

## 백서의 척수손상에서 Wnt-3a 분비 섬유아세포 이식의 효과분석

울산대학교 의과대학 서울아산병원 신경외과학교실<sup>1</sup>, 의학과<sup>2</sup>, 재활의학과학교실<sup>3</sup>,  
생화학분자생물학교실<sup>4</sup>, 소아과학교실<sup>5</sup>

오선규<sup>1</sup> · 민종기<sup>1</sup> · 서형일<sup>2</sup> · 최경효<sup>3</sup> · 김승후<sup>4</sup> · 김기수<sup>5</sup> · 전상룡<sup>1</sup>

### Analysis on the Result of Wnt-3a Producing Fibroblast Implantation in Spinal Cord Injury of Rat

Sun-Kyu Oh, MD<sup>1</sup>, Joong-Kee Min<sup>1</sup>, Hyung-Il Seo, MS<sup>2</sup>, Kyoung-Hyo Choi, MD, PhD<sup>3</sup>,  
Seong-Who Kim, MD, PhD<sup>4</sup>, Ki-Soo Kim, MD, PhD<sup>5</sup> and Sang Ryong Jeon, MD, PhD<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Neurosurgery, <sup>2</sup>College of Medicine, <sup>3</sup>Rehabilitation Medicine, <sup>4</sup>Biochemistry and Molecular Biology,  
<sup>5</sup>Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** Promoting axonal regeneration is one of essential goals to be achieved for effective repair from spinal cord injury (SCI). The authors performed an experiment on the effect of Wnt-3a producing fibroblast injection on SCI. **Methods:** SCI is performed by New York University (NYU) impactor in 21 rats, and 1 week after injury, the rats were grouped into Wnt-3a producing fibroblast transplantation group (Wnt group, n=7), fibroblast transplantation group (vehicle group, n=7), and no treatment group (sham group, n=7). For the behavioral tests, the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale were evaluated. Also, to study radiological evidence of axon regeneration, the rats underwent manganese enhanced MRI (ME-MRI) twice, before treatment and 5 weeks after treatment. **Results:** On average, the sham group and vehicle group rats attained BBB score of 10.4 and 12.1, respectively, whereas Wnt group rats achieved a significantly higher BBB score of 14.0 at 5 weeks after treatment. At 5 weeks after treatment, relative signal intensities of ME-MRI was significantly higher in the Wnt group than in the vehicle group and sham group at 5 weeks after injury. **Conclusion:** In this study, the authors observed that neurological recovery after SCI in rats were improved by Wnt-3a producing fibroblasts which were injected intramedullary at 1 week after SCI. (J Kor Neurotraumatol Soc 2010;6:1-5)

**KEY WORDS:** Axonal regeneration · Manganese enhanced MRI · Spinal cord injury · Wnt-3a.

## 서론

척수손상은 인체에서 신경조직의 재생, 즉 축삭돌기의 재생이나 신경회로의 재건이 이루어지지 않으므로 영구

적 장애를 남긴다.<sup>3)</sup> 그러므로 척수손상의 치료를 위해 축삭의 재생이 주된 치료목표가 된다.<sup>8)</sup> 손상된 척수의 재생을 돕기 위해 촉진인자를 제공하거나 내재적 발현을 자극할 수가 있는데 백서의 실험에서 몇 가지 촉진인자가 손상된 축삭돌기의 재생을 향상시키는 것으로 알려졌다.<sup>4-6,11,15)</sup> 대표적인 촉진인자들로는 nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), neurotrophin 4 (NT-4) 등이 있는데 이들의 작용 기전은 아직 명확히 알려져 있지 않지만 인산화를 통한 글리코젠 합성 촉매 효소(glycogen synthase kinase-3: GSK-3)의 비활성화가 작용 기전 중 하나인 것으로 알려져 있다.<sup>1,18,19)</sup> 최근 Wnt-3a라는

Received: April 2, 2010 / Revised: April 5, 2010

Accepted: May 21, 2010

Address for correspondence: Sang Ryong Jeon, MD, PhD  
Department of Neurosurgery, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 86 Asanbyeongwon-gil, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea

Tel: +82-2-3010-3562, Fax: +82-2-476-6738

E-mail: srjeon@amc.seoul.kr

본 연구는 아산 생명과학 연구소의 연구비(2007-241) 지원에 의하여 이루어졌음.

물질 또한 GSK-3의 활동성을 억제하여 다른 촉진인자와 동일한 기전으로 축삭의 재생을 향상시킨다고 보고되었다.<sup>1)</sup> 따라서 저자들은 발생기에 발달, 세포성장을 돕고 인체에 질병과도 연관이 있는<sup>7,9)</sup> Wnt-3a 물질이 척수손상에 긍정적 영향을 미치는지 알아보하고자 본 실험을 하였다.

## 대상 및 방법

### 동물수술

실험 쥐는 체중 230~280 g 범위의 Sprague-Dawley 암컷을 사용하였다. 마취는 복막강 내로 zoletil (35 mg/kg)과 rompun (5 mg/kg)을 섞어 주사하였고 7번 흉추와 8번 흉추 사이를 후궁 절제를 하여 뉴욕 대학 충격기 (NYU impactor)를 10 g 막대로 50 mm에서 떨어뜨려 척수손상을 가하였다 (Figure 1). 수술부위 봉합 후 항생제 cefazolin (10 mg/kg)을 피하주사하였다. 이후 3일간 매일 ketoprofen (5 mg/kg)을 주사하였다. Wnt-3a 분비 섬유아세포는 Wnt-3a 물질을 생산할 수 있도록 유전자 조작된 세포 (L929 provided by Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Ulsan College of Medicine)를 사용하였고 척수손상 일주일 후 Wnt-3a 분비 섬유아세포를 척수 내 주입한 실험군 (Wnt군, n=7), 섬유아세포만 주입한 실험군 (vehicle군, n=7), 그리고 세포주입을 하지 않은 실험군 (sham군, n=7)으로 나누었다.

주입용액은 15  $\mu$ L의 생리식염수에 각각 106개의 Wnt-3a 분비 섬유아세포를 혼합하거나 (Wnt군), 106개의 섬유아세포를 혼합하였고 (vehicle군), sham군은 생리식염수만을 주입하였다. 세포주입을 위해서는 다시 마취한

후, 손상을 가한 창상부위를 다시 열고 fixed Hamilton syringe와 Nano injector를 이용하여 분당 0.5  $\mu$ L의 속도로 척수 내 주입을 하였다.

### 행동분석

치료효과를 알아보기 위한 신경학적 검사로 Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale 검사를 하였다. 검사 전 실험동물은 90 cm<sup>2</sup>의 넓이에 10 cm 높이의 벽이 쳐진 개방공간에 적응한 후 동물이 움직이기 시작하면 녹화영상으로 10분간 기록하고 추후 이 녹화 자료를 두 검사자가 맹검방식으로 정량화 하였다. BBB 검사는 척수손상 후 1, 2, 3일 그리고 6주간 주1회 시행하였다.

### 망간 조영증강 자기공명 검사(Manganese enhanced MRI: ME-MRI)

모든 실험동물에 대해 망간 조영증강 자기공명영상을 2회 (척수손상 1주 후 치료 직전, 치료 경과 5주 후) 시행하였다. 망간 조영증강을 위해 망간을 측뇌실에 MRI 48시간 전에 주입하고 MRI를 시행하였다. 망간주입방법은 실험동물을 전신마취하에 정위틀에 고정 후 Hamilton syringe와 Nano injector를 사용하여 총 6  $\mu$ L의 0.17 M MnCl<sub>2</sub> 용액을 분당 1  $\mu$ L 속도로 한쪽 측뇌실에 (좌표: 1 mm caudal to the bregma, 1.5 mm lateral, 1.8 mm depth) 주입하였다. MRI 기기는 아산생명과학연구소 NMR 연구실(NMR laboratory, Asan Life Science Institute)에서 시행하였다. 망간 조영증강 자기공명검사에서 얻은 영상은 브루커 영상기기 (Bruker medical systems, Karlsruhe, Germany)의 스캐너 프로그램을 이용하여 평가하였다. 그 후, 축삭재생의 여부를 평가하기 위하여 손상된 척수의 하방 부위의 신호강도와 뇌질의 신호강도를 측정하였다. 뇌질의 신호강도 측정은 균등하게 조영증강되는 뇌질 내에 2 mm<sup>2</sup>의 직사각형을 설정한 후 이 부위의 평균 신호를 100%로 설정하였다. 그리고 손상된 척수의 원위부 신호강도를 계산하고 각각의 평균값을 설정하여 뇌질 신호강도와의 상대적인 비율을 백분율로 표시하였고 이를 상대적 신호강도로 표시하였고, 상대적 신호강도는 척수손상 후 치료 전과 치료 후 5주 경과한 시점에 2차례에 걸쳐 측정하였다 (Figure 2).

### 자료 분석 및 통계기법

세 그룹의 BBB 점수는 투키 크레이머 방법(Tukey-Kramer method)을 이용한 일원분산분석을 통해 비교



**FIGURE 1.** The spinal cord injury was performed according to the NYU system developed by Gruner 1992. NYU: New York University.



**FIGURE 2.** ME-MRI of Wnt group. A: At a week after injury, ME-MRI revealed showed manganese uptake was decreased at caudal to the lesion (arrowhead). B: At 5 weeks after treatment, ME-MRI revealed that manganese uptake by active neuronal tissue resulted in signal enhancement below injury level (arrowhead). ME-MRI: manganese enhanced MRI.

분석 하였다. 상대적 신호강도는 각각의 값을 스튜던트의 T 검정을 이용해 분석하였다. 모든 통계학적 분석은 SPSS 12.0.1 (SPSS Institute, Inc., Chicago, Illinois, USA) 을 이용하여 시행하였다.

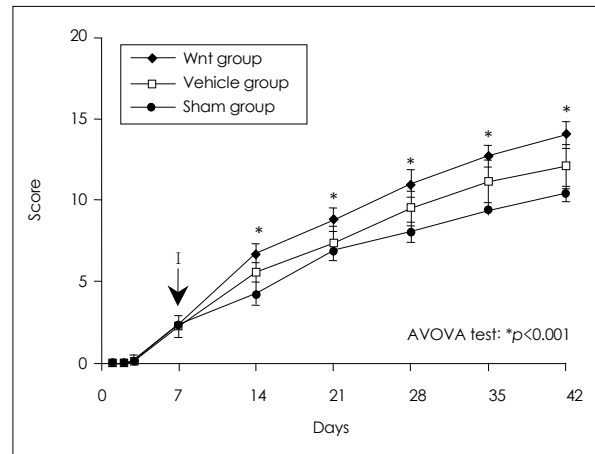
## 결 과

### 행동분석

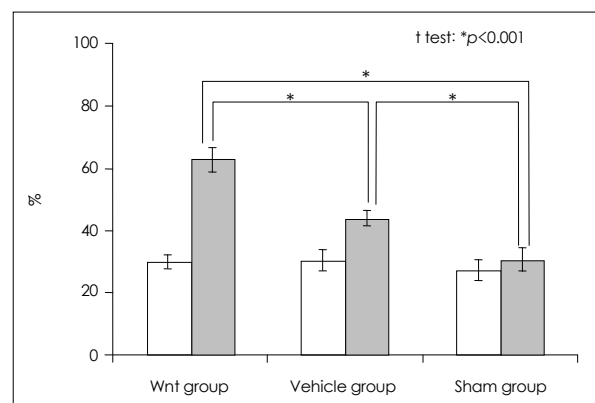
모든 실험 쥐들은 척수손상을 입은 후 3일까지 완전 마비상태에 있다가 운동능력이 점차 서서히 회복되었다. 치료 후 1~5주가 경과하였을 때 Wnt군에서 sham군과 vehicle군 보다 더 좋은 회복능력을 보이는 것이 관찰되었다. 치료 후 5주가 경과한 시점에서 sham군과 vehicle군의 BBB 점수는 각각 평균 10.4, 12.1이었고, Wnt군의 BBB 점수는 14점으로 (Figure 3), Wnt군에서 통계적으로 유의하게 신경학적 회복이 향상됨을 관찰하였다 ( $p < 0.001$ ).

### 망간 조영증강 자기공명 검사(ME-MRI)

척수손상시 활성화된 신경세포의 망간 흡수는 자기공명검사에서 신호 증강되는 형태로 나타났으며 상대적 신호강도는 손상부위의 상방으로 높은 수치를 보였고 하방으로는 낮은 수치를 보였다. 척수손상 1주 후 치료 직전에 시행한 자기공명 검사에서는 세 그룹 간에서 상대적 신호강도의 수치가 유의한 차이를 보이지 않았다. 치료 후



**FIGURE 3.** Diagram of BBB locomotor scale. At 1 week after injury, the rats were treated (arrow). 5 weeks after treatment, mean values of Wnt group showed significant improvement compared to vehicle group and sham group ( $*p < 0.001$ ). BBB: Basso, Beattie and Bresnahan, AVOVA: analysis of variance.



**FIGURE 4.** Diagram of the relative signal intensities. A week after injury, the relative signals of all three groups have no significant differences (left histogram of each group). 5 weeks after treatment, mean values of the relative signal intensities showed significant differences between three groups, statistically (right histogram of each group,  $*p < 0.001$ ).

5주 경과시 각각의 상대적 신호강도의 수치는 Wnt군 평균  $62.7 \pm 3.9\%$ , vehicle군  $44 \pm 2.5\%$ , sham군  $30.7 \pm 3.9\%$ 이었다 (Figure 4). 치료 후 5주가 경과한 시점에서 Wnt군의 상대적 신호강도의 수치가 vehicle군, sham군보다 통계적으로 유의하게 높았다 ( $p < 0.001$ ).

## 고 찰

배아상태에서의 초기 신경발달과정에서 Wnt-3a 물질은 신경능의 형성, 신경세포의 분화, 시냅스의 형성에 중요한 역할을 담당한다.<sup>13)</sup> 또한 Wnt-5 물질은 티로신 촉매효소 수용체의 독특한 일종인 디레일드 가이드런스 수용체(derailed guidance receptor)를 통하여 초과리의 신

경 축삭의 유도를 증대하고,<sup>16)</sup> Wnt-3a는 Frizzled and Ryk 수용체 복합체를 통해 척수 후근신경절의 신경돌기 성장을 유도한다.<sup>10)</sup> Wnt-3a 물질은 신경계 발달에 있어서 축삭의 발달을 유도하는 신경세포 성장인자로서 척수손상에서의 축삭 재생을 증진시키기 위한 새로운 치료 방법으로도 가능성을 인정받고 있다. 이러한 Wnt-3a 물질의 특성으로 볼 때 손상된 축삭의 말단이 원위부로 재생될 수 있는 자극과 환경을 제공하여 본 연구에서 Wnt-3a 분비 섬유아세포 주입시 BBB 점수와 ME-MRI에서 상대적 신호강도의 향상이 나타났을 것으로 사료된다.

척수 좌상 모형은 척수손상의 병태생리기전의 발견과 치료 방침의 수립에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서도 Wnt-3a 물질의 치료 효과를 입증하기 위해 뉴욕 대학 충격기를 사용하였다. 다기관 동물 척수손상 연구 단체에 속한 8그룹의 실험실에서 척수손상과 관련된 치료를 연구하는 데 있어 본 기기가 신뢰도, 재현성, 일관성이 높음을 입증하였다.<sup>17)</sup> 뉴욕 대학 충격기에서 일반적으로 중등도 척수손상을 가하는데 (10 g, 25 mm 높이), 본 실험에서는 ME-MRI 검사에서 치료 전 척수손상부위 하방으로의 망간 조영증강을 좀 더 뚜렷이 차단하기 위하여 중증의 척수손상을 가하였는데 (10 g, 50 mm 높이), 중증의 척수손상에서도 배뇨에 관한 관리를 함으로써 백서의 생존에서는 큰 차이가 없었고 향후 ME-MRI 검사를 위해서도 중등도 척수손상보다 중증 척수손상 모델이 바람직할 것으로 사료된다.

저자들은 척수손상의 치료 결과를 분석하기 위해 시행해오던 종래의 행동분석, 조직학적 분석 외에도 생체에서의 치료 효과 분석을 위해 망간 조영증강 자기공명 검사를 시행하였는데, 이는 실험동물의 신경 회로와 해부학적 영상을 직접 얻을 수 있다는 점에서 중요성이 점차 증대되고 있다.<sup>12)</sup> 또한 자기공명 검사는 신경의 연결성과 생체 내에서의 척수손상의 정도, 기능의 회복을 정량화하는 데에도 유용하며,<sup>2)</sup> 백서가 죽은 뒤 시행한 자기공명 검사에서도 백서의 죽기 전 운동기능과 밀접한 연관성을 찾을 수 있다.<sup>14)</sup> ME-MRI의 기전으로는 뇌실 내 주입한 망간이 대뇌신경세포로 확산되어 이후 축삭의 하방부로 이동하는데, 척수손상시 축삭이 파괴되면 손상부 하방으로 이동하지 못해 ME-MRI에서 원위부 조영증강이 감소되게 나타난다. 따라서 손상부 하방으로 조영증강이 증가한다는 것은 손상 후 축삭이 원위부로 재생이 되었음을 간접적으로 시사하는 것이다. 본 실험에서도 실험군 간에 정량적 비교가 가능함을 알 수 있었다.

본 연구에서는 통계적으로 유의한 결과를 도출해 낼 만

큼 표본 수를 확보하지 못하여 실험 결과를 일반화하기 어렵지만 추후 여러 기관에서의 공동 연구를 통해 충분한 표본 수를 얻을 수 있도록 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

Wnt-3a 물질을 분비하는 섬유아세포를 주입 받은 Wnt 군에서 다른 군에 비해 척수손상의 회복과 축삭돌기의 재생이 유의하게 좋은 결과를 보였다. Wnt-3a 물질의 효과에 대한 명확한 기전은 밝혀지지 않았지만 척수손상의 치료의 유망한 대안이 될 가능성이 높다. 추후 Wnt-3a 물질이 축삭재생을 유도하는 기전과 이를 촉진시키는 방법에 대해 추가적인 연구가 필요할 것이다.

**중심 단어:** 축삭재생 · 망간 조영증강 자기공명 검사 · 척수손상 · Wnt-3a.

## REFERENCES

- 1) Arévalo JC, Chao MV. Axonal growth: where neurotrophins meet Wnts. *Curr Opin Cell Biol* 17:112-115, 2005
- 2) Bilgen M, Dancause N, Al-Hafez B, He YY, Malone TM. Manganese-enhanced MRI of rat spinal cord injury. *Magn Reson Imaging* 23:829-832, 2005
- 3) Blesch A, Tuszynski MH. Spontaneous and neurotrophin-induced axonal plasticity after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137:415-423, 2002
- 4) Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 273:510-513, 1996
- 5) Grill RJ, Blesch A, Tuszynski MH. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* 148:444-452, 1997
- 6) Guest JD, Hesse D, Schnell L, Schwab ME, Bunge MB, Bunge RP. Influence of IN-1 antibody and acidic FGF-fibrin glue on the response of injured corticospinal tract axons to human Schwann cell grafts. *J Neurosci Res* 50:888-905, 1997
- 7) Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 115:3977-3978, 2002
- 8) Kalb RG, Strittmatter SM. Neurobiology of spinal cord injury. Totowa, NJ: Humana Press, p284, 2000
- 9) Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810, 2004
- 10) Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119:97-108, 2004
- 11) Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367:170-173, 1994
- 12) Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 17:532-543, 2004
- 13) Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog Neurobiol* 86:281-296, 2008

- 14) Walder N, Petter-Puchner AH, Brejnikow M, Redl H, Essig M, Stieltjes B. Manganese enhanced magnetic resonance imaging in a contusion model of spinal cord injury in rats: correlation with motor function. **Invest Radiol** 43:277-283, 2008
- 15) Ye JH, Houle JD. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. **Exp Neurol** 143:70-81, 1997
- 16) Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB. Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. **Nature** 422:583-588, 2003
- 17) Young W. Spinal cord contusion models. **Prog Brain Res** 137: 231-255, 2002
- 18) Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 $\beta$  and functions of the microtubule plus end binding protein APC. **Neuron** 42:897-912, 2004
- 19) Zumburn J, Kinoshita K, Hyman AA, Näthke IS. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3  $\beta$  phosphorylation. **Curr Biol** 11:44-49, 2001