

가토 모델에서 인체지방유래 줄기세포가 슬관절의 퇴행성 변화에 미치는 영향

정기환 · 김석권 · 정재우 · 허 정 · 권용석 · 이근철

동아대학교 의과대학 성형외과학교실

The Effects of Human Adipose Tissue-derived Stem Cells on Degenerative Change of Knee in Rabbit Model

Ki-Hwan Jeong, M.D., Seok-Kwun Kim, M.D.,
Jae-Oo Jeong, M.D., Jeong Heo, M.D.,
Yong-Seok Kwon, M.D., Keun-Cheol Lee, M.D.

Department of Plastic & Reconstructive Surgery, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea

Purpose: The survival of bone marrow derived stem cell was reported several times. But the survival of adipose tissue derived stem cells(hASCs) was not mentioned on. We studied the adipose tissue derived stem cell's survival and effect on articular cartilage in rabbits.

Methods: Osteoarthritis was induced in twenty New Zealand white rabbits by intraarticular injection of monosodium iodoacetate(MIA). After four weeks, hASCs were also injected into the knee joints space without any vehicle, but the control group received phosphate buffered saline only. The histologic grade of articular cartilage was measured in 4 and 8 weeks after the transplantation of hASC and the viability of injected stem cells measured by Fluorescent in situ Hybridization (FISH) examination.

Results: After 4 and 8 weeks from hASCs transplantation, histologic grade was not significantly difference between two groups($p>0.05$), and the Y chromosome of the transplanted hASCs was not detected in articular cartilage.

Conclusion: We found that direct injection of hASC in joint space didn't work on damaged articular cartilage repair.

Key Words: hASCs, Stem cell, Osteoarthritis

I. 서 론

골 관절염(osteoarthritis)은 관절연골의 퇴행성 변화로, 기질(matrix)의 감소와 기질 구성요소의 합성 억제, 섬유화(fibrillation), 연골의 침식(erosion), 연골세포의 증식, 관절 가장자리의 골극(osteophyte)형성, 연골 하골(subchondral bone)의 경화(sclerosis) 같은 특징을 가지고¹ 결국 관절면의 완전한 소실을 야기한다. 또, 다른 관절조직 즉, 인대, 관절낭, 활액막, 관절 주변 근육들도 또한 손상을 받게 된다.^{2,3} 이러한 변화는 오랜시간에 걸쳐 잘 인식하지 못한 채 일어나고 만성기에 이르면 연골손상은 결국 관절의 손상과 통증을 유발한다.¹ 일단 손상 받거나 퇴행성 변화를 일으킨 연골은 재생력이 부족하여 치료의 한계점을 보이는데, 큰 결손일 경우 치유가 되지 않아 지금까지도 관절 연골 손상 부위의 회복은 중요한 임상적 과제로 남는다.¹

현재 약물요법이나 물리치료 등에 의존하고 있으나 관절염을 치료하는 확실한 약물이 개발되지 않은 상태이며, 스테로이드 제제 및 윤활제의 장기간 사용은 연골의 변성을 촉진시키는 결과를 초래한다.⁴ 관절내 주사, 약물복용, 물리치료, 수술요법 같은 전통적인 치료는 원래의 초자연골(hyaline cartilage)로 완전히 재생되지 않아 체중지지에 대한 정상적인 유연성을 떨어뜨리고 장시간의 신체적 활동에 지장을 준다.⁴ 이렇게 골관절염은 인간의 활동에 큰 영향을 주지만 지금까지 병태 생물학적 변화를 가져올 만한 치료가 거의 없거나 효과적이지 못한 실정이다.

최근에 자가 연골세포이식술(autologous chondrocyte implantation)이 개발되었지만 연골조직의 제한, 연골 세포의 시험관 배양 중 탈분화, 고 연령에 따른 세포증식의 한계 등이 문제점으로 남아있다. 따라서 재생력이 풍부한 중간엽 줄기세포들의 이용이 생물학적 복원이 파괴된 연골을 재생시키는데 효과적인 치료방법으로 응용되고 있다.⁵ 자가 연골세포이식 같은 세포조직공학(cell-based tissue-engineering)이 전통적인 기술에 대한 대체기술로

Received January 24, 2008

Revised June 16, 2008

Accepted September 3, 2008

Address Correspondence: Seok Kwun Kim, M.D., Ph.D.,
Department of Plastic & Reconstructive Surgery, College of Medicine, Dong-A University, 1,3 ga, Dongdaeshin-dong, Seo-gu, Busan 602-715, Korea. Tel: 051) 240-2807 / Fax: 051) 243-5416 / E-mail: sgkim1@dau.ac.kr

* 본 논문은 2007년 제63차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

대표되는데 연골세포를 얻기 위한 공여부위의 이용이 제한적이고, 실험관내(*in vitro*)에서 긴 배양증식기간이 요구되고, 공여부위의 병적상태가 제한점이 된다. 이러한 연골세포 전구체(*precursors*)의 대체자원으로 여러 가지 세포형태가 연구되었는데 그 중 줄기세포가 연골조직 공학 기술에 부가적인 자원으로 대표되고 있다.⁶

최근 여러 연구자들은 피하지방조직으로부터 풍부한 잠재력을 보유한 인간중간엽 줄기세포(*human mesenchymal stem cells*)을 얻을 수 있다고 하였다.¹ 지방조직은 골수와 같이 중간엽(*mesenchyma*)에서 기원하며 여러 다양한 기질세포 집단을 포함하고 있다고 알려져 있다. 최근의 시험관내에서 지방세포에서 분리한 줄기세포(*human adipose-derived stem cells; hASCs*)가 뼈, 연골, 지방, 그리고 근육 등 중간엽에서 기원한 다양한 조직으로 분화가 가능하다고 밝혀졌다.⁷

지금까지 골수유래 줄기세포를 이용한 관절연골 재생에 관한 많은 연구들이 있었으나^{1,2,6} 인체지방조직에서 분리된 줄기세포에 대한 잠재력과 그 유용성이 증명되면서 많은 연구자들의 관심이 쏠리고 있는 실정이다. 골관절염의 동물 모델은 폭 넓게 이용되었고 주로 관절 손상의 진행과 병태 생리적 연구에 이용되어 왔다. 퇴행성관절염을 유발하는 방법에는 부분적 반월 연골 절제, 내측 측부 인대 절제,³ 관절면의 인위적인 손상, 외부고정 등이 있으며, 그 중 하나가 *monosodium iodoacetate*(MIA)로 관절염을 유발한 모델인데, 약 20년 전 Kalbhen에 의해 처음으로 기술되었다. MIA를 국소적으로 주사하면, 해당작용(*glycolysis*) 억제물이 연골세포 대사 작용을 파괴하여 연골 변성을 초래하는데, 조직병리학적으로 인간의 관절퇴행에서와 거의 비슷하게 나타난다고 하였다. 더욱이 MIA 모델에서 관절 손상의 만성기에는 인간에서와 같이 연골 하 골이 드러나고, 활액막이 손상되어 통증이 유발된다고 하였다.³

그간 화학적 방법으로 유발한 퇴행성 슬관절에서의 줄기세포 치료에 대한 연구는 아직 없으며, 지방조직에서 유래한 줄기세포를 이용하여 퇴행성 슬관절의 치료에 대한 연구가 없었다. 이에 본 연구에서는 가토의 슬관절에 MIA를 주사하여 퇴행성변화를 유발한 뒤 인체 지방조직에서 분리한 줄기세포를 이식하여 이식한 세포의 생존여부를 확인하고, 이식된 세포가 관절연골의 재생에 어떤 영향을 미치는지를 알아보려고 연구를 시행하였다.

중 암컷 가토 20마리를 실험동물로 사용하였다. 10마리씩 실험군과 대조군으로 나눈 후 각각에서 4주, 8주군으로 나누었다. 실험기간 동안 사육장의 온도와 습도는 일정하게 유지하였다. 먹이와 물은 충분히 공급하였고 표준사료를 먹이로 이용하였으며 가토의 운동을 제한하지 않고 자유롭게 움직이도록 하였다.

나. 슬관절의 퇴행성변화 유발

Ketamine HCl 50 mg/kg을 둔부 근육내로 주사하여 전신마취를 시행하였으며, 양쪽다리의 털을 깎은 후 *povidone iodine* 용액으로 소독하였다. 슬관절의 퇴행성변화를 유발하기 위해 *monosodium iodoacetate*[®](Sigma, USA) 2.5 mg을 0.2 mL phosphate buffered saline(PBS)에 혼합하여 투시촬영 하에서 전 외측으로 접근하여 슬개골 하 인대(*infrapatella ligament*)를 통과하여 슬관절강 내에 주사하였다(Fig. 1).

다. 중간엽줄기세포의 배양 및 주입

동의서를 작성한 지원자에서 지방절제술을 통해 얻은 피하지방조직을 잘게 자른 후 지방조직과 동일한 양의 PBS로 세척하여 혈액을 제거하였다. RPMI-1640(Hyclone, USA)과 *Collagenase type I*(Sigma, USA)의 혼합배지에 넣고 37°C에서 60분 동안 소화(*digest*)과정을 거친 후 세포부유액을 얻은 후 2000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 얻어진 세포층은 Basal Medium for Human Mesenchymal Stem Cells, Mesenchymal Stem Cells Stimulatory Supplement 및 Basal Bovine Serum for Human Mesenchymal Stem Cells(Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, Canada)의 혼합배지에 10,000 U/mL penicillin과 10,000 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

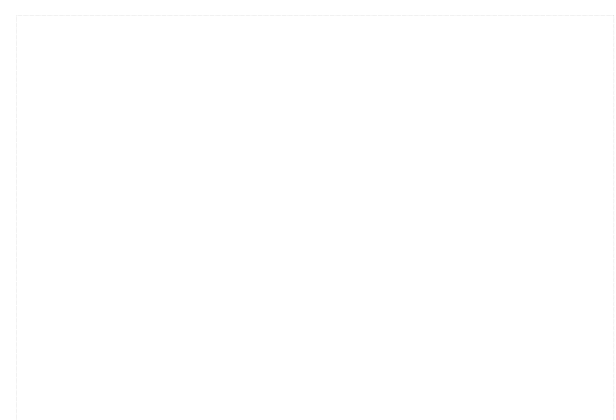


Fig. 1. Intra-articular injection of monosodium iodoacetate into the knee.

II. 재료 및 방법

가. 연구대상

생후 22주된 체중 2.56 ± 0.32 kg의 New Zealand white

플라스크에 80% 이상 세포가 부착하여 자라면 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)와 0.05% trypsin (Sigma, USA)로 세포를 떼어낸다. 떼어낸 세포를 세척한 후 MesenCult[®] 배지(Basal Medium for Human Mesenchymal Stem Cells + Mesenchymal Stem Cells Stimulatory Supplement, available for the culture ad expansion, as well as detection and enumeration of mouse mesenchymal stem cells using the CFU-F assay)를 사용하여 계대배양한 후, 동일한 방법으로 세포를 얻었다.

배양되어진 hASCs는 위상차현미경에서 섬유아세포와 비슷한 모양으로 관찰되었다(Fig. 2). 유세포 분석기(flow cytometry) 분석에서 MSCs의 표지자인 CD73, CD105, CD166가 표현되며 조혈세포 표지자인 CD45는 표현되지 않았다(Fig. 3).

슬관절 내 줄기세포의 이식은 슬관절의 퇴행성 변화

유발 4주 후, 실험군 가토에서는 hASCs 1×10^5 cells/PBS 0.2 mL을 27 gauge 주사기를 이용하여 슬관절 강 내에 주사하였으며 대조군에서는 PBS 0.2 mL만을 주사하였다.

라. 조직학적 평가

줄기세포이식 후 4, 8주에서 가토를 각각 실험군과 대조군에서 10마리씩 희생시킨 후 양쪽 슬관절을 적출하였다. 조직은 10% buffered formalin으로 72시간 고정한 후 탈칼슘화(decalcification)하여 파라핀 처리하였다. 미세조직절편은 시상면으로 제작한 후 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 사용하여 조직학적 등급평가를 시행하였다(Table I). 분석에서는 가능한 오차를 줄이고 객관성을 높이기 위해 병리학 전문의를 포함한 3명의 의사가 2회 반복하여 시행 후 평균값을 채택하였다.

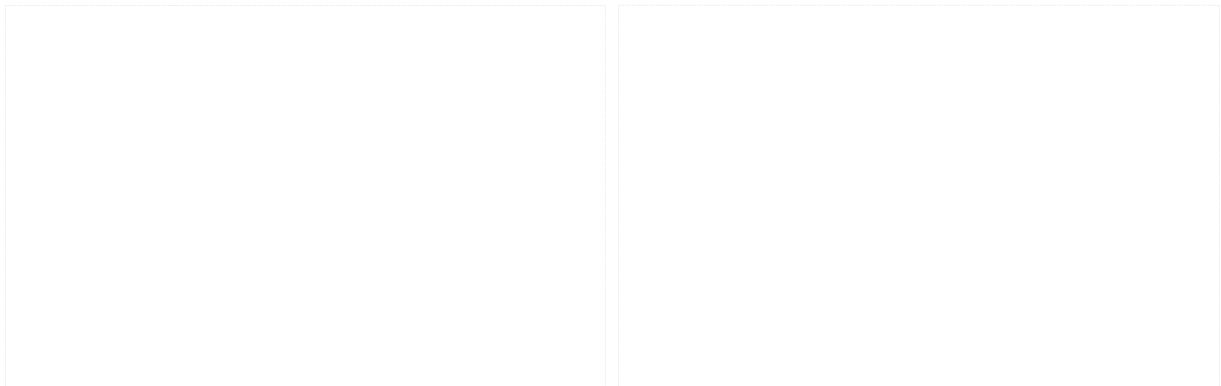


Fig. 2. (Left) The morphology of a human adipose tissue derived mesenchymal stem cells by phase microscope is shown. These cells exhibited a fibroblast-like morphology (Original magnification, $\times 100$). (Right) In Wright-giemsa stained smear, these cells showed bigger in size than others ($\times 1000$).

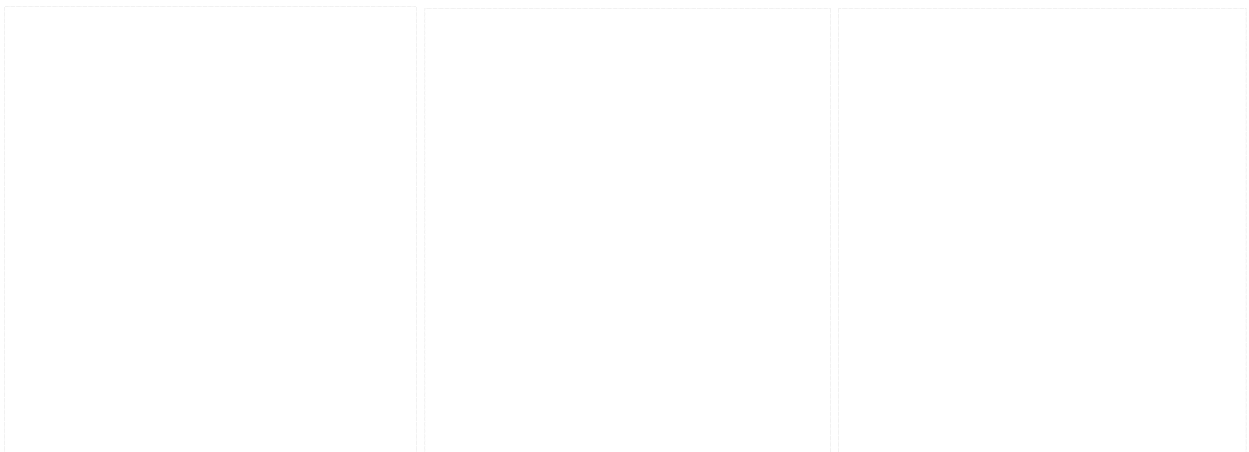


Fig. 3. Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells(hATSCs) samples were examined by flow cytometry. hATSCs expressed (Left) CD73, (Center) CD105, (Right) CD166 which are considered to be a marker for mesenchymal stem cells. In contrast, the hematopoietic lineage marker CD45 was not expressed.

마. 형광제자리 부합화 검사(Fluorescent *in situ* Hybridization)

FISH 슬라이드를 37°C water jar(D.W + SSC × 20 + 0.1% Nonylphenoxypolyethoxylethanol 40)에 30분간 넣어둔 후 젖은 상태의 슬라이드를 70% 에타놀(ethanol), 100% 에타놀에 각각 1분간 넣어서 탈수(dehydration) 시켰다. 제작된 probe 10 µL(D.W 2 µL + buffer 7 µL + probe 1 µL)을 슬라이드에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮고 기포를 잘 제거한 뒤 paper bond로 밀봉한 뒤 하룻밤

수세하고, 45°C 물에 5개의 jar를 넣어 두었다. 각각의 jar의 성분은 50% Formamide(20 × Saline Sodium Citrate buffer + DW + Formamide) 2개, 2 × SSC 1개, 2 × SSC + 0.1 40NP 1개이다. Paper bond를 제거한 슬라이드를 차례로 10분, 10분, 10분, 5분씩 넣어둔 뒤 실온의 2 × SSC에 5분 넣어둔 후, 슬라이드를 꺼내어 DAPI II(4'6-diamidino-2-phenylindole) 10 µL 분주한 뒤 형광현미경을 관찰하였다.

Table I. Histologic Classification between hATSCs and Control Group

Pastweeks after transplantation	hATSCs group	Control group
4 weeks	A group	B group
8 weeks	C group	D group

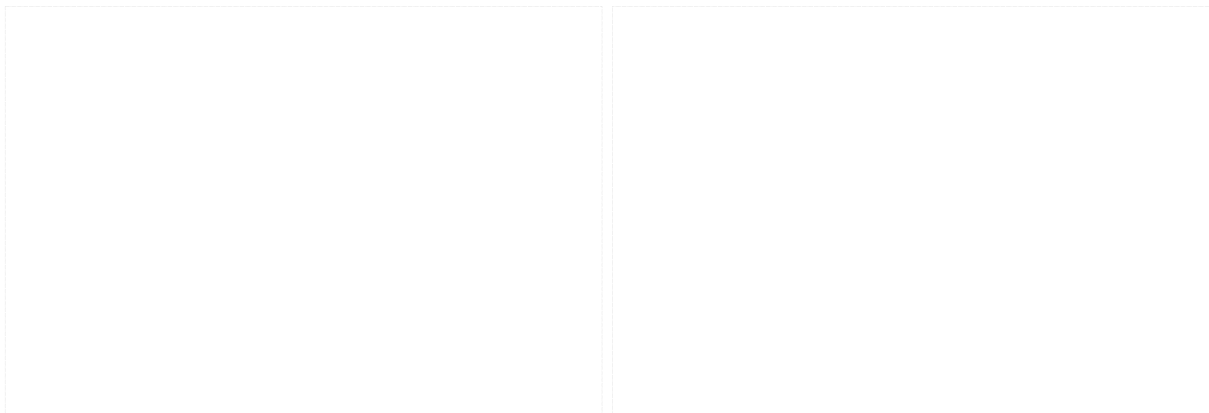


Fig. 4. (Left) Photomicrographs in the human adipose tissue derived mesenchymal stem cell group showing that the knee joint surface was smooth, regular and covered with fibrocartilaginous tissue in 4 weeks(Stained hematoxylin and eosin; original magnification, × 200), (Right) control group showing fibrous tissue only.

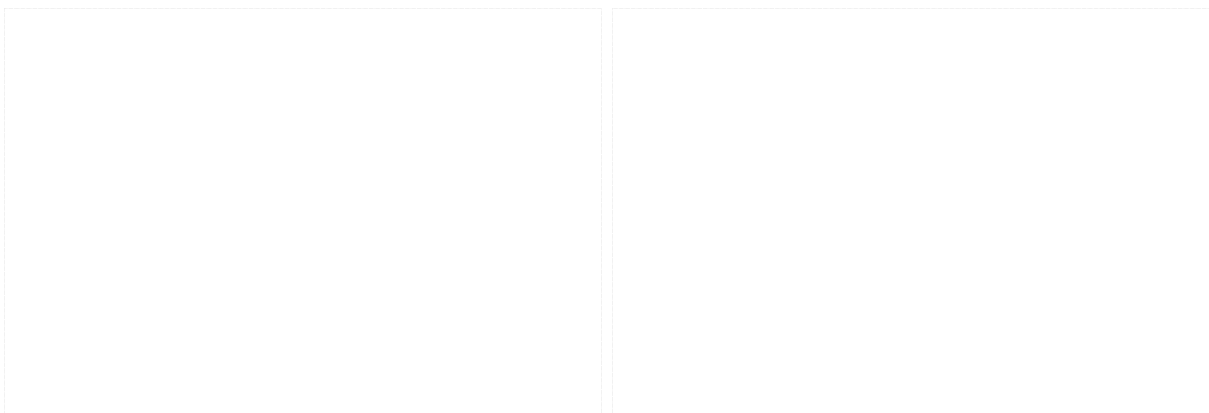


Fig. 5. (Left) Photomicrographs in the human adipose tissue derived mesenchymal stem cell group showing a fibrocartilaginous tissue in 8 weeks(Stain, hematoxylin and eosin: original magnification, × 200), (Right) control group showing replaced by fibrous tissue.

바. 통계학적 분석

통계처리는 SPSS version 12.0을 이용하여 4, 8주에서 실험군과 대조군에서 연골의 조직학적 등급을 Mann-Whitney test를 이용하여 비교분석하였다.

III. 결 과

가. 조직학적 평가

대조군에서는 시간이 경과함에 따라서 점차적으로 연골표면과 조직 구성에서 퇴행성 변화가 진행하였고, 인체지방조직유래 중간엽 줄기세포를 주입한 실험군에서도 대조군과 비교해 조직학적으로 유의한 차이는 없었다(Table II).

- 1) 대조군에서 형태학적 변화: PBS 주입 4주 후 대조군에서 연골 표면은 균일한 상태를 보이며 군데군데 섬유조직만 보이며, PBS 주입 8주 후에도 역시 연골표면이 매끈한 상태로 남아있으며 연골조직이 섬유조직으로 대체되어 있었다.
- 2) 실험군에서 형태학적 변화: 인체지방조직유래 줄기세포를 이식한 실험군에서는 이식 후 4주에서는

연골표면이 매끈하며 규칙적이고 섬유연골조직(fibrocartilaginous tissue)으로 덮여 있는 것을 볼 수 있고, 연골의 두께는 전반적으로 감소되었다. 이식 8주 후의 연골표면도 다소 매끈하게 보이며 연골조직과 섬유조직을 함께 관찰할 수 있었다.

- 3) 조직학적 평가표에 의한 평가: 인체지방조직유래 줄기세포를 이식한 실험군에서는 4주 후 조직학적 평가점수 평균이 7.5 ± 0.5 로 나왔고, PBS만 주입한 대조군에서는 평균 7.6 ± 0.5 가 나왔다. 8주 후에 실험군의 점수는 7.6 ± 0.4 , 대조군에서는 7.8 ± 0.4 로 두 군간에 차이는 있지만 통계적으로 유의하지 않았다($p > 0.05$).

나. 형광제자리 부합화 검사(Fluorescent *in situ* Hybridization)

hASCs를 이식한 실험군에서 4주와 8주 후에 주입한 줄기세포의 생존여부를 알아보기 위하여 형광제자리 부합화 검사를 한 결과 Y염색체가 연골 내에 생존하고 있지 않았다.

Table II. Histologic Grading Scale Criteria for the Defects of Cartilage

Category	Points
Cell morphology	
Hyaline cartilage	0
Mostly hyaline cartilage	1
Mostly fibrocartilage	2
Mostly non-cartilage	3
Non-cartilage only	4
Matrix-staining(metachromasia)	
Normal(compared with host adjacent cartilage)	0
Slightly reduced	1
Markedly reduced	2
No metachromatic stain	3
Surface regularity	
Smooth(> 3/4)	0
Moderate(> 1/2 - 3/4)	1
Irregular(1/4 - 1/2)	2
Severely irregular(> 1/4)	3
Thickness of cartilage	
> 2/3	0
1/3 - 2/3	1
> 1/3	2

Table III. Results of the Histological Grading Scale

Past weeks after transplantation	hATSCs group	Control group
4 weeks	7.4 ± 0.5	7.6 ± 0.5
8 weeks	7.7 ± 0.4	7.8 ± 0.4

Values are mean ± standard deviation.

* $p > 0.05$.

hATSCs, Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells.

IV. 고 찰

골관절염은 동통과 장애를 일으키는 가장 흔한 관절 질환으로서 하나의 질환이라기보다는 여러 형태의 손상에 의해 나타나는 관절조직의 공통적인 반응이며, 이전에는 노화에 따른 결과로 생각되어 퇴행성관절염으로 명명되었으나 지금은 관절구조, 유전, 물리적인 요소, 세포내 변화, 생화학적 요인과 같은 여러 요인들이 관여하여 초래되는 질환으로 인식된다.³

골관절염은 관절이 기능적으로 악화되거나 통증이 있을 때까지 잘 알아차리지 못하고 이와 같이 만성기에 알았다하더라도 이미 관절의 손상부위는 심해진 상태에서 이것을 회복하기 위한 사실상의 치료는 효과적이지 못하다.

이러한 골관절염의 병태 생리적 기전을 알기위해 또는 약물의 연골보호효과를 평가하기 위해 많은 골관절염 실험 모델들이 개발되어 왔다. 골관절염 모델에 동물들을 주로 사용하는데 동물에서 골관절염의 다양한 수술적 모델은 장기간에 걸쳐 자연발생적으로 일어나는 행적 변화를 촉진하기 위해 고안되었다. 관절염을 유발하는 방법에는 부분적 반월판연골 절제, 내측측부인대 절제, 부목고정을 통한 슬관절 고정, mono-iodoacetate (MIA) 주사 그리고 관절면을 인위적으로 손상시키는 방법들이 있다.³

우리는 여러 가지 방법들 중에 mono-iodoacetate (MIA)를 관절 강 내로 주사하여 관절의 퇴행성 변화를 유발하였다. 이것은 MIA의 농도를 조절함으로써 관절 손상의 진행과 심한정도(severity)를 쉽게 조절할 수 있는 장점을 가진 아주 간단하며 빠른 방법이다. 백서의 슬관절 내에 MIA를 주사하여 골관절염을 유발하였는데, 높은 강도인 0.3 mg과 3.0 mg의 MIA를 주입한 15일 후부터 30일까지 관절의 기능이 악화되어 장기간에 걸쳐 활동이 소실되고 연골 하 골이 드러나며 proteoglycan 함량이 감소되는 등 통증과 기능악화 면에서 인간에서의 임상증상과 비슷하다.³

지금까지 많은 연구들이 골수유래 줄기세포를 이용하

여 조직의 재생능력을 밝혔다. 이들은 대부분 동물에 자가 골수유래 줄기세포를 이식하거나 또는 동종에 의한 이식을 한 경우이다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)는 골막(periosteum)이나 골수(bone marrow)에 있는 적은 수의 분화되지 않은 세포이며, 중배엽에서 기원하는 결합조직의 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가졌고, 그 분화능력은 세포들이 위치한 환경에 영향을 받는다.⁴ 최근, 중간엽 줄기세포의 이식이 여러 분야에서 성공적으로 적용된 연구들이 보고되고 있다. 중간엽 줄기세포는 연골세포, 지방세포, 및 근육세포 등으로 분화할 수 있는 세포로서, 실험실연구(*in vitro*)에서 특정 배양조건 하에 연골, 뼈, 근육, 인대 및 지방조직 등 여러 가지 중배엽성 세포로 분화하는 능력이 밝혀졌다.⁸ 중간엽 줄기세포는 골수에서 추출이 용이하며 여러 가지 난치성질환에 대한 세포치료제의 가능성에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.^{8,9} 줄기세포에는 배아줄기세포(embryonic stem cells)와 성체줄기세포(adult stem cells)가 있는데, 배아줄기세포의 잠재력은 아주 거대하지만 그것의 이용에는 많은 도덕적, 법적 논쟁이 따른다.

따라서 성체줄기세포가 대체자원으로 제기되는데, 골수유래 중간엽 줄기세포(BMSCs)는 뛰어난 재생능력을 가졌고, 빠르게 증식하여 다양한 연골세포 형태(pre-chondrocytes, mature chondrocytes, hypertrophic chondrocytes)로 분화하는 능력을 가졌다.¹ Wakitani 등¹⁰은 동물실험을 통해 이러한 골수유래 중간엽 줄기세포(BMSCs)가 인체의 연골재생에도 유용할 것 이라고 하였고, Im 등⁹도 가토의 골수로부터 추출한 중간엽 줄기세포가, 드릴과 같은 물리적 방법을 이용해 만든 가토의 슬관절 연골 결손을 회복시킨다고 보고하였다. 그러나 골수유래 중간엽 줄기세포(BMSCs)는 공여부위(donor site)의 이용가능성이 제한되고, 골수를 얻기 위한 과정의 불편감과 통증, 그리고 얻을 수 있는 세포수가 적다는 문제점이 있다.⁹

그리고 줄기세포를 이식할 때 세포를 운반하는 매질로(carrier) collagen gel, sodium hyaluronan 등을 사용해 성공적으로 이식한 선행 연구들이 많이 나와 있는 실

정이다. Huang 등에 의하면 실험실 연구에서 인체지방 조직에서 분리된 hASCs로부터 분화된 연골세포에서 제 2형 교원질(collagen type II), 4 황산콘드로이틴(chondroitin 4 sulfate) 그리고 황산케라탄(keratan sulfate) 등의 연골 표지자가 발현되었다고 하였다. 생 지방조직(raw adipose tissue)에 함유된 줄기세포 집단을 processed lipoaspirate(PLA) cells 이라 하는데, 이것은 많은 양의 추출이 가능하며, 비교적 쉽게 얻을 수 있고 공여부위의 병적상태와 불편감을 최소화 할 수 있다. Wakitani 등¹⁰은 자가 연골세포를 이식한 실험에서 collagen gel을 사용하여 성공하였는데 이것은 이식한 연골세포가 쉽게 소실되지 않도록 collagen gel이 고정역할을 잘 해주었고, 이식된 세포가 생존할 수 있도록 collagen gel이 기질합성을 위한 적절한 환경을 제공했다는 것이다.

또 Wakitani 등¹⁰에 의하면 가토의 골수(bone marrow)와 골막(periosteum)으로부터 분리한 자가 골연골 전구세포(osteochondral progenitor cells)를 이식한 후, 2주부터 연골재생이 시작되어 24주에서는 연골 하 골까지 완전히 회복되었다고 하였다. 그들은 collagen gel을 매질로 사용하였고, 조직학적 평가표를 사용해 관절연골을 이식 후 2주, 4주, 12주, 24주에 평가했는데 4주에서 가장 초자연골에 가까운 회복을 보였다고 하였다. 인체 지방흡인물(human lipoaspirates) 내에 있는 풍부한 줄기세포집단인 processed lipoaspirate(PLA) cells 은 지방조직에서 충분한 수로 분리가능하며, 배지에서 안정되게 성장, 증식할 수 있고, 골수유래 중간엽줄기세포와 같이 PLA cells도 뼈, 지방, 근육, 연골조직으로 분화가 가능하다고 하였다. 지방조직에 함유된 줄기세포인 PLA cells 에서도 골수유래 중간엽 줄기세포에서 관찰된 CD 표지자 항원과 아주 비슷한 CD 표지자를 확인하였다. 이에 근거하여 우리는 인체지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 이식한 후 4주와 8주에 Wakitani 등에 의한 조직학적 평가표를 적용하였다.

Im 등⁹의 연구에서도 실험적 슬관절 연골손상을 일으킨 가토에 자가 중간엽 줄기세포를 이식한 군에서 그렇지 않은 군 보다 조직학적 평가 점수가 유의하게 높게 나왔지만 그 조직학적 모양이 완전하게 회복된 것이 아니라고 하였다. 본 실험에서는 인체 지방조직유래 중간엽 줄기세포를 이식하여 연골의 재생을 관찰하였으나, 이식되어진 세포의 생존도 확인할 수가 없었고, 대조군과 비교하여 조직학적으로도 별 차이가 없었다.

한편 Morizono 등¹⁰은 nude mice 피하로 PLA cells 을 이식하여 연골형성을 관찰하였는데 시간이 경과함에 따라 크기가 감소하여 20주가 되었을 때는 50%로 줄었다고 하여 인간 줄기세포가 동물 생체 내에서 생존이 가

능함을 보여주었다. 하지만 본 연구에서는 퇴행성 변화를 유발한 상태의 열악한 환경에 줄기세포를 이식하였고 자がい식이 아니고 vehicle을 사용하지 않아, 생착이 어려웠을 것으로 생각된다. 또, mono-iodoacetate가 8주까지 퇴행성변화를 유발시킬 수 있는데 본 연구에서는 4주째에 실험을 하였고, 줄기세포의 분화를 촉진시키는 인자들을 제공하지 못했다는 점, 그리고 골수에서 유래한 중간엽 줄기세포 보다 지방에서 유래한 중간엽 줄기세포가 연골이나 골 형성 능력이 떨어진다는 점 등을 생각해 볼 수 있다. 인체 지방조직유래 중간엽 줄기세포의 여러 가지 장점과 잠재력이 부각되면서 그에 따른 관심과 기대로 많은 연구들이 시도되고 있으나, 생체 내에서의 생존 가능성이나 조직재생에 대한 역할과 기전 등에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 슬관절에 화학적 방법으로 퇴행성 변화를 유발한 가토모델에서 인체 지방조직으로부터 분리한 중간엽 줄기세포를 이식하여 슬관절 연골의 퇴행성 변화에 어떠한 영향을 주는가에 관하여 알아보았다. 이식되어진 줄기세포가 연골 내에서 생존하고 있는 것을 확인하지 못했고, 줄기세포를 이식한 실험군에서 대조군과 비교하여 조직학적으로 유의한 차이가 없었다. 인체지방조직유래 중간엽 줄기세포의 이식은 물리적인 방법으로 퇴행성 변화를 유도한 것이 아닌 화학물질을 이용한 슬관절 퇴행성 연골에서는 퇴행성변화를 지연 혹은 회복시키는데 기여하지 못하는 것으로 여겨지며 향후 더 많은 수의 개체를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 사료되며, 본 연구가 인체 지방조직유래 중간엽 줄기세포의 연골재생에 관한 앞으로의 연구와 치료에 보탬이 될 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F: Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46: 704, 2002
2. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47: 487, 1998
3. Creamer P, Hochberg MC: Osteoarthritis. *Lancet* 350: 503, 1997
4. Kim SB, Yoon KS, Park HS, Kwak H, Ha NJ, Park JS: The effect of intra-articular Hyaluronic acid and Steroid injection in osteoarthritis of the Knee. *J Korean Acad Rehabil Med* 24: 747, 2000
5. Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JA,

- Smith RL: Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 427: 96, 2004
6. Watt FM: Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* 89: 373, 1988
 7. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ: Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 72: 003, 1990
 8. Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641, 1991
 9. Im GI, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH: Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg* 83-B(2): 289, 2001
 10. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76: 579, 1994
 11. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zuk PM, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101, 2003