

혈관형성 및 혈관내피세포의 성장에 미치는 모유의 영향

이옥희* · 김정선** · 심경희** · 김규원* · 정해영**†

부산대학교 분자생물학과*, 약학과**

Effect of human milk on the angiogenesis and endothelial cell growth

Ok-Hee Lee*, Jung-Sun Kim**, Kyung-Hee Shim**, Kyu-Won Kim*, Hae-Young Chung**

*Department of Molecular Biology

**Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea.

Abstract

Human milk was examined for antiangiogenic activities by using the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay and endothelial cell growth. The low molecular weight (20 KD) ~) fraction of human milk stimulated the angiogenesis and increased the endothelial cell growth. These results suggest that the increase of angiogenesis and endothelial cell growth might be attributed to several growth factors and/or angiogenic factors in low molecular fraction (20 KD) ~) of human milk.

서 론

모유는 신생아와 영아의 성장과 발달에 가장 적합한 식품이며, 특히 질병에 대한 저항력을 증가시킬 수 있는 여러 종류의 단백질이 존재한다. 모유에 함유된 단백질은 우선 영아의 성장에 요구되는 생체 단백질 합성의 질소원이 되며, 아울러 생체 효소, hormone 및 면역체 뿐 아니라 급속히 성장하기 위한 성장과 분화에 관여하는 여러가지 인자들이 존재할 것이다¹⁻³⁾.

최근의 보고에 의하면, 모유 속에는 epithelial cell의 성장을 증가시키는 human epithelial transforming growth factor가 존재하며⁴⁾, hepatocyte를 증식시키는 mitogenic activity를 가진 물질이 존재하여 간의 성장과 발육에 관여한다고 보고하였다⁵⁾. 또한 모유속에는 T lymphocyte 증식을 자극하거나 억제하는 factor가 존재하여 유아의 면역계를 조절한다고 보고된 바 있다⁶⁾.

Angiogenesis(혈관신생)이란 기존 혈관에서 내피세포가 발아(budding)해서 새로운 혈관망이 형성되는 과정을 말하는데, 동물의 발생, 성장과 더불어 혈관망의 발달, 월경에 따라 자궁점막의 주기적인 혈관망의 증식, 퇴축, 태반형성이나 조직의 재생과 더불어 혈관망의 발달 등 생리적인 현상 뿐만 아니라 상처나 염증에서의 모세혈관의 증식 등에서도 볼 수 있다⁷⁾. 이 혈관신생은 모세혈관의 신생이 주체이며, 모세혈관은 주로 내피세포로 구축되어 있으며, 또한 내피세포의 분열 증식이 중요한 과정이다. 혈관 형성에는 growth factor, heparin, steroid hormone, macrophage 등이 관여한다고 알려져 있다⁸⁻¹¹⁾. 모유에도 이러한 성분 등이 함유되어 있으므로, 본 연구에서는 모유를 Centricon으로 분획하여 20KD 이하의 분획이 혈관형성을 촉진하는 인자가 있는 지를 알아보기 위하여 chick embryo의 chorioallantoic membrane(CAM) method로 bioassay를 행하였으며, 또한 혈관내피세포의 성장을 검토하였다.

† Corresponding author

실 험 방 법

모유의 채집

모유 시료들은 오전 9시 30분~11시 30분 사이에 수유를 하고 난 후 양 쪽 유방으로 부터 채취하였다. 유착기로 유즙을 채취하여 수집한 후 얼음통에 넣은 상태로 실험실로 옮겨서 -70°C에 냉동보관하였으며, 세포배양에 첨가할 경우는 0.2µ의 filter로 여과 멸균하였다.

세포 배양

혈관 내피세포를 bovine aorta로 부터 분리하여 10% FCS를 함유하는 RPMI 1640 배지로 37°C에서 5% CO₂ 하에서 T-75 flask에 confluent 될 때까지 배양후 24 well culture plate에 옮겨 약 10⁵ cell/well이 되도록 하였다. 모유를 media 1 ml당 각각 2 µl, 10 µl, 50 µl, 100 µl를 가하고 72시간 배양하여 세포수를 hemacytometer로 count하였다.

CAM assay

CAM assay 방법은 수정란을 구입하여 45시간 동안 18°C에 놓아둔 다음 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양하였다. 3일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3 ml 뽑아내었다. 4일배가 되면 계란의 공기주머니가 있는 쪽을 요오드팅크로 소독한 후 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들었다. 공기주머니 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프로 구멍을 막았다.

혈관형성 촉진제의 검색을 위하여 이것을 계속 배양기에 서 키워 9일배가 되면 thermanox coverslip에 양성대조군으로 PMA(12-phorbol 13-myristate acetate) 123 ng과 모유의 분획 10 µl를 도포한 후 이를 40분 동안 말렸다. 다 마른 것을 확인하고 9일배의 유리테이프를 떼어낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프로 창문을 막았다.

이를 배양기에서 3일동안 배양시킨 후 10% fat emulsion(Intralipid, 녹십자)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부 현미경(magnification x 8)으로 혈관형성이 유도되었는 지 관찰하고 CAM의 사진을 찍었다.

결과 및 고찰

모유의 혈관형성에 미치는 영향

모유의 여러성분 중 혈관형성을 유도하는 인자가 있는지 알아보기 위해 CAM assay를 실시하였다. CAM assay는 계배의 용모요막이 많은 모세혈관을 가지며 주위의 다른 혈관과 구분되는 잇점을 이용한 것으로 혈관이동과 형태형성에 영향을 주는 인자를 연구하는데 적당한 모델로 사용될 수 있다. 따라서 혈관형성이 거의 완성단계에 있는 9일배의 용모요막에 모유를 처리하여 모유에 의하여 새로운 혈관형성이 유도되는 지를 조사하였다.

CAM assay에는 모유 20KD 이하의 분획을 사용하였다. 그 결과, Table 1에서와 같이 빈 coverslip을 처리한 대조군에 비해 모유 20KD 이하 분획 10 µl를 처리하였을 경우 혈관형성이 41%로 촉진되었다. 양성대조군으로는 이미 혈관형성을 유도하는 것으로 알려져 있는 PMA를 사용하였으며 혈관형성을 75%로 촉진하였다. Fig. 1에서와 같이 PMA를 처리하였을 경우 나타나는 혈관클립과 새로이 형성된 모세혈관에 의한 수레바퀴모양이 20KD 이하의 모유 분획에서 나타났다. 따라서 이상의 CAM assay에 의해 모유에 혈관형성을 촉진하는 인자가 포함되어 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Activation of angiogenesis on CAM by low molecular weight (20KD < ~) fraction of human milk

Treatment	Dose	% Positive
Control		20
PMA	123 ng/egg	75
Human milk (20KD < ~)	10 µl/egg	41

모유 중의 혈관 내피세포 성장에 미치는 영향

혈관형성 단계중 혈관내피세포의 성장은 필수적인 과정이다. 따라서 CAM assay에 의해 혈관형성을 촉진하는 것으로 사료되는 모유분획이 혈관내피세포의 성장에도 영향을 미치는 지를 조사하였다. 20KD 이하 분획을 사용했을 경우 혈관내피세포의 성장을 Fig. 2에 나타내었다. 대조군의 경우 2.66 × 10³ cells, 2 µl 투여군은 2.74 × 10³ cells,

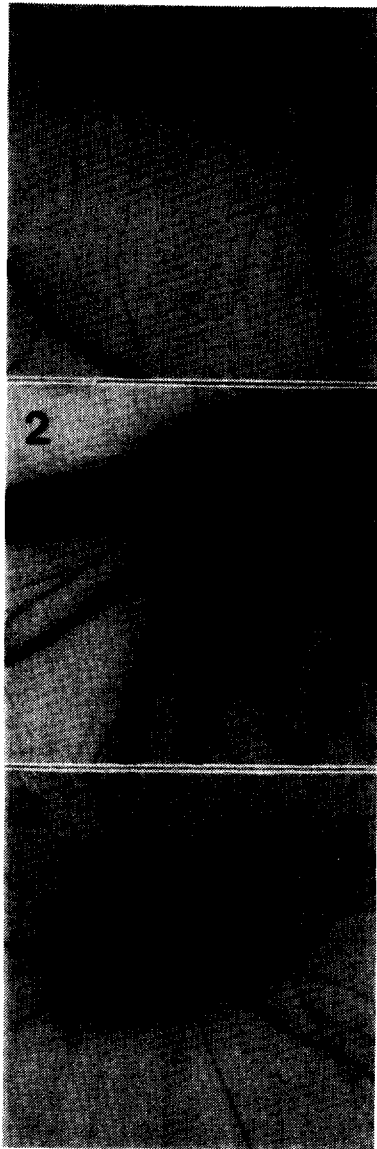


Fig. 1. Effects of low molecular weight (20KD) ~) fraction of human milk on angiogenesis in CAM. (1) control; (2) PMA (123 ng/egg); (3) low molecular weight (20KD) ~) fraction of human milk.

10 μl 투여군은 2.65×10^3 cells, 50 μl 투여군은 3.23×10^3 cells로서 대조군보다 약 21% 혈관내피세포의 성

장이 증가하였다. 100 μl 투여군은 3.99×10^3 cells로서 대조군보다 약 50% 혈관내피세포의 성장이 증가하였다. 그러므로 20KD 이하 분획의 경우 투여량이 증가할수록 혈관내피세포의 성장이 증가하였다.

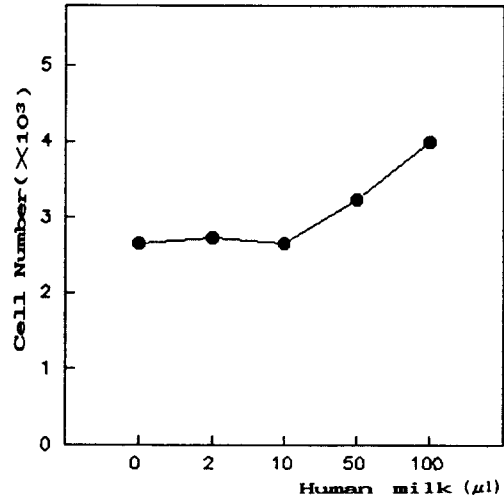


Fig. 2. Effect of low molecular weight (20KD) ~) fraction of human milk on the growth of endothelial cell.

개체의 발달 및 성장과 직결되는 혈관내피세포의 성장인자는 모유의 20KD 이하의 분획에 존재하여 혈관내피세포의 성장을 증가시키는 것으로 사료된다. 그리고 모유속에는 혈관내피세포 성장인자가 존재하여 혈관망을 형성시켜, 특히 모세혈관의 신생을 통해 개체의 발달과 성장에 기여할 것으로 사료된다.

혈관신생은 생리적인 발육과 월경주기에 따른 자궁내막의 비후, 상처 치유등에 나타나는 현상이며, 또 한편으로 각종의 질환 즉 고형악성신생물, 안과질환, 만성류마치스 혈관종, 혈관섬유종 및 건선 등에서 중요한 역할을 한다. 따라서 이들 혈관신생 기전 규명은 개체의 성장, 발육뿐 아니라 질환 치료법의 개발에 관한 연구는 최근 많은 주목을 받고 있다. 혈관신생은 대단히 복잡한 과정으로 되어 있지만, 크게 나누어 6종류의 과정으로 나눌 수 있다¹²⁾. 첫째로 어떠한 혈관신생 자극에 의해 혈관신생 인자가 방출된다. 둘째로 혈관신생 인자는 주변의 모세혈관 후정맥의 내피에서 plasminogen activator collagen 등의 단백질 분해효소의

분비를 자극해서 혈관내피가 고정되어 있는 기저막을 분해한다. 세째로 파괴된 기저막 간격에서 내피세포는 혈관 신생자극이 있는 장소로 향해 유주하면서 혈관 신생인자에 의해 직접적 혹은 간접적으로 자극해서 왕성하게 분열, 증식 유주하여 관강을 형성(vasculogenesis)하는 내피세포를 공급한다. 네째로 증식, 유주한 내피세포는 관강을 형성하여 기저막 구성물질을 분비해서 관강외측에 기저막을 형성한다. 다섯째로 기저막을 따라서 pericyte가 유주하여 세층의 혈관벽 구축이 완성된다. 마지막으로 인근 신생혈관의 분합(glomus)이 신생하여 새로운 혈관망이 형성된다.

최근 혈관내피세포의 배양이 가능하게 되어 혈관신생에 관련된 혈관내피세포의 여러 기능이 분석적으로 검토할 수 있는 것이 가능하게 되었다. 내피세포를 장기간 배양 dish에 배양하면 모세혈관양관강 구조물이 형성된다¹³⁾. 또한 Montesano 등은 2층의 collagen에 내피세포를 샌드위치와 같은 형으로 배양하면 2~3일 후 모세혈관양관강 구조물이 형성된다고 보고되어있다¹⁴⁾. 이러한 혈관신생을 촉진하는 인자들로서는 주로 polypeptide의 증식인자들이 중요한 혈관신생 인자로 생각되고 있다. 단독으로 혈관신생을 유발한다고 보고되어 있는 증식인자로는 fibroblast growth factor(FGF), epidermal growth factor(EGF), platelet derived growth factor(PDGF)가 알려져 있다. 그런데 이들의 분자량을 보면 EGF가 6KD 이하이고, PDGF가 33KD, FGF-1, 2가 7KD, FGF-3가 27~32KD, FGF-4가 19KD, FGF-5가 26KD이다. 본 연구에서 20KD 이하의 분획이 혈관내피세포의 성장과 혈관신생을 촉진시킨 것은 이 분획속의 FGF-1, 2, FGF-4 및 EGF에 기인할 것으로 생각되며 이들 중 어느 것이 크게 관련하며, 유즙중의 농도 및 작용 기전 등에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 제 2 차 파스퇴르 모유연구회 연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 심심한 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Richardson, T. and Mattarella, N. J. : Food. Protect., 1977, 40, 57.
2. Gupta, D. : Endocrinol. Exp., 1983, 17, 359.
3. Koldovsky, O. and Thornburg, W. : J. Pediat. Gastroent, Nutr., 1987, 6, 172.
4. Dunnington, D. J., Scott, R. J., Anzano, M. A. and Greig, R. : J. cell. Biochem., 1990, 44, 229.
5. Kohno, Y., Shiraki, K. and Mura, T. : Pediat. Res., 1991, 29, 251.
6. Mincheva, N. L., Hammarstrom, M. L. and Hammarstrom, S. : Clin. Exp. Immunol., 1990, 79, 463.
7. Mitsui, Y. : Experi. Med., 1991, 9, 108.
8. Crum, R., Szabo, S., and Folkman, J. : Science, 1985, 230, 1375.
9. Folkman, J. : Cancer Research, 1986, 46, 467.
10. Stevens, I.C. : CHS Conferences on Cell Proliferation, 1983, 10, 23.
11. Strickland, S. : Cell, 1981, 24, 277.
12. 井藤英喜 : 血管細胞の培養法と その應用. 東京化學同人, 東京. 1989, p. 13
13. Folkman, J. and Handenschild, C. : Nature. 1980, 288, 551
14. Montesano, R., Orci, L. and Vassalli, P. : J. Cell Biol., 1983, 97, 1648