

저산소 허혈 뇌 손상을 유발시킨 미성숙 흰쥐에서 마우스 골수 기원 중간엽 줄기 세포 이식 후 기능 회복

고려대학교 의과대학 소아과학교실, 연세대학교 의과대학 소아과학교실*

최옥선[†] □ 신혜경 □ 은소희 □ 강훈철* □ 박성원 □ 유기환 □ 홍영숙 □ 이주원 □ 은백린

= Abstract =

Functional recovery after transplantation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells for hypoxic-ischemic brain injury in immature rats

Wooksun Choi, M.D., Hye Kyung Shin, M.D., So-Hee Eun, M.D., Hoon Chul Kang, M.D.*
Sung Won Park, Kee Hwan Yoo, M.D., Young Sook Hong, M.D., Joo Won Lee, M.D. and Baik-Lin Eun, M.D.

Department of Pediatrics, Korea University College of Medicine, Seoul
Department of Pediatrics*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : We aimed to investigate the efficacy of and functional recovery after intracerebral transplantation of different doses of mouse mesenchymal stem cells (mMSCs) in immature rat brain with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE).

Methods : Postnatal 7-days-old Sprague-Dawley rats, which had undergone unilateral HI operation, were given stereotaxic intracerebral injections of either vehicle or mMSCs and then tested for locomotory activity in the 2nd, 4th, 6th, and 8th week of the stem cell injection. In the 8th week, Morris water maze test was performed to evaluate the learning and memory dysfunction for a week.

Results : In the open field test, no differences were observed in the total distance/the total duration ($F=0.412$, $P=0.745$) among the 4 study groups. In the invisible-platform Morris water maze test, significant differences were observed in escape latency ($F=380.319$, $P<0.01$) among the 4 groups. The escape latency in the control group significantly differed from that in the high-dose mMSC and/or sham group on training days 2-5 (Scheffe's test, $P<0.05$) and became prominent with time progression ($F=6.034$, $P<0.01$). In spatial probe trial and visible-platform Morris water maze test, no significant improvement was observed in the rats that had undergone transplantation.

Conclusion : Although the rats that received a high dose of mMSCs showed significant recovery in the learning-related behavioral test only, our data support that mMSCs may be used as a valuable source to improve outcome in HIE. Further study is necessary to identify the optimal dose that shows maximal efficacy for HIE treatment. (*Korean J Pediatr* 2009;52:824-831)

Key Words : Cerebral ischemia, Mesenchymal stem cell, Newborn

서 론

신생아학 및 중환자관리의 발달로 많은 저출생 체중아 및 미

Received : 6 March 2009, Revised : 3 April 2009

Accepted : 12 May 2009

Address for correspondence : Baik-Lin Eun, M.D.

Department of Pediatrics, Korea University Guro Hospital, #80, Guro-dong, Guro-gu, Seoul, 152-703, Korea

Tel : +82.2-2626-3153, Fax : +82.2-2626-1249

E-mail : bleun@chollian.net, bleun@korea.ac.kr

*본 논문은 2005년도 대한소아과학회 일동 학술상 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

*본 논문의 요지는 2007년 제57차 대한소아과학회 추계학술대회에서 구연 발표함.

[†]최근주소: 인천시 서구 당하동 40BL/7LT 우리 소아청소년과의원

숙아들의 생존율이 증가하고 있지만, 역설적으로 이에 비례하여 저산소 허혈 뇌병증(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)의 빈도는 줄어들지 않고 있다^{1,2)}. HIE는 저산소 허혈의 시기와 이후 재관류 시기(reperfusion phase)를 거쳐 일련의 손상 진행과정(ongoing injury process)으로 발생하게 되는데³⁾ 그 동안 많은 연구들은 이 과정을 차단함으로써 뇌신경을 보호하는 것에 중점을 두고 이루어지고 있다. 최근 들어 장기 손상 후 재생을 시키기 위한 방법으로 줄기 세포(stem cell) 사용에 대한 연구가 많아지고, 특히 비가역적 손상 이후 뚜렷한 재생 방법과 장기 이식 방법이 없는 중추성 뇌신경계 손상에서 줄기 세포는 새로운 치료 방법으로 각광받고 있다.

줄기 세포는 크게 배아(embryonic) 줄기 세포와 성체(adult) 줄기 세포로 구분되며, 성체 줄기 세포는 다시 태아(fetus) 기원 줄기

세포와 제대혈 줄기 세포, 골수 줄기 세포 등으로 구분할 수 있다. 골수 기원 중간엽 세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, mMSC)와 같은 체줄기 세포(somatic stem cells)는 다능성(multipotent)을 가지고 있어 일정한 생리적 또는 실험적 상황에서 다양한 세포로 분화될 수 있다⁹. 또한 배아 줄기 세포에서 대두되는 윤리적 문제와 기형종 발생의 우려가 없고, 태아를 이용한 성체 줄기 세포에 비해 공급의 제한이 없다는 장점이 있으며, 제대혈 줄기 세포와는 달리 허혈 뇌 손상 이후 자가 세포의 확보가 용이하다^{5, 6}. 특히 mMSC에서 유도한 신경세포를 퇴행 신경 질환이나 뇌졸중, 뇌경색과 같은 뇌혈관 질환 동물 모델을 통해 다양한 경로로 투여 시 손상된 뇌 영역으로 이주하여 중추신경세포로의 분화(differentiation) 및 항신경 요소(neurotrophic factor)의 분비를 통한 신경세포 회복에 획기적인 역할을 한다는 증거가 보고되고 있다⁷⁻¹⁰. 이렇게 mMSC 이식이 동물 모델에서 일부 성공적인 결과를 거두고 있다는 점을 고려할 때, 사후 치료방법이 없는 HIE에서의 mMSC 투여 요법은 치료적 이득이 있을 것으로 기대된다.

이에 본 연구에서는 주산기 및 신생아기에 일어날 수 있는 뇌병증의 대표적인 원인인 HIE의 회복과 장기적인 신경학적 후유증을 예방하거나 최소화시킬 수 있는 치료 방법의 개발을 위하여, 실제 인간에 대한 임상 실험의 전 단계로 동물 모델을 이용하여 mMSC를 분리(isolate), 증식(expansion) 후 이식함으로써, mMSC의 뇌 손상 회복에 대한 효과 및 안전성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

체중 9-11 g인 생후 7일 된 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐(Orient bio inc., Korea) (n=39)를 사용하였다. 임의로 선택된 흰쥐는 sham 대조군(n=10), 뇌 손상 대조군(n=14), 고용량 mMSC 이식군(n=10), 저용량 mMSC 이식군(n=5)으로 나누었으며, 실험은 3회에 걸쳐 시행하였고 모든 동물에 대한 조작은 통증을 최소화하는 방법으로 시행되었다.

2. 저산소 허혈 뇌 손상 동물 모델

뇌 손상 대조군 및 mMSC 이식군 흰쥐를 2% isoflurane에 마취시키고, 전경부 피부를 수직으로 1 cm 정도 절개한 후 경부 근육을 박리하였다. 우측 총경동맥(right common carotid artery)을 노출시켜 전기 응고기(GEMINI Cautery system, Stoelting Co., IL, USA)를 이용하여 응고 절단한 후 4-0 silk suture로 피부를 봉합하였다. 이후 체온 유지를 위해 36°C 보육기에서 1시간 동안 회복시킨 후, 보육기내 유리 용기에서 2시간 동안 300 mL/분의 일정한 속도로 공급되는 8% 산소와 92% 질소 혼합 가스에 노출시켰다. 그 후 보육기에서 30분 동안 회복시키고 사육장으로

옮겨 줄기 세포 이식을 시행하기까지 2주 동안 사육하였다.

3. 세포 배양 및 이식준비

5주령 수컷 CrjBgi (ICR) 마우스(Orient bio inc., Korea)를 경추 탈골을 통해 희생시킨 후 양쪽 대퇴골과 경골을 적출하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO[®]-Invitrogen Corporation, CA, USA)에 조직을 모았다. 26 G 주사침을 이용하여 골조직 내에 DMEM을 관류시켜 골수를 추출한 후 세포를 모으고, cell strainer (BD Falcon, CA, USA)로 옹고된 혈액덩어리와 조직의 잔여물을 제거하였다. 이후 1,500 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액은 버려 세포를 분리한 뒤 DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 100 mM sodium pyruvate (GIBCO[®]-Invitrogen Corporation, CA, USA, 이하 세포 배양액)에 넣어 37°C, 5% CO₂의 조건에 평판 배양하였다. 48시간 동안 배양 후 정착되지 않은 세포는 버리고 새로운 세포 배양액으로 교체해 주며, 2-3일 간격으로 교체하였다. 세포 정착 7일 후 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO[®]-Invitrogen Corporation, CA, USA, 이하 trypsin-EDTA) 2 mL/dish로 처리하고 15분간 배양하여 순수한 mMSC를 분리한 후 같은 조건하에 평판 배양하였다. 배양 접시 내 세포가 가득 자라면 일부는 mMSC의 순수성을 확인하기 위해 계대 배양하고, 이식할 세포를 준비하였다. 이식에 사용된 세포는 계대 1세대를 사용하였다. Trypsin-EDTA를 처리하여 배양접시로부터 세포를 떼어낸 후 1,500 rpm에 5분간 원심 분리하고 얻어진 세포는 phosphate buffered saline (PBS, GIBCO[®]-Invitrogen Corporation, CA, USA)으로 세척 후 다시 1,500 rpm에 5분간 원심 분리하였다. 수확된 세포는 세포 배양액에 각각 고용량(1×10⁵ cells/PL)과 저용량(1×10⁴ cells/PL)으로 풀어 이식에 사용하였다.

4. mMSC 이식

mMSC 이식은 저산소 허혈 뇌 손상 유도 후 2주 뒤에 시행하였다. 모든 흰쥐는 충분한 영양 공급을 시행하였으며 세포 이식 24시간 전부터 3주간 1일 1회 cyclosporine A (10 mg/kg)와 세포 이식 24시간 전부터 이식 후 3일간 1일 1회 ampicillin sodium (100 mg/kg)을 근육 주사하여 거부 반응과 감염의 위험을 낮추었다. 모든 흰쥐는 ketamine (50 mg/kg)을 근육 내 주사하여 재 마취시킨 후 Korf microstereotaxis 장치(Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)에 두개 고정용 하고 두피 정중선을 따라 피부를 절개하여 두개골을 노출시켰다. 정수리점(bregma)에서 중앙선(midline)에서 우측방으로 2 mm 이동한 뒤, 후방으로 2 mm와 4 mm 지점에 치과용 드릴을 이용하여 2개의 Burr hole을 만들었다. 이 작업 시 생리식염수를 지속적으로 점적하여 hole이 만들어지는 주위의 대뇌 백질의 온도가 올라가는 것을 방지하였다. 바늘의 굵기가 25 G인 10 µL Hamilton 주사기를 이용하여 각각 고용량(1×10⁵ cells/PL)과 저용량(1×10⁴ cells/PL)의 세포 부유액을

각 위치 당 4 mm 깊이에 2 µL 씩 주입하였다. 이 위치는 해마방회(parahippocampus)와 줄무늬체(striatum)로 학습과 기억에 관여한다. 이 때 세포의 정착 및 응집 예방을 위해 30초 간 1 µL의 속도로 세포 주입 속도를 조절하고 주입 후 30초 동안 정지하고 있었으며, 이후 4-0 silk suture로 두피를 봉합하였다.

5. 행동 평가

mMSC 이식 2주 후 4개 실험군 흰쥐 모두에서 2가지 행동 평가를 시행하였다.

1) 개방장 시험(open field test)

개방장 시험은 60×60×25 cm 크기의 검은 유리상자(Plexiglas[®], Evonik Röhm GmbH, Darmstadt, Germany)로 된 개방장 장치에 mMSC 이식 후 2, 4, 6, 8주에 흰쥐를 10분간 노출시킨 후 시행하였다. 10분간 이동한 궤적을 측정하여 그 비율을 산출하였다(total distance/600 seconds). 본 연구에 사용된 개방장 장치는 중앙부 천장에 설치된 카메라와 자동 추적 장치(SmarTrack, Smartech, Madison, WI, USA)로서, 이를 이용하여 흰쥐의 행동을 기록하고 분석하였다.

2) Morris 수중 미로 시험(Morris water maze test) (Fig. 1)

본 시험은 mMSC 이식 후 8주부터 마지막 개방장 시험을 마치고 1주일간 시행하였다. 본 실험에 사용된 장치는 스테인레스 철로 제작된 원통형 수조(지름 1.55 m/깊이 60 cm)로 40 cm 깊이로 물(21-23°C)을 채우고 탈지분유를 넣어 혼탁하게 만들었다. 수면에서 1.5 cm 하방에 지름 10 cm의 투명한 원형의 도피대를 복동(N-E) 사분면의 중간에 설치하고, 수조 주변의 기물들(포스터, 문, 컴퓨터 등)의 위치가 바뀌지 않게 하였다.

(1) 공간 획득 검사(spatial acquisition test, invisible test)

검사 1일전 수중 환경에 익숙하게 하기 위해서 도피대 없이

수중에 120초간 노출시켰다. 검사 당일엔 임의로 5등분하여 지정된 출발점의 수조 벽에서 차례대로 흰쥐를 출발시켜 거치대까지 도달하는 시간을 측정하였다. 60초 동안 거치대를 찾지 못하면 실험자의 도움으로 거치대로 수영하여 이동하며 30초 간 쉬게 하였다. 휴식 후 즉시 다음 출발점에서 위 실험을 반복하며, 1일 당 5회씩 5일간 실시하였다.

(2) 참조 기억 검사(reference memory test, probe trial)

마지막 공간 획득 검사를 마치고 24시간 뒤 1회 시행하였다. 도피대를 제거한 후 도피대 반대 방향의 수조 벽에서 흰쥐를 출발시켜 60초 동안 도피대가 있던 공간을 지나는 시간을 측정하였다. 각 흰쥐의 이동 경로, 위치 및 시간은 수조 위 중앙부 천장의 카메라에 촬영 후 연결된 컴퓨터에 있는 자동 추적 장치로 분석하였다.

(3) 시각 단서 검사(visible test)

참조 기억 검사 시행 다음날 시행하였다. 도피대를 수면 아래 다시 설치한 후 중앙에 8×8 cm의 주황색 깃발을 설치하였다. 방법은 공간 획득 검사의 것과 같으며 1일간 실시하였다.

위 검사를 시행한 후 ketamine (50 mg/kg)을 근육 내 주사하여 재 마취 시킨 후 작두로 경부를 절단하여 흰쥐를 희생시켰으며, 두개골을 제거하고 뇌를 적출하여 냉동 보관하였다.

6. 통계 처리

통계 처리는 SPSS 12.0 version을 이용하여 이원 반복측정 분산분석(two-way ANOVA with repeated measures) 및 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA) 방법으로 자료를 분석하였다. 모든 값은 평균과 표준 편차로 표시하였으며, P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

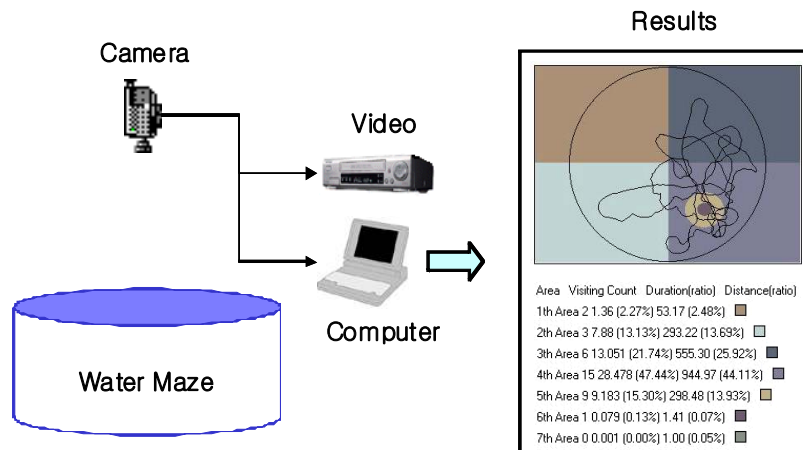


Fig. 1. Morris water maze system and computerized analysis. This system is able to extract automatically from such video information (metadata) describing the spatio-temporal trajectories of animals in the maze and the timing of behavioral events such as stopping or crossing of a target area and to analyse the results.

결 과

1. 개방장 시험(open field test)

네 군간에서의 단위 시간 대비 총 이동거리[total distance/total duration (600 seconds)]는 통계적으로 서로 유의한 차이가

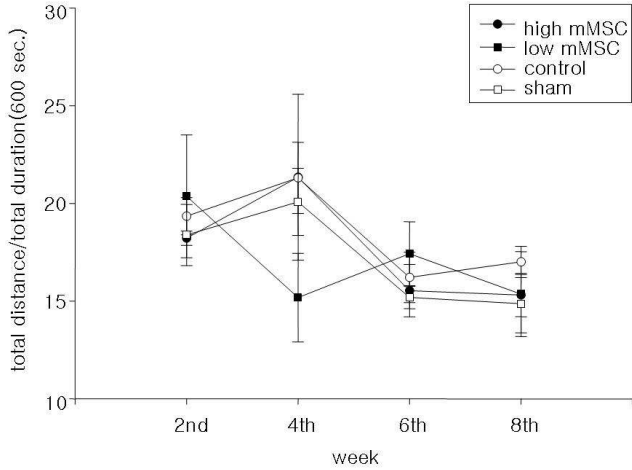


Fig. 2. Acquisition curves of the open field test. Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) showed no significant differences in the total distance/the total duration ($F=0.412, P=0.745$) among the 4 groups. Although the session effect was significant ($F=7.789, P<0.05$), the interaction effect was not ($F=0.682, P=0.724$).

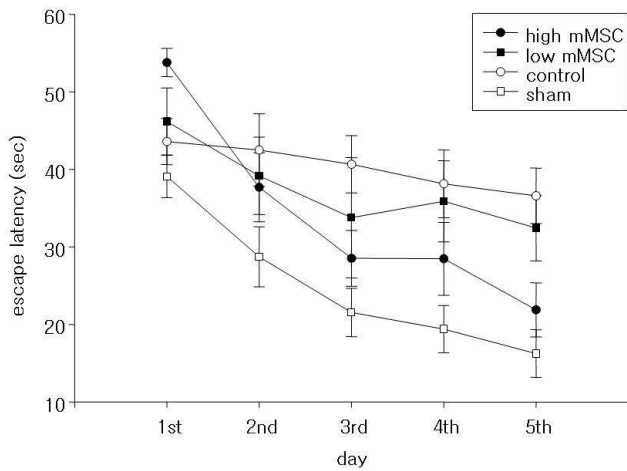


Fig. 3A. Acquisition curves of the invisible-platform Morris water maze test. The result revealed significant group ($F=380.319, P<0.01$), trial ($F=46.574, P<0.01$), and interaction ($F=16.034, P<0.01$) effects. Intergroup analysis revealed significant differences between the high-dose mMSC and control groups ($F=12.517, P<0.01$). However, no significant differences were observed between the low-dose mMSC and control groups. The escape latency in the control group significantly differed from that in the high-dose mMSC and/or sham groups on training days 2-5 (Scheffe's test, $P<0.05$).

없으나($F=0.412, P=0.745$), 검사를 시행할수록 그 수치는 감소하는 경향은 보였다($F=7.789, P<0.05$). 그러나 네 군에 대한 위 수치는 시행한 주에 따라 서로 동일한 패턴을 보였다(상호작용효과, $군*week, F=0.682, P=0.724$). 단지 4주째에 저용량 mMSC 이식군 결과가 나머지 세 군과 차이가 있었고($P<0.05$) 각 주별 네 군의 차이는 없었다(Fig. 2).

2. 공간 획득 검사(spatial acquisition test, invisible platform test)

네 군간에서의 평균 탈출 시간(escape latency)은 통계적으로 서로 유의한 차이가 있었으며($F=380.319, P<0.01$), 검사를 시행할수록 평균 탈출 시간은 감소 추세를 보였다($F=46.574, P<0.01$). 또한 네 군에 대한 평균 탈출 시간은 시행일에 따라 서로 달라져 동일한 패턴을 보이지 않았다(상호작용효과, $군*day, F=16.034, P<0.01$). 특히 고용량 mMSC 이식군은 뇌 손상 대조군에 비해 더 유의하게 평균 탈출 시간이 감소하였으나($F=12.517, P<0.01$), 저용량 mMSC 이식군과 뇌 손상 대조군과의 비교에서는 통계적으로 차이가 없었다($F=0.553, P=0.665$). 제 2, 3, 4, 5검사일에 고용량 mMSC 이식군 및 sham 대조군은 뇌 손상 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Scheffes test, $P<0.05$). 고용량 mMSC 이식군과 sham 대조군의 평균 탈출 시간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($F=5.434, P=0.672$) (Fig. 3A).

3. 참조 기억 검사(reference memory test, probe trial)

뇌 손상 대조군이 다른 세 군에 비해 평균 점유 시간은 다소 적었으나 네 군간 평균 점유 시간은 서로 통계적으로 유의한 차이는 없었다($F=0.604, P=0.617$) (Fig. 3B).

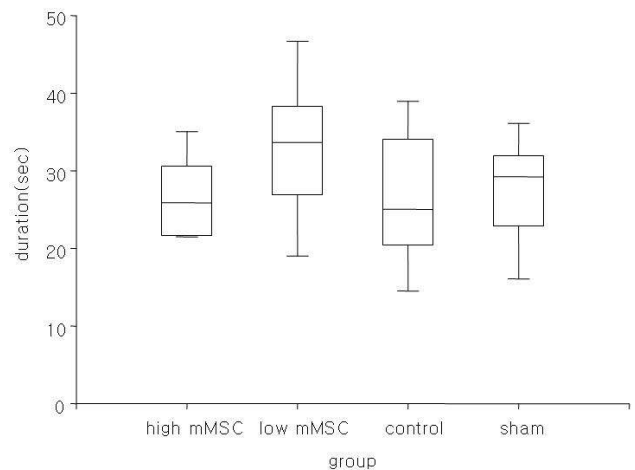


Fig. 3B. Histograms of the spatial probe trial. No significant improvement of cognitive function was observed in the high-dose and/or low-dose mMSC groups, compared to the control group ($F=0.604, P=0.617$).

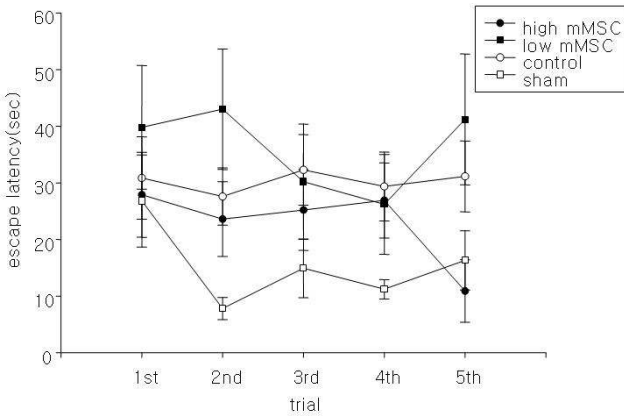


Fig. 3C. Acquisition curves of the visible-platform Morris water maze test. Although the group effect was significant ($F=3.354$, $P=0.03$), the session and interaction effects were not (session, $F=0.548$ and $P=0.702$; interaction, $F=1.176$ and $P=0.314$).

4. 시각 단서 검사(visible platform test)

네 구간에서의 평균 탈출 시간(escape latency)은 통계적으로 서로 유의한 차이가 있었다($F=3.354$, $P=0.03$). 하지만 검사 시행에 따른 평균 탈출 시간의 증감 추세는 보이지 않았고($F=0.548$, $P=0.702$), 네 군에 대한 평균 탈출 시간은 시행일에 따라 서로 달라지지 않았다(상호작용효과, 군*trial, $F=1.176$, $P=0.314$). 다섯번째 시행 검사에서만 고용량 mMSC 이식군과 뇌 손상 대조군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P<0.05$) (Fig. 3C).

고찰

본 연구에서 저산소 허혈을 유발시킨 미성숙 흰쥐의 뇌 손상 영역에 mMSC를 이식한 후 부분적으로 학습 관련 뇌기능의 회복을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 mMSC가 HIE에서의 치료적 대안으로 가능성이 있음을 나타내 주는 것이라고 할 수 있다.

HIE는 신생아기에 일어날 수 있는 뇌병증의 여러 원인들 중 하나로 단기적으로는 경련 및 의식의 변화 등이 올 수 있으며 뇌성마비, 발달 지연, 학습 지연 및 간질 등의 만성 신경학적 후유증을 남기거나 사망을 초래할 수 있다^{11, 12}. HIE는 출생아 1,000명당 0.5-0.75명의 빈도로 발생하며 이 중 25-28%에서 신경학적 이상이 나타난다고 알려져 있으나¹³, 이에 대해 현재까지는 임상적으로 확립된 치료 방법이 없는 실정이다. 저산소 허혈 현상으로 신경원 세포(neurons) 및 교세포(glial cells)의 일련의 상호작용 및 구조의 변화가 발생하며¹⁴ 이것의 회복을 위해서는 이론적으로 여러 형태의 신경 세포들의 재배치 및 정착 그리고 생리화학적 기능 회복이 필요하다. 따라서 다양한 접근 방법으로 HIE가 발생한 뇌에 신경 전구 세포(neuronal precursor cells)를 이식하는 것은 해부학적으로나 기능적으로 의미가 있다고 할 수 있다. 이러한 개념을 바탕으로 비가역적 손상 이후 뚜렷한 재생 방법과 장기 이식 방법이 없는 중추성 뇌신경계 손상에서 배아

줄기 세포나 성체 줄기 세포와 같은 여러 종류의 줄기 세포를 이용한 다양한 치료적 시도가 이루어지고 있다. 실제로 척수 손상이나 퇴행성 뇌질환 및 뇌졸중과 같은 질환에서 이를 이용한 긍정적인 결과가 보고되고 있다¹⁵⁻¹⁷.

이 중 mMSC는 최근 임상적인 치료 수단으로서의 그 효능이 연구되고 있다. 이것은 생체내(*in vivo*) 또는 생체외(*in vitro*) 실험에서 신경원 세포 neuronal cells를 비롯하여 골모세포(osteoblasts), 연골세포(chondrocytes), 지방세포(adipocytes) 및 간세포(hepatocytes)과 같은 중배엽 세포(mesodermal cells)로 분화할 수 있는 다능성을 가지고 있다¹⁸. 특히 이식된 주변 세포와 같은 계열 세포로 분화할 수 있는 능력(transdifferentiation)이 있다^{19, 20}. 위의 두 조건에서 mMSC의 약 5-8% 정도가 분화시킨 신경원 세포 neurons 및 교세포 glial cells 표지자(marker)를 표현한다고 보고되고 있다²¹. 또한 mMSC는 골수내 유핵세포 중 0.001-0.01% 정도만이 존재하고 있어 충분한 양과 동질(homologous)의 고농도 세포군을 얻기 위해서는 배양 증식(cultural expansion)이 필요하며 초기 계대가 후기 계대에 비해 증식 능력(proliferative potential)이 더 좋다고 알려져 있다^{21, 22}. 그러므로 본 연구와 같이 계대 1세대를 사용한 것은 매우 이상적이라고 할 수 있겠다. 그리고 기형종 발생의 우려가 없고, 배아 줄기 세포 취급 시 발생할 수 있는 윤리적인 문제를 피할 수 있으며 태아를 이용한 성체 줄기 세포에 비해 공급의 제한이 없으며, 계대별 줄기 세포와는 달리 허혈 뇌 손상 이후 자가 세포의 확보가 용이하다는 장점이 있다^{5, 6}.

줄기 세포 이식 후 기능 회복이 이루어지는 이유에 대하여 이식한 줄기 세포가 손상 조직에서 새로운 신경 조직으로 분화하거나 기존 조직에 기능적 통합(functional integration) 때문인지, 아니면 다른 기전이 작용해서인지에 대해서 많은 연구가 이루어졌다. 여러 연구에서 뇌 손상을 유발한 흰쥐에 mMSC를 투여한 후 운동 및 인지 기능 향상을 보고하였는데 이는 투여된 줄기 세포가 허혈 뇌 손상을 받은 조직으로부터 신경 세포로의 분화 신호를 받아 중추 신경 세포로의 분화를 거쳐 여기에서 분비된 여러 사이토카인 및 항신경 효소의 효과로 설명하고 있다. 특히 뇌 허혈 후에 BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) 및 NT-3 (neurotrophin-3)과 같은 항신경 요소의 발현이 더욱 증대된다^{23, 24}. 이러한 항신경 요소는 이식된 세포의 생존, 분화, 신생 혈관 생성 및 기존 조직의 세포자멸사 억제에 유도하는 역할을 하는 것으로 생각된다^{25, 26}. 또한 이러한 항신경 요소에 의해서 손상된 뇌반구의 줄무늬체로 이식된 줄기 세포가 정상 뇌반구에 이식한 것보다 유의하게 더 멀리 허혈 손상을 받은 주변 피질쪽으로 이동한다고 알려져 있다²⁷. 반음영 구역(penumbra zone)의 신경세포도 MSC를 이식한 군이 대조군에 비해서 조직병리 검사시 더 적게 손상을 받은 것으로 나타

난다²⁷⁻²⁹). 본 연구에서 뇌 손상 대조군이 다른 줄기 세포 이식군이나 sham 대조군과 비슷한 개방장 시험 결과를 보이는 것은 생후 7일의 미성숙 흰쥐의 뇌는 인간의 재태령 34주의 뇌와 비슷한 조직학적 소견을 보이는데 이 시기는 신경 가소성(neuronal plasticity)이 매우 높은 때이므로 허혈 뇌 손상을 받았다고 할지라도 시간이 지나면서 환측에서 정상 대뇌 반구 측으로 운동 조화 조절 능력이 이전하여 가능하다고 볼 수 있다^{30, 31}). 하지만 저산소 허혈 조작 이후 mMSC를 투여하였을 시 초기 1-2주에는 투여군에서 운동능의 호전을 보이는 연구 보고도 있어 좀 더 명확한 기전 설명이 필요하다고 생각된다^{32, 33}). Morris 수중 미로 시험은 공간 학습 능력 및 참조 기억을 평가하는 방법으로 많이 이용되고 있으며 이는 해마의 기능을 잘 반영해 주고 있다. 본 연구에서 공간 획득 검사(spatial acquisition test, invisible test)에서 고용량 mMSC 이식군에서 특별히 통계적으로 유의한 결과를 보이는 이유는 이식된 mMSC가 해마 세포로 분화되어서라기보다는 위에서 언급한 여러 향신경 요소의 발현 및 이에 따른 CA1, CA3 지역의 신경세포 손상 감소의 결과로 판단된다³⁴). 하지만 예상과는 달리 공간 참조 기억 검사 및 시각 단서 검사 항목에서 mMSC 투여군의 결과가 뇌 손상 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았는데 이는 실험 시 최소화하려고 노력하였으나 고용량 mMSC이 주입된 뇌조직 내에서 서로 엉겨서(aggregation) 세포자멸사 또는 세포괴사 과정을 거쳐 주변 뇌 조직에 적절한 영향을 미치지 못하였거나³⁵ 열 배 차이의 각각 실험군의 세포 용량이 유의한 실험 결과를 도출하지 못할 정도의 특이성(specificity)을 보이지 못해서의 가능성을 둘 수 있겠다. Stroke 모델에서 일부 연구에 의하면 3-10배 차이의 MSC를 정맥 또는 뇌내 투여 시 고용량 투여군에서 기능의 호전이 더욱 유의하게 나타났다는 보고가 있다³⁵⁻³⁷). 이러한 관점에서 본다면 본 HIE 모델 실험에서 공간 획득 검사 시 고용량 mMSC의 세포수를 더 증량시켜 나갔다면 sham 대조군의 결과에 가깝게 도출되었을 가능성도 추측해 볼 수 있다. 또한 줄기 세포를 이식한 시기에 따라 효과가 다르게 나올 가능성이 있다. Ogawa 등³⁸은 뇌 손상 급성기에는 IL-1, IL-6 및 TNF- α 같은 염증성 사이토카인이 증가되어 약 20시간 정도 후에야 기저치로 떨어지기 때문에 이 시기에 줄기 세포를 이식 시 생존 가능성이 떨어질 가능성이 있다고 언급하고 있다. Ma 등³⁹은 저산소 허혈 뇌 손상을 일으킨 흰쥐에 배아 줄기 세포를 2-3일 후 이식한 결과 기능 회복을 보였다고 하며, Yasuhara 등⁴⁰은 골수 기원 줄기 세포를 저산소 허혈 뇌 손상 후 7일 째에 이식하고 역시 동일한 결과를 얻었다고 보고하였다. 본 연구는 뇌 손상 유도 14일째에 줄기 세포를 이식하여 명확한 결과가 나오지 않았을 가능성도 있으나 최근 연구⁴¹에 의하면 일과성 중간대뇌동맥 결찰(middle cerebral artery occlusion) 유도 1개월 후에 중간엽 줄기 세포를 이식한 후에도 기능 회복을 보였다는 결과도 있어 아직 최적의 이식 시기에 대한 결론은 없는 상태이다. 따라서 줄기 세포 투여 시점에 따른 기능 회복 정도를 평가하는 연구가 필요하다고 하겠다.

본 연구는 줄기 세포의 이식 후 기능 회복을 평가하는 것이므로 이식된 줄기 세포의 면역 조직학적인 평가 및 이에 따른 기능 회복 정도의 연관성이 이루어지지 않은 것에 한계점이 있다고 할 수 있다. 향후 최적의 효과를 보이는 줄기 세포의 농도 및 이식 시기에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목 적: HIE의 치료법으로 줄기 세포가 대안으로 떠오르고 있다. mMSC가 성인 동물 모델에서의 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환에 유의한 기능 회복을 보인다는 보고가 많이 있으나 미성숙 동물 모델에서의 연구 보고는 거의 없는 상태이다. 이에 HIE가 유발된 미성숙뇌에 mMSC를 투여하여 기능 회복에 대한 효과를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법: 생후 7일된 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 sham 대조군, 뇌 손상 대조군, 고용량 mMSC 이식군 및 저용량 mMSC 이식군으로 나누었으며 저산소 허혈 뇌 손상 유도 2주 후에 mMSC를 병변부 국소 이식을 시행하였다. 세포 이식 2, 4, 6 및 8주째에 개방장 시험을 시행하여 운동 기능 회복 정도를 평가하였고, 이후 1주일 동안 Morris 수중 미로 시험을 3개 부문으로 시행하여 학습 및 기억력 회복 정도를 평가하였다.

결 과: 개방장 시험 결과 네 군간에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다($F=0.412$, $P=0.745$). 공간 획득 검사에서 네 군간 평균 탈출 시간에 서로 차이가 있었고($F=380.319$, $P<0.01$), 고용량 mMSC 이식군 및 sham 대조군은 뇌 손상 대조군에 비해 검사 2일째부터 5일째까지 각각 평균 탈출 시간이 감소하였으며($P<0.05$), 시간이 갈수록 더 유의하게 차이를 보였다($F=16.034$, $P<0.01$). 참조 기억 검사에서는 네 군간 차이는 없었으며 시각 검사에서는 다섯번째 시행 검사에서만 고용량 mMSC 이식군과 뇌 손상 대조군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P<0.05$).

결 론: 일부 검사에서만 고용량 mMSC 이식의 효과가 뚜렷하였고 그 외의 검사에는 통계적으로 유의한 결과는 보이지는 않았으나 산술적인 호전을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 향후 최적의 효과를 보이는 줄기 세포의 농도와 이식 시기를 결정하는 연구가 필요할 것으로 보이며 HIE에서 mMSC가 대안적인 치료 수단으로 이용될 수 있다고 생각된다.

References

- 1) Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
- 2) Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 2006;28:1353-65.
- 3) Calvert JW, Zhang JH. Pathophysiology of an hypoxic-ischemic insult during the perinatal period. *Neurol Res* 2005;27:246-60.
- 4) Pontikoglou C, Delorme B, Charbord P. Human bone marrow

- native mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2008;3:731–41.
- 5) Sell S. Stem cells: What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going? In: Sell S, editor. *Stem cells handbook*. 1st ed. Totowa: Humana Press Co, 2004:1–18
 - 6) Lindvall O, Kokaia Z, Martinez–Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work. *Nat Med* 2004;10 Suppl 1:S42–50.
 - 7) Pavlichenko N, Sokolova I, Vijde S, Shvedova E, Alexandrov G, Krouglyakov P, et al. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res* 2008;1233:203–13.
 - 8) Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:329–40.
 - 9) Morita E, Watanabe Y, Ishimoto M, Nakano T, Kitayama M, Yasui K, et al. A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Exp Neurol* 2008;213:431–8.
 - 10) Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB, et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 2005;195:16–26.
 - 11) Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:107–34.
 - 12) Scafidi J, Gallo V. New concepts in perinatal hypoxia ischemia encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008;8:130–8.
 - 13) Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* 2005;365:891–900.
 - 14) Kim HT, Kim IS, Lim SE, Lee IS, Park KI. Gene and cell replacement via neural stem cells. *Yonsei Med J* 2004;1:406–14.
 - 15) Conti L, Reitano E, Cattaneo E. Neural stem cell systems: diversities and properties after transplantation in animal models of diseases. *Brain Pathol* 2006;16:143–54.
 - 16) Meng XT, Li C, Dong ZY, Liu JM, Li W, Liu Y, et al. Co-transplantation of bFGF-expressing amniotic epithelial cells and neural stem cells promotes functional recovery in spinal cord-injured rats. *Cell Biol Int* 2008;32:1546–58.
 - 17) Bantubungi K, Blum D, Cuvelier L, Wislet-Gendebien S, Rogister B, Brouillet E, et al. Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 2008;37:454–70.
 - 18) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
 - 19) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775–9.
 - 20) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364–70.
 - 21) Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih CC. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev* 2008;17:1109–21.
 - 22) Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615–25.
 - 23) Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076–84.
 - 24) Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 2002;22:275–9.
 - 25) Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 2000;39:711–6.
 - 26) Sanchez–Ramos J, Song S, Cardozo–Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247–56.
 - 27) Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, Anderson KJ, Steindler DA, Weiss MD. Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. *Brain Res* 2006;1112:99–105.
 - 28) Zacharek A, Chen J, Cui X, Li A, Li Y, Roberts C, et al. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1684–91.
 - 29) Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. 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.
 - 30) Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 2000;859:318–25.
 - 31) Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic–ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res* 2001;118:17–25.
 - 32) Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Mays RW, Kovach J, et al. Behavioral and histological characterization of intra-hippocampal grafts of human bone marrow-derived multipotent progenitor cells in neonatal rats with hypoxic–ischemic injury. *Cell Transplant* 2006;15:231–8.
 - 33) Yasuhara T, Hara K, Maki M, Mays RW, Deans RJ, Hess DC, et al. Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic–ischemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:1804–10.
 - 34) Zhong C, Qin Z, Zhong CJ, Wang Y, Shen XY. Neuroprotective effects of bone marrow stromal cells on rat organotypic hippocampal slice culture model of cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2003;342:93–6.
 - 35) Isakova IA, Baker K, DuTreil M, Dufour J, Gaupp D, Phinney DG. Age- and dose-related effects on MSC engraftment levels and anatomical distribution in the central nervous systems of nonhuman primates: identification of novel MSC subpopulations that respond to guidance cues in brain. *Stem Cells* 2007;25:3261–70.
 - 36) Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001;32:1005–11.
 - 37) Borlongan CV, Lind JG, Dillon–Carter O, Yu G, Hadman M,

- Cheng C, et al. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res* 2004; 1010:108-16.
- 38) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 2002;69:925-33.
- 39) Ma J, Wang Y, Yang J, Yang M, Chang KA, Zhang L, et al. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int* 2007;51:57-65.
- 40) Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Mays RW, Kovach J, et al. Transplantation of cryopreserved human bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells for neonatal hypoxic-ischemic injury: targeting the hippocampus. *Rev Neurosci* 2006;17:215-25.
- 41) 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.