

돼지 심근경색증 모형에서 Akt-간엽줄기세포를 이용한 심근재생치료의 효과

전남대학교병원 심장센터, 전남대학교 의학연구소

임상엽 · 정명호 · 안영근 · 김용숙 · 김정하 · 이상록 · 김계훈 · 손일석
홍영준 · 박형욱 · 김주한 · 김 원 · 조정관 · 박종춘 · 강정채

The Effects of Mesenchymal Stem Cells Transduced with Akt in a Porcine Myocardial Infarction Model

Sang Yup Lim, MD, Myung Ho Jeong, MD, Young Keun Ahn, MD, Yong Sook Kim, PhD,
Jung Ha Kim, MS, Sang Rok Lee, MD, Kye Hun Kim, MD, Il Suk Sohn, MD,
Young Joon Hong, MD, Hyung Wook Park, MD, Ju Han Kim, MD, Weon Kim, MD,
Jeong Gwan Cho, MD, Jong Chun Park, MD and Jung Chae Kang, MD

The Heart Center of Chonnam National University Hospital, Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : This study was designed to examine whether mesenchymal stem cells (MSCs) transduced with Akt are more resistant to apoptosis, and enhance cardiac repair, following the transplantation into infarcted porcine myocardium. **Materials and Methods :** The MSCs were separated and genetically engineered using ex-vivo myr-Akt-adenoviral gene transfer. The MSCs were delivered by intracoronary injection into infarcted porcine myocardium [group I (control: n=8), media only; group II (n=8), MSCs only; group III (n=8), MSCs modified with Akt]. Myocardial SPECT was performed before and 4 weeks after the MSC transplantation, with the pigs sacrificed for immunocytochemical staining and histological analyses for apoptosis and fibrosis. **Results :** The left ventricular ejection fractions (LVEF) were 44.7 ± 16.6 , 35.9 ± 10.0 and $41.1 \pm 7.9\%$ at first (each n=8), which changed to 29.7 ± 8.5 , 39.0 ± 9.5 and $60.4 \pm 16.6\%$ at 4 weeks after the MSC implantation in groups I, II and III, respectively. The myocardial infarction (MI) area changed from 17.6 ± 9.2 , 35.0 ± 11.8 and $24.3 \pm 11.2\%$ to 19.6 ± 10.1 , 27.2 ± 13.9 and $7.4 \pm 5.3\%$ in groups I, II and III, respectively. Transplantation of 1×10^7 cells into group II increased the Δ LVEF (-15.0 ± 15.3 vs. $3.0 \pm 4.3\%$, n=8 in each, p=0.016) and decreased the Δ MI area (2.1 ± 0.9 vs. $5.6 \pm 3.1\%$, n=8 in each, p=0.04) compared to those of the control group, and these changes were more significant in the Δ LVEF ($19.3 \pm 15.7\%$, p=0.006) and Δ MI area ($-16.4 \pm 6.1\%$, p=0.037) of group III. **Conclusion :** MSCs transduced with Akt enhance the repair of the injured area, prevent remodeling and restore systolic performance in infarcted porcine myocardium. (Korean Circulation J 2005;35:734-741)

KEY WORDS : Myocardial infarction ; Stem cells ; Ventricular remodeling.

서 론

최근 관상동맥질환은 선진국뿐만 아니라 한국에서도 급증

하여 성인 사망률의 주요한 원인이 되고 있다. 이러한 관상동맥질환의 치료는 경피적 관상동맥 풍선 확장술과 스텐트 등으로 치료가 가능해 졌지만, 급성 심근경색증의 후유증으

논문접수일 : 2005년 5월 18일

수정논문접수일 : 2005년 9월 2일

심사완료일 : 2005년 9월 12일

교신저자 : 정명호, 501-757 광주광역시 동구 학동 8번지 전남대학교병원 심장센터, 전남대학교 의학연구소

전화 : (062) 220-6243 · 전송 : (062) 228-7174 · E-mail : myungho@chollian.net

로 발생하는 허혈성 심부전은 이러한 시술 및 약물치료의 발전에도 불구하고 증가하고 있다.

최근 유전자치료 및 줄기세포치료는 심근경색증 후 심장 기능을 개선시키는 효과적인 치료법의 하나로 제시되고 있다.¹⁻⁵⁾ 적절한 세포배양조건에서 줄기세포는 심근세포, 내피 세포로 전환될 수 있다.⁶⁾ 이러한 상황이 생체에서도 적용될 수 있다는 가정 하에 급성 심근경색증으로 손상 받은 심근에서 줄기세포 치료로 심근을 재생시킬 수 있다는 많은 연구 결과가 발표되고 있다.⁷⁾ 여러 초기 연구에서 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells: MSCs)를 이용하여 비가역적인 허혈성 심근손상 환자에서 심근경색부위를 줄이고 심근기능을 개선시키는 것으로 보고되고 있다.

Akt(serine-threonine kinase)는 여러 조직에서 강력한 생존신호로 작용하며, insulin, insulin-like growth factor (IGF)-1, 그리고 gp130 signaling 등에 의하여 활성화 된다.^{8,9)} Matsui 등¹⁰⁾은 일시적 허혈성 심근손상 모델에서 아데노바이러스를 이용한 Akt의 활성화로 심근세포의 죽음을 줄이고 심근기능이 개선됨을 보고하였다. 그러나 돼지와 같은 대형 동물의 심근 경색 모델에서 줄기세포의 효과를 입증한 보고는 아직까지 없다.

저자 등은 돼지 심근경색증 모형에서 MSCs를 관상동맥을 통하여 심장에 전달하여 심근세포의 재생 및 심장 기능의 향상을 알리고자 하였다.

재료 및 방법

동물실험은 전남대학교 의과대학 의과학연구소 및 전남대학교병원 임상연구소 윤리위원회의 허가를 받아 실시하였고, 실험동물은 15 내지 20 kg의 암돼지를 이용하였다. 동물사육사는 항온, 항습 시설이 갖추어진 곳으로서 사료 및 수돗물을 공급하였다.

돼지는 ketamine 12 mg/kg와 xylazine 8 mg/kg을 근주하여 마취하였다. 무균상태에서 2% 리도케인으로 목 중앙부에 국소마취를 실시한 후 돼지의 경동맥을 절개하여 7 French 동맥 유도초를 삽입하였다. 헤파린 10,000 단위를 투여한 후 6 Fr. 또는 7 Fr.의 관상동맥 유도도자를 C-arm(Philips BV-25 Gold)의 투시 하에 관상동맥 개구부에 위치시켰다. 실험 진행 중에는 안면 산소마스크를 이용하여 지속적으로 산소를 공급하고, 귀의 정맥을 통하여 식염수를 공급하였다.

풍선도자를 이용한 돼지의 심근경색증 모델은 좌전하행지 관상동맥을 3.0×18 mm 풍선확장 유도도자를 이용하여 30분 동안 폐쇄시켰다. 그리고 관상동맥 조영술을 시행하여 원위부 관류가 없음을 확인하였다. 30분 뒤 다시 풍선확장 유도도자를 제거하여 재관류를 유도하였다.

돼지 심근경색모델을 만들기 14일 전에 국소 마취한 돼지의 장골돌기(iliac crest)에서 10~20 cc의 골수를 채취하여 헤파린 처리 한 후 상온에서 800 g로 10분간 원심분리 하였다.

다. 혈청층(serum layer)을 버리고 남은 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 1:1로 희석한 후 동일한 양의 Lymphoprep(Technoclon, 1,077 g/mL)에 섞어 800 g로 30분간 원심분리 하였다.

분리된 MSCs의 수를 hemocytometer로 측정한 후 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 의 농도로 포도당 1 g이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium containing(DMEM-LG), 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% Gentamicin이 포함된 culture flask에 5% CO₂가 포함된 대기 중에서 37℃에서 7일간 배양하였다.

Culture medium은 3일마다 교환하였고 non-adherent cells들은 5일 후 제거하였다. 7일 후 MSCs의 colony가 분명해지면 0.05% trypsin-EDTA로 trypsinization한 후 이 과정을 반복하였다. 주입 전 MSCs의 평균 수는 $1.0 \sim 5.0 \times 10^7$ 개였다.

myr-Akt-HA 표현형 아데노바이러스는 293 cells를 이용하여 증폭(amplification) 하였으며, 바이러스의 titer는 plaque assay를 이용하여 결정하였다. 중간엽줄기세포에 myr-Akt-HA 표현형 아데노바이러스를 transfection시키고 24~48시간 incubation time을 가졌다. Incubation time 후 fluorescent microscope를 이용하여 green fluorescence 확인으로 transfection을 평가하였고, 세포가 죽지 않는 범위에서 가장 Akt가 잘 발현되는 조건을 확보하였다.

MSCs의 관상동맥을 통한 투여의 유용성은 돼지의 Y 염색체 특이 유전자(Y chromosome specific gene, SRY, primer 410 F-CTTGAGAATGGGTAGGTTGGTTCCG, 970RG-TAGCCTCTGTGCCTCCTCGAAGAA)를 이용한 in situ hybridization을 통하여 증명하였다. 수태지의 골수에서 채취한 MSCs를 암돼지의 심근경색 모델에 관상동맥을 통하여 투여한 후 DIG oligonucleotide 3'-End labeling kit(Roche, Germany)을 이용하여 Y 염색체의 발현 여부를 관찰하였다.

MSCs의 관상동맥을 통한 투여는 심근경색증 모델을 만든 지 3~4일 후 over-the wire balloon을 좌전하행지의 원위부에 삽입하여 4~6기압의 낮은 압력으로 inflation 시킨 후 혈류를 5분 정도 완전 차단하고 MSCs를 balloon의 중심부에 있는 central port를 통하여 주입하였다.

I 군은 대조군으로서 saline만을 주입하였으며(n=8), II 군은 1.0×10^7 개의 MSCs만을(n=9), III군은 Akt가 transfection된 1.0×10^7 개의 MSCs를(n=9) 관상동맥을 통하여 투여하였다.

심근손상 1 내지 2일 후 심근관류 SPECT를 이용하여 심근경색부위, 심근관류정도, 그리고 부분 심근벽운동 등의 심기능을 평가하였고, MSCs를 투여한지 4주 후 다시 추적 심근관류 SPECT를 시행하였다. 심근관류 SPECT는 심근관류 제제인 tetrofosmin(TF)를 사용하여 Tc-99m TF를 약 1,110 MBq(30 mCi) 용량으로 돼지에게 정맥주사한 뒤 45분 뒤 시행하였다.

추적 심근관류 SPECT 후 돼지를 희생시켜 조직병리검사를 실시하였다.

통계학적 분석

모든 자료는 평균±표준편차로 표시하였으며, 변수의 비교는 MS Window용 SPSS-PC 11.0(Statistical package for the social sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 paired t-test와 ANOVA test로 하였다. P값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)의 면역조직학적 특징은 Fig. 1과 같았다. 배양된 MSCs를 10 pfu/cell의 MOI의 myr-Akt-HA 표현형 아데노바이러스에 의해 감염시켰으며 24시간 후 green fluorescence로 확인한 결과 약 80~90%에서 양성을 보였다.

돼지의 Y 염색체 특이 유전자인 SRY를 이용한 in situ hybridization에서는 MSCs가 이식된 그룹의 심근경색의 주위조직(perı-infarction area)에서만 양성을 보였다(Fig. 2).

M-SPECT로 좌심실 구혈율과 심근경색의 면적을 측정하였으며(Fig. 3), 심근경색 후 평균 좌심실 구혈율은 I 군 $44.7 \pm 6.6\%$, II 군 $35.9 \pm 0.0\%$, III 군 $41.1 \pm 7.9\%$ 였으며, 평균 심근경색 면적은 I 군 $17.6 \pm 9.2\%$, II 군 $35.0 \pm 11.8\%$, III 군 $24.3 \pm 11.2\%$ 였다(Table 1).

MSC를 관상동맥을 통하여 주입한 후 2마리(II 군 1마리,

III 군 1마리)가 돌연사 하였으며, 사망률은 11.1%(2/18)였다.

MSCs 투여 4주 후 평균 좌심실 구혈율은 I 군 $29.7 \pm 8.5\%$, II 군 $39.0 \pm 9.5\%$, III 군 $60.4 \pm 16.6\%$ 로 변화하였으며, 평균 심근경색 면적은 I 군 $19.6 \pm 10.1\%$, II 군 $27.2 \pm 13.9\%$, III 군 $7.4 \pm 5.3\%$ 로 변화하였다(각각 $n=8$, Table 2).

약 1.0×10^7 개의 MSCs를 관상동맥을 통하여 투여한 결과, 평균 좌심실 구혈율의 변화는 I 군에서 $15.0 \pm 15.3\%$ 감소, II 군에서 $3.0 \pm 4.3\%$ 증가, III 군에서 $19.3 \pm 15.7\%$ 증가로 I 군에 비하여 II, III 군에서 유의하게 감소되었으며, II 군과 III 군을 비교하였을 때 III 군에서 더욱 유의하게 감소하였다($p=0.01$).

평균 심근경색 면적의 변화 역시 I 군은 $2.1 \pm 0.9\%$ 증가, II 군에서 $5.6 \pm 3.1\%$ 감소, III 군에서 $16.4 \pm 6.7\%$ 감소로 I 군에 비하여 II, III 군에서 유의하게 감소되었으며, II 군과 III 군을 비교하였을 때 III 군에서 더욱 유의하게 감소하였다($p=0.03$)(각각 $n=8$, Table 3).

면역 조직학적 검사에서 vimentin 양성세포는 대조군에서는 관찰되지 않았으며(Fig. 4A), MSCs를 투여한 II, III 군에서 관찰되었다(Fig. 4B). α -sarcomeric actin 역시 MSCs를 투여한 II, III 군에서 강양성으로 관찰되었으며(Fig. 4C, D), c-kit, CD71, 그리고 CD90은 MSCs를 투여한 II, III 군에서만 양성을 보였다(Fig. 4E-J).

Masson's trichrome 염색에서는 MSCs를 투여한 II, III 군보다 대조군에서 심근의 섬유화가 더 많이 진행된 소견을 보였다(Fig. 4K, L). 각 군에서 염증세포의 침윤이나 염증세포 수에 차이에 유의한 차이를 보이지 않았다.

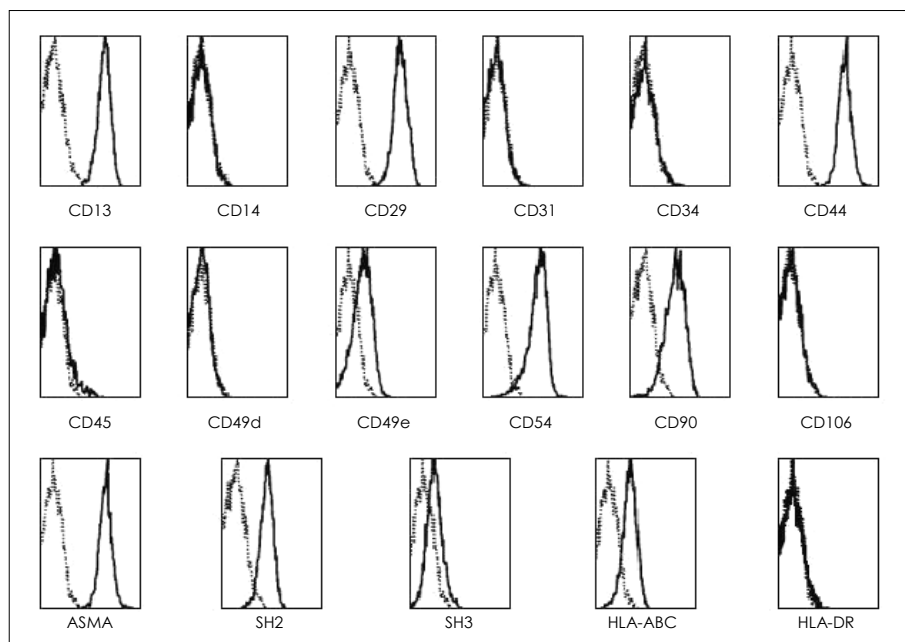


Fig. 1. Result of flow cytometry. The characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs) are demonstrated as red colors. Cultured MSCs expressed MSC-related antigens such as CD13, CD29 (1-integrin), CD44, CD49e (5-integrin), CD54 (ICAM-1), CD90 (Thy-1), α -smooth muscle actin (ASMA), SH2, SH3 (CD73), and HLA-ABC. In contrast, they expressed neither hematopoietic lineage markers such as CD14, CD34, and CD45, nor endothelial markers such as CD31 and CD106 (VCAM). And the cells were negative for HLA-DR. HLA: human leukocyte antigen, ICAM: inter cellular adhesion molecule, VCAM: vascular cell adhesion molecule.

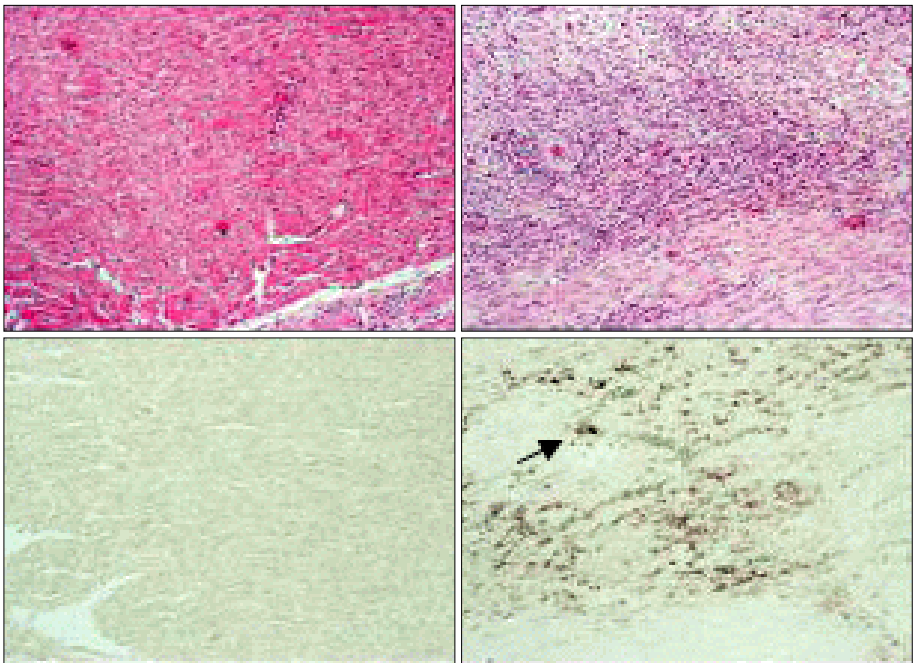


Fig. 2. In situ hybridization using porcine Y chromosome specific gene, SRY. Positive signal was observed in the mesenchymal stem cells (MSCs) delivered group only and almost limited to the peri-infarct area (left column: control group, right column: MSCs delivered group). SRY: sex-determining region Y.

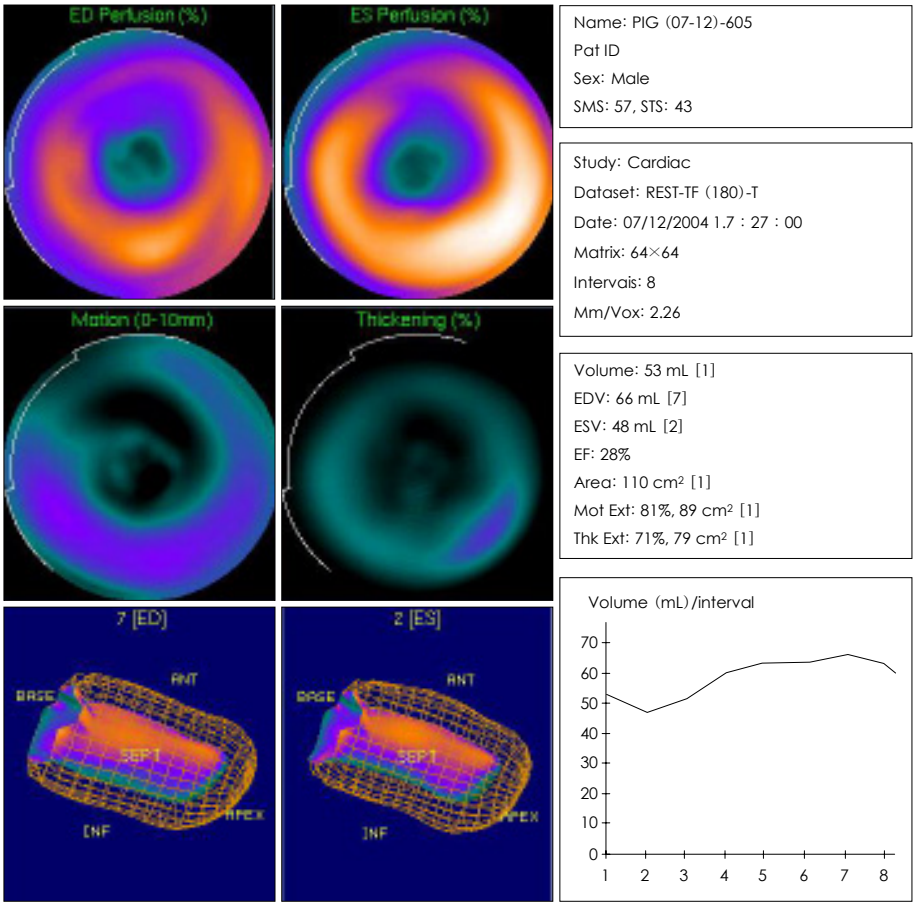


Fig. 3. Left ventricular ejection fraction and myocardial infarction area were determined by gated myocardial perfusion SPECT. Left ventricular volume (mL), end-diastolic volume (EDV, mL), end-systolic volume (ESV, mL), left ventricular ejection fraction (EF) and left ventricular area (area, cm²) were measured at the first and follow-up experiments. SPECT: single photon emission computed tomography.

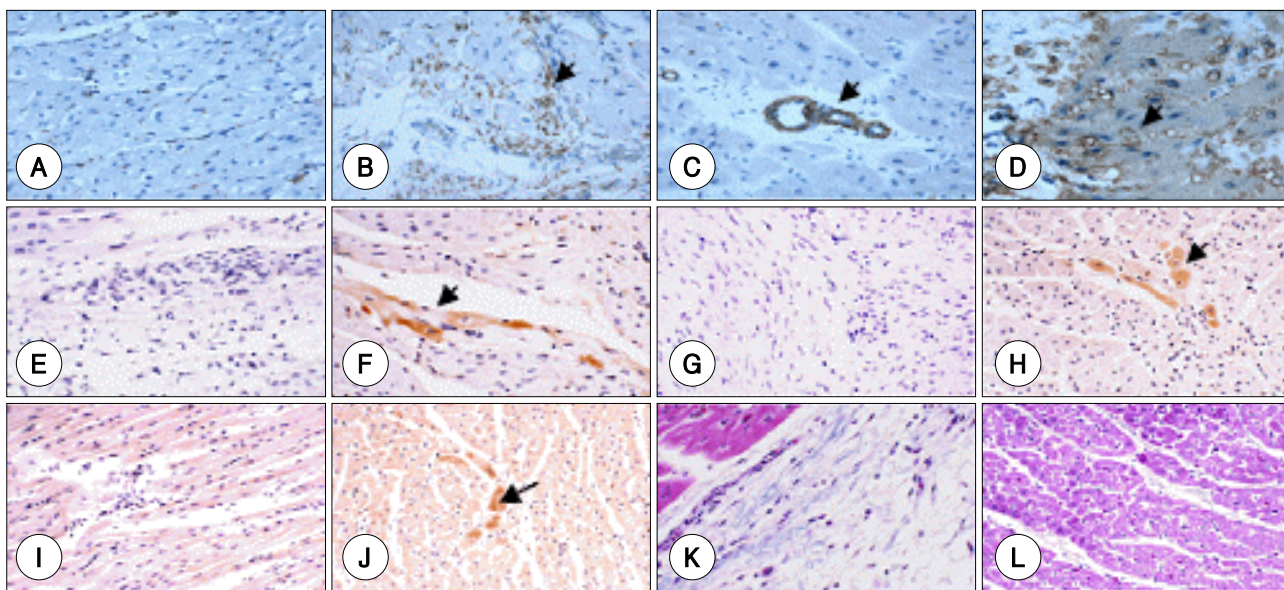


Fig. 4. Findings of immunohistochemistry. Left side (A, C, E, G, I, K) are control group and right side (B, D, F, H, J, L) are mesenchymal stem cells (MSCs) group. The characteristic cells are arrowed. Vimentin was negative in control group (A) and cardiomyocyte-like cells were observed in MSCs group (B). Alpha-sarcomeric actin showed more positive staining in MSCs group (D) than in control group (C). Control group was negative for c-kit (E), CD71 (G), and CD90 (I). Staining for c-kit, CD71, and CD90 was positive in only MSCs group (F, H, J, respectively). Masson's trichrome stain revealed control group to be more developed fibrosis (K) than in MSCs group (L). The images were photographed at 200 \times magnification.

고 찰

본 연구는 대형동물의 심근경색증 모델에서 관상동맥을 통해 Akt를 transduction시킨 MSCs를 투여하여 치료효과를 관찰한 새로운 시도로서 향후 임상 연구에 대한 가능성을 제시한 예비 연구라고 할 수 있다.

최근 심혈관 질환이 급증하면서 급성 심근경색증에 대한 재관류 치료를 하더라도 발생할 수 있는 심근세포의 소실 및 심실의 재형성이 허혈성 심부전의 가장 중요한 원인으로 대두되고 있다.¹¹⁾ 현재까지 이러한 허혈성 심부전에서 약물치료를 제외하고는 심장이식만이 가장 확실한 치료로 여겨져 왔다. 그러나 최근 줄기세포를 이용한 심근의 재생이 새로운 치료법으로 주목받고 있다.

줄기세포는 스스로를 재생할 수 있으며, 혈관과 심근을 새롭게 형성하여 경색된 심근을 재생시킬 수 있다.¹²⁾¹³⁾ 지금까지 몇몇 연구에서 그 성과를 발표하였지만, 아직까지는 사람에게 적용시키기에는 많은 문제점들이 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 아직도 어떤 세포를 이용할 것이며, 어떻게 줄기세포가 심근 세포로 분화하는가, 또 줄기세포를 손상된 심근에 투여하는 가장 이상적인 방법과 최적의 투여 시기가 언제인가 등은 확실하지 않다.

배양된 MSCs는 근원세포(myogenic cells), 심근세포, 연골세포, 지방세포 등으로 분화할 수 있다.¹⁸⁾ DNA methylation 억제제인 5-azacytidine을 배지에 첨가하면, MSCs는 심근세포와 유사한 세포로 분화됨이 알려져 있다.¹⁹⁾

Wang 등²⁰⁾은 쥐의 MSCs를 쥐의 체내에 투여하면 정상 심장에서도 새로운 심근세포가 형성되며 이는 MSCs의 투여와

연관되어 있다고 보고하였다. 이러한 정상상태의 동물 실험 이외에 심근 손상의 모델에서도 MSCs의 투여를 통한 심근의 재생과 심장 기능의 개선이 많이 보고되고 있다.²¹⁻²⁵⁾

그러나 이전의 연구에서는 MSCs의 투여로 인한 심장 기능의 개선이 기대한 것만큼 충분하지 않았다.²⁶⁾²⁷⁾ 본 연구에서는 Akt(serine-threonine kinase)가 encoding된 아테노바이러스를 이용하여 조직 내에서 줄기세포의 고사(apoptosis)를 방지하고 줄기세포의 투여로 인한 심장 기능의 개선 효과를 극대화시키고자 하였다. 대형동물인 돼지를 이용한 심근경색증 모델에서 MSCs를 카테터를 이용하여 관상동맥내로 투여한 방법은 지금까지 시도된 바 없으며 좋은 결과를 얻었다.

Akt(serine-threonine kinase)는 여러 조직에서 강력한 생존신호로 작용하며, 심근손상 모델에서 심근세포의 고사를 줄이고 심근기능의 개선됨이 보고된 바 있다.⁸⁾ 본 연구에서도 Akt가 transfection된 MSCs를 관상동맥 내로 투여하여 대조군에 비하여 유의한 심장기능의 개선 및 심근 경색의 감소 효과를 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 줄기세포의 투여방법으로 관상동맥 내로 직접 투여하는 방법을 선택하였다. 줄기세포를 정맥 내로 투여하였을 때에는 순환계의 여러 과정을 거쳐 투여한 세포의 극히 일부만이 원하는 경색부위로 운반되기 때문에 그 효율성이 감소할 것으로 생각되었다. 또한 심실 내 직접 주입법은 심근의 mapping으로 인해 많은 시간이 필요하며, 특수한 장비가 필요하므로, 직접 사람에게 비교적 손쉽게 적용할 수 있는 관상동맥 내 투여를 선택하였다.

줄기세포를 투여하는 시점은 심근경색증 발생 3~4일 후

Table 1. Initial myocardial SPECT findings

	Group I (control group, n=8)	Group II (MSCs group, n=9)	Group III (MSCs modified with Akt group, n=9)	P
Ejection fraction (%)	44.7 ± 16.6	35.9 ± 10.0	41.1 ± 7.9	0.531
End diastolic volume (mL)	43.8 ± 15.8	58.7 ± 17.3	34.0 ± 13.2	0.077
End systolic volume (mL)	26.0 ± 16.1	36.7 ± 7.5	19.6 ± 6.6	0.082
MI extent (%)	17.5 ± 9.2	32.8 ± 10.9	23.6 ± 11.1	0.105
Total area (cm ²)	82.6 ± 22.8	85.6 ± 9.4	81.6 ± 16.7	0.930
Infarcted area (cm ²)	14.8 ± 10.5	28.0 ± 9.0	19.6 ± 13.9	0.217
Viable myocardium (cm ²)	67.8 ± 19.4	57.6 ± 11.1	62.0 ± 7.1	0.508

MSCs: mesenchymal stem cells, MI: myocardial infarction, SPECT: single photon emission computed tomography

Table 2. Follow-up myocardial SPECT findings

	Group I (control group, n=8)	Group II (MSCs group, n=8)	Group III (MSCs modified with Akt group, n=8)	P
Ejection fraction (%)	29.7 ± 8.5	39.0 ± 9.5	60.4 ± 16.6	0.005
End diastolic volume (mL)	67.4 ± 9.3	46.6 ± 10.9	47.4 ± 18.0	0.049
End systolic volume (mL)	47.8 ± 11.2	28.4 ± 7.6	18.2 ± 8.3	0.001
MI extent (%)	19.6 ± 10.1	27.2 ± 13.9	7.2 ± 5.0	0.030
Total area (cm ²)	98.4 ± 4.7	80.8 ± 10.5	87.4 ± 22.5	0.057
Infarcted area (cm ²)	19.6 ± 10.1	27.2 ± 13.9	4.8 ± 3.6	0.050
Viable myocardium (cm ²)	78.6 ± 10.2	60.5 ± 5.3	82.6 ± 21.1	0.008

MSCs: mesenchymal stem cells, MI: myocardial infarction, SPECT: single photon emission computed tomography

Table 3. Differences of left ventricular function, area of myocardial infarction and viable myocardium between initial and follow-up myocardial SPECT findings

	Group I (control group, n=8)	Group II (MSCs group, n=8)	Group III (MSCs modified with Akt group, n=8)	P
ΔEjection fraction (%)	-15.0 ± 15.3	3.0 ± 4.3	19.3 ± 15.7	0.013
ΔArea of MI (%)	2.1 ± 0.9	-5.6 ± 3.1	-16.4 ± 6.1	0.037
ΔViable myocardium (%)	-2.3 ± 3.5	4.0 ± 4.2	17.2 ± 13.9	0.058

MSCs: mesenchymal stem cells, MI: myocardial infarction, SPECT: single photon emission computed tomography

로 잡았는데, 기존의 동물 실험에서 심근경색증 후 첫 3일 내에 손상 조직에 fibrin 등의 물질이 활발하게 침착되기 시작하며,²⁸⁾²⁹⁾ 3~4일 후에는 intercellular adhesion molecule 과 vascular cell adhesion molecule이 감소하기 시작하며 그 이후에는 염증반응이 우세하게 된다고 보고하고 있다.³⁰⁾ 따라서 줄기세포를 심근경색 1주일 내, 특히 3~4일 후에 투여하는 것이 심근의 재생 및 심실의 재형성 억제에 적절할 것이라고 판단되었다.

본 연구에서는 수태지의 골수에서 MSCs를 채취한 후 암 태지의 심근경색 모델에 이식하여, 돼지의 Y 염색체 특이 유전자인 SRY가 암 태지의 심근경색 모델에서 발현됨을 증명함으로써 관상동맥을 통한 MSCs의 투여가 유용한 방법이며, 투여된 MSCs가 심근경색증 주위조직(perinfarction area)으로 도달(homing)함을 증명하였다. MSCs가 심근경색증 주위조직에서만 생존하여 α -sarcomeric actin 등을 발현하는 심근세포와 유사한 세포로 분화하는 기전은 아직 불확실하나, 완전히 섬유화 된 경색조직에서보다는 정상 조직에서 더 가까운 경색 주위조직(perinfarction area)에서 분화와 관련된 signal을 전달받기 더 용이할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 관찰된 좌심실 수축기 말 용적(left ventricular end-systolic volume)의 감소 및 구혈율(ejection fraction)의 증가는 MSCs 투여에 따른 심근경색 부위의 치료 효과를 반영한다고 볼 수 있다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, SPECT만을 이용하여 심근경색의 크기와 심장기능을 측정하였고, 일반적으로 사용되는 심초음파 검사나 좌심실 이완기말압력(left ventricular end diastolic pressure) 등의 혈액학적 검사를 시행하지 않은 점이다. 다음으로 MSC를 관상동맥을 통하여 주입한 후 돌연사 한 2마리의 사망원인이 기존의 심근경색의 합병증에 의한 사망인지, MSC를 관상동맥을 통하여 주입한 후 경색크기의 확장에 의한 사망인지 확인하지 못한 점이다. 이를 확인하기 위하여서는 관상동맥을 통하여 MSC를 주입하기 전, 후로 심근효소 등의 생화학적 검사, EKG에서 ST 분절의 상승 유무 및 심장 초음파검사 등으로 좌심실 벽운동 장애의 확대 유무를 관찰해야 할 것으로 사료된다. 또한 최근 관상동맥에 줄기세포를 주입한 후 혈관에 동맥경화를 촉진시킬 수 있다는 우려가 있으나 관상동맥에 대한 조직병리 검사가 이루어지지 않은 점과, 이식된 MSCs가 심근 세포와 유사한 세

포로 분화하여 α -sarcomeric actin 등이 발현되었으나 이것을 double stain 등을 이용하여 MSCs와 α -sarcomeric actin이 co-localization 되는 것을 증명하지 않았으며, 체내에서 MSCs가 어떤 기전으로 분화하는지 증명하지 못한 점이라 할 수 있다. 그밖에 control군에서 culture media를 injection 하지 않고 단순히 saline만을 injection한 점이나, MSC와 Akt-MSC군의 비교에서 Adenovirus에 의한 효과를 배제하기 위하여 adenovirus-GFP 주입군을 대조군으로 하지 않은 점 등을 제한점으로 들 수 있다.

본 연구의 의의는 줄기세포를 어느 일정한 부위의 관상동맥 내로 투여하는 것은 원하는 부위로 줄기세포를 운반(delivery)할 수 있는 안전하고 효과적이며 사람에게 적용될 수 있는 방법이라 생각되었다. 심근경색증 후 적절한 시간에 Akt가 transfection된 MSCs를 관상동맥 내로 투여하면 경색된 심근을 효과적으로 재생시킬 수 있을 것으로 생각된다. 만일 인체에 적용된다면 본인의 골수에서 비롯된 MSCs를 이용하는 것이므로 배아 줄기세포를 이용한 다른 치료법에서 비롯되는 윤리적인 논란은 발생하지 않을 것이다. 심근경색증 환자의 치료에 적용하기 위하여서는 줄기세포의 처리방법이나 투여 방법 등에서 더욱 개선되어야 하고 안전성과 효과가 확립된 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

요 약

배경 및 목적 :

돼지 심근경색증 모델에서 Akt를 transfection시킨 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells: MSCs)를 관상동맥을 통하여 심장에 전달하여 MSCs의 고사(apoptosis)를 막고, 심근세포의 재생 및 심장 기능의 향상여부를 알고자 하였다.

방 법 :

돼지 심근경색증 모델은 좌전하행지 관상동맥을 풍선도자를 이용하여 30분 동안 폐쇄시켜 유도하였다. 심근경색증 모델을 만든지 3~4일 후 over-the wire balloon을 이용하여 관상동맥을 통하여 MSCs를 투여하였다. I군(n=8)은 대조군으로서 saline만을 주입하였으며, II군(n=9)은 1.0×10^7 개의 MSCs를 주입하였고, III군(n=9)은 Akt가 transfection된 1.0×10^7 개의 MSCs를 관상동맥을 통하여 투여하였다. 심근손상 1 내지 2일 후 심근관류 SPECT를 이용하여 심근경색 부위, 심근관류정도, 그리고 부분 심근벽운동 등의 심기능을 평가하였고, MSCs를 투여한지 4주 후 다시 추적 심근관류 SPECT를 시행하였다.

결 과 :

MSC를 관상동맥을 통하여 주입한 후 2마리(II군 1마리, III군 1마리)가 돌연사 하였다. 심근경색증 후 좌심실 구혈율은 I군 $44.7 \pm 6.6\%$, II군 $35.9 \pm 0.0\%$, III군 $41.1 \pm 7.9\%$ 였으며, 심근경색증 면적은 I군 $17.6 \pm 9.2\%$, II군 $35.0 \pm 11.8\%$, III군 $24.3 \pm 11.2\%$ 였다. MSCs 투여 4주 후 좌심실 구혈율

은 I군 $29.7 \pm 8.5\%$, II군 $39.0 \pm 9.5\%$, III군 $60.4 \pm 16.6\%$ 로 변화하였으며, 심근경색증 면적은 I군 $19.6 \pm 10.1\%$, II군 $27.2 \pm 13.9\%$, III군 $7.4 \pm 5.3\%$ 로 변화하였다. MSCs를 투여한 후, 좌심실 구혈율의 변화는 II군에서 $3.0 \pm 4.3\%$ 증가, I군에서 $15.0 \pm 15.3\%$ 감소로서 II군에서 유의하게 증가되었으며, 심근경색증 면적의 변화는 II군에서 $5.6 \pm 3.1\%$ 감소, I군은 $2.1 \pm 0.9\%$ 증가로 II군에서 유의하게 감소되었다. III군에서는 좌심실 구혈율은 $19.3 \pm 15.7\%$ 증가로 더욱 유의하게 증가되었으며, 심근경색증 면적은 $16.4 \pm 6.7\%$ 감소되어 I군에 비하여 유의하게 감소되었다. 면역 조직학적 검사에서 vimentin 양성세포는 I군에서는 관찰되지 않았으며, II군과 III군에서 관찰되었다. α -sarcomeric actin은 II, III군에서 강양성으로 관찰되었으며, c-kit, CD71, CD90 등은 II, III군에서만 양성을 보였다. Masson's Trichrome 염색에서는 I군에서 심근의 섬유화가 더 많이 진행된 소견을 보였다.

결 론 :

돼지 심근경색증 모델에서 MSCs를 관상동맥을 통하여 심장에 전달함으로써 심근세포의 재생 및 심장 기능의 회복효과를 보였으며, Akt는 MSCs의 고사를 방지할 수 있었다.

중심 단어 : 심근경색증 ; 줄기세포 ; 심실 재형성.

본 연구는 2004년 한국 학술진흥재단 선도연구자 연구비(103053)의 지원에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

- 1) Nabel EG, Plautz G, Boyce FM, Stanley JC, Nabel GJ. *Recombinant gene expression in vivo within the endothelial cells of the arterial wall.* Science 1989;244:1342-4.
- 2) Isner JM, Vale PR, Symes JF, Losordo DW. *Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects.* Circ Res 2001;89:389-400.
- 3) Khurana R, Martin JF, Zachary I. *Gene therapy for cardiovascular disease: case for cautious optimism.* Hypertension 2001;38:1210-6.
- 4) Lim DS. *Stem cells for cardiovascular disease.* Korean Circ J 2004;34:435-40.
- 5) Cho MC. *Stem cells for myocardial regeneration.* Korean Circ J 2002;32:543-8.
- 6) Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. *Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians.* Circulation 2003;108:1139-45.
- 7) Reinlib L, Field L. *Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease?: a workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute.* Circulation 2000;101:E182-7.
- 8) Li B, Setoguchi M, Wang X, et al. *Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart.* Circ Res 1999;84:1007-19.
- 9) Hirota H, Chen J, Betz UA, et al. *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress.* Cell 1999;97:189-98.
- 10) Matsui T, Tao Z, Monte F, et al. *Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo.* Circulation 2001;104:330-5.

- 11) Cohn JN. *New therapeutic strategies for heart failure: left ventricular remodeling as a target.* *J Card Fail* 2004;10:S200-1.
- 12) Hassink RJ, Dowell JD, Brutel de la Riviere A, Doevendans PA, Field LJ. *Stem cell therapy for ischemic heart disease.* *Trends Mol Med* 2003;9:436-41.
- 13) Zwaginga JJ, Doevendans P. *Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering.* *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:900-8.
- 14) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.* *Nature* 2001;410:701-5.
- 15) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. *Myoblast transplantation for heart failure.* *Lancet* 2001;357:279-80.
- 16) Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. *Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results.* *Jpn Circ J* 2001;65:845-7.
- 17) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. *Intracoronary, human autologous stem cells transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction.* *Dtsch med Wochenschr* 2001;126:932-8.
- 18) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function.* *Circulation* 1999;100:II247-56.
- 19) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.* *Nat Med* 2001;7:430-6.
- 20) Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. *The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications.* *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:699-705.
- 21) Sussman M. *Cardiovascular biology: hearts and bones.* *Nature* 2001;410:640-1.
- 22) Piao HN, Youn TJ, Kwon JS, et al. *Cellular cardiomyoplasty using bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in post myocardial infarction heart failure.* *Korean Circ J* 2004;34:1113-21.
- 23) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.* *Circulation* 2002;105:93-8.
- 24) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. *Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.* *Circulation* 2001;104:1046-52.
- 25) Ferrari G, Cusella de la Angelis G, Coletta M, et al. *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.* *Science* 1998;279:1528-30.
- 26) Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. *Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease.* *Circulation* 2004;109:1615-22.
- 27) Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects.* *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919-25.
- 28) Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. *The inflammatory response in myocardial infarction.* *Cardiovasc Res* 2002;53:31-47.
- 29) Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. *Atherosclerosis as inflammation.* *Ann Vasc Surg* 2005;19:130-8.
- 30) Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Tanaka H, Bando K, Fukuda N. *Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction.* *Cardiology* 2000;93:168-74.