

## 흰쥐 대동맥의 내피세포와 민무늬근육세포 분리

윤영은 · 송인환 · 성언기 · 김주영  
영남대학교 의과대학 해부학교실

### Isolation of Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells from Rat Aort

Young Eun Yun, In Hwan Song, Eon Ki Sung, Joo Young Kim

*Department of Anatomy,  
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

**Background:** Atherosclerosis has emerged as the leading cause of death in developed countries. At present, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) are most commonly used for the investigation of Endothelial cells (EC). However, HUVEC are not found in arteries but only in veins. Currently there are many reports on methods used to isolate EC; most of these methods require special equipment to remove contaminating smooth muscle cells (SMC).

**Materials and Methods:** The method described here may be used to isolate not only ECs but also SMCs; the approach presented here did not require special equipment. Rat aorta was treated with 2 mg/ml of type II collagenase solution for 45 minutes. The isolated cells from the aorta were incubated in medium G for a week; only ECs could be separated. After the collagenase treatment, the rest of aorta was cut lengthwise, and left undisturbed to obtain SMCs in the culture dish for 10 days. To verify the purity of the isolated cells, we performed immunofluorescence and evaluated the results with transmission electron microscopy analysis.

**Results:** The immunofluorescence study demonstrated specific expression of CD31 and  $\alpha$ -smooth muscle actin in the isolated ECs and SMCs, respectively. Cultured ECs and SMCs showed their own fine structure characteristics.

**Conclusion:** These results suggest that this method for isolating ECs and SMCs may be

especially useful for the study of atherosclerosis.

**Key Words:** Atherosclerosis, Endothelial cell, Smooth muscle cell, CD31,  $\alpha$ -smooth muscle actin

## 서 론

죽상경화는 다양한 크기의 동맥에서 발생하는 국소적인 혈관내막질환이다. 죽상경화증의 발생 기전에 있어서, 그 시작은 내피세포의 손상에 있다. 콜레스테롤과 이를 운반하는 지질단백들 중 초저비중 지질단백(VLDL)과 저비중 지질단백(LDL)이 내피세포가 선택적 장벽으로서의 기능을 잃어버린 것을 틈타 중간막으로 여과 침착 한다. 이들 지질단백은 중간막의 민무늬근육세포 내막으로 이동하여 동맥벽은 두꺼워지고 탄력을 잃는다. 이와 같이 반복되는 손상에 의하여 심혈관계 질환의 하나인 죽상경화가 발생한다. 따라서 내피세포와 민무늬근육세포를 이용한 다양한 실험 모델을 이용하면 죽상경화의 발생기전을 연구하는데 유용하다.

대동맥의 벽은 3개의 막으로 구성되는데, 내막에는 대개 내피세포들이 있고, 중간막에는 민무늬근육세포들과 바탕질로 구성되며, 그리고 바깥막에는 주로 섬유모세포들이 있다.<sup>1)</sup> 쥐의 대동맥 벽은 3개의 막으로 절개될 수 있는 구조적으로 분명한 기관이다. 그러나 쥐의 대동맥은 내피세포의 분리가 상대적으로 어렵기 때문에 중간막의 민무늬근육세포<sup>2)</sup>와 바깥막의 섬유모세포<sup>3)</sup>들이 배양된다. 따라서 혈관내피세포들은 주로 소<sup>4)</sup>와 돼지에서 배양되고 쥐의 내막으로부터 혈관내피세포를 직접 분리하여 사용하는 경우는 드물다.

조직배양기술의 발전으로 미세혈관내피세포가 뇌,<sup>5)</sup> 진피,<sup>6)</sup> 콩팥,<sup>7)</sup> 윤향액,<sup>8)</sup> 코의 점막,<sup>7)</sup> 망

막, 탈락막,<sup>9)</sup> 허파,<sup>10)</sup> 젖<sup>10)</sup> 및 지방조직 등에서도 사람 혈관내피세포를 분리할 수 있게 되었다. 다양한 동물에서 큰 혈관의 내막을 긁어내거나<sup>11)</sup> 동맥과 정맥의 속 공간으로 collagenase를 관류<sup>12-14)</sup>시킨 실험에서 내피세포의 대부분의 기능이 밝혀졌다.

생쥐나 흰쥐에서 대동맥의 내피세포를 분리하는 기존의 방법에서는 민무늬근육세포가 같이 분리되는 것을 막기 위해서 항체를 붙인 magnetic bead를 이용하거나, FACS라는 기계를 이용한다. 이러한 방법들은 번거로운 과정으로 인하여 손쉽게 내피세포를 분리하는 방법의 정립이 필요하다. 이 실험에서 우리는 collagenase를 이용한 효소반응<sup>15, 16)</sup>으로 내피세포와 민무늬근육세포를 분리할 수 있었고, 내피세포와 민무늬근육세포의 표지인자를 이용하여 각 세포의 종류를 확인하였다. HE 염색과 면역세포화학법을 통해서 세포의 형태를 관찰하였고, 투과전자현미경으로 그 미세구조를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

혈관내피세포와 민무늬근육세포의 분리를 위해 암수 구분 없이 6~7주령 된 무게 120~150g 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐로부터 가슴 및 배 대동맥만을 사용하였다.

대동맥 분리를 위해서 마취용 에테르와 거즈, 수술기구를 위한 70% 알코올, 수술용 가위, 편셋, 캘리 등을 사용하였다. 먼저 분리 할

내피세포의 효소반응을 유도하기 위해서 Pasteur pipet과 Type 2 Collagenase (Worthington, U.S.A.), syring filter, Hanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen, U.S.A. 이하 HBSS로 표기함), Dulbecco's Modified Medium-low glucose (Gibco, U.S.A. 이하 DMEM으로 표기함), Fetal Bovine Serum (Gibco, 이하 FBS로 표기함), L-Glutamin (Gibco) 1× non-essential amino acids (Gibco), 1× sodium pyruvate (Gibco), 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic acid (pH 7-7.6), 25 mM HEPES (Gibco), Endothelial Cell Growth Supplement (Gibco, 이하 ECGS로 표기함), Gelatin(Sigma, U.S.A.), 15 T와 25 T flask를 사용하였다. 세포계대 배양 시에는 Trypsin-EDTA (Gibco, 이하 TE로 표기함)를 사용하였다.

면역형광염색을 수행하기 위해서 3.7% para-formaldehyde (PFA), 인산완충용액, Chamber Slide, CD31 primary Ab (Abcam), Alpha Smooth Muscle Actin Ab (Abcam), FITC conjugated secondary Ab (Abcam), Propium Iodide (Molecular Probes, 이하 PI로 표기함), ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen)을 사용하였다.

투과전자현미경 시약은 Glutaraldehyde (Merck, Germany), OsO<sub>4</sub> (Polyscience, Germany), polybed 812 (Polyscience), DDSA (Polyscience), MNA (Polyscience) 및 DMP 30 (Polyscience)을 사용하였다. 그 외에 일반적으로 사용되어지는 HE 시약과 탄력섬유 염색시약을 사용하였다.

### 실험방법

### 대동맥 분리

흰쥐를 에테르를 이용해서 마취시킨 후에 수술용 가위를 이용해서 복강을 열어 핀셋과 가위를 이용해서 가슴부터 복부까지의 대동맥을 잘라내었고, DMEM배양액에 담귀 두었다. 핀셋을 이용해서 대동맥의 혈액과 지방조직 및 결합조직등을 제거하였다. Pasteur pipet으로 대동맥 안으로 DMEM배양액을 넣어 대동맥 내벽을 깨끗하게 해주었다. 이 대동맥은 세포들을 분리하기 위해 준비해 두었다. 그리고 일부분은 메스를 이용해서 0.5 cm로 잘랐고, 일면염색조직표본과 면역형광염색조직표본을 만들었다.

### 내피세포 분리

분리하여 준비된 대동맥을 20% FBS와 penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml가 함유된 DMEM배양액에 담귀, 대동맥 안쪽을 씻었다. 37°C로 준비한 항온수조에서 대동맥을 효소와 45분 동안 반응시켰다. 이때 효소는 2 mg/ml Type 2 collagenase를 이용하였다. 효소와의 반응 시에는 분당 90회의 속도로 항온수조를 움직였고, 효소반응이 끝난 후에는 대동맥 조직을 건져내었다. 나머지 용액은 1200 rpm에 5분 동안 원심분리 시켜 상층액은 버렸고, 남은 세포는 내피세포 배양액인 Medium G를 이용해서 15 T 플라스크에 배양하였다. Medium G의 조성은 20% FBS, 2 mM L-Glutamin, 1× non-essential amino acids, 1× sodium pyruvate, 25 mM HEPES (pH 7-7.6), ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)을 DMEM 배양액에 섞은 것이다. 이때 사용하는 플라스크의 바닥은 바로 전날 0.1% 젤라틴으로 처리하였다. 젤라틴으로 처리해서 사용하는 방법은 아래와

같다. 배양 플라스크에 0.1% 젤라틴을 녹인 인산완충용액을 바닥이 잠길 정도로 넣어 두었다. 세포배양기 안에서 적어도 두 시간 이상 보관하였다. 그 후 0.1% 젤라틴 용액을 제거하였고, 멸균한 증류수로 플라스크 바닥을 세척하였다.

위의 과정을 거쳐 분리된 내피세포들은 1주일 동안 세포배양기 안에서 보관하였고, 보관 시에는 어떤 방해도 하지 않았다. 그 이후부터는 도립현미경(Olympus)으로 내피세포를 관찰하였다.

#### 민무늬근육세포의 분리

내피세포가 분리되고 남은 대동맥 조직은 메스를 이용해서 잘랐다. 잘게 잘린 조직을 모아서 1200 rpm에 5분 동안 원심분리 시켰고, 침전된 조직을 10% FBS가 첨가된 DMEM배지에다가 잘 섞어 25T 플라스크에 배양하였다. 세포는 10일 동안 세포 배양기에서 보관하였고, 보관 시에는 어떤 방해도 하지 않았다. 10일 후부터는 현미경으로 민무늬근육세포를 관찰하였다.

#### 세포배양

자라나온 내피세포들은 새로운 배지로 갈아주었고, 이후 내피세포를 배양할 때도 Medium G를 사용하였다. 배양액 교체 후에 2~3일 정도 지나면 세포가 배양액용기에서 80%이상 자라있는 것을 확인 한 후 계대배양하였다. 계대배양 시에는 TE를 사용하여 부착된 세포를 떼어 내었고, 3일마다 계대배양하였다. 실험목적에 따라 젤라틴으로 처리된 chamber slide 또는 플라스크를 사용하여 내피세포를 키웠다.

민무늬근육세포의 경우에는 분리 10일 후,

새로운 배지로 갈아주었고 그 배지는 DMEM에 FBS가 10%첨가된 것을 사용하였다. 내피세포와 같은 방법으로 계대배양 하여 민무늬근육세포를 키웠다. 실험에 따라 젤라틴으로 처리된 chamber slide 또는 플라스크에 민무늬근육세포를 배양하였다.

#### 특수염색

각각의 조직과 세포의 모양을 광학현미경 상에서 관찰하기 위해서 HE염색을 하였고, 대동맥 조직에서 탄력섬유만을 염색하게 위해서 Verhoeff elastic 염색법을 시행하였다.

#### 면역염색

3.7% paraformaldehyde로 대동맥 조직과 분리한 내피세포 및 민무늬근육세포를 15분 동안 고정하고, 인산완충용액으로 세척하였다. 0.2% Triton X-100을 10분간 반응시켰고, 그 후 인산완충용액으로 씻어주었다. 0.2% BSA를 처리하였고, 일차항체를 두 시간 동안 반응시켜 주었다. 내피세포의 경우에는 세포확인을 위해서 CD31을 사용하였고, 민무늬근육세포의 경우에는  $\alpha$ -smooth muscle actin을 이용하였다. 세 번 정도 인산완충용액으로 씻어준 다음에 이차항체를 각 일차항체에 대하여 1시간 동안 반응시켰다. 이때 이차항체는 FITC가 연결되어 있는 것을 사용하였다. 1시간이 지나면 인산완충용액으로 씻어주고, 필요에 따라 PI로 핵을 대조염색하였다. Prolong Gold Antifade를 이용해 봉입하였다. 건조시킨 후에 형광현미경(Leitz Wetzlar Aristoplan)을 이용해서 관찰하였다.

#### 투과전자현미경

표본을 제작하기 위하여 먼저 Falcon flask에 들어있는 배양액을 제거하였고 인산완충용액으로 세척한 후, 2.5% glutaraldehyde에서 5분간 고정하였다. 1% OsO<sub>4</sub>에서 30분간 다시 고정한 후 일상적인 탈수과정을 거쳤다. Isopropyl alcohol을 사용하여 치환하였고, epoxy resin에 포매하여 60°C 배양기에서 48시간 중합시켰다. 중합된 resin을 배양용기에서 떼어내어 다듬은 후 다이아몬드 칼을 이용하여 50~70 nm의 절편을 만들었고, uranyl acetate와 lead citrate에 각각 10분씩 이중 염색하여 투과전자현미경 H-7000B (Hitachi)으로 관찰하였다.

## 결 과

광학현미경하에서 내피세포와 민무늬근육세포 바깥막을 제거한 대동맥조직을 파라핀 표본으로 만들어 Hematoxylin-eosin 염색을 하였고 그 결과 바깥막이 거의 제거된 채 중간막과 내막으로만 구성된 대동맥을 확인 할 수 있었다(Fig. 1A). 중간막에 있는 탄력섬유만을 특이적으로 염색하는 Verhoeff elastic 염색법을

이용해서 염색을 수행하였다(Fig. 1B).

대동맥으로 내피세포를 먼저 분리하고, 그 후에 민무늬근육세포의 조직 덩어리를 얻는데, 내피세포의 분리에 있어서는 효소반응을 이용하였다. 실험을 통하여 얻어낸 내피세포의 최적 분리 조건은 2 mg/ml collagenase 용액으로 분당 90회의 속도로 shaking incubator 안에서 45분 처리하는 것이었다. 효소를 처리하는 과정에서 37°C 항온수조에서 반응이 이루어지게 하였고, 분당 90회 정도로 수조를 흔들어 주었다. 이 과정이 초기의 플라스크에 붙게 되는 내피세포의 양을 증가시키는데 아주 중요하였다. 동일한 조건으로 실험하더라도 교반을 하지 않은 경우에는 내피세포가 분리되지 않았다. 그리고 초기에 대동맥 분리가 이루어질 때, 대동맥 안을 pasteur pipet으로 씻어주는 과정이 있는데, 이 과정을 거쳐야만 내피세포가 잘 분리되었다.

Type 2 collagenase 용액 2 mg/ml으로 분당 90회의 속도로 45분 처리된 대동맥은 형태가 온전하게 남아 있었고, 민무늬근육세포의 분리를 위해서 분리된 내피세포를 제외한 조직

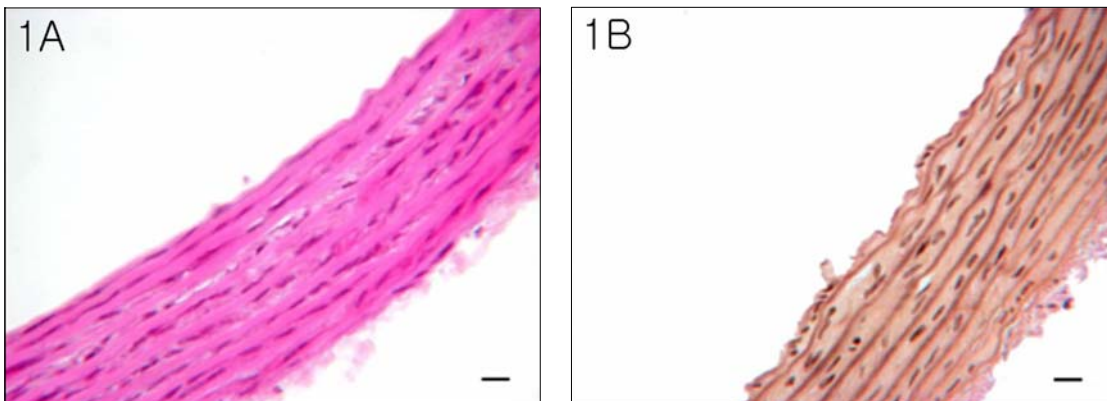


Fig. 1. Hematoxylin-eosin staining (1A) and verhoeff elastic fiber staining (1B) in isolated aorta after removing tunica adventitia. Isolated aorta almost consists of tunica intima and tunica media. Scale bar; 10  $\mu$ m

은 메스를 이용해서 잘게 잘랐다.

내피세포는 1주일 뒤에 배양기에서 꺼내서 광학현미경으로 관찰하였다. 미리 37°C로 데워진 Medium G로 기존의 배양액을 갈아준 다음 관찰하였다. 광학현미경 상에서 여러 무리로 자라고 있는 내피세포를 확인하였다. 내피세포들은 시간이 지남에 따라 조약돌모양의 형태로 자리 잡는 것을 볼 수 있었다. 민무늬근육세포는 10일 뒤에 배양기에서 꺼내고, 배양액을 바꿔 준 다음 세포의 모양을 확인하였다. 민무늬근육세포는 세포들이 무리지어 자라 있는 것을 볼 수 있었고, 세포 각각이 방추사모양을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 광학도립위상차현미경으로 관찰된 특징적인 세포 모양을 HE염색을 통해서 다시 확인하였다(Fig. 2).

내피세포의 경우에는 민무늬근육세포에 비해서 둥글고 큰 핵이 두드러지고, 대체로 조약돌모양으로 자리 잡고 있다(Fig. 2A). 내피세포의 작은 물질의 이동인 pinocytosis 때문인지 소포체가 두드러지게 많이 있는 것을 볼 수 있다. 민무늬근육세포의 경우에는 방추사모양이 염색으로 인하여 더욱더 확연하게 보였다

(Fig. 2B).

#### 면역형광염색 소견

내피세포의 표지인자로 널리 알려진 CD31을 이용해서 분리한 내피세포를 면역형광염색을 하였다. CD31은 PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)과 같은 물질로 알려져 있다. PECAM-1은 막 관통단백질로써 내피세포의 표면에서 발현되며, 내피세포 상호간의 부착을 매개한다. CD31은 내피세포와 혈소판에서만 특이적으로 발현하는 당 단백질이다. 이미 기존에 알려져 있는 내피세포 표지인자인 von Willebrand factor의 경우에는 분자량이 CD31에 비해서 상대적으로 매우 크다. 따라서 근래에는 분자량이 작아서 항원항체반응에 좀 더 유리한 CD31을 내피세포의 표지인자로 널리 사용하고 있다. 본 연구자들은 효소반응과 조건배지를 이용해서 분리한 내피세포가 정확한지를 알아보기 위해서 각각의 계대 배양 시점마다 면역형광염색을 하였다. CD31 일차항체의 농도는 1 : 50에서 가장 강하게 발현되었다. CD31이 세포의 핵이 아닌 세포질에

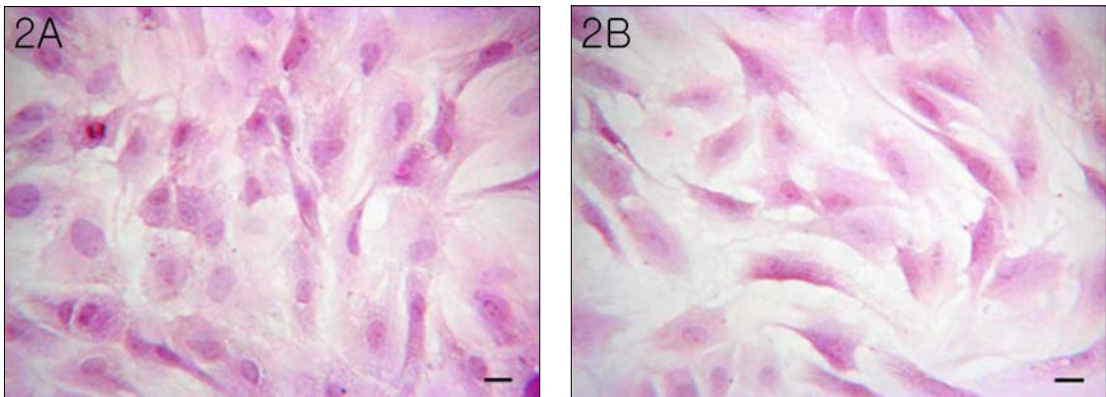


Fig. 2. Hematoxylin-eosin staining of endothelial cell (2A) and smooth muscle cell (2B) cultivating in falcon flask. They show typical pattern of the endothelial cell, having cobble-stone shape and the smooth muscle cell, consisting of spindle shape, respectively. Scale bar; 10  $\mu$ m

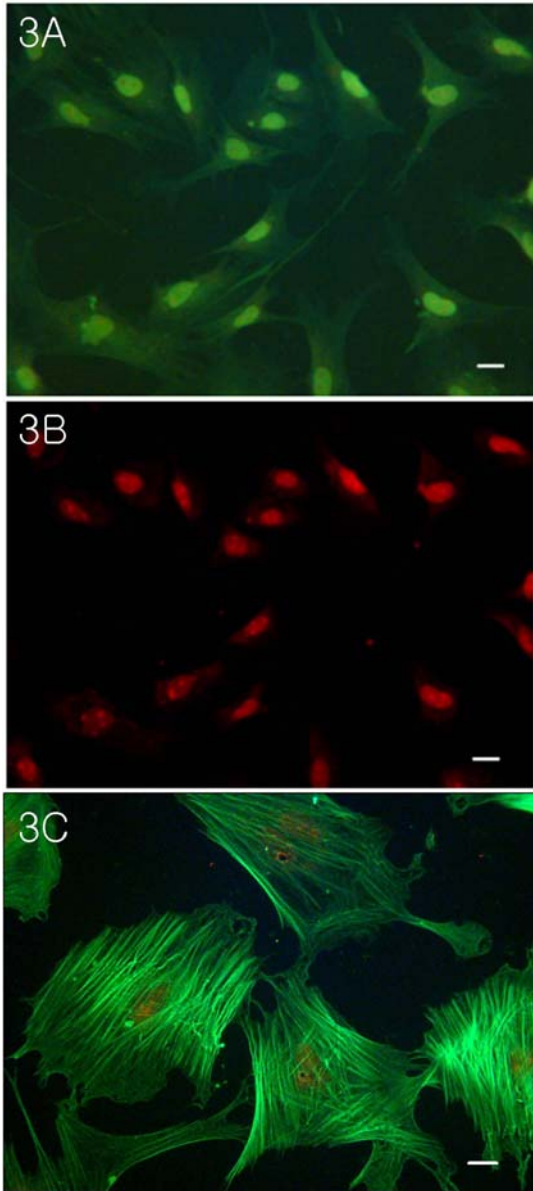


Fig. 3. Immuno-fluorescence staining of CD31 in endothelial cell (3A) grown on chamber slide. PI counter-staining of nuclei showing red color in cultured endothelial cell (3B). This is the same microscopic field with 3A. Immuno-fluorescence staining  $\alpha$ -smooth muscle actin in smooth muscle cell (3C) grown on chamber slide. Scale bar; 10  $\mu$ m

서 초록색으로 강하게 발현됨을 확인 하였다(Fig. 3A, 3B). 이것은 같은 현미경 시야에서 PI에 의해 핵이 빨갛게 염색되는 것을 보면 알 수 있다(Fig. 3B).

민무늬근육세포의 경우에는 그 세포의 표지 인자  $\alpha$ -smooth muscle actin을 이용해서 형광면역 염색을 수행하였다(Fig. 3C).  $\alpha$ -smooth muscle actin의 일차항체의 농도는 1 : 100에서 가장 강하게 발현되는 것을 확인하였다.

조직상에서의 내피세포와 민무늬근육세포의 위치 및 모양을 확인하기 위해서 흰쥐에서 분리한 대동맥 조직으로 미리 냉동표본을 만들어 HE 염색을 수행하였다. 그리고 같은 절편을 앞서서 세포에서 수행한 두 가지 표지인자인 CD31과  $\alpha$ -smooth muscle actin을 이용해서 면역 염색을 수행 하였다(Fig. 4). 세포에서의 면역 형광염색과 같은 농도로 실험을 시행하였다. 흰쥐 대동맥의 구조상 내피세포는 대동맥 가장 안쪽의 내막에 존재하고, 세포가 한 줄로 배열 되어 있다. 민무늬근육세포의 경우에는 중간막에 탄력섬유와 섞여져 있다. CD31의 대동맥 조직에서의 염색은 강도가 약하기는 하였지만 내막의 내피세포에 형광이 보이는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 일차항체의 농도는 1 : 50으로 하였고, 반응시간은 2시간을 두었다. 대동맥에서 민무늬근육세포를 둘러싸고 있는 탄력섬유는 그 자체가 형광현미경에 형광 반응한다는 사실은 이미 알려져 있다. CD31 조직형광염색에서 중간막에서 형광으로 반응하는 곳이 탄력섬유임을 Verhoeff elastic 염색법으로 확인하였다(Fig. 1B, 4A).  $\alpha$ -smooth muscle actin은 염색의 강도가 CD31에 비해 상대적으로 강하면서 중간막에 널리 분포하였다(Fig. 4B).



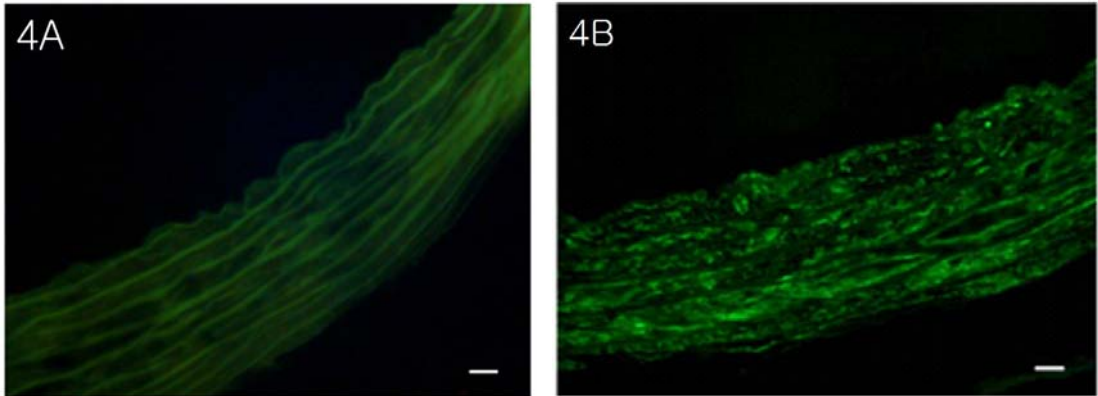


Fig. 4. Immuno-fluorescence staining of CD31 (4A) and  $\alpha$ -smooth muscle actin (4B) in frozen Rat aorta section removing tunica adventitia. Scale bar; 10  $\mu$ m

#### 미세구조 모습

앞서서 광학현미경 상에서 분리한 내피세포와 민무늬근육세포를 키워서 HE염색을 수행하였고, HE염색을 통해서 전체적인 세포의 모양을 확인하였다. 보다 정밀한 미세구조로써 분리한 내피세포와 민무늬근육세포의 정확성을 확인하기 위해서 투과전자현미경 표본을 만들어서 그 미세내부구조를 확인하였다. 혈관내피세포는 전형적이고 가늘게 이어진 소낭인 Weibel-Palade Body를 가지고 있다<sup>17)</sup>. 이것은 혈관에

상처가 있을 때 혈소판의 응고와 부착을 통제하는데 중요한 역할을 하는 플라즈마 단백질인 von Willebrand factor의 저장고 역할을 수행한다.

우리가 분리한 내피세포의 투과전자현미경 표본을 살펴보면 우선 세포마다 핵이 하나씩 있었고, 내피세포의 경우에는 Pinocytosis로 인한 소포들의 왕성한 활동을 볼 수 있었다. 핵에서 세포질 바깥쪽으로 여러 크기의 리보솨체들이 줄지어 있는 모습을 볼 수 있었다. 이러

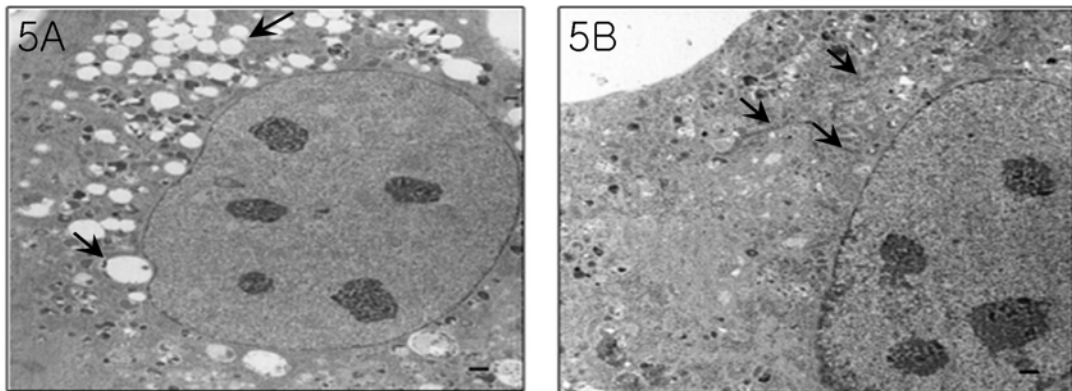


Fig 5. Transmission electron micrograph of endothelial cell (5A) and smooth muscle cell (5B) cultured in falcon flask. Arrows of (5A) indicate pinocytic vesicle or vesicle in endothelial cell. Arrows of (5B) indicate several mitochondria. Scale bar; 1  $\mu$ m



한 미세구조의 확인을 통해서 우리가 분리한 대동맥 내피세포의 정확성을 검증할 수 있었다 (Fig. 5A).

전형적인 민무늬근육세포는 핵주위에 활면소포체(smooth endoplasmic reticulum)와 많은 수의 미토콘드리아를 가지고 있는 것을 특징으로 한다. 활면소포체의 경우에는 칼슘의 저장고 역할을 하기 위해 존재하고, 미토콘드리아는 세포수축에 필요한 ATP를 공급하기 위해서 민무늬근육세포 내에 존재한다. 분리 배양하여 키운 민무늬근육세포의 전자현미경 표본에서는 우선 핵주위에 많은 수의 미토콘드리아를 볼 수 있었다. 그리고 내피세포에서 두드러지게 관찰할 수 있었던 리보솜체들은 보이지 않았었다. 이로서, 다른 세포의 오염 없이 민무늬근육세포가 분리되었다는 것이 확인되어졌다 (Fig. 5B).

## 고 찰

흰쥐 대동맥에서 내피세포를 분리하는 방법은 이미 여러 가지 방법들이 알려져 있다. 그 중에서도 손쉽게 효소반응을 이용해서 내피세포를 분리하는 방법이 알려져 있다. 우리는 위의 분리 방법을 조금 변형해서 실험을 수행하였고, Kobayashi<sup>18)</sup> 그룹보다는 내피세포와 민무늬근육세포의 형태, 면역형광염색소견, 미세구조의 연구에 중점을 두고 수행하였다.

위와 같이 본 연구자들에 의해 새롭게 정립된 효소반응조건 또는 medium G배지 등을 이용한 대동맥에서의 내피세포와 민무늬근육세포의 분리방법은 많은 장비나 시약을 필요로 하지 않고 그 방법이 간편하다. 본 실험에서는 각각의 세포의 고유의 특성을 유지하기 위해

계대배양 하는 횟수를 3회로 제한했다. 그러나 계대배양이 4회를 넘어도 세포들이 활발하게 분열하는 것을 확인하였다.

처음 방법을 정립하는 동안 효소반응 시간이나 반응상황에서 가하는 기계적인 충격에 있어서 여러 조건을 두고 실험을 수행하였다. 내피세포의 분리에 있어서는 45분 정도의 시간이 적당하고 시간을 더 주는 경우에는 민무늬근육세포에 의해 오염되 있었다. Medium G에는 내피세포가 잘 자랄 수 있는 ECGS 등이 첨가되어 있고, 효소 반응하는 동안 shaking 정도는 분당 90회에서 최대효율을 올릴 수 있었으나 shaking이 없는 경우에는 내피세포의 분리가 일어나지 않았다.

내피세포의 경우에는 일주일, 민무늬근육세포의 경우에는 10일정도 부착되는 기간을 가지는데 그 동안은 어떠한 충격도 주지 않는 것이 좋다. 각각의 부착기간이 지난 후에 현미경으로 세포를 확인하면 플라스크 여러 곳에 세포가 무리지어 자라고 있는 것을 확인할 수 있다. 배양액을 갈아주고 그 상태에서 플라스크가 80%이상 되도록 세포를 키운다. 내피세포의 경우에는 세포를 부착시키고 유지하는 동안 계속 Medium G를 사용한다.

민무늬근육세포는 내피세포의 분리 반응이 끝난 후에, 남아 있는 대동맥 조직을 메스로 1mm정도로 잘게 잘라야 플라스크의 바닥에 부착이 쉬워진다. 그리고 세포부착을 증가시키기 위해서 배지 양을 일반적인 양보다 줄이는 경우가 있는데, 배지 양 조건을 변화시켜서 실험을 수행한 결과 5 ml/25T 정도를 넣어주는 것이 부착효율을 증가시키는데 바람직하다는 것을 알 수 있었다.

따라서 Wolinsky와 Glagov에 의하면 큰 동

맥의 외막은 주로 섬유모세포로 되어 있고,<sup>1)</sup> Battle 등은 쥐 대동맥의 섬유모세포는 매우 빨리 배양 용기에 부착, 성장한다고 보고하였다. 혈관내피세포의 분리과정 중 핀셋을 이용하여 외막을 제거하였는데, 이것은 외막의 섬유모세포를 제거하는 중요한 단계이며 내피세포 분리 후 섬유모세포에 의한 오염을 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

분리한 내피세포와 민무늬근육세포를 CD31과  $\alpha$ -smooth muscle actin으로 형광면역염색을 시행하였고, 대동맥 조직에서도 같은 실험을 수행하였다. 내피세포에는 세포질에 CD31이 강하게 발현되는 것을 확인하였다. CD31이 내피세포 표면에서 발현된다는 기존의 연구와 실험의 결과가 일치한다고 할 수 있다. 조직의 경우에는 그 절편이 얇고, 실험수행과정에서 소실에 의해서인지 세포에서보다는 약하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 민무늬근육세포의 경우,  $\alpha$ -smooth muscle actin이 강하게 발현되는 것을 볼 수 있고, 조직상에서도 중간막에서 강하게 발현되는 것을 확인하였다. 이로서 분리한 세포들의 순수도를 확인 할 수 있었다.

## 요 약

죽상경화는 선진국에서 사망의 주요 원인이 되고 있다. 현재, 사람배꼽정맥내피세포는 대부분의 내피세포의 연구에 사용되고 있다. 그래도 사람배꼽정맥내피세포는 동맥이 아닌 정맥에서 유래하는 근본적인 문제가 있다. 현재 내피세포를 분리하는 방법이 여러 가지 보고가 되어있으나 이들 방법 대부분은 민무늬근육세포에 의해 오염되는 것을 제거하기 위해 특별

한 장비가 필요하다.

여기서 시행한 방법은 내피세포와 민무늬근육세포를 분리하는데 있어서 어떤 특별한 장비들을 요하지 않는다. 쥐 대동맥의 내막에 2 mg/ml의 농도인 제2형 교원질분해효소 용액을 사용하여 내피세포를 분리하는데, 다른 세포의 오염을 막기 위해서 Medium G 배지를 사용하였다. 1주일 후가 되면 내피세포만이 분리가 된다. 교원질분해효소를 처리하고 남은 대동맥의 나머지는 길이방향으로 잘라 10일간 DMEM 용액에 배양하였다. 10일이 지나면 민무늬근육세포가 분리된다. 순수도를 검증하기 위해 면역형광염색과 투과전자현미경으로 분석을 하였다. 면역형광염색상 분리된 내피세포에서는 CD31, 민무늬근육세포에서는  $\alpha$ -smooth muscle actin이 특이하게 발현되었다. 배양된 내피세포와 민무늬근육세포에서는 미세구조상 세포의 종류에 따른 특징적 소견을 보였다.

따라서 이 연구에서 시행한 내피세포와 민무늬근육세포를 분리하는 방법은 죽상경화를 연구하는데 있어 특히 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res* 1967 Jan;20(1):99-111.
2. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979 Jan;59:1-61 Review.
3. Zhu DL, Herembert T, Marche P. Increased proliferation of adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rat aorta. *J Hypertens* 1991 Dec;9(12):1161-8.

4. Fillinger MF, O'Connor SE, Wagner RJ, Cronenwett JL. The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg* 1993 Jun;17(6):1058-68.
5. Dorovini-Zis K, Prameya R, Bowman PD. Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Lab Invest* 1991 Mar;64(3):425-36.
6. Davison PM, Bensch K, Karasek MA. Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *J Invest Dermatol* 1980 Oct;75(4): 316-21.
7. Gospodarowicz D, Greengard G. Growth control of mammalian cells, growth factors and extracellular matrix. New York: Raven press; 1981;p. 1-21.
8. Jackson CJ, Garbett PK, Nissen B, Schrieder L. Binding of human endothelium to Ulex europaeus- I coated dynabeads : application to the isolation of microvascular endothelium. *J Cell Sci* 1990 Jun;96:257-62.
9. Drake BL, Loke YW. Isolation of endothelial cells from human first trimester decidua using immunomagnetic beads. *Hum Reprod* 1991 Sep;6(8):1156-9.
10. Hewett PW, Murray JC. Human microvessel endothelial cells : isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993 Nov;29A(11):823-30 Review.
11. Ryan US, Maxwell G. Isolation, culture and subculture of bovine pulmonary artery endothelial cells : mechanical methods. *J Tissue Cult Meth* 1986;10:3-5
12. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins : Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973 Nov;52(11):2745-56.
13. Johnson AR. Human pulmonary endothelial cells in culture. Activities of cells from arteries and cells from veins. *J Clin Invest* 1980 Apr; 65(4):841-50.
14. Watkins MT, Sharefkin JB, Zajtchuk R, Maciaq TM, D'Amore PA, Ryan US et. al. Adult human saphenous vein endothelial cells : assessment of their reproductive capacity for use in endothelial seeding of vascular prostheses. *J Surg Res* 1984 Jun;36(6):588-96.
15. Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1974 Mar;60(3):673-84.
16. Hewett PW, Murray JC. Human lung microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *Microvasc Res* 1993 Jul;46(1): 89-102.
17. Joo-Young K. Endothelial Cells from the Rat Aorta in Culture. *The Korean Journal of Anatomy* 1998;31(1):105-18
18. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2005;12(3):138-42.
19. van Merik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol* 2002 Feb;117(2): 113-22.
20. Lidington EA, Rao RM, Marelli-Berg FM, Jat PS, Haskard DO, Mason JC. Conditional immortalization of growth factor-responsive cardiac endothelial cells from H-2K(b)-tsA58 mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 Jan;282(1):C67-C74.
21. Fukuda K, Imamura Y, Koshihara Y, Ooyama T, Hanamura Y, Ohyama M. Establishment of human mucosal microvascular endothelial cells from inferior turbinate in culture. *Am J Otolaryngol* 1989 Mar-Apr;10(2):85-91.