해 신경 축삭의 재생과 이차적 신경세포의 손상 또는 사멸을 방지 할 수 있다는 것이다.^{7,9,36} 그 이외에도 이식 된 세포가 분비하는 기질이나 세포 자체가 축삭 재생의 지지체 역할, 탈수 초화된 축삭의 수초 형성을 할 수 있다는 것¹⁵, 또한 내재적 줄기 세포를 활성화하여 신경세포로의 분화를 촉진한다는 것 등이 있다. 따라서 임상 적용 이전에 먼저 골수 간엽 세포의 이식 후 신경학적 호전을 가져오는 기전의 규명은 중요하며 실험실 환경에서 골수 간엽 세포가 신경세포의 성장 생존에 미치는 영향을 분석하는 것은 기전 규명의 간접적 방법으로 가치가 있을 것이다. 줄기 세포의 이식이 손상된 척수 신경의 기능 호전에도움을 준다는 보고가 있으나 아직 그 정확한 기전에 대해 논란의 여지가 있고 어떤 세포를 어떤 방법으로 이식하는 것이 이상적인지는 정립되어 있지 않은 상태이다. 자가 이식이 가능한 간엽 줄기 세포는 배아 줄기 세포에서 주로 거론되는 윤리적 문제로부터 자유롭게 임상적 적용이 가능하며 이식 효과에 대해서는 동물 실험에서는 인정되고 있으나 아직까지 인간을 대상으로 한 치료에는 그 적용 가능성이 의문시 되고 있다.^{3,7,9,23} 이식된 줄기 세포가 어떤 기전을 통해 이식 효과를 나타내는지 확립되어 있지 않은 상태이다. 특히 척수 내에서의 줄기 세포의 생존과 신경세포로의 분화는 어려운 것으로 더 많이 보고되었고 이식된 간엽 줄기 세포가 신경세포로 분화되어 손상된 신경세포를 대체해서 신경 기능의 호전을 보일 가능성

에 대해서는 회의적이다. 골수 간엽 세포는 여러 종류의 단백물질을 분비한다고 알려져 있는데 Chen 등은 생체 외 실험으로 손상된 뇌 조직과 골수 간엽 세포를 동시 배양시 대조군에 비해서 그리고 손상된 시점에서 적출한 시점까지의 시간 경과에 따라서 brain-derived neurotrophic factor(BDNF), nerve growth factor(NGF), basic fibroblast growth factor(bFGF) 등이 증가됨을 보여 주었고⁶, Neuhuber 등은 골수 간엽 세포에서 vascular endothelial growth factor(VEGF), BDNF, interleukin-6(IL-6) 등 다양한 신경 영양 인자가 분비됨을 보고하였는데²³ 이러한 신경 영양 인자들은 신경계 발생 단계에서 신경 발달(neural development), synaptogenesis, angiogenesis를 촉진 시키는 데 매우 중요하다고 알려져 있고 성인 신경계에서도 어느 정도 손상된 신경을 복구 및 재생하는 신경 유연성(natural plasticity)에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이 물질들은 또한 조혈 모세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{1,10,35} 따라서 이들 단백질 중 신경 성장 촉진 인자가 포함되어 있으며 이로 인해 손상된 축삭의 재생이나 신경세포의 성장을 촉진시켜 신경학적 증상을 호전 시킬 가능성이 있다.^{1,2,4,5,13,14,17,19,20,21,22,24,26,27,28,29,30,31,32,33,34} 이 실험의 가설은 사람 골수 간엽 세포에서 신경 성장 촉진 물질이 분비되고 이것이 신경 세포의 성장과 생존에 영향을 미친다는 것이다. 이 가설을 증명하기 위하여 사람 골수 간엽 세포와 태아 백서 배부 신경절(Dorsal root ganglion, DRG) 신경세포를 함께 배양하여 그 효과를 분석하고 또한 사람 골수 간엽 세포 배양액으로 태아 백서 배부 신경절 신경세포를 배양하여 그 효과를 분석할 것이다. 그리고 실제로 사람 골수 간엽 세포에서 분비된 단백질(cytokine)을 검출하는 시도를 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사람 골수에서 간엽 줄기 세포의 분리 및 배양

척추 융합 수술 환자에서 환자의 동의하에 장골 이식 시 골수 혈액 3cc를 채취한다. 골수 혈액 3ml를 부피가 1:2가 되도록 RPMI 1640(Gibco,Uppsand, NY)으로 희석한뒤 4개의 원추형 시험관에 4ml Ficoll-Hypaque($d=1.077\text{g/ml}$,Pharmacia Uppsala, Sweden) 위에 조심스럽게 중층한다. 2,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 형성된 저비중의 단핵구층을 Pasteur pipette 으로 흡입하여 새로운 시험관에 옮긴다. PBS 용액을 첨가하여 1000rpm으로 10분, 800 rpm으로 10분 2회 세척하여 단핵구를 얻는다. 60ml 배양접시에 5×10^6 개씩 분리하여 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS) 와 50U/ml penicillin, 0.05mg/ml streptomycin가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY)에서 배양한다. 배양기의 온도는 37도, 이산화탄소의 농도는 5%로 유지한다. 배양 72시간에 배양접시에 부착되지 않은 세포를 배지를 갈아 주면서 제거한다. 그 후 같은 조건에서 세포가 배양접시에 가득 찰 때까지 배양한다. 배양액은 48시간에 한번씩 교체한다. 배양된 세포를 0.05% trypsin 과 0.02% EDTA를 첨가하여 세포를 떼어낸 후 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 농도로 다시 배양한다. 같은 방법으로 3회 분리 배양 후 세포를 냉동 보관한다.

2. 골수 세포 배양액의 채취 및 골수 세포의 표지

냉동 보관 되어 있는 골수 세포를 상온에서 해동한 후 24시간 동안 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS) 와 50U/ml penicillin, 0.05 mg/ml streptomycin가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY)에서 배양한다. 배양액을 제거한 후 PBS로 2회 세척한 다음 DMEM만 5cc 넣고 72시간 동안 같은 조건에서 배양하여 골수 세포 배양액(conditioned media)을 얻은 후 -20도에 냉동 보관한다. 골수 세포와 신경세포를 동시에 배양하는 경우 골수 세포를 표지하기 위하여 신경세포에 첨가하기 24시간 전에 표지자(Cell Tracker Green

(Molecular probes, Eugene, OR))로 표지한다.

3. 백서 배아 채취, 배부 신경절 배양

임신 14일 백서에서 태아를 적출한 후 현미경하에서 배부 신경절을 떼어낸다. 배부 신경절 주위의 연부 조직과 말초 신경을 제거한다. 배부 신경절 중 일부는 반으로 절개하여 rat-tail collagen으로 건조 시킨 ACLAR hats에서 NGF(100ng/mL)가 포함된 Neurobasal medium 배지로 배양한다(explant culture). 나머지 신경절은 1.25U/ml dispase 와 0.05% collagenase가 포함된 DMEM/F12 medium에서 24시간 동안 효소 분해 후 같은 배지에서 ACLAR hats에서 배양한다(dissociate culture).

4. 대조군과 실험군의 신경절, 신경세포의 배양 과 면역염색

신경절 배양과 신경세포의 배양은 3가지 다른 조건에서 배양한다. 1)대조군은 Neurobasal medium 만 준 상태에서 배양한다(n=20, explant, dissociate). 2) 골수 세포 동시 배양군은 대조군에 배양 24시간 후 골수세포를 10,000개를 첨가하여 배양한다(n=20, explant, dissociate). 3) 골수세포 배양액 첨가군은 Neurobasal medium 80%와 배양액 20%를 첨가하여 배양한다(n=20, explant, dissociate). 모든 군에서 배지 교환은 48시간 마다 시행하며 37°C, 5% CO₂ 조건에서 7일간 배양한다. 신경절과 신경세포 배양 7일째 신경사에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역염색을 시행한다. 배양기 hat을 L15 용액으로 2회 세척한 후 상온에서 20분간 4% paraformaldehyde로 고정한다. 15분간 0.2% Triton 100 용액으로 처리 후 다시 L15 용액으로 3회 세척 후 20% NGS로 30분간 상온에서 blocking한다. 일차 항체인 신경사 단클론 항체로 1시간 동안 처리 후 세척 후 이차 항체(Anti-mouse Ig rhodamine conjugated secondary antibody)로 45분간 세척한다. 핵 표지자로는 Hoechst 33342를 이용하여 슬라이드를 만든다.

5. 세포 돌기의 측정 및 생존 세포수의 비교

형광 현미경으로 면역 염색을 한 신경절을 관찰 후 현미경에 부착되어 있는 디지털 사진기로 이미지 촬영을 한 후 Metamorph 프로그램으로 신경 돌기의 개수를 측정한다. 신경돌기의 길이는 가장 길게 성장한 돌기 4개를 선택하여 길이를 잴 후에 평균 값을 구한다. 신경세포의 면역염색 슬라이드에서 무작위로 10 곳을 택하여 세포체 길이의 세 배 이상 길이의 신경돌기를 가진 세포 수를 세어 역시 평균값을 구한다(Gavazzi et al., 1999). 측정된 신경돌기의 수, 길이, 생존 세포 수를 비교한다.

6. 골수 간엽 세포에서 분비되는 단백질질의 분석

골수 간엽 세포에서 분비되는 단백질질의 분석은 RayBio human cytokine assay kit(C series 1000, RayBiotech Inc., Norcross, GA)를 이용하여 검출한다. 배양액의 채취는 배양을 시작한지 72시간 후에 채취한다. 대조군은 신경절 신경세포만 배양한 용액으로 하고, 골수 세포만 배양한 용액, 골수 세포와 신경세포를 동시에 배양한 배양액을 각각 채취하여 -20도에서 냉동 보관한 후에 상온에서 해동하여 RayBio의 공정 지침(Fig. 1.)에 따라 분석을 시행한다. RayBio human cytokine assay kit는 사람에서 발견된 이미 알려진 120종의 cytokine을 검출할 수 있는 kit로서 각각의 단백질질에 대한 항체가 부착된 array support에서 sample과 반응 시키고 labeled-Streptavidin 과 다시 반응 시켜 그 신호를 detection후 opticometer를 사용하여 정량적으로 분석하고 array map을 이용하여 의미 있는 강도 이상의 단백질질을 검출한다.

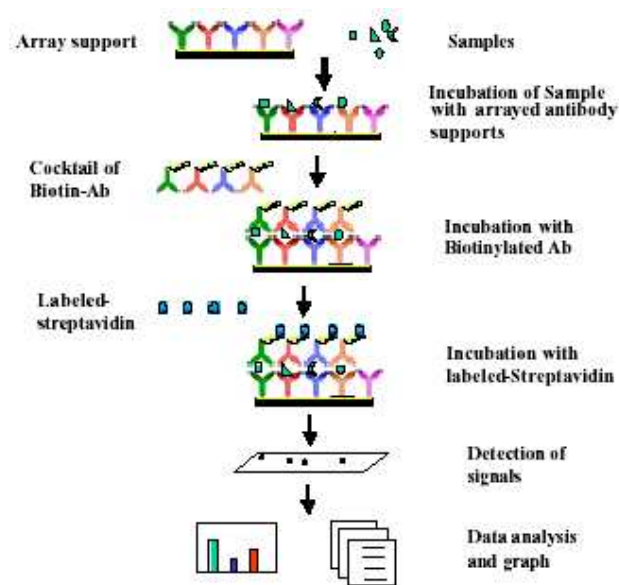


Fig. 1. Process of RayBio human cytokine assay kit

7. 통계 처리

대조군과 실험군의 신경돌기 수, 길이와 생존 세포 수의 통계학적 차이는 ANOVA 검사와 post hoc 검사로 하고 $P < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정한다.

III. 결과

1. 사람 골수 간엽 줄기 세포의 특성

용기 부착 방법을 사용하여 분리된 사람 골수 간엽 줄기 세포는 전형적인 기질 세포의 다각형 구조를 보였다(Fig. 2 A, B). 첫 평판 배양후 세포가 배양접시에 가득 찰 때까지 3-4주가 소요되었고 이 세포들의 배양 시간은 3-4일 이었다. 사람 골수 간엽 줄기 세포는 특별한 성장 인자 없이 10% FBS만 첨가된 DMEM 배지에서 잘 증식하였다. 세 차례 계대 배양된 사람 골수 간엽 줄기 세포는 anti-CD 105 항체를 사용한 면역 세포 화학 검사에서 90%가 양성반응을 보였다(Fig. 2 C). 또한 세포 표면 표지자에 대한 반응 검사상 CD13 과 CD105에는 양성 반응을 CD45 와 CD34에는 음성 반응을 보였다(Fig. 3).

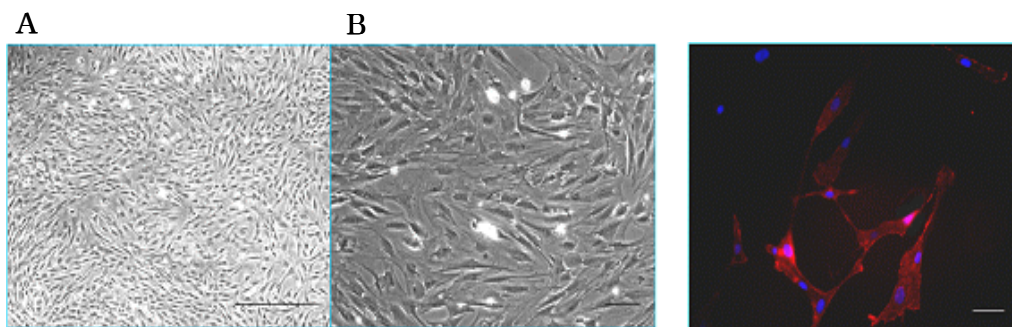


Fig. 2. Characteristics of third passage BMSC prepared from human using a gradient dissociation and flask adherent method. A, B. Phase contrast micrographs shows the typical polygonal shape of stromal cells. C. Immunocytochemistry using anti-CD105 antibody and DAPI nuclear marking show that primate BMSC are mostly positive (>90%). (Scale bar 100 μ m)

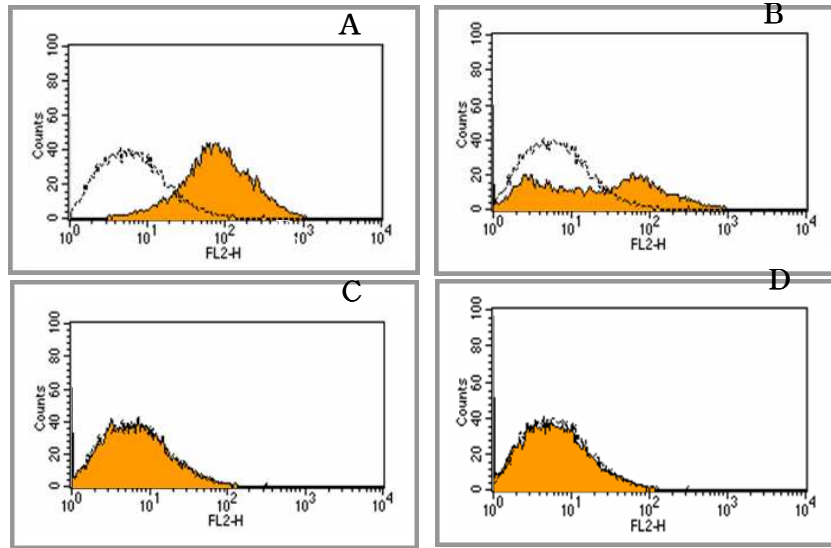


Fig. 3. Analysis of human BMSC surface marker. A. CD13, B. CD105, C. CD45, D. CD34. A, B show that human BMSC surface marker is positive, C, D show that hematopoietic cell surface marker is negative.

2. 사람 골수 간엽 줄기 세포가 배부 신경절 신경세포의 생존에 미치는 영향

세 가지 다른 조건에서 배양 7일후 신경돌기가 있는 혹은 신경돌기가 없는 배부 신경절 신경세포의 수를 정량화 하였다. 배부 신경절 신경세포의 신경돌기는 SMI-33 단클론 항체를 이용한 면역염색을 통하여 분명하게 표지되었다(Fig. 4 A-C). 신경세포의 생존은 세포체 직경의 세 배 이상 길이를 갖는 신경돌기가 하나 이상일 때 생존 세포로 정의 되었다. 태아 백서의 배부 신경절 신경세포의 dissociated culture시 생존한 신경세포 수는 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포 동시 배양군이 대조군 보다 의미 있게 많았다. 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포 동시 배양군 사이에는 의미 있는 차이가 없었다(Fig. 5).

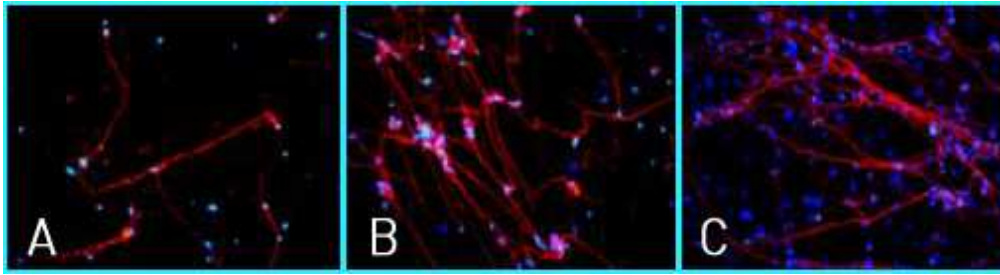


Fig. 4. A-C. Merged picture of SMI-33 immunostaining and the nuclear marker staining of dissociated fetal DRGs cultured in NBL medium with 3 different conditions for 7 days. A. control medium, B. BMSC conditioned medium, C. coculture with BMSC. (Scale bar 100 μ m).

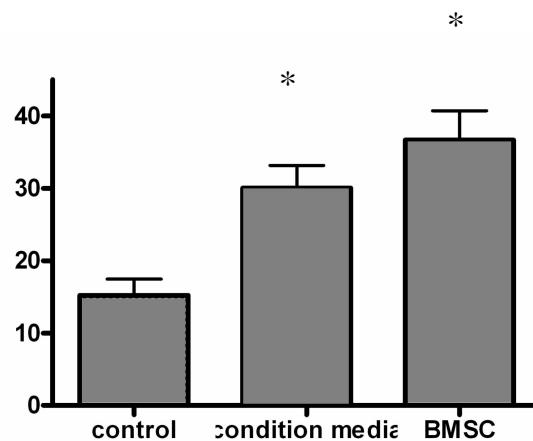


Fig. 5. Bar graph of mean numbers of neurons with neurites after 7 days dissociated culture under 3 different conditions. There is a significant difference between control medium and BMSC conditioned medium, coculture with BMSC group (* $p < 0.05$, two way ANOVA-test).

3. 사람 골수 간엽 줄기 세포가 배부 신경절 신경세포의 신경돌기 성장에 미치는 영향

태아 백서 배부 신경절 explant culture에서 SMI-33 면역염색 후 신경돌기의 수와 길이를 측정하였다(Fig. 6). 실제 신경돌기의 수가 너무 많아 그 수를 측정하기가 불가능 하여 그들이 차지하는 면적으로 측정하였으며 세포당

가장 긴 신경돌기 4개의 길이를 측정하였다(Fig. 7 A, B). 배양 14일째 신경돌기가 차지하는 상대 면적 (전체 신경돌기 면적/전체 신경세포 면적)은 각각 6.59 ± 1.79 ; 대조군 (n=4), 24.65 ± 1.53 ; 골수 세포 배양액 첨가군 (n=6), 26.92 ± 5.82 ; 골수 세포 동시 배양군 (n=6) 이었다(Fig. 7 A). 가장 긴 4개의 신경돌기의 평균 길이는 각각 615.7 ± 53.7 , 1652.0 ± 96.2 , $1521.0 \pm 104.1 \mu\text{m}$ 이었다(Fig. 7 B). 즉, 신경돌기의 수 와 길이는 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포 동시 배양군이 대조군 보다 의미 있게 많았다. 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포 동시 배양군 사이에는 의미 있는 차이가 없었다.

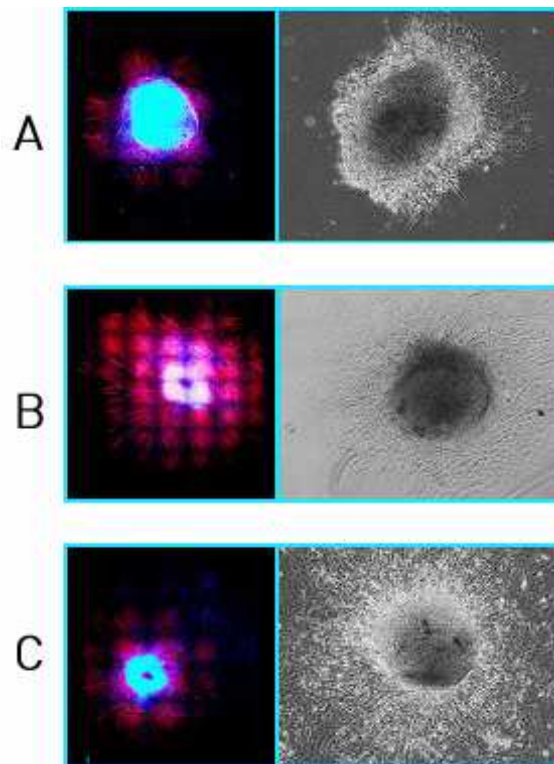


Fig. 6. Immunostaining of fetal DRG explants with SMI-33 (A: control medium, B: BMSC conditioned medium, C: coculture with BMSC)

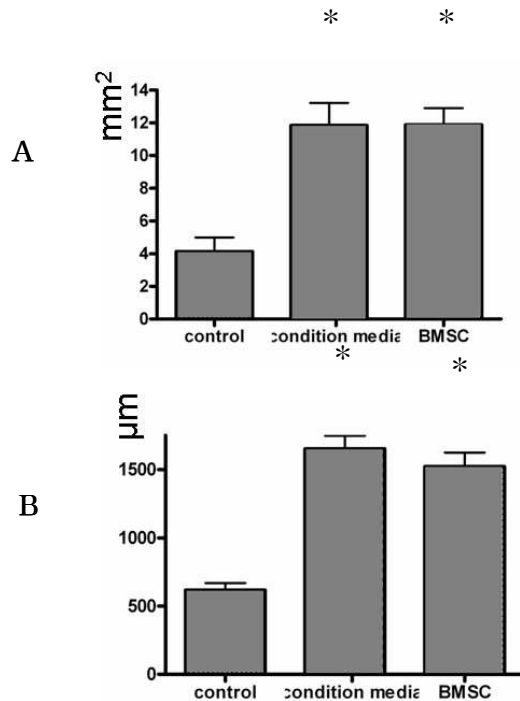


Fig. 7. A. The relative area of neurites. B. The mean length of the 4 longest neurites. There were significant differences between control medium and BMSC conditioned medium, coculture with BMSC groups in length and number of neurites (* $p < 0.05$, twoway ANOVA-test).

4. 사람 골수 간엽 줄기 세포에서 분비되는 단백질질의 분석결과

대조군에 비해 골수 세포 배양액에서 신경돌기의 성장과 신경세포의 생존이 더욱 뚜렷하였다. 이런 소견은 사람 골수 간엽 줄기 세포에서 분비된 어떤 인자가 신경 영양 효과를 가지고 있음을 암시한다. human cytokine assay kits를 사용하여 각각의 배양액(사람 골수 간엽 줄기세포 배양액, 태아 백서 배부 신경절 신경세포 배양액, 동시 배양액)을 분석하였다. 사람 골수 간엽 줄기 세포 배양액에서 검출된 단백질질은 IL-6, IL-8, IGFBP-2, GM-CSF, RANTES, MCP-1, TIMP-1, TIMP-2, u-PAR, 와 VEGF였고 배부신경절 신경세포 배양액에서 검출된 단백질질은 FGF-6, b-NGF, IL-2, IL-3, Leptin, GCSF, MCP-1, TNF, TIMP-2 이었다(Fig. 8). 동시 배양액에서는 위의 언급된 모든 단백질질이 검출되었다. 이러한 단백질질중 IL-6, VEGF, 와 GM-CSF는 생체 내에서 모두 신경 영양 효과를 가지는 것으

로 알려져 있다. [abbreviations: IL-interleukin, IGFBP-insulin like growth factor binding protein, GM-CSF-granulocyte macrophage colony stimulating factor, RANTES-regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, MCP-monocyte chemoattractant protein, TIMP-tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, uPAR-urokinase plasminogen activator receptor, VEGF-vascular endothelial growth factor, FGF-fibroblast growth factor, NGF-nerve growth factor, GCSF-granulocyte colony stimulating factor, TNF-tumor necrotic factor]

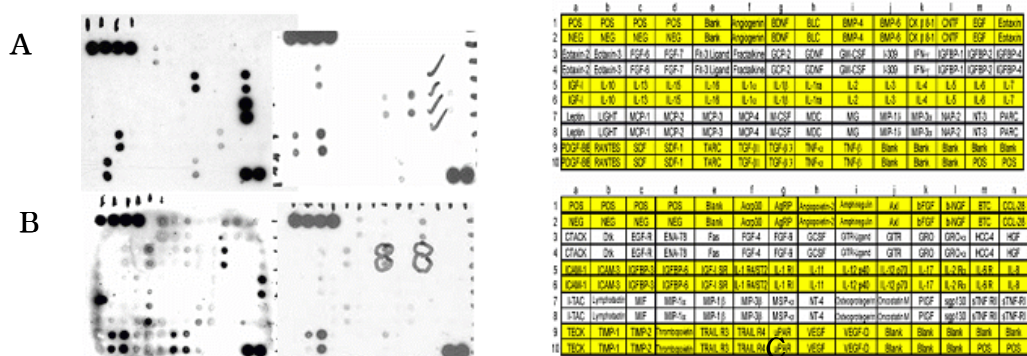


Fig. 8. Cytokine assays results. A. BMSC conditioned medium. The positive spots were noted on angiogenin, GM-CSF, IGFBP-2, MCP-1, MIP-3, RANTES, TNF-, GRO, IL-8, TIMP-1, TIMP-2, uPAR, VEGF, and IL-6 binding sites. B. DRG conditioned medium. The positive spots were noted on FGF-6, IL-2, IL-3, Leptin, MCP-1, TNF- β , bFGF, GCSF, TIMP-2 binding sites. C. RayBio human cytokine antibody array map.

5. 사람 골수 간엽 줄기 세포에서 분비되는 단백질질의 골수 공여자에 따른 변이

사람 골수 간엽 줄기 세포에서 분비되는 단백질질의 종류는 공여자마다 약간의 차이를 보였다(Fig. 9). 그 중에서 공통적으로 검출되는 단백질질로는 IL-6, VEGF, GM-CSF, TIMP-1 등이 있었고 이들은 대부분이 많은 연구가 있어온 잘 알려진 단백질들로서 다양한 신경 영양 효과가 입증된 것

들이다.

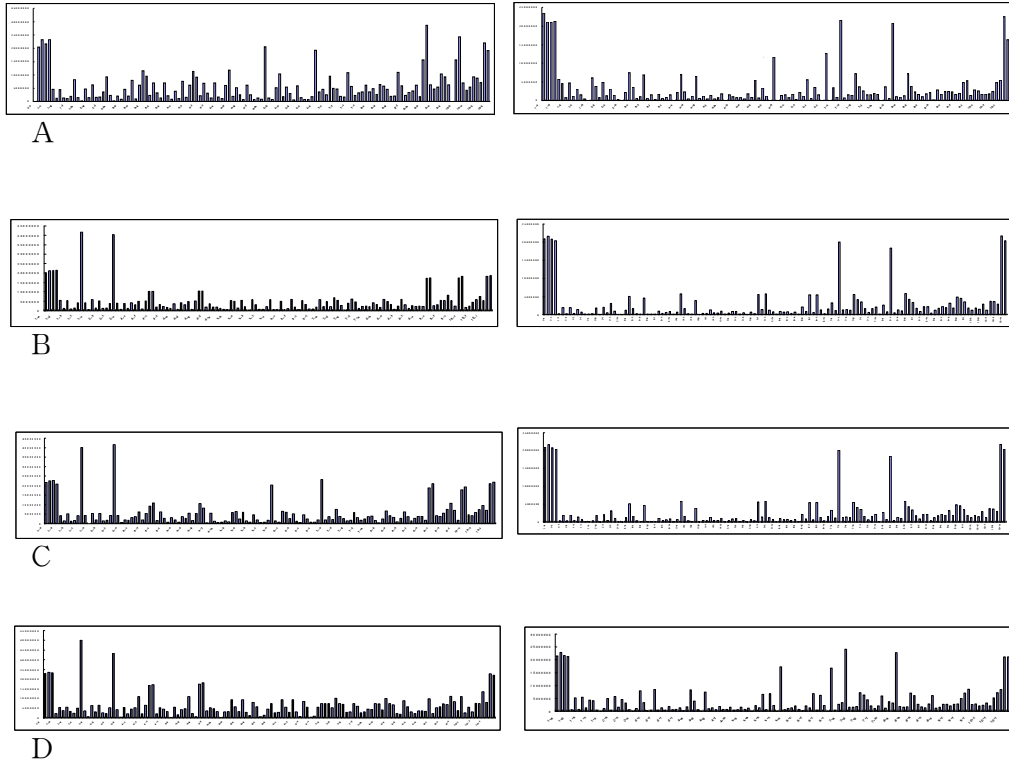


Fig. 9. Donor dependent variation of cytokines released from human BMSC A. Donor 1 ; IL-6, VEGF, MCP-1, GM-CSF, TIMP-1. B. Donor 2 ; IL-6, VEGF, IL-8, GM-CSF, NGF, TIMP-1. C. Donor 3 ; IL-6, VEGF, GM-CSF, TIMP-1, IGFBP-2, RANTES. D. Donor 4 ; IL-6, VEGF, MCP-1, TIMP-1, u-PAR, TIMP-2.

6. 사람 골수 간엽 줄기 세포 와 태아 백서 신경절 신경세포간의 기질적 상호 작용

신경절 신경세포를 사람 골수 간엽 줄기 세포와 동시 배양시 신경돌기의 성장은 대조군이나 사람 골수 간엽 줄기 세포 배양액에서 배양된 신경세포에 비해서 일정한 방향성을 갖는 fasciculation 소견을 더 뚜렷하게 보였다 (Fig. 10). 이런 소견은 골수 간엽 줄기 세포와 신경세포간에 어떤 기질적 상호 작용이 존재함을 의심하게 하는 것이다.

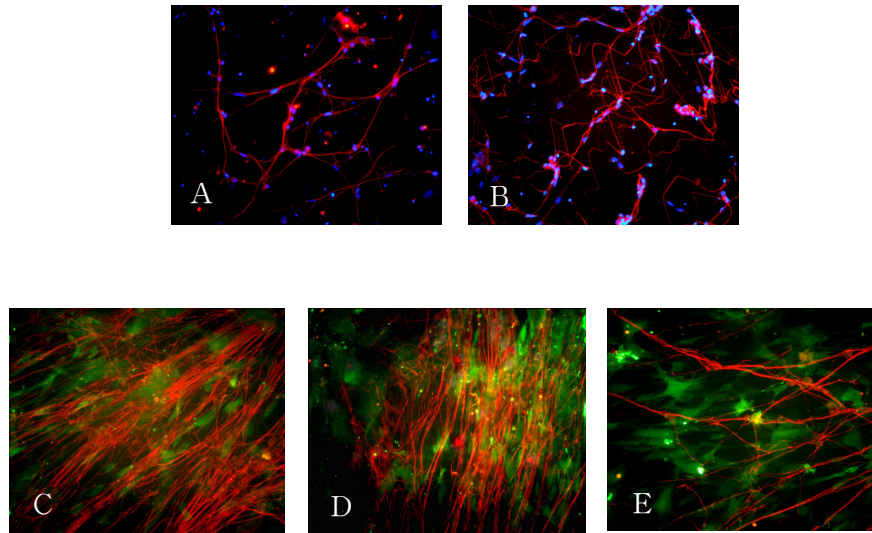


Fig. 10. The pattern of neurite outgrowth with or without BMSC in A. control medium, B. BMSC conditioned medium, C-E. Coculture with BMSC. The pattern of neurite outgrowth in C-E shows directional growing associated with BMSC and more fasciculation. Scale bar $100\mu\text{m}$

IV 고 찰

대조군에 비해서 골수 세포 배양액 첨가군과 골수 세포 동시 배양군에서 태아백서의 배부 신경절 신경세포는 의미 있는 성장 및 생존을 보여 주었다. 이런 결과는 골수 간엽 줄기 세포에서 분비된 어떤 단백질질이 배부 신경절 신경세포의 성장과 생존을 자극하였다는 것을 간접적으로 암시한다. 그러나 배양액만을 첨가하거나 골수 간엽 세포를 동시 배양한 실험군 사이에 의미 있는 차이가 없는 것과 골수 세포 동시 배양군에서 추가로 발견된 단백질질이 없었던 점으로 보아 동시 배양군에서 골수 세포와 배부 신경절 신경세포간의 지속적인 세포간 상호작용에 의한 단백질 분비의 변화는 뚜렷하지 않았던 것으로 생각된다. 하지만 골수 간엽 세포 존재 시 신경돌기 성장이 방향성을 갖는 특징은 세포간 기질 상호작용이 일어나고 있음을 암시한다. 향후 검출된 단백질 각각의 역할을 알기 위해 blocking antibody 혹은 neutralizing antibody를 사용하여 신경세포 생존 및 성장에 대한 각각의 단백질이 미치는 효과를 분석하는 것이 중요하며, 척수손상 동물 모델에서 골수 간엽 세포의 이식 후 이러한 단백질들이 생체 내에서 분비됨을 검사할 필요도 있겠다. 골수 간엽 세포에서 분비된 단백질의 종류는 공여자간에 상당한 변이가 존재하였는데 이 원인에 대해서는 더 많은 sample 분석을 통한 연구가 필요하겠지만 각 공여자마다 골수 간엽 세포의 유전자 발현에 영향을 주는 미세 환경의 차이가 그 원인이 아닐까 생각된다. 골수 흡입 후 분리한 세포를 플라스틱 용기에서 배양하였을 때 부유하는 세포군은 조혈 세포로 용기에 부착하는 세포를 골수 간엽 세포로 언급하며 이런 골수 간엽 세포에 간엽 줄기 세포와 전구 세포가 포함되어 있다.⁷ 이들 세포들은 미분화 형태로 복제할 수 있으며, 다양한 종류의 간엽 세포 (bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and marrow stroma)로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 골수 간엽 세포는 IL-6 and 7, leukaemia inhibitory factor, stem-cell factor, GM-CSF, thrombopoietin, TNF- β 1, β 2와 같은 조혈기능을 가진 단백질을 분비하며, 이런 단백질 중 일부(GM-CSF, stem-cell factor, leukemia inhibitory factor, IL-6)는 glycoprotein-130과 관련된 신호 전달 체계를 사용하는 표적 세포 수용체를 통하여 골수 간엽에서 유래된 세포의 분화에 영향을 주는 것으로 보고되었다.^{7,10} 엄밀히 말하면 줄기 세포란 지속적인 복제가 가능하며 신체의 어떤 세포로도 분화가 가능한 세포로

정의 되며 아직까지 골수로부터 줄기세포군이 순수하게 분리 동정되지는 못하였다. 골수 간엽 줄기 세포는 손상된 척수나 뇌 조직의 기능적 복원을 촉진 한다는 많은 동물 연구 결과가 보고되었고 실제로 약간의 골수 간엽 줄기 세포가 신경세포에 특이한 단백물질을 표현하였으나 분화된 줄기 세포가 손상된 조직을 대체하였을 개연성은 드물며 분비된 단백물질에 의하여 손상된 신경조직의 내재적 복원 반응을 활성화하였다고 보는 시각이 많다.¹⁰ 본 연구 방법에 의해 공통적으로 검출된 단백물질로서 IL-6, GM-CSF, 와 VEGF는 신경 영양 효과 및 손상된 신경조직에 대한 보호 작용에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 많이 거론될 뿐만 아니라 최근 활발히 연구되고 있는 물질이므로 그 의의가 크다. IL-6의 경우, P.Marz는 IL-6가 교감 신경 세포 기능을 조절함을 보여 주었는데 말초 교감 신경 세포 와 PC12 cells에서 functional IL-6R가 발현됨을 증명함과 동시에 tumor necrosis factor α 가 IL-6와 gp130 mRNA발현의 주 조절자임을 보여 주었다.²¹ Takashi Shuto 등은 백서 신경절 신경세포를 사용하여 IL-6가 ciliary neurotrophic factor 발현을 up-regulation하여 신경돌기의 재생을 증강시킴을 보여 주었다.³¹ William B등은 본래 손상 받은 중추신경계내의 성인 감각 신경은 재생이 불가능한 것으로 알려져 있지만 백서에서 injury-induced IL-6 up-regulation이 중추신경계 내에서 재생을 촉발시키고 이것이 dorsal column projecting sensory neuron의 boosted growth state를 통해서 일어남을 증명하였다.⁵ S. Okada 등은 척수 손상 모델에서 IL-6R의 차단이 reactive astrogliosis를 억제하고 기능 복구를 저지함을 보여 주었다.²⁶ GM-CSF의 경우 골수에서 간엽 세포 증식을 자극하는 강력한 조혈기능을 가진 단백 물질이지만 Kim 등은 GM-CSF가 신경 전구 세포의 증식을 자극하고 apoptosis를 억제하여 신경 발달과 복구에 중요한 역할을 함을 보여 주었다.¹⁹ VEGF의 경우, 혈관 내피 세포의 mitogen이고 생체 내에서 angiogenesis를 촉발하는 것으로 알려져 있지만 최근 많은 연구자들이 VEGF가 말초 및 중추신경계에서 신경의 발달 및 손상 시 복구에 중요한 역할을 함을 증명하였다.^{28,29,30,33} 다양한 cytokines 중 neurotrophins (BDNF, NGF, NT-3, NT-6, GDNF)는 중추 및 말초 신경에서 신경 세포의 생존 및 분화에 관여하는 중요한 단백 물질로서 trk 수용체들에 의해서 그 작용이 매개 되는데¹² Gavazzi 등은 그 중 NGF 와 GDNF 만이 돌기를 가진 신경 세포의 비율을 의미 있게 증강 시키는데 GDNF가 NGF보다 small, IB4-neuron들에 대해서 그 효과가 크고 신경돌기의 전체 길이에 대해서는 NGF

가 GDNF 보다 훨씬 더 증강 효과가 있음을 보여 주었다. 또한 BDNF는 신경 돌기 성장에 대해 억제 효과를 보였으며 BDNF와 NT-3는 함께 작용시 특별한 신경세포 군에서 NGF의 성장 촉진 효과를 부분적으로 차단함을 보여 주었다.¹⁴ 본 연구에서 골수 간엽 세포에서 분비된 단백 물질중 신경세포의 생존 및 성장에 중요한 역할을 하는 neurotrophins는 검출되지 않았는데 그 이유에 대해서는 앞으로 더 연구가 필요할 것으로 생각되지만 Chen 등의 연구에서 손상된 뇌 조직에서 손상 후 시간경과에 따라 BDNF와 NGF가 증가됨을 고려하면 추측컨대 본 연구에서 생체 외 실험의 미세환경이 골수 간엽 세포에서 neurotrophins의 유전자 발현을 충분히 자극하기에 부족하지 않았나 생각되며 신경 세포의 생존 및 성장에 영향을 주는 neurotrophins는 주로 신경 세포 자체에서 발현될 가능성이 있다. 이를 증명하기 위해서는 손상된 척수 동물 모델에서 골수 간엽 세포 이식후 시간에 따른 골수 간엽 세포 및 신경 세포 각 각에서 분비된 단백질질의 정량적 분석이 요구된다. 본 연구를 통해서 알 수 있는 사실은 생체 외에서 골수 간엽 세포가 분비하는 단백질 중 신경 세포의 생존과 성장에 영향을 주는 것은 기존에 잘 알려진 neurotrophins (NGF, GDNF, BDNF, NT-3) 보다는 IL-6, GM-CSF, VEGF와 같은 신경 영양 효과를 가진 단백질이라는 것이다. 그 외에 본 연구에서 발견된 단백질(IL-8, IGFBP-2, RANTES, MCP-1, TIMP-1, TIMP-2, u-PAR)의 기능에 대한 앞으로의 연구 또한 중요하다 할 수 있다.

V. 결 론

본 실험의 결론은 골수 간엽 줄기 세포에서 신경 성장 촉진 물질이 분비되고 이것이 신경 돌기의 성장과 신경 세포 생존에 영향을 미친다는 것이다. 검출된 단백질 중 IL-6, GM-CSF, VEGF 등은 신경 영양 효과가 이미 입증된 것이고 그 외에 검출된 단백질의 역할에 대해서도 앞으로 더 연구가 필요할 것으로 생각된다. 신경절 신경세포를 사람 골수 간엽 줄기 세포와 동시 배양 (co-culture)시 신경돌기의 성장은 일정한 방향성을 갖는 fasciculation 소견을 더 뚜렷하게 보였는데 이런 소견은 골수 간엽 줄기 세포와 신경세포간에 어떤 기질적 상호작용이 존재함을 암시한다. 앞으로 검출된 단백질이 단일 혹은 복합적으로 신경 세포 생존 및 성장에 어떤 영향을 미치는 지 그리고 척수 손상 동물 모델에서 생체 내 실험을 통하여 사람 골수 간엽 줄기 세포 이식후 단백질 분비에 어떤 변화가 있는가에 대한 연구가 중요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Armitage J O, Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998 ; 92 : 4491-4508.
2. Augustin H G, Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 1998 ; 19 : 216-222.
3. Bjorklund A, Lindvall O, Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000 ; 3 : 537-544.
4. Bouhy D, Schoenen J, Franzen R, Delayed injection of GM-CSF improves functional recovery and promotes axonal regeneration after spinal cord injury. Program No. 245.9 Abstract, San Diego, Society for Neuroscience 2003.
5. Cafferty W B, Gardiner N J, Das P, Qiu J, McMahon S B, Thompson S W, Conditioning Injury-Induced Spinal Axon Regeneration Fails in Interleukin-6 Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 2004 ; 24(18) : 4432-4443.
6. Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, et al, Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res.* 2002 ; 69(5) : 687-691
7. Chopp M, Li Y, Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *The Lancet* 2002 ; 1 : 92-100.
8. Chopp M, Zhang X H, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, et al, Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000 ; 11(13) : 3001-3005.
9. Deans R, Moseley A, Mesenchymal stem cell: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 2000 ; 28 : 875-884..
10. Dormady S P, Bashayan O, Dougherty R, Zhang X M, Basch R S, Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001 ; 10 : 125-140.
11. Dvorak H F, VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin*

Perinatol 2000 ; 24 : 75-78.

12. Ebadi M, Bashir R M, Heidrick M L, Hamada F M, Refaey H E, Hamed A, et al, Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int.* 1997 ; 30(4-5) : 347-374.

13. Feldmann M, Saklatvala J, Proinflammatory cytokines, in: J.J. Oppenheim, M. Feldman (Eds.), *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA. 2001 : 291-305.

14. Gavazzi I, Kumar R D, McMahon S B, Cohen J, Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors in vitro. *European J of Neuroscience* 1999 ; 11 : 3405-3414.

15. Hofstetter C P, Schwarz E J, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop D J, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *PNAS* 2002 ; 99(4) : 2199-2204.

16. Hynds D L, Snow D M, A semi-automated image analysis method to quantify neurite preference/axon guidance on a patterned substratum. *J Neurosci Methods* 2002 ; 121(1) : 53-64.

17. Kannan Y, Moriyama M, Sugano T, Yamate J, Kuwamura M, Kagaya A, et al, Neurotrophic action of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine sympathetic neurons. *Neuroimmunomodulation* 2000 ; 8(3) : 132-141.

18. Kessinger A, Sharp J G, Mobilization of blood stem cells. *Stem Cells* 1998 ; 16(Suppl 1) : 139-143.

19. Kim J K, Choi B H, Park H C, Park S R, Kim Y S, Yoon S H, et al, Effects of GM-CSF on the neural progenitor cells. *Neuroreport* 2004 ; 15(14) : 2161-2165.

20. Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon F X, Ferrer J, Parrens M, et al, Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol* 1999 ; 154 : 405-415.

21. März P, Gadiant R A, Otten U, Expression of interleukin-6 receptor (IL-6R) and gp130 mRNA in PC12 cells and sympathetic neurons: modulation by tumor necrosis factor α (TNF- β). *Brain Res* 1996 ; 706 : 71-79.

22. März P, Cheng J G, Gadiant R A, Patterson P H, Stoyan T, Otten U, et al, Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 3251-3256.
23. Neuhuber B, Himes B T, Swanger S A, Fisher I. Bone marrow stromal cell transplantation into spinal cord injury: promises and obstacles. Program No. 933.9 Abstract, San Diego, Society for Neuroscience. 2004
24. Nicola N A, GM-CSF, in: J.J. Oppenheim, M. Feldman (Eds.), *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA, 2001 : 899-910.
25. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, et al, Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery on the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurology* 2004 ; 187 : 266-278.
26. Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al, Blockade of Interleukin-6 Receptor Suppresses Reactive Astrogliosis and Ameliorates Functional Recovery in Experimental Spinal Cord Injury *Journal of Neuroscience Research* 2004 ; 76 : 265-276.
27. Penkowa M, Quintana A, Carrasco J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J, Metallothionein Prevents Neurodegeneration and Central Nervous System Cell Death After Treatment With Gliotoxin 6-Aminonicotinamide. *Journal of Neuroscience Research* 2004 ; 77 : 35-53.
28. Rosenstein, J.M., Krum, J.M. New roles for VEGF in nervous tissue beyond blood vessels *Experimental Neurology* 2004 ; 187 : 246-253.
29. Rosenstein J M, Mani N, Khaibullina A, Krum J M, Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons *The Journal of Neuroscience* 2003 ; 23(35) : 11036-11044.
30. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, Curry C, Kearney M, Magner M, et al, Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 2000 ; 6 : 405-413.
31. Shuto T, Horie H, Hikawa N, Sango K, Tokashiki A, Murata H, et al, IL-6 up-regulates CNTF mRNA expression and enhances neurite regeneration *Neuroreport*. 2001 ; 12(5) : 1081-1085.

32. Soker S, Takashima S, Miao H Q, Neufeld G, Klagsbrun M, Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998 ; 92 : 735-745.
33. Sondell M, Lundborg G, Kanje M, Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and schwann cell proliferation in the peripheral nervous system, *The Journal of Neuroscience*. 1999 ; 19(14) : 5731-5740.
34. Taga T, Kishimoto T, gp130 and interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997 ; 15 : 797-819.
35. Takai K, Hara J, Matsumoto K, Hosoi G, Osugi Y, Tawa A, et al, Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood* 1997 ; 89 : 1560-1565.
36. Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, Noda T, Bai H, Kitada M, et al, Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. *J of Neuro Res* 2003 ; 72 : 343-351.

Abstract

Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells for growth and survival of dorsal root ganglion neurons

Sang Won Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Yong Eun Cho)

Stem cell transplantation suggests a new paradigm of treatment for spinal cord and brain injured patients. Among the various stem cells, bone marrow mesenchymal stem cell is available to clinical use and focus of many studies at present. The reasons are followed. First, these cells are multipotent adult stem cells to differentiate hematopoietic, neural, epithelial, mesenchymal, embryonic cells. Second, these cells can be easily isolated and are available to autologous delivery. Third, there have been wide clinical use to treat non-neurologic diseases. Especially, in many injured spinal cord animal study, the transplantation of BMSC improved functional outcome. But, the clear mechanism is not unknown. There are many studies in which the survival and neuronal differentiation of BMSC is not feasible. After such a short period, even differentiated cells are highly unlikely to integrate truly into tissue and form complex connections, which improve function. Thus tissue replacement as the mechanism by which BMSC promote their beneficial effects is very unlikely. BMSC behave as small molecular factories, producing many different cytokines and trophic factors. these cytokines included neurotrophic and neuroprotective factors by which endogenous restorative function is probably activated to improve the neural function.

But, the studies to prove this mechanism were rare. To confirm this mechanism we analysed the effect of co-culture of BMSC and DRG neurons and the effect of culture of DRG neurons in BMSC conditioned medium. And we tried to detect the factors secreted from BMSC. 7 day after culture, we measured number and length of neurite and number of surviving neurons. All of these significantly increased in co-culture group and BMSC conditioned media group compared to control. But there was no significant difference between co-culture group and BMSC conditioned media group. The cytokines detected from BMSC conditioned media was IL-6, IL-8, IGFBP-2, GM-CSF, RANTES, MCP-1, TIMP-1, TIMP-2, u-PAR, and VEGF. Among them, IL-6, VEGF, and GM-CSF is well known to possess the neurotrophic effect in vivo or vitro. In conclusions, human BMSC secrete the neurotrophic factors which promote the growth and survival of neurons. To know the respective role of detected proteins, it is important to analyze the effect of the protein for growth and survival of the neuron using blocking or neutralizing antibody. And further studies should be performed to examine the in-vivo expression of these cytokines following transplantation in a spinal cord injury animal model.

Key Words : human BMSC, rat, DRG, neurite out-growth, neuronal survival, cytokine