

Doxorubicin 유발 심근증 백서 모델에서 성체골수줄기세포를 이용한 심근재생 효과

가톨릭대학교 의과대학 순환기내과학교실

양관모 · 박찬석 · 장성원 · 박훈준 · 김동빈 · 김범준 · 정해익 · 백상홍 · 승기배 · 최규보

Effect of Adult Bone Marrow Stem Cells on Myocardial Regeneration in Doxorubicin-Induced Mouse Cardiomyopathy

Kwan Mo Yang, MD, Chan Seok Park, MD, Sung-Won Jang, MD, Hun-Jun Park, MD, Dong-Bin Kim, MD, Pum-Joon Kim, MD, Hae-Ok Jung, MD, Sang Hong Baek, MD, Ki Bae Seung, MD and Kyu-Bo Choi, MD

Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives: Bone marrow cells have been shown to differentiate into various cell lineages, including cardiomyocytes, in recent studies. This study evaluates the hypothesis that intravenous injection of bone marrow mononuclear cells (BMNCs) into rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy can induce myocardial regeneration and improve myocardial contractility. **Materials and Methods:** Adult male Sprague-Dawley rats were induced to develop cardiomyopathy by treatment with doxorubicin (2.5 mg/kg, 6 times, 2-week period). Stem cell enriched BMNCs were injected into the tail vein of the rats after cessation of the doxorubicin injections. One week after the injection of PKH-67-labeled BMNCs, the localization of transplanted cells was evaluated. Immunohistochemical studies and Western blots were performed two weeks after BMNCs injection. **Results:** Cell-treated animals showed significant improvement in left ventricular fractional shortening as compared to untreated (control) rats (cell treated group vs. control group $47.2 \pm 4.9\%$ vs. $34.4 \pm 3.6\%$, $p < 0.01$). Histological analyses showed that in the cell-treated animals there was an increase in ventricular interstitial collagen deposition and the cell-treated animals had an improved number of capillary endothelial cells as compared with the control rats. PKH-67-labeled BMNCs and cell proliferation by BrdU was noted in the cell-treated hearts. Cardiac CXCR4 protein expression increased at day 7 and 14 in the cell-treated rats, but only at day 14 in the control animals. **Conclusion:** These results suggest that intravenous injection of BMNCs effectively induce engraftment of BMNCs into the myocardium and attenuation of fibrosis. Intravenous injection of BMNCs also improved myocardial contractility in doxorubicin-induced cardiomyopathy. (Korean Circ J 2008;38:110-118)

KEY WORDS: Adult stem cell; Doxorubicin; Cardiomyopathies; CXCR4; Regeneration.

서론

Doxorubicin은 유리 산화기 생성에 의한 세포 독성으로 심장 근육을 비가역적으로 손상하여 확장성 심근증을 유발시

킨다.¹⁾ 이로 인하여 효과 있는 항암제의 임상적 사용이 제한을 받고 있으며, 심각한 것은 doxorubicin유발 심독성은 약제의 사용량 제한 이외에는 효과 있는 예방법이나 치료법이 없다는 것이다.²⁾

최근까지 심근세포는 최종 분화된 세포로 출생 후에는 재생이 되지 않는 것으로 알려져 왔으나, 최근 연구에 의하여 심근경색 후 환자의 심장 조직에서 분화하는 심근 세포가 관찰되고, 말기 심부전 환자의 심장에서 심근세포가 증식하는 조직조건들이 발표된 후, 이제는 심근세포가 더 이상 세포분화가 완료된 세포가 아닌 가능성을 제시하였다.^{3,4)} 심근의 손상

Received: May 29, 2007

Revision Received: November 5, 2007

Accepted: November 22, 2007

Correspondence: Sang Hong Baek, MD, Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, College of Medicine, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
Tel: 82-2-590-2075, Fax: 82-2-591-1506

E-mail: whitesh@catholic.ac.kr

시 심근세포의 증식이 심근 재생에 일부 도움을 줄 수 있으나, 심장 기능 회복이 충분한 정도의 심근재생에 효과적인 양의 심근세포를 적절한 시기에 증식시키는 것은 불가능하여, 줄기세포를 이용한 세포 이식치료가 손상된 심근을 복구시킬 수 있는 대안으로 제시되고 있다.⁵⁾⁶⁾

성체 줄기세포의 존재와 유연성이 증명된 후, 세포 재생과 기능 유지를 위한 줄기세포에 대한 연구가 증가하고 있다.⁷⁾ 성체 줄기세포는 분화가 용이하고, 생체조직 환경에 적합한 분화능력이 있으므로 의학적 응용이 용이하고 세포 이식 후 안전성이 있으나, 줄기세포의 성질을 쉽게 상실하는 단점이 있다.⁸⁾ 그러나 임상 적용 시 배아 줄기세포와는 달리 윤리적 문제의 분규에서 벗어날 수 있는 장점이 있다. 반면에 성체 줄기세포는 숫자가 적으며 유전자 이입 등의 조작 시 쉽게 분화되어 줄기세포의 성질을 상실한다는 제한점이 있다. 그러나 줄기세포의 분화의 유연성 및 조직 손상부위로 이동하는 능력은 병변 부위로의 치료제 전달 수단 및 조직재생의 가능성을 보여준다.

이에 줄기세포를 이용한 심근재생의 효과에 대한 응용 연구로서, 본 연구자는 doxorubicin 유발 심근증의 심부전 모델에서 줄기세포가 풍부한 골수 유래 단핵구세포를 이용한 심근재생 및 심근기능 개선 효과를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

9주령의 체중 300~320 g의 무균 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (샘타코, 오산, 한국)를 실험 동물로 사용하였다. 실험 쥐는 doxorubicin 유발 심근증 모델에 생리적 식염수 투여군 (대조군, control group, n=20), 세포 치료군 (치료군, cell-treated group, n=20)으로 나누어 실험하였고 정상 대조군 (normal control group, n=10)과 비교하였다. 실험 중 동물의 관리 및 처치는 가톨릭대학교 의과학 연구원 실험 동물 연구실 규정에 따랐다.

Doxorubicin 유발 심근증 백서 모델

흰쥐에게 doxorubicin (일동제약, 서울, 한국) 2.5 mg/kg를 2주 동안에 6회 복강 내 투여하여 심근증 모델을 만들었다.⁹⁾

성체 골수 줄기세포 채취 및 이식

골수에서 단핵구 세포의 분리

줄기세포가 비교적 풍부한 골수 유래 단핵구 세포의 분리는 Tomita 등¹⁰⁾이 기술한 방법을 응용하였다. 골수 유래 단핵구세포의 근원으로 200 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (n=50)를 희생하기 48시간 전에 5-fluorouracil (중외제약, 서울, 한국) 150 mg/kg을 복강 내 주입하였다. 흰쥐의 경골 및 대퇴골에서 골수 세포를 채취한 뒤, 비중 1.077 Fi-

coll-Hypaque용액 (Histopaque*-1,077, Sigma, St. Louis, MO)으로 처리 후, 600 g에서 25분간 원심 분리 후 단핵구층을 회수한 뒤, Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 phosphate buffer solution (PBS)로 세척 후 적혈구 용혈 완충용액 [NH_4Cl , KHCO_3 , EDTA, pH 7.3]으로 적혈구를 제거한 뒤 단핵구를 분리하였다. 세포 생존능은 trypan blue로 염색 후 관찰하고, hemocytometer로 계수하여 90% 이상의 생존율을 확인하였다.

성체 줄기세포 이식

Doxorubicin 2주 투여 종료 시 심근증이 유발된 흰쥐를 대상으로, 세포 치료군은 분리된 골수 단핵구 세포를 세포수 5×10^7 개로 0.5 mL PBS 용액에 희석하여 꼬리 정맥으로 정주하였다. 대조군은 생리적 식염수를 정주하였다.

세포 이식 후 심장 기능 분석

실험 쥐를 세포 이식 14일 후에 케타민 (ketamine hydrochloride, 유한양행, 서울) 50 mg/kg을 복강 내 투여 후 의식을 유지한 가벼운 마취 상태에서 좌측 양와위로 눕힌 뒤, 15 MHz의 고주파 탐촉자 (Acouson, Palo Alto, CA)를 이용하여 경흉부 심초음파검사를 시행하였다. 심전색 부위에서 이면성 및 M-mode 단층 심초음파로 좌심실 (left ventricular, LV)의 수축기말 (end systolic dimension, ESD) 및 이완기말 좌심실 내경 (end diastolic dimension, EDD) 및 내경 분획률 [percent fractional shortening, % fractional shortening (FS)]을 측정하였다. 이러한 심초음파에 의한 평가는 5회 반복하여 평균값을 사용하였다 (Fig. 1). 좌심실 내경 분획률의 계산은 $\text{LV}\%FS = (\text{EDD} - \text{ESD}) / \text{EDD} \times 100$ 으로 하였다.

세포이식 효과의 조직학적 분석

세포이식 7일, 14일 후 흰쥐에게 렘폰 (Xylazine, 바이엘 코리아, 서울) 10 mg/kg과 케타민 100 mg/kg 혼합 마취용액을 복강 내 주입하여 전신 마취시킨 뒤 KCl을 정주하여 심장을 이완기 상태로 정지시킨 뒤 심장을 적출하였다.

심장 조직의 섬유화 정도 측정

파라핀으로 포매된 조직을 5 μm 두께의 조직 절편으로 만든 뒤, sirius red F3B (Fluka, Buchs, Switzerland)와 포화 picric acid (Sigma, St. Louis, MO)의 혼합 용액인 picrosirius red 용액으로 90분 동안 반응시켜 염색한 뒤, 심장 조직의 섬유화 정도를 분석하고, 일반적인 조직학적 변화는 hematoxylin-eosin (H/E) 염색으로 관찰하였다. 섬유화의 정도는 image analysis software를 이용하여 총 pixels에 대한 적색 pixels의 비율로 정량 분석을 하였다.¹¹⁾

심근조직에서의 capillary endothelial stain

냉동 보관된 심장 조직을 OCT media (Sakura, Torrance,

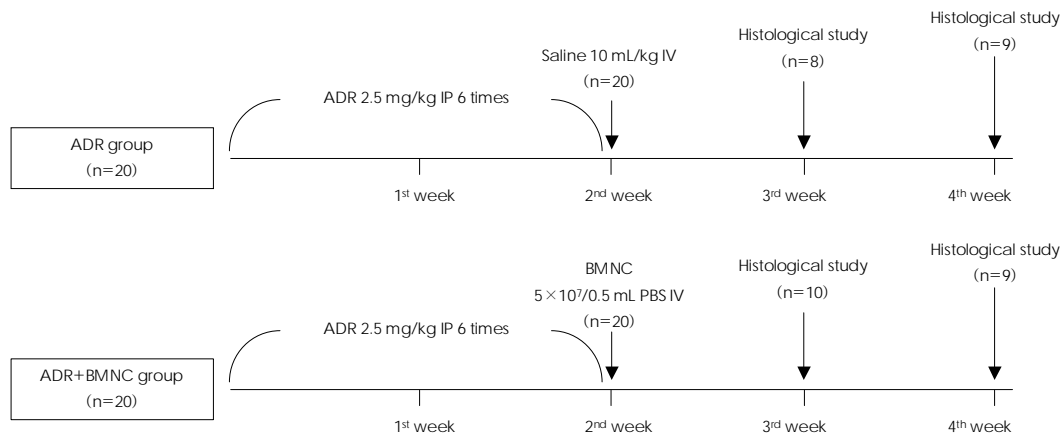


Fig. 1. Schedule of histological study, echocardiography and injection of saline, BMNCs, ADR. ADR: adriamycin, BMNCs: bone marrow mononuclear cells, PBS: phosphate buffer solution, IP: implantable pneumatic, IV: intravenous.

CA)로 냉동 보관 후, 5 μ m 두께의 조직 절편을 만든 뒤 alkaline phosphatase (Fast[®] BCIP/NBT; Sigma, St. Louis, MO)으로 염색한 뒤, eosin으로 대조 염색하여 모세혈관 내피 세포를 관찰하였다. 각각의 조직에서 임의로 선택한 3곳의 200배 확대 현미경 시야에서 염색된 모세혈관을 개수하였다.

심근세포 증식 평가

흰쥐의 안락사 48시간 전, 24시간 전, 3시간 전에 50 mg/kg의 bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma St. Louis, MO)를 복강 내 주사하였고, 세포 증식 평가를 위하여 BrdU in-situ detection kit (BD, San Diego, CA)를 사용하였다. 파라핀으로 포매된 조직을 5 μ m 두께의 조직 절편을 만든 뒤, BrdU 면역 조직 화학 염색은 제조사에서 제공하는 설명서를 참고하였다. 간단히 기술하면 제공된 용액 A와 용액 B를 혼합한 뒤, BD retrievagen A 용액을 만들어 항원성을 회복 (antigen retrieval) 시켰다. Anti-BrdU 항원을 1 : 10으로 희석시켜 1 시간 동안 습기 있는 용기에서 반응시켰다. PBS로 세척한 후 streptavidin-HRP를 30분 동안 반응시켜 DAB로 발색하고, hematoxylin으로 대조 염색을 하였다. 면역조직화학 검사는 BrdU에 대한 단일클론항체를 사용하여 수행하였다. 400배 확대 시야에서 심근에 있는 BrdU로 표지된 세포 수를 세어, BrdU-labeling index (BrdU-labeled nuclei 비율 \times 100)로 사용하였다.

세포이식 후 심근 조직에서 PKH 표지 세포의 존재 분석

이식된 세포의 심장 내 위치를 파악하기 위하여, 골수 단핵구 세포에 PKH-67를 부착하였다. PKH-67 green fluorescent cell linker kit (Sigma, St. Louis, MO)의 사용법은 제조사에서 제공한 설명서를 참조하였다. 간단히 기술하면, 1×10^6 개의 세포를 400 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤, 용액 C 100 μ m와 PKH-67 dye 100 μ m를 혼합하여 상온에서 5분간 반응시킨 뒤, BSA를 사용하여 반응을 중지시키고 Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM) 배지로 3번 세척하였다. 실험 쥐에 2.5×10^7 개의 세포를 정맥 주사하였다. 보관된 냉동 조직을 5 μ m 두께의 조직절편을 만든 뒤, 심장 조직 내에서 PKH-67이 표지된 세포의 위치를 490~520 nm 파장의 필터에서 confocal microscopy (Bio-Rad, Hercules, CA)로 분석하였다.

면역 조직 화학 염색 (Immunohistochemistry)

Cardiac Troponin I-C

PKH-67 표지 세포가 투여된 심장 냉동 조직을 5 μ m 두께의 조직절편을 만든 뒤, 심장 근육세포를 염색하기 위하여 심근세포에 특이적인 일차항원으로 polyclonal goat anti-human troponin I-C (Santa Cruz, Santa Cruz, CA)를 1 : 100으로 희석시켜 16시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 세척한 뒤 이차항체로 rhodamine (TRITC)-conjugated affinipure donkey anti-goat IgG (Jackson, Baltimore, MA)를 사용하여 475~575 nm 파장의 필터에서 confocal microscopy (Bio-Rad, Hercules, CA)로 분석하였다.

CXCR4

줄기세포의 homing에 관여하는 CXCR4에 관한 연구를 위하여 세포 치료 군과 대조군을 세포 치료 후 각각 7일과 14일에 희생시켜 심장조직을 파라핀에 포매한 뒤, 조직절편을 5 μ m 두께로 연속 절편을 만들어 Probe on+ 슬라이드 (Fisher)에 붙였다. 파라핀을 제거하고 탈수과정을 거친 다음 내인성 peroxidase를 차단하기 위하여 0.6% 과산화수소를 10분간 상온에서 반응시켰다. Elite ABC kit (Vector, Burlingame, CA)를 이용하여 정상 혈청으로 차단하고 일차항체인 polyclonal goat anti-human CXCR4항체 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA; 희석배수 1 : 100)을 첨가한 후 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 세척 후 biotinylated 이차항체를 첨가한 후 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St. Louis, MO)로 발색하였다.

CXCR4의 western blot

심장 분리 및 단백질 추출

Doxorubicin유발 심근증 모델에 세포 치료 후 7일 및 14일에 동물을 희생시켰다. 쥐의 심장을 적출한 뒤 액화 질소에 냉동 보관하였고 실험 시 보관한 심장 조직을 녹여서 PMSF (1.0 mM), EDTA (1.0 mM), pepstatin (1 μ M), leupeptin (1 μ M), aprotinin (0.1 μ M)등의 protease inhibitors가 함유된 Pro-Prep protein extraction solution* (iNtRON, 성남, 한국)을 넣은 뒤 tissue homogenizer (Polytron*, Luzern, Switzerland)로 균질화했다. 균질화물을 원심 분리한 후 상층액을 따로 분리하여 -70°C 에 보관하였다. 최종 단백질 정량은 Commassie plus protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 총 단백질을 정량하였다.

CXCR4의 western blot 검사

심근에서 추출된 총 단백질 80 μ g을 sample buffer (0.1 mol/L, Tris-HCl, 0.2 mol/L, dithiothreitol, pH 6.8, containing 4% SDS, 0.01% bromophenol blue)와 섞어 100°C 에서 5분간 가열하여 변성시킨 후 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 한 후 PVDF 막에 전이하여 5% blocking 용액으로 blocking한 후 일차 항체인 polyclonal goat anti-human CXCR4 항체 (C-20, Santa Cruz, Santa Cruz, CA; 희석배수 1:200)을 첨가한 후 4°C 에서 18시간 동안 반응시켰다. 세척 후 이차 항체로 horse radish peroxidase conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz, Santa Cruz, CA)를 첨가한 후 chemiluminescent detection 방법 (ECL, Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발색하였고, 결과는 ultrascan XL-enhanced laser densitometer (Pharmacia LKB Biotechnology Inc, Piscataway, NJ)를 이용하여 발색하였고 결과는 ultrascan XL-enhanced laser densitometer (Pharmacia LKB Biotechnology Inc, Piscataway, NJ)를 이용하여 정량하였다. 양성 대조군으로 배양된 HeLa 세포에서 추출한 단백질 (60 μ g)을 사용하였다. 지금까지 기술한 실험과정을 요약하면 Fig. 1과 같다.

통 계

모든 측정치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, One-way analysis of variance (ANOVA) 및 다중 검사는 Dunnett's t-test로 검정하였다. 통계학적 의미는 $p<0.05$ 인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

좌심실 기능 분석을 위한 심초음파검사

치료 14일 후 시행한 심초음파 검사에서 좌심실 이완기말 내경은 대조군이 8.4 ± 0.7 mm로 정상 대조군의 7.1 ± 0.6

mm에 비하여 증가되어 확장성 심근증이 유발되었으며, 세포 치료군에서는 7.2 ± 0.4 mm로 감소하였다 (대조군 vs. 세포 치료군: $p<0.01$). 좌심실 수축기말 내경은 대조군이 5.5 ± 0.4 mm로 정상 대조군 3.3 ± 0.3 mm에 비하여 증가하였으나 세포 치료군에서는 3.8 ± 0.4 mm로 유의있게 감소하였다 (대조군 vs. 세포 치료군: $p<0.01$). 치료 14일 후 대조군은 정상 대조군에 비하여 좌심실 기능의 지표인 내경 분획률 (LV%FS)이 21.5%로 저하되었으나 (대조군 vs. 정상 대

Table 1. M-mode echocardiograms findings recorded at 2 weeks after cell treatment

	NI	Con	Cell	p
LVIDd (mm)	7.1 ± 0.6	8.4 ± 0.7	7.2 ± 0.4	<0.01
LVIDs (mm)	3.3 ± 0.3	5.5 ± 0.4	3.8 ± 0.4	<0.01
LV%FS (%)	55.9 ± 5.3	34.4 ± 3.6	47.2 ± 4.9	<0.01

NI: normal control group, Con: control group, Cell: cell treated group, LVIDs: left ventricular interventricular dimension at diastole/systole, LV%FS: left ventricular percentage fractional shortening

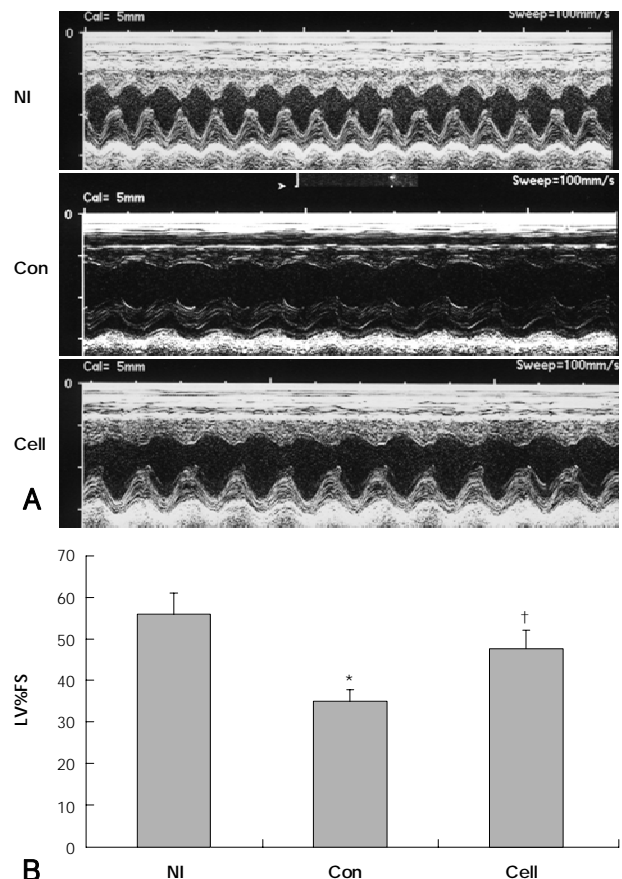


Fig. 2. Functional results of left ventricle on echocardiography. A: representative M-mode echocardiograms recorded at 2 weeks after treatment. B: left ventricular percent fractional shortening (LV%FS) calculated from M-mode tracings. Paper speed was 100 mm/sec. Control group (n=9) showed significantly decreased fractional shortening compared to normal control group (n=10). But it was increased significantly after intravenous injection of bone marrow mononuclear cell in mouse with doxorubicin induced cardiomyopathy (n=9). * $p<0.01$ versus normal group, † $p<0.01$ versus control group. NI: indicates normal control group, Con: control group, Cell: cell-treated group.

조군: $34.4 \pm 3.6\%$ vs. $55.9 \pm 5.3\%$, $p < 0.01$), 세포 치료군의 좌심실 내경 분획률은 대조군에 비하여 12.8% 개선되었다 (치료군 vs. 대조군: 47.2 ± 4.9 vs. $34.4 \pm 3.6\%$, $p < 0.01$) (Table 1) (Fig. 2).

세포 이식 후 PKH-67 표지 세포의 심근 조직내 분포

형광 물질인 PKH-67로 표지된 이식 세포는 정맥 주사 7일 후, 녹색 형광 색상을 띤 이식 세포가 심근 조직내 비교적 고르게 분포하고 있었다. 심근 세포를 cardiac TnI-C

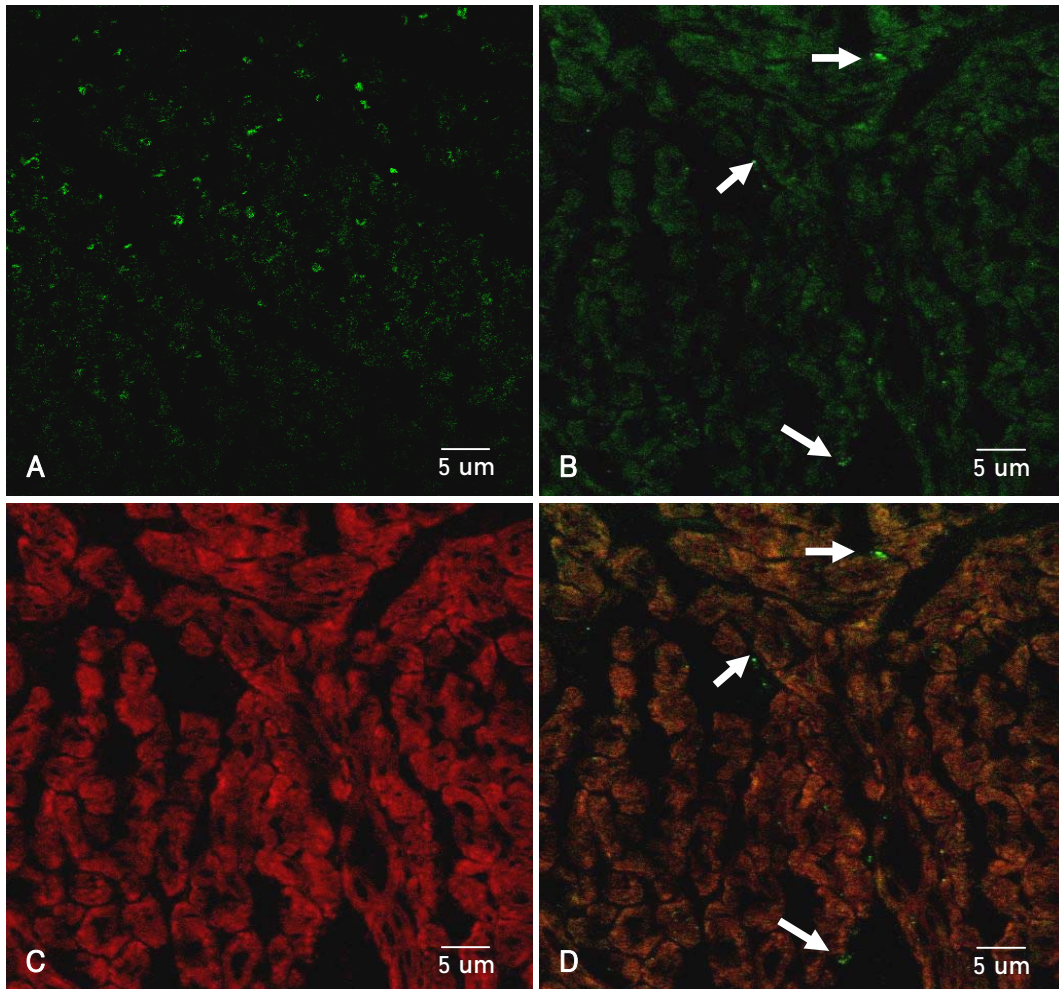


Fig. 3. Distribution of injected cells in rat heart. Bone marrow mononuclear cells (BMNCs) were labeled with fluorescent PKH-67. BMNCs or saline were then injected into the tail vein after a 2-week doxorubicin treatment. One week after injection, the hearts were examined. (A) The distribution of injected PKH-67 labeled stem cell-enriched BMNCs, in the heart appears as cells showing green fluorescence, using confocal microscopy (original magnification $\times 400$). (B) Injected cells, which had been labeled with PKH-67, emitted green fluorescence, while (C) expressions of cardiac troponin (TnI-C) were detected with red fluorescence after immunohistochemical staining. (D) Overlaps of PKH-67 (B) and TnI-C staining (C) demonstrate that transplanted PKH-67 co-locates in cardiomyocytes. Original magnification, $\times 400$. Representative data from five independent experiments are shown.

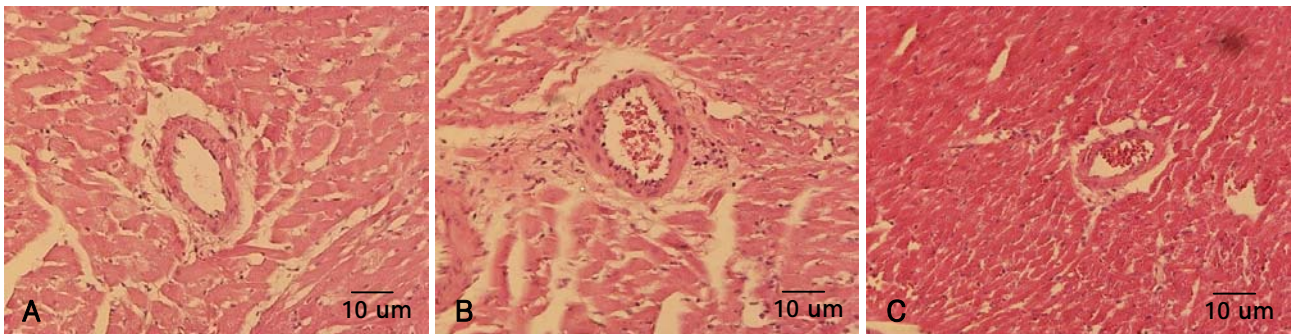


Fig. 4. Photomicrographs of H/E stained heart sections. From normal control (A), control (B) and cell-treated (C) rats. Cell-treated hearts showed significant reduction of inflammatory cells. Magnifications, $\times 200$. H/E: hematoxylin-eosin.

로 면역 염색한 뒤 분석한 결과 PKH-67 표지 세포가 심근 세포에 부착되어 있었다 (Fig. 3).

심장 조직 검사

세포 치료 14일 후 채취한 심장 조직에서 시행한 HE 염색에서 대조군은 정상군에 비하여 혈관 주위에 염증세포가 침습하여 있었으나, 세포 치료군은 대조군에 비하여 염증 세포의 침습은 감소하였다 (Fig. 4).

섬유화 정도를 분석하기 위하여 시행한 picrosirius red 염색상 대조군 (26.99 ± 2.54)은 정상 대조군 (11.24 ± 1.83)에 비하여 심근의 간질조직에 섬유화가 진행 되었으나 ($p < 0.01$), 줄기세포 치료군 (10.68 ± 1.66)은 대조군에 비하여 심근의 간질 조직의 섬유화는 감소되었다 ($p < 0.01$) (Fig. 5).

모세혈관 내피세포의 분포를 파악하기 위한 alkaline phosphatase 염색 검사에서 대조군 ($150.34 \pm 18.21/\text{mm}^2$)은 정상군 ($322.45 \pm 35.21/\text{mm}^2$)에 비하여 좌심실의 모세혈관의 분포가 감소하였으나 ($p < 0.01$), 치료군 ($234.56 \pm 25.31/\text{mm}^2$)

은 대조군에 비하여 모세혈관의 분포가 증가하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 6).

BrdU

세포 주기에서 S주기의 핵을 규명하는 BrdU in situ 조직 검사상, 세포 치료군의 심근조직에서 BrdU 양성세포가 3.2% 관찰된 반면에 정상 대조군이나 대조군에서는 BrdU 양성 세포를 관찰할 수 없었다 (Fig. 7).

CXCR4

Western blot

줄기세포의 homing에 관여하는 CXCR4의 발현은 정상 대조군 (58.74 ± 6.9)에 비하여 대조군에서 doxorubicin 투여 종료 7일 후까지 변화는 없었으나 (63.21 ± 5.7), 14일 후 발현이 유의 있게 증가하였다 (99.43 ± 10.1 ; $p < 0.01$). 세포 치료군은 세포 투여 7일에 CXCR4 발현이 유의 있게 증가하

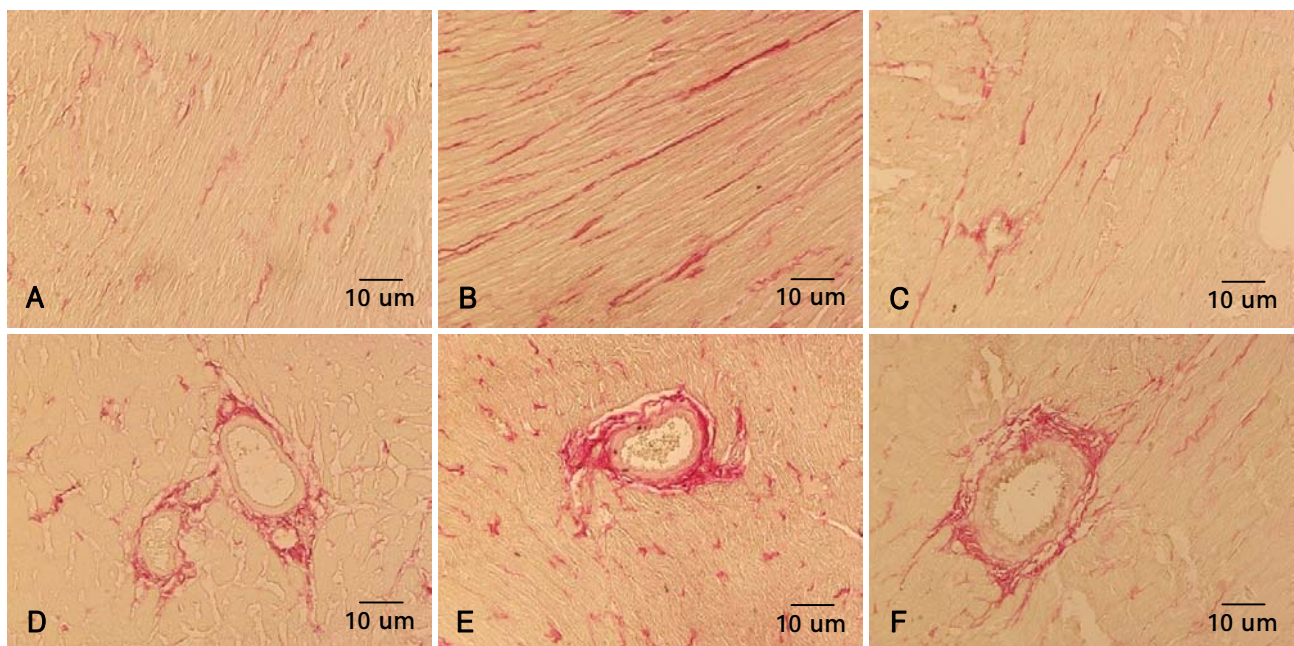


Fig. 5. Photomicrographs of picrosirius red stained heart sections from normal control (A, D), control (B, E) and cell-treated (C, F) rats. Cell-treated hearts showed attenuation representative of perivascular and myocardial fibrosis. Magnifications, $\times 200$.

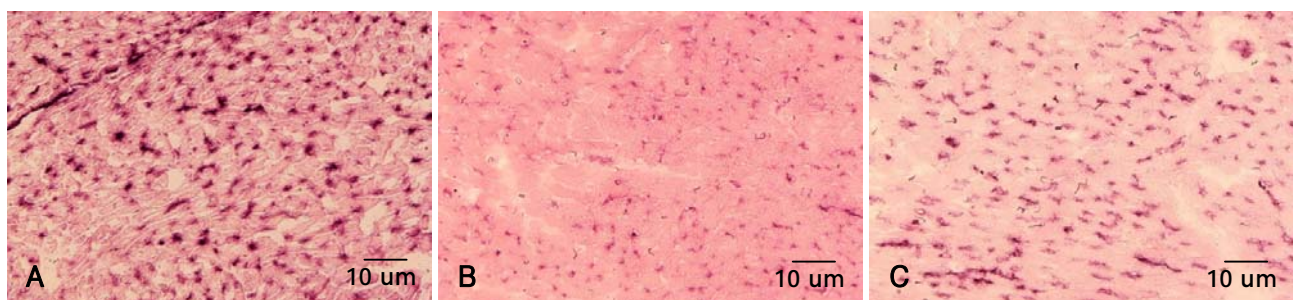


Fig. 6. Photomicrographs of alkaline phosphatase stained heart sections. From normal control (A), control (B) and cell-treated (C) rats. Cell-treated hearts showed increment of capillary density. Magnifications, $\times 200$.

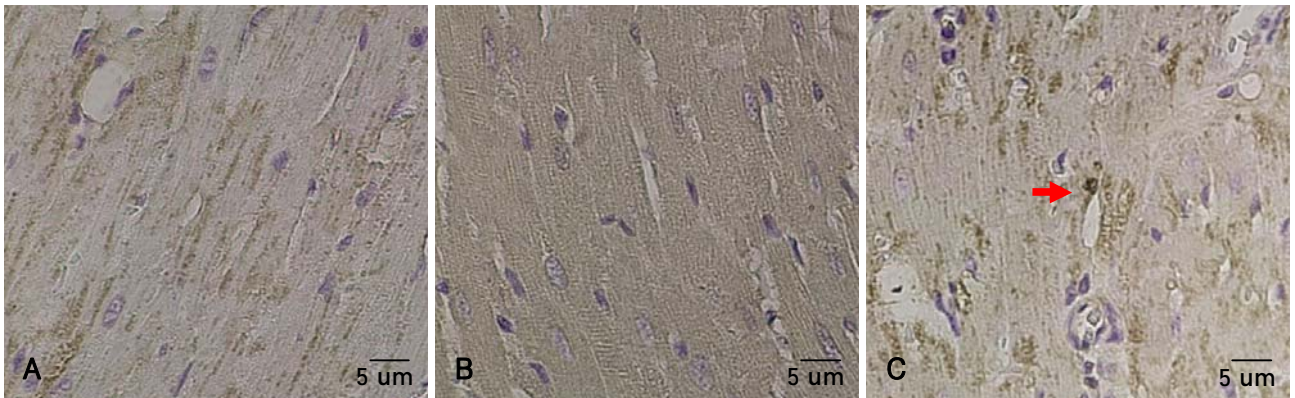


Fig. 7. Photomicrographs of BrdU stained heart sections. From normal control (A), control (B) and cell-treated (C) rats. Identification of BrdU-positive cells (dark brown color, arrow) in the cell-treated heart. Magnifications, $\times 400$.

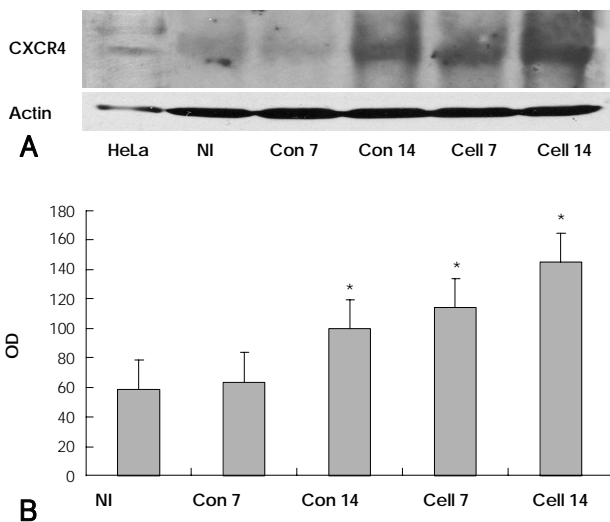


Fig. 8. Western blot analysis of CXCR4 expression in heart tissue. A: representative western blot images from normal control (NI), control (Con7, Con14), and cell-treated (Cell 7, Cell 14) rats 7 and 14 days after treatment. B: quantification of CXCR4 protein expression in ventricles from rats treated with saline and cells. Cardiac CXCR4 protein expression increased at day 7 (cell treated group vs. control group; $114.0 \pm 11.9\%$ vs. $63.2 \pm 5.7\%$, $p < 0.01$) and 14 in the cell-treated group, but only at day 14 in the control group. Cell extracts of the HeLa cell were used as positive control. Results are mean \pm SD. * $p < 0.01$ versus normal group. OD: optical density.

여 (114.01 ± 11.9 ; $p < 0.01$), 투여 14일 후에도 증가는 지속되었다 (145.03 ± 13.8 ; $p < 0.01$) (Fig. 8).

면역 조직화학검사

치료 14일 후 대조군과 세포 치료군의 심장 근육세포에서 현저한 CXCR4 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 9).

고 찰

본 연구는 doxorubicin 유인성 심근증 모델에서 성체 줄기세포를 이용한 심근 재생의 유효성을 실험하였다. 손상된 심근 조직에서 CXCR4 발현은 투여된 줄기세포의 homing에

관여하고, 이들 세포는 심근 및 혈관의 재생에 역할을 하였다.

최근 심장 질환의 치료 방법의 발전으로 환자의 생존 기간이 연장됨에 따라 심부전의 발생빈도는 점차 증가하는 추세이다. 심부전의 치료는 전통적인 약물치료 이외에도, 수술적 요법으로 좌심실 보조장치 (ventricular assist device), 전치환형 인공 심장 (total artificial heart) 등이 심장 이식과 더불어 발전하고 있으나 많은 환자에게 혜택을 주기에는 아직 극복해야 할 과제가 많다.

손상된 심장으로 줄기세포의 가동화 및 심근세포로의 분화는 자연적인 현상이라는 증거들이 대두되고 있지만,^{4,5)} 이들 과정은 너무나 천천히 진행하여 손상된 좌심실 기능을 회복하기에는 역부족이다. 세포 이식을 이용한 심기능 개선은 여러 심부전 모델의 실험에서 치료적 가능성을 제시하였으며,¹²⁻¹⁴⁾ 세포 공급원으로 골격근 세포 (skeletal myoblast), 심근세포 (cardiac myocytes), 심장 섬유아세포 (cardiac fibroblast), 골수 유래세포 (bone marrow-derived cell) 등의 여러 가지 세포가 가능성을 보였다. 그러나 Orlic 등¹⁵⁾이 심근 경색모델에서 골수세포의 직접 투여와 G-CSF투여를 통한 체내 줄기세포의 가동화로 심근 재생의 가능성을 보고한 뒤,¹⁶⁾ 임상적으로 말기 심부전 환자를 대상으로 자가 골수세포를 심장에 이식하는 임상 연구가 진행 중이다.⁶⁾

성체 줄기세포를 심장에 주사하는 방법으로는 관상동맥을 통하여 카테터로 주입하는 방법, NOGA* 시스템을 이용한 바늘이 달린 카테터로 심내막을 경유하여 심장 근육에 주사하는 방법, 개흉술 후 심장 근육에 직접 주사하는 방법 등이 임상 시험에서 시도되고 있으며,⁷⁾ 본 실험에서는 실험 동물의 정맥에 고용량의 골수유래 단핵구 세포를 주사하였다.

Doxorubicin 유인성 심근증은 현재 효과적인 치료법이 없으므로, 줄기세포를 이용하는 심기능 개선의 치료에 가능성이 있다.

본 연구 결과 doxorubicin 투여 후 심장 조직은 염증 세포의 침윤이 증가하고, 심근 간질조직에서 섬유화가 증가하며, 모세 혈관 내피세포가 감소하는 심장 조직에 변형이 생긴다. 그러나 세포 이식 후 염증 세포 침윤이 감소하고 심근 간질

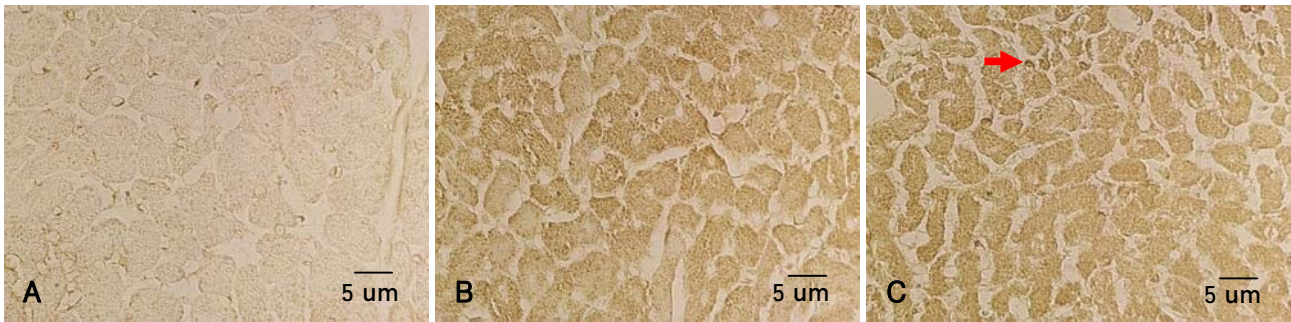


Fig. 9. Immunohistochemical findings for CXCR4 protein in heart cross-sections. From normal control (A), control (B) and cell-treated (C) rats. Positive staining was found in the cardiomyocytes. Magnifications, $\times 400$.

조직에서의 섬유화가 감소하며 모세혈관 내피세포의 분포도 정상화하는 등 조직학적으로 개선되는 결과가 관찰되고, 심초음파 검사에서 심기능의 개선도 관찰되었다.

세포 치료 시 주입된 세포의 생체 내 목표 장기에서의 분포 양상을 추적 또는 분석하고자 할 때, 세포에 형광 물질을 부착하는 Di-LDL (fluorescence-labeled acetylated LDL)나 PKH 등을 이용하거나 fluorochrome이나 대사 효소를 유전자에 주입한 유전자 조작술 등이 있다.¹⁷⁻²⁰⁾ 그리고 최근에는 주입한 세포의 생체 내 분포를 비 침습적인 방법인 방사선 동위 원소를 이용하여 측정하는 방법이 소개 되었으며, ¹¹¹In-oxine labeled endothelial progenitor cell (EPC)를 정맥 주사한 실험 결과, 96시간 뒤 심장 조직에 'homing' 하는 세포 양은 총 투여량의 약 1% 였다.²¹⁾

줄기세포의 homing과 engraftment는 염증 부위로의 백혈구의 이주 (migration) 및 임파절에 임파구의 homing과 일부 공통적인 양상을 띠는 다단계 과정이다.²²⁾ Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12)은 chemokine CXC subfamily의 한 종류로서 설치류의 골수세포에서 최초로 분리 되었으며, 여러 조직의 간질에서 발현되는 강력한 chemoattractant로서 발달기 조직 및, 성체의 여러 조직에서 광범위하게 발현한다. 그러나 다른 pro-inflammatory chemokine과는 달리 골수를 포함한 많은 장기들에서 구조적 (constitutively)으로 생산되어, 백혈구의 trafficking, 조혈모세포의 골수 내 체류 (retention)를 조절하는 등 일정한 항상성 과정 (steady-state homeostatic process)에 주요 역할을 하리라 생각된다.²³⁾ Chemokine 수용체인 CXCR4는 7-transmembrane spanning G protein-coupled receptor로 SDF-1에 대해 알려진 유일한 수용체이다. 가동화된 CD34 양성이 풍부한 세포에서 CXCR4의 발현이 낮게 관찰되고, 생체 외 이동 (migration)은 SDF-1 증감률 (gradient)이 감소된 쪽으로 향한다.

SDF-1과 CXCR4의 상호작용은 조혈모 세포 (hematopoietic stem cell)의 homing과 재분포 (repopulation)에 강하게 작용하며,²³⁻²⁵⁾ 혈관생성,²⁶⁾ cardiogenesis,²⁰⁾ 허혈 조직에서의 EPC의 recruitment,²⁷⁾ primordial germ cell의 이주²⁸⁾ 및 뇌조직 발달에²⁹⁾ 관여한다. 그리고 체내 SDF-1의 과다

발현은 줄기세포의 가동화에 관련된다.³⁰⁾

본 연구의 제한점은 PKH와 CXCR4를 이용하여 골수유래 단핵구 세포가 심장근육에 homing 및 engraftment함은 확인할 수 있었으나 실제로 골수유래단핵구 세포가 심장근육 세포로 분화하여 기능을 하였는지에 대한 실험이 시행되지 못하였다는 점과 또한 PKH에 의한 염색에서 세포간의 확산에 의한 artifact가 발생한 가능성을 배제할 수 없다는 것이다. 본 실험에서 doxorubicin 투여 후 세포 치료군에서 투여 7일 후 CXCR4 발현이 증가한 사실은 CXCR4를 발현하는 골수 유래 단핵구 세포들이 손상된 심장 조직으로 많이 homing 된 것을 의미할 수도 있지만 장차 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며 향후 "enhanced" green fluorescent protein (EGFP) transgenic mouse를 사용하면 세포의 분화 및 homing을 더욱 확실하게 증명할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

배경 및 목적

성체 줄기세포를 이용한 재생 의학의 기법으로 손상된 심장을 개선시킬 수 있다는 보고들이 증가하고 있다. 본 연구는 doxorubicin 유발 심근증 모델에서 골수 단핵구세포를 이용하여 심근 재생 및 심근 기능 개선 효과를 연구하고자 하였다.

방 법

Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 이용한 doxorubicin 유발 심근증 모델에서 쥐 골수에서 분리된 성체 줄기세포를 정맥주사 하였다. 세포 치료 7일 후 이식된 세포의 심장 조직 내 분포를 평가하였고 세포 치료 14일 후에 심초음파를 이용하여 좌심실 기능을 분석하였다. 세포 이식 효과의 판정으로 조직학적 검사에서 조직의 섬유화 정도 및 모세혈관 내피세포 분포를 검사하였다. 이식된 세포의 심장조직으로의 homing 기전을 규명하기 위하여 CXCR4의 발현을 분석하였다. 심근세포의 증식 평가를 위하여 BrdU 면역 조직화학검사를 하였다.

결 과

PKH-67로 표지된 이식 세포는 심장 조직에 잘 분포되

었다. Doxorubicin 유인성 심근증의 조직은 염증세포의 침윤과 간질조직에서 섬유화가 증가하고, 모세 혈관 내피세포의 분포가 감소하였지만, 세포 이식 후 염증 세포 침윤과 심근 간질 조직에서의 섬유화가 감소하였고 모세혈관 내피세포의 분포도 정상화하는 등 조직학적 소견이 개선되었고, 심초음파 검사상 좌심실 기능도 개선하였다. CXCR4 단백질 발현이 대조군은 세포 치료 14일에 증가하였으나, 세포 치료군은 7일에 상승하여 14일까지 지속하였다. 세포 치료 후 손상된 심장의 심근 세포 증식의 지표인 BrdU 양성세포가 관찰되었다.

결론

Doxorubicin 유발 심근증 모델에서 성체 줄기세포 정주 후 심근에서 골수유래 단핵구 세포가 발견되었고 심근 재생 및 심근 기능이 개선되었다.

중심 단어: 성체 줄기 세포; Doxorubicin; 심근증; CXCR4; 심근 재생.

Acknowledgments

본 연구는 보건복지부 기능성 세포 치료제 개발사업 (0405-DB01-0104-0006)의 지원에 의하여 이루어져 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977;197:165-7.
- Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;339:900-5.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001;344:1750-7.
- Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5-15.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
- Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transcatheter injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110(11 Suppl 1): II213-8.
- Baek SH. The current concept of cell therapy for heart failure. *Korean Circ J* 2005;35:415-23.
- Korbling M, Estrov Z. Adult stem cell for tissue repair: a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-82.
- Park CS, Youn HJ, Cho EJ, et al. Cardioprotective effect of IGF-1 in mouse with adriamycin induced cardiomyopathy. *Korean Circ J* 2002;32:1116-23.
- Tomita M, Adachi Y, Yamada H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 2002;20:279-83.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-55.
- Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994;264:98-101.
- Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4:929-33.
- Lim SY, Jeong MH, Ahn YK, et al. The effects of mesenchymal stem cells transduced with akt in a porcine myocardial infarction model. *Korean Circ J* 2005;35:734-41.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10344-9.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3422-7.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776-9.
- 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* 2002;90:284-8.
- Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:1132-40.
- Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003;107:2134-9.
- Peled A, Kollet O, Ponomarev T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000;95:3289-96.
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002;3:687-94.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Nature* 1996;382:635-8.
- Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003;111:187-96.
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-4.
- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322-8.
- Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, et al. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002;111:647-59.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in hematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595-9.
- Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354-60.