

체외 배양한 골수줄기세포를 이용한 말초신경재생에 관한 연구

최병호¹ · 주석강¹ · 정재형² · 허진영³ · 이승호⁴

¹연세대학교 원주의과대학 치과학교실, ²연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

³울산대학교 의과대학 강릉아산병원 치과, ⁴이화여자대학교 의과대학 치주과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:492-495)

A STUDY OF THE EFFECT OF CULTURED BONE MARROW STROMAL CELLS ON PERIPHERAL NERVE REGENERATION

Byung-Ho Choi¹, Shi-Jiang Zhu¹, Jae-Hyung Jung²,
Jin-Young Huh³, Seoung-Ho Lee⁴

¹Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, South Korea

³Department of Dentistry, Gangneung Asan Hospital, University of Ulsan, Gangneung, South Korea

⁴Department of Periodontology, Ewha Womans University, Seoul, South Korea

The role of cultured bone marrow stromal cells (BMSCs) in peripheral nerve regeneration was examined using an established rabbit peroneal nerve regeneration model. A 15-mm peroneal nerve defect was bridged with a vein filled with BMSCs (1×10^6), which had been embedded in collagen gel. On the contralateral side, the defect was bridged with a vein filled with collagen gel alone. When the regenerated tissue was examined 4, 8 and 12 weeks after grafting, the number and diameter of the myelinated fibers in the side with the BMSCs were significantly higher than in the control side without the BMSCs. This demonstrates the potential of using cultured BMSCs in peripheral nerve regeneration.

Key words: Bone marrow stem cell, Peripheral nerve regeneration, Collagen gel

I. 서 론

골수줄기세포는 미분화세포로서 골, 연골, 지방, 건, 근육 및 골수와 같이 여러 형태의 조직을 형성할 수 있는 능력을 가지고 있다¹⁾. 또한 신경세포로 분화도 이루어 질 수 있는 능력이 있으며 손상된 중추신경계통에 주입해 넣었을 때 신경조직재생도 가져온다^{2,4)}. 골수줄기세포를 이식하는 방법은 뇌경색⁵⁾, 파킨슨병⁶⁾, 뇌외상, 척수손상 등^{7,8)} 실험모델에서 이미 사용되

어 왔다. MURAKAMI 등⁹⁾은 신경줄기세포를 말초신경결손에 이식하였을 경우 신경축삭이 재생되었다고 보고하였고 또한 신경줄기세포가 슈반세포를 지지하는 세포로 분화 가능하다고 보고하였다. 골수줄기세포는 신경줄기세포와 비교하면 세포의 채취가 간단하고 줄기세포를 얻기 위해 뇌에 손상주는 것을 피할 수 있다는 장점이 있다. 그리고 자가줄기세포의 이식은 배아 줄기세포를 사용과 관련된 윤리적인 문제점과 면역학적인 문제들을 피할 수 있다. 최근의 연구결과에 의하면 골수 줄기세포를 결손된 말초신경부위에 이식하였을 경우 신경섬유의 재생을 촉진하였다. 이런 연구결과들은 골수줄기세포가 말초신경재생을 촉진할 수 있는 잠재적인 가능성을 제시하였다¹⁰⁻¹²⁾. 본 실험에서는 골수줄기세포를 콜라겐젤과 혼합하여 정맥내에 넣고 이것을 토끼의 말초신경결손부위(15 cm 길이)에 사용하여 신경재생효과를 평가하였다.

최 병 호

220-701 강원도 원주시 일산동 162번지
연세대학교 원주의과대학 치과학교실

Byung-Ho Choi

Department of OMFS, Wonju Christian Hospital, Yonsei University

162 Ilsan-Dong, Wonju, Kwangwon-Do, 220-701, Korea

Tel: 82-33-741-1430 Fax: 82-33-748-2025

E-mail: choibh@wonju.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제번호: 02-PJ1-PG1-CH07-0001)

II. 재료 및 방법

1. 골수의 채취와 골수줄기세포의 배양

본 실험에서는 체중이 약 3 kg 되는 토끼 15마리를 사용하였다. 골수는 토끼의 대퇴골에서 18개이지 바늘이 달린 주사기로 채취하였고 골수줄기세포의 배양은 이전 논문에서 보고된 방법을 따랐다⁹⁾. 간략히 기술하면, 약 3 ml의 골수를 채취하여 여기에 같은 량의 배지를 넣고 1000×g에서 30분 동안 원심분리하였다. 원심분리후 실험관내 액체가 3 층으로 분리되었으며, 맨 윗층의 지방층과 아래의 적혈구층은 버리고 가운데 층을 분리해내어 배지와 함께 배양용기에 넣었다. 37°C, 5% CO₂ Incubator에 3일간 배양한 후 바닥에 붙은 세포만 남겨두고 배양용기에 든 액을 제거하고 2~3일 한번씩 배지를 갈아주었다. 증식된 세포가 바닥을 덮으면 트립신으로 계대배양을 하였다. 본 실험에 사용한 배지는 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)에 20% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acid (Gibco), sodium pyruvate (100 ng/ml, Gibco), antibiotics (100 U penicillin, 100 mg/ml streptomycin, Gibco)을 첨가하여 사용하였다.

2. 생체내에 이식

우선 ketamine (5 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)를 사용하여 골수 줄기세포를 채취한 동일한 토끼를 마취하고 토끼경부의 피하에서 25 cm길이의 정맥 두개를 채취하였다. 25 cm 길이의 정맥은 장력이 가하지 않는 생체외에서 17 cm 길이로 되었다. 제거한 정맥을 젖은 거즈로 보관한 다음, 좌우측 대퇴골부위를 절개하여 양측 비골신경을 노출시키고 15 cm 길이의 신경결손부위를 인위적으로 형성하였다. 17 cm 정맥을 신경결손부위의 근심부와 원심부 신경에 1 mm정도 삽입하고 10-0 나일론 봉합사로 문합하였다. 문합후 배양해서 얻은 골수줄기세포와 150 μl collagen (type I collagen, Nitta Co., Japan)을 혼합하여 이것을 1 ml 주사기를 이용하여 문합한 틈새로 천천히 주사해 정맥내로 주입하였다. 다른 한쪽의 정맥은 150 μl collagen만 주입하여 대조군으로 사용하였다 (Fig. 1). 본 실험에 사용한 collagen은 PH가 7.5, 4°C 온도에서는 액체상태인데 정맥안에 주입한 후 체온 온도(37°C)에서 젤 형태로 되었다.

3. 신경재생의 평가

수술후 4주, 8주, 12주째 각각 5마리에서 표본을 채취하였다. 이식된 정맥의 중심부분에서 1-2 mm 길이의 조직을 채취하여 2.5%의 glutaraldehyde로 고정하고 통상적인 방법으로 Epon포매하고, 절편(0.5 μm)을 만들고 toluidine blue로 염색하였다. image analysis software (IBAS, Contron, Erching, Germany)를 이용하여 유수화 신경섬유의 개수, 유수화 신경섬유의 직경과 수초의 두께를 측정하였다. Paired student's t-test 를 이용하여 통계학적인 분석을 하였다.

III. 결 과

Table 1은 실험군과 대조군의 재생한 유수화 신경섬유의 개수, 직경 및 수초의 두께를 나타낸 표이다. 술후 4주째는 골수 줄기세포를 넣은군과 골수줄기세포를 넣지 않은군 모두에서 재생한 신경섬유가 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 그러나 술후 8주와 12주에서는 골수줄기세포를 넣은 군과 넣지 않은 군에서 모두 재생된 신경섬유가 나타났으며 골수줄기세포를 넣은 군에서 대조군보다 더 재생된 신경섬유의 개수가 많았다 (Fig. 3, 4). 골수줄기세포를 넣은 군에서 신경섬유의 직경은 평균 7.2 μm로서 대조군의 평균 4.7 μm보다 통계적으로 유의성있는 차이를 보였다. 단, 두 그룹에서 수초의 두께는 각각 0.6 μm과 0.5 μm로 유의성있는 차이를 보이지 않았다..

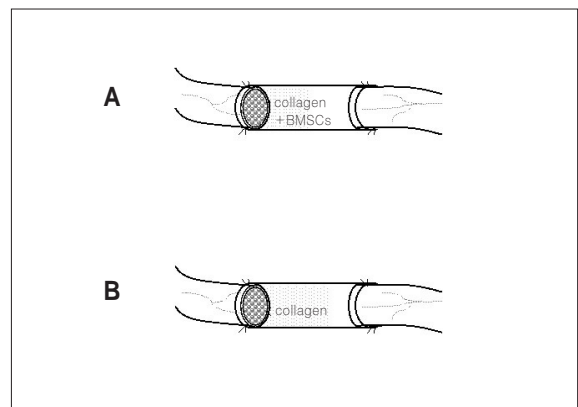


Fig. 1. (A) In the BMSC-grafted side, the vein is filled with the collagen-BMSCs mixture. (B) In the control side, the vein is filled with collagen only.

Table 1. The total number and diameter of myelinated fibers and the myelin sheath thickness in the BMSC-grafted and control sides. The values are the mean. * P < 0.05.

	Stem cells-grafted side			Control side		
	4weeks	8weeks	12weeks	4weeks	8weeks	12weeks
Number of fibers	0	1421*	2164*	0	633*	1103*
Diameter of fibers(mm)	0	6.1*	7.2*	0	4.1*	4.7*
Thickness of fibers(mm)	0	0.4	0.6	0	0.3	0.5

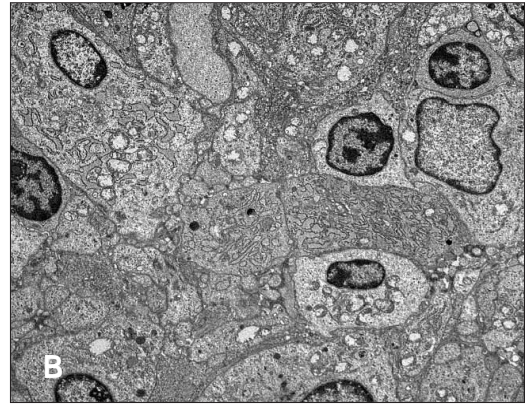
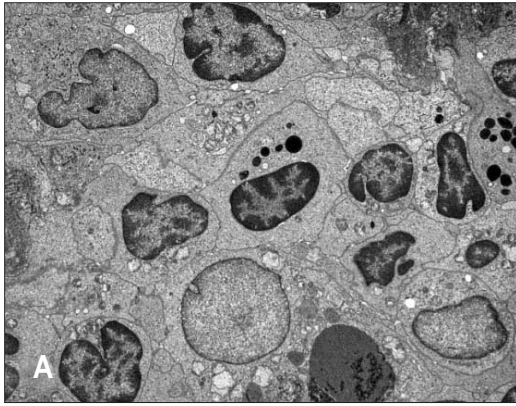


Fig. 2. Regenerated tissue 4 weeks after grafting, magnification $\times 4000$. No regenerated nerve fibers were present in both the BMSC-grafted and control sides. (A) BMSC-grafted side. (B) control side.

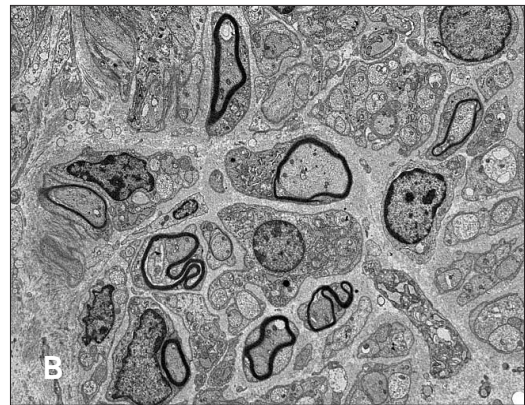
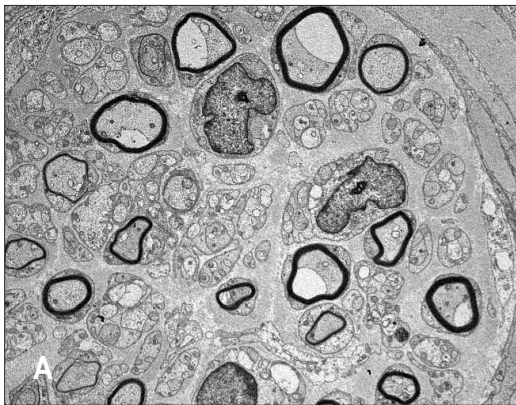


Fig. 3 Regenerated tissue 8 weeks after grafting, magnification $\times 4000$. There was more axon formation in the BMSC-grafted side. (A) BMSC-grafted side. (B) control side.

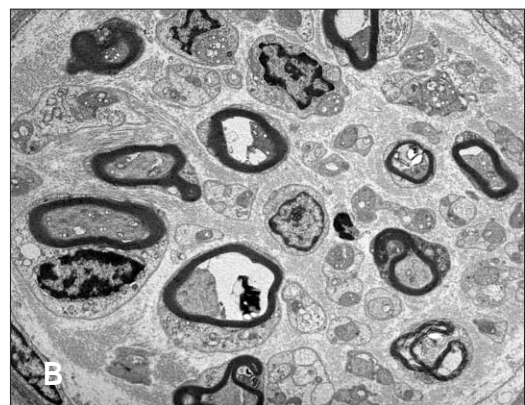
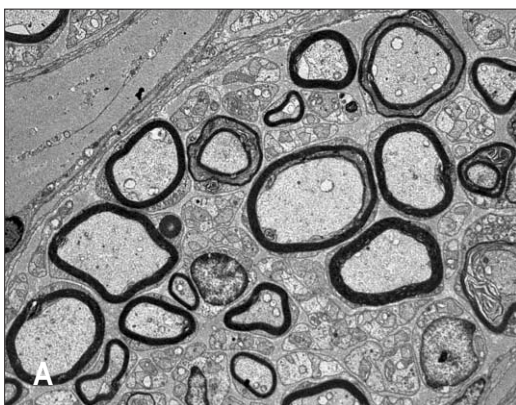


Fig. 4. Regenerated tissue 12 weeks after grafting, magnification $\times 4000$. There was clearly more axon formation with a larger diameter in the BMSC-grafted side. (A) BMSC-grafted side. (B) control side.

IV. 고 찰

참고문헌

본 실험에서는 토끼에서 분리배양한 골수줄기세포를 말초신경결손부위에 이식한 결과 재생된 신경섬유의 수와 크기가 골수줄기세포를 이식하지 않은 대조군보다 현저하게 많았다. 이것은 골수줄기세포가 신경축삭의 재생에 영향을 준다는 것을 제시한다. 골수줄기세포를 신경결손부위에 이식하였을 때 골수줄기세포가 직접 신경축삭과 접촉하고 신경이 자라는 것을 도와준다는 결과는 이전 연구자들이 보고한 결과와 일치한다^{5,8,10,11}.

신경줄기세포는 대뇌피질, 해마, 소뇌저부, 전뇌와 척수 등에 존재하며¹⁹ 위치가 비교적 깊어서 채취하기 힘들고 위험성이 있어서 임상적용면에서 한계가 있다. 반면에 골수줄기세포는 채취가 쉽고 간단하여 신경줄기세포를 얻기 위해 일어나는 조직손상과 위험성을 극복할 수 있어 향후 임상적용에 있어서도 환자들한테 쉽게 적용될 수 있다. 이전의 연구결과에 의하면은 슈반세포를 말초신경결손부위에 이식하면 신경축삭의 재생을 촉진한다고 하였고^{14,15} 또한 슈반세포는 생물활성분자를 분비하며 신경축삭을 지지하여 신경재생에 있어서 중요한 작용을 한다고 하였다^{16,17}. 그러나 슈반세포의 분리배양기술을 개선하고¹⁸ 효과적인 슈반세포 *mitogens*를 사용함에도 불구하고¹⁰ 이식할 수 있는 충분한 량의 슈반세포를 얻는데 어려움이 있다. Cuevas 등은^{10,11} 골수줄기세포를 신경결손부위에 이식하였을 때 *trophic factors*과 그와 관련된 *receptors*를 발현할 수 있고 또한 *trophic factors*는 골수줄기세포가 슈반세포로의 분화를 촉진할 수 있다고 보고하였다. 그러므로 골수줄기세포를 슈반세포 대용으로 사용할 수 있다고 생각되며 이로써 자가슈반세포의 채취로 인한 어려움을 피할 수 있다. 그러나 이 논문에서는 골수줄기세포가 체내에서 슈반세포로 분화되는지 여부를 명확히 밝히지 못하였다. 그러므로 골수줄기세포가 말초신경결손부위에서 신경재생을 촉진하는 기전을 연구하기 위해서는 이식후 골수줄기세포의 변화에 관한 연구가 앞으로 이루어 질 필요가 있겠다.

인류의 질병을 치료하는데 있어서 골수줄기세포는 큰 잠재력을 가지고 있어서 현재 가장 관심있게 이루어 지고 있는 분야중의 하나이다. Chopp 등은⁷ 쥐의 손상된 척수에 골수줄기세포를 이식하여 상당한 신경기능의 향상을 얻었다고 보고하였고, Kopen 등은¹⁹ 쥐의 측뇌실 (*lateral ventricle*)에 주입한 골수줄기세포가 *astrocyte*와 *neurofilament-containing cells*로 분화된다고 보고하였다. 그러나 이식한 골수줄기세포의 분화과정의 기전에 대하여 아직 명확하지 않다. 골수줄기세포를 이용하여 신경질환과 손상을 치료하는데 이용하기 위하여 가장 중요한 것은 골수줄기세포가 어떻게 특정세포로 분화하는가를 명확히 이해하는 것이 중요하다.

V. 결 론

본 연구에서 골수줄기세포를 15 mm길이의 비골신경 결손부에 이식하였을 때 유수화신경섬유의 개수가 많아지고 재생된 신경의 직경이 커지는 결과를 얻었다. 이는 골수줄기세포가 신경축삭의 재생에 촉진 작용이 있다는 것을 나타낸다.

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
2. Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS: Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *NeuroReport* 2002;13:1185-1188.
3. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247-256.
4. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-370.
5. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautan SC, Xu YX, Zhang Z: Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improve functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1311-1319.
6. Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M: Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;315:67-70.
7. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M: Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *NeuroReport* 2000;11:3001-3005.
8. Mahmood A, Lu D, Yi L, Chen JL, Chopp M: Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg* 2001;94:589-595.
9. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M: Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res* 2003;974:17-24.
10. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, Diaz-Gonzalez D, Reimers D: Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 2002;24:634-638.
11. Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gomez I, Yan M, Dujovny M: Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res* 2004;26:230-232.
12. Dazawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H: Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001;14:1771-1776.
13. Temple S: The development of neural stem cells. *Nature* 2001;414:112-117.
14. Levi AD, Bunge RP: Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. *Exp Neurol* 1994;130:41-52.
15. Levi AD, Guenard V, Aebischer P, Bunge RP: The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1994;14:1309-1319.
16. Martin D, Schoenen J, Delree P, LePrince P, Rogister B, Moonen G: Grafts of syngeneic cultured, adult dorsal root ganglion-derived Schwann cells to the injured spinal cord of adult rats: preliminary morphological studies. *Neurosci Lett* 1991;124:44-48.
17. Tonge DA, Golding JP: Regeneration and repair of the peripheral nervous system. *Sem Neurosci* 1993;5:385-390.
18. Casella GT, Bunge RP, Wood PM: Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 1996;17:327-338.
19. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10711-10716.