

중증하지허혈 모델에서 골수유래 중간엽줄기세포가 혈관 형성에 미치는 영향

손명주¹, 강웅철², 변경희¹

¹가천대학교 의과대학 해부학교실, ²가천대학교 길병원 심장내과

(2016년 5월 31일 접수, 2016년 6월 22일 수정접수, 2016년 6월 23일 게재승인)

간추림 : 중증하지허혈(Critical limb ischemia, CLI)은 동맥경화성 말초동맥질환의 가장 심한 임상 양상 중 하나로 혈전에 의해 유발되어 하지혈관을 통한 혈류를 감소시키고 피부궤양이나 조직괴사, 진행 정도에 따라 사지 절단을 초래할 수 있다. 질환 치료를 위해서 경피적 혈관 중재술(percutaneous peripheral intervention) 등을 시도하고 있으나 이는 혈관을 뚫어줄 뿐 혈관 재협착률을 줄이지 못하며 새로운 혈관 생성을 하지 못하기 때문에 사지 절단률과 사망률을 유의하게 줄이지 못하고 있다. 최근 골수유래 줄기세포의 주변분비효능(paracrine effect)을 통한 허혈성 질환에서의 치료 효과에 대해서 보고되었다. 본 연구에서는 중증하지허혈 동물 모델에서 골수유래 중간엽줄기세포의 치료 및 신혈관 형성(angiogenesis) 효능을 확인하고자 한다.

이를 위해 사람의 골수에서 분리한 중간엽줄기세포의 특성을 유세포분석과 분화실험을 통해 확인하였다. 사람제대정맥혈관내피세포에서 줄기세포의 배양 배지를 처리한 후 혈관 형성 확인을 통해 주변분비효능을 확인하였다. 또한 10% Ferric chloride (FeCl₃)를 이용하여 흰쥐의 넓다리동맥 내에 혈전을 생성하여 중증하지허혈과 비슷한 조건을 만들었으며, 10만 개의 사람골수유래 중간엽줄기세포를 넓다리동맥의 주행에 따라 다리근육에 주입하였다. 28일 후에 줄기세포의 생착능, 다리혈관의 변화, 다리근육의 상태와 섬유화 등을 비교하여 주입한 줄기세포의 효능을 확인하였다.

실험 결과 줄기세포 배양 배지 처리 후 혈관내피세포의 혈관 형성능이 대조군보다 높았을 뿐만 아니라 주입한 중간엽줄기세포를 주입한 흰쥐에서의 신생혈관 형성능이 높았다. 다리의 상태를 육안으로 확인한 허혈 정도 또한 좋아졌으며, 다리근육 세포의 조직학적 상태와 섬유화 정도에서도 유의미하게 호전되었다. 이상의 실험 결과를 통해 골수에서 분리 배양한 중간엽줄기세포는 중증하지허혈에서의 혈관 형성능뿐만 아니라 섬유화 억제 등의 효과로 중증하지허혈에서 하지 절단을 예방할 수 있음을 확인하였다.

찾아보기 낱말 : 중증하지허혈, 골수유래 중간엽줄기세포, 신혈관 형성

서론

*이 논문은 2012년도 정부(보건복지부)의 지원을 받아 수행된 첨단의료기술개발사업의 실적임 (No. A121991).

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자 : 변경희(가천대학교 의과대학 해부학교실), 강웅철(가천대학교 길병원 심장내과)

전자우편 : khbyun1@gachon.ac.kr, kangwch@gilhospital.com

중증하지허혈(Critical limb ischemia)은 동맥경화로 인해 말초동맥이 좁아지거나 막히면서 생기는 말초동맥질환 중 가장 심한 임상 양상 중 하나이다. 중증하지허혈 환자들은 다리의 통증, 마비, 조직괴사뿐만 아니라 심한 경우 약 40% 환자는 사지를 절단하게 되며 약 20% 환자는 6개월 이내에 사망하기도 한다[1]. 중증하지허혈 질환을 유발하

는 위험요소는 나이, 흡연, 당뇨와 고지혈증 등이 있으나 대표적인 원인으로 동맥경화로 인한 다리혈류 감소를 들 수 있다[2]. 동맥경화는 여러 가지 원인들에 의해 혈관의 내피세포가 손상되고 지방이 축적되어 동맥 혈관의 내벽이 두꺼워지며 죽상판(atheromatous plaque)을 형성해 가는 과정을 지칭한다. 혈관 내에 축적되는 지방으로 인해 혈관 내 혈류가 감소될 뿐만 아니라 염증 세포의 침윤과 죽상판을 통한 혈관기질의 와해(matrix disorganization) 등을 통해 세포의 괴사가 동반된다[3]. 세포 괴사 및 혈관벽 손상은 혈액응고와 용해 과정을 통해 혈소판이 침착 후 활성화, 응집되는 과정에서의 혈액 응고계를 활성화 함으로써 혈전을 형성하게 된다[4]. 이와 같이 형성된 혈전은 생성되는 작은 blood clot의 형태로 지속적으로 혈관 내에 쌓여가며 혈류를 막아 하지로 가는 영양소과 산소의 공급을 차단하여 마침내 중증하지허혈을 유발토록 한다[5].

중증하지허혈을 치료하는 방법으로 스텐트 삽입술, 풍선 확장술과 같은 내과적 중재술과 우회 수술, 혈관 성형술 등의 수술적인 요법 혹은 약물 요법 등이 있다. 이러한 방법을 통해 막힌 혈관을 뚫어줌으로써 재관류를 도와주는 효과가 있으나 재협착률이 높다. 뿐만 아니라 막혀 있는 혈관을 그대로 두고 부형 혈관의 형성을 도와 새로운 혈류를 생성하지만 모든 방법이 환자의 하지 절단을 막아내지는 못하고 있는 실정이다[6,7].

최근 여러 연구들을 통해 허혈 부위에 새로운 혈관의 형성을 촉진시킬 수 있는 여러 가지 단백질을 투여하는 시도[8]가 있었으나 이 또한 단백질의 반감기나 생체 내에서의 불안정성을 고려할 때 새로운 치료법으로 이용되기에는 한계가 있음을 보여준다.

이를 극복하기 위해 줄기세포를 이용한 세포 치료제 방법으로 접근하고 있다. 중간엽줄기세포는 처음 골수에서 발견된 뒤 제대혈[9]과 지방조직[10] 등에서도 발견되었다. 중간엽줄기세포는 분화(differentiation)를 통한 효능보다는 주변분비효능(paracrine effect)을 통한 효과가 더 크다고 알려져 있으며[11,12] 혈관 재생을 유발하는 Vascular endothelial growth factor (VEGF), Angiopoietin 1 (ANG-1), Erythropoietin (EPO), Placental growth factor (PLGF) 등의 단백질이 중간엽줄기세포에서 분비된다고 보고되었고[13] 이러한 분비된 단백질은 세포 증식, 이동, 혈관 성숙 등을 통해 신혈관 생성(angiogenesis)을 유발한다는 연구[11]도 발표되었다.

본 연구에서는 중증하지허혈의 환자를 유사하게 모사할 수 있는 (FeCl₃ 처리를 통한) 혈전 유발 중증하지허혈 질환 모델을 제작한 후 골수유래 중간엽줄기세포를 투여하여 치료 효율 및 혈관 생성능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 골수유래 중간엽줄기세포 특성 확인

본 실험에 사용된 사람 골수유래 중간엽줄기세포(BD-MS-C)는 파미셀(Seongnam, Korea)에서 구매하였으며 줄기세포의 특성을 확인하기 위하여 각각 분화 실험과 유세포 분석을 진행하였다.

1) 골세포 분화

삼십만 개의 줄기세포를 6 well plate(Nunc, United State)에 넣어 배양하며 골세포 분화 배지[high glucose DMEM containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Rockville, USA), 0.1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 10 mM β -glycerol phosphate (Sigma-Aldrich), and 50 μ M L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich)]로 교환하여 3주간 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 분화 후 골세포 확인을 위하여 alkaline phosphatase 염색을 시행하였다. 우선 세포를 phosphate buffer saline (PBS)를 이용하여 3회 씻어 준 후 cold methanol로 고정된 뒤 BCIP/NBT liquid substrate (Sigma-Aldrich)로 상온에서 10분간 두어 염색하고 다음 3회 PBS로 씻어 준 후 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

2) 지방세포 분화

골세포 분화 실험과 동일한 조건의 세포에서 지방세포 분화 배지[high glucose DMEM containing 10% fetal bovine serum, 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich), 100 mM indomethacin (Sigma-Aldrich), and 0.5 mM methyl-isobutylxanthine (Sigma-Aldrich)로 72시간 배양한 뒤 지방세포 유지 배지로 24시간 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 본 배양 방법을 총 3회 반복 시행한 후 Oil Red O (Sigma-Aldrich) 시약을 분화된 지방세포에 45분간 상온에서 두어 염색을 한 후 광학현미경(Olympus)으로 관찰하였다.

3) 유세포 분석

본 실험에 사용된 항체(Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)는 모두 fluorescein isothiocyanate (FITC)이 삽입되어 있으며 20만 개의 줄기세포를 0.2 mL PBS에 섞어 준 다음 각각의 항체들과 상온에서 20분간 반응시킨다. 그 다음 PBS로 3회 씻어 준 다음 flow cytometry (Beckman Coulter, Miami, USA)로 형광 강도를 측정하였다.

2. Wound migration assay

사람 제대정맥내피세포(HUVEC)가 줄기세포의 주변분

비효능(paracrine effect)에 의해 이동하는 것을 알아보기 위하여 줄기세포를 이틀간 배양했던 배지를 이용하여 migration assay를 시행하였다. 4 well plate (Thermo Scientific, Hudson, USA)에 1% gelatin으로 coating한 후 10만 개의 HUVEC을 각각의 well에 넣어 세포들이 well을 가득 채우도록 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였으며 부착된 세포들을 멸균된 1 mL pipette tip으로 선을 그어 plate의 가운데 부분에 빈 공간이 생기도록 한 후 떨어져 나간 세포들을 제거하기 위하여 PBS로 3회 세척하였다. 대조군에는 300 µL PBS를 넣고 실험군에는 동량의 줄기세포 배양액을 넣어 준 후 11시간 더 배양하였다. 위상차현미경(Olympus)의 100배 렌즈를 이용하여 세포의 이동을 관찰하였으며 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구한 뒤 대조군과 비교하였다.

3. Matrigel tube formation assay

온도에 민감한 Growth Factor Reduced Matrigel (Becton Dickinson)을 4 well plate (Nunc)에 넣기 전 pipette tip을 냉장고에 넣어 차갑게 준비하였다. 각 well당 300 µL씩 넣어준 다음 37°C, CO₂ incubator에서 35분 정도 굳혔으며 굳은 Matrigel에 10만 개의 HUVEC과 대조군에는 200 µL PBS를, 실험군에는 동량의 줄기세포 배양 배지를 함께 넣어 37°C, CO₂ incubator에서 18시간 배양하며 혈관 형성 정도를 비교하였다. 실험 결과는 앞서 실험에서 사용한 것과 동일한 위상차 현미경의 100배 렌즈를 이용하여 촬영하였으며 형성된 전체 tube의 길이는 wimasis image analysis를 통하여 분석한 후 평균값과 표준편차를 구하였다.

4. 흰쥐에서의 중증하지허혈 모델 제작

7주된 Balb/c 수컷흰쥐(Orient bio, Seongnam, Korea)를 1주일간 순응시킨 다음 실험에 사용하였다. 흰쥐는 25 mg/kg 졸레틸 50 (Virbac Laboratories, Carros, France)과 5 mg/kg 럽폰(Bayer, Leverkusen, Germany) 섞어 복강 내 주사로 주사하여 마취하였으며 실험 동물 간의 차이를 줄이기 위하여 모든 절차는 heating pad 위에서 진행하였다. 양와위 자세(supine position)로 눕힌 흰쥐의 왼쪽 넓적다리 부위에 소독용 에탄올을 문혀 소독 후, 약 2 cm로 피부를 절개한 후 넓다리동맥(femoral artery)을 노출시켰다. 3차 증류수로 희석한 10% ferric chloride (FeCl₃, Sigma-Aldrich)를 2 mm² 크기의 3M paper (Bio-rad, Richmond, USA)에 적신 후 넓다리동맥에 3분간 노출시켰으며 Paper를 제거한 후 비교군(saline)과 실험군(BDMSC)에 각각 80 µL의 멸균 생리식염수와 80 µL에 10만 개의 줄기세포를 1 cc

Hamilton 주사기에 담아 넓다리동맥의 주행 방향대로 4군데로 나누어 근육에 천천히 주사하였다. 주사가 끝난 뒤에는 세포가 새어 나오지 않도록 주의하였다. 절개한 피부를 5-0 prolene (Johnson & Johnson, Switzerland)으로 봉합 후 포비돈으로 상처 부위를 소독한 뒤 마무리하였다. 본 동물 실험은 국제 실험 동물 관리 평가 인증 협회(AAALAC international)의 인증을 받은 가천대학교 이길여 암당뇨연구원 실험동물센터(LCDI-2013-0002)에서 진행되었다.

5. In vivo imaging systems (IVIS)

십만 개의 줄기세포를 vivo track 680 시약(Perkin Elmer, Norwal, USA)과 섞은 후 15분간 암실의 상온에서 처리한 뒤 PBS 이용하여 씻어 주었다. 준비된 줄기세포를 넓다리동맥의 주행을 따라 근육에 주입한 뒤 각각 3일과 7일에 형광 intensity를 in vivo imaging system (Perkin Elmer)을 이용하여 측정하였다.

6. 동결 조직절편 제작

줄기세포 주입 후 28일째 되는 날 흰쥐를 CO₂ gas chamber를 이용하여 희생시킨다. 넓다리동맥 주변의 근육을 절제한 뒤 cold PBS로 충분히 씻어 주고 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich)에 담고 고정시킨다. 조직 내 Crystal 형성을 방지하기 위하여 4°C, 30% sucrose에 24시간 보관 후 OCT compound (Leica, Wetzlar, Germany)에 담고 동결절편을 제작한다. 모든 조직은 10 µm로 절삭 후 -20°C에 보관하였다.

7. 면역형광 염색

흰쥐의 다리근육 동결절편 조직에서 주입한 줄기세포의 생존률을 확인하기 위하여 사람 유래 세포 마커인 anti-human nuclei (Hu-Nu)를 사용하였고 혈관 형성 정도를 비교하기 위하여 anti-Von Willebrand factor (vWF; Dako, Carpinteria, USA) 항체를 이용한 면역형광염색을 시행하였다. 조직 내 비특이적 항원-항체반응을 줄이기 위하여, 3% normal goat serum을 처리 후 상온에서 1시간 두었고 항체는 4°C에서 24시간 처리하였다. 조직은 PBS를 이용하여 씻어준 후 세포 내 핵 염색을 위하여 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich)를 상온에서 5분간 처리 후 공초점현미경 (LSM 710; Zeiss, Jena, Germany)으로 촬영 후 Zen 2009 software (Zeiss)로 분석하였다.

8. 다리의 허혈 상태 확인

중증하지허혈 모델을 제작 후 다리의 허혈 상태를 확인

Table 1. Ischemia scale used for functional test of limb ischemia leg

Score	
0	Auto-amputation > half lower limb
1	Gangrenous tissue > half foot
2	Gangrenous tissue < half foot, with lower limb muscle necrosis
3	Gangrenous tissue < half foot, without lower limb muscle necrosis
4	Pale foot or gait abnormalities
5	Normal

하기 위하여 기존의 연구들에서 많이 사용되고 있는 ischemia scale [14]을 적용하였으며 자세한 내용은 Table 1에 첨부하였다.

9. Hematoxylin and eosin 염색

십 마이크로 미터로 절삭된 동결 조직 절편의 OCT compound를 제거하기 위하여 증류수로 상온에서 5분씩 3번 씻어 준 뒤 100%, 95%, 80% 그리고 70% 에탄올을 순서에 따라 5분씩 담가 두어 함수하고, 흐르는 물로 10분간 수세하였다. 남아 있는 에탄올을 제거한 후 염색을 시행하였으며 세포핵은 mayer's hematoxylin (DAKO)을 1분간 상온에 두어 염색하였으며 근육조직의 세포질을 95% 에탄올로 희석된 eosin Y (Sigma-Aldrich)를 30초간 상온에서 처리하여 염색하였다. 남아 있는 eosin Y 시약을 흐르는 물에 1분간 담가 제거하고 70%, 80%, 95%, 100% 에탄올에 각 단계당 1분간 담가 탈수를 진행하였다. 염색성의 투명도를 높이기 위하여 100% xylene (Duksan, Ansan, Korea)에 5분간 상온에서 처리한 후 조직의 탈색 방지와 손상을 막고 현미경 관찰 시 굴절율을 향상시키기 위하여 xylene based DPX (Sigma-Aldrich)를 발라 봉입한 후 다음 깨끗한 cover glass로 덮어 주었다.

10. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 염색

BD-MSC 주입 후 세포자멸사(apoptosis)로 진행되는 세포의 수의 변화를 확인하기 위하여 TUNEL assay kit (Sigma-Aldrich)을 이용하였다. PBS로 씻은 조직 슬라이드를 준비한 뒤 제조사에서 제공하는 프로토콜에 따라 염색을 진행하였다. 핵(Nuclei) 염색을 위하여 DAPI (Sigma-Aldrich)를 상온에서 처리 후 공초점현미경 (LSM 710)을 이용하여 촬영 후 Image J software (NIH)로 염색된 세포의 개수를 센 후 분석하였다.

11. Masson's trichrome 염색

근육조직의 섬유화(fibrosis) 정도를 확인하기 위하여 masson's trichrome (Sigma-Aldrich) 염색을 시행하였다. 염색을 시행하기 전 100%, 95%, 80% 그리고 70% 에탄올을 순서에 따라 처리하여 함수를 진행하고 Bouin 용액에 1시간 실온에 둔 후 조직의 노란색이 빠질 때까지 수세시켰다. 조직을 weigert's iron hematoxylin 용액에 5분간 담가 세포의 핵을 염색 후 흐르는 물에 5분간 세척하고 Biebrich scarlet-acid fuchsin에 5분간 담가 세포질을 염색하였다. 섬유질을 푸른색으로 염색하기 위하여 조직을 phosphotungstic/phosphomolybdic acid 용액에 5분간 상온에서 반응 후 aniline blue 용액에 5분간 두어 반응시킨 뒤 조직을 농도를 달리한 에탄올을 이용하여 탈수 후 xylene과 xylene based DPX (Sigma-Aldrich) 처리하여 봉입하였다.

12. 통계 분석

본 연구에서 얻은 데이터는 적은 샘플 수로 인하여 비모수 검정 (Non-parametric statistics), Mann-Whitney 방법으로 통계 분석을 실시하였으며 p값이 0.05 이하인 경우만 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 사람 골수유래 중간엽줄기세포 분리 및 *in vitro* 혈관 형성 능력 평가

정상인의 골수에서 분리한 중간엽줄기세포가 다른 세포의 혼입이 없었는지 관찰하기 위하여 중간엽줄기세포의 음성표지자로 알려진 CD45, CD14 표면항원을 이용하여 유세포 분석을 실시하였다. 분리한 골수 유래 중간엽줄기세포(BD-MSC)에서 CD45는 78%, CD14에서는 75%로 음성의 결과가 나왔다(Fig. 1A). 또한 줄기세포가 각기 다른 조직세포로 다양하게 분화되는지를 확인한 결과 골세포와 지방세포로 분화되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B).

분리한 줄기세포의 주변분비효능을 통한 신혈관 형성(angiogenesis)을 평가하기 위하여 matrigel tube formation과 wound migration 분석을 시행하였다. HUVEC은 PBS를 처리한 세포군보다 줄기세포 배양 배지 처리하였을 때 모세혈관 모양 구조가 잘 형성되었고(Fig. 1C), 세포의 이동능력이 약 9.3배 증가되었다(Fig. 1D).

2. 생체 내 줄기세포 분포 시험

사람 골수유래 중간엽줄기세포의 흰쥐의 근육 내 분포

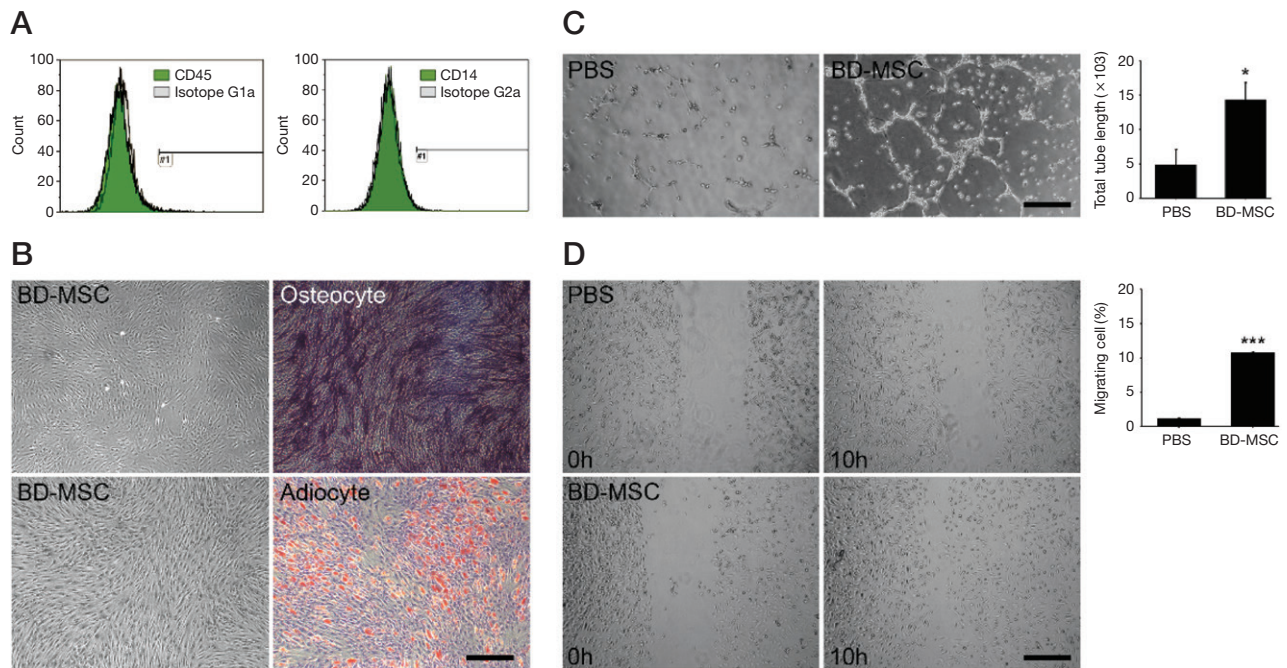


Fig. 1. Characterization of Bone marrow derived mesenchymal stem cell and validation of angiogenesis *in vitro*. A. Flow cytometry analysis showed BD-MSC of negative stem cell markers such as CD45 and CD14 expression. B. BD-MSC of left panel differentiated to osteocytes (right, top) and adipocytes (right, bottom) respectively and the differentiated cells stained with alkaline phosphatase and Oil red O respectively. Magnification = $\times 40$. C. HUVEC showed tube formation in growth factor reduced Matrigel assay after PBS treated (PBS) or BD-MSC incubated medium (BD-MSC). Magnification = $\times 40$. D. HUVEC showed wound migration assay after PBS treated (PBS) or BD-MSC incubated medium (BD-MSC). Scale bar = 1,000 pixel, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. PBS treated HUVEC. PBS: phosphate buffer saline, BD-MSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cell.

양상을 평가하기 위하여 중증하지허혈 동물 모델의 다리 근육에 생리식염수(saline)를 투여한 대조군과 Vivo track 680을 염색한 10만 개의 줄기세포(BD-MSC)군을 준비하였다. 줄기세포 주입 후 시간이 지남에 따라 vivo track 680의 밝기가 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 또한, Human nuclei (Hu-Nu) 항체를 이용한 면역형광 염색시험 결과도 마찬가지로 주입 후 3일에서 7일로 시간이 갈수록 살아 있는 줄기세포의 수가 감소됨을 확인하였다(Fig. 2B).

3. 동물 모델에서의 줄기세포 혈관 신생능력 평가

골수유래 중간엽줄기세포 투여에 따른 허혈 조직 내 모세혈관(capillaries) 및 소동맥(arterioles) 생성을 확인하기 위하여 중증하지허혈 동물 모델에 줄기세포 투여 4주 후에 부검하여 von Willebrand factor (vWF)를 이용하여 혈관내피세포를 염색하여 관찰하였다(Fig. 2A). 줄기세포를 투여한 군은 생리식염수(saline)를 투여한 대조군보다 $10 \mu\text{m}$ 이하의 모세혈관의 크기에는 크게 변화가 없었으나, $20 \mu\text{m}$ 이상의 소동맥의 수가 약 4배 증가하였다(Fig. 2B).

4. 골수유래 중간엽줄기세포의 육안 평가 및 조직학적 검증

중증하지허혈 모델 제작 4주 후 육안으로 관찰한 결과, 생리식염수(saline)를 투여한 군에서는 완전한 사지탈락이 75%, 부분적 사지 탈락이 15%로 관찰되었으나, 줄기세포를 투여한 군에서는 완전한 사지탈락, 부분적 사지탈락이 없었으며, 발가락괴사 33%, 회복된 개체가 66%로 허혈 평가 점수가 약 14.6배 증가하였다(Fig. 4A).

다리근육의 모양 변화와 세포자멸사(apoptosis) 확인을 위하여 Hematoxylin and eosin (H&E)와 TUNEL 시험을 진행하였다. 대조군인 생리식염수를 투여한 군에서는 손상 받은 골격근 세포에서 나타나는 특징인 둥근 모양과 중앙핵(central nuclei)의 모습을 보이는 근육이 나타났으나 줄기세포를 투여한 군에서는 정상 모양의 근육이 관찰되었다(Fig. 4B). 또한, 세포 자멸사로 진행되는 세포의 수도 줄기세포를 투여한 군에서는 4.17배 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 4C).

섬유화(fibrosis)의 변화를 확인하기 위해 조직 표본에서 Masson's trichrome (MT) 염색을 실시하였다. 대조군인 생

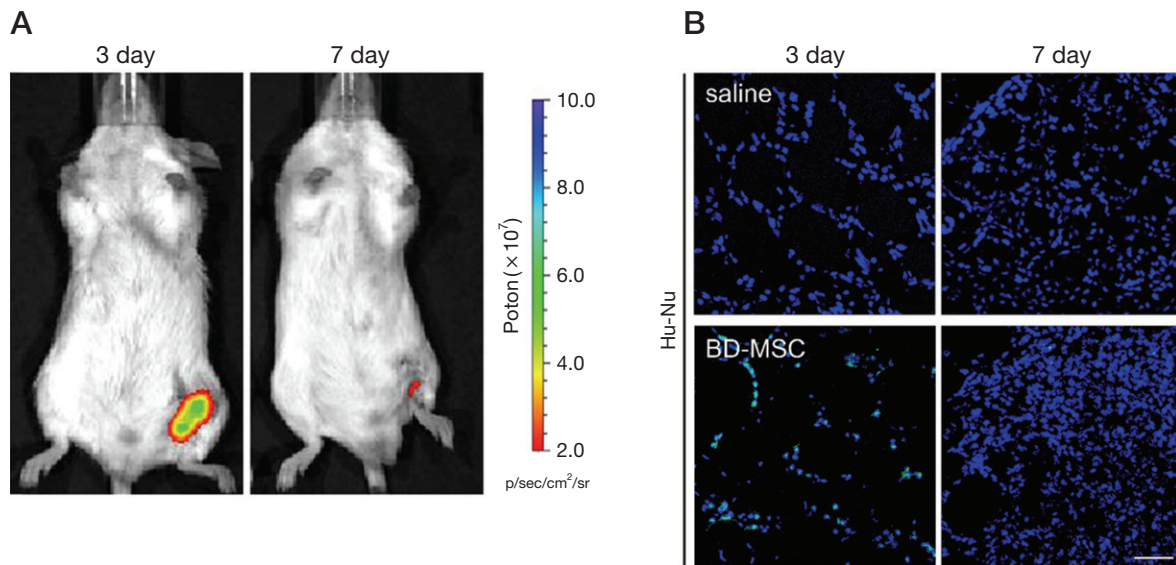


Fig. 2. Validation of injected BD-MSC survival to FeCl_3 treated mouse model. A. In vivo images showed expression of injected BD-MSC in FeCl_3 treated mouse leg (BD-MSC) after 3 and 7 days. B. Confocal microscopy images showed Hu-Nu intensity of saline injected (saline) or BD-MSC injected (BD-MSC) in FeCl_3 treated mouse model after 3 and 7 days (green: Hu-Nu, blue: DAPI (nucleus)). Scale bar = 50 μm , Hu-Nu: human nuclei, BD-MSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cell.

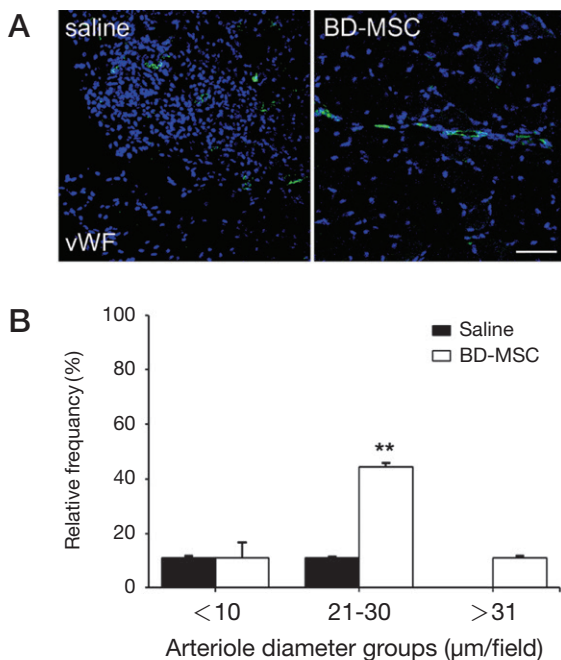


Fig. 3. Validation of angiogenesis in FeCl_3 treated mouse model. A. Confocal microscopy images showed vWF (endothelial cells) intensity of saline injected (saline) or BD-MSC injected (BD-MSC) in FeCl_3 treated mouse model (green: vWF, blue: DAPI (nucleus)). Scale bar = 50 μm . B. Density for each group of blood vessels: under 10, 10-20, 20-30 and above 31 $\mu\text{m}/\text{field}$ was obtained from vWF stained slides and measured by Zen software. ** $P < 0.01$ vs. saline treated mice. BD-MSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cell, vWF: von Willebrand factor.

리식염수를 투여한 군에서는 섬유화가 진행되어 푸른색으로 염색된 섬유(fiber)가 많이 관찰되었으나 줄기세포를 투여한 군에서 섬유화가 약 15.10배 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D).

고 찰

중증하지허혈을 유발하기 위하여 동물 모델은 크게 하지 동맥을 묶는 방법과 Ferric chloride (FeCl_3)에 노출하는 두 가지 방법이 있다. Tie occlusion법 [14]으로 이미 많은 중증하지허혈 연구에서 사용되고 있다. Tie occlusion법은 혈관을 물리적으로 묶어 짧은 시간 내에 혈류의 흐름을 차단하여 조직 내 허혈을 유발하고 염증 관련 인자들의 증가에 따른 조직 변화를 관찰할 수 있으나 혈전을 관찰할 수 없다. 반면 Ferric chloride (FeCl_3) 처리법은 혈관에 노출되면 산화 스트레스를 유발하여 혈관의 손상을 유발하여 혈소판의 점착, 활성화되어 혈액 응고속도가 빨라져 급속한 혈전 생성을 일으키는 방법 [15,16]으로 항혈소판, 항응고제 관련 연구에 많이 사용되고 있다 [17]. 본 연구에서는 임상적용을 위한 줄기세포치료제 개발을 위해 혈전 형성을 통해 서서히 넓다리 혈관 내에 허혈이 진행되는 것을 모사한 FeCl_3 처리법을 적용한 중증하지허혈 모델을 제작한 후 사람 골수에서 분리 배양한 중간엽줄기세포의 치료 효능

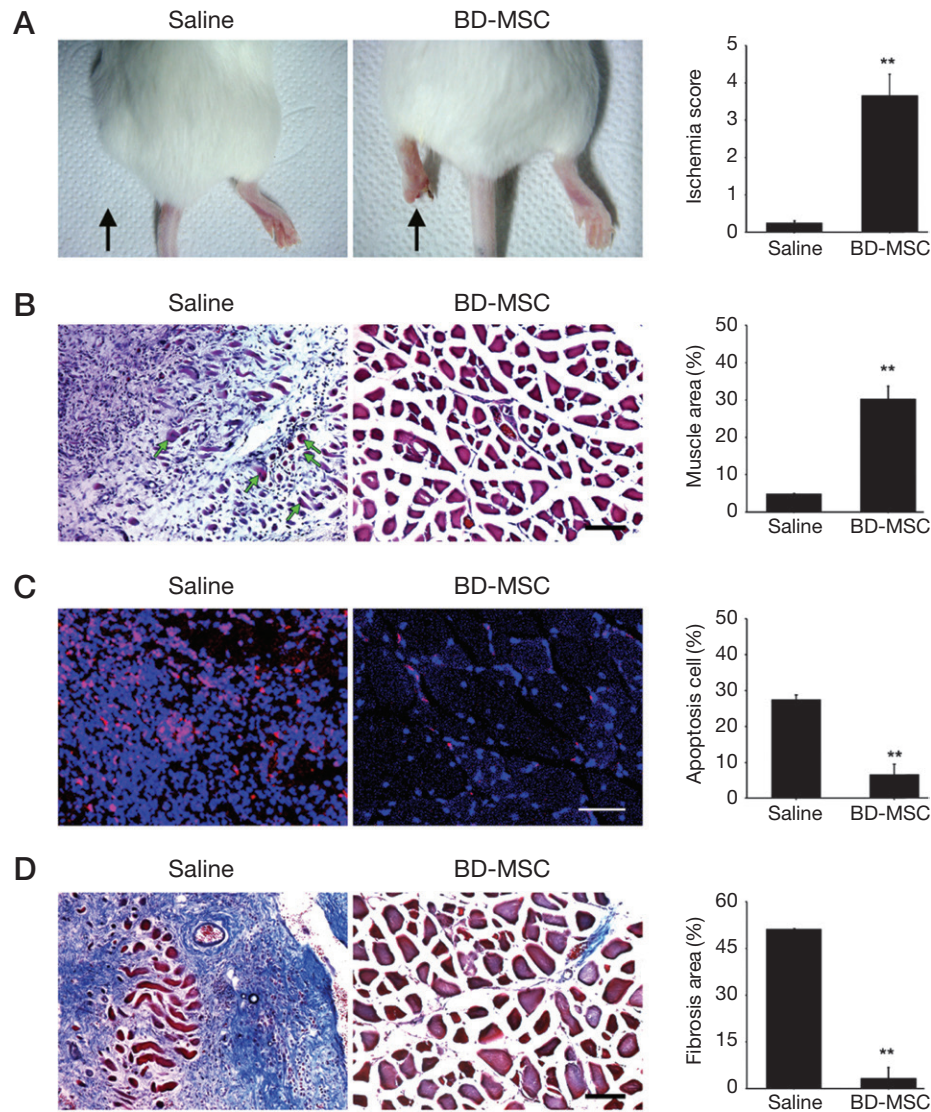


Fig. 4. Validation of BD-MSC protection from FeCl_3 induced damage. A. left side of leg appearance showed skin color and limb condition of saline injected (saline) or BD-MSC injected (BD-MSC) in FeCl_3 treated mouse model (arrow) and graph indicated improved functional outcomes in BD-MSC injected group. B. Central nucleus of damaged skeletal muscles was indicated (green arrow) and confirmed by Hematoxylin and Eosin staining. C. Confocal fluorescence analysis showed apoptosis cell (red) in FeCl_3 treated mouse model. D. Fibrous (blue) was validated by Masson's trichrome in FeCl_3 induced muscle. Scale bar=100 μm , * $P < 0.01$ vs. saline treated mice.

을 평가하였다.

골수에서 직접 분리배양한 중간엽줄기세포는 다른 세포들과 혼합 배양되는 경우가 많기 때문에 CD45, CD14 등 음성 표지자 분석[18]을 통하여 순도 확인을 해야 하며, 줄기세포로서 골세포, 지방세포 등 다양한 세포로 분화능[19]이 있는지 확인하고 사용해야 한다. 본 연구에 사용된 골수유래 중간엽줄기세포는 음성표지자에 음성으로 검출되었고, 골세포, 지방세포로 분화되는 것을 확인하였다.

중간엽줄기세포의 신생혈관 생성에 대한 효능은 허혈성 질환인 심근경색[20]과 허혈성 뇌졸중[21]에서의 효과가

보고된 바가 있다. 본 연구에서 또 다른 허혈성 질환인 중증하지허혈 모델에서 신생혈관 형성 능력을 평가하였다. *in vitro*에서 혈관내피세포의 이동(migration assay)과 튜브 생성(matrigel tube formation assay) 실험을 통해 확인하였고 중증하지허혈 동물 모델에서도 말초혈관의 수가 대조군에 비해 유의미하게 증가됨을 보여준다. 또한 중간엽줄기세포를 주입한 흰쥐는 대조군(saline)에 비하여 소동맥의 개수가 크게 증가함으로써 골수유래 중간엽줄기세포는 소동맥 형성에 기여함을 확인하였다.

주입한 줄기세포의 생착능을 확인해 본 결과, 주입 후 3

일째에는 주입한 세포들이 *In vivo* image 시험과 면역형광 염색 시험(Hu-Nu)에서 확인되었으나, 7일째에는 확인되지 않았다(Fig. 2). 이는 정상 조직에 주입해 준 줄기세포가 최대 3주간 생존하였다는 이전 연구[22]와 맥락은 같아한다. 그럼에도 불구하고 중증하지허혈 모델의 허혈성 정도를 확인하는 육안 기준[14]에 따라 평가하였을 때, 중간엽 줄기세포 주입 28일 후 다리 절단 및 과사가 호전되었을 뿐만 아니라 다리근육 조직의 섬유화 정도, 다리근육의 변화를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 주입한 줄기세포는 생착되어 있을 때 주변분비효과(paracrine effects)를 통하여 혈관 형성, 섬유화 억제 등에 효과가 있어 사지 절단률을 줄이는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007; 45 Suppl S:S5-67.
- Weitz JI, Byrne J, Clagett GP, Farkouh ME, Porter JM, Sackett DL, et al. Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: a critical review. *Circulation*. 1996; 94:3026-49.
- Lee HS. How safe is the readministration of streptokinase? *Drug Saf*. 1995; 13:76-80.
- Burggraf D, Vosko MR, Schubert M, Stassen JM, Hamann GF. Different therapy options protecting microvasculature after experimental cerebral ischaemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2010; 103:891-900.
- Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*. 2005; 115:3355-62.
- Söder HK, Manninen HI, Jaakkola P, Matsi PJ, Räsänen HT, Kaukanen E, et al. Prospective trial of infrapopliteal artery balloon angioplasty for critical limb ischemia: angiographic and clinical results. *J Vasc Interv Radiol*. 2000; 11: 1021-31.
- Nasr MK, McCarthy RJ, Hardman J, Chalmers A, Horrocks M. The increasing role of percutaneous transluminal angioplasty in the primary management of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002; 23:398-403.
- Silvestre JS, Lévy BI. Angiogenesis therapy in ischemic disease. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2002; 95:189-96.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; 321:1174-78.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:4279-95.
- Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008; 103:1204-19.
- Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*. 2010; 316:2213-19.
- Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*. 2008; 3:e1886.
- Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP, et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc*. 2009; 4:1737-46.
- Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990; 60:269-80.
- Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest* 2000; 106:385-92.
- Surin WR, Prakash P, Barthwal MK, Dikshit M. Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010; 61:287-91.
- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001; 86:1099-100.
- Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF, et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000; 275:9645-52.
- Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, et al. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009; 27:230-7.
- van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res*. 2012; 71:474-81.
- Ramot Y, Meiron M, Toren A, Steiner M, Nyska A. Safety and bio distribution profile of placental-derived mesenchymal stromal cells (PLX-PAD) following intramuscular delivery. *Toxicol Pathol*. 2009; 37:606-16.

The Study of BD-MSCTherapy against Critical Limb Ischemia

Myeongjoo Son¹, Woong Chol Kang², Kyunghee Byun¹

¹Department of Anatomy & Cell Biology, School of Medicine, Gachon University

²Department of Cardiology, Gil Hospital, Gachon University, Gil Medical Center

Abstract : Critical limb ischemia (CLI) is the most severe peripheral artery disease and caused by thrombus formation in blood vessel. The current strategies for treating CLI does not protect limb amputation and reduction in the risk of mortality. Recently, human bone marrow derived mesenchymal stem cells (BD-MSCT) were reported to have a paracrine effects on angiogenesis in several ischemic diseases. So, we validate to determine whether BD-MSCT protect against ferric chloride treated CLI and induce angiogenesis.

To characterized human bone marrow derived stem cell, BD-MSCT differentiated to osteocytes and adipocytes and validated stemness using flow cytometry. Endothelial cell induced angiogenesis followed by mesenchymal stem cell cultured medium treatment in HUVEC *in vitro*. We also mimicked CLI patients condition using FeCl₃ treated CLI mouse and injected one hundred thousand of BD-MSCT along the femoral artery to leg muscle. We validated stem cell survival, blood vessel formation, leg muscle condition and fibrosis compared by saline injected mice 28 days later.

In this study, BD-MSCT cultured medium treatment increased migration and tube formation of HUVEC and BD-MSCT injection had an effective blood vessel formation in FeCl₃ treated CLI. As well as blood vessel formation, limb salvage rate also improved and fibrosis area statistically decreased in BD-MSCT injected mice.

In conclusion, bone marrow derived mesenchymal stem cell improved not only blood vessel formation but also reduction of fibrosis in FeCl₃ treated CLI mice and finally protected limb amputation.

Keywords : Critical limb ischemia, Bone marrow derived mesenchymal stem cells, Angiogenesis