

골수유래 중간엽줄기세포에서
재생중인 후각점막 추출액에 의한
neurotrophic factor 의 상향조절

연세대학교 대학원

의학과

정 상 호

골수유래 중간엽줄기세포에서
재생중인 후각점막 추출액에 의한
neurotrophic factor 의 상향조절

지도 교수 박 동 준

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2010년 1월 일

연세대학교 대학원

의학과

정 상 호

정상호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 박 동 준 인

심사위원 조 병 필 인

심사위원 최 병 호 인

심사위원 정 성 우 인

심사위원 김 현 수 인

연세대학교 대학원

2010년 1월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 도움을 아끼지 않고 베풀어 주셨던 모든 분들께 감사의 마음을 전합니다. 더욱 더 넓은 배움의 기회를 주시고 학위시작과 동시에 무한한 인내와 관심으로 지도해 주셔서 박사과정을 마칠 수 있게 지도해 주신 박동준 교수님께 무엇보다 감사를 드립니다. 학자적 양심과 연구과정에 대한 세심한 배려로 지도해 주셨던 조병필 교수님 또한 논문을 세심하게 지도해 주신 최병호 교수님, 실험의 부족한 부분을 자세히 지적해 주셨던 정성우 교수님, 항상 친형님처럼 따뜻한 조언을 해주셨던 김현수 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 실험 시작부터 세세한 과정을 함께 했던 조효경 선생님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 항상 기도와 사랑으로 지지해 주시고 기다려 주신 부모님, 묵묵히 지켜봐 주시고 받쳐주신 장모님께도 깊은 감사를 드리며 마음으로 응원을 해주고 수고 많이 한 사랑하는 아내 김현아, 또한 사랑하는 아들 준희와 딸 예원이와도 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

무엇보다도 항상 살아계시고 함께 하신 하나님께 영광을 돌립니다.

2010년 1월 정 상 호

차 례

차례.....	i
그림 및 표차례.....	iii
국문요약.....	iv
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	6
1. 후각 점막 재생 동물모델.....	6
2. 후각 점막재생 정도 측정.....	7
3. 후각 점막에서 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 통한 신경성장인자의 전사 RNA 의 측정.....	8
4. 골수유래 중간엽줄기세포의 분리 및 배양.....	11
5. 골수유래 중간엽줄기세포 에서 Western blotting 분석.....	12
6. 통계	13
III. 결과	14
1. Triton X-100 으로 손상시킨 후각점막의 재생.....	14
2. 재생중인 후각 점막에서 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 통한 NGF, BDNF 전사 RNA 발현의 변화.....	19
3. 골수유래 중간엽 줄기세포에서 재생중인 후각점막 추출물에 의한 NGF, BDNF 의 발현.....	20
IV. 고찰	24
V. 결론	28

참고 문헌.....	29
영문요약.....	35

그림 차례

- 그림 1. Triton X-100 처리 3 일 후 탈락된 후각신경상피의 소견
- 그림 2. 후각상피의 두께와 s-100 단백질의 면역염색강도에 따른 구분
- 그림 3. 후각신경수상돌기(Olfactory dendritic knobs)의 밀도에 따른 구분
- 그림 4. 손상 후 재생되는 시간에 따른 후각신경수상돌기밀도, S-100 단백질에 대한 염색반응정도 및 후각상피의 두께의 grade 의 변화
- 그림 5. 시간에 따른 후각 점막에서의 NGF 와 BDNF 전사 RNA 의 발현양상의 변화
- 그림 6. NGF 와 BDNF 에 대한 전사 RNA 의 발현과 Western blot 을 통한 단백질의 발현양상
- 그림 7. 생리완충용액 첨가 배지, 정상점막추출물첨가배지 및 재생점막추출물첨가배지를 첨가 후 24 시간 경과된 골수유래 중간엽줄기세포의 BDNF 에 대한 형광면역염색소견

표 차례

- 표 1. 역전사 중합효소연쇄반응에 사용한 시발체의 염기서열

국문요약

골수유래 중간엽줄기세포에서 재생중인 후각점막 추출액에 의한 neurotrophic factor 의 상향조절

척수 손상이나 뇌졸중등 신경계 손상의 치료 방법으로 골수유래 중간엽줄기세포를 이식하는 세포 치료가 임상적으로 좋은 결과를 보이고 있다. 골수유래 중간엽줄기세포를 이용한 세포 치료에서 손상된 신경계의 회복기전을 알기 위해 재생중인 후각신경 동물모델을 이용한 본 연구를 시행하였다.

후각신경조직을 손상시키고 재생중인 후각신경조직을 만들기 위해 Sprague-Dawley 쥐에 Triton X-100 으로 처리하였고 손상시킨 후 9 주간의 재생 과정을 H&E, 주사전자현미경, 면역화학 염색을 이용하여 분석 하였다. 이러한 손상된 후각신경의 재생과정에 신경성장인자 (neurotrophic factors)가 필요한지 확인하기 위해 nerve growth factor(NGF), brain derived growth factor(BDNF)의 전사 RNA 발현을 역전사 중합효소연쇄반응으로 측정하였다. 또한 손상된 후각점막을 채취해 분쇄하고 그로부터 추출한 추출액을 시험관내 골수유래 중간엽줄기세포의 배지에 첨가한 후 72 시간 배양하고 NGF, BDNF 에 대한 역전사 중합효소연쇄반응, Western blot, 형광면역화학염색법을 시행하여 분석하였다.

후각점막은 형태적으로 손상 후 9 주 내에 회복되었고 이와 병행하여 신경이 재생되는 동안 후각 점막에서 NGF 와 BDNF 을 코딩하는 전사RNA 의 발현이 손상 이후부터 증가하였다가 같은 기간 내에 정상치로 회복되었다. 재생중인 후각점막 추출액을 첨가한 골수유래 중간엽줄기세포에서는 정상 후각점막 추출액을 첨가하거나 생리완충용액[phosphate buffered saline(PBS)]만을 첨가한 대조군에

비해 NGF 와 BDNF 의 생성 증가를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로, Triton X-100 으로 손상된 후각 신경은 손상후 3 일째부터 재생과정이 활발함을 확인할 수 있었고 그 재생 과정에서 NGF 와 BDNF 가 필요한 물질임을 알 수 있었다. 더 나아가서 재생중인 후각점막의 추출액을 투여한 중간엽줄기세포에서 NGF 와 BDNF 생성을 촉진 시키는 것으로 보아, 이식된 줄기세포가 손상된 신경 조직 안에서 필요한 물질을 분비하여 재생을 유도한다는 가설을 확인 할 수 있었다. 또한 줄기세포의 신경재생 기전의 연구에 있어 후각신경 동물모델은 매우 유용한 방법이라 추측되었다.

핵심되는 말 : 골수유래 중간엽줄기세포, 후각점막, neurotrophic factor

골수유래 중간엽줄기세포에서 재생중인 후각점막 추출액에 의한 neurotrophic factor 의 상향조절

<지도 박 동 준 교수>

연세대학교 대학원 의학과

정 상 호

I. 서 론

골수유래 중간엽줄기세포(bone marrow derived mesenchymal stem cell)는 골수 내에 존재하는 혈액 줄기세포 이외의 세포 중에서 플라스틱 배양기에 잘 붙어있는 세포에서 유래된 줄기세포를 칭하며 characterization 을 시행하기 전까지는 골수 간세포(bone marrow stromal cells)라고도 혼용하여 쓰이고 있다. 이는 골, 연골, 지방, 근육 심지어 신경세포(Woodbury 등, 2000)로도 분화가 가능하다고 알려진 성체 줄기세포로서, 배아줄기세포, 제대 혈 유래 줄기세포 등과는 달리 윤리적 문제없이 사용 될 수 있는 사용 될 수 있는 좋은 세포치료제의 하나이다. 척수 손상이나, 뇌졸중 등 신경계 질환의 치료는 신경재생의 한계로 현대의학이 안고

있는 난제 중 하나이며 최근 줄기세포를 신경세포로 분화시켜 이를 이용해보려는 시도가 진행되고 있고 (Lee 등, 2007; Andrew 등, 2008) 제한적이긴 하나 골수유래 중간엽줄기세포를 이용한 임상실험에서 그 효과가 보고된 적이 있다(Mazzini 등, 2008; Moviglia 등, 2006). 그러나 microarray 와 proteomics 등을 이용한 최근의 연구를 살펴보면 시험관내에서 신경으로 분화된 골수유래 중간엽줄기세포의 유전자가 실제 신경세포나 원래의 줄기세포의 그것과는 차이가 있음을 알 수 있는데 실제로 기능을 가진 신경으로 분화된 것이 아니라 그 모양만 신경과 유사한 형태로 변화된 것이라는 연구결과들이 보고 되고 있다(Choi 등, 2006; Bertani 등, 2005). 생체 이식의 경우도 주입한 줄기 세포의 생착율이 매우 낮아 극소수의 줄기세포가 신경으로 분화되어 기능을 한다기보다는 손상된 신경부위 또는 그 주위에서 신경재생에 도움을 주는 환경을 제공할 것이라는 주장이 설득력을 얻고 있다 (Pisati 등, 2007). 이런 재생에 도움을 주는 기전으로는 골수유래 중간엽줄기세포가 다양한 사이토카인(cytokine)과 영양인자(trophic factor)들을 생산해냄으로써 이러한 역할을 수행하는 것으로 보고 있다. 골수유래 중간엽줄기세포는 hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor(VEGF), NGF 그리고 BDNF 등을 생산할 수 있다(Chen 등, 2001). 이런 인자들은 독립적으로 작용했을 때 보다 함께 작용하였을 때 시너지효과가 나타나는 것으로 알려져 있다. 중요한 골수유래 중간엽줄기세포의 특징 중 하나가 주위의 다양한 미세환경(ionic microenvironment)에 따라 변화하는 성장인자의 영향에 따라 다르게 반응하는 것이 밝혀져 있다(Chen 등, 2001). 이것은 손상된 조직 안의 골수유래 중간엽줄기세포가 다양한 조직 안에서의 요구에 따라 필요한 요소 및 성장인자들을 분비하는 것을 뜻한다. Qu 등 (2007)은 생쥐의 뇌혈관을 일시적으로 결찰하여 허혈을 일으킨 후, 회복이 진행중인 2, 3 일째 분리한 뇌조직을

분쇄하여 추출한 추출물을 골수유래 중간엽줄기세포에 첨가해 배양한 결과 줄기세포 내에서 손상된 뇌조직의 회복에 도움이 될만한 여러 성장인자와 NGF, BDNF 등을 코딩하는 유전자들의 발현이 증가한 것을 관찰하였다 (Qu 등, 2007). 이 실험의 의의는 중추신경계질환이 골수유래 줄기세포의 투여에 의해 회복이 되는 중요한 기전의 하나를 제공한 것이다. 이러한 결과가 허혈을 일으킨 뇌조직에서만 발생하는 것이 아니라 후각신경조직 등 다른 신경조직에서도 유사한 결과를 보이는지 확인하는 것도 유용한 일일 것이다.

실험에 이용한 후각신경은 제 1 번 뇌신경으로서 유일하게 코 점막에 포함되어 외부에 노출 되어 있는 신경이며 일생을 통해 지속적으로 손상부위가 재생되는 유일한 신경이다(Costanzo 등, 1991). 이렇게 외부에 노출되어 있는 후각신경은 외부로부터의 화학적 혹은 외상성 손상에 취약할 수 밖에 없다. 또한 인간을 포함하여 많은 포유동물들은 후각이 생존에 필요한 요소이므로 손상된 후각신경이 재생될 수 있는 능력은 중요하다고 할 것이다. 이러한 후각신경의 재생은 후각신경이 포함된 후각상피의 기저층에서 일어난다고 밝혀져 있다(Graziadei 등, 1979b). 일차적으로 손상 후 후각신경의 재생이 촉진되는데 (Graziadei 등, 1979a) 새로운 후각신경은 그 축삭(axon)이 후각신경의 구부(olfactory bulb)로 연결되는 기능적인 재생도 이루어 지는 것으로 밝혀졌다(Costanzo, 1985; Doucette 등, 1983; Harding 등, 1977). 이와 같이 포유동물의 일생에 있어서 재생과정이 지속되는 후각신경은 그 재생되는 축삭이 중추신경계로 직접적으로 들어갈 수 있는 유일한 신경이다(Doucette, 1991). 이러한 특징으로 인해 후각신경의 재생과정을 밝힘으로써 척수 손상 등의 영역에 있어서 세포치료에 이용하려는 연구들이 활발히 이루어지고 있다.

손상후에 후각상피에서 일어나는 주된 과정으로는 뉴런의 세포사멸(apoptosis)과 이후의 기저세포(basal cell)의 증식 및 분화가 있다. 이때 대식세포(Macrophage)등의 왕성한 침윤이 일어나는 면역 반응도 동반된다.

이러한 후각신경의 재생, 발달 및 생존에 미치는 중요한 성장인자로서 NGF, BDNF, NT-3 NT-4 등의 신경성장인자들이 있으며 이들은 후각점막에서 그들의 수용체와 함께 광범위하게 존재하여 후각신경의 재생에 기여한다. 후각신경재생 조절에 관여하는 중요 신호전달 물질(signal molecule)들은 그 외에도 insulin-like growth factor, FGF(fibroblast growth factor)와 epidermal growth factor 들을 포함하고 있는 성장인자군(growth factor families)이 있다. 이들은 후각 신경의 전구세포(olfactory progenitor cell)의 증식과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있고 더욱이 이들의 수용체들이 다양한 발달단계에 있어서 발현되는 것으로 나타났다(Kawauchi 등, 2004; Mackay-Sim 등, 2000). 신경성장인자는 신경의 분화 및 재생에 관여하는 인자이면서 또한 태아의 성장과정뿐만 아니라 성인에 있어서도 중추신경이 손상 받은 후 재생과정 동안 신경조직의 생존과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다(Semkova 등, 1999). 이들 신경성장인자들 중 본 실험에서 발현을 보고자 했던 인자들은 NGF 와 BDNF 이다. 정상적인 후각신경의 발달에 있어서는 증식률 및 분화가 증가함에 따라 이들 NGF 와 BDNF 의 발현이 증가하는 것으로 밝혀져 있다(Roskams 등, 1996). NGF 는 뇌경색 이후 회복 시에 감각신경과 교감신경의 생존과 분화를 증진시키는 것으로 알려져 있고(Semkova 등, 1999) 건강(intact)한 상피자체 내에서는 발견되지 않지만 실험적으로 NGF 를 후각신경구부에 주사한 이후에는 후각상피 쪽으로 이동되는 것이 밝혀져 있다(Miwa 등, 1998). 강력한 신경 보호 및 생존을 증진시키며 신경재생을 촉발시키는 factor 로 알려진 FGF2 가 없는 knock-out mice 에서 대뇌허혈을

일으켰을 때 뇌경색 부위의 확대 및 BDNF 전사 RNA 의 생성이 되지 않는 것이 밝혀졌다(Kiprianova 등, 2004). 이것은 BDNF 가 중추신경계에서 발현되며 재생에 관여하는 신경성장인자임을 의미한다. 또한 신생아의 신경의 생존에도 관여하며 시냅스 가소성(synaptic plasticity)의 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Sairanen 등, 2005). NGF, BDNF 는 후각점막은 물론 분화되지 않은 골수유래 중간엽줄기세포에도 존재하는 것으로 알려져 있다(Feron 등, 2008; Rodrigues 등, 2009). 그간의 연구에 의하면 일부 논란은 있으나 Triton X-100 이나 ZnSO₄ 같은 화학물질을 후각점막에 처치하면 후각신경이 손상 되는데 이들은 시간이 지남에 따라 정상신경으로 회복되는 것으로 보고되어 있다(McBride 등, 2003; Williams 등, 2004). 이 회복 과정에 여러 신경성장인자들의 생산이 증가됨으로써 이 물질들이 autocrine 혹은 paracrine 기능에 의해 후각신경 재생에 관여한다고 예측할 수는 있으나 실제로 생성의 증가나 감소에 대해서는 아직 연구된 바가 없는 실정이다.

본 연구자는 이러한 사실들을 토대로 다음과 같은 가설을 세울 수 있었다. 즉 허혈성 뇌조직에 의한 줄기세포의 반응에서와 유사하게 인위적으로 TritonX-100 으로 손상된 후각신경이 시간경과에 따른 재생을 할 때 그 회복을 촉진하기 위해 신경성장인자의 생성증가가 필요한 생물학적 상태가 될 것이다. 또한 이런 손상된 상태에 있는 재생 중인 후각점막의 추출물을 골수유래 중간엽줄기세포와 접촉시켜주면 후각점막에서 유래한 신호나 물질에 의해 줄기세포 내에서 신경성장인자의 생성 및 분비가 자극 받을 것이다. 이러한 사실이 확인된다면 후각신경의 손상으로 인한 무후각증의 치료영역은 물론 다른 신경병변에도 줄기세포치료가 유용하다라는 근거를 제공할 수 있을 것이다.

이러한 가설을 검증하기 위하여 본 연구에서는 손상된 후각점막 내에서 신경이 재생되는 동안 NGF 와 BDNF 생성의 증가가 시작되는 상태를 전사 RNA 발현의 증가로 확인해 보고 동시에 재생중인 후각점막의 추출물을 골수유래 중간엽줄기세포 배양시 투여함으로써 이 줄기세포 내에서 NGF 와 BDNF 발현의 증가를 유도하는지 분석하여 이 결과를 토대로 줄기세포치료가 손상된 신경재생에 기여하는 기전을 제시하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 후각 점막 재생 동물모델

모든 동물실험은 연세대학교 원주의과대학 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 시행하였다. 6 주된 Sprague-Dawley 쥐를 ketamine(10mg/kg)과 Zylazine hydrochloride (2mg/kg)의 혼합액을 근육주사하여 전신 마취한 후, Williams 등(2004)의 방법을 약간 변형하여 시행하였는데, 간략하면 다음과 같다. 오른쪽 비공을 통해 약 30-50 μ l의 0.7% TritonX-100(Sigma, USA) 용액을 26 게이지 silicone IV 카테터를 이용해 투여하였다. 대조군에는 같은 양의 생리완충용액을 투여하였다. 용액이 후각점막 부위에 잘 접촉되도록 5 분간 양와위를 취한 후 회복실로 보냈다. 후각점막의 자연재생을 관찰하기 위해 0 일, 3 일, 1 주, 2 주, 3 주, 5 주, 7 주, 9 주 후에 과량의 이산화탄소흡입으로 안락사 시킨 후 heparin 수용액 및 4%의 paraformaldehyde 를 차례로 심장으로 관류시켰다.

고정된 쥐의 안와(orbit) 앞쪽부위의 비강 골부를 채취, 약 2 주간 EDTA 로 decalcification 시행 후 후각점막의 H&E 염색 및 immunohistochemistry 를 시행하였다. 이때 정확한 관찰을 위해 whole mount 방법으로 쥐의 두부 전체를 자르고 염색하였다. 각 시간 포인트에 따른 각 군의 실험동물은 3 마리씩으로 하였다.

역전사 중합효소연쇄반응을 위해서 쥐의 안와 앞쪽부위의 비강 골부를 채취, 오른쪽 비중격과 비강의 후상부 점막을 채취한 후 이를 영하 70 도에 급속 동결 후 필요할 때 사용하였다. 주사전자현미경 관찰을 위해서 나머지 일부분을 4% glutaraldehyde 로 고정하였다. 각 시간 포인트에 따는 각 군의 실험동물은 역시 3 마리씩 사용하였다.

2. 후각 점막재생 정도 측정

Triton X-100 로 손상된 후각 점막의 재생 정도는 1) H&E 염색 후 200 배 현미경 시야에서 측정된 후각 상피의 두께, 2) 항 S-100 단백질 항체를 이용, 점막고유층에서 Olfactory ensheathing glial cell(OEG)의 면역염색 강도, 3) 주사전자현미경하에서 관찰한 후각신경수상돌기(Olfactory dendritic knob)수의 회복 정도를 정상치와 비교함으로써 판별하였다.

전통적인 파라핀 포매법에 의한 H&E 염색을 시행한 후 시간경과에 따른 후각상피두께의 비교를 위해서 이 실험의 내용을 알지 못하는 이비인후과 의사가 정상대조군 후각 상피층의 두께를 200 배 시야의 현미경으로 관찰 후, 이를 grade5 로 정하고 각 실험군의 두께를 측정, 정상치와 비교하여 1-5 사이의

grading 을 시행하였다 (그림 2). grade 5 는 $50\mu\text{m}$ 로써 각각 $10\mu\text{m}$ 씩 줄어들 때마다 grade 가 한 단계씩 낮아지게 grading 하였다.

비공을 통해 투여된 Triton X-100 은 detergent 로서 후각점막상피 및 후각신경도 탈락시키고 점막 고유층(lamina propria)의 축삭다발(axon bundle)을 퇴화(degeneration)시키기도 한다. 축삭돌기(Axon)를 둘러싸고 있는 Olfactory ensheathing glial cell 은 말초신경의 Schwann cell 과 성분과 기능이 유사하여 이의 재생 정도는 s-100 단백질에 대한 goat anti rat s-100 antibody (goat polyclonal IgG, epitope mapping near the N-terminus of SP-100 of human origin, $200\mu\text{g}$ IgG in 1.0 ml of PBS with $<0.1\%$ sodium azide and 0.1% gelatin. Santacruz, CA, USA)로 면역화학염색을 시행하여 비교할 수 있는데, H&E 염색에서와 같은 방법으로 이를 정상치와 비교하여 재생 정도를 1-5 사이의 grading 을 시행하였다(그림 2).

또한 후각점막의 비강쪽 측면은 후각수용체뉴런(olfactory receptor neuron)의 최말단 부분이며 신경세포의 축삭(dendrite)의 일종인 후각신경수상돌기가 존재한다. scanning electron microscope(TM-1000, Hitachi, Japan)을 시행하여 3000 배 시야에서 확인하고 정상치 대비 1-5 사이의 grading 을 시행하여 그 갯수를 비교 분석하였다(그림 3).

3. 후각 점막에서 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 통한 신경성장인자의 전사 RNA 의 측정

Triton x-100 을 투여한지 0 일, 3 일, 1 주, 2 주, 3 주, 5 주, 7 주, 9 주에 손상된 후각 점막을 채취하여 5 mm x 5 mm 크기로 잘라 NGF, BDNF 전사 RNA 의 변화 추이를 역전사 증합효소연쇄반응으로 관찰하였다.

실험 방법으로는 손상된 후각 점막을 채취하여(50mg) trizol reagent(Life technologies, Scotland) 1ml 를 넣고 균질화 하였다. chloroform 200 μ l 를 첨가하고 15 초 동안 vortex 시킨 후, 실온에서 5 분 동안 반응시키고 4℃에서 12000rpm 으로 15 초 동안 원심분리를 실시하였다. 위층의 무색으로 분리된 부분만 새로운 eppendorf tube 에 옮겨 동량의 isopropanol 을 첨가하고 약하게 8 번 위아래로 흔들어 준 뒤에 실온에서 10 분 동안 반응시켰다. 4℃에서 12000rpm 으로 10 분 동안 원심분리 한 후에 상층액을 제거하고 75% 에탄올 1ml 를 첨가하고 약하게 위아래로 흔들어 준 뒤에 4℃ 에서 12000rpm 으로 5 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 10 분 동안 건조시킨 후, RNase free water 를 50~100 μ l 첨가하였다. 55℃에서 10 분 동안 반응시킨 후에 얼음에 넣고 U.V. spectrometer 를 이용, 260nm 와 280nm 에서 RNA 농도를 측정하였다. 추출된 RNA 1 μ g 에 25mM MgCl₂ 4 μ l, 2.5mM dNTP 8 μ l, 50 μ M oligo d(T) 1 μ l, murine leukemia virus reverse transcriptase 1 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, 10xPCR 완충액 2 μ l, 증류수를 포함하여 최종 20 μ l 되게 섞은 후 42℃에서 60 분, 99℃에서 5 분, 4℃에서 5 분간 반응시켜 cDNA 를 합성하였다. 증합효소연쇄반응은 AccuPower™ HotStart PCR Premix(Bioneer, Korea)를 사용하였으며, 각각의 primer 는 최종 농도 0.5 pM, c DNA 는 1 μ l 넣어 총량이 20 μ l 가 되게 한 후 94℃에서 45 초간 denaturation, 60℃에서 45 초간 annealing, 72℃에서 1 분간 extension 하여 총 35 회를 시행하였다.

각 신경성장인자에 대한 시발체(primer)는 이미 발표된 cDNA 염기서열을 토대로 적당한 기대 크기 하에 sense primer, antisense primer 를 만들고 housekeeping gene 은 GAPDH 를 사용하였다. PCR 결과물은 1.5% agarose gel 에 전기영동 후 스캔하여 GAPDH 밴드의 밝기와 상대적으로 비교하여 반 정량적으로 비교하였다. 이때 사용된 각 primer 의 염기서열 및 조건은 표 1 과 같다.

표1. 역전사 중합효소연쇄반응에 사용한 시발체의 염기서열(Sequences of primers used for RT-PCR)

Gene	Primer sequences(5' to 3')	length(bp)	TM(°C)
NGF	Forward : GCC CAC TGG ACT AAA CTT CAG C	349	60.0
	Reverse : CCG TGG CTG TGG TCT TAT CTC		60.0
BDNF	Forward : CGA CGT CCC TGG CTG ACA CTT TT	491	62.0
	Reverse : AGT AAG GGC CCG AAC ATA CGA TTG G		62.2
GAPDH	Forward : TCC CAT TCT TCC ACC TTT GAT GCT	102	58.7
	Reverse : ACC CTG TTG CTG TAG CCA TAT TCA T		58.9

4. 골수유래 중간엽줄기세포의 분리 및 배양

동종의 쥐의 대퇴골에서 골수유래 줄기세포를 분리 배양하는데 Kadiyala(1997)의 방법대로 시행하였다. decapitation 으로 희생 시킨 쥐의 대퇴골을 분리하였다. 주위의 근육을 모두 제거 한 후 대퇴골의 양쪽 끝을 잘라낸 뒤 15% FBS 가 함유된 DMEM 1cc 를 26 게이지 바늘이 있는 주사기로 flushing 하면 골수부위의 조직들이 모두 밀려 나오는데 이를 지름 100mm 배양접시에 3 일간 배양하여 접시 벽에 붙어있는 세포만 채취해 이를 계대 배양한 후 passage 2-3 의 세포를 이용하였다. TritonX-100 으로 손상 시킨 지 3 일 후 비강의 후상부 점막을 모두 채취하였다. 1ml 의 생리완충용액에 넣어 조직균질화시킨 후 2000rpm 에서 15 분간 원심분리 하였다. 상층액을 채취한 후 멸균을 위해 0.2 μ m pore size filter 로 걸러내었다. 이를 100mm 세포배양접시에서 50%의 합류(confluency)를 이룬 골수유래 중간엽줄기세포에 배지와 섞어 첨가하였는데 그 양은 한 마리의 쥐에서 나온 추출액의 20%의 양으로 첨가하였고 배양하여 72 시간 후 세포를 채취하였다(RO-CM, Regenerating olfactory mucosa-conditioned medium). 채취한 세포는 생리완충용액으로 세 번 이상 세척 후 total RNA, total protein 을 추출하고 BDNF, NGF 에 대한 역전사 중합효소연쇄반응을 상기에서와 같은 방법으로 시행하되 각군당 3 번 시행하였다. 대조군으로는 정상후각점막을 조직균질화 한 상층액(NO-CM, normal olfactory mucosa conditioned medium)과 생리완충용액을 첨가한 배지 등 두 종류를 사용하였다.

5. 골수유래 중간엽줄기세포 에서 Western blotting 분석

중간엽줄기세포에서 발생한 전사 RNA 의 변화가 단백질의 형성에 직접적인 영향을 미쳤는지 알아보기 위해 Western blot 을 시행하였다. 채취한 중간엽줄기세포를 lysis buffer(50 m M Tris-HCl, Ph 8.0, with 150mM sodium chloride, 1.0% Igepal CA-630(NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate)에 넣어 4℃에서 10 분 동안 3,000rpm 으로 균질화 하였다. 상층부의 단백질 표본을 Bradford 방법[Bradford protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)]을 이용하여 정량화하고 30 μ l씩 채취한 다음 10% running gel 과 5% stacking gel 로 이루어진 비연속계를 써서 전기영동 한 후 polyvinylidene fluoride(PVDF)막 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 35V 에서 70 분 동안 전이시켰다. 10 x transfer buffer(pH 8.3)는 Tris base 30.3g, glycine 144g, 증류수 1 L 로 조성하였으며 사용하기 전에는 1X 로 만들어 메탄올이 전체양의 20%가 되게 조성하여 사용하였다. 전이가 끝나면 PVDF 막을 TBST [20mM Tris HCl(pH 7.6), 137mM NaCl, 0.05% Tween 20]로 5 분씩 5 번 흔들면서 세척하였다. 차단용액(5%탈지분유를 포함한 TBST)으로 전이막의 비특이적 결합을 차단하고 5 분씩 5 번 세척 하였다. 일차항체인 NGF(rabbit polyclonal IgG, epitope mapping at the N-terminus of the mature chain of NGF of human origin, 200 μ g/ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin, Santacruz, CA, USA)와 BDNF (rabbit polyclonal IgG, epitope mapping within an internal region of BDNF of human origin, 200 μ g/ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin, Santacruz, CA, USA)를 차단용액에 1:200 으로 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 5 분씩 5 번 세척 한 후에 1:500 으로

희석한 horseradish peroxidase(HRP)가 붙은 goat anti-rabbit IgG 항체(Santacruz, CA, USA)를 실온에서 2 시간 동안 느리게 흔들면서 반응시켰다. 다시 세척한 후 ECL plus western blot detection system(GE Healthcare, UK)으로 발색시켜 LAS 3,000(Fujifilm, Japan)로 조사하였다.

줄기세포의 모양의 변화와 세포질 내에서의 NGF, BDNF 의 분포양상을 보기 위해 각각 형광 면역염색을 시행하였다. 아세톤에 고정시킨 세포를 1% bovine serum albumin 이 포함된 차단용액에 처리 후 일차항체인 rabbit anti rat NGF antibody(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)와 rabbit anti rat BDNF antibody(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)로 하룻밤 동안 반응시켰다. 이차항체로는 FITC-conjugated goat anti-rabbit Ig(Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)을 사용하였으며 핵 대조염색으로는 DAPI(Vector Laboratories, USA)를 실험 매뉴얼에서 지시한 농도로 염색하여 형광현미경 200 배 시야에서 관찰하였다. 대조군으로는 배양액에 생리완충용액, NO-CM 을 처치한 줄기세포를 사용하였다.

6. 통계

모든 결과의 수치는 mean \pm SD 로 표기하며, 시간의 경과에 따른 값과 대조군과의 비교는 Wilcoxon rank test 로 검증하며, *P*값은 0.05 이하를 통계적으로 의미 있는 것으로 규정하였다. SPSS software version 11.0 을 사용하였다.

III.결과

1. Triton X-100 으로 손상시킨 후각점막의 재생

마취에서 회복된 쥐는 모두 특이 사항 없이 9 주까지 생존하였다. H & E 염색에 의한 후각상피층을 관찰한 결과 오른쪽 비공으로 투여한 Triton X-100 에 의해 상피층의 탈락이 반대쪽에 비해 뚜렷한 차이가 관찰되었다(그림 1).

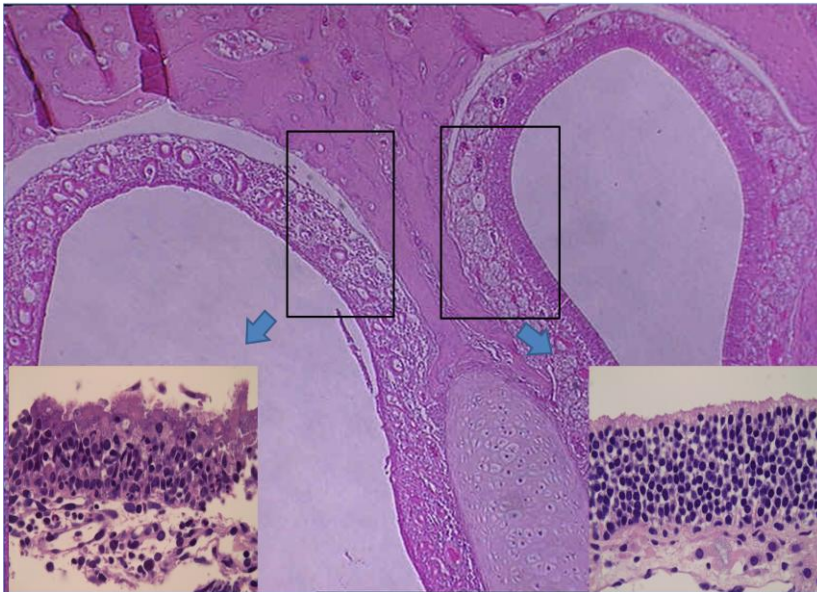


그림 1. Triton X-100 처리 3 일 후 탈락된 후각신경상피의 소견(좌측). 반대측 비강의 정상적인 후각신경상피(우측). (H&E 염색; 40 배, 확대된 사진은 100 배)

후각점막영역은 호흡기 상피층에 비해 goblet cell 이 없고 섬모(cilia)의 높이가 작으며 작은 크기의 상피세포로 확연히 구분될 수 있고 평균 후각상피층의 두께는 약 50 μm 로 이를 기준으로 어렵지 않게 손상 정도를 grading 할 수 있었다. 정상 후각점막의 경우 50 μm 의 두께로 측정되었고 OEC 의 면역염색강도와 밀도가 강양성을 보이며 이를 grade5 로 측정한다(그림 2).Triton X-100 을 처치한 3 일 후 grade 는 급속하게 1.5 ± 0.3 으로 떨어지다가 서서히 회복되어 9 주째 정상화 되는 패턴을 보였다. 고유층(lamina propria)에 존재하는 OEC 는 상피의 탈락과 더불어 역시 3 일 째 가장 낮은 grade 를 보이다가 서서히 회복되는데 상피층의 두께를 측정하는 것보다 다소 주관적이어서 그런지 3 주째보다 오히려 5 주와 7 주째 약간 떨어지다가 회복되는 패턴을 보였다.

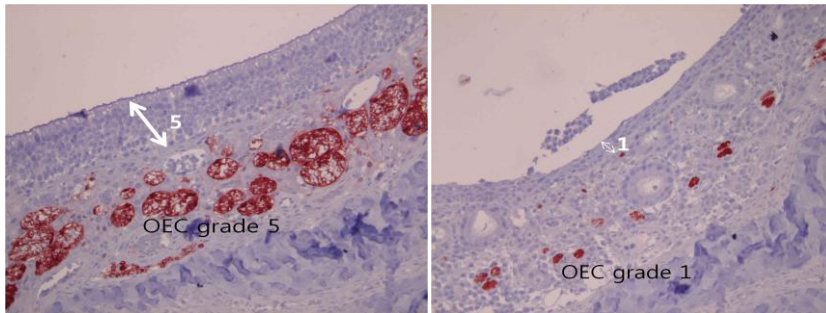


그림 2. 후각상피의 두께와 s-100 단백질의 면역염색강도에 따른 구분. 정상 후각점막의 경우 50 μm 의 두께로 측정되었고 OEC 의 면역염색강도와 밀도가 강양성을 보이며 이를 grade5 로 측정한다(좌측). Triton-X 처리 후 손상 받은 3 일된 후각상피의 모습으로 퇴화되어 얇아진 두께를 보이고 OEC 에 대한 면역염색강도와 밀도가 약해진 것을 관찰할 수 있으며 이를 grade1 로 정의한다. (우측). (200 배)

후각신경수상돌기의 모양과 분포에 대해서는 이전에 인간을 대상으로 보고된 연구와 거의 흡사하였다(Morrison 등, 1990). 즉 정상의 후각 점막영역과 호흡기점막은 이행영역(transition area)을 사이에 두고 잘 구분되었고 후각상피영역에서 수상돌기는 많은 길쭉한 모양의 섬모를 내고 있어 호흡기점막과 구분이 가능하였다. 주사전자현미경소견상 손상이 심할수록 돌기의 일부와 몇 가닥의 섬모만 관찰되어 이를 기준으로 grading 하였다. Grade 5 는 정상후각상피에서의 후각신경수상돌기의 밀도를 보여주고 있다. 각각의 후각신경수상돌기 안에는 이를 이루고 있는 섬모가 모여 섬모 군집처럼 관찰되는데 grade4 는 섬모군집이 규칙성이 사라지기 시작하여 3 에서는 모양이 일정치 않고 적은 수의 수상돌기가 관찰되고 grade 2 는 한 두 개의 수상돌기만 보인다. 반면에 grade 1 에서는 수상돌기가 관찰되지 않고 적혈구와 백혈구만 관찰된다(그림 3).

후각신경수상돌기 역시 9 주째 회복을 하였다. Grading 에 따른 세 종류의 형태학적 회복패턴은 3 일째 가장 심한 손상을 보이다가 그 직후부터 바로 재생과정에 들어가 9 주째 회복되는 패턴은 모두 동일하였다. 즉 손상 된지 3 일째의 점막부터 재생과정에 있는 점막(regenerating mucosa)라 할 수 있었다.

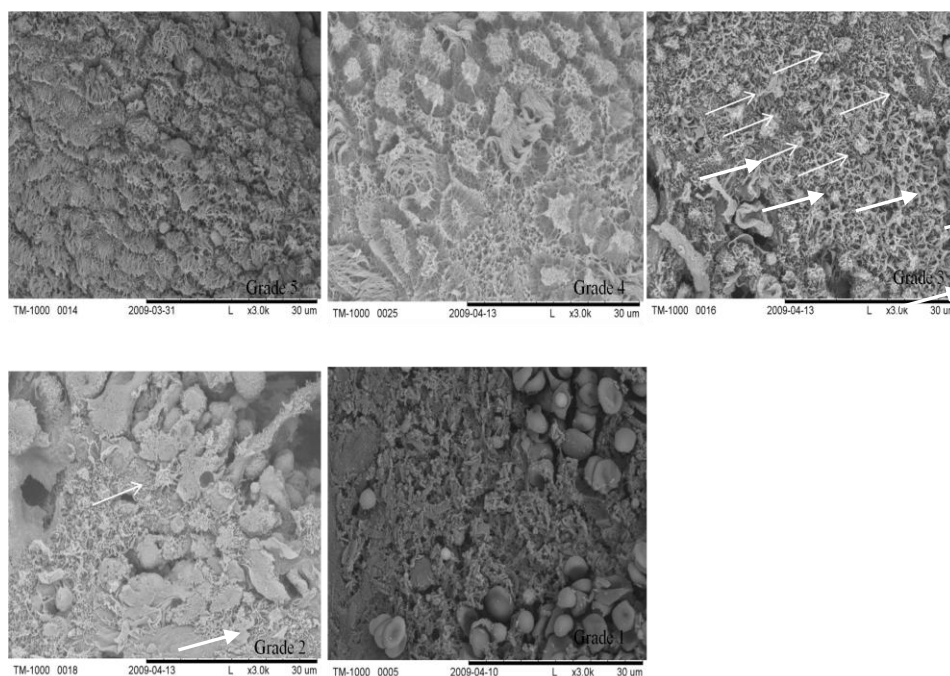


그림 3. 후각신경수상돌기(Olfactory dendritic knobs)의 밀도에 따른 구분. Grade 5 는 정상후각상피에서의 후각신경수상돌기의 밀도를 보여주고 있다. 각각의 후각신경수상돌기 안에는 이를 이루고 있는 섬모가 모여 섬모 군집처럼 관찰된다(K). Grade4 는 섬모군집이 규칙성이 사라지기 시작하여 3 에서는 모양이 일정치 않고 적은 수의 수상돌기가 관찰되고 Grade 2 는 한 두 개의 수상돌기만 보인다(화살표). 반면에 Grade 1 에서는 수상돌기가 관찰되지 않고 적혈구와 백혈구만 관찰된다.

후각신경수상돌기의 회복패턴을 기준으로 나머지 상피세포, S-100 면역반응회복 과정과의 상관관계를 통계 처리하였을 때 7 주째에 통계적으로 유의있는 상이함을 보이긴 했으나 나머지는 모든 시간대에서 통계적으로 차이가 없는, 즉 같은 회복패턴을 나타내었다(그림 4).

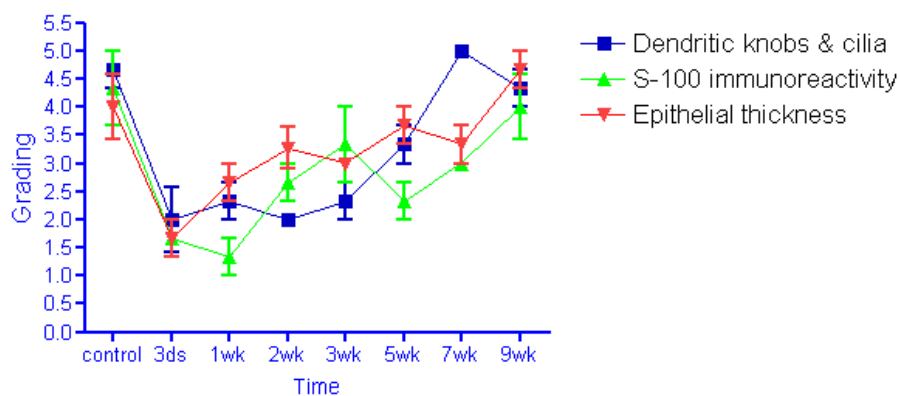


그림 4. 손상 후 재생되는 시간에 따른 후각신경수상돌기밀도, S-100 단백질에 대한 염색반응정도 및 후각상피의 두께의 grade 의 변화. 세가지 모두 3 일째 grade1 까지 감소한 이후 9 주까지 유사한 증가 양상을 보인다.

2. 재생중인 후각 점막에서 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 통한 NGF, BDNF 전사 RNA 발현의 변화

정상대조군에 비해 NGF 발현이 상대적으로 2, 3, 5, 7 주에 통계적으로 유의 있게 상승 하였으며 최고 2.3 배의 증가를 보이다가 9 주째 대조군과 비슷하게 정상화 되었다. BDNF 는 NGF 에 비해 덜 명확하였으나 3 주 5 주에 통계적으로 유의 있는 증가를 보였다(그림 5).

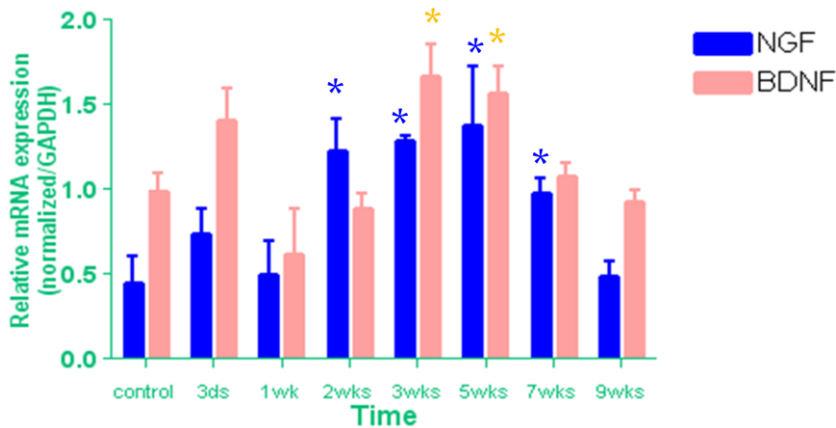


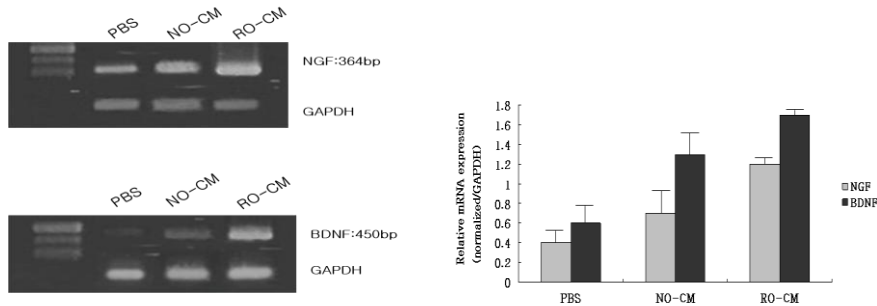
그림 5. 시간에 따른 후각 점막에서의 NGF 와 BDNF 전사 RNA 의 발현양상의 변화. NGF 의 경우 2, 3, 5, 7 주에 통계적으로 유의 있게 상승 하였으며 9 주째 정상화되는 패턴을 보였다. BDNF 는 3, 5 주에 통계적으로 유의 있는 증가를 보였다. Wilcoxon rank test. *P<0.05

3. 골수유래 중간엽 줄기세포에서 재생중인 후각점막 추출물에 의한 NGF, BDNF 의 발현

쥐의 골수에서 채취하여 배양한 세포들은 이전의 연구에서 flow cytometry 상 골수에서 혈액줄기세포표지자인 CD34 에 음성이고 골세포, 연골세포, 수지상 세포로의 분화가 가능한 골수유래 중간엽줄기세포임이 확인 되었다(data not shown).

Triton X-100 으로 손상을 준지 3 일 후에 채취한 점막의 추출물인 Regenerating olfactory mucosa-conditioned medium(RO-CM)과 정상 후각 점막 추출물 normal olfactory mucosa-conditioned medium(NO-CM), 그리고 생리완충용액만을 첨가한 배지를 사용하여 줄기세포를 배양한 후 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 두 개의 대조군인 생리완충용액으로 배양한 것과 NO-CM 으로 배양한 것에 비해 RO-CM 에서 NGF 와 BDNF 전사 RNA 의 발현이 각각 364bp, 450bp 에서 증가 하였고 House keeping gene 인 GAPDH 를 기준으로 세가지 band 의 density 를 반정량적으로 측정한 결과, NGF 와 BDNF 전사 RNA 발현이 증가하였음을 알 수 있었다(그림 6A). 단백질 수준에서 확인하기 위한 western blot 검사에서도 명확하게 RO-CM 에서 두 신경성장인자 모두 증가하는 양상을 보였다. 그리고 β -actin 을 기준으로 한 band 들의 반정량적 측정결과, 두 대조군에 비해 RO-CM 에서 NGF 와 BDNF 단백질의 발현이 증가했음을 알 수 있었다 (그림 6B).

A.



B.

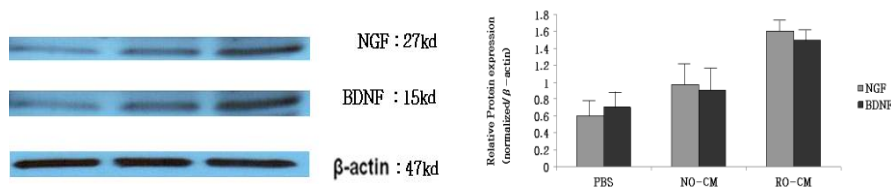


그림 6. NGF 와 BDNF 에 대한 전사 RNA 의 발현(A)과 Western blot 을 통한 단백질의 발현양상(B).

(A). RO-CM 하에서의 NGF 와 BDNF 에 대한 전사 RNA 의 발현이 각각 364bp, 450bp 에서 증가되어있음을 알 수 있다. GAPDH 를 기준으로 한 band 들의 반정량적 측정결과, 두 대조군에 비해 RO-CM 에서 NGF 와 BDNF 전사 RNA 의 발현이 증가됨을 알 수 있다. (B). Western blot 에서도 RO-CM 에서 두 인자에 대한 단백질 발현이 증가되어 있음을 알 수 있다. β -actin 을 기준으로 한 band 들의 반정량적 측정결과, 두 대조군에 비해 RO-CM 에서 NGF 와 BDNF 단백질의 발현이 증가했음을 알 수 있다. (PBS, phosphate buffered saline conditioned medium; NO-CM, normal olfactory mucosa conditioned medium; RO-CM, Regenerating olfactory mucosa conditioned medium).

형광면역화학염색결과에서도 NGF 나 BDNF 모두 중간엽줄기세포 내에 균일하게 분포하였고 NGF 나 BDNF 각각의 항체에 따른 세포 모양의 차이는 없었다. 세포의

모양은 24 시간 후에 관찰하였는데 대조군인 생리완충용액 첨가 배지의 경우 대부분의 세포모양이 편평하고 polygonal 하였으며 세포의 증식은 활발하지 않았다. RO-CM 의 경우 fibroblast 의 형태와 함께 bipolar 한 모습을 보였으며 심지어는 신경돌기(neurite)같은 모습을 보이기도 하였다. NO-CM 의 경우 적은 양의 bipolar 한 세포들이 관찰되었다(그림 7).

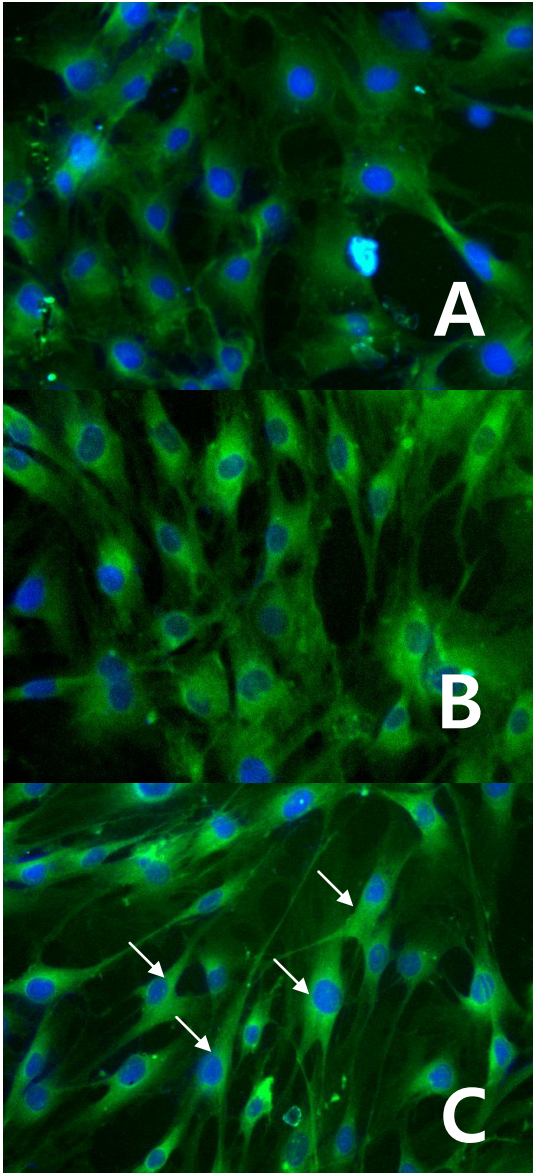


그림 7. 생리완충용액 첨가 배지(A), 정상점막추출물첨가배지(B) 및 재생점막추출물첨가 배지(C)를 첨가 후 24 시간 경과된 골수유래 중간엽줄기세포의 BDNF 에 대한 형광면역염색소견. 대조군인 (A,B)에 비해 재생점막추출물첨가배지를 사용하여 배양된 골수유래 중간엽줄기세포(C)에서 세포질 모양이 신경축삭처럼 변화된 것을 관찰 할 수 있다(화살표). (200 배)

IV. 고찰

상처를 입거나, 병변이 있는 경우 줄기세포가 어떤 기전으로 치료효과를 나타내는가에 대한 명확한 기전은 알려지지 않고 있다. 뇌졸중 등 뇌신경의 병변을 대상으로 한 연구에서 정맥으로 주사한 줄기세포가 뇌실질 내에서 발견되는 숫자는 수천-수십만 개에 불과하다. 이는 부피로 계산해도 극미량이나 치료 효과는 수일 내에 바로 나타나기도 한다. 즉 주입된 세포들이 바로 뇌세포로 변환되었다는 가설은 그 가능성이 희박하다. 비록 병변 내에서 발견된 줄기세포에서 신경세포를 나타내는 단백질이 발견된다 해도 짧은 시간에 분화가 이루어졌다고 보긴 힘들다. 또한 줄기세포의 분화가 진행될수록 세포사도 함께 진행된다는 연구도 있다(Yaghoobi 등, 2008). 치유기전을 설명하는 다른 하나는 소위 회복(restoration)에 대한 가설이다. 즉 정상이 아닌 상처를 입은 곳에 줄기세포가 이식되면 신생혈관생성(angiogenesis), 신경생성유도(neurogenesis induction), 신경돌기생성(neurite out-growth), 시냅스생성(synaptogenesis), 세포사멸(apoptosis) 등에 의해 신경조직의 치유가 유도된다는 것이다. 여기에 관여하는 인자로는 VEGF, TGF, FGF 등의 성장인자와 neurophilin 그리고 NGF 나 BDNF 등의 신경성장인자 등이 있다(Chop 등, 2002).

신경성장인자의 측면에서 이러한 사실을 재현하기 위해 본 실험에서 사용된 모델은 신경 조직 중에 재생활동이 가장 활발하다고 알려진 후각신경계이다. 후각신경은 일상생활에서 흡입하는 바이러스나 화학물질에 의해 탈락되기도 하지만 수 주안에 자연재생을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 때에 따라서는 심각한 영구 무후각증을 초래하기도 하여 어떠한 경우에는 자연재생이 되지 않을 수 있다는

것이다. 또한 ZnSo₄ 나 Triton X-100, methyl-bromide 등의 화학물질로 손상된 설치류의 후각점막 재생 정도는 연구방법이나 측정방법 등 연구자에 따라 각각 그 결과가 상이하고 심지어 소수이지만 후각상피 기저층이 파괴되면 비가역적으로 재생이 불가능하다는 결과들이 있다(Burd 등, 1993). 실제로 많은 연구에서 ZnSo₄ 를 이용한 후각상피 손상 후 자연회복이 가능하다고 하였으나 우리가 시행한 예비 연구에서는 회복되지 않았다(data not shown). 이에 따라 문헌 고찰 및 예비연구를 통해 Triton X-100 에 의한 손상이 재생 가능성이 높다고 판단하였다. 줄기세포가 신경재생에 관여한다는 기전을 찾기 위해 시행한 본 연구의 중요한 전제가 신경조직의 급속한 회복이 있어야 하는데 이렇게 9 주 만에 완전 회복되는 신경조직은 후각신경 이외에는 없다.

본 연구의 목적이 손상후 재생중인 상태의 조직이 줄기세포에 미치는 영향을 보려는 것인 만큼 후각점막의 인위적인 손상 및 재생이 실제로 확인되어야 하므로 9 주간에 걸친 관찰로 이를 확인하였고 더불어 손상 3 일째 이후의 점막은 재생점막이라는 것을 확인할 수 있었다.

그간 알려진 후각신경 재생의 평가방법은 주로 상피 세포의 두께변화와 면역염색화학을 이용한 각종 신경 표지자의 변화 관찰이 대부분이었다. 본 연구에서 사용된 주사현미경을 통한 후각신경수상돌기 관찰법에 의한 재생의 평가는 처음으로 시도 되었는데 함께 시행된 상피세포 두께 측정이나 신경조직의 면역염색화학과 대체로 일치하는 결과를 보여 유용성이 있다고 할 수 있다.

화학약품에 의해 실험적으로 유발된 신경손상이 9 주 내에 회복되었다는 것은 손상에도 불구하고 신경의 줄기세포층 즉 기저세포층은 손상을 받지 않고 주위의 남은 부위 (예를 들어 점막하층이나 고유층)에서 신경의 재생에 필요한 신경성장인자들이 분비되어 paracrine 기능을 했거나 기저세포 자체에서 분비하는

autocrine 기능에 의한 재생임을 추측 할 수 있다. 현재까지 후각 점막의 기저세포층에서 NGF, BDNF, NT4 및 이들의 수용체의 존재가 보고 되었고, 고유층내의 OEC 에서도 BDNF 의 존재가 밝혀져 이러한 추측을 가능하게 한다(Carter 등, 2002; Feron 등, 2008). 본 연구에서 후각점막 신경성장인자의 단백질을 측정하지 않고 전사 RNA 를 측정한 것은 전사 RNA 의 증가패턴만으로도 남아있는 점막에서 신경성장인자를 생산하려는 노력을 반영한 것으로 볼 수 있기 때문이다. 단백질을 생산하는 최종 세포는 상해의 정도에 따라 남아있는 수가 일정치 않을 것 이므로 생산되는 단백질의 양은 중요한 지표가 아니기 때문이다. 우리가 알고자 하는 것은 재생이 필요한 후각신경조직 내에서 어떠한 물질이 어떤 기전으로 주위에 이식된 줄기세포에 신호를 전달하는 지이다. 실험대상인 후각점막이 완전히 괴사되어 생물학적 기능이 없는 조직이 아니라 손상 후 재생되는 조직이라면 자체적으로 많은 생물학적 활동을 하고 있을 것 이므로 이는 재생중인 후각점막 조직과 줄기세포간에 어떠한 교류가 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서도 손상후 1, 2 일 이내의 점막보다는 3 일째의 점막이 줄기세포에 손상 신호를 전달하는데 유용하다고 판단하고 이를 사용하였다.

예상한 대로 RO-CM 영향 하에서 줄기세포의 NGF 와 BDNF 를 코딩하는 전사 RNA 는 물론 이들 단백질의 생성이 증대 되었다. 이 연구는 줄기세포가 주위 환경에 따라 필요한 물질을 만들어 paracrine 기능을 할 수 있도록 ‘small molecular factory’ 의 기능을 한다는 것을 허혈성 뇌조직(Sairanen , 2005) 이외의 다른 조직에서는 최초로 보고하는 것이다.

허혈모델 이외에도 스트레스 회복과정에서 신경성장인자가 필요할 것으로 생각할 수 있는데 신경세포에 대한 tensile stress 나 알레르기 질환에서도 신경성장인자들의 생성이 자극을 받는다는 연구가 있기 때문이다(Kemi C 등, 2006;

Uchida K 등, 2008). 이러한 기존의 연구들과 본 연구에서의 공통점은 아마도 염증반응(inflammation)일 것이다. 알레르기 질환도 하나의 염증질환이며 본 연구의 경우 Triton X-100 으로 손상을 입은 점막주위로 많은 염증세포들이 몰려있는 것을 확인할 수 있다. 실제로 proinflammatory cytokine 중 TNF- α , IL- β , IL-1 등은 NGF, BDNF 등 신경성장인자를 상향조절(up-regulation) 시킨다(Kemi 등, 2006; Manni 등, 2003 Purmessur 등, 2008). 이식된 줄기세포가 이러한 cytokine 의 영향을 받아 신경성장인자의 생성을 증가시키는지 확인하기 위해 proinflammatory cytokine 의 기능을 억제하는 항체나 knock out mouse, siRNA 를 이용한 실험이 향후 필요할 것으로 생각된다. 흥미롭게도 RO-CM 에 의해 배양된 골수유래 줄기세포의 모양이 24 시간 안에 매우 확연하게 신경세포의 모양을 보여주었다. 이는 정상 후각점막조직 배양액인 NO-CM 과도 확연히 구분되고 있으며 양방향으로 bipolar 한 세포 모양과 많은 수상돌기 양상(neurite-like process)을 보이고 있는 것은 신경유도배지(neural induction medium)에서 배양되고 있는 줄기세포의 형태와 유사하였다. 기존의 전통적 방법에 의한 신경분화 유도 배양액에서 신경세포처럼 보이는 세포들은 생존력이 높지 않고 많이 증식되지 않는다. 그 이유는 분화가 진행됨에 따라 세포사(apoptosis)를 촉진하는 유전자의 출현으로 설명이 가능하였다(Yaghoobi 등, 2008). 따라서 분화가 진행될수록 NGF, BDNF 의 발현은 떨어지게 되어 실제로 치료목적으로 사용할 수 없는 것도 문제였다. 본 연구에서 RO-CM 에서 배양된 세포들은 그 증식이 매우 빨라 1×10^5 개의 세포가 2-3 일 내에 100mm 배양접시에 합류(confluency)를 이룰 정도였다. passage 0 의 줄기세포를 배양액에 RO-CM 을 3 일마다 한 번씩 교환하여 passage 5-6 까지도 유지가 가능하였다. 물론 이 세포가 신경세포로 유도되었다고 볼 수는 없지만 지속적으로 신경성장인자를 생산하고 증식이 잘된다면 향후

신경재생을 위한 세포치료의 좋은 재료가 될 것으로 본다. 이를 위해 향후 RO-CM 에 의해 유도된 neuron-like cells 에 대한 apoptosis 의 비교 등의 연구가 필요하다고 판단된다.

V. 결론

결론적으로 Triton X-100 으로 손상을 입힌 쥐의 후각점막은 9 주 내에 자연회복이 가능하고 이 기간 동안 재생후각점막 내에서 신경성장인자의 생성을 위한 전사 RNA 의 증가 관찰을 통해 생물학적 활동을 확인하였다. 또한 이 재생후각점막 성분을 골수유래 중간엽줄기세포에 첨가한 결과 강력하게 신경성장인자의 생성을 촉진한다는 것을 확인하였다. 이렇게 신경성장인자를 생성하는 줄기세포를 이용해 향후 중추신경계 질환이나 손상된 말초신경의 회복에 이용될 수 있도록 후속 연구가 필요할 것이다.

참고 문헌

- Andrews EM, Tsai SY, Johnson SC, et al. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. *Exp Neurol*. 2008;211(2):588-92.
- Bertani N, Malatesta P, Volpi G, Sonogo P, Perris R. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci*. 2005 ;1;118(Pt 17):3925-36.
- Burd GD. Morphological study of the effects of the intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microsc Res Tech*. 1993;24:195-213.
- Canalon P. Influence of a detergent on the catfish olfactory mucosa. *Tissue Cell*. 1983;15(2):245-58.
- Carter LA, Roskams AJ. Neurotrophins and their receptors in the primary olfactory neuraxis. *Microsc Res Tech*. 2002;58:189-196.
- Chen X, Li Y, Wang I et al. calcium promotes secretion of growth factors from human bone marrow stromal cells and tube formation of human brain microvessel endothelial cells. *Stroke* 2001;33:401.
- Choi CB, Cho YK, Prakash KV, et al. Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;10;350(1):138-46.
- Costanzo RM. Regeneration of olfactory receptor cells. *Ciba Found Symp*. 1991;160:233-42

Chop M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 2002;1:92–100.

Costanzo RM. Neural regeneration and functional reconnection following olfactory nerve transection in hamster. *Brain Res.* 1985 Dec 30;361(1–2):258–66.

Doucette, 1991 R. Doucette, PNS–CNS transitional zone of the first cranial nerve, *J. Comp. Neurol.* 312 (1991), pp. 451–466.

Doucette et al., 1983 J.R. Doucette, J.A. Kiernan and B.A. Flumerfelt, The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system, *J. Anat.* 137 (Pt 1) (1983), pp. 1–19.

Feron F, Bianco J, Ferguson I, Mackay–Sim A. Neurotrophin expression in the adult olfactory epithelium. *Brain Res.* 2008 27;1196:13–21.

Graziadei PP, Graziadei GA. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol.* 1979b Feb;8(1):1–18.

Graziadei PP, Graziadei GA. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol.* 1979b Feb;8(1):197–213.

Harding et al., 1977 J. Harding, P.P. Graziadei, G.A. Monti Graziadei and F.L. Margolis, Denervation in the primary olfactory pathway of mice: IV.

Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section, *Brain Res.* 132 (1977), pp. 11–28.

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997 Mar–Apr;6(2):125–34.

Kawauchi et al., 2004 S. Kawauchi, C.L. Beites, C.E. Crocker, H.H. Wu, A. Bonnin, R. Murray and A.L. Calof, Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium, *Dev. Neurosci.* 26 (2004), pp. 166–180.

Kemi C, Grunewald J, Eklund A, Höglund CO: Differential regulation of neurotrophin expression in human bronchial smooth muscle cells. *Respir Res* 2006: 7:18.

Kiprianova I, Schindowski K, von Bohlen und Halbach O, Krause S, Dono R, Schwaninger M, Unsicker K. Enlarged infarct volume and loss of BDNF mRNA induction following brain ischemia in mice lacking FGF-2. *Exp Neurol.* 2004 Oct;189(2):252–60.

Lee KH, Suh–Kim H, Choi JS, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67(1):13–22.

Mackay–Sim and Chuah, 2000 A. Mackay–Sim and M.I. Chuah, Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway, *Prog. Neurobiol.* 62 (2000), pp. 527–559.

Manni L, Lundeberg T, Fiorito S, Bonini S, Vigneti E, Aloe L: Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumour necrosis factor- α , interleukin-1 beta and cholecystokinin-8: the possible role of NGF in the inflammatory response. *Clin Exp Rheumatol*.2003;21:617-624.

Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Sci*. 2008;15;265(1-2):78-83.

McBride K, Slotnick B, Margolis FL. Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chem Senses*. 2003 Oct;28(8):659-70.

Miwa T, Uramoto N, Ishimaru T, Furukawa M, Shiba K, Morjizumi T.

Retrograde transport of nerve growth factor from olfactory bulb to olfactory epithelium. *Neuroreport*. 1998 Jan 5;9(1):153-5.

Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol*. 1990;297:1-13.

Moviglia GA, Fernandez Viña R, Brizuela JA, et al. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy*. 2006;8(3):202-9

Pisati F, Bossolasco P, Meregalli M, et al. Induction of neurotrophin expression via human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases. *Cell Transplant*. 2007;16(1):41-55

Purmessur D, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R99.

Qu R, Li Y, Gao Q, Shen L, Zhang J, Liu Z, Chen X, Chopp M. Neurotrophic and growth factor gene expression profiling of mouse bone marrow stromal cells induced by ischemic brain extracts. *Neuropathology*. 2007;27(4):355–63.

Rapp U, Fokkens W, Bruder M et al. Modulation of neurotrophin receptor expression in nasal mucosa after nasal allergen provocation in allergic rhinitis. *Allergy*. 2008;63:468–475.

Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira AL. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis*. 2009;33(2):290–300.

Roskams et al., 1996 A.J. Roskams, M.A. Bethel, K.J. Hurt and G.V. Ronnett, Sequential expression of Trks A, B, and C in the regenerating olfactory neuroepithelium, *J. Neurosci*. 16 (1996), pp. 1294–1307.

Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 2005 Feb 2;25(5):1089–94

- Semkova I, Krieglstein J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999 Aug;30(2):176–88. Review.
- Uchida K, Nakajima H, Takamura T et al. Gene expression profiles of neurotrophic factors in rat cultured spinal cord cells under cyclic tensile stress. *Spine* .2008;33:2596–2604.
- Williams SK, Franklin RJ, Barnett SC. Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. *J Comp Neurol* .2004 :470:50–62.
- Woodbury D, EJ Schwarz, DJ Prockop and IB Black. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364–370.
- Yaghoobi MM, Mahani MT. NGF and BDNF expression drop off in neutrally differentiated bone marrow stromal cells. *Brain Res.* 2008;1203:26–31.

Abstract

Up-regulation of neurotrophic factors in the bone marrow derived mesenchymal stem cells by the regenerating olfactory mucosa lysates

Sang Ho Jung

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Dong -Joon Park)

Transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) shows relatively promising clinical outcome in treatment of neuronal injury including spinal cord injury and cerebral ischemia. However, there is a controversy in the mechanism whether MSC is differentiated to neural cells or just act as a neuroprotective material to help recovery of neuron. This study was performed to investigate the recovery mechanism of injured neuronal cells by the stem cell therapy using rat regenerating olfactory mucosa model

The Sprague-Dawley rat olfactory mucosa was injured by the Triton X-100 irrigation, and the regenerating process was analyzed by H&E, scanning

electron microscope and immunohistochemistry during 9 weeks. RT-PCR to evaluate mRNA expression of the nerve growth factor(NGF), brain derived growth factor(BDNF) was performed in the regenerating mucosa.

To mimic BMSC transplantation into the injured olfactory neuronal system, The BMSC were treated with injured(regenerating) olfactory mucosa lysates conditioned medium. The expression of NGF and BDNF was analyzed by RT-PCR, Western blotting and fluorescent immunocytochemistry. As results, Olfactory mucosa was recovered within 9 weeks after the injury and mRNA of NGF and BDNF was increased concomitantly. The mRNA were recovered by the normal range at 9 weeks. BMSC cultured with regenerating olfactory mucosa lysates conditioned medium showed increased mRNA and protein level of NGF and BDNF compared with the control group.

These results suggest that NGF and BDNF are some of the neurotrophic factors critical for regenerating process of olfactory nervous system. Furthermore, BMSC in the microenvironment that is mimic to injured olfactory neuronal system, may produce some essential neurotrophic factors like NGF and BDNF to promote neuronal recovery.

Key word : bone marrow derived mesenchymal stem cells, regenerating

olfactory mucosa neurotrophic factors,