creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000233340

2006년 2월
박사학위논문

흰쥐 태생기 솔기핵과 사람탯줄혈액 이식 후 척수의 형태 재생에 관한 연구

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

임 만 택

흰쥐 태생기 솔기핵과 사람탯줄혈액 이식 후 척수의 형태 재생에 관한 연구

Morphological restoration after transplantation of the human umbilical cord blood and medullary raphe nucleus in complete clip compression and transection into the spinal cord of rats.

2006년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

임 만 택

흰쥐 태생기솔기핵과 사람탯줄혈액 이식 후 척수의 형태 재생에 관한 연구

지 도 교 수 유 재 원

논문을 의학박사학위 신청 논문으로 제출함.

2005년 10월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

임 만 택

임 만택의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 인

위 원 연세대학교 교수 인

위 원 조선대학교 교수 인

위 원 조선대학교 교수 인

위 원 조선대학교 교수 인

2005년 12 월 10 일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

도 목 차

ABSTRACT

1. 서 론 ---------- 1

2. 실험재료 및 방법 ---------- 4

3. 결 과 ---------- 9

4. 고 찰 ----------13

5. 결 론 ---------- 16

참 고 문 헌 ---------- 17

Legends for Figures ---------- 22

도 목 차

Fig.1. Identification of hUCB in compressed spinal cord immunohisto-chemical stained with mouse anti-human mitochondria monoclonal antibody (MAB1273).

Fig.2. Identification of the hUCB in compressed spinal cord.

Fig.3. The coronal section of midbrain. mesencephalic raphe group(X30)

Fig.4. The coronal section of midbrain. medullary raphe group(X30)

Fig.5. The coronal section of midbrain. medullary raphe group(X60)

Fig.6. The transverse section of longitudinal serotonin immunoreactive fiber bundle in the lateral funiculus(X30)

Fig.7. The transverse section of cervical(7A), thoracic(7B),lumber(7C) and sacral(7D)regions(X100)

Fig.8. The transverse section L1(X100)

Fig.9. The sagittal section of spinal cord reacted with serotonin antiserum(X60)

Fig.10. The sagittal section of lateral funiculus of the thoracic spinal cord(X60)

Fig.11. The transverse section of thoracic spinal cord(X100)

Fig.12. The transverse section of lumber spinal cord(X100)

Fig.13. two step cycle in the normal animals

Fig.14. The stick diagram of two step cycle of right fore-and hindlimbs

Fig.15. The right fore-and hindlimbs trajectories from the bilateral hemisected(T8, T12) animal.

Abstract

Morphological restoration after transplantation of the human umbilical cord blood and medullary raphe nucleus in complete clip compression and transection into the spinal cord of rats.

Man-Taeck Lim

Advisor : Prof.You,Jae-Won,M.D.,Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Many approaches have been adopted to restore function following spinal cord injury (SCI). These have included transplantation of fetal neurons, neuronal progenitor cells, or glial cells, or transplantation of transected cells which produce a variety of substances. The use of human umbilical cord blood (hUCB)—a rich source of nonembryonic or adult stem cells— has recently been reported to ameliorate behavioral consequences of stroke.

The purpose of this study was to confirm the morphological restoration after transplantation of the human umbilical cord blood and fetal serotonin containing medullary raphe nuclei into the transected thoracic spinal cord(T9~T11) of adult rats.

We performed that hUCB delivered intravenously in rats with compression injury of the spinal cord increase the rate of behavioral recovery. Twenty-four rats were divided into four groups: (1) SCI only(control); (2) SCI + hUCB delivered at one day post-injury ; (3)

SCI + hUCB delivered at 3 days post-injury; (4) SCI + hUCB delivered at 5 days post-injury). SCI was produced by compressing the spinal cord for one minute with an aneurysm clip calibrated to a closing pressure of 50g. Spinal cords from these rats were examined immunohistochemically to identify hUCB. Spinal cords from SCI + hUCB animals contained hUCB in the area of SCI: No hUCB were found in non-injured areas of the spinal cord from these animals or in animals in which only a SCI was performed. Rats in the SCI + hUCB 1 day and 3 days group were significantly different in recovery of motor function as compared to the SCI + hUCB 5 days group. These results indicate that hUCB may be beneficial in reversing the behavioral effects of SCI.

The suspension of cells derived from the mesencephalic and medually raphe nuclei of 13-15 day embryonic rats were injected in the upper and lower areas of the transected spinal cord(T9~T11). After survival periods of 15 days to 1 year, the animals were sacrificed and the spinal cord was processed for the localization of serotonin immunoreactive neurons in the transected spinal cord, and was studied using ABC immunohistochemistry.

Immunohistochemical analyses revealed the presence of many serotonin immunoreactive neurons in the transplants. The serotonin nerve fibers were densely distributed in lamina I and II of the dorsal horn and in lamina VII and IX of the ventral horn of all segments of the spinal cord. The nontransplanted spinal cord of the control rats showed a total absence of serotonin immunoreactive fibers below the section. In the rats with simultaneous double hemisection(T8 and T12), hindlimb locomotion did not recover during the maximum observation period of 60 days, and in the rats with single hemisection in the thoracic cord(T8),

hindlimb locomotion did recover during the maximum observation period of 30 days.

In conclusion, we confirmed the morphological restoration of spinal cord after transplantation of the human umbilical blood and medullary raphe nuclei into the transected spinal cord as well as functional restoration, and we are sure that continuous stem cell study will give an oppotunity to treat the uncurable spinal disorders in the future.

서 론

뇌와 척수의 구조 및 기능의 신비한 비밀을 밝혀내고 최근에 신경발생과정을 비롯한, 신경조직이식, 신경세포배양, 신경세포의 분화, 사멸, 가소성에 대한 유전자 발현과 신호전달 기작, 그리고 신경심리학적 방법에 이르기까지 신경원성 퇴행성 질환으로부터 고통 받고 있는 환자들을 치료하기 위하여 여러 신경 과학자들의 연구가 활발히 진행되고 있다(Akiyama 등, 2001; Basso 등, 1995; Cao 등, 2001; Duchossoy 등, 2001; Foster 등, 1990).

뇌와 척수가 여러 가지 사고나 충격, 식생활, 생활주변의 환경, 노화, 또는 알 수 없는 원인으로 인하여 일정 부위가 손상을 받아 그 부위의 고유한 기능을 수행하지 못할 때 Alzheimer병, Parkinson병, Huntington병을 비롯한 뇌졸증, 간질, 근위축증, 척수장애 등 각종 신경성 질환이 유발될 수 있으며 그 때문에 환자는 고통을 호소하게 되고 보호자들은 물론 사회적으로도 심각한 문제가 발생하게 된다(Akesson 등, 1998; Bagden과 Bregman, 1990; Castellanos 등, 2002; Hartly 등, 1999 ; Saporta 등, 2002; Sieradzan 과 Vrbova, 1989).

이러한 질병을 치료하기 위하여 Privat 등(1988)은 척수에 공간을 만들어 태아 척수신경조직의 상청액을 이식하였을 때가 태아 신경조직덩어리를 이식했을 때보다 혈액공급이 좋아서 생존율과 기능회복이 더 좋았다고 보고하였으며 Molokanova와 Tamarova(1995)는 뇌줄기 신경조직의 상청액을 척수를 절단하자마자 주입하거나 혹은 척수 절단 후 2~3 일이 경과한 후에 주사기를 이용하여 이식한 결과는 큰 차이가 없었다고 보고하였다.

또한 최근 신경과학자들은 뇌와 척수에 질병과 장애가 유발된 부위에 신경세포와 신경아교세포로 분화 증식하고, 자가유지능력을 지닌 새로운 신경조직을 형성하여 성인의 신경조직으로 대치 할 수 있는 무한한 가능성과 잠재력을 가지고 있는 신경줄기세포(neural stem cell, NSC)를 이용하는 것에 대

한 관심이 매우 높아지고 있다. 앞으로 뇌신경세포의 분화와 성장 및 노화의 비밀이 밝혀지고 신경줄기세포를 이식하는 방법을 이용하여 유전자 치료기술을 활용한 형질전환기법을 응용하여 동물의 뇌세포를 사람 뇌에 직접 이식하거나 사람 대 사람의 뇌조직을 이식하여 손상 받은 뇌 세포의 재생 및 질병치료는 물론 뇌세포를 활성화할 수 있는 방법도 개발 될 것으로 기대할 수 있다(Duchossoy 등, 2001; Lu 등, 2002; Magnuson 등, 1999; Miya 등, 1997; Sieradzan 와 Vrbova 1989).

줄기세포는 발현의 기원에 따라 배아줄기세포와 성체줄기세포로 나눌 수 있다. 배아줄기세포는 260가지 이상의 새로운 세포로 분화할 수 있는 만능세포(pluripotential stem cell)이다.그러나 배아줄기세포는 신경질환을 치료할 수 있는 새로운 치료법으로 가장 적합하지만 소중한 생명의 시작인 배아의 뇌 조직과 척수조직을 이용해야 한다는 윤리적인 문제점을 가지고 있어서 사회적으로 논란의 대상이 되고 있다 (Bagden과 Bregman, 1990; Euler 등, 1997; Hartley 등, 1999; Magnuson 등, 1999). 이와 같은 이유 때문에 신경과학자들은 이에 대한 대안을 연구하던 중 다행히 골수세포, 탯줄혈액세포, 심지어는 동물 및 사람의 성인 뇌 조직을 포함한 신체의 여러 가지 조직에서 성체줄기세포(adult stem cell)를 분리해 이용 할 수 있는 방법을 알게 되었다

성체줄기세포인 사람탯줄혈액세포(human umbilical cord blood, hUCB)는 정맥에 주입하였을 때 스스로 손상 받은 부위로 이주하여 신경세포와 신경아교세포로 분화, 증식한다는 연구가 보고되고 있다(Saporta 등, 2002; Zigova 등, 2002).

사람탯줄혈액세포는 배아줄기세포에 비해서 증식능력이 떨어지고 잠재력이 약하다는 약점은 있지만 윤리적인 측면에서 사회적인 논란의 대상이 되지 않으며 어린이를 출산할 때 탯줄이나 태반에서 쉽게 얻을 수 있는 혈액세포로써 혈우병, 팡코니증후군, 각종 암, 면역계통과 신경계통의 질병을 치료할 수 있는 자원이 풍부한 성체줄기세포이며 어린이나 어른에게도 충분히 이용

할 수 있고 특히 급성 이식편대숙주 반응(Acute Graft-Versus-Host Reaction)의 위험성이 거의 없는 것으로 알려지고 있다(Akiyama 등, 2001; Cario와 Wagner, 1997; Miya 등, 1997; Pranke 등, 2001; Sanchez-Ramos 등, 2001; Sieradzan과 Vrbova, 1989; Zigoba 등, 2002). 따라서 근위축성측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 신경원성 퇴행성 질환, 뇌졸증, 뇌외상, 척수손상(spinal cord injuy, SCI) 등을 동물에 실험적으로 유발시킨 후 탯줄혈액을 이식하여 신경세포나 신경아교세포로 분화 증식하여 기능이 회복되는가에 대한 연구를 많이 수행하고 있다(Cario와 Wagner, 1997; Chopp 등, 2000; Craven과 Ward, 1999; Hartley 등, 1999; Lu 등, 2002; Magnuson 등, 1999; Zerman 등, 2001; Zigoba 등, 2002).

따라서 본 연구의 목적은 실험쥐의 척수 흉수분절을 완전히 절단하여 태생기솔기핵은 직접 손상 부위에 주입하고, 척수를 압박 손상시킨 실험쥐에는 탯줄혈액은 꼬리정맥에 주입한 후 마비된 척수가 기능적으로 회복되는 가를 확인하기 위하여 시도하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

사람탯줄혈액 이식군과 태생기솔기핵 이식군 모두 조선대학교 동물사육장, 서울대학교 동물사육장, 삼육실험동물사육장에서 분양받은 흰쥐 암컷 Sprague Dawley 30마리(220~250gm)를 이용하였으며 사육장에 도착 즉시 동물 길들이기를 한 마리 당 3~5분씩 1일 1~2회, 10일 동안 실시하였다.

2. 실험군

1) 사람탯줄혈액 이식군은 대조군으로 척수 손상만 시행한 군과 실험군으로 척수를 압박손상 시킨 후 1일, 3일, 5일이 경과한 후 사람탯줄혈액 세포를 주입하였다.

2) 태생기솔기핵 이식군은 정상군과 실험군으로 나누었다.

3. 척수손상부위

각 실험 군은 각각 4 마리씩를 사용하였으며 Chloral hydrate를 복강내 주사하여 전신마취 후 정위고정대(stereotaxic frame)에 엎드린 자세로 고정하여 흉추8~12번째 부위를 척추궁절제술을 하여 척수를 노출시켜 55g 정도 압력을 유지할 수 있는 특수하게 제작한 정맥 집게(clip)로 척수의 배쪽과 등쪽을 동시에 1분간 압박하여 척수를 손상시켰다(Euler 등, 1997). 수술 도중 6마리는 죽었다. 그 후 정상적으로 근육과 피부는 봉합하여 소독된 동물 사육장에서 먹이와 물을 제한 없이 공급하여 사육하였다.

4. 수술 후 관리

수술 후 실험쥐는 특수 소독 처리된 사육장에서 사육하였으며 면역 억제제인 Cyclosporine(10㎎/㎏/day/im)을 실험기간 동안 주사하였으며 항생제인 Baytril(20㎖/㎏)을 5일 동안 피하 주사하였고 하루에 2회씩 배변과 배뇨를 인위적으로 시켰다.

5. 사람탯줄혈액 준비 및 주입과 태생기솔기핵(제공자) 신경조직처리

단핵 hUCB세포는 CryoCell International Inc.(Tampa. FL)로부터 냉동된 상태로 분양 받아 사용하였다. 이식할 hUCB세포 준비는 냉동 보관되어 있는 탯줄혈액을 10% bovine serum(Gibco)과 gentamicin(50㎕/㎖, Sigma)이 들어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM. Gibco)에 37℃에서 빠른 속도로 녹인 다음 이들 세포를 10㎖ Isolyte 용액(pH 7.4)이 들어 있는 15cc 원심분리관에 옮겨 7분 동안 1,000rpm으로 원심분리한 뒤 상청액은 버리고 hUCB세포는 glucose-saline에 2~3회 씻어낸 다음 FITC(fluorescent isothiocyanate)가 결합되어 있는 cholera toxin subunit B(CTX-FITC)에 결합시키기 위하여 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 이식하기에 앞서 세포의 생존율과 세포수를 평가하기 위하여 trypan blue로 염색한 후 현미경으로 관찰하여 세포수를 3,000/㎕로 조절하였다. 세포의 생존율은 hUCB세포를 주입하기 전에는 81%, 주입 후에는 61%로 매우 좋은 상태였다.

hUCB세포의 주입은 실험군의 날짜에 따라 쥐를 플라스틱으로 제작한 원형의 통(restrainer)속에 머리 부분이 앞쪽을 향하게 한 다음 꼬리만 원통 밖으로 나오게 하여 꼬리정맥을 쉽게 노출시키기 위하여 약 40℃정도의 뜨거운 물로 꼬리를 씻어주었다. 미리 준비된 hUCB세포를 1㎖주사기에 부착된 27gauge 주사바늘을 이용하여 서서히 한 마리 당 0.5㎖($1.5x10^6$)씩 주입하였다.

태생기솔기핵 이식군은 동일교배의 혈통을 이어 받은 임신 13~17일된 태아쥐를 임신한 어미 쥐에서 제왕절개술을 시행하여 꺼낸 후 0.6%

glucose-saline(pH7)50~70㎕용액이 든 배양접시에 옮긴 후 해부현미경을 이용하여 솔기핵 만을 분리시켜 다른 배양접시에 모았다. 미세가위를 이용해서 솔기핵을 2~3개의 덩어리로 더 잘게 분리시킨 후 원심분리시험관에 옮겨 20~30회 파이페팅(pasteur pipette)을 시행한 후 배양액을 재거하고 0.25%trypsin(Sigma)10㎖를 첨가하여 37℃에서 약 20분간 배양하였다. 그 후 다시 20~30번 파이페팅을 한 후 trypsin을 제거하고 4~5회 정도 HBSS(Sigma) 배양액으로 조직덩어리를 씻어낸 후 최종적으로 솔기핵 조직덩어리당 HBSS 5~10㎕씩 첨가해서 1.000rpm으로 8분간 원심분리하여 1㎕당 10.000~100.000개의 세포가 되도록 하였다.

신경조직의 이식은 5~10㎕ Hamilton Syringe를 이용하여 손상된 척수부위 1~2㎜ 상, 하방 부위에 일회에 2~5㎕씩 3~4회 주입시켰다. 주입 후 상청액이 흘러내리는 것을 방지하기 위하여 약 5분~10분 정도 방치한 후 주사기를 서서히 제거하고 주입부위는 gelform으로 덮고 근육과 상피를 원상태로 봉합 후 소독하여 사육하였다.

6. 형태학적 분석

1) 사람탯줄혈액 이식군의 광학현미경적 면역조직화학염색;

실험동물은 척수를 손상시킨 후 28일 동안 사육한 다음 29일째 되는 날 희생시켰다. 동물은 chloral hydrate와 ketamin으로 마취시킨 후 왼쪽심실을 통하여 heparin이 함유된 생리식염수로 관류시켜 혈액을 제거한 다음, 0.1M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)용액에 녹인 4% paraformaldehyde로 관류 고정시킨 후 척수를 채취하여 4℃에서 같은 고정액에 3~5시간 더 고정하였다. 그 후 조직은 0.1M PBS용액에 10% sucrose(Sigma)를 희석하여 4℃에서 24시간 침적시킨 다음 냉동절편기(Reichert-Jung)를 이용하여 35~40㎛로 수평과 관상절편을 만들었다. 조직내의 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위하여 0.5% 과산화수소(H_2O_2)에 30분간 반응시켰다. 손상된 척수조직에서 hUCB세포의 활성화를 확인하기 위하여 제1차 항체는 mouse anti-human

mitochondria monoclonal antibody(MAB1273, Chemicon)를 1:30으로 희석하여 사용하였으며 조직은 항체 희석액에 4℃에서 48시간 반응시켰다.

2차항체는 biotinylated goat anti-mouse IgG와 ABC complex (Vectastain, Elite. Vector. CA)를 1:200과 1: 1,000으로 희석하여 실온에서 1 시간씩 반응하였다. 기질액은 3.3'-diaminobenzidine-HCL (DAB, Sigma)을 0.1M PBS 용액에 용해하여 여과한 후 과산화수소가 0.003%되도록 첨가하였다. 발색반응을 확인한 후 탈수, 투명과정을 거쳐 봉합하여 양성반응을 보이는 hUCB양성반응신경세포 (MAB1273)를 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

2) 사람탯줄혈액 이식군의 형광현미경적 면역조직화학염색;

hUCB세포가 척수의 손상부위로 이동한 것을 확인하기 위하여 형광면역조직화학염색을 시행하였다. 1차적으로 hUCB세포는 CTX-FITC와 결합시켜 꼬리정맥을 통하여 주입했기 때문에 이 상청액이 손상부위로 이동했는지를 확인하기 위하여 슬라이드에 있는 조직절편을 매 5개의 절편 중 1개의 절편을 선택하여 2차 증류수로 10분씩 2회 씻어낸 다음 조직을 건조시킨 후 형광물질 보호 봉합제를 이용하여 덮개유리로 봉합하여 형광현미경으로 hUCB양성반응신경세포를 관찰하였다. 그 후 다음 단계의 염색을 위하여 덮개유리를 조심스럽게 벗겨낸 다음 10% normal goat serum(NGS)과 0.3% triton X를 혼합한 0.1M PBS 용액에 실온에서 1시간 침적하고 나서 제 1차 항체인 MAB1273을 2% NGS와 0.3% triton X로 혼합한 PBS 용액에 각각 1:50으로 희석하여 4℃에서 24~48시간 반응시킨 후 2차 항체는 0.1M PBS 용액으로 3회 씻어낸 후 2차 항체는 biotinylated goat anti-mouse rhodamine(Alexa Fluor 594, Molecular Probes)을 2% NGS가 첨가된 0.1M PBS 용액에 1:800으로 희석하여 실온의 암실에서 2시간 반응시켰다. 그 후 봉합하여 MAB1273의 양성반응을 형광현미경으로 관찰하였다.

3) 태생기솔기핵 이식군의 면역조직화학염색;

태생기솔기핵 이식이 끝난 실험쥐를 30~60일 동안 사육한 후 ether로 전신마취 시킨 후 가슴우리를 열고 심장을 통하여 생리식염수로 관류한 후

Zamboni고정액으로 고정한 뒤 뇌와 척수를 채취하여 동일 고정액에 4℃에서 12~24시간 동안 후 고정하였다. 냉동절편을 위하여 20% sucrose에 4℃에서 12~24시간 방치한 후 O.C.T compound로 포매하여 30㎕ 두께의 절편을 만들었으며 PBS 보관용액에 넣어 두었다가 염색 시 선택하여 사용하였다.

면역조직화학염색은 조직을 먼저 PBS 용액에 들어 있는 용기에서 수차례 씻어낸 후 3% H_2O_2로 20~30분간 실온에서 처리하여 내인성 과산화 효소 활성을 억제 시킨 다음 PBS 용액에 5분씩 3회 처리한 후 0.5% bovine serum albumin(Sigma),1% NGS와 0.3% TritonX-100이 들어있는 PBS 용액에 약 12시간 정도 처리하여 비특이적반응을 억제시킨 후, 제1항체인 rabbit anti-serotonin(Dako)을 1:500으로 희석하여 4℃에서 24~36시간 반응시켰다. PBS 용액에 3회 세척한 후, 제2항체인 goat anti-rabbit IgG(Dako)를 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 정도 반응시킨 후 다시 세척한 다음 avidin-biotin complex(Vector)를 1:100으로 희석한 후 실온에서 1시간정도 반응시켰다. 발색제는 3-3 'diaminobenzidine(DAB : Sigma)를 사용하였다. 반응이 끝난 조직은 gelatin이 발라진 유리판에 얹어 말린 후 통상의 탈수 과정을 거쳐 Polymount로 봉입한 후 현미경을 이용하여 신경세포와 신경섬유를 관찰하였다.

7. 태생기솔기핵 이식군의 행동시험

쥐의 척수운동 회복을 관찰하기 위하여 흉추8~12 번째 좌,우 어느 한쪽을 절단하고 난 후 10~15일 지난 다음 다시 흉추 12번째를 이중절단 하였다. 척수를 절단한 쥐는 수술 후 7일째부터 3일 간격으로 답차시험(treadmill test)을 시행하여 쥐의 운동회복을 관찰하였다. 쥐의 걸음걸이와 뒷다리 궤도를 분석하기 위하여 답차위를 걷는 쥐의 동작을 video tape으로 촬영하여 운동 분석계 방법을 이용하여 분석하였다.

결 과

사람탯줄혈액 이식군에서 척수의 손상 받은 부위에서 hUCB양성반응신경세포를 확인하기 위하여 광학현미경과 형광현미경으로 관찰하기 위한 면역조직화학염색을 시행하였다. 광학현미경으로 관찰한 결과 손상 받지 않은 부위에서는 hUCB양성반응신경세포를 전혀 관찰할 수 없었으나(Fig.1 B,D,F) 척수손상 부위에서는 hUCB양성반응신경세포를 관찰할 수 있었다(Fig.1 A,C,E).

형광현미경으로 관찰한 결과 각 실험 군에서 척수손상 부위에서 내인성 형광물질을 나타내는 세포들이 매우 다량으로 출현하여 구별하기 어려웠으나 CTX-FITC로 표지된 hUCB양성반응신경세포로 판단되는 MAB1273양성반응세포(Fig.2 A,C,E)와 형광물질이 매우 뚜렷하게 염색되어 있어서 확실하게 관찰할 수 있었다. 그러나 각 실험군에서 척수손상 부위의 주변이나 손상 받지 않은 정상부위에서는 MAB1273양성반응세포(Fig.2 B,D,F)는 전혀 관찰할 수 없었다.

또한 척추를 손상시키고 hUCB세포를 주입하지 않은 실험 군에서는 손상 받지 않은 정상부위와 마찬가지로 MAB1273양성반응세포(Fig.2 B,D,F)는 전혀 관찰할 수 없었다. 이런 결과는 hUCB세포가 손상부위로 이동하여 신경세포나 혹은 신경아교세포로 분화 성장하여 본래의 신경기능으로 회복되는 것으로 생각된다.

척수의 손상된 부위에서 관찰된 CTX-FITC로 표시된 hUCB양성반응신경세포는 대부분 아주 뚜렷한 핵과 함께 직경 약 10㎛정도 된 둥글고 약간 길쭉한 모양이었다(Fig.2 A,C,E). 또한 꼬리정맥을 통하여 주입한 hUCB세포가 척수의 손상 받은 부위에 얼마나 많은 수가 도착하였는지 정확히 알 수 없어서 실험에 사용한 조직절편의 일정부위를 선택하여 그 부위의 조직절편에 출현한 hUCB양성반응신경세포를 계수하여 세포의 출현 밀도를 추정하여 결정하였다. 척수손상 후 1일에 hUCB세포를 주입한 실험 군에서 척수조직 1.2㎟ 에서

약 370개의 hUCB양성반응신경세포를 관찰할 수 있었고, 반면 척수손상 후 5일에 hUCB를 주입한 실험군에서는 척수조직 1.2㎟약 870 개의 hUCB양성반응신경세포를 관찰할 수 있었다.

태생기솔기핵 이식군은 면역조직화학염색을 시행하여 솔기핵, 정상척수, 절단한 척수, 신경조직을 이식한 척수의 백색질과 회색질에서 위장관계 및 중추신경계의 신경전달물질인 serotonin 신경세포와 섬유의 분포양상을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

1.솔기핵(raphe nucleus)

중간뇌 솔기핵군에서 serotonin 양성반응을 나타내는 신경세포와 섬유들을 관찰할 수 있었으며 특히 숨뇌의 솔기핵군에서는 내림신경섬유를 따라 척수로 내려가는 신경섬유들을 다수 관찰할 수 있었고 serotonin양성반응세포의 모양은 방추형, 난원형이 대부분 이었으며 축삭과 수상돌기가 서로 얽혀 얼기를 형성하고 있었으며 신경세포체의 크기는 13~15㎛이었다(Fig.3, 4, 5).

2.척수

척수는 횡단면과 시상단면으로 절단하여 관찰한 결과 양성반응을 나타내는 serotonin신경섬유는 DAB의 발색반응의 결과 갈색의 점이나 염주모양으로 나타나 수많은 신경얼기를 형성하고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig.6).

1) 회색질(gray matter)

등쪽회색질기둥(dorsal gray column) : 정상 흰쥐 척수의 경수, 흉수, 요수, 천수 등에서 이 핵의 가장자리의 I, II층에 매우 강한 양성반응을 나타내는 serotonin신경섬유가 분포하고 있었으며, III IV층에는 중등도의 분포양상을 보였다(Fig.7 A, B, C, D). 그러나 흉수 9~11번째를 절단한 흰쥐 척수에서 절단부위 아래에서는 serotonin 양성반응 신경세포나 신경섬유는 전혀 관찰할 수 없었다(Fig.8).

척수 절단 후 태생기솔기핵을 이식한 척수에서는 serotonin에 양성반응을 나타내는 신경섬유들을 관찰할 수 있었다. 이식한 태아 신경조직은 10일 후부터 면역반응양성신경세포가 절단부위 인접부위로 뻗어 자라나는 모습을 관찰할 수 있었으며(Fig.9 A), 20일 후에는 serotonin 양성반응을 나타내는 축삭과 가지돌기 들을 쉽게 관찰할 수 있었다(Fig.9 B). 30일이 지난 척수에서는 serotonin 양성반응 축삭과 가지돌기 들이 회색질속으로 깊숙이 뻗어 들어가는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig.9 C).

배쪽회색질기둥(ventral gray matter) : 정상 흰쥐 척수의 경수, 흉수, 요수, 천수 분절의 배쪽기둥에서도 매우 강한 양성반응을 나타내는 serotonin신경섬유가 넓게 분포하고 있었다(Fig.7 A, B, C, D). 그러나 흉수 9~11번째를 절단한 흰쥐 척수에서는 등쪽회색질기둥에서와 마찬가지로 전혀 관찰할 수 없었다(Fig.8).

척수 절단 후 태생기솔기핵을 이식한 척수에서는 serotonin에 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 배쪽회색질기둥속의 숙주조직속으로 뻗어들어 가는 것을 관찰할 수 있었으며 배쪽내측핵(ventromedial nucleus)과 배쪽외측핵(ventrolateral nucleus)에서는 이식한 태아 신경조직이 시상단면에서 면역반응양성신경세포가 긴 염주모양의 신경돌기가 얼기를 만들면서 주행하는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig.10).

중간외측회색질기둥(intermediolateral gray column) : 정상 흰쥐 척수의 경수, 흉수, 요수, 천수 분절의 중간외측회색질기둥에서도 매우 강한 양성반응을 나타내는 serotonin신경섬유가 넓게 분포하고 있었으며(Fig.7 A, B, C, D), 특히 외측으로 백색질의 외측섬유단에 현저히 발달된 신경섬유가 연장되어 있었다. 흉수분절의 내측의 중심관 주위의 X층 부위와 연결되어 있는 강한 선상의 serotoninn양성신경섬유가 분포하고 있었는데 이는 흉수분절에서 특히 현저 하였다(Fig.11) 그러나 흉수 9~11번째를 절단한 흰쥐 척수에서는 등쪽회색질기둥에서와 마찬가지로 전혀 관찰할 수 없었다(Fig.8).

2) 백색질(white matter)

정상 흰쥐 척수의 경수, 흉수, 요수, 천수 분절에서 외측섬유단(lateral funiculus)과 배쪽섬유단(ventral funiculus)에 매우 강한 양성반응을 나타내는 serotonin신경섬유가 넓게 그물 모양으로 분포하고 있었으나 등쪽섬유단(dorsal funiculus)에서는 한, 두개의 serotonin 양성반응 신경섬유들만 분포하고 있는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig.7 A, B, C, D). 그러나 흉수 9~11번째를 절단한 흰쥐 척수에서는 등쪽회색질기둥에서와 마찬가지로 전혀 관찰할 수 없었다(Fig.8).

척수 절단 후 태생기솔기핵을 이식한 척수에서는 정상군과 마찬가지로 serotonin 양성반응을 나타내는 신경섬유들이 백색질 내,외측 섬유단에 그물 모양으로 분포되어 있었는데, 세로로 달리는 염주모양의 신경섬유들이 배쪽과 외측섬유단을 형성하여 하행하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig.12).

3. 척수절단 후의 행동시험

실험쥐의 좌, 우 8~12번째 흉수분절 반쪽을 절단하여 15일 동안 사육한 후 다시 좌, 우 12번째 흉수분절을 절단한 후 그들의 뒷다리의 운동회복과 척수기능의 재생을 관찰하였다. 그 결과 8~9번째 흉수분절의 좌, 우 한쪽만을 절단한 실험쥐는 2~3 일 동안은 간신히 운동할 수 있었으나 14일 이후부터 treadmill위에서 걸을 수 있었다(Fig.13). 그 후 차츰 회복되어 60일이 경과한 뒤에는 거의 회복이 되었다(Fig.14)

또한 반대쪽(contralateral) 12번째의 흉수분절을 절단한 실험쥐에서는 처음에는 뒷다리가 완전히 마비되는 척수충격(spinal shock)증상을 나타냈으나 서서히 척수의 충격에서 회복되고 난 후 뒷다리의 운동은 절단이전의 상태로 회복됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 같은 쪽(ipsilateral)12번째 흉수분절을 절단한 실험쥐에서는 뒷다리에 심한 운동장애를 보여주었으며 반대쪽에 손상을 받은 쥐에 비해서 뒷다리의 기능회복이 훨씬 미약하였다. 또한 동시에 흉수 8번째와 12번째를 절단한 실험쥐는 척수 기능이 회복되지 않아 뒷다리의 기능은 전혀 회복되지 않았다(Fig.15)

고 찰

척수는 뇌와 연속되어 있으며 말초신경과 연결되어 우리 몸의 각종 장기 및 뼈와 근육에 신경을 공급하여 운동과 감각을 조절하는 중요한 역할을 수행하고 있다. 따라서 교통사고를 비롯한 각종 사고와 여러 장해요인에 의하여 뇌와 척수의 특정 부위가 손상을 받아 그 고유 기능이 상실되면 치명적인 결과를 초래하게 된다(Akesson 등, 1998; Cao 등, 2001: Foster 등 1990). 그렇기 때문에 이런 여러 요인에 의하여 발생되는 질병을 치료하기 위한 방편으로 신경과학자들은 신경면역학과 신경조직이식에 관하여 끊임없는 연구를 계속하고 있는 실정이며 이런 노력의 결과 여러 가지 신경원성퇴행질환을 치료하는데 상당한 성과를 얻었다(Cairo 와 Wagner, 1997; Euler 등, 1997; Pranke 등, 2001; Zerman 등, 2001). 그러나 불행하게도 신경원성 퇴행성 질환을 치료하기 위하여 신경세포를 이식해야하는데 이 이식세포를 배아 줄기세포에 의존해야 하는 까닭에 요즈음 줄기세포가 사회적으로 많은 관심을 갖게 되었으나 윤리적인 문제가 제기되어 신경세포이식에 대한 연구가 상당한 제약을 받게 되었다. 따라서 최근에는 배아 줄기세포를 대체할 수 있는 것으로 성체줄기세포인 골수와 사람의 탯줄 혈액세포가 신경세포 및 신경아교세포로 분화, 성장하여 척수질환, 뇌졸증, 빈혈, 신경원성퇴행질환을 치료하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Chen 과 Ende, 2000; Chopp 등, 2000; Craven과 Ward, 1999; Duchossoy 등, 2001; Magnuson 등, 1999; Lu 등, 2002; Sanchez-Ramos 등, 2001; Zigoba 등, 2002). 특히 이들 줄기세포는 종교 및 윤리적인 문제가 없다는 장점이 있어서 앞으로 획기적인 연구의 성과를 얻을 것으로 생각된다.

본 연구에서 사람탯줄혈액 이식군의 결과 척수손상 후 1일에 hUCB세포를 주입한 군과 척수손상 후 5일에 hUCB세포를 주입한 군에서 마비된 실험쥐의 척수운동기능이 유의하게 회복되었으며 수술 직후와는 달리 시간이 경과할수

록 걸음걸이 및 행동이 향상됨을 확인할 수 있었다. 손상 받은 쥐에 따라 차이는 있었으나 꾸준히 운동의 기능이 향상되었으며 3주일 이후부터는 거의 정상에 가깝게 걷는 쥐도 관찰할 수 있었다. 또한 면역조직화학염색 및 형광염색법을 시행한 조직절편에서 꼬리정맥에 주입한 hUCB세포가 척수의 손상받은 부위로 이주하여 신경세포와 신경아교세포로 분화하기 위한 단계로 변형되는 양상을 관찰할 수 있었다. hUCB세포양성반응세포는 척수손상부위에 집중적으로 분포하고 있는 양상을 관찰할 수 있었으나 손상부위의 경계와 손상 받지 않은 정상부위에서는 전혀 관찰할 수 없었다. 일부 연구자들은 뇌의 일정한 부위를 손상시킨 다음 hUCB세포를 이식하여 신경세포와 신경아교세포로 분화하여 신경원성퇴행질환을 치유하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다(Lu 등, 2002; Sanches-Ramos 등, 2001; Saporta 등, 2002; Zigoba 등, 2002). 그러나 비록 hUCB세포를 이용하여 생체(in vitro)에서 척수기능회복에 관한 연구보고가 지금까지 없어서 직접 비교 분석할 수는 없지만 이와 같은 연구결과로 보아 hUCB세포는 마비된 척수기능을 회복시키는데 매우 효과적인 성체줄기세포라고 생각된다.

한편 여러 연구자들이 척수를 손상시킨 다음 2주일 후에 사람신경줄기세포를 직접 손상부위에 이식한 결과 실험쥐의 행동이 매우 양호하였다고 보고하였으며(Akesson 등, 1998; Akiyama 등, 2001; Castellanos 등, 2002; Howland 등, 1995; Hugues 등,2003; Jitka와 Vaclav, 2004) 이는 사람신경줄기세포가 척수 손상부위를 치유하여 척수기능을 회복시킨 것으로 추측되며 이는 신경원성퇴행질환을 치료하기 위하여 앞으로 hUCB세포와 비교하여 계속 연구되어야 할 매우 흥미 있는 대상으로 생각된다.

한편 태생기솔기핵 이식군에서는 정상 흰쥐 척수에 면역화학적염색을 시행하여 serotonin 양성반응 신경섬유의 분포는 주로 숨골의 거대솔기핵 및 창백솔기핵을 걸쳐 내림섬유를 내어 등쪽회색질기둥의 I과 II층에 가장 많이 분포하고 있다고 보고한 여러 연구자들(Bergman 등, 1997; David 등, 2003; Dwaine과 Shelly, 2004; Foster 등, 1990; Hasimoto 와 Fukuda 1991; Nores

등, 1983; Selina 등, 2003)의 보고와 일치 하였다.

Privat(1986)는 20마리의 흰쥐 척수의 흉수분절(T10~12)를 완전히 절단하여 7일 동안 사육한 후 태령 14일에 태생기솔기핵을 이식한 실험동물에서 이식한 부위근처에서 serotonin 양성반응세포 및 섬유들이 다수 출현하였다고 보고하였다. Foster등(1990)은 태령 13~14일된 중뇌솔기핵과 숨뇌솔기핵을 숙주의 척수에 이식하여 12개월 동안 사육한 후 검사한 결과 serotonin과 substance P등을 함유한 양성반응 신경세포와 돌기들이 관찰되었으며, 이식한 위, 아래 약 1.5㎝까지 연장되어 있었으며 등쪽회색질기둥의 I, II층에 주로 분포해 있고, 많은 양성반응의 신경세포들이 신경얼기를 형성하며 백색질의 배쪽섬유단과 외측섬유단에도 신경얼기를 형성 한다고 보고하였다. 이들의 결과는 저자의 실험결과와 일치하였다. Pallini 등(1989)은 태령 13~14일된 태아척수조직을 동종의 어미 쥐 척수에 이식하여 12주 후에 조직화학적방법, 신경로추적방법 등을 이용하여 분석한 결과 이식부위에서 serotonin 양성반응 신경세포들이 분포한다고 보고하였느데 이는 저자의 연구 결과와 일치 하였다.

Nores등(1983)은 척수회색질에 작은 중심공간을 만들어 상청액의 신경조직을 이식하는 방법과 척수회색질의 등쪽외측 ⅓을 제거한 후 신경덩어리를 이식하는 방법, 그리고 척수를 완전히 절단한 후 신경조직덩어리를 이식하는 방법등으로 실험을 하였는데 이중 중심공간에 상청액의 신경조직을 이식한 방법이 혈액공급을 충분히 받을 수 있기 때문에 생존율이 제일 좋았다고 보고 하였는데 이는 저자의 실험결과와 일치하였다.

결 론

사람탯줄 혈액세포 이식군에서 압박 손상 받은 실험쥐의 척수에 꼬리정맥에 주입하였을 때 마비된 척수기능이 회복되는 것을 관찰할 수 있었으며 특히 척추손상 후 5일에 hUCB세포를 주입한 실험군이 기능회복이 가장 양호하였다. 광학 및 형광 면역세포화학적 염색을 하여 관찰한 결과 척추의 손상부위에서 hUCB세포에 반응하는 MAB1273 양성세포를 관찰할 수 있었다.

태생기 솔기핵 이식군에서는 척수를 절단한 실험쥐에 태령 13~15일된 태생기솔기핵을 이식한 실험군에서 손상부위는 물론 절단 부위 아래에서도 serotonin 양성반응 신경섬유를 관찰할 수 있었으며 숙주의 신경조직과 연결되어 등쪽회색질기둥의 I, II층과 흉수와 요수분절의 배쪽회색질기둥의 IX층 그리고 자율신경의 중간외측세포기둥 부위에 신경절이전신경원이 집중적으로 출현하였다.

결론적으로 척수에 손상을 받아 기능이 마비되었을 때 hUCB세포와 태생기 솔기핵을 이식하여 척수의 형태학적 복원은 물론 기능적으로 회복되는 것을 확인하였으며,향후 계속적인 줄기세포의 연구는 척수 질병으로부터 고통 받고 있는 수많은 환자들의 치료에 획기적인 성과를 기대 할 수 있을 것으로 예상된다.

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.*

Akiyama Y, Honmou O, Kato T, Uede T, Hashi K, Kocsis JD : Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord, *Exp Neurol 167:27-39, 2001.*

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.*

Basso DM, Beattle MS, Bresnahan JC : A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats, *J Neurotrauma 12:1-21, 1995.*

Bregman BS, McA tee M, Dai HN, Kuhn PL : Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat, *Exp Neurol 148:475-494, 1997.*

Cao, QL, Zhang YP, Howrad RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR : Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage, *Exp Neurol 167:48-58, 2001.*

Cairo MS, Wagner JE : Placental and or umbilical cord blood : an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation, *Blood 90:4665-4678, 1997.*

Castellanos DA, Tsoulfas P, Frydel BR, Gajavelli S, Bes JC, Sagan J : TrkC overexpression enhances survival and migration of neural stem cell transplants in the rat spinal cord, *Cell Transplant 11:297-307, 2002.*

Chen R. Ende N, : The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice, *J Medicine 31:21-30, 2000.*

Chopp M, Zhang Xu, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosemblum M : Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation, *NeruroReport 11:3001-3005, 2000.*

Craven CM, Ward K : Transfusion of fetal cord blood cells: an improved method of hematopoietic stem cell transplantation, *J Reproductive Immunology 42:59-77, 1999.*

David IH, Dugald TS, Andrew JT, John SR : Lack of evidence for sprouting of Aß afferents into the superficial laminas of the spinal cord dorsal horn after nerve section, *J Neuroscience 23(29):9491-9499, 2003.*

Duchossoy Y, Kassar-Duchossoy L, Orsal D, Stettler O, Horvat C : Reinnervation of the biceps brachii muscle following cotransplantation of fetal spinal cord and autologous peripheral nerve into the injured cervical spinal cord of the adult rat, *Exp Neurol 167:329-340, 2001.*

Dwaine FE, Shelley RW : Neuroprotective effects of encapsulated CNTF-producing cella in a rodent model of huntington's disease are dependent on the proximity of the implant to the lesioned striatum, *Cell Transplant 13:253-259, 2004*

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 spinal cord after implantation of embryonic 5HT- and substance P-containing raphe neurones, *Brain Res 82:247-259, 1990.*

Hartley RS, Trojanowski JQ, Lee VMY : Differential effects of spinal cord gray and white matter on process outgrowth from grafted human NTERA2 neurons, *J Comp Neurol 415:404-418, 1999.*

Hasimoto T, Fukuda N : Contribution of serotonin neurons to the functional recovery after spinal cord injury in rats, *Brain Res 539:263-270,1991.*

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.*

Hugues L, Marion L, Didier O, Serge R : Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse, *J Neuroscience 23(36):11411-11419, 2003.*

Jakeman L, Reier PJ, Bregman BS, Wade EB, Daily M, Kastner RJ, Himes BT, Tessler A : Differentiation of substantia gelatinosa-like regions in intraspinal and intracerebral transplants of embryonic spinal cord tissue in the rat, *Exp Neurol 103: 17-33,1989*

Jitka O, Vaclav O : Graft-induced plasticity in the mammalian host CNS, *Cell Transplant 13:307-318, 2004.*

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.*

Magnuson DSK, Trinder TC, Zhang YP, Burke D, Morassuti D, Shields C: Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumber spinal cord of the rat, *Exp Neurol 156;191-204,1999.*

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.*

Molokanova EA, Tamarova ZA : The effects of dopamine and serotonin on rat dorsal root ganglion neurons : An intracellular study, *Neuroscience 65(3):859-867, 1995.*

Nores H, Bjorklund A, Stenvi U : Rainnervation of the denervated adult spinal cord of rat by intraspinal transplants of embryonic brain stem neurons, *Cell Tissue Res 230;15-35,1983.*

Pallini R, Fernandz E, Gangitano C, Del Fa A, Olivieri SC, Sbriccoli A: Astudies on embryonic transplants to the transected spinal cord of adult rats, *J Neurosurg 70:454-463,1989.*

Pranke P, Failace RR, Allebrandt WF, Steibel G, Schmidt F, Nardi NB : Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood, *Acta Haematologica 105:71-76, 2001.*

Privat A, Mansour H, Geffard M : Transplantation of fetal seroronin into the transected spinal cord of adult rats : Morphological development and functional influence. *Brain Res 78:155-165, 1988.*

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.*

Saporta S, Makoui AS, Willing AE, Daadi M, Cahill DW, Sanberg PR : Functional recovery after complete contusion injury to the spinal cord and transplantation of human neuroteratocarcinoma neurons in rats, *J Neurosurg 97:63-68, 2002.*

Selina AP, Abdeslam M, Quentin JP, Patrick JW : Peptidergic activation of locomotor pattern generators in the neonatal spinal cord, *J neuroscience 23(31):10154-10163, 2003.*

Sieradzan K, Vrbova G : Replacement of missing motoneurons by embryonic grafts in the rat, *Neuroscience 31:115-130, 1989.*

Sieradzan K, Vrbova G : The ability of developing spinal neurons to reinnervate a muscle through a peripheral nerve conduit is enhanced by cografted embryonic spinal cord, *Exp Neurol 122:232-243, 1993.*

Zagon A : Innervation of serotonergic medullary raphe neurons from cells of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Neuroscience 55(3):849-867, 1993.*

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 antigens after transplantation into the developing rat brain, *Cell Transplant 11:265-274, 2002.*

Legends for Figures

Fig. 1. Identification of hUCB in compressed spinal cord immunohistochemical stained with mouse anti-human mitochondria monoclonal antibody (MAB1273).

A: hUCB were injected into the tail vein 1 day compression injury. we can observed immuno-positive hUCB for the MAB1273(arrows).

C: hUCB were injected into the tail vein 3 days compression injury. we could observed numerous immuno- positive hUCB for the MAB1273(arrows).

E: hUCB cells were injected into the tail vein 5 days compression injury. we can observed numerous immuno-positive hUCB for the MAB1273(arrows).

B,D,F(right panel) were of the contralateral spinal cord, in which immuno-positiv hUCB were not found.

Fig. 2. Identification of the hUCB in compressed spinal cord. hUCB, prelabeled with FITC-conjugated cholera toxin, were injected into the tail vein 1, 3, 5 days after compression injury. Fluorescent hUCB (MAB1273,arrows) are seen within the injured spinal cord at 5(A), 3(C), 1(E)days post-injection. Right panel(B,D,F) is of the contralateral spinal cord(intact spinal cord), in which fluorescent hUCB were not found.

Fig. 3. The coronal section of midbrain. Serotonin immunoreactive neurons in the dorsal raphe nucleus of the mesencephalic raphe group. X 30

Fig. 4. The coronal section of midbrain. Serotonin immunoreactive neurons in the nucleus raphe magnus of the medullary raphe group. X 30.

Fig. 5. The coronal section of midbrain. Serotonin immunoreactive neurons in the nucleus raphe pallidus of the medullary raphe group. X 60.

Fig. 6. The transverse section of longitudinal serotonin immunoreactive fiber bundle in the lateral funiculus. Abundunt dot like and beaded shape serotonin fibers run craniocaudally. X 30.

Fig. 7. The transverse section of cervical(7A), thoracic(7B), lumber(7C) and sacral(7D)regions. Intact spinal cord shows density aggregated serotonin immunoreactive fibers in the gray matter and white matter. X 100.

Fig. 8. The transverse section L1. Note non-transplanted animal showed a total absence of serotonin immunoreactivity below the section. X 100.

Fig. 9. The sagittal section of spinal cord reacted with serotonin antiserum. X 60.

9A: In the grafted area(T8), 10 days after transplantation, everal immunoreactive fibers show well developed processes.

9B: In the 10mm below the grafted area. 20 days after transplantation, many immunoreactive fibers show well developed processes.

9C: In the 15mm below the grafted area, 30 days after transplantation, densely innervation with varicose fibers shows well developed fibers.

Fig. 10. The sagittal section of lateral funiculus of the thoracic spinal cord shows numerous beaded descending serotonin immunoreactive fibers. X 60.

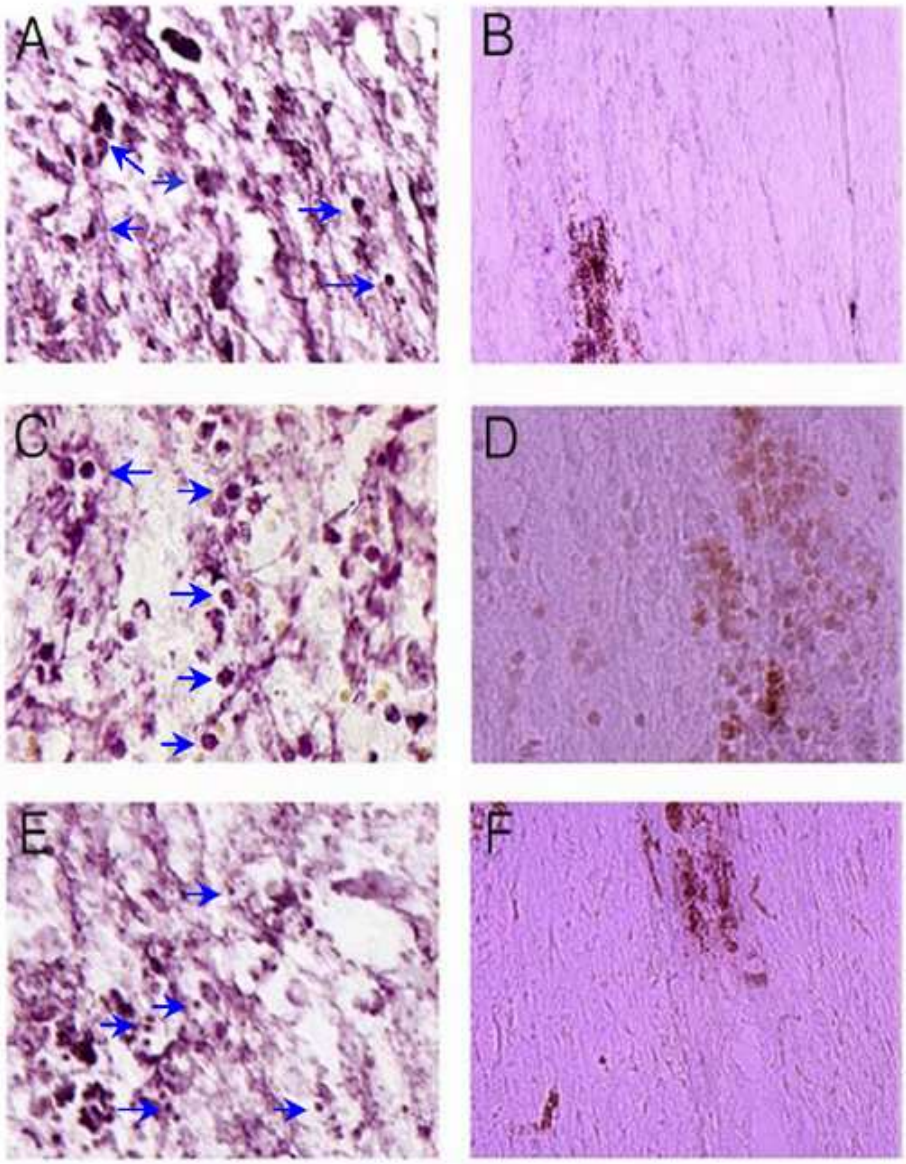
Fig. 11. The transverse section of thoracic spinal cord. Two month after transplantation, the intermediolateral area and surrounding central canal were densely innervation with varicose fibers. X 100.

Fig. 12. The transverse section of lumber spinal cord. Many serotonin immunoreactive fibers from the lateral funiculus and ventral funiculus show in the white matter. X 100.

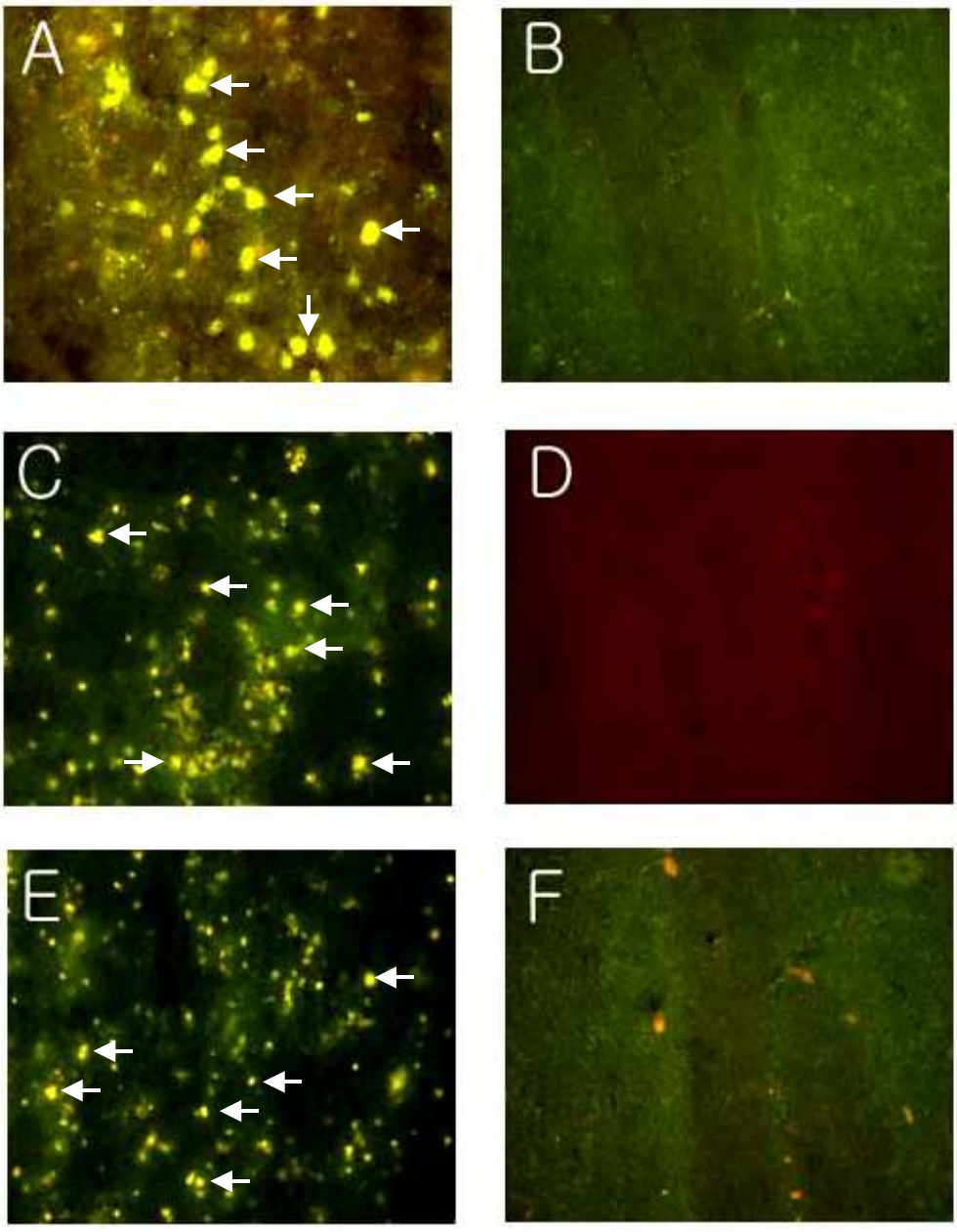
Fig. 13. In the normal animals, the right fore-and hindlimbs trajectories during two step cycle were superimposed and plotted. The animal is walking from left to right.

Fig. 14. The stick diagram of two step cycle of right fore-and hindlimbs obtained from the T8 hemisected animal. This animal recovered forelimb trajectories was similar to that of a normal animal.

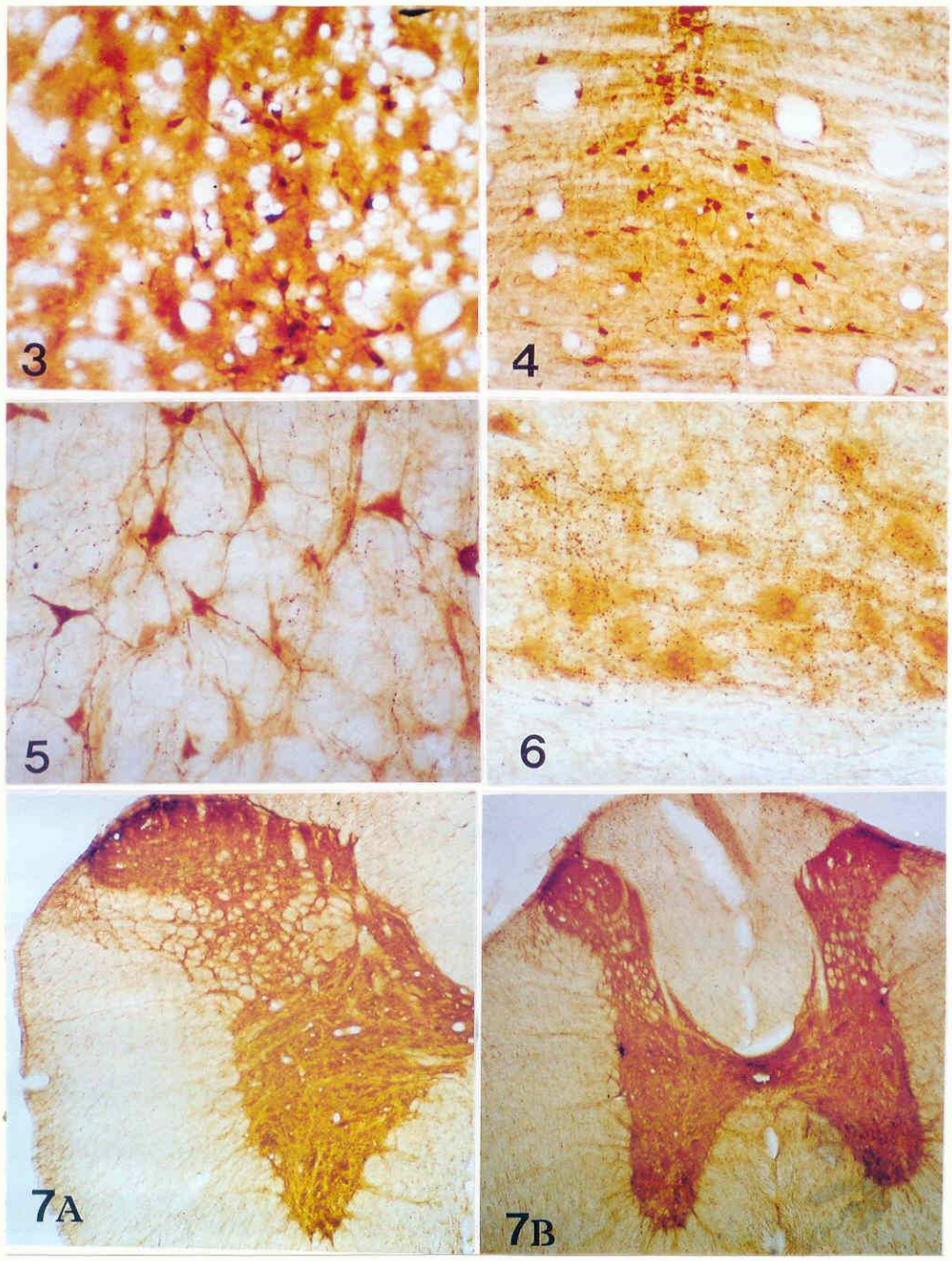
Fig. 15. The right fore-and hindlimbs trajectories from the bilateral hemisected(T8, T12) animal. This animal exhibited low posture short gaits, and no fore-and hindlimbs locomotion.



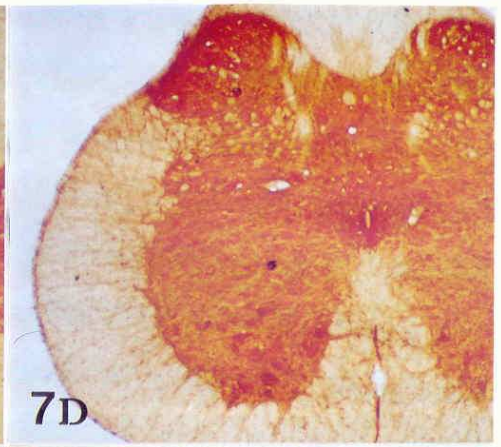
1

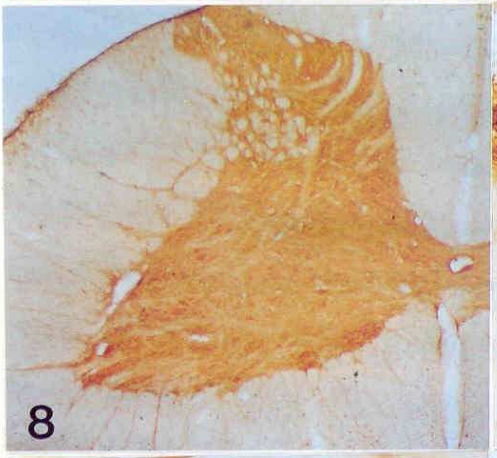


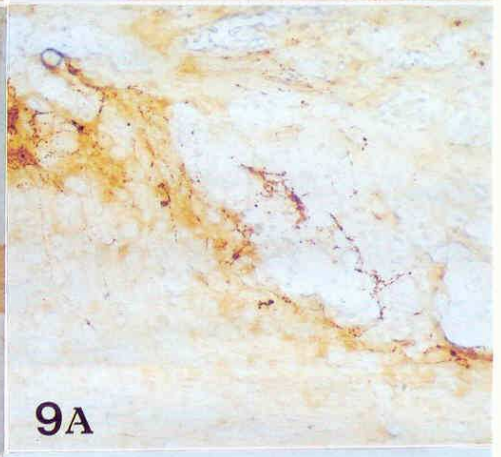
2

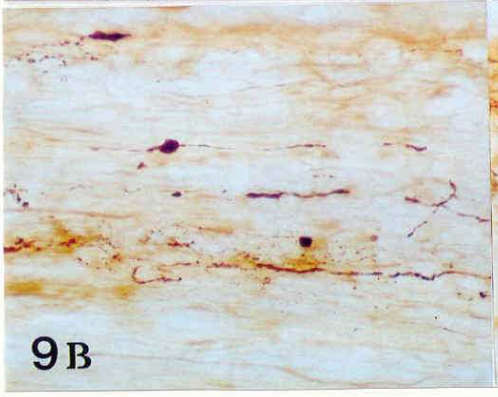

3
4
5
6
7A
7B

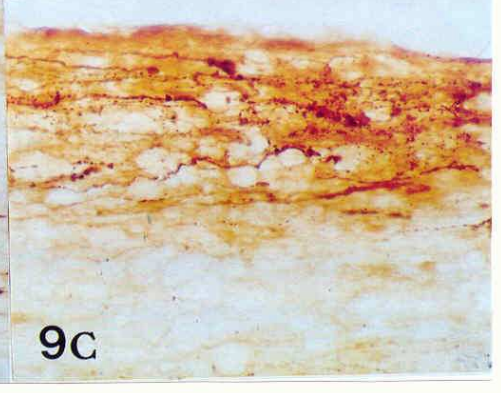
7C

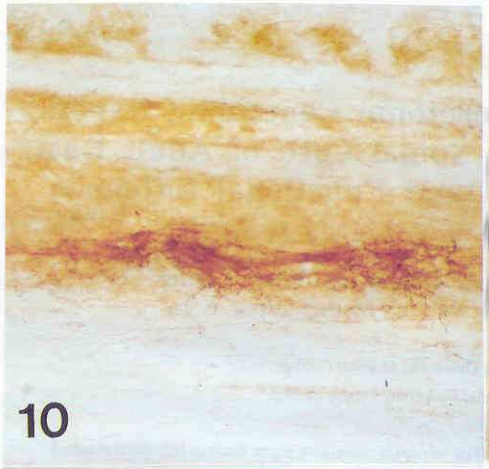

7D


8

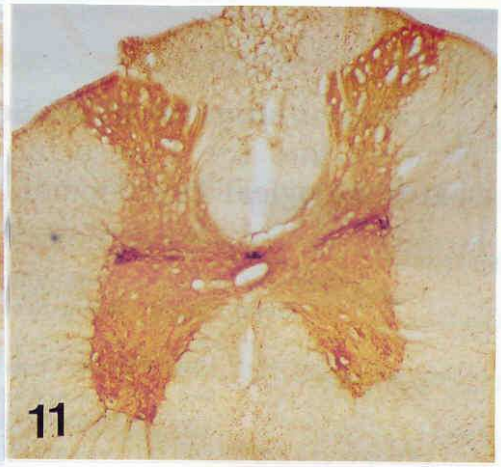

9A


9B

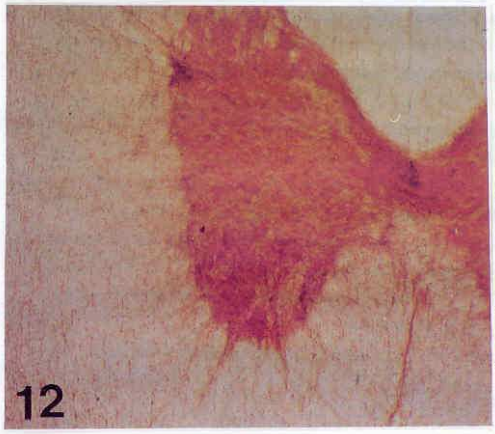

9C



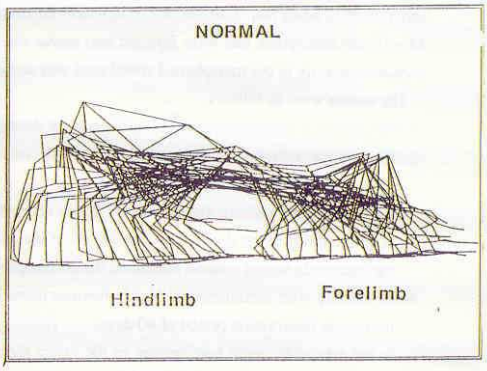
10



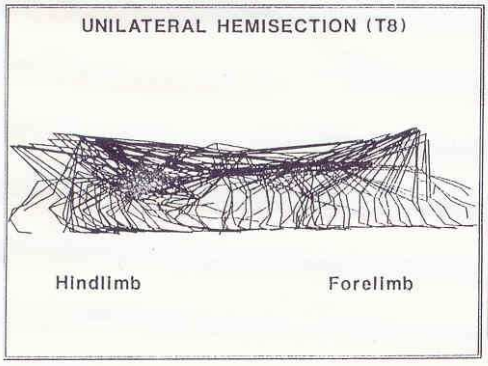
11



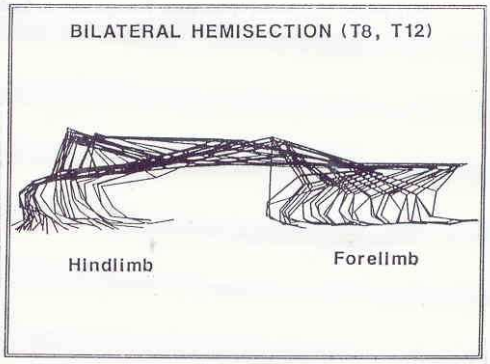
12



13



14



15