KISEP Experimental Research J Korean Neurosurg Soc 26 : 1493-1501, 1997

혈관내막세포 단층배양에서 동시배양 세포의 악성도에 따른 투과도 변화

아주대학교 의과대학 신경외과학교실, 연세대학교 의과대학 신경외과학교실*

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

= Abstract =

Permeability Changes of Capillary Endothelial Monolayer according to the Malignancy of Co-cultured Cell Lines

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 Choi, M.D.*

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

Even though many hypotheses have been derived from the anatomical and functional analysis of in vivo models of brain tumors, it is still impossible to explain the mechanism of peritumoral edema. To determine whether increased permeability in a blood - brain barrier model correlated with the malignancy of a co - cultured brain tumor, the authors established an in vitro brain capillary endothelial monolayer co - culture model. Water - soluble factors which might explain the pathogenetic mechanism of peritumoral edema in brain tumors were expected and observed.

The benign cell co - culture model used co - cultured astrocytoma cell lines such as C6 and H683 in the second compartment of a brain capillary endothelial monolayer culture model circumscribed with a 0.4u sized porous membrane which permitted communication of the media but limited cell migration to another compartment, and the malignant cell co - culture model used co - cultured glioblastoma cell lines such as 87MG and 373MG. Permeability at molecular weight 373 increased in the astrocytoma and glioblastoma co - culture models to 150% and 240% respectively, of that in a normal astrocyte co - culture model. Permeability at this molecular weight also increased in the astrocytoma - and glioblastoma - conditioned medium culture models to 38% and 131%, respectively, of that in a normal astrocytoma - conditioned medium culture model. The observed result was that permeability of the endothelial monolayer increased in accordance with the malignancy of co - cultured cells in the system permitting – other than cell migration – media transfer only.

The result suggested that some factor soluble in media secreted from co - cultured cells changes the permeability of the endothelial monolayer and could explain the pathogenetic mechanism of peritumoral edema in malignant brain tumors.

KEY WORDS : Blood - brain barrier · In vitro model · Malignant brain tumor · Peritumoral edema · Transendothelial permeability · Electrical resistance.

서 론

임상에서 악성 뇌종양에서 볼 수 있는 종양주위의 부종현상은 결국 종양에 의해서 유도된 혈관 생성의 과정에서 비정상적으로 투과도가 높은 이른바, 미분화된 혈관세포[15)36)]가 생성되었기 때문이거나, 악성 뇌종양으로부터 주위에 있는 혈관 내막세포에 어떤 수용성 인자가 직접적으로 또는

다른 우회경로를 통하여 방출되어 정상혈관세포가 투과도가 변한 것[7)14)16)19)20)25)]의 두가지로 크게 나누어 볼 수 있다. 이러한 여러 가설들의 타당성은 미세혈관의 구조적 관찰에서, 또는 종양세포배양에서 여러 수용성 인자를 발견할 수 있었다는 면에서 인정되고 있다. 그러나, 정상 세포에서도 이러한 인자들은 분비되고 있고, 수용성 인자의 조건에 따른 정량적 분석이 어렵기 때문에 이러한 수용성 인자에 의해서 투과도가 변한다고 하여도 실제 체내에서 이것만으로 투과도가 변할 것인가에 대해서 악성도에 따라서 정상과 비교하여 보고된 바가 없다. 이에 저자는 악성도에 따라서 혈관내막세포의 투과도가 달라진다는 것을 확인하기 위해서 우선 체외혈뇌장벽 모델에서 혈관내막세포와 같은 배양액에 의해서 배양하지만 세포는 접촉되지 않도록 되어 있는 이중배양관에서 정상 성상세포, 양성 성상세포종, 그리고 악성 교모세포종을 동시배양하여, 악성도에 따라서 혈관내막세포의 투과도가 변화하는지를 검증하고자 하였다.

연구 범위 및 방법

체외혈뇌장벽 모델을 이용하여 정상 성상세포, 저악성도의 성상세포종과 고악성도의 교모세포종을 혈관내막세포와 각각 동시배양하여 fluorescein과 여러 분자량의 fluorescein isothiocyanate conjugated dextran에 대한 투과도를 측정하여 악성도에 따른 혈뇌장벽의 투과도 증가에 대하여 검증하였다.

1. 미세혈관 내막세포 배양

체외혈뇌장벽 모델은 발표된 방법 1을 사용하였으며, 간단히 기술하자면 뇌조직을 작게 잘라낸후 원심분리에 의해서 뇌미세혈관 조각을 모은 다음, 이들을 DMEM으로 배양하여 뇌미세혈관 내막세포를 배양하였다(Fig. 1). 혈관내막세포에 대한 Anti - Factor VIII antigen antibody 면역형광염색에 의해서 혈관내막세포임을 확인하였다(Fig. 2). 미세공막위에서 배양된 혈관내막세포의 모양은 단일층으로 되기 전까지는 비정형의 모양이었고, 단일층으로 배양된 후에는 동그란 소위 자갈(cobble stone) 모양을 보이는 경우도 있었지만 길쭉한 모양으로 보이는 경우가 월등히 많았다(Fig. 3). 내막세포의 배양시의 모양이 각 모델에 따라서 차이를 보이지는 않았다. 뇌미세혈관을 배양하여 구축한 혈뇌장벽은 배양액만이 교류할 수 있도록 0.4um 구멍을 가진 차단막이 설치되어 있는 이중배양기에서 차단막위에 내막세포 단일층을 배양하였다.

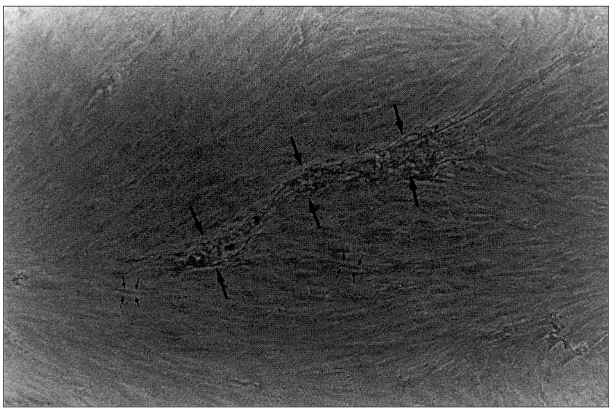

Fig. 1. Phase-contrast photomicrograph of embeded end-othelial cells(small arrows) growing from a small capillary fragment(large arrows) in the flask culture. (100×)

2. 동시배양 세포 배양

정상 성상세포, 양성 성상세포종 C6(rat glial cell tumor)와 Hs 683(human glioma) 세포, 그리고 고악성도의 교모세포종 373MG와 87MG를 10% 우태아혈청이 추가된 DMEM으로 배양하였다. Porous collagen - coated membrane에 구획되어 만들어진 이중구조의 배양관에서 100,000cells/ml의

Fig. 2. Photomicrograph of cultured endothelial cells stained like ‘ starry night ’ using indirect immuno-fluorescence with anti-Factor VIII antigen antibody. (200×)

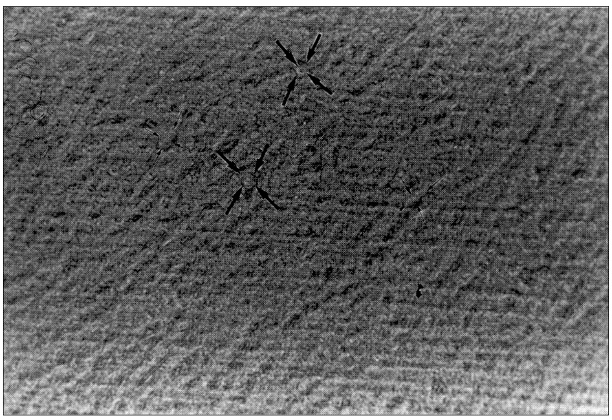

Fig. 3. Phase-contrast photomicrograph of endothelial monolayer on the microporous membrane in the transwell. Typical cobble stone appearance was noted (large arrows) but some cells shows round, elliptical, and various types of morphology(small arrows).

밀도로 아래쪽 부분의 구획에 분포시키고 배양하면 3 5일 정도 후면 세포가 풍부하게 단일층으로 자랐다. 이후에 약 5일이 되면 이중배양관의 0.4u 크기의 공막위에 배양한 내막세포의 투과도를 측정함으로서 하부구조에서 배양된 세포의 악성도에 따른 혈관내막세포 단일층의 투과도에 미치는 영향을 측정하였다.

3. 정상 성상세포, 양성 성상세포종 그리고 교모세포종 세포 배양액에 의한 미세혈관 내막세포 배양

정상 성상세포, 양성 성상세포종 C6(rat glial cell tumor)와 Hs 683(human glioma) 세포, 그리고 고악성도의 교모세포종 373MG와 87MG를 10% 우태아혈청이 추가된 DMEM으로 배양한다. 배양하면 3 5일정도 후면 세포가 풍부하게 단일층으로 자라게 되며 배양액의 색이 분홍색에서 노란색으로 변하게 되는데, 이때 배양액을 교환하였다. 약 2 3일 정도 후에 역시 세포상태와 배양액의 색 변화를 확인하고 배양액을 채취하여 0.4u 크기의 필터로 걸러내고 나서 즉시 -70℃에 냉장보관한다. 혈관 내막세포가 이중관의 차단 공막위에 풍부하게 단층으로 자란후에 냉동된 배양액을 녹여서 DMEM과 1 : 1 용적비율로 섞어서 이를 가지고 혈관내막세포를 2일정도 배양한 후에 혈관 내막세포의 투과도를 측정하였다.

4. 전기저항 측정과 투과도 측정

전기저항은 투과도를 측정하기 전, 또는 후에 시행하며, 은도금 전극에 의한 전기저항 측정기(Circuit tester 3201-E, YOKOGAWA Electric Co. Japan)에 의해서 이루어지게 된다. 대조군으로 내막세포를 배양하지 않은 porous collagen-coated membrane의 저항을 측정하여 내막세포의 저항측정값에서 감하여 내막세포만의 저항을 계산한다.

투과도 측정은 fluoresceine sodium(MW=373), 분자량 4400, 9300, 38900의 fluoresceine isothiocyanate conjugated dextran을 10 100uM의 농도가 되도록 배양관의 위측 구획에 투여하고 아래측 구획의 배양액을 0.1 1mL 정도 채취하여 phosphate buffered saline 으로 희석하여 1ml가 되게 한 다음 spectrofluorometer에 의해서 excitation 490nm로 설정하고 520nm에서 fluoresence를 측정한다.

Sill 등[34]에 의해 정의되어 있는 Effective Permeability Coefficient는 다음과 같이 표시된다.

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

여기서 V는 위층 chamber media의 volume이고, A는 endothelial cell-covered membrane의 면적이며, T_L은 아래쪽 chambe에 있는 표지물질의 농도이고, Tu는 위층 chamber의 표지물질의 농도이며, t는 표지물질을 첨가한 후부터의 시간이다.

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.

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

결 과

1. 전기저항

세포층이 없는 배양막만으로 측정한 전기저항은 4650±290Ωcm^2 이었으며, 내막세포 단층배양에서 전체 전기저항은 5817±530Ωcm^{2}이었고, 따라서 내막세포 단층막만의 전기저항은 1166±527Ωcm^{2}이었다. 성상세포 배양에 의한 내막세포 배양에서 전체 전기저항은 6917±462Ωcm^{2}이었고, 배양막의 전기저항을 감하면 2367±462Ωcm^{2}이었다. 또한 이중배양관 구조를 이용한 양성 성상세포종 동시배양 모델에서의 전기저항은 1975±529Ωcm^{2}이었고, 악성교모세포종 동시배양 모델에서의 전기저항은 1633±98Ωcm^{2}이었다(Fig. 4).

2. 미세혈관 내막세포 단일층을 정상 성상세포와 동시배양

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 투과

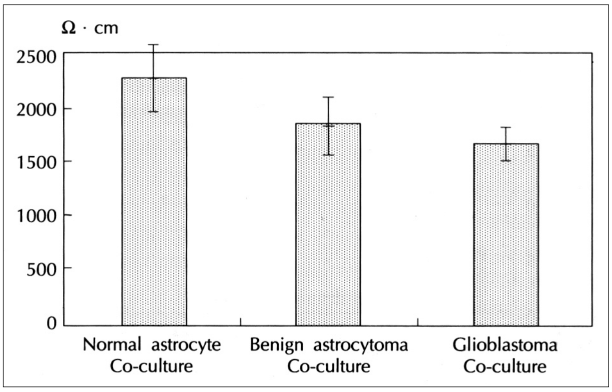

Fig. 4. Graph showing the trans-endothelial electrical resistance of three models. The normal astrocyte co-culture model show highest among four models in the trans-endothelial electrical resistance.

도는 분자량에 따라 각각 8.87×10^{-4}, 1.01×10^{-4}, 0.66×10^{-4}, 그리고 $0.56\times10^{-4}cm \cdot min^{-1}$이었다(Fig. 5).

3. 미세혈관 내막세포 단일층을 양성 성상세포종과 동시배양

저악성도의 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 $0.50\times10^{-4}cm \cdot min^{-1}$이었고, 배양층만의 투과도가 $23\times10^{-4}cm \cdot min^{-1}$이었으므로 결국 내막세포 단일층만의 투과도는 분자량에 따라 각각 14.3×10^{-4}, 1.7×10^{-4}, 1.01×10^{-4}, 그리고 $0.51\times10^{-4}cm \cdot min^{-1}$이었다(Fig. 6).

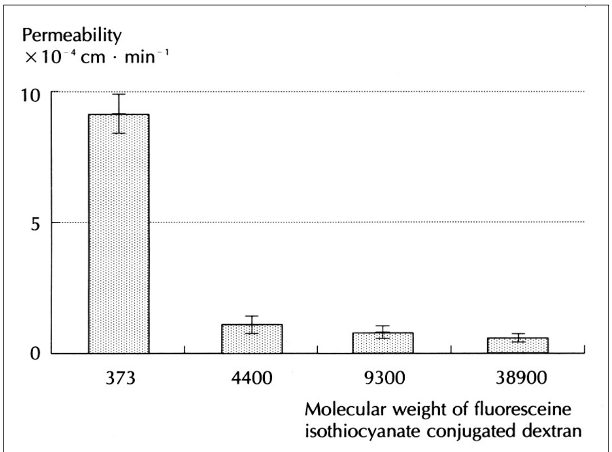

Fig. 5. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer in the astrocyte co-culture system for various molecular weight of fluorescein sodium and fluoresceine isothiocyanate conjugated dextran.

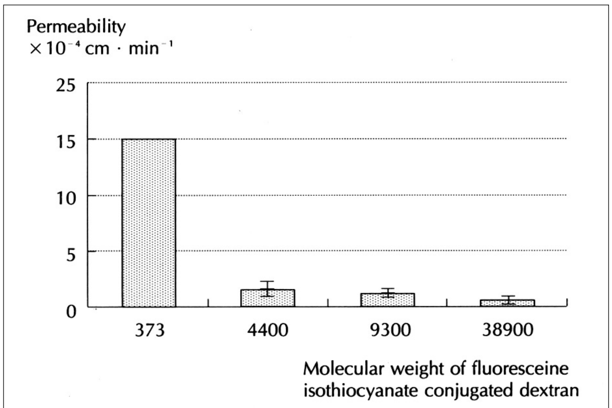

Fig. 6. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer in the benign astrocytoma co-culture system for various molecular weight of fluoresceine sodium and fluoresceine iso-thiocyanate conjugated dextran.

4. 미세혈관 내막세포 단일층을 교모세포종과 동시배양

성상세포와 동시배양한 이중구조에서 내막세포 배양에 의한 투과도는 분자량 373, 4400, 9300 그리고 38900의 각각에 따라 13×10^{-4}, 4.5×10^{-4}, 2.8×10^{-4}, 그리고 $2.1\times10^{-4}cm \cdot min^{-1}$ 이었고, 배양층만의 투과도가 $23\times10^{-4} cm \cdot min^{-1}$이었으므로 결국 내막세포 단일층만의 투과도는 분자량에 따라 각각 29.9×10^{-4}, 5.6×10^{-4}, 3.2×10^{-4}, 그리고 $2.3\times10^{-4}cm \cdot min^{-1}$ 이었다(Fig. 7).

5. 정상 성상세포, 양성 성상세포종 그리고 교모세포종 세포 배양액에 의한 미세혈관 내막세포 배양

분자량 373에서 정상성상세포의 배양액을 사용한 경우 투과도는 8.1×10^{-4}, 양성성상세포종 배양액을 사용한 경

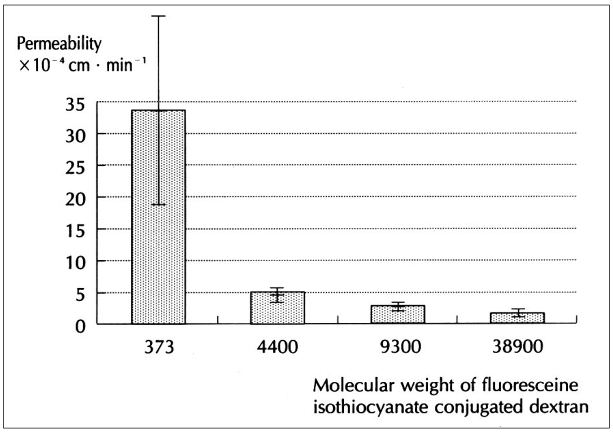

Fig. 7. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer in the malignant glioblastoma co-culture system for various molecular weight of fluorescein sodium and fluoresceine isothiocyanate conjugated dextran.

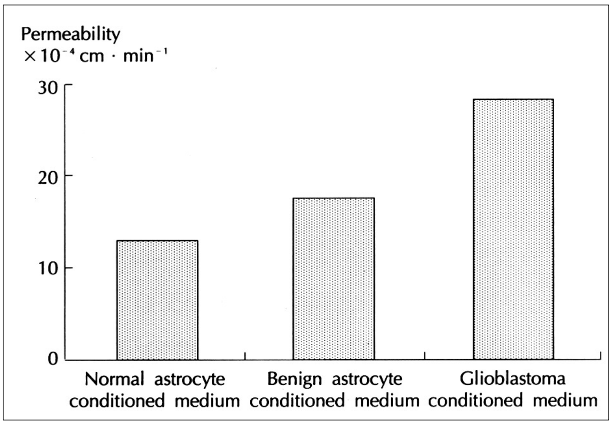

Fig. 8. Graph showing permeability ratio of endothelial monolayer cultured non-conditioned medium compared to endothelial monolayer cultured with the normal astrocyte, benign astrocytoma and malignant glioblastoma conditioned medium for the molecular weight 373 of fluoresceine sodium.

우에는 투과도가 9.4×10^{-4}, 악성교모세포종 배양액을 사용한 경우에 투과도는 11.8×10^{-4}로서 배양층만의 투과도가 23×10^{-4}이었으므로 혈관내막세포 단일층의 투과도는 각각 12.5×10^{-4}, 17.0×10^{-4}, 그리고 26.9×10^{-4}이었다(Fig. 8).

고 찰

악성 뇌종양에서 흔히 동반되는 뇌부종의 발생기전에는 여러 가지 가설이 있으나 종양에 의한 혈관생성시에 투과도가 높은 비정상적인 혈뇌장벽으로 이루어진 혈관세포에 의해서 혈관이 이루어진다는 가설[15)36)], 종양에서 분비된 투과인자에 의해서 혈뇌장벽의 투과도가 높아진다는 가설[7)20)25)35)38)], T 임파구와 PGE2, IL-1과 IL-2에 의해서 제시된 면역학적인 기전[16)17)19)21)], 그리고 대식세포와 다형백혈구에 의해서 혈소판 자극인자가 방출되고 arachdonic acid등과 eicosanoid들이 생성되며, superoxide anion radical등이 발생하게된다는 염증성 기전[14)39)]으로 나누어 볼 수 있다. 이상혈관발생 가설의 타당성은 종양세포와 동시배양된 미세혈관의 구조적 관찰에서 비정상적인 다발성 공막이 발견되어 투과도가 증가할 것이라는 추측[8)36)]에서 뒷받침되고 있지만 이러한 조건만으로 체내에서 투과도의 변화가 발생하였는가에 대해서는 더 연구가 이루어져 확인되어야 할 부분이다. 이중에서 수용성 인자에 의해서 투과도 변화가 일어난다는 가설 역시 종양세포배양에서 여러 수용성 인자를 발견할 수 있었고, 이러한 혈관수축인자들이 혈관세포의 투과도를 변화시킬수 있다는 면에서 인정되고 있지만 정상 세포에서도 이러한 인자들은 분비되고 있고, 수용성 인자의 정량적 분석이 어렵기 때문에 이러한 수용성 인자에 의해서 투과도가 변한다고 하여도 실제 체내에서 이것만으로 투과도가 변할 것인가 에 대해서 정상 구조와 비교하여 보고된 바가 없다. 수용성 인자의 역할을 확인하기 위해서 본연구에서는 혈관내막세포를 배양한 모델에서 악성 교모세포종을 비접촉에 의해서 동시 배양하여 수용성 인자에 의해서 과연 체외모델에서 얼마나 투과도가 변하는지를 측정하고자 하였다.

혈뇌장벽의 체외 모델을 구축하는 방법으로는 뇌미세혈관 단일층 배양에 의한 방법이 사용되어 왔지만 근래에 성상세포를 동시 배양하거나 성상세포 배양액을 사용하는 모델이 체내 혈뇌장벽 모델에 유사성이 높다고 보고되고 있으며[1)4)10)13)37)40)], 정상 성상세포를 배양을 유지하는 어려움에서 정상 성상세포 대신에 양성 성상세포종을 혈관내막세포와 동시배양한 모델도 있다[18)24)31)]. 본 실험에서도 뇌미세혈관 내막세포을 배양한 후, 정상 성상세포를 동시배양한 모델, 그리고 양성 성상세포종 동시배양 모델을 대조군으로 하여 교모세포종 동시배양 모델에서의 투과도와 비교하고자 하였다.

경혈관내막세포 전기저항이 투과도와 반비례하지 않는다는 보고 22도 있지만, 정상 세포를 동시배양한 경우에서 Dehouck 등[11)]과 Rubin 등[32)], 그리고 윤 등[1)]은 전기저항은 투과도와 반비례한다고 보고하였다. 본연구에서는 정상 성상세포 동시배양 모델, 양성 성상세포종 동시배양 모델, 그리고 교모세포종 동시배양 모델의 순서로 전기저항은 감소하였으며 투과도는 증가하였다. 따라서 악성도에 따라서 전기저항과 투과도는 반비례함을 보여주었다(Fig. 9). 그러나, 윤 등[1)]의 자료를 인용하면 혈관 내막세포만을 배양한 모델에서는 전기저항이 가장 낮았지만 투과도는 교모세포종 보다 낮아서 전기저항과 투과도가 모든 모델에서 항상 반비례한다고 단정할 수는 없으며, 한가지 모델에서의 투과도와는 좋은 반비례를 보여 같은 모델에서의 적용은 가능할 것으로 보인다.

실험동물에서 측정된 투과도에 대한 연구들은 면적투과도(vascular permeability×capillary surface area)를 비교연구하는 것으로 부터 시작되었는데 이것은 다음과 같은 측정치를 이용하여 계산할 수 있다.

$$PA = \frac{C_{brain}}{\int_0^t C_{plasma}\, dt}$$

여기서 P는 투과도이며, A는 투과면적이다. $\int_0^t C_{plasma}$ 은 10분간 plasma concentration curve에서 계산할 수있으며, C_{brain}은 뇌부분적 동위원소량에서 혈관내의 동위원소량을 감산하면 계산된다.

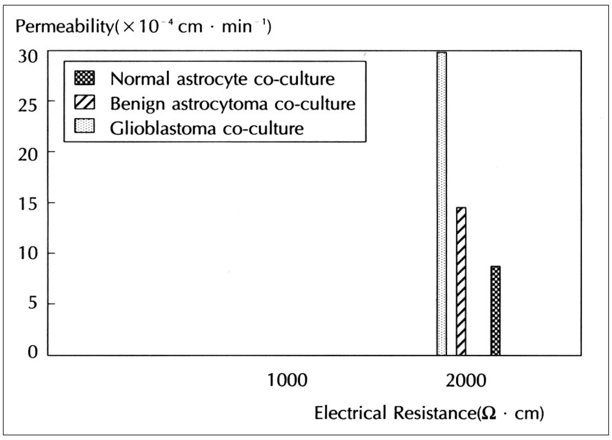

Fig. 9. Graph showing the inversed correlation(R2=0.94) between transendothelial resistance and permeability ratio of the lowest molecular weight fluorescine sodium(MW = 373) in each model.

체내실험에서 측정된 적투과도는 Rapoport 등[30]이 뇌의 여러부분에 따른 비교를 하였는데 전체적으로 6.46 - 14.1 $\times 10^{-6}$/sec로 보고하였고, Brooks 등[6]은 11±2.4$\times 10^{-5}$/sec이었다고 발표하였다. 특정 물질에 대해서는 Ziylian 등[41]이 sucrose(MW 340)에서 6.3 - 24.8$\times 10^{-6}$/sec이며, dextran(MW 79000)에서는 0.1 - 0.6$\times 10^{-6}$/sec이었다고 보고하였으며, Pardridge 등[27]은 glucose에서 2.7$\times 10^{-3}$cm/min, 그리고 sucrose에서 1$\times 10^{-5}$cm/min보다 적었다고 하였다. 또한, Ohno 등[26]은 쥐에서 면적투과도가 3.3$\times 10^{-6}$/sec 이었지만, 고삼투압제제를 투여하면 28$\times 10^{-6}$/sec까지 증가한다고 발표하여 면적투과도를 변화시킬 수 있음을 보고하였고, 윤 등[2,3]은 쥐에서 분자량 68,000의 알부민을 사용하여 투과도를 측정하였는데 정상상태에서는 0.42 - 1.81$\times 10^{-6}$cm/min이었으며, 만니톨을 투여하는 경우 3 10배의 넓은 투과도 변이가 있을 수 있음을 보고하였다.

체외모델에서의 투과도는 면적을 바로 계산할 수 있어 면적투과도가 아닌 투과도가 보고되고 있는데, 우선 내막세포만을 단독배양한 모델에서 Pardridge 등[27]에 의하면 glucose에 대한 투과도는 1.4$\times 10^{-2}$cm/min, sucrose에 대한 투과도는 5.1$\times 10^{-3}$cm/min으로 보고하였다. 최근에 Raeissi와 Audus[28]는 체외모델에서 내막세포 단독배양시 Fluorescein에 대한 투과도는 7$\times 10^{-4}$cm/min, Delta Sleep-Inducing Peptide에 대한 투과도는 1$\times 10^{-4}$cm/min, FITC dextran 20000에 대한 투과도는 0.8$\times 10^{-5}$cm/min등으로 발표하였으며, Shi와 Audus[33]는 FITC dextran 4400에 대한 투과도는 4$\times 10^{-5}$cm/min, FITC dextran 9400에 대한 투과도는 3$\times 10^{-5}$cm/min, FITC dextran 19000에 대한 투과도는 1.2$\times 10^{-5}$cm/min, FITC dextran 40,500에 대한 투과도는 0.25$\times 10^{-5}$cm/min으로 의외로 투과도가 낮아진 결과를 보고하였다. 성상세포와 동시배양 모델에서의 투과도측정에서도 과거에 Dehouck 등[12]에 의하면 glucose에 대한 투과도는 5.06$\times 10^{-3}$cm/min, sucrose에 대한 투과도는 0.63$\times 10^{-3}$cm/min으로 보고되어 있지만, 최근에 Raub 등[31]이 성상세포와 동시배양시 [3H] Dextran 70,000에 대한 투과도는 3.3$\times 10^{-6}$cm/min, [14C] Sucrose 342에 대한 투과도는 2.45$\times 10^{-5}$cm/min으로 보고하였으며, 본연구에서도 분자량에 따라 5 - 89$\times 10^{-5}$cm/min으로 낮은 수치를 보여 내막세포 단독배양의 체외모델에서와 마찬가지로 투과도는 보고연도에 따라 크게 감소된 결과를 보였다.

정상 뇌에서 미세혈관 면적(exchanging capillary surface area)이 원숭이에서 100cm^2/ml이며[29], 쥐에서는 240cm^2/ml라는 보고[9]를 인용하여 계산하면 면적투과도에서 투과도를 계산할 수 있다. 이 결과에서 투과도의 계산은 각 실험마다 많은 차이가 있는 것을 알 수 있었는데, 그 이유로는 각 실험군내에서는 큰 차이가 없는 것으로 보아 무엇보다도 체내 실험에서 각 실험실마다의 다른 실험조건이 관건일 것으로 추측된다. 체외모델에서 투과도를 보면 체외모델중에서도 과거의 결과에서는 투과도가 100 10000배 이상 높았지만, 최근 실험결과에서는 특히 성상세포와 동시배양한 모델에서는 체내실험결과의 10 100배정도의 수치를 보이고 있다. 성상세포와 동시배양한 경우에도 발생하는 투과도의 차이는 체외모델에는 세포외물질(extracellular matrix)이 없어 체내모델에 비하여 투과도가 낮을 것이라는 추측에서 어느 정도 설명이 가능하다. 실제로 본 연구에서 collagen이 도포된 공막은 이중배양관에서 내막세포 배양이 없어도 투과도가 약 5$\times 10^{-2}$cm/min 정도를 보였으며, 이를 배양액에 장시간 담가두면 배양액내의 고형성분이 가라앉아 투과도가 2$\times 10^{-4}$cm/min 정도까지 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 지금까지의 많은 투과도 실험논문에서 배양액만을 같은 배양시간동안 넣은 차단막에 대한 대조군을 설정하지 않고 측정되었지만, 측정된 투과도가 절대수치로서 의미를 가지기 위해서는 이러한 대조군이 반드시 설정되어야 할 것으로 사료되었다.

악성종양의 혈관세포에서 투과도에 대한 체내 실험은 최근까지도 많은 연구가 Ebans blue등과 같은 염색제를 사용하여 혈뇌장벽이 개방될 때의 생체 염색크기에 의해서 투과도 증가를 판정하였는데, 이러한 투과도 증가의 판정은 오차가 커서 2배이상 투과도가 증가되어도 차이를 알 수 없는 경우가 많다[3]. 방사성 동위원소에 의해서 측정된 투과도에 대해서 Brooks 등[6]에 의하면 정상 체내에서 11±2.4$\times 10^{-5}$/sec, 양성종양에서 6.6±5.8$\times 10^{-5}$/sec이었으며, 그리고 악성종양에서 109±86$\times 10^{-5}$/sec이었다고 보고되었다. 쥐에 이식된 교종세포종에서는 2$\times 10^{-5}$cm/min[23], 쥐에서 뇌내에 주사되어 생육된 뇌종양에서 214$\times 10^{-5}$cm/min, 정상 뇌조직에서 26.2$\times 10^{-5}$cm/min[5]으로 보고되고 있다. 또한, C6 교종 배양용액을 뇌혈관으로 주사한 후에는 투과도가 주사전에 비하여 2 4배이상 증가하였다고 보고되었다[25]. 그러나 이러한 체내실험 모델들은 피하에 종양을 이식하여 측정하였거나, 또는 뇌실질내에 종양을 정위적으로 삽입 이식하여 측정한 것으로 이러한 실험조작에 의해서 조작된 뇌부분에 필연적으로 혈뇌장벽의 개방이 있게 되며, 또한 조직이식은 신생혈관을 형성시키며 신생혈관은 혈뇌장벽이 개방될 수 있어 정상조직이식에 의한 대조군의 비교가 반드시 필요하나 지금까지의 보고에서는 모두가 대조군이 없어 그결과에 대한 신빙성이 적다. 또한, Ohnishi 등[25]의 실험에서 C6 교종의 배양액에 있는 투과도를 증가시키는

인자에 의해서 혈관내막세포가 영향을 받아서 투과도가 증가하였다고 상상하기란 상당히 무리이다. 왜냐하면 배양액에 의한 내막세포의 투과도 감소현상이 본 연구의 경우 동시배양을 하여도 적어도 수십분 또는 수시간 이상이 소요되었기 때문에 혈관내 주사를 하는 경우에 영향인자가 내막세포에 효과적인 농도로 혈중내에서 오랫동안 지속한다는 것은 거의 불가능하다. 그런데, 이종 단백질을 주사하였기 때문에 당연히 면역반응에 의한 혈전증이 발생하였을 것이며, 이러한 현상에 의해서 혈뇌장벽의 개방이 유도되어 투과도가 증가하였을 가능성이 추측된다.

악성 종양에 대한 체외 혈뇌장벽 모델에서의 투과도는 본 연구에서 분자량에 따라 $2-30\times10^{-4}$cm/min으로 상기한 체내 모델의 투과도와 비교하여 1 100배의 수치를 보여 정상 성상세포를 동시배양한 체외모델과 체내모델의 투과도 차이와 비슷한 결과를 보였다(Fig. 10). 본연구에서 양성 성상세포종을 동시배양한 모델에서는 정상 성상세포를 동시배양한 경우에 비해서 60%의 투과도 증가를 보였으며, 교모세포종을 동시배양할 때에는 정상 성상세포를 동시배양할 경우보다 혈관내막세포층의 투과도가 240%까지 증가하였다. 또한, 정상 성상세포, 양성 성상세포종, 그리고 악성 교모세포종을 배양한 배양액을 0.4u 크기의 필터로 걸러내고 나서 이를 이용하여 혈관내막세포를 배양한 경우에도 정상 성상세포 배양액을 사용한 경우보다 양성 성상세포종 배양액을 이용항 경우와 교모세포종 배양액을 이용한 경우에서 혈관 내막세포층의 투과도는 각각 36%, 131%가 증가하였다. 모든 동시 배양모델은 0.4u 크기의 공막에 의해서 분리된 공막 분리법에 의해서 이루어졌기 때문에 이로서 각세포에서 방출하는 수용성 물질이 공막을 통과하여 혈관내막세포에 작용하여 투과도가 증가한 결과로 추정할 수 있었다. 따라서 지금까지 추측되었던 종양세포의 영향인자에 의해서 양성보다 악성에서 투과도가 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 혈관 내막세포 단독배양보다 양성 교종세포 동시배양에서 투과도가 오히려 감소한다는 사실에서 종양세포에서 지금까지 추측되었듯이 투과도 증가 인자만이 방출되는 것은 아니며, 투과도를 감소시키는 알려지지 않은 인자가 같이 방출되며, 악성종양 세포동시배양에서 양성종양 세포 동시배양이나 내막세포 단독배양과 비교하여 투과도가 월등히 높은 것으로 보아 투과도의 증가 인자와 감소인자의 비율에 의해서 투과도가 결정될 것으로 추측된다. 앞으로 이러한 혈뇌장벽 모델을 이용하여 악성 뇌종양에서 투과도에 관계가 있을 것으로 추측되고 있는 여러 인자의 효과를 투과도의 관점에서 확인할 수 있을 것으로 기대한다.

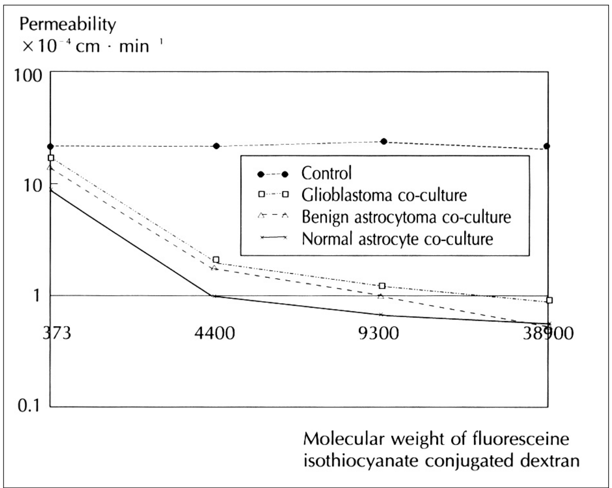

Fig. 10. Graph showing permeability ratios according to various molecular weight of fluorescein sodium and fluorescein isothiocyanate conjugated dextran in each model. More malignant co-cultured cell is, higher permeability co-cultured model system shows especially in small molecular weight molecules.

결 론

본 신경외과교실에서는 혈관내막세포를 단일층으로 배양하여 구축한 체외 혈뇌장벽 모델을 이용하여 공막분리 동시배양법으로 정상 성상세포, 양성 성상세포종 세포, 그리고 교모세포종 세포를 동시배양하였을 때 체외 혈뇌장벽의 투과도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 혈관내막세포와 교모세포종을 동시배양할 때에는 정상 성상세포를 동시배양할 경우보다 혈관내막세포층의 투과도가 240%까지 증가하였다. 또한, 정상 성상세포, 양성 성상세포종, 그리고 악성 교모세포종을 배양한 배양액을 각각 사용하여 혈관내막세포를 배양한 경우에도 정상 성상세포 배양액을 사용한 경우보다 혈관 내막세포층의 투과도가 각각 36%, 131%가 증가하였다. 모든 동시 배양모델은 0.4u 크기의 공막에 의해서 분리된 공막 분리법에 의해서 이루어졌기 때문에 이로서 각세포에서 방출하는 수용성 물질에 의해서 혈관 내막세포의 투과도가 증가한 결과로 추정할 수 있었다.

2) 내막세포의 전기저항은 정상 성상세포, 양성 성상세포종, 또는 교모세포종 동시배양 모델에서 비교할 때 악성도에 따라 감소하였으며, 투과도와 통계적으로 반비례하였다 ($R2=0.94$).

결국, 악성뇌 종양에서 동반되는 뇌부종은 종양에서 분비되는 수용성 물질에 의한 혈뇌장벽의 투과도 증가가 뇌부종의 기전에 기여할 것이라는 증거를 제시하였으며, 앞으로 이러한 모델을 이용하여 투과도 증가의 요인분석에 중요한

단서를 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

• 논문접수일 : 1997년 7월 9일
• 심사완료일 : 1997년 8월 25일
• 교신저자 : 윤 수 한
442 - 380 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지
아주대학교병원 신경외과학교실
전화 : 0331) 219 - 5664, 전송 : 0331) 219 - 6658

References

1) 윤수한 조기홍 조경기 안영민 안영환 : 정상 성상세포와 혈관내막세포를 공막 분리 동시배양으로 구축한 체외 혈뇌장벽 모델. 대한신경외과학회지 *26 : 617-624, 1997*
2) 윤수한 조기홍 조경기 안영민 안영환 : 미세투석법을 이용한 만니톨 유발 혈뇌장벽개방의 실시간 측정. 대한신경외과학회지 *25 : 1761-1767, 1996*
3) 윤수한 조기홍 조경기 안영민 안영환 : 만니톨 투여에 의한 혈뇌장벽의 개방은 *all-or-none phenomenon*인가? 대한신경외과학회지 *25 : 1768-1771, 1996*
4) 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*
5) Baba T, Chio CC, Black KL : *The effect of 5-lipoxygenase inhibition on blood-brain barrier permeability in experimental brain tumors. J Neurosurg 77 : 403-406, 1992*
6) Brooks DJ, Beaney RP, Lammertsma AA, Leenders KL, Horlock PL, Kensett MJ, Thomas DG, Jones T : *Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability using Rubidium-82 and positron emission tomography. J Cereb Blood Flow Metab 4 : 535-545, 1984*
7) Bruce JW, Criscuolo GR, Merrill MJ : *Vascular permeability induced by a protein of malignant brain tumors : Inhibition by dexamethasone. J Neurosurg 67 : 880-884, 1987*
8) Coomber BL, Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF : *Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels : structural basis of blood-brain barrier defect. J Neuro- Oncol 5 : 299-307, 1987*
9) Crone C : *The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the the "indicator diffusion" method. Acta Physiol Scand 58 : 292-301, 1963*
10) DeBault LE, Cancilla PA : *γ-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells in vitro. Science 207 : 653-655, 1980*
11) Dehouck B, Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R : *Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : Intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. J Cell Biol 126 : 465-473, 1994*
12) Dehouck MP, Pascale JR, Bree F, Fruchart JC, Cecchelli R, Tillement JP : *Drug transfer across the blood-brain barrier : Correlation between in vitro and in vivo models. J Neurochem 58 : 1790-1797, 1992*
13) Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R : *An easier, reproducible and mass-production method to study the blood-brain barrrier in vitro. J Neurochem 54 : 1798-1801, 1990*
14) Del Maestro RF : *An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand Suppl 492 : 153-168, 1980*
15) Farrell CL, Stewart PA, Del Maestro RF : *A new rat glioma model in rat : The C6 spheroid implantation technique, permeability and vascular characterization. J Neurooncol 4 : 403-415, 1987*
16) Fontana A, Hengartner H, de Tribolet N : *Glioblastoma cells release interleukin-1 and factors inhibiting interleukin-2-mediated effects. J Immunol 132 : 1837-1844, 1984*
17) Fontana A, Kristensen F, Dubs R : *Production of prostaglandin E and an interleukin-1-like factor by cultured astrocyte and C6 glioma cells. J Immunol 129 : 2413-2419, 1982*
18) 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*
19) Lauro GM, Di Lorenzo N, Grossi M : *Prostaglandin E2 as an immunomodulating factor released in vitro by human glioma cells. Acta Neulopathol 69 : 278-282, 1986*
20) Maiuri F, Gangem M, Cirillo S : *Cerebral edema associated with meningiomas. Surg Neurol 27 : 64-68, 1987*
21) Merchant RE, McVicar DW, Merchant LH, Young HF : *Treatment of recurrent malignant glioma by repeated intracerebral injections of human recombinant interleukin-2 alone or in combination with systemic interferon-alpha. Results of a phase I clinical trial. J Neurooncol 12 : 75-83, 1992*
22) Milton SG, Knutson VP : *Comparison of the function of the tight junction of endothelial cells and epithelial cells in regulating the movement of electrolytes and macromolecules across the cell monolayer. J Cell Physiol 144 : 498-504, 1990*
23) Nakagawa H, Groothuis DR, Owens ES, Fenstermacher JD, Patlak CS, Blasberg RG : *Dexamethasone effects on [^{125}I]albumin distribution in experimental RG-2 Gliomas and adjacent brain. J Cereb Blood Flow Metab 7 : 687-701, 1987*
24) Odonnell ME, Martinez A, Sun D : *Cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransport : regulation by astrocyte-conditioned medium. Am J Physiol 268 : C747-C754, 1995*
25) Ohnishi T, Shapiro WR : *Vascular permeability factors produced by brain tumors : Possible role in peritumoral edema. (Abstract) J Neurooncol 5 : 179, 1987*
26) Ohno K, Fredricks WR, Rapoport SI : *Osmotic opening of the blood-brain barrier to methotrexate in the rat. Surg Neurol 12 : 323-328, 1979*
27) Pardridge WM, Triguero D, Yang J, Cancilla PA : *Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 253 : 884-891, 1990*
28) Raeissi S, Audus KL : *In-vitro characterization of blood-brain*

barrier permeability to delta sleep-inducing peptide. J Pharm Pharmacol 41 : 848-852, 1989

29) Raichle ME, Eickling JO, Straatman MG, Welch MJ, Larsen KB, Ter-Pogossian MM : *Blood-brain barrier permeability of 11C-labelled alcohols and 15O-labelled water. Am J Physiol 230 : 543-552, 1976*

30) Rapoport SI, Ohno K, Fredericks WR, Pettigrew KD : *Regional cerebrovascular permeability to [14C] sucrose after osmotic opening of the blood-brain barrier. Brain Res 150 : 653-657, 1978*

31) 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*

32) Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw W, Manning K, Morales J, Tanner LI, Tomaselli J, Bard F : *A cell culture model of the blood-brain barrier. J Cell Biol 115 : 1725-1735, 1991*

33) Shi F, Audus KL : *Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. Neurochem Res 19 : 427-433, 1994*

34) Sill HW, Butler C, Hollis TM : *Albumin permeability and electrical resistance as means of assessing endothelial monolayer integrity in vitro. J Tissue Cult Methods 14 : 253-258, 1992*

35) Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL : *A quanttative study of microvessel ultrastructure in human peritumoral brain tissue. J Neurosurg 67 : 697-705, 1987*

36) Stewart PA, Hayakawa K, Hayakawa E : *A quanttative study of blood brain barrier permeability ultrastructure in a new rat glioma model. Acta Neuropathol(Berl) 67 : 96-102, 1985*

37) Tao-Cheng JW, Nagy Z, Brightman MW : *Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. J Neurosci 7 : 3293-3299, 1987*

38) Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY : *Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines : induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. J Neurosurg 82 : 864-873, 1995*

39) Werns SW, Lucchesi BR : *Leukocytes, oxygen radicals and myocardial injury due to ischemia and reperfusion. Free Radic Biol Med 4 : 31-37, 1987*

40) Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krau B, Schmid EM, Ocalan M, Farrelll C, Risau W : *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*

41) Ziylian YZ, Robinson PJ, Rapoport SI : *Blood-brain barrier permeability to sucrose and dextran after osmotic opening. Am J Physiol 247 : R634-R638, 1984*