

※그림 1, 4번은 칼라인지 흑백인지 확인부탁드립니다.

한국전자현미경학회지 제 35 권 제 4호 2005
Korean J. Electron Microscopy 35(4), 00~00(2005)

쥐의 뇌 미세혈관 내피세포를 이용한 뇌혈관장벽 내피세포의 배양과 특성

이희상, 김석중, 김대진, 정윤희, 김성수, 이원복, 김정용*
중앙대학교 의과대학 해부학교실

Primary Culture and Characteristics of Blood-Brain Barrier Endothelial Cells from Rat Brain Microvessel

Hee-Sang Lee, Seok-Jung Kim, Dae-Jin Kim, Yoon-Hee Chung,
Sung-Su Kim, Won-Bok Lee and Kyung-Yong Kim*
Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University,
Seoul 156-756, Korea

(Received November 16, 2005; Accepted December 13, 2005)

ABSTRACT

The characteristics of primary cultured rat brain microvessel endothelial cells (RBMECs) were studied using microscopy, immunohistochemistry and measuring of transendothelial electrical resistance (TER). The RBMECs formed a monolayer by 5~6 days after plating and showed characteristics of whirling appearance. The TER increased until day 5 and decreased then. There was few immunoreaction with anti GFAP, anti GalC, anti neurofilament 160/200 kD antibodies. So the contamination of astrocyte, oligodendrocyte, and neuron. could be ruled out.. Immunoreaction to vWF antigen was widespread throughtout the cytoplasm as Weibel Palade granule. Immunoreaction to tight junction proteins, i.e. occludin, ZO 1, and ZO 2 was seen at cell contact. In summary, RBMECs isolated and cultured showed morphological, immunohistochemical and electrical characteristics of blood brain barrier (BBB). The in vitro BBB model can be used in studying characteristics of in vivo BBB.

Key words : BBB, Endothelial cell, Tight junction

서 론

혈액뇌장벽 (blood-brain barrier, BBB)은 혈액과 뇌

실질 사이에 존재하여 혈액으로부터 뇌로의 물질이동
이나 뇌로부터 혈액으로의 물질 이동에 중요한 역할
을 담당하고 있다. 혈관뇌장벽은 뇌 미세혈관 내피세
포가 가장 주된 구성요소이며, 그 외에도 혈관주위세

이 논문은 2005학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임

* Correspondance should be addressed to Dr. Kyung-Yong Kim, Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea. Ph.: (02) 820-5643, FAX: (02) 815-4814, E-mail: skull@cau.ac.kr

포, 별아교세포로 구성되어 있다 (Shi & Audus, 1994; Eddy et al., 1997). 다른 부위의 미세혈관 내피세포와 달리 뇌 미세혈관 내피세포는 특징적으로 세포사이 치밀이음부(tight junction)가 발달해 있고 세포내 세포 흡수소포(pinocytotic vesicles)와 세포창(fenestrae)이 거의 없다(Reese & Karnovsky, 1967; Bowman et al., 1981; Bowman et al., 1983). 이러한 특성으로 인해 뇌 미세혈관 내피세포는 분자량이 큰 약물이거나 극성을 띤 약물들이 혈액으로부터 뇌실질 내로 이동하는 것을 제한하는 역할을 한다.

과거에는 혈액과 뇌실질간에 일어나는 약물의 이동에 대해 생체실험이나 생체에서 분리된 뇌를 이용하여 혈관뇌장벽의 역할에 대해 연구를 수행하였다(Takasato et al., 1984). 그러나 생체내 실험은 시공간적인 해상력의 저하, 이동 속도가 느린 약물의 검출이나 뇌 미세혈관 내피세포의 뇌실질쪽 접근의 어려움 등으로 그 사용에 제한이 있었다(Abbott et al., 1992; Dehouck et al., 1992). 이와는 달리 뇌 미세혈관 내피세포 단층을 이용한 약물 투과 실험은 위에서 열거한 단점들을 해결할 수 있으며, 또한 생체내 실험에서 야기될 수 있는 감염과 영양공급, 외상, 면역반응, 산소공급, 심혈관계 문제 등의 여러 변인을 피할 수 있고 세포 수와 약물의 농도를 정확하게 조절할 수 있다는 장점이 있다(Dehouck et al., 1992; Grabb & Gilbert, 1995).

1970년대 말에 Panula et al. (1978)과 De Bault et al. (1979) 이 각각 쥐와 쥐의 뇌에서 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하는데 성공한 이후로 그 기술이 점차 발전하여 최근에는 기능적으로나 형태적으로 완전한 내피세포를 분리, 배양할 수 있게 되었고, 내피세포의 화학적 성분이 상당부분 밝혀졌으며 내피세포 기능에 대한 분자 수준에서의 설명이 가능해졌다.

사람이나 소, 돼지, 고양이, 쥐, 생쥐의 뇌로부터 뇌 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하여 생체의 혈관뇌장벽 모형을 만들 수 있으며 모든 포유류에서 혈관뇌장벽의 생리적인 특성이 유사하기 때문에 이들 모형을 통한 약물의 이동은 비슷한 결과를 보여주고 있다(Cserr & Bindgaard, 1984; Audus et al., 1990). 특히, 소의 뇌가 크기가 크고 쉽게 얻을 수 있어 생체의 혈관뇌장벽 모형을 이용한 실험에서 뇌 미세혈관 내피세포를

얻는데 가장 많이 이용되고 있다(Audus & Borchardt, 1986; Meresse et al., 1989; Audus et al., 1990). 그러나 소의 뇌는 실험실단위에서 쉽게 접근하는데 여러 문제점이 있어왔다.

소의 뇌를 이용하는 방법은 도살장과의 일정조정문제, 각종 항체의 반응성 저하, 고비용 지출 등 많은 문제가 있어 왔다. BBB 내피세포의 분리와 배양은 많은 예민한 조건과 방법이 필요하며, 쥐의 뇌에서 이 세포를 분리하는 방법은 또한 소의 뇌에서와는 다른 조건들을 필요로 한다. 연구자는 실험동물로 손쉽게 구할 수 있는 쥐의 뇌로부터 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하고 이 내피세포가 생체에서 보여주는 내피세포의 특성을 나타내는 지를 확인하여, 앞으로 진행될 실험적 뇌혈관장벽 모델을 성립하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

배양액은 Gibco life technologies (Grand Island, New York, U.S.A.)에서 구입한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/F-12에 Sigma chemical Co.에서 구입한 plasma derived horse serum(10%)과 페니실린, 스트렙토마이신, 헤파린을 첨가하여 만들었다. Dispase와 collagenase/dispase는 Roche molecular biochemicals (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. 다른 모든 시약들은 Sigma chemical Co.와 Fisher scientific, Inc. (Fair Lawn, New Jersey, U.S.A.)에서 구입하였다. 세포배양도구(12-well Transwell™, 표면적 1.13 cm², 0.4 μm 구멍을 가진 폴리카보네이트 다공막)는 Corning costar corporation (Cambridge, Massachusetts, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

2. 쥐의 뇌를 이용한 뇌 미세혈관 내피세포의 분리와 배양

쥐의 뇌에서 큰 혈관과 뇌막을 제거하고 회색질을 분리하여 세절한 다음 collagenase/dispase를 처리하였다. 그 다음 텍스트란과 퍼콜로 미세혈관 내피세포만을 분리하고, 그 후 20% 말혈청과 10% dimethyl sul-

foxide (DMSO, Fisher scientific, Inc.)를 넣은 DMEM/F-12 세포배양액에 부유시켜 -80°C 냉동고에 보관한 다음 이틀날 배양하였다.

뇌 미세혈관 내피세포를 Transwell™의 위쪽 구획에 $300,000\text{개}/\text{cm}^2$ 의 밀도로 배양하였다. 배양액은 DMEM/F-12에 10% 말혈청, 100 Units/mL 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 스트렙토마이신, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin을 넣어 만들었다. 세포가 들어있는 쪽에는 배양액을 0.5 mL 넣고 세포가 들어있지 않는 쪽에는 배양액을 1.5 mL 넣어 37°C 의 세포배양기 (5% CO_2 , 95% 습도)에서 세포를 배양하였다. 배양액은 3일째 되는 날 처음 교체하고 그 다음부터는 이틀에 한번 교체하였다. 세포의 성장과정은 CK2 위상차현미경 (Olympus, Japan) 으로 관찰하였다.

3. 뇌 미세혈관 내피세포 단층의 전기저항 측정

세포 단층의 전기저항 값은 이중구조배양관에 내피세포를 배양한 후 EVOM epithelial voltohmmeter (World precision instruments, Sarasota, Florida)를 이용하여 측정하였다. 측정된 값에다 세포 단층의 표면적 (1.13 cm^2)을 곱하여 전체 전기저항 값을 산출하였다. 이와 같이 산출된 값에서 콜라겐이 도포되어 있는 다공막 자체의 전기저항 값을 뺀 최종 값을 뇌 미세혈관 내피세포 단층의 전기저항 값으로 계산하였다.

4. 투과전자현미경관찰을 위한 처리과정

이중구조배양관에 배양된 내피세포를 투과전자현미경으로 관찰하기 위해 0.01 M PBS로 다공막에 배양된 세포를 세척하였다. 2.5% 글루타알데하이드 (4°C , pH 7.4, 0.1 M PBS) 에 30분간 선고정하고 0.01 M PBS로 세척한 후 1% osmium tetroxide (4°C)에 20분간 후고정하였다. 에탄올과 프로피렌 옥사이드로 탈수한 후 이폰에 포매하였다. 초박절편기 (Reichert-Jung, Wien, Austria)로 준초박절편을 제작해 Richardson 염색을 하여 광학현미경으로 관찰한 후 초박절편을 제작해 JEM-200CX 투과전자현미경 (Jeol, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

5. 면역형광현미경관찰

면역형광현미경관찰을 위해 일차항체는 내피세포의 표지자로 rabbit polyclonal anti-von Willebrand factor (vWF) antibody, rabbit polyclonal anti-zonula occludens-1 and 2 (ZO-1, 2) antibody (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, California, U.S.A.)를 사용하였다. 오염된 세포를 확인하기 위해 mouse monoclonal anti-gial fibrillary acid protein (GFAP) antibody (Dako A/S, Copenhagen, Denmark), mouse monoclonal anti-galactocerebroside C (GalC) antibody (Chemicon International, Inc., Temecula, California, U.S.A.), 그리고 mouse monoclonal anti-neurofilament 160/200kD antibody (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, California, U.S.A.)를 사용하였다. 대조군에서는 일차항체 대신 PBS를 사용하였다. 이차항체는 fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 Rhodamine을 붙인 goat anti-rabbit IgG와 goat anti-mouse IgG (Zymed Laboratories Inc.)를 사용하였다. 12-well plate에 배양된 세포는 3% paraformaldehyde (0.01 M PBS)나 70% 에탄올에 10분간 고정하였고 PBS로 세척하고 0.1% Triton X-100 (PBS)으로 세포막의 투과성을 증대시켰다. Bovine serum albumin (BSA, 0.5 gm/mL)으로 10분간 차단한 후, 일차항체 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 4°C 에서 12시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBS로 세척하고 FITC 또는 Rhodamin 이 붙은 이차항체로 1시간 반응시키고 PBS로 세척한 후, 50% glycerol을 세포 위에 몇 방울 떨어 뜨리고 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 미세혈관 내피세포의 분리와 배양

분리한 내피세포는 Trypan blue 염색을 통해 세포의 생존율을 확인하고 배양밀도를 조절하였다. 내피세포의 일차배양을 위한 분리과정을 통해 얻어진 작은 조각의 모세혈관들과 내피세포는 아교로 도포한 배양기구의 표면에서 고착되어 성장하였다. 내피세포는 모세혈관에서부터 이주하여 성장하였으며 배양 1일째부터 방추모양의 세포들이 형성되기 시작하였다. 이 세포들

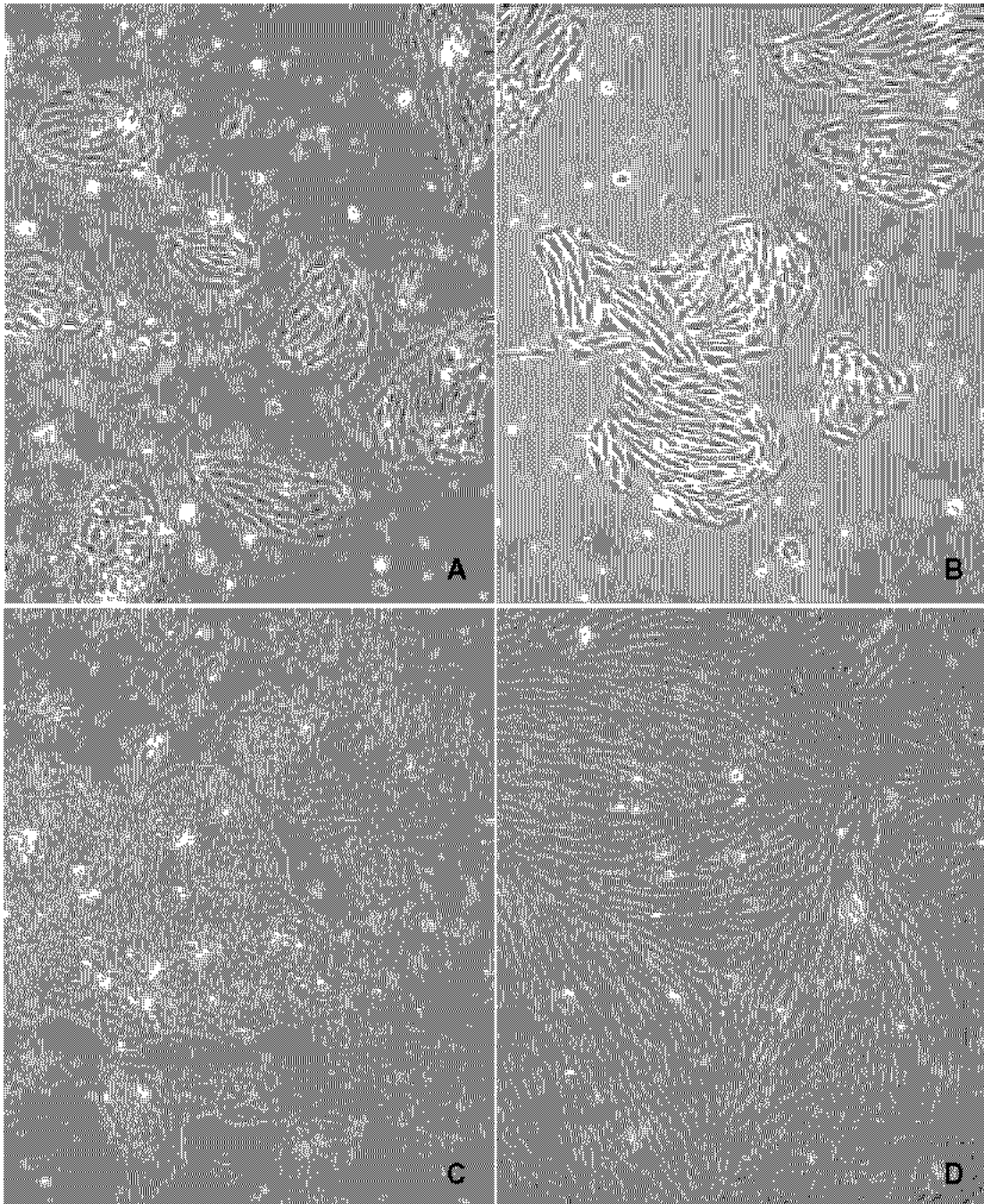


Fig. 1. Phase-contrast micrographs of rat brain microvessel endothelial cells in primary culture. They are postseeding 2 days (A, $\times 40$), 3 days (B, $\times 40$), 4 days (C, $\times 10$), and 5 days (D, $\times 20$). The endothelial cells (D) show typical spindle-shapes approximately $5\ \mu\text{m}$ across the broadest part, and around $50\ \mu\text{m}$ long.

은 곧 여러 개의 작은 세포군락은 형성하였으며 이러한 군락들이 계속 성장하여 이웃 군락과 만나 결과적으로 배양도구의 바닥을 전부 뒤덮는 단층을 형성하는 과정을 거쳤다(Fig. 1).

2. 뇌 미세혈관 내피세포 단층의 전기저항 측정

내피세포 단층의 전기저항은 배양 후 11일 경까지 시간의 경과에 따라 서서히 증가하다가 5일째에 가장 높은 $36 \pm 7 \cdot \text{Cm}^2$ 을 나타내고 그 이후로는 감소하였다(Fig. 2).

3. 투과 전자현미경 관찰

뇌 미세혈관 내피세포를 $0.4 \mu\text{m}$ 직경의 구멍을 가진 Transwell의 위쪽 구획, 즉 아교로 도포한 막의 표면

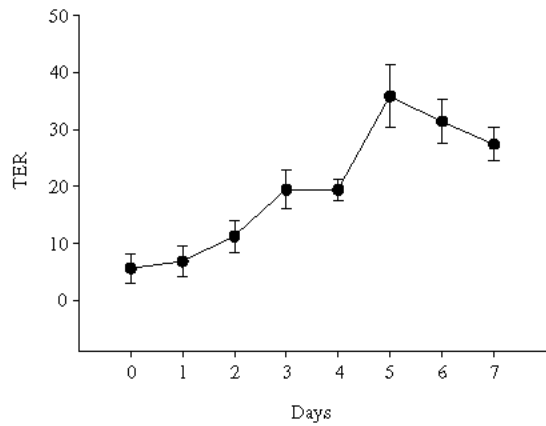


Fig. 2. Transendothelial electrical resistance (TER) of RBMEC monolayers cultured on $0.4 \mu\text{m}$ polycarbonate membrane inserts. Each value is the mean and standard deviations of $n=5$.

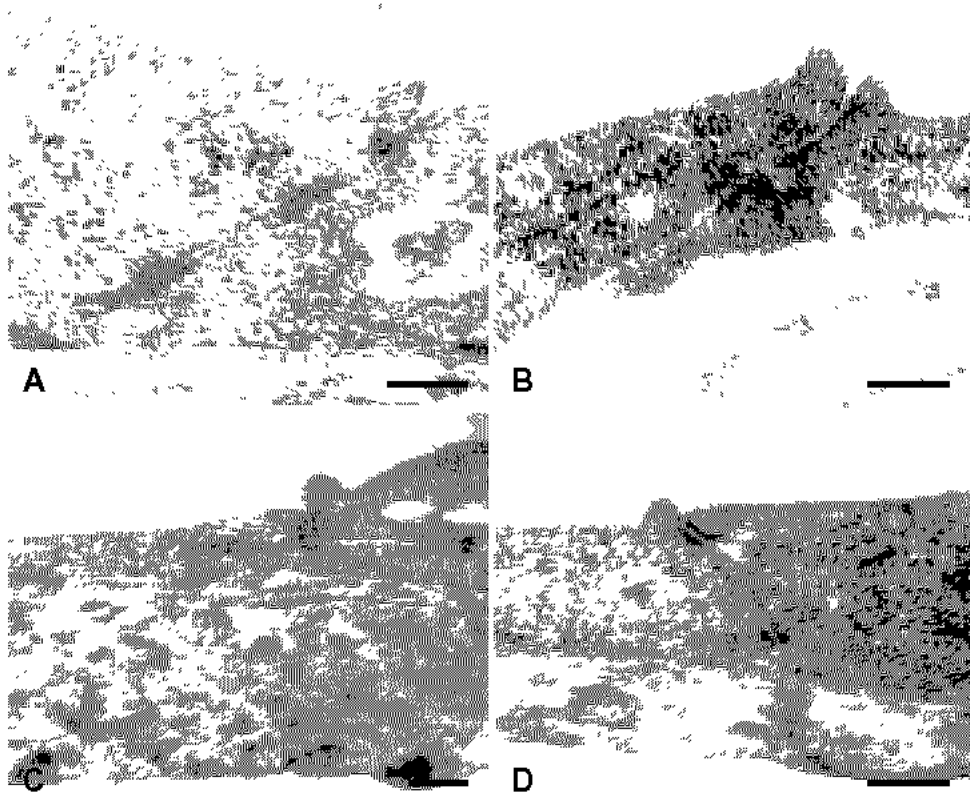


Fig. 3. Transmission electron micrographs of Transwell membranes. $0.4 \mu\text{m}$ (a) pore membrane (bar equals $1 \mu\text{m}$) and $3 \mu\text{m}$ (b) pore membranes (bar equals $1 \mu\text{m}$).

에 분리한 내피세포를 넣어 배양할 경우에는 세포가 다공막의 위쪽 구획에 면한 표면에서는 정상적으로 성장하여 세포단층을 형성하였다. 세포사이연접의 꼭대기 쪽에서는 내피세포의 특징적인 구조의 하나인 전자밀도가 높은 치밀이음부를 관찰할 수 있었고 내피세포의 창이나 세포흡수소포가 없어 배양한 내피세포가 뇌혈관장벽을 형성하고 있음을 알 수 있었다

(Fig. 3).

4. 공초점 레이저 현미경 관찰

배양 5일에 시행한 면역형광염색에서 anti-GFAP, anti-GalC, anti-neurofilament 160/200 kD antibody에 대한 면역반응을 거의 찾아볼 수 없었다. 따라서 별아

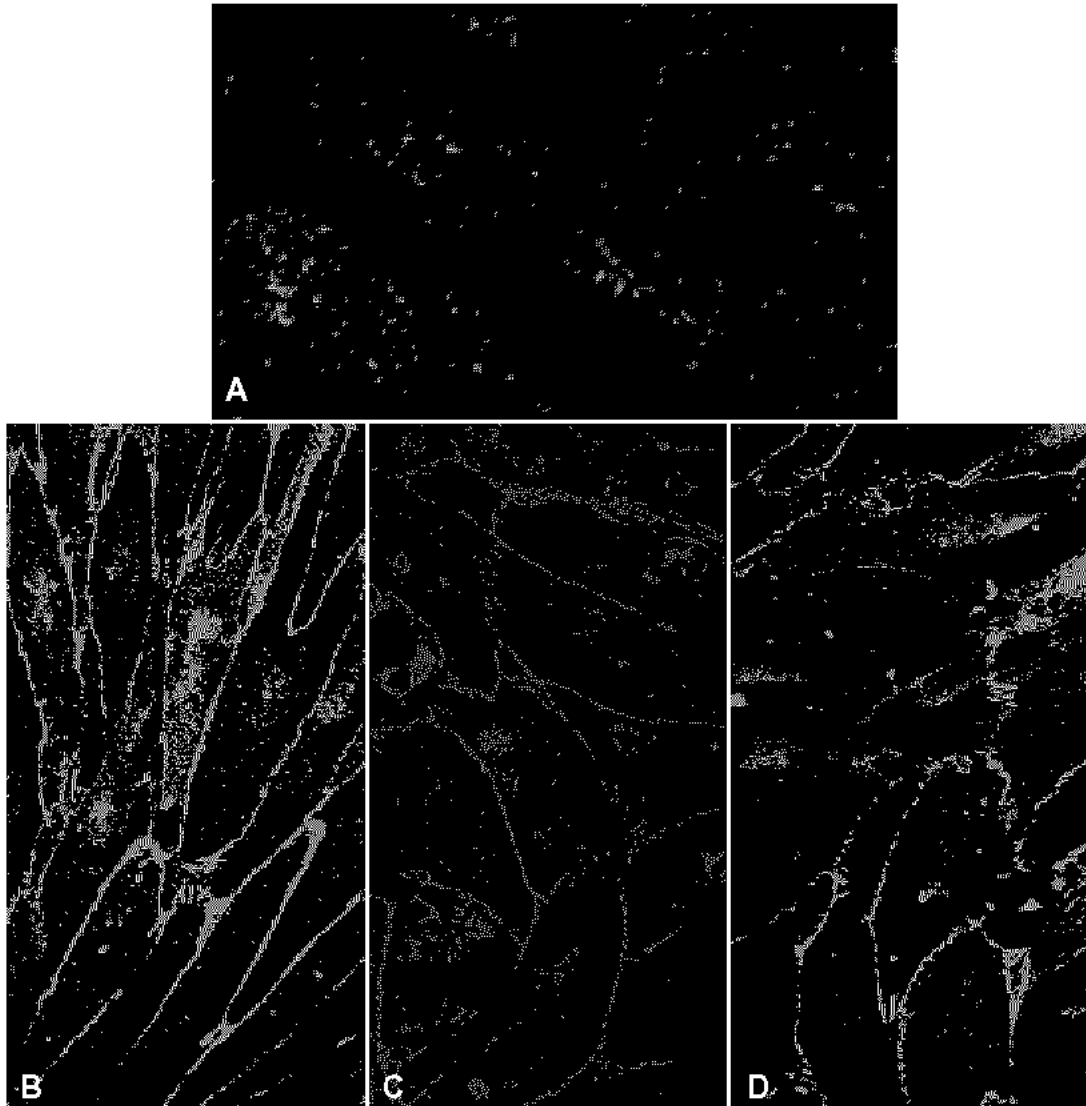


Fig. 4. Confocal micrographs of RBMECs. Immunofluorescent staining showed Weibel-Palade granule (4A), occludin (4B), ZO-1 (4C), and ZO-2(4D).

교세포, 희소돌기아교세포 및 신경세포에 의한 우려할 만한 오염은 배제할 수 있었다. vWF 항원에 대한 면역반응은 내피세포의 세포질 전반에서 과립양상으로 나타나, 내피세포의 특징인 Weibel-Palade body가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 치밀이음부를 구성하는 occludin(Fig. 4B), ZO-1(Fig. 4C), ZO-2(Fig. 4D)에 대한 면역반응은 내피세포의 접촉부위인 치밀이음부에서 그물처럼 나타났다.

고 찰

실험동물에서 뇌를 적출하여 뇌의 미세혈관 내피세포를 분리하여 배양하는 것은 언제나 번거롭고 복잡한 일 중의 하나이다(Joo, 1993). 흰쥐의 뇌를 대상으로 한 본 실험에서는 collagenase/dispase를 이용하였고, 텍스트란분리, 그리고 percoll gradient separation을 이용해 혈관내피세포를 분리하였다(Audus & Borchardt, 1987). 분리된 내피세포는 아교로 도포된 바닥에 잘 붙지 않는다고 하였지만(Szabo et al., 1997), 본 실험에서는 미세혈관의 조각과 분리된 내피세포들을 모두 아교가 도포된 배양기구와 다공막에 부착시켜 배양할 수 있었다.

배양된 세포를 대상으로 생화학적 그리고 생리적인 실험을 하기 위해서는 배양된 세포의 성상을 명확하게 확인하는 게 중요하다. 대뇌의 걸질을 효소처리하여 얻은 처음의 산물은 신경원, 별아교세포, 희소돌기아교세포와 함께 혈관에서 나온 근육세포, 혈관주위세포, 그리고 내피세포로 혼합되어 있다. 이외에 뇌수막에서 나온 섬유모세포와 미세아교세포들과 함께 혈액에서 나온 세포들도 포함되어 있다. 본 실험에서 신경원은 효소처리과정과 함께 배양성분과 바탕질의 조건이 맞지 않기 때문에 배양을 통해 관찰되지 않았다. 그러나 단층배양을 할 때 아교세포들이 종종 내피세포와 함께 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 내피세포를 분리하는 방법이 기계적인 것이나, 또는 효소를 이용한 것이나 양쪽의 방법에서 많은 연구자들이 내피세포 외에도 아교세포들이 같이 자라는 것을 경험하고 있다(Batter et al., 1992; Chen et al., 1998). 그러나 일반적으로 알려진 바와 같이 내피세포는 세포분리과정

과 그 후의 과정에서 입을 수 있는 손상에 대해 저항력이 있고, 다양한 단백질 분해효소에 대해 손상을 입지 않으므로 효소를 이용한 본 실험과정에서 분리한 세포는 대부분 내피세포라는 결론을 형태학적 관찰을 통해 내릴 수 있었다. 오염된 세포들은 효소나 기계적 조작에 의해 제거할 수 있다(Fisher & Kissel, 2001).

Trypan blue를 이용해 세포의 viability를 조절하여 배양 후 1일째부터 혈관내피세포가 분화하는 것을 관찰하였다. 배양액에 FBS를 사용하면 일부 오염된 세포들이 빠르게 성장한다(Demeuse et al., 2002). 그러므로 본 실험에서는 platelet derived horse serum(PDS)을 사용하여 오염된 세포의 성장을 억제시켰으며 내피세포가 조밀하게 성장하면서 세포 사이의 간격이 거의 없어지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 PDS는 빠르게 성장하는 세포 즉 섬유모세포나 민무늬근육세포의 성장을 억제하여 순도 높은 배양세포를 얻는데 적합한 것으로 알려져 있다(Male et al., 1990; Greenwood, 1991). 내피세포가 배양도구의 바닥을 완전히 채우는 시기는 약 5일 내지 6일 경이었다. 내피세포의 모양은 방추형이거나 또는 못형의 형태를 나타냈으며, 세포들은 작고 매우 조밀하며, 서로 겹쳐지지 않고, 세포간 접촉에 의해 성장이 억제되는 세포들이다. 이와같은 세포의 분리와 배양 조건을 통해 매우 순도가 높고 오염된 세포가 적은 내피세포의 배양을 할 수 있었다. 내피세포는 배양 초기에는 세포집락을 형성하여 자라지만 이내 집락들의 서로 연결되어 세포단층을 형성하였다. 세포들의 특징적인 소용돌이치는 모양은 배양된 세포가 뇌의 모세혈관 내피세포로 단정할 수 있는 근거가 될 수 있다.

내피세포 단층의 전기저항은 배양 초기부터 증가하다가 5일 경에 최대치인 $36 \pm 7 \cdot \text{Cm}^2$ 을 나타내었고 이후로는 점차 감소하였다. 이는 세포의 장벽기능이 5일 경에 최고에 도달하며 이후부터는 점차 감소한다는 것을 말해준다. 전기저항 값은 측정기구와 측정방법에 따라 심한 차이를 보이는 요소지만(Dehouck et al., 1992) 이 값으로 시험관내 BBB가 제대로 형성되어 있는 지를 생리적으로 확인할 수 있었으며, 또한 다른 실험을 할 때 실험시기를 결정할 수 있는 가장 우수한 시기를 예측할 수 있는 도구가 된다(Demeuse et al., 2002).

투과전자현미경으로 관찰한 결과 치밀이음부는 세포사이의 꼭대기에서 관찰할 수 있었고, 세포의 창이나 세포흡수소포가 없어, 배양된 세포가 뇌 미세혈관 내피세포라는 것을 일부 확인할 수 있었다. 다공막의 재질로 사용된 polycarbonate 막은 불투명하여 세포의 성장을 관찰하는데 부적합하지만, PET 재질의 막보다는 세포의 부착성이 좋아 많이 사용되고 있다. PET 재질의 막을 사용하는 경우 matrigel을 우선 도포하고 그 위에 아교로 다시 도포하면 세포들이 잘 부착하여 좋은 결과를 얻을 수 있다 (Male et al., 1990). 그러나 본 실험에서는 polycarbonate 막을 아교만으로 도포하여도 세포들이 잘 부착하여 자라는 결과를 얻을 수 있었다.

형광면역염색을 시도한 결과 내피세포는 GFAP, neurofilament 160/200 kD, GalC에 면역염색을 거의 드물게 나타내어 별아교세포, 신경세포, 희소돌기아교세포에 의한 우려할 만한 오염을 배제할 수 있었다. 배양된 세포는 vWF 항원에 대한 면역염색반응을 보이는 Weibel-Palade 과립을 확인할 수 있었다. 그러나 vWF는 모든 내피세포가 생산하므로 면역염색의 결과만을 가지고 내피세포가 순수하게 뇌 결질의 미세혈관에서 분리되었다고 볼 수는 없다. 치밀이음부를 구성하는 중요한 단백질인 occludin, ZO-1, 그리고 ZO-2에 대한 면역염색반응은 세포사이연접에서 나타났다. 이들 단백질들은 세포사이연접을 따라 그물망처럼 연결되어 있어 장벽으로서 기능을 하는 구조임을 알 수 있었다. 본 실험에서 분리배양한 세포들을 대상으로 한 실험결과들, 즉 세포의 배양되는 양상, 전자현미경관찰조건, TER 측정, 내피세포에 특이한 면역염색 등의 결과를 종합하여 판단해 볼 때, 분리배양한 세포가 뇌 미세혈관에서 분리된 내피세포이고, 생체의 뇌 혈관장벽의 특징을 나타낸다고 할 수 있다.

이 연구에서는 쥐의 뇌 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하여 생체의 혈액뇌장벽 모델을 개발하여 형태학적, 생리학적, 조직면역화학적 등의 방법으로 내피세포의 특성을 확인하여 이 모델의 적절성을 일부 입증하였다. 이 생체의 혈액뇌장벽 모델은 앞으로 진행되는 다양한 시험관내 실험에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고 문헌

- Abbott NJ, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J: Development and characterization of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood brain barrier. *J Cell Sci* 103 : 23-37, 1992.
- Audus KL, Bartel RL, Hidalgo JJ, Borchardt RT: The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolic studies. *Pharm Res* 7 : 435-451, 1990.
- Audus KL, Borchardt RT: Characterization of an in vitro blood brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharm Res* 3 : 81-87, 1986.
- Audus KL, Borchardt RT: Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for blood brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 507 : 9-18, 1987.
- Batter DK, Corpina RA, Roy C, Spray DC, Hertzberg EL, Kessler JA: Heterogeneity in gap junction expression in astrocytes cultured from different brain regions. *Glia* 6 : 213-221, 1992.
- Bowman PD, Betz AL, Ar D, Wolinsky JS, Penney JB, Shivers RR, Goldstein GW: Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* 17 : 353-362, 1981.
- Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, Betz AL, Goldstein GW: Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood brain barrier permeability. *Ann Neurol* 14 : 396-402, 1983.
- Chen Z, Zandonatti M, Jakubowski D, Fox HS: Brain capillary endothelial cells express MBEC1, a protein that is related to the claustridium perfringens enterotoxin receptors. *Lab Invest* 78 : 353-363, 1998.
- Cserr HF, Bindgaard M: Blood brain interfaces in vertebrates: a comprehensive approach. *Am J Physiol* 246 : R277-R288, 1984.
- De Bault LE, Kahn LE, Frommes SP, Cancilla PA: Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. *In Vitro* 15 : 473-487, 1979.
- Dehouck M P, Jolliet Riant P, Bree F, Fruchart J C, 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.
- Demeuse Ph, Kerhofs A, Struys Ponsar C, Knoop B, Remacle

- C, Aguilar Ph: Compartmentalised coculture of rat brain endothelial cells and astrocyte: a synergistic model to study the blood brain barrier. *J Neurosci Methods* 121 : 21-31, 2002.
- Eddy EP, Maleef BE, Hart TK, Smith PL: In vitro models to predict blood brain barrier permeability. *Adv Drug Del Rev* 23 : 185-198, 1997.
- Fisher D, Kissel T: Histochemical characterization of primary capillary endothelial cells from brains using monoclonal antibodies and fluorescein isothiocyanate labelled lectins: implications for drug delivery. *Eur J Pharmaceut Biopharm* 52 : 1-11, 2001.
- Grabb PA, Gilbert MR: Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an in vitro blood brain barrier. *J Neurosurg* 82 : 1053-1058, 1995.
- Greenwood J: Astrocytes, cerebral endothelium and cell culture: the pursuit of an in vitro blood brain barrier organ. *Ann NY Acad Sci* 633 : 426-430, 1991.
- Joo F: Endothelial cell of brain and other organ system: some similarities and differences, *Progr Neurobiol* 48 : S35-S37, 1993.
- Male DK, Pryce G, Rahman J: Comparison of the immunological properties of rat cerebral and aortic endothelium, *J Neuroimmunol* 30 : 290-295, 1990.
- Meresse S, Dehouck M P, Delorme P, Bensaid M, Tauber J P, Delbart C, Fruchart J C, Ceccelli R: Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long term culture. *J Neurochem* 53 : 1363-1371, 1989.
- Panula P, Joo F, Rechart L: Evidence for the presence of viable endothelial cells in culture derived from dissociated rat brain. *Experimentia* 34 : 95-97, 1978.
- Reese TS, Karnovsky MJ: Fine structural localization of a blood brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34 : 207-217, 1967.
- Shi F, Audus KL: Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. *Neurochem Res* 19 : 427-433, 1994.
- Szabo CA, Deli MA, Ngo Thi Khue, Joo F: Production of pure primary rat endothelial cell culture; a comparison of different method. *Neurobiol* 5 : 1-16, 1997.
- Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR: An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol* 247 : H484-H493, 1984.

< 국문초록 >

쥐의 뇌로부터 미세혈관에서 분리하고 배양한 내피세포의 특성을 현미경 관찰, 면역염색과 전기저항을 측정해 관찰하였다. 미세혈관 내피세포는 배양 후 5~6일 경에 단층을 형성하였으며 특징적으로 소용돌이치는 모양을 나타냈다. 내피세포 단층의 전기저항은 배양 후 5일 경까지 따라 증가하였고 이후로는 감소하였다. 면역형광염색에서 anti GFAP, anti GalC, anti neurofilament 160/200 kD antibody에 대한 면역반응을 거의 찾아볼 수 없었어 별아교세포, 희소돌기아교세포 및 신경세포에 의한 우려할 만한 오염은 배제할 수 있었다. vWF 항원에 대한 면역반응은 내피세포의 세포질에 Weibel Palade 과립이 전반적으로 퍼져 있었다. 치밀이음부를 구성하는 occludin, ZO 1, ZO 2에 대한 면역반응은 내피세포의 접착부위에서 매우 특징적으로 나타나고 있었다. 요약하면 쥐의 뇌 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하여 형태학적, 조직면역화학적 방법과 전기저항을 측정하여 내피세포의 특성을 확인하였다. 이 생체의 혈액뇌장벽 모델은 앞으로 진행될 혈액뇌장벽의 특징을 규명하고자 하는 시험관내 실험에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.