

흰쥐 광 혈전 뇌경색 모델에서 줄기세포 추적에 위한 자화강조영상

Susceptibility Weighted Image for Stem Cell Tracking in Rat Photothrombotic Infarction

하본철*, 임청환**

중앙대학교병원 영상의학과*, 한서대학교 방사선학과**

Bon-Chul Ha(bcha72@naver.com)*, Cheong-Hwan Lim(lch116@hanseo.ac.kr)**

요약

사람 중간엽 줄기세포(hMSCs)를 초상자성산화철(SPIO)로 표지하여, 체외에서 세포 농도에 따른 신호의 변화를 알아보고, 흰쥐 광 혈전 뇌경색 모델에 이식하여 자기공명영상 기법 중, T2강조영상과 T2*강조영상 그리고 자화강조영상의 줄기세포 검출능을 분석하고, 병리 소견과 비교하고자 하였다. 체외실험은 SPIO(Feridex I.V.[®])로 표지한 줄기세포 1.56×10^4 , 3.13×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 개/ml, SPIO로 표지 하지 않은 5×10^5 개/ml의 세포를 Control로 준비하여 0.5ml 튜브에 담아 T2WI, T2*WI, SWI sequence로 자기공명영상을 얻었다. 체내실험은 8마리의 흰쥐를 대상으로 정수리점(bregma)에서 우측으로 2.5mm, 뒤쪽으로 2.5mm 부위에 광 혈전 뇌경색을 만들고, SPIO-hMSC 2.5×10^5 개/ml, 1ml을 꼬리 정맥에 주입하여 실험하였다. 자기공명영상은 주입 전과 주입 후 1, 3, 7 그리고, 14일째 T2WI, T2*WI, SWI 영상을 얻고 정량적으로 평가하였다. 자기공명영상검사 후 흰쥐는 조직검사를 위해 희생시켰다. 체외실험 결과 CNR은 SWI, T2*WI, T2WI 순으로의 높게 나왔고, 세포 농도에 따라서는 2.5×10^5 개/ml의 농도에서 가장 높게 나왔다. 체내실험에서 normal, infarction, SPIO 상호간의 CNR을 분석해본 결과 normal-infarction의 CNR은 T2WI가 가장 높게 나왔고, normal-SPIO 그리고 infarction-SPIO에서 CNR은 SWI, T2*WI, T2WI순으로 나왔다. 따라서 흰쥐를 이용한 실험에서 T2WI sequence는 infarction을 잘 표현해 주고, SWI는 SPIO로 표지한 줄기세포를 normal과 infarction으로 부터 잘 구별해 주었다. 현재 임상에서 SWI는 출혈, 석회화 병변 등을 쉽게 찾아내는 sequence로 사용 되고 있지만 향후에 줄기세포 치료가 인간의 질병을 치료하는 주요 방안으로 자리 잡을 때에도 이식된 줄기 세포를 관찰 할 수 있는 좋은 도구가 될 것으로 기대 된다.

■ 중심어 : | 자화강조영상 | 사람 중간엽 줄기세포 | 광 혈전 | 초상자성산화철 | 대조도잡음비 |

Abstract

To the detect of SPIO-labelled hMSC, *in vitro* study on various cell concentration and *in vivo* molecular magnetic resonance imaging(MRI) technique using T2, T2* and SWI are compared with pathology. Cell concentration was 1.56×10^4 , 3.13×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 cells/ml and for control 5×10^5 cells/ml. MRI technique using T2, T2* and SWI. Photothrombotic infarction was located 2.5mm from bregma right, posterior. Cell injected through the tail vein of rat for 8 rats. MRI performed pre injection and post injection of 1, 3, 7 and 14days and sacrifice for pathology. MRI analysed on quantitatively. *In vitro* result, SWI was highest CNR as compared with T2*WI, T2WI and 2.5×10^5 cells/ml cell concentration. *In vivo* result among the T2WI, T2*WI, SWI, T2WI is highest CNR between normal and infarction. CNR in normal-SPIO and infarction-SPIO is high score in SWI. Therefore, T2WI is good distinguish between normal and infarction, SWI are well detect SPIO-labelled hMSC from normal and infarction. Nowadays, SWI are mostly used on hemorrhage, calcification etc. in clinically, but for the future, stem cell therapy is commonly application at all disease which is good observing tool for SPIO-labelled stem cells.

■ keyword : | SWI | hMSC | Photothrombotic Infarction | SPIO | CNR |

* 이 논문은 2009년도 한서대학교 교비 학술연구 지원 사업에 의하여 연구되었음.

접수번호 : #100622-002

심사완료일 : 2010년 08월 01일

접수일자 : 2010년 06월 22일

교신저자 : 임청환, e-mail : lch116@hanseo.ac.kr

I. 서론

유전적 원인과 후천적으로 흡연, 비만, 고지혈증, 불규칙한 식습관 등에 의해 혈관계질환(동맥경화 등)이 증가함에 따라 뇌졸중등 치사율이 높고, 치유가 되더라도 심각한 장애를 남기는 신경계질환들이 늘어가고 있다.

뇌졸중 등 신경계 질환은 후유장애가 심각하여 이를 극복하기 위해 많은 노력을 하고 있지만 신경세포는 한번 죽으면 재생되지 않는 특징이 있어 죽기직전의 세포를 약물이나 기계적으로 막힌 혈관을 뚫어 살리는 방법과 더 이상 병이 진행하지 못하도록 하는 방향으로 이루어진다.

최근에는 이러한 소극적인 치료법이 아닌 신경세포로 분화할 수 있는 세포를 체외에서 주입하여 근지적인 치료를 할 수 있는 줄기세포 치료법에 관심이 모아지고 있다. 줄기세포는 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되는 세포로서, 그 특징은 반복 분열하여 자가 재생산(self-renewal)할 수 있고, 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는 세포를 말한다[1].

줄기세포 치료법은 뇌졸중, 뇌종양 등 여러 뇌신경계 손상 질환에서 영양인자를 발현해서 기능장애를 보이는 신경원을 구하거나, 신경원이나 아교세포로 분화해서 손상된 세포를 대체할 수 있다는 점에 기반을 두고 있고[2], 이러한 획기적인 치료법을 인체에 적용하기 위해서는 이식된 세포의 이동(migration), 경로(track), 분화(proliferation), 치료성적 등에 대한 정보를 가지고 있어야 하므로 이와 관련된 동물 실험을 많이 하고 있다.

생체에 주입 한 줄기세포의 이동 경로는 사후 조직병리학적 방법으로 확인할 수 있다. 그러나 조직병리학적 방법은 이동하는 줄기세포들을 연속적으로 보여주지 못하고, 침습적이며, 단지 결과를 가지고 추론할 수밖에 없다는 단점이 있다[3].

한편, 분자 영상법(molecular imaging)은 살아있는 생체에서 목적한 세포를 관찰하는 것이다. 따라서 이식된 줄기세포의 생물학적 변화(biological process)를 동물의 희생 없이 반복적으로 평가하는 것이 가능하다[4].

생체 분자 영상 연구에 자기공명영상(Magnetic Resonance Imaging; MRI)이 주목받는 이유는 핵의학 검사, 광학영상 등 타 영상법에 비해 해상도 및 대조도가 높고 심부 장기 영상과 3차원 정보 제공이 실시간으로 가능하다는 장점이 있기 때문이다. 또, 자기공명영상은 세포와 세포조직의 분자, 대사, 생리 정보와 구조 정보를 동시에 제공 할 수 있다[5].

MRI를 이용하여 목적이 되는 세포를 관찰하기 위해 세포 내에 초상자성산화철(SuperParamagnetic Iron Oxide; SPIO) 또는 미세 초상자성산화철(UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxide; USPIO)을 탐식시켜 생체 내에서 추적(in vivo tracking)을 시도하는 연구가 많이 진행되어 왔다[5].

MRI를 이용하여 이식된 세포를 관찰하는 방법으로는 T1강조영상, T2강조영상, T2*강조영상 등을 많이 사용 하였는데, 이들 sequence는 소량의 세포는 영상으로 잘 보여주지 못했다. 그러나 자화율의 변화에 더욱 민감한 자화강조영상(Susceptibility Weight Image ; SWI)을 이용하면 SPIO로 표지된 이식된 세포를 좀 더 용이하게 관찰할 수 있을 것으로 예상된다.

현재, 생체에 이식된 줄기세포를 관찰하기 위한 동물 실험에 자기공명영상을 많이 이용하고 있지만, 자기공명영상은 이식된 세포 자체를 영상화하기에는 한계가 있어서, 이식할 동물과 세포의 손상이 없으면서 자화율에 의한 조영 효과가 뛰어난 초상자성산화철(SPIO)을 줄기세포에 표지하여 실험한다. 지금까지 SPIO로 표지한 줄기세포를 관찰하기 위한 동물실험에서 여러 가지 자기공명영상 기법들이 사용되었지만, 자화강조영상을 이용하여 이식된 세포를 관찰한 연구가 없었다.

본 연구에서는 체외 상태(*in vitro*) 및 흰쥐의 광 혈전 뇌경색 모델에서 사람 중간엽 줄기세포를 초상자성산화철로(SPIO) 표지 한 후 줄기세포의 추적에 자화강조영상과 다른 자기공명영상 sequence를 비교하고, 병리 소견과 검토하여 자기공명영상을 이용한 줄기세포 추적에 유용한 자료를 제공하고자 한다.

II. 대상 및 방법

사람의 골수에서 유래한 중간엽 줄기세포 (hMSC-bm 7500 ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 구매하여 이용하였다. 37°C 온도와 95% 공기, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서, T75 세포배양 플라스크를 이용하여 배양하였으며, 10% FBS, 200 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 사용하였다. 배지는 3일에 한 번씩 교환해 주었다. 세포가 성장하기 전에 계대배양을 하였고, 80% 정도의 세포성장에서 SPIO 나노입자를 사용하여 표지하였으며, 4~6번의 계대 배양을 실험에 사용하였다. MRI에서 세포의 이동과 분포를 관찰하기 위해 hMSC를 MRI 조영제로 세포를 표지 (labeling) 하였다. 사용한 조영제는 Feridex I.V.[®] (Ferumoxide; Advanced Magnetix Inc, Cambridge, MA, USA)이었다[7]. hMSC-bm에 Feridex I.V.[®]가 잘 표지 되었는지, 그리고 세포 농도의 변화에 따른 MRI 영상의 신호 변화를 확인하기 위하여 세포 MRI를 시행하였다. 표지된 세포는 PBS로 2회 세척하고, 0.25% Trypsin-EDTA로 3분간 처리하였다. Feridex I.V.[®]로 표지한 hMSC-bm를 각각 1.56 × 10⁴, 3.13 × 10⁴, 6.25 × 10⁴, 1.25 × 10⁵, 2.5 × 10⁵ 그리고, 5 × 10⁵ 개/ml씩 0.5 ml를 튜브에 옮겨, 12,000rpm에서 3분간 원심 분리하여 침사(pellet)를 만들었다. 비교를 위해 SPIO로 표지 하지 않은 5 × 10⁵ 개/ml, 0.5 ml의 세포를 준비하였다. 각 튜브에 PBS가 가득 채워진 상태로 다시 증류수가 담긴 상자에 기포가 생기지 않도록 넣어 3.0T MRI장치(Achieva; Philips, Eindhoven, The Netherlands)를 이용하여 T2강조영상(TR 2128msec, TE 80msec, flip angle 90°, FOV 250×250mm, matrix size 700×625, thickness 1mm, gap 1mm, NEX 8), T2*강조영상 (TR 656msec, TE 9.2msec, flip angle 30°, FOV 250×250mm, matrix size 676×676, thickness 1mm, gap 1mm, NEX 1), SWI(TR 31.5msec, TE 41.5msec, flip angle 10°, FOV 250×250mm, matrix size 480×486, thickness 1mm, gap 1mm, NEX 2) 검사기법으로 영상을 획득하였다[표 1].

표 1. 세포 MR영상을 위한 자기공명영상의 매개변수

P Se	TR (ms)	TE (ms)	f/a (°)	FOV (mm)	matrix size	th. (mm)	gap (mm)	NEX
T2WI	2128	80	90	250×250	700×625	1	1	8
T2*WI	656	9.2	30	250×250	676×676	1	1	1
SWI	31.5	41.5	10	250×250	480×480	1	1	2

P : Parameter, Se : Sequence, f/a : flip angle, th. : thickness

흰쥐는 에어레인액[®](Isoflurane, 일성신약, 서울, 한국) 5%로 마취를 유도하고, 1.5~2%로 유지하여 흡입 마취 상태에서[8] 모델을 제작하였다. 옆드린 자세로 흰쥐 머리를 정위고정기(stereotactic system; Stoelting, illinois, USA)에 고정시켰다. 두피(scalp)를 앞뒤방향으로 1.5cm 절개하고, 뼈막(periosteum)을 박리하여 머리 뼈를 노출 시켰다. 냉광선(Cold light) 발생기 (Fiber-Lite MI-150; Dolan Jenner Co., South carolina, USA)의 fiber optic guide를 정수리점(bregma)에서 우측으로 2.5mm 뒤쪽으로 2.5mm 부위의 표면에 밀착시켰다. 냉광선 발생기의 직경은 5mm, 빛의 파장은 400~670nm 이고 색온도는 3,200°K 이었다.

로즈벵갈 20 mg/kg 농도로 1ml의 생리식염수에 혼합하여 꼬리 정맥으로 90초 동안에 걸쳐 천천히 투여한 후, 즉시 냉광선을 15분간 조사하여 대뇌반구 국소 광혈전 뇌경색 모델을 만들었다. 수술 중 체온조절이 가능한 항온담요(homeothermic blanket control unit; Harvard Apparatus, Massachusetts, USA)로 흰쥐의 직장내의 온도를 37°C로 맞추어 놓고 체온을 유지시켰고, 수술 후에 피부를 4-0 견사(silk)로 봉합해주었다. SPIO로 표지된 사람 중간엽 줄기세포 hMSC-bm 2.5 × 10⁵ 개/ml를 1ml의 생리식염수에 준비하여 24G 주사바늘(Introcan Celto; B Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)로 90초 동안 천천히 꼬리 정맥에 주입하였다. 마취는 케타라 (ketamine hydrochloride, 유한양행, 서울, 한국) 100mg/kg 과 립퐁(xylazine hydrochlorode, 바이엘코리아, 안산시, 한국) 10mg/kg 을 혼합하여 근육 주사하였다. 3.0T MRI (Philips)와 wrist 코일 (SENSE-wrist-4; Philips)을 이용하여 옆드린 자세로, T2강조영상 (TR 4,709msec, TE 80msec, flip angle 90°, FOV 50×50mm, matrix size

200×200, slice thickness 1mm, gap 1mm, NEX 4), T2* 강조영상 (TR 707msec, TE 23msec, flip angle 18°, FOV 50×50mm, matrix size 200×200, slice thickness 1mm, gap 1mm, NEX 4), SWI(TR 39msec, TE 51.8msec, flip angle 15°, FOV 50×50mm, matrix size 128×128, slice thickness 1mm, gap 1mm, NEX 3) 검사 기법을 이용하여 뇌 MRI 영상을 얻었다[표 2].

표 2. 흰쥐 MR영상을 위한 자기공명영상의 매개변수

Se	P	TR (ms)	TE (ms)	f/a (°)	FOV (mm)	matrix size	th. (mm)	gap (mm)	NEX
T2WI	470 ₉	80	90	50×50	200×200	1	1	4	
T2*WI	707	23	18	50×50	200×200	1	1	4	
SWI	39	51.8	15	50×50	128×128	1	1	3	

P : Parameter, Se : Sequence, f/a : flip angle, th. : thickness

그룹에 따라 광 혈전 뇌경색 모델 만든 후 2일째 (줄기세포 주입 하루 전), 주입 후 1일, 3일, 7일 그리고, 14 일째에 각각 영상을 얻었다. 얻어진 각각의 영상을 정량적으로 분석하다. 그리고 자료처리는 통계 패키지 프로그램 SPSS(Statistical Package for the Social Science)를 이용하였으며, sequence(T₂WI, T₂*WI, SWI)별 흰쥐의 유의성 검정은 friedman test를 하였고, Multiple comparison은 Bonferroni test를 이용하였다.

III. 결 과

1. 표지 세포의 평가

Feridex I.V.[®]로 표지한 hMSC-bm를 1.56×10^4 , 3.13×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 그리고, 5×10^5 개/ml씩 나누어 얻은 세포 MRI의 SNR은 T2강조영상에서 97.48, 70.77, 68.23, 59.01, 52.65 그리고, 38.68이었고, T2*강조영상에서는 54.81, 35.00, 31.37, 23.33, 13.65, 16.51이었으며, SWI에서는 54.46, 32.77, 28.67, 21.93, 20.48, 22.89이었다[표 3].

표 3. 세포 농도에 의한 촬영기법 별 신호대 잡음비 (N=8)

S	cells/ml	control	1.56×10^4	3.13×10^4	6.25×10^4	1.25×10^5	2.5×10^5	5×10^5
T2WI	140.23	97.48	70.77	68.23	59.10	52.65	38.68	
T2*WI	292.55	54.81	35.00	31.70	23.33	13.65	16.51	
SWI	426.99	54.45	32.77	28.67	21.93	20.48	22.89	

S : sequence

SPIO를 표지하지 않은 5×10^5 개/ml 세포(control)와의 CNR은 T2강조영상에서 42.75, 69.46, 72.00, 81.13, 87.58, 101.55이었고, T2*강조영상에서는 237.74, 257.55, 260.85, 269.21, 278.90, 276.04이었으며, SWI에서는 372.55, 394.22, 398.31, 405.06, 406.51 그리고, 404.10이었다[표 4].

표 4. 세포 농도에 의한 촬영기법 별 대조도대 잡음비 (N=8)

S	cells/ml	control	1.56×10^4	3.13×10^4	6.25×10^4	1.25×10^5	2.5×10^5	5×10^5
T2WI	0.00	42.75	69.46	72.00	81.13	87.58	101.55	
T2*WI	0.00	237.74	257.55	260.85	269.21	278.90	276.40	
SWI	0.00	372.53	394.22	398.31	405.06	406.51	404.10	

S : sequence

SPIO로 표지된 세포의 각각의 검사기법에 따른 농도 별 영상[그림 1-A,B,C]과 control hMSC는 H&E staining[그림 1-E]에서 세포질과 세포핵이 잘 관찰되었고, SPIO-hMSC는 Prussian blue staining[그림 1-F]에서 푸르게 보이는 것으로 보아 SPIO가 잘 표지된 것을 알 수 있었다[그림 1].

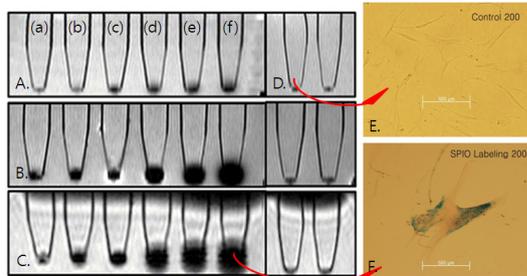


그림 1. 세포 농도에 의한 촬영기법별 세포 MR영상

- A. T2 강조영상
- B. T2*강조영상
- C. 자화강조영상
- D. control(5×10^5 cells/ml)
- E. H & E staining
- F. Prussian blue iron staining
- (a) 1.56×10^4 cells/ml, (b) 3.13×10^4 cells/ml,
- (c) 6.25×10^4 cells/ml, (d) 1.25×10^5 cells/ml,
- (e) 2.5×10^5 cells/ml, (f) 5×10^5 cells/ml

2. 체내 MRI의 정량적 평가

1) Normal 부위에서 각 sequence 별 SNR

뇌경색 반대쪽 대뇌 반구의 정상 부위에서 뇌실 (ventricle)과 큰 혈관 부위를 피하여 ROI를 설정하고 SNR을 측정된 결과, 세포 주입 전 영상의 T2WI, T2*WI, SWI에서 13.10 ± 2.29, 13.98 ± 1.38, 17.72 ± 2.03 이었고, 주입 후 1일째 얻은 영상에서는 12.32 ± 0.17, 14.43 ± 0.94, 16.87 ± 2.32 이었으며, 3일째 영상에서는 12.02 ± 1.88, 13.72 ± 2.24, 18.40 ± 4.78 이었고, 7일째 영상에서는 12.54 ± 1.28, 14.06 ± 1.67, 18.14 ± 2.11, 그리고 14일째 영상에서는 13.79 ± 3.67, 14.53 ± 1.27, 17.91 ± 1.06 이었으며 통계적으로 유의하였다(p < .05)[표 5].

2) Infarction 부위에서 각 sequence 별 SNR

뇌경색 부위에서 부종으로 의심되는 부위를 피하여 가능한 크게 ROI를 설정하여 SNR을 측정된 결과, 세포 주입전 영상의 T2WI, T2*WI, SWI에서 각각 25.83 ± 5.42, 20.35 ± 2.17, 26.35 ± 2.90 이었고, 주입 후 1일째 영상에서는 21.42 ± 2.11, 20.32 ± 2.71, 23.02 ± 4.40 이었으며, 3일째 영상에서는 19.02 ± 3.20, 18.94 ± 2.59, 24.15 ± 4.35이었고, 7일째 영상에서는 16.49 ± 2.35, 17.96 ± 1.79, 22.35 ± 4.09, 그리고 14일째 영상에서는 각각 18.00 ± 5.23, 15.86 ± 1.42, 19.49 ± 2.55 이었으며 데이터는 통계적으로 유의하였다(p < .05)[표 5].

3) SPIO 부위에서 각 sequence 별 SNR

뇌경색 주변에 검은 띠를 형성하며 SPIO로 표지된 줄기세포가 있을 것으로 보이는 저 신호부위에 ROI를 설정하고 SNR을 측정된 결과, 세포 주입 후 1일째 영상의 T2WI, T2*WI, SWI에서 각각 11.16 ± 3.49, 7.91 ± 2.76, 5.36 ± 1.36 이었고, 3일째 영상에서는 7.00 ± 3.62, 4.80 ± 2.85, 3.11 ± 1.79 이었으며, 7일째 영상에서는 8.16 ± 1.35, 4.54 ± 1.13, 3.66 ± 1.29, 그리고 14일째 영상에서는 8.52 ± 3.21, 4.64 ± 1.74, 3.93 ± 2.06이었고, 통계적으로 유의하였다(p < .05)[표 5].

표 5. 줄기세포 주입 전, 후 시간 경과에 따른 촬영기법간의 신호대 잡음비에 대한 정량적 분석 (N=8)

D	Se	Mean±SD			x ²	p-value
		T2WI	T2*WI	SWI		
PRE	N	13.10 ± 2.29	13.98 ± 1.38	17.72 ± 2.03	9.75	0.008
	I	25.83 ± 5.42	20.35 ± 2.17	26.35 ± 2.90	9.75	0.008
1D	N	12.32 ± 0.71	14.43 ± 0.94	16.87 ± 2.32	14.25	0.001
	I	21.42 ± 2.11	20.32 ± 2.71	23.02 ± 4.40	9.25	0.010
3D	S	11.16 ± 3.49	7.91 ± 2.76	5.36 ± 1.36	16.00	0.0001
	N	12.02 ± 1.88	13.72 ± 2.24	18.40 ± 4.78	16.00	0.0003
7D	I	19.02 ± 3.20	18.94 ± 2.59	24.15 ± 4.35	9.25	0.010
	S	7.00 ± 3.62	4.80 ± 2.85	3.11 ± 1.79	10.51	0.005
14D	N	12.54 ± 1.28	14.06 ± 1.67	18.14 ± 2.11	13.00	0.002
	I	16.49 ± 2.35	17.96 ± 1.79	22.35 ± 4.09	10.75	0.005
SPIO	S	8.16 ± 1.35	4.54 ± 1.13	3.66 ± 1.29	13.00	0.002
	N	13.79 ± 3.67	14.53 ± 1.27	17.91 ± 1.06	9.75	0.008
14D	I	18.00 ± 5.23	15.86 ± 1.42	19.49 ± 2.55	3.00	0.223
	S	8.52 ± 3.21	4.64 ± 1.74	3.93 ± 2.06	13.00	0.002

D : Day, Se : Sequence, N : Normal, I : Infarction, S : SPIO

4) Infarction-Normal 부위간의 CNR

뇌경색 부위에서 부종 부위를 피하여 가능한 크게 ROI를 설정하고 SNR을 측정된 값과 뇌경색 반대쪽 대뇌 반구에서 측정된 normal 부위의 SNR의 차이로 CNR을 구해본 결과, 세포 주입 전 영상의 T2WI, T2*WI, SWI에서 각각 12.73 ± 3.89, 6.36 ± 1.89, 8.62 ± 1.83 이었고, 세포 주입 후 1일째 영상에서 9.10 ± 1.80, 5.88 ± 2.22, 6.15 ± 3.59 이었으며, 3일째 영상에서는 6.99 ± 2.91, 5.23 ± 1.83, 5.74 ± 2.03 이었고, 7일째 영상에서는 3.95 ± 1.73, 3.89 ± 1.77, 4.27 ± 2.58, 그리고 14일째 영상에서는 각각 4.20 ± 5.35, 1.33 ± 1.09, 1.98 ± 1.29 이었고, 주입 후 3, 7, 14일 데이터는 통계적으로 유의하지 않았다[표 6].

5) Normal-SPIO 간의 CNR

뇌경색 반대쪽 대뇌 반구에서 측정된 normal 부위와 SPIO로 표지된 줄기세포가 있을 것으로 예상되는(경색을 둘러싼 저 신호) 부위의 SNR의 차이로 CNR을 구한 결과, 세포 주입 후 1일째 영상의 T2WI, T2*WI, SWI에서 각각 3.06 ± 1.60, 6.52 ± 2.81, 11.50 ± 3.16 이었고, 3일째 영상에서는 각각 8.75 ± 2.94, 8.91 ± 2.47, 15.28 ± 3.32 이었으며, 7일째에서는 4.38 ± 1.02, 9.51 ± 1.15, 14.47 ±

1.94, 그리고 14일째 영상에서는 각각 5.27 ± 2.08 , 9.89 ± 1.73 , 13.98 ± 2.11 이었고 통계적으로 유의하였다($p < .05$)[표 6].

6) Infarction-SPIO 간의 CNR

뇌경색 부위와 SPIO로 표지된 줄기세포가 모여 있을 것으로 예상되는 부위의 SNR의 차이로 두 부위간의 CNR을 구한 결과, 세포 주입 후 1일째 영상의 T2WI, T2*WI, SWI에서 각각 10.26 ± 3.15 , 12.41 ± 3.63 , 17.65 ± 4.98 이었고, 3일째 영상에서는 12.01 ± 5.25 , 14.14 ± 3.53 , 21.03 ± 3.12 이었으며, 7일째 영상에서 8.33 ± 2.33 , 13.41 ± 1.95 , 18.69 ± 4.27 , 그리고 14일째 영상에서는 각각 9.47 ± 4.54 , 11.21 ± 1.94 , 15.57 ± 3.75 이었고, 통계적으로 유의하였다($p < .05$)[표 6].

표 6. 줄기세포 주입 전, 후 시간 경과에 따른 촬영기법간의 대조 도대 잡음비에 대한 정량적 분석(N=8)

D	Se	Mean±SD			x ²	p-value
		T2WI	T2*WI	SWI		
PRE	I-N	12.73 ± 3.89	6.36 ± 1.98	8.62 ± 1.83	12.25	0.002
	I-N	9.10 ± 1.80	5.88 ± 2.22	6.15 ± 3.59	6.75	0.034
1D	N-S	3.06 ± 1.60	6.52 ± 2.81	11.50 ± 3.16	13	0.002
	I-S	10.26 ± 3.15	12.41 ± 3.63	17.65 ± 4.98	14.25	0.001
	I-N	6.99 ± 2.91	5.23 ± 1.83	5.74 ± 2.03	4.75	0.093
	N-S	875 ± 2.94	8.91 ± 2.47	15.28 ± 3.32	16.00	0.0003
3D	I-S	12.01 ± 5.25	14.14 ± 3.53	21.03 ± 3.12	9.75	0.008
	I-N	3.95 ± 1.73	3.89 ± 1.77	4.27 ± 2.58	0.25	0.882
7D	N-S	4.38 ± 1.02	9.51 ± 1.15	14.47 ± 1.94	16.00	0.0003
	I-S	8.33 ± 2.33	13.41 ± 1.95	18.69 ± 4.27	16.00	0.0003
14D	I-N	4.20 ± 5.35	1.33 ± 1.09	1.98 ± 1.29	4.00	0.135
	N-S	5.27 ± 2.08	9.89 ± 1.73	13.98 ± 2.11	16.00	0.0003
	I-S	9.47 ± 4.54	11.21 ± 1.94	15.57 ± 3.75	9.25	0.010

D : Day, Se : Sequence, N : Normal, I : Infarction, S : SPIO

CT(Computed Tomography), US(Ultra Sound), 그리고 MRI 등이 있다. 이중 MRI는 줄기세포의 tracking(추적)에 있어서 조직 대조도(tissue contrast)가 다른 장치(modality) 보다 월등히 좋으면서도 뛰어난 공간 분해능을 갖는 장점이 있다. 하지만 아무리 MRI가 공간 분해능이 좋아도 현재까지의 과학 기술로도 나노크기(nanometer size; 10^{-9})의 세포단위를 표현하기에는 한계가 있는 것이 사실이다. 세포단위의 신호를 MRI로 보기 위해서는 SPIO 조영제의 도움이 필요하고, SPIO는 산화철을 이용하므로 susceptibility가 심하게 일어나 이로 인해 영상에서 신호를 감소시켜 나노크기에서 나오는 신호도 영상에 잘 보여준다[10].

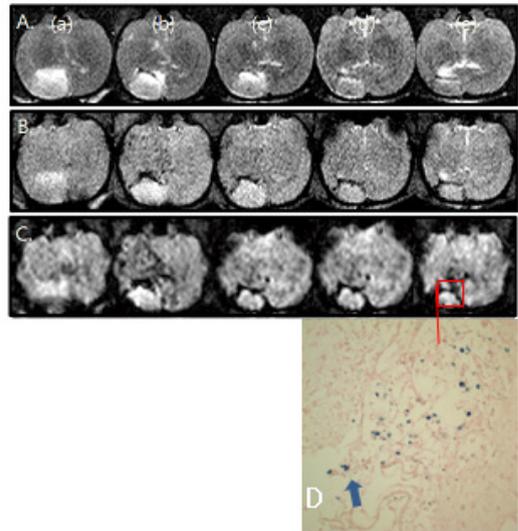


그림 2. 시간 경과에 따른 촬영기법별 흰쥐의 MR영상

- A. T2강조영상
- B. T2*강조영상
- C. 자화강조영상
- D. Prussian blue staining × 400
- (a). Pre, (b). 1D, (c). 3D, (d). 7D, (e). 14D
- Arrow, SPIO labeled hMSCs

IV. 고 찰

MRI는 각종 질환의 조기 발견, 치료효과 판정 및 뇌 기능 판정 등 인체 병태생리 현상 연구에 널리 이용되고 있으며 그 사용이 급속히 증가하고 있다[5]. 또한 줄기세포의 체내동태 관찰 등 분자 영상법에도 많이 기여하고 있다. 분자영상법에 이용된 영상 장비들은

2008년 교육과학기술부에 보고한 정준기[11]는 생체 내에서 줄기세포의 분포 정량화 및 분화 영상 영상추적 기술의 개발을 통하여 줄기세포 이식 후 이동 및 생착, 증식을 분자영상기법으로 확인 할 수 있었으며, 대상물의 희생이나 조직의 적출 없이 반복적으로 오랜 기간 줄기세포의 체내에서의 동태를 측정할 수 있을 것이라

고 했다. 이와 같이 생체 내에서 줄기세포의 동태에 대한 연구는 향후 줄기 세포 치료를 통한 인간의 질병 극복에 중요한 과제이다. 지금까지 SPIO로 표지된 줄기세포에 대한 연구에서 TIWI, T2WI, T2*WI 등을 많이 사용하였지만, susceptibility의 효과가 극대화 되어 나타나는[12] SWI를 사용하면 훨씬 적은 세포가 모여 있더라도 MRI 영상에서 잘 보일 것으로 기대하였고, 이 연구를 통하여 다시 한 번 확인되었다[그림 2].

또한 실험동물 모델을 제작함에 있어서 MCA(middle cerebral artery)폐색모델, 화학적 약물 주입법 등은 뇌경색을 범위가 일정하지 않고 반복적으로 다시 만들기 힘들지만, 광화학적 뇌경색 모델은 실험동물의 종, 광민감성, 화학물질의 양, 화학물질의 활성화에 영향을 미칠 수 있는 체온, 광원의 세기, 조사 강도 등을 연구자가 조절하여 뇌경색을 일정하게 만들 수 있어[13] 작은 동물 실험에서 연구자의 의도에 따라 실험을 진행 할 수 있을 것으로 사료된다.

2007년 광병국 등[9]의 연구 결과에서 보편 상용화된 Feridex I.V.®, Resovist®(Ferucarbotran, Schering Germany)와 자체 제작한 PVP-SPIO, Chitosan-SPIO의 입자 크기를 다르게 하여 한 실험에서 4가지 용액의 신호가 다르게 나온 것으로 보아 입자 크기, 용액의 농도가 신호에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 본 연구는 SPIO를 Feridex I.V.® 한 가지만 사용하였으므로 신호에 영향을 미치는 변수를 세포 농도만으로 제한하여 줄기세포의 수(SPIO의 양)가 많을수록 영상의 신호가 많이 낮아질 것으로 예상하였다. 그러나 T2*WI와 SWI에서는 세포수가 1.56×10^4 , 3.13×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 개/ml까지는 SNR이 감소하다가 5×10^5 개/ml에서는 미약하게 증가하였다. 향후 줄기세포 농도의 단계를 더 많이 해서 세포 농도에 따른 신호 변화에 대한 연구가 더 필요 할 것으로 보인다.

또, 본 연구 결과 SWI는 다른 검사기법에 비해 SPIO에 대한 CNR이 높게 나왔다. SWI가 CNR 높다하여 무조건 좋다고 평가 할 수는 없을 것이다. 신호를 증폭시켜 보여주는 것으로 실제보다 훨씬 과장되게 보여주기 때문이다. 그러나 아주 조금 모여 있는 세포를 발견하려는 목적으로만 보면 SWI는 충분히 좋은 결과를 보여

주었다.

모든 질병에 대해 근치적인 치료의 길을 열어줄 것으로 기대되는 줄기세포 치료의 전 과정(process)을 영상을 통해 관찰할 수 있다면 인간의 질병에 대한 정복은 쉽게 이루어 질 수 있을 것이다. 따라서 SWI는 향후에 줄기세포 치료가 인간의 질병을 치료하는 큰 방안으로 자리 잡을 때에도 줄기세포를 관찰 할 수 있는 좋은 도구로 이용될 것으로 기대 된다.

V. 결 론

사람 중간엽 줄기세포에 SPIO를 표지하여 체외(In vitro) 및 체내(In vivo) 실험을 통하여 세포 수에 의한 신호의 변화와 같은 세포의 수를 T2WI, T2*WI, SWI로 영상을 획득하였을 때의 변화를 알아보고자 한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다. 첫째, 사람 중간엽 줄기세포는 SPIO에 표지 되어도 세포의 생존 및 기능에 변화가 없어 줄기세포 실험에 적합하다. 둘째, 광 혈전 뇌경색 모델은 제작의 재현성이 좋고 연구자의 의도에 따라 뇌경색을 디자인 할 수 있어서 작은 동물 뇌경색 실험에 유용하다. 셋째, Feridex I.V.®를 표지한 hMSC-bm의 실험에서 적절한 세포 농도는 2.5×10^5 개/ml 세포가 CNR이 가장 좋은 것으로 보인다. 넷째, 같은 양의 SPIO-hMSC 일 경우 가장 검출이 잘 되는 현재의 MRI 검사기법은 자화강조영상(SWI)으로 사료 된다.

참 고 문 헌

- [1] Raphael Guzman, Nobuko Uchida, Tonya M. Bliss, Dongping He, Karen K. Christopherson, David Stellwagen, Alexandra Capela, Joan Greve, Robert C. Malenka, Michael E. Moseley, Theo D. Palmer, and Gary K. Steinberg, "Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and

pathological contexts with MRI," PNAS, Vol.104, No.24, pp.10211-10216, 2007.

[2] 장남규, "뇌출혈 백서 모델에서 3T MRI를 이용한 신경줄기세포의 추적", *전남대학교 박사학위논문*, 2007.

[3] Jeff W. M. Bulte, Ian D. Duncan, and Joseph A. Frank, "In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labelled cells after transplantation," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Vol.22, No.8, pp.899-907, 2002.

[4] Y. S. Song, J. H. Ku, E. S. Song, J. H. Kim, J. S. Jeon, K. H. Lee, S. J. Kim, H. J. Cheong, I. S. Lim, D.H. Choi, and J. H. Won, "Magnetic resonance evaluation of human mesenchymal stem cells in corpus cavernosa of rats and rabbits," *Asian Journal of Andrology*, Vol.9, No.3, pp.361-367, 2007.

[5] 문우경, "분자자기공명영상", *대한의사협회지*, Vol.2, pp.133-138, 2004.

[6] 김대윤, "대식 세포의 생체 내 추적에 있어 세포 내 SPIO의 양이 자기공명영상의 신호 강도에 미치는 영향", *울산대학교 석사학위논문*, 2007.

[7] Alavala Matta Reddy, B. K. Kwak, H. J. Shim, C. Y. Ahn, S. H. Cho, B. J. Kim, S. Y. Jeong, S. J. Hwang, and S. H. Yuk, "Functional characterization of mesenchymal stem cells labeled with a novel PVP-coated superparamagnetic iron oxide," *Contrast Media Mol Imaging*, Mar, [Epub ahead of print], 2009.

[8] Kuroiwa T, Xi G, Hua Y, Nagaraja TN, Fenstermacher JD, and Keep RF, "Development of a rat model of photothrombotic ischemia and infarction within the caudoputamen," *Stroke*, Vol.40, pp.248-253, 2009.

[9] 광병국, "나노물질을 이용한 줄기세포치료제의 생체분포시험연구", *식품의약품안전청*, 2007.

[10] E. M. Haacke, S. Mittal, Z. Wu, J. Neelavalli, and Y.-C.N. Cheng, "Susceptibility-Weighted

Imaging: Technical Aspects and Clinical Applications, Part 1," *American Journal of Neuroradiology*, Vol.30, pp.19-30, 2009.

[11] 정준기, "허혈질환 모델에 이식된 줄기세포의 분포 정량화 및 분화 양상 영상추적 기술 개발", *서울대학교 산학협력단, 교육과학기술부*, 2008.

[12] Andreas Deistung, Enrico Dittich, Jan Sedlacik, Alexander Rauscher, and Jürgen R. Reichenbach, "ToF-SWI: Simultaneous Time of Flight and Fully," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, Vol.29, pp.1478-1484, 2009.

[13] 김태진, "광화학적 뇌경색 모델에서 광원의 세기에 의한 뇌경색 적정화 연구" *원광대학교 석사학위논문*, 2006.

저 자 소 개

하 본 철(Bon-Chul HA)

정회원



- 2008년 2월 : 한서대학교 방사선학과(보건학사)
- 2010년 8월 : 한서대학교 대학원 방사선학과(방사선학 석사)
- 1997년 10월 ~ 현재 : 중앙대학교병원영상의학과 방사선사

<관심분야> : 방사선학, 자기공명영상학

임 청 환(Cheong-Hwan Lim)

정회원



- 1997년 8월 : 단국대학교 대학원 보건행정학과(보건학 석사)
- 2005년 2월 : 경원대학교 대학원 의료경영학과(보건학 박사)
- 2001년 3월 ~ 현재 : 한서대학교 방사선학과 교수

<관심분야> : 방사선학, 영상정보학, 자기공명영상학