

배양중 심장내피 세포에 미치는 Hydrocortisone의 영향

정태은*·박이태*·한승세*·이웅창*

— Abstract —

Effects of Hydrocortisone on Cardiac Endothelial Cells in Vitro

Tae Eun Jung, M.D.*, Yee Tae Park, M.D.*,
Sung Sae Han, M.D.*, Yung Chang Lee, Ph.D.**

To investigate the effects of hydrocortisone on new-born rat cardiac endothelial cells in culture, the endothelial cells were isolated by means of enzyme-cocktail method. The cells were cultivated in Lee's modified Dulbecco's medium and 10^{-6} M or 10^{-4} M of hydrocortisone was added to the medium. The cells were harvested or cover-glass and processed for thiamine pyrophosphatase reaction and Feulgen reaction. The enzymatic activities of Golgi complex, number of cells and number of large nucleated(more than tetraploid) cells were counted and discussed for their significance.

The results were summarized as follows;

1. Hydrocortisone seemed to accelerate the rate of recovery of cardiac endothelial cells from isolation damage.
2. Endothelial cells treated with hydrocortisone revealed strong positive reaction to thiamine pyrophosphatase in early culture and 10^{-4} M group had stronger reaction than that of 10^{-6} M group.
3. Hydrocortisone had inhibiting effects on endothelial proliferation and the higher the concentration of the reagent were the stronger effects.
4. Hydrocortisone inhibited the appearance of large nucleate cells in endothelial cell population.
5. Hydrocortisone seemed to suppress the nuclear DNA synthesis.

서론

내피세포는 순환계장기의 전내면을 덮고 있으면서 혈장과 조직액 사이의 선택적투과 및 확산 장벽을 이

루고 광범위한 분자들의 양극이동과 많은 물질들의 생산에 적합하도록 고도로 분화되어있다. 심장내피 세포는 일부장기의 그것과는 달리 연속내피를 형성하고 비교적 얇은 기저판 위에 놓여있다.

내피세포는 물질 이동장벽으로서의 기능 이외에도 중요한 물질들을 생산하는 기능이 있다. 혈관활성물질, 혈액응고물질, 혈액항응고물질, 혈액군 항원, collagen, fibronectin, elastin 및 glycosaminoglycan 등이 그것이며 이들 물질의 생산은 유기체의 내외환경 요소의 변화에 대해 아주 민감한 반응을 보이고 있다.

* 영남대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Yeungnam University Hospital, Taegu, Korea.

** 영남대학교 의과대학 해부학교실

** Department of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea.

1988년 12월 3일 접수

최근 내피세포를 분리하고 배양, 동정하는 기술이 발달됨으로써 내피세포의 성장, 증식 및 기능을 이해하는데 많은 진전이 이루어지고 있다.

Booyse등¹⁾, Brendel등²⁾ 및 Duthu와 Smith는³⁾ 소의 대동맥 내피세포를 분리 배양하였고 Hayes등과⁴⁾ Slater와 Sloan은⁵⁾ 돼지의 대동맥내피세포의 생성물질을 조사하였고 Maciag등⁶⁾, Jahnson은⁸⁾ 사람의 폐대정맥 내피세포 및 폐동정맥 내피세포를 분리하여 이 세포들을 장·단기 배양하는 방법을 연구하였다.

내피세포는 동물의 종류에 관계없이 태생초기에 분화를 시작하여 다른 세포에 비해 비교적 일찍 분화가 끝나며 그후에도 계속해서 분열활동을 계속한다. 이렇게 분화와 분열기능을 동시에 갖추고 있는 것이 이들 세포가 많은 연구의 대상이 되는 이유중의 하나이다.

Hydrocortisone은 배양중 각막내피세포의 생존을 증진, 미세구조보존 및 생리적 기능의 유지에 유리하며⁹⁾ 각막을 보존할때 hydrocortisone을 첨가하면 온도변화에 대한 특성이 호전된다고 한다¹⁰⁾. 또한 hydrocortisone에 의해 세포의 분화와 성숙에 중요한 역할을 하는 transglutaminase의 역할이 항진된다는 보고도 있으며¹¹⁾ Obinata등은¹²⁾ 표피세포에서 hydrocortisone이 구조단백의 양을 증가시킨다고 하였다.

한편 Charap은¹³⁾ hydrocortisone이 단백질 합성과 Collagen 축적을 방해한다고 주장하여 Obinata등¹²⁾과는 반대 이론을 전개하고 있다.

저자는 백서심장내피세포를 분리배양하면서 hydrocortisone을 배양액에 첨가함으로써 이 약제가 내피세포에 미치는 효과를 검사하기 위하여 약제 투입후에 일어나는 세포분열 정도의 변화와, 세포내 생산물질의 조립 및 hydrocortisone에 민감한 효소체의 생성에 밀접한 관계가 있는 Golgi 복합체의 상태를 세포화학적 방법으로 조사 하였다.

재료 및 방법

1. 용 액

1. P.B.S.; NaCl-6.9g
KCl-0.4g
NaHPO₄-0.21g
NaHPO₄ H₂O-0.068g
Glucose-12.6g

을 증류수에 섞어서 1000ml을 만들었다.

2. Trypsin: 0.125% in P.B.S.(Gibco 사제)
3. Collagenase: 0.1% in P.B.S.(Gibco 사제)
4. Hydrocortisone: 하이드로 코티손 나트륨 호박산염 10⁻⁶ & 10⁻⁶M in heant medium
5. 심장배양액 : Lee's modified Dolbeco's MEM.
Distilled Water-954 ml
Earle's Salt-10 ml
L-glutamine-0.2923 g
Glycin-0.05 g
Hypoxanthine-0.0125 g
Penicilline-100.000 U
Streptomycine-100 mg
MEM 100X Vitamin-10 ml
MEM 50X essential amino acid-20 ml
MEM 100X amino acid-10 ml

이 용액에서 hypoxanthine이 용해되는 데는 오랜 시간이 걸리므로 하룻밤 동안 자석봉을 이용하여 배양액을 회전시켜서 완전히 용해 시켰다. 이 용액에 sodium bicarbonate 2.2g을 첨가하여 녹였다. Osmolarity는 300±5 mosmoles를 기준으로 사용하였다.

용액을 무균상태로 만들기 위하여 lamina flow hood 안에서 여과 한 후 fetal bovine serum 100ml를 첨가 하였다. 배양액의 pH는 Earle's salt 내에 들어 있는 phenol red의 색깔로 측정하였으며 pH가 높을 때는 사용전에 CO₂ 가스를 불어 넣어 pH를 7.3~7.4에 맞추었다.

II. 실험동물 및 세포

생후 72 시간제의 Sprague Dawley종 백서의 심장을 적출하여 세포를 분리하였으며 배양후 90분 이전에 착상하는 내피세포 만을 사용하였다.

III. 실험방법

모든 과정은 무균 조작을 하였다. 백서는 머리를 잘라 희생시켰고 즉시 흉강을 열고 심장을 적출하여 준비된 4℃의 P.B.S.에 담겨 두었다. 이렇게 10마리의 심장을 모아 각각을 4배등분 하여 두번 P.B.S.에 세척하여 그속의 혈액을 씻어낸후 4℃ 0.125% trypsin액

10ml에 넣어 4℃에서 하룻밤 동안 두었다. Trypsin은 실온에서 효소 작용이 아주 강하므로 낮은 온도에 두어 효소작용을 매우 감소 시켜서 세포손상을 줄이면서 장기간 동안에 서서히 조직내로 침투시켜 세포 결합 단백질을 소화시켜서 조직을 느슨하게 하였다. 다음날 trypsin용액을 제거 하였다. 여기에 10ml의 37℃로 유지된 shaking incubator에서 60회/분의 회수로 10분간 진탕하였다.

첫번째 상층액은 버리고 다시 10ml의 37℃ collagenase를 가하여 10분간 소화하였다. 이것의 상층액을 취하여 1000rpm에서 3분간 원심한 후 상층액을 버리고 세포 덩어리에 4℃ P.B.S. 10ml를 첨가하여 잘 섞은후 원심하여 상층액은 버리고 4℃ P.B.S. 5ml를 첨가하여 혼든후 얼음위에 저장하였다. 이러한 일련의 조작을 4회 반복하여 심장 세포가 포함된 P.B.S. 20ml를 얻었다. 이용액을 원심하여 P.B.S.은 버리고 4℃ 배양액 10ml를 첨가하여 잘 섞은후 일부를 뽑아내어 위상차 현미경하에서 살아있는 세포수를 측정하였는데 살아있는 세포를 죽은 세포와 구분하는 방법은 0.1% trypan blue로 염색하여 염색이 되면 죽은세포이고 염색이 되지 않으면 살아 있는 세포로 간주하였다. 이렇게 살아있는 세포의 숫자를 알고나서 세포가 들어있는 배양액을 원심하여 상층액을 버리고 세포덩어리에 37℃ 배양액을 섞어 세포수가 3×10^5 개/ml가 되도록 희석하였다.

Microcoverglass가 담긴 직경 90mm 평판 접시에 희석된 세포들을 10ml씩 옮겨서 37℃ 5% CO₂ 배양기에 90분간 배양하였다. 90분이 지나면 심장내피세포는 microcoverglass에 부착되나 심근세포와 죽은세포는 배양액에 떠 있게 된다. 따라서 평판접시의 상층액을 제거하고 새로운 배양액 10ml를 첨가하여 계속 배양하였다. 새로운 배양액은 hydrocortisone이 포함되어 지 않은 control과 10^{-4} M과 10^{-6} M의 hydrocortisone이 포함된 세 종류의 배양액을 각각의 평판접시에 따로 따로 첨가하였으며 배양액은 이틀마다 교환하였는데 hydrocortisone은 용액에 녹히면 3일후에는 효과가 없는걸로 알려져 있어 배양액을 교환할때 마차 새로 만들어 투여하였다. 배양후 1일째부터 세포화학 염색을 시행하여 배양이 진행되는 첫주에 매일 염색하였다. 검경은 배양중에 도립 현미경으로 하였고 염색표본은 Olympus BH-2 위상차 현미경과 Olympus BH-2 투과 현미경으로 관찰하였고 100배 및 400배의 배율에서 35 mm 사진기로 기록하였다. Golgi의 관찰은 표지효소

인 thiamine pyrophosphatase을 염색하여 보았고, DNA 염색은 Feulgen반응으로 관찰하였다.

IV. 세포화학과정

배양중의 microcoverglass가 배양액에서 나오면 먼저 생리 식염수로 세척하였고 고정은 10% formol calcium으로 행하였으며 이후의 세척 조작은 증류수로 하였고 mounting시 thiamine pyrophosphatase는 phosphate buffed glycerin gelly로, Feulgen reaction은 Canada balsam을 사용하였다.

1. Thiamine pyrophosphatase

- 1) 세척
- 2) 10% formol calcium에 고정
- 3) 세척
- 4) 37℃ incubation medium에 1시간 30분 방치
- 5) 세척
- 6) 1% ammonium sulfide yellow 용액에 1분간 방치

7) 세척

8) mount

incubation medium은 50mg thiamine pyrophosphate chloride를 증류수 7ml에 녹인후 맹렬히 섞으면서 0.2M tris-malate buffer, PH 6.5용액 10ml와 0.025M Magnesium chloride 용액 5ml를 섞은후 1% lead nitrate 용액 3ml를 첨가하여 원심하여 상층액을 사용하였다.

2. Feulgen reaction

- 1) 세척
- 2) 실온에서 5N-HCl에 40분 방치
- 3) 세척
- 4) Schitt's 용액에 10분간 방치
- 5) 0.05M Na₂S₂O₃ 용액에 1분씩 3회 행굼 방치
- 6) 세척
- 7) 순차적 alcohol로 탈수
- 8) clear & mount

성 적

1. Thiamine Pyrophosphatase(표 1)

반응강도의 척도로서 다음과 같이 표시하였다.

± : 미약한 양성반응

+ : 강한 양성반응
 ++ : 아주 강한 양성반응

그 기준은 기질을 빼고 염색 반응을 본 대조군과 비교하여 반응이 겨우 눈에 띌 정도이면 ±, 반응이 핵 주위에 국한되어 강하게 나타나면 +, 세포핵 주위뿐만 아니라 세포질 전반에 강하게 나타나면 ++로 하였다.

배양후 반응의 정도는 시일이 지남에 따라 강하여졌으며 배양후 첫 3일까지는 대조군 보다도 hydrocortisone를 투여한 군에서 반응이 강하였으며 $10^{-6}M$ 군(도 1)보다도 $10^{-4}M$ (도 2)에서 더욱 강하였고 특히 $10^{-4}M$ 군에서는 1일째 보다 2일째 더욱 강해졌다가 3일째(도 3)에는 그 강도가 다소 약해짐을 볼 수 있었다. 실험 3일에는 모든 군에서 반응강도가 약하게 나타났으며 4일 이후에는 모두 강한 반응을(도 4) 나타내어 hydrocortisone 처리후 3일이 되면 모든 군에

서 hydrocortisone의 영향에서 회복되거나 적응하는 경향을 나타내었다.

2. Feulgen 반응에 의한 핵의 수와 크기의 조사

Feulgen 반응법으로 핵 DNA를 염색하고 매일 대조군과 각 실험군의 표본을 제작하고 $0.0625mm^2$ 내의 격자속에 포함되는 핵수를 세었으며 각 Slide 당 15개의 시야를 임의 선정하였다. 큰핵과 작은핵의 기준은 넓이가 $40\mu m^2$ 를 기준으로 그 이상이 될 때는 큰것으로 그 이하일 때는 작은 것으로 간주하여 그 수를 헤아리고 핵 분비를 산정하였다.

Hydrocortisone으로 처리한 후 1일째에는 대조군의 세포수가 12 인데 비해 hydrocortisone $10^{-6}M$ 처리군(이하 $10^{-6}M$ 군)은 149개, hydrocortisone $10^{-4}M$ 처리군(이하 $10^{-4}M$ 군)은 132개로 hydrocortisone 처리군에서 세포수가 대조군에 비해 증가되어 있었고 거대

Table 1. Reaction intensity of thiamine pyrophosphatase in endothelial cells after exposure to hydrocortisone

Culture in day	Group		Hydrocortisone	
	Control		$10^{-6}M$	$10^{-4}M$
1st day	±		+	±
2nd day	±		+	++
3rd day	+		+	+
4th day	++		++	++
5th day	++		++	++
6th day	++		++	++



Fig. 1. Thiamine pyrophosphatase activity of endothelial cells at $10^{-6}M$ experimental group. Note the distribution of the enzyme in the Golgi network to one side of the nucleus (arrow). 2-day culture. x 1000. Phase-contrast photomicrograph.

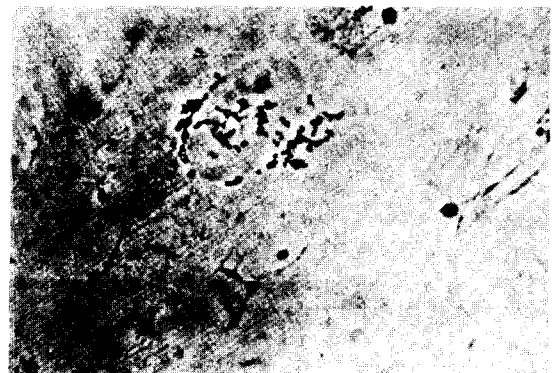


Fig. 2. Thiamine pyrophosphatase activity of endothelial cells at $10^{-4}M$ experimental group. As compared with $10^{-6}M$ experimental group, the reaction intensity increased. 2-day culture. x 1000. Phase-contrast photomicrograph.

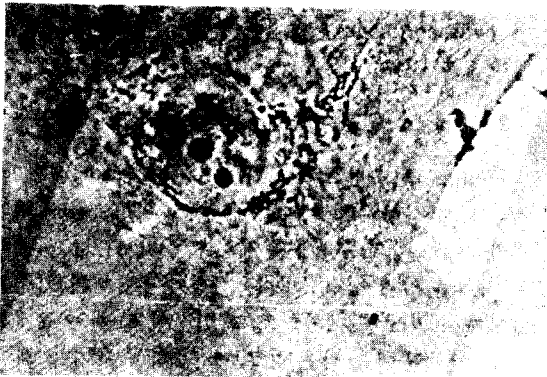


Fig. 3. Thiamine pyrophosphatase activity of endothelial cells at 10^{-4} M experimental group. Note the diminution of reaction intensity. 3-day culture. x 1000. Phase-contrast photomicrograph.

Table 2. Number of endothelial cells after exposure to hydrocortisone

Day in culture		Total	Small(%)	large(%)
1st day	control	125	124(99)	1(1)
	10^{-6} M.H.C	1549	147(98)	2(2)
	10^{-4} M.H.C	132	132(100)	0(0)
2nd day	control	240	229(9)	11(5)
	10^{-6} M.H.C	203	195(96)	8(4)
	10^{-4} M.H.C	193	186(96)	7(4)
3rd day	control	257	240(93)	17(7)
	10^{-6} M.H.C	219	210(96)	9(4)
	10^{-4} M.H.C	196	191(97)	5(3)
4th day	control	283	249(91)	34(9)
	10^{-6} M.H.C	274	259(95)	15(5)
	10^{-4} M.H.C	267	254(95)	13(5)
5th day	control	450	408(91)	42(9)
	10^{-6} M.H.C	298	280(94)	18(6)
	10^{-4} M.H.C	301	290(97)	11(3)
6th day	control	593	540(90)	3(10)
	10^{-6} M.H.C	451	429(95)	22(5)
	10^{-4} M.H.C	320	310(97)	10(3)

핵세포의 발생빈도는 미소하였다. 2일 이후에는 모든 실험군에서 세포수가 대조군보다 적어졌는데 제2일에는 대조군의 240에 비해 10^{-6} M 군은 203, 10^{-4} M 군은 193으로 격감되고 거대핵 세포수는 대조군의 11에 비해 10^{-6} M 군은 8, 10^{-4} M 군은 7개로 적어 졌으며 제

3일에는 대조군이 257이었는데 비해 10^{-6} M 군의 219, 10^{-4} M 군은 196으로 2일째의 그것과 큰 차이가 없었으며 거대핵세포는 대조군의 17보다 10^{-6} M 군은 9, 10^{-4} M 군의 로 크게 적은것을 볼 수 있었다. 제 4일에는 대조군이 283개였으며 실험군은 10^{-6} M 군이 274 개, 10^{-4} M 군이 267개로 대조군과 실험군의 세포수가 큰 차이를 나타내지는 않았으나 거대핵 세포수에서 대조군의 34개에 비해 10^{-6} M 군이 15, 10^{-4} M 군이 13개로 크게 떨어졌다. 제 5일에 이르러 대조군(도 5)은 450개로 대폭 증가하였는데 비해 10^{-6} M 군(도 6)은 298, 10^{-4} M 군은 301개로 증가 폭이 매우 낮았고 세포 수에서도 큰 차이가 있었으며 거대핵 세포수에서도 각각 42, 18 및 11개로 큰 차이를 보였다. 제 6일에서는

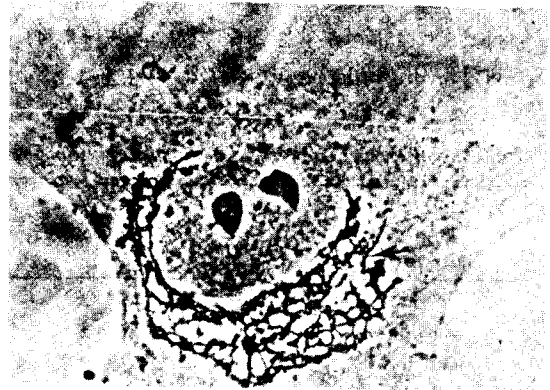


Fig. 4. Thiamine pyrophosphatase activity of endothelial cells at 10^{-6} M experimental group. Note the very strong positive reaction showing filamentous and complex structure(arrow). 5-day culture. x 1000. Phase-contrast photomicrograph.



Fig. 5. Feulgen reaction of endothelial cells at control group. 5-day culture. x 1000. Phase-contrast photomicrograph.

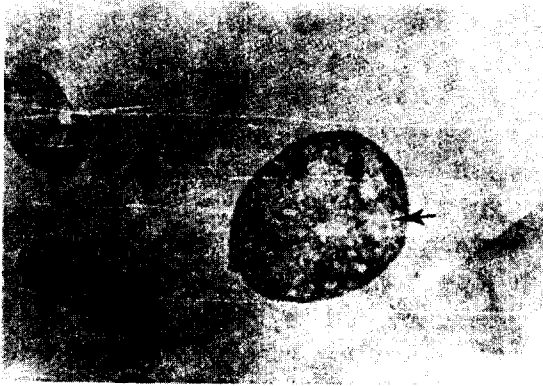


Fig. 6. Feulgen reaction of endothelial cells at 10^{-6} M experimental group. Note the large nucleus(arrow). 5-day culture. x 1000. Phase-contrast photomicrograph.

대조군이 593개인데 비해 10^{-6} M군은 451, 10^{-4} M군은 320개로 대조군에 비해 실험군의 세포수가 적었으나 10^{-4} M군에서 이외로 세포수가 증가하여 있음을 알 수 있었다. 거대핵 세포수는 대조군이 53이었고, 10^{-6} M군은 22, 10^{-4} M군은 10개 였다. 전반적으로 10^{-6} M군보다 10^{-4} M군에서 세포수, 거대핵 세포수가 더 적었다.

모든 실험군에서 세포수의 다소에 관계없이 죽은 세포는 발견되지 않았다.

고 찰

척추 동물의 내피세포는 비교적 일찍 분화되어지고 분화가 완성된 뒤에도 활발한 분열능을 유지한다. 이들이 효소복합체를 사용한 방법에 의해 잘 분리가 되고 분리과정에서도 세포파괴나 손상의 정도가 약하며 배양액의 종류에 까다롭지 않은 장점때문에 배양실험에 많이 사용되어 왔다¹⁻¹⁰⁾.

내피세포는 혈액과 조직액 사이에 존재하면서 세포 내·외의 환경요인에 민감하게 반응하고 투과, 확산의 장벽으로서 뿐만아니라 혈액 조직액간의 평행유지에 필요한 많은 물질을 생산함으로써 순환계 장기세포로서는 가장 중요한 위치에 있다. 배양중 내피세포의 기능을 연구하는데는 여러가지 방법이 있을 수 있으나 그중 세포소기관의 변천과정을 추적하는 것이 좋은 방법중의 하나일 것이다. 세포 소기관은 그 세포의 생리적 상태를 나타내는 가장 정확한 척도이며 이들 소기관 추적은 세포화학적 방법으로 가능하다¹⁴⁾. 세

포소기관중 Golgi 복합체는 원형질막, 핵막 및 내형질막의 중간에 위치하면서 이들 막성구조사이를 긴밀히 연결하고 세포내 물질의 생산, 조립 및 농축에 관여하고 분해 소체와 peroxisome의 생성, 그 효소의 합성에 긴밀한 관계를 가진다. 이 Golgi 복합체의 표지 효소인 thiamine pyrophosphatase의 반응정도를 조사함으로써 내피세포의 Golgi 복합체의 변천과정을 추적할 수가 있을 것이다.

세포의 활동 기능상태를 추적하는 또 하나의 방법은 핵속의 DNA는 세포활동의 역동적 상태를 나타내는 중요한 지표가 되는 물질이므로 이를 Feulgen 반응으로 조사함으로써 DNA의 양의 증감을 현미경하에서 관찰할 수 있고 핵의 크기를 측정하여 이 이배체, 사배체 또는 다배체의 핵을 구분할 수 있고 이 자료로 미루어 세포활동상태 추적할 수가 있다.

조직의 재생이나 치유에 대한 steroid의 역할은 잘 확립되어 있으나 이들 약제의 배양중 세포 특히 심장 내피 세포에 대한 효과에 대해서는 잘 연구되어 있지 않다. 만일 hydrocortisone 이 세포의 구조를 변경시키지 않으면서 세포증식이나 성장을 억제할 수 있다면 세포 보존제로서 사용될 수 있을 것이며 반대로 고농도의 hydrocortisone이나 다른 steroid가 심장내피세포의 대사를 억제한다면 장기이식을 위한 장기 보존액의 제작시등 임상적으로 매우 중요한 의미를 가질 것이다⁹⁾.

본 실험에서 hydrocortisone 처리를 한 뒤 내피세포를 단기배양하면서 Golgi 복합체의 표지효소인 thiamine pyrophosphatase의 반응검사를 매일 실시한 결과 대조군에서는 배양 2일까지 반응이 미약하였으나 hydrocortisone 처리군은 10^{-6} M 군과 10^{-4} M군이 모두 강한 양성반응을 나타내었고 특히 10^{-4} M군은 2일에서 아주 강한 양성반응을 보였다. 3일에는 대조군, 실험군 공히 강한 반응을 보이고 4일 이후에는 모두 강한 반응이 계속되었다. 이 현상은 내피세포가 효소분리로부터 회복되는데 약 3일이 걸리며¹³⁾ 그 기간중 hydrocortisone을 처리한 군에서 이약제의 치유효과에 의해서 10^{-6} M군과 10^{-4} M군이 강한 양성반응을 나타낸 것이 아닌가 생각된다. 그 이유는 세포가 효소분리 되면서 세포막이 손상되며 손상된 세포막의 보완과 재생에는 Golgi장치의 활성화가 필수불가결 하기 때문이다. 또한 이결과는 hydrocortisone이 표피세포 구조단백의 출현을 촉진 시킨다는 Obinata등의¹²⁾ 결과와 비교할만하다고 생각된다. 생물막이 합성되기

위해서는 단백질합성이 선행되어야 하기 때문이다. 처리 3일에 대조군과 실험군이 같이 강한 양성반응을 나타낸 것은 대조군에서는 세포분리 3일경에 효소분리에 따른 손상으로 부터 세포가 회복되었음을 가리키고 실험군에서 강한 양성반응이 나타날 것은 hydrocortisone의 치유 효과에 의한 대조군보다 빠른 회복 이후에 오는 세포 안정상태에의 예외속이 아닌가 생각되며 이는 hydrocortisone이 효소체 효소의 안정화에 기여하지 않는다는 Samples등의⁹⁾ 이론과는 거리가 있는 것으로 간주된다. 4일 이후에 대조군과 실험군이 모두 아주 강한 반응을 보인 것은 일단 안정된 세포들이 hydrocortisone의 효과에 대해 적응한 결과로 보여진다.

Feulgen 반응법으로 핵 DNA를 염색하고 세포수와 거대핵 세포수를 헤아려 대조군과 hydrocortisone 처리군을 비교하였다. 약물처리 1일후의 세포수에서 처리군의 세포수가 대조군에 비해 약간 높았으며 이는 대조군의 세포가 효소분리에 따른 손상으로 부터 회복되기 전에 실험군의 세포는 빨리 회복되고 분열상태에 있던 세포는 분열을 완성하였을 가능성을 생각할 수 있는데 대조군의 세포일부는 손상으로부터 회복하지 못하고 파괴되어 버린 결과로 간주할 수 있었다. 제2일에 대조군은 1일에 비해 거의 두배로 세포수가 증가되었으나 실험군에서는 약 505 정도만 증가하였고 대조군 보다도 세포수가 월등이 낮아졌다. 대조군의 세포는 손상으로 부터 회복은 빠르나 증식이 억제되었음을 알 수 있고 이는 단백질합성이 hydrocortisone에 의해 억제 된다고 한 Charap의¹³⁾ 이론과 상통하나 그 반대 이론을 펴 Obinata 등¹²⁾의 연구결과와는 상치되는 결과이었다. 제 3일에 이르러도 세포수는 제2일과 큰 차이가 없었으며 세포분리로부터 회복에 이르는 데 3일가량이 소요된다고 보고한 성과 이¹⁴⁾의 결과와 일치되는 것으로 생각되었다. 제 4일에는 대조군의 세포수도 증가하였으나 실험군의 세포수가 크게 증가하였고 그 증가폭은 대조군의 증가폭보다 훨씬 큰것을 볼 수 있었다. 이 현상은 세포가 손상으로 부터 회복되고 안정상태로 접어들면서 세포소기관의 안정과 함께 hydrocortisone에 대한 저항력이 형성된 것이 아닌가 생각된다. 제 5일과 6일에 대조군의 세포수는 제4일에 비해 현저히 증가되었으며 이는 제4일까지 단층막을 형성하여 세포간의 접촉억제 현상이 있었으나 중층막을 형성하기 시작하면서 접촉억제 현상이 해제된 때문이 아닌가 생각되며 실험군에서는 제 6일에 중층막이

형성되면서 접촉억제 현상이 해제된 것으로 생각된다.

전반적으로 10^{-4} M군이 10^{-6} M군보다 세포수가 더 적었으며 이것은 hydrocortisone의 단순독작용에 의한 세포증식의 억제 효과인 것으로 생각된다⁹⁾.

거대핵 세포의 출현은 제2일째부터 현저하여 졌으며 대조군에서 5%의 세포가 실험군에서는 10^{-6} M군, 10^{-4} M군 모두 4%의 세포가 거대핵을 가지고 있었으며 제3일에는 7%에 비해 실험군은 10^{-6} M군이 4%, 10^{-4} M군이 3%로 대조군에 비해 거대핵의 출현 빈도가 아주 낮았는데 이것은 hydrocortisone에 의한 DNA 복제의 억제현상의 결과가 아닌가 생각된다. 세포의 회복이 끝난 제4일부터는 대조군은 계속 9-10%의 거대핵 세포가 출현하였으나 실험군은 3-6% 선을 유지하였으며 10^{-4} M군이 10^{-6} M군보다 출현빈도가 더 낮았고 이 역시 hydrocortisone의 억제효과의 결과로 생각되었으며 생리적 농도를 증가하는 hydrocortisone의 투여는 내피세포의 초기 손상으로부터의 회복에는 도움이 되지만 단기간 배양중에 세포 증식을 억제하는 효과가 있음이 확인되었다. 다만 이러한 억제 효과가 단순한 약물의 독작용 때문인지⁹⁾, 단백질합성 촉진효과인지^{12,12)} 아니면 단백질합성 억제효과¹⁵⁾ 인가에 관한 것은 앞으로 더욱 연구해 보아야 할 과제로 생각된다.

요 약

신생백서의 심장으로부터 내피세포를 효소복합제를 이용하여 분리하고 Lee's modified Dulbelo's medium에서 배양하면서 10^{-6} M 및 10^{-4} M의 hydrocortisone을 첨가하여 이 약제에 대한 내피세포의 반응태도를 Golgi 복합체의 표지효소인 thiamine pyrophosphatase 반응 정도와 핵 DNA 염색법인 Feulgen의 반응을 이용한 세포수 산정을 통하여 조사하였다. 실험결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. Hydrocortisone은 세포분리 직후 손상회복의 촉진효과가 있었다.
2. Hydrocortisone 처리한 심장 내피세포는 배양초기에 강한 thiamine pyrophosphatase 양성반응을 나타내었고 그 정도는 10^{-4} M군이 10^{-6} M군보다 강하였다.
3. Hydrocortisone은 심장 내피세포증식에 대한 억제효과가 있었고 그 효과는 약물의 농도가 높을수록

강하였다.

4. Hydrocortisone은 내피세포군에 거대핵세포의 출현을 억제하였고 10^{-4} M군에서 더욱 강하였다.

5. Hydrocortisone은 심장내피세포의 핵 DNA 합성을 억제한다고 생각되었다.

REFERENCES

1. Booyers, F.M., Sedlak, B.J. and Rafelson, M.E. Jr: *Culture of arterial endothelial cells, Characterization and growth of bovine aortic cells. Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 825-839, 1975.*
2. Brendel, K., Meezan, E. and Carson, E.C.: *Isolated brain microvessels: a purified metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. Science, 185: 953-955, 1974.*
3. Dutho, G.S. and Smith, J.R.: *In vitro proliferation and life span of bovine aorta endothelial cells: effects of culture conditions and fibroblast growth factor, J. cell. physiol., 103: 385-392, 1980.*
4. Hayes, L.W., Goguen, C.A., Ching, S.F. and Slakey, I.L.: *Angiotensin-Converting enzyme: accumulation in medium from cultured endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., 82: 1147-1153, 1978.*
5. Salter, D.N. and Sloan, J.M.: *The porcine endothelial cell in tissue culture. Atherosclerosis, 21:259-272, 1975.*
6. Maciag, T., Hoover, G.A., Stemerman, M.B. and Weinstein, R.: *Serial prepagation of human endothelial cells in vitro, J. Cell Biol., 91:420-426, 1981.*
7. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R.: *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. J. Clin. Invest., 52:2745-2756, 1973.*
8. Johnson, A.R.: *Human pulmonary endothelial cells in culture: activities of cells from arteries and cells from veins. J. Clin. Invest. 65: 841-850, 1980.*
9. Samples, J.R., Nayak, S.K., Gualtieri, C. and Binder P.S.: *Effects of hydrocortisone on corneal endothelial cells in vitro. Exp. Eye Res., 41: 487-495, 1985.*
10. Hull, D.S., Green, K., Bowman, K. and Horu, D.L.: *Corneal endothelial cell function after storage in M-K medium and hydrocortisone, Can. J. Ophthalmol. 14:114-116, 1979.*
11. Goldman, R.: *Modulation of transglutaminase activity in mononuclear phagocytes and macrophage-like tumor cell lines by differentiation agents. Exp. Cell. Res., 168:31-48, 1987.*
12. Obinata, A., Takata, K., Kawada, H., Hirano, H. and Endo, H.: *Reversible inhibition by RMSO of hydrocortisone induced keratinization of chick embryonic skin, Exp. cell. Res., 138: 135-145, 1982.*
13. Charap, A.D.: *Corticosteroids. Biomedical Foundations of Ophthalmology. Vol. 3(Eds. Duane, T.D. and jaeger, E.A), pp. 1-39, Harper and Row, 1983.*
14. 성연기, 이용창: 배양 중 백서 심근 및 내피세포의 소기관 표시효소의 변천, 대한해부학회지, 19: 219-227, 1986.
15. Hale, T.W. and Wevzel, D.G.: *Quantitation of mitochondrial injury in cultured rat heart endothelial cells with mitroblue tetrazolium. Histochem. J. 10: 409-415, 1978.*
16. Hasilik A., Voss, B. and Frguru, K.V.: *Transport and processing of lysosomal enzymes by smooth muscle cells and endothelial cells. Exp. Cell. Res., 133:23-30, 1981.*
17. Madri, J.A. and Williams, S.K.: *Capillary endothelial cell Cultures; Phenotypic modulation by matrix components. J. Cell. Biol., 97: 13-165, 1983.*
18. Bourne, W.M., Lindstrom, R.L. and Doughman, D.J.: *Endothelial survival on transplant human corneas preserved by orga culture with 1.35% chondroitin sulfate. Am. J. Ophthalmol., 100: 781-793, 1985.*
19. Mulcallum, D.K., Lillic, J.H., Scaletta, L.J., Occhinom, K.C., Frederick, W.C. and Ledbetter, S.R.: *Bovine Corneal endothelium in vitro: Elaboration and organization of a basement membrane Exp. Cell, Res., 139: 1-13, 1982.*
20. Zimmerman, M. and Mcgeachie, J.: *The effect of nicotine on aortic endothelial cell turnover: an antoradiographic study, Artherosclerosis, 58: 39-47, 1985.*
21. Faris, B., Mozzicato, P., Mogagzel, P.J., Ferrera, R., Gerstenfeld, L.C., Glemboartt, M., Makarski, J.S., JR, Havidenschild, C.C. and Franzblaw, C.: *Effect of protein-hydroxyethylmenthacrylate hyd-*

- rogels on cultured endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*, 143: 15-25, 1983.
22. Schleef, R.R. and Birdwell, C.R.; *The effect of proteases on endothelial cell migration in vitro*; *Exp. Cell. Res.* 141, 1980.
 23. Wang, Z.W., Irimura, I., Nakajima, M., Belloni, D.N. and Nicolson, G.L.; *Characterization of extracellular matrix-associated glycosaminoglycans produced by untransformed and transformed bovine corneal endothelial cells in culture* *Eur. J. Biochem.*, 153: 125-130, 1985.
 24. Miyazono, K., Okabe, T., Ishihashi, S., Urabe, A. and Takaku, F.; *A platelet factor stimulating the proliferation of vascular endothelial cells: partial purification and characterization*. *Exp. Cell. Res.*, 159: 489-494, 1985.
 25. Vischer P. and Baddecke, E.: *Alteration by glycosyltransferase activities during proliferation of cultured arterial endothelial cells and smooth muscle cells*, *Exp. Cell. Res.* 156: 15-28, 1985.
 26. Antorov, A.S., Nikolaeva, M.A., Ronanov, Y.A., Babaev, V.R., Bystrevskaya, V.B., Peror, N.A., Re-pin, V.S. and Smiraor, V.N.; *Primary culture of endothelial cells from arteriosclerotic human aorta; Identification. morphological and ultrastructural characteristics of two endothelial cell subpopulations*, *Artherosclerosis*. 59: 1-19, 1986.
 27. Meyrick, B.: *Endotoxin-mediated Pulmonary endothelial cell injury*, *Federation Proc.*, 49: 19-24, 1986.
 28. Kramer, R.H. and Fuh, G.M.: *Type IV Collagen Synthesis by cultured human microvascular endothelial cells and its deposition into the subendothelial basement membrane*. *Biochemistry*, 24: 7423-7430, 1985.
 29. Sandra, A., Bar, R.S., Dolasm, S., Marshall, S.J., Kaduce, T.L. and Specter A.A.: *Morphological alterations in cultured endothelial cells induced by arachidonic acid*. *Exp. Cell. Res.*, 158: 484-492, 198.
 30. Orledge, A. and D'Amore, D.A.: *Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells*. *J. Cell. Biol.*, 105: 1455-1461, 1987.