

뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료와

Matrix metalloproteinase의 역할

연세대학교 대학원

의 학 과

남 효 석

뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료와  
Matrix metalloproteinase의 역할

지도교수 허 지 회

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2009 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

남 효 석

# 남효석의 박사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2009 년 12 월

## 감사의 글

이 논문이 완성되기까지 끊임없는 지도와 격려를 베풀어 주시고 항상 좋은 멘토로서 오늘의 저를 있게 해 주신 허지희 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 정말 바쁘신 와중에도 실험 결과뿐만 아니라 글자 한 자 한 자부터 그림까지 꼼꼼히 봐 주신 박창일 의무부총장님과 허승곤 선생님, 김동구 선생님, 김정훈 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

중간엽 줄기세포를 흔쾌히 제공해 주신 김현옥 선생님과 실험 진행 중에 좋은 조언을 주신 이필휴 선생님께 감사를 전합니다. 실험을 진행하는데 헌신적인 노력을 해준 김혜진 연구원, 권일 연구원, 김새롬 연구원, 박현정 연구원에게 감사를 드립니다. 오늘이 있기까지 이해해 주시고 도와 주신 부모님, 장인, 장모님께 감사를 전합니다. 언제나 지칠 때도 저의 버팀목이 되어준 사랑하는 아내 박은정과 사랑하는 딸 서영, 서진에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 실험동물	7
2. 방법	
가. 실험설계	7
(1) Phase 1 실험	7
(2) Phase 2 실험	8
나. 실험방법	8
(1) 중대뇌동맥 폐색	8
(2) 중간엽 줄기세포의 이식	9
(3) 조직처리	9
(4) 신경학적 평가	10
(5) 뇌경색 크기 측정	11
(6) Gelatin zymography를 이용한 MMP측정	11
(7) 통계 분석	12
III. 연구결과	13
1. 중간엽 줄기세포의 특성확인 및 생리학적 지표	13
가. 유세포분석기(Flow cytometry, FACS) 분석	13
나. NuMA에 대한 면역조직화학염색	14
다. 생리학적인 지표	14
2. 중간엽 줄기세포 투여 후 변화	17
가. MMP 발현을 유도하는 시기 탐색	17

(1) 신경학적 검사.....	17
(2) MMP-2 and MMP-9에 대한 Zymography.....	21
나. 중간엽 줄기세포 투여 후 뇌경색 크기와 MMP 변화	25
(1) 신경학적 검사.....	25
(가) Rotarod 검사.....	27
(나) 신경장애점수.....	29
(2) 뇌경색의 크기 변화.....	31
(3) 허혈 반구에서의 MMP의 변화.....	33
(가) MMP-2의 변화.....	33
(나) MMP-9의 변화.....	35
IV. 고찰 .....	36
V. 결론 .....	42
참고문헌.....	44
영문요약.....	50

## 그림 차례

Fig 1. Phase 1 study design-----	7
Fig 2. Phase 2 study design-----	8
Fig 3. Flow cytometric analysis-----	13
Fig 4. Immunohistochemistry for human-specific nuclear matrix antigen -----	14
Fig 5. Body weight changes after MCAO -----	18
Fig 6. Behavioral tests -----	20
Fig 7. Gelatin zymography -----	21
Fig 8. MMP-2 activities at 7 days after MCAO -----	23
Fig 9. MMP-9 activities at 7 days after MCAO -----	24
Fig 10. Body weight changes after MCAO -----	26
Fig 11. Rotarod test after MCAO-----	28
Fig 12. Neurological Severity Scores (NSS) after MCAO---	30
Fig 13. Infarction size after MCAO-----	32
Fig 14. MMP-2 activities in the ischemic hemisphere-----	34
Fig 15. MMP-9 activities in the ischemic hemisphere-----	35

## 표 차례

Table 1. Physiological data before MCAO-----	15
Table 2. Physiological data after MCAO-----	15
Table 3. Physiological data after MSC and saline injection--	16



## <국문요약>

### 뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료와 Matrix metalloproteinase의 역할

중간엽 줄기세포는 환자 자신의 골수를 이용하기 때문에 세포치료가 안고 있는 거부반응이나 종양 형성 등에서 비교적 안전한 치료로 많은 질환에서 연구가 활발히 진행되고 있다. 뇌경색에서 중간엽 줄기세포의 치료 효과는 신생 신경세포의 형성, 신생 혈관의 형성, 뇌가소성 향상, 신경보호, 혈뇌장벽 투과성 조절, 성장인자 분비, 내인성 신경회복을 돕는 등의 기전이 제시되었지만 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

Matrix metalloproteinase (MMP)는 세포외 기질을 파괴시킬 수 있는 단백분해 효소로 정상세포, 소교세포, 혈관내피세포 등에서 분비된다. MMP는 뇌경색의 출혈성 전환, 뇌부종, 혈전용해 실패 등 뇌경색의 나쁜 예후와 밀접하다. 뇌경색에서 MMP의 해로운 역할과 달리, 최근 MMP가 뇌경색 후 회복과정에서 도움이 될 수 있다는 가설이 제시되었다. 회복기에서 MMP는 혈관형성을 돕고, 수상돌기와 축삭이 재생되어 뺏어 나갈 때 필요하다.

중간엽 줄기세포 치료와 MMP가 뇌경색 후 회복기에서 모두 리모델링에 관여한다는 점에 착안을 하여 뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료의 기전이 MMP를 통해서 이루어지는 지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

실험은 두 단계로 이루어졌는데 phase 1에선 중간엽 줄기세포 투여의 최적의 시기를 알아보는 실험이었고, phase 2에서는 phase 1에서 확인된 시기에 중간엽 줄기세포를 실제 투여하고 시간에 따른 신경학적 호전과 MMP의 변화 및 뇌경색 크기의 변화를 살펴 보았다.

Phase 1 실험에선 최적의 중간엽 줄기세포 투여 시기를 찾기 위해서 1시간, 1일, 3일째 중간엽 줄기세포를 투여하였는데, 1시간째 투여한 경우가 신경학적 회복이 가장 우수하였다. 7일째 동물을 희생시키고 gelatin zymography로 MMP의 활성을 측정하였는데, 중간엽 줄기세포를 1시간째 투여한 군이 대조군에 비해서 7일째 허혈반구에서 MMP-2의 활성이 증가되어 있었고 MMP-9은 차이가 없었다.

Phase 2 실험에선 중간엽 줄기세포를 중대뇌동맥 폐색 후 1시간째 투여한 군에서 유의한 신경학적 호전을 10일째부터 관찰할 수 있었다. 뇌경색을 유도한 허혈반구가 비허혈 반구에 비해서 MMP-2와 MMP-9의 발현이 각각 증가되어 있었다. 중간엽 줄기세포를 1시간째 투여한 군에서 MMP-2의 활성이 1일째부터 허혈반구에서 증가되어 있었다. MMP-9은 대조군과 투여군에서 유의한 차이가 없었다. 뇌경색의 크기는 중간엽 줄기세포 투여군이 대조군에 비해서 작았으나, 4일째에만 뇌경색의 크기가 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

본 연구에서는 중간엽 줄기세포를 급성기인 1시간째 투여했을 때 가장 좋은 신경학적 호전을 보였다. 중간엽 줄기세포 투여군과 대조군간의 뇌경색의 크기는 차이가 없었다. 신경학적 호전은 있으나 뇌경색 크기가 차이가 없는 것으로 볼 때 중간엽 줄기세포가 뇌경색에서 치료 효과를 보이는 것은 신생 신경형성보다는 뇌의 가소성 향상에 기인한다고 생각된다. 중간엽 줄기세포가 뇌의 가소성 향상을 가져오는 기전으로 비교적 이른 시기에 MMP-2가 증가하는 것으로 볼 때 MMP-2가 매개체로 작용할 것으로 생각된다.

---

핵심되는 말 : 중간엽 줄기세포, 뇌경색, 기저막 분해 효소

# 뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료와 Matrix metalloproteinase의

## 역할

<지도교수 허지희>

연세대학교 대학원 의학과

남 효 석

## I. 서론

분화가 끝난 신경세포는 재생 능력이 없기 때문에 뇌경색에 의한 신경세포의 허혈손상은 결과적으로 치명적인 뇌기능 상실을 일으킨다.<sup>1,2</sup> 세포대체요법(cell replacement therapy)은 질병으로 인해 손상된 기관이 회복되기 위한 생물학적인 대체 세포를 제공하는 새로운 개념의 치료로서 여러 질환에서 시도되고 있다.<sup>2</sup>

줄기세포는 두 가지 특징을 가지는데, 그것은 미분화 상태로 자가 복제할 수 있는 능력(self-renewal)과 특정 세포로 분화할 수 있는 능력(potency)을 말한다.<sup>3,4</sup> 줄기세포는 크게 배아줄기세포와 성체 줄기세포로 나뉘어 진다. 골수, 피부, 위장관 등에는 대체 세포를 만들기 위해서 성체줄기세포가 이들 기관에 존재한다. 이 중 골수에는 혈액을 만드는 혈액생성 줄기세포(hematopoietic stem cell)와 간엽조직을 만드는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)가 있다. 중간엽 줄기세포는 골세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포로 분화할 수 있고 특수한 상황에서는 신경세포나 혈관내피세포로도 분화할 수 있다.<sup>5,6</sup>

뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료는 동물실험을 거쳐서 임상실험까지 시도되었으나 그 작용기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 먼저, 중간엽 줄기세포가 새로운 신경세포로 분화되어 새로운 신경으로 자라날 가능성이 있으나 새로운 신경이 자라나서 기존의 신경을 완전히 대체할 가능성은 크지 않다. 이 보다는 내인성 신경줄기세포의 이동이나 분화를 촉진할 가능성이 높다. 중간엽 줄기세포가 여러 신경성장인자를 분비할 수 있는 능력은 잘 알려져 있다. 투여된 중간엽 줄기세포는 homing기전에 의해서 뇌경색 주변 부위로 이동할 수 있고 이동한 중간엽 줄기세포가 신경성장인자를 분비하고, 내인성 신경줄기세포를 활성화 시킬 수 있다. 그 외 신생 혈관을 형성하여 허혈 부위의 혈류 증가를 가져올 수 있고 시냅스 형성을 촉진하여 기능회복에 도움을 줄 수 있다.<sup>7</sup>

중간엽 줄기세포 연구에서 투여 시기에 대해서는 대부분의 연구들이 1일 혹은 7일째 중간엽 줄기세포를 투여하였고 최근에는 1달째 투여가 시도되어 유의한 효과가 보고되었다.<sup>8</sup> 초급성기 기간에 대한 연구로는 3시간 짜 투여 시 대조군에 비해서 뇌경색의 크기 및 신경학적 회복이 우수하다고 보고된 바가 있으나,<sup>9</sup> 그 외 초급성기 투여에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

Matrix metalloproteinase (MMP)는 세포외 기질을 파괴시킬 수 있는 단백분해 효소로, 현재까지 약 25종류의 MMP가 알려져 있다. MMP는 정상세포, 소교세포, 혈관내피세포 등에서 분비된다. MMP는 정상적으로는 세포와 조직의 분화, 발달 및 이동, 상처조직의 재생 등에 필요하다. 그러나 비정상적으로 분비되거나 활성화되는 경우 암의 성장, 염증성 질환 및 동맥경화증 등에서 중요한 역할을 한다. MMP 중에서 MMP-2와 MMP-9은 각각 gelatinase A(72 kDa, type IV collagenase) 및 gelatinase B(92 kDa, type IV collagenase)로도 불리

는데, 이들은 뇌의 기저막을 구성하는 주요 세포의 기질인 type IV collagen이나 laminin등을 파괴한다.<sup>10</sup>

뇌경색에서 MMP는 여러 측면에서 나쁜 역할을 하는데 혈뇌장벽을 파괴하고, 탈수초화를 일으키며, 염증반응을 유도하고, 신경-혈관단위체(neurovascular unit)의 결속성(integrity)을 파괴한다. MMP-9은 출혈성 전환이나 tissue plasminogen activator(t-PA) 투여 후 뇌출혈의 발생과 밀접한 관계가 있다.<sup>11,12</sup> 또한, 혈전용해 치료 실패 환자들에서 현저하게 MMP-9이 증가하였다.<sup>13</sup> 치료적인 측면에서 MMP 억제제인 BB-94를 투여 하거나 MMP-9에 대한 중화 항체를 투여하였을 때 뇌손상을 줄일 수 있었다.<sup>14</sup> 따라서, MMP를 억제하여 뇌경색 후의 출혈 전환이나 뇌부종 및 신경 손상을 감소시키도록 유도하는 것이 주요 치료 목표로 연구되어 왔다.

MMP의 뇌경색에서 해로운 역할에 대한 보고와 달리, 최근 MMP가 뇌경색 후 회복과정에서 도움이 될 수 있다는 가설이 제시되었다. 뇌경색 후 회복은 신경가소성, 신생 신경형성, 신생 혈관형성 등이 관련된다. MMP는 발생기에 혈관형성을 돕고, 수상돌기와 축삭이 재생되어 뺏어 나갈 때 필요하다.<sup>15</sup> MMP가 세포외 기질을 리모델링 할 수 있기 때문에 파괴된 조직을 처리하고 새로운 조직이 자라나게 하는 등 회복기에는 유익한 역할을 할 가능성이 있다. MMP-9은 뇌경색 후 24-48시간 이내에 증가하고, 1주일 정도 까지 계속 증가되어 있는 것이 확인된다.<sup>10,16</sup> 하지만 급성기를 지나서 회복기에서 MMP의 역할은 아직 잘 알려져 있지 않다.<sup>17</sup> 회복기에 대한 최근의 연구로는 MMP-9이 뇌경색 변연부에 7-14일째 증가하였는데, MMP-9이 증가된 부위와 리모델링의 표지자 발현 부위가 잘 일치하였다. MMP 억제제를 뇌경색 후 7일째 투여하였을 때 뇌경색의 크기가 오히려 커졌고 신경학적 회복이 저하되었다. 이러한 결과를 통해 MMP-9이 뇌경

색 후 회복과정에 도움을 줄 수 있다는 가설이 제시되었다. 따라서, MMP가 뇌경색에서 무조건 해로운 역할을 하는 것은 아니며 회복기의 MMP의 활성 증가는 뇌경색 후 리모델링을 도와 줄 수 있다고 생각된다.

본 연구자는 중간엽 줄기세포 치료와 MMP가 뇌경색 후 회복기에서 리모델링에 관여한다는 점에 착안하여, 뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료의 기전이 MMP를 통해서 이루어지는 지를 알아보려고 연구를 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

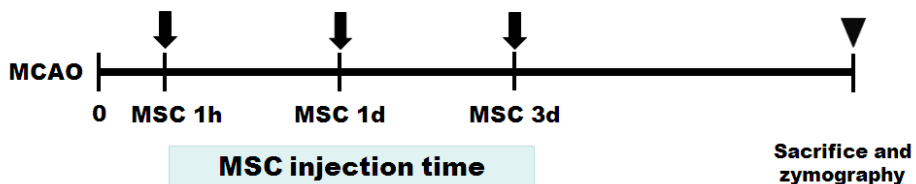
본 연구에서는 270-400gm 정도의 웅성 Sprague-Dawley (SD) rat을 사용하였다. 중간엽 줄기세포는 세브란스 병원 세포치료센터로부터 기증받은 세포주를 이용하였다 [LN tank2 - green rack 5th box, LN2 green line 1st box]. 동물실험은 연세대학교 의료원 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee) 방침 및 동물실험 관련 법규에 따라 시행되었다.

### 2. 방법

#### 가. 실험설계

##### (1) Phase 1 실험: MMP 발현을 최대 유도하는 시기 탐색

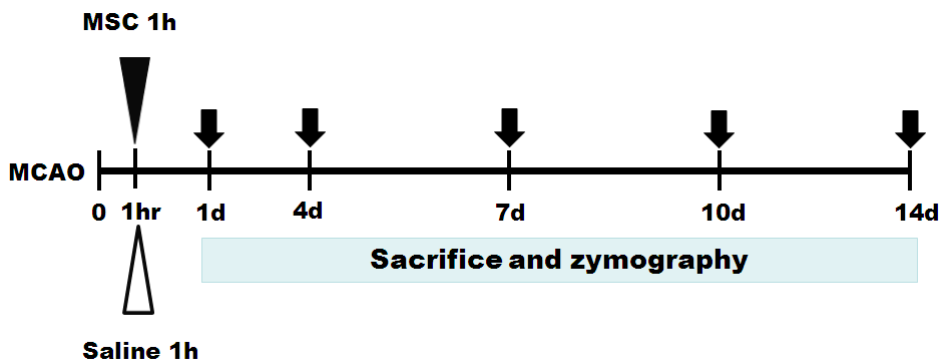
중간엽 줄기세포의 투여 시기에 따라 MMP 발현이 최대화 되는 시점을 찾기 위해 중간엽 줄기세포를 중대뇌동맥 폐색 후 1시간 (MSC 1h군, N = 7), 1일(MSC 1d군, N = 7)과 3일째(MSC 3d군, N = 7) 각각 투여하였다. 대조군(N = 8)은 중대뇌동맥 폐색 후 중간엽 줄기세포를 투여하지 않은 군으로 하였다. 신경학적 장애는 뇌경색 전과 1일, 4일, 7일째 rotarod test와 Longa점수를 측정하였다. MMP 발현은 중대뇌동맥 폐색 7일째에 동물을 희생하여 MMP 활성을 zymography를 통해서 확인하였다 (Fig 1).



**Fig 1. Phase 1 study design. It was aimed to reveal proper MSC injection time.**

## (2) Phase 2 실험: 중간엽 줄기세포 투여 후 뇌경색 크기와 MMP변화

시간에 따른 뇌경색의 크기와 MMP 발현의 차이를 보기 위해서 두 번째 실험을 진행하였다. 뇌경색 유도 1시간 후 중간엽 줄기세포를 투여한 투여군(MSC 1h군, N = 34)과 뇌경색 유도 1시간 후 생리 식염수를 투여한 대조군(N = 34)으로 나누어서 1, 4, 7, 10, 14일째 각각 희생하여 뇌경색의 크기와 MMP 발현의 차이를 확인하였다(Fig 2).



**Fig 2. Phase 2 study design. Sequential changes of neurologic scores, MMP levels, and infarction sizes of rats between MSC injection and saline injection at 1 hour after MCAO were evaluated.**

### 나. 실험방법

#### (1) 중대뇌동맥 폐색

중대뇌동맥 폐색은 대상 동물을 70%의 N<sub>2</sub>O, 30%의 O<sub>2</sub>와 아이소플루란(isoflurane)으로 흡입마취를 시킨 상태에서 실험하였다. 체온은 직장체온계를 이용하여 지속적으로 측정하여 섭씨 37℃ 정도로 일정하게 유지하였다. 중대뇌동맥 폐색 유도는 기존에 보고된 나일론을 이용한 중대뇌동맥 폐색 방법을 변형시켜서 이용하였다. 실험 쥐의



경부를 가운데에서 절개하여 경동맥을 노출시키고 총경동맥을 결찰한 다음 내경동맥과 외경동맥의 분지들과 외경동맥을 전기 소작하였다. 다음으로 내경동맥을 일시적으로 혈관 클램프를 이용하여 차단한 뒤 poly-L lysine으로 처리한 3-0 나일론 실을 원위부로 밀어 넣어서 내경동맥으로 들어간 것을 확인하였고, 혈관 클램프를 풀고 나일론 실을 총경동맥 분지부부터 17.5mm까지 밀어 넣어 중대뇌동맥을 폐색하였다. 대상 쥐는 재관류 하지 않고, 영구히 봉합하는 방법을 이용하였다(완전 폐색 모델, permanent MCAO model).

## (2) 중간엽 줄기세포의 이식

기증받은 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포( $2 \times 10^6$ , passage 5)를 생리식염수 400  $\mu$ l에 부유시켜 실험동물의 꼬리 정맥을 통해 1 ml 주사기로 천천히 주입하였다. 대조군은 같은 용량의 생리 식염수를 천천히 주입하였다. 중간엽 줄기세포의 투여 시기는 뇌경색을 유도한 후, phase 1 실험에선 1시간, 1일, 3일째 각각 투여하였고, phase 2 실험에선 1시간째 투여하였다.

## (3) 조직처리

실험동물에 졸레틸(zoletil)을 복강 내로 주사하여 마취한 상태에서 액체 이송 펌프(peristaltic pump)를 이용하여 헤파린이 섞인 차가운 생리 식염수를 우심방을 절개한 상태에서 좌심실을 통해 관류하여 실험동물을 희생시켰고 즉시 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 관상면에 평행하게 전두부부터 2 mm 두께로 잘라 7개의 관상 절편면을 얻었다. 각각의 절편 중 1, 3, 5, 7번째 절편은 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)에 담가 섭씨 37°C에서

30분간 배양하여 염색하였으며 후에 뇌경색의 크기를 측정할 때 이용하였다. 나머지 절편 중 4번째(6-8 mm) 절편은 좌우 반구를 절단한 후 Tissue-Tek OCT compound (Miles, Inc., Elkhart, IN, USA)에 넣고 2-methylbutane과 드라이아이스를 이용하여 급속 냉각한 후 영하 80℃ 냉동고에 보관하여 분석에 이용하였다.

#### (4) 신경학적 평가

실험동물은 뇌경색 전 과 1일 4일, 7일에 신경학적 검사를 시행하였다. 실험 쥐의 운동능력을 보기 위해서 rotarod 테스트를 시행하였다. Rotarod 속도를 4 rev/min부터 40 rev/min까지 증가시킴에 따라 쥐가 최대한 운동발판에서 견디는 시간을 측정하였다. 실험동물을 수술 3일전부터 훈련시켰고, 뇌경색 유도 전 실험동물이 최대한 견디는 시간을 3회 평균하여 baseline으로 하였고 이후 rotarod에서 1일, 4일, 7일, 10일, 14일에 견디는 시간을 각각 측정하였다. 신경학적 평가를 위해서 phase 1 실험에선 Longa점수를 측정하였다. Longa점수는 꼬리로 들어 올렸을 때 책상 모서리를 잡을 수 없으면 1점, 측면 발을 완전히 내전 시킬 때 1점, 움직이려고 할 때 마비 방향으로 회전 동작을 취하면 1점, 가볍게 밀었을 때 옆으로 넘어지면 1점을 주었다. 그러므로 Longa점수는 최대 신경학적 장애를 갖는 경우가 4점, 정상인 경우가 0점으로 기록되었다. Phase 2 실험에선 뇌경색 전과 1일 4일, 7일에 신경장애척도(Neurological Severity Scores, NSS) 점수를 측정하였다. NSS는 운동검사(6점), 감각검사(2점), 균형검사(6점), 반사검사(4점) 로 총 18점으로 구성된다. 정상 쥐는 0점이고 신경학적 장애가 심하면 최대 18점의 점수를 가질 수 있다.

### (5) 뇌경색 크기 측정

뇌경색의 크기는 TTC로 염색을 한 1, 3, 5, 7 관상 절편의 앞쪽 및 뒤쪽의 전체 면적의 합에 대한 뇌경색 면적의 비율(%)을 구하였다. 분석에는 미국국립보건원에서 제공받은 Medical Image Processing, Analysis, and Visualization (MIPAV) 소프트웨어 (<http://mipav.cit.nih.gov/>)를 이용하여 측정하였다.

### (6) Gelatin zymography를 이용한 MMP 측정

본 실험에서는 MMP-2와 MMP-9을 gelatin zymography를 통하여 측정하였다. Zymography는 민감도가 매우 높은 검사법으로, 같은 젤에서 MMP-2와 MMP-9의 비활성화 및 활성화된 형태를 모두 한번에 측정 가능한 장점이 있다. Zymography를 위해 10  $\mu$ m의 cryostat 절삭 절편들을 120  $\mu$ l의 균질 완충액(homogenizing buffer) (1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl[pH 7.5], 75mmol/L NaCl, 1 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride[PMSF; Sigma])에 넣고 균질화 한 후 4°C에서 20분간 9000 rpm으로 원심분리한 후, 상층액을 취하여 영하 80°C에 보관하였다. 보관된 샘플의 단백질농도는 zymography전 bovine gamma globulin standard를 이용하여 Bradford 방법(Bio-Rad Laboratories, herculus, CA, U.S.A.)에 기초한 키트를 이용하여 정량화 하였다. 50  $\mu$ g이 포함된 샘플을 같은 양의 샘플 완충액(80 mmol/L Tris-HCl[pH 6.8], 4% sodium dodecyl sulfate[SDS], 10% glycerol, 0.01% bromphenol blue)과 섞어서 전기영동 겔에 투여하였다. 전기영동은 1% gelatin이 함유된 8% SDS-polyacrylamide 겔을 사용하여 실시하였다. 이 때 표준화된 정량을 위해 첫번째 열에 recombinant MMP-2와 MMP-9 (Gelatinase zymography standards, Chemicon International Inc, CA, U.S.A.)를 1  $\mu$ g씩 함께 투여하여 시행

하였다. 표준화를 위한 샘플들은 일회 사용량을 미리 분주하여 섭씨 영하 80℃에 냉동하여 해동과 냉동이 반복되지 않고 모두 동일한 조건의 상태에서 사용되도록 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 증류수에 잠깐 세척 후 150 ml의 2.5% Triton X-100 용액에 담가 진탕기 (shaker)에서 15분씩 3번 세척하였다. 세척이 끝난 겔은 250 ml의 50 mmol/L Tris-HCl 배양 완충액(pH 7.5, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)에 넣고 37℃에서 66시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 겔을 아세트산, 메탄올 및 증류수가 1: 3: 6으로 들어 있는 0.1 % amido black 용액에 넣고 1시간 동안 염색하였다. 염색이 끝난 후에는 amido black만 없는 같은 용액을 수 차례 바꾸어 주면서 130분간 탈색하였다. 탈색 후 증류수에서 20분간 세척하였다. 이 과정을 통해서 MMP에 의해 젤라틴이 파괴된 부분은 염색되지 않아 푸른색 바탕에 흰색을 띤 띠가 나타나게 된다. 세척이 끝난 겔은 스캐너(ArtixScan F1, Microtek, Taiwan)를 이용하여 600 dpi로 스캔하였고 Scion Image program (NIH, U.S.A)의 gel plotting macro를 이용하여 하얀 띠 부분을 정량하였다. 측정된 값은 integrated density로 표시하였다.

### (7) 통계 분석

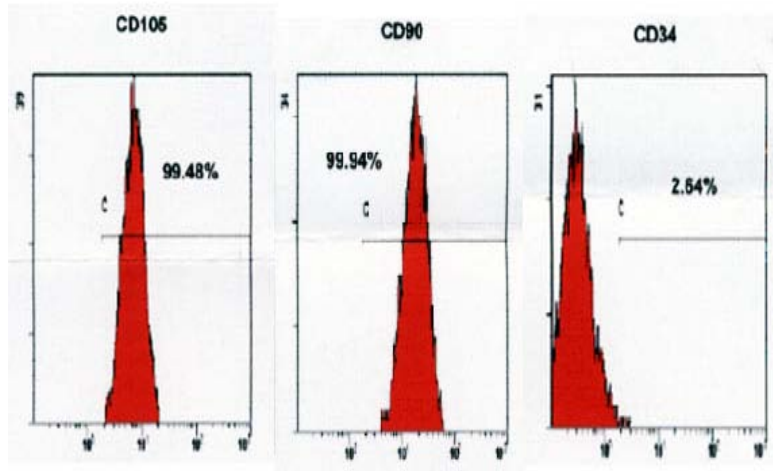
실험 결과값은 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다. 신경학적 검사는 각 군간의 차이를 반복 측정 analysis of variance (ANOVA) test 로 확인하였고 Tukey's post hoc analysis 를 이용하여 사후 분석하였다. MMP 의 정량화는 standard 를 이용하여 교정된 optical density 값을 구한 다음, 이 값의 차이를 t 검정을 통해 각 군의 차이를 분석하였다. 각각의 검정에서 유의수준이 0.05 미만일 경우에 통계적으로 의의가 있는 것으로 정하였다 (version 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### Ⅲ. 연구결과

#### 1. 중간엽 줄기세포의 특성확인 및 생리학적 지표

##### 가. 유세포분석기(Flow cytometry, FACS) 분석

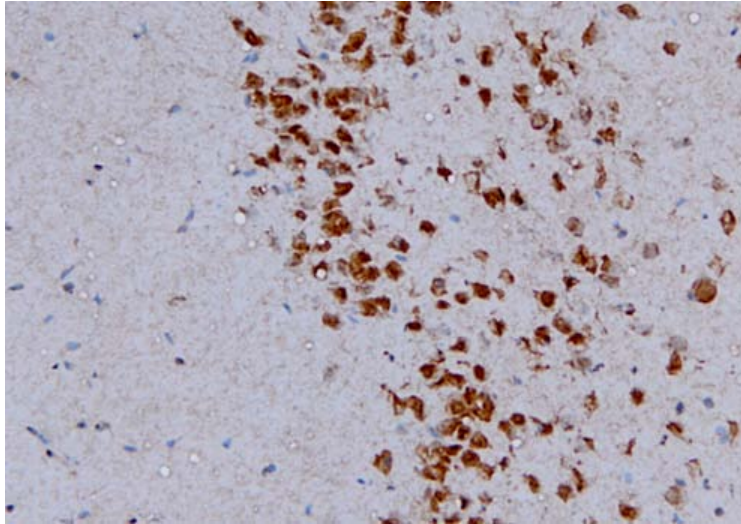
FACS 결과 중간엽 줄기세포 특이항원인 CD 105가 99.48%, CD 90이 99.94%에서 발현되었고, CD 34는 2.64%만이 발현됨을 확인할 수 있어서 기증받은 세포는 중간엽 줄기세포의 형질을 나타내었다 (Fig 3).



**Fig 3. Flow cytometric analysis. Flow cytometry showed that the specific antigens of mesenchymal stem cells were frequently detected (CD 105 and CD 90), whereas a CD 34 was rarely detected.**

#### 나. NuMA 에 대한 면역조직화학염색

면역조직학 검사상 인간에서 유래된 중간엽 줄기세포임을 human-specific nuclear matrix antigen (NuMA) 양성으로 확인할 수 있었다 (Fig 4).



**Fig 4. Immunohistochemistry for human-specific nuclear matrix antigen (NuMA). NuMA antigen was reactive in a rat injected with human MSC 1 hour after 7 days MCAO (x100).**

#### 다. 생리학적인 지표

중간엽 줄기세포 투여군과 대조군의 생리학적 지표 (mean arterial blood pressure, PH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, hemoglobin)를 중대뇌동맥 폐색 전 후 와 중간엽 줄기세포 및 생리식염수 투여 후의 결과를 구하였는데 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1, 2, 3).

**Table 1. Physiological data before MCAO.**

	MSC injection group Before MCAO ( n = 5)	Saline injection group Before MCAO ( n = 5)	p
MAP (mmHg)	96.33 ± 10.46	98.76 ± 9.53	0.7110
PH	7.42 ± 0.05	7.41 ± 0.04	0.7359
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	47.00 ± 9.27	46.85 ± 8.30	0.9792
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	137.80 ± 15.99	140.17 ± 15.43	0.8175
Hb(gm/dL)	13.54 ± 1.96	14.62 ± 0.82	0.2886

MSC indicates mesenchymal stem cell; MCAO = middle cerebral artery occlusion; MAP = mean arterial blood pressure; Hb = hemoglobin.

**Table 2. Physiological data after MCAO.**

	MSC injection group After MCAO ( n = 5)	Saline injection group After MCAO ( n = 5)	p
MAP (mmHg)	90.47 ± 23.90	92.14 ± 19.72	0.9070
PH	7.37 ± 0.08	7.37 ± 0.07	1.000
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	49.08 ± 6.21	48.92 ± 5.39	0.9664
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	132.75 ± 12.61	129.00 ± 13.77	0.6653
Hb(gm/dL)	14.05 ± 0.76	14.24 ± 0.78	0.7066

MSC indicates mesenchymal stem cell; MCAO = middle cerebral artery occlusion; MAP = mean arterial blood pressure; Hb = hemoglobin.

**Table 3. Physiological data after MSC and saline injection.**

	MSC injection group After MSC injection ( n = 5)	Saline injection group After saline injection ( n = 5)	p
MAP (mmHg)	87.80 ± 7.11	82.86 ± 10.28	0.4026
PH	7.43 ± 0.06	7.44 ± 0.05	0.7819
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	43.94 ± 9.30	44.28 ± 8.37	0.9530
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	132.40 ± 12.62	136.00 ± 14.32	0.6843
Hb(gm/dL)	14.36 ± 0.51	14.55 ± 0.65	0.6210

MSC indicates mesenchymal stem cell; MCAO = middle cerebral artery occlusion; MAP = mean arterial blood pressure; Hb = hemoglobin.

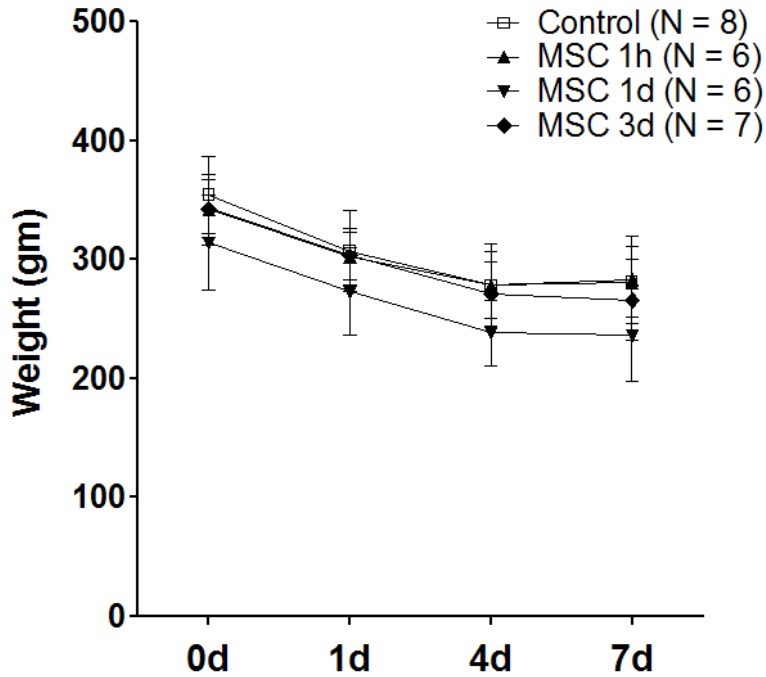


## 2. 중간엽 줄기세포 투여 후 변화

### 가. MMP 발현을 유도하는 시기 탐색

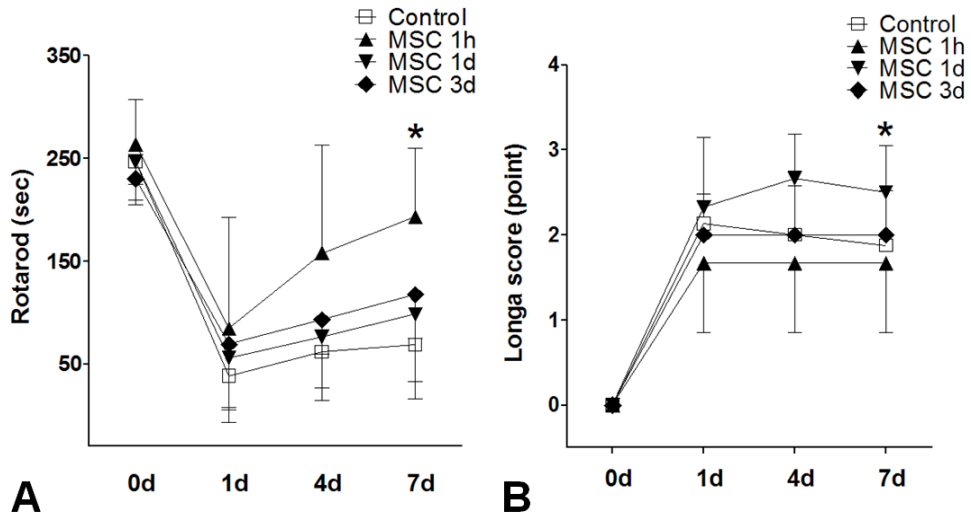
#### (1) 신경학적 검사

MSC 1h군과 MSC 1d군 7마리 중 각각 1마리가 중간엽 줄기세포 투여 전에 사망하여 나머지 동물과, MSC 3d군 7마리 및 대조군 8마리에 대해서 분석을 진행하였다. 중대뇌동맥 폐색에 따른 사망률은 7%였다. 중뇌동맥 폐색 전 대상동물의 평균 몸무게는  $340 \pm 34$  gm 이었으며 각 군간의 통계적인 차이는 없었다 (MSC 1h군  $342 \pm 30$  gm, MSC 1d군  $314 \pm 40$  gm, MSC 3d군  $342 \pm 24$  gm, 대조군  $354 \pm 32$  gm,  $p=0.352$ ) (Fig 5).



**Fig 5. Body weight changes after MCAO. MSC 1h (N = 6), MSC 1d (N = 6), and MSC 3d (N = 7) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour, 1 day, and 3 day after surgery with occlusion of the middle cerebral artery. Control (N = 8) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 7 days after MCAO. No significant differences of body weight changes were observed between groups.**

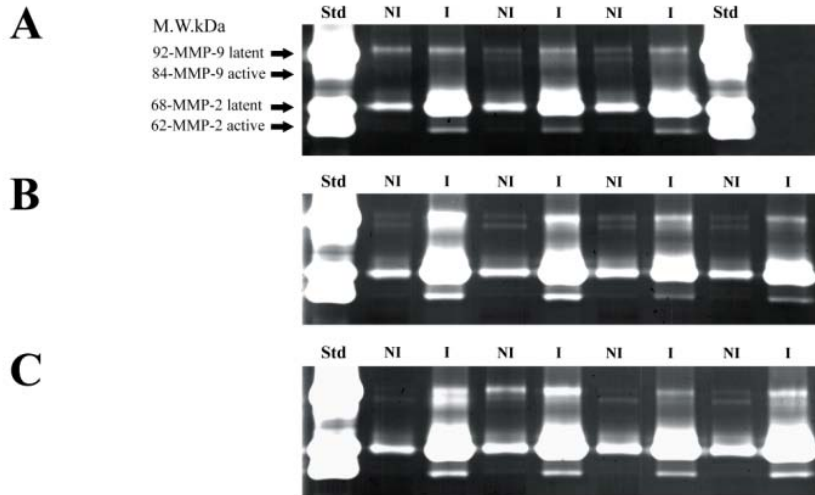
대상동물은 rotarod에서 3일간 훈련하였는데 뇌경색 유도 직전에 시행한 rotarod 검사상 각 군간의 차이는 없었다 (MSC 1h군  $264 \pm 44$ 초, MSC 1d군  $247 \pm 38$ 초, MSC 3d군  $230 \pm 25$ 초, 대조군  $247 \pm 22$ 초,  $p = 0.453$ ). 그러나, 1일, 4일, 7일째의 rotarod 결과를 가지고 반복 측정 ANOVA test를 하였을 때 각 군간의 유의한 차이가 있었다 ( $df = 3, F = 3.431, p = 0.034$ ). 사후검증에서 1시간째 중간엽 줄기세포를 투여한 군이 대조군에 비해서 유의하게 나은 회복을 보였다 ( $p = 0.023$ ) (Fig 6 A). Longa 점수에서도 각 군간의 유의한 차이가 있었으며( $df = 3, F = 1.597, p = 0.03$ ), 1시간째 투여군이 1일째 투여군 보다 신경학적 회복이 양호하였다 ( $p = 0.018$ ) (Fig 6 B).



**Fig 6. Results of behavioral functional tests. MSC 1h (N = 6), MSC 1d (N = 6), and MSC 3d (N = 7) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour, 1 day, and 3 day after surgery with occlusion of middle cerebral artery. Control (N = 8) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 7 days after MCAO. In the rotarod test, a significant functional recovery was detected in rats treated with MSC 1 hour after MCAO compared with control (A). Longa scores were also favorable in MSC 1 h group than control (B). \* $p < 0.05$ .**

## (2) MMP-2 and MMP-9에 대한 Zymography

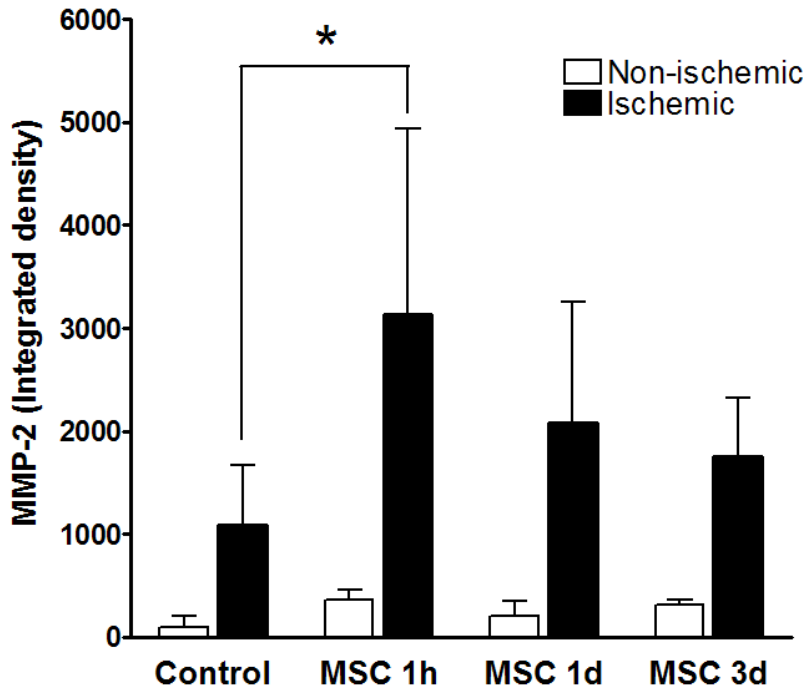
Gelatin zymography를 이용하여 중대뇌동맥 폐색 후 7일째 MMP 활성을 측정하였을 때 허혈반구는 비허혈반구에 비해서 MMP의 발현이 증가되었다 (Fig 7). MMP-2는 허혈반구에서  $1435.83 \pm 730.18$ , 비허혈반구에서  $385.95 \pm 266.69$ 였고( $p < 0.001$ ), MMP-9은  $604.56 \pm 100.64$  대  $224.52 \pm 80.64$  ( $p = 0.004$ )였다.



□

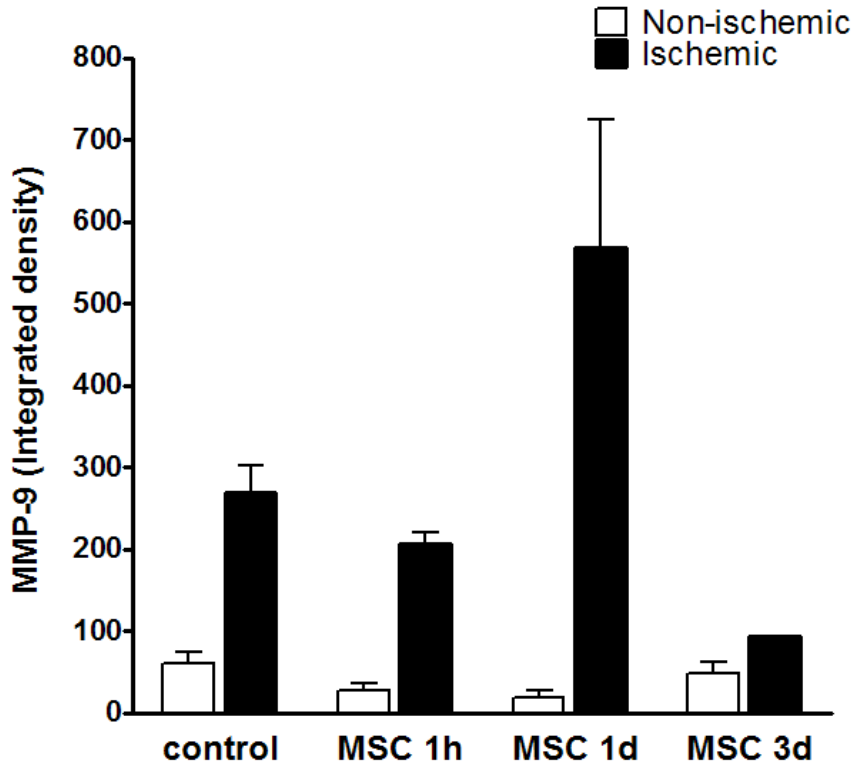
**Fig 7. Representative zymograms of subjects at 7 days after MCAO. The zymograms of control group (A), MSC 1 day injection group (B), and MSC 3 day injection group (C) showed higher MMPs activities in the ischemic (I) hemisphere than non-ischemic (NI) hemisphere.**

허혈반구에서 zymography를 통해서 MMP-2의 활성을 측정하였다. 중간엽 줄기세포를 1시간째 투여한 군에서 7일째 MMP-2의 활성이  $3130 \pm 1807$ 이었고 대조군이  $1087 \pm 579$ 로 유의하게 증가되어 있었다 ( $p=0.028$ ). 1일째 및 3일째 중간엽 줄기세포 투여군은 대조군과 차이를 보이지 않았다 (Fig 8).



**Fig 8.** MMP-2 activities were measured by zymography after 7 days MCAO. MSC 1h (N = 6), MSC 1d (N = 6), and MSC 3d (N = 7) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour, 1 day, and 3 day after surgery with occlusion of the middle cerebral artery. Control (N = 8) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 7 days after MCAO. Gelatin zymography showed higher MMP-2 activity demonstrated in the rats with MSC 1 hour injection after MCAO compared with the control group in the ischemic hemispheres. Whereas, no significant differences were noted in MSC 1d or MSC 3d group compared with control group. \*p <0.05.

이에 반해서, 허혈반구의 MMP-9 활성은 1시간, 1일째 및 3일째 중간엽 줄기세포 투여군과 대조군에서 차이를 보이지 않았다 (Fig 9).



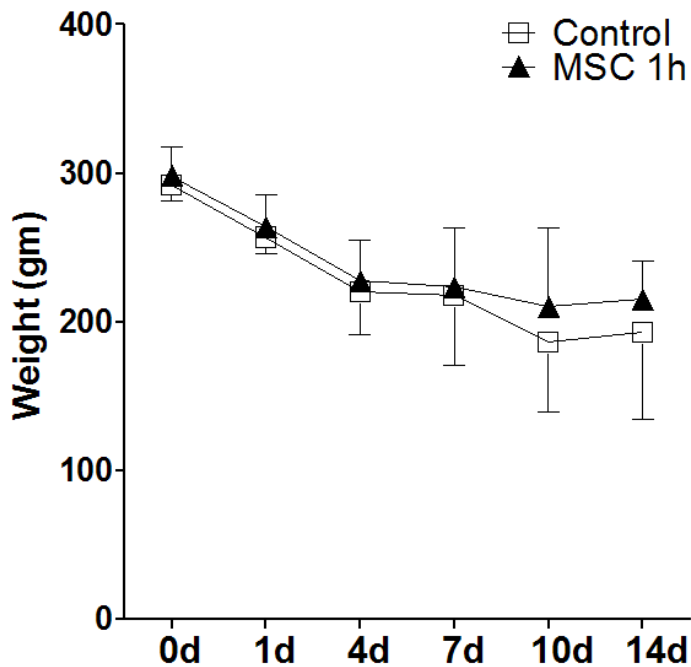
**Fig 9.** MMP-9 activities were measured by zymography at 7 days after MCAO. MSC 1h (N = 6), MSC 1d (N = 6), and MSC 3d (N = 7) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour, 1 day, and 3 day after surgery with occlusion of the middle cerebral artery. Control (N = 8) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 7 days after MCAO. Gelatin zymography showed no significant difference of MMP-9 activities between the groups in the ischemic hemispheres.



## 나. 중간엽 줄기세포 투여 후 시간에 따른 뇌경색 크기와 MMP 변화

### (1) 신경학적 검사

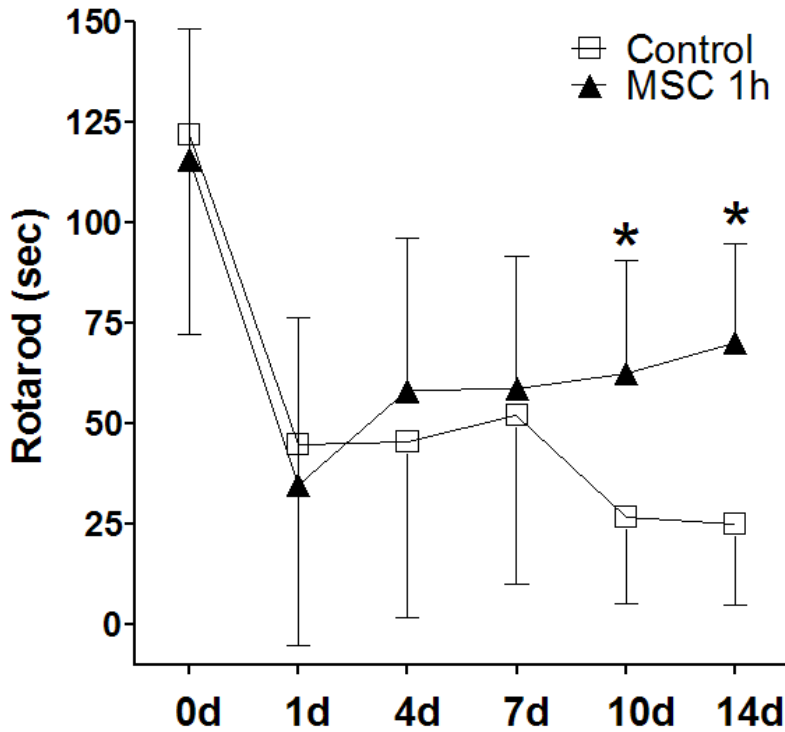
뇌경색 1시간 후 중간엽 줄기세포를 투여한 투여군 (MSC 1h, N = 34)과 대조군(N = 34)군 간에 시간에 따른 뇌경색의 크기와 MMP 발현의 차이를 보았다. MSC 1h 군 중 2마리는 뇌경색 모델 제작 중 사망하였고, 대조군 7마리는 1일 이내에 사망하여 분석에서 제외하였다. 중대뇌동맥폐색에 따른 사망률은 13%였다. 중대뇌동맥폐색을 만들기 전 실험동물의 몸무게는 MSC 1h군이  $292.52 \pm 7.14$  gm, 대조군이  $290.64 \pm 8.11$  gm으로 차이가 없었다 ( $p = 0.33$ ) (Fig 10). 뇌경색 유도 후에도 시간에 따른 두 군간의 몸무게의 변화는 통계적으로 유의한 차이는 없었다.



**Fig 10. Body weight changes after MCAO. MSC 1h (N = 32) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour after surgery with occlusion of middle cerebral artery. Control (N = 27) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 1 day, 4 days, 7 days, 10 days, 14 days after MCAO. No significant differences of body weight changes were noted before and after MCAO.**

### (가) Rotarod 검사

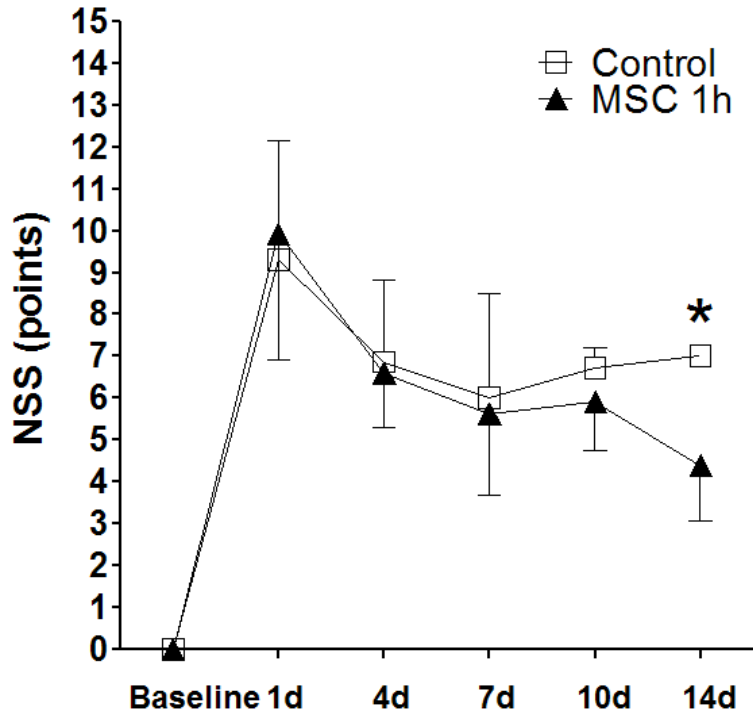
중대뇌동맥폐색 전에 측정한 rotarod 검사 결과는 양 군간에 차이가 없었다 (MSC 1h군  $115.88 \pm 32.31$ 초, 대조군  $121.94 \pm 49.78$ 초,  $p = 0.552$ ). Rotarod 검사에서 10일째부터 양 군간의 뚜렷한 차이가 나타났는데, MSC 1h군이  $62.58 \pm 28.12$ 초, 대조군이  $26.71 \pm 21.49$ 초( $p = 0.013$ )였고, 14일 째는 MSC 1h 군이  $70.20 \pm 24.57$ 초, 대조군이  $25.00 \pm 20.31$ 초였다( $p = 0.027$ )(Fig 11).



**Fig 11. Rotarod test after MCAO. MSC 1h (N = 32) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour after surgery with occlusion of the middle cerebral artery. Control (N = 27) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 1 day, 4 days, 7 days, 10 days, 14 days after MCAO. The rats with MSC 1 hour injection after MCAO showed significant improvement at 10 days and 14 days compared with control group. \* $p < 0.05$ .**

### (나) 신경장애점수(Neurological Severity Scores, NSS)

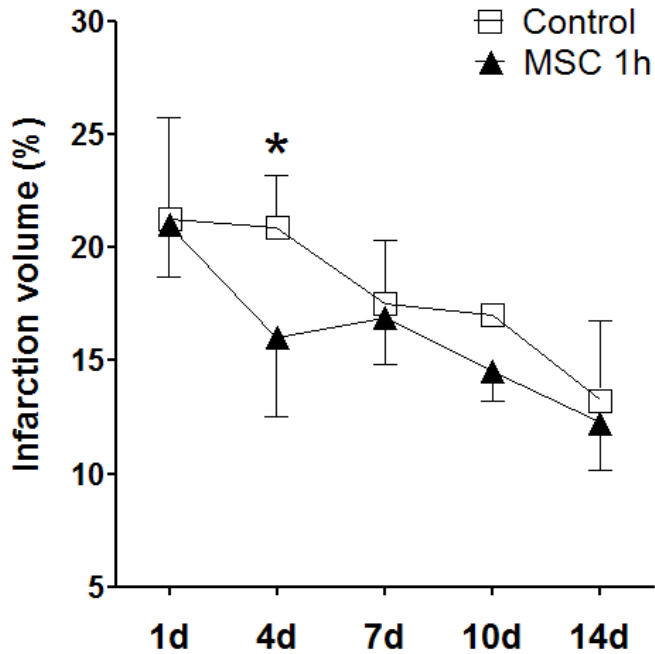
MSC 1h군과 대조군에서 각각 측정한 NSS 점수는 7일째까지는 큰차이를 보이지 않았으나 14일에 측정한 NSS점수가 MSC 1h군이 4.4점이었고 대조군이 7점으로 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p = 0.01$ ) (Fig 12).



**Fig 12. Neurological Severity Scores (NSS) after MCAO. MSC 1h (N = 32) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour after surgery with occlusion of the middle cerebral artery. Control (N = 27) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 1 day, 4 days, 7 days, 10 days, 14 days after MCAO. The rats with MSC 1 hour injection after MCAO showed significant improvements at 14 days compared with control group. \*p <0.05.**

## (2) 뇌경색의 크기 변화

MSC 1h군과 대조군의 뇌경색 크기를 보기 위해서 대상 쥐를 1일, 4일, 7일, 10일, 14일째 희생하여 뇌경색 크기를 측정하였다. 1일째 뇌경색의 크기는 MSC 1h군이  $21.02 \pm 2.61\%$ , 대조군은  $21.25 \pm 5.02\%$ 로 차이가 없었다 ( $p = 0.465$ ). 4일째 측정된 뇌경색의 크기는 MSC 1h군이  $16.032 \pm 4.08\%$ , 대조군은  $20.87 \pm 2.66\%$ 로 MSC 투여군에서 유의한 감소가 관찰되었다 ( $p = 0.043$ ). 7일째 뇌경색의 크기는 MSC 1h군이  $16.92 \pm 2.37\%$ , 대조군은  $17.53 \pm 3.20\%$ 로 차이가 없었다( $p = 0.75$ ). 10 일째 뇌경색의 크기는 MSC 1h군이  $14.53 \pm 1.59\%$ , 대조군은  $17.04 \pm 0.35\%$ 를 보였고 ( $p = 0.05$ ). 14 일째 뇌경색의 크기는 MSC 1h군이  $12.25 \pm 2.09\%$ , 대조군은  $13.25 \pm 3.51\%$ 로 중간엽 줄기세포 투여군이 뇌경색의 크기는 작았으나 통계적인 차이를 보이지 않았다( $p = 0.625$ ) (Fig 13).



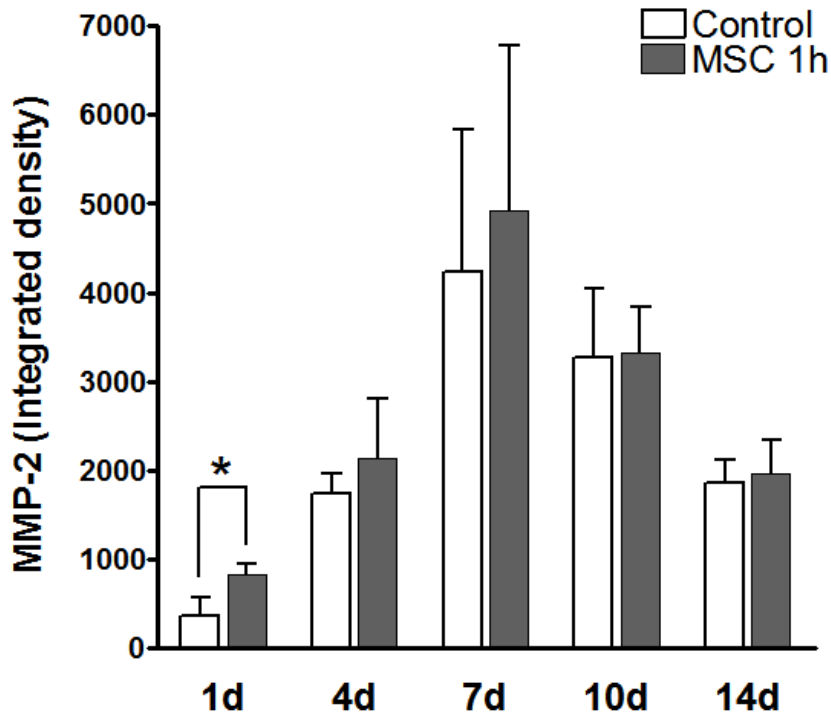
**Fig 13. Infarction sizes after MCAO. At 4 days. MSC 1h (N = 32) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour after surgery with occlusion of middle cerebral artery. Control (N = 27) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were killed at 1 day, 4 days, 7 days, 10 days, 14 days after MCAO. At 4 days, the rats with MSC 1 hour injection after MCAO showed small infarction sizes compared with saline injection group. There was no difference in infarct size at 7 days, 10 days and 14 days.**



### (3) 허혈 반구에서의 MMP의 변화

#### (가) MMP-2의 변화

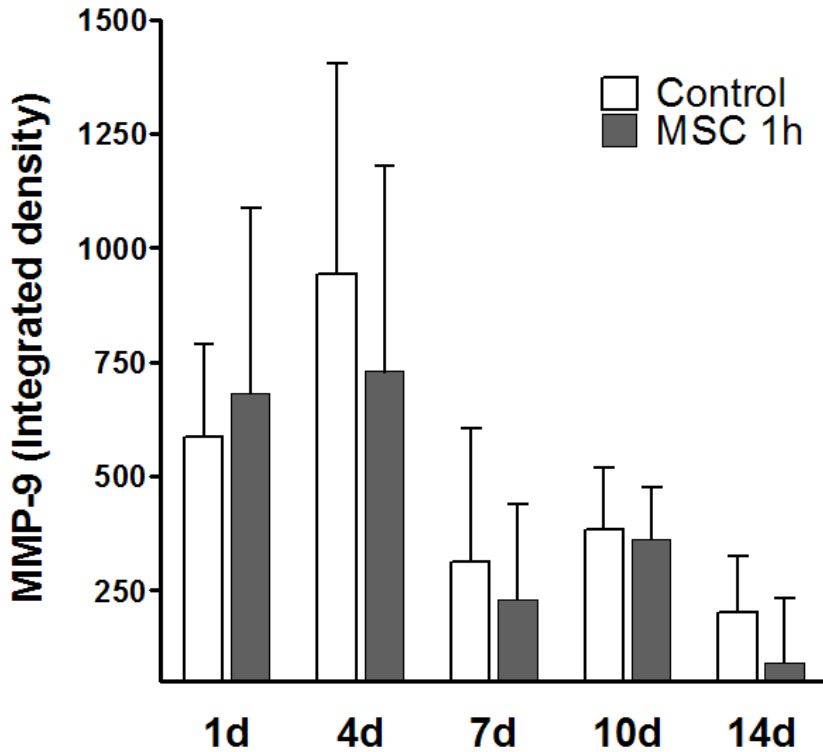
MSC 1h군은 대조군에 비해서 1일째부터 10일째까지 MMP-2의 활성이 증가되어 있었다. 1일째 MMP-2의 활성은 MSC 1h군이  $828 \pm 119$ , 대조군이  $360 \pm 203$ 로 유의한 차이가 있었다( $p = 0.002$ ). 4일째는 각각  $2137 \pm 676$  대  $1742 \pm 216$ 였고, 7일째는 각각  $4914 \pm 1863$  대  $4225 \pm 1607$ 였고, 10일째는  $3327 \pm 516$  대  $3261 \pm 776$  였으며, 14일째는  $1954 \pm 392$  대  $1864 \pm 247$ 였는데 대조군에 비해서 계속 MMP-2가 증가되어 있는 경향을 보였으나 1일 이후에는 통계적인 차이는 없었다 (Fig 14).



**Fig 14. MMP-2 activities in the ischemic hemisphere. MSC 1h (N = 32) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour after surgery with occlusion of middle cerebral artery. Control (N = 27) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 1 day, 4 days, 7 days, 10 days, 14 days after MCAO. MMP-2 activities were higher at 1 day in MSC injection 1 hour after MCAO when compared with the control groups. \* $p < 0.05$ .**

#### (나) MMP-9의 변화

MSC 1h군과 대조군에서 MMP-9의 시간에 따른 변화를 측정하였다. MMP-2와 달리 MMP-9은 시간의 변화에 따라서 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig 15).



**Fig 15. MMP-9 activity in the ischemic hemisphere. MSC 1h (N = 32) represents intravenous administration of 400  $\mu$ l MSCs ( $2 \times 10^6$ , passage 5) through tail vein at 1 hour after surgery with occlusion of middle cerebral artery. Control (N = 27) represents administration of 1 ml saline 1 hour after surgery with MCAO. Rats were sacrificed at 1 day, 4 days, 7 days, 10 days, and 14 days after MCAO. No significant differences were observed between the MSC treated and control groups.**

## IV. 고찰

본 연구는 뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료와 MMP의 관계를 연구하였는데, 뇌경색 유도 후 중간엽 줄기세포를 1시간째 투여하였을 때 MMP-2의 활성이 증가되었고 뚜렷한 신경학적 호전을 관찰할 수 있었으나 뇌경색의 크기는 비슷하였다.

뇌경색은 신경계의 대표적인 질환으로 뇌질환과 혈관질환의 공통적인 성격을 가지고 있다. 뇌세포는 뇌혈관이 폐쇄된 후 불과 수 분 내에 죽기 시작하는데 1분에 200만 개의 신경세포가 죽고, 분당 약 12 km의 신경섬유가 파괴된다.<sup>18</sup> 뇌혈관 폐쇄 후 신경세포가 죽어가는 속도가 매우 빠르기 때문에 혈전용해 치료를 포함한 혈류를 회복시키는 치료는 한계가 있다.<sup>19</sup> 또한 뇌경색 치료에서 유일하게 효과가 입증된 혈전용해치료의 경우에도 단지 전체 뇌경색 환자의 2-4%에서만 혜택을 보고 있기 때문에 나머지 환자에 대한 새로운 치료가 필요하다.<sup>20</sup>

현재까지 중간엽 줄기세포는 다양한 질환에서 새로운 치료법으로 시도되고 있다. 지금까지 발표된 연구 결과는 상당히 고무적이지만, 아직까지 치료제로서 활발하게 임상에 적용되고 있지는 못하며 실험실 연구에 그치고 있다.<sup>21</sup> 중간엽 줄기세포 치료의 한계는 중간엽 줄기세포가 치료제로서 효과가 부족하여서 일 수도 있으나, 그 기전에 대한 탐색과 효과를 극대화 시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 부족해서 일 수도 있다고 생각된다. 뇌경색에서 신경보호 치료에 대한 연구가 무수히 진행하였지만, 실험실 연구에서는 성공하였으나 임상에서까지 효과를 보인 신경보호 치료제는 없다.<sup>22, 23</sup> 중간엽 줄기세포는 신경보호제와 같은 약물이 넘어야 하는 독성적인 측면에서 큰 장점이

있다. 배아 줄기세포의 경우 윤리적인 문제를 차치하고라도 면역학적인 거부반응이나 종양형성이 가능성이 있다. 중간엽 줄기세포는 환자의 골수를 채취하여 외부에서 배양이 가능하므로 면역학적인 거부반응에서 자유로울 수 있다.<sup>24-26</sup>

이미 임상에서 중증 뇌경색 환자를 대상으로 중간엽 줄기세포 치료에 대한 연구가 진행되었는데, 중간엽 줄기세포 투여군 5명과 대조군 25명을 추적하였을 때 투여군에서 유의한 신경학적 호전이 있었고 뇌경색 크기는 차이가 없었지만 뇌위축의 정도는 중간엽 줄기세포 치료군에서 덜하였다.<sup>26</sup> 동물 실험의 결과도 이와 유사하게 신경학적인 호전이 관찰되었는데 3시간에서 1개월까지 다양한 시점에 중간엽 줄기세포를 투여하였을 때 신경학적 호전이 보고 되었다.<sup>7</sup>

뇌경색에서 중간엽 줄기세포 치료의 작용기전은 아직 알려져 있지 않다. 그 중에서 먼저 생각할 수 있는 중간엽 줄기세포가 파괴된 신경세포를 대체할 가능성<sup>27</sup>은 극히 낮다고 생각된다. 그 근거는 첫째, 주입한 중간엽 줄기세포 중에 극히 일부만이 신경세포로 분화된다. 투여된 중간엽 줄기세포 2백만 세포 중에서 0.02%만이 신경 표지자(neural marker)를 보이는 세포로 변한다.<sup>28</sup> 둘째, 중간엽 줄기세포 치료 후 신경학적 호전은 대체 세포가 신경세포로 분화하여 기능을 하기 시작하기에는 너무나 짧은 수일 후에 바로 나타난다는 점 등을 들 수 있다. 다른 가능성은 중간엽 줄기세포가 내인성 신경생성을 유도하기 때문일 수 있다. 중간엽 줄기세포 투여 시 뇌실하 부위(subventricular zone) 혹은 맥락총(choroid plexus)등에서 NeuN(Neural markers) 및 별아교세포의 중간세포유인 GFAP (glial cell markers)가 증가함이 보고되었다.<sup>29, 30</sup> 하지만, 이렇게 증가된 내인성 신경들이 과연 직접적으로 기능 회복을 가져오는지는 확실하지 않다. 중간엽 줄기세포가 뇌경색 동물 모델에서 혈관형성을 도와주거나,<sup>31</sup>

시냅스의 형성을 촉진시킨다는 보고도 있다.<sup>32</sup> 세포고사의 방지, 염증 감소, 탈수초화 감소 등을 통한 신경보호 작용도 중요기전으로 보고 되었다.<sup>33</sup> 중간엽 줄기세포 치료는 뇌경색에서 뇌혈류 회복과 혈뇌장벽의 정상화에도 도움을 준다는 증거가 있다.<sup>34, 35</sup> 중간엽 줄기세포는 뇌경색 후 반흔(Scar/gliosis)형성을 감소시킨다. 뇌경색 후의 반흔은 신경이 뻗어나가는 것(neurite outgrowth)을 막고 수상돌기의 발달(dendrite arborisation)을 막는 것으로 알려져 있다. 중간엽 줄기세포가 분비하는 성장인자 중 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )가 있는데 피부 등 다른 조직에서 TGF- $\beta$ 는 반흔 형성을 차단하는 것으로 알려져 있다. 더불어서 TGF- $\beta$ 는 혈관형성을 촉진하고 신경보호작용을 하여 신경재생에 중요하다.<sup>36</sup>

이 중에서 가장 각광을 받는 중간엽 줄기세포 치료의 작용기전은 사이토카인 이나 성장인자 분비를 통한 내인성 회복능력(재생능력)을 향상시키는 것이다.<sup>7</sup> 중간엽 줄기세포는 hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor, nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor 등의 성장인자와 사이토카인을 분비하는 분자 공장의 역할을 한다.<sup>37-39</sup> 즉, 주입된 중간엽 줄기세포는 뇌경색으로 손상된 조직의 변연부로 이동하여 여러 성장인자를 분비하여 뇌가소성을 향상시킬 수 있다.

지금까지 중간엽 줄기세포와 MMP 발현과의 관계를 본 연구는 없었다. 회복기에는 이미 손상된 부위를 효율적으로 제거해야 하고 신생혈관이 만들어져야 한다. 면역세포가 손상된 부위로 들어오기 위해선 혈뇌장벽이 다시 한 번 열려야 될 필요가 있다. MMP의 세포외기질 파괴 효과는 리모델링 과정에서 필수적인 것으로 생각된다.<sup>15</sup> 실험동물에서 뇌경색 회복기에 MMP를 억제했을 때 대상 동물의 신경학적 회복이 저하되었음은 본 연구의 가설을 뒷받침한다.<sup>17</sup>

본 연구에서 중간엽 줄기세포 투여 시기에 따른 치료 효과는 1시간째 투여 시 가장 큰 신경학적 호전을 보였다. 현재까지 초급성기에 정맥을 통한 중간엽 줄기세포 투여 연구는 Liu등의 연구가 유일하다. 연구자들은 placenta growth factor (PIGF) modified human MSC를 투여하여 신경학적 회복과 뇌경색의 크기를 연구하였는데 투여 후 24시간째부터 뇌경색의 크기가 대조군에 비해서 감소하였고 3일째부터 신경학적 호전이 중간엽 줄기세포 투여군에서 우월하였다. 초급성기는 흥분 독성, 활성 산소, 염증 유발인자 등이 존재하여 세포 치료의 효과를 저해할 소지가 있다. 반면에 세포 치료를 통해서 구할 수 있는 뇌경색 변연부의 크기가 가장 크고, 혈뇌장벽이 열려있으며, 혈류의 흐름이 부족하지만 결순환에 의해서 유지되고 있을 가능성이 높아서 중간엽 줄기세포가 뇌경색 부위로 용이하게 이동할 수 있는 긍정적인 면이 있다. 임상적으로는 조기에 신경학적 호전을 가져온다면 강도 높은 재활치료를 받을 수 있어서 결국 좋은 예후를 가져 올 수 있으리라 기대된다. 본 연구는 초급성기인 1시간째 중간엽 줄기세포를 투여하여 실험을 진행하였는데, 중간엽 줄기세포를 1시간째 투여하였을 때 1일, 3일 투여군에 비해서 뚜렷한 신경학적 호전을 확인할 수 있었다. 더불어 1시간째 중간엽 줄기세포를 투여한 군이 대조군에 비해서 MMP-2의 발현이 7일째 측정 시 증가되어 있었다. MMP-9은 대조군과 큰 차이를 보이진 않았다. 따라서 중간엽 줄기세포 투여의 효과가 가장 극대화 되는 시기는 1일이나 3일보다 좀더 빠른 시기로 생각된다.

MMP-2는 MMP-9과 달리 기질적으로 분비되는 MMP이지만 그 역할이 아직 잘 알려져 있지 않다. MMP-2는 뇌경색 후 1시간째부터 활성이 증가한다.<sup>10</sup> 다른 연구에 의하면 MMP-9은 뇌경색 급성기에 증가하였다가 감소하지만 MMP-2는 급성기 3-4일 후부터 증가되기

시작하여 만성기를 거쳐 수 년까지도 분비가 증가되어 있다고 한다.<sup>40</sup> MMP-2가 분비되는 양상을 볼 때 MMP-2는 뇌경색 후 회복기 전 과정에서 신경세포의 재건과 혈관형성 및 기능회복에 도움을 줄 것으로 기대된다.

MMP-2가 증가된 이유와 그 생물학적 역할에 대해서 몇 가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째, 중간엽 줄기세포가 뇌경색 부위로 이동하는 과정에서 세포외 기질을 뚫고 침투할 때 중간엽 줄기세포에서 유도되는 MMP-2가 필요하기 때문일 가능성이 있다. 한 연구에 의하면 세포배양 모델에서 중간엽 줄기세포의 이동능력이 MMP-2 차단 항체를 처리하거나 siRNA로 처리하였을 때 현저히 저하되었다.<sup>41</sup> 이것은 중간엽 줄기세포의 이동에 MMP-2가 중요하다는 증거이다. 둘째, MMP-2가 혈관형성에 영향을 줄 수 있다. 심근경색 동물 모델에선 MMP-2 결핍 마우스에서 신생혈관 형성 능력이 떨어짐이 보고되었었다.<sup>42</sup> 셋째, MMP-2는 상처치유에서 중요한 역할을 한다. 척수손상 동물모델에서 MMP-2 knock out 마우스는 신경학적 회복이 대조군에 비해서 떨어졌으며, 반흔 형성이 심하였고 축삭이 자라나는 정도도 덜 하였다.<sup>43</sup> 하지만, 이와 상반되게 MMP-2가 과발현되도록 만든 유전자 변형 생쥐에서 심근경색을 유도하였을 때 손상이 크게 나타났고, 동물 모델에서 MMP-2를 정제하여 투여하였을 때 회복이 나쁘다는 보고가 있다.<sup>44, 45</sup> 뇌경색 동물 모델에선 MMP-2결핍 마우스와 대조군에서 뇌경색의 크기가 차이가 없었다고 하였다.<sup>46</sup> 넷째, 최근의 척수 손상 모델 연구에서 태반줄기세포를 투여했을 때 MMP-2의 활성이 7일째부터 21일째까지 지속적으로 증가 되었다. MMP-2는 chondroitin sulfate proteoglycan의 활성을 감소 시켜서 반흔 형성을 감소시켰고 신경가소성을 증가시켜 신경학적 회복을 일으켰다.<sup>47</sup> 본 연구와는 질환 모델이 다르고 투여 세포 치료제가 다르지



만 줄기세포 치료가 MMP-2를 경유해서 유익한 효과를 준다는 점에서 본 연구 결과와 일치한다.

중간엽 줄기세포가 신경학적인 호전을 일으켰으나 뇌경색 크기 감소는 크지 않았는데 이것은 중간엽 줄기세포 치료의 유익한 역할이 신생신경으로의 분화나 기존의 신경을 보호하는 신경 보호효과 보다는 기능적 회복인 뇌가소성 활성화일 가능성을 시사한다. 뇌경색에서 중간엽 줄기세포 투여 시 뇌가소성 향상에 본 연구에서 밝혀진 MMP-2가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

## V. 결론

본 연구에서는 중간엽 줄기세포 치료와 MMP 활성의 관계를 알아보려고 하였다. 뇌경색 동물모델에서 중간엽 줄기세포를 투여하였고 신경학적 검사와 MMP를 gelatin zymography를 이용하여 측정하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 실험동물에서 중대뇌동맥 폐색 후 중간엽 줄기세포를 1시간, 1일 및 3일째 투여한 후 rotarod 검사 및 Longa 점수를 비교해 보았을 때, 1시간째 중간엽 줄기세포를 투여한 군에서 유의한 신경학적 회복을 보였다.

2. 중대뇌동맥 폐색 후 7일째 gelatin zymography를 이용하여 MMP 활성을 측정하였을 때, 전체적으로 허혈반구에서 비허혈반구에 비하여 MMP-2와 MMP-9이 증가되어 있었다. 중간엽 줄기세포를 1시간째 투여한 군이 대조군에 비해서 허혈반구에서 7일째 MMP-2의 활성이 증가되어 있었고 MMP-9은 차이가 없었다.

3. 중간엽 줄기세포 투여 후 시간 경과에 따른 신경학적 변화를 대조군과 비교하였을 때 rotarod 점수 및 신경장애 점수에서 모두 중간엽 줄기세포 투여군에서 유의한 신경학적 호전을 관찰할 수 있었다.

4. 시간경과에 따른 MMP-2의 변화는 중간엽 줄기세포 투여군에서 대조군에 비하여 1일째 유의하게 증가 되어있었다. MMP-9은

대조군과 차이가 없었다.

5. 뇌경색의 크기는 중간엽 줄기세포 투여군이 대조군에 비해서 뇌경색의 크기가 작았으나, 4일째만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.

이상의 실험 결과를 종합하면 중간엽 줄기세포를 급성기인 1시간째 투여했을 때 신경학적 호전을 볼 수 있었으나 뇌경색의 크기는 차이가 없었다. 뇌경색에서 중간엽 줄기세포의 치료 효과는 신생 신경형성보다는 뇌의 가소성 향상에 기인한다고 생각된다. 중간엽 줄기세포가 뇌의 가소성 향상을 가져오는 기전으로 MMP-2가 매개체로 작용할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 2008;14:497-500.
2. Hess DC, Borlongan CV. Stem cells and neurological diseases. *Cell Prolif* 2008;41 Suppl 1:94-114.
3. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* 2005;23:719.
4. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180.
5. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143.
6. Locatelli F, Bersano A, Ballabio E, Lanfranconi S, Papadimitriou D, Strazzer S, et al. Stem cell therapy in stroke. *Cell Mol Life Sci*:757-72.
7. Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009;16:12-20.
8. Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:6-13.
9. Liu H, Honmou O, Harada K, Nakamura K, Houkin K, Hamada H, et al. Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after

cerebral ischaemia. *Brain* 2006;129:2734-45.

10. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-33.

11. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003;34:40-6.

12. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003;107:598-603.

13. Heo JH, Kim SH, Lee KY, Kim EH, Chu CK, Nam JM. Increase in plasma matrix metalloproteinase-9 in acute stroke patients with thrombolysis failure. *Stroke* 2003;34:e48.

14. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-40.

15. Zlokovic BV. Remodeling after stroke. *Nat Med* 2006;12:390-1.

16. Chang DI, Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Abumiya T, Mazar AP, et al. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1408-19.

17. Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* 2006;12:441-5.
18. Saver JL. Time Is Brain--Quantified. *Stroke* 2006;37:263-6.
19. Nam HS, Han SW, Ahn SH, Lee JY, Choi HY, Park IC, et al. Improved time intervals by implementation of computerized physician order entry-based stroke team approach. *Cerebrovasc Dis* 2007;23:289-93.
20. Katzan IL, Hammer MD, Hixson ED, Furlan AJ, Abou-Chebl A, Nadzam DM. Utilization of Intravenous Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *Arch Neurol* 2004;61:346-50.
21. Barry F, Murphy J. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004;36:568-84.
22. Gladstone D, Black S, Hakim A. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 2002;33:2123.
23. O'Collins V, Macleod M, Donnan G, Horkey L, van der Worp B, Howells D. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006;59:467-77.
24. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:726-36.
25. Ryan J, Barry F, Murphy J, Mahon B. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation* 2005;2:8.

26. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005;57:874-82.
27. Mezey E. Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-82.
28. Chen X. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 2002;22:275-9.
29. Li Y. Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1311-9.
30. Brazelton TR. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-9.
31. Chen J. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003;92:692-9.
32. Shen LH. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience* 2006;137:393-9.
33. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73:778-86.
34. Borlongan CV. Intracerebral xenografts of mouse bone marrow cells in adult rats facilitate restoration of cerebral blood flow and blood-brain barrier. *Brain Res* 2004;1009:26-33.

35. Borlongan CV. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res* 2004;1010:108-16.
36. Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 2005;49:407-17.
37. 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;59:514-23.
38. Willing AE. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 2003;73:296-307.
39. Chen J. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73:778-86.
40. Clark AW, Krekoski CA, Bou S-S, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 1997;238:53-6.
41. De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 2007;92:440-9.
42. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, et al.



Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res* 2007;100:904-13.

43. Hsu JY, McKeon R, Goussev S, Werb Z, Lee JU, Trivedi A, et al. Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26:9841-50.

44. Zhou HZ, Ma X, Gray MO, Zhu BQ, Nguyen AP, Baker AJ, et al. Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:189-95.

45. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000;101:1833-9.

46. Asahi M, Sumii T, Fini M, Itohara S, Lo E. Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport* 2001;12:3003.

47. Veeravalli KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, Fassett D, et al. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2009;36:200-12.

Abstract

**Roles of matrix metalloproteinase and mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke**

Hyo Suk Nam

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Ji Hoe Heo)

Many researches for mesenchymal stem cells (MSC) have been conducted in various diseases. Because MSC can be rapidly expanded in ex vivo for autologous transplantation, the reports of immunologic rejections or tumor formation are scant. The beneficial mechanism of MSC in ischemic stroke is largely unknown. Several factors, such as neurogenesis, angiogenesis, improvements of brain plasticity, neuroprotection, and activation of endogenous neurorestorative processes have been suggested.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases. They can destruct extracellular matrix. Detrimental effects of MMPs have been well known in ischemic stroke. MMPs contribute to hemorrhagic transformation, edema or thrombolytic failure in ischemic stroke. Recently, a hypothesis has been proposed that MMPs have a role

in recovery phase after stroke. In developmental periods, MMPs modulate growth, regeneration development, neurogenesis, angiogenesis and termination of neuroinflammation.

Based on current evidences, both MSC and MMPs may be helpful in the recovery phase of ischemic stroke. The hypothesis of this study was that MSC therapy after ischemic stroke will be beneficial for recovery and MMPs play a role in it.

The experiments were conducted through two phases. In phase 1, we searched the appropriate time for MSC injection after middle cerebral artery occlusion (MCAO). In phase 2, the serial changes of neurological improvements, changes of MMPs and infarction volumes after MSC injections were investigated.

In phase 1, human MSC were injected at 1 hour, 1 day, or 3 days after MCAO. Improvement of neurologic deficits, which was demonstrated on rotarod tests and Longa score, was noted in the group of MSC injection at 1 hour after MCAO. Activities of MMPs at 7 days after stroke were evaluated with gelatin zymography. In the group of MSC injection at 1 hour after ischemic stroke, MMP-2 levels increased compared with control, whereas MMP-9 levels were not different between MSC injection and control groups.

From phase 2 experiments, there were significant neurological improvements on rotarod test and Neurological Severity Score in the group of MSC injection at 1 hour after MCAO. In gelatin zymography, the MMP-2 activities at 1 day were higher in the MSC groups than the control. No differences of MMP-9 were detected. Infarctions sizes were not different between the MSC-treated animals and control.

From this study, a favorable neurological outcome after the MSC injection was shown, particularly after earlier injection of MSC. Higher MMP-2 levels were also detected in MSC-treated rats. Neurological improvements without accompanied reduction of infarction sizes in this study may suggest that the beneficial effects of MSC are not from neurogenesis but from increasing plasticity. The brain plasticity may be associated with MMP-2 elevation after MSC injection.

---

Key words : mesenchymal stem cell, matrix metalloproteinase, cerebral infarction