

## 인간 단뇌 세포에서 분화된 신경줄기세포를 이용한 백서의 척수 재생

김상림 · 정광훈 · 이광복

제주대학교 의과대학 정형외과학교실, 제주대학교병원 정형외과

### Spinal Cord Regeneration in Rat using Neural Stem Cell Differentiated from Human Telencephalon

Sang-Rim Kim, M.D., Kwang Hoon Chung, M.D., and Kwang-Bok Lee, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Cheju National University College of Medicine,  
Cheju National University Hospital, Jeju, Korea

**Purpose:** To evaluate the effect of neural stem cells differentiated from a human telencephalon on the neural regeneration in the severed spinal cord.

**Materials and Methods:** The 1<sup>st</sup> surgery involving the insertion of plastic membrane in the transected cord was performed to prevent spontaneous healing of adult female rats (n=20, 171-237 g) with a complete spinal cord transection. The media was inserted only after removing the previously inserted plastic membrane in the control group (n=6). In the experimental group (n=14), media and neural stem cell (1×) were transplanted after removing the membrane, and immunohistochemical staining was performed. The experimental group was perfused transcardially 5 weeks after the 2<sup>nd</sup> surgery, and the level of neural cell regeneration determined by immunohistochemical staining. In behavioral analysis, the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scores of the control and experimental group were compared weekly from immediately after the injury until 5 weeks post-injury after the 2<sup>nd</sup> surgery.

**Results:** Immunohistochemical stain revealed no neural regeneration in the control group. On the other hand, the survival of transplanted human neural stem cells and remarkable neural regeneration (differentiate to neuron and astrocyte) were observed in the experimental group. In the BBB locomotor scale, the experimental group showed significant recovery in terms of control; and the score increased from postoperative 2 weeks to 3 weeks, and reached a plateau from 3 weeks to 5 weeks.

**Conclusion:** The effect of neural stem cells differentiated from human telencephalon on cord regeneration does not produce functional recovery in the BBB locomotor scale, but there is slight recovery of the muscle function. The survival of transplanted human neural stem cells and the possibility of differentiation to neurons or astrocytes were observed.

**Key Words:** Neural stem cell, Cord injury, Neural regeneration

### 서 론

현재 척수 손상의 재생에 관련된 동물 실험은 그 동물의 줄기세포를 이용하여 비교적 좋은 결과를 보고하고 있으나<sup>3,10,12-16,19</sup>, 이는 해당 동물의 줄기세포의 기능이나

재생 능력의 정도를 확인 할 수는 있어도, 이러한 실험의 궁극적 목적인 인간 척수 손상 환자의 치료에 이 동물들의 줄기세포를 이식하여 치료 할 수는 없음으로 인한 제한점이 있다. 그러므로 인간 줄기세포의 기능이나 재생능

통신저자 : 이 광 복

제주시 삼도 2동 154

제주대학교병원 정형외과

TEL: 064-750-1119 · FAX: 064-726-0173

E-mail: osdr2815@cheju.ac.kr

Address reprint requests to

Kwang-Bok Lee, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Cheju National University Hospital,  
154, Samdo 2-dong, Jeju 690-716, Korea

Tel: +82,64-750-1119, Fax: +82,64-726-0173

E-mail: osdr2815@cheju.ac.kr

\*본 논문의 요지는 2005년도 대한정형외과학회 추계학술대회에서 발표되었음.

\*이 논문은 2005년도 제주대학교 학술연구지원사업에 의하여 연구되었음.

력의 정도를 알아보는 실험이 필요하리라 생각된다. 물론 인간 줄기세포를 직접 인간에게 이식하여 치료 효과나 줄기세포의 기능을 알아보는 것이 가장 적절한 실험이겠으나, 줄기세포의 특성을 완전히 파악하지 못한 상태에서 인간에게 직접 실험을 시행하는 것은 윤리적 문제를 야기할 수 있으며, 문제의 상황에 따라 법적 책임까지 발생할 수 있는 곤란한 점이 있다. 그럼에도 불구하고 현재 우리나라와 중국 등에서 인간을 대상으로 직접 수술 및 실험하는 곳이 있으나, 이는 매우 위험한 발상이며 사회적 문제를 야기할 수 있는 실험으로 이 문제에 있어서 조금 더 신중한 자세를 보여야 할 필요성이 있다고 생각한다.

그래서 저자들은 백서의 척수 손상 모델을 이용하여, 인간 신경 줄기세포를 척수 손상 부위에 이식하고, 해당 부위에서 신경세포의 재생 여부를 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 신경줄기세포 획득

제대 기간 12-18주의 인간 태아 단뇌(fetal telencephalon)에서 세포를 얻어, insulin, transferrin, selenium, hydrocortisone, T3,  $\beta$ FGF를 함유한 UBC (University of British Columbia) 1 serum-free media에 세포를 배양하여 신경 줄기세포(F3 cell)을 분화하여 얻었다. 신경줄기세포는 유전적으로 변화시킨 세포로, 그 세포내에는 Lac Z라는 유전자가 내재(encoding)되어 있다<sup>5)</sup>.

### 2. 동물 수술 및 술 후 처치

모든 수술 및 처치는 미국의 국립보건원(NIH) 지침에

따라 시행하였으며, 척수 손상 모델(척수 좌상, 척수 후방 부분 절단, 척수 완전 절단) 중 자연적 치유 또는 손상을 입지 않은 신경으로 인한 척수 신경 재생이 발생할 수 있으므로, 결과의 혼선을 줄이기 위해 척수 완전 절단 모델을 선택하였다<sup>6)</sup>. 대조군과 실험군으로 구분하였으며, 실험군은 면역형광염색을 통하여 결과를 확인하였다.

생후 8주의 암컷 Sprague-Dawley계 백서(n=20, 171-237 g)에게 수술을 시행하기 전, 마취를 위해 케타민(ketamine) 25 mg/ml와 롬폰(rompun) 1.3 gm/ml를 복강내 주사하였고, 마취의 정도를 확인하기 위해 발을 포셉(forcep)으로 꼬집어보아서 반응이 없으면 완전히 마취된 것으로 판단하고, 술 전에 cefazolin 50 mg/kg을 근육내 주사하였다. 수술은 먼저 피부에 절개를 가한 후 T9-T10 부위를 확인하고, 후방에서 추궁관을 제거 후, 척수를 노출시킨 후 11번 스칼펠(scalpel) 칼(knife)을 이용하여 한쪽 척추관 부위에서 반대쪽 척추관까지 피질골을 긁을 정도로 척수를 완전히 절단하였다. 척수 절단 이후 자연적인 척수의 재생을 방지하기 위해 척수 절단 공간에 1.5 mm 두께의 플라스틱 막을 삽입하였고, 근막 및 근육은 2차 수술 시 1차 수술부위를 쉽게 찾기 위해 5-0 Nylon으로 봉합하였으며, 피부는 소독된 메탈 클립(metal clip)으로 봉합하여 1차 수술을 마쳤다. 술 후 따뜻한 환경에 안정을 취하게 한 후 약 1시간 정도 후에 마취에서 깨어나면, 물과 음식을 동물 보관함(cage)에 놓아먹을 수 있게 하였다. 술 후 항생제 주사는 술 전 항생제 주사의 용량대로 한차례만 주사하였다.

2차 수술은 1차 수술을 시행한 후 9일째 상기 과정을 통하여 시행하였으며, 1차 수술 시 삽입된 플라스틱 막을

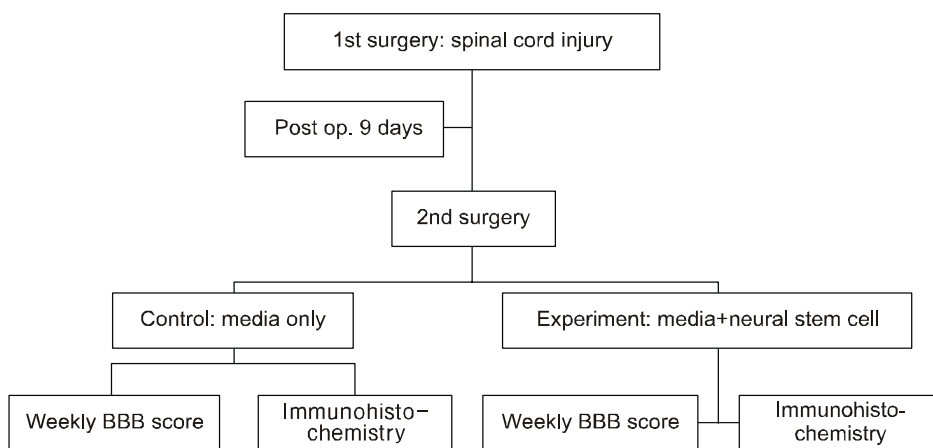


Fig. 1. Diagram summarizing the system of all procedures in this experiment.

제거하였다. 이 후 그 공간에 실험군(n=14)은 척추 수술이나 복부 장기 수술 시 지혈작용을 위해 사용하는 트롬빈(thrombin), 피브리노겐(fibrinogen), 콜라겐(collagen) 처리된 매개물(media)인 타코콤(Tachocom<sup>®</sup>) 0.3×0.2×0.3 cm과 신경줄기세포 ( $1 \times 10^6$ )를 이식하였고, 거부 반응을 방지하기 위해 모두 술 후 면역 억제제인 사이클로스포린(cyclosporin) 1정을 먹는 물에 녹여, 구강내 투여를 3일간 시행하였다. 대조군(n=6)은 매개물(타코콤)만 삽입하고, 면역억제제는 사용하지 않았다(Fig. 1).

### 3. 면역조직화학적 검사

대조군과 실험군은 2차 수술 후 5주째 심장을 통해 phosphate buffered saline (PBS) 와 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 관류시켜 척수를 고정하였고, 척수 손상부위의 근위부 및 원위부 1 cm 정도를 얻

어, 고정액에 24시간 고정하였다. 이 후 30% sucrose 용액에 침전(immersing)한 후 동결시켜 종단 절편(longitudinal sectioning, 25- $\mu$ m 연속 절편)을 얻었다. 그 후 발색 및 재생된 세포를 확인하기 위해 이식한 신경줄기세포(인간 신경줄기세포, F3 cell)는 B-gal, 신경원세포(neuron)은 Neurofilament, 성상세포(astrocyte)는 GFAP의 특정 항체를 이용하여 이중 염색을 시행하였고, 이식된 신경 줄기세포가 신경원 세포나 성상세포로 분화되는 것을 확인하였다.

### 4. 임상적 분석

임상적 결과를 알아보기 위해 대조군과 실험군 모두에서 2차 수술 후, 마취에서 깨어난 직후, 술 후 1주째부터 1주간격으로 5주째까지 21점 만점의 open-field Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating scale<sup>3)</sup>을

Table 1. BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) Locomotor Rating Scale

0	No observable hindlim (HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints and extensive movement of the third
6	Extensive movement of two joints and slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e, when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported plantar steps; no FL-HL coordination
11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and no FL-HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and occasional FL-HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and frequent FL-HL coordination
14	Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL-HL coordination, and predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes initial contact with the surface as well as just before it is lifted off at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
17	Consistent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off
18	Consistent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
19	Consistent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, and tail is down part or all of the time
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, and trunk instability; tail consistently up
21	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up



이용하여 점수를 기록하였다. 평가자는 실험자와 관련이 없는 1인이 백서의 처리가 어떤 군인가 모르는 상태에서 평가하였으며, 평평한 면에 백서를 놓은 후 그들의 움직임을 4분간 관찰하였다. 즉 양측 하지의 움직임, 발가락의 위치, 보행 및 협조(coordination) 등을 관찰한 후 점수화 하였다(Table 1). 각 점수에 따른 평균을 구한 후

그 결과를 student t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

## 결 과

### 1. 수술부위의 육안적 소견

1차 수술 시에 삽입되었던 플라스틱 막을 비교적 쉽게 제거할 수 있었으며, 손상된 척수 부위 및 플라스틱 막 주변이

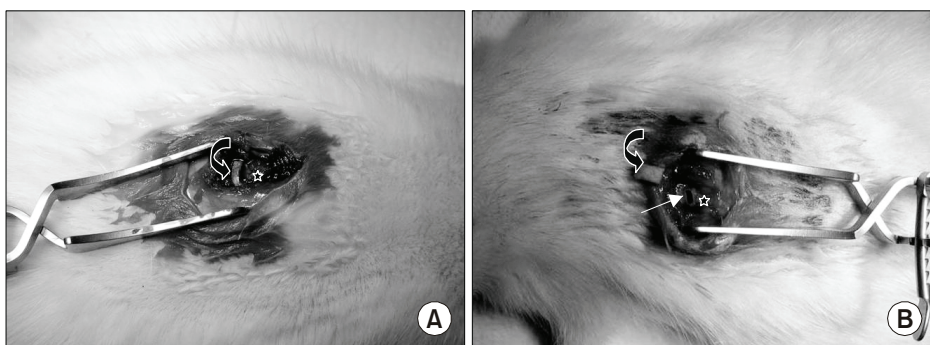


Fig. 2. Photograph showing the injured spinal cord (asterix), and the insertion and removal of the plastic membrane (curved arrows) during the 1st surgery (A) and 2nd surgery (B). Showing the wide defect and surrounding scar tissue of the spinal cord result from the inserted plastic membrane.

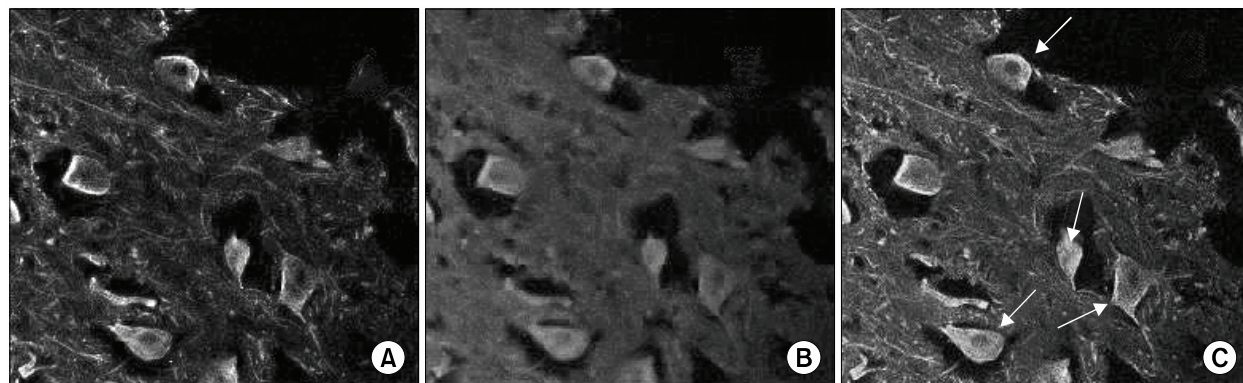


Fig. 3. Images showing  $\beta$ -gal (+) cell as a red color (B), Neurofilament (+) cell as a green color (A), and double staining (C) with two antibodies.

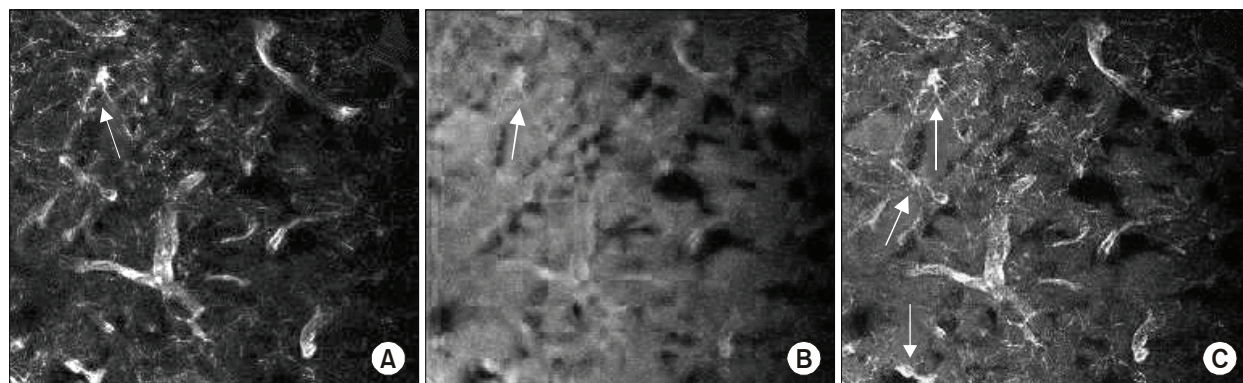


Fig. 4. Image showing  $\beta$ -gal (+) cell as a red color (B), GFAP (+) cell as a green color (A) and double staining (C) with two antibodies.

흉터 조직(Scar tissue)으로 생각되는 육아조직 (granulation tissue)에 의해 둘러싸여 있었다(Fig. 2A, B).

## 2. 면역조직화학 검사의 분석

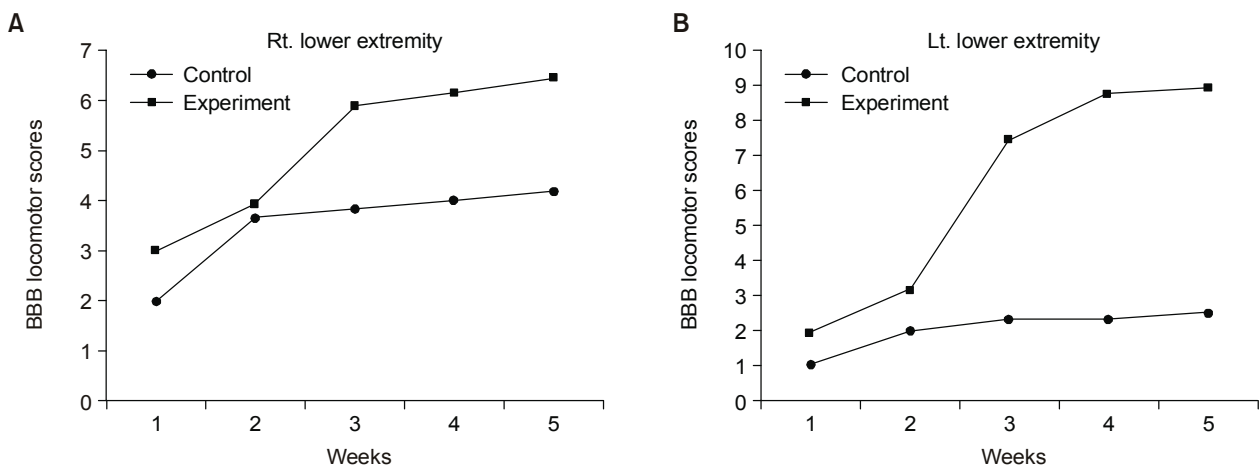
면역조직화학 염색 상, 실험군(n=14) 모두에서 이식한 신경줄기세포에 내재된 Lac Z에 대한 항체인 B-gal에 대해 형광염색(TRITC, 적색)이 강하게 되었으며 (Fig. 3B), 신경원세포에 대한 항체인 Neurofilament에 대한 형광

염색(FITC, 녹색)이 되어(Fig. 3A), 두 형광염색에 대해 강하게 이중 염색이 되었다(Fig. 3C). 이는 내재된 신경줄기세포가 아닌 이식한 인간 신경줄기세포에 의해서 신경원 세포로 분화가 되었다는 것을 의미한다. 또한 성상세포(astrocyte)에 대한 항체인 GFAP에 대해서도 형광염색(FITC, 녹색, Fig. 4A)이 되었고 B-gal에도 염색이 되어(Fig. 4B), 두 형광염색에 대해 이 세포도 이중염색이 되었다(Fig. 4C, Table 2). 이는 내재된 신경줄기세포가

**Table 2.** Summary of the Data for Immunohistochemical Staining and the BBB Locomotor Scores

Number	Weight (g)	Operation	$\beta$ -gal*	GFAP <sup>†</sup>	Neuro filament	BBB (Rt)	BBB (Lt)
1	196	Media only	—	—	—	0, 0, 1, 1, 1, 1	0, 2, 2, 2, 2, 2
2	180	Media only	—	—	—	1, 1, 3, 3, 3, 3	0, 1, 1, 1, 1, 1
3	211	Media only	—	—	—	0, 1, 2, 2, 2, 2	0, 0, 0, 0, 0, 0
4	218	Media only	—	—	—	4, 6, 9, 9, 10, 10	5, 7, 9, 9, 10, 10
5	220	Media only	—	—	—	0, 0, 0, 0, 0, 0	1, 2, 2, 2, 2, 2
6	197	Media only	—	—	—	2, 4, 7, 8, 8, 9	0, 0, 0, 0, 0, 0
1	237	Stem cell	+	+	No	0, 0, 0, 0, 0, 2	1, 3, 9, 9, 9, 10
2	213	Stem cell	+	+	No	0, 0, 0, 0, 0, 0	1, 2, 3, 3, 3, 3
3	193	Stem cell	+	+	No	1, 3, 3, 3, 3, 3	1, 1, 9, 11, 11, 11
4	171	Stem cell	+	+	No	3, 12, 19, 19, 19, 19	0, 0, 11, 14, 14, 15
5	205	Stem cell	+	+	No	0, 0, 0, 6, 6, 7	7, 7, 15, 15, 15, 15
6	216	Stem cell	+	+	No	3, 8, 8, 13, 13, 14	7, 10, 14, 16, 16, 16
7	233	Stem cell	+	+	No	14, 16, 18, 19, 19, 19	3, 3, 9, 9, 10, 10
8	213	Stem cell	+	No	+	0, 1, 1, 3, 3, 4	0, 0, 0, 0, 0, 0
9	222	Stem cell	+	No	+	0, 0, 3, 3, 3, 3	0, 3, 3, 3, 3, 3
10	204	Stem cell	+	No	+	0, 0, 0, 1, 1, 1	1, 3, 6, 6, 6, 6
11	201	Stem cell	+	No	+	0, 0, 0, 3, 3, 3	2, 2, 14, 15, 15, 15
12	199	Stem cell	+	No	+	2, 2, 2, 10, 13, 14	4, 9, 9, 16, 18, 19
13	207	Stem cell	+	No	+	0, 0, 1, 2, 2, 2	0, 0, 1, 2, 2, 2
14	237	Stem cell	+	No	—	0, 0, 0, 0, 1, 1	0, 1, 1, 3, 3, 3

\* $\beta$ -gal:  $\beta$ -galactosidase, <sup>†</sup> GFAP: glial fibrillary acidic protein.



**Fig. 5.** Image showing the behavioral analysis with the BBB locomotor scores of the right (A) and left (B) lower extremities.

아닌 이식한 인간 신경줄기세포에 의해서 정상세포로 분화가 되었다는 것을 의미한다.

### 3. 임상적 행동 분석 결과

대조군의 우측 하지의 평균 BBB 점수는 술 후 1.17, 1주째 2.00, 2주째 3.67, 3주째 3.83, 4주째 4.00, 5주째 4.17이었고, 좌측 하지는 술 후 1.00, 1주째 2.00, 2주째 2.33, 3주째 2.33, 4주째 2.50, 5주째 2.50이었다. 실험군의 우측 하지의 평균 BBB 점수는 술 후 1.64, 1주째 3.00, 2주째 3.93, 3주째 5.86, 4주째 6.14, 5주째 6.43이었고, 좌측 하지는 술 후 1.93, 1주째 3.14, 2주째 7.43, 3주째 8.71, 4주째 8.93, 5주째 9.07이었다. 우측 하지 및 좌측 하지의 BBB 점수는 대조군에 비해 실험군에서 통계적으로 의미있는 증가를 보였고(student t-test,  $p=0.014$ ,  $p=0.010$ ), 실험군에서 2주 및 3주째에 회복의 급격한 증가를 보이고, 이후 회복은 큰 차이가 없게 나타났다(Fig. 5A, B).

## 고 찰

현재 중추신경계의 질환이나 손상 시 치료는 골수 이식, 효소 치환, 유전자 치료, 합성 물질이나 비신경 조직의 이식, 신경 조직의 이식이 있으며, 최근에 신경 줄기세포를 이식하는 실험 등이 이루어지고 있다<sup>1,2,4,7,9,17,18,21,22</sup>). 전능(multipotent) 신경줄기세포는 자기 재생이 가능하며, 신경원 세포 및 지지세포로 분화가 가능하고, 병변이나 손상 부위로 이동이 가능하며, 숙주 중추 신경계 조직의 운명을 변화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>1,2,6,10,15</sup>). 신경세포의 재생에 관한 현재까지의 실험실적 결과 상 난이도를 보면, 지지(glia) 세포 재생, 재수초화, 말초 신경 재건, 세포 손상 간 간극의 연결(create bridges), 손상 부위에서 유리되거나 생성되는 신경 재생 억제 단백질 발현의 억제, 신경세포 재생 및 치환은 순서대로 난이도가 어렵지만 가능한 것으로 증명되어 있으나<sup>15</sup>), 피질 척수로 등과 같이 장 신경로(long tract)의 재생이나 손상 신경 부위에 같은 수초끼리의 정확한 재 연결은 아직까지 규명되거나 가능하다고 보고한 논문은 없다.

현재까지 보고된 실험<sup>8,10,11,15,20</sup>) 중 면역조직화학 염색의 결과는 동물의 신경줄기세포나 골수 유래 중간엽 줄기세포를 이용하여 신경 재생의 정도를 알아보았고, 이를 통해 이식된 동물의 신경줄기세포, 심지어 골수 유래 중

간엽 줄기세포에서 신경원 세포나 성상세포, 회돌기세포(oligodendrocyte) 등의 여러 신경세포나 지지세포로 분화 된다고 하였다. 또한 동물의 신경줄기세포가 직접적인 신경 세포의 재생이나 최소한 척수 손상부위에서 신경 세포의 재생을 돕는 환경을 조성한다고 보고하였다. 저자들은 동물 신경줄기세포의 좋은 결과의 보고를 여러 논문을 통해 알 수 있었고, 서론에서 언급했듯이 결국 사람이 이용할 세포는 인간 신경줄기세포이므로 이 세포들의 효과를 알아보려고 하였다. 우리 실험에서 사용한 인간 신경줄기세포는 유전적으로 조작하여 세포에 Lac Z라는 유전자를 삽입한 세포로, 이 세포의 존재 유무를 확인하고자 할 때, Lac Z에 특이하게 반응하는 B-gal이라는 항체를 이용하면 쉽게 이 세포의 존재 여부를 확인할 수 있는 장점이 있다<sup>5</sup>). 우리의 실험 결과에서 알 수 있듯이 B-gal에 강한 형광염색을 보이므로, 이식된 인간 줄기세포가 쥐의 손상된 척수에서 생존하였다는 것을 알 수 있었다. 또한 신경원 세포에 대해 특이하게 반응하는 Neurofilament 항체나 성상세포에 대해 특이하게 반응하는 GFAP이라는 항체를 이용하여 염색하였을 때 형광염색이 되었는데 이는 이식된 인간 신경 줄기세포에서 신경원 세포나 성상세포로 분화되었음을 의미한다. 즉 동물 신경줄기세포를 이식하여 신경 세포의 분화를 얻은 기존의 다른 보고들과는 다르게 저자들은 인간 신경줄기세포를 이용하여도 다른 종인 백서의 손상된 척수에서 생존 및 분화가 가능하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이식된  $1 \times 10^6$ 개의 신경줄기세포 중 몇 개의 세포가 생존하고, 또 몇 개의 세포가 신경원 세포나 성상 세포로 분화가 되었는 지에 대해서는 알 수 없는 단점이 있다. 즉 현재까지 정량적 분석 방법에 대한 평가 방식을 보고한 논문이 없어, 회복 또는 재생 정도를 정확히 평가할 수 없는 단점이 있으므로, 향후 이에 대한 방법론적 연구가 필요하리라 생각된다.

신경의 기능적 회복 정도는 다른 보고<sup>10,12,14,16</sup>)들처럼 2주에서 3주 정도에 회복의 정점(peak)을 보였고, 이 후에는 회복 정도가 정체됨을 확인할 수 있었다. 또한 대조군에 비해 실험군에서 통계적으로 유의한 수준의 회복은 있었지만, 이 점수 상의 회복 정도가 기능적 회복을 나타낼 정도의 수준은 아니었다. 즉 점수 상에서 회복을 보인 것이지 관절을 움직일 수 있을 정도의 근력 회복을 의미하는 수준의 회복은 보이지 않는 것으로 생각된다. 면역형광염색 상 신경원 세포나 성상 세포로 분화는 이루어지



면서 기능적 수준으로 회복이 되지 않은 이 결과의 해석에 있어서 두 가지를 고려할 수 있다. 하나는 신경세포의 분화가 기능적 수준의 회복을 보일 정도의 세포 수로 분화가 되지 않았다고 생각할 수 있으며, 다른 하나는 기능적 수준의 회복을 보일 정도의 세포 수로 분화가 되었으나, 하지 근육의 섬유화나 근 위축 등의 발생으로 근력 약화를 보였을 가능성도 있다. 저자들은 분화된 세포 수가 적어, 기능적 수준의 회복을 보이지 않았다고 생각한다. 그래서 이에 대한 대안으로 이식하는 신경 줄기세포의 수를 증가시키거나, 또는 그들의 기능을 증가시키는 방법을 강구해야 한다고 생각하며, 차후 실험에는 이러한 방법인 신경줄기세포의 기능을 증가시키는 여러 성장인자들과 병행 투여하는 방법도 생각하고 있다.

이 논문은 몇 가지 제한점이 있다. 첫째는 면역형광염색의 방법적 측면에서 정량적 분석을 하지 않음으로 인해, 신경 줄기세포가 신경세포나 지지세포로 재생이 가능하다는 기존의 논문들과 비슷한 결과는 얻을 수 있었으나, 어느 정도의 양으로 어느 정도의 효과를 보이는 지에 대해 알 수 없다는 점이며, 이를 위해 정량적 분석을 할 수 있는 방법의 개선이 필요하며, 이에 대한 실험이 다음 단계에 이루어져야 할 것으로 생각된다. 둘째는 수술 방법의 선택에 있어서 척수 좌상 모델 대신 완전 절단 모델을 선택하였는데, 그 이유로 척수 손상부위의 자연 치유의 변수를 제거하기 위해서였으나, 저자들의 결과에서 알 수 있듯이 쥐가 하등 동물인 관계로 자연 회복되어, BBB 점수가 술 후에도 개체에 따라 몇 점씩은 나타나므로 자연 치유를 완전히 막을 수는 없었다고 보며, 이의 변수가 신경줄기세포 이식 후의 결과에 어느 정도 혼선을 주었는지 파악할 수 없었다는 점이다. 셋째는 백서에 인간의 세포를 이식하면서, 면역학적 거부 반응을 없애기 위한 완벽한 처치가 없었다는 점이다. 즉 경구 면역억제제(cyclosporin)를 물에 타서 경구 투여하였는데, 이의 양이 쥐의 물의 섭취량에 의해 약물 용량이 결정됨으로써 면역억제제의 효과를 부정확하게 알 수밖에 없었다. 즉 신경줄기세포 이식 후 이 세포가 거부반응에 의해 얼마만큼 영향을 받았으며, 이로 인해 신경세포로의 재생이나 치환에 어느 정도 영향을 미쳤는지를 정확히 평가할 수 없었다. 이에 대한 평가나 언급은 현재까지 보고된 논문이 없는 점으로 미루어 앞으로 이런 면역학적 문제에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결론

인간 줄기세포를 이용한 백서의 척수 재생 정도는, 이식된 신경줄기세포의 생존 및 신경원 세포나 성상 세포로 분화가 가능함을 확인할 수 있었고, 임상적으로는 어느 정도 근력 회복을 보이거나 기능적 수준의 회복은 보이지 않음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. **Alessandri G, Pagano S, Bez A, et al:** Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet*, 364: 1872-1883, 2004.
2. **Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB:** Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 190: 17-31, 2004.
3. **Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC:** A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12: 1-21, 1995.
4. **Blesch A, Lu P, Tuszynski MH:** Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. *Brain Res Bull*, 57: 833-838, 2002.
5. **Chu K, Kim M, Jung KH, et al:** Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Res*, 1023: 213-221, 2004.
6. **de Castro R Jr, Tajrishi R, Claros J, Stallcup WB:** Differential responses of spinal axons to transection: influence of the NG2 proteoglycan. *Exp Neurol*, 192: 299-309, 2005.
7. **Diener PS, Bregman BS:** Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci*, 18: 779-793, 1998.
8. **Diers-Fenger M, Kirchhoff F, Kettenmann H, Levine JM, Trotter J:** AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia. *Glia*, 34: 213-228, 2001.
9. **Caggiano AO, Zimmer MP, Ganguly A, Blight AR, Gruskin EA:** Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal

- cord. *J Neurotrauma*, 22: 226-239, 2005.
10. **Galvin KA, Jones DG:** Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. *Med J Aust*, 177: 316-318, 2002.
  11. **Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, et al:** Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci*, 8: 346-353, 2005.
  12. **Liu S, Qu Y, Stewart TJ, et al:** Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6126-6131, 2000.
  13. **Lu P, Jones LL, Tuszynski MH:** BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol*, 191: 344-360, 2005.
  14. **Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH:** Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 181: 115-129, 2003.
  15. **McDonald JW, Sadowsky C:** Spinal-cord injury. *Lancet*, 359: 417-425, 2002.
  16. **Myckatyn TM, Mackinnon SE, McDonald JW:** Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting-recovery from spinal cord injury. *Transpl Immunol*, 12: 343-358, 2004.
  17. **Rabchevsky AG, Fugaccia I, Turner AF, Blades DA, Mattson MP, Scheff SW:** Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances functional recovery following severe spinal cord injury to the rat. *Exp Neurol*, 164: 280-291, 2000.
  18. **Sayer FT, Oudega M, Hagg T:** Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, 175: 282-296, 2002.
  19. **Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH:** Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 20: 8727-8735, 2000.
  20. **Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH:** FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol*, 148: 577-586, 1997.
  21. **Yick LW, Cheung PT, So KF, Wu W:** Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. *Exp Neurol*, 182: 160-168, 2003.
  22. **Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D:** Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol*, 154: 654-662, 1998.

#### = 국문초록 =

**목 적:** 인간 단뇌에서 분화된 신경 줄기세포의 척수 재생에 대한 효과에 대해 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법:** 생후 8주의 암컷 백서(n=20, 171-237 g)에게 척수 손상 모델 중 완전 절단(transection model)을 선택한 후 척수의 자가 재생(spontaneous healing)을 방지하기 위해 플라스틱 막(0.2×0.1×0.3 cm)을 삽입하여 1차 수술하였다. 대조군(n=6)은 2차 수술 시 삽입된 플라스틱 막을 제거 후 media만 삽입하였고, 실험군(n=14)은 media와 신경줄기세포( $1 \times 10^6$ )를 이식한 후, 5주째 척수 손상 부위를 얻어 면역조직화학 염색으로 신경세포의 재생 여부를 확인하였다. 임상적 결과는 2차 수술 후 1주째부터 1주 간격으로 5주째까지 BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) locomotor scale을 이용하여 비교 분석하였다.

**결 과:** 면역조직화학 염색 상 대조군은 신경세포의 재생은 없었고, 실험군에서 이식한 인간 신경줄기세포의 생존 및 신경원세포와 성상세포로 분화를 확인할 수 있었다. BBB locomotor scale은 대조군에 비해 실험군에서 통계적으로 유의한 수준의 회복을 보였고, 술 후 2주에서 3주째까지 점수가 상승되다가, 술 후 3주째부터는 큰 변화는 없었다.

**결 론:** 인간 줄기세포를 이용한 백서의 척수 재생 정도는, 이식된 신경줄기세포의 생존 및 신경원 세포나 성상 세포로 분화가 가능함을 확인할 수 있었고, 임상적으로는 어느 정도 근력 회복을 보이나 기능적 수준의 회복은 보이지 않음을 알 수 있었다.

**색인 단어:** 신경줄기세포, 척수손상, 신경재생