

인간 골수 기질세포 이종이식이 백서의 축삭절단 안와하 신경 재생에 미치는 효과

박은진*, 김은석**, 김진만†, 김현옥**, 염광원*

*서울대학교 치과대학 치과마취과학교실, **충남대학교 의과대학 치과학교실,

†충남대학교 의과대학 병리학교실, **연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

Eun-Jin Park*, Eun-Seok Kim**, Jin-Man Kim†, Hyun-Ok Kim**, Kwang-Won Yum*

*Department of Dental Anesthesiology, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea,

**Department of Dentistry, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

†Department of Pathology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

**Department of Diagnosis and Laboratory Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul,

Korea

Corresponding author: 염광원

서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 치과병원 치과마취과

TEL)02-760-3847, FAX)02-766-9427, Email: kwyum@plaza.snu.ac.kr

상기논문은 2000년 충남대학교병원 공모과제 연구비의 일부 보조로 이루어졌음.

별책 30부

Abstract

This study demonstrated that xenogenic human marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) could elicit the regeneration of the sensory nerve after axotomy in the adult rats' infraorbital nerves without immunosuppression. For this, we evaluated the behavioral testing for functional recovery of the nerve and histological findings at weeks 3 and 5 compared to controls. Xenogenic hMSCs did not evoke any significant inflammatory or immunologic reaction after systemic and local administrations. hMSCs-treated rats exhibited significant improvement on sensory recovery tested with von Frey monofilaments. At 5 postoperative weeks, in the hMSCs treated nerve, expression of myelin basic protein (MBP), neurofilament (NF) at the site of axotomy was higher than control. And mRNA expression of neurotrophin receptor Trk precursor (TrkPre), nerve growth factor receptor (NGFR) and neuropeptide (NPY) in trigeminal ganglion were also higher. The number of myelinated nerve at distal stump and cells in trigeminal ganglion were higher in hMSC treated rats. So it was supposed that transplanted MSCs contributed to reducing post-traumatic degeneration and production of neurotrophic factors. Immunofluorescence labeling showed small portion of hMSCs (<10%) expressed a phenotypic marker of Schwann cell (S-100). Xenogenic or allogenic mesenchymal stem cells might have immune privileged characteristics and useful tool for cell based nerve repair.

Key words: Mesenchymal stem cell, Nerve regeneration, Infraorbital nerve, Schwann cell

I. 서론

삼차신경 손상은 임상적으로 어렵지 않게 접하는 질환으로 증례에 따라서는 그 회복이 불완전하여 비가역적인 기능적 손상을 초래하기도 한다. 삼차신경 손상의 첫 단계 치료는 신경의 연속성을 회복하는 것이다. 경우에 따라서는 신경이식이 이용되기도 하지만 공여할 수 있는 신경을 얻기가 어려운 경우도 많고, 공여부의 이차적인 손상을 야기하기도 한다. 그리고 발달된 신경문합술에도 불구하고 그 기능적 회복이 만족스럽지 못한 경우가 많다. 이러한 것의 대안으로 세포이식을 통한 기능적 회복을 얻고자 하는 연구들이 시도되었다. 많은 연구들이 슈반세포 (Schwann cell)이 말초신경의 가장 중요한 요소로 마이엘린 (myelin)을 형성하고 신경손상의 회복과정 중에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 보고있다¹⁾. 슈반세포의 이식한 후에 절단된 hemicord가 성공적으로 연결되었다는 보고가 있으며²⁾, 슈반세포가 시신경 중추와 좌골신경의 재생에 효과적인 환경을 제공한다는 연구도 있다³⁾. 최근에는 비신경세포에서 기원한 세포들, 예를 들면 골수기질세포 (marrow stromal cells) 혹은 간엽줄기세포 (mesenchymal stem cells)가 신경재생에 도움을 줄 수 있다는 보고도 있다³⁻⁹⁾. 간엽줄기세포를 어린 쥐의 뇌에 주입했을 때, 뇌-혈관 장벽을 통과해서 전뇌와 소뇌에 도달하고, astrocyte와 뉴우론(neuron)으로 분화했다는 연구도 있다^{5,8)}. 또한 Dezawa 등⁴⁾과 Cuevas⁹⁾는 분화 혹은 비분화된 간엽줄기세포의 이식이 성숙한 백서의 신경재생에도 도움을 줄 수 있다고 보고하고 있다. 또한 자가세포를 이용한 치료는 치료에 필요한 충분한 세포를 체외에서 증식시키기까지 많은 시간이 소요되며, 자가신경이식과 같이 이차적인 공여

부를 필요로 한다는 단점이 있다. 따라서 임상적인 면에서, 이종 혹은 동종의 세포가 사용될 수 있는 방법이 필요할 것이다. 그러나 아직까지 구강악안면외과 영역에서 의미를 가지는 삼차신경 손상의 회복에서 간엽줄기세포의 역할에 대한 연구는 많지 않다. 이 연구에서는 이종이라는 면역학적으로 나쁜 환경에서 비분화된 간엽줄기세포의 이식이 성숙한 백서의 안와하신경 절단 모델에서 감각기능의 회복에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1) 인간 간엽줄기세포의 추출과 체외 증식

정형외과적 수술을 받은 환자의 동의 하에 후방장골능에서 천자를 이용하여 환자 당 20cc의 골수를 채취하였다. 골수 간엽줄기세포의 분획 및 체외증폭은 기존에 알려진 방법⁶⁾을 이용하였다. 체외에서 증폭된 세포는 사용 전, 유세포분석기를 통해서 간엽줄기세포 표지자로 알려진 CD29, CD44, 그리고 CD105에 양성, 임파구 혹은 백혈구의 표지자로 알려진 CD14, 34, 45의 음성임을 확인한 후에 실험에 사용하였다.

2) 생체내 세포 추적을 위한 염색

세포를 체내에 이식한 후 그 활동여부를 추적하기 위하여, 간엽줄기세포를 CFSE dye (Molecular Probes, Eugene, Oregon, US)를 이용하여 제조사가 기술한 방법에 따라, 생염색(vital staining)을 실시하였다.

3) 동물실험

동물실험은 한국식품의약품 안전청이 발간한 “실험동물의 관리 및 사용지침”에 의거하여 관리하였으며, 이 기준에 의하여 희생시켰다. 200g 내외의 면역기능이 정상인 Sprague-Dawley 백서 (다물사이언스) 30마리를 사용하였다. 통법에 따라 ketamine hydrochloride (80mg/kg, Ketara[®], 유한양행)와 xylazine (20 mg/kg, Rumpun[®], Byel, Germany)을 사용하여 복강마취를 시행하고, 전두부와 비부를 삭모하였다. 전두부 피부에 수직절개선을 가하고, 골막을 박리하여 내측 안와주를 노출시킨 후 Gregg^{10,11)}, Benett¹²⁾ 그리고 Vos¹³⁾ 등이 기술한 방법을 변형하여

백서의 안와하 신경을 노출하였다. 모든 수술은 Zeiss사의 수술현미경 하에서 시행하였다. 간략히 기술하면, 상악골, 전두골, 관골 및 누골로 구성된 안와부위를 골막 하 박리를 시행하여 안와저에 도달하였다. 안와저 골구에 위치한 안와하신경을 박리하여 다른 안와의 내용물과 분리하였다. 안와하구로 나가는 부위의 5mm 원심부를 미세수술용 가위를 이용하여 절단하고, 10/0 nylon으로 신경외막을 1-2바늘 봉합하여 위치를 유지하였다. 그리고 5×10^5 개의 인간 간엽줄기세포를 5 μ l fibrinogen solution (Greenplast[®], 녹십자)에 넣어서 절단사이의 간극에 주입하고, 주위에 동량의 thrombin이 포함된 calcium chloride 용액을 도포하여 gelation을 유도하였다. 수술부위의 보호를 위해서 비흡수성 PTFE 막 (TefGen[®], Biomend, USA)으로 덮어주었다. 골막 및 피부의 층별 봉합을 실시하고, 적절한 항생제 및 진통제를 투여하였다. 또한 수술 직후와 수술 후 7일에 각각 3×10^6 개의 간엽줄기세포를 생리식염수에 넣어서, 미세 정맥을 통하여 전신주사하였다. 대조군은 신경절단 후 세포가 들어있지 않은 10 μ l의 fibrin glue와 PTFE 막을 이용하여 치료하였다. 또한 동량의 생리식염수를 전신투여 하였다.

4) 안와하 신경의 감각기능 회복의 평가

안와하 신경의 감각회복의 평가는 술전과 술후에 von Frey monofilament (Stoeling, IL, USA)에 대한 반응정도로 평가하였다. 평가 전에 백서를 실험을 위해 제작된 틀 안에 30분 이상 위치시켜 환경에 적응하도록 하였다. 삼차신경 분포 부위 중 vibrissal pad 중앙의 피부에 1-3초 간격으로 von Frey monofilament를 3회 접촉시켜, 회피반응을 보이는 경우 그 filament의 숫자를 기록하여, 감각의 역치로 기록하였다.

5) 조직표본의 제작

술후 5주에 백서를 희생시켰다. 깊은 마취 후 심장을 통해 3% buffered paraformaldehyde와 10% sucrose를 투입하여 관류고정을 시행하였다. 안와하신경과 동측 삼차신경절을 적출한 후, 적절히 다듬고 즉시 냉동하였다.

면역조직화학염색

모든 말초신경 표본은 10% sucrose가 포함된 phosphate buffered saline (PBS)에 3시간 동안 처리하고 20% sucrose PBS 용액에 4 °C 하에서 12시간 동안 보관하였다. 냉동표본제작기를 이용하여 -20 °C 하에서 6 μ m 두께로 표본을 제작하고, silane이 코팅된 유리판 위에 부착시켰다. 단백질 차단 시약으로 1시간 처리 후 일차항체를 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 사용된 일차항체는 mouse monoclonal anti-neurofilament (NF) H 200kDa (1:2000, Chemicon, Temecula, CA, USA), rat monoclonal anti-myelin basic protein (MBP, 82-87 region, 1:50, Chemicon), mouse monoclonal anti-growth associated protein (GAP)-43 (1:200, Chemicon) 그리고 rabbit polyclonal anti-S-100 (1:200, Dako, Carpinteria, CA, USA) 였다. 반응 후 PBS로 3회 세척한 후 fluorescein-conjugated secondary antibody IgG (Biomed, USA)를 반응시켰다. 2차 항체로는 FITC-conjugated antimouse IgG (Chemicon), rhodamine-conjugated antirat IgG (Biomed), Cy5-conjugated antimouse IgG (Biomed)가 사용되었다. 광학현미경 하에서도 관찰하기 위해서, ABC 시약 (Endvision, USA)으로 염색하고, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dacocytomation,

USA)로 발색시켰다. 또한 hematoxylin and eosine (H&E) 염색도 같이 시행하였다. 삼차신경절의 표본은 일반적인 paraffin-embedding 후에 조직표본을 제작하고, H&E 염색과 5% cresyl violet 염색을 시행하여 광학현미경 하에서 삼차신경절 세포의 변화를 관찰하였다. 영상은 공초점 현미경과 광학현미경 하에서 촬영하고 분석이 필요한 항목은 Image Pro Plus Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 을 이용하여 평가하였다.

전자현미경 표본제작

안와하신경 손상부위에서 5mm 원심부의 신경을 적출하여 2.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde가 포함된 0.1M PBS 용액에 12시간 이상 담가놓았다. 이 후 2% OSo₄ 용액에 2시간 동안 후고정을 실시하고, 건조 후 연속된 농도의 알코올 용액으로 처리하여 Epon 812 (Nisshin EM, Tokyo, Japan)에 포매하였다. LKB ultratome을 이용하여 2장의 표본을 만들어, 하나는 toluidine blue로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하고, 나머지는 lead citrate와 uranyl acetate로 염색하여 SEM 전자현미경 (JEOL JEM-100, Japan) 1000배의 확대율에서 관찰하였다. Toluidine 염색표본의 영상은 Image Pro Plus 프로그램으로 분석하여 단위면적 당 myelinated axon의 수를 계산하였다.

삼차신경절 총 RNA의 추출과 역전사 연쇄중합효소반응 (RT-PCR)

삼차신경절은 적출 후 바로 액체질소에서 냉동시켰다. 총 RNA의 추출 및 cDNA의 제작은 제조사 (Quiagen, Valencia, CA, USA)가 추천한 방법에 따라 시행하였다. 총 RNA의 농도는

spectrophotometer (260nm)에서 결정하였으며, 0.5 µg/ml ethidium bromide를 포함하는 1% agarose gel에서 RNA의 추출상태를 확인하였다. 이후에 사용전까지 -80°C에 보관하였다.

Trk precursor, NGF receptor, Neuropeptide Y에 대한 RT-PCR을 시행하였다. Primer의 설계는 OLIGO 4.0 primer analysis software (National Biosciences, Hamel, MN, USA)를

사용하였고, 구성은 다음과 같다. Trk precursor(445bp):

TCTGGTGACTIONTCGTTGATGC(sense), ACCACACAAATCCTCCTGCT(antisense), NGF

receptor(508bp): GGTGCATAGCGTAATGTCCA(sense),

TGGCTGTGGTCTTATCTCCA(antisense), Neuropeptide Y (NPY, 370bp):

GCCATGATGCTAGGTAACAA(sense), TGGTTTCACGGATGAGATG(antisense). 역전사

반응 후에 2µl를 0.5mM dNTP, 0.2µM primer, 1.25 units Taq polymerase, 40mM KCl, 그

리고 1.5mM MgCl₂로 구성된 PCR 반응용액에 넣고, 전체 용량이 50µl가 되게 하였다.

Denaturation: 94°C, 1분, annealing: 55°C, 2분, 그리고 elongation: 72°C, 3분의 조건으로

연쇄중합효소반응을 30회 반복하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gels에서 전기영동 시키

고, 자외선등 아래에서 촬영하였다.

6) 통계처리

실험군의 유의성 확인을 위해서 SAS 6.0 프로그램을 이용하여 paired Student t-test를

시행하였고, *p*값이 0.05보다 작은 경우 유의한 것으로 평가하였다.

III. 결과

1) 기능적 회복

실험군 및 대조군의 술전 평균 회피반응 수치는 각각 1.39 ± 0.28 과 1.45 ± 0.18 이었다. 수술 직후 및 1주일까지는 가장 굵은 filament (value 5.6)에도 반응을 보이지 않았다. 술후 3주부터 감각의 회복이 관찰되었고, 실험군과 대조군의 차이를 보였다. 간엽줄기세포로 처리한 실험군의 반응 수치는 3.56 ± 0.17 이었고 대조군은 4.35 ± 0.28 로 약간의 차이가 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 술후 5주에서 실험군(2.01 ± 0.16)의 감각회복이 대조군(3.45 ± 0.21)에 비해 더 좋음을 알 수 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 1).

2) 조직학적 소견

H&E 소견에서 이식부위의 두드러진 염증이나 면역반응은 관찰되지 않았다. 임파구나 염증세포의 침윤은 대조군과 유사하였다. (결과는 여기에 나타내지 않았음.) 면역염색표본에서 myelin의 정도는 MBP의 발현으로 확인하였고, NF의 발현으로 신경섬유의 배열상태를 확인하였다. NF와 MBP의 발현양상도 감각기능의 평가와 유사한 결과를 나타내었다. 실험군과 대조군 모두 NF와 MBP의 발현이 관찰되고, 근심부와 원심부의 신경섬유의 배열이 잘 유지됨을 관찰할 수 있었지만, 간엽줄기세포로 처리한 실험군에서 NF와 MBP의 강한 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, 3). 반면에 GAP-43의 발현은 실험군에서 더 약하게 나타났다(Fig. 4).

CFSE로 염색한 세포를 이식한 안와하신경에서, 술후 5주에도 초록색 형광을 띠는

세포들이 이식부위의 신경에 산재하는 것으로 보아, 이식된 세포가 살아있음을 알 수 있었다. 또한 일부의 CFSE 양성세포들은 슈반세포의 표지단백질로 알려진 S-100에도 양성반응을 보임으로서, 일부의 간엽줄기세포는 슈반세포로 분화되었음을 예상할 수 있었다. 그러나 그 세포의 수는 전체 CFSE를 발현하는 세포의 10% 미만이었다(Fig. 5). 삼차신경절에서 신경세포의 수는 실험군 ($15,250 \pm 1325/\text{mm}^2$)이 대조군 ($13,623 \pm 1936/\text{mm}^2$)보다 많았으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6, 7).

3) 전자현미경 소견

전자현미경과 toluidine blue 염색 광학현미경 소견에서 간엽줄기세포를 이식한 실험군에서 회복된 myelinated axon의 수가 $7,458 \pm 226/\text{mm}^2$ 로 대조군($5,388 \pm 312/\text{mm}^2$)과 유의한 차이를 보임을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 8, 9).

4) 삼차신경절에서의 Trk precursor, NGF receptor, Neuropeptide Y mRNA의 발현

간엽줄기세포를 국소 및 전신적으로 투여한 실험군의 동측 삼차신경절 Trk precursor, NGF receptor, Neuropeptide Y mRNA의 발현이 모두 대조군에 비해서 높았다(Fig. 10).

IV. 고찰

본 연구에서는 면역기능이 완전한 성숙 백서의 편측 안와하신경을 절단한 후, 이중의 간엽줄기세포를 국소 및 전신적으로 투여했을 때, 신경회복에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 간엽줄기세포는 다른 면역학적 환경에서도 잘 유지될 수 있는 독특한 성질을 가지는 것으로 알려져 있으나, 그 기전에 대해서는 아직 정확하게 이해되고 있지 않다. 기존의 연구에 의하면 간엽줄기세포는 T 면역세포의 기능을 변화시킬 수 있다는 것과 이것으로 인해 면역학적 내성을 가질 수 있다는 것이다. 또한 간엽줄기세포는 조직손상부위에서 회복이 잘 일어날 수 있도록 염증반응을 억제하는 것으로 추측되어지고 있다¹⁴. 또한 간엽줄기세포가 면역 내성을 가지는 기전을 “danger model”로 설명하기도 하는데, 간엽줄기세포는 면역학적으로 치명적인 항원을 나타내지 않기 때문에 T 세포를 활성화시키지 않는다는 것이다¹⁶. 본 실험의 결과에서도 전신적인 투여시 이상반응을 관찰할 수 없었고, 조직학적으로도 간엽줄기세포 국소적 이식부위의 염증세포나 임파구 침윤은 대조군과 차이가 없었다.

안와하신경이 분포하는 vibrissal pad의 감각기능 회복은 간엽줄기세포를 이식한 경우에 상당히 향상되는 것을 알 수 있었다. 감각역치의 정량적 분석은 변형된 von Frey filament를 이용해서 쉽게 평가할 수 있었다. 손상된 안와하신경의 회복은 5주에 유의한 차이를 보였는데, 이것은 Cuevas⁹)가 보고한 동종 간엽줄기세포를 이식한 좌골신경의 회복양상과 유사한 결과였다. 비록 이 방법으로 외상성 신경통과 감별을 할 수는 없지만, Vos¹³)가

보고한 신경손상 후의 외상성 신경통 모델에서 보이는 독특한 행동양식들은 이번 실험에서는 관찰할 수 없었다. 또한 일반적으로 백서의 신경절단 모델에서는 외상성 신경통이 거의 발생하지 않는 것으로 알려져 있기 때문에 이 실험에서 보이는 회피반응이 외상성 신경통에 의한 것은 아니라고 사료되었다.

유수신경 (myelinated nerve)의 수와 신경을 구성하는 일부 단백질의 발현정도도 간엽줄기세포를 처리한 실험군에서 더 많고 규칙적이었다. 이러한 결과는 위에서 보고한 von Frey monofilament 자극에 보이는 감각의 회복정도와 일치하는 결과로 생각되며, 이식된 이종의 간엽줄기세포가 절단된 신경의 회복에 일정한 역할을 하는 것으로 사료되었다. 한가지 흥미로운 것은 GAP-43 단백질의 발현이 간엽줄기세포로 처리한 실험군이 대조군에 비해 낮았다는 것이다. 신경성장이나 재생에서의 GAP-43의 역할을 생각할 때 다른 단백질의 발현의 결과와는 정반대의 결과를 나타낸 것이다. 그러나 Verze¹⁷⁾의 보고에 의하면 GAP-43의 발현은 말초신경의 재생과정 중 초기에서 관찰되는 것으로 알려져있다. 따라서 간엽줄기세포로 처리한 실험군에서는 GAP-43이 발현되는 최고조의 시간이 대조군보다 훨씬 빠르고, 결과적으로 신경재생의 과정이 간엽줄기세포로 처리했을 경우 빨리 진행된다고 생각할 수 있었다. 하지만 이에 대한 더욱 자세한 연구는 필요할 것으로 사료된다.

간엽줄기세포가 말초신경재생에 미치는 효과는 아직 확실하지 않다. 간엽줄기세포가 손상의 환경에서 활성화되어 재생에 필요한 여러 성장인자 (trophic factors)나 수용기들을 발현하고, 이것들에 의해 슈반세포의 증식을 촉진하는 것으로 가정하고 있다. 이러한

요소들은 신경절단 후에 일반적으로 나타나는 신경세포의 사멸을 줄여줄 수 있고, 또한 슈반세포에 발현되었을 때 초기재생을 빠르게 진행시킬 수 있을 것으로 생각하고 있다. 본 연구에서도 이러한 가정을 뒷받침할 수 있는 결과를 얻었다. 안와하신경이 분지하는 삼차신경절에서 신경의 재생 및 유지에 관여하는 요소 (neuropeptide)¹⁷⁾들의 발현이 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 신경 손상 후 그 수가 줄어드는 것으로 알려진 삼차신경절의 세포의 수와 신경손상 후 신경의 재생에 관여하는 인자로 알려진 tyrosine kinase precursor (TrkPre)와 neuropeptide Y (NPY)의 발현이 대조군에 비해 유의하게 높았다. 이는 말초신경의 손상 후 삼차신경절의 퇴행성 변화를 간엽줄기세포의 이식을 통해 억제할 수 있으며, 이로 인해 말초신경의 빠른 재생에 도움을 주는 것으로 사료된다. 하지만 간엽줄기세포의 삼차신경절에 대한 효과는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 간엽줄기세포의 일부가 슈반세포로 분화하는 것을 관찰할 수 있었지만, 이것이 신경재생에 어떤 효과를 나타내는지는 확실하지 않다.

자가 신경이식에 의한 2차적인 공여부의 발생이나, 신경줄기세포의 임상적 이용이 현실적으로 어려운 점을 고려할 때, 간엽줄기세포를 이용한 신경재생은 매우 유용한 방법이 될 수 있다. 이들 세포는 다른 줄기세포에 비해 쉽게 얻을 수 있고, 체외에서 잘 증식하기 때문에 쉽게 적용이 가능하다. 또한 다른 세포들에 비해 면역반응을 적게 유발하는 것도 장점이라 할 수 있다. 본 연구를 통해서 저자들은 악안면영역의 말초신경 손상의 치료에 이종의 간엽줄기세포를 이용할 수 있는 가능성과 그 효과를 확인할 수 있었고 향후 이에

대한 연구가 더 필요할 것으로 사료되었다.

V. 결론

저자는 이종의 간엽줄기세포를 정상 안와하신경이 손상된 정상 면역기능을 가진 백서에 투여했을 때, 신경의 재생에 미치는 효과에 대해서 평가하였다. 이종의 세포가 투여됐음에도 불구하고, 특이한 염증반응이나 면역반응은 발생하지 않았으며, 손상 후 감각의 회복에도 효과가 있음을 알 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Tyndall DA, Gregg JM, Hanker JS: Evaluation of peripheral nerve regeneration following crushing or transection injuries. *J Oral Maxillofac Surg* 1984;2:314-318.
2. Xu XM, Zhang SX, Li H, Aebischer P, Bunge MB: Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999;11:1723-1740.
3. Dezawa M: Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anat Sci Int* 2002;77:12-25.
4. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H: Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001;14:1771-1776.
5. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-370.
6. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ: *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:148-152.
7. Black IB, Woodbury D: Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27: 632-636.
8. 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.

9. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, Diaz-Gonzalez D, Reimers D: Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 2002;24:634-638.

10. Waite PME, Tracey DJ: Trigeminal sensory system. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*, 2nd edn., San Diego, CA: Academic Press 1995, pp. 705-724.

11. Gregg JM: A surgical approach to the ophthalmicmaxillary nerve trunks in the rat. *J Dent Res* 1973;52:392-394.

12. Bennett GJ, Xie YKA: Peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.

13. Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ: Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 1994;14:2708-2723.

14. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;11:1282-1286.

15. Matzinger P: An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10:399-415.

16. Anderson CC, Matzinger P: Danger: the view from the bottom of the cliff. *Semin Immunol*

2000;12:231-238.

17. Verze L, Paraninfo A, Viglietti-Panzica C, Panzica GC, Ramieri G: Expression of neuropeptides and growth-associated protein 43 (GAP-43) in cutaneous and mucosal nerve structures of the adult rat lower lip after mental nerve section. *Ann Anat* 2003;185:35-40.

Fig. 1. Evaluation of sensory function by von Frey filament. After 3 weeks, hMSCs treated rats showed more favorable improvement in sensory function than the control group. Significant improvement was showed in the hMSCs treated group. ($p<0.005$)

Fig. 2. Expression of neurofilament. Both groups show good connection between two stumps of a transected infraorbital nerve. Regeneration of NF in hMSCs-treated nerve (B, D) is more regular and intense than non-treated nerve (A, C). A, B: expressed with DAB, C, D: expressed with FITC (Scale bar = 50 μ m).

Fig. 3. Expression of myelin basic protein (MBP). Immunohistochemical staining with MBP shows outlines of myelin. The number and density of myelin in hMSCs-treated nerve (B, D) is higher than non-treated nerve (A, C). A, B: expressed with DAB, C, D: expressed with rhodamin. (Scale bar = 50 μ m)

Fig. 4. Expression of growth-associated protein 45 (GAP-45). Expressions of GAP-45 are generally weak in both groups. But hMSCs-treated nerve shows scanty positive reaction of GAP-45. GAP-45 is usually expressed at early stage of nerve regeneration. So it suggests that hMSCs accelerate the regeneration rate.

A, B: expressed with DAB, C, D: expressed with Cy-5. (Scale bar = 50 μ m)

Fig. 5. Tracking of CFSE-labeled hMSCs and expression of S-100. Transplanted hMSCs could survive in the regeneration site even after 5 weeks (A). Some of these cells (<10%) also expressed Schwann cell marker, S-100 (B). A: expressed with FITC, B: expressed with rhodamin. (Scale bar = 50 μ m)

Fig. 6. Cellular changes in ophthalmic division of trigeminal ganglion. More apoptotic cells (without nucleus) are observed in the control group (A, C). Higher number of cells in hMSCs-treated trigeminal ganglion is survived (B, D). A, B: H&E staining, C, D: Cresyl violet staining. (Scale bar = 50 μ m).

Fig. 7. Number of cells in ophthalmic division of trigeminal ganglion (cells/mm²).

Fig. 8. Cross-sectional view of distal stump of post-transected infraorbital nerve. Density and number of myelinated nerve are higher in hMSC-treated infraorbital nerve (B, D) than the control group (A, C). A, B: toluidine blue staining (Scale bar = 100 μ m). C, D: SEM (Scale bar = 10 μ m), arrowhead: unmyelinated nerve, rectangular: Schwann cell, asterisk: myelinated nerve.

Fig. 9. Number of myelinated nerve in cross-sectional distal stump of post-transected infraorbital nerve
(cells/mm²).

Fig. 10. mRNA expression of Trk precursor (A), nerve growth factor receptor (NGFR, B), and neuropeptide Y (NPY, C). All arrows: hMSCs-treated trigeminal ganglion. Expression of β -actin (D).