

다공성막이 혈액뇌관문 내피세포의 배양에 끼치는 영향

이금정, 조혜진, 최형택, 나오순, 김경용*
중앙대학교 의과대학 해부학교실

Effect of Porous Membrane on Culture Properties of Blood-Brain Barrier Endothelial Cell

Keum-Jeong Lee, Hye-Jin Cho, Hyung-Taek Choi,
O-Soon Na and Kyung-Yong Kim*
Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University Dong-Jak Koo,
156-756, Seoul, Korea
(Received November 10, 2003; Accepted December 11, 2003)

ABSTRACT

The growth patterns of primary culture of bovine brain microvessel endothelial cells (BBMECs) were studied using electron microscopy when grown on 3.0 μm and 0.4 μm pore Transwell. The capillary fragments and isolated endothelial cells grew on collagen coated culture plate and Transwell membrane. The BBMECs grew only on the upper surface of membrane of 0.4 μm . But BBMECs on 3.0 μm pore membrane migrated through the pore and grew on the opposite side of the membrane. In summary, BBMECs isolated by enzyme digestion could migrate through 3.0 μm pore membrane but not through 0.4 μm pore membrane. So 0.4 μm pore membrane instead of 3 μm pore membrane should be used for drug transport experiment or transendothelial electrical resistance measurement.

Key words : BBB, Endothelial cell, Transwell

서 론

혈관뇌장벽(blood-brain barrier)은 혈액과 뇌 실질 사이에 존재하여 혈액으로부터 뇌로의 물질 이동이나 뇌로부터 혈액으로의 물질 이동에 중요한 역할을 담

당하고 있다. 혈관뇌장벽은 뇌 미세혈관 내피세포가 가장 주된 구성요소이며(Abbott et al., 1992; Abbruscato et al., 1999), 그 외에도 혈관주위세포, 별아교세포로 구성되어 있다(Shi & Audus, 1994; Eddy et al., 1997). 다른 부위의 미세혈관 내피세포와 달리 뇌 미세혈관 내피세포는 특징적으로 세포간 치밀이음부(tight junc-

이 논문은 2003학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

* Correspondence should be addressed to Dr. Kyung-Yong Kim, Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University Dong-Jak Koo, 156-756, Seoul, Korea. Ph: (02) 820-5643~4, FAX: (02) 815-4814, E-mail: skull@cau.ac.kr

Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

tion)가 발달해 있고(Arthur et al., 1987; Audus et al., 1990) 세포내 세포흡수소포(pinocytotic vesicles)와 세포창(fenestrae)이 거의 없다(Reese & Karnovsky, 1967; Bowman et al., 1981; Bowman et al., 1983). 이러한 특성으로 인해 뇌 미세혈관 내피세포는 분자량이 큰 약물이거나 극성을 띤 약물이 혈액으로부터 뇌 실질 내로 이동하는 것을 제한하는 역할을 한다.

일부 연구자들이(Panula et al., 1978; De Bault et al., 1979) 각각 쥐와 생쥐의 뇌에서 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하는데 성공한 이후로 그 기술이 점차 발전하여 최근에는 기능적으로나 형태적으로 완전한 내피세포를 분리, 배양할 수 있게 되었고, 내피세포의 화학적 성분이 상당부분 밝혀졌으며 내피세포 기능에 대한 분자 수준에서의 설명이 가능해졌다.

현재 뇌 미세혈관 내피세포를 분리하는 방법은 여러 가지가 있지만(Audus et al., 1987, 1990; De Bault et al., 1979; Williams et al., 1980), 크게 효소를 이용한 방법과 조직분쇄기를 이용한 방법으로 나눌 수 있다. 이 중에서 효소를 이용하는 방법이 살아있는 내피세포를 더 많이 얻을 수 있으며 신경세포나 아교세포의 오염을 줄일 수 있는 장점이 있다. 조직분쇄기를 이용하는 방법은 많은 세포를 얻을 수 있지만 분리 과정에서 세포막에 손상이 생겨 실제로 살아있는 세포의 수는 효소를 이용하는 방법에 비해 감소한다(Grabb & Gilbert, 1995).

뇌 미세혈관 내피세포를 이용한 생체의 혈관뇌장벽 모형은 혈관뇌장벽을 통한 약물의 이동과 그 기전을 밝히는데 유용하게 사용되고 있다. 그러나 생체의 모형을 통한 세포사이 투과 모델 약물(paracellular transport model drugs)의 투과도가 생체내 모형에 비해 높게 나타나는 문제가 있다. 연구자들이 뇌 미세혈관 내피세포를 별아교세포(astrocytes)와 동시배양 함으로써 이러한 문제점을 극복하려고 노력한 결과 내피세포를 단독으로 배양한 모형보다는 더 높은 전기저항을 얻을 수 있었고 세포사이 투과 모델 약물의 투과도를 더 낮출 수 있었지만 아직까지도 많은 한계점이 있다.

본 연구에서는 소의 뇌로부터 미세혈관 내피세포를 분리하여 다공막에 배양할 때 나타나는 특성을 비교 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 소의 뇌를 이용한 뇌 미세혈관 내피세포의 분리와 배양

소의 뇌에서 큰 혈관과 뇌막을 제거하고 회색질을 분리하여 세절한 다음 dispase와 collagenase/dispase를 처리하였다. 그 다음 percoll로 미세혈관 내피세포만을 분리하고, 그 후 horse serum과 dimethyl sulfoxide(DMSO, Fisher Scientific, Inc.)를 넣은 DMEM/F-12 세포배양액에 부유시켜 -80°C 냉동고에 보관한 다음 이틀날 배양하였다. 뇌 미세혈관 내피세포를 각각 $3.0\ \mu\text{m}$ 와 $0.4\ \mu\text{m}$ 직경의 구멍을 가진 Polycarbonate 재질의 막을 가진 Transwell™의 위쪽 구획에 $300,000\ \text{cells}/\text{cm}^2$ 의 밀도로 배양하였다. 배양액은 DMEM/F-12에 10% horse serum, 100Units/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin을 넣어 만들었다. 세포가 들어있는 쪽에는 배양액을 0.5 mL 넣고 세포가 들어있지 않는 쪽에는 배양액을 1.5 mL 넣어 37°C 의 세포배양기(5% CO_2 , 95% humidity)에서 세포를 배양하였다. 배양액은 3일째 되는 날 처음 교체하고 그 다음부터는 이틀에 한번 교체하였다. 세포의 성장과정은 위상차현미경(Olympus, CK2)으로 관찰하였다.

2. 투과전자현미경 관찰을 위한 처리과정

이중구조배양관에 배양된 내피세포를 투과전자현미경으로 관찰하기 위해 0.01 M PBS로 다공막에 배양된 세포를 세척하였다. 2.5% glutaraldehyde (4°C , pH 7.4, 0.1 M PBS)에 30분간 선고정하고 0.01 M PBS로 세척한 후 1% osmium tetroxide (4°C)에 20분간 후고정하였다. 에탄올과 프로필렌 옥사이드로 탈수한 후 이폰에 포매하였다. 초박절편기(Reichert-Jung, Wien, Austria)로 준초박절편을 제작해 Richardson염색을 하여 광학현미경으로 관찰한 후 초박절편을 제작해 JEM-200CX 투과전자현미경(Jeol, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

3. 주사전자현미경관찰을 위한 처리과정

다공막에 배양된 내피세포를 2.5% glutaraldehyde

(4°C, pH 7.4, 0.1 M PBS) 에 30분간 선고정하고 0.01 M PBS로 세척한 후 1% osmium tetroxide (4°C)에 20분간 후고정하였다. 에탄올로 점진적으로 탈수한 후, amylacetate에서 10분간 치환하고, critical point dryer에서 건조하였다. Jeol IonSputter JFC 1100을 이용하여 Gold coating을 실시한 후, JSM 35 CF로 15kV 하에서 관찰하였다.

결 과

내피세포의 일차배양을 위한 분리과정을 통해 얻어진 작은 조각의 모세혈관들은 콜라겐으로 도포한 배양기구의 표면에서 고착되어 성장하였다. Trypan blue 염색을 통해 세포의 생존율을 확인하고 배양밀도를 조절하였다. 내피세포는 모세혈관에서부터 이주하여 성장하였으며 배양 3일째부터 방추모양의 세포들이 형성되기 시작하였다. 이 세포들은 곧 3 내지 5개의 작은 세포군락은 형성하였으며 이러한 군락들이 계속 성장하여 이웃 군락과 만나 결과적으로 배양도구의 바닥을 전부 뒤덮는 단층을 형성하는 과정을 거쳤다 (Figs. 2A, 3A).

배양을 시작한 후 뇌 미세혈관 내피세포는 배양 후 6~7일 경에 단층을 형성하였다. 내피세포는 넓이가 약 5 μ m, 길이가 약 50 μ m 정도로 방추 모양으로 자랐으며, 특징적으로 소용돌이치는 모양을 나타냈다. 또한 일부의 세포들은 다각형의 형태를 보이는 것들도 있었으며 대체로 세포의 형태는 앞서 서술한 두 가지 형태의 범주 내에 있었다. 본 연구자는 이와 같은 분리와 배양을 통해 다양한 면역염색을 시도하여 별모양아교세포, 미세아교세포, 희소돌기아교세포 및 신경세포에 의한 오염은 극히 적음을 확인할 수 있었다.

배양액은 DMEM/F12에 Platelet derived horse serum을 10%로 하여 사용하였다. 이는 platelet derived growth factor가 적은 serum의 사용이 내피세포의 적절한 성장과 형태를 나타내는데 필수적이기 때문이다. 내피세포들은 충분히 성장하여 단층을 형성하면 세포 사이의 간격은 없어지며 혈액뇌관문의 특징적인 치밀이음부가 세포사이에 형성된다. 이 세포들은 서로 겹쳐 성장하지 않았으며 세포간의 접촉에 의해 서로 견

제가 되었다.

분리한 뇌 미세혈관 내피세포를 각 3.0 μ m와 0.4 μ m 직경의 구멍을 가진 막에 배양하여 구멍의 크기에 따른 내피세포의 성장 양상을 관찰하였다.

3.0 μ m 구멍을 가진 막에 배양을 한 경우에는 막의 양쪽에서 내피세포가 성장하여 단층을 형성하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 3A). Transwell의 위쪽 구획, 즉 collagen으로 도포한 막의 표면에 분리한 내피세포를 넣어 배양할 경우에는 세포가 다공막의 위쪽 구획에 면한 표면에서는 정상적으로 성장하여 세포단층을 형성하였다(Figs. 1A, 3A). 그러나 위쪽구획에 있는 내피세포는 콜라겐 막을 뚫고 직경 3.0 μ m의 구멍을 통해 다공막의 반대쪽으로 이주하여 원래 의도하지 않은 다공막의 아래쪽 구획에 면한 표면에서도 성장하고 있었다(Figs. 1A, 3B). 다공막의 양쪽에서 성장하는 내피세포는 구멍을 통해 세포질 돌기를 내어 서로 반대쪽의 표면에 돌기를 형성하였다. 이러한 돌기로 인해 내피세포 사이의 접촉이 방해 받아 치밀이음부의 형성을 방해되어 세포의 단층 뿐만 아니라 혈액뇌관문의 형성이 불완전하게 형성되었다.

0.4 μ m 구멍을 가진 막에 배양을 한 경우에는 Transwell의 위쪽구획을 형성하고 있는 다공막의 표면에서 내피세포가 정상적으로 성장하여 내피세포 단층을 형성하고 있는 것이 관찰되었다(Figs. 1B, 2A). 그러나 3.0 μ m의 구멍을 가진 다공막에서와는 달리 다공막의 아래쪽 구획에 면한 표면에서는 세포가 관찰되지 않았다(Figs. 1B, 2B).

이것으로 보아 뇌의 미세혈관에서 분리한 내피세포는 Transwell 중에서 3.0 μ m 크기의 구멍을 가진 다공막보다는 0.4 μ m 구멍을 가진 다공막을 사용하여 배양해야 원하는 구획에서만 세포를 배양할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

뇌 미세혈관 내피세포를 분리하여 배양하는 것은 언제나 힘든 작업 중의 하나이다(Joo, 1993). 본 실험에서는 dispase와 collagenase/dispase를 이용하여 최종적으로는 percoll gradient separation을 이용해 혈관

내피세포를 분리하였다(Audus & Borchardt, 1999). 분리된 내피세포는 collagen으로 도포된 바닥에 잘 붙지 않는다고 하였지만(Szabo et al., 1997), 본 실험에서는 미세혈관의 조각과 분리된 내피세포들을 모두 collagen 이 도포된 다공막에 부착시켜 배양할 수 있었다. Trypan blue를 이용해 세포의 viability를 조절하여 배양 후 3일째부터 혈관내피세포가 분화하는 것을 관찰하였다. 배양액에 FBS를 사용하면 일부 오염된 세포들이 빠르게 성장한다(Demeuse et al., 2002). 그러므로 본 실험에서는 platelet derived horse serum(PDS)을 사용하여 오염된 세포의 성장을 억제시켰으며 내피세포가 조밀하게 성장하면서 세포 사이의 간격이 거의 없어지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 종류의 PDS는 빠르게 성장하는 세포 즉 섬유모세포나 민무늬근육세포의 성장을 억제하여 순도 높은 배양세포를 얻는데 적합한 것으로 알려져 있다(Male et al., 1990; Greenwood, 1991). 내피세포가 배양도구의 바닥을 완전히 채우는 시기는 약 7일 경이었으며 14일 정도(Demeuse et al., 2002)라는 것에 비해 상당히 빠른 시기였다. 본 실험에서는 분리된 내피세포 자체를 사용하였지만 타 연구자는 미세혈관 조각을 사용하였기 때문으로 생각된다. 또한 실험실 조건이나 사용한 동물의 차이를 배제할 수도 없다. 내피세포의 모양은 방추형이거나 또는 다각형의 형태를 나타냈으며, 세포들은 작고 매우 조밀하며, 서로 겹쳐지지 않고, 세포간 접촉에 의해 성장이 억제되는 세포들이다. 이와같은 세포의 분리와 배양 조건을 통해 매우 순도가 높고 오염된 세포가 적은 내피세포의 배양을 할 수 있었다.

다공막의 재질로 사용된 polycarbonate 막은 불투명하여 세포의 성장을 관찰하는데 부적합하지만, PET 재질의 막보다는 세포의 부착성이 좋아 많이 사용되고 있다. PET 재질의 막을 사용하는 경우 matrigel을 우선 도포하고 그 위에 collagen으로 다시 도포하면 세포들이 잘 부착하여 좋은 결과를 얻을 수 있다(Male et al., 1990). 그러나 본 실험에서는 polycarbonate 막을 collagen만으로 도포하여도 세포들이 잘 부착하여 자라는 결과를 얻을 수 있었다.

막의 구멍 크기에 따른 세포배양의 결과는 차이가 뚜렷하였다. 3.0 μm 크기의 구멍을 가진 다공막에서는 내피세포가 구멍을 통해 이주하여 막의 반대쪽에서도

성장하였다. 그러나 0.4 μm 크기의 구멍을 가진 다공막에서는 구멍을 통해 이동을 하지 못하고 원하는 표면에서만 내피세포가 배양되었다. 그러므로 다공막을 이용하는 실험에서는 0.4 μm 크기의 다공막을 사용해야 한다는 것을 알 수 있었다. 1 μm 크기의 구멍을 가진 다공막을 사용하여 별아교세포와 내피세포를 양쪽 면에 동시배양을 한 실험에서는 이 크기의 구멍을 통해서 두 세포들이 이동하지 않았으며 별아교세포의 세포들기가 이 구멍을 통해 내피세포에 접촉하고 있는 것을 보고하기도 하였다(Demeuse et al., 2002). 내피세포는 별아교세포와의 접촉을 통해 생체내의 성질을 더욱 많이 띠게 되어 in vitro 실험의 조건을 더욱 생체 내에서와 유사하게 만들 수 있게 된다.

본 실험에서는 효소를 이용해 내피세포를 분리, 배양하여 3.0 μm 및 0.4 μm 크기의 구멍을 가진 다공막에 배양하여 성장양상을 관찰하였다. 내피세포는 3.0 μm 구멍의 다공막을 이동하였으나 0.4 μm 크기의 구멍을 가진 다공막을 이동하지 못하였다. 그러므로 약물이동도를 관찰하는 실험이나 전기저항을 측정을 목적으로 하는 실험에서는 3.0 μm 의 다공막을 사용하는 대신 0.4 μm 크기의 다공막을 사용해야 한다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Abbott NJ, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J: Development and characterization of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood brain barrier. *J Cell Sci* 103 : 23-37, 1992.
- Abbruscato TJ, Davis TP: Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood brain barrier integrity. *J Pathol Exp Ther* 289 : 668-675, 1999.
- Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD: Astrocyte mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev Brain Res* 36 : 155-159, 1987.
- Audus KL, Borchardt RT: Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for blood brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 507 : 9-18, 1987.
- Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT: The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport

- and metabolic studies. *Pharm Res* 7 : 435-451, 1990.
- Bowman PD, Betz AL, Ar D, Wolinsky JS, Penney JB, Shivers RR, Goldstein GW: Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* 17 : 353-362, 1981.
- Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, Betz AL, Goldstein GW: Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood brain barrier permeability. *Ann Neurol* 14 : 396-402, 1983.
- De Bault LE, Kahn LE, Frommes SP, Cancilla PA: Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. *In Vitro* 15 : 473-487, 1979.
- Demeuse PH, Kerhofs A, Struys Ponsar C, Knoop B, Remacle C, Aguilar PH: Compartmentalised coculture of rat brain endothelial cells and astrocyte: a synergistic model to study the blood brain barrier. *J Neurosci Methods* 121 : 21-31, 2002.
- Eddy EP, Maleef BE, Hart TK, Smith PL: In vitro models to predict blood brain barrier permeability. *Adv Drug Deliv Rev* 23 : 185-198, 1997.
- Grabb PA, Gilbert MR: Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an in vitro blood brain barrier. *J Neurosurg* 82 : 1053-1058, 1995.
- Greenwood J: Astrocytes, cerebral endothelium and cell culture: the pursuit of an in vitro blood brain barrier organ. *Ann NY Acad Sci* 633 : 426-430, 1991.
- Joo F: Endothelial cell of brain and other organ system: some similarities and differences, *Progr Neurobiol* 48 : S35-S37, 1993.
- Male DK, Pryce G, Rahman J: Comparison of the immunological properties of rat cerebral and aortic endothelium, *J neuroimmunol* 30 : 290-295, 1990.
- Panula P, Joo F, Rechart L: Evidence for the presence of viable endothelial cells in culture derived from dissociated rat brain. *Experientia* 34 : 95-97, 1978.
- Reese TS, Karnovsky MJ: Fine structural localization of a blood brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34 : 207-217, 1967.
- Shi F, Audus KL: Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. *Neurochem Res* 19 : 427-433, 1994.
- Szabo CA, Deli MA, Ngo Thi Khue, Joo F: Production of pure primary rat endothelial cell culture; a comparison of different method. *Neurobiol* 5 : 1-16, 1997.
- Williams SK, Gillis JF, Matthews MA, Wagner RC, Bitensky MW: Isolation and characterization of brain endothelial cells: Morphology and enzyme activity. *J Neurochem* 35 : 374-381, 1980.

< 국문초록 >

소뇌 미세혈관에서 분리한 내피세포(BBMECs)를 직경 3.0 μm 및 0.4 μm 인 구멍을 가지는 다공성막(Transwell)에서 일차배양하였을 때의 특징을 전자현미경을 사용하여 살펴보았다. 분리된 모세혈관의 작은 조각과 분리된 내피세포들은 콜라겐으로 도포한 배양기구의 표면에 고착되어 성장하였다. BBMECs들은 직경 0.4 μm 인 다공성막의 위쪽 구획에서만 성장하였으나 직경 3.0 μm 인 구멍을 가진 막에서는 세포들이 구멍을 통해 막의 반대쪽으로 이주하여 다공성막의 아래쪽 구획에서도 성장하여 세포단층을 형성하였다.

이상의 결과로 효소 처리에 의해 분리한 BBMECs는 직경 0.3 μm 의 다공성막을 통과하나 직경 0.4 μm 의 다공성막을 통과할 수 없음을 알 수 있었으며, 약물이동도를 관찰하는 실험이나 전기저항을 측정을 목적으로 하는 실험에서는 3.0 μm 의 다공성막을 사용하는 대신 0.4 μm 크기의 다공성막을 사용해야 한다는 것을 알 수 있었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Transmission electron micrographs of primary endothelial cells cultured on the porous membranes (Day 7). A) The endothelial cells are growing on both sides of 3.0 μm pore size membrane (2,500 \times). B) Monolayer is formed only on upper side of 0.4 μm pore size membrane (2,500 \times). C), D) Tight junctions are formed between endothelial cells of monolayer (14,000 \times).
- Fig. 2.** Scanning electron micrographs of 0.4 μm pore Transwell membranes. BBMECs in upper part of membrane (A) reached confluence and showed few intercellular space (arrow). But there was no BBMECs grown on lower part of membrane (B). Bar equals 1 μm .
- Fig. 3.** Scanning electron micrographs of 3 μm pore Transwell membranes. BBMECs in upper (A) and lower (B) parts of membrane showed a few intercellular space (arrows). BBMECs were growing on lower parts of membrane. Bar equals 10 μm .

