원 저

대한신경과학회지 21(2):183~190, 2003 ISSN 1225-7044

백서 뇌출혈모델에서의 인간신경줄기세포이식

서울대학교 의과대학 신경과학교실 임상의학연구소, 아주대학교 뇌질환 연구소*

정상욱 주 건 정근화 김승업* 김만호 노재규

Human Neural Stem Cells Transplantation in Experimental Intracerebral Hemorrhage

Sang-Wuk Jeong, M.D., Kon Chu, M.D., Keun-Hwa Jung, M.D., Seung U. Kim*, Ph.D., Man Ho Kim, M.D., Ph.D., Jae-Kyu Roh, M.D., Ph.D.

*Brain Disease Research Center, Ajou University**
Department of Neurology and Neural stem cell laboratory, Clinical Research Institute Seoul National University Hospital

Background : Intracerebral hemorrhage (ICH) is associated with a considerable proportion of stroke and head injuries, but except for supportive care, there is no medical therapy available. Transplantation of human neural stem cells (NSCs) can be used to reduce behavioral deficit in experimental ischemic infarct model. However, effect of stem cell transplantation in experimental intracerebral hemorrhage (ICH) is unknown. We hypothesized that NSCs could migrate and differentiate into neurons or glial cells, and improve functional outcome in ICH. **Methods** : Experimental ICH was made by intrastriatal administration of bacterial collagenase in adult rats. Animals were randomized to receive intravenously either immortalized Lac-Z positive human NSCs (5×10^6 in 500 μL, n=15) or same volume of saline (n=12) on the following day. Animals were evaluated for 8 weeks after surgery with behavioral test battery. After 8 weeks, animals were sacrificed and the brains were sectioned. Transplanted NSCs were detected by X-gal histochemistry or βgal immunohistochemistry, and differentiation of grafted NSCs were evaluated by double labeling of GFAP, NeuN, or neurofilament. **Results** : Transplanted NSCs migrated to the side of peri-hematomal areas, and differentiated into neurons and astrocytes. NSCs injection group showed improved performances on rotarod test after 2 weeks and on limb placing test after 5 weeks compared with control group ($p<0.05$) and these effect persisted up to 8 weeks. **Conclusions** : Intravenously injected NSCs enter rat brain with ICH, and differentiate into astrocytes or neuronal cell, which lead to functional recovery. These findings show the possibility that NSCs can be used to reduce neurological deficits in the experimental ICH.

J Korean Neurol Assoc 21(2):183~190, 2003

Key Words : Intracerebral hemorrhage, Neural stem cell, Neural transplantation, Immunohistochemistry

신경계 이식술은 파킨슨병, 간질, 뇌경색 등에서 실험적으로 이루어져 왔다.[1] 파킨슨병이나 뇌경색에서는 임상시험단계에까지 이르렀으나 뇌출혈에서의 이식실험은 아직 이루어진 바가 없다.[2] 뇌경색 모델의 경우 다양한 종류의 세포가 실험적으로 이용되었다. 대표적인 예를 들면 설치류[3-6] 및 인간 간엽줄기세포,[7] 인간제대혈액세포,[8] 설치류 발생기 해마 세포,[9] 태생기 마우스에서 만들어진 신경상피세포주인 MHP36,[10,11] 인간기형세포종에서 기원한 신경세포[12,13] 등이 있다. 뇌허혈 모델에서 이러한 세포의 이식은 신경학적인 호전을 일으키는 것으로 보고되었다. 임상실험 보고도 있는데 Kondziolka등은 인간 기형종에서 유래한 NT2/D 세포주를 뇌경색 이후 6개월이상이 경과한 환자 12명에게 이식한 후 부분적인 신경학적인 호전을 보고 하였다.[14] 한편 Diacron사에서는 돼지의 태아 뇌세포를 이용한 이식치료를 진행하고 있다고 한다.[2] 하지만 뇌출혈 동물모델에서의 연구는 아직 보고되지 않았다.

뇌출혈은 서양에서는 전체 뇌졸중의 10%정도를 차지하나[15] 동양인의 경우 그 빈도가 높아서 30%에 이른다.[16] 뇌출혈이후 예후는 비슷한 크기의 뇌경색에 비해 나쁜 경우가 많고 혈전용해술 이후에 생기는 뇌출혈의 경우 치사율

Manuscript received December 26, 2002
Accepted in final form March 12, 2003
* Address for correspondence
Jae-Kyu Roh, M.D., PhD
Department of Neurology, Seoul National University Hospital
28 Yongon-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-744, Korea
Tel : +82-2-760-3265 Fax : +82-2-3672-7553
E-mail : rohjk@snu.ac.kr

이 58%에 이른다는 보고도 있다.[17] 주지하는 바와 같이 뇌출혈의 경우 혈압조절, 뇌압조절등과 같은 보존적 치료외에 특별한 내과적 치료가 없으며 큰 천막상부출혈이나 소뇌출혈인 경우에 수술을 시행하나 신경학적인 결손을 치료하는 데는 큰 도움이 되지 못하는 경우가 많다. 하지만 그간 많은 연구자들이 뇌경색에 대한 실험적인 연구를 하는데 비해 뇌출혈 모델에 대한 연구는 부족하였다.

이에 저자들은 뇌출혈에서 인간 신경줄기세포이식술의 효과를 확인하고자 본 실험을 시행하였다.

대상과 방법

동물의 관리와 실험조건은 서울대학교의과대학의 동물관리위원회의 심의를 통과하였고 인간줄기세포이식의 경우 서울대학교병원 윤리위원회의 심의를 받았다.

1.뇌출혈모델

체중이 240~280 g의 백서(Sprague-Dawley) 38마리를 대상으로 실험을 진행하였다. 1% 케타민(30 mg/kg, Ketara; Yuhan Yanghang, Seoul, Korea) 과 염산자일라진(4 mg/kg, Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea)으로 마취를 시행하고 뇌정위수술기 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA)에 백서를 고정하였다. 두피에 절개를 하고 전기드릴로 두개골을 천공 하였다. 정위좌표는 bregma에서 좌측으로 3.0 mm, 뒤로 0.2 mm, 깊이는 6 mm로 선조체에 해당하는 부위로 정하였다. 30게이지 해밀턴 주사기를 이용하여 PBS(phosphate-buffered saline) 1 μL에 희석된 collagenase (type IV, Sigma) 0.23unit를 1분에 걸쳐 주입후 4분간 바늘을 정치 시킨 다음 천천히 뽑았다. Bone wax로 구멍을 막고 두피를 봉합한 뒤 마취가 깰 때까지 관찰 후 동물실에서 키웠다. 이후 실험기간동안 25℃로 유지되고 12시간 단위로 조명을 끄는 조건에서 사육되었다. 10마리는 24시간 후 희생시켜 뇌출혈의 크기를 측정하였다. 바늘이 들어간 자리를 중심으로 1 mm 간격으로 절단하여 타원형인 뇌출혈의 단면의 장축과 수직축의 길이를 곱하고 출혈이 보이는 단면의 수를 곱해 2로 나누었다.

2. 인간신경줄기세포

이 실험에 사용된 인간줄기세포는 15주된 배아의 종뇌에서 분리배양된 것으로 실험을 위하여 배아 종뇌에 lac-Z 유전자와 v-myc유전자를 삽입한 세포주이다.[18,19] 간단히 설명하면 배아 종뇌를 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with high glucose supplemented with 5% horse serum, 20 μg/ml gentamicin (GIBCO-BRL, USA), 과 2.5 μg/l amphotericin B (Gibco-BRL, USA)에서 일차 배양 하였다. 7~14일 뒤 v-myc 을 포함한 amphotropic retroviral vector를 이용하여 불멸화된 세포주를 만들었다. 이렇게 만들어진 여러 클론중 하나에 xenotropic retroviral vector를 이용하여 Lac Z 유전자를 주입하였다.[19] Lac-Z유전자는 이식한 세포를 확인하기 위한 것이고 v-myc유전자는 세포를 불멸화하여 세포주를 만들기 위한 것이다. High-glucose DMEM containing insulin (10 μg/ml), transferrin (10 μg/ml), sodium selenite (30 nM), hydrocortisone (50 nM), and triiodothyronine (0.3 nM)를 포함한 serum-free medium (DM4)에서 배양하였다.

이렇게 만들어진 세포주를 HB1.F3으로 명명하고 이번 실험에 사용하였다. 이 세포는 배양용기의 바닥에 붙어서 자라며 8~10 μm 크기이고 형태는 삼각 혹은 다각형 모양이다. 두 배로 늘어나는 시간은 약 25시간이며 세포유전학적 검사상 46, XX로 정상인간의 염색체를 갖추었다. 미성숙 신경세포에서 발현되는 vimentin에 양성반응을 보인다.[20] 면역세포화학 염색을 위해 coverslips 에서 3일 키운 후 차가운methanol로 15분간 고정하고 말린 후에 anti-βgal antibody (1:200, Sigma)와 anti-vimentin antibody (1:200, Sigma)로 4℃에서 overnight incubation하였고 2차 항체로 FITC-conjugated anti-mouse IgM (Jackson Immunoresearch) 과 Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibodies를 사용하였다(Fig. 1).

3. 이식과정

뇌출혈을 유발한지 24시간 후에 무작위적으로 15마리를 선발하여 인간신경줄기세포를 꼬리정맥을 통해 5분간 주사하였다. 500만개의 인간신경줄기세포를 식염수 500 μl 에 희석하여 주사하였다. 대조군에는 같은 양의 식염수만을 주입하였다.

4.신경학적 검사(Behavioral testing)

수술이후 1일째와 이후 매주 간격으로 8주간 신경학적인 검사를 시행하였다. Rotarod 검사는 5분 동안에 분당 4회전에서 40회전으로 회전속도가 증가하는 검사기에 백서를 달리게 하여 떨어질 때까지의 시간을 측정한 것이다.[5,21] 회전판에서 매달려 두 바퀴 이상 도는 경우는 떨어진 것으로 간주하였다. 총 3회를 시행하여 이중 가장 높은 수치를 점수로 하였고 뇌출혈을 일으키기 전 미리 3일 동안 훈련을 시켜 최고치를 기록하였다가 이와 비교하여 백분율로 환산하였다.

Limb-placing test는 사지의 감각 및 운동신경계를 검사하는 것으로 문헌에 기술된 것을 변형하여 사용하였다.[22,23] 촉각과 위치감각에 대한 환측(우측) 앞발과 뒷발의 반응을 검사하는 것으로 백서의 꼬리를 잡고 들어서 앞발이 비정상적으로 굴곡하는 경우 1점, 정상적으로 신전하는 경우 1점을 주었다. 다음으로 백서를 실험대의 경계부에 놓고 앞발과 뒷발을 천천히 신전시켜서 반응을 보았다. 발을 움직이지 않으면 2점, 2초이상 지연되거나 부족하면 1점, 정상적으로 빨리 움직이면 0점을 주었다. 마지막으로 백서를 잡고 앞발이 실험대의 측부에 닿도록 하여 (later-

al placement test) 동일한 방법으로 평가하였다. 총 7점으로 0점이 정상을 의미한다.

Turning in an alley test는 운동능력의 조화를 측정하는 것으로 너비가 10 cm 이고 높이가 30 cm 인 막힌 복도에 백서를 놓고 들어가서 머리가 벽에 닿고 몸을 돌려 나올 때까지의 시간을 초단위로 측정하였다.[24] 1분이상 나오지 않는 경우는 60초로 하였다.

5. 면역 형광 조직염색법 (Fluorescent Immunohistochemical examination)과 면적측정

이식 이후 8주에 동물들을 희생하여 조직학적인 검사를 시행하였다. 마취를 하고 개흉술을 시행한 뒤 차가운 생리식염수 100 ml 로 관류하고 이어서 100 ml 4% formaldehyde로 관류-고정하였다. 뇌를 분리해서 4% formaldehyde가 담긴 통에 24시간 보관한 뒤 40% sucrose에 24시간 넣어서 드라이아이스로 급속 냉동후 보관하였다.

Hamilton 주사기 바늘이 들어간 자리와 여기서부터 앞으로 1 mm, 뒤로 1 mm인 관상면을 30 μm 단위로 절제하여 Nissl 염색으로 뇌반구의 위축정도를 확인하였다. 영상분석기를 이용하여 병변을 준 좌측 반구와 우측반구의 면적을 측정하였다. 인접단면에서 이식된 인간신경줄기세포를 확인하기 위하여 X-gal 염색과 이중면역형광염색을 시행하였다. 1차 항체로 anti-neurofilament (1:200; Sigma), NeuN (1:200, Chemicon), GFAP (1:1000, Sigma) antibodies 와 anti-βgal antibody (1:200, Sigma) 를 사용하였고 2차 항체로 FITC-conjugated anti-mouse IgM (Jackson Immunoresearch) 과 Cy3-conjugated anti-mouse IgG antibodies를 사용하였다. 1차 항체는 4℃에서 overnight incubation하였고 2차 항체는 상온에서 1시간 반응시켰다. 음성대조 슬라이드로 1차 항체만을 넣지 않고 2차 항체를 반응시킨 것도 확인하였다. 공초점현미경 (laser scanning confocal microscopy, Bio-Rad MRC 1024)을 이용하여 녹색 (FITC for βgal)과 적색(Cy3 for NeuN, NF, GFAP)으로 이중 형광면역조직화학검사를 시행하였다. 한 동물의 3단면에서 βgal양성, βgal과 GFAP양성, βgal과 NeuN 양성인 세포의 수를 출혈강 주위에서 각각 5개의 region of interest (ROI, 0.3 mm × 0.3 mm) 를 잡아 400배율에서 세었다.

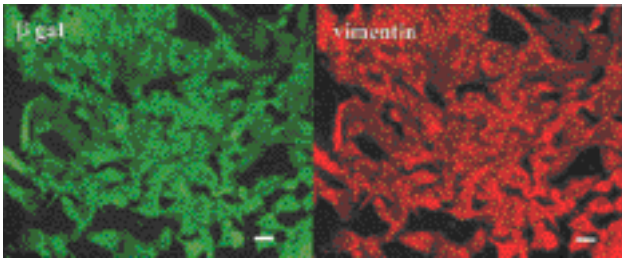

Figure 1. Shape of HB1.F3 cell line shows beta-gal and vimentin positivity on immunofluorescent microscopy (×200). White bar means 10 μm.

6. 통계적처리(Statistical Analysis)

이식군과 대조군사이의 rotarod 검사, limb placing검사, turning in an alley검사, 8주후 위축된 면적은 student t-test를 이용하여 비교하였다. 통계 패키지는 SPSS10.0을 이용하였다.

결 과

1. 면역세포화학 염색 (immunocytochemistry)

HB1.F3 세포주는 βgalactosidase와 vimentin에 대한 항체에 모두 양성반응을 보이는 bipolar, tripolar or multipolar 형태이며 크기는 8~10 μm 였다(Fig. 1).

2. 뇌출혈의 크기

24시간이후 희생된 10마리의 뇌출혈의 크기는 19.8±6.4 mm^3 (15.7~30.1) 였으며 대부분의 경우(n=8) 에서 뇌실질내 출혈이 동반되어 있었다(Fig. 2).

3. 신경학적 검사(Behavioral testing)

Rotarod검사는 2주 이후부터 인간줄기세포 이식군에서 통계적으로 유의하게 더 나은 결과를 보여주었다. 이런 결과는 8주까지 이어졌다(Fig. 3-A). Limb placing test의 경우 5주 이후부터 유의한 차이를 보여 이식군에서 호전된 결과를 보여주었으며 이는 8주까지 이어졌다(Fig. 3-B). Turning in an alley test는 8주 동안 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3-C).

4.면역 형광 조직염색 (Fluorescent Immunohistochemical examination)과 면적측정

이식된 인간신경줄기세포는 출혈강 주변부에 주로 분포되어 있었으며 대부분은 (75%)은 GFAP양성인 성상세포

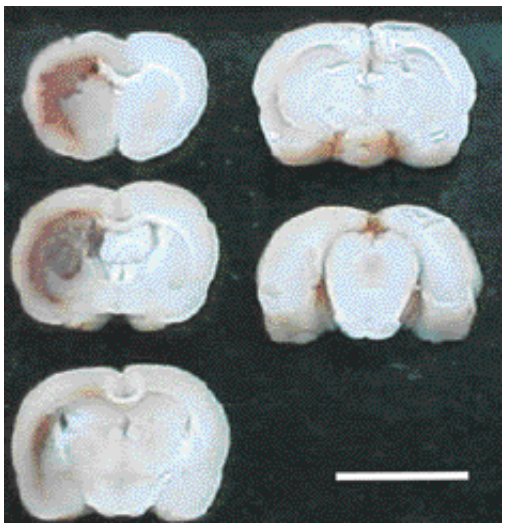

Figure 2. Gross morphology of collagenase-induced intracerebral hemorrhage with intraventricular hemorrhage after 1 day. White bar means 1 cm.

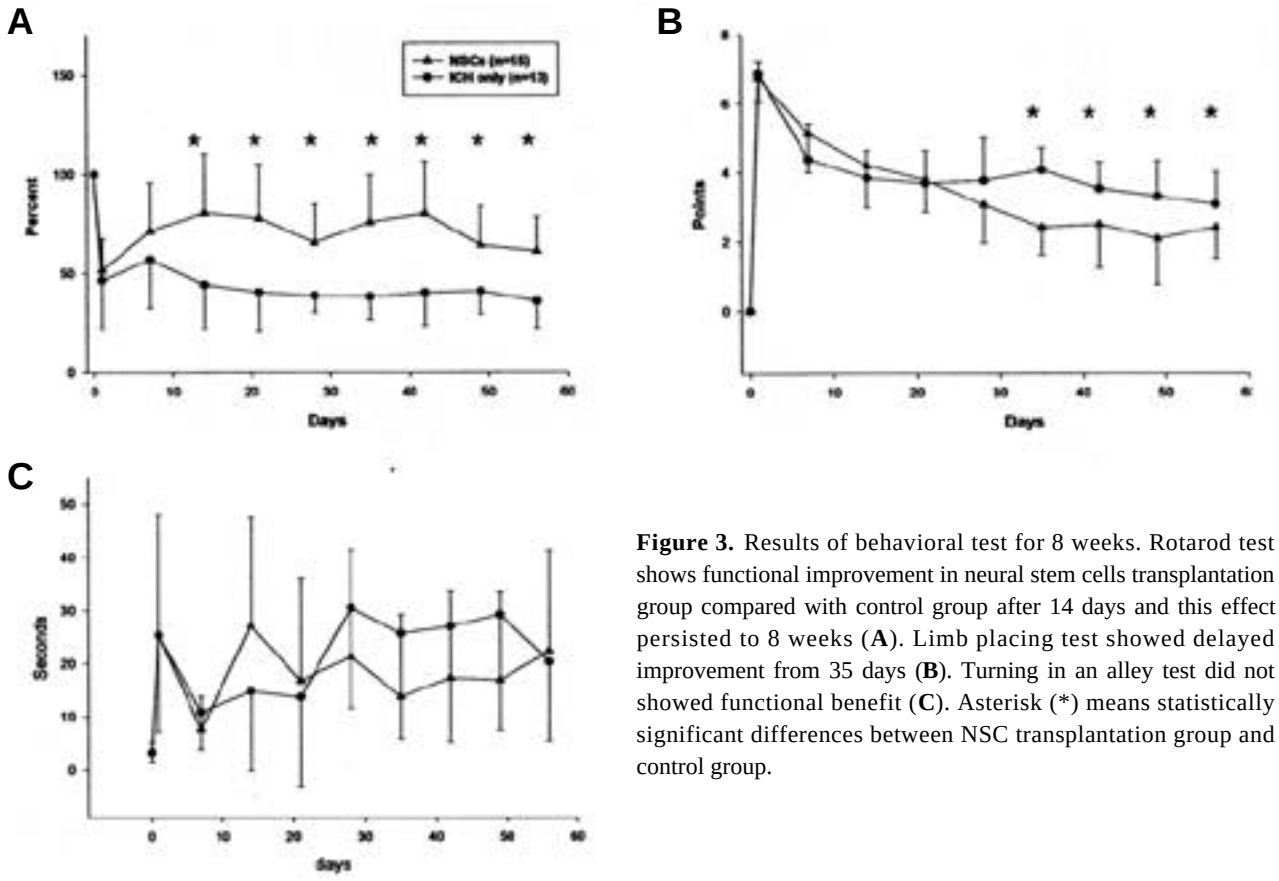

Figure 3. Results of behavioral test for 8 weeks. Rotarod test shows functional improvement in neural stem cells transplantation group compared with control group after 14 days and this effect persisted to 8 weeks (**A**). Limb placing test showed delayed improvement from 35 days (**B**). Turning in an alley test did not showed functional benefit (**C**). Asterisk (*) means statistically significant differences between NSC transplantation group and control group.

Table 1. Differentiation of transplanted neural stem cells in rat brain with experimental intracerebral hemorrhage.

	Lesional side	Contralateral side
βgal(+)	1019.6±227.5	86.0±33.0
βgal(+), GFAP(+)	766.9±177.8	60.2±29.5
βgal(+), NeuN(+)	102.7±45.4	3.8±6.9

Values are mean number of cells ± SD (/mm²).

Table 2. Mean brain atrophy in control and neural stem cell (NSC) transplantation groups

	Brain hemisphere		Atrophy as % of
Group	Contralateral	Ipsilateral	contralateral hemisphere
Control group	43.2±2.8	35.2±4.3	18.5±5.7
NSCs transplantation group	42.8±3.4	36.0±2.5	15.8±1.2

Values are mean area±SD (mm²), NSCs; neural stem cells

(astrocytes로 분화하였고 10%는 NeuN양성인 신경세포로 분화하였다(Table 1, Fig. 4 a, b, c). 대부분의 βgal양성세포는 병변주위에 있었으며 반대측 건측 반구에도 소수의 βgal양성세포가 관찰되었다(Table 1).

Nissl염색에서 확인한 대조군의 건측 반구와 병변측 반구는 유의한 면적차이가 있었고 (43.2±2.8 mm² versus 35.2±4.3 mm², p<0.001), 인간신경줄기세포를 이식한 경우에도 이는 마찬가지였다(42.8±3.4mm² versus 36.0±2.5mm², p<0.001)(Table 2). 대표적인 사진을 Figure 5에 제시하였다. 반대쪽 반구를 기준으로 하여 병변측 반구의 위축을 평가하였을 때 인간신경줄기세포 이식군에서 뇌위축 정도가 작은 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(18.5±5.7% vs 15.8±1.2%, p=0.66)(Table 2).

고 찰

본 저자들은 정위적 수술을 통해 선조체에 collagenase를 주입한 뇌출혈모델에서 인간신경줄기세포를 이식하여 기능적인 호전을 확인하였다. 이식된 신경줄기세포는 신경

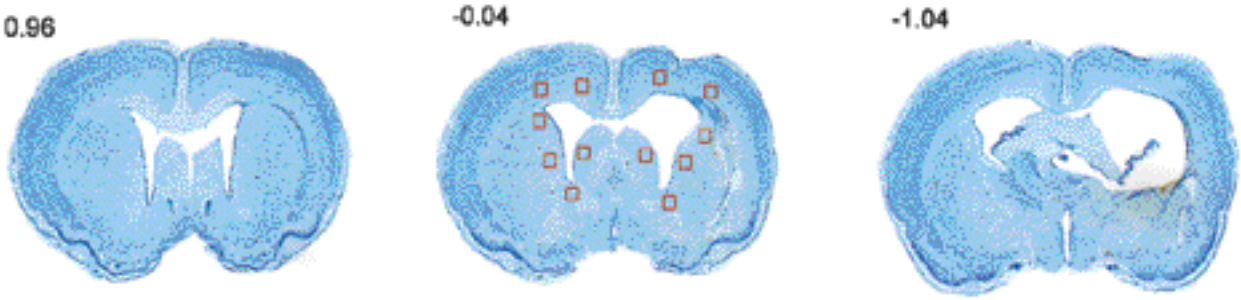

Figure 5. Brain section at 8 weeks shows definite left hemisphere atrophy. 3 Sections (1mm anterior to needle insertion site, needle insertion site, 1mm posterior) were analyzed. 0.96, -0.04, -1.04 means anterior-posterior coordinate from bregma. Red square means region of interest (0.3×0.3 mm). We used two cortical ROIs, three striatal ROIs, and one septal ROIs.

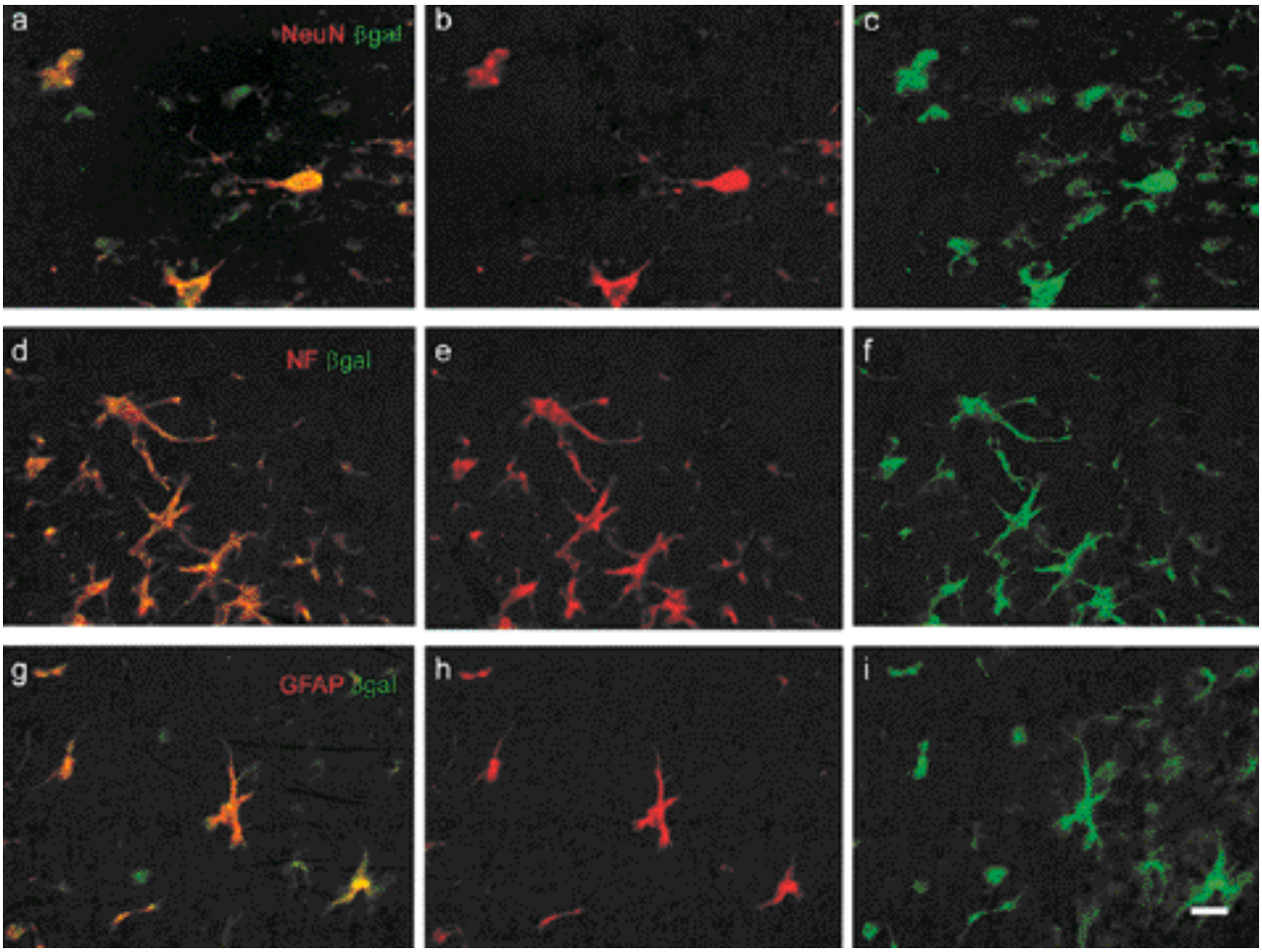

Figure 4. Differentiation of neural stem cells in the peri-hematomal area. 8 weeks after transplantation, the intravenously injected neural stem cells (Beta-gal in green) differentiated into neurons (NeuN and neurofilaments in red), or astrocytes (GFAP in red). Beta-gal positive and neurofilament-positive cells (d, e, f) and GFAP-positive cells (g, h, i) had a mature morphology similar to that of the host neurons and astrocytes, respectively. (Scale bar = 20 μm)

세포와 교세포로 분화하였으며 8주 후에 뇌출혈에 의한 뇌위축은 큰 차이가 없었다. 이는 뇌출혈 모델에서의 세포이식치료를 적용한 첫 보고이다. 지금까지 보고된 유일한 자료는 태생기 14일 백서의 뇌조직을 뇌출혈모델에 이식하였으나 신경학적인 호전이 없었으며 절반에서만 이식조직이 남아 있었고 주로 교세포 조직이었다는 보고가 있을 뿐이다.[25] 뇌조직을 이식하는 것(tissue graft)은 세포를 이식하는 것(cell transplantation)보다 단점이 많다고 할 수 있다. 우선 이식할 뇌조직을 얻기가 쉽지 않을 뿐더러 그 이식편도 적절한 혈관이 형성되지 않으면 숙주에서 생존할 수 없다.

주지하는 바와 같이 신경계는 다른 조직들과는 달리 재생능력이 떨어져 치료의 어려움이 있다. 하지만 성체의 뇌에도 신경줄기세포가 존재하고 각종 손상에 대해 새로운 신경세포를 형성하는 것이 최근에 알려지게 되었다. 하지만 임상에서 경험하는 바와 같이 이런 재생능력은 초기 손

상이 클수록 그 정도가 미약하다. 최근에 실험 보고에 의하면 중대뇌동맥 뇌경색모델에 있어서 내재되어 있던 신경줄기세포가 손상된 신경세포를 보충하는 비율은 단지 0.2%에 불과하다고 한다.[26] 이러한 점은 뇌경색 이후 내인성 신경줄기세포의 증식을 늘리거나 외부에서 신경세포를 만들 수 있는 세포이식치료의 필요성을 강조한다.

신경줄기세포는 자가복제를 할 수 있는 미분화세포로 신경세포, 성상세포, 희돌기세포를 만들 수 있다. 이러한 신경줄기세포는 뇌실하 영역(subventricular zone), 해마, 척수, 심지어는 성숙한 포유류의 중추신경계에도 존재한다.[27] 분리된 신경줄기세포는 섬유아세포 성장인자 (FGF)나 상피성장인자 (EGF) 에 반응하여 계속 증식할 수 있고 배양조건이 달라지면 여러 종류의 신경계 세포로 분화할 수 있다.[28] 더욱이 신경줄기세포에서 유래한 신경세포는 in vitro [29,30]나 in vivo[31]에서 시냅스를 이루어 기능을 한다는 보고도 있다. 이러한 결과를 보건데 신경줄기세포는 신경회로를 구성하는 적절한 신경세포로 분화 할 수 있는 것으로 보이고 다양한 신경계질환에 있어서 세포이식을 가능하게 해줄 것으로 기대된다. 이식된 신경줄기세포는 숙주의 뇌에서 신경세포, 성상교세포, 희돌기세포로 분화될 수 있고 심지어 신경줄기세포로 뇌실하영역에 남아 있기도 한다고 하였는데 이는 본 연구와 일치되는 결과이다.[19] 이런 점에서 신경계질환으로 손상받거나 손실된 세포들을 보충해 주는데 신경줄기세포를 사용하는 것이 합당한 근거라 사료된다. 신경줄기세포가 신경세포 뿐만 아니라 교세포로도 분화할 수 있다는 것은 중요한 의미를 가지는데 이는 교세포나 지지세포들이 해독작용, 수초화, 지지작용 등을 통해 신경세포의 생존에 적절한 미세환경을 구성할 수 있기 때문이다. 신경줄기세포는 생체에서 신경세포를 만드는 신호에 반응하는 것으로 보인다.[32, 33] 이러한 반응은 발생기뿐만 아니라 뇌경색, 세포고사(apoptosis)등에 의한 뇌손상에서도 가능하다. 이렇듯 강한 가소성(plasticity)에 비해서 신경줄기세포이식에 의한 종양생성의 보고는 아직 없을 뿐만 아니라 신경계에 부적절한 조직, 예를 들어 근육, 뼈 등을 생성했다는 보고도 없다.[33]

동물모델에서 인간신경줄기세포의 이식이 효과가 있는 기전에 대해서 살펴보면 두 가지로 설명할 수가 있다. 첫째는 신경줄기세포가 직접 손상된 신경조직에 들어가 신경회로를 재구성하는 것이고 두번째는 신경영양인자(neurotrophic factor)를 분비하는 것이다.[34] 신경줄기세포에서 기원한 신경세포에서 in vitro 나 in vivo에서 시냅스를 이루어 기능을 한다는 보고가 있다. Toda등은 성체 신경줄기세포가 in vitro에서 glutamate 혹은 GABA를 분비하는 신경세포로 바뀐 것을 보였는데 활동전위(action potential)는 12일째, 시냅스형성은 28일이나 35일째 관찰되었다고 한다.[29] Auerbach 등은 태생기 14일째 백서 배아에서 신경줄기세포를 얻어서 태생기 18일째 백서의 해마부위에 심었는데 30일이 지난 경우 반복적인 활동전위가 생긴다고 보고했다.[31] 이는 이식된 신경줄기세포가 in vivo에서 신경회로에 통합됨을 증명한 최초의 보고였다. 하지만 이식 세포에서 기원한 성숙된 세포가 6주 정도 지나서야 나타난다는 보고[35,36]가 있으므로 본 실험에서 2주가 지나서 생기는 rotarod검사상의 호전은 이식된 신경줄기세포에서 생긴 신경세포생성(neurogenesis) 만으로는 설명될 수 없다.

신경줄기세포의 다른 작용을 생각해 볼 수 있는데 숙주의 뇌에서 어떤 가소성을 유발 할 수 있는 물질을 분비하는 것이다. 이러한 작용은 급성기에 세포고사나 괴사를 막는 작용이거나 만성기의 신경재생을 돕는 작용으로 생각해 볼 수 있다. Veizovic등은 conditionally-immortalized mouse NSC line인 MHP36를 백서의 국소허혈모델 2내지 3주째 이식하였다.[11] 양측 비대칭검사(Bilateral asymmetry test)상에서 신경줄기세포를 이식 받은 동물은 유의하게 더 나은 결과를 보였고 54주 후에 뇌의 손상부위는 대조군16%, 이식군 26%였다. 이러한 차이는 상대적인 비율로 35%의 뇌조직 손상을 줄여주었다는 의미인데, 이식된 세포의 수가 많지 않기 때문에 이식된 세포의 부피보다는 이들이 분비하는 어떤 물질에 의해 뇌조직의 손상을 막은 것으로 주장하였다. 즉 단순히 손상된 뇌조직을 채워넣는 것이 아니라 가소성을 유도한다는 것이다. 최근 Li 등은 인간 골수기질세포을 국소허혈1일째 이식하고 1주일에 신경성장인자(nerve growth factor)와 뇌기원신경영양인자(brain derived neurotrophic factor)를 측정하여 이들이 대조군에 비해 유의하게 증가되어있고 2주일후에 세포고사가 줄어든 점을 보여 신경영양인자에 의한 작용을 보인바 있다.[37] Zhao 등은 국소뇌허혈이후 1주일째 인간간엽줄기세포를 정위적으로 반대측 대뇌피질에 주입하였다. 이식 2주 이후부터 신경학적인 호전을 관찰하였고 6주 이후 뇌경색부피는 대조군과 차이가 없었다. 이식한 간엽줄기세포는 신경세포, 성상세포, 희돌기세포로 분화되었지만 돌기가 적은 구형세포여서 기능적인 회복은 간엽줄기세포가 분비한 물질에 의한 것으로 생각하였다.[7]

이식된 세포가 신경세포로 완성되어 기능을 하는 데는 6주 정도가 걸리는 것으로 보고되고 있다.[35,36] 따라서 이번 실험에서 2주째 rotarod 검사상 호전을 보이는 것은 이식된 세포가 신경회로에 통합되어 기능을 한다기 보다는 시냅스의 가소성을 유발하거나 파괴되어가는 신경세포를 구해주는 신경보호작용에 기인하는 것으로 보는 것이 옳을 것이다. 더불어 6주 이상이 지난 경우에는 시냅스를 이룬 신경세포를 형성하여 기능호전을 일으켰을 가능성이 있다. 본 실험에서 limb placing test의 경우 5주 이후에 호전을 보이는 점은 이러한 가능성을 보여준다.

결론적으로 백서 뇌출혈모델에서 정맥을 통해 이식한 신경줄기세포는 뇌출혈이 일어난 부위에 선택적으로 이동하였으며 신경세포와 교세포로 분화하였다. 더불어 대조군에 비해 기능적 호전을 이루었다. 신경줄기세포를 이용한 신경계 이식술은 뇌경색뿐만 아니라 뇌출혈에서도 적용이 가능한 것으로 판단되며 이에 대한 기전 연구가 필요하다.

REFERENCES

1. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3: 537-544.
2. Savitz SI, Rosenbaum DM, Dinsmore JH, Wechsler LR, Caplan LR. Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol* 2002;52:266-275.
3. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Chopp M. Caspase inhibition by Z-VAD increases the survival of grafted bone marrow cells and improves functional outcome after MCAo in rats. *J Neurol Sci* 2002;199:17-24
4. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001;189:49-57.
5. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001;32: 1005-1011.
6. Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 2001;56:1666-1672.
7. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002; 174:11-20.
8. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-2688.
9. Onifer SM, Low WC. Spatial memory deficit resulting from ischemia-induced damage to the hippocampus is ameliorated by intra-hippocampal transplants of fetal hippocampal neurons. Prog. *Brain Res* 1990;82: 359-366.
10. Sinden JD, Rashid-Doubell F, Kershaw TR, Nelson A, Chadwick A, Jat PS, et al. Recovery of spatial learning by grafts of a conditionally immortalized hippocampal neuroepithelial cell line into the ischaemia-lesioned hippocampus. *Neuroscience* 1997;3:599-608.
11. Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, Watson WP, Hodges H. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 2001;32:1012-1019.
12. Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, Sanberg PR. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. Exp. *Neurol* 149;1998:310-321.
13. Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience* 1999; 2: 519-525.
14. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000;55:565-569.
15. Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. N *Engl J Med* 2001; 344: 1450-1460.
16. Lo YK, Yiu CH, Hu HH, Su MS, Laeuchli S-C. Frequency and characteristics of early seizures in Chinese acute stroke. *Acta Neurol Scand* 1994;90:83-85.
17. Sloan MA, Sila CA, Mahaffey KW, Granger CB, Longstreth WT Jr, Koudstaal P, et al. Prediction of 30-day mortality among patients with thrombolysis-related intracranial hemorrhage. *Circulation* 1998;98:1376-1382.
18. Kim SU, Nakagawa E, Hatori K, Nagai A, Lee MA, Bang JH. Production of immortalized human neural crest stem cells. *Methods Mol Biol* 2002;198:55-65.
19. Ourednik V, Ourednik J, Flax JD, Zawada WM, Hutt C, Yang C, et al. Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. *Science* 2001;293;1820-1824.
20. Cho T, Bae JH, Choi HB, Kim SS, McLarnon JG, Suh-Kim H, et al. Human neural stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *Neuroreport* 2002;13:1447-1452.
21. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994;11:187-196.
22. Puurunen K, Jolkkonen J, Sirvio J, Haapalinna A, Sivenius J. An alpha(2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology* 2001;40:597-606.
23. De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, Wauquier A, Janssen PA. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke* 1989;20:1383-1390.
24. Hattori K, Lee H, Hurn PD, Crain BJ, Traystman RJ, DeVries AC. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2000;31:1939-1944.
25. Altumbabic M, Del Bigio MR. Transplantation of fetal brain tissue into the site of intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* 1998;257:61-64.
26. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002;8:963-970.
27. Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. Curr. Opin. *Neurobiol* 1999;9:135-141.
28. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 1999;38:65-81.

29. Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, Koyano K, Hashimoto N. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol* 2000;165:66-76.
30. Vicario-Abejon C, Collin C, Tsoulfas P, McKay RD. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* 2000;12:677-688.
31. Auerbach JM, Eiden MV, McKay RD. Transplanted CNS stem cells form functional synapses in vivo. *Eur J Neurosci* 2000;12:1696-1704.
32. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billinghurst LL, et al. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 1998;16:1033-1039.
33. Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Auguste KI, et al. Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther* 2002;9:613-624
34. Price J, Williams BP. Neural stem cells Curr Opin *Neurobiol* 2001;11:564-567.
35. Ostenfeld T, Caldwell MA, Prowse KR, Linskens MH, Jauniaux E, Svendsen CN. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation. *Exp Neurol* 2000;164:215-226
36. Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Bjorklund A. Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *Neurosci* 1999;19: 5990-6005
37. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59:514-523.