

혈관내막 성장인자에 의해 유도된 내막세포 분화에 대한 정맥용 면역글로불린과 메틸프레드니솔론의 효과

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실

최현아 · 하경화 · 윤증서 · 이 윤 · 이준성 · 한지환

Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Endothelial Cell Differentiation by Intravenous Immunoglobulin and Methylprednisolone

Hyoun Ah Choi, M.D., Kyung Hwa Ha, M.D., Jong Seo Yoon, M.D., Yoon Lee, M.S.
Joon Sung Lee, M.D. and Ji Whan Han, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: Kawasaki disease is the most common cause of systemic vasculitis in children less than 5 years of age. Recent immunohistochemistry findings suggest that many vascular growth factors play a role in the formation of the coronary artery lesions. Active remodeling of the coronary artery lesions in Kawasaki disease continues in the form of intimal proliferation and neoangiogenesis for several years after the onset of the disease. Intravenous immunoglobulin(IVIG) and corticosteroid have been used in the treatment of Kawasaki disease but the exact mechanism is not clear. We have investigated that IVIG and corticosteroid inhibited vascular endothelial growth factor(VEGF)-induced tube formation of endothelial cells in vitro on Matrigel assay.

Methods: Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were cultured and seeded on Matrigel coated 24 well plates in medium with or without the following agents: VEGF, VEGF plus IVIG, VEGF plus VEGF antibody, VEGF plus methylprednisolone, VEGF, IVIG plus methylprednisolone for 18 hours. The total length of tube structures in each photograph was quantified.

Results: IVIG significantly inhibited the proliferation of HUVECs. The inhibitory effect of IVIG was also reversible. In the meantime, VEGF induced the differentiation of HUVECs into capillary like structures on Matrigel, which was inhibited by VEGF antibody in a dose-dependent manner. Interestingly, IVIG and methylprednisolone inhibited VEGF-induced tube formation of HUVECs. IVIG was more effective in inhibition than methylprednisolone alone.

Conclusion: We revealed that VEGF induced the differentiation of HUVECs and this effect was inhibited by IVIG and methylprednisolone. (Korean J Pediatr 2005;48:886-893)

Key Words: Endothelial cell, Vascular endothelial growth factor(VEGF), Intravenous immunoglobulin(IVIG), Methylprednisolone

서 론

가와사키병은 어린 소아에서 전신성 혈관염을 일으키는 가장 흔한 원인이다^{1,2)}. 미국에서는 5세 미만에서 연간 10만명 당 10명, 일본에서는 5세 미만에서만 10만명 당 80-90명의 유병률을

보인다³⁾. 자연 치유 질환이나 치료를 안한 경우에는 20%에서 관상동맥협착증이 발생한다³⁾. 또한 7세 이상에서 발병하거나 재발한 경우 거대 관상동맥류가 생길 위험도가 높아지며 이런 거대 관상동맥류가 발생한 환자의 50%에서 관상동맥류 파열, 심근염, 관상동맥류 내 혈전, 심근 경색 등의 합병증이 발생한다^{2,3)}.

가와사키병에서 관상동맥질환이 생기는 기전은 여러 논문에서 연구되어 보고되고 있는데, Suzuki 등⁴⁾은 가와사키병이 발병한 경우 여러 혈관 성장인자들의 분비가 촉진되어 내막세포의 성장, 분화, 이동이 일어나면서 혈관이 생성되고 평활근 세포들이 내막층에서 증식, 이동되어 이로 인해 관상동맥이 재구성된다고 주장

접수: 2005년 4월 7일, 승인: 2005년 6월 3일
책임저자: 한지환, 가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 소아과
Correspondence: Ji Whan Han, M.D.
Tel: 02)590-1472 Fax: 02)537-4544
E-mail: han59@catholic.ac.kr

하였다. 또한 이런 재구성 과정은 가와사키병 발병 후 수년에 걸쳐 내막층의 증식과 신생 혈관 생성 작용이 진행되면서 일어난다⁵⁾. 혈관 성장인자로 transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), platelet-derived growth factor-A(PDGF-A), basic fibroblast growth factor(bFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF) 등이 있으며 가와사키병에서 두꺼워진 내막에 영양 공급을 위한 신생 혈관 생성에 VEGF가 혈관 성장인자로 작용하고 특히 관상동맥합병증이 생긴 가와사키병의 아급성기에 증가되는 경향을 보인다는 보고가 있다^{1, 4)}. VEGF는 내막세포의 분화와 맥관 형성, 미세혈관투과성을 유도하고^{1, 3, 4, 6-10)}, 이런 가와사키병의 관상동맥의 재구성뿐 아니라^{1, 3, 4)} 종양의 성장이나^{1, 9, 10)} 류마티스 관절염에서 활액 조직내의 신생혈관생성^{1, 11-13)}, 당뇨에서 혈관기능이상¹⁴⁾, 허혈성 심질환에서 관상동맥의 동맥경화^{15, 16)}와 같은 혈관연관성 질환의 병인론에서 중요한 역할을 한다.

수년간 가와사키병의 치료제로 intravenous immunoglobulin (IVIG)이 사용되었으나 그 치료 기전이 명확히 밝혀진 바는 없다³⁾. 그러나 가와사키병에서 IVIG 치료 후 관상동맥 합병증의 발생이 15-25%에서 5%로 감소하였다는 보고가 있으며¹⁷⁾, 가와사키 발병 후 첫 10일 이내에 IVIG를 사용할 경우 심혈관계 합병증이 감소한다는 보고도 있다¹⁸⁾. Shinorhara 등¹⁹⁾은 코르티코스테로이드를 IVIG와 같이 치료에 사용한 경우가 치료효과가 높아진다고 보고하였으며, Dale 등²⁰⁾은 8명의 임상 증례를 고찰하여 심각한 합병증이 동반된 가와사키병에서 스테로이드와 아스피린 병합 치료시 효과가 좋았다는 보고를 하였다. 이런 IVIG와 코르티코스테로이드가 가와사키병의 관상동맥합병증을 감소시키는 데 어떠한 기전으로 작용하는지 알아보고자 본 연구에서는 Matrigel을 이용하여 *in vitro*에서 VEGF에 의해 유도된 내막세포 분화에 대한 IVIG와 methylprednisolone의 효과를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. Gelatin이 도포된 배양접시 준비

2차 증류수로 1% gelatin(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 용액을 만든 뒤 121°C에서 20분간 멸균시켰다. 이를 배양접시에 3-5 mL 넣어준 뒤 4°C에 보관하였다.

2. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)의 분리

정상적으로 분만된 건강한 신생아로부터 제대정맥 혈관을 얻었다. 세포배양액(M199, Life Technologies GIBCO BRL, Grand Island, USA)으로 희석시킨 0.2% collagenase(Life Technologies GIBCO BRL, Grand Island, USA)를 혈관 안으로 주입시킨 후 37°C 배양기에 15분간 두어 혈관내피세포를 분리하였다. 분리된 세포를 50 mL tube로 옮겨 4°C, 1,500 rpm에

서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 세포배양액[20% 우태혈청, 30 μ g/mL, endothelial growth supplements(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 90 μ g/mL heparin(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 25 mM Hepes, 2.2 g/L sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine] 5 mL을 넣어 잘 혼합한 뒤 1% gelatin이 도포된 30 mm 배양접시에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다.

3. HUVECs의 계대배양

HUVECs를 3-4일 배양하여 배양 접시 표면의 80-90% 정도 자라면 pH 7.4 인산완충용액으로 2번 세척 후, trypsin-EDTA (Life Technologies GIBCO BRL, Grand Island, USA)를 처리하여 단일세포로 분리하였다. 20% 우태혈청이 들어있는 세포배양액 10 mL로 한차례 세척하였다. 상층액은 제거하고 세포배양액 8 mL에 잘 용해시킨 뒤 1% gelatin이 도포된 100 mm 배양접시에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에 계대배양 하였다. 실험에는 이러한 과정을 3-4번 정도 반복한 계대배양 세포를 사용하였다.

4. IVIG의 HUVECs 증식 억제 효과

1% gelatin이 도포된 24 well plate에 HUVECs를 2×10^4 /well로 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 16시간 배양하였다. IVIG(Green Cross, Seoul, Korea)를 well당 1, 10, 25, 40 mg/mL의 농도로 넣어 준 다음 24시간, 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 24시간 및 48시간 후 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포의 수를 세었다.

5. IVIG가 처리되었던 HUVECs의 가역성 여부

1% gelatin이 도포된 24 well plate에 HUVECs를 2×10^4 /well로 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 16시간 배양한 후, IVIG를 40 mg/mL의 농도로 넣어 준 다음 24시간 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 24시간이 되었을 때 IVIG를 제거하고 20% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 M199 배양액을 새로 넣어주고 이때부터 24시간, 48시간 배양 후 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포의 수를 세었다.

6. Matrigel에서 튜브(tube) 형성

80-90% 자란 HUVECs를 trypsin/EDTA 처리하여 단일세포로 만든 뒤, Matrigel이 코팅된 24 well plates(Beckton Dickinson, San Jose, USA)에 4×10^4 개의 세포와 ① purified human recombinant VEGF 20 ng/mL(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), ② VEGF 20 ng/mL와 IVIG 40 mg/mL, ③ VEGF 20 ng/mL와 monoclonal VEGF antibody(2 μ g/mL or 20 μ g/mL; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA), ④ VEGF 20 ng/mL와 methylprednisolone(10^{-12} M, 10^{-9} M or 10^{-6} M; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), ⑤ VEGF 20 ng/mL, IVIG 40 mg/mL와 methylprednisolone

(10^{-12} M, 10^{-9} M or 10^{-6} M; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 각각 넣고, 18시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 18시간 후 튜브 형성 여부를 현미경으로 관찰하고, ×100의 배율로 사진을 찍어, 튜브의 총 길이를 측정하였다.

7. 세포 부착성 검사

1% gelatin이 도포된 24 well plate에 2×10^4 /well의 HUVECs과 40 mg/mL의 IVIG를 넣어 주고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 배양하였다. 6시간 후 배양액을 제거하여 흡착된 세포만을 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수를 세었다.

8. 통계

통계 분석은 SPSS for windows Version 10.0 프로그램을 IVIG와 methyl-prednisolone의 처리 유·무 등에 대한 ANOVA(Bonferroni Post hoc Test)를 이용하여 시행하였고, 각 실험군에 대한 비교는 Mann-Whitney U-test를 이용하였다. 실험은 각각 다른 HUVECs를 이용하여 3회 시행하였으며, 실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계학적 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. IVIG의 농도와 투여시간에 따른 HUVECs 증식 억제 효과

IVIG를 각각 1, 10, 25, 40 mg/mL 농도로 투여한 후 24시간 또는 48시간 HUVECs를 배양한 뒤 IVIG 농도와 세포 배양 시간의 차이에 따른 세포증식 억제 정도를 관찰하였다.

IVIG의 농도를 1 mg/mL, 10 mg/mL로 하였을 때에는 24시간, 48시간 동안 배양 모두 대조군에 비해 세포수의 유의한 감소가 없었다(Table 1). 그러나 25 mg/mL, 그리고 40 mg/mL로 증량하였을 경우에는 IVIG를 투여하지 않은 대조군에 비하여 통계학적으로 각각 유의한 세포수 감소 효과를 관찰할 수 있었으며($P < 0.001$)(Table 1), 25 mg/mL와 40 mg/mL 두 농도간에도 40 mg/mL를 처리한 경우가 25 mg/mL를 처리한 경우보다 세포수 감소 효과가 더 뚜렷하였다($P < 0.05$)(Table 1).

Table 1. Inhibitory Effect of Intravenous Immunoglobulin on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Proliferation

	Control	IVIG			
		1 mg/mL	10 mg/mL	25 mg/mL	40 mg/mL
0 hr	23	23	23	23	23
24 hr	47±3	48±3	41±3	27±3*	23±4*, †
48 hr	85±2	82±5	77±1	51±2*	41±4*, †

Data are given as mean±SD(Cell number×10³). * $P < 0.001$ vs. control; † $P < 0.05$ IVIG 25 mg/mL vs. 40 mg/mL. Abbreviation : IVIG, intravenous immunoglobulin. This study was repeated 3 times

세포 배양 시간에 따른 억제 효과는 25 mg/mL과 40 mg/mL에서 배양 후 24시간과 48시간 모두에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 효과를 보였다($P < 0.001$)(Fig. 1, Table 1).

2. IVIG에 의한 HUVECs 증식 억제 효과의 가역성

IVIG 40 mg/mL을 24시간 동안 처리해 주어 HUVECs의 증식 억제를 본 후, IVIG를 제거해 주면 IVIG를 처리해 주지 않았던 대조군과 비교하여 세포의 증식이 잘 일어날 수 있는지를 살펴보았다.

IVIG를 제거하고 48시간 후, 세포의 증식은 대조군과 유사한 비율로 증식됨이 관찰되었으나, IVIG 제거 후 24시간 때는 세포의 증식 비율이 대조군에 비해 떨어짐이 관찰되었다(Fig. 2).

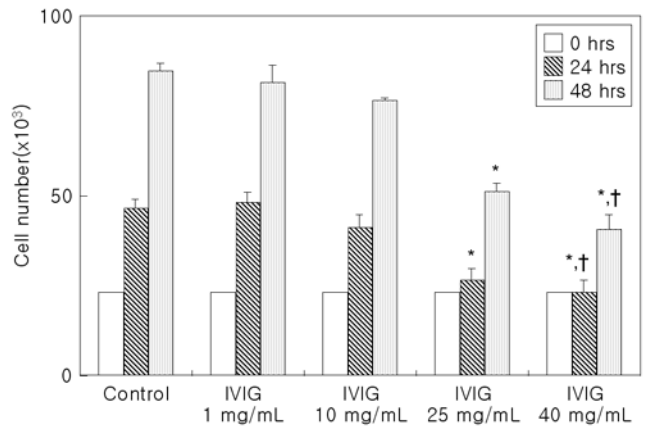


Fig. 1. Inhibitory effect of IVIG on HUVECs proliferation. As assessed by trypan blue exclusion, the number of live cells was significantly reduced by IVIG in a dose-dependent manner(* $P < 0.001$ vs. control). Nevertheless, 25 mg/mL of IVIG had less effect than 40 mg/mL of IVIG(† $P < 0.05$).

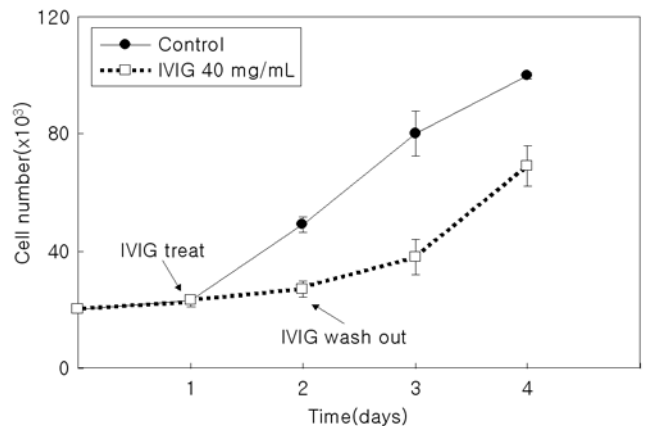


Fig. 2. Effect of IVIG washout on HUVECs proliferation. Cells were treated with (□) or without (●) IVIG 40 mg/ml. IVIG-treated medium was changed to a IVIG-free medium on days 2, 3, and 4 as indicated by the arrow. The restoration of growth was delayed by 24 hrs. Cells were counted by the trypan blue exclusion method.

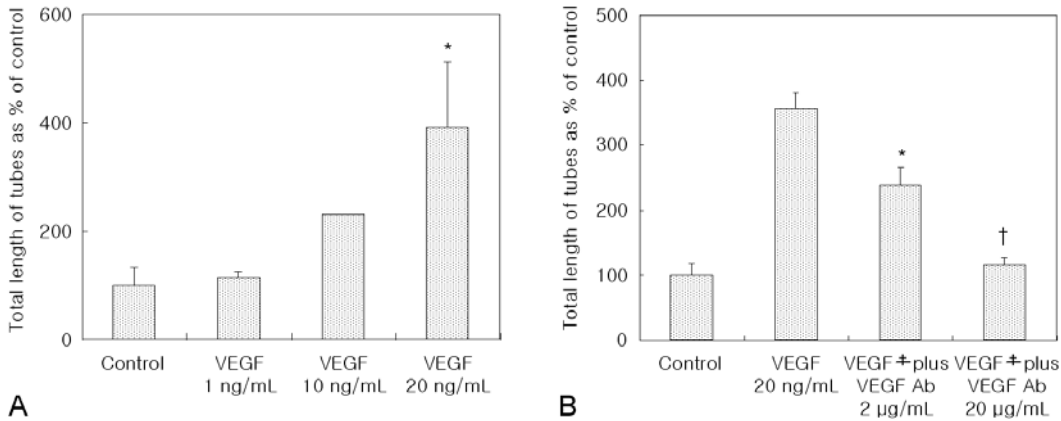


Fig. 3. The effect of VEGF and anti-VEGF Antibody on differentiation of HUVECs. **(A)** VEGF enhances tube formation in a dose-dependent manner ($P < 0.05$ vs. control). **(B)** Total length of tubes were significantly reduced by a monoclonal VEGF antibody in a dose-dependent manner ($P < 0.05$ vs. VEGF 20 ng/mL; $^{\dagger}P < 0.001$ vs. VEGF 20 ng/mL; ‡ VEGF 20 ng/mL; bars, \pm S.D). Experiments were repeated 3 times. Abbreviation : Ab, antibody.

3. VEGF에 의해 유도된 HUVECs의 튜브형성

Matrigel을 이용하여, VEGF(1, 10, 20 ng/mL)가 HUVECs의 분화를 유도하여 튜브를 형성하는지를 보았다. VEGF를 처리해 주지 않은 대조군과 비교하여 튜브길이를 백분율화 했을 때 (대조군 100%) VEGF 1, 10, 20 ng/mL 처리해 주었을 때 튜브형성이 VEGF의 농도에 비례하여 116±8%, 231±15%, 390±85%로 일어났고, 특히 20 ng/mL의 VEGF 처리군(390±85%)은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$)(Fig. 3A).

이렇게 나타난 결과가 VEGF 특이적으로 일어났는지를 확인하기 위해 항 VEGF 항체를 처리한 후 관찰하였는데, VEGF 항체의 농도가 2 µg/mL에서 20 µg/mL로 증가함에 따라 형성된 튜브의 총 길이가 항체 농도에 비례하여 239±27%에서 117±8%로 유의하게 감소하였으며($P < 0.05$), 특히 20 µg/mL로 처리해 주었을 때 튜브형성은 VEGF를 처리해 주지 않은 대조군과 각각 117±8%, 100±18%로 유사한 결과를 보였다(Fig. 3B).

4. IVIG와 methylprednisolone의 HUVECs의 튜브형성 억제 효과

Matrigel을 이용한 실험에서 VEGF에 의해 유도되는 튜브형성이 IVIG와 methylprednisolone에 의해 억제되는지를 살펴 보았다.

VEGF 20 ng/mL를 처리하였을 때 대조군과 비교하여 튜브형성이 356±25%로 관찰되었다. VEGF 20 ng/mL를 처리한 군에 IVIG 40 mg/mL 또는 여러 농도의 methylprednisolone (10^{-12} M, 10^{-9} M or 10^{-6} M)을 처리해 주었을 때 튜브형성이 유의하게 억제되었으며($P < 0.05$), methylprednisolone의 경우 그 억제 정도가 농도에 비례하여 일어났으나 IVIG 투여시 보다는 억제 효과가 약하였다(Fig. 4, Table 2). 한편, IVIG와 meth-

ylprednisolone을 병합투여한 경우는 methylprednisolone 농도에 상관없이 모두 튜브 형성을 잘 억제하였으나($P < 0.001$), IVIG만 단독 투여한 것과 통계적 차이는 없었다(Fig. 4A, Table 2).

5. HUVECs의 부착에 미치는 IVIG의 영향

in vitro 상에서 튜브형성을 억제한 IVIG가 HUVECs의 부착에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 1% gelatin을 이용하여 알아보았다.

40 mg/mL의 IVIG를 처리해 준 것과 그렇지 않은 대조군의 부착된 세포수를 비교한 결과 IVIG는 세포의 부착에는 영향을 미치지 않음이 관찰되었다(Fig. 5).

고 찰

Matrigel을 이용한 본 연구에서, 18시간 동안 VEGF를 처리해 준 결과, 내막세포가 튜브로 유도되었으며, VEGF 항체의 농도가 2 µg/mL에서 20 µg/mL로 증가함에 따라 형성된 튜브의 총 길이가 항체 농도에 비례하여 239±27%에서 117±8%로 유의하게 억제되었다($P < 0.05$). 이런 결과는 VEGF가 *in vitro* 상에서 특이적으로 내막세포의 분화에 작용한다는 것을 보여주며 Ferrara 등²¹⁾도 VEGF의 비슷한 효과를 보고한 바 있다.

In vitro 상에서 IVIG 농도와 세포 배양 시간의 차이에 따른 세포 증식 억제 정도를 관찰한 연구에서는 IVIG는 그 용량에 비례하여 HUVECs의 증식을 통계학적으로 유의하게 억제하였고, 또한 이러한 IVIG의 억제 효과는 가역적으로 나타났다.

이는 IVIG에 의한 세포 증식 억제 효과가 비록 그 기전은 정확하지는 않으나, 단지 세포의 치사율과 관련이 있는 것이 아니라 일시적으로 내막세포의 증식에 영향을 주는 인자들을 억제하는 기전으로 작용함을 시사해준다.

Matrigel은 재구성된 기저막 단백질 기질로 내막세포의 튜브 형

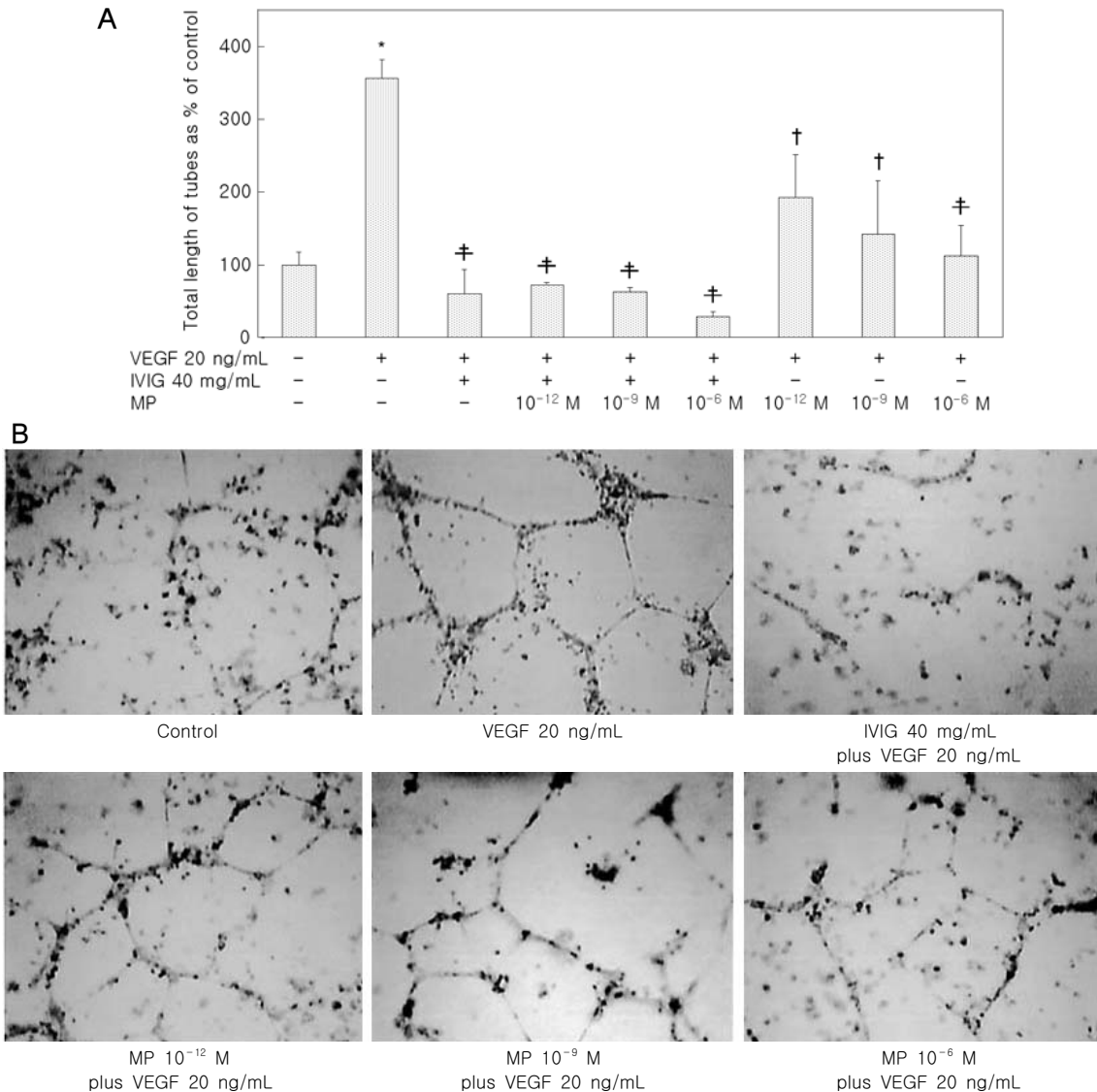


Fig. 4. The effect of IVIG and/or methylprednisolone on differentiation of HUVECs. **(A)** VEGF at 20 ng/mL enhances tube formation, whereas IVIG and methylprednisolone(MP) reverses this effect in a dose-dependent manner. Experiments were repeated 3 times ($P < 0.001$ vs. control; $^{\dagger}P < 0.05$ vs. VEGF 20 ng/mL; $^{\ddagger}P < 0.001$ vs. VEGF 20 ng/mL; bars, \pm S.D). **(B)** IVIG and methylprednisolone effectively inhibited the length of endothelial tube induced by VEGF in a dose dependent manner. Six examples of the HUVECs-tube formation assay on Matrigel matrix. Photographs were taken under phase-contrast microscopy($\times 100$). Abbreviation: MP, methylprednisolone.

성을 유도하는 실험에 사용된다²²⁾. 또한 혈관생성과 관련된 여러 생화학적 분자학적 작용 등과 내막세포들의 상호작용과 기저막의 특성을 연구할 수 있는 유용한 모델로 많이 이용되고 있다²²⁾.

Matrigel을 이용한 본 실험에서 IVIG와 methylprednisolone은 VEGF에 의해 유도되는 내막세포의 튜브 형성을 유의하게 억제하였는데, 이는 닭의 용모모막 모델, 토끼의 각막모델, 쥐의 종양 등에 코르티손, 하이드로코르티손과 코르티손의 합성유도체를 헤파린과 같이 투여했을 때 새로운 모세혈관 생성을 억제했다고 보고한 바 있는 Folkman 등²³⁾의 연구결과와 유사하다 할

수 있다. 특히 본 연구에서는 IVIG가 methylprednisolone 단독 투여시 보다 더 효과가 있었으며 또한, IVIG와 methylprednisolone을 병합 투여했을 때 IVIG 단독 투여시 때와 통계적으로 유의한 차는 없었다(Fig. 4A, Table 2). 이는 VEGF에 의한 혈관생성의 억제 효과는 methylprednisolone보다 IVIG가 더 강력하다는 것을 의미한다.

한편, 본 연구에 IVIG의 튜브 형성 억제에 세포의 부착 단계에서부터 억제하는 지를 살펴 본 결과, IVIG를 처치한 세포와 처치하지 않은 세포 사이에 1% 젤라틴의 부착성은 통계학적으로

로 유의한 차이를 보이지 않음에 따라, IVIG는 세포의 부착에는 영향을 미치지 않음이 관찰되었다. 즉 IVIG는 세포의 튜브형성

과정 자체에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

내막세포는 가와사키병, Wegener's granulomatosis와 같은 염증성 혈관성 질환의 면역성 병인론에서 중요한 역할을 하는 세포이며^{18, 24} VEGF는 이러한 내막세포의 이동과 증식의 유도, 맥관 구조 형성 등의 여러 내막세포의 기능을 조절하는 기능을 한다고 보고되고 있다^{21, 25}.

가와사키병의 병태생리학적 연구 논문들에서는 VEGF 등과 같은 여러 혈관 성장인자들이 촉진되어 내막층이 증식함으로써 이로 인해 관상동맥이 재구성된다고 보고하였다^{1, 4}. 이러한 관상동맥의 재구성은 가와사키병의 관상동맥 합병증에 중요한 병리기전으로 작용하며 세포의 기질이 합성되고 이런 기질들에서 세포들의 이동, 증식, 맥관 형성 등이 이루어지고 마지막으로 중간층에서 평활근 세포들이 증식되고 이동하여 혈관 내막이 두꺼워지고 영양공급을 위해 맥관 형성을 이루면서 관상동맥이 재구성(remodeling)된다⁴.

Inmaculada 등²⁶은 맥관 형성이 이루어지는 기전으로 VEGF에 의해 유도되는 내막세포의 분화는 세포의 아포토시스(apoptosis)가 일어나는 과정이 필요하며, 내막세포의 아포토시스에 의해 맥관 세포들이 재배열되면서 신생혈관이 생성된다는 보고

Table 2. The Effect of Intravenous Immunoglobulin and/or Methylprednisolone on Differentiation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Agents	Mean ± SD(%)
Control	100 ± 18
VEGF*	356 ± 25
VEGF* plus IVIG [†]	60 ± 33
VEGF*, IVIG [†] plus MP(10 ⁻¹² M)	73 ± 2
VEGF*, IVIG [†] plus MP(10 ⁻⁹ M)	63 ± 4
VEGF*, IVIG [†] plus MP(10 ⁻⁶ M)	31 ± 5
VEGF* plus MP(10 ⁻¹² M)	192 ± 58
VEGF* plus MP(10 ⁻⁹ M)	142 ± 73
VEGF* plus MP(10 ⁻⁶ M)	113 ± 42

Data are given as mean ± SD(total length of tubes as % of control)

*VEGF 20 ng/mL; [†]IVIG 40 mg/mL

Abbreviations : MP, methylprednisolone; IVIG, intravenous immunoglobulin; VEGF, vascular endothelial growth factor

This study was repeated 3 times

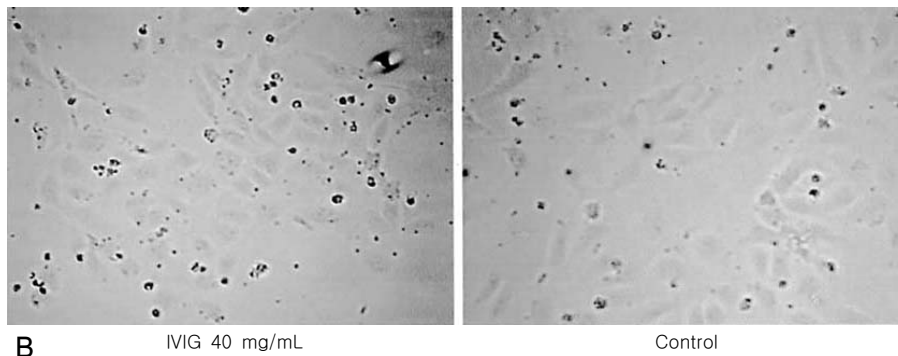
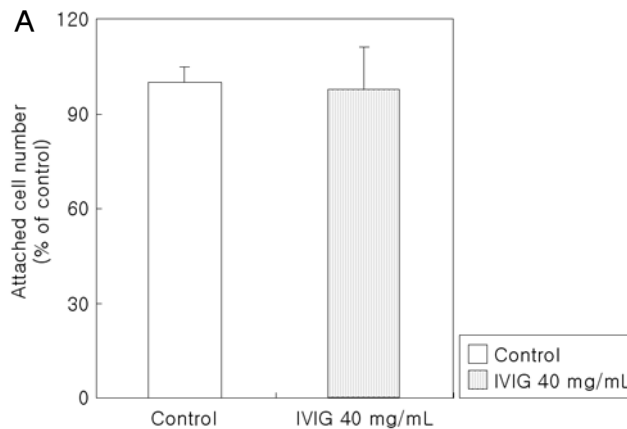


Fig. 5. The effect of IVIG to attachment of HUVECs on 1% gelatin. **(A)** Attachment of HUVECs on 1% gelatin was not affected in the presence of IVIG. Cells were counted by the trypan blue exclusion method. **(B)** HUVECs attaches on 1% gelatin with or without IVIG. Attachment of HUVECs on 1% gelatin were not affected in the presence of IVIG. Photographs were taken under phase-contrast microscopy at 6 hrs of incubation(×200).

를 한 바 있으며, Trautman 등²⁷⁾은 IVIG와 고용량의 텍사메타손이 각질세포의 항아포토시스(anti-apoptosis)를 보인다고 보고한 바 있다. 이러한 보고에서 본 논문의 IVIG나 스테로이드가 맥관 형성을 저해하는 작용이 항아포토시스 작용과 연관이 있을 수 있음을 알 수 있다.

또한 Abe 등²⁸⁾은 IVIG가 여러 자가면역질환이나 감염성 질환에서 치료제로 사용되는 경우 사이토카인을 중화시킬 자가 항체가 포함되어 염증 작용에서 사이토카인의 작용을 막는다는 보고가 있었다.

이렇게 IVIG의 항아포토시스 작용이나 항염증작용을 보고한 논문은 있으나 정확히 IVIG나 스테로이드를 투여하였을 때 내막세포들이 튜브를 형성하는 것을 저해하는 효과를 보여준 연구는 없다.

본 연구에서는 *in vitro*에서 VEGF가 HUVECs의 분화를 유도하고 이 내막세포의 맥관 형성이 IVIG와 methylprednisolone에 의해 저해된다는 것을 보여주었다. 이는 가와사키병의 관상동맥합병증이 생기는 기전 중 VEGF와 내막세포의 분화로 인해 일어나는 관상동맥의 재구성을 IVIG와 methylprednisolone이 억제한다는 것을 시사하며 치료 기전 중 하나로 제시될 수 있다. 그러나 이 억제 작용이 어떠한 분자 생물학적 방법으로 이루어지는지, *in vivo*에서도 같은 효과를 보이는지에 대해서는 아직 연구가 부족하다. 또한 내막세포의 분화 과정에 영향을 미치는지 VEGF의 내막세포에 대한 작용에 영향을 미치는지 더 연구할 필요가 있다. 앞으로 *in vivo*와 *in vitro* 상에서 IVIG와 methylprednisolone의 역할에 대한 연구가 좀 더 필요하며 이러한 연구는 가와사키병을 포함한 혈관염의 치료에 유용할 것이라 사료된다.

요 약

목 적 : 가와사키병은 어린 소아에서 전신성 혈관염을 일으키는 가장 흔한 원인이다. 가와사키병이 발병한 경우 여러 혈관 성장인자들의 분비가 촉진되어 내막층의 증식과 신생 혈관 생성 작용이 진행되면서 관상동맥이 재구성된다. 수년간 가와사키병의 치료제로 IVIG와 코르티코스테로이드가 사용되었으나 그 치료 기전이 명확히 밝혀진 바는 없다. 이런 IVIG와 코르티코스테로이드가 가와사키병의 관상동맥합병증을 감소시키는데 어떠한 기전으로 작용하는지 알아보려고 본 연구에서는 Matrigel을 이용하여 *in vitro*에서 VEGF에 의해 유도된 내막세포 분화에 대한 IVIG와 methylprednisolone의 효과를 보고자 하였다.

방 법 : Matrigel을 이용하여 *in vitro*에서 VEGF에 의해 유도된 내막세포 분화에 대한 IVIG와 methylprednisolone의 효과를 보고자 VEGF, VEGF와 IVIG, VEGF와 VEGF antibody, VEGF와 methylprednisolone, VEGF, IVIG와 methylprednisolone을 각각 넣어주고, HUVECs를 18시간 동안 배양 후 튜브의 총 길이를 측정하였다.

결 과 :

1) IVIG의 농도를 25 mg/mL, 그리고 40 mg/mL로 증량하였을 경우 IVIG를 투여하지 않은 대조군에 비하여 통계학적으로 각각 유의한 세포수(HUVECs) 감소 효과를 관찰할 수 있었으며($P < 0.001$), 40 mg/mL를 처리한 경우가 25 mg/mL를 처리한 경우보다 세포수 감소 효과가 더 뚜렷하였다($P < 0.05$). 세포 배양 시간에 따른 억제 효과는 25 mg/mL과 40 mg/mL에서 배양 후 24시간과 48시간 모두에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 효과를 보였다($P < 0.001$).

2) VEGF 20 ng/mL를 처리한 군에 IVIG 40 mg/mL 또는 여러 농도의 methylprednisolone(10^{-12} M, 10^{-9} M or 10^{-6} M)을 처치해 주었을 때 튜브 형성이 유의하게 억제되었으며($P < 0.05$), methylprednisolone의 경우 그 억제 정도가 농도에 비례하여 일어났으나 IVIG 투여시 보다는 억제 효과가 약하였다. 한편, IVIG와 methylprednisolone과 병합투여한 경우는 methylprednisolone 농도에 상관없이 모두 튜브 형성을 잘 억제하였으며($P < 0.001$), IVIG만 단독 투여한 것과 통계적 차이는 없었다.

결 론 : 본 연구에서는 *in vitro*에서 VEGF가 HUVECs의 분화를 유도하고 분화된 내막세포의 맥관 형성이 IVIG와 methylprednisolone에 의해 저해된다는 것을 보여주었다. 이는 가와사키병의 관상동맥합병증이 생기는 기전 중 VEGF와 내막세포의 분화로 인해 일어나는 관상동맥의 재구성을 IVIG와 methylprednisolone이 억제한다는 것을 시사하며 치료 기전 중 하나로 제시될 수 있다.

References

- 1) Maeno N, Takei S, Masuda K, Akaike H, Matsuo K, Kitajima I, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in Kawasaki disease. *Pediatr Res* 1998;44:596-9.
- 2) Rowley AH, Shulman ST, Mask CA, Finn LS, Terai M, Baker SC, et al. Ig A plasma cell infiltration of proximal respiratory tract, pancreas, kidney, and coronary artery in acute Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2000;182:1183-91.
- 3) Freeman AF, Shulman ST. Recent developments in Kawasaki disease. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:357-61.
- 4) Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Yutani C. Remodeling of coronary artery lesions due to Kawasaki disease: comparison of arteriographic and immunohistochemical findings. *Jpn Heart J* 2000;41:245-56.
- 5) Suzuki A, Miyagawa-Tomita S, Komatsu K, Nishikawa T, Sakomura Y, Horie T, et al. Active remodeling of the coronary arterial lesions in the late phase of Kawasaki disease: immunohistochemical study. *Circulation* 2000;101:2935-41.
- 6) Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-32.

- 7) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
- 8) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascularendothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
- 9) Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32.
- 10) Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992;359:845-8.
- 11) Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, et al. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1994;152:4149-56.
- 12) Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor(VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994;180:341-6.
- 13) Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1624-30.
- 14) Tilton RG, Kawamura T, Chang KC, Ido Y, Bjercke RJ, Stephan CC, et al. Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1997;99:2192-202.
- 15) Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996;270:H1803-11.
- 16) Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y. Rapidinduction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1994;267:H1948-54.
- 17) Terai M, Honda T, Yasukawa K, Higashi K, Hamada H, Kohno Y. Prognostic impact of vascular leakage in acute Kawasaki disease. *Circulation* 2003;108:325-30.
- 18) Leung DY. Kawasaki disease. *Curr Opin Rheumatol* 1993; 5:41-50.
- 19) Shinohara M, Sone K, Tomomasa T, Morikawa A. Corticosteroids in the treatment of the acute phase of Kawasaki disease. *J Pediatr* 1999;135:465-9.
- 20) Dale RC, Saleem MA, Daw S, Dillon MJ. Treatment of severe complicated Kawasaki disease with oral prednisolone and aspirin. *J Pediatr* 2000;137:723-6.
- 21) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413-22.
- 22) Baatout S. Endothelial differentiation using Matrigel(review). *Anticancer Res* 1997;17:451-5.
- 23) Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983;221:719-25.
- 24) Savage CO, Cooke SP. The role of endothelium in systemic vasculitis. *J Autoimmun* 1993;6:237-49.
- 25) Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:259-70.
- 26) Segura I, Serrano A, Buitrago GG, Gonzalez MA, Abad JL, Claveria C, et al. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB J* 2002;16:833-41.
- 27) Trautmann A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, Disch R, Broker EB, Blaser K, et al. Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:839-46.
- 28) Abe Y, Horiuchi A, Miyake M, Kimura S. Anti-cytokine nature of natural human immunoglobulin: one possible mechanism of the clinical effect of intravenous immunoglobulin therapy. *Immunol Rev* 1994;139:5-19.