

냉동손상을 준 누드마우스방광에서 GIKVAV와 인간의 근육유래 줄기세포가 신경재생 및 방광수축력에 미치는 영향

The Effect of Human Muscle-Derived Stem Cells (MDSC) and Glycine-Isoleucine-Lysine-Valine-Alanine-Valine (GIKVAV) on the Cryo-Injured Bladder of Nude Mouse

Yong Seok Lee, Ji Young Lee, Eun Bi Kwon, Hee Youn Kim, Hyuk Jin Cho, Sae Woong Kim, Tae-Kon Hwang, Seok Soo Byun¹, Dong Keun Han², Ji Youl Lee

From the Department of Urology, The Catholic University of Korea College of Medicine, ¹Seoul National University College of Medicine, ²Department of Biomaterials Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

Purpose: In neurogenic bladder, both smooth muscle contraction and nerve regeneration are very important for functional improvement. Glycine-isoleucine-lysine-valine-alanine-valine (GIKVAV) is a peptide that can induce nerve regeneration in vivo. In this study, we evaluated bladder function after injection of muscle-derived stem cells (MDSCs) and GIKVAV into the cryo-injured bladder of nude mice.

Materials and Methods: Human muscle samples were obtained from the rectus abdominis muscle of 12 patients who underwent laparotomy. The purpose and entire method of the study were explained to the patients, and all subjects who participated in this study provided written informed consent. The MDSCs were isolated by a modified preplate technique, and only CD34+ human MDSC were extracted by use of Mini-MACS kits. The nude mice were subdivided into 5 groups (n=40): normal group (N, n=8), saline injection group after cryo-injury (S, n=8), GIKVAV injection group after cryo-injury (G, n=8), human MDSC injection group after cryo-injury (M, n=8), and GIKVAV and human MDSC injection group after cryo-injury (GM, n=8). At 2 weeks after injection, we compared the contractility of a bladder muscle strip of each group by organ bath and polygraph by using electronic field stimulation (EFS). Nerve regeneration was evaluated by choline acetyl transferase (ChAT) immunostaining.

Results: The contractile powers of the N, S, G, M, and GM groups were 3.58 ± 0.27 , 1.54 ± 0.25 , 1.54 ± 0.31 , 2.49 ± 0.36 , and 2.44 ± 0.34 mN/mg, respectively, by EFS. The contractility of the bladder muscle strip in the S and G groups was lower than that in the N group. The contractile powers of the M and GM groups were lower than those of the N group but greater than those of the S and G groups. In ChAT immunohistochemical staining, nerve regeneration was increased in the G and GM groups compared with the S and M groups.

Conclusions: Nerve regeneration was induced by GIKVAV injection regardless of human MDSC injection. There was no direct effect of GIKVAV on bladder muscle contractility. (Korean J Urol 2009;50:480-485)

Key Words: Muscles, Stem cells, Nude mice, Nerve regeneration

Korean Journal of Urology
Vol. 50 No. 5: 480-485, May 2009

DOI: 10.4111/kju.2009.50.5.480

가톨릭대학교, ¹서울대학교
의과대학 비뇨기과학교실,
²한국과학기술연구원
생체재료연구센터

이응석 · 이지영 · 권은비 · 김희연
조혁진 · 김세웅 · 황태곤
변석수¹ · 한동근² · 이지열

Received : November 26, 2008
Accepted : January 6, 2009

Correspondence to: Ji Youl Lee
Department of Urology, Seoul St.
Mary's Hospital, The Catholic
University of Korea College of
Medicine, 505, Banpo-dong,
Seocho-gu, Seoul 137-040, Korea
TEL: 02-2258-6227
FAX: 02-2258-6227
E-mail: uroljy@catholic.ac.kr

© The Korean Urological Association, 2009

서 론

뇌, 척수 손상에 의한 신경인성방광뿐 아니라 당뇨병 등 만성병에 의한 합병증으로 인한 신경인성방광 환자와 고령화 사회가 되어감에 따라 방광기능 저하로 인한 배뇨장애 환자가 늘어나고 있으며, 이들의 근본적인 치료로는 현재 간헐적 도뇨와 Foley catheter의 주기적인 반복삽입만이 사용되고 있다.

저자들은 근육줄기세포를 이용한 요실금 치료 및 평활근으로의 분화에 대한 연구를 해 왔으며^{1,4} 이들이 허부요로에서 요도 및 방광기능의 향상에 기여함을 보고하였다.

Glycine-isoleucine-lysine-valine-alanine-valine (GIKVAV) sequence는 laminin $\alpha 1$ chain의 C-terminal에 위치하고 있으며 세포 부착, 신경돌기 증식, 종양 성장 등에 관여한다고 알려져 있으며 현재 신경재생에 도움을 주는 물질로 알려져 있다.⁵

본 연구에서는 누드마우스의 방광에 냉동 손상을 주어 만든 방광기능저하 동물모델에서 사람의 근육유래 줄기세포와 신경재생을 촉진시키는 peptide인 GIKVAV를 주사하여 방광의 신경 재생 및 수축력 향상에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 근육유래줄기세포의 분리 및 동정

연구계획서는 가톨릭대학교 성의교정 생명윤리심의위원회에서 승인을 받고 동의서에 서명한 12명의 환자에서 개복술 시행도중 복직근 (rectus abdominis muscle)에서 약 1 cm³의 골격근을 채취하였다. 채취한 근조직에서 세 가지 효소를 이용하여 사람의 근육유래줄기세포를 분리하였다. 24 시간 후 세포들이 플라스크에 달라붙는 접착 정도의 차이를 이용하여 일정 시간 간격으로 콜라젠을 코팅한 플라스크 (Nalge Nunc International, Rochester)를 사용하는 전플라스크방법 (preplate method)⁶을 변형하여 이용하였고 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM: Gibco-BRL, Gland island, USA), 10% fetal bovine serum (FBS), 항생제 (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml)가 포함된 배양액에서 4일간 배양한 후 magnetic bead sorting (Mini-MACS Kits; Miltenyi Biotec Inc. USA)을 이용하여 CD34 양성인 근육줄기세포만을 분리하여 사용하였다.⁷ 사람의 근육유래 줄기세포는 주입 1시간 전에 PKH-label (red color)하여 사용하였다.

2. 실험 동물

약 20 g의 7주령 암컷 누드마우스 (BALB/c-nu Slc strain, SLC Inc., Shizoka, Japan) 40마리를 1주일간의 적응기간을 거친 후 사용하였다. 실험동물은 가톨릭대학교 성의교정 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 동물실험실에서 사육되었으며 동물들은 18-21°C의 온도와 50%의 습도를 유지시키며 12시간씩 밤과 낮의 밝기를 지켜주었고, 적절한 사료와 물을 공급하였다. 실험동물은 5군으로 분류하였다; 정상 방광군 (Normal; N group, n=8), 냉동손상 후 생리식염수 주입군 (Saline; S group, n=8), 냉동손상 후 GIKVAV를 주사한 군 (GIKVAV; G group, n=8), 냉동손상 후 근육유래 줄기세포를 주사한 군 (MDSC; M group, n=8), 그리고 냉동손상 후 GIKVAV 및 근육유래 줄기세포를 주사한 군 (GIKVAV + MDSC; GM group, n=8).

3. 방광기능저하 동물모델 구축

S, G, M 및 GM군에서는 드라이아이스에서 냉동시킨 직경 3 mm의 알루미늄 핀을 이용하여 누드마우스의 방광 배측 정중앙을 15초간 냉동손상 시켜 방광기능저하 동물 모델을 구축하였다.⁸

4. 방광 수축력 평가

방광손상 2주 후에 GIKVAV 및 근육유래 줄기세포를 1 cc 주사기를 이용하여 손상 부위에 주입하고, 주입 4주 후에 실험동물들을 희생시키고 각 군의 방광을 떼어내어 각각 방광근육 조직절편 (5x1 mm)을 준비하였다. Organ bath 실험에서 vertical chambers (vol. 20 ml)에 CO₂/bicarbonate buffered Tyrode solution을 채운 후 방광조직 절편을 고정시켰다. 약 1시간 동안 안정화시킨 후 전기 자극 (electrical field stimulation, EFS: 60 V, 20 Hz, 1 msec)을 준 후 각 군의 방광수축력을 비교하였다.

5. 조직학적 관찰

주입 4주 후 방광 수축력 검사 후에 방광절편을 동결조직으로 만들어 형광현미경으로 PKH를 관찰하여 근육유래 줄기세포 주사부위를 확인한 후에 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 하여 관찰하였다. 그 후 근육줄기세포의 형태학적 특성을 규명하기 위해 vector shield with DAPI (Vector, Burlingame, USA), choline acetyl-transferase (CAT) (Chemicon, Temecula, USA; 1:250) 항체를 이용한 면역형광염색을 시행하였으며 방법은 다음과 같다. 염색 시 비특이적 반응을 억제하기 위하여 blocking solution (1.5% normal goat serum, 1.5% normal horse serum, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in

PBS)으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, CAT 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS로 3회 수세한 후, 이차항체인 FITC conjugated anti-mouse IgG와 Texas-red conjugated anti-rabbit IgG를 각각 1:500으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS로 3회 수세한 후, DAPI로 mounting 하고 Olympus BX50 형광현미경으로 관찰하여 Olympus DP70 디지털카메라로 choline acetyl transferase의 면역염색을 통하여 신경재생을 관찰하였다.

6. 통계 분석

모든 실험 자료는 SPSS프로그램 (11.0 for Windows)을 사용하였으며 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 방광 수축력을 비교하기 위하여 Student's t-test를 사용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

결 과

1. 근육유래줄기세포와 GIKVAV 주입 후 방광 수축력의 변화

Organ bath에서 전기 자극을 주어 측정한 방광 수축력은 N, S, G, M 및 GM군에서 각각 3.58 ± 0.27 , 1.54 ± 0.25 , 1.54 ± 0.31 , 2.49 ± 0.36 그리고 2.44 ± 0.34 g/tension이었다 (Fig. 1). S

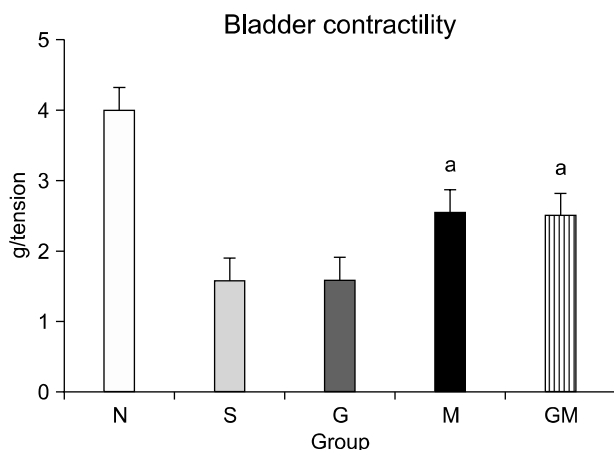


Fig. 1. The organ bath study of bladder contractility by use of electrical field stimulation. The average contractile power of the bladder muscle strip in all experimental groups (S, G, M, GM) was significantly less than in the normal control group (N). The average contractile power of the M and GM groups was significantly higher than that of the S and G groups. N: normal, N group, S: saline, S group, G: glycine-isoleucine-lysine-valine-alanine-valine, G group, M: muscle-derived stem cells, M group, GM: GIKVAV+MDSC, GM group, ^a: $p < 0.01$ compared with S and G groups.

와 G군의 방광수축력은 N군에 비하여 감소하였고, M과 GM군의 방광 수축력은 N군 보다는 낮았으나 S와 G군보다는 높게 나타났다.

2. 근육유래줄기세포와 GIKVAV 주입 후 조직학적 관찰

1) H&E staining: 주입 4주 후 방광 조직을 H&E 염색으로 관찰한 결과 N군에 비하여 S와 G군의 방광벽은 평활근의 감소로 인하여 두께가 감소하였으나, M과 GM군에서는 평활근의 증가로 인하여 방광벽이 다시 증가된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2A-E).

2) 형광현미경 소견: 근육줄기세포가 주사된 M과 GM군에서는 PKH를 발현하는 red-color가 평활근 사이에 관찰되었으나, N, S 및 G군에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 2F-J).

3. Choline acetyl transferase 면역염색

정상군에서는 green color의 신경조직이 DAPI로 염색되는 평활근 사이에서 관찰되고 있다 (Fig. 3A). 그러나 S 및 M군에서는 choline acetyl transferase 발현정도가 감소되어 있으며 (Fig. 3B, D), G 및 GM군에서는 choline acetyl transferase 발현정도가 다시 증가되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3C, E).

고 찰

배뇨근저활동성은 평활근이 소변을 배출하기에 적합한 압력을 발생시키지 못하는 경우와 수축을 유지하지 못하는 경우로 나뉜다. 배뇨근수축력은 나이가 들에 따라 저하하며 신경이나 근육 기능이상으로 인해 감소한다. 방광의 소변 배출에는 지속적인 긴장성 수축이 필요한데 방광에 허혈성 장애가 오면 긴장성 수축력은 소실된다. 방광의 수축력 장애는 방광의 혈액순환이나 신경, 배뇨근의 기능장애 등으로 인해 유발될 수도 있다. 또한 방광에 대한 말초신경 지배의 장애 (당뇨병, 갑상선기능저하증, 요독증, Guillain-Barre 증후군, 척수로, 알코올 중독, 영양실조, 비타민 B₁₂ 결핍증)가 있어도 배뇨근의 수축장애가 올 수 있다.

신경인성방광은 전통적으로 청결 간헐적 도뇨법, 약물요법 등을 통해 방광 내 압력을 줄이는 동시에 어느 정도의 요도 저항을 유지시켜 줌으로써 비정상적인 방광 근육 운동의 치료 및 상부요로손상의 예방, 배뇨 기능의 복원을 목표로 치료되고 있고 이러한 치료가 실패한 경우에는 방광 내 충전제 (bulking agent) 주입술, 방광 대치술, 방광 확대술 같은 수술적 치료를 시행할 수 있다. 그러나 이러한 수술적 치료는 산염기 불균형, 영양분 결핍, 재발성 요로감염, 결석

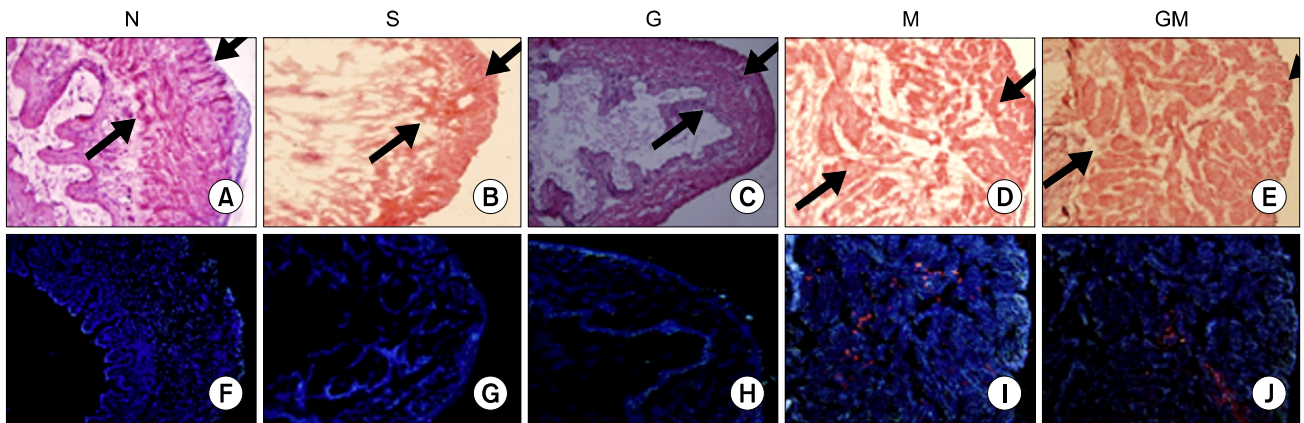


Fig. 2. H&E and fluorescent imaging of nude mouse bladder. The black arrows show the smooth muscle thickness of each group. The bladder smooth muscle layers of the S and G groups were thinner than those of the N group (A-C, x100). The bladder smooth muscle layers of the M and GM groups were thicker than those of the S and G groups (D, E, x100). Newly developed muscle layers were found in the M and GM groups. In fluorescent microscopy, PKH-labeled (red colored) injected cells were observed in the newly developed smooth muscle layers in the M and GM groups (I, J, x100) but not in the N, S, and G groups (F-H, x100). N: normal, N group, S: saline, S group, G: glycine-isoleucine-lysine-valine-alanine-valine, G group, M: muscle-derived stem cells, M group, GM: GIKVAV+MDSC, GM group.

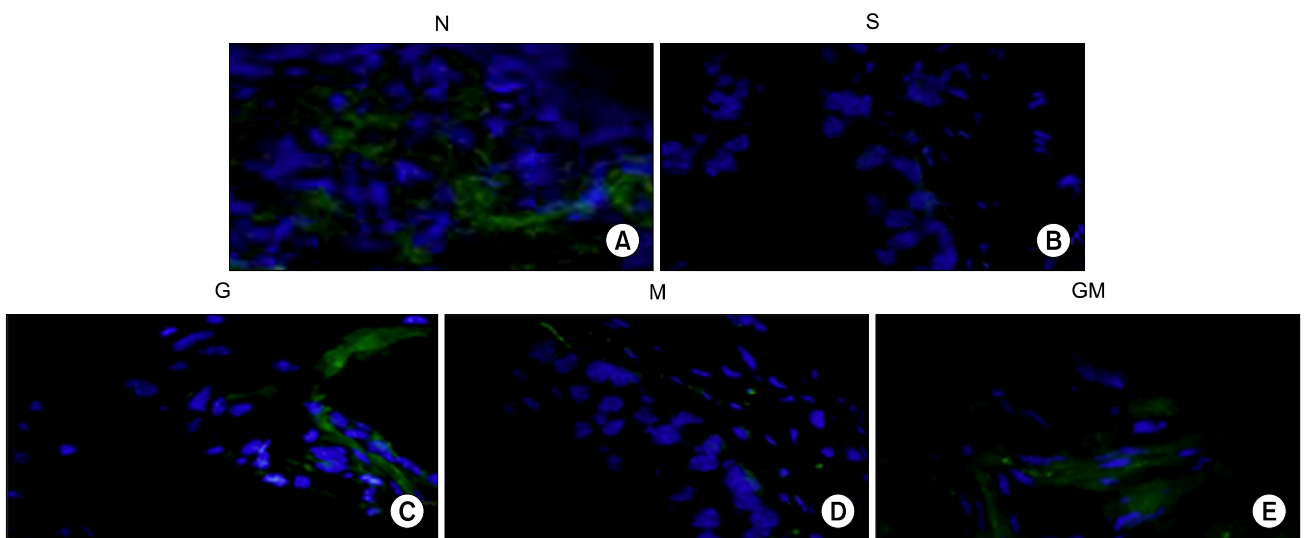


Fig. 3. Immunohistochemical staining of choline acetyl transferase in nude mouse bladder. The nuclei were colored with DAPI (blue color). Four weeks after cryo-injury, immunofluorescence analysis showed a decreased expression (green color) of choline acetyltransferase in the S and M groups compared with the N group (A, B, D, x100). After injection of GIKAV, the expression of choline acetyl transferase (green color) was increased in the G and GM groups compared with the S and M groups (C, E, x100). N: normal, N group, S: saline, S group, G: glycine-isoleucine-lysine-valine-alanine-valine, G group, M: muscle-derived stem cells, M group, GM: GIKVAV+MDSC, GM group.

형성 등의 부작용이 발생할 수 있다. 최근 조직 공학과 세포 이식이 많은 분야에서 고식적인 치료방법들을 대체할 수 있는 신기술로 각광받고 있고 많은 연구들이 진행되고 있다.

본 연구에서는 냉동 손상을 준 누드마우스 방광에서 근육유래 줄기세포와 신경재생을 촉진시키는 peptide인 GIKVAV를 주사하였을 때 신경 재생유도 및 방광 수축력 향상에 대하

여 실험하였다. 또한 근육 줄기세포는 환자의 골격근에서 쉽게 얻을 수 있고 비교적 짧은 시간에 많은 양을 분리 및 배양시킬 수 있다. Cannon 등⁹은 근육 줄기 세포를 신경 절단된 쥐의 요도에 주입했을 때 요도 조임근의 수축력 향상을 볼 수 있었고 Lee 등¹⁰은 SUI 쥐 모델에서 근육 줄기 세포를 주입했을 때 leak point pressure의 증가를 관찰 할

수 있었다고 보고하였다.

Huard 등¹¹은 하부요로기관인 방광 및 요도에 근육줄기세포를 투여 후에 6개월 이상의 장기적인 생존을 보고하였다. 이 실험에서 누드마우스와 쥐의 방광에 냉동손상을 준 후 근육줄기세포를 주사한 결과 이들의 일부가 평활근 세포로 분화하였으며, 이들 세포에서 신경재지배를 받는 것이 관찰되었다. 본 연구에서는 방광에 근육유래줄기세포의 주입을 통해 평활근으로의 분화를 관찰할 수 있었고 organ bath study를 이용해 Huard 등¹¹의 실험의 결과와 같이 방광 수축력도 증가했음을 관찰할 수 있었다. 저자들은 방광 손상부위에 GIKVAV를 주입하여 choline acetyl transferase의 면역염색이 증가된 것을 관찰하였는데 이는 방광 손상부위의 신경재생을 의미하는 결과이다. 그러나 GIKVAV만 주입한 경우 이러한 신경재생이 방광근육의 수축력을 증가시키지는 못하였다. 근육유래줄기세포와 GIKVAV를 동시에 주입한 경우에서만 방광근육 수축력이 증가되었고 동시에 신경재생이 관찰되었다.

Laminin은 기저막에서 발견되는 당단백질로 laminin-1은 $\alpha 1$, $\beta 1$ 그리고 $\gamma 1$ 3가지 chain으로 구성되어 있으며 교차형태로 구성되어 있고 세포 분화, 세포 모양 및 운동, 조직 표현형의 유지, 조직 생존에 관여하고 있다. Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) sequence는 laminin $\alpha 1$ chain의 C-terminal에 위치하고 있고 세포 유착, 신경돌기 증식, 혈관신생 그리고 종양 성장과 관련이 있다. IKVAV sequence를 이용하여 세포 유착, hydrogel과 결합하여 신경 재생, 척수 손상 이후 axon elongation 등 여러 분야에서 이용되고 있다.^{12,13}

Choline acetyl transferase의 존재는 신경근 접합부의 존재로 분석될 수 있다. GIKVAV를 주입한 군에서 근육 줄기세포의 주사여부에 관계없이 choline acetyl transferase의 면역염색이 증가된 것을 관찰할 수 있었고 이는 peptide가 신경 재생을 유도한 것으로 설명될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 신경재생이 방광근육 수축력에는 영향을 주지는 못하였지만 다른 연구의 결과로 볼 때 신경재생이 신경인성방광의 치료에 의미 있는 결과를 가져다 줄 것으로 기대된다.

본 연구는 방광기능저하 동물모델에서 방광 수축력 및 신경 재생을 보여주었지만 실제 신경인성방광은 오랜 시간에 걸쳐 발생하는 만성 질환으로 이 연구의 결과를 그대로 신경인성방광에 적용하기에 무리가 있을 것이며 아직 더 많은 연구가 필요하다. 하지만 이러한 조직 공학 및 세포 이식법이 신경인성방광의 새로운 치료 방법으로 자리매김할 것으로 생각한다.

결론

누드마우스의 신경인성 방광모델에서 인간 근육유래줄기세포치료는 평활근 세포의 증가와 함께 저하된 방광 수축력을 향상시켰다. GIKVAV는 누드마우스의 방광 내에서 근육유래줄기세포의 주사 여부에 관계없이 choline acetyl transferase의 발현을 증가시켰으나 방광 수축력에는 영향을 미치지 못하였다.

REFERENCES

- Koh JS, Lee JY, Lee JY. The effects of human muscle derived stem cells on the Induction of peripheral nerve regeneration. Korean J Urol 2008;49:350-9
- Lee HN, Lee JY, Koh JS, Kim HW, Byun SS, Lee SS, et al. Muscle derived stem cell/alginat/polycaprolactone/ injection therapy in rats with denervated urethral sphincter. Korean J Urol 2007;48:1296-301
- Choo GY, Lee JY, Park WH, Jung YS. Effects of injection therapy using muscle derived stem cell/chitosan/hydroapatite composite gel in a rat model of urinary incontinence. Korean J Urol 2007;48:627-32
- Byun SS, Chung YS, Lee SS, Lee HN, Lee JY, Lee JY. Augmentation cystoplasty using hydroxapatite/chitosan composite sheet seeded with autologous muscle-derived stem cells. Korean J Urol 2007;48:433-8
- Lin X, Takahashi K, Liu Y, Zamora PO. Enhancement of cell attachment and tissue integration by a IKVAV containing multi-domain peptide. Biochim Biophys Acta 2006;1760: 1403-10
- 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
- Real C, Scintu F, Pillai R, Cabras S, Argioli F, Ristaldi MS, et al. Differentiation of human adult CD34+ stem cells into cells with a neural phenotype: role of astrocytes. Exp Neurol 2006;197:399-406
- Somogyi GT, Yokoyama T, Szell EA, Smith CP, de Groat WC, Huard J, et al. Effect of cryoinjury on the contractile parameters of bladder strips: a model of impaired detrusor contractility. Brain Res Bull 2002;59:23-8
- Cannon TW, Lee JY, Somogyi G, Pruchnic R, Smith CP, Huard J, et al. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. Urology 2003;62:958-63
- Lee JY, Cannon TW, Pruchnic R, Fraser MO, Huard J, Chancellor MB. The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence. Int Urogynecol J Pelvic Floor

Dysfunct 2003;14:31-7

11. Huard J, Yokoyama T, Pruchnic R, Qu Z, Li Y, Lee JY, et al. Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction. *Gene Ther* 2002;9:1617-26
 12. Gunn JW, Turner SD, Mann BK. Adhesive and mechanical properties of hydrogels influence neurite extension. *J Biomed Mater Res A* 2005;72:91-7
 13. Tysseling-Mattiace MV, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, Fehlings MG, et al. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *J Neurosci* 2008;28:3814-23
-