

Primary Culture of Endothelial Cells from Murine Brain Microvessels

Sun-Ryung Lee[†]

Department of Life Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

It is important to coordinated interaction among neurons, astrocytes and endothelial cells to maintain the function of brain. To study their regulatory mechanisms in vitro system, the co-culture system among the isolated cells from brain may be needed. However, the method for purifying brain microvascular endothelial cells (BMEC) for culture have not established yet. In this study, the proper culture methods of mice cells using two different strains, CD1 and C57BL/6, to obtain the pure and plentiful endothelial cells were described. The flatted-round forms of CD1 endothelial cells grew on the collagen-IV coating plates, while the purified cells from C57 mice preferred type collagen-I dishes for their growth. Both cells displayed anti-PECAM-1 (CD31) and von Willebrand Factor immuno-reactivity. These results indicated that different coating materials not only improve attachment of isolated cells but also promoting growth of cells, suggesting that this method of purifying murine Brain microvascular endothelial cells (BMEC) provides a suitable model to investigate blood-brain-barrier (BBB) properties within neurovascular unit in vitro.

Key Words: Brain microvascular endothelial cells (BMEC), Homeostasis, Blood-brain-barrier (BBB), Neurovascular unit

서 론

뇌신경혈관계 (Neurovascular unit)는 뇌의 미세혈관들의 구성요소인 내피세포, 성상세포 및 신경세포와 이들을 연결하는 세포외기질로 구성되어 있으며 서로간의 상호작용에 의해 항상성이 유지되고 있다. 혈관계와 신경계는 각자의 독립된 시스템으로서 분자생물학적 연구가 활발히 진행되어 왔으나 최근에 뇌신경혈관계의 역동성이 강조되고 혈관 신생과 신경형성에 동시에 작용하는 여러 인자들에 대한 보고를 통해 혈관계와 신경계간의 상호작용에 주목하게 되었다 (Park et al., 2003).

뇌의 발생분화와 기능을 위해서는 신경세포, 성상세포, 그리고 뇌혈관세포 및 세포외기질물질의 상호작용이 필요하며 뇌에만 존재하는 특이한 구조인 뇌혈관장벽 (blood-brain-barrier; BBB)과 matrix integrity는 뇌신경혈관계의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Lo et al., 2002; Lo et al., 2003; Lee et al., 2004; Ward et al., 2004). 또한, 중추신경계 (CNS)에서 뇌신경혈관계의 이해는 뇌혈관장벽의 기능을 이해할 뿐 아니라 신경병리학적 질환들, 혈관성치매

(vascular dementia), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 신경퇴행성 질환 (neurodegeneration) 등의 발병기전을 연구, 이해하는데 있어서도 그 중요성이 더욱 부각되고 있다 (Kalara, 2002; Miyakawa, 2002; Plumb et al., 2002; Rosenberg, 2002). 특히, 뇌혈관은 인체의 일반적인 다른 혈관과는 달리 선택적 투과성을 지니도록 뇌혈관장벽으로 되어 있으며 이는 고도로 정교화된 microvascular endothelium로서 tight junction에 의해 다른 세포들 또는 세포외기질들과 서로 상호작용을 하는 특이한 수송체계에 의해 뇌신경망의 보호와 영양분 공급 기능을 담당하고 있다 (Park et al., 2003). 이러한 뇌혈관장벽은 뇌혈관을 이루는 내피세포와 성상세포 간의 상호작용에 의해 생성되므로 이에 관련된 단백질들을 연구하고, 그들 간의 유기적인 상호조절 네트워크를 규명하기 위해 직접 대뇌로부터 분리되어지는 primary in vitro culture 모델의 중요성은 in vivo와 가장 유사한 상태의 재현이라는 점에서 강조되고 있으나 적은 양의 내피세포와 pericyte와의 오염도, 증식을 등등 여러 장애 요인으로 실제 이 모델의 확립은 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 두 종류의 다른 혈통인 CD1과 C57BL/6 mice를 이용하여 뇌의 피질로부터 효소 처리 후 얻어진 미세혈관 절편들로부터 뇌 내피세포가 부착되어 자라는 과정을 관찰하였다. 배양접시에 부착된 내피세포는 배양 3일 후부터 일정한 모양을 갖춘 세포의 형태로 증식을 시작하였고 배양 6~7일 후 건강한 내피세포들을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 내피세포의 부착과 증식을 위해 대부분의 경우 ECM의

*논문 접수: 2006년 3월 3일
수정재접수: 2006년 4월 18일

[†]교신저자: 이선령, (우) 690-756 제주도 제주시 아라1동 1, 제주대학교 자연과학대학 생명과학과
Tel: 064-754-3522, Fax: 064-756-3541
e-mail: srlee@cheju.ac.kr

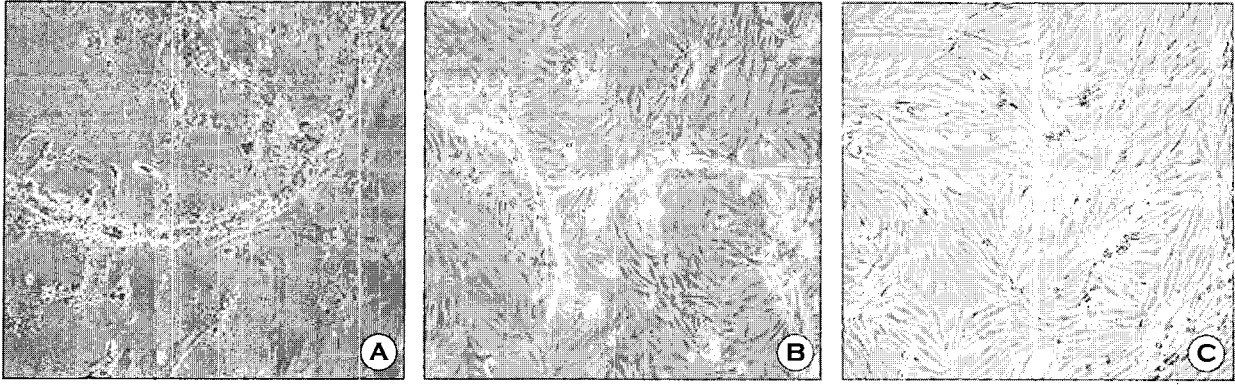


Fig. 1. Progression of brain microvascular endothelial cell cultures from C57BL/6. After treatment of collagenase-dispase, digested fragments were further purified by immuno-magnetic bead isolation. Images were obtained on day 1 (A), day 3 (B) and day 7 (C).

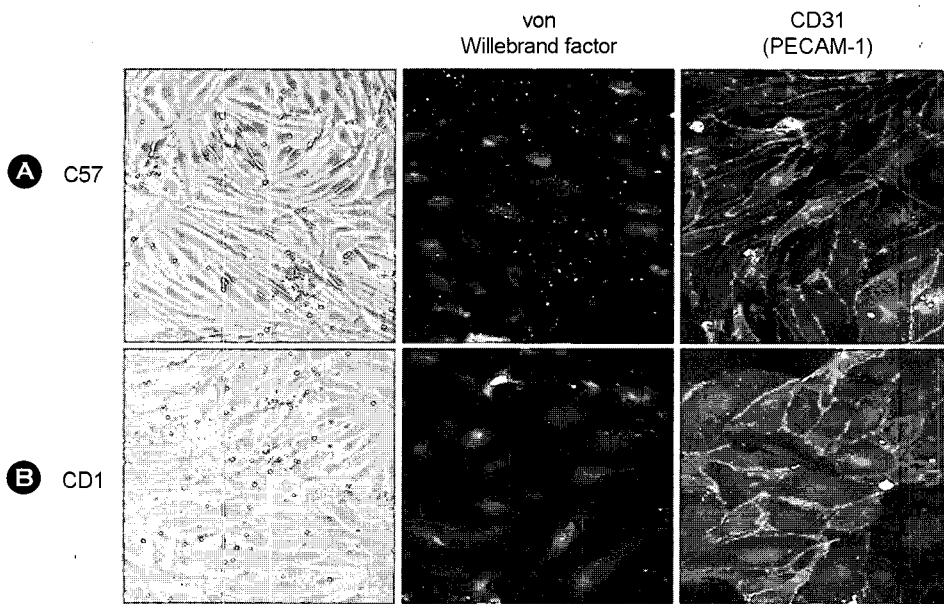


Fig. 2. The expression of endothelial markers on primary brain microvascular endothelial cell (BMEC) cultures. BMECs of C57BL/6 (A) or CD1 (B) strain were immunostained with anti-CD31 (PECAM-1) or anti-von Willebrand factor. Photos were taken by fluorescent microscope.

일종인 collagen, fibronectin, 또는 여러 종류의 ECM이 혼합된 attachment factor를 사용하고 있으나 (Ichikawa et al., 1996; Stins et al., 2001; Lee et al., 2004), 이는 각 종에 따라 활성화되는 수용체나 integrin isotype의 발현 정도에 따라 달라질 수 있다. 본 연구에서도 동일하게 얻어진 세포라 하더라도 CD1의 경우 collagen type-IV에서, C57BL6의 경우 collagen type-I에서 많은 수의 내피세포들이 배양조에 부착되는 것을 관찰하였다. 이는 각 종에 따라 선호하는 부착인자가 있음을 제시해 주는 것으로 보다 많은 양의 내피세포를 수확할 수 있는 요인으로 간주될 수 있다. 다음으로 분리 배양된 세포가 내피세포인지를 확인하기 위해 일반적으로 많이 사용되는 2종류의 내피세포 마커들을 이용하여 immunocytochemistry를 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 세포내 경계

선을 따라 CD31이라 불리는 platelet-endothelial cell adhesion molecular-1 (PECAM-1) 단백질이 발현되었고 또 다른 마커인 von Willebrand Factor는 세포질 부분에 분포하는 것으로 관찰되었다. 이러한 분포 양상은 인간의 뇌나 rat의 뇌를 이용한 이전의 내피세포 분포도와 일치하는 것이다 (Ichikawa et al., 1996; Stins et al., 2001).

본 연구에 사용된 재료 및 방법은 아래와 같다. 뇌의 내피세포를 배양하기 위해 4~5주된 CD1과 C57BL6를 구입하였고 마취 후 얻어진 쥐의 뇌로부터 피질부분을 분리하여 menings와 표면의 큰 혈관을 제거하였다. 조직은 마르지 않도록 주의 하면서 HEPES가 첨가된 차가운 DMEM배지 위에서 대략 1 mm 두께로 잘게 잘라 7 ml Dounce homogenizer를 이용하여 먼저 30회 정도 큰 피스틀을 이용해 균질화 시

켜 주었고 이어서 작은 피스톨로 25회 정도 분쇄하였다. 200 X g에서 5분 동안 원심분리하여 얻어진 균질물은 dextran 용액 (15% dextran in MEM medium)으로 현탁시켜 10,000 X g에서 10분 동안 고속원심분리한 후 dextran층은 조심스럽게 제거하고 Ca^{2+} - Mg^{2+} -free HBSS로 재현탁시켜 75 μ m nylon mesh filter를 이용해 현탁액을 여과시켰다. 여과지 위에 걸러진 미세혈관은 미리 만들어둔 차가운 collagenase-dispase 용액 (Ca^{2+} - Mg^{2+} free HBSS, 1 mg/ml collagenase-dispase, 20 U/ml deoxyribonuclease-I, 0.147 μ g/ml protease inhibitor tosyllysine chloromethyl ketone (TLCK)으로 모아 막에 연결된 내피세포를 분리하기 위해 40분 (C57BL6) - 50분 (CD1) 동안 37°C 배양기에서 반응하였고 40 μ m nylon mesh filter로 여과시켜 잘게 잘라진 미세혈관들을 분리하였다. 짧은 단편의 혈관들로부터 순수한 내피세포들을 얻기 위해 내피세포의 마커로 사용되는 항체, anti-murine PECAM-1를 코팅한 immunomagnetic-bead를 분리된 미세혈관과 섞어 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. Immunomagnetic-bead는 배양을 시작하기 전 sheep anti-rat IgG가 코팅된 M-450 Dynabeads와 rat anti-murine PECAM-1 항체를 섞어 4°C에서 30분 동안 반응한 후 비특이적인 결합을 제거하기 위해 magnetic particle concentrator를 이용해 0.1% bovine serum albumin (BSA)을 포함한 phosphate-buffered saline (PBS)로 3회 수세하여 미리 준비하였다. Bead에 결합한 혈관편편들은 Magnetic particle concentrator를 이용해 분리하고 배양액 (10% FBS, 5% HS, ECGS, heparin을 포함한 DMEM)으로 현탁하여 collagen type I (C57BL6)과 type IV (CD1)이 코팅된 배양접시 위에 심어 혈관내피세포들을 부착시켰다. 48시간 후 free magnetic bead는 제거되었고 배지는 3일에 한번씩 갈아 주었으며 실험을 위해서 2번의 계대 배양을 실시하였다. 분리 배양한 세포들의 순수도를 확인하기 위해 slide chamber에서 배양한 내피세포들은 3.7% formaldehyde 용액에 10분 동안 고정한 후 0.2% Triton X-100와 5% normal goat serum을 포함한 blocking 용액에서 1시간 반응하였다. 희석된 1차 항체인 rat anti-PECAM-1 또는 rabbit anti-von Willebrand factor와 각각 3시간 동안 반응시킨 후 형광물질이 결합된 2차 항체를 이용해 발현도 및 분포도를 형광현미경으로 확인하였다.

이상의 결과들은 mouse의 뇌로부터 성공적인 내피세포의 분리 및 배양법을 보여주는 것이지만 해결해야 할 문제는 여전히 남아 있다. 첫째, BBB를 위한 모델로 이용하기 위해서는 다양한 tight junction proteins에 대한 연구가 함께 병행되어야 한다. Li 등 (2003)에 따르면 mouse에 기원을 둔 immortalized 내피세포인 bENDO.3 세포의 경우 tight junction proteins인 occludin과 ZO-1의 분포는 정상적인 내피세포에서의 발현 양상과 달리 세포질 전반에 분포하는 것으로 보고하였다. 둘째, 각 종에 따라 뇌를 둘러싼 다른 세포들의

오염을 최소화 할 수 있고 효율을 높일 수 있는 보다 좋은 조건을 확립해야 한다는 것이다. 본 연구에서는 효소를 이용한 미세혈관의 digestion방법과 순수도를 높이기 위해 immunomagnetic bead를 사용하였다. 효소와의 적절한 반응 시간은 많은 수의 세포를 얻을 수 있게 하는 요인이다. 비록 짧은 시간의 차이라 하더라도 CD1의 경우 50분, C57의 경우 40분이란 다른 반응 시간은 종에 따라 또는 동일종이라도 그 혈통에 따라 조건이 다양할 수 있는 있음을 제시해 주는 것이다. 또한, bead의 사용은 순수도를 증가시키지만 이와 반대로 회수율을 감소시키는 요인으로도 작용한다. 따라서 분리하는 과정과 적절한 농도의 immuno-bead와 혈관 및 세포수의 관계는 중요한 것으로 보여 진다.

뇌혈관으로부터의 내피세포는 주로 소의 뇌를 이용해서 사용하였으나 인간의 뇌질환과 관련된 연구를 위해서는 인간의 뇌로부터의 모델이 최상이나 현실적으로 거의 불가능하다. 이를 대체하는 모델로 인간과 상동성이 높은 쥐의 뇌로부터의 내피세포를 이용함으로써 뇌신경혈관계의 기능, 특히 BBB의 기능을 연구하는데 좋은 모델을 제공해 줄 것으로 생각된다.

감사의글

이 논문은 2005년 정부 (교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2005-003-E00215).

REFERENCES

- Ichikawa N, Naora K, Hirano H, Hashimoto M, Masumura S, Iwamoto K. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport in vitro. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 1996. 36: 45-52.
- Kalaria RN. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological conditions. *Cerebrovasc.* 2002. 13: 48-52.
- Li S, Pachter JS. Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction associated proteins. *In Vitro Cell Dev Biol.* 2003. 39: 313-320.
- Lee SR, Wang X, Tsuji K, Lo EH. Extracellular proteolytic pathophysiology in the neurovascular unit after stroke. *Neurol Res.* 2004. 26: 854-861.
- Lee SR, Lo EH. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia-reoxygenation. *J Cerebr Blood Flow Metab.* 2004. 24: 720-727.
- Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain

- injury and inflammation: role for plasmonogen activators and matrix metalloproteinase. *J Neurosci Res*. 2002. 69: 1-9.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003. 4: 399-415.
- Miyakawa T. Vascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 2002. 977: 303-305.
- Plumb J, McQuaid S, Mirakhor M, Kirk J. Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2002. 12: 154-169.
- Park JA, Choi KS, Kim SY, Kim KW. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: molecular and cell-based approaches. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 311: 247-253.
- Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in multiple sclerosis. *Neuroscientist* 2002. 8: 586-595.
- Stins MF, Badger J, Kim SK. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*. 2001. 30: 19-28.
- Ward NL, Lamanna JC. The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems. *Neurol Res*. 2004. 26: 870-883.