

생물물리학적 미세환경에 따른 혈관내피세포의 전단유래박리 거동

함석훈¹, 권태윤¹, 박은영¹, 강민우¹, 정호윤², 신현정^{1*}

한국과학기술원 기계공학과¹

경북대학교 의과대학 성형외과학교실²

Shear-induced detachment behaviors of vascular endothelial cells in controlled biophysical microenvironments

Seok Hoon Ham ¹, Tae Yoon Kwon ¹, Eun Young Park ¹, Minwoo Kang ¹, Ho Yun Chung², and Jennifer H. Shin ^{1*}

¹ Dept. of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea

²Dept. of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyungpook National University School of Medicine, Korea

*j_shin@kaist.ac.kr

Abstract

Understanding shear-induced detachment, a mechanism of endothelial loss, is critical in resolving vascular graft dysfunction. In this study, through real-time fluorescence imaging, the shear-induced detachment behavior of vascular endothelial cells was examined and analyzed as a phenomenon that consisted of voids generation, voids expansion, and cell detachment over time. In addition, we found that fibronectin delayed the initiation of shear-induced detachment compared Matrigel by formation of stable adherens junctions.

1. 연구 배경

심혈관질환은 전 세계적인 주요 사망원인이며, 심각한 경우 환자의 혈관이 제 기능을 하지 못하게 되어 혈관 이식편을 이용한 수술이 필요하다. 하지만 기존의 혈관이식편들은 만성 염증반응(chronic inflammation), 내막 증식(endothelial hyperplasia), 또는 혈전증(thrombosis)과 같이 혈관이식편의 기능장애를 일으키는 주요 문제점들을 극복하지 못하는 실정이다. 이러한 문제점들의 근본적인 원인 중 하나가 내피층(endothelium)의 소실이라고 알려져 있으며, 실제로 안정적인 내피층은 혈관 수술로 인해 발생하는 전염증성(pro-inflammatory), 증식성(proliferative), 그리고 전혈전성(pro-thrombotic) 반응을 감소시킨다고 보고된 바 있다. 이에 따라 혈관이식편에 내피세포를 안정적으로 배양하기 위한 방법으로, 데코린(decorin)과 파이브로넥틴(fibronectin) 혼합물을 혈관이식편 내부에 coating 하는 방법 혹은 내피세포의 세포-기질간 접착(cell-substrate adhesion)을 촉진시키는 항체를 혈관이식편 내부에 고정시키는 방법과 같은 공학적 접근들이 제시되고 있다. 하지만 아직까지 혈관이식편의 기능 장애는 완벽하게 해결되지 않아, 근본적인 해결방안을 모색하는 것이 필요하며, 이를 위해 내피층의 소실을 유발하는 전단유래박리(shear-induced detachment) 거동에 대한 이해가 우선 되어야한다.

세포역학적인 관점에서 미루어 보면, 세포단일층에 존재한 세포가 바닥기질로부터 탈착되는 현상은 세포-기질간 접착과 세포간 연접이 동시에 파괴되어야 발생하기 때문에, 전단유래박리 거동을 이해하기 위해서 이 두가지 생물물리학적 특성을 긴밀하게 고려해야 한다. 세포단일층 내 국부적인 세포간 연접의 파괴는 찢어진 피부의 상처부위가 잔류응력에 의해 벌어지는 것과 같이, 세포간 연접에 존재하던 인장응력(pre-tension)이 소실되면서 틈새영역 확장(voids expansion)을 유발하고, 세포-기질간 접착의 국부적인 파괴는 바닥 기질에 대한 부착력을 감소시켜 전단응력에 의한 세포의 탈착(cell detachment)을

촉진한다. 이러한 두 거동이 맞물려 일어나게 되면, 세포단일층 내 세포가 부착되지 않은 부분의 면적이 증가하게 된다.

부착연접과 초점접착은 ECM(extracellular matrix) 및 바닥기질 강성(substrate stiffness)으로부터 영향을 받는다고 잘 알려져 있고, 각각 세포간 연접과 세포-기질간 접착을 구조적 및 생리학적으로 안정화시키는 데에 중요한 단백질 구조체로 알려져 있다[1]. 세포 외 기질은 그 종류에 따라 특이적인 인태그린에 결합되는 특성을 가지고 있고, 이를 통해 부착연접을 포함한 세포의 생물물리학적 상태를 조절한다. 이러한 세포 외 기질의 분비는 생물물리학적 미세환경에 의해서도 촉진되는데, 파이브로넥틴은 내피층의 투과성 및 염증성의 증가가 관찰되는 동맥경화와 같은 염증성 부위의 혈관 기저판에서 분비가 촉진된다고 알려져 있고, 라미닌(laminin) 및 콜라겐iv (collagen iv)는 내피투과성 및 염증성의 저하가 관찰되는 정상적인 혈관 기저판에서 분비가 촉진된다고 알려져 있다. 또한 세포-기질간 접합은 바닥기질의 강성으로부터 영향을 받는데, 일반적으로 바닥기질의 강성이 높을수록 더 강력한 초점접착을 형성한다고 알려져 있다.

본 연구에서는 실시간 형광 이미지 촬영을 통해 세포 외 기질 및 강성에 따른 혈관내피세포의 전단유래박리 거동을 고찰했고, 이를 바탕으로 전단유래박리를 억제하는 데에 중요할 것으로 추측되는 원인을 제시했다.

2. 연구 방법

2.1 실험군 설정

세포 외 기질 및 바닥기질 강성에 따른 HUVEC(VE-cad_GFP)의 전단유래박리 거동을 고찰하기 위해 세포 외 기질과 바닥기질을 바꾸어 실험군들을 설정했다. 세포 외 기질은 동맥경화 부위의 혈관 기저판에서 분비가 촉진되는 파이브로넥틴과 정상적인 혈관 기저판과 매우 흡사한 조성인 매트리지젤을 사용했다. 바닥기질의 종류로는 세포실험에 일반적으로 널리 사용되는 기질인 PDMS와

유리를 사용했으며, 두 기질의 강성은 각각 1.7 MPa(PDMS)와 72 GPa(유리)로 확연한 차이를 나타냈다. 두개의 세포 외 기질과 두개의 바닥기질을 사용하여 F_Glass(fibronectin coated glass), F_PDMS(fibronectin coated PDMS), M_Glass(Matrigel coated glass), M_PDMS(Matrigel coated PDMS)와 같이 총 4개의 실험군을 설정했다.

2.2 실험 방법

전단유래박리 거동을 고찰하기 위해 2일간 5%의 이산화탄소 및 37°C로 습식 대기상태가 유지되는 미세유체칩 내 HUVEC(VE-cad_GFP)을 배양하여 안정한 단일층을 형성했다. 혈관내피세포의 전단유래박리를 발생시키기 위한 전단응력 자극은 미세유체칩을 연동펌프(peristaltic pump)에 연결하여 발생시켰으며, 시간당 2.5dyne/cm²로 증가시켜 10 dyne/cm²에 도달하도록 설정했다. 세포간 연결의 파괴 및 세포-기질간 접착의 파괴로 인해 발생하는 틈새영역(voids) 면적은 10 dyne/cm²의 전단응력이 정상상태로 유지될 때부터 매 1시간마다 측정했고, 이를 바탕으로 전단유래박리 거동에 대한 정성적 및 정량적인 분석을 수행했다. 틈새영역에 대한 분석은 새롭게 생성된 틈새영역(newly generated voids)과 이미 존재하는 틈새영역(existing voids)에 대한 면적들을 시간에 따라 추적하여 수행했다. 해당 측정은 틈새영역이 처음 생성되기 전까지는 매 2시간 마다, 틈새영역이 처음 생성된 이후에는 매 1시간마다 수행했고, 두 틈새영역의 면적합이 화면의 전체면적(total window area)의 20% 이상을 차지했을 때 측정을 종료했다. 또한 시간에 따른 조건 별 면적은 화면의 전체면적으로 정규화(normalized)했다.

3. 연구 결과

틈새영역에 대한 정성적 분석을 수행한 결과, 틈새영역의 생성(voids generation)은 혈관내피세포 단일층 내 국소부위에서 세포간 연결이 파괴되어 발생했고, 이후 틈새영역이 팽창(voids expansion)한 다음 세포의 탈착(cell detachment)이 진행되었다. 틈새영역 면적의 정량적 분석을 통해 각 실험군들의 전단유래박리가 시작된 시간을 의미하는 틈새영역이 처음으로 생성된 시간을 표 1에 나타냈다. 전단 유래 박리가 시작된 시간은 파이브로넥틴을 사용한 실험군들의 경우 13시간과 14시간의 값을 나타냈고, 매트리젤을 사용한 실험군들의 경우 6시간과 7시간의 값을 나타냈다. 즉, 바닥기질의 종류에 따른 강성의 차이보다 세포 외 기질의 종류에 더 의존적으로 전단유래박리의 시작이 지연됨을 알 수 있다. 실험군들에게 나타난 틈새영역의 확장에 대해 더 면밀히 고찰하기 위해 새로 생긴 틈새영역 면적과 이미 존재하는 틈새영역 면적을 시간에 따라 측정했다. 그림 1. (a)에 보이듯, 모든 실험군들의 새로 생긴 틈새영역 면적이 전단 유래 박리 동안 전체 화면면적의 5 % 내외의 값을 나타냈으며 시간이 지남에 따라 증가한 후 감소하는 경향을 보였다. 또한 그림 1. (b)에서 보이듯 새로 생긴 틈새영역 면적이 시간에 따라 점점 증가하여 최댓값에 도달하기까지는, 이미 존재하는 틈새영역 면적이 완만하게 증가하다가 그 이후엔 급격하게 증가하는 공통적인 양상을 보였다. 이는 새로 생긴 틈새영역이 사전장력의 소실로 인해 팽창함으로써 이미 존재하는 틈새영역 면적이 완만히 증가하고, 이후 세포의 탈착이 추가적으로 발생함으로써 이미 존재하는 틈새영역의 면적이 급격하게 증가한 것으로 추측된다.

전단유래박리가 틈새영역의 생성으로부터 시작되는 것을 미루어 봤을 때, 세포간 연결을 안정하게 유지하는 것이

전단유래박리를 지연하는 데에 중요함을 알 수 있다. 또한 전단유래박리를 지연하는 것은 세포 외 기질의 종류에 따라 확연한 차이를 보였으며, 파이브로넥틴이 매트리젤보다 더 우수한 지연효과를 나타냈음을 확인했다. 따라서 전단유래박리를 억제하기 위해서는 세포간 연결을 안정하게 유지하는 것이 하나의 방법이 될 수 있으며, 이를 위해 세포 외 기질에 의존적으로 달라지는 세포간 연결의 안정성에 대한 추가연구가 필요할 것이다.

표 1. 실험군들의 전단유래박리 시작 시간

Experimental groups	Time to start of shear-induced detachment
F_Glass	14 h
F_PDMS	13 h
M_Glass	6 h
M_PDMS	7 h

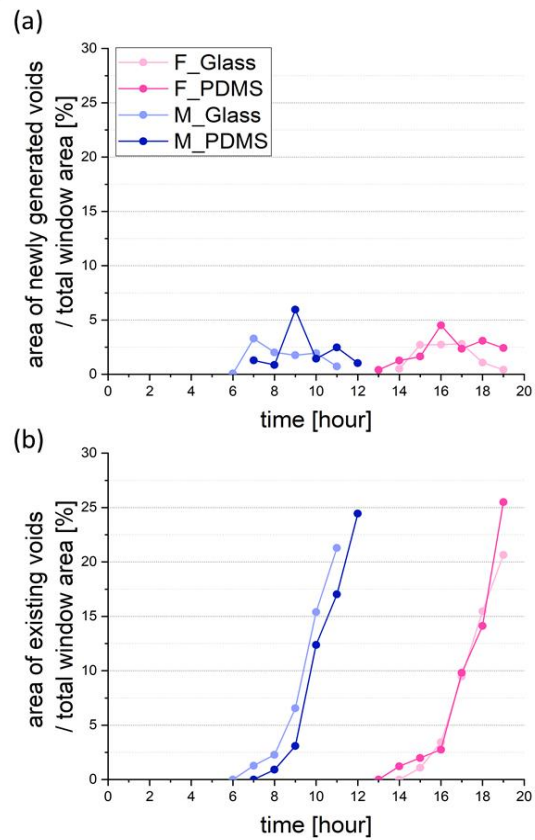


그림 1. 틈새영역 면적에 대한 정량적 분석. (a) 새롭게 생성된 틈새영역(newly generated voids) 면적의 시간에 따른 변화. (b) 이미 존재하는 틈새영역(existing voids) 면적의 시간에 따른 변화.

4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음.(NRF-2020M3A9E403965813)

5.참고 문헌

[1] Dejana, Elisabetta. "Endothelial cell-cell junctions: happy together." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 5,4, p.261-70,2004