

의학 박사학위 논문

뇌졸중 쥐 모델에서 사람
중간엽세포의 이식 후 신경세포로의
분화와 신경기능의 회복 관찰

아주대학교 대학원

의학과

김형석

뇌졸중 쥐 모델에서 사람
중간엽세포의 이식 후 신경세포로의
분화와 신경기능의 회복 관찰

지도교수 조 경 기

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.

2005년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 형 석

김형석의 의학 박사학위 논문을 인준함.

심사위원장 조 기 홍 인

심사위원 조 경 기 인

심사위원 서 해 영 인

심사위원 진 병 관 인

심사위원 장 진 우 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2005년 6월 22일

감사의 글

부족한 제자에게 항상 애정 어린 관심과 격려로 신경외과의 길을 걸을 수 있게 하였고, 연구의 방향을 제시하여 좋은 논문을 쓸 수 있도록 지도해 주신 은사 조정기 선생님께 감사를 드립니다. 때로는 칭찬과 격려로 때로는 호된 꾸지람으로 저를 바로 잡아주시고, 스스로 걸을 수 있도록 가르침을 주신 은혜에 깊은 존경과 감사를 드립니다.

보잘 것 없는 연구로부터 값진 결실을 맺을 수 있도록 날카롭고 냉철한 지적과 지도로 본 연구를 빛내 주신 조기홍선생님, 서혜영선생님, 진병관 선생님, 장진우 선생님께 머리 숙여 감사드립니다.

동물실험과 논문 작성에 있어서 도움과 조언을 아끼지 않은 송지영 연구원에게 감사하며, 실험을 할 수 있도록 세포를 제공해 주신 파미셀 세포치료연구소의 김현수 선생님께 심심한 감사를 드립니다.

보이지 않는 곳에서 묵묵히 일하며 물신양면으로 도움을 주신 아주대학교 신경외과학 교실원들과 의국원들의 노력에 진심어린 감사를 드립니다.

그리고 다양한 도움을 주셨던 모든 분들에게 비록 보잘 것 없지만 본 학문적 성과를 보여드릴 수 있게 됨을 기쁘게 생각하며, 그 분들의 노고에 감사드립니다.

끝으로 항상 무한한 사랑과 따스함으로 감싸주시고, 인내와 이해로 제 힘의 원동력이 되어 주시는 사랑하는 아버지와 어머니께 보답하는 마음으로 저의 작은 노력을 바칩니다.

뇌졸중 쥐 모델에서 사람 중간엽세포의 이식 후 신경세포로의 분화와 신경기능의 회복 관찰

목적 : 뇌허혈을 유발시킨 쥐에 신경세포로의 분화를 촉진하는 성장인자를 처리하여, 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포(Cytokine-induced Human Mesenchymal Stem Cell)를 이식하여 신경세포의 재생 및 허혈부위로의 이동을 관찰하고 신경기능의 회복을 도모하고자 하였다.

대상 : 중간엽줄기세포는 일반적으로 골수에서 조혈작용을 돕는 지지세포(Stroma)로 알려져 있다. 이 세포는 환자로부터 직접 채취하므로 개체간의 면역거부반응을 최소화 할 수 있는 장점을 가진 세포로서, 본 실험에서는 성장인자를 사용하여 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포(Human Mesenchymal Stem Cell)를 사용하였다. 뇌허혈동물모델은 Nylon Suture를 이용하여 쥐의 중뇌동맥(Middle cerebral artery; MCA)의 원위부를 막는 transient MCA occlusion 모델을 사용하였다. 허혈을 유발시킨 지 24시간 경과 뒤, 신경세포로 분화 유도가 된 사람의 중간엽줄기세포 1×10^6 cells/ml를 꼬리정맥(tail vein)을 통해 정주하였다. 세포 이식 후 1일, 3일, 7일, 14일, 28일, 56일 간격으로 신경기능의 회복을 알아보기 위해 modified Neurological Severity Score(mNSS) test와 Rotarod test로 동물행동을 측정한 후 희생시켜 뇌조직을 고정한 후, 이식된 세포의 확인을 위해 LacZ 염색 및 2중 면역형광염색을 실시하였다.

결과 : 동물 모델에 세포이식 1주일 후 LacZ 염색을 통해 관찰한 결과 이식한 세포가 허혈부위인 왼쪽 뇌피질(cortex)과 선조체(striatum) 부위에 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이식된 사람의 중간엽줄기세포의 분화여부 관찰을 위한 2중 면역형광염색 결과, 세포들이 신경원(neuron)과 성상세포(astrocyte)로 분화된 것을 볼 수 있었으며, VEGF와 bFGF의 발현양상을 보였다. 동물행동평가검사의 결과에서 신경기능이 대조군과 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 군보다 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 군에서 통계적으로 의미있게 회복되었다.

결론 : 본 연구를 통해서 쥐의 꼬리정맥을 통하여 이식한 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포가 손상부위로 이동하여 생존하였으며, 일부는 신경원과 성상세포로 분화되었음을 알 수 있었고, 그 결과 신경기능의 회복을 보였다. 환자의 골수로부터 채취된 중간엽줄기세포를 신경세포로 분화 유도하여 이식함으로써 결손세포 대체효과와 신경기능의 회복 등 향후 뇌졸중환자의 임상에 적용할 예비실험으로서 충분한 가능성을 보였다.

핵심어 : stroke, focal cerebral ischemia, middle cerebral artery occlusion, stem cell transplantation, cytokine-induced human mesenchymal stem cells, behavioral tests

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	v
표 차례	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
A. 사람의 중간엽줄기세포의 준비	3
B. 동물모델	4
1. 실험동물	4
2. 뇌졸중 동물 모델 제작	4
3. 실험 그룹 및 이식 방법	5
C. 조직학 및 면역조직학적 평가	5
1. 뇌허혈 부위의 부피 측정	5
2. 조직의 처리	6
3. 조직의 염색	6
D. 행동평가검사	8
1. modified Neurological Severity Score(mNSS) test	9
2. Rotarod test	10
3. 통계 처리	10
III. 결과	11
A. 뇌허혈 부피의 측정	11
B. 이식된 세포의 이동과 분화	13
C. 실험동물의 행동평가검사	21

IV. 고찰	25
V. 결론	29
참고문헌	30
영문요약	39

그림 차례

Fig. 1. Photograph showed TTC stained coronal brain sections	12
Fig. 2. Photograph showed LacZ staining in the ischemic area	14
Fig. 3. Laser scanning confocal microscope demonstrated the differentiation of transplanted cytokine-induced human mesenchymal stem cells in the ischemic area at 4 weeks (A-F) and 8 weeks (G-L)	17
Fig. 4. Laser scanning confocal microscope demonstrated the endothelial proliferation in the ischemic boundary zone and ischemic core at 8 weeks after the transplantation	19
Fig. 5. Modified Neurological Severity Score (mNSS) test and Rotarod test	23

표 차 례

Table 1. Points of Modified Neurological Severity Score (mNSS) Test	8
Table 2. Results of mNSS test (points)	21
Table 3. Results of Rotarod test (second)	22

I. 서론

뇌졸중(stroke)은 뇌혈관이 막혀서 국소적인 허혈 또는 경색으로 인하여 유발되며, 노년층에서 장애를 유발하는 주요 원인 중의 하나이다(Ferrer 등, 2001; Steinberg 등, 2004). 이미 손상을 받은 신경조직은 재생이 되지 않기 때문에 현대 의학의 수준에서 뇌졸중에 대한 치료는, 발병 전에는 혈액응고를 예방하는 약을 복용하거나 혈관내 혈전제거술, 발병 후에는 뇌혈관을 문합하는 수술적 치료 그리고 발병 후 신경학적 결손이 유발되었을 시에는 기능향상을 위한 재활치료를 시행하는 등 예방적이고 보존적인 치료 수준에 머무르고 있다(Zivin 등, 2000). 발병 후 즉각적인 의학적 치료에도 불구하고 많은 환자들에게 영구적인 장애를 남기는 뇌졸중은 예방적이고 보존적인 치료뿐만 아니라 손상된 신경조직의 재생 및 기능회복과 같은 적극적인 치료가 요구된다.

최근 신경조직의 기능회복에 있어서 cell-based therapy에 많은 관심이 집중되고 있는 가운데 줄기세포를 이용한 연구가 많아지고 있다(Chopp 등, 2000; Chen 등, 2000; Li 등, 2000; Li 등, 2004). 이론적으로 줄기세포(stem cell)는 자가 생성(self renewal)과 다양한 결합조직(connective tissue)으로 분화될 수 있고 쉽게 뇌혈관장벽(blood brain barrier)을 통과할 수 있어 사람의 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)을 치료하는 데도 가능성이 높아 보인다. 그 중 윤리적 문제에서도 자유롭고 면역학적 거부반응의 문제도 없는 골수의 줄기세포가 많이 이용되고 있다. 골수 유래 중간엽줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cell)는 대략 초기 부착 세포의 1/3 정도가 다분화 능력을 지니고 있으며, 골아세포, 연골아세포, 근육세포, 지방세포, 심근세포 등의 여러 종류의 세포로 분화가 가능하며 성체 골수뿐만 아니라 지방조직, 말초혈액, 체대혈 등에서도 분리가 가능하다(Makino 등, 1999; Pittenger 등, 1999; Jeffery 등, 2004). Johns Hopkins에 의해서 처음 시작된 연구에서 쥐의

골수 줄기세포는 장, 폐, 피부를 구성하는 특정 세포로 발달 될 수 있음이 밝혀졌고 이식된 골수의 줄기세포는 골수를 재구성할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 조직이나 기관을 치료하는 역할도 수행하는 것으로 알려졌다.

특히 최근의 연구에서는 동물실험에서 중간엽줄기세포 이식 후 이식된 세포들이 뇌에서 생존할 뿐만 아니라 손상 부위로 이동하고 신경원, 성상세포 등을 포함한 신경세포로 분화했으며 신경학적 기능도 향상되었음이 발표되었다. 중간엽줄기세포는 허혈성 뇌손상 후 다양한 신경 영양성 인자들(neurotrophic factors)을 분비하며, 허혈성 손상에 노출된 신경세포에 대한 신경보호 효과와 신경재생을 가능하게 한다는 보고도 있다. 그래서 유전자를 조작한 중간엽줄기세포를 이식하거나, 중간엽줄기세포의 이식 후 여러 신경영양성 인자들을 함께 처리하는 연구도 보고 되었다(Chopp 등, 2002; Chopp 등, 2003).

본 연구에서는 아직은 이식 후의 안전성을 확신할 수 없는 유전자 조작 등을 하지 않고, 성장인자를 사용하여 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 뇌허혈을 유발시킨 쥐의 뇌 속에 이식한 후, 허혈부위로의 이동을 관찰하고 이식세포인 인간 자신의 신경원조세포의 활성화 및 유동성을 증가시켜 뇌손상에 대한 신경재생에 직접 참여할 수 있도록 하여, 좀 더 효과적인 신경세포의 재생 및 신경기능의 회복을 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 사람의 중간엽줄기세포의 준비

정상인의 골반에서 국소마취 하에 14G-puncture needle을 이용하여 5ml의 골수 (bone marrow)를 채집한 후 heparin tube에 빠르게 옮겨 담고, 5ml의 phosphate buffering solution(PBS)을 섞어 Ficoll에 띄워 원심 분리하였다(2000rpm, 20℃, 20min). 원심분리 후 단핵구세포만 수집하여 PBS(phosphate buffering solution)로 2차례 세척한 후(1800rpm, 25℃, 5min), 분리된 단핵구세포에 DMEM(10% FBS)를 넣었다. 배양용기(T-75)에 2×10^5 개의 단핵구세포를 이식하여 incubator에서 배양하였다(37℃, 5% CO₂). 며칠 후에 단핵구세포에서 사람의 중간엽줄기세포만을 선택적으로 분리하여 LacZ 염색체를 삽입한 후 다시 배양하였다. 사람의 중간엽줄기세포가 배양용기의 80%이상을 차지하면 세포를 다른 배양용기(T-175)로 옮겨서 계대 배양하였고, 3-4일에 한번씩 배지를 교환하여 5회 정도 계대배양을 실시하였다. 초기 계대배양에서 증식된 사람의 중간엽줄기세포를 이용하여 신경세포로 분화를 유도하였으며, 사람의 중간엽줄기세포가 배양용기에 90%이상을 차지하면 배지를 신경 분화배지로 교체하고 3-4일에 한번씩 여러 가지 cytokine으로 처리하여 배양하였다. 분화 10일째 신경세포로 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 현미경으로 관찰한 후 모아서 PBS으로 두 번 세척한 후 Hanks balanced salt solution(HBSS)에 부유하였다.

B. 동물모델

1. 실험동물

실험동물은 72마리의 무게 230~250g의 성숙한 Sprague-Dawley(Sam: TacN(SD) BR, Korea) 암컷 백서를 대상으로 하였다. 실험동물은 외부와 격리된 20~25℃의 온도를 유지한 동물사육장에서 사료와 물을 자유롭게 공급하며 사육하였다.

2. 뇌졸중 동물모델 제작

400g/kg chloral hydrate를 복강 내 주사(intraperitoneal injection)를 통하여 마취를 시행한 후 목 부위의 정중선을 따라 2cm 정도 절개하였다. 왼쪽 총경동맥(common carotid artery; CCA), 외경동맥(external carotid artery; ECA) 그리고 내경동맥(internal carotid artery; ICA)을 미주신경(vagus nerve)이 손상되지 않도록 조심히 노출시킨 후, 먼저 실을 이용하여 총경동맥, 외경동맥 및 후교통동맥의 말단 부위를 묶어주고, 내경동맥의 말단부위는 느슨하게 묶어준 후 micro clip으로 결찰하고, 외경동맥의 혈관 벽에 가위를 이용하여 작은 구멍을 만들었다. 불을 이용하여 끝부분을 둥글게 만든 4-0 silk suture를 clip을 제거시키면서 작은 구멍을 낸 외경동맥에서부터 내경동맥을 통하여 중뇌동맥을 막을 때까지(2.0-2.3mm) 천천히 밀어 넣었다. 2시간 후에 중뇌동맥을 막았던 silk suture를 제거하여 재관류 시킴으로써 모델을 완성시켰다. 수술적 처치를 시행하는 동안 디지털 온도계를 이용하여 직장 내 온도를 37℃로 유지하도록 하였다.

3. 실험 그룹 및 이식 방법

72 마리의 adult female rats를 무작위로 선정하여 3개의 실험 group으로 나누었다. Group1은 PBS를 주입한 대조군이고(각 7일, 14일, 28일, 56일 n=6씩), group2에는 뇌졸중 유발 후 사람의 중간엽줄기세포를 이식하였고, group3에는 뇌졸중 유발 후 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식하였다.

Group1 (control ; injection of PBS) : n=24

Group2 (injection of human MSC) : n=24

Group3 (injection of cytokines-induced human MSC) : n=24

Transient focal cerebral ischemia를 유발한 후 24시간 뒤에 Chloral hydrate를 복강 내 주사하여 마취시킨 후 꼬리정맥을 통하여 각각의 실험군에 PBS 1ml, 사람의 중간엽줄기세포 1×10^6 cells/1ml HBSS 그리고 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포 1×10^6 cells/1ml HBSS를 이식하였다. 모든 실험동물들에게 면역억제제는 사용하지 않았다.

C. 조직학 및 면역조직학적 평가

1. 뇌허혈부위의 부피 측정

뇌허혈의 확인과 부피 측정을 위해 중뇌동맥의 결찰 후 24시간 뒤에 희생시킨 실험동물로부터 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌는 곧바로 rodent brain matrix (Harvard Instrument Inc., South Natick, MA)에 고정시킨 후 2mm 두께로 coronal section을 시행하였다. Coronal section으로 얻은 6개의 뇌조직을 2%

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC, T-8887, Sigma chemical, Steinheim, Germany) 용액에 넣어 37℃에서 30분간 반응시켰다. TTC염색을 끝낸 후 TTC 용액을 흡입해 내고 뇌조직은 10% 포르말린에 넣어 고정시켰다.

염색된 조직은 스캐너를 사용해 스캔하고, TINA software를 사용하여 뇌경색 부피를 계산하였다.

2. 조직의 처리

세포를 이식했던 동물모델들은 세포이식 후 7, 14, 28, 56일 간격으로 관류 고정하였다. 관류고정은 먼저 chloral hydrate를 복강에 주입하여 마취를 시킨 후 흉곽을 열고 심장을 통하여 헤파린용액이 포함된 생리식염수(0.9% heparinized normal saline)를 관류시켜 혈관내 혈액 성분을 제거하고, 2% paraformaldehyde(in 0.1M PBS, pH 7.4) 250ml~300ml를 관류시켜 뇌를 고정시켰다. 관류고정이 끝난 후 뇌를 적출하여 같은 고정액에서 4℃에서 한 시간 정도 고정하고 30% sucrose 용액에 담가 서서히 용액을 침투시켜 가라앉혔다. 고정된 뇌조직은 이식된 사람의 중간엽줄기세포의 확인과 면역염색을 위해서 슬라이드를 만들었다. 뇌조직은 OCT (optimal cutting temperature gel) compound에 포매하고 동결한 후 cryostat (LEICA CM 3000)를 사용하여 30 μ m두께로 연속 절단하여 gelatin 코팅된 슬라이드에 붙여서 보관하였다.

3. 조직의 염색

뇌허혈에 의한 뇌조직 괴사부위 주변에 있는 세포가 이식된 사람의 중간엽줄기 세포로부터 유래된 세포인지 확인하기 위하여 단일 및 2중 면역형광염색을 시행하였다.

준비된 슬라이드로 이식된 세포의 확인을 위해 LacZ염색을 시행하였다. 각 조직

에 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) solution (2mmol/L MgCl₂, 35mmol/L potassium ferricyanide and 35 mmol/L potassium in PBS)을 가하고 37°C에서 14~18시간동안 배양한 후 eosin으로 대비염색(counter-staining)을 하였다. 대조군으로 세포를 이식하지 않고 허혈만 유발시킨 동물모델의 조직은 Hematoxyline and eosin (H&E)으로 염색하였다. 그 후 통상적인 방법에 따라 에탄올과 크실렌(xylene)의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

실험동물에 이식된 사람의 중간엽줄기세포의 분화여부를 확인하기 위하여 2중 면역형광염색을 실시하였다. 이식된 사람의 중간엽줄기세포와 모델 자체의 세포를 구분하기 위해 1차 항체로 β -galactosidase를 사용하였다. 우선 조직 절편들을 15분씩 3회 세척(1×PBS/0.1 triton X-100)한 후 비특이적 반응을 차단하기 위해 10% normal horse serum(in PBST)으로 2시간 처리하였다. 1차 항체로 β -galactosidase(dilution 1:500, Sigma)를 4°C에서 18시간 반응시키고, 2차 항체는 texas red (1:100; Vector laboratories, Burlingame, CA)를 사용하여 상온에서 2시간 동안 반응 과정을 거쳤다. 이식세포의 분화를 알아보기 위한 이중면역형광염색의 1차 항체는 세포인식표지자로서 신경원에 대하여 Neuronal Nuclear Antigen(NeuN, dilution 1:300 ; Chemicon), 정상세포에 대하여 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP, dilution 1:300 ; Sigma), 혈관내피세포에 대하여 anti-von Willebrand Factor(vWF, dilution 1:30, Sigma), Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF, dilution 1:100, Santa Cruze) 그리고 basic Fibroblast Growth Factor(bFGF, dilution 1:100, Santa Cruze)를 사용하여 4°C에서 18시간 반응시키고, 그 후에 2차 항체로 FITC(1:100 Sigma)를 사용하여 상온에서 2시간 동안 반응과정을 거쳤다. 신생혈관의 평가는 강력한 신생혈관 성장촉진인자인 VEGF(vascular endothelial cell growth factor)와 vWF(von Willebrand Factor)를 사용하여 면역염색을 시행하였다. 각각의 검출은 DAB(diaminobenzidine)를 이용하여 반응시킨 후 양성반응을 관찰하였다. 염색된 조직은 laser-scanning confocal microscope하에서 관찰하였다.

D. 행동평가검사

Modified Neurological Severity Score(mNSS) test(Table 1) 와 Rotarod test를 이용하였다.

Table 1. Points of Modified Neurological Severity Score (mNSS) Test

Motor Test			
Raising rat by the tail			
Flexion of forelimb			1
Flexion of hindlimb			1
Head moved more than 10 degree to vertical axis within 30 second			1
Sensory Test			
Placing test (visual and tactile test)			
Visual	table top	Normal placing of the limb on the table	0
		Delayed placing (< 2 second)	1
		No or very delayed placing (> 2 second)	2
	table side	Normal placing of the limb on the table	0
		Delayed placing (< 2 second)	1
		No or very delayed placing (> 2 second)	2
Tactile	Normal placing of the limb on the table		0
	Delayed placing (< 2 second)		1
	No or very delayed placing (> 2 second)		2
Proprioceptive	Pushing the paw against the table edge to stimulate limb muscles	spontaneous	0
		response	1
		no response	2
Maximum points			11

1. modified Neurological Severity Score(mNSS) test

Modified Neurological Severity Score test는 neurological function을 측정하기 위한 구성표이다. 운동(muscle status)과 감각(visual, tactile and proprioceptive) 항목으로 평가하였다. 점수가 높을수록 기능 이상의 정도가 심한 것으로 정상은 0 점, 가장 심한 신경장애 점수는 11점이다.

정상적인 실험동물의 경우는 꼬리를 잡고 지면에서 15cm정도 들어 올렸을 때, 양 다리를 신전하면서 바닥을 주시하는 자세를 취하며 어떠한 신경학적 이상도 보이지 않았다. 그러나 중뇌동맥 결찰로 뇌허혈이 성공적으로 유발된 동물은 특징적인 자세를 취하였다. 실험동물들을 꼬리를 잡고 지상으로 들어 올렸을 때, 몸을 뇌허혈이 유발된 부분의 반대방향으로 뒤틀면서 올라오고(C-shaped lateral bending of the body) 앞발이나 뒷발이 굴곡된 자세를 취하기도 하였다.

탁자 위에 앞발을 올려놓음으로써 각 앞발의 감각-운동 기능을 평가하는 forelimb placing test는 visual, tactile & proprioceptive stimuli를 포함하여 시행하였다. Visual limb placing test는 실험동물을 가볍게 쥐고 테이블 표면과 눈높이를 맞추어 테이블 방향으로 천천히 다가가면서 테이블 표면에 앞발이 접촉할 때 반응을 관찰하는 것이다. 정상의 경우에는 앞발이 테이블 표면에 닿게 되면 테이블 위로 앞발을 뺄으며 올려 놓게 되지만 이상이 있는 경우에는 앞발이 테이블 표면에 닿아도 반응하지 않았다. 실험동물을 테이블 모서리와 같은 눈높이로 향하여 측면으로 움직이면서 앞발을 접촉하게 하는 실험도 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

Tactile/proprioceptive limb placing test는 실험동물을 테이블 모서리에 평행하게 움직이지 못하게 고정시킨 후 앞발을 테이블의 모서리 측면에 가볍게 접촉하도록 테이블 아래로 떨어뜨렸다. 정상의 경우는 앞발이 테이블 모서리에 가볍게 접촉되자마자 앞발이 있던 원상태로 돌아가지만, 이상이 있는 경우에는 접촉 후에도 앞발을 테이블 모서리 아래로 떨어뜨린 상태로 그대로 있었다. 실험동물이 접촉에 반응을 보이지 않는 경우에는, 테이블 모서리에 내려져 있는 앞발에 약하게 또는 강하게 일정한 자극을 주어서 반응을 보이는지 관찰하였다.

각각의 실험은 이식 후 1, 3, 7, 14, 28, 56일에 실시하였으며 3번씩 반복하였다. 실험동물의 얼굴이 접촉에 의하여 자극받는 것을 피하기 위해 실험동물의 턱을 고정시켜 머리를 45° 정도로 들어 올려 실험하였다.

2. Rotarod test

Rotarod test는 동물모델의 균형능력과 전정-운동 기능을 알 수 있는 확실한 척도이다. 모든 실험동물은 뇌허혈을 유발하기 위한 시술 3일 전부터 매일 3회 연습을 시키고 학습이 잘된 동물을 선별하여 뇌허혈동물모델을 만들었다.

실험동물을 고무표면으로 된 회전봉(직경 3cm)에 올려놓고 가속화되는 (4-40rpm) 회전봉에서 낙하할 때까지의 시간을 측정하였다. 실험은 동물모델이 봉에서 완전히 떨어지거나, 봉을 붙잡고 늘어지게 되면 끝났다. 한번 시행할 때의 최장 관찰 시간은 5분간으로 하고 3회 시행하여 3번의 평균성적을 집계하였다.

3. 통계 처리

Modified Neurological Severity Score test 와 Rotarod test에 의하여 얻은 수치를 SPSS[®]를 이용하여 반복 측정된 자료의 분산분석법(repetitive measure of ANOVA)을 통하여 통계 처리하였다. 수치는 mean values \pm standard error of the mean(S.E.M.)으로 표시하였고, *p*값이 0.05미만인 경우를 통계적 의미가 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

A. 뇌허혈 부피의 측정

뇌졸중 모델을 만든 후 24시간 후에 뇌를 적출하고, 적출한 뇌는 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색에 의해 뇌의 손상여부와 부위를 확인하였다. TTC 염색은 세포내의 정상 mitochondrial oxidative enzyme system과 반응하여 염색되는데, 뇌허혈 손상을 받아서 mitochondria가 손상되면 oxidative system이 파괴되어 염색이 되지 않아 흰색을 나타내므로 뇌의 손상부위를 구별할 수 있었다. 중뇌동맥결찰에 의해 유발된 손상은 주로 왼쪽 뇌의 피질부위와 선조체 부위에 발생하였고(Fig. 1), 각 group 간의 뇌허혈 부피에는 큰 차이가 없었다. 손상부위의 크기는 스캐너로 스캔한 후 컴퓨터로 TINA software를 사용하여 측정하였고 측정결과는 평균 $312.02 \pm 40.76 \text{ mm}^3$ 이었다.



Fig. 1. Photograph showed TTC stained coronal brain sections. Brain slices (2mm thick) stained by the TTC solution 24 hours after the development of transient focal cerebral ischemia. The lesion of cerebral ischemia was visualized as the white area in contrast to the normal red-stained area. The development of cerebral ischemia was limited in the left cortex and striatum.

B. 이식된 세포의 이동과 분화

LacZ-expressing donor-derived cell을 알아내기 위하여 LacZ염색을 시행하였다. 사람의 중간엽줄기세포의 이식후 생존은 LacZ염색에 양성반응을 보이는 것으로 정의하였다. 대부분의 LacZ염색에 양성반응을 보인 세포들은 손상부위로 이동하여 뇌허혈의 중심부분(ischemic core)과 뇌허혈과 정상뇌조직의 경계부위(ischemic boundary zone)에 위치하고 있었으며(Fig. 2. A, B), 손상부위의 반대측에서는 일부의 세포들이 혈관부위에서 관찰되었다(Fig. 2. C, D, E).

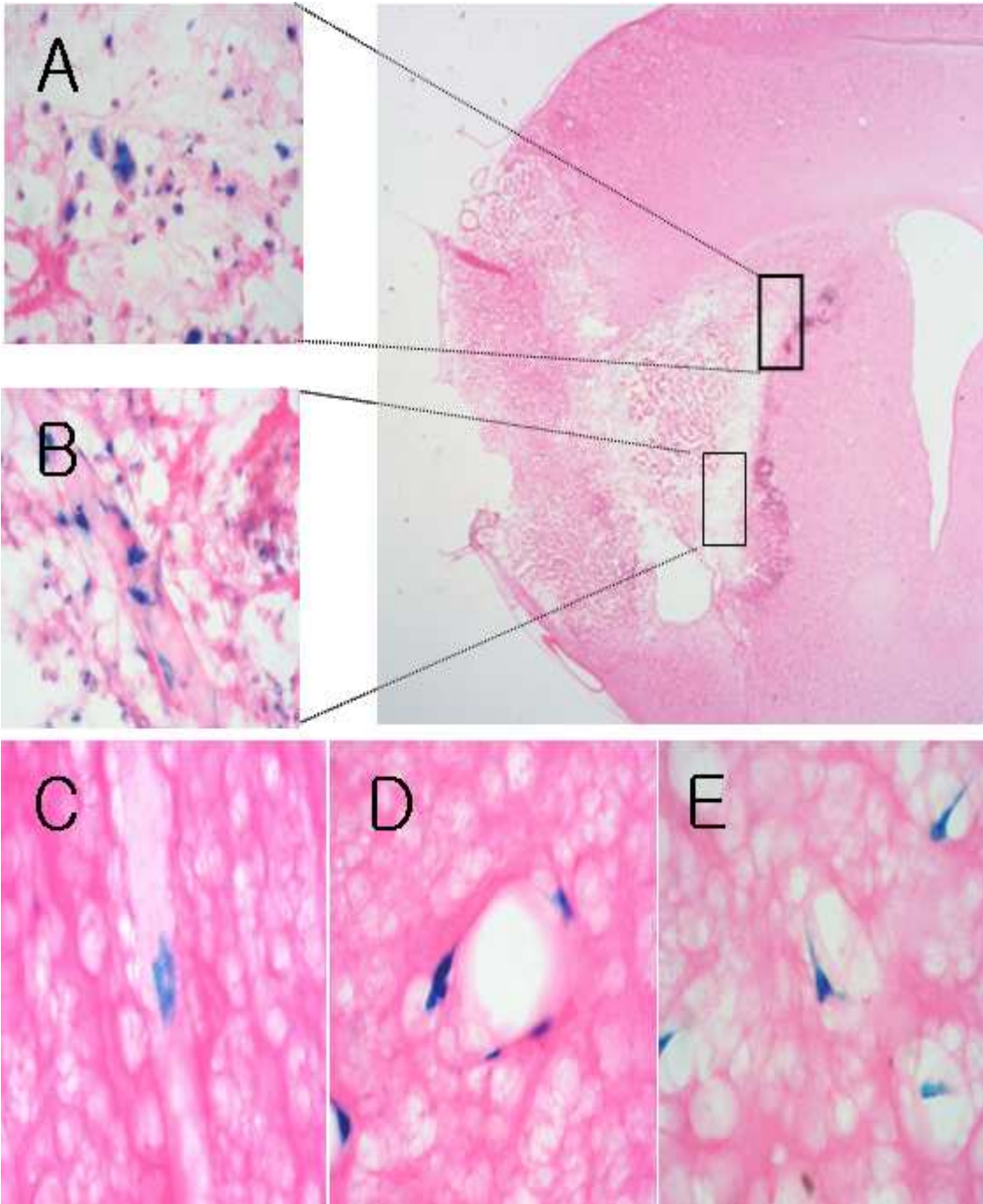


Fig. 2. Photograph showed LacZ staining in the ischemic area. These brain sections were obtained from a rat that was transplanted cytokine-induced human mesenchymal stem cells at 8 weeks after the transplantation. Cytokine-induced human mesenchymal stem cells (cells stained with blue) had migrated and survived to the ischemic area, especially ischemic boundary zone (A, B). Cytokine-induced human mesenchymal stem cells were observed in vessels on contralateral hemisphere of the rat brain (C, D, E).

이식한 세포의 분화여부를 확인하기 위해 2중 면역형광염색을 실시했다. 일부의 β -galactosidase에 염색된 세포들이 손상부위와 뇌허혈 경계부위에서 신경원의 표지자(neuronal marker)인 NeuN에 양성반응을 보였으며(Fig. 3, A-I), 성상세포 표지자(astrocytic marker)인 GFAP에 양성반응을 보이는 약간의 세포들이 뇌허혈 경계부위에서 관찰되었다(Fig. 3, J-L). 이것으로 이식된 세포 중 일부가 신경원과 성상세포로 분화하였음을 관찰할 수 있었다. NeuN에 양성반응을 보인 세포들이 이식 후 4주에는 세포표지자에 양성을 보였더라도 형태학적으로는 분화가 완전하지 않은 원형세포의 모습을 보였다(Fig. 3, F). 그러나 이식 후 8주에는 형태학적으로도 신경원세포의 모습을 갖추고 있었다(Fig. 3, I).

또한, 이식한 세포는 손상 부위에서 혈관내피세포 표지자(mature endothelial cell marker)인 vWF의 2중 면역형광염색에 양성을 보여서 혈관내피세포(endothelial cell)의 형태적 특징을 나타내는 것으로 관찰되었고(Fig. 4, A-C), 혈관생성인자들인 VEGF(Fig. 4, D-F)와 bFGF(Fig. 4, G-I)에도 양성반응을 보였다.

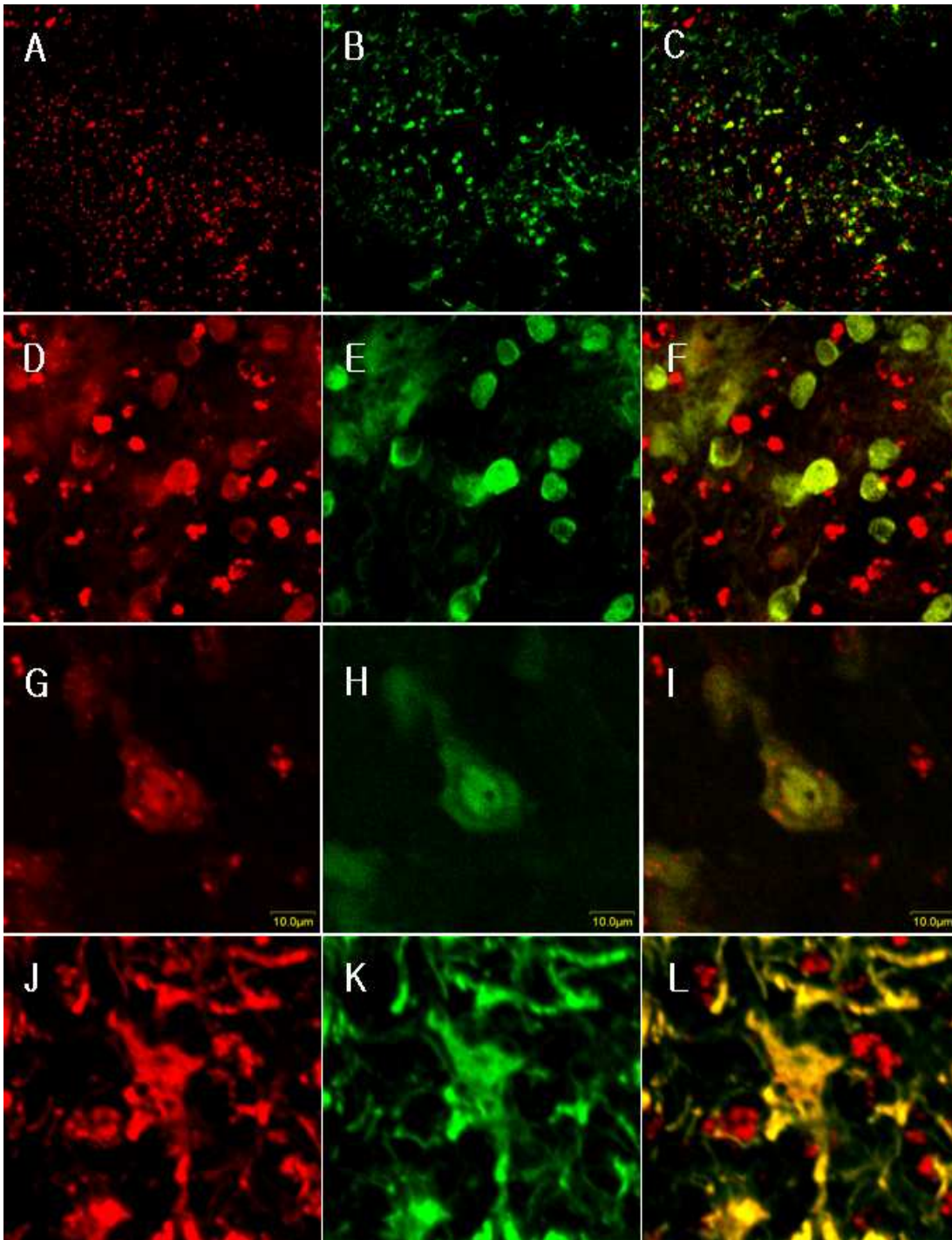


Fig. 3. Laser scanning confocal microscope demonstrated the differentiation of transplanted cytokine-induced human mesenchymal stem cells in the ischemic area at 4 weeks (A-F) and 8 weeks (G-L). Brain sections were stained first with the anti- β -galactosidase antibody (cells stained with red, A, D, G, J) to identify cytokine-induced human mesenchymal stem cells and then stained second with the anti-NeuN to identify neuron (cells stained with green, B, E, H) and anti-GFAP to identify astrocyte (cells stained with green, K). β -galactosidase positive human mesenchymal stem cells were immunoreactive for NeuN (cells stained with yellow in C, F at 4 weeks and I at 8 weeks after transplantation) and for GFAP (cells stained with yellow L at 8 weeks after transplantation). On the fourth week after the transplantation, it was immunoreactive for neuronal marker (NeuN) but it was not the fully-formed neuron (cells stained with yellow in C, F). While, on the eight week, it was morphologically neuron. This means, the differentiation was successfully performed (cells stained with yellow in I).

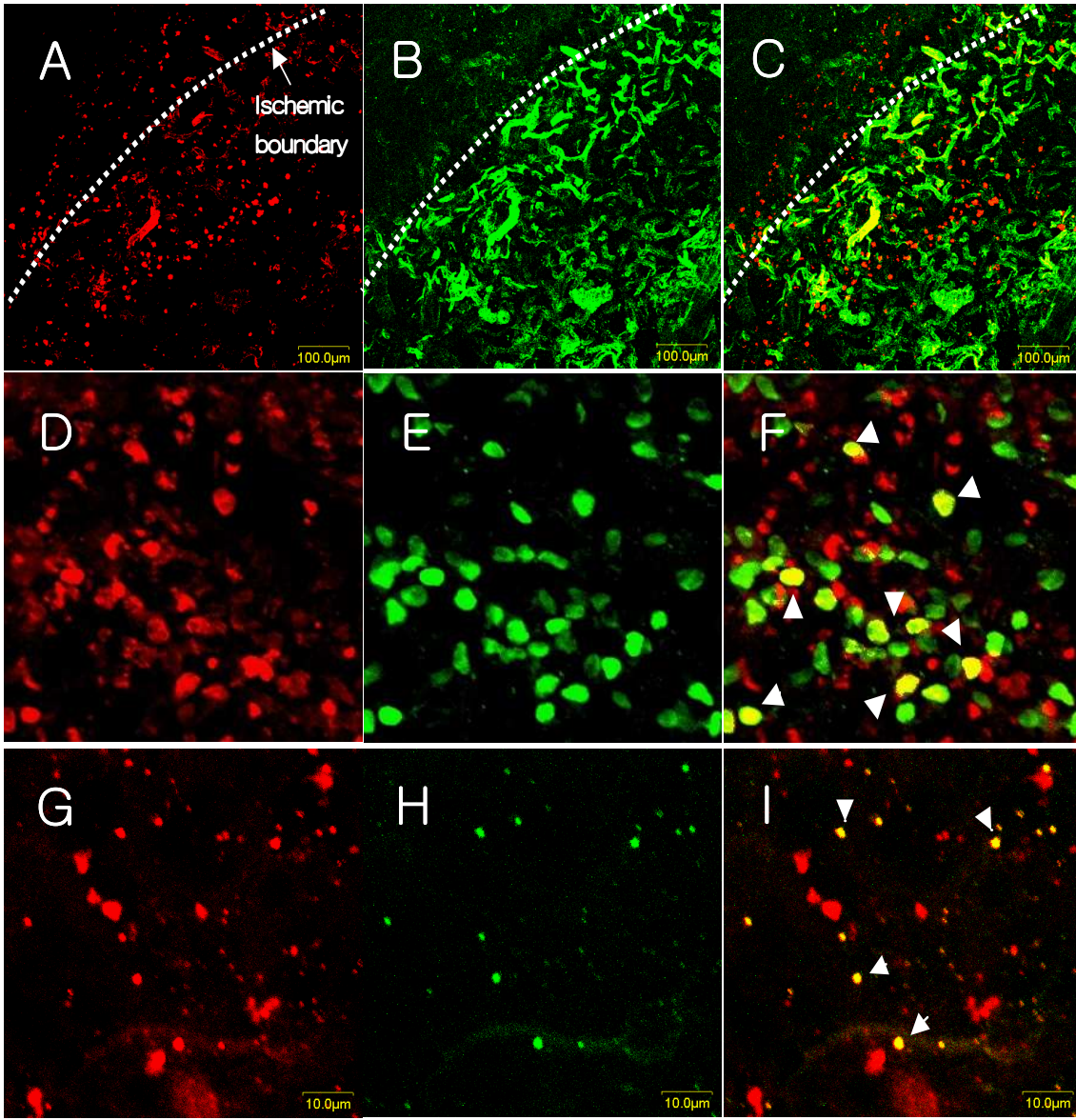


Fig. 4. Laser scanning confocal microscope demonstrated the endothelial proliferation in the ischemic boundary zone and ischemic core at 8 weeks after the transplantation. Brain sections were stained with the β -galactosidase (red, A,D,G), vWF (green, B), bFGF (green, E), VEGF (green, H). β -galactosidase positive cytokine-induced human mesenchymal stem cells were immunoreactive for vWF (endothelial cell marker) staining (yellow, C), bFGF staining in ischemic boundary zone (arrow head, F) and VEGF staining in ischemic area (arrow head, I).

C. 실험동물의 행동평가검사

Modified Neurological Severity Scores test와 Rotarod test를 이용하여 행동평가검사를 시행하였다. 상기 검사는 세포를 이식한지 1, 3, 7, 14, 28, 56일 뒤에 각각 시행하였다.

mNSS test에서 group1은 뇌허혈을 유발시킨 1일 후 평균 8±0점에서 28일 후 평균 6.5±0.3점, 56일 후 평균 6±0점으로 감소하였고, group2는 1일 후 평균 8.8±0.5점에서 28일 후 평균 6.2±0.4점, 56일 후 평균 5.8±0.2점으로 감소하였고, group3은 1일 후 평균 8.8±0.6점에서 28일 후 평균 5±0점, 56일 후 평균 5±0점으로 감소하여, 모든 group에서 통계적으로 의미있게 감소하였다($p<0.000$). 뇌허혈 유발부터 56일 후 group1은 1일째 평균 8±0점에서 평균 6±0점으로 평균 2±0점이 감소되어 행동기능이 1일째에 비교하여 25%의 호전을 보였고, group2는 평균 8.8±0.5점에서 평균 5.8±0.2점으로 평균 3±0.58점이 감소되어 34%의 행동기능 호전을 보였으며, group3에서는 평균 8.8±0.6점에서 평균 5±0점으로 평균 3.7±0.6점으로 감소하여 43.4%의 행동기능 호전을 보였다($p<0.000$)(Table 2)(Fig. 5, A, B).

Table 2. Results of mNSS test (points)

Group	0d	1d	3d	7d	14d	28d	56d	Improvement [‡]
1(n=4) ^a	0	8±0	8±0	6.5±0.3	6.5±0.3	6.5±0.3	6±0	2±0 (25%)
2(n=5) ^b	0	8.8±0.5	7.6±0.4	6.6±0.5	6.4±0.5	6.2±0.4	5.8±0.2	3±0.58 (34%)
3(n=4) ^c	0	8.8±0.6	7.3±0.5	6±0	5.3±0.3	5±0	5±0	3.7±0.6 (43.4%)

Improvement[‡] means that the comparison between first day and 56th day with the arabic number and the percentage that indicates the improvement ratio comparing the first day assessment. $p^a=0.745$ vs. Group2, $p^b=0.023$ vs. Group3, $p^c=0.031$ vs. Group3. The data are mean values ± standard error of the mean(S.E.M.).

Rotarod test에서 group1은 뇌허혈을 유발 시킨 1일 후 평균 58±2.3초에서 28일 후 평균 160.5±3.2초, 56일 후 평균 208±9.5초로 증가하였고, group2는 1일 후 평균 63.2±9.4초에서 28일 후 평균 174.6±12.8초, 56일 후 평균 205.8±10.1초로 증가하였고, group3은 1일 후 평균 46.8±17.8초에서 28일 후 평균 211.3±23.9초, 56일 후 250.5±22.5초로 증가하여 모든 group에서 통계적으로 의미있게 증가하였다 ($p<0.000$). group1은 56일 뒤 평균 58±2.3초에서 평균 208±9.5초로 평균 150±5.2초 증가하여 258.6%의 호전을 보였고, group2는 평균 63.2±9.4초에서 평균 205.8±10.1초로 평균 142.6±15.9초 증가하여 225.6%의 호전을 보였으며, group3은 평균 46.8±17.8초에서 평균 250.5±22.5초로 203.7±19.2초 증가하여 435.8%의 호전을 보였다($p<0.000$)(Table 3)(Fig. 5, C, D).

Table 3. Results of Rotarod test (second)

Group	1d	3d	7d	14d	28d	56d	Improvement [‡]
1(n=4) ^a	58±2.3	81±1.7	124±2	137.5±1.2	160.5±3.2	208±9.5	150±5.2 (258.6%)
2(n=5) ^b	63.2±9.4	100.2±22.7	145±11.5	157±9.5	174.6±12.8	205.8±10.1	142.6±15.9 (225.6%)
3(n=4) ^c	46.8±17.8	140.5±29.6	170.5±29.5	193±19.8	211.3±23.9	250.5±22.5	203.7±19.2 (435.8%)

Improvement[‡] means that the comparison between first day and 56th day with the arabic number and the percentage that indicates the improvement ratio comparing the first day assessment. $p^a=0.446$ vs. Group2, $p^b=0.019$ vs. Group3, $p^c=0.05$ vs. Group3. The data are mean values ± standard error of the mean(S.E.M.).

mNSS test에서 group3이 group1보다 통계적으로 의미 있게 호전되었으며 ($p=0.023$), group3이 group2보다 통계적으로 의미 있게 호전되었다($p=0.031$). Rotarod test 또한 group3이 group1과 group2보다 통계적으로 의미있게 신경기능이 호전되었다($p=0.019$, $p=0.05$)(Fig. 5).

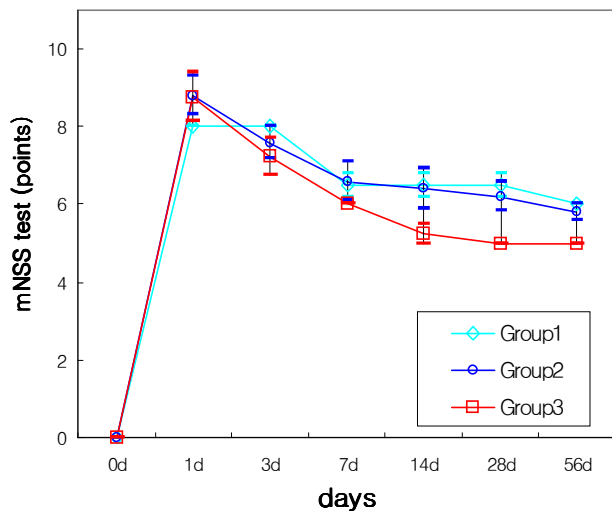
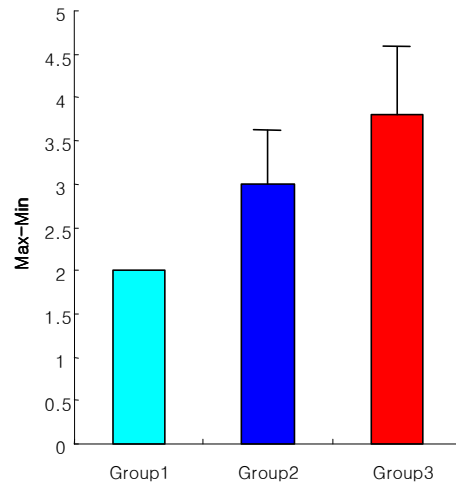
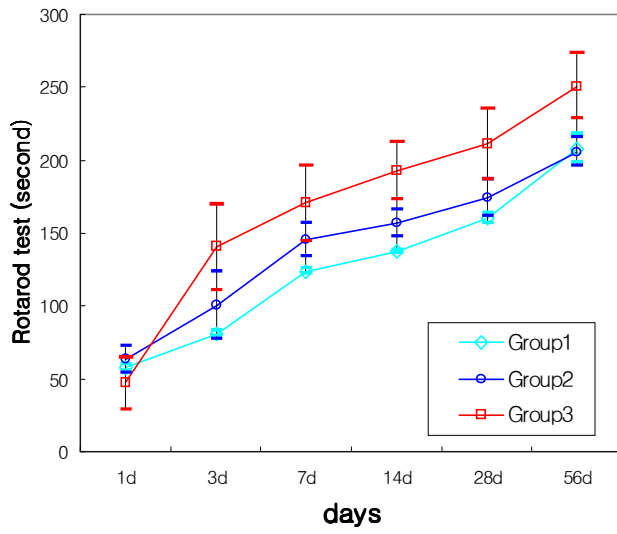
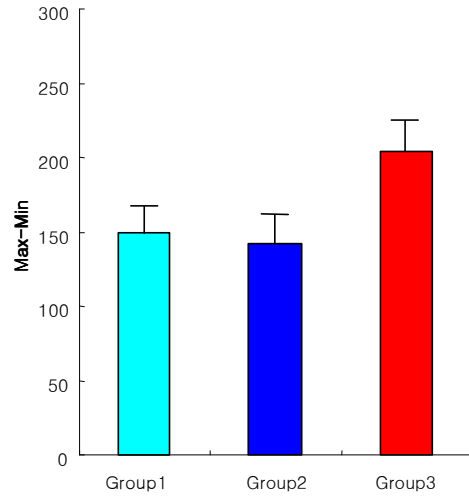
A**B****C****D**

Fig. 5. Modified Neurological Severity Score (mNSS) Test and Rotarod

Test. Behavioral assessment after MCA occlusion was evaluated by modified Neurological Severity Scores test and Rotarod test for group 1 (control, n=4), group 2 (transplanted by human mesenchymal stem cells, n=5) and group 3 (transplanted by cytokine-induced human mesenchymal stem cells, n=4). The decrease of the scores on mNSS test was statistically more significant at the 56th day after development of ischemia comparing to the scores at the 1st day of the development of ischemia in all groups ($p < 0.000$)(A, B). The improvement of the scores on mNSS was statistically more significant in group 3 than those of group 1 ($p = 0.023$), while group 3 was statistically more significant than group 2 after transplantation ($p = 0.031$)(A). The increase of scores on Rotarod test was statistically more significant at the 56th day comparing to the scores at the 1st day of the development of ischemia in all groups ($p < 0.000$)(C). The improvement of the scores on Rotarod test was statistically more significant in group3 than those of group1 ($p = 0.019$), and group3 than group2 ($p = 0.05$) after transplantation (D). The data are mean values \pm standard error of the mean(S.E.M.).

IV. 고찰

본 연구에서 허혈을 유발시킨 동물모델에 아무것도 처리하지 않은 사람의 중간엽줄기세포 보다는 성장인자를 이용하여 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식하는 것이 이식 세포의 손상된 부위로 이동율과 신경 세포로의 분화율을 더 높여서 더 효과적인 신경 기능의 회복이 되는지 알아보려고 하였다. 중간엽줄기세포를 정주하기 때문에 어디든 갈 수 있고 어떤 세포든지 분화할 수 있는 능력 때문에 신경세포로 분화 유도된 세포를 이식한다면 아무것도 처리하지 않은 중간엽줄기세포보다는 뇌 손상부위의 이동율과 신경세포로의 분화율도 더 높아져서 신경기능회복에 더 도움이 될 것으로 사료되었다. 허혈만을 유발시켰을 때에도 성장인자의 분비가 관찰되므로 신경세포로 분화 유도된 세포를 이식했을 때 혈관생성을 유도하는 VEGF나 bFGF의 분비가 더 늘어날 것이라고 예상하지만 이번 실험에서는 발현양상만을 보았을 뿐 늘어난다는 증거를 보이지는 못하였다. 다만 행동평가검사의 결과에서 신경세포로 분화 유도된 세포를 이식했을 때의 신경기능의 회복도가 높았기 때문에 어느 정도 많은 영향을 주었을 것으로 예상되었다.

사람의 중간엽줄기세포와 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포가 이식 후 8주 후에도 생존하면서 신경세포로 분화가 되었고 신경기능 또한 향상된 것을 관찰하였다. 이식된 사람의 중간엽줄기세포는 주로 뇌허혈부위와 정상 뇌조직과의 경계부위에서 관찰되었다. 또한 신생혈관 생성에 관계된 인자들의 지표인 VEGF가 면역형광염색에 의해 양성반응을 나타냈고, 2중 면역형광염색에서 von Willebrand Factor(vWF)가 관찰되었는데, 이는 손상부위에서의 신생혈관형성을 보여주고 있었다.

여러 저자에 의하여 이식된 줄기세포가 뇌허혈부위에 동화(integration)되고 손상된 뇌조직을 재생한다는 것이 밝혀졌으며, Zhao 등은 이식된 사람의 중간엽줄기세

포가 rodent 뇌에서 생존하면서 신경원이나 정상세포 등으로 분화함을 보고하였다 (Zhao et al., Satoshi et al., 2003). 본 실험에서도 사람의 중간엽줄기세포와 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포가 이식 후 8주 후에도 생존하면서 신경세포로 분화 되고 신경기능이 향상되는 것을 관찰하였다. 이식된 사람의 중간엽줄기세포는 주로 뇌허혈부위와 정상 뇌조직과의 경계부위에서 관찰되었고 신경원과 정상세포로 분화되었음을 관찰하였다.

이론적으로 줄기세포는 모든 세포로 분화될 수 있기 때문에, 이들의 분화 메커니즘을 이해하고 원하는 세포로 분화시킬 수 있다면 난치병의 상당 부분을 치료할 수 있는 가능성이 있을 것으로 예상된다. 본 실험에서 행동평가검사 결과, 사람의 중간엽줄기세포 또는 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 군이 대조군보다 신경기능이 통계적으로 의미 있게 호전되었으며, 사람의 중간엽줄기세포 보다는 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 군이 가장 좋은 신경기능 회복을 보였다. 이러한 결과는 난치병 치료의 가능성을 뒷받침하는 것으로 사료된다.

Sanchez-Ramos 등은 reinoic acid, brain derived neurotrophic factor(BDNF) 등을 이용하여 골수 유래 중간엽줄기세포가 생체 외에서도 신경세포로 분화할 수 있다고 보고하였다. 생체 외에서 신경세포로 분화 유도를 하여 이식함으로써 손상부위에서 신경세포로의 분화율을 높이고 또한 손상된 세포를 대체해 VEGF나 bFGF 등의 성장 인자 등을 국소부위에서 지속적으로 분비하는 역할을 할 수 있을 것이라고 생각한다. 그러나 혈관의 형성이 있어야 손상된 부위에서의 이식된 세포의 생존과 재생 및 반흔 형성을 억제시킬 수 있다(Li et al., 2002). 이식된 중간엽줄기세포 또한 VEGF나 bFGF와 같은 혈관형성인자들을 분비하여 뇌허혈 손상으로부터 혈관내피세포를 보호하고, 신생혈관을 만들어내어 신경학적 기능을 회복하고 향상시키는 데 관여할 것이며 이러한 중간엽줄기세포의 이식은 endogenous brain repair mechanism을 촉진시킬 수 있을 것이다(Satoshi et al., 2003; Chen et al., 2003). 최근 들어 혈관을 형성하는 세포의 분자학적 기전이 밝혀짐에 따라, 혈관형

성인자, 또는 혈관형성인자를 만드는 유전자를 허혈부위에 투여하여 혈관의 형성을 증진시킴으로써 허혈성 질환을 치료하고자 하는 새로운 시도가 이루어지고 있다.

주입한 또는 유전자로부터 만들어진 혈관형성인자가 전신적인 순환을 하여 원하지 않는 다른 부위에 혈관형성을 증가시킬 수 있기 때문에 혈관생성은 일시적으로 일어나는 것이 아니고 일정시간 이상 특정부위에 VEGF나 bFGF의 농도가 유지되어야 한다는 측면에서 본다면 세포를 분화 유도하여 이식하는 것이 효과적일 것이다.

행동평가검사의 결과에서 사람의 중간엽줄기세포 또는 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 group2와 group3이 대조군인 group1보다 신경기능이 통계적으로 의미 있게 호전되었으며, 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 group3이 가장 효과적인 신경기능 회복을 보였다. 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포가 손상 부위에서 신경 세포로 분화하고 성장인자를 분비하여 혈관을 생성시켜 신경기능의 회복을 도모했다고 추측하지만 VEGF나 bFGF를 제외한 다른 인자들도 신경기능의 회복에 관여하지 않았다고 할 수 없기 때문에 좀더 오랜 기간 관찰 및 평가가 필요할 것으로 사료된다(Zhang et al., 2000).

본 실험에서는 뇌졸중 쥐 모델을 만든 후 많은 쥐들이 죽어서 마지막까지 생존한 실험쥐 수(n)가 적었고, 대조군과 실험군간의 형태학적인 비교분석의 결여 그리고 각 group간 행동평가 검사상의 차이를 형태학적인 차이와 연관시키지 못한 점은 아쉬운 부분이라고 할 수 있다. 따라서 향후 형태학적인 차이를 평가하기 위해서는 이식된 사람의 중간엽줄기세포와 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포의 정량적인 평가와 이를 바탕으로 행동평가검사결과와의 연관성을 비교 분석해야 할 것으로 사료된다. 실험쥐의 생존율이 낮았던 이유는 뇌졸중발생부위를 크게 만들었기 때문이다. 즉, 뇌허혈부위를 크게 만들면 신경학적 결손이 심하게 발생되므로 결과를 비교, 분석하기에 용이하나 실험동물이 질환자체를 견디지 못하여 생존율이 낮아지게 되고, 실험동물의 생존율을 높이기 위하여 뇌허혈부위를 적게 만들면 신경학적 결손이 미약하게 발생하므로 결과를 평가하고 도출해내기가 어려워

진다. 따라서 필요한 국소부위만 뇌허혈을 유발시켜 신경학적 결손을 발생시키는 모델을 개발하거나, 미세한 신경학적 결손을 평가할 수 있는 행동평가검사가 필요할 것으로 사료된다. 본 실험에서는 행동평가검사를 2가지 기준(mNSS test와 Rotarod test)으로만 시행하였고, 주된 척도인 mNSS test도 최고 11점으로만 평가하여 동물의 신경학적 기능을 평가하고 반영하는데 부족함이 있었다. 따라서 신경기능의 손상정도 및 회복정도를 측정할 수 있도록 행동평가검사를 좀 더 다양하고 세분화해서 동물의 신경기능의 변화를 명확하고 섬세하게 반영할 필요가 있을 것으로 여겨진다.

V. 결 론

뇌허혈을 유발시킨 쥐에 신경세포로의 분화를 촉진하는 성장인자를 처리하여 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식하여 신경세포의 재생 및 허혈부위로의 이동을 관찰하고 신경기능의 회복을 평가한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

쥐의 꼬리정맥을 통하여 이식된 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포는 신경세포의 손상부위로 이동하여 신경원과 성상세포 및 혈관내피세포로 분화되었다. 이식 후 시행한 행동평가검사에서 이식 28일과 56일 후 모두에서 신경학적 결손이 대조군과 비교하여 통계적으로 의미 있게 호전되었으며, 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 경우가 분화 유도하지 않은 사람의 중간엽줄기세포를 이식한 것보다 통계적으로 의미 있는 기능의 호전을 보였다.

본 실험을 통하여 신경세포로 분화 유도된 사람의 중간엽줄기세포 이식이 뇌졸중을 비롯한 퇴행성 신경계 질환들에 대한 잠재적 치료법으로써 가능성이 있음을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Borlongan CV, Hida H, Nishino H: Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery. *Neuroreport* 9(16):3615-3621, 1998
2. Callaway JK, Knight MJ, Watkins DJ, Beart PM, Jarrott B, Delaney PM: A novel rapid, computerized methods for quantitation of neuronal damage in a rat model of stroke. *J Neurosci Methods* 102:53-60, 2000
3. Chen J, Li Y, Chopp M: Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 39:711-716, 2000
4. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M: Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 73:778-786, 2003
5. 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* 32:1005-1011, 2001
6. Chen J, Li Y, Zhang R, Katakowski M, Gautam SC, Xu Y, Lu M, Zhang Z, Chopp M: Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor

and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res* 1005:21-28, 2004

7. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M: Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32:2682-2688, 2001
8. Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M: Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 22:275-279, 2002
9. Chu K, Kim M, Chae SH, Jeong SW, Kang KS, Jung KH, Kim JH, Kim YJ, Kang L, Kim SU, Yoon BW: Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 50:459-465, 2004
10. Chu K, Kim M, Jeong SW, Kim SU, Yoon BW: Human neural stem cells can migrate, differentiate and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci. Lett* 343:129-133, 2003
11. Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, Marti E, Ambrosio S, Arenas E: Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol* 101:229-238, 2001
12. Hess DC, Hill WD, Studdard AM, Carroll J, Brailer J, Carothers J: Bone

marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33:1362-1368, 2002

13. Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA: Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39:806-816, 2000
14. Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, Shimazaki T, Onodera M, Okano H, Mizusawa H: Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J Neurosci Res* 78:215-223, 2004
15. Jeff B, Garry C, Dale C: Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci* 24:1245-1254, 2004
16. Jeffrey MR, Janette MK: New roles for VEGF in nervous tissue-beyond blood vessels. *Exp Neurology* 187:246-253, 2004
17. Jennifer MP, Ruowen L, Tsu WW, Faye SS, Jack MP: Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiology of disease* 16:585-595, 2004
18. Jiang W, Gu WG, Brannstrom T, Rosqvist R, Wester P: Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32:1201-1207, 2001

19. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS* 99:11946–11950, 2002
20. Kawamata T, Dietrich WD, Schallert T, Gotts JE, Cocke RR, Benowitz LI, Finklestein SP: Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. *Neurobiology* 94:8179–8184, 1997
21. Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, MA M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK: Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *PNAS* 101:11839–11844, 2004
22. Khan SH, Baziany A, Banigesh A, Hemmings SJ, Shuaib A: Evaluation of an optimal temperature for brain storage in delayed 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *J Neurosci Methods* 98:43–47, 2000
23. Li F, Liu KF, Siva MD, Omae T, Sotak CH, Fenstermacher JD, Fisher M: Transient and permanent resolution of ischemic lesion on diffusion-weighted imaging after brief periods of focal ischemia in rats. *Stroke* 31:946–954, 2000
24. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowaki M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M: Human marrow stromal cell

therapy for stroke in rat. *Neurology* 59:514-523, 2002

25. Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M: Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56:1666-1672, 2001
26. Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M: Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurolo Sci* 156:119-132, 1998
27. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M: Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 12(3):559-563, 2001
28. Mathews KS, McLaughlin DP, Ziabari LH, Toner CC, Street PC, Hisgrove E, Bezzina L, Stamford JA: Rapid quantification of ischemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *J Neurosci Methods* 102:43-51, 2000
29. Modo M, Stroemer RP, Tang E, Patel S, Hodges H: Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 33:2270-2278, 2002
30. Panya SM, Catherine JF, Paul JM, Robert LS, Patrick DL: Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: The

clean-up hypothesis. *J cereb Blood Flow Metabol* 21:1223-1231, 2001

31. Ren JM, Kaplan PL, Charette MF, Speller H, Finklestein SP: Time window of intracisternal osteogenic protein-1 in enhancing functional recovery after stroke. *Neuropharmacology* 39:860-865, 2000
32. Riess P, Zhang C, Saatman KE, Laurer HL, Longhi LG: Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury. *Neurosurgery* 51:1-10, 2002
33. Ryck MD, Reempts JV, Duytschaever H, Deuren BV, Clincke G: Neocortical localization of tactile/proprioceptive limb placing reactions in the rat. *Brain Res* 573:44-60, 1992
34. Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR: Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma(hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neurosci* 91:519-525, 1999
35. Satoshi I, Osamu H, Kiyohiro H, Kazuo H, Jeffery DK: A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res* 1007:1-9, 2004
36. Savitz S, Rosenbaum DM, Dinsmore JH, Wechsler LR, Caplan LR: Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol* 52:266-275, 2002

37. Shichinohe H, Kuroda S, Lee JB, Nishimura G, Yano S, Seki T, Tamura M, Iwasaki Y: In vivo tracking of bone marrow stromal cells transplanted into mice cerebral infarct by fluorescence optical imaging. *Brain Res Protocols* 13:166-175, 2004
38. Sun Y, Jin k, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA: VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest* 111:1843-1851, 2003
39. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: Focal cerebral ischemia in the rat : 1. description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1:53-60, 1981
40. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI: Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regulatory Peptides* 117:3-10, 2004
41. Tim W, Matthias B, Ilker E, Konstantin P, Marco P, Francisco FK, Matthias H, Ingo B, Robert N, Helmut K, Ulrich D, Josef P: Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23:5004-5011, 2003

42. Van der staay FJ, Augstein KH, Horvath E: Sensorimotor impairments in rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the left middle cerebral artery: stain differences and effects of the occlusion site. *Brain Res* 735:271-284, 1996
43. Villars F, Bordenave L, Bareille B, Anedee J: Effect of human endothelial cells on human bone marrow cell phenotype: Role of VEGF?. *J Cellular Biochemistry* 79:672-685, 2000
44. Wang CX, Yang Y, Yang T, Shuaib A: A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation. *Brain Res* 7:115-120, 2001
45. Winder H, Brundin P: Immunological aspects of grafting in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis. *Brain Res* 472:287-324, 1998
46. Yamamoto H, Nagata I, Hashimoto N, Kikuchi H: Three-vessel occlusion using a micro-clip for the proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats. *Brain Res* 3:209-220, 1998
47. Yang Y, Shuaib A, Li Q: Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *J Neurosci Methods* 84:9-16, 1998
48. Zausinger S, Hungerhuber E, Baehmann A, Reulen HJ, Schmid-Elasesser R: Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery

- occlusion; a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* 863:94-105, 2000
49. Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniago P, Li Q, Lu M, Chopp M: A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* 117:207-214, 2002
50. Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M: Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J cereb blood flow metabol* 24:441-448, 2004
51. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 90:284-288, 2002
52. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen NV, Chopp M: VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest* 106:829-838, 2000
53. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC: Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurology* 174:11-20, 2002
54. Zivin JA: Cell transplant therapy for stroke. *Neurology* 55:467, 2000

-ABSTRACT-

Neuronal Differentiation and Functional Recovery after Transplantation of Human Mesenchymal Stem Cell in The Ischemic Rat Model

Hyung Suk Kim

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Kyung Gi Cho)

Brain transplantation had offered as an effective treatment for patients suffering from neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease, Huntington's disease and Stroke. Human mesenchymal stem cells are pluripotent stem cells, which can be differentiated into mesenchymal lineage cells. Those cells from the individual patient have the advantage to minimize the immune rejection. In this study, cytokine-induced human mesenchymal stem cells were transplanted via tail vein into cerebral ischemic rat model exposed to transient MCA occlusion. We examined that cytokine-induced human mesenchymal stem cells transplanted in brain had survived and differentiated into neural cells and neurological functions were improved after stroke in the rats.

Adult female Sprague-Dawley rats were anesthetized with chloral hydrate,

and ischemic lesions were made in the rats by transient MCA occlusion lasted for 120 minutes. One day later, cytokine-induced human mesenchymal stem cells carrying LacZ gene were implanted via tail vein. The rats were assessed for sensory-motor function and sacrificed for histologic examination at 7, 14, 28, 56 days after transplantation. Immunohistochemical staining was used to identify cells derived from human mesenchymal stem cells. A large number of X-galactosidase positive human mesenchymal stem cells were observed in the ischemic core and ischemic boundary zone in the rat brain. Some human mesenchymal stem cells were reactive for the astrocytic marker - glial fibrillary acidic protein(GFAP) and neuronal marker - neuronal nuclear antigen(NeuN). These findings show that some cytokine-induced human mesenchymal stem cells were differentiated into neurons and astrocytes to replace the damaged neural cells in the rats of cerebral stroke. The rats that were transplanted with cytokine-induced human mesenchymal stem cells showed slightly better functional improvement than control groups and the rats with human mesenchymal stem cells, which was statistically significant. Then, the neural differentiation of cytokine-induced human mesenchymal stem cells suggested that transplantation of the cytokine-induced human mesenchymal stem cells may provide the possibility of the clinical implication for cerebral stroke

Key Words : stroke, focal cerebral ischemia, middle cerebral artery occlusion, stem cell transplantation, cytokine-induced human mesenchymal stem cells, behavioral tests