

# 인체 근육유래줄기세포의 말초신경재생 유도 효과

## The Effects of Human Muscle Derived Stem Cells on the Induction of Peripheral Nerve Regeneration

Jun Sung Koh, Ji Young Lee, Ji Youl Lee

From the Department of Urology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose:** In this study, we evaluated the extent of functional and histological axonal regeneration after resection of the sciatic nerve. The nerve was repaired with silicone tubes filled with human muscle derived stem cells (MDSCs) and neuronal progenitor cells (NPCs) in nude mice.

**Materials and Methods:** The human muscle samples were obtained from the rectus abdominis muscle of 12 patients that underwent a laparotomy. The MDSCs were isolated using a modified preplate technique. Using the MDSCs, neurogenic differentiation was induced by dissociating neurospheres produced in a neurosphere culture medium containing neuronal induction agents. A part of the sciatic nerve, approximately 7 mm in length, was excised bilaterally, and a 9mm long silicone tube guide was placed at the resulting gap in 40 nude mice. The transplanted sites were divided randomly into three groups according to the type of grafting cells: silicone tube guides filled with PBS (P group, n=20), silicone tube guides filled with MDSCs (M group, n=40) and silicone tube guides filled with NPCs (N group, n=20). Histological observations and a nerve conduction study were performed 12 weeks after the graft.

**Results:** The number and diameter of the myelinated axons were significantly increased in the M and N groups ( $p < 0.001$ ). In a nerve conduction study, the amplitude of the compound muscle action potential (CMAP) and motor latency of response were significantly higher and shorter in the M and N groups ( $p < 0.001$ ). Moreover, reaction with neuronal class III  $\beta$ -tubulin (Tuj1, a neuronal marker) and antigial fibrillary acidic protein (GFAP, a glial marker) was observed in the regenerated nerve that originated from the M and N groups.

**Conclusions:** These results show that MDSCs can differentiate into NPCs and improve the peripheral nerve regeneration rate after transplantation into a nerve guide. (Korean J Urol 2008;49:350-359)

**Key Words:** Muscles, Stem cells, Nude mouse, Nerve regeneration, Nerve conduction

대한비뇨기과학회지  
제 49 권 제 4 호 2008

가톨릭대학교 의과대학  
비뇨기과학교실

고준성 · 이지영 · 이지열

접수일자 : 2008년 1월 30일  
채택일자 : 2008년 3월 3일

교신저자: 이지열  
가톨릭대학교 성가병원  
비뇨기과  
경기도 부천시 원미구 소사동 2  
☎ 420-717  
TEL: 032-340-2120  
FAX: 032-340-2124  
E-mail: uroljy@catholic.ac.kr

본 연구는 제 1차 대한비뇨기과학회-아스텔라스 연구지원사업의 지원에 의해 이루어짐 (과제번호: 2007277001).

### 서론

신경결손의 치료를 위해 자가 신경이식 사용되어 왔지만 제한된 신경 길이로 인해 자가 신경이식으로 치료되기 어려운 심한 신경 결손에는 적용하기 어렵기 때문에 실리콘 관, 신경분화인자인 라미닌(laminin)으로 도포된 관,

polyglycolic acid 관 등을 이용한 신경재생 방법이 고안되었지만 효과적이지 않았다.<sup>1,2</sup> 따라서 최근에는 비생물학적 물질과 함께 신경원성단백 또는 슈만세포와 같은 결합세포를 이용하여 신경재생능을 향상시켜 신경결손을 치료하려는 시도 등이 이루어지고 있으나 공여 세포의 관점에서 볼 때 많은 양의 슈만세포를 추출하기가 어렵고 또한 증식 및 장기간 보존하기 어려운 단점이 있다.<sup>3,4</sup>

최근에 줄기세포를 대한 연구가 각광을 받기 시작하여 이들 줄기세포를 필요한 세포로 분화시켜 세포이식 및 장기이식에 사용되고 있다. 이러한 줄기세포는 보통 배아 또는 태아 조직에 많이 존재하여 다양한 세포로 분화하는 능력을 가지고 있으며 신경계열에서는 신경세포뿐만 아니라 별아교세포 (astrocyte), 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte) 등으로 분화할 수 있어 뇌졸중, 척수손상 등과 같은 질환의 치료에 실험적으로 이용되고 있으나 윤리적 문제를 야기한다.<sup>5,6</sup> 성체줄기세포 또한 여러 가지 세포형태로 분화할 수 있다. 예를 들면 피부줄기세포는 신경세포와 평활근세포로,<sup>7,8</sup> 지방줄기세포는 골형성세포, 근형성세포, 연골형성세포로,<sup>9,10</sup> 골수 중간엽줄기세포는 혈액세포, 근형성세포, 혈관세포, 신경형성세포로<sup>11,12</sup> 분화할 수 있어 배아줄기세포와 비슷한 분화능을 지니고 있다.

지금까지 중추신경계의 기간세포를 이식하여 신경재생을 유도하려는 시도가 있었으나 채취할 때의 통증이나 이환 (morbidity), 채취되는 세포 수가 적다는 단점이 있어 다른 줄기세포의 원천을 찾게 되었다. 성체줄기세포 중 하나인 근육조직에서 유래한 줄기세포들은 배양 시 안정적인 성장과 증식을 보여주고 있으며, 수년 전에는 근섬유만 재생시키는 것으로 알려졌으나 최근에 연구에 의하면 신경세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포 등으로 분화가 가능하다고 보고되었다.<sup>13,14</sup>

이에 저자는 인체 근육조직에서 쉽게 얻을 수 있는 근육유래줄기세포를 신경기간세포로 분화시키고 누드마우스의 좌골신경에 결손을 만들어 실리콘 관으로 대체한 후, 관 안에 근육유래줄기세포 또는 근육유래줄기세포에서 분화된 신경기간세포를 주입한 뒤 재생된 말이집 축삭 (myelinated axon)의 수와 지름, 근전도상 복합근활동전위 (compound muscle action potential), 운동신경반응잠시 (motor latency of response) 등을 비교하여 신경 재생에 미치는 영향을 알아보려 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 근육조직의 채취

개복술을 시행하는 12명의 환자의 복직근 (rectus abdominis muscle)을 채취하였다. 시행 전 연구계획서를 생명윤리심의위원회에서 승인 받고 헬싱키 선언에 따른 동의서를 환자에게 제공하여 동의를 구하였다. 채취한 근조직 (40-300mg)을 1% 항세균-항진균제가 포함된 Hanks balanced salt solution (HBSS)으로 여러 번 세척한 후 외과용 가위를 사용하여 10ml 피펫에 통과가 가능한 크기까지 조직을 잘게 잘라내었다.

### 2. 실험 동물

몸무게 19-24g의 7주령 누드마우스 BALB/c-nu Slc strain (SLC Inc., Shizoka, Japan) 40마리를 1주일간의 적응기간을 거친 후 사용하였다. 동물들은 18-21°C의 온도와 50%의 습도를 유지시키며 12시간씩 밤과 낮의 밝기를 지켜주었고, 누드마우스 표준의 적절한 사료와 물을 공급하였다.

### 3. 근육유래줄기세포의 분리와 배양, 신경세포로의 분화 유도

**1) 근육유래줄기세포의 분리와 배양:** 24시간 후 세포들이 플라스크에 달라붙는 접착 정도의 차이를 이용하여 일정 시간 간격으로 콜라젠을 코팅한 플라스크 (Nalge Nunc International, Rochester)를 사용하는 Qu 등<sup>15</sup>이 고안한 전플라스크방법 (preplate method)을 이용하여 분리하였고 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Gibco-BRL, Gland island, USA), 10% fetal bovine serum (FBS), 항생제 (penicillin 100U/ml, streptomycin 100 µg/ml)가 포함된 배양액에서 4일간 배양한 후 magnetic bead sorting (Mini-MACS Kits; Miltenyi Biotec Inc. USA)을 이용하여 CD34 양성인 근육줄기세포만을 분리하여 사용하였다.

**2) 신경세포로의 분화 유도:** 신경세포로 분화하기 위해 먼저 분리한 근육유래줄기세포 1x10<sup>5</sup>개/ml를 DMEM/F12 (Gibco-BRL)와 2mmol/l L-glutamine, 33mmol glucose, 9.26 g/ml putrescine, 6.3 µg/l progesterone, 5.3 µg/l sodium selenite, 0.0025g/l insulin, 0.1g/l grade II transferring sodium salt로 구성된 N2 배지 (Gibco-BRL)에 넣고 20 µg/l human recombinant EGF, 10 µg/l bFGF를 2일에 한 번씩 첨가하면서 바닥이 코팅되지 않은 배양접시에서 1-2주 동안 neurosphere를 만들었다. 형성된 neurosphere를 분리시켜 poly-L-ornithine (Sigma, St. Louis, USA)으로 코팅된 플라스크에 심어 B27, IBMX, laminin, Foslolin을 넣은 N2 배지 (Gibco-BRL)에서 3일간 신경세포로 분화시켰다. 추후 신경결손 부위에 주입된 세포의 위치를 알기 위해 붉은색을 띠는 PKH26 dye (Sigma)를 첨가하였다.

### 4. 면역형광법을 이용한 근육유래줄기세포의 신경세포로의 분화 관찰

근육유래줄기세포의 배양액 및 시간에 따른 형태를 역상 현미경으로 관찰하였고, 신경세포로의 분화를 면역형광법으로 관찰하기 위해 염색을 시행하였다. 염색 시 비특이적 반응을 억제하기 위하여 차단 용액 (1.5% NGS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS)으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, 신경세포에서 특이적으로 발현하는 단백질인 Tuj1, 다

클론항체 (1:500, Sigma)와 별아교세포에 특이적으로 발현하는 단백질인 GFAP, 다클론항체 (1:200, Sigma) 1차 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS로 10분씩 3회 수세한 후, 2차 항체인 Alexa Flour 568 goat anti-mouse IgG를 각각 1:500으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS로 10분씩 3회 수세한 후, DAPI (Vectorshield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)로 핵을 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

### 5. 근육유래줄기세포 및 분화된 신경 기간세포의 생체 내 이식

배양된 근육유래줄기세포 및 분화된 신경기간세포를 PBS 10  $\mu$ l에  $1 \times 10^5$ 개의 세포가 포함되도록 반복적으로 균등하게 부유시킨 후 0.4mm의 내경과 9mm의 길이를 가진 실리콘 관 안에 각각 Hamilton syringe를 이용하여 주입하였다. 40마리 누드마우스를 ketamine hydrochloride (10mg/kg, (주)유한, 한국)와 xylazine hydrochloride (2mg/kg, (주)바이엘 코리아, 한국)를 2:1로 섞어 주사하여 마취시키고 둔부와 대퇴부 근육이 손상되지 않도록 조심스럽게 절개를 가하여 박리하여 양측 좌골신경을 노출시킨 후 7mm의 신경결손을 만든 뒤 9mm 길이의 실리콘 관을 삽입하였고, 좌골신경의 근위부 및 원위부 말단이 실리콘 관에 1mm씩 끼워지게 한 뒤 9-0 나일론 봉합사로 두 군데 봉합하였다. 주입된 세포에 따라 이식 부위를 무작위로 세 군으로 분류하였다; PBS가 주입된 부위 (P군, n=20), 근육유래줄기세포가 주입된 부위 (M군, n=40), 신경기간세포가 주입된 부위 (N군, n=20). 모든 과정은 해부현미경하에 무균적으로 시행하였다.

### 6. 검체 조직 채취 및 조직 재생의 평가

1) 조직학적 관찰: 이식 6주와 12주에 실리콘 관 안에 형성된 조직을 2.5% glutaraldehyde에 24시간 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하여 5  $\mu$ m의 두께로 절단하고 toluidine blue와 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 하여 400배 배율에서 4개의 필드를 선택하여 각 조직당 말미집 축삭 수와 1,000배의 배율에서 5개의 필드를 선택하여 말미집 축삭의 지름을 측정하여 각각의 평균을 비교분석하였다.

2) 면역조직화학적 검사: 이식 12주에 채취한 조직을 액체 질소에 미리 냉각시킨 2-methylbutane을 이용하여 냉동시킨 후 조직 냉각매질 (tissue freezing medium)로 고정시켰다. 냉동절편기 (cryostat microtomes, Leica, Germany)를 이용하여 5  $\mu$ m 두께로 절편을 만들어 슬라이드에 부착한 후 PBS로 10분씩 3회 세척한 뒤 염색 시 비특이적 반응을 억제하기 위하여 차단 용액 (1.5% NGS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS)으로 상온에서 1시간 반응시킨 후 1차 항체로

Tuj-1, GFAP 을 사용하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 PBS로 10분씩 3회 세척하고 2차 항체인 Alexa Flour 488 goat anti-rabbit IgG (1:500; Molecular probe, Eugene, USA)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 10분씩 3회 수세한 후, 세포핵을 DAPI를 이용하여 5분간 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다.

3) 근전도 검사: 이식 12주에 좌골신경의 기능적 전기 전달을 측정하기 위해 근전도 검사 (Viking 4 System, Nicolet, Madison, USA)를 시행하여 비복근의 활동전위 및 운동신경 반응잠시를 비교하였다. 마우스를 마취 후 좌골신경을 다시 노출시키고 자극바늘전극 (stimulating electrode)을 궁둥 패임 (sciatic notch)에, 동심바늘전극 (concentric needle electrode)을 이용하여 기록바늘전극 (recording electrode)을 뒷발 원위 1/3 지점에 경피적으로 삽입하였고, 접지전극 (ground electrode)은 대퇴부 피부에 부착하였다. Sweep은 2ms, gain은 5mV로 하였고 자극 전류를 반응이 있을 때까지 점차적으로 증가시켰으며 만일 10mA까지 증가될 때까지 반응이 없으면 신경재생이 일어나지 않은 것으로 간주하였다.

### 7. 통계 분석

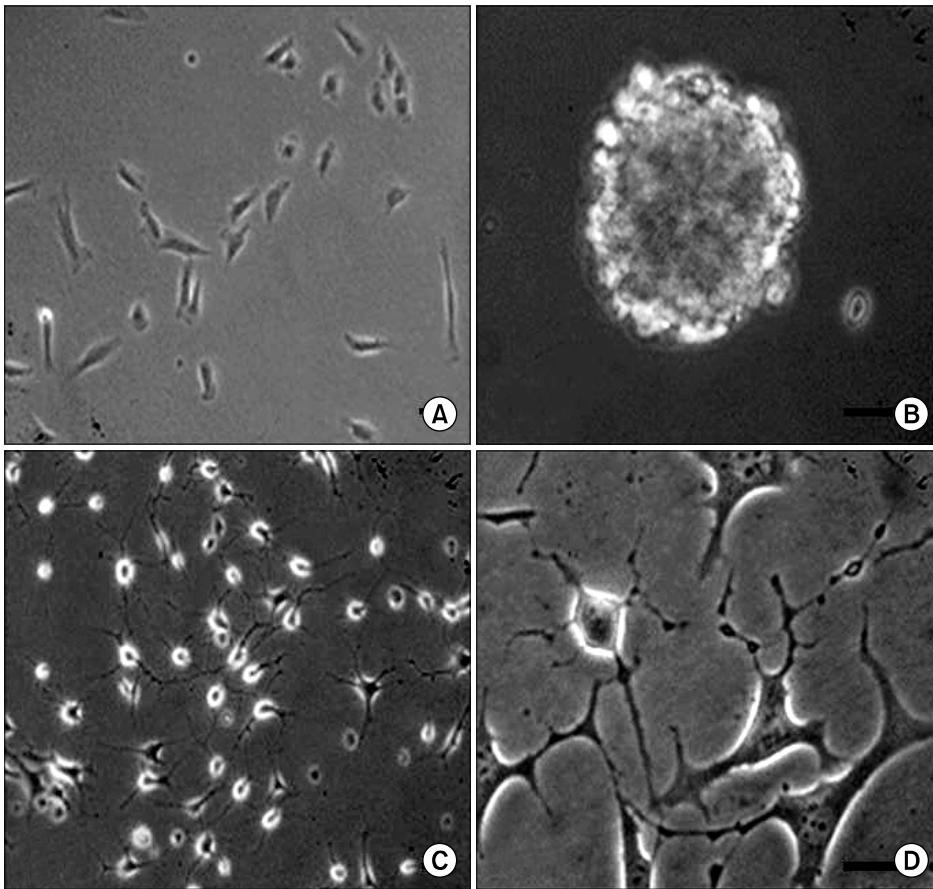
모든 실험 자료는 SPSS 프로그램 (11.0 for Windows)을 사용하였으며 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 세 군 간의 말미집 축삭 수와 지름, 비복근의 복합근활동전위, 운동신경반응잠시를 비교하기 위하여 ANOVA test를 시행하였고 다중비교를 위해 Scheffe method를 사용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

## 결 과

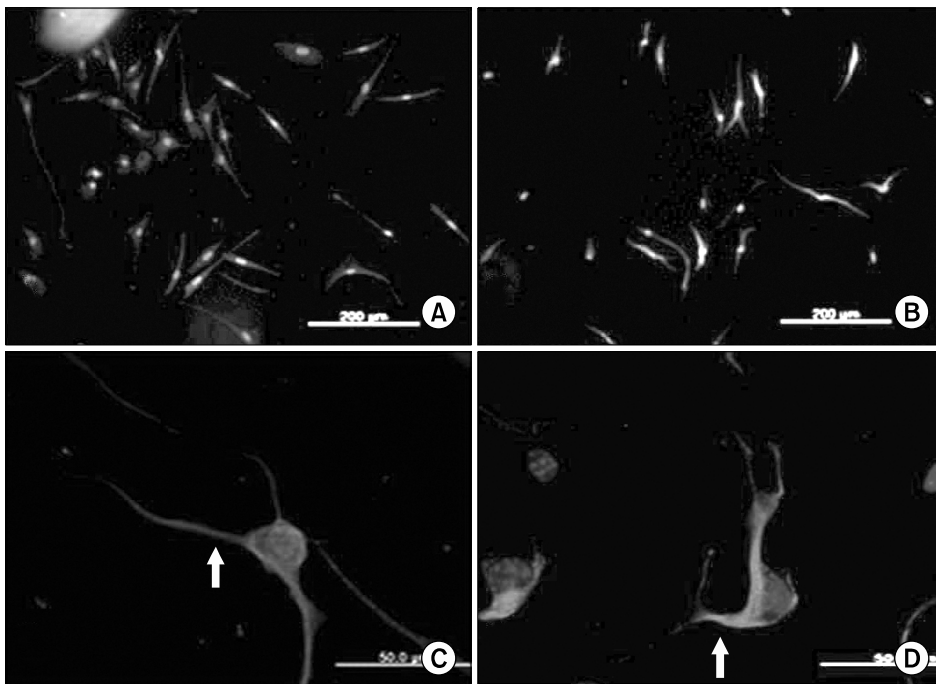
### 1. 근육유래줄기세포의 신경세포로의 분화

1) 분화된 신경세포의 성장: 근육줄기세포의 형태는 납작한 다각형의 모양이었으며 neurosphere 배지에서 7-15일간 배양 후 세포들이 분리되고 점점 군집을 이루었다. 이러한 군집은 위상차 현미경에서 밝은 색깔이었으며 섬모의 형태도 관찰되었다 (Fig. 1A). 군집들은 성공적으로 계대 (passage)와 확장 (expand)하였으며 4-5번 연속계대 후 neurosphere를 형성하였다 (Fig. 1B). Neurosphere를 분리하여 poly-L-ornithine이 코팅된 cover slip에 부착시킨 후 배지에서 3일간 배양한 결과 세포질이 핵 쪽으로 수축된 다극성 (multipolar) 또는 양극성 (bipolar) 의 신경세포의 형태로 변화하였고, 초기의 납작한 모양의 줄기세포 형태를 관찰할 수 없었다 (Fig. 1C, 1D).

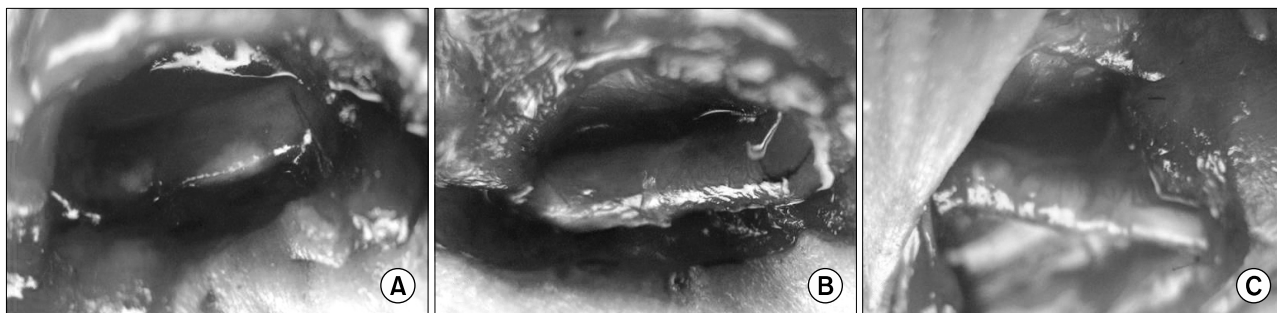
2) 면역세포화학적 염색: 분화된 세포를 면역세포화학법으로 확인한 결과 신경세포 특이표지인자 Tuj1 (Fig. 2A,



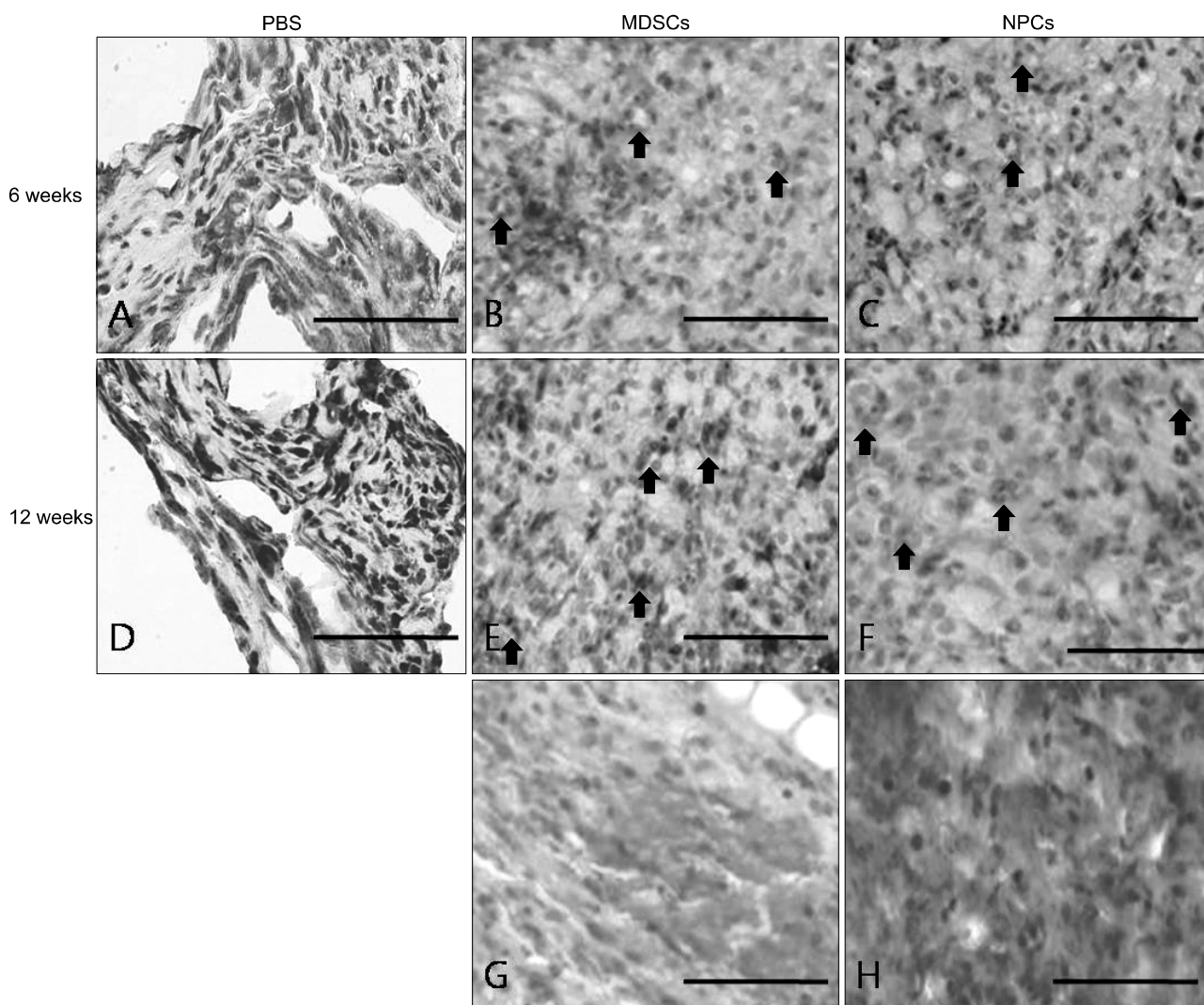
**Fig. 1.** Pre and post neurogenic differentiation morphology of MDSCs grown as neurospheres. (A) Undifferentiated MDSCs: polygonal flat cells predominated, with a few cells with a round or triangular cell body. (B) MDSCs derived neurospheres were observed after 7 days in the neurospheres medium. (C, D) Morphology of cells isolated from neurospheres and plated on coverslips after 3 days. Bipolar, tripolar and large flat cells were observed. Scale bar=20  $\mu$ m. MDSCs: muscle derived stem cells.



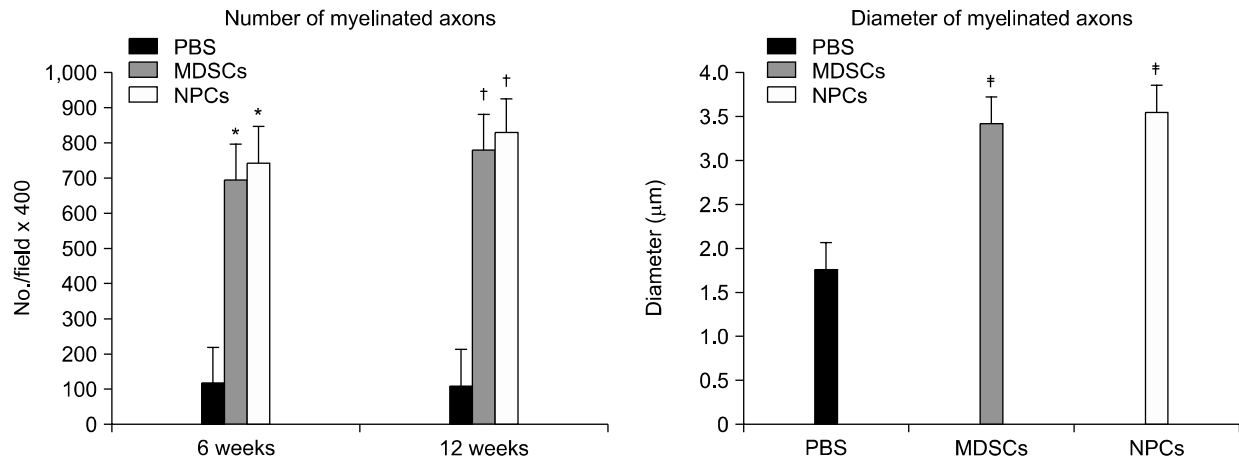
**Fig. 2.** Immunocytochemical staining. (A, C) Cells with a neuronal like morphology were positive for Tuj1 (white arrow). (B, D) Cells with a neuronal like morphology were positive for GFAP (white arrow). The nuclei are colored with DAPI. Tuj1: neuronal class III  $\beta$ -tubulin, GFAP: antigenial fibrillary acidic protein.



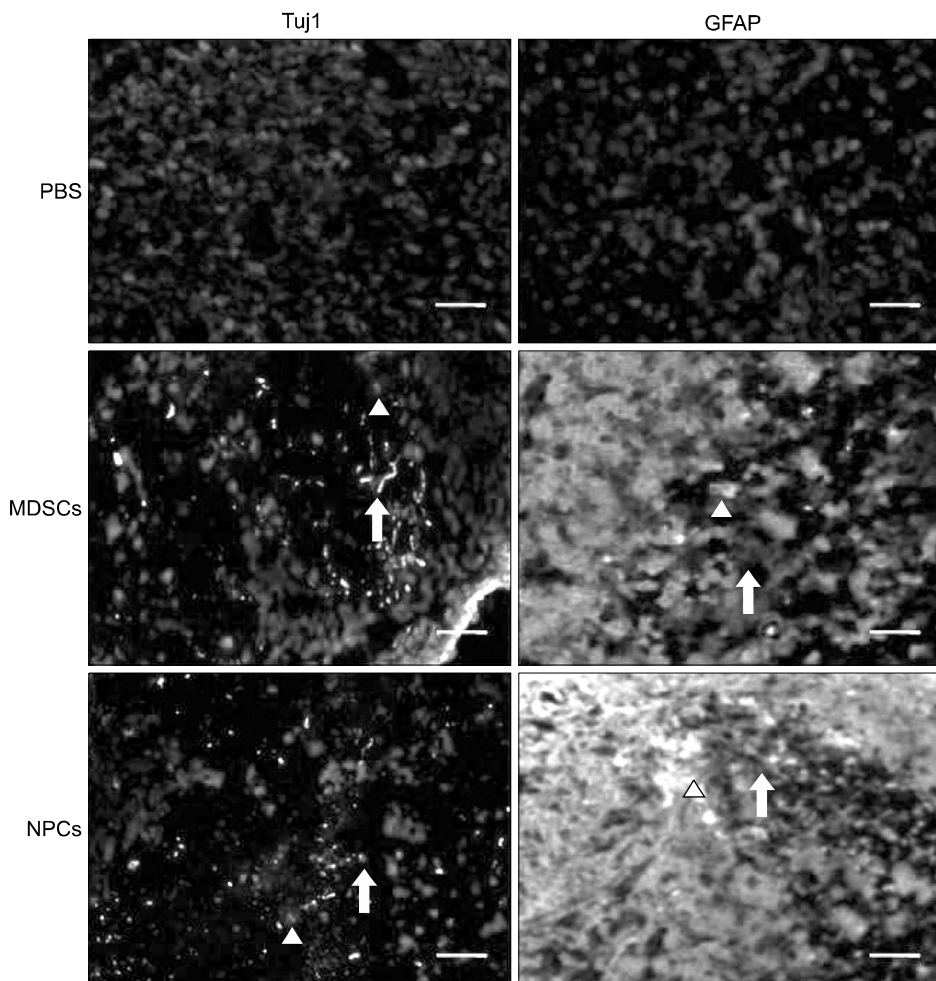
**Fig. 3.** Gross findings of regenerated tissue. (A) An empty tube filled with yellowish fluid was seen at 12 weeks after the grafting of PBS alone. (B) A regenerated nerve was seen in the tube at 12 weeks after the grafting of MDSCs. (C) A regenerated nerve was seen in the tube at 12 weeks after grafting of NPCs. PBS: phosphate buffered saline, MDSCs: muscle derived stem cells, NPCs: neuronal progenitor cells.



**Fig. 4.** Morphological analysis of axonal regeneration in the nude mouse sciatic nerve. (B, C, E, F) At 6 and 12 weeks, MDSCs and NPCs transplanted animals show numerous regenerated axons. Myelinated cells (black arrow) with a large diameter are observed. (G, H) Angiogenesis is remarkable around the nerve fibers. (A, D) There are no visible regenerated axons in the PBS filled silicone tube transplanted animals. Toluidine blue staining or H&E staining. Scale bar=100  $\mu$ m. MDSCs: muscle derived stem cells, NPCs: neuronal progenitor cells, PBS: phosphate buffered saline.



**Fig. 5.** Comparison of the number (A) and diameter (B) of myelinated axons among the PBS, MSCs, and NPCs transplanted groups. Significant improvement of regeneration of myelinated axons was observed at 6 and 12 weeks after MDSCs and NPCs transplantation as compared with the infusion of PBS alone (\*, †, ‡ p < 0.001). However, there were no significant differences in number and diameter of myelinated axons between the MSCs and NPCs transplanted groups. MDSCs: muscle derived stem cells, NPCs: neuronal progenitor cells, PBS: phosphate buffered saline.



**Fig. 6.** Immunohistochemical staining of regenerated tissue. Twelve weeks after transplantation immunofluorescence analysis showed an increased expression of Tuj1 (white arrow) and GFAP (white arrow) in the MDSCs and NPCs transplanted animals as compared to the PBS filled silicone tube transplanted animals. The nuclei are colored with DAPI. The existence of formerly transplanted stem cells was verified by the use of PKH dye (arrow head). Scale bar = 50 μm. Tuj1: neuronal class III β-tubulin, GFAP: antigenic fibrillary acidic protein, MDSCs: muscle derived stem cells, NPCs: neuronal progenitor cells, PBS: phosphate buffered saline.

2C)과 별아교세포 특이표지인자인 GFAP (Fig. 2B, 2D)에 상당수의 세포가 양성반응을 보여(빨간색) 신경계통세포로 분화된 것을 알 수 있었다.

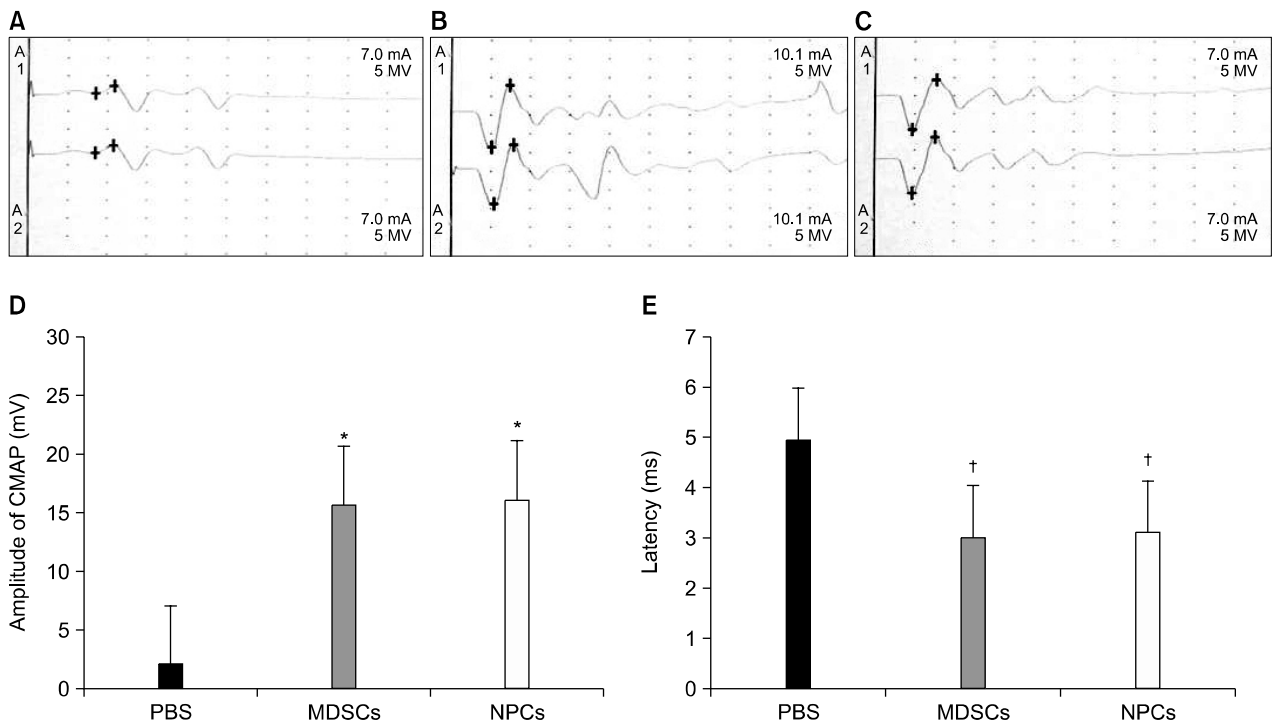
## 2. 조직재생의 평가

**1) 조직학적 소견:** 총 40마리의 누드마우스 중 6마리가 이식 후 감염 또는 마취 부작용으로 사망하였다. 생존한 34마리를 희생하여 이식 6주와 12주에 육안적 검사를 시행한 결과 삽입된 관의 이동이나 심한 감염병터(septic lesion)는 없었다. 얇은 섬유피막이 관을 둘러싸고 있었으며 이러한 섬유성 조직은 미세수술적 비절개박리로 쉽게 분리되었다. P군(n=17)에서는 이식 6주, 12주에 모두 재생된 조직은 없었고, 관 안에 노란색 조직액 또는 섬유성 조직으로만 대체되어 있었다(Fig. 3A). M군(n=34)은 27부위에서 재생된 신경을 관찰할 수 있었으며, N군(n=17)은 14부위에서 재생된 신경을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B, 3C). 현미경학적 검사상 P군에서는 말아집 축삭을 거의 관찰할 수 없었고 반흔 조직으로만 대체되어 있었다. M군 및 N군에서는 재생된 다수의

말아집 축삭이 관찰되었고, 그 주위로 증가된 혈관신생이 관찰되었다(Fig. 4). 이식 6주 후 P군, M군, N군의 말아집 축삭의 수가 필드당 평균  $116 \pm 39$ ,  $698 \pm 109$ ,  $747 \pm 159$ 개였고, 이식 12주 후에는 각각  $108 \pm 29$ ,  $783 \pm 106$ ,  $829 \pm 151$ 개로 M군과 N군이 P군보다 더 증가되어 있었다( $p < 0.001$ ). 이식 12주 말아집 축삭의 지름은 P군, M군, N군에서 각각  $1.77 \pm 0.33$ ,  $3.42 \pm 0.59$ ,  $3.55 \pm 0.61 \mu\text{m}$ 로 M군과 N군이 P군보다 더 컸다( $p < 0.001$ ). 그러나 M군과 N군 사이에서 말아집 축삭의 수 및 지름에는 차이가 없었다(Fig. 5).

**2) 면역조직화학적 검사:** 근육유래줄기세포 및 분화된 신경기간세포를 주입한 군은 실리콘 관내의 조직에 주입된 세포가 존재하였으며 PKH26에 의해 붉은색 형광을 나타냈다. Tuj1과 GFAP로 처리한 결과 PBS만 주입한 군에서는 양성반응을 보이는 세포를 거의 관찰할 수 없었으나 근육유래줄기세포 및 분화된 신경기간세포를 주입한 군은 조직 중 녹색 형광을 띄는 세포들이 관찰되어 신경세포 및 신경지지세포로 분화한 것으로 확인되었다(Fig. 6).

**3) 근전도:** 이식 12주 후 누드마우스의 비복근의 신경재



**Fig. 7.** At 12 weeks post-surgery, motor reinnervation was assessed by means of nerve conduction test. (A) No compound muscle action potentials (CMAPs) were measurable in any of the animals that received PBS alone. (B, C) Recovery of CMAPs appeared in both the MDSCs (B) and NPCs (C) transplanted groups. Comparison of the amplitude of CMAP (D) and motor latency of response (E) among the PBS, MDSCs, and NPCs transplanted groups. The amplitude of CMAP was significant higher in the animals that received MDSCs and NPCs transplantation (\* $p < 0.001$ ). The latency of response was significant shorter in the animals that received MDSCs and NPCs transplantation († $p < 0.001$ ). However, there were no significant differences in CMAPs and latency between the MDSCs and NPCs transplanted groups. CMAP: compound muscle action potentials, MDSCs: muscle derived stem cells, NPCs: neuronal progenitor cells, PBS: phosphate buffered saline.



분포의 양을 측정하기 위해 비복근의 복합근활동전위를 측정하였다. 복합근활동전위의 진폭은 P군, M군, N군이 각각  $2.14 \pm 0.32$ ,  $15.63 \pm 2.10$ ,  $16.14 \pm 2.07$  mV으로 M군과 N군에서 더 증가되어 있었으며 P군은 진폭이 현격하게 감소하였고 파형이 점차로 분산되었다 ( $p < 0.001$ ). 좌골신경의 반응잠시는 재생된 말이집 축삭의 수를 반영하는 것으로 P군, M군, N군이 각각  $4.97 \pm 0.75$ ,  $3.04 \pm 0.29$ ,  $3.13 \pm 0.26$  ms으로 M군과 N군에서 P군보다 더 짧았다 ( $p < 0.001$ ). 그러나 M군과 N군 사이에서 복합근활동전위의 진폭, 운동신경반응잠시의 차이는 없었다 (Fig. 7).

## 고 찰

근육유래줄기세포는 성체줄기세포의 하나이며 아직은 많은 부분이 알려져 있지는 않지만 근육 손상 시 근육조직의 재생에 관여하는 근육 모세포 (myoblast) 및 근육 위성세포 (satellite cell) 중 일부분에서 분리되는 것으로 알려져 있다. 또한 세포배양 시 많은 양의 세포를 단시간 내에 구할 수 있으며, 바이러스나 기타 벡터들로 유전자전달감염 (transfection)이 용이한 특징을 가지고 있고 세포와 세포가 접촉 시 근육섬유로 분화되어 성장이 멈추기 때문에 과분화에 의한 부작용이나 암세포로 전환이 되지 않는 특징이 있다. 최근 연구에서 근육유래줄기세포가 뼈, 연골, 지방, 인대, 근육 등의 여러 조직의 세포로 분화한다는 연구가 보고되었으며,<sup>16,21</sup> 특히 근육으로부터 분리한 줄기세포 및 전구세포가 neurosphere 또는 monolayer 분화방법을 통하여 신경계통 유사세포로 분화되었다고 보고되었다.<sup>13,14,22</sup> 본 연구에서는 세포부착특성에 따른 세포분리방법인 전플라스크 방법을 사용하여 인체의 골격근으로부터 근육유래줄기세포를 획득하였으며 이를 neurosphere 분화방법을 이용하여 신경계통 세포로 분화한 것을 확인할 수 있었다.

말초신경 손상 후 축삭의 연장 (axonal elongation)은 자발적으로 일어날 수 있지만 기능의 회복은 만족스럽지 못하다. 이러한 관점에서 볼 때 생체공학적 이식은 신경을 재생시키는데 유망한 방법으로 간주되고 있다. 여러 가지의 합성 또는 비합성 신경도관이 절단된 신경 간격을 이어주는 데 사용되어 왔다. 이러한 신경도관의 장점은 손상된 신경으로의 섬유성 포착 (fibrous entrapment)을 방지하고, 신경의 정렬 및 신경 다발의 봉합과 관련된 문제점을 감소시키는 것이다. 많은 신경도관들이 최근 소개되었고 그 중 높은 신경재생능을 보이는 것으로 콜라겐 관, lactic acid와 caprolactone의 혼성중합체 등이 알려져 있다.<sup>23</sup> 그러나 신경도관 자체는 신경원성 단백질이 포함되어 있지 않기 때문에 재생될 수 있는 신경의 길이에는 제한이 있다. 따라서 신경

도관을 통한 신경 재생의 효능을 증가시키는 방법으로 신경성장인자 (nerve growth factor), 슈반세포 또는 골수줄기세포 등을 같이 이식하는 방법이 제안되었고 이를 통해 쥐의 말초신경재생능을 향상시켰다는 보고들이 있다.<sup>24-26</sup> 신경재생에 관여하는 슈반세포는 라미닌, IV형 콜라겐 등 신경축삭의 성장을 촉진시키는 역할을 하는 물질을 분비하고, NGF를 포함한 여러 종류의 신경영양인자를 분비한다. Bunge 등<sup>27</sup>은 위와 같은 기능을 가진 슈반세포를 배양하여 신경유도관에 넣고 신경재생을 향상시켰다고 보고하였고, Guenard 등<sup>24</sup>은 이러한 슈반세포를 인체에 적용할 경우 인체 기능에 큰 문제를 초래하지 않고도 슈반세포를 채취할 수 있는 말초신경이 산재해 있으므로 기능상으로 중요한 말초신경의 손상 시 자가 슈반세포를 이용한 신경유도관의 사용 가능성도 제시하였다. 따라서 슈반세포가 조직공학을 이용한 신경재생의 유도에 많이 이용되고 있으나, 이식하기 위한 공여세포의 관점에서 볼 때 많은 양의 슈반세포를 추출하기가 어렵고, 증식 및 장기간의 보존이 어려운 단점이 있다. 또한 골수줄기세포의 경우 신경재생의 공여세포로 가장 적절한 것으로 생각되나 줄기세포를 채취할 때의 이환율, 채취된 세포 수가 적다는 단점이 있다. 따라서 저자들은 생체공학적 이식과 세포치료를 병합하여 신경재생을 향상시키고자 하였고, 개복 시 쉽게 얻을 수 있는 근육조직에서 줄기세포를 추출하여 사용하였다.

본 실험에서는 이종 간의 이식 반응 시 나타날 수 있는 거부반응을 줄이고자 누드마우스를 사용하였는데 현재까지 누드마우스를 이용한 신경도관 실험은 시행되지 않았고 이는 다른 실험들과의 큰 차이점이라고 할 수 있다. 그러나 실험 시 몇 가지 어려움이 있었는데 첫째, 보통 쥐의 경우 10mm 이하의 짧은 신경결손은 자발적 신경재생이 이루어지지만,<sup>28</sup> 누드마우스에서는 자발적 신경재생이 일어날 수 있는 신경결손 길이에 대한 기준이 없었다. 따라서 저자들의 경우 7mm의 신경결손을 만들었는데 이는 누드마우스의 좌골신경 길이의 3/4에 해당하며 실리콘 관 이식 등의 조작을 가할 수 있는 최소한의 조건이었기 때문이었다. 둘째, 누드마우스의 좌골신경의 크기가 작아 조작의 어려움이 있었고, 특히 신경유도관과 신경의 연결방법의 선택에 어려움이 있었다. 고식적으로는 주로 봉합 방법이 사용되어 왔으나 최근에는 fibrin glue를 이용하여 연결시키는 것이 신경재생에 보다 더 좋은 조건을 제공한다고 보고되고 있다.<sup>29,30</sup> 저자의 경우도 실험 시 fibrin glue를 이용하여 연결하려고 하였으나 누드마우스의 좌골신경이 너무 얇아 fibrin glue로는 고정되지 않아서 봉합방법을 사용하였다. 이식 6주 또는 12주에 육안적 검사상 약간의 섬유화와 이물반응은



있었으나 연결은 잘 유지되어 있어 실험결과에 큰 영향은 없었다.

근육유래줄기세포 및 신경기간세포들을 이식한 군에서 PBS만 이식한 군보다 현미경학적 검사상 많은 수의 말집축삭과 혈관신생이 관찰되었고, 이렇게 재생된 신경섬유는 근전도검사상에서 뚜렷한 복합근활동전위를 보여주어 재생된 신경의 기능이 회복된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 근육유래줄기세포를 이식한 군과 신경기간세포를 이식한 군에서 신경재생능 및 재생된 신경의 기능에는 큰 차이가 없어 두 방법이 모두 신경결손 치료에 효과적이나 경제적 측면에서 보았을 때 근육유래줄기세포를 조작 없이 이식하는 것이 효율적일 것으로 생각한다.

이러한 근육유래줄기세포 또는 신경기간세포를 이식 후 확인되는 신경재생의 기전으로 생각할 수 있는 것은 이식된 근육유래줄기세포 또는 신경기간세포가 슈반세포와 같은 지지세포로 분화하여 신경축삭의 성장을 촉진시키는 역할을 담당하는 신경영양인자들 (neurotropic factors)을 분비하고, 새로운 혈관들이 만들어져 재생되고 있는 축삭에게 영양분을 제공하여 신경재생이 이루어지는 것으로 생각한다. 본 실험에서는 이러한 지지세포들은 면역조직화학적 검사에서 GFAP 양성반응으로 확인하였으나, 신경영양인자의 발현에 대해서는 객관적으로 증명하지 못하였고 이것이 본 실험결과의 제한점으로 생각하며 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 결 론

결론적으로 본 실험에서 인체 근육유래줄기세포는 신경계통세포로의 분화와 증식이 가능하다는 것을 확인하였고, 말초신경 결손부위에 이식 시 이식된 세포가 신경세포 및 신경 지지세포로 분화하여 신경재생능을 향상시키는 것을 알 수 있었다. 따라서 근육유래줄기세포의 이식은 말초신경 결손의 적절한 치료방법으로 생각하나 이를 인체에 적용시키기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

1. Nakao Y. An experimental study on the effect of laminin in vivo on promoting regeneration of axons. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1992;66:334-49
2. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:419-24
3. Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP. Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:439-6
4. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1998; 18:397-405
5. Peault B, Tavian M. Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:132-40
6. Daley GQ. From embryos to embryoid bodies: generating blood from embryonic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:122-31
7. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 2004;6:1082-93
8. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-84
9. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95
10. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005;9:929-39
11. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904
12. Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Miyatake H, et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 2003;31:1323-30
13. Romero-Ramos M, Vourc'h P, Young HE, Lucas PA, Wu Y, Chivatakarn O, et al. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. *J Neurosci Res* 2002;69:894-907
14. Alessandri G, Pagano S, Bez A, Benetti A, Pozzi S, Iannolo G, et al. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* 2004;364:1872-83
15. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol* 1998;142:1257-67
16. McKinney-Freeman SL, Majka SM, Jackson KA, Norwood K, Hirschi KK, Goodell MA. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:806-14
17. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1341-6
18. Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent

- muscle stem cells. *Development* 2002;129:2987-95
19. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* 2004;12:311-9
  20. Hwang JH, Yuk SH, Lee JH, Lyoo WS, Ghil SH, Lee SS, et al. Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation. *Mol Cells* 2004;17:57-61
  21. Sun JS, Wu SY, Lin FH. The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:3953-60
  22. Kondo T, Case J, Srouf EF, Hashino E. Skeletal muscle-derived progenitor cells exhibit neural competence. *Neuroreport* 2006;17:1-4
  23. Yannas IV, Hill BJ. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials* 2004;25:1593-600
  24. Guenard V, Aebischer P, Bunge RP. The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration is reversed by Schwann cells. *Exp Neurol* 1994;126:44-60
  25. Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6:119-27
  26. Paino CL, Fernandez-Valle C, Bates ML, Bunge MB. Regrowth of axons in lesioned adult rat spinal cord: promotion by implants of cultured Schwann cells. *J Neurocytol* 1994;23:433-52
  27. Bunge MB, Bunge RP, Kleitman N, Dean AC. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev Neurosci* 1989;11:348-60
  28. Marchesi C, Pluderi M, Colleoni F, Belicchi M, Meregalli M, Farini A, et al. Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia* 2007;55:425-38
  29. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante RL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg* 2006;22:123-8
  30. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante PL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part I. Wave amplitude, conduction velocity, and plantar-length factors. *J Reconstr Microsurg* 2006;22:119-22
-