

마우스 하지 허혈 모델에서 골수세포 주입에 의한 신생혈관 생성기전

가톨릭대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²조혈모세포 연구실, ³외과학교실

조현민³ · 홍종욱² · 김준기³ · 김정아^{1,2}

The Role of Bone Marrow Mononuclear Cells in Angiogenesis in Mouse Hind Limb Ischemic Model

Hyeon-Min Cho³, Jong-Wook Hong², Jun-Gi Kim³ and Jeong-A Kim^{1,2}

¹Department of Internal Medicine, ²Hematopoietic Stem Cell Transplantation Laboratory,

³Department of General Surgery, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Angiogenesis is enhanced in the ischemic tissues after the injection of bone marrow cells (BMCs). However the exact mechanisms for this are not yet fully understood.

Methods: A unilateral ischemic limb was surgically induced in mice and then BMCs were injected into the ischemic area. We measured the capillary/muscle ratio. Fluorescence-labeled BMCs were injected into the ischemic tissues and then the locations of the cells were examined by using a confocal microscope. Recruitment of bone marrow-derived cells into the ischemic tissue was examined in a sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) setting by identifying the Y chromosome with using the FISH technique. The expressions of VEGF, MMP-9, SDF-1 and CXCR-4 were measured by Western blot analysis.

Results: The capillary/muscle ratio was more increased in the BMC-injected group than in the control group ($P < 0.05$). Fluorescence-labeled BMCs, which had been directly injected into ischemic tissue, were not detected in the tissue. In the sex-mismatched bone marrow transplantation models, the ischemic tissues of the BMC-injected group recruited a much greater number of Y chromosome-positive bone marrow-derived cells, as compared to the control group. The expressions of VEGF and MMP-9 were increased after injection of BMCs. SDF-1 was expressed on the seventh day in the BMC-injected group and CXCR-4 was highly expressed until 12 weeks in the BMC-injected group.

Conclusion: We suggest that the injection of BMCs into ischemic tissue recruits CXCR-4-positive cells from the bone marrow via the up-regulation of VEGF, MMP-9 and SDF-1, and these CXCR-4-positive cells may play a role in neovascularization. (*Korean J Hematol* 2007;42:106-113.)

Key Words: Ischemia, Angiogenesis, Bone marrow cell, VEGF, MMP-9, SDF-1, CXCR-4

접수 : 2006년 12월 22일, 수정 : 2007년 3월 15일

승인 : 2007년 4월 5일

교신저자 : 김정아, 경기도 수원시 팔달구 지동 93번지

☎ 442-723, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

Tel: 031-249-8456, Fax: 031-252-8456

E-mail: jakim@catholic.ac.kr

본 연구는 학술진흥재단 우수여성과학자도약연구지원(2004-204-c00077)과 가톨릭대학부속 성빈센트병원 임상의학연구소 2005년 연구지원으로 수행되었음.

Correspondence to : Jeong A Kim, M.D., Ph.D.

Division of Hematology, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea St. Vincent's Hospital

93-6, Ji-dong, Paldal-gu, Suwon 442-723, Korea

Tel: +82-31-249-8456, Fax: +82-31-252-8456

E-mail: jakim@catholic.ac.kr

서 론

태생기와는 달리 성인에서의 신생혈관생성은 저산소증과 같은 환경적인 요인이 크게 관여하며, 혈관 내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현이 가장 중요한 역할을 한다. VEGF는 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)의 작용으로 nitric oxide (NO)를 합성하여 혈관내피세포의 증식을 자극하며, 혈관의 투과성을 증가시킨다. 특히 eNOS에 의해 생성되는 NO는 Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 경로를 통하여 혈관세포의 세포자멸사(apoptosis)를 저해하고, 골수로부터 혈관 생성에 관여하는 세포들을 허혈 부위로 이동시킬 수 있다.¹⁻³⁾ 최근에 조직에서 VEGF를 발현시키면 골수로부터 혈관생성에 관여하는 세포들의 이동이 증가된다는 결과들이 보고되면서,^{1,2)} 신생혈관 생성에 있어서 VEGF의 발현과 골수유래 혈관생성 세포에 대한 관심이 집중되고 있다. VEGF 이외에 골수세포를 허혈 부위로 동원하는 것으로 알려진 물질은 간질세포 유래인자 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1)이다.^{1,3,4)} SDF-1은 섬유아세포나 혈관내피세포에서 분비되며, chemokine receptor-4 (C-X-C motif receptor 4, CXCR-4) 양성세포에 특이적으로 반응한다. VEGF와 마찬가지로 조직의 저산소증 시에 증가하며,⁵⁾ 조직 허혈 부위나 중앙부위로 골수세포 특히 CXCR-4 양성 세포의 이동을 증가시켜 신생혈관 생성에 관여한다.^{3,4,6-8)} 또 골수세포에서 분비되는 metalloproteinase-9 (MMP-9)은 VEGF에 의해 유도되며, 골수 내에서 soluble Kit-ligand (s-KitL)를 증가시켜 조혈모세포를 골수에서 혈액이나 다른 장기로 이동시킨다.⁹⁾

조직의 허혈이 유도되면 골수로부터 조직재생에 관여된 세포들이 허혈부위의 화학주성에 의해 혈관재생 부위로 이동하여 신생혈관을 형성한다.¹⁰⁻¹²⁾ 이러한 결과를 이용하여, 심근경색이나 하지 허혈 환자에서 혈관 내피전구세포(endothelial progenitor cells)나 골수세포를 허혈부위에 주사하면 허혈부위의 혈류 증가를 유도할 수 있으나,¹³⁻¹⁵⁾ 주입한 세포가 직접 혈관생성에 관여하는지 혹은 허혈 부위에서 혈관생성에 관여하는 물질을 증가시키는지는 아직 불분명한 상태이다. 본 연구에서는 마우스에서 하지 허혈 모델을 만들고, 허혈 부위에 골수세포를 주사하여 신생혈관생성을 증가시키고, 이 세포의 혈관생성유도 기전을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 C57BL/6 마우스에서 하지 허혈수술을 시행하였고, 하지 허혈수술만을 시행한 허혈군과 허혈부위에 골

수세포를 주입한 골수세포주입군으로 나누어 신생혈관 생성 및 혈관생성과 관련된 VEGF, SDF-1, CXCR-4와 MMP-9의 발현 여부를 측정하였다. 또, PKH2로 표지한 골수세포를 이용하여 허혈부위 근육에 주사된 골수세포를 추적 관찰하였다. 동시에 성 불일치(sex-mismatch) 골수이식을 시행한 마우스모델에서 하지 허혈유도수술을 시행하고 허혈부위에서 Y 염색체 양성세포의 유무를 확인하여, 정상적인 허혈 상태에서 골수로부터 유래된 세포의 존재를 관찰하였다. 또 같은 마우스 모델에서 허혈부위에 골수세포를 주입하여 더 많은 양의 Y 염색체 양성세포가 허혈부위로 유입되었는지 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 생후 7~8주, 몸무게 20g 정도의 특정 병원체가 없는 C57BL/6마우스를 구입(오리엔트바이오, 경기도, 한국)하여 사용하였다. 무균 사육기에서 멸균된 사료와 물을 충분히 공급하고, 일주일 동안 12시간/12시간(light/dark) 조명조건의 적응기를 거쳐 실험에 이용하였다.

2. 하지 허혈 모델 제작

Zoletil50 (버발코리아)과 rompun (바이엘코리아)을 3:1의 비율로 섞어서 마우스의 대퇴부에 주사(2ml/kg)하여 마취시킨 후, 양와위에서 좌측 대퇴동맥의 주행을 따라 피부를 절개하였다. 외장골동맥 기시부의 혈관을 분리하여 3~0 실크봉합사로 결찰하고, 대퇴동맥과 슬와동맥이 분지하는 지점까지 박리하여 대퇴동맥과 정맥을 결찰한 뒤 그 사이의 혈관을 잘라내었다.¹⁶⁾

3. 골수 세포 채취 및 주입

공여 쥐의 대퇴골, 경골, 상완골을 박리하여 분리한 후, 박리한 뼈에서 주사기를 이용하여 인산완충용액(phosphate buffered saline; Gibco BRL, MD, USA)을 통과시켜서 골수를 채집하였다. 이 용액을 원심 침전하여 혈장성분을 제거한 뒤, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL)으로 세포 부유액을 만들고 100 μ m nylon mesh를 통과시켜 작은 골 파편들을 제거했다. 적혈구 용혈 용액(170mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA)을 첨가하여 적혈구를 용혈시킨 다음 원심 분리하여 유핵 세포만을 분리했고, 세포 수와 생존율을 트리판블루(trypan blue)염색으로 확인하였다. 허혈 유도수술만을 시행한 허혈군(n=3)과 골수세포를 허혈

유도수술 10일 후에 허혈 부위 근육에 주사한 골수세포 주입군(n=3)으로 나누어 실험하였다.

4. 신생혈관 생성 관찰

허혈유도 부위의 내전근(adductor muscle)과 반막근(semimembranous muscle)을 분리하여 OCT compound에 담근 후 액체질소에서 급속 동결하고 -20°C 에서 동결 박편하였다. 박편된 조직 시료를 slide glass에 붙인 다음 acetone을 이용하여 고정시키고, 살아있는 혈관을 측정하기 위해 alkaline phosphatase 염색⁸⁾을 시행하였다. 먼저 alkaline dye mixture (Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 만들기 위해, 1mL 염화질소용액에 1mL FRV-alkaline 용액을 섞어서 상온에서 2분간 활성화시킨 후, 45 mL의 증류수를 첨가 diazonium salt 용액을 만들고 이 용액에 1mL naphthol AS-BI alkaline을 첨가한 후 Coplin jar에 넣었다. 다음으로 슬라이드를 Citrate-acetone-formaldehyde 고정용액에 30초간 담가두어 고정시킨 후 증류수로 세척 한 뒤 이것을 상온에서 15분간 alkaline dye mixture와 반응시키고, 2분간 증류수를 이용하여 세척을 하고 hematoxylin 용액으로 염색하였다. 광학현미경으로 한 검체당 세 군데의 영역에서 200배 시야 하에서 신생혈관을 계측하여 모세혈관/근육의 비율로 결과를 표시하였다.

5. 주입한 골수세포의 추적

주입한 골수세포를 추적관찰하기 위해, 암컷 C57BL/6에서 분리한 골수세포를 PKH2 green fluorescent cell linker kit (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 염색하고 허혈 부위 근육에 주사하였다. 15mL 콘 모양의 튜브에 2×10^7 개의 골수세포를 넣고 10mL DMEM으로 세척을 한 뒤 $15 \mu\text{L}$ 의 펠렛에 1mL Diluent A를 넣고 잘 섞어주었다. PKH2 염색시약을 Diluent A로 4×10^6 로 희석한 뒤 골수세포에 섞어 PKH2로 염색하고, 염색된 골수세포를 허혈 부위 근육에 주사하였다. 주입한 골수세포의 추적관찰을 위해 4주 후에 허혈 부위 근육을 동결박편하여 diaminido-2-phenylindole 2 HCl (DAPI; Vector laboratories, CA, USA)로 핵을 염색하고, 초록색의 형광을 나타내는 PKH2 양성세포 유무를 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscope; Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하였다.

6. 성 불일치 골수이식 및 Y-염색체 fluorescence in situ hybridization (FISH)

C57BL/6 암컷을 6MV X선 선형가속기(Clinac 2100

CD, Varian Medical Systems Inc., CA, USA)를 이용하여 0.65Gy/분 용량으로 조사하였다.¹⁷⁾ 방사선 조사 후 수컷 C57BL/6 마우스의 골수세포를 마리당 2×10^7 개씩 꼬리 정맥에 주사하여, 성불일치 골수이식을 시행했다. 이식 3주 후에 Y-염색체 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하여 수컷 골수세포 생착을 확인하고, 좌측 대퇴동맥 절제수술을 시행하였다. 수술 4주 후에 허혈부위의 근육을 $5 \mu\text{m}$ 두께로 동결박편, 아세톤 고정 및 에탄올로 함수 처리한 뒤, 단백분해효소로 20분간 30°C 에서 처리하고, 탈수과정을 거친 후 Y-probe (Labs Inc., London, UK)를 검체에 12~16시간 반응시킨 후, DAPI 처리하여 현광 현미경으로 검경하였다.

7. VEGF, SDF-1, CXCR-4 및 MMP-9에 대한 Western blot 분석

허혈유도 부위의 내전근과 반막근을 분리하여 파쇄기로 조직을 잘게 조각을 낸 후 RIPA 버퍼(1% Noidet P-40, 100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM Naf, 1mM sodium orthovanadate, 30nM Na-glycerophosphate, and protein inhibitor mixture)로 세포를 용혈시킨 후, SDS-PAGE에 샘플을 연동시킨 후에 PVDF 막에 옮기고, 5% skim milk에 1시간 blocking 반응을 시킨 뒤 anti-VEGF, anti-SDF-1, anti-CXCR-4과 anti-MMP-9 (Santa cruz biotechnology Inc., CA, USA)를 1시간 동안 반응시켰다. Horse radish peroxidase가 결합된 각각의 2차 항체(Zymed laboratories, CA, USA)를 각각 1시간 동안 반응시킨 뒤 X선 필름에 감광시켜서 각 항체에 대한 반응을 확인하였다.

8. 통계 분석

두 군간 모세혈관/근육 비의 차이가 있는지에 대한 통계적 분석은 SPSS 12.0을 이용한 비모수적 방법으로 Student t-test를 이용하였으며 P 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 신생 혈관의 생성

허혈 근육에 마리당 2×10^7 개의 골수세포를 주입하고 alkaline phosphatase 염색을 시행하여 모세혈관/근육 비를 알아보았다. 골수세포주입군에서는 모세혈관/근육의 비율이 골수세포 주입 2주, 4주, 12주 후에 1.37 ± 0.09 , 1.1 ± 0.14 , 1.07 ± 0.09 로 측정되었으며, 대조군에서는 같은 시점에서의 모세혈관/근육의 비율이 각각

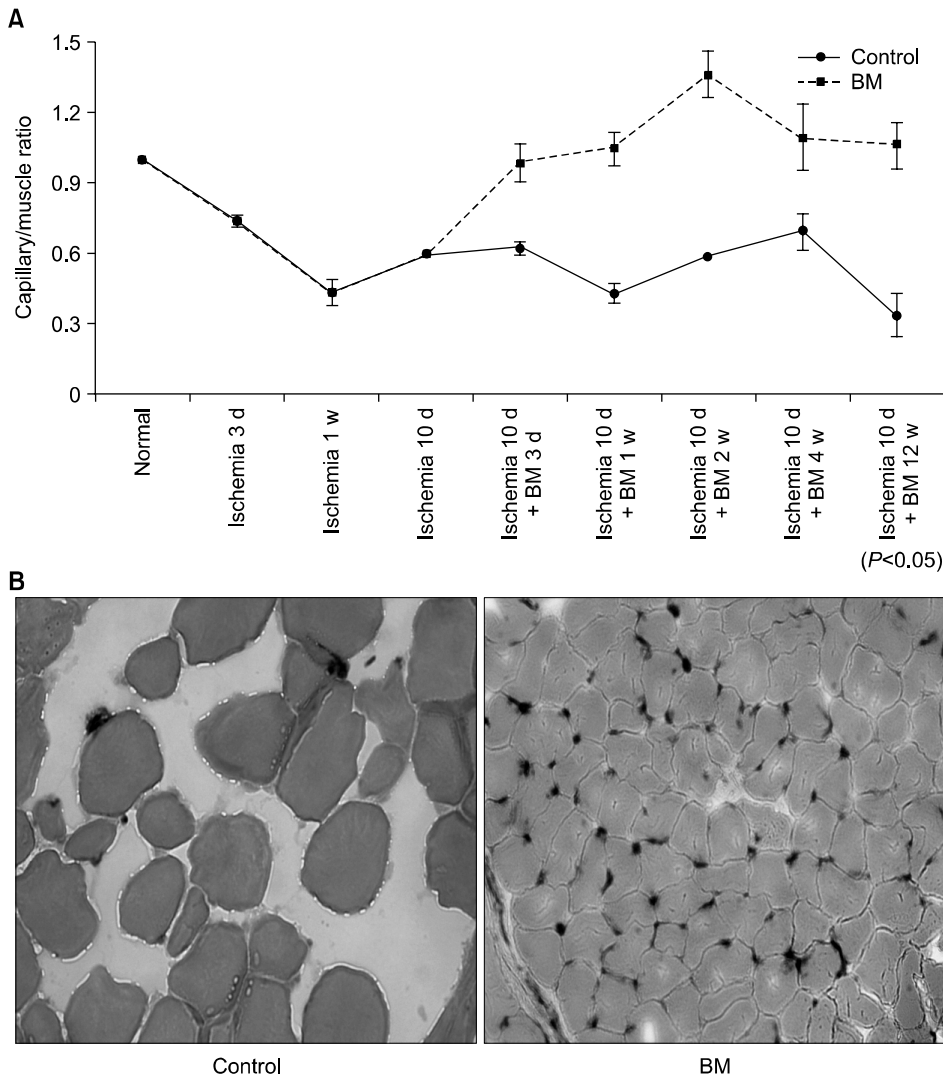


Fig. 1. The injection of bone marrow cells into the ischemic limb increased angiogenesis. Ischemia was induced in the hind limb of mouse, and bone marrow cells injected into the lesion 10 days after the induction. (A) The capillary/muscle ratio was more increased in the bone marrow cell-injected group than in the control group ($P < 0.05$). (B) Photomicroscopic examination findings of the lesions which were stained with alkaline phosphatase also showed highly increased angiogenesis in the bone marrow cell-injected group. Blue spots show the viable endothelial cells at 4 weeks after the induction of ischemia. Magnification, $\times 200$. Control, control group; BM, bone marrow cell-injected group.

0.59 ± 0.01 , 0.70 ± 0.08 , 0.27 ± 0.09 로 측정되어, 모세혈관/근육의 비율이 골수세포주입군에서는 유의하게 증가된 것을 알 수 있었다($P < 0.05$). 특히 골수세포 주입 3일 후부터 이미 혈관의 생성이 증가되었고, 골수세포 주입 12주 후까지 지속적으로 혈관의 비율이 높게 관찰되었다(Fig. 1).

2. 주입한 골수세포의 추적

허혈부위에 주사한 골수세포를 추적 관찰하기 위해 허혈근육에 PKH2를 표지한 골수세포를 주입한 뒤 4주 후에 공초점 레이저 주사 현미경으로 PKH2 양성세포를 관찰하였다. 주입한 골수 세포의 86%가 PKH2에 염색되었으며, 세포 주입 4주 후에 공초점 현미경으로 관찰한 근육조직 내에서는 DAPI로 염색된 다수의 핵들이 관찰되었으나 초록색의 형광을 나타내는 PKH2 양성세포는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

3. FISH에 의한 Y 염색체 확인

성불일치 골수이식을 시행한 마우스에서 허혈유도 4주 후에 Y 염색체 FISH를 시행한 결과, 허혈군에서는 허혈 부위 근육에서 다수의 Y 염색체 양성 세포가 관찰되었다(Fig. 3A). 골수세포주입군에서는 허혈군에 비하여 더욱 증가된 수의 Y 염색체 양성 세포가 관찰되어(Fig. 3B) 허혈부위에 골수세포 주입으로 더 많은 수의 골수유래 세포가 유입되었음을 알 수 있었다.

4. VEGF, MMP-9, SDF-1와 CXCR4의 발현

Western blot 분석결과, 허혈군에서는 허혈부위 근육에서 VEGF의 발현이 관찰되지 않았으나 골수세포주입군에서는 골수세포 주입 후 2일째에 VEGF의 발현이 뚜렷하게 관찰되었다. MMP-9는 허혈유도 5일과 7일째 발현되었고, 골수주입 2일 후에 발현이 증가되어 나타났

다(Fig. 4A). SDF-1 발현은 허혈군에서 허혈유도 후 2일째와 3일째에 나타났으며 그 이후로는 발현되지 않았으나, 골수세포주입군에서는 골수세포 주입 후 7일째에

SDF-1의 발현이 다시 나타났다(Fig. 4A). 골수세포주입군에서는 CXCR-4 발현이 대조군보다 더 증가되어 나타났다(Fig. 4B).

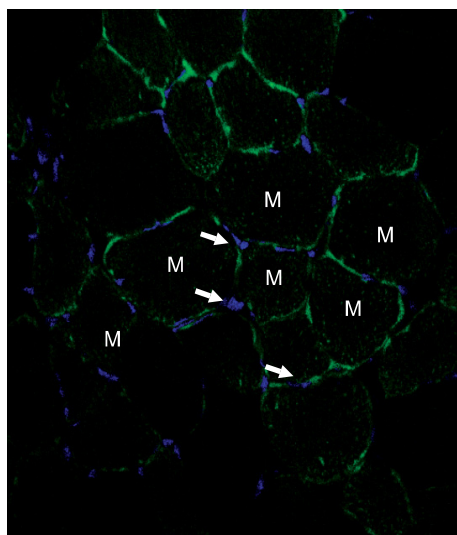


Fig. 2. The Localization of transplanted cells in the ischemic limb. Fluorescence-labeled bone marrow cells were injected into the lesion 10 days after the induction of ischemia and the presence of the cells were examined using confocal laser scanning microscope at 4 weeks after the bone marrow cells injection. The DNA of nucleus was stained with DAPI (arrows, blue). Fluorescence-labeled bone marrow cells were not detected in the ischemic tissues, Magnification, $\times 200$. Abbreviation: M, muscle.

고찰

조직이 허혈 상태가 되면 골수로부터 이동된 세포가 신생혈관 생성에 관여한다.¹⁰⁻¹²⁾ VEGF는 국소부위에서 혈관신생을 자극할 뿐만 아니라 골수세포를 골수에서 허혈부위로 이동시켜 신생혈관 생성을 유도하는 물질로^{1,3)} 오래 전부터 신생혈관 생성에 있어서 VEGF의 역할에 대한 연구가 진행되어 왔다. 특히 최근에는 허혈 상태가 아니더라도 특정 장기나 조직에 VEGF를 주사하거나 VEGF의 발현을 증가시키면 골수로부터 세포의 이동이 증가된다는 연구 결과들이^{1,2)} 보고되면서, VEGF가 골수세포의 이동에 직접적으로 관여한다는 사실이 증명되었다. 특히 상승된 VEGF는 골수유래 세포의 이동을 증가시킬 뿐 아니라 섬유아세포에서 SDF-1의 생성을 증가시켜 CXCR-4 양성세포를 허혈부위 혈관세포 주위로 이동시킨다. 본 실험 결과에서도 성 불일치 골수이식 후에 근육 조직에서 시행한 FISH 결과에서 Y 염색체-양성세포가 허혈 부위 근육에 전반적으로 분포되어 있어 자가골수로부터 유래된 세포가 허혈부위로 이동하여 신생 혈관 생성에 관여한 사실을 알 수 있었다(Fig. 3A). 하지만 허혈근육의 Western blot 결과에

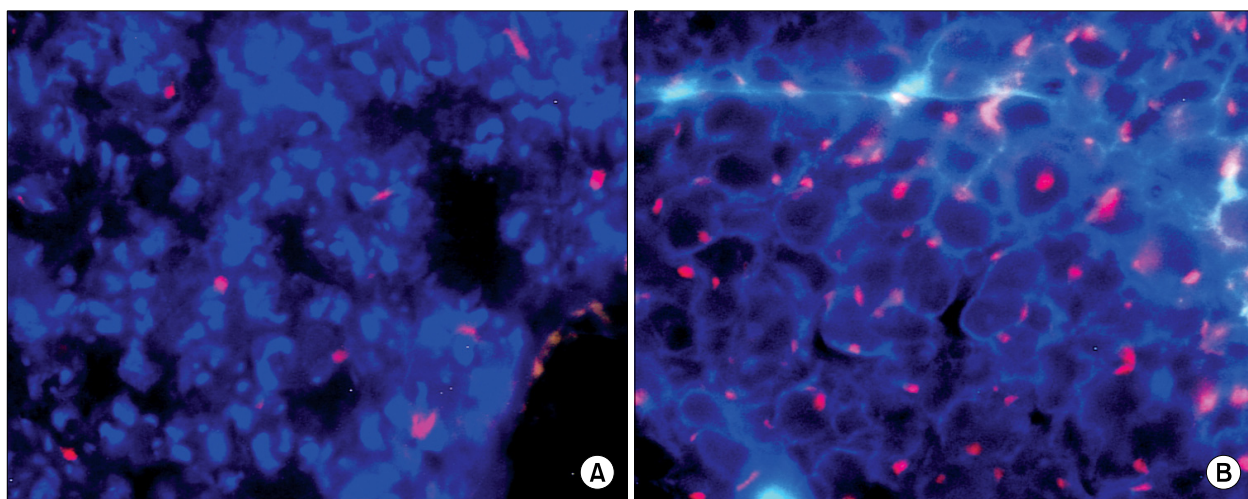


Fig. 3. The increased recruitment of autologous bone marrow cells by injected bone marrow cells. Ischemia was induced in the hind limb of sex-mismatched bone marrow transplanted mouse (A), and bone marrow cells were injected into the lesion 10 days after the ischemia induction (B), and the cells immunoreactive to Y chromosome were examined 4 weeks after the bone marrow cell-injection using FISH method. Bone marrow cell-transplanted group (B) showed much higher number of Y chromosome-positive bone marrow cells than control group (A), Magnification, $\times 200$.

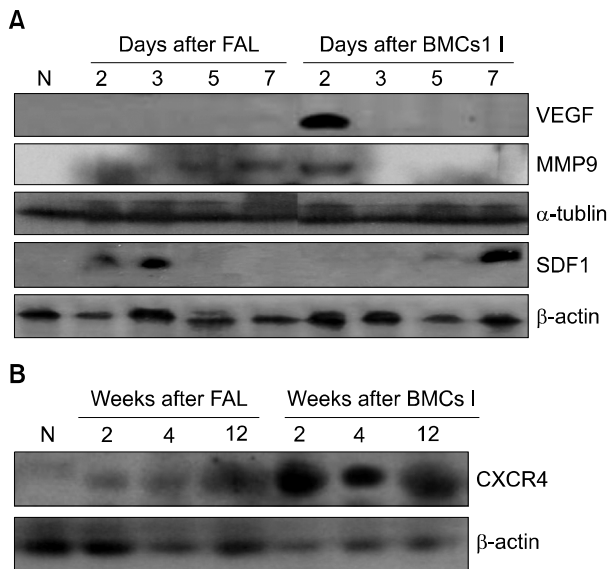


Fig. 4. The expressions of VEGF, MMP-9, SDF-1 and CXCR-4 in the ischemic limb. (A) The expressions of VEGF, MMP-9, and SDF-1 were examined at the indicated times in both ischemic control and bone marrow cell-injected groups using western blot analysis. The expression of VEGF was not detected in the ischemic control group, but it was transiently increased on the second day after the transplantation. The expression of MMP-9 was detected on the fifth and seventh days after the induction of ischemia and on the second day after the injection of bone marrow cells. The expression of SDF-1 was detected on the second and third days in the ischemic control group, and it was increased on the seventh day after the transplantation. Actin and tubulin were used as a loading control. (B) The expression of CXCR-4 was examined at the indicated times in both ischemic control and bone marrow cell-injected groups using western blot analysis. CXCR-4 was increased on second week in the ischemic control group, but it was continuously increased after bone marrow cells injection. Actin was used as a loading control. Abbreviations: N, normal; FAL, femoral artery ligation; BMCs I, bone marrow cells injections.

서 VEGF가 발현되지 않아 허혈부위로 이동된 Y 염색체-양성세포가 VEGF의 발현과 직접적인 연관이 있는지는 확실하지는 않으나, 하지 허혈유도 수술 후 2~3일에 조직에서 SDF-1의 발현이 증가된 결과로 보아 VEGF가 이보다 좀더 이른 시점에 발현되었을 가능성을 배제할 수는 없을 것 같다. 하지만 Jin 등¹⁸⁾과 O'Neill 등¹⁹⁾의 결과에서도 마우스 하지허혈 모델에서 허혈유도 수술 3일 후에 SDF-1의 발현이 증가되면서 허혈부위에 CXCR-4-양성 세포가 이동되어 혈관 생성이 증가된다고 보고하여, 허혈 상태에서 VEGF의 발현과는 별도로 SDF-1의 발현만으로도 골수유래세포를 허혈 부위로 이

동시킬 수 있다고 생각한다.

허혈부위에 골수세포를 주입하면 혈관생성이 증가되며, 실제로 이 결과를 임상에서 치료적 목적으로 사용하고 있지만,¹³⁻¹⁵⁾ 이와 관련된 기전에 대해서는 주입된 세포가 직접 혈관 생성에 관여하지 않는다는 사실 이외는 밝혀진 것이 없는 상태이다. 본 실험 결과에서도 골수세포 주입으로 신생혈관생성이 증가되었음에도 불구하고 허혈 부위의 근육조직에서 PKH2형광 표지자가 부착된 골수세포가 관찰되지 않아(Fig. 2), 주입된 골수 세포가 직접적으로 혈관생성에 관여하지 않았다는 사실을 알 수 있었다. 또, Fig. 3B 결과에서 골수 세포 주입으로 더 많은 수의 자가 골수세포가 허혈 부위로 이동된 것을 확인할 수 있었다. 이는 정상적인 상태에서 골수 세포는 VEGF나 MMP-9을 발현하지 않지만 허혈 상태에서는 골수세포 자체에서 VEGF와 MMP-9의 발현이 증가된다는 결과¹⁴⁾를 고려해보면, 골수세포주입군에서 세포 주입 2일 후에 VEGF와 MMP-9이 발현되고(Fig. 4A) 이로 인해 허혈부위로 더 많은 수의 골수유래세포를 유입시켰을 뿐 아니라, SDF-1의 발현이 다시 한 번 증가되어 허혈군에서보다 보다 많은 양의 CXCR-4 -양성세포가 이동된 것으로 생각된다(Fig. 4B).

이상의 결과를 종합해 보면, 허혈 부위에 골수세포를 주입하면 골수세포를 주입하지 않은 경우에 비해서 신생혈관의 생성이 더욱 증가되는데, 이는 허혈 부위에 골수세포 주입으로 VEGF와 MMP-9의 발현이 증가되고 SDF-1가 유도되어, 더 많은 수의 CXCR-4-양성 자가 골수세포를 허혈 부위로 유입시키기 때문이라고 생각한다. 하지만 골수세포 주입으로 유도된 신생혈관 생성 증가 효과가 VEGF와 SDF-1의 발현과 직접적으로 관계되는지에 관해 명확한 결론을 내리기 위해서는 앞으로 VEGF나 SDF-1/CXCR-4 억제인자를 이용한 실험이 필요하다고 생각한다.

요 약

배경: 신생혈관 생성은 심근 경색증을 비롯한 허혈 질환에서 환자의 치료나 예후를 결정하는 중요한 문제로 관심의 초점이 되고 있다. 허혈 부위의 혈관 재생에는 골수로부터 이동한 세포가 중요한 역할을 하며, 골수세포를 허혈 부위에 주사하면 혈관 생성이 증가되나 이와 관련된 정확한 기전은 아직까지 불분명한 상태이다.

방법: 마우스에서 하지 허혈 모델을 만들고 허혈유도군(허혈군)과 허혈유도 후 10일째에 허혈 부위에 골수세포를 주사한 군(골수세포주입군)에서 신생혈관생성

을 비교하였다. 주입한 골수세포의 추적을 위해 골수세포를 PKH2 형광표지자와 배양하여 주입한 뒤, 4주 후 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰하였다. 성불일치 골수이식 후 4주째에 FISH 방법을 이용하여 Y 염색체를 조사함으로써 신생혈관 생성에 관여하는 골수세포의 유래를 확인하였다. 허혈군과 골수세포주입군의 허혈 부위 근육에서 VEGF, MMP-9, SDF-1와 CXCR-4의 발현 여부를 Western blot 분석으로 측정하였다.

결과: 허혈군에 비해 골수세포주입군에서의 모세혈관/근육비가 유의하게 증가되었다($P < 0.05$). PKH2로 표지한 골수세포를 주입하고 4주 후에 공초점 레이저 주사 현미경으로 주입한 세포를 조사하였으나, PKH2 양성세포는 관찰되지 않았다. 성불일치 골수이식 4주 후에 시행한 Y 염색체 FISH 결과, 허혈군보다 골수세포주입군에서 더 많은 Y 염색체 양성 세포가 관찰되었다. Western blot 분석결과, VEGF는 허혈군의 근육조직에서는 발현되지 않았고 골수세포주입군에서 세포 주입 후 2일째에 발현되는 것을 확인하였다. MMP-9은 허혈 유도 5일, 7일째와 세포 주입 2일 후에 발현되었다. SDF-1의 발현은 허혈 유도 후 2일, 3일째에만 나타났으며, 이후로는 골수세포주입군에서 골수세포 주입 후 7일째에 다시 발현되었으며, CXCR-4는 허혈군보다 골수세포주입군에서 더 높게 발현되었다.

결론: 마우스 하지 허혈 모델에서의 골수세포 주입이 허혈부위에서의 VEGF, MMP-9과 SDF-1 발현 증가를 통하여 더 많은 수의 CXCR-4-양성 자가골수세포를 허혈부위로 이동시키는 기전으로 신생혈관 생성을 증가시킨다는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

- 1) Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89.
- 2) Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, et al. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood* 2006;107:3546-54.
- 3) Ruiz de Almodovar C, Luttun A, Carmeliet P. An SDF-1 trap for myeloid cells stimulates angiogenesis. *Cell* 2006;124:18-21.
- 4) Jin DK, Shido K, Kopp HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med* 2006;12:557-67.
- 5) Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110:3300-5.
- 6) Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;283:845-8.
- 7) Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 2005;435:969-73.
- 8) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001;103:897-903.
- 9) Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625-37.
- 10) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
- 11) Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004;8:294-300.
- 12) Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000;355:1688-91.
- 13) Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol* 2006;97:823-9.
- 14) Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-9.
- 15) Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
- 16) Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8:831-40.
- 17) Colson YL, Wren SM, Schuchert MJ, et al. A non-lethal conditioning approach to achieve durable mul-

- tilineage mixed chimerism and tolerance across major, minor, and hematopoietic histocompatibility barriers. *J Immunol* 1995;155:4179-88.
- 18) Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangio-
cytes. *Nat Med* 2006;12:557-67.
- 19) O'Neill TJ, Wamhoff BR, Owens GK, Skalak TC. Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res* 2005; 97:1027-35.
-