

# 흰쥐에서 요실금의 주사요법제로서 근육유래 줄기세포/키토산/수산화아파타이트 복합겔의 효과

## Effects of Injection Therapy using Muscle Derived Stem Cell/ Chitosan/ Hydroapatite Composite Gel in a Rat Model of Urinary Incontinence

Gwoan Youb Choo, Ji Youl Lee<sup>1</sup>, Won Hee Park, Yong Sik Jung<sup>2</sup>

From the Department of Urology, Inha University College of Medicine, Incheon, <sup>1</sup>The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, <sup>2</sup>Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea

**Purpose:** We investigated whether periurethral injections of muscle-derived stem cells (MDSC) and chitosan/hydroapatite after denervation of rat's pudendal nerve could increase the leak point pressure over a long time period in a rat model of urinary incontinence.

**Materials and Methods:** Muscle-derived stem cells isolated from the gastrocnemius muscle of normal female rats were purified to obtain a myogenic population by using the preplate technique. The N group was the normal female rats, the D Group was the pudendal nerve transected group and the M Group was the MDSC/chitosan/hydroapatite composite gel injected group after pudendal nerve transection. The MDSC/chitosan/hydroapatite composite gel was injected into the proximal periurethral area. At 2 and 4 weeks, visually identified leak point pressure measurement was done with using the vertical tilt/intravesical pressure clamp model of urinary incontinence. The rats were then sacrificed and the periurethral tissues harvested for histological examination.

**Results:** The leak point pressure was significantly lower in the D group at each time compared with the N group, and the leak point pressure in the N and M groups were significantly higher than those in the D group at both 2 and 4 weeks. The persistence of MDSC over the period of study was verified by histological examination.

**Conclusions:** MDSC/chitosan/hydroapatite injection into the denervated external urethral sphincter in female rats increased the leak point pressure at 2 and 4 weeks. This MDSC/chitosan/hydroapatite composite gel can be an alternative injection method for treating urinary incontinence in the future. (Korean J Urol 2007;48:627-632)

**Key Words:** Muscle, Stem cells, Urinary incontinence, Rats

대한비뇨기과학회지  
제 48 권 제 6 호 2007

인하대학교 의과대학  
비뇨기과학교실,  
<sup>1</sup>가톨릭대학교 의과대학  
비뇨기과학교실,  
<sup>2</sup>전북대학교 의과대학  
비뇨기과학교실

추관엽 · 이지열<sup>1</sup> · 박원희 · 정용식<sup>2</sup>

접수일자 : 2007년 3월 14일  
채택일자 : 2007년 4월 29일

교신저자: 박원희  
인하대학교 의과대학  
비뇨기과학교실  
인천광역시 중구 신흥동 3가  
7-206  
☎ 402-751  
TEL: 032-890-3563  
FAX: 032-890-2363  
E-mail: drwonhee@inha.ac.kr

### 서 론

과거에 요실금 환자를 치료하기 위한 주사요법은 고가 물질이어서 환자에게 용이하게 쓰일 수 없을 뿐만 아니라, 장기 성공률이 50-60% 밖에 되지 않아 재주사가 요구되는 등 많은 문제점을 가지고 있었다.<sup>1,2</sup>

근육유래 줄기세포 (muscle-derived stem cells; MDSC)는

자신의 근육조직 생검만으로 쉽게 얻을 수 있고, 상호 접촉 시 바로 근육세포로 분화하여 과성장되는 일이 없어, 성장을 조절하기가 쉬우므로 세포 이식 및 조직 재생에 용이하게 사용된다. 또한, 각종 바이러스를 이용하여 쉽게 유전자나 성장인자 등을 근육줄기세포에 쉽게 형질전환을시킬 수 있다.<sup>3-5</sup>

키토산은 생체적합성과 세포친화력이 있어 세포의 생존율을 높이며, 수산화아파타이트는 성장인자 등을 잘 부착

시키고 오랜 시간 동안 방출하는 능력이 있다. 그러므로 이러한 생체고분자와 근육유래 줄기세포를 혼합하여 주사하면 줄기세포의 생존율을 증가시킬 수 있으며, 향후 혈관내피성장인자, 신경성장인자 등을 수산화아파타이트에 부착시켜 주사한다면 세포의 성장과 분화에 맞는 생체환경을 조성할 수 있다.

본 연구에서는 근육유래 줄기세포와 생체적합성과 세포친화성을 갖는 고분자를 접목하여, 근육유래 줄기세포의 장기간 생존율을 높이는 복합 생체재료(겔형)를 개발하고, 이를 이용하여 요실금 치료용 주사치료제를 만들어 효과를 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 근육유래 줄기세포 분리

흰쥐의 가자미근에서 생검한 조직을 잘게 썰어 3가지 효소(collagenase XI, dispase와 trypsin)를 처리해 근육세포를 분리하였다. 이를 콜라젠을 코팅한 플라스크(Nalge Nunc International, Rochester, USA)에 시간간격과 플라스크에서의 세포의 부착 정도에 따라 다시 분리하여, CD34(+), CD45(-)와 desmin(+)-인 근육유래 줄기 세포를 동정하였다.<sup>6</sup> 근육유래 줄기세포는 배양 시 배지에 PKH26(Sigma, Saint Louis, USA)을 첨가하여 요도 주위에 주입된 근육유래 줄기세포는 빨간 형광색을 발현하도록 하였다.

### 2. 키토산/수산화아파타이트 복합겔 제조

100mM의 초산 용액으로 키토산 10g을 용해시켜 제조한 2% (w/w) 키토산 용액을 60mM의 인산 용액과 혼합하였다. 이렇게 얻어진 키토산/인산 혼합액을 100mM의 Ca(OH)<sub>2</sub> 현탁액에 피펫을 사용하여 3.2ml/min의 속도로 적하시켰다. 이때 기계적 교반기를 사용하여 pH 9±0.2가 될 때까지 교반 속도는 800rpm 이상의 고속으로 지속적으로 교반하며, 반응 온도는 25°C를 유지시켰다. 키토산과 수산화아파타이트의 중량비가 50:50인 키토산/수산화아파타이트 복합체를 물에 충분히 수세하고 난 후, 원심분리기로 탈수하여 여분의 물을 제거하여 키토산/수산화아파타이트 겔을 제조하였다.

### 3. 실험군 및 수술방법

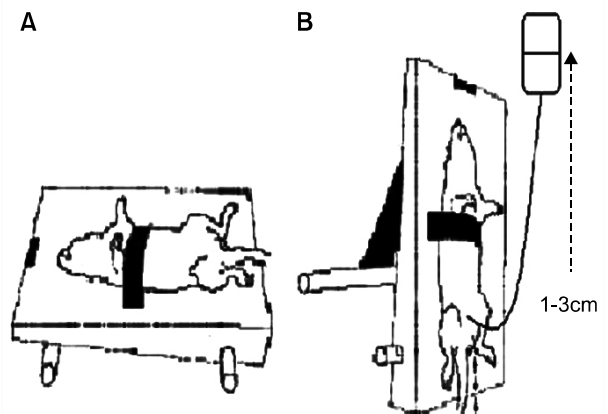
**1) 실험군:** Sprague-Dawley 암컷 쥐를 사용하였으며, 실험은 정상군(N군, n=10), 음부신경 절단군(D군, n=10) 및 음부신경 절단 후 근육유래 줄기세포/키토산/수산화아파타이트복합겔을 사용한 군(M군, n=10) 등 3군으로 나누어 시행되었다. 각각의 군은 다시 2주군(n=5)과 4주군(n=5)으로 나

누었다.

**2) 수술방법:** Ketamine을 근육주사(50mg/kg)하여 마취를 유도한 후 양측 음부 신경을 2cm 절단하여 신경절단으로 유발된 요실금 모델 쥐를 만들었다. 실험쥐의 하복부에 정중 절개를 가하여 요도를 노출시킨 후에 PKH와 함께 배양된 근육유래 줄기세포를 키토산/수산화아파타이트 복합겔과 혼합하였고, 근육유래 줄기세포가 약 105개 포함되어 있는 복합겔 50μl를 요도 주위 조직에 주사하였다.

### 4. 근육유래 줄기세포/키토산/수산화아파타이트 복합겔 주사 후 효과 확인

**1) 요누출압의 측정:** 상부신경에 따른 방광 수축 효과를 억제하기 위하여 실험쥐를 ketamine 50mg/kg의 용량으로 마취한 후 흉추 10번에서 척수를 절단하였다. 실험쥐의 하복부에 정중 절개를 시행하여 결장의 배설물 제거하고 방광을 노출시킨 후 Tube (PE-90)를 방광을 통해 삽입하였다. Tube가 안전하게 삽입된 것을 확인한 후 복부를 봉합하고 Tube에 식염수를 연결하였다. 실험쥐를 테이블에 붙이고 수직으로 위치를 고정시키고 3-4시간 후 방광에 연결된 식염수의 높이를 1-3cm씩 올리면서 요도를 통하여 요가 흘러나오는 시점의 방광 내압을 요누출압(leak point pressure; LPP)으로 정의하였으며, 실험 2주와 4주 후에 요누출압을 poly-graph로 측정하여 요실금 치료효과를 판정하였다(Fig. 1).<sup>5</sup>



**Fig. 1.** Vertical tilt/intravesical pressure clamp model of urinary incontinence. Vertical tilt/intravesical pressure clamp model of urinary incontinence. (A) Acute spinal cord transection at the T9-T10 level was performed with the rat in a supine position and a transvesical catheter with a fire-flared tip (PE-90) was inserted into the dome of the bladder for measuring bladder filling and the pressure. (B) The intravesical pressure varied in 1-3cmH<sub>2</sub>O steps from zero upward until visual identification of the leak point (leak point pressure; LPP).

## 5. 근육유래 줄기세포/키토산/수산화아파타이트 복합겔 주사 후 조직학적 성상 확인

실험 2주와 4주 후에 실험쥐의 하복부를 열어 요도 주위 조직을 채취하였고, 10% 중성 포르말린 용액에 담아 1일간 고정하였다. 고정된 요도 주위 조직의 광학현미경 표본제작을 위하여 알코올로 탈수하여 (+)-Limonene 및 paraffin 포매를 거쳐 4-5 $\mu$ m로 박절하여 hematoxylin-eosin (H&E) 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다. 요도에 주입된 고분자가 포매 시 용해되는 것을 막기 위해 (+)-Limonene을 사용하였다. 자가 근육줄기세포의 형태학적 특성을 규명하기 위해 DAPI (Vector, Burlingame, USA), myosin heavy chain (MyHC, Chemicon, Temecula, USA),  $\alpha$ -SMA (Chemicon, Temecula, USA) 항체를 이용한 면역형광염색을 시행하였으며 방법은 다음과 같다.

염색 시 비특이적 반응을 억제하기 위하여 차단용액 (1.5% normal goat serum, 1.5% normal horse serum, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in phosphate buffered saline; PBS)으로 상온에서 1시간 반응시킨 후, MyHC와  $\alpha$ -SMA 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응시켰다. PBS로 3회 수세한 후, 이차항체인 Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG와 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG를 각각 1:500으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. PBS로 3회 수세한 후, DAPI로 슬라이드를 제작하고 Olympus BX50 형광현미경으로 관찰하여 Olympus DP70 디지털카메라로 이미지를 얻었다.

## 6. 통계적 분석

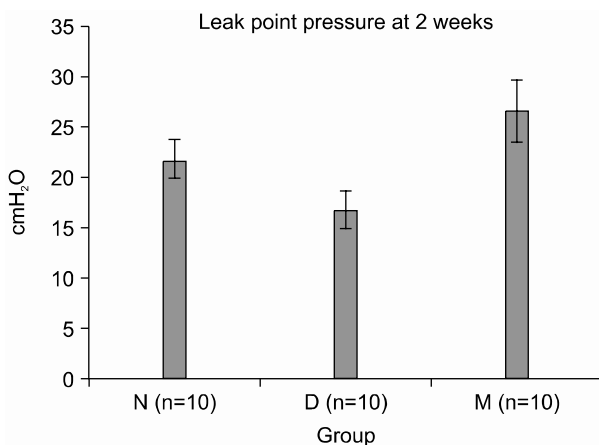
통계는 세 군 간에 평균을 비교하는 통계법으로 One-way ANOVA를 사용하였고 사후검정법으로는 Tukey's method를 사용하였다. 2주군과 4주군 간의 비교는 상기 Wilcoxon rank-sum test를 이용하였고, p값이 0.05 미만일 때 의미 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

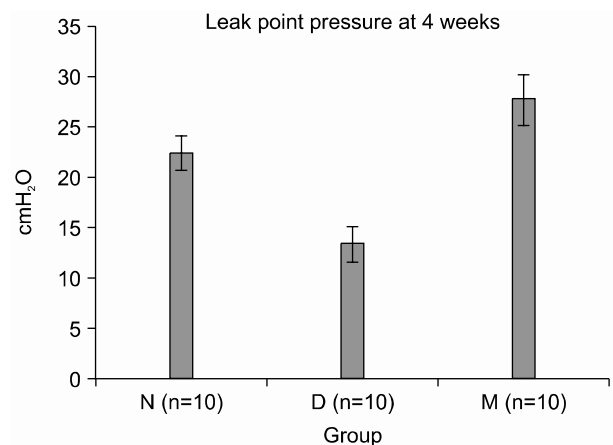
### 1. 요누출압 측정

요도 주위에 근육유래 줄기세포 주입 후 2주에 측정한 요누출압은 N군, D군 및 M군에서 각각  $21.8 \pm 1.5$ ,  $16.8 \pm 1.8$  및  $26.6 \pm 3.3$  cmH<sub>2</sub>O이었다. D군에서 N군에 비하여 요누출압이 통계학적으로 의미있게 감소하였고 ( $p < 0.01$ ), M군은 N군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, D군에 비해서는 유의하게 높게 나타났다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2).

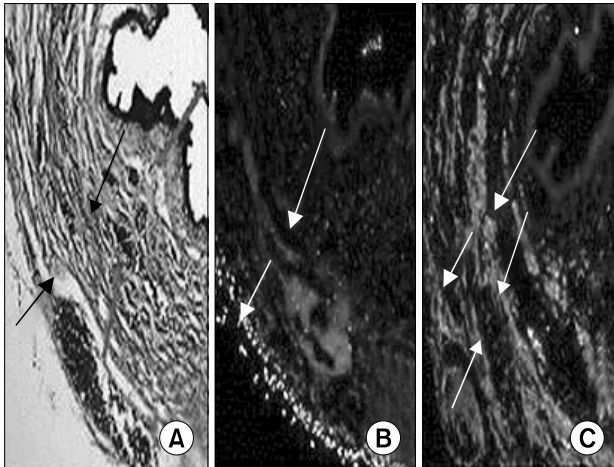
요도 주위에 근육유래 줄기세포 주입 후 4주에 측정한 요누출압은 N군, D군 및 M군에서 각각  $22.2 \pm 1.5$ ,  $13.2 \pm 1.8$  및  $27.6 \pm 2.6$  cmH<sub>2</sub>O이었다. D군에서 N군에 비하여 요누출압이 통계학적으로 의미있게 감소하였고 ( $p < 0.01$ ), M군은 N군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, D군에 비해서는 유의하게 높게 나타났다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3).



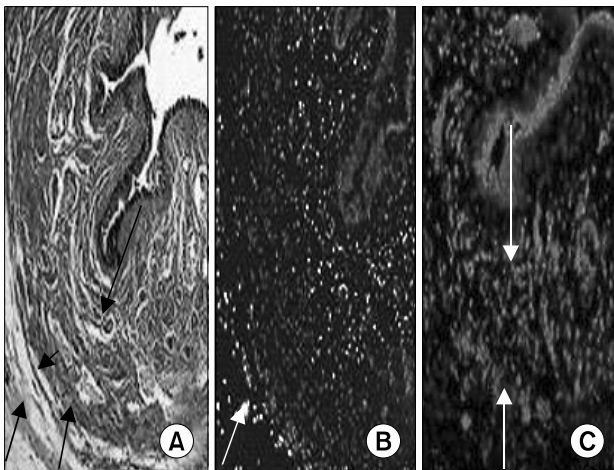
**Fig. 2.** Leak point pressure (LPP) at 2 weeks. The LPP in the D group was significantly lower at 1 month than the LPP at 1 month in the N and M groups. The LPP in the M group was significantly higher than that in the D group at 2 weeks (N: normal group, D: denervated group, M: denervated and muscle stem cell/chitosan/hydroapatite injected group). \*:  $p < 0.01$  compared to N group, †:  $p < 0.01$  compared to D group.



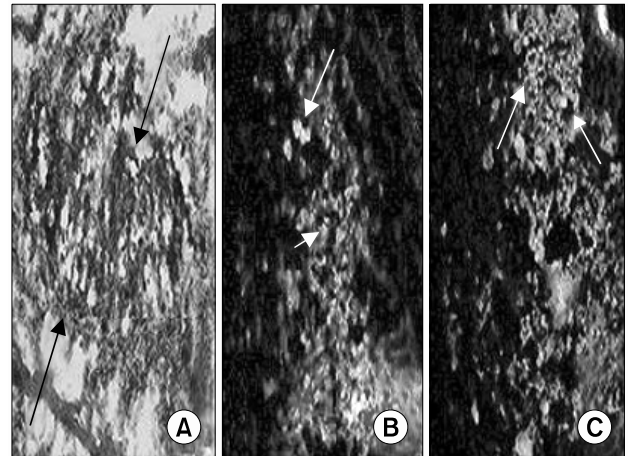
**Fig. 3.** Leak point pressure (LPP) at 4 weeks. The LPP in the D group was significantly lower at 4 weeks than the LPP at 4 weeks in the N and M groups. The LPP in the M group was significantly higher than that in the denervation group at 4 weeks (N: normal group, D: denervated group, M: denervated and muscle stem cell/chitosan/hydroapatite injected group). \*:  $p < 0.01$  compared to N group, †:  $p < 0.01$  compared to D group.



**Fig. 4.** Histology of the normal urethral sphincter of female rat. (A) Hematoxylin/eosin staining at 4 weeks. In the normal female rat urethral sphincter, a layer of striated muscle fibers (black arrow) encircles the smooth muscle fibers (red arrow). (B) MyHC (red) immunostaining of the specimen at 4 weeks post-treatment. In the normal female rat urethral sphincter, the striated muscle (white arrow) shows positive MyHC staining. (C)  $\alpha$ -SMA (green) immunostaining of the specimen at 4 weeks post-treatment. The smooth muscle (red arrow) shows positive  $\alpha$ -SMA staining, and the striated muscle (white arrow) shows blanks (A, B, C: x100).



**Fig. 5.** Histology of the denervated urethral sphincter of female rat. (A) Hematoxylin/eosin staining at 4 weeks. The denervated proximal urethral sphincter also showed atrophic and thin circular striated fibers (black arrow). The smooth muscle is well preserved (red arrow). (B) MyHC immunostaining of specimen at 4 weeks post-treatment. The denervated proximal urethral sphincter, which is striated muscle (red arrow), shows negative MyHC staining. (C)  $\alpha$ -SMA (green) immunostaining of the specimen at 4 weeks post-treatment. The smooth muscle (red arrow) shows positive  $\alpha$ -SMA staining (A, B, C: x100).



**Fig. 6.** Histology of the MDSC/chitosan/hydroapatite injected urethral sphincter of female rat. (A) Hematoxylin/eosin staining at 4 weeks. The MDSC/chitosan/hydroapatite injection area (black arrow) is well preserved. (B) MyHC immunostaining of the specimen at 4 weeks post-treatment. The area where the MDSC was injected area is PKH26 positive (red) and the striated muscle (white arrow) shows positive MyHC staining. (C)  $\alpha$ -SMA immunostaining of the specimen at 4 weeks post-treatment. Muscular bundles (white arrow) are observed to be positive for  $\alpha$ -SMA staining (green) on the periphery of the polymer (A, B, C: x100).

## 2. 조직학적 사진

N군은 hematoxylin-eosin 염색에서 횡문근(MyHC)이 외부에 존재하고 평활근이 내부에 존재하였다(Fig. 4A). MyHC를 이용한 면역형광염색에서 적색으로 발현되는 횡문근이 외부에 위치하였고(Fig. 4B),  $\alpha$ -SMA를 이용한 면역형광염색에서 녹색으로 발현되는 평활근이 내부에 위치하였다(Fig. 4C).

D군에서 요도는 신경절단 후 횡문근의 두께가 줄어든 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 면역형광염색에서도 적색으로 나타나는 MyHC의 발현은 감소하였고(Fig. 5B), 녹색으로 나타나는 평활근( $\alpha$ -SMA)은 잘 발현되었다(Fig. 5C).

M군에서는 hematoxylin-eosin 염색에서 요도 주위에 주입된 근육유래 줄기세포를 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 면역형광염색에서 근육유래 줄기세포를 인지할 수 있도록 이전에 염색한 PKH26(적색)이 발현되는 것을 확인하였고, MyHC(노란색)의 발현이 부분적으로 관찰되었다(Fig. 6B). 같은 위치에서 PKH26(적색)이 발현되는 것을 확인하였고,  $\alpha$ -SMA(노란색)의 발현이 관찰되었다. 이 부분의 세포의 수를 측정된 결과 주입된 근육유래 줄기세포의 약 50%에서 평활근으로 분화되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 6C).

각 군에서 2주와 4주 사이에 조직학적으로 차이는 없었으며, 복합겔 주입 후 주위 부분으로 심한 백혈구의 침윤은

관찰되지 않았다.

## 고 찰

복합성요실금은 방광기능에는 이상이 없이 웃거나 뽀뽀기 등을 할 때 일시적으로 복압이 증가되어 자신도 모르게 소변이 새는 배뇨이상이다. 주 원인은 질식분만 또는 골반 근육이나 신경손상에 의해 골반근육이 이완되어, 방광경부나 요도가 정상보다 아래로 많이 처지게 되는 요도의 과유동성에 의해 정상적인 요도괄약근의 기능이 발휘할 수 없게 되어 요실금이 생긴다. 또 다른 원인으로 내인성요도괄약근기능부전이 있는데, 이는 요도의 위치에 관계없이 요도괄약근의 기능이 저하되어 요실금이 발생하는 것을 말한다. 그러나 요도의 과유동성이 있는 모든 요실금 환자에게 어느 정도의 내인성요도괄약근기능부전이 동반되리라 생각한다.

현재 요실금 환자를 치료하기 위해 요도 및 방광을 지지하기 위한 수술요법과 주사요법이 사용되고 있다. 요도 내 주사요법은 요도 주위 조직 내 부피유지 효과를 나타냄으로써 위축된 점막을 가진 요도내강에 압력을 가하여 요실금의 치료효과를 나타낸다. 요실금 환자에 있어서 요도 내 주사요법은 현재 주된 치료는 아니나 비침습적이고, 간단하게 시술할 수 있어 좋은 재료와 방법이 개발된다면 요실금 제3형 타입인 내인성요도괄약근기능부전 환자의 일차적인 치료로 사용될 수도 있을 것으로 생각한다.

요도주위 이물질 주입술로 1973년 Berg<sup>7</sup>에 의해 polytetrafluoroethylene (PTFE)가 처음 발표한 이래, 콜라겐,<sup>8</sup> 실리콘 분자 (silicone particle),<sup>9</sup> 지방,<sup>10</sup> polymeric microsphere<sup>11</sup> 등 여러가지 물질이 사용되었으며, 현재도 새로운 물질이 개발되고 있다. 하지만 이런 물질의 단기적 성공에도 불구하고 재흡수, 재주사 및 재수술, 알리지 반응, 타부위로의 물질 이동 등으로 인하여 한계가 있었다.<sup>12</sup> 이에 새로운 물질을 이용한 치료법의 개발이 필요하게 되었고, 세포분자 분야의 발전을 바탕으로 성체 줄기세포의 하나인 근육유래 줄기세포를 이용한 요실금 치료 연구가 진행되었다.

근육유래 줄기세포는 아주 빠르게 증식하여 세포 배양 시 많은 양의 세포를 단시간 내에 구할 수 있으며, 바이러스나 기타 벡터 등으로 유전자 형질전이 (transfection)가 용이하다는 특징이 있다. 이식된 장기에서 골격근육섬유로 분화하면 아주 안정적으로 자리를 잡게 되어 세포이식, 장기이식에 적합하고 세포와 세포가 접촉할 때 근육섬유로 분화되어 성장이 멈춤으로써 과분화에 의한 오토파괴나 암세포로 전환되는 걱정이 없다. 또한, 성체 줄기세포는 구하기가 쉽고 배아 줄기세포와는 달리 윤리적인 문제에서 자

유로우며 대부분의 경우 자가치료로 이용되기 때문에 거부반응이 없다는 점에서 배아 줄기세포보다 유리하다.<sup>4</sup>

요실금에서의 세포치료의 효과는 최근 활발히 연구되고 있다. Cannon 등<sup>13</sup>은 쥐에서 분리한 근육유래 줄기세포를 음부신경 절단 요실금 모델 쥐의 요도주위에 자가이식하여 요도의 수축력이 개선되는 효과가 있음을 보고하였다. 또한 음부신경을 절단한 군에서 요누출압은 시간이 지남에 따라 계속 감소하였고, 콜라겐을 요도주위에 주입한 경우에도 처음에는 요누출압의 증가되었으나 시간이 지남에 따라 다시 감소하였다. 그러나 근육유래 줄기세포를 주입한 실험에서는 요누출압의 증가가 확인되었으며, 시간이 지나도 요누출압의 변화는 없었다.<sup>14</sup>

신경절단으로 유발된 요실금 모델쥐에서 세포치료는 주입된 부위에서 근육조직을 형성함으로써 부피유지 효과를 나타내지만, 주사한 부위에서 세포가 퍼지는 현상 (spread-out) 때문에 원하는 만큼의 세포의 양을 측정하기가 어렵다. 그러므로 이러한 단점을 보완하기 위하여 세포와 친화성이 좋으며 가교시간이 조절되는 성질을 가지고 있는 키토산을 사용하였다.

본 실험에서 2주와 4주 사이에 N군과 M군에서는 요누출압의 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과가 근육유래 줄기세포만의 효과 때문인지, 아니면 키토산의 효과 때문인지, 마지막으로 두 개의 시너지 효과인지는 본 실험에서 알 수는 없었다. 이 결과의 해석을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 그러나 키토산과 수산화아파타이트를 주입한 요도 주위 조직에서 백혈구의 심한 침윤은 관찰되지 않았고, 요누출압의 차이가 없었기 때문에, 키토산과 수산화아파타이트가 근육유래 줄기세포의 연구와 요실금 치료에 이용될 수 있는 가능성이 있다고 생각한다.

M군에서 주입된 근육유래 줄기세포의 약 50%가 평활근으로 변화되었고, 50%는 횡문근으로 분화하였음을 조직학적 검사로 확인하였다. 이는 이들 분화된 세포들이 손상 받은 요도괄약근의 기능에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

키토산은 근육유래 줄기세포 연구에서 유용할 수 있으며, 수산화아파타이트는 여러 성장인자를 부착시켜 근육유래 줄기세포의 성장과 분화에 맞는 생체환경을 조성함으로써 근육유래 줄기세포 분화와 성장에 시너지 효과를 기대할 수 있어 향후 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 결 론

신경절단으로 유발된 요실금 모델 쥐에서 근육유래 줄기세포/키토산/수산화아파타이트 복합겔의 요도 주위 주입은

정상군과 같이 2주 및 4주에서 요누출압을 유지시켰다. 따라서 이 복합겔은 요실금 환자의 치료에서 좋은 주사세포 치료제가 될 가능성을 보여주었다고 생각한다.

## REFERENCES

1. Lee JY, Cannon TW, Pruchnic R, Fraser MO, Huard J, Chancellor MB. The effects of periurethral muscle-derived stem cell injection on leak point pressure in a rat model of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2003;14:31-7
2. Yokoyama T, Huard J, Chancellor MB. Myoblast therapy for stress urinary incontinence and bladder dysfunction. *World J Urol* 2000;18:56-61
3. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851-64
4. Lee JY, Paik SY, Yuk SH, Lee JH, Ghil SH, Lee SS. The isolation and characterization of muscle derived stem cells from gastrocnemius muscle of rats using the modified preplate method. *Korean J Urol* 2004;45:1279-84
5. Lee JY, Paik SY, Yuk SH, Lee JH, Ghil SH, Lee SS. Long term effects of muscle-derived stem cells on leak point pressure and closing pressure in rats with transected pudendal nerves. *Mol Cells* 2004;18:309-13
6. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol* 1998;142:1257-67
7. Berg S. Polytef augmentation urethroplasty. Correction of surgically incurable urinary incontinence by injection technique. *Arch Surg* 1973;107:379-81
8. Shortliffe LM, Freiha FS, Kessler R, Stamey TA, Constantinou CE. Treatment of urinary incontinence by the periurethral implantation of glutaraldehyde cross-linked collagen. *J Urol* 1989;141:538-41
9. Pecker R, Edlund C, Wennberg AL, Fall M. The treatment of sphincter incontinence with periurethral silicone implants (macroplastique). *Scand J Urol Nephrol* 2002;36:194-8
10. Cervigni M, Tomiselli G, Perricone C, Panei M. Endoscopic treatment of sphincter insufficiency with autologous fat injection. *Arch Ital Urol Androl* 1994;66:219-24
11. Emans PJ, Saralidze K, Knetsch ML, Gijbels MJ, Kuijter R, Koole LH. Development of new injectable bulking agents: biocompatibility of radiopaque polymeric microspheres studied in a mouse model. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:430-6
12. Henry DR, Barrett DM, Weiland TL, O'Conner MK, Malizia AA, Wien AJ. Particulate silicone for use in periurethral injections: local tissue effects and search for migration. *J Urol* 1995;153:2039-43
13. Cannon TW, Lee JY, Somogyi G, Pruchnic R, Smith CP, Huard J, et al. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology* 2003;62:958-63
14. Yokoyama T, Yoshimura N, Dhir R, Zhuqing Qu, Fraser MO, Kumon H, et al. Persistence and survival of autologous muscle derived cells versus bovine collagen as potential treatment of stress urinary incontinence. *J Urol* 2001;165:271-6