KISEP Experimental Research J Korean Neurosurg Soc 26 : 617-624, 1997

정상성상세포와 혈관내막세포를 공막 분리 동시배양으로 구축한 체외혈뇌장벽 모델*

아주대학교 의과대학 신경외과학교실, 연세대학교 의과대학 신경외과학교실**

윤수한 · 조기홍 · 김세혁 · 안영환 · 안영민 · 조경기 · 최중언**

= Abstract =

In Vitro Blood-brain Barrier Model of Astrocyte and Endothelial Monolayer Co-culture Using Collagen-coated Microporous Membrane

Soo Han Yoon, M.D., Ki Hong Cho, M.D., Se Hyuk Kim, M.D., Young Hwan Ahn, M.D., Young Min Ahn, M.D. Kyung Gi Cho, M.D., Joong Uhn Cho, M.D.**

Department of Neurosurgery, School of Medicine, Ajou University Hospital, Suwon, Korea
*Department of Neurosurgery,** Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

There are three types of the in vitro blood - brain barrier models that are endothelial monolayer, astrocyte and end - othelial monolayer co - culture, and benign glioma and endothelial monolayer co - culture. We made these three types of models and evaluated permeability ratio for four molecular weight(MW 373, 4400, 9300, 38900) and ele - ctrical resistance of endothelial monolayer in each type. Astrocyte and endothelial monolayer co - culture showed the lowest permeability ratio and highest electrical resistance among them and that suggested astrocyte and endothelial monolayer co - culture was best for the in - vitro blood - brain barrier model.

KEY WORDS : Endothelial monolayer · Coculture system · Blood - brain barrier.

서 론

혈뇌장벽은 혈내 주입한 염색액이 다른 장기에서는 장기 실질로 투과되어 염색이 되지만 뇌실질에서는 투과되지 않아 염색이 되지 않았다는 결과에서 추정된 Paul Ehrlich[11]나 Edwin Goldman[13]의 고전적인 보고에서 시작하여 근래에는 혈뇌장벽변화가 뇌실질내의 투과물질의 조성을 변화시키고, 이로 인하여 치료제의 뇌실질 내에 전달이라는 측면외에도 뇌질환의 진전이나 증상의 발현에 있어서 주요인자의 발현이나 뇌부종의 정도 등에 있어서 영향을 주게 되어 이에 대한 광범위한 연구가 진행되어 왔지만[4)5)20)24)31)33)], 아직까지도 기능적으로나 구조적인 규명이 되지 못하고 있는 실정이다.

혈뇌장벽의 특성과 구조에 대한 연구에서 구조적 문제와 단일 인자에 대한 영향을 연구하기 위해서 체내모델에서의 한계를 극복하기 위해서 동물의 혈관내막세포를 단층 배양하여 만든 실험적 체외 모델이 제기되었으며[2)6)], 이것이 발전하여 여러 동물의 말초혈관 및 뇌미세혈관 내막세포를 이용한 모델들이 발표되고 있다[3)8)12)14)25)28)]. 체외모델을 사용하는 경우 혈뇌장벽 조건을 구성하는 세포의 수, 세포의 종류, 투여되는 약제 등에 대한 정확한 조절이 가능하고, 체내실험에서 야기되는 외상, 면역반응, 감염, 영양공급, 산소공급, 그리고 심혈관계 등의 문제를 피할 수 있다는 장점은 물론이며[16)], 또한 실험대상이 체내모델의 경우 동물에 한정되지만 체외모델의 경우 인간의 세포를 배양하여 실험에 이용할 수 있다는 잇점도 있다.

본 실험에서도 혈관 내막세포를 배양한 단일 층에 의해서 단일 막에 의한 혈뇌장벽을 구축하고나서, 정상적인 성상 세포를 배양하여 이 두 가지 세포를 이중배양관의 위층과 아래층

*본 연구는 아주대학교 교내연구비에 의해서 일부 지원을 받았음.

에서 동시 배양함으로서 이중배양 구조의 혈뇌장벽 체외모델을 구축하였다. 상기한 두 가지 체외 혈뇌장벽 모델을 양성 성상세포종과 내막세포를 이중배양관에서 배양한 혈뇌장벽 모델과 전기저항과 투과도의 측면에서 비교하여 이상적인 혈뇌장벽의 모델을 선정하고자 하였다.

연구 범위 및 방법

체외혈뇌장벽 모델은 혈관내막세포를 배양하여 구축한 뇌미세혈관 배양에 의한 내막세포 단일층에 의해서 이루어졌으며, 혈관내막세포 단일층에서 혈뇌장벽의 발현을 촉진시키기 위하여 정상 성상세포를 배양하여 배양액만이 교류할 수 있도록 0.4um 구멍을 가진 차단막이 설치되어 있는 이중배양기(Fig. 1)에서 아래층에 성상세포를 배양하고 차단막위에 내막세포 단일층을 배양하였다. 이러한 이중 배양구조의 체외장벽 모델에서 세포층의 전기저항을 측정하고, fluorescein과 여러 분자량의 fluorescein isothiocyanate conjugated dex-tran에 대한 투과도를 측정하였다.

1. 미세혈관 내막세포 배양

미세혈관 내막세포는 뇌적출물에서 얻게 되는데, 적출된 뇌를 절개하여 회백질(cortical gray matter)를 분리한 후 1% 우혈청 알부민(bovine serum albumin)이 있는 10cc 0.01M isotonic phosphate buffered saline(PBS)에 씻어내고, 비활성화시킨 10% 우태아 혈청(FBS, fetal bovine serum)을 추가한 MEM(minimal essential media)에 넣어서 실험실로 옮긴다. 조직절편은 #10 칼날을 사용하여 잘게 쪼개며(mincing), $1mm^3$ 이하의 작은 크기로 만들고나서 MEM를 같은 양으로 넣고 잘 섞는다(homogenize). 섞여진 양을 같은 양의 30% 덱스트란 용액에 넣고 5800G에서 약 10분간 원심분리한다. Pellet를 15% 덱스트란 용액에서 다시 원심분리한다. 이렇게 얻어진 덩어리는 MEM에 의해서 씻어내고 0.1mg/ml collagenase/dispase를 추가하고 5시간에서 16시간 정도를 37C 의 shaker에 두게 된다. 용액은 1500G에서 10분동안 원심분리하고, 세포부분을 모아서 위상차현미경으로 관찰하여 반짝이는 세포임을 확인하고 DMEM(Dulb-ecco's minimal essential media)에 비활성화시킨 5% 우태아 혈청에 의해서 희석시킨 다음, 1500G에서 10분동안 원심분리를 두 번한다. 결과로 얻어진 덩어리는 DMEM/F12에 10U/ml heparin, 2.5uM hydrocortisone, 10% FCS, 1% 항생제 용액 등을 추가한 용액에 넣고 콜라겐을 도포하거나 fibronectin에 처리한 플라스틱배양용접시(plastic dish)나 15ml의 플라스틱 플라스크에 넣어 37℃, 5% CO_2에서 배양한다. 배양액의 신선 상태를 유지하기 위하여 주2회 배양액을 교환하고, 이때 위상차 현미경으로 생육상태를 관찰한다.

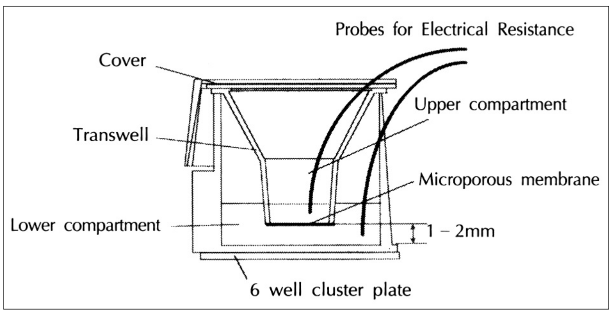

Fig. 1. Schematic illustration of Transwell.

2. 내막세포 단일층에 의한 모델

배양을 시작하고 10 14일 정도 지나면 혈관내막세포는 풍부하게 단일층으로 자라게 되며 이들은 가온된 PH 7.4의 0.01M PBS로 세 번 씻어내고, 10% dispase가 첨가된 3ml의 PBS에 37C의 2 3분동안 처리하고 1% 우혈청 알부민이 첨가된 7ml PBS를 넣고 가볍게 흔든다. 세포가 떨어지면 phosphate-buffered saline(PBS, PH 7.2)에서 200g로 10분동안 세 번에 걸쳐서 원심분리함으로서 씻어내고 세포를 모으게 된다. 원심분리 이후에 세포를 세고 trypphan blue에 의해서 90%이상의 생존도를 확인한다. 이를 거둬들여서 콜라겐이 도포된 공포막(porous collagen-coated membr-ane)에 구획되어 만들어진 이중구조의 배양관(Fig. 2)에서 100,000cells/ml의 밀도로 위쪽 구획에 분포시키고 배양하면 7일 정도 후면 공포막 위에 혈관내막세포가 풍부하게 단일층으로 자라게 되며 약10일이 되면 물질이동에 사용하여 측정하게 된다.

3. 성상세포 동시배양 모델

Dehouck 등[8]이 조작배양한 것과 같이 출생 1일의 쥐의 대뇌를 채취하여 경막과 지주막 및 연막과 혈관을 제거하고, DMEM에서 뇌실질부분을 작게 조각을 내고 나서, 구멍크기 80um의 나일론 그물구멍을 통과시킨후 통과된 조각을 20% 우태아혈청이 추가된 DMEM으로 배양한다. 배양된 조각에서 성상세포는 자라기 시작하고, 7일 정도 지나면 DMEM의 우태아혈청 농도를 10%로 낮추고 배양하며 7 10일 정도는 빠르게 자란다. 풍부하게 단일층으로 자라게 되면 이들은 가온된 PH7.4의 0.01M PBS로 세 번 씻어내고, 10% dispase가 첨가된 3ml의 PBS에 37C의 2 3분 동안 처리하고 1% 우혈청 알부민이 첨가된 7ml PBS를 넣고 가볍게 흔든다. 세포가 떨어지면 PBS에서 200g로 10분 동안 세 번에 걸쳐서 원심분리함으로서 씻어내고 세포를 모으게 된다. 원심분리후

에 세포를 세고 trypphan blue에 의해서 90% 이상의 생존도를 확인한다. 이를 거둬들여서 콜라겐이 도포되어 있는 공포막에 구획되어 만들어진 이중구조의 배양관에서 100,000cells/ml의 밀도로 아래쪽 구획에 분포시키고 배양하면 3일 정도 후면 성상세포가 풍부하게 단일층으로 자라게 되며 약 7일이 되면 물질이동에 사용하여 측정하게 된다.

4) 양성 신경교종 동시배양에 의한 모델

양성 신경교종 C6(rat glial cell tumor)와 Hs 683(human glioma) 세포를 10% 우태아혈청이 추가된 DMEM으로 배양한다. 배양을 시작하고 5 7일 정도 지나면 풍부하게 단일층으로 자라게 되며 이들은 가온된 PH 7.4의 0.01M PBS로 세 번 씻어내고, 10% dispase가 첨가된 3ml의 PBS에 37C의 2 3분 동안 처리하고 1% 우혈청 알부민이 첨가된 7ml PBS를 넣고 가볍게 흔든다. 세포가 떨어지면 PBS에서 200g로 10분 동안 세 번에 걸쳐서 원심분리함으로서 씻어내고 세포를 모으게 된다. 원심분리후에 세포를 세고 trypphan blue에 의해서 90% 이상의 생존도를 확인한다. 이를 거둬들여서 콜라겐이 도포되어 있는 공포막에 구획되어 만들어진 이중구조의 배양관에서 100,000cells/ml의 밀도로 아래쪽 구획에 분포시키고 배양하면 3일 정도 후면 성상세포가 풍부하게 단일층으로 자라게 되며 약 5일이 되면 물질이동에 사용하여 측정하게 된다. 이중배양관의 하부구획에서 성상세포 대신 배양하여 내막세포의 투과도를 측정함으로서 저악성도의 성상세포종 세포가 내막세포 단일층의 투과도에 미치는 영향을 측정하여 성상세포 배양시와의 차이를 조사한다

5) 전기저항 측정

전기저항은 투과도를 측정하기 전, 또는 후에 시행하며, 은도금 전극에 의한 전기저항 측정기(Circuit tester 3201 - E, YOKOGAWA Electric Co. YOKOGAWA, Japan)에 의해서 측정하였다. 한쪽 전극은 내막세포 단일층의 아래에, 그리고 다른 전극은 내막세포의 상부에 설치한다. 대조군으로 전극을 같은 상부나 하부 구획에 같이 동시에 설치하여 용액의 저항을 측정하고, 또한 다른 대조군으로 내막세포를 배양하지 않은 콜라겐이 도포된 공포막의 저항을 측정하여 내막세포의 저항 측정값에서 감하여 내막세포만의 저항을 계산한다[9)18)25)26)].

즉 이것은 다음과 같이 표시된다.

내막세포 전기저항(R_0)= 전체전기저항(R_t) - 투과막 전기저항(R_m)

6) 투과도 측정

다른 세포를 동시배양하거나 또는 혈관내막세포만을 단독 배양하여 각각의 체외 혈뇌장벽모델을 만든 다음, 혈관내막세포 단층막에 대한 투과도(permeability) 검사를 시행한다. 투과도에 대한 연구는 여러 가지 크기의 분자량을 만들 수 있고, 측정이 용이한 fluorescine sodium(MW=373), 분자량 4400, 9300, 38900의 fluorescein isothiocyanate conjugated dextran을 10 100uM의 농도가 되도록 배양관의 위측 구획에 투여하고 아래측 구획의 배양액을 0.1 1mL 정도 채취하여 phosphate buffered saline으로 희석하여 1ml가 되게 한 다음 분광형광측정기(spectrofluorometer)에 의해서 excitation 490nm로 설정하고 520nm에서 형광을 측정한다.

Sill 등[30)]에 의해 정의되어 있는 Effective Permeability Coefficient는 다음과 같이 표시된다.

$$Pe = \frac{V}{A} \times \frac{(T_L / T_u)}{t}$$

여기서 V는 위층 구획의 부피이고, A는 혈관내막세포가 배양되어 있는 공포막의 면적이며, TL은 아래쪽 구획에 있는 표지물질의 농도이고, Tu는 위층 구획의 표지물질의 농도이며, t는 표지물질을 첨가한 후부터의 시간이다. 농도차이가 적어지면 오차가 발생하므로 시간은 20분 정도에서 측정하였다.

이때 측정된 투과도(P_t)는 배양하기 위하여 설치한 배양막의 투과도를 포함하고 있으므로 실제 내막세포 단일층에 의한 투과도(P_0)는 배양막의 투과도(P_m)를 감하여야 하며 다음과 같이 표시된다[29)30)].

$$\frac{1}{P_0} = \frac{1}{P_t} - \frac{1}{P_m}$$

결 과

1. 전기저항

세포층이 없는 배양막만으로 측정한 전기저항은 4650±0.29Ωcm^2이었으며, 내막세포 단층배양에서 전체 전기저항은 5817±0.53Ωcm^2이었고, 따라서 내막세포 단층막만의 전기저항은1167Ωcm^2이었다. 성상세포 배양에 의한 내막세포 배양에서 전체 전기저항은 6917±0.46Ωcm^2이었고, 배양막의 전기저항을 감하면 2267Ωcm^2이었으며, 이중배양관 구조를 이용한 양성 성상세포종 동시배양 모델에서의 전기저항은 1945Ωcm^2이었다(Fig. 2).

2. 미세혈관 내막세포 단일층 배양

내막세포 단일층배양에 의한 투과도는 분자량 373, 4400, 9300 그리고 38900의 각각에 따라 10.3×10^{-4}, 1.8×10^{-4},

1.2×10^{-4}, 그리고 0.8×10^{-4}cm · min^{-1}이었고, 배양층만의 투과도가 $23\times10+^{4}$cm · min^{-1}으로 측정되어 결국 내막세포 단일층만의 투과도는 분자량에 따라 각각 18.65×10^{-4}, 1.95×10^{-4}, 1.27×10^{-4}, 그리고 0.83×10^{-4}cm · min^{-1}이었다(Fig. 3).

3. 미세혈관 내막세포 단일층을 성상세포와 이중배양관에서 동시 배양

성상세포와 동시배양한 이중구조에서 내막세포 배양에 의한 투과도는 분자량 373, 4400, 9300 그리고 38900의 각각에 따라 6.4×10^{-4}, 0.97×10^{-4}, 0.64×10^{-4}, 그리고 0.55×10^{-4}cm、min^{-1}이었고, 배양층만의 투과도가 23×10^{-4} cm、min^{-1}이었으므로 결국 내막세포 단일층만의 투과도는 분자량에 따라 각각 8.87×10^{-4}, 1.01×10^{-4}, 0.66×10^{-4}, 그리고 0.56×10^{-4}cm、min^{-1}이었다(Fig. 4).

4. 미세혈관 내막세포 단일층을 양성 성상세포종과 동시배양

양성 성상세포종 C6(rat glial cell tumor)와 Hs 683 (human glioma) 세포와 동시배양한 이중구조에서 내막세포 배양에 의한 투과도는 분자량 373, 4400, 9300 그리고 38900의 각각에 따라 8.8×10^{-4}, 1.6×10^{-4}, 0.97×10^{-4}, 그리고 0.50×10^{-4}cm、min^{-1}이었고, 배양층만의 투과도가 23×10^{-4}cm、min^{-1}이었으므로 결국 내막세포 단일층만의 투과도는 분자량에 따라 각각 14.3×10^{-4}, 1.7×10^{-4}, 1.01×10^{-4}, 그리고 0.51×10^{-4}cm、min^{-1}이었다(Fig. 5).

5. 면역염색 및 직접촬영

혈관내막세포에 대한 Anti-Factor VIII antigen antibody 면역형광 염색과 성상세포에 대한 GFAP 면역형광 염색에 의해서 각 세포를 확인하였다(Fig. 6). 미세공막위에서 배양된

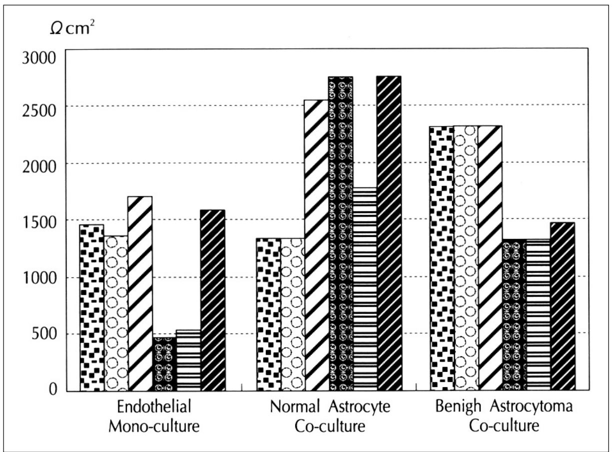

Fig. 2. Graph showing the transendothelial electrical resistance of three models.

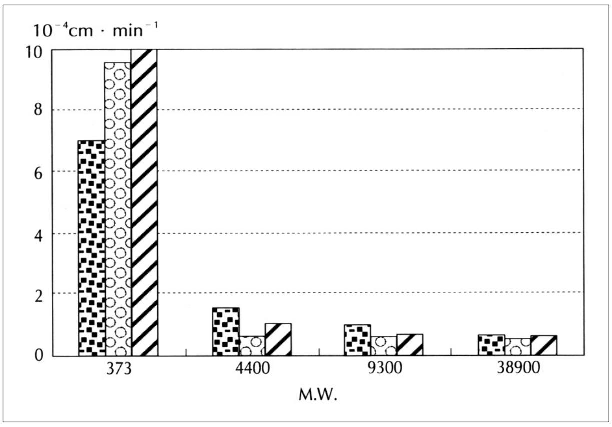

Fig. 4. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer in the astrocyte co-culture system for various molecular weight of fluorescein sodium and fluorescein isothiocyanate conjugated dextran.

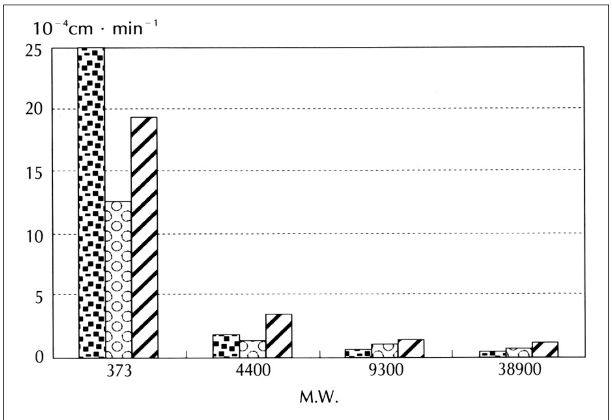

Fig. 3. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer in endothelial mono-culture system for various molecular weight of fluorescein sodium and fluorescein isothiocyanate conjugated dextran.

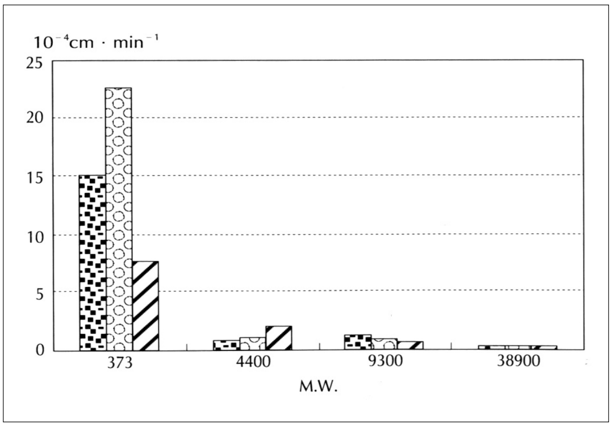

Fig. 5. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer in the benign astrocyte co-culture system for various molecular weight of fluorescein sodium and fluorescein isothiocyanate conjugated dextran.

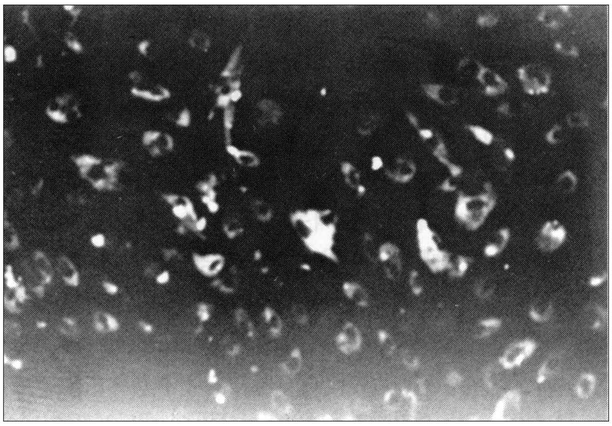

Fig. 6. Photomicrograph of cultured endothelial cells stained using indirect immuno-fluorescence with anti-Factor VIII antigen antibody(×200).

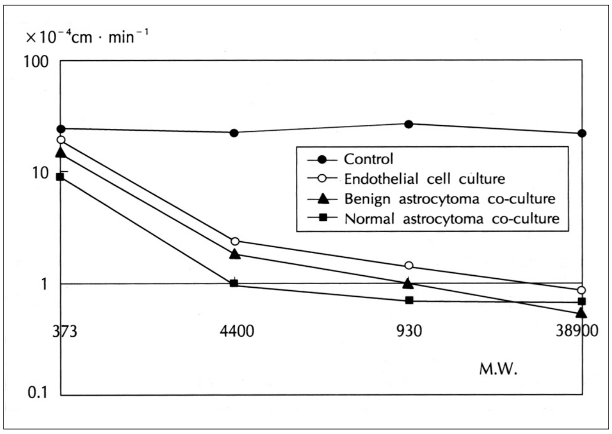

Fig. 7. Graph showing permeability ratios according to various molecular weight of fluorescine sodium and fluorescein isothiocyanate conjugated dextran in each model. Astrocyte and endothelial monolayer co-culture shows the lowest permeability ratio among all three models.

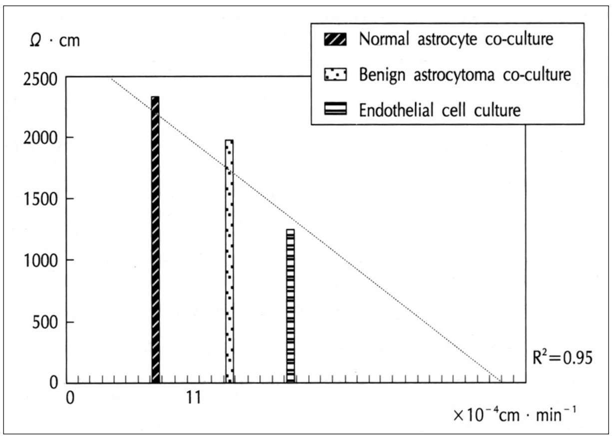

Fig. 8. Graph showing the inversed correlation between trans-endothelial resistance and permeability ratio of the lowest molecular weight fluorescine sodium(MW=373) in each model.

내막세포의 모양은 단일층으로 되기 전까지는 비정형의 모양이었고, 단일층으로 배양된 후에는 동그란 소위 cobble stone 모양을 보이는 경우도 있었지만 길쭉한 모양으로 보이는 경우가 월등히 많았다. 내막세포의 배양시의 모양이 각 모델에 따라서 차이를 보이지는 않았다.

고 찰

혈뇌장벽의 체외 모델을 연구하는 방법으로 내막세포 단독배양에 의한 단일층에서도 폐쇄소대를 유지하고 있으며 고삼투압 약제에 의해서 투과도가 증가한다는 사실에서 혈뇌장벽의 체외모델로 사용할 수 있다고 주장한 Bowman 등[2]의 보고를 시작으로 혈관내막세포 단일층 단독 배양에 의한 방법이 사용되었으며, Killackey 등[15]이 체외모델로 사용하여 histamin, bradykinin, 그리고 serotonin 등에 대해서 투과도를 측정하여 보고하였고, Villacara 등[37]은 arachdonic acid를 투여하여 투과도가 증가하였다고 보고하였다. 또한 최근에는 Trautnann 등[36]이 내막세포에서 NO와 endothelin-1을 분비할 수 있다고 하였으며, Stanimirovic 등[32]은 내막세포의 투과도에 protein kinase C가 관련되어 있다고 보고하였고, 그리고, Nagashima 등[19]은 leukotriene C4에 의해서 투과도가 변하지 않았다고 보고하였다.

그러나 내막세포 배양에서 성상세포의 중요성은 DeBault와 Cancilla[7]가 내막세포 배양에서 내막세포막의 γ-glutamyl transpeptidase(GGTP)의 표현 정도를 측정하여 혈뇌장벽을 생성시키기 위해서는 성상세포와의 동시배양이 중요하다고 발표한 이후, 구조적으로는 혈관이식에 의해 뇌조직에 이식된 혈관에는 혈뇌장벽이 생성되지만 말초조직에 이식된 혈관에서는 혈뇌장벽이 형성되지 않는다는 Stewart와 Wiley[33]의 보고에서 더욱 확인되었고, Patridge 등[22]은 내막세포 단독배양에 의한 체외모델이 체내모델에서 측정된 투과도와 비교하여 체외모델에서 투과도가 높으며, 여기에서 체외모델의 혈뇌장벽에는 성상세포에 의한 trophic factor가 없기 때문이라고 추정하였다. 전자현미경적 관찰에서 내막세포는 계대배양에서 폐쇄소대가 점진적으로 소실되지만, Arthur 등[1]은 성상세포 배양액으로, 한편 Tao-Cheng 등[35]은 성상세포 동시배양으로 내막세포를 배양하여 폐쇄소대가 다시 유도된다고 하였다. 이후에 Rubin 등[26]이 C-AMP를 배양액에 추가시 폐쇄소대의 발현이 더욱 촉진된다고한 보고를 발전시켜 Wolburg 등[39]은 성상세포 배양액이나 성상세포 동시배양에 의한 내막세포의 폐쇄소대 증가는 C-AMP를 첨가시 전자현미경적 관찰에서 더욱 향상되었다고 보고하였다. 그리고 기능적인 측면에서는 Dehouck 등[8]이 성상세포를 동

시배양하면 투과도가 감소한다고 보고하여 단순한 내막세포의 특성연구가 아니라 혈뇌장벽을 이루는 내막세포에 대한 연구를 위해서는 성상세포의 영향이 필요할 것이라는 공감을 불러일으켰다.

내막 단층세포의 배양모델에서 성상세포의 영향인자를 내막세포의 배양에 사용하기 위해서 성상세포의 배양액을 내막세포의 배양액으로 사용하거나[1)26)] 또는 성상세포를 내막세포와 같은 배양액으로 동시에 배양하는 동시배양방법[8)10)] 35으로 발전되었다. 성상세포 배양액을 사용하는 방법은 조작은 쉽지만 성상세포에서 방출하는 인자의 수명이 짧은 경우에는 적당하지 않을 수도 있다는 단점으로 성상세포를 동시배양하는 방법이 조작적인 어려움은 있지만 실제 체내모델과의 유사성이 더 높은 장점이 있다. 또한 정상 성상세포를 배양, 유지하는 어려움에서 정상 성상세포 대신에 양성 성상세포종을 혈관내막세포와 동시배양하여 체외 혈뇌장벽모델로 이용한 보고[14)21)25)]도 많이 발표되었다. 이러한 동시배양 모델은 미세공막을 가운데 두고 양면으로 각각의 세포를 배양한 접촉배양법에 의한 것[7)9)]과 미세공막에 내막세포를 배양하고 같은 세포 배양액을 공유하는 구획에서 정상 성상세포나 양성 성상세포를 배양하는 분리배양법에 의한 것[34)]이 있다. 접촉배양법에 의해서 동시배양하는 경우에는 다음실험을 위한 내막세포 분리가 어렵고, 동시배양되는 성상세포의 투과도에 대한 영향으로 발생하는 오차때문에 투과도보다 세포분화도를 연구하는데 사용되고 있으며, 비접촉 배양법에 의한 동시배양의 경우에는 반대로 수용체 발현보다는 투과도 측정에 이용되고 있다.

내막세포 배양에서 정상 성상세포를 동시배양하는 방법과 비슷하게 양성 성상세포종을 내막세포와 동시배양한 경우에도 정상 성상세포를 동시배양하였을 때와 마찬가지로 구조적 그리고 기능적으로 변화가 일어난다고 보고되고 있지만 정상성상세포와 양성 성상세포종을 동시배양한 경우를 비교한 경우는 아직 없었다. 본 연구에서 내막세포를 단독배양한 경우, 정상 성상세포를 동시 배양한 모델, 그리고 양성 성상세포종 동시 배양 모델 각각에서 여러 분자량의 투과도를 측정해 보면 정상 성상세포를 동시 배양한 경우가 가장 투과도가 낮아 세포의 분화도 또는 혈뇌장벽의 발달이 잘 이루어진 것으로 추측되며, 양성 성상세포종은 내막세포를 단독배양한 모델보다는 월등히 투과도가 낮았지만, 정상 성상세포를 동시배양한 모델보다는 투과도가 높았다(Fig. 7). 분자량에 따른 투과도의 변화는 세 가지 모델 모두에서 분자량이 커짐에 따라 투과도가 감소하는 반비례현상을 보여 이는 다른 연구보고[17)]와 일치하였다. 그러나 분자량이 작은 물질의 경우에 모델에 따라 투과도의 차이가 더 크게 있었는데 이것은 분자량이 큰 물질은 투과도가 낮아 모델의 조건에 따른 차이를 보이지 못한 것으로 추측된다.

투과도 측정에 사용되는 표지물질로서 크게 여러 가지 방사성 동위원소[12)38)]와 색깔에 의해서 농도측정을 할 수 있는 색화합물[23)]로 나눌 수 있으며, 방사성 동위원소의 경우에는 사용의 허가나 사용할 때 위험문제 등이 있지만 실험에서 측정방법은 오히려 간단하다는 장점이 있는 반면에 색화합물은 취급에 있어서의 위험도는 없지만 색화합물의 종류가 제한되어 있어 측정이 제한되며, 색농도와 물질농도가 1 : 1로 비례하지 않기 때문에 계산이나 상관관계곡선을 만들어야 하는 어려움이 있다. 본 실험에서는 여러 가지 크기의 분자량을 만들기 쉬운 fluorescein isothiocyanate conjugated dextran을 사용하였다.

경내막세포층 전기저항은 Rutten 등[27)]이 내막세포가 뇌에 있었던 것을 배양한 것과 말초조직에 있었던 것을 배양한 경우 전기저항에 커다란 차이가 있다고 보고함으로서 혈뇌장벽의 유무를 간단히 측정하기 위한 방법으로 제시되고 나서 Milton과 Knutson[18)]은 대장암 표피세포, 섬유아세포, 그리고 내막세포에서 전기저항을 측정하여 전기저항만으로는 폐쇄소대의 유무를 추정할 수는 없다고 하였으나, Dehouck 등[8)10)], Rubin 등[26)], 그리고 Raub 등[25)]은 내막세포 단독배양에서보다 성상세포를 동시배양하거나 성상세포 배양액으로 내막세포를 배양할 경우 투과도가 감소하였고, 동시에 전기저항이 증가하였다고 하였고 본 실험에서도 전기저항은 각 모델의 투과도와 반비례하여 전기저항에 의해서 다른 세포배양에서 폐쇄소대 유무를 추정할 수는 없다고 하여도, 내막세포에서 조건에 따른 폐쇄소대의 형성정도와는 상관관계에 있을 것으로 추측된다(Fig. 8). 그러나 전기저항을 투과도와 관련이 있다고한 Dehouck 등[8)]과 Rubin 등[26)]의 보고에서 전기저항은 평균 661과 115, 그리고 Raub 등[25)]은 160Ωcm 2으로 100% 이상의 차이를 보임으로서 세포의 배양조건이나 배양액의 조성, 그리고 측정방법 등에 의한 상대적 오차로 추측한다면 전기저항은 다른 보고와 절대치의 비교보다는 같은 배양조건에서 상대적 비교가 타당할 것으로 고려되었다.

혈관내막세포에 대한 면역 염색은 Factor VIII 면역형광 염색에 의해서 내막세포임을 확인할 수 있으며, 이외에 acetylated low-density lipoprotein(acyl-LDL) 염색과 세포의 크기에 의해서 확인할 수도 있다[16)]. 성상세포에 대한 확인은 GFAP 면역형광 염색에 의해서 확인할 수 있었다. 현미경상에서 관찰한 미세공막위에 배양된 내막세포는 일반배양관에서 배양될 때보다 세포의 착상이 늦고 실패율이 높았지만 일단 배양되면 세포의 증식율은 더 높은 결과를 보였다. 배양관에서 내막세포는 고전적으로 자갈모양(cobble stone apperance)을 한다고 보고되었지만 많은 보고에서 길쭉한 모양으로 보인다[18]고 하였는데 본 실험에서도 배양관뿐만 아니라 미세공막위에서 배양된 모양에서도 단일층으로 되기 전까지는 비정형의 모양을 가지지만, 단일층으로 배양되면 길쭉한 모양으로 보이는 경우가 월등히 많았는데 이러한 모양의 차이에 대해서는 아직 연구된 보고가 없다.

결 론

본 신경외과학교실에서는 혈관내막세포를 단일층으로 배양하여 기본적인 체외 혈뇌장벽 모델을 구축하고 공막분리 동시배양법으로 정상 성상세포와 양성 성상세포를 동시배양하여 전기저항과 투과도를 측정하였다. 동시배양 모델이 전기저항이나 투과도에 있어서 혈관내막세포 단독배양보다 체외 혈뇌장벽 모델로서 이상적이며, 동시배양 모델중에서는 정상 성상세포를 동시배양할 때가 양성 성상세포종을 동시 배양할 경우보다도 이상적일 것으로 추측되었다. 전기저항과 투과도는 각 모델에서 반비례하는 상관관계를 보였다.

• 논문접수일 : 1997년 4월 9일
• 심사완료일 : 1997년 5월 15일

References

1) 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*
2) Bowman PD, Ennis SR, Rarey KR, et al : *Brain microvessel endothelial cells in tissue culture : A model for study of blood-brain barrier permeability. Ann Neurol 14 : 396-402, 1983*
3) Bowman PD, du Bois M, Dorovini-Zis K : *Microvascular endothelial cells from brain. In Piper HM ed. Cell culture techniques in heart and vessel research. New York, Springer-Verlag, 1990, pp140-157*
4) Brightman MW : *The anatomic basis of the blood-brain barrier, in Neuwelt EA(ed): Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation, New York : Plenum Publishing Corp, 1989, pp53-83*
5) Broadwell RD : *Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier : A cell biological perspective and critical appraisal. Acta Neuropathol 79 : 117-128, 1989*
6) DeBault LE, Kahn LE, Frommes SP, et al : *Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture : Isolation and preminary characterization. In Vitro 15 : 473-487, 1979*
7) DeBault LE, Cancilla PA : *γ-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells : Induction by glial cells in vitro. Science 207 : 653-655, 1980*
8) Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, et al : *An easier, reproducible and mass-production method to study the blood-brain barrrier in vitro. J Neurochem 54 : 1798-1801, 1990*
9) Dehouck MP, Pascale JR, Bree F, et al : *Drug transfer across the blood-brain barrier : Correlation between in vitro and in vivo models. J Neurochem 58 : 1790-1797, 1992*
10) Dehouck B, Dehouck MP, Meresse S, et al : *Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : Intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. J Cell Biology 126 : 465-473, 1994*
11) Ehrlich P : *Das Sauerstoff-Bedurfnis des Organismus ; Eine Farbenanalytische Studie. Berlin : Hirschwald, 1885*
12) Fischer S, Renz D, Schaper W, et al : *In vitro effects of fentanyl, methohexital, and thiopental on brain endothelial permeability. Anesthesiology 82 : 451-458, 1995*
13) Goldman E : *Vital Faubung am Zentralnerven-system. Abh Preuss Akad Wiss Phys-Math K1 1 : 1-60, 1913*
14) Hurst RD, Fritz IB : *Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. J Cell Physiol 167 : 81-88, 1996*
15) Killackey JF, Johnston MG, Movat HZ : *Increased permeability of microcarrier-cultured endothelial monolayers in response to histamine and thrombin. Am J Pathol 122 : 50-61, 1986*
16) Laterra J, Goldstein GW : *Brain microvessels and microvascular cells in vitro. In Pardridge WM ed. The Blood-Brain Barrier New York, Raven Press, 1993, pp1-24*
17) Mayhan WG, Hiestad DD : *Permeabillity of blood-brain barrier to various sized molecules. Heart Circ Physiol 17 : H712-H718, 1985*
18) Milton SG, Knutson VP : *Comparison of the function of the tight junction of endothelial cells and epithelial cells in regulating the movement of electrolutes and macromolecules across the cell monolayer. J Cellular Physiol 144 : 498-504, 1990*
19) Nagashima T, Shigin W, Mizoguchi A, et al : *The effect of leukotriene C4 on the permeability of brain capillary endothelial cell monolayer. Acta Neurochir 60 : 55-57, 1994(suppl)*
20) Nagy Z, Peters H, Huttner I : *Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. Lab Invest 50 : 313-322, 1984*
21) Odonnell ME, Martinez A, Sun D, et al : *Cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransport : Regulation by astrocyte-conditioned medium. Am J Physiol 268(Cell Physiol 37): C747-C754, 1995*
22) Pardridge WM, Triguero D, Yang J, et al : *Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 253 : 884-891, 1990*
23) Raeissi S, Audus KL : *In-vitro characterization of blood-brain barrierpermeability to delta sleep-inducing peptide. J Pharm Pharmacol 41 : 848-852, 1989*
24) Rapoport SI, Fredricks WR, Ohno K, et al : *Antitatative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. Am J Physiol 238 : R421-431, 1980*
25) Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA : *Permeability of bovine*

brain microvessel endothelial cells in vitro : Barrier tightening by a factor released from astroglioma cells. Exp Cell Res 199 : 330-340, 1992

26) Rubin LL, Hall DE, Porter S, et al : *A cell culture model of the blood-brain barrier. 115 : 1725-1735, 1991*
27) Rutten MJ, Hoover RL, Karnovsky MJ : *Electrial resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. Brain Res 425 : 301-310, 1987*
28) Shi F, Audus KL : *Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. Neurochem Res 19(4): 427-433, 1994*
29) Siflinger-Birnboim A, Del Becchio PJ, Cooper JA, et al : *Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. J Cell Physiol 132 : 111-117, 1987*
30) Sill HW, Butler C, hollis TM, et al : *Albumin permeability and electrical resistance as means of assessing endothelial monolayer integrity in vitro. J Tis Cult Meth 14 : 253-258, 1992*
31) Singh A, Belshe BD, Gumerlock MK : *Radionuclide assessment of blood-brain barrier disruption performed for chemotherapy of high grade malignant brain gliomas. Nucl Med Biol 18 : 641-645, 1991*
32) Stanimirovic DB, Bertrand N, McCarron R, et al : *Arachdonic acid release and permeability changes induced by endothelins in human cerebromicrovascular endothelium. Acta Neurochir suppl 60 : 71-75, 1994*
33) Stewart PA, Wiley MJ : *Devloping nervous tissue induces formation of blood-brain barrier charateristics in invading endothelial cells : A study using quail-chick transplatation chimeras. Dev Biol 84 : 183-192, 1981*
34) Sun D, Lytle C, Odonnell ME : *Astroglial cell-induced expression of Na-K-Cl cotransporter in brain microvascular endothelial cells. Am J Physiol 269(Cell Physiol 38): C1506-C1512, 1995*
35) Tao-Cheng JW, Nagy Z, Brightman MW : *Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. J Neurosci 7 : 3293-3299, 1987*
36) Trautmann OD, Federici C, Creminon C, et al : *Nitric oxide and endothelial secretion by brain microvessel endothelial cells: Regulation by cyclic nucleotides. J Cellular Physiol 155 : 104-111, 1993*
37) Villacara A, Spatz M, Dodson RF, et al : *Effect of arachidonic acid on cultured cerebromicrovascular endothelium : Permeability, lipid peroxidation and membrane "fluidity". Acta Neuropathol 78 : 310-316, 1989*
38) Westergaard E : *Ultrastructural permeability properties of cerebral microvasculature under normal and experimental conditions after application of tracers. Adv Neurol 28 : 55-74, 1980*
39) Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, et al : *Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. J Cell Sci 107 : 1347-1357, 1994*