물리적 환경과 자극조건 변화에 따른 혈관내피세포의 운동성과 분극화에 대한 연구

Physical modulation of cell motility and polarization of vascular endothelial cells

*송석현 [1], 이우택 [1], 고웅현 [1], 김현유 [1], 심재훈 [1], 한희섭 [1], #신현정 [1]
*S. H. Song[1], W. T. Lee[1], U. H. Ko[1], H. Y. Kim[1], J. H. Sim[1], H. S. Han[1], #J. H. Shin (j_shin@kaist.ac.kr)[1]
[1] 한국과학기술원 기계공학과

Key words : stiffness modulation, shear stress, vascular endothelial cell, cell motility, temporal gradient

1. 서론

혈관내피세포(Vascular endothelial cell)는 혈관내벽을 감싸고 있는 단일세포층으로 혈액과 조직을 분리하는 기능을 수행한다. 이 세포들은 혈액의 유동에 의한 전단응력과 정수압, 그리고 혈관의 팽창에 따른 주기적인 인장력 등 다양한 기계적인 자극에 노출되어 있다. 이런 기계적 자극의 변화는 심혈관계 질환의 발병에 깊은 연관이 있으며, 특히 전단응력의 이상 현상은 죽상동맥경화(atherosclerosis)를 유발하는 요인 중 하나라고 알려져 있다 [1,2].

상대적으로 낮은 전단응력이 일정하게 가해지는 정맥에서와는 대조적으로, 동맥에서는 심장으로부터 전달되는 맥동성의 혈류에 의해 평균 전단응력이 높고 시간에 따라 빠르게 변화하는 혈류 특성을 가진다. 죽상동맥경화와 같은 심혈관계 질환은 이렇게 동적 전단응력이 가해지는 동맥에서 주로 발생하며 [3], 유동이 시간에 따라 일정한 유동환경과 비교하여 맥동성이 있는 유동환경에서 세포의 모양과 정렬상태, 세포의 운동성, 세포 내골격과 이와 관련된 연결단백질에 다른 양상의 변화가 나타난다고 알려져 있다 [4,5]. 이렇게 시간에 따른 전단응력의 변화는 시간에 따라 일정한 형태와는 서로 다른 자극으로 인식된다는 것을 알 수 있다.

일반적으로 기계공학에서는 시간에 따라 변화하는 입력과 출력의 관계를 파악하기 위해서 복잡한 입력을 임펄스입력, 계단입력, 경사입력으로 단순화하여 해석한다. 기존 연구들에서도 이런 단순화된 입력에 따라 나타나는 세포의 분열속도 변화와 그와 관련 신호전달경로 해석과 함께 심혈관계 질환유전자의 발현 등 짧은 시간에 일어나는 세포의 생화학적 반응에 대해 보고된 바가 있다 [6-8].

본 연구에서는 혈관 내부의 상처치유에 중요한 역할 [9]을 한다고 알려져 있는 세포의 운동성에 집중하여 급격하게 변화하는 전단응력의 형태에 따라 나타나는 세포의 반응을 확인하고자 한다. 이를 위하여 임펄스입력, 계단입력, 그리고 경사입력의 초기 전단응력 패턴에 따른 세포의 운동성을 측정하였다. 또한 죽상동맥경화를 비롯한 혈관의 여러 질병현상에서는 혈관을 이루고 있는 근육층의 강성의 변화로 혈관내피세포가 물리적인 자극을 받을 수 있으며, stent 와 같이 질병에 의해 좁아진 혈관을 확장시키는 시술에 사용되는 구조체와 조직간의 물성 차이로 인한 물리적인 자극이 야기 될 수 있다. 따라서 이러한 물리적 환경의 변화가 세포의 운동성과 같은 기능 조절에 어떠한 영향을 주는지에 대해 연구 하였다.

본 연구의 결과는 혈관성형술(angioplasty)로 인한 전단응력의 패턴의 변화와 혈관세포가 노출되는 환경의 강성 변화에 따른 세포의 기능적 특성을 밝힘으로 stent 의 설계 및 시술방법에 올바른 방향을 제시할 수 있을 것이며, 이를 통해 혈관에 삽입된 구조물과 혈관 조직의 효과적인 융합을 유도하는데 활용될 수 있을 것이라 기대한다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 세포배양

동적 전단응력 실험에 사용된 Human aortic endothelial cells (HAEC, Lonza, USA)은 Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM-2, Lonza, USA) 배양액에서 배양했다.

2.2 세포 전단응력장비

세포에 원하는 전단응력을 가하면서 실시간으로 세포의 위치와 모양을 살펴보기 위해 Fig. 1 과 같은 유동 순환형 전단응력 장비를 개발했다. 세포배양 챔버는 직사각형의 단면(4×0.3mm)을 가지는 평행판 유동챔버 (parallel plate flow chamber)의 형태를 기본으로 한다. 이 채널은 공급되는 유량에 따라 바닥에 위치한 세포에 아래와 같은 전단응력이 가해지도록 설계되었다.

$$\tau\left[\mathrm{dyne/cm^2}\right] = 3.131\ Q\ \left[\mathrm{ml/min}\right]$$

맥동성이 있는 연동펌프의 출력을 시간에 따라 안정된 유동으로 만들기 위해서 유동완충기(damper)를 사용했다. 세포 배양에 필요한 기본적인 조건을 제공하기 위해 항온수조로 온도를 제어하고, 가습 된 5% CO_2 를 지속적으로 공급하여 pH 를 조절한다.

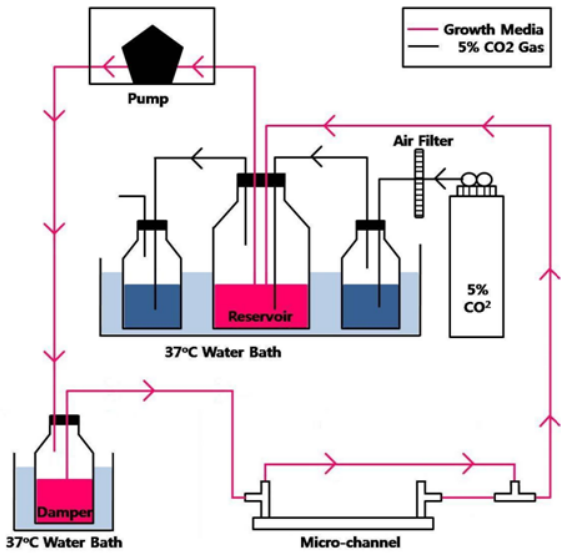

Fig. 1 Shear flow system; Cells are plated on the micro-channel. Cell culture media is circulated at desired flow rate. Damper helps to make flow stable. Water bath and 5% CO_2 are essential for the cell culture condition.

2.3 세포외기질의 물리적 강성변화

세포가 자라는 바닥은 4 가지 다른 강성을 갖는 PDMS 를 이용했다. Sylgard 184 cross-linker agent 와 PDMS Sylgard 184 base 의 비율을 다르게 하여 강성을 조절하였으며, 1:10 (1.5 MPa), 1:20 (750 kPa), 1:30 (80 kPa) 그리고 1:50 (10 kPa)을 실험에 사용했다 [10]. 제작한 바닥은 70% 에탄올에 넣어 UV 아래에서 1 시간 소독했으며, 세포의 부착을 위해 세포외기질 성분인 fibronectin (Sigma-Aldrich, USA)을 10 μg/ml 의

농도로 실온에서 30 분 동안 코팅하여 사용했다. 세포는 2.5×10^4 개/cm^2 의 농도로 배양한 후 실험을 진행했다.

2.4 동적 전단응력의 종류

세포에 가해지는 전단응력의 급격한 변화는 Fig. 2 에 나타낸 것처럼 임펄스, 계단, 경사 입력의 형태를 가진다. 자극의 최대 크기는 15dyne/cm^2 의 전단응력으로 모두 동일한 값을 가진다. 이 때, 세포에 가해지는 초기 전단응력의 변화 형태에 따라 나타나는 세포 움직임의 변화를 12 시간 동안 측정한다.

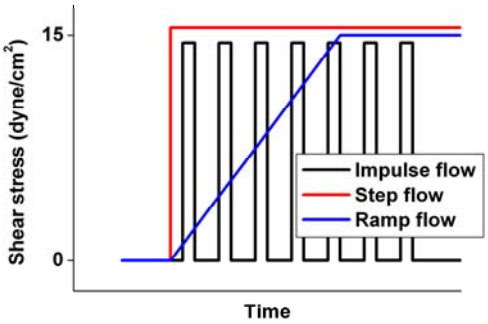

Fig. 2 Example of dynamic shear stress pattern; Cells are adapted for 24 hour in steady shear stress conditions. Applied shear stress is changed for short period, and then recovered.

2.5 세포 이미징 및 세포 운동성 해석

세포의 움직임을 측정하기 위해서 Zeiss inverted microscope system(Carl Zeiss, Inc., Germany)을 사용했다. 세포의 형상은 20 분마다 위상차 이미지 (phase contrast image)를 통해 얻었으며, 시간에 따른 세포의 위치는 ImageJ software (NIH)를 이용하여 측정했다.

3. 실험결과

바닥의 강성에 따른 세포의 움직임은 Fig. 3 에 나타난 것처럼 biphasic 한 반응을 보인다. 세포의 운동성은 세포의 부착과 탈착에 관련된 GTPase 단백질(Cdc42, Rac1, RhoA)의 균형이 중요하며 부착과 탈착이 dynamic 하게 이루어질 수 있도록 최적화된 부착력이 요구되는데 강성이 너무 낮거나 높은 곳에서는 이러한 부착과 탈착의 균형이 맞지 않아 운동성이 낮아지는 것으로 보인다

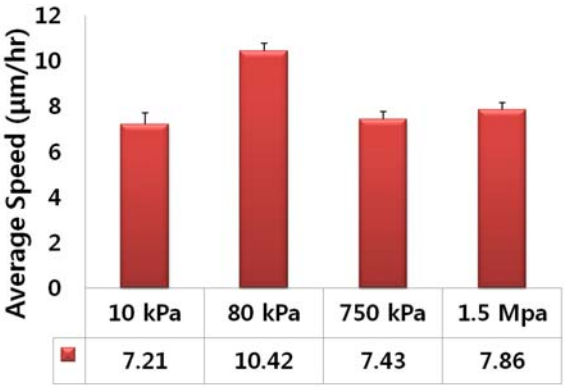

Fig. 3 Effect of substrate stiffness on average speed of cells; the optimal stiffness condition exists for maximum cell motility.

4. 결론 및 논의

본 연구에서 세포가 자라는 바닥의 강성이라는 물리적 환경에 따라 세포의 이동속도가 달라지고, 그에 따라 최적인 조건이 존재함을 알 수 있었다. 2001 년 Cox 는 강성이 아닌 세포부착에 관련된 세포외 기질 단백질의 농도로 부착력을 달리해서 실험한 결과에 따르면 부착관련 단백질의 농도가 높아질 수록 RhoA 의 발현은 높아지고 이는 Rac 과 cdc42 와 같은 세포의 분극화(polarization)와 lamellipodium 형성에 관련된 인자들의 발현을 억제하는 메커니즘을 제안한 바 있다[11].

본 연구에서는 세포외기질의 강성의 증가가 부착단백질 발현의 증가와 밀접한 관련이 있음을 밝히고 강성의 변화에 따른 biphasic 한 운동성 반응이 Rho GTPase 단백질 발현의 차이에 의존할 수 있다는 가설 하에 연구를 진행하고 있다. 이러한 물리적 강성 외에도 초기 전단응력 변화의 조건에 따른 세포의 운동성과 그에 따른 분극화 차이도 함께 연구하고 있다.

참고문헌

1. Ohashi, T., and Sato, M., "Remodeling of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress: Experimental and numerical approach," Fluid Dyn. Res., 37(1-2), 40~59, 2005.
2. Chien, S., "Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall," Prog. Biophys. Mol. Biol., 83(2), 131~151, 2003.
3. Gibson, C. M., Diaz, L., Kandarpa, K., Sacks, F. M., Pasternak, R. C., Sandor, T., Feldman, C., and Stone, P. H., "Relation of vessel wall shear stress to atherosclerosis progression in human coronary arteries," Arterioscler. Thromb., 13, 310~315, 1993.
4. Hsiai, T. K., Cho, S. K., Honda, H. M., Hama, S., Navab, M., Demer, L. L., Ho, C. M., "Endothelial cell dynamics under pulsating flows: significance of high versus low shear stress slew rates (d(tau)/dt)," Ann. Biomed. Eng., 30(5), 646~656, 2002.
5. Blackman, B. R., Garcia-Cardena, G., Gimbrone, M. A. Jr., "A new in vitro model to evaluate differential responses of endothelial cells to simulated arterial shear stress waveforms," J. Biomech. Eng., 124(4), 397~407, 2002.
6. Bao, X., Lu, C., Frangos, J. A., "Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1," Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19(4), 996~1003, 1999.
7. White, C. R., Haidekker, M., Bao, X., Frangos, J. A., "Temporal gradients in shear, but not spatial gradients, stimulate endothelial cell proliferation," Circulation, 103(20), 2508~2513, 2001.
8. Bao, X., Lu, C., Frangos, J. A., "Mechanism of temporal gradients in shear-induced ERK1/2 activation and proliferation in endothelial cells," Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 281(1), H22~H29, 2001.
9. Chien, S., "Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall," Prog. Biophys. Mol. Biol., 83(2), 131~151, 2003.
10. Brown, X. Q., Ookawa, K., Wong, J. Y., "Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologicallyrelevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response," Biomaterials, 26, 3123~3129, 2005.
11. Cox, E. A., Sastry, S. K., Huttenlocher, A., "Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases," Mol. Biol. Cell. 12(2), 265~277, 2001.