

사람의 대망미세혈관내피세포 증식에 대한 내피세포성장인자 및 CYCLIC AMP 증가물질의 효과

김원곤* · 김종만** · 유세영**

=Abstract=

Effect of Endothelial Cell Growth Factor and Cyclic AMP Increaseers on the Proliferation of Human Omental Microvascular Endothelial Cells

Won-Gon Kim*, Jong-Man Kim**, Se-Yeung Yoo**

Complete prelining of artificial vascular grafts with autologous endothelial cells may be one of the ideal solutions to obtain a nonthrombogenic blood-contacting surface. To establish an intact endothelial cell monolayer on a prosthetic surface at the time of implantation, a sufficient number of endothelial cells and adequate propagation condition in cell culture are prerequisites.

In this experimental study, endothelial cells from microvessels of adult human omental adipose tissue were enzymatically harvested, and optimal culture conditions for proliferation of the endothelial cells in cell culture were examined. Human omental adipose tissue was digested with collagenase and endothelial cells were separated from other stromal elements by mesh filtration method. Cultured cells were identified as endothelial cells by immunofluorescent staining for factor VIII-related antigen. Proliferation in usual 20% fetal bovine serum (FBS) medium or medium containing endothelial cell growth factor (ECGF) (5 ng/ml) and heparin (HEP) (1,000 units/ml) were compared, and the effects of adding compounds that increase intracellular cyclic adenosine monophosphate levels, that is, cholera toxin (CT) (1 µg/ml) and isobutylmethylxanthine (IBMX) (0.2 ml), were also analyzed. In total, following eight media groups were examined. 1) FBS medium + ECGF + HEP, 2) FBS medium + ECGF + HEP + CT, 3) FBS medium + ECGF + HEP + IBMX, 4) FBS medium + ECGF + HEP + CT + IBMX, 5) FBS medium, 6) FBS medium + CT, 7) FBS medium + IBMX, 8) FBS medium + CT + IBMX. It was shown that the medium containing ECGF + HEP with or without cholera toxin was most efficient in stimulating cell proliferation. IBMX was considered to have antagonistic effect to ECGF. Among experimental groups without ECGF and HEP, the addition of cholera toxin and IBMX was shown to significantly potentiate cell proliferation. This results could provide a practical method for use of cultured human endothelial cells for endothelial cell seeding of cardiovascular prosthetic device, particularly in small-diameter vascular grafts.

Key words : 1. Endothelial cells, 2. Vascular grafts

* 서울대학교병원 흉부외과, 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

** 경희대학교 의과대학 흉부외과학교실

** Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Kyeung Hee University, Seoul, Korea

통신저자: 김원곤, (110-744) 서울시 종로구 연건동 28, Tel. (02) 760-2346 Fax. (02) 764-3664

서 론

외과적 혈관질환의 치료에 널리 이용되고 있는 인조혈관은 40여년전에 처음 임상에 소개된 이후¹⁾, 이제는 혈관질환의 치료에 없어서는 안될 중요한 도구로 자리잡고 있다. 그러나 꾸준한 연구에도 불구하고 아직 자가혈관 (autogenous vessel)을 완전히 대체할만한 우수한 인조혈관의 개발에는 한계가 있는 것도 사실이다. 특히 내경이 작고 인체삽입시 상대적으로 저속 혈류에 노출되는 소구경 인조혈관인 경우에는 삽입후 혈전 형성으로 인한 조기 폐쇄 위험성이 중요한 문제점으로 지적되고 있다²⁾. 이에 따라 항혈전성이 뛰어난 소구경 인조혈관을 개발하려는 연구노력이 세계적으로 광범위하게 진행되고 있으며, 내피세포파종법 (endothelial cell seeding)도 그런 노력중의 하나로 현재 가장 생리적 방법중의 하나로 그 가능성을 인정받고 있다³⁾.

혈관의 내피세포층은 혈관의 가장 내측에 존재하면서 혈액과 직접 접촉하는 단층의 세포군으로, 인체에 존재하는 가장 효율적인 혈액접촉표면으로 인정받고 있다. 또한 내피세포층은 단순히 혈관내면을 싸고있는 수동적 항혈전성 층이 아니라 혈전의 생성을 억제하는 여러가지 물질들을 생성하는 능동적 기능을 가진 세포층으로 알려져 있다⁴⁾.

이러한 내피세포의 항혈전성에 착안하여 1970년대 말부터 인조혈관 내면에 내피세포들을 파종시켜 생체 삽입후의 항혈전성을 향상시키려는 연구노력들이 진행되기 시작하였다⁵⁾. 그러나 다각도의 연구와 부분적인 임상실험에도 불구하고 아직까지는 만족할만한 결과가 나오지는 못하고 있다^{6, 7)}. 그 중요한 이유중의 하나는 아직까지 인조혈관의 내면을 효율적이면서 완전하게 내피세포로 피복시켜줄 수 있는 방법이 개발되지 못하고 있는 점이다. 불완전하게 내피세포로 피복된 인조혈관은 혈전형성에 가장 민감한 기간인 생체삽입 직후에 내피세포를 파종하지 않은 인조혈관과 같은 정도의 혈전발생 위험도를 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서 인조혈관의 항혈전성 향상을 위해서는 생체삽입시에 이미 완전히 기능적인 내피세포로 피복되어 있는 혈액접촉표면을 만들어 주는 것이 무엇보다도 중요하다^{8, 9)}. 이를 위해서는 우선 손쉽게 다량의 내피세포를 획득할 수 있는 혈관공급원이 확보될 수 있어야 하고, 그런 다음 내피세포들을 효율적으로 배양증식하고 유지할 수 있는 방법이 필요하다.

사람의 내피세포는 동물 내피세포에 비해 배양증식이 상대적으로 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 사람의

내피세포를 보다 효율적으로 배양증식 시키기 위해서 배양액에 내피세포성장인자 (endothelial cell growth factor)를 헤파린과 함께 첨가하는 방법이 많이 사용되어 오고 있다^{9, 10)}. 또 최근에는 세포내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)을 증가시키는 물질들인 콜레라독소 (cholera toxin)와 아이소부틸메틸산틴 (isobutylmethylxanthine, IBMX)을 세포배양액에 첨가하여 내피세포 증식을 향상시킨 실험결과가 보고되고 있다¹¹⁾. 이런 연구결과들을 토대로 할때 내피세포 배양액에 내피세포성장인자 및 헤파린과 함께 cAMP 증가물질을 같이 첨가하여 주면 내피세포의 성장증식을 보다 더 향상시킬 수 있을 것이라는 가설이 가능하다. 본 실험에서는 이와 같은 가설을 검증하기 위해 사람의 대망 미세혈관 (omental microvessel)에서 내피세포를 분리배양한뒤 내피세포성장인자 및 헤파린과 cAMP 증가물질들의 첨가가 내피세포의 증식에 미치는 영향을 분석하고, 궁극적으로는 사람 내피세포의 최적 배양증식 조건을 확립하는데 그 연구목적이 있다.

실험방법

1. 사람의 대망지방 미세혈관 (omental fat microvessel)에서 내피세포 채취 및 배양

1) 대망지방조직 미세혈관의 확보

대망 (greater omentum)의 제거가 수반되는 복부수술환자에서 수술중에 절제 제거된 대망 지방조직의 일부를 무균적으로 소량 (약 10 gm) 획득하였다. 단 악성 종양환자의 대망은 실험대 상에서 제외하였다. 대망지방조직은 냉각 인산염완충식염수 (phosphated buffered saline)로 채워진 멸균 용기에 담아서 바로 세포배양실로 옮겼다. 대망지방조직을 2~3gm씩 절제하여 페트리 접시에 나누어 옮긴뒤에, 멸균된 미세 수술가위를 사용하여 아주 잘게 잘랐다 (그림 1).

2) 효소 소화 (enzymatic digestion) 과정

원심분리튜브에 잘라진 대망 지방조직과 동량으로 0.2% 콜라제네이스 (1 mg/ml; Worthington bio chemical corporation, cat # 4194)를 첨가하였다. 원심분리튜브를 섭씨 37도로 유지한 진탕형 물통 (stirring water bath)에서 30분간 두면서 미세혈관 내피세포를 소화분리 시켰다.

3) 내피세포의 여과 분리

진탕형 물통에서 제거한 원심분리튜브의 내용물을 200 micrometer 망사여과기 (mesh filter)로 일차 여과시킨뒤, 여과 용액에 완전배양액 5ml를 혼합하였다. 그런뒤 혼합액을 300g에서 10분간 원심분리 시켰다. 원심분리후 내

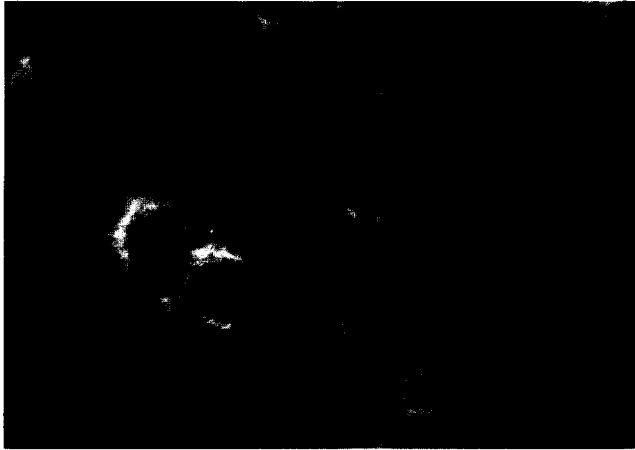


그림 1. 면역형광기법으로 제 8인자 연관 항원의 증명에 의한 내피세포 확인

Fig. 1. Identification of endothelial cells by demonstration of VIII-related antigen with immunofluorescent technique

피세포 펠리트(pellet)를 완전배양액 20cc에 재부유 시켰다. 재부유액을 34 micrometer 망사여과기에서 이차 여과 시켰다. 이때 망사여과기에 여과되지 않고 남아있는 부분을 수거하여 원심분리 튜브에 넣었다. 원심분리 튜브를 300g에서 10분간 원심분리 시켰다. 그리고 원심분리된 세포 펠리트를 완전 배양액 10cc에 재부유 시켰다.

4) 내피세포 배양

재부유액을 4cc씩 폴리스티렌 세포배양 플라스크에 옮기고, 섭씨 37도, 90% 습도, 그리고 5% 이산화탄소의 조건에서 항온배양 하였다. 배양액은 초대 및 이대 배양 모두 M199 배지에 fetal bovine serum(20%, Gibco company, Grand Island, NY, USA), 인슐린(5 microgram/ml, Collaborative Research Inc, Bedford, MA, 01730, USA), 내피세포성장인자(5ng/ml, Collaborative Research Inc, Bedford, MA, 01730, USA), 헤파린(10 u/ml, Sigma chemical, St. Louis, MO, 63178, USA)을 첨가한 것을 사용하였다. 이후 내피세포가 합류상태(confluence)를 이룰 때까지 매일 역상대조현미경(in verted contrast microscopy)으로 상태를 확인하였다. 이때 배양플라스크내의 세포수를 혈구계 산판(hemocytometer)으로 측정하여 $4 \times 10^4/1cm^2$ 즉 $1 \times 10^6/25cm^2$ 정도로 유지시켰다.

5) 계대배양(subculture)

내피세포가 배양플라스크내에서 합류상태를 이루면 트립신용액(0.1% trypsin-0.02% ethylenediamine tetraacetic acid(1:1) solution)으로 분리시킨뒤 계대배양 시켰다. 계대배양은 second passage때 1:4 split ratio로 시

행하였다.

2. 내피세포 확인

배양세포의 내피세포 확인은 면역형광법에 의해 시행하였다. 먼저 내피세포내 제 8인자 연관항원(factor VIII related antigen)에 대한 일차항체(Immunotech, cat. # 0803, 100microliter)로 항원-항체반응을 일으킨뒤 이를 fluorescein isothiocyanate(FITC)표식 이차항체로 처리하여 형광현 미경(Olympus BH-2)하에서 관찰하였다. 구체적으로는 배양세포를 챔버슬라이드에 옮긴뒤 48시간 동안 배양하였다. 그리고 인산화완충식염수로 3번 세척한뒤 찬 아세톤으로 세포들을 10분간 고정 시키고 다시 인산화완충식염수로 3번 세척하였다. 토끼에서 만들어진 제 8인자 연관항체에 대한 일차항체(1:10 dilution) 100 microliter를 첨가하여 60분동안 항온배양하였다(37°C). 세척 후 FITC 표식 이차항체(1:40 dilution) 100 microliter를 첨가하였다. 다시 세척후 30% 글리세롤-인산화완충식염수(glycerol-PBS)로 슬라이드를 제작하고 이를 형광현미경으로 관찰하였다.

3. 적정 배양조건의 실험

1) 실험용 내피세포 배양

2대 배양에서 세포가 배양플라스크 바닥의 80~90%에서 단층 합류상태를 형성하였을때 배양액을 제거하고 칼슘과 마그네슘이 배제된 Hank's balanced salt solution으로 세포들을 2회 세척하였다. 그리고 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 25cm² 세포배양플라스크당 3ml씩 투여하여 내피세포들을 분리수확하였다. 수확된 내피세포들을 혈구계산판에 도달하여 세포수를 계산하였다. 그리고 6-well plate에 well당 fetal bovine serum과 인슐린이 첨가된 M199 배양액을 각각 3ml 씩을 주입한뒤 여기에 2대 배양되었던 내피세포를 well당 2×10^4 개씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 48시간 배양후 각 well로부터 배양액을 제거하고 실험군에 따른 8 종류의 배양액(실험군 참조)을 각각 할당된 well당 3ml씩 주입한뒤 그후 7일간 배양하였다. 이 때 세포배양액의 교체는 2일마다 시행하였으며 세포수의 산정은 배양 2, 4, 7일째에 각각 시행하여 8종류 배지에서 미세혈관 내피세포의 성장속도를 비교 측정하였다.

2) 실험군

실험군은 먼저 소의 시상하부(hypothalamus)에서 추출된 내피세포성장인자(5 ng/ml)와 헤파린(1,000 unit/ml)을 20% fetal bovine serum을 기본으로 한 세포배양배지에

첨가한 군과 그렇지 않은 군으로 크게 나누고, 각각의 군을 다시 콜레라독소(1 microgram/ml)와 IBMX(0.2 mM)의 첨가 여부에 따라 다음과 같이 4개군씩, 모두 8종류의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 첨가물질의 양은 모든 실험군에서 18ml로 하였다.

- A. 내피세포성장인자와 헤파린을 배지에 첨가한 실험군들
- (1) 제 1 실험군: 콜레라 독소 및 IBMX를 모두 첨가하지 않은 실험군
 - (2) 제 2 실험군: 콜레라독소만을 배지에 첨가한 실험군
 - (3) 제 3 실험군: IBMX만을 배지에 첨가한 실험군
 - (4) 제 4 실험군: 콜레라독소와 IBMX를 모두 배지에 첨가한 실험군
- B. 내피세포성장인자와 헤파린을 배지에 첨가하지 않은 실험군들
- (5) 제 5 실험군: 콜레라 독소와 IBMX를 모두 배지에 첨가하지 않은 실험군
 - (6) 제 6 실험군: 콜레라독소만을 배지에 첨가한 실험군
 - (7) 제 7 실험군: IBMX만을 배지에 첨가한 실험군
 - (8) 제 8 실험군: 콜레라독소와 IBMX를 모두 배지에 첨가한 실험군

결 과

1. 사람 대망미세혈관 내피세포의 배양

역상대조현미경으로 관찰한 결과 배양세포들은 배양 24시간 후에 주로 군집을 이룬 상태로 배양 플라스크 바

다에 군데 군데 부착하고 있었다. 배양 5일후의 세포들은 부위에 따라 군집상태를 유지하기도 하고 독립적으로 증식을 하기도 하였다. 세포들은 배양 7일째에 단층을 이룬 상태에서 완전한 세포간의 합류상태를 형성하는것이 관찰되었다. 합류상태의 세포들은 전형적인 자갈돌 모양(cobblestone appearance)을 하고 있었으며, 각각의 세포들은 3~4개의 핵인(nucleolus)을 함유 한 한개의 난원형 핵을 가지고 있었다. 세포들은 2차 계대배양에서도 이러한 특징들을 유지하고 있었다.

2. 내피세포의 확인

전술한 항원-항체반응 기법으로 배양세포들을 처리하여 면역형광 현미경으로 관찰한 결과 세포내에 뚜렷한 형광성이 관찰되었다(그림 1). 형광성은 주로 세포질내에서 관찰되었으며 세포핵에서는 거의 관찰되지 않았다.

3. 배양기간에 따른 실험군별 세포증식속도(표 1)

실험 배지에서 내피세포를 각각 배양하여 배양 2일, 4일, 7일째에 배지내의 내피세포의 수를 혈구계산판으로 측정하여 내피세포의 증식속도를 비교분석하였는데, 모든 실험은 두번 반복하여 시행하였다. 각각의 배지들에 처음에 주입한 내피세포의 양은 첫번째 실험에서는 1.27×10^4 개였고 두번째 실험에서는 1.38×10^4 개로 평균 1.33×10^4 개였다. 내피세포성장인자 및 헤파린을 배지에 첨가한 A실험군에서는 IBMX를 첨가한 군에서 콜레라독소와의 병합투여 여부에 관계없이 좋지않은 증식속도를 보였다. 반면 내피세포성장인자와 헤파린을 첨가하지 않은 배지에서는 콜레라독소와 IBMX를 병합투여한 군에서 가장 증식속도가 빨랐지만 IBMX를 단독으로 투여한 군에서도

표 1. 배양기간에 따른 내피세포의 증식속도
Table 1. Proliferation rate of endothelial cells according to the culture period.

실험군/배양기간	0일	2일	4일	7일
	세포수(평균)($\times 10^4$ cells)			
A실험군				
1	1.27/1.38(1.33)	2.25/1.50(1.88)	2.05/2.50(2.28)	5.65/5.15(5.40)
2	1.27/1.38(1.33)	1.66/1.70(1.68)	3.88/2.88(3.38)	5.55/5.80(5.68)
3	1.27/1.38(1.33)	1.27/1.30(1.29)	1.05/1.27(1.16)	1.33/1.38(1.25)
4	1.27/1.38(1.33)	1.27/1.10(1.19)	1.72/1.22(1.47)	1.50/1.38(1.44)
B실험군				
5	1.27/1.38(1.33)	1.44/1.60(1.52)	1.27/0.94(1.11)	1.88/1.77(1.83)
6	1.27/1.38(1.33)	1.50/1.70(1.60)	1.44/1.50(1.47)	1.61/1.72(1.67)
7	1.27/1.38(1.33)	1.44/1.38(1.41)	2.50/2.61(2.56)	4.00/3.72(3.86)
8	1.27/1.38(1.33)	1.72/1.70(1.71)	2.72/3.33(3.03)	4.72/5.05(4.89)

표 2. 실험군에 따른 내피세포의 집단배가수 및 집단배가시간
Table 2. Population doubling number and population doubling time of endothelial cells according to the experimental groups.

실험군	세포수(×10 ⁴)		집단배가수*	집단배가시간** (시간)
	주입량(0일째)	산출량(7일째)		
1	1.33	5.40	2.02	83.16
2	1.33	5.68	2.09	80.38
3	1.33	1.25	-0.09	×
4	1.33	1.44	0.11	1527.27
5	1.33	1.83	0.46	365.22
6	1.33	1.67	0.33	509.09
7	1.33	3.86	1.54	109.09
8	1.33	4.89	1.88	89.36

* 집단배가수 (population doubling number)
 =log(산출세포수) - log(주입세포수) / log2

** 집단배가시간 (population doubling time)(시간)
 =(세포산출 - 세포주입)기간 / 집단배가수

IBMX를 첨가하지 않은 군에 비해 우수한 증식속도를 나타내었다.

4. 실험군에 따른 내피세포의 집단배가수 (population doubling number) 및 집단배가시간 (population doubling time)(표 2)

실험군들에서 최초로 주입한 세포수와 배지종류에 따른 최종 산출세포수를 이용하여 집단배가수 및 집단배가시간을 계산하였다. 제 1실험군과 제 2실험군, 그리고 내피세포성장인자 없이 콜레라 독소와 IBMX를 첨가한 제 8실험군에서 각각 83.16시간, 80.38시간, 89.36시간을 기록하였다. 반면에 내피세포성장인자를 첨가한 실험군들중에서 콜레라독소와 함께 IBMX를 첨가한 제 4실험군에서는 집단배가시간이 1527.27시간이나 되었고 IBMX만을 단독으로 첨가한 제 3실험군에서는 세포주입량에 비해 오히려 세포산출량이 감소하는 소견을 보였다.

고 찰

인조혈관에 내피세포를 파종시켜 항혈전성을 개선시키려는 노력은 많은 긍정적인 결과들이 보고되어 오고있다^{4, 12, 13}. 사람에서는 특히 인조혈관의 자연적인 내피세포화 (endothelialization)가 거의 일어나지 않기 때문에¹⁴, 내피세포 파종에 의한 항혈전성 개선이 더욱 필요한 것으로 생각되고 있다. 그러나 실험동물들을 사용하여 시행한 초기의 내피세포 파종에 관한 연구들은 대부분 소량의 내피

세포를 분리채취한뒤 혈액을 매개체로 하여 인조혈관에 파종시키는 이른바 저밀도파종 (low-density seeding) 실험들이었다^{4, 12}. 저밀도 파종에서는 파종된 내피세포들이 혈병 (blood clots)내에서 산발적으로 인조혈관의 내면에 부착된뒤 증식하면서 일정 기간후에 세포합류상태를 이루는 것으로 보고되고 있다¹⁵. 따라서 생체 삽입후 2주내에서는 내피세포를 파종하지 않은 인조혈관과 항혈전성의 측면에서 유사한 소견을 보이는 것으로 보고되었다¹⁴. 이런 점은 혈전 형성이 가장 문제가 될 수 있는 인조혈관 삽입후 1개월내 기간의 단기개방성 (short-term patency)을 향상시키는데에 큰 문제점으로 지적되고 있다. 이런 관점에서 파종 내피세포의 수를 가능한 많이하여 내피세포층의 회복에 기여하는 내피세포의 수를 증가시켜 주는 효과적인 고밀도파종법 (high-density seeding)에 관한 연구가 필요하게 되었다. 고밀도파종법이 효과적으로 된다는 것은 인조혈관의 혈액접촉표면에 노출되어 부착되는 내피세포의 숫자가 많다는 뜻이고, 이에 따라 완전한 회복을 위해 각 내피세포이 필요한 집단배가시간 (population doubling time)을 감소시켜 결국 내피세포층의 회복속도가 증가될 수 있다는 뜻이다. 그러나 효과적인 고밀도파종법을 확립하기 위해서는 무엇보다도 사람 내피세포의 적절한 획득방법과 함께 이를 효율적으로 배양증식시킬 수 있는 방법의 정립이 중요한 선결과제가 될 것이다.

사람에서 내피세포의 장기 배양이 이루어진 것은 비교적 최근으로, 일반적으로 사람에서는 내피세포의 증식속도가 낮고 효율적인 배양증식에 따르는 조건도 동물에 비해서 훨씬 까다로운 것으로 알려져있다. 고밀도파종법을 위해 필요한 내피세포량은 상당하기 때문에 보통 혈관들을 사용하는 경우에는 상당한 길이를 요하게 되나 사람에서 내피세포의 공급혈관으로 실제 사용될 수 있는 혈관들은 그 수에서 한정이 되어 있다. 이에 반해 소동맥, 소장맥 또는 모세혈관 같은 미세혈관들은 인체의 거의 모든 조직에 고밀도로 존재하고 있고 획득이 용이하다는 큰 장점이 있다. 미세혈관의 공급원으로는 포피 (foreskin)나 부신피질 그리고 비장 등이 소개되고 있으나^{16, 17, 18}, 실용적인 측면에서 문제점이 많아 현재 가장 보편적으로 사용되는 방법은 지방조직의 미세혈관을 이용하는 방법이다.

사람의 지방조직은 손쉽게 얻을 수 있는 조직으로서, 조직내의 미세혈관으로부터의 내피세포분리도 비교적 용이하게 이루어지며 큰 혈관들에 비해 조직단위 그람당 더 많은 양의 내피세포를 획득할 수 있다는 장점이 있다. 일반적으로 1gm의 지방조직은 약 10cm²의 인조혈관표면을 회복할 수 있는 내피세포를 제공할 수가 있다¹⁹. 또 이 내

피세포들은 세포배양시 큰 혈관들의 내피세포들과 유사한 형태적 기능적 특징을 지니고 있을뿐 아니라 세포합류상태의 단층을 형성하는 양상에서도 거의 같은 면을 보임으로서 내피세포과종에 특별한 문제가 없는 것으로 보고되고 있다²⁰⁾. 지방조직에서 내피세포를 분리배양하는 방법에는 여러가지가 있지만 본 실험에서는 Kern 등의 방법²¹⁾을 약간 변형시켜 사용하였다. Kern 등의 방법은 망사여과기를 이용하여 지방조직내의 미세혈관내피세포를 분리채취하는 것이 특징이다. 본 실험에서는 사람의 대망 지방조직을 사용하였다. 지방조직 미세혈관의 공급원으로는 대망 이외에도 피하지방이나 신장주위 지방 등을 이용할 수도 있으나 본 실험에서는 대망의 적출이 동반되는 복부수술환자에서 비교적 용이하게 조직을 얻을 수 있는 장점때문에 대망을 이용하였다. 34 microliter 망사여과기를 통과시키는 실험시에는 4~15개의 세포들로 구성된 내피세포응집물은 망사여과기에 걸리고 대부분 비내피세포성 기질세포들인 단독세포들은 망사여과기를 통과할 것으로 기대되었다²¹⁾. 따라서 34 microliter 망사여과기를 통과하지 못한 세포응집물을 수거하여 원심분리후 재부유시켰다. 이를 세포배양플라스크에 옮겨 배양 24시간후에 역상대조현미경으로 관찰한 결과 균집양상의 내피세포들이 주로 관찰되었다. 실험용 내피세포의 배양은 내피세포성장인자의 첨가하에 시행하였는데 배양 7일째에 전형적인 자갈돌 모양의 세포들이 완전한 세포간의 합류상태를 이루고 있는 것이 관찰되었다.

내피세포로서의 최종확인인 세포내 제 8응고인자 연관항원의 존재를 확인하는 방법을 사용하였는데²²⁾, 면역형광현미경으로 관찰 결과 형광성은 세포핵에서는 거의 발견되지않고 주로 세포질에 국한되어 있었다(그림 1). 이런 소견은 기왕의 문헌보고들과 일치하는 소견이었다²³⁾.

전술한대로 사람의 내피세포는 동물의 내피세포에 비해 배양증식이 상대적으로 어렵다. 사람의 내피세포의 효율적인 배양을 위해서 가장 보편적으로 사용되는 방법은 배양액에 내피세포성장인자를 헤파린과 함께 첨가하는 방법인데^{9, 10)}, 사람의 내피세포 배양에서 내피세포성장인자의 첨가가 세포의 증식과 이동을 향상시킨다는 것은 여러 보고에서 증명되고 있다^{19, 24, 25)}.

사람에 비해 동물의 내피세포들은 내피세포성장인자의 도움 없이도 원활한 성장을 할 수 있는 것으로 보고되고 있다^{26, 27)}. 한편 Leseche 등은 대복재정맥에서 채취한 내피세포의 배양실험에서 내피세포성장인자 단독으로는 효과적인 계대배양을 유지하기 어렵다는 것을 보고하고 헤파린의 첨가가 내피세포의 수명을 증가시키는데 도움을 준

다는 사실을 보고하였다⁹⁾. 헤파린은 단독으로 사용될때는 내피세포 증식에 억제작용을 하지만 내피세포성장인자와 같이 사용할때는 내피세포의 분열촉진인자활성(mitogenic activity)을 증가시켜 내피세포 수명을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{28, 29)}.

한편 최근에와서 콜레라독소나 IBMX를 첨가하면 사람의 내피세포 증식이 향상될 수 있다는 연구결과가 보고된 바 있다¹¹⁾. 콜레라독소는 세포내 cAMP(cyclic adenosine monophosphate)의 생성을 자극하는 효과로, IBMX는 세포내 cAMP의 파괴를 억제하는 작용으로 각각 세포내 cAMP를 증가시키는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 이와 관련하여 Davison 등은 콜레라독소와 IBMX를 사용하여 사람의 미세혈관세포들을 성공적으로 배양하였고³⁰⁾ Hagerstrand 등은 제정맥의 내피세포의 배양에서 cAMP증가물질들을 첨가할때 세포의 증식이 증가한다는 것을 보고하였다³¹⁾. 이런 관점에서 내피세포의 배양액에 내피세포성장인자와 cAMP증가물질을 함께 첨가하면 내피세포의 성장증식을 보다 더 증가시킬 수 있을 것이라는 가설이 가능하다. 본 실험에서는 이러한 가설을 증명해 보고자 사람의 대망 미세혈관으로부터 내피세포를 제 2차 계대배양한 다음 이들 내피세포들을 모두 8종류의 다른 배양배지에 넣어 이에 따른 세포증식의 속도를 관찰분석하였다. 8종류의 배지는 먼저 크게 내피세포성장인자와 헤파린을 첨가한 실험군과 그렇지 않은 실험군으로 나누고 각각의 실험군을 콜레라독소와 IBMX의 첨가 여부에 따라 다시 4종류의 실험군으로 구분하였다.

실험결과 내피세포성장인자와 헤파린을 첨가한 실험군들에서는 특징적으로 콜레라독소와 IBMX를 동시 투여하거나 또는 IBMX를 단독투여한 군에서 이들을 전혀 첨가하지 않았거나 또는 콜레라독소 단독으로만 첨가한 경우에 비해 현저한 증식감소 소견을 보였다. 이는 결론적으로 내피세포성장인자가 들어있는 배지에 IBMX를 첨가하는 경우에는 단독으로 첨가하던 콜레라독소와 함께 첨가하던 간에 내피세포의 성장증식에 나쁜 영향을 미친다고 말할 수 있는 것이다. 이러한 현상은 내피세포성장인자와 IBMX간의 어떤 상호작용으로 내피세포 성장에 필요한 대사작용의 일부에 부정적으로 영향을 미치는 결과로 추정되며 그 정확한 기전에 대해서는 추후 연구 가치가 있는 것으로 생각된다. 한편 내피세포성장인자와 헤파린이 첨가되지 않은 실험군들에서는 콜레라독소와 IBMX를 함께 배양액에 첨가한 군에서 세포증식이 가장 증가된 소견을 보였다. 이는 실험전 예상했던 결과에 일치하는 소견으로 Hagerstrand 등의 실험과 비슷한 결과였다¹¹⁾. 그러나

IBMX 단독으로 투여한 경우 비록 콜레라독소와 IBMX를 동시에 투여한 것에 비해서는 증식속도가 느리지만 콜레라독소만 첨가한 경우나 또는 cAMP 증가물질들을 전혀 첨가하지 않은 경우에 비해서는 유의한 증가소견을 보였다. 이 검사소견 만을 볼때는 콜레라독소에 의한 IBMX의 보다 효율적인 cAMP의 증가효과로 해석할 수도 있고 또는 실험에 사용된 콜레라독소의 양이 cAMP를 증가시키는데 최상의 양이 아니었다는 해석도 가능하다. 실험에 사용된 콜레라독소와 IBMX의 양은 본 실험실에서 일반 세포들의 배양시 가장 적합한 용량으로 역가측정(titration)이 된 양이었다. 따라서 이 양이 내피세포에서도 똑같이 적용될 수 있는지의 여부는 추후 실험을 통해 검증을 요하는 부분이라 하겠다. 또 콜레라독소양에 관한 문제점의 하나는 콜레라독소가 임상적용 목적으로 세포 배양에 사용될때 부작용 발발의 가능성이다. 이와 관련해서는 중증 화상환자를 위한 피부상피세포의 배양에 콜레라독소가 성공적으로 사용된 보고가 있지만³²⁾ 내피세포의 경우 생체삽입후 혈액과 직접 접촉한다는 점에서 피부상피세포의 배양과는 다른 측면이 있다. 그러나 일반적으로 인조혈관의 내피세포화에 사용되는 콜레라독소의 양이 비교적 적는데다(약 $1.5 \times 10^5/cm^2$), 내피세포파종 약 2일 전에 세포배양액에서 콜레라독소를 제거하는 등의 방법으로 그 위험성을 줄일 수 있다는 견해가 있다¹¹⁾.

결 론

본 실험의 결과 사람의 대망 미세조직에서 내피세포를 분리하여 이를 효과적으로 배양증식하기 위해서는 내피세포성장인자와 헤파린을 첨가한 배지를 사용하거나, 또는 내피세포성장인자를 사용하지 않는 경우 콜레라독소와 IBMX를 병합 첨가하는 것이 좋은 것으로 관찰되었으며, 내피세포성장인자와 콜레라독소 및 IBMX를 동시에 병합 첨가하는 것은 효과가 없는 것으로 밝혀졌다.

참 고 문 헌

1. Voorhees AB, Jaretski A, Blakemore AH, "The use of tubes constructed from Vinyon 'N' cloth in bridging arterial defects", *Ann Surg* 135:332, 1952.
2. Burkel WE, Graham LM, Stanley JC, Endothelial linings in prosthetic vascular grafts. In: Bo land B, Cullinan J, Cohn T, New York, The New York Academy of Sciences, pp 131-144, 1987.
3. Hoffman AS, Modification of material science to affect how they interact with blood. In: Bo land B, Cullinan J, Cohn T,

- New York, The New York Academy of Sciences, pp 96-101, 1987.
4. Herring M, Gardner A, Glover J, "A single-staged technique for seeding vascular graft with autogenous endothelium", *Surgery* 84:498-504, 1978.
5. Graham LM, Vinter DW, Ford JW, Kahn RH, Burkel WE, Stanley JC, "Cultured autogenous endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts", *Surg Forum* 30:204-206, 1979.
6. Herring MB, Compton RS, Legrand DR, Gardner AL, Madison DL, Glover JL, "Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene popliteal bypass. A preliminary report", *J Vasc Surg* 6:114-118, 1987.
7. Ortenwall P, Wadenvik H, Kutti J, Risberg B, "Endothelial cell seeding reduces thrombogenicity of Dacron grafts in humans", *J Vasc Surg* 11:403-410, 1990.
8. Jarrel Be, Williams SK, Solomon L, et al, "Use of an endothelial monolayer on a vascular graft prior to implantation", *Ann Surg* 203:671-678, 1986.
9. Leseche G, Bikfalvi A, Dupuy E, Tobelem G, Andreassian B, Caen J, "Prelining of polytetrafluoro ethylene grafts with cultured human endothelial cells isolated from varicose veins", *Surge ry* 105:36-44, 1989.
10. Watkins MT, Sharefkin JB, Zajtchuk, et al, "Adult human saphenous vein endothelial cells: assessment of their reproductive capacity for use in endothelial seeding of vascular prostheses", *J Surg Res* 36:588-596, 1984.
11. Hagerstrand A, Gillis C, Bengtsson L, "Serial cultivation of adult human endothelium from the great saphenous vein", *J Vasc Surg*: 280-285, 1992.
12. Belder TA, Schmidt SP, Falkow LJ, Sharp WV, "Endothelial cell seeding of small-diameter vascular grafts", *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 28:173-177, 1982.
13. Pennell RC, Hollier LH, Solis E, Kaye MP, "Xenograft seeding of Dacron grafts in dogs", *J Vasc Res* 40:332-339, 1986.
14. Berger K, Sauvage LR, Rao AM, Wood SJ, "Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness", *Ann Surg* 175:118-127, 1972.
15. Burkel W, Vinter D, Ford J, Kahn R, Graham L, Stanley J, "Sequential studies of healing in endothelial seeded vascular prostheses: histologic and ultrastructural characteristics of graft incorporation", *J Surg Res* 30:305-324, 1981.
16. Davison PM, Bensch K, Karasek MA, "Isolation and growth of endothelial cells from the micro vessels of the newborn human foreskin in cell culture", *J Invest Dermatol* 75:316-321, 1980.
17. Scherer GK, Fitzharris TP, Faulk WP, Le Roy EC, "Cultivation of microvascular endothelial cells from human preputial skin", *In Vitro* 16:675-684, 1980.
18. Folkman JC, Haudenschild CC, Zetter BR, "Long-term culture of capillary endothelial cells", *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5217-5221, 1979.
19. Rupnick MA, Hubbard A, Pratt K, Jarrell BE, Williams SK, "Endothelialization of vascular prosthetic surfaces after seeding or sodding with human microvascular endothelial cells", *J*

- Vasc Surg 9:788-795, 1989.
20. Herring M, Diller R, Cullison T, Gardner A, Glover J, "Seeding endothelium on canine arterial prostheses-the size of the inoculum", J Surg Res 28:35-38, 1980.
 21. Kern PA, Knelder A, Eckel RH, "Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue", J Clin Invest 71:1822-1829, 1983.
 22. Wagner DD, Marder VJ, "Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: Processing steps and their intracellular localization", J Cell Biol 99:2123-2130, 1984.
 23. Macarak EJ, Howard BV, Kefalides NA, "Properties of calf endothelial cells in culture", Lab Invest 36:62-67, 1977.
 24. Maciag T, Hoover GA, Stemerman MB, Weinstein R, "Serial propagation of human endothelial cells in vitro", J Cell Biol 91:420-426, 1981.
 25. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T, "Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin", J Cell Biol 101:2330-2334, 1985.
 26. Graham LM, Vinter DW, Ford JW, Kahn RH, Burkel WE, Stanley JC, "Endothelial cell seeding of pro sthetic vascular grafts", Arch Surg 115:929-933, 1980.
 27. 김원곤, 광영태, 유세영, "소피동맥내피세포를 이용한 인조혈액 접촉표면의 혈액적합성", 대흉외지, 26권, 2호, 80-85, 1993.
 28. Rosenbaum J, Tobelem G, Molho P, Barzu T, Caen J, "Modulation of endothelial cell growth by heparin", Cell Biol Int Rep 10:437-446, 1986.
 29. Thornton SC, Mueller SN, Levine EM, "Human endothelial cells:use of heparin in cloning and long term serial cultivation", Science 222:623-625, 1983.
 30. Davison PM, Karasek MA, "Human dermal microvascular endothelial cells in vitro:effect of cyclic AMP on cellular morphology and proliferation rate", J Cell Physiol 106:253-258, 1981.
 31. Hagerstrand A, Dalsgaard C-J, Jonson B, Larsson O, Nilsson J, "Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells", Proc Natl Acad Sci USA 87:3299-3303, 1990.
 32. Green H, Kehinde O, Thomas J, "Growth of human epidermal cells into multiple epithelia suit able for grafting", Proc Natl Acad Sci USA 76:5665-5668, 1979.

=국문초록=

사람의 내피세포는 동물내피세포에 비해 배양증식이 어려운 것으로 알려져 있어 이를 효율적으로 배양증식 시키기 위해서 배양액에 내피세포성장인자를 헤파린과 함께 첨가하는 방법이 많이 사용되어 오고 있다. 한편 최근에는 세포내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)을 증가시키는 물질들인 콜레라독소와 아이소부틸메틸산틴 (isobutylmethylxanthine, IBMX)을 세포배양액에 첨가하여 내피세포 증식을 향상시킨 실험결과가 보고된바 있다. 이런 연구결과들을 토대로 할때 내피세포 배양액에 내피세포성장인자 및 헤파린과 함께 cAMP 증가물질을 같이 첨가하여 주면 내피세포의 성장증식을 보다 향상시킬 수 있을 것이라는 가설이 가능할 것이다. 본 실험에서는 이와같은 가설을 검증하기 위해 사람의 대망 미세혈관 (omental microvessel)으로부터 내피세포를 분리배양한뒤 내피세포성장인자 및 헤파린과 cAMP 증가물질들의 첨가가 내피세포의 증식에 미치는 영향을 분석하고, 궁극적으로는 사람 내피세포의 최적 배양증식 조건을 확립하고자 하였다. 실험 결과 사람의 대망 미세조직에서 내피세포를 분리하여 이를 효과적으로 배양증식하기 위해서는 내피세포성장인자와 헤파린을 첨가한 배지를 사용하거나, 또는 내피세포성장인자를 사용하지 않는 경우 콜레라독소와 IBMX를 병합 첨가하는 것이 좋은 것으로 관찰되었으며, 내피세포성장인자와 콜레라독소 및 IBMX를 동시에 병합 첨가하는 것은 효과가 없는 것으로 밝혀졌다.