



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**동일조건변경허락.** 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2006년 2월

박사학위논문

손상된 척수에 이식한  
사람탯줄혈액이 뇌줄기에 미치는  
공초점 주사현미경적 연구

조선대학교대학원

의학과

정영욱

손상된 척수에 이식한  
사람탯줄혈액이 뇌줄기에 미치는  
공초점 주사현미경적 연구

*Confocal microscopic observation on the brain stem  
after transplantation of human umbilical cord blood  
cells(hUCB) in the complete spinal cord injury of the  
rats*

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

정 영 욱

손상된 척수에 이식한  
사람탯줄혈액이 뇌줄기에 미치는  
공초점 주사현미경적 연구

지도교수 김 종 중

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

정 영 욱



# 목 차

## ABSTRACT

1. 서 론	1
2. 실험재료 및 방법	4
3. 결 과	7
4. 고 찰	9
5. 결 론	11
<b>참고문헌</b>	12
<b>Explanation of Figures</b>	16
<b>Figures</b>	18

# Abstract

Confocal microscopic observation on the brain stem after transplantation of human umbilical cord blood cells(hUCB) in the complete spinal cord injury of the rats

Jung, Young-Wook

Advisor : Prof. Kim, Jong-Joong, Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Stem cells are a valuable resource for treatment of the disease. but limited access to stem cells from tissues such as brain restricts their utility. Many approaches have been adopted to restore the function following brain stem injury (BSI) and spinal cord injury (SCI). The use of the human umbilical cord blood (hUCB) - a rich source of nonembryonic or adult stem cells - has recently been reported to ameliorate the behavioral consequences of stroke. Forty rats were divided into 8 groups: (1) SCI 1+hUCB (infused 1 day post injury); (2) SCI 2+hUCB (infused 2 days post injury); (3) SCI 3+hUCB (infused 3 days post injury); (4) SCI 4+hUCB (infused 4 days post injury); (5) SCI 5+hUCB (infusedt 5 days post injury); (6) SCI 6+hUCB (infused 6 days post injury); (7) LO+hUCB (laminectomy + hUCB); and (8) LO (laminectomy only). SCI was produced by compressing the spinal cord for one minute with an aneurysm clip calibrated to a closing pressure of 50 g.

We report here that immunohistochemical identification of fluorescent hUCB

positive cells in the brain stem after compressed spinal cord using mouse anti-human mitochondria monoclonal antibody (MAB1273).

All SCI + hUCB(1-8) groups contained fluorescent hUCB positive cells in the all area of the brain stem. Especially, a large number of fluorescent hUCB positive cells also were observed in the whole area of the brain stem of the experimental 5(SCI 5+hUCB) and 6(SCI 6+hUCB)groups. No hUCB positive cells were found in the brain stem area from non-injured spinal cord of these animals or in the animals receiving only a laminectomy was performed.

These results suggest that hUCB are potentially useful as a vector for treating a variety of the central nervous system disorders, and we are sure that continuous stem cell study will give an best opportunity to treat the all incurable organs disorders in the future.



# 서론

뇌줄기(뇌간, Brain stem)는 식물의 줄기모양과 같은 구조물로서 시상부와 척수를 이어 주는 작은 기관으로 척수 쪽에서부터 숨뇌(연수), 다리뇌(교뇌), 중간뇌(중뇌)로 구성되며 뒷머리뼈우묵에 수용되어 있는 감성의 중추기관이다. 뇌줄기는 비록 작은 기관이지만 기능이 매우 발달되어 앞뇌에 위치한 고위중추의 여러 부위와 척수 사이를 연결하는 오름신경로(상행신경로)와 내림신경로(하행신경로)가 출입하는 통로의 역할을 수행할 뿐만 아니라 호흡과 심혈관계의 조절에 관련된 중요한 반사중추와 의식의 조절과도 밀접한 관련이 있으며 12쌍의 뇌신경중 3~12번까지의 뇌신경핵이 들어 있는 중요한 기관이다.

숨뇌는 뇌줄기의 가장 밑에 위치하며 아래의 척수와 계속되며 심박동, 혈관직경을 조절하고 숨쉬기, 삼키기, 토하기, 기침, 재채기를 조절하는 중추핵을 가지고 있다.

다리뇌는 숨뇌의 바로 위에 위치하며 여러 개의 핵뿐만 아니라 오름, 내림신경로가 있고 대뇌와 소뇌 사이의 정보를 중계하는 뇌의 일부이다.

중간뇌는 다리뇌의 바로 위에 위치하고 뇌줄기의 가장 작은 부위이며 눈이 목표물을 따라 이동하는 시각중추와 큰소리가 나는 쪽으로 머리를 돌리게 하는 청각중추를 조정해 주는 정보를 가지고 있다.

뇌줄기 전체에 흩어져 있는 핵집단을 그물활동계통(reticular activating system)이라 하며 각성과 자각능력을 유지시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Snell, 2001; Nolte, 2002).

한편 현대 생활에 있어서 각종 사고나 충격, 식생활, 노화, 또는 알 수 없는 원인으로 인하여 뇌줄기와 척수를 비롯한 중추신경계의 일정 부위가 손상을 받게 되어 그 부위가 고유한 기능을 수행하지 못함에 따라 Parkinson병을 비롯한 뇌졸중, 간질, 척수장애, 혈관장애등 각종 신경원성퇴행질환(neurodegenerative diseases)이 발병하게 된다(Akesson 등, 1998; Bagden과 Bregman, 1990; Craven과 Ward,

1999; Newman과 Ginsberg, 1994; Sanchez-Ramos 등, 2001).

따라서 신경 과학자들은 뇌와 척수의 구조 및 기능의 비밀을 밝혀내기 위하여 활발한 연구를 수행하고 있으며 신경성질환으로부터 고통 받고 있는 환자들을 료하기 위하여(Bandler와 Shipley, 1994; Chopp 등, 2000) 신경발생과정을 비롯한, 신경조직이식, 신경세포배양방법에 이르기까지 여러 측면에서 연구가 활발히 진행되고 있다(Craig와 Serrano, 1994; Craven과 Ward, 1999; Euler 등, 1997 ; Foster 등, 1990; Zeman 등, 2001).

또한 신경세포와 신경아교세포로 분화, 증식하고 새로운 신경조직을 형성할 수 있는 무한한 가능성과 잠재력을 가지고 있는 신경줄기세포(neural stem cell, NSC)에 대한 관심이 매우 높아지고 있다(Cario와 Wagner, 1997; Howland등, 1995; Kuhar 등, 1973; Lu 등, 2002; Miya 등, 1997; Sanchez-Ramos 등 2001). 신경줄기세포는 배아줄기세포와 성체줄기세포로 나눌 수 있는데 배아 줄기세포는 매우 다양한 새로운 세포로 분화할 수 있는 만능세포(pluripotential stem cell)로서 신경질환을 치료하는데 가장 적합하지만 소중한 생명의 시작인 배아조직을 이용해야 한다는 윤리적인 문제점을 가지고 있다(Bagden과 Bregman, 1990 ; Euler 등, 1997; Gene등, 1996; Grant 등, 1988; Zeman 등, 2001). 이와 같은 이유 때문에 신경과학자들은 배아줄기세포의 대안으로 성체줄기세포인 골수세포, 탭줄혈액세포, 동물 및 사람의 성인 뇌 조직을 포함한 여러 가지 조직에서 성체줄기세포를 분리해 이용할 수 있는 연구가 활발히 진행되고 있다(Akesson 등, 1998; Cario와 Wagner 등, 1997 ; Miya 등, 1997). 배아 줄기세포에 비해서 증식능력이 떨어지고 잠재력이 약하지만 윤리적인 측면에서 사회적인 논란의 대상이 되지 않은 성체줄기세포에 대해서 최근 신경세포와 신경아교세포로 분화, 증식하는 것에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Jennifer 등, 1995; Jacobs와 Azmitia, 1992; Sanchez-Ramos 등, 2001; Zigoba 등, 2002).

사람탯줄혈액(human umbilical cord blood, hUCB)세포는 태아를 출산할 때 탯줄이나 태반에서 쉽게 얻을 수 있는 혈액세포로써 혈우병, 판코니증후군 각종 암, 면역계통과 신경계통의 질병을 치료할 수 있는 자원이 풍부한 성체 줄기세포이며 사람뿐만 아니라 동물에도 충분히 이용할 수 있다는 보고가 있어서 탯줄혈액을 이식하여 신경세포나 신경아교세포로 분화, 증식하여 손상부위의 기능을 회복시키는 연구가 활발히 진행하고 있다(Cario와 Wagner, 1997; Chopp 등, 2000 ; Craven과 Ward, 1999 ; Hartley 등, 1999; Lu 등, 2002; Miya와 Giszter,1997; Zerman 등, 2001; Zigoba 등, 2002).

따라서 본 연구의 목적은 척수의 흉수분절을 완전히 압박 손상시킨 후 꼬리정맥을 통하여 사람탯줄혈액을 주입한 후 이들 세포가 뇌줄기의 오름신경섬유와 내림신경섬유, 그리고 여러 신경핵에 미치는 영향을 형태학적으로 분석하기 위하여 형광면역화학염색을 시행하여 공초점주사현미경으로 관찰하였다.

# 실험재료 및 방법

## 1) 실험동물

실험동물은 흰쥐 수컷 Sprague Dawley 40마리(Zivic-Miller, Zenienople PA. 220~250g)를 이용하였으며 사육장에 도착 즉시 동물 길들이기를 한 마리 당 3~5분씩 1일 1~2회, 10일 동안 실시하였다.

## 2) 실험 군

- 제1군: 척수압박손상 1일후 사람탯줄혈액세포 주입군(SCI 1+hUCB),
- 제2군: 척수압박손상 2일후 사람탯줄혈액세포 주입군(SCI 2+hUCB),
- 제3군: 척수압박손상 3일후 사람탯줄혈액세포 주입군(SCI 3+hUCB),
- 제4군: 척수압박손상 4일후 사람탯줄혈액세포 주입군(SCI 4+hUCB),
- 제5군: 척수압박손상 5일후 사람탯줄혈액세포 주입군(SCI 5+hUCB),
- 제6군: 척수압박손상 6일후 사람탯줄혈액세포 주입군(SCI 6+hUCB)
- 제7군: 척추궁절제술 후 사람탯줄혈액세포 주입군(LO+hUCB),
- 제8군: 척추궁절제술만 시행한 군(laminectomy only, LO).

## 3) 척수손상 및 관리

각 실험군은 5 마리씩 사용하였으며 흉추 8~9번째 부위를 척추궁절제술을 하여 척수를 노출시켜 1분간 압박하여 손상시켰다(Euler 등, 1997). 그 후 정상적으로 근육과 피부는 봉합하여 동물 사육장에서 먹이와 물을 제한 없이 공급하여 사육하였다. 면역 억제제인 cyclosporin(10mg/kg/day/im)을 30일의 실험기간동안 주사하였으며 항생제인 baytril(20ml/kg)을 5일 동안 피하 주사하고 하루에 2회씩 배변과 배뇨를 시켰다.

#### 4) 사람 뱀줄혈액 준비와 주입

단핵 hUCB세포는 CryoCell International Inc.(Tampa, FL)로부터 냉동된 상태로 분양받아 사용하였다. 이식할 hUCB세포 준비는 냉동 보관되어 있는 뱀줄혈액을 10% bovine serum(Gibco)과 gentamicin( $50\mu\text{l}/\text{ml}$ , Sigma)이 들어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco)에  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 빠른 속도로 녹인 다음 이들 세포를 조심스럽게 10ml Isolyte 용액(pH 7.4)이 들어 있는 15ml 원심분리기관에 옮겨  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 1,000rpm으로 원심 분리한 뒤 상청액은 버리고 세포는 glucose-saline에 2~3회 씻어낸 다음 hUCB세포를 FITC(fluorescent isothiocyanate)가 결합되어 있는 cholera toxin subunit B(CTX-FITC)를 실온에서 15분 동안 반응시켰다. hUCB세포를 이식하기에 전에 세포의 생존율과 세포 수를 확인하기 위하여 슬라이드 글라스에  $20\mu\text{l}$  떨어뜨린 다음 0.1%trypan blue  $180\mu\text{l}$ 로 염색한 후 현미경으로 관찰하여 세포 수에 맞춰  $3 \times 10^6/\text{ml}$ 가 되게 한 다음 DMEM용액에 10%FBS를 10ml관에  $1.5 \times 10^6\text{cell}/0.5\text{ml}$ 씩 나누어 희석하였다. hUCB세포의 생존율은 주입하기 전에는 81%, 주입 후에는 61%로 매우 좋은 상태였다.

hUCB세포의 주입은 실험 군에 따라 쥐를 원형의 통속(tail access rodent restrainer)에 가둔 다음 꼬리만 원통 밖으로 나오게 하여 꼬리정맥을 쉽게 확인하기 위하여 약  $40^{\circ}\text{C}$  정도의 뜨거운 물로 꼬리를 적셔 정맥혈관을 찾은 다음 준비된 hUCB세포를 1ml주사기에 부착된 27gauge 주사바늘을 이용하여 한 마리 당  $0.5\text{ml}(1.5 \times 10^6)$ 씩 주입하였다. 그 후 주사기를 제거한 후 주입한 세포가 흘러나오지 않도록 약 3분 동안 손가락으로 꼭 눌러 주었다.

## 5) 공초점주사현미경적 면역조직화학염색

hUCB세포가 척수의 손상부위와 뇌줄기로 이동한 것을 확인하기 위하여 형광면역조직화학염색을 시행하였다. 1차적으로 hUCB세포는 CTX-FITC와 결합시켜 꼬리정맥을 통하여 주입했기 때문에 이를 확인하기 위하여 슬라이드에 있는 조직절편을 매 5편의 절편 중 1개의 절편을 선택하여 2차 증류수로 10분씩 2회 씻어낸 다음 조직의 물기를 완전히 제거하고 형광물질을 관찰하기 위한 봉합제를 이용하여 덮개유리로 덮은 다음 공초점주사현미경으로 CTX-FITC에 결합되어 있는 hUCB양성세포를 관찰하였다. 그 후 다음단계의 염색을 위하여 덮개유리를 조심스럽게 벗겨낸 다음 10% normal goat serum(NGS)과 0.3% triton X를 혼합한 0.1M PB(이하 모두 pH 7.4)용액에 실온에서 1시간동안 침적하고 나서 제 1차 항체인 mouse anti-human mitochondria monoclonal antibody(MAB1273, Chemicon)를 2% NGS와 0.3%triton X로 혼합한 PB용액에 1:50으로 희석하여 4°C에서 24-48시간 반응시켰다.

다음날 0.1M PB용액으로 3회 씻어낸 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse rhodamine(Alexa Fluor 594, Molecular Probes)을 2% NGS가 첨가된 0.1M PB용액에 1:800으로 희석하여 실온의 암실에서 2시간 반응시켰다. 그 후 봉합하여 MAB1273의 양성반응세포를 공초점주사현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

척수의 흉수분절을 완전히 압박 손상시킨 후 꼬리정맥을 통하여 사람탯줄혈액을 주입한 후 척수의 상위부위에 위치한 뇌줄기의 오름신경섬유와 내림신경섬유 그리고 여러 신경핵에 미치는 영향을 형태학적으로 분석하기 위하여 형광면역염색을 시행하여 공초점주사현미경으로 관찰하였다. 그 결과 각 실험 군의 뇌줄기에서 내인성 형광물질로 판단되는 세포들이 많이 출현하였으며 CTX-FITC(Fig.1~16)와 rhodamine(Fig.2-1~16-1)으로 표지된 hUCB양성반응세포로 판단된 MAB1273양성반응 세포들이 형광물질에 매우 뚜렷하게 염색되어 있었다. 각 실험군에서 관찰된 hUCB 양성반응세포들의 크기는 대체적으로 비슷하였다(Fig. 1~16).

**실험1군**(척수압박손상 1일 후 탯줄혈액세포주입군)에서 숨뇌의 중심관 옆의 가쪽겉질척수로 주위에서 일렬로 배열되어 출현하는 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었으며(Fig. 1), 중간뇌의 적색주위를 둘러싸고 있는 그물핵의 혈관벽에서도 hUCB양성반응세포를 확인할 수 있었다(Fig.2와 2-1).

**실험2군**(척수압박손상 2일 후 탯줄혈액세포주입군)에서 숨뇌의 안쪽섬유띠 주변의 혈관벽과(Fig.3과 3-1) 다리뇌의 다리뇌핵(Fig.4와 4-1)을 따라 출현하는 hUCB 양성반응세포를 관찰할 수 있었다.

**실험3군**(척수압박손상 3일 후 탯줄혈액세포주입군)에서 관찰된 숨뇌의 피라밋교차 높이의 여러핵과(Fig.5와 5-1) 다리뇌의 제4뇌실의 바로 밑에 위치하고 있는 삼차신경운동핵과 안쪽섬유띠(Fig.6과 6-1)사이의 핵 주변 부위에서도 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었으나 세포의 모양이 불규칙하였다.

**실험4군**(척수압박손상 4일 후 탯줄혈액세포주입군)에서 숨뇌의 의문핵(Fig.7과 7-1)과 중간뇌의 중간뇌수도관 주위와 중심회색질(Fig.8과 8-1)부위에서도 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었다.

**실험5군**(척수압박손상 5일 후 태줄혈액세포주입군)의 숨뇌의 달팽이핵(Fig.9)과 다리뇌의 갯돌림신경핵의 가쪽에 위치하며 넷째뇌실의 바닥에 연해 있는 안쪽안뜰핵(Fig.9-1), 그리고 중간뇌의 흑색질의 가장자리(Fig.10과 10-1)를 따라 뚜렷한 hUCB양성반응세포가 출현함을 관찰할 수 있었다.

**실험6군**(척수압박손상 6일 후 태줄혈액세포주입군)의 숨뇌의 널판다발핵(Fig.11과 11-1)과 바로 인접해 있는 췌기다발핵(Fig.12와 12-1)과 다리뇌의 안쪽섬유띠의 뒤가쪽부분에 위치하고 있는 얼굴신경핵(Fig.13과 13-1)과 그리고 중간뇌의 위둔덕핵(fig.14와 14-1)에서도 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었다.

**실험7군**(척추궁절제술 후 태줄혈액세포주입군)의 숨뇌(Fig.15와 15-1)에서는 흔적적으로 출현하는 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었다.

**실험8군**(척추궁절제술만 시행한군)의 다리뇌(Fig.16과 16-1)에서도 실험7군과 비슷한 양상을 관찰할 수 있었다. 모든 실험군에서 관찰된 hUCB양성반응세포의 대부분은 직경이 약 10~15 $\mu$ m정도 된 둥글고 약간 길쭉한 실꾸리 모양이었다.



## 고찰

뇌줄기(뇌간, Brain stem)는 식물의 줄기모양과 같은 구조물로서 넓은 시상부와 좁은 척수를 이어 주는 작은 기관으로 척수 쪽에서부터 숨뇌(연수), 다리뇌(교뇌), 중간뇌(중뇌)로 구성되며 뒷머리뼈우묵에 수용되어 있다. 뇌줄기는 비록 작은 기관이지만 기능이 매우 발달되어 앞뇌에 위치한 고위중추의 여러 부위와 척수 사이를 연결하는 오름신경로(상행신경로)와 내림신경로(하행신경로)가 출입하는 통로의 기능 역할을 하며 호흡과 심혈관계의 조절에 관련된 중요한 반사중추와 의식의 조절과도 밀접한 관련이 있으며 12쌍의 뇌신경 중 3~12번까지의 뇌신경핵이 들어 있는 중요한 기관이다.

따라서 교통사고를 비롯한 각종 사고와 여러 장애요인에 의하여 뇌줄기의 특정 부위가 손상을 받아 그 고유 기능이 상실되면 치명적인 결과를 초래하게 된다(Akesson 등, 1998; Chopp 등, 2000; Foster 등 1990). 그렇기 때문에 이런 여러 요인에 의하여 발생하는 질병을 치료하기 위한 방편으로 신경과학자들은 신경면역학과 신경조직이식에 관하여 끊임없는 연구를 계속하고 있는 실정이며 이런 노력의 결과 여러 가지 퇴행성신경질환을 치료하는데 상당한 성과를 얻고 있다(Cairo와 Wagner 등, 1997; Euler 등, 1997; Zerman 등, 2001). 이러한 퇴행성신경질환을 치료하기 위해서 최근 사회적으로 많은 관심을 갖고 있는 배아 줄기세포를 이용할 수 있으나 사회적으로 윤리적인 문제가 제기되고 있어 신경세포이식에 대한 연구가 상당한 제약을 받고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 배아 줄기세포를 대체할 수 있고 윤리적인 문제가 없는 성인 줄기세포인 골수와 사람의 탭줄 혈액세포를 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이며 이들 성체줄기세포가 신경세포 및 신경아교세포로 분화, 성장하여 뇌졸중, 빈혈, 퇴행성신경질환을 치료하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다( Chopp 등, 2000 ; Craven과 Ward, 1999 ; Lu 등, 2002 ; Sanchez-Ramos등, 2001 ; Zigoba 등, 2002).

본 연구의 결과 척수손상 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일에 사람탭줄혈액을

주입한 모든 실험군의 뇌줄기에 분포하고 있는 여러핵에서 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었으며 척수손상 후 5일과 6일에 사람탯줄혈액을 주입한 실험군이 가장 양호함을 관찰할 수 있었으며 척추궁절제술 후 사람탯줄혈액 주입군과 척추궁절제술만 시행한 실험군에서는 흔적적으로 출현함을 관찰할 수 있었다. 또한 척수손상을 받지 않은 정상군의 뇌줄기에서는 hUCB양성반응세포를 전혀 발견할 수 없었다. 일부 연구자들은 뇌의 일정부위와 척수를 손상시킨 다음 사람탯줄혈액을 이식하여 신경세포와 신경아교세포로 분화하여 퇴행성신경질환을 치유하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다(Lu 등, 2002 ; Sanches-Ramos 등, 2001 ; Zigoba 등, 2002). 그러나 척수를 손상시킨 후 사람탯줄혈액을 이식하였을 때 뇌줄기에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 형태학적 연구는 아직까지 보고된바 없어서 직접 비교 분석할 수는 없었으나 척수의 손상으로 인하여 충격을 받은 뇌줄기도 사람탯줄혈액을 이식하였을 때 뇌줄기로 이동하여 그의 고유기능을 회복시키는데 매우 좋은 효과가 있을 것으로 판단된다.

한편 일부 연구자들은 척수를 손상시킨 다음 5일 또는 2주일 후에 사람탯줄혈액 대신에 사람신경줄기세포를 직접 손상부위에 이식한 결과 실험쥐의 행동이 매우 양호하였다고 보고하였는데(Akiesson 등, 1998 ; Akiyama 등, 2001 ; Castellanos 등, 2002 ; Howland(c) 등, 1995) 이는 사람혈액세포와 거의 같은 결과를 나타낸 것으로 판단된다.

이상의 결과로 보아 척수의 목, 등 및 허리분절에 손상을 받아 기능이 마비되었을 때 태아신경줄기세포와 사람탯줄혈액세포를 이식하여 척수의 형태학적 복원은 물론 기능적으로 회복하여 척수 질병으로부터 고통 받고 있는 수많은 환자들을 치료하는 획기적인 성과를 기대 할 수 있을 뿐만 아니라 뇌줄기와 시상하부를 포함한 해마, 뇌의 기저핵과 곁질의 손상부위에 사람탯줄혈액세포를 이식하여 본래의 기능을 회복하여 척수장애의 치료는 물론 Parkinson's disease 같은 대표적인 퇴행성신경질환을 치료 할 수 있는 효과를 기대 할 수 있다고 판단된다.

## 결 론

본 연구에서 형광 면역세포화학적 염색을 하여 공초점주사현미경으로 관찰한 결과 척수손상 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일에 사람탯줄혈액을 주입한 모든 실험군의 뇌줄기의 여러핵에서 hUCB양성반응세포를 관찰할 수 있었으며 척수손상 후 5일과 6일군에 사람탯줄혈액을 주입한 실험군이 가장 양호함을 관찰할 수 있었으며 척추궁절제술 후 사람탯줄혈액 주입군과 척추궁절제술만 시행한 실험군에서는 흔적적으로 출현함을 관찰할 수 있었다. 또한 척수손상 받지 않은 정상부위의 뇌줄기에서는 hUCB양성반응세포를 전혀 발견할 수 없었다. 이러한 결과로 보아 척수를 비롯한 중추신경계뿐만 아니라 우리 몸의 어느 장기에든 사람탯줄혈액을 이용하여 질병을 치료할 수 있다고 판단된다.

## 참 고 문 헌

- Akesson E, Kajaeldgaard A, Seiger A : Human embryonic spinal cord grafts in adult rat spinal cord cavities: Survival, Growth, and Interactions with the Host, *Exp Neurol* 149:262-276, 1998.
- Bagden EK, Bregman BS : spinal cord transplants enhance the recovery of locomotor function after spinal cord injury at birth, *Exp Brain Res* 81:25-34, 1990.
- Bandler R, Shipley MT : Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional express? *Trends Neurosci* 17:379-382, 1994
- Cairo MS, Wagner JE : Placental and umbilical cord blood : an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation, *Blood* 90:4665-4678, 1997.
- Chopp M, Zhang Xu, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Roseblum M :spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation, *Neruro Report* 11:3001-3005, 2000.
- Craven CM, Ward K : Transfusion of fetal cord blood cells: an improved method of hematopoietic stem cell transplatation, *J Reproductive Immunology* 42:59-77, 1999.

Craig AD, Serrano LP : Effects of systemic morphine on lamina I spinothalamic tract neurons in the cat, *Brain Res* 636:233-236, 1994.

Euler MV, Seiger A, Sundstrom E : Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations, *Exp Neurol* 145:502-510, 1997.

Foster GA, Brodin E, Gage FH, Maxwell DJ, Roberts MHT, Sharp T : Restoration of function to the denervated brain stem cord after implantation of embryonic 5HT- and substance P-containing raphe neurones, *Brain Res* 82:247-259 1990.

Gene CK, Darwin JP, Donald GP : Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 96:10711-10716, 1996

Grant SJ, Aston -Jones G, Redmond DEJr : Responses of primate locus coeruleus neurons to simple and complex sensory stimuli, *Brain Res Bull* 21:401-405, 1988.

Howland DR, Bregmen BS, Tessler A, Goldberger ME : Transplants enhance locomotion in neonatal kittens whose spinal cords are transected: a behavioral and anatomical study, *Exp Neurol* 135:123-145, 1995.

Jennifer AS, Kazue S : Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei, *Brain Res* 677:39-49, 1995

Jacobs BL, Azmitia EC : Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol Rev* 72:165-168, 1992.

Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH : Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain, *Nature* 245:447-450, 1973.

Lu D, Sanberg PR, Mahood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, Chopp M : Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury, *Cell Transplant* 11:275-281, 2002.

Miya D, Giszter S, Mori F, Adipudi V, Tessler A, Murray M : Fetal transplants alter the development of function after spinal cord transection in newborn rats, *J Neuroscience* 17:4856-4872, 1997.

Newman DB, Ginsberg CY : Brainstem reticular nuclei that project to the thalamus in rats: a retrograde tracer study, *Brain Behav Evol* 44:1-5, 1994.

Nolte J : The human brain : An introduction to its functional anatomy (5th ed.). Philadelphia, Mosby, 2002.

Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigoba T, Willing A, Cardozo-Pelaez, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR : Expression of neural markers in human cord blood, *Exp Neurol* 171:109-115, 2001.

Snell RS : Clinical neuroanatomy for medical school(5th ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Visintainer PF, Moorthy CR, Couldwell WT, Etlinger JD : X-irradiation of the contusion site improves locomotor and histological outcomes in spinal cord-injured rats, *Exp Neurol* 172:228-234, 2001.

Zigoba T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR : Human umbilical cord blood cells express neural antigen after transplantation into the developing rat brain, *Cell Transplant* 11:265-274,2002.

## Explanation of Figures

Figures : Immunohistochemical identification of fluorescent hUCB positive cells(arrows) in brainstem after compressed spinal cord using mouse anti-human mitochondria monoclonal antibody(MAB1273).

**Left panel(1~16)** is FITC immunostains.

**Right panel(2~1~16~1)** is rhodamine immunostains.

**Fig.1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the lateral corticospinal tract of the medulla oblongata(SCI 1+hUCB).

**Fig.2~2-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the red nucleus of the midbrain(SCI 1 +hUCB).

**Fig.3~3-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the medial lemniscus of the medulla oblongata(SCI 2 +hUCB ).

**Fig.4~4-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the pontine nucleus(SCI 2 +hUCB).

**Fig.5~5-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the level of pyramid decussation of the medulla oblongata(SCI 3 +hUCB).

**Fig.6~6-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the motor nucleus of trigeminal nerve of the pons(SCI 3 +hUCB).

**Fig.7~7-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the nucleus ambiguus of the medulla oblongata(SCI 4 +hUCB).

**Fig.8~8-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the central gray matter of the midbrain(SCI 4 +hUCB).

**Fig.9:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the cochlear nucleus of the medulla oblongata(SCI 5 +hUCB).



- Fig.9-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the medial vestibular nucleus pons(SCI 5 +hUCB).
- Fig.10-10-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the substantia nigra of the midbrain(SCI 5 +hUCB).
- Fig.11-11-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the nucleus grcilis of the medulla oblongata(SCI 6 +hUCB).
- Fig.12-12-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the nucleus cuneatus of the medulla oblongata(SCI 6 +hUCB).
- Fig.13-13-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the facial nucleus of the pons(SCI 6 +hUCB).
- Fig.14-14-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the nucleus of superior colliculus(SCI 6 +hUCB).
- Fig.15-15-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the inferior olivary nucleus of the of the medulla oblongata(SCI 7 + hUCB).
- Fig.16-16-1:** Fluorescent hUCB positive cells(arrows) in the spinal lemniscus of the pons(SCI 8 +hUCB).









