

백서의 심근경색 모델에서 중간엽 줄기세포를 이용한 심근형성술의 효과

충북대학교 의과대학 내과학교실,¹ 진단검사의학과학교실,⁵ 서울대학교 의과대학 내과학교실,²
제주대학교 의과대학 내과학교실,³ 경희대학교 의과대학 내과학교실⁴

박해남¹ · 연태진² · 권진숙¹ · 김영화¹ · 김기석³ · 배장환⁴
손보라⁵ · 황경국¹ · 김동운¹ · 이명목² · 조명찬¹

Cellular Cardiomyoplasty Using Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Post Myocardial Infarction Heart Failure

Hainan Piao, MD¹, Tae-Jin Youn, MD², Jin-Sook Kwon, DVM¹, Young-Hwa Kim, MS¹,
Ki-Seok Kim, MD³, Jang-Whan Bae, MD⁴, Bora Sohn, MD⁵, Kyung-Kuk Hwang, MD¹,
Dong-Woon Kim, MD¹, Myoung-Mook Lee, MD², and Myeong-Chan Cho, MD¹

¹Department of Internal Medicine, and ⁵Clinical Pathology, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, ²Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul,

³Department of Internal Medicine, College of Medicine, Cheju National University, Jeju,

⁴Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Cellular cardiomyoplasty (CCM) is considered to be a novel therapeutic approach for post-myocardial infarction (MI) heart failure. In this study, the functional effects of cultured mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation and the associated histopathologic changes were evaluated in a rat model of MI. **Materials and Methods :** Rats were subjected to 5 hours of coronary ligation followed by reperfusion, and 10 days after MI, animals were randomized into either the MSCs transplantation (MI-MSC, n=8) group or the control (n=8) group. Allogeneic MSCs (3×10^6 cells) or media were epicardially injected into the center and the border area of the infarct scar. **Results :** Four weeks after the MSCs transplantation, the echocardiogram showed preserved anterior regional wall motion and increases in fractional shortening in the MI-MSC heart relative to the control heart. Left ventricular (LV) end diastolic pressure was smaller in the MI-MSC than in the control group. Implanted MSCs formed islands of cell clusters on the border of the infarct scar, and the cells were positively immunostained by sarcomeric α -actinin and cardiac troponin T. In addition, the number of microvessels on the border area of the infarct scar was greater in the MI-MSC than in the control group. **Conclusion :** Allogeneic MSCs transplanted into the MI scar formed clusters of cell grafts on the border of the infarct, expressed cardiac muscle proteins, increased microvessel formation, and improved regional and global LV function. Our data indicate that CCM using MSCs may have a significant role in the treatment of post-MI heart failure. (Korean Circulation J 2004; 34(11):1113-1121)

KEY WORDS : Stem cells ; Transplantation ; Myocardial infarction ; Heart failure.

논문접수일 : 2004년 5월 7일

수정논문접수일 : 2004년 7월 12일

심사완료일 : 2004년 8월 28일

교신저자 : 조명찬, 361-711 충청북도 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교 의과대학 내과학교실

전화 : (043) 269-6356 · 전송 : (043) 273-3252 · E-mail : mccho@cbnu.ac.kr

서론

급성 심근경색에 의해 심근 세포가 영구적으로 소실 되게 되면, 좌심실은 경색 부위의 팽창에 이어 비경색 부위의 확장 및 비대라는 일련의 재성형 과정을 거치게 되며, 이러한 재성형의 정도는 심기능 감소의 정도 및 궁극적으로 환자의 장기적 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 따라서, 심근경색 후 좌심실의 재성형 및 심부전의 진행을 억제하기 위해 여러 가지 약물 요법 및 기타 여러 수술적 방법이 사용되고 있으나, 현재까지의 심부전 치료로는 손실된 심근세포가 재생되지는 못한다는 점이 이러한 치료의 가장 큰 한계로 생각되고 있다. 그러므로, 소실된 심근 세포를 다른 세포를 이용하여 보강함으로써, 심근경색 후 심부전의 진행을 억제하며, 심기능을 향상시키고자 하는 심근형성술(cellular cardiomyoplasty)이 지금까지의 심부전 치료의 한계를 뛰어넘을 수 있는 새로운 방법으로서 최근 주목을 받고 있다.

심근형성술에 사용하기 위해 주로 연구되는 세포는 크게 심근세포, 골격근 근육모세포, 배아줄기세포, 골수에서 기인한 줄기세포 등을 들 수 있으며, 이 중 골수에서 기인한 줄기세포로는 중간엽 줄기세포(골수간질세포, mesenchymal stem cells, MSCs), 조혈줄기세포(조혈모세포), 내피줄기세포 및 이들을 모두 포함한다고 생각되는 골수 단핵구세포 등이 있다.²⁻⁴⁾

골수에서 기인한 줄기세포 중 MSCs는 특히, DNA demethylating agent인 5-azacytidine(5-aza) 처리에 의해 근육세포 표현형 특이적 유전자가 활성화되어 근세포 혹은 심근유사세포(cardiomyogenic cells)로 유도가 되는 특징을 가지고 있어 심근재생을 위한 세포이식 치료에 좋은 재료가 될 것으로 생각되고 있다.⁵⁻⁸⁾ 그러나, 5-aza에 의해 다른 여러 유전자가 비특이적으로 demethylation 될 수 있다는 가능성 때문에, 약물처리에 의해 심근유사세포로 전환된 MSCs를 임상에 이용하기에는 한계가 있을 것으로도 여겨지기도 한다.^{9,10)}

한편, Wang 등¹¹⁾은 5-aza 전처치를 시행하지 않은 MSCs를 백서의 정상 심장에 주입하였을 때, 이식된 MSCs가 MF20(sarcomeric myosin)과 connexin 43(gap junction protein)을 표현하고 있음을 확인하여, 전처치 없이 이식된 MSCs도 심장내 환경에 의해서 심근세포로 분화할 수 있음을 보고하였다. 또한, Tomita 등¹²⁾도 5-

aza 전처치를 시행하지 않은 MSCs를 냉동 손상(cryo-injury)을 시행한 심장 반흔에 주입하였을 때, troponin I가 발현되는 것을 보고하여 주위 환경에 의해 MSCs가 심근유사세포로 전환될 수 있다는 가능성을 보여주었다. 그러나, 아직까지 관동맥 혈류의 차단에 의한 심근경색 후 심부전 심장에서, 전처치에 의해 심근유사세포로 전환되지 않은 MSCs를 이식하였을 때의 변화 및 그 효과에 대해 통합적으로 관찰한 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구는 5-aza 전처치를 시행하지 않은 MSCs를 백서의 심근경색 모델에 이식하였을 때, 세포 이식이 좌심실의 재성형과 심기능에 미치는 효과 및 이식 세포의 분화에 대해 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

백서 MSCs의 배양

백서의 경골과 대퇴골 양끝을 통해 10 mL의 배양액(DMEM, 10% FBS, 50 IU/mL penicillin-streptomycin, GibcoBRL, USA)이 담긴 주사기로 골수를 세척하여 골수액을 채취하였다. Percoll solution(1.073 g/mL, Sigma, USA)을 이용해 단핵 세포층을 얻은 후, 5×10^7 cell이 되게 분주하여 배양하였다. 이 후 3일 간격으로 배양액을 교환하였으며, 이때 바닥에 부착되지 않는 조혈세포들은 제거가 되었다. 세포 이식에는 2차 계대배양한 세포를 사용하였다.

심근경색의 모델 및 수술적 처치

백서(Sprague-Dawley rat, 체중 240~290 g)를 대상으로 ketamine(100 mg/kg)과 xylazine(10 mg/kg)을 복강내에 투여하여 전신마취를 시킨 후 기관지를 삽관하고, 소동물용 인공호흡기(Harvard rodent ventilator, model 683, Harvard Apparatus, USA)를 이용하여 호흡을 유지하였다. 심근경색 후 재관류 모델의 생성은 Fliss 등¹³⁾의 방법을 응용하였다. 좌측 제 4 늑간을 절개한 후 심막을 절개하고 좌측 관동맥이 주행한다고 추측되는 우심실 유출로와 좌심방이(left atrial appendage) 사이의 심근(관동맥을포함한)을 6-0 silk 수술사로 'shoe string tie'를 이용하여 묶어서 좌관동맥을 결찰하였다. 수술사의 양 끝을 체외로 노출시킨 후, 봉합하였다. 결찰 5시간 후에 결찰을 풀고 재관류를 유도하였다.

MSCs의 이식

심근경색 10일 후에 무작위로 MSCs를 이식하는 군 (MI-MSC군, n=8)과 media 만을 주입하는 대조군 (n=8)으로 나누었다. 백서를 전술한 방법으로 마취를 한 후, 흉곽을 열고 심장을 노출시켰다. 총 용적이 50 μ L가 되도록 media로 희석한 MSCs(3×10^6 cells)를 30 G needle이 연결된 Hamilton syringe를 이용하여 경색의 중앙부위와 주변부위에 총 3~5회에 걸쳐 주입하였다.

In vivo 심초음파도 검사 및 혈액학적 검사

MSCs 이식 4주 후에 백서를 전술한 방법으로 마취한 다음, 7.0 MHz 탐촉자를 사용하여 심초음파(Acuson 128XP, Acuson, USA)를 시행하였다. 먼저, 이면성 심초음파도를 통해 좌심실의 단층 영상을 관찰한 후 100 mm/sec의 속도로 M형 심초음파도를 시행하였다. American Society of Echocardiography의 선도법에 의거하여 좌심실 수축말기 및 확장말기 내경을 측정하고 이를 통해 좌심실 분획단축률을 계산하였다. 심초음파 검사 후, 백서의 우측 경동맥을 통해 1.4F micromanometer catheter(Millar Instruments, USA)를 삽입한 후 좌심실까지 전진시켜서 좌심실 수축기압 및 확장말기압을 측정하였다.

조직 준비 및 슬라이드 제작

흉곽을 절개하고 포화 KCl을 우심방에 주사하여 확장기에서 심장지시된 다음, 18 G medicut을 복부 대동맥에 위치시키고 생리식염수로 100 mmHg의 압력 하에 5분 이상 관류시킨 후 10% formalin으로 관류 고정하였다. 심장을 적출하여 10% buffered formalin 용액에 24 시간 더 고정시킨 후 심첨부부터 기저부 쪽으로 4개의 횡단면 절편을 만들어 paraffin에 embedding시킨 다음, 4 μ m의 두께로 박절하여 슬라이드를 만들었다.

형태학적 분석

준비된 슬라이드를 Masson's Trichrome(MT) 염색과 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 시행하여 형태학적 분석을 하였다. 심근경색의 크기는 4개의 횡단면 절편 중 가운데 2개의 절편에서 심외막과 심내막의 둘레의 합에 대한 경색 부위의 둘레의 비율 Image analysis

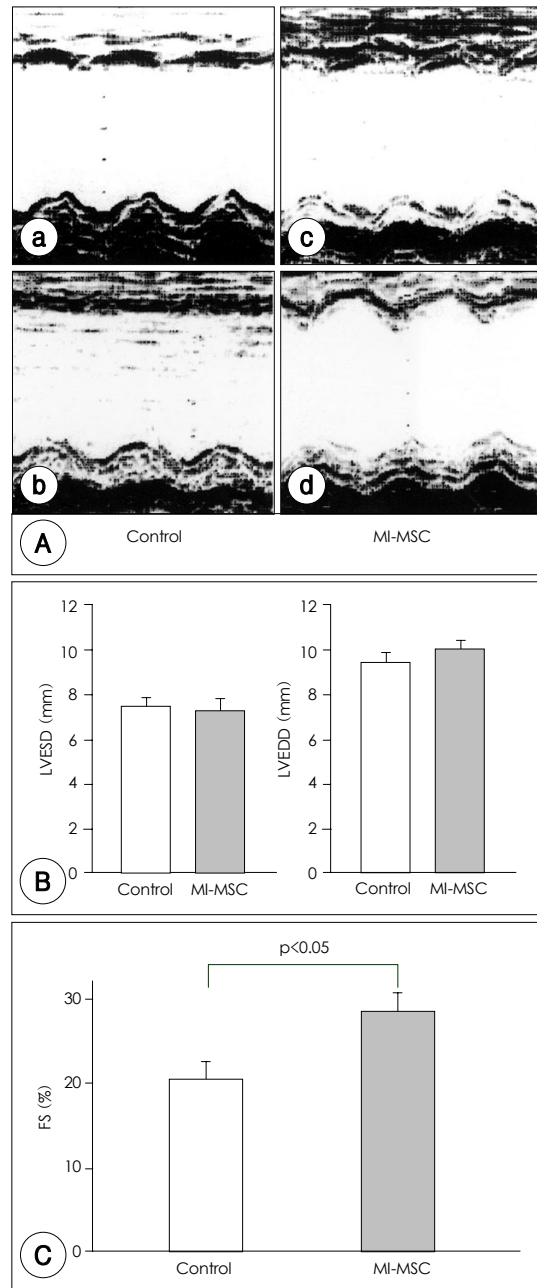


Fig. 1. Echocardiographic data of control MI rats and MSCs transplanted MI rats (MI-MSC). A: M-mode echocardiograms showed that left ventricular (LV) anterior wall motion was preserved in the MI-MSC hearts (c and d), but not in the control hearts (a and b). B: LV dimensions. LV end systolic dimension (ESD) and LV end diastolic dimension (EDD) were not significantly different between the control and the MI-MSC group (n=8 in each group). C: LV systolic function. Fractional shortening (FS) was significantly higher in the MI-MSC compared to the control group (n=8 in each group).

system(Scion Image, Scion Corporation, USA)을 이용하여 계산하였으며, 경색 반흔의 두께는 반흔의 양측 경계부, 반흔의 중간 부위 및 경계부와 중간 부위의 사이에서 각각 측정된 후 그 평균을 구하였다.¹⁴⁾ 미세혈관의 개수는 경색의 주변부와 경색의 중간 부위에서 각각 4개의 400배 시야(high power field, HPF)를 무작위로 골라 혈관의 수를 측정된 후 평균을 구하였다.

면역조직화학적 염색

조직 슬라이드는 deparaffinization과 dewaxing한 후 rehydration시켜 준비한 후 면역염색을 시행하였다 1차 항체인 mouse monoclonal anti- α -actinin(sarcomeric) antibody, (1 : 400, Sigma, USA), mouse monoclonal anti-troponin T(cardiac) (cTnT) antibody, (1 : 200, Neo-Markers, USA) 또는 rabbit polyclonal anti-Factor VIII related antigen/von Willebrand factor (vWf) antibody (1 : 80, NeoMarkers, USA)를 처리한 후, α -actinin과 cTnT의 경우에는 Rhodamine red dye-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 50, Jackson ImmunoResearch, USA)를 2차 항체로 이용하여 발색시킨 후 confocal microscope 관찰하였다. vWf인 경우에는 biotinylated anti-rabbit IgG (1 : 200, VECTOR LABORATORIES, USA)를 2차 항체로 처리하고 DAB로 발색시킨 후 광학현미경에서 관찰하였다.

통계학적 분석

모든 측정치는 평균±표준오차로 표시하였으며, 자료의 통계학적 분석은 t-test (SPSS for window version 7.5)를 이용하였다.

결 과

심초음파 및 혈액학적 검사

대조군의 심장을 이면성 심초음파로 관찰하였을 때, 심근경색으로 인하여 좌심실 전벽, 전측벽 및 측벽의 벽운동이 소실되고, 좌심실 내경이 증가된 것을 확인할 수 있었다. MI-MSC군도 좌심실 전측벽과 측벽의 벽운동이 소실되고 좌심실 내경이 증가하였으나, 심근경색의 주변부인, 심실 중격에 의한 전벽의 운동성은 대조군과는 달리 어느 정도 유지되고 있었다. M형 심초음파를 통해 좌심실 수축말기 및 확장말기 내경을 측정하고 이를 통해 분획단축률을 계산하였을 때, MI-MSC군과 대조군의 좌심실 내경에는 유의한 차이가 없었으나, MI-MSC군의 분획단축률은 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다(27.1 ± 1.4 vs. $19.8 \pm 2.6\%$, $p < 0.05$) (Fig. 1). 혈액학적 검사에서 MI-MSC군의 좌심실 확장말기압은 대조군에 비해 감소되는 경향을 보여주었다(6.4 ± 0.7 vs. 10.8 ± 1.8 mmHg, $p = 0.05$) (Fig. 2).

조직학적 검사

심근경색의 크기는 대조군이 43%이었으며, MI-MSC군이 41%로, 두 군 사이에 유의한 차이가 없었으나, 경색 반흔의 두께는 MI-MSC군이 대조군에 비교하여 유의하게 증가되어 있었다(1.54 ± 0.05 vs. 1.14 ± 0.1 mm, $p < 0.05$) (Fig. 3).

MI-MSC군의 MT 및 H & E 염색 슬라이드에서 세포질이 풍부한 단핵세포인 이식된 MSCs를 확인할 수 있었다. 이식된 MSCs는 주로 경색의 주변부에서 군집을 이룬 형태로 발견되었으며, 이러한 세포들은 대조군의 심장에서는 발견되지 않았다. 이식된 MSCs의 근세

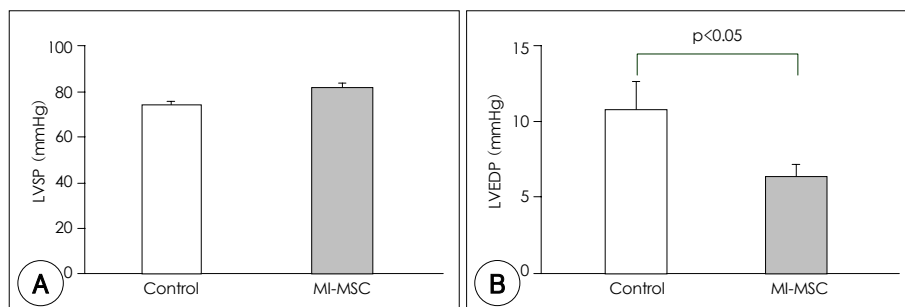


Fig. 2. Hemodynamic data of control MI rats and MSCs transplanted MI rats (MI-MSC). LV systolic pressure (LVSP) (A) was higher and LV end diastolic pressure (LVEDP) (B) was lower in the MI-MSC than in the control group ($n=8$ in each group).

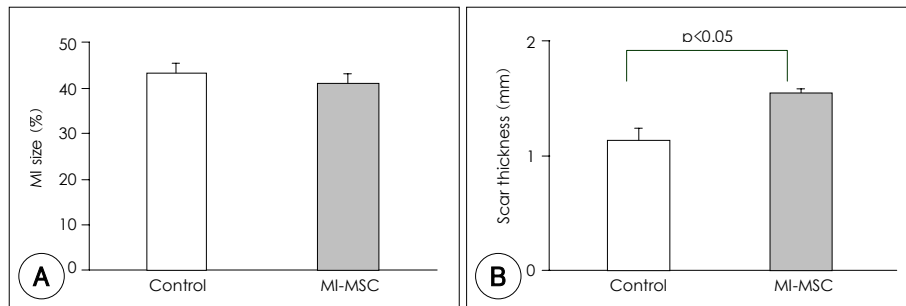


Fig. 3. Morphometric data of control MI rats and MSCs transplanted MI rats (MI-MSC). MI size (A) was not significantly different between the control and the MI-MSC group. However, scar thickness (B) was greater in MI-MSC than in the control hearts (n=8 in each group).

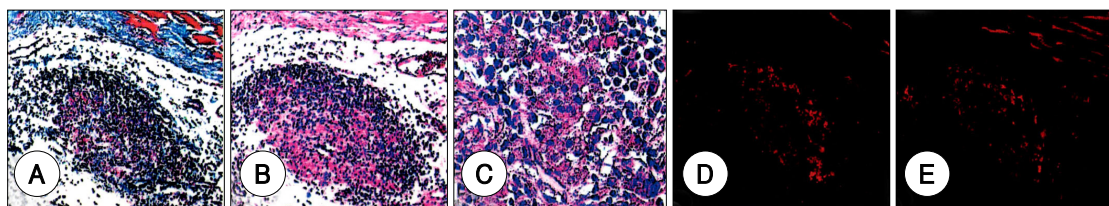


Fig. 4. Photomicrographs of implanted MSCs 4 weeks after cell transplantation. A: MT staining showed a cluster of implanted cells at the anterior border area of MI scar (blue stain denotes the fibrous tissues in MI scar) ($\times 100$ magnification). B: HE staining of an adjacent tissue section ($\times 100$ magnification). C: higher-power view ($\times 400$ magnification) showed cytoplasm-rich mononuclear transplanted MSCs. Immunohistochemical staining revealed sarcomeric α -actinin (D) and cardiac troponin T (cTnT) (E) expressions in implanted MSCs ($\times 100$ magnification).

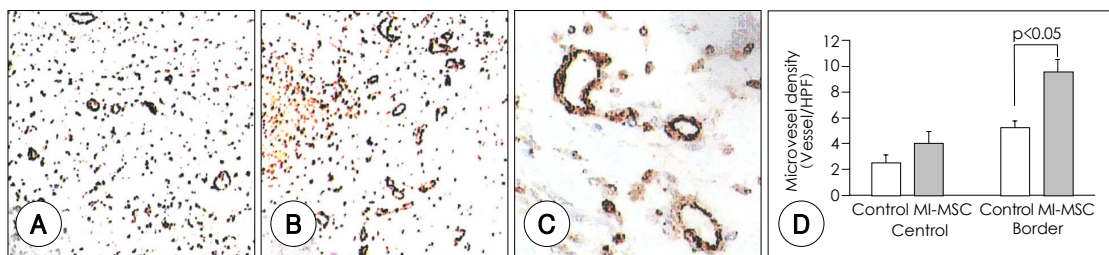


Fig. 5. Microvessel formation after MSCs transplantation. Numerous blood vessels expressing vWf were observed near the implanted cell clusters in the MI-MSC heart (B) relative to the control heart (A) ($\times 100$ magnification). C: vWf positive vessel cells in higher ($\times 400$) magnification. D: microvessel density. Vessel density was increased mainly in the border of infarct scar where the implanted cell clusters were observed (n=8 in each group).

포 혹은 심근유사세포로의 분화 가능성을 확인하기 위하여 시행한 면역조직화학 검사에서는, sarcomeric α -actinin과 cTnT가 발현되는 많은 수의 세포들을 이식 세포의 군집에서 발견할 수 있었다(Fig. 4).

미세혈관 형성

이식 세포의 군집 주위에서 vWf에 염색되는 많은 혈관들을 발견할 수 있었으며, MI-MSC군의 미세혈관 개수는, 경색의 중심부에서는 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이지는 않았으나, 이식 세포가 관찰되는 경색의

주변부에서는 유의하게 증가되어 있었다(9.5 ± 1.0 vs. 5.3 ± 0.5 vessels/HPF, $p < 0.05$) (Fig. 5).

고 찰

본 연구에서 백서의 심근경색 후 MSCs의 이식은 대조군과 비교한 좌심실의 분획단축률을 향상시키고 좌심실 확장말기압을 감소시켜, 심근경색 후 심부전 심장에서 MSCs의 이식을 통해 심기능을 향상시킬 수 있음을 시사하였다. 또한, 5-aza 전처치를 시행하지 않은 MSCs

도 심근경색내 환경에서 sarcomeric α -actinin이나 cTnT 단백질과 같은 수축조절 단백질을 발현하는 심근 유사세포로 전환될 수 있음을 확인할 수 있었다. 한편, 이 식세포의 군집 주위에서는 vWf 단백질을 발현하는 혈관 내피세포가 증가되어, 심근경색 후 MSCs의 이식이 심근 유사세포를 형성하여 손상된 심근의 재생에 도움을 줄 뿐만 아니라, 신생혈관의 생성을 촉진하는 효과가 있음을 시사하였다.

심근경색 모델

심근 손상 백서에서 세포 이식을 통한 심근형성술의 효과를 관찰한 현재까지의 연구들은 대부분, 측부혈관이 거의 없다고 알려진 백서에서 관동맥을 영구히 결찰함으로써 통벽성 심근경색을 유도하거나,¹⁴⁻¹⁸⁾ 냉동 손상을 이용하여 심장에 반흔을 만들어¹²⁾¹⁹⁻²²⁾ 실험한 것들이었다. 그러나, 인체의 심장은 백서에 비해 비교적 풍부한 측부혈관이 있으며, 심근경색 후 대부분의 경우에 초기 혹은 후기에라도 재관류 요법을 시행하는 최근의 경향 등을 고려하면, 관동맥 혈류의 차단에 의해 대부분의 심근이 손상을 받았으나, 재관류는 이루어진 심근경색 모델을 이용하여 심근형성술의 효과를 검토하는 것이 임상적 상황에 좀 더 적합할 것으로 생각된다. 심근경색 후 재관류 시기에 따른 좌심실의 재성형을 관찰한 Boyle 등²³⁾의 연구에 의하면, 백서에서 관동맥 혈류를 완전히 차단시킨 군과 심근경색 1~2시간 혹은 6~8시간 후 재관류를 이룬 군 사이에 좌심실의 재성형에는 어느 정도의 차이가 있으나, 심근경색의 크기나 경색의 통벽성은 유의한 차이가 없는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 본 연구는 백서의 관동맥 완전 결찰에 따른 '통벽성 심근경색 모델'이나 결찰 후 조기 재관류에 따른 '비통벽성 심근경색 모델'과 같이 기존에 많이 사용되어 왔던 모델과는 다른, 관동맥 결찰 5시간 후에 재관류를 이룬 '재관류가 이루어진 통벽성 심근경색 모델'을 이용함으로써, 임상적 상황에 좀 더 부합되는 모델에서의 MSCs 이식의 효과를 알아보고자 하였다.

MSCs의 이식이 심근경색 후 좌심실 기능에 미치는 영향

MSCs를 비롯한 여러 종류의 세포 이식을 통해 심부전 심장의 전반적인 심기능을 향상시킬 수 있다는 것이 현재까지의 많은 연구들을 통해 알려져 왔으나, 심기능

을 향상시키는 정확한 기전에 대해서는 이식되는 세포의 종류에 따라, 혹은 연구자에 따라 설명이 일치되지는 않고 있다. Orlic 등²⁴⁻²⁶⁾은 조혈모세포라고 생각되어지는 Lin⁻ c-kit⁺ 세포를 마우스의 심근경색에 주입하거나 혹은 Granulocyte-colony stimulating factor를 이용하여 동원시켰을 때, 심근경색 반흔에 새로운 심근이 '재생'되어 심기능을 향상시킬 수 있었다고 주장하였다. 그러나, 이후 이러한 효과를 재확인할 수 있는 연구 결과는 아직까지 나오지 않고 있다.²⁾ 또한, 숙주의 심근세포와 효과적인 간극결합을 형성하지 않는 것으로 알려진 골격근 근육모세포의 경우에는 과연 이식 세포가 숙주 심근세포와 협동적으로 수축할 수 있는지에 대해 많은 의문이 제기되고 있는 실정이다.²⁾ 한편, MSCs의 경우에는, 비록 Makino 등⁸⁾이 5-aza 처리에 의해 심근유사세포로 전환된 MSCs가 실험실 조건하에서 자발적으로 수축하는 것을 증명하였지만, 현재까지 이식된 MSCs가 생체내에서 수축하는지는 밝혀진 바가 없다. 따라서, 많은 연구자들은 세포 이식의 긍정적인 효과를 이식 세포의 수축과는 상관없는, 경색 반흔의 변화 혹은 신생혈관의 생성 효과를 통해 설명하고 있다. 즉, 이식된 세포에 의해 경색 반흔이 작아지거나 반흔의 확장이 감소하게 되고 혹은 단순히 경색 반흔이 두꺼워짐으로써, 좌심실 벽장력이 감소하고 좌심실의 재성형이 억제되거나 혹은 경색 반흔의 벽운동 이상이 감소되어 심기능이 향상될 수 있으며,¹⁴⁾¹⁹⁻²¹⁾ 또한, 세포 이식에 의해 신생혈관이 형성됨으로써 경색 주변부 동면 심근의 혈류가 호전되어 수축력을 향상시킬 수 있는 것¹²⁾²⁷⁾²⁸⁾으로 생각되고 있다.

본 연구에서 MSCs의 이식이 심근경색 후 좌심실의 기능을 향상시킨 정확한 기전은 아직 확실하지는 않다. 본 연구에서 이식된 MSCs는 주로 경색의 주변부에서 정상 심근 세포와는 떨어져서 작은 군집들을 이루고 있었던 관계로, 이식된 MSCs가 정상 심근과 협동적으로 수축하여 국소 벽운동을 향상시켰을 것으로는 생각되지 않는다. 또한, MSCs 이식군과 대조군의 심근경색의 크기나 좌심실 내경에 유의한 차이가 없었던 관계로, 심근경색 후 경색 반흔의 감소 혹은 좌심실 재성형의 감소에 의해 심기능이 향상되었을 것으로도 생각되지는 않는다. 그러나, 이식된 MSCs에서 심근세포 특이적인 수축 조절 단백질이 발현되는 것으로 미루어 보아, 이들

세포들이 섬유화 조직에 비해 좀 더 탄성이 있는 세포로 분화되어 반흔의 과진전을 억제하고, 이완기 기능에 도움을 주며, 혹은 인근 정상 심근의 수축을 전파함으로써 심기능의 향상에 기여했을 것으로 생각된다. 또한, 대조군과 비교하여 더 두꺼운 MI-MSC군의 경색 반흔도, 좌심실 벽장력을 어느 정도 감소시킴으로써 심기능을 향상시켰을 것으로 추측된다. 경색 반흔의 두께에 대한 가지 흥미로운 사실은, 이식 세포가 주로 경색 반흔의 주변부에서만 관찰되었음에도 불구하고 반흔의 전반적인 두께가 대조군과 비교하여 두꺼웠다는 점이다. 본 연구의 결과와 비슷한, 즉 이식 세포의 용적에 의한 것으로는 생각되지 않는 반흔 두께의 증가 현상은 태아 심근세포나 MSCs를 이용한 다른 연구자들의 보고에서도 관찰할 수 있으며, 이들은 이러한 현상의 이유를 세포 이식에 의한 세포외 기질의 변화 때문일 것으로 추측하고 있다.¹⁷⁾²⁹⁾ 한편, 본 연구에서도 MI-MSC군의 심장에서 vWf가 발현되는 혈관내피세포가 경색의 주변부에서 증가하여, 이미 많은 연구자들이 보고한 바와 같은 세포 이식에 의한 신생 혈관 생성을 확인할 수 있었으며, 이러한 신생 혈관이 경색 주변부 동면 심근의 혈류 공급을 호전시켜서 경색 주변부의 국소 벽운동을 향상시켰을 것으로 생각된다.

기존 연구와의 비교

MSCs를 이용한 심근형성술의 효과를 알아본 기존의 연구결과를 살펴보면, Tomita 등¹²⁾은 백서의 심장에 냉동 손상을 가하고 3주 후에 5-aza를 처리한 MSCs와 처리하지 않은 MSCs를 심근 손상 반흔의 중앙부에 이식하여, 두 군 모두에서 이식된 MSCs에서 troponin I가 발현하고 손상 반흔의 모세혈관이 증가하나, 5-aza를 처리한 MSCs 이식군에서만 반흔의 면적이 감소하며 심기능이 호전된다고 보고하였다. 그들은 5-aza 전처치를 시행한 MSCs군에서만 심기능이 향상되었던 이유를, 5-aza 전처치 후에 심근으로 이식된 MSCs가 전처치를 시행하지 않은 MSCs보다 좀 더 많은 근조직을 발현시키기 때문일 것이라고 추측하였다. 그러나 본 연구에서는, 전술한 Tomita 등¹²⁾에 의한 백서 냉동 손상 모델에서의 MSCs 이식 결과와는 달리, 5-aza 전처치를 시행하지 않은 MSCs를 심근경색 후 심장에 이식하였을 때에도 좌심실 기능이 향상된다는 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 차이의 이유가 재관류를 시행한

심근경색과 냉동손상의 차이인지, 혹은 주입한 세포의 수에 따른 차이(3×10^6 vs. 10^6 cells) 인지, 혹은 주입 부위(경색 주변과 중심 vs. 경색 중심)에 따른 차이인지는 확실하지 않다. 하지만, 냉동 손상과는 달리 재관류를 통해 어느 정도의 혈류 공급이 이루어지는 심근경색 상황에서 본 연구진이 좀 더 많은 세포를 경색의 중앙부만이 아니라 주변부까지 주입함으로써, 이식 세포가 경색의 주변부에서 좀 더 많이 생존할 수 있었을 것으로 보이며, 경색의 주변부에 생존한 MSCs는 정상 심근 세포 환경과 근접한 관계로, 심근유사세포로의 분화가 용이하였을 것으로 추측해 볼 수 있겠다. 돼지의 심근경색 모델을 이용하여 5-aza 전처치를 시행하지 않은 MSCs 이식의 효과를 살펴본 최근의 다른 연구에서도, 이식된 MSCs에서 α -actinin, troponin T, phospholamban 및 tropomyosin과 같은 근육세포 단백질이 발현되며, MSCs 이식에 의해 경색 부위의 수축기 벽운동 이상이 호전된다는 결과를 보고하고 있어,²⁹⁾ 이식된 MSCs의 심근 환경내에서의 근세포로의 분화 가능성 및 MSCs 이식에 따른 긍정적인 효과를 뒷받침하고 있다.

본 연구의 제한점

본 연구에서 세포 이식에 사용된 MSCs가 자가 세포가 아니고 동종 세포라는 점은 본 연구의 주 제한점이면서도 새로운 사실로 생각된다. 백서에서 충분한 양의 골수를 얻기 위해서는 절단된 경골 및 대퇴골에서 골수 세포를 추출해야 했으므로, 본 연구는 자가 MSCs를 이용하지 못하고 동종의 백서에서 얻은 MSCs를 사용할 수밖에 없었다. 자가 MSCs의 이식과는 달리 동종 MSCs의 이식은 면역 반응의 가능성이 있으므로 세포 이식의 효과가 감소될 수도 있을 것으로도 추측되었지만, MSCs가 동종 세포에 대한 T cell 반응을 억제시키는 면역 억제 효과가 있고,³⁰⁾³¹⁾ 면역 억제제를 사용하지 않은 상태에서 동종 혹은 이종 MSCs를 이식하여도 면역 반응이 일어나지 않는다는 실험 결과³²⁾³³⁾ 등이 있으며, 본 연구자들의 pilot 실험에서 동종 MSCs 이식 후 이식된 세포가 심근 환경에서 잘 생존하는 것을 확인하였었던 바 동종 MSCs를 이용하여 본 연구를 진행하였으며, 심근경색 후 동종 MSCs의 이식으로도 좌심실 기능이 향상되는 것을 알 수 있었다. 또한, MSCs의 동종 이식이 가능할 수 있다는 사실은, 비록 대부분의 임상 상황에 있어서는 자가 MSCs를 쉽게 또한 충분하게 얻을 수

있을 것으로 생각되지만, 고령이나 다른 혈액학적 질환, 혹은 골격계 질환으로 인해 자가 MSCs를 충분하게 얻을 수 없는 경우에 동종 MSCs의 이식을 고려할 수 있는 기회를 준다고 생각된다. 향후, 동종 MSCs 이식 후의 따른 면역 반응에 관한 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구의 또 다른 제한점으로는 BrdU 혹은 Green Fluorescent Protein과 같은 표식자를 이용한 MSCs의 표식이 시행되지 않아서, 이식된 MSCs의 심근경색 환경내에서의 생존 및 분화를 알아보는 데에 한계가 있다는 점이다. 즉, 심근세포 특이적인 단백질을 발현한 세포가 이식 세포가 아닐 가능성을 제시할 수도 있었으나, 본 연구진이 pilot 실험에서 4'6'-diamino-2-phenylindole (DAPI)로 표지된 MSCs를 이용하여 이미 확인한 바 있는, 세포질이 풍부한 단핵구인 이식된 MSCs의 특징적인 형상 및 군집을 이룬 조직학적 소견은 이들이 이식된 MSCs임을 쉽게 감별할 수 있게 하였다. 한편, 신생혈관형성에 있어서, 본 연구에서 관찰되는 혈관 세포들이 이식된 MSCs가 변환된 것인지, 혹은 MSCs 이식의 다른 효과에 의해 증가하였는지에 대해서는 향후 계속되는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적 :

세포를 이용한 심근형성술(cellular cardiomyoplasty)이 심근경색 후 심부전 치료의 새로운 방법으로서 최근 주목을 받고 있다. 본 연구는 백서의 심근경색 모델에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)의 이식이 경색 심장의 심기능 및 조직병리학적 변화에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

방 법 :

백서에서 5시간 동안 관동맥을 결찰한 후 결찰을 풀어 재관류가 이루어진 통벽성 심근경색을 유도한 뒤, 10일 후 무작위로 MSCs를 이식한 군(MI-MSC, n=8)과 대조군(n=8)으로 나누었다. MI-MSC군은 3×10^6 개의 배양된 MSCs를 심근경색의 중앙 부위와 주변 부위에 총 3~5회에 걸쳐 주입하였다.

결 과 :

세포 이식 4주 후 심초음파를 이용해 측정한 좌심실 내경은 MI-MSC군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없

었으나, MI-MSC군에서는 심근경색의 주변부인 좌심실 전벽의 운동성이 대조군과는 달리 어느정도 유지되었으며, 좌심실 분획단축률은 MI-MSC군에서 유의하게 증가하였다(27.1 ± 1.4 vs. $19.8 \pm 2.6\%$, $p < 0.05$). 또한, 좌심실 확장말기압도 MI-MSC군에서 대조군과 비교하여 감소하는 경향을 보였다. 조직학적 검사에서 심근경색의 크기는 양군 간에 차이가 없었으나, 경색 반흔의 두께는 MI-MSC군이 유의하게 두꺼웠다(1.54 ± 0.05 vs. 1.14 ± 0.1 mm, $p < 0.05$). 이식된 MSCs는 주로 경색의 주변부에서 군집을 이룬 형태로 발견되었으며, 이식 세포의 군집에서 sarcomeric α -actinin과 cardiac troponin T가 발현되는 많은 수의 이식 세포들을 확인할 수 있었다. 또한, 이식 세포의 군집 주위에서는 von Willebrand factor에 염색되는 많은 혈관들을 발견할 수 있었으며, 경색 주변부의 미세혈관 개수는 MI-MSC군에서 대조군과 비교하여 유의하게 높았다(9.5 ± 1.0 vs. 5.3 ± 0.5 vessels/HPF, $p < 0.05$).

결 론 :

백서의 심근경색 반흔에 이식된 MSCs는 경색의 주변부에서 군집을 이루며 생존하였고 수축 조절 단백질을 발현하였으며, 경색 반흔 두께의 감소를 억제하였고 경색 주변부 미세혈관의 형성을 증가시켰으며, 국소 벽운동 및 전반적인 심기능을 향상시켰다. 본 연구의 결과는 MSCs를 이용한 심근형성술이 심근경색 후 심부전 치료의 새로운 방법으로서 고려될 수 있음을 시사한다.

중심 단어 : 세포 ; 이식 ; 심근경색 ; 심부전.

본 연구는 2001년도 대한 순환기학회 신진연구비의 지원(Youn TJ) 및 Stem Cell Research Center of the 21st Century Frontier Research Program 연구비(SC13121, Cho MC)의 일부 보조로 이루어졌음.

REFERENCES

- 1) Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observation and clinical implication. *Circulation* 1990;81:1161-72.
- 2) Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:711-7.
- 3) al-Radi OO, Rao V, Li RK, Yau T, Weisel RD. Cardiac cell transplantation: closer to bedside. *Ann Thorac Surg* 2003;75:S674-7.
- 4) Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:336-50.

- 5) 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;284:143-7.
- 6) Wakitani S, Saito T, Caplan AL. *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve* 1995;18:1417-26.
- 7) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science* 1998;279:1528-30.
- 8) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest* 1999;103:697-705.
- 9) Agbulut O, Menot ML, Li Z, Marotte F, Paulin D, Hagege AA, Chomienne C, Samuel JL, Menasche P. *Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Cardiovasc Res* 2003;58:451-9.
- 10) Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, Hagege AA, Menasche P. *Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. Circulation* 2003;108 (10 Suppl 1):II247-52.
- 11) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. *Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:999-1005.
- 12) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation* 1999;100 (19 Suppl):II247-56.
- 13) Fliss H, Gattlinger D. *Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. Circ Res* 1996;79:949-56.
- 14) Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, Laird PW, Kloner RA. *Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. Circulation* 2002;105:1720-6.
- 15) Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P. *Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:1169-75.
- 16) Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. *Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1321-30.
- 17) Sakakibara Y, Tambara K, Lu F, Nishina T, Nagaya N, Nishimura K, Komeda M. *Cardiomyocyte transplantation does not reverse cardiac remodeling in rats with chronic myocardial infarction. Ann Thorac Surg* 2002;74:25-30.
- 18) al Attar N, Carrion C, Ghostine S, Garcin I, Vilquin JT, Hagege AA, Menasche P. *Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. Cardiovasc Res* 2003;58:142-8.
- 19) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, Rao V, Ivanov J. *Cardiomyocyte transplantation improves heart function. Ann Thorac Surg* 1996;62:654-60.
- 20) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. *Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. J Mol Cell Cardiol* 1999;31:513-22.
- 21) Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, Kim EJ, Yau TM. *Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types. J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:715-24.
- 22) Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. Circulation* 1999;100:193-202.
- 23) Boyle MP, Weisman HF. *Limitation of infarct expansion and ventricular remodeling by late reperfusion: study of time course and mechanism in a rat model. Circulation* 1993;88:2872-83.
- 24) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-9.
- 25) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. Ann N Y Acad Sci* 2001;938:221-9.
- 26) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature* 2001;410:701-5.
- 27) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. *Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. Circulation* 2001;104:1046-52.
- 28) Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF. *Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:361-9.
- 29) Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. Ann Thorac Surg* 2002;73:1919-25.
- 30) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol* 2002;30:42-8.
- 31) le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. *Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol* 2003;57:11-20.
- 32) Archambault MP, McIntosh KR, Duty A, Peter SJ. *Allogeneic rat mesenchymal stem cells do not elicit an immune response after implantation in immunocompetent recipients. Blood* 2000;96:762a.
- 33) Saito T, Kuang JQ, Bittira B, al-Khaldi A, Chiu RC. *Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. Ann Thorac Surg* 2002;74:19-24.