

두 가지 형태의 혈관내피전구세포 (Endothelial Progenitor Cell, EPC) 의 특성분석

서울대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교병원 임상의학연구소, 심혈관 연구실¹
 한림대학교 의과대학 내과학교실, 순환기내과,² 충북대학교 의과대학 내과학교실, 순환기내과³
 서울특별시립보라매병원 내과⁴

윤창환¹ · 서재빈¹ · 허진¹ · 최진호¹ · 김지현¹ · 박승정¹ · 조상호¹
 이준희² · 황경국³ · 김상현^{1,4} · 조주희^{1,4} · 김명아^{1,4} · 김효수¹

Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells(EPC)

Chang-Hwan Yoon, MD¹, Jae-Bin Seo, MD¹, Jin Hur, MA¹, Jin-Ho Choi, MD¹, Ji-Hyeon Kim, MA¹,
 Seung-Jung Park, MD¹, Sang-Ho Jo, MD¹, Jun-Hee Lee, MD², Kyoung-Kook Hwang, MD³,
 Sang-Hyun Kim, MD^{1,4}, Joo-Hee Zo, MD^{1,4}, Myung-A Kim, MD^{1,4} and Hyo-Soo Kim, MD¹

¹Cardiovascular Laboratory, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital,
 Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul,

²Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hallym University, Seoul,

³Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chung-buk University, Cheongju,

⁴Department of Internal Medicine, Seoul National University, Boramae Hospital, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Endothelial progenitor cells (EPC) in one study group are not the same as those in other investigators, suggesting that EPC is not a single type of cell population. In this study, we tried to demonstrate the heterogeneity of EPC. **Materials and Methods** : We cultured total mononuclear cells from human peripheral blood to get two types of EPC sequentially from the same donors ; termed early EPC and late EPC. **Results** : Early EPC with spindle shape showed a peak at 2-3 weeks and died at 4 weeks, while late EPC with cobblestone shape appeared late at 2-3 weeks, showed exponential growth at 4-8 weeks and were sustained up to 12 weeks. Late EPC expressed VE-cadherin, Flt-1 and KDR at higher levels than early EPC did, and did not express CD45, whereas early EPC did. Late EPC was superior in the production of nitric oxide, the incorporation into HUVEC monolayer and the formation of capillary tubes. **Conclusion** : We found two different types of EPC that might play different roles in adult neovasculogenesis based on the genetic and functional differences. (**Korean Circulation J 2004; 34(3):304-313**)

KEY WORDS : Stem cells ; Endothelial progenitor cell ; Endothelial cell ; Angiogenesis ; Cell therapy.

논문접수일 : 2003년 10월 20일

심사완료일 : 2003년 11월 3일

교신저자 : 김명아, 156-707 서울 동작구 신대방동 425 서울특별시립보라매병원 내과

전화 : (02) 840-2179 · 전송 : (02) 831-2826 · E-mail : kma@brm.co.kr

1997년 Science지에 처음으로, CD34 양성 세포를 인간의 말초혈액으로부터 분리하여 얻은 혈관내피전구 세포 이하(EPC)라 한다. 쥐의 허혈하지 모델의 혈관신생에 참여할 수 있다는 연구가 발표되었다.¹⁾ 이후, EPC를 이용한 다양한 연구들이 심혈관계 분야에서 활발히 수행되었다.²⁻⁵⁾ 이러한 연구에 쓰인 EPC는 말초혈액으로부터 3주 이내에 배양된 방추형(spindle shaped)의 세포였다. 이 세포들은 실험 조건에서는 제한된 증식능력을 보여서, 4~6주 후에 점차 죽어가는 것으로 나타났다.

이와 달리, 골수와 말초혈액으로부터 모양과 증식능력이 이전의 보고들과 매우 다른, 또 다른 종류의 EPC의 존재를 시사하는 연구가 있었다.^{6,7)} 이 연구에서 전체 단핵구를 혈관내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)를 첨가하여 배양하면, 방추형 세포와 다른 형태의 군집을 형성한 후, 체대정맥내피세포(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)의 단층배양과 유사한 모양으로, 빠르게 증식하는 EPC가 배양된다고 보고하였다. 이러한 세포들은 30번 이상의 계대배양이 가능하고, 신선하게 분리한 HUVEC에 비해서 약 10배가량 빠른 증식능력을 가지는 것으로 나타났다. Lin 등은 이성간의 골수이식을 통한 염색체 분석기법(chromosomal analysis of sex-mismatched bone marrow-transplanted recipients)을 통해서 이러한 세포가 골수에서 유래한 EPC임을 주장하였다.⁷⁾ 최근 Reyes 등⁸⁾은 골수로부터 유래한 단핵구 중 표면항원들(CD34+, VE-cadherin+, AC133+, and Flk1+)에 의해 구분되는, 소위 다분화능 성체전구세포(Multipotent Adult Progenitor Cell, MAPC)로 불리는 세포가 EPC의 기원이라고 보고하였다. 이와 같이, 각 연구 그룹에서 사용한 세포의 종류나 방법에 큰 차이가 없음에도 불구하고, 실험실 조건에서 서로 다른 EPC를 보고하는 것으로 미루어, 최소한 두 종류의 서로 다른 EPC가 있음을 알 수 있다.

현재까지 그러한 두 종류의 EPC를 동시 배양에 성공하고 두 세포간의 혈관신생 능력을 비교 연구한 보고가 없었다. 따라서 본 연구에서 저자들은 한 공여자로부터 두 종류의 서로 다른 EPC를 배양하였고, 이들 두 세포간의 혈관신생능력을 비교하여보았다.

단핵구의 분리

본 연구에 사용된 검체의 획득을 위해 본 실험의 모든 내용은 서울대학교병원 IRB(institutional review board)의 승인을 얻었다. 기증자의 동의를 얻어 말초혈액 50 mL씩을 공여 받았다. 단핵구는 Histopaque 1077 (Sigma ; St. Louis, MO)을 사용하여 밀도구배 분리하였다.

세포배양

분리된 단핵구를 EGM-2 BulletKit system(Clonetics® Walkersville, USA : catalog number CC-3162 ; endothelial basal medium, 5% fetal bovine serum, hEGF, VEGF, hFGF-B, IGF-1, ascorbic acid and heparin을 포함함)으로 배양하였다. 2% gelatin (Sigma ; St. Louis, MO)을 입힌 6-well plate에 1×10^7 개/well로 분주한 후, 37도, 5% CO2 배양기에서 배양하였다. 세포 분주 후 약 6일경에 배지를 교환하였고, 이후 3일에 한번씩 배지를 교환하였으며, 매일 관찰하였다.

혈관내피세포의 특성 확인

이전의 보고에서와 같이, DiI-acLDL (molecular probe; Eugene, USA) 섭취와 Ulex europaeus agglutinin (UEA)-1 lectin 결합 여부를, 두 가지 EPC에서 각각 확인하였다.

성장곡선

본 연구자들이 명명한 초기 EPC는 1×10^7 개/well의 단핵구로부터 분화되었고 첫 번째 배지 교환 후부터, 8주간 위상차현미경을 통해서 관찰하였다. 함께 명명한 후기 EPC는 세포 분주 후 약 2주 후에 초기 EPC와는 다른 군집 형태로 나타났다. 초기 EPC의 사이사이에 있는 후기 EPC의 세포 군집들을 Trypsin 처리 후, 새로운 100 mm 배양접시에 옮겨 배양하였다. 그 후, 순수하게 후기 EPC만 있는 것을 확인한 후, 12주까지 배양하였다(n=4). 후기 EPC와 성숙한 혈관세포와의 성장능력을 비교하기 위하여, 적출된 인간의 위 조직에서 박리해 낸 위대망동맥(gastroepiploic artery)으로부터 혈관내피세포를 분리 배양하였다. 이하(gastroepiploic)

artery endothelial cell, GEAEC)라 하다. EPC와 GEAEC를 각각, 1×10^4 개의 세포를 gelatin을 입힌 100 mm 배양접시에 옮겨 12주 동안 세포의 수를 측정하였다.

증식능력과 생존능력 측정

초기 및 후기 EPC와 GEAEC를 각각 1×10^4 개씩 96-well 배양접시에 분주 한 후, 세포 증식능력 조사를 위해서는 EGM-2 배지를, 세포 자살에 대한 저항능력 조사를 위해서는 EBM-2배지를 이용하여 전체 200 μ L 양이 되게 배양하였다. 48시간 후, 각 세포군의 증식을 20 μ L의 WST-1 (Roche molecular biochemicals) 용액을 각 well에 첨가하여 각 세포군의 증식을 비교하였다.

유세포분석기(Fluorescence-activated cell sorter analysis)를 통한 세포표면항원 분석

EPC를 배양함에 따라 변화하는 각 세포표면항원을 유세포 분석기로 조사하였다.¹⁰⁾ 실험에 사용된 일차 항체들은 다음과 같다; anti-CD31 (DAKO, Denmark), anti-VEGFR-2(KDR) (Sigma), anti-VE-Cadherin (BD PharMingen; San Diego, CA), anti-CD45 (DAKO).

역전사효소 연쇄증합 사슬반응 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

혈관내피 전구세포 특이적 유전자(eNOS, Flt-1, KDR, VE-Cadherin and vWF) 변화를 조사하기 위하여, 제조 회사의 지침대로 Trizol Reagent (Gibco BRL)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. 첫 번째 cDNA 가닥은 Reverse Transcription System (Promega)을 사용하여 합성하였으며, 전체 25 μ L 반응 혼합물을 NOVA-Taq DNA polymerase (Genenmed)를 이용하여 PCR 증폭(CyclerTM; MJ research)을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다; 5 minutes of denaturing at 94°C, 40 cycles of 30 seconds of denaturing at 94°C, 30 seconds of annealing at 60°C, 30 seconds of extension at 72°C, 그리고, 마지막으로 extension step of 5 minutes을 수행하였다. 본 실험에 사용된 primer 들은 다음과 같다; aagacatttctgggctcac/ggcactttagtagttctcc for e-NOS(548 bp), agcaagtgggagtttg/agtcccgatgaatgc for Flt-1(617 bp), ctggcatgtctctgtg/aatgggattgtaaggatg for KDR(629 bp), aagac-

atcaatgacaacttcc/cctccacagtcaggttatacc for VE-Cadherin(594 bp), gaggctgagtttgaagtgc/ctgctccagctcattccac for vWF(477 bp) and cgtggaaggactcatgac/caaatcgtgtgcataccag for GAPDH(446 bp).

Nitric oxide 생산능력 비교

세포 내의 Nitric oxide(NO) 생산능력을 분석하기 위해서 세포막의 NO-특이적 표지자인 diamino-fluorescein-2 diacetate(DAF-2 DA; Daiichi, Tokyo, Japan) 형광물질을 이용하였다. 각각의 EPC를 Ca^{2+} -free PBS로 부드럽게 세척한 후, L-arginine(1 mM)과 DAF-2DA(10 μ M)를 함유한 Krebs-Henseleit buffer를 이용하여 15분 동안 배양시켰다. 재조합 human VEGF165(50 ng/mL)를 각 well에 첨가한 후, 37도 배양기에서 15분간 추가로 배양하였다. 각 세포의 형광강도를 비교하면 발생한 NO의 양을 정량적으로 비교 할 수 있는데 이를 위하여, 형광현미경의 노출시간을 고정하여 영상을 얻은 후, Image-Pro Plus[®](Media-Cybernetics; www.mediacy.com)를 이용하여 각 세포의 형광강도를 정량적으로 얻어 분석하였다.

제대정맥내피세포(HUVEC) 단층배양내로 혈관내피 전구세포의 편입능력 비교 실험

6 well 배양접시에 HUVEC을 단층배양한 후, green fluorescent protein(GFP)을 발현하는 아데노바이러스를 감염시킨 각각의 EPC를 1×10^5 개씩 각 well에 분주 하였다. 3시간 배양 후, PBS를 이용하여 각각의 세포를 부드럽게 세정한 후, 무작위로 네 지점을 선정하여 HUVEC 단층배양에 통합된 EPC의 수를 측정하였다.

Matrigel을 이용한 시험관내 혈관형성능력 비교.

Matrigel[®](Becton Dickinson Labware) basement membrane matrix를 chamber slide의 각 well에 골고루 입혔다. 한 시간 동안 37도 배양기에 넣어 둔 후, EGM-2배지 500 μ L를 이용하여 각각 2×10^4 개의 세포를 분주 하였다.

12시간 후, 무작위로 4곳을 선정하여, 일정 단위 공간에서 세포에 의해 형성된 완전한 tube들의 전체 면적의 평균을 Image-Pro Plus[®]로 비교 분석하였다.

EPC 단독배양을 통해서 EPC자체의 tube 형성능력을 알아보고자 하였고, HUVEC과 공배양을 통해서 기

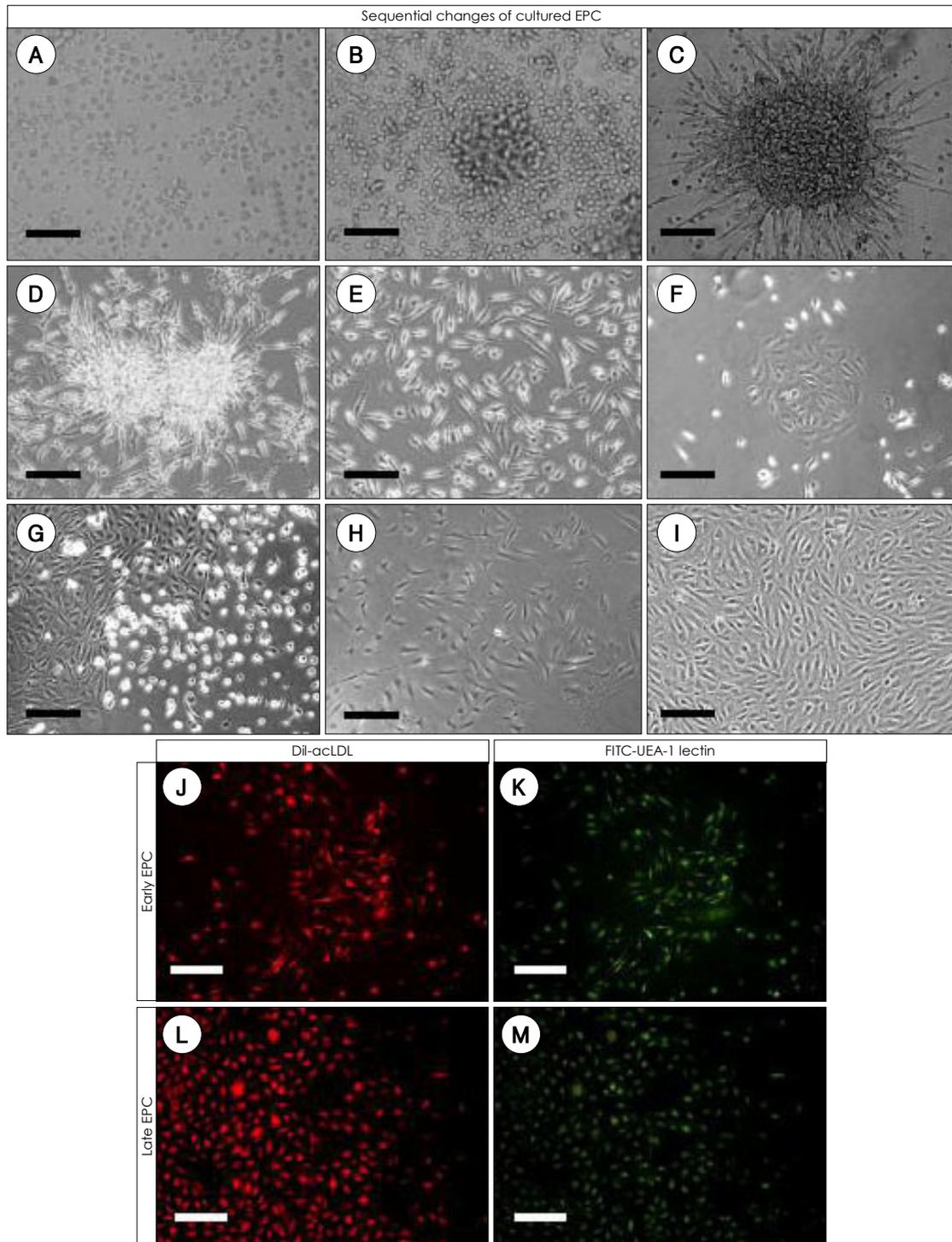


Fig. 1. Sequential changes of cultured EPC. A: peripheral blood mononuclear cells right after plating; scale bar, 100 μ m. B: one day after seeding. C: three days after seeding. D, E: ten days after plating. F: three weeks after plating. G: late EPC grew exponentially. H: late EPC which were selected and reseeded. I: late EPC grew to confluence showing a cobblestone-like monolayer. J, K: early EPC taking up DiI-acLDL and stained by FITC-labeled UEA-1 lectin. L, M: late EPC. EPC: endothelial progenitor cell.

존 혈관내피세포와의 상호 협동에 의한 tube 형성능력을 알아보고자 하였다. 공배양은 GFP를 발현하는 아테로노바이러스를 EPC에 감염시킨 후 HUVEC과 동일한 수의 세포를 섞어 시행하였다.

통계분석

통계처리는 SPSS 11.0 version을 이용하였으며, 모든 자료는 평균과 표준오차로 표시하였다. 그룹간의 비교는 Student t-test나 ANOVA로 하였고 p값이 0.05미만 일 때 통계적인 의미가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

두 가지 형태의 혈관내피 전구세포

전체 단핵구는 분주한 직후에는 둥근 형태였다(Fig. 1A). 3~4일이 경과한 후, 배양접시 바닥에 붙은 세포들로부터 세포괴가 형성되었다(Fig. 1B, C). 세포괴는 방추형의 모양으로 Asahara¹⁾가 처음으로 보고한 EPC와 동일한 형태였고, 이러한 세포들을 초기 EPC라 명명하였다. 초기 EPC는 약 2주간 그 수가 계속적으로 증가하였으나, 4주가 경과된 이후부터는 서서히 사라져가는 양상이었다. 본 연구자들은 또 다른 모양과 성장양상을 보이는 세포들을 관찰할 수 있었다. 이러한 세포들은 분주 후 약 2~4주경부터 관찰되었으며(Fig. 1F), HUVEC과 유사하여 세포표면이 부드럽고 조약돌모양이었다(Fig. 1G, H, I). 이 세포들은 빠른 증식능력으로 몇몇 세포로부터 군집을 형성하였으며, 곧 세포단층을 이루었다. 이 세포들을 후기 EPC라 명명하였다. 후기 EPC의 경우 모두 검체에서 나타나는 것은 아니었다. 본 연구자들이 수행했던 22명의 성인말초혈액 검체 중 11명의 검체에서 후기 EPC를 얻을 수 있었고, 본 실험에 사용하지 않았으나, 제대혈 검체의 경우는 분리 배양했던 6검체 모두에서 후기 EPC가 나타났다. 성인 검체의 경우 관상동맥 질환 유무로 나누어 빈도를 살펴보면 관상동맥 질환이 없는 공여자 12명 중 3명의 검체에서 후기 EPC가 출현한데 반해, 관상동맥 질환이 있는 공여자 10명 중 8명의 검체에서 후기 EPC가 분리되어 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fisher's exact test, p=0.03). 이러한 두 가지 형태의 세포들은 DiI-acLDL 섭취(Fig. 1J, I)와 UEA-1 lectin 결합(Fig. 1K, M)을 하여 혈관내피세포의 특성을 가지고 있었다.

두 가지 형태 혈관내피전구세포의 증식능력, 생존력 연구

말초혈액과 GEAEC의 공여자들의 평균 나이는 56.3±5.6와 55.3±6.3세로 유사하였다. 말초혈액 50 cc로부터 얻은 초기 EPC의 수는 대략, $3 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$ 이었으며, 3주 경에는 약 5×10^5 까지 증식 후, 서서히 죽어갔다.

전체 단핵구 배양 2주 후에 나타난 후기 EPC 1×10^4 을 배양접시에 분주하니 12주경에는 $1 \times 10^{11} \pm 9 \times 10^{10}$ 에 이르렀다(Fig. 2A). 만개의 GEAEC를 후기 EPC와 같은 방법으로 시험관에 분주 후 추적 관찰하니 후기 EPC보다 느린 증식능력을 보였고 곧 세포가 죽어가는 것이 관찰되었다. WST-1 검사에 의해 후기 EPC가 초기 EPC나 GEAEC보다 빨리 증식함을 증명하였고 세

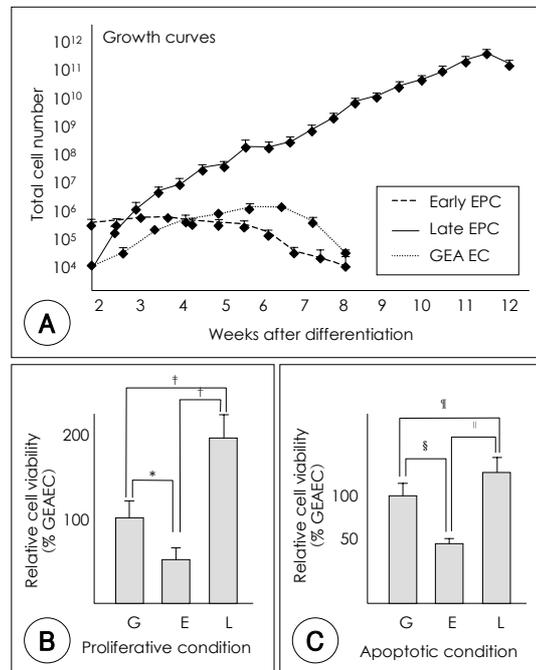


Fig. 2. Differences in proliferating or survival potential among three kinds of cells, early, late EPC, and mature endothelial cell. A: growth curves of both types of EPC and mature arterial endothelial cells. The number of early EPC, broken line; late EPC, solid line; the mature endothelial cells, GEA EC (endothelial cells of gastroepiploic artery), dashed line. B: assessment of proliferation potential by WST-1 assay in 5% FBS condition. the proliferation rate was compared among early EPC, late EPC and GEAEC and represented with relative % to GEAEC. The difference was statistically significant when analyzed by ANOVA. G: GEAEC; E: early EPC; L: late EPC. *, †, ‡: p<0.001 C: assessment of apoptosis resistance in serum-starvation condition showed similar result to proliferation in growth medium. §, ¶: p<0.001, ¶: p=0.04.

포자살을 혈청이 없는 배지에서 키우며 분석하여 보면 후기 EPC가 가장 저항성이 큰 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B, C).

두 가지 혈관내피 전구세포의 서로 다른 내피세포 특이적 유전자 발현과 Nitric oxide 형성능력

새로 분리한 단핵구세포는 Flt-1과 e-NOS, vWF를 발현하였다(Fig. 3A). 배양 후 10일 쯤에 VE-cadherin

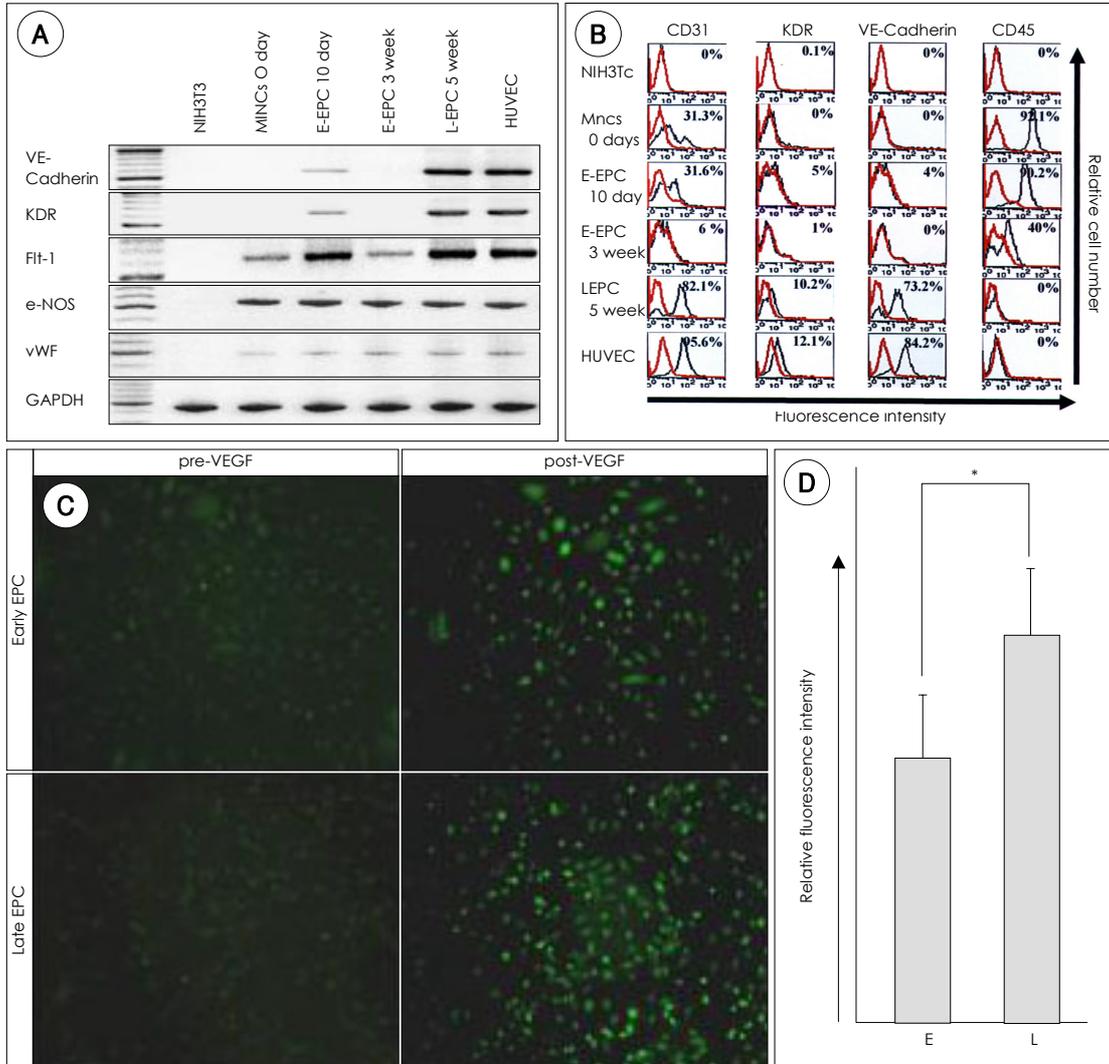


Fig. 3. Differences in gene expression pattern leading to the functional differences between early and late EPC. A: different patterns of endothelial cell-specific gene expression between early and late EPC by RT-PCR. NIH 3T3 fibroblasts were used as a negative control and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a positive control. GAPDH served as internal standard. MNCs 0 day fresh mononuclear cells, E-EPC 10 day: the early EPC 10 days after plating, E-EPC 3 week: the early EPC after 3 weeks after plating, L-EPC 5 week: the late EPC 5 weeks after plating. B: different pattern of cell surface markers between two types of EPC by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. Fibroblast served as a negative control and HUVEC as a positive control. Plots show isotype control IgG staining profile (red line) versus specific Ab staining profile (black line). Values on x axes indicate intensity log. C: differences between the two types of EPCs in the ability to produce nitric oxide in response to VEGF by DAF-2 DA staining. D: transformed graph. The intensity of the fluorescence of each cell is the vertical length of each line in the graph. The summation of the line let us compare the intensity of fluorescence between the two types of EPC. E: early EPC, L: late EPC. *: p=0.029.

과 KDR이 약하나마 발현하여 초기 EPC로 분화되고 있는 것을 알 수 있었고 Flt-1의 발현도 강해졌다. 초기 EPC에서 이러한 내피세포 특이 유전자의 발현은 배양

3주경에 이르러 발현이 감소하는 것이 관찰되었다. 그러나 후기 EPC의 경우는 배양 내내 VE-cadherin, Flt-1, KDR, e-NOS, vWF 등의 발현이 강하게 나타났다. 세포

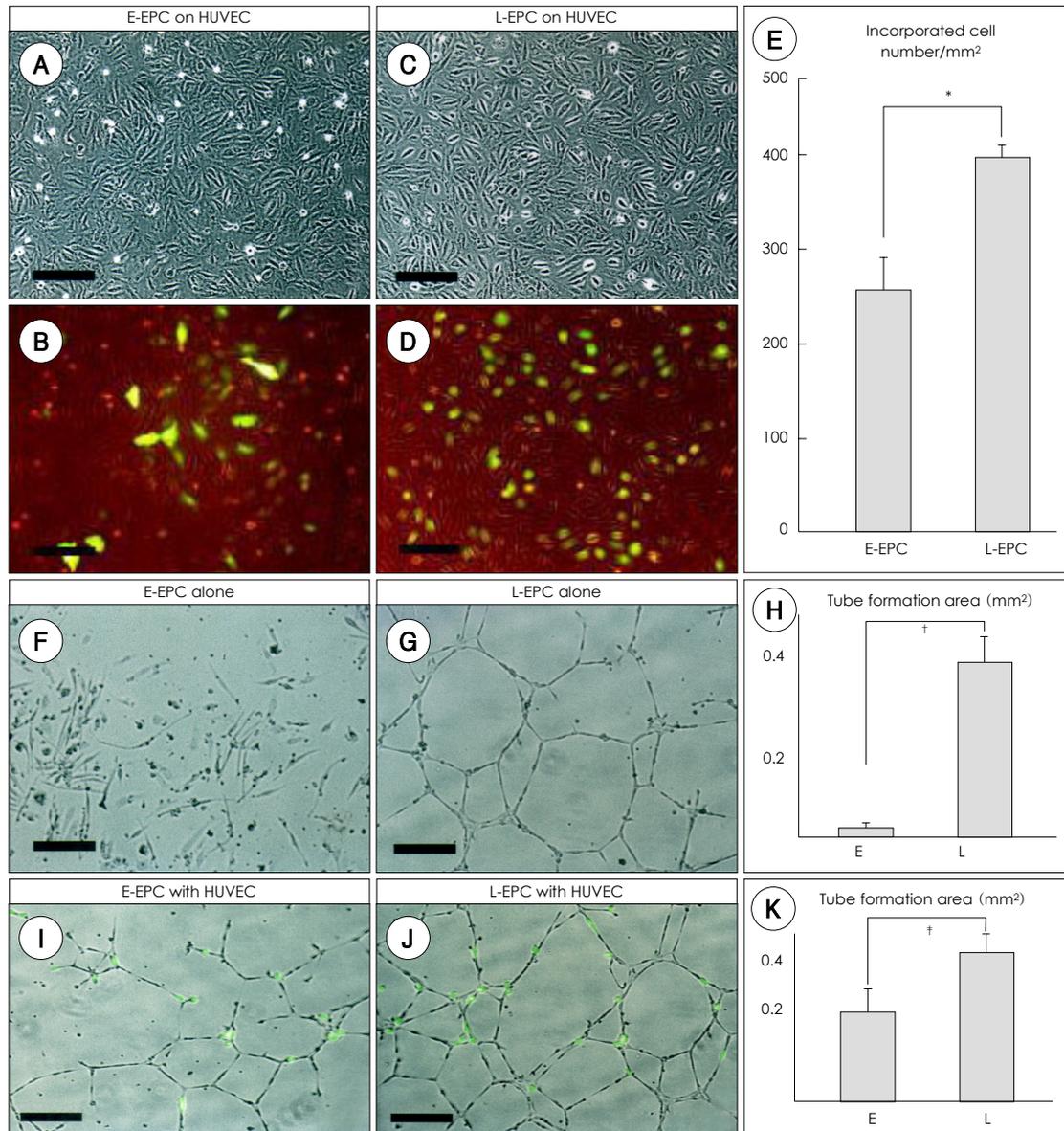


Fig. 4. Differences between the two types of EPC in the ability to incorporate into HUVEC or to form tube on the Matrigel in vitro. A–E: in vitro incorporation of EPC into HUVEC monolayer. A, C: the bright field image of early EPC and late EPC respectively added to HUVEC. B, D: the same dark field image. B: early EPC were GFP-positive. D: late EPC were GFP-positive. E: graph represents the difference of the number of cells that incorporated into HUVEC. F–J: capillary tube formation on Matrigel. F: only early EPC. They seldom made a tube form. G: only late EPC. H: the complete tube area in unit area made by each group is shown in the graph. E: early EPC. L: late EPC. I, J: green fluorescent cells were early EPC on I and late EPC on J respectively which were transfected by ad-GFP, and non-fluorescent cells were HUVEC. They harmoniously made tubes on Matrigel but late EPC did better than early EPC. K: quantitative comparison of the complete tube area in unit area made by each group. *: $p < 0.001$, †: $p < 0.001$, ‡: $p = 0.008$. Scale bar, 100 μ m.

표면항원의 경우 말초혈액의 단핵구는 CD31과 CD45를 발현하였다(Fig. 3B). 백혈구 표지자인 CD45는 배양을 하면서 점차 사라져 후기 EPC의 경우는 발현되지 않았고, VE-cadherin이나 KDR의 경우는 점차 증가되었다. CD31의 경우는 초기 EPC에서는 감소하다가 후기 EPC로 가서는 증가하는 변화를 보였다. 두 가지 EPC 모두 VEGF에 반응하여 Nitric oxide를 생성하였으며, 이는 DAF-2DA로 확인하였다(Fig. 3C). 형광의 강도를 비교하여 nitric oxide의 생성능력을 비교하였으니, KDR을 강하게 발현하는 후기 EPC가 NO를 더 많이 발생하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3D).

시험관 내에서 두 가지 EPC의 기능적 차이

단순히 혈관내피세포 사이로 부착하여 자라는 능력을 평가하기 위해 시행한 HUVEC 단층배양으로의 편입은 초기 EPC와 후기 EPC가 모두 가능한 것으로 나타났으나(Fig. 4A-D), 초기 EPC에 비해 후기 EPC가 더욱 뛰어난 것으로 관찰되었다(Fig. 4E).

일정한 방향성을 가지고 모양변화를 나타내고 주변세포들과 융합할 수 있는 능력을 평가하기 위한 Matrigel tube 형성능력 평가에서 두 세포의 모세혈관 형성능력은 매우 다르게 나타났다. 후기 EPC는 HUVEC과 동일한 정도의 모세혈관 형성능력을 나타낸 반면(Fig. 4G), 방추형의 초기 EPC는 관 모양의 구조를 이루지 못하였다(Fig. 4F). 이를 비교하기 위하여, 일정단위면적내의 완전한 tube 면적을 분석하였다(Fig. 4H).

기존의 혈관내피세포와 협동하는 혈관신생능력의 평가를 위해 시행한 EPC와 HUVEC의 Matrigel 공배양에서는, 두 EPC 모두 방향성을 가지고 HUVEC과 결합하여 tube의 한 변을 이루는 등 HUVEC과 조화를 이루며 모세혈관을 형성 하였다(Fig. 4I, J). 그러나 초기 EPC가 후기 EPC에 비하여 형성한 tube의 면적이 적어 저조한 tube 형성능력을 보였다(Fig. 4K).

고 찰

저자들은 성인 말초혈액으로부터 두 가지 다른 양상의 EPC를 동시에 배양하였으며, 출현 시기에 따라 각각 초기 EPC와 후기 EPC라 명명하였다. 이 두 가지 세포는 혈관내피세포의 특성을 일부 공유하였으나 모양뿐만 아니라 증식능력과 생존능이 달랐다. 또한 유전자 발현 양

상이 다르고, VEGF에 반응하여 nitric oxide를 생성하는 능력이나 Matrigel위에서 tube 형성능력, 또 HUVEC 단층배양에 편입하는 능력 등에서 차이를 보였다.

Asahara 등¹⁾은 처음으로 성인 말초혈액에서 EPC를 보고하였는데 그 이후 많은 연구들이 표면항원이나 배양 방법에 있어 약간씩의 차이를 보이는 EPC를 보고하였다.⁸⁾¹¹⁾¹²⁾ 이러한 사실은 EPC라 불리웠던 세포들이 이질적임을 시사하며 EPC자체의 정의도 모호하다는 것을 알 수 있다. EPC의 이질성을 확인하기 위해 우리는 표면항원으로 특정 세포군을 분리한 후 배양하지 않고 전체 단핵구를 배양하였다. 그리하여 한 검체에서 순차적으로 배양되는 두 가지 다른 세포군을 볼 수 있었다. 그 중 한 가지는 Asahara가 보고한 EPC¹⁾¹¹⁾¹²⁾와 많은 성상을 공유하는데 저자들은 이를 초기 EPC라 하였고, 후기 EPC라 명명한 것은 Lin⁷⁾ 또는 Reyes 등⁸⁾이 보고한 세포한 유사하였다.

Murasawa 등¹³⁾은 최근 아테노바이러스를 이용하여 telomerase reverse transcriptase를 유도 발현시켜 초기 EPC가 후기 EPC와 유사한 세포로 분화함을 보고하였다. 그러나 저자들은 어떠한 유전자 조작도 거치지 않고 후기 EPC를 얻어내어, telomerase reverse transcriptase의 발현이 후기 EPC를 얻는데 꼭 필요한 것은 아님을 알 수 있었다.

후기 EPC의 경우 출현 빈도가 정상 성인에서 25%에 지나지 않는데 이는 말초혈액에 극소수만 존재하기 때문일 것으로 보인다. 또한, 저자들 경험에 의하면 철저한 관찰을 통하여 후기 EPC의 군집이 형성된 초기에 후기 EPC를 초기 EPC로부터 선택적으로 분리해 내어 배양하는 것이 후기 EPC를 얻는데 중요하였다.

후기 EPC의 출현 빈도가 관상동맥 질환 유무와 밀접한 관계가 있었는데, 이는 이전 보고에서 허혈이 있는 경우 EPC의 동원이 증가된다는 사실과 부합한다.¹⁴⁾ 정상 성인에서는 말초혈액에 극소수가 존재하지만 이렇게 동원을 통하여 늘어난 후기 EPC는 허혈장기의 신생혈관 형성에 다수가 참여할 것으로 추정된다.

한편, Reyes 등⁸⁾은 초기 EPC와는 세포표지자나 모양에서 상당히 다른 골수유래의 MAPC를 보고하면서 우리의 후기 EPC로 분화시킬 수 있음을 주지하였는데 그 분화과정에서 초기 EPC가 있었는지의 여부는 보고하지 않았다. 따라서 아직 초기 EPC와 후기 EPC간의 관계는 명확하지 않다고 할 수 있다.

두 가지 EPC간의 세포 생물학적 차이

초기 EPC는 길어야 3~4주라는 짧은 기간동안만 배양가능하며 이는 이전의 보고와 유사하다.¹¹⁾¹²⁾ 반면, 후기 EPC는 장기간 배양가능하며 급속히 증식하며 유사한 세포를 배양했던 이전의 또 다른 보고와 비슷함을 알 수 있다.⁶⁾⁷⁾⁸⁾ 그러나 후기 EPC는 단순히 완전 분화된 혈관내피세포로 여겨져 왔다. 저자들은 이에 대해 의문점을 가지고 후기 EPC와 GEAEAC와의 성장 속도와 세포 노화를 비교하였다. 검체를 제공한 공여자의 연령이 유사하였음에도 불구하고 후기 EPC가 보다 빠르게, 오랫동안 증식하여 단순히 혈관벽에서 떨어져 우연히 배양된 세포가 아니며 성체줄기세포에서 갓 분화된 EPC임을 간접적으로 알 수 있었다.

두 가지 EPC의 유전자 발현형의 차이

갓 분리한 단핵구는 CD45 뿐만 아니라 Flt-1, eNOS, vWF, CD31 등을 발현하였다. 따라서 뒤의 네 가지 유전자는 혈관내피세포 특이성이 약함을 알 수 있다. 이러한 단핵구의 유전형은 시험관 내에서 배양 후 크게 두 가지 방향으로 변화한다. 초기 EPC의 경우 점차 CD31과 CD45를 잃어가며 발현이 없었던 KDR과 VE-cadherin은 배양 10일경 약하게 발현하였다가 3주경에는 사라진다. 이러한 유전형의 변화는 1997년 Asahara의 보고와 일치한다.¹⁾ 그러나 초기 EPC의 유전형에 대하여는 다양한 보고가 있다. 예를 들면 KDR, CD14, Flt-1 등의 발현양상은 여러 연구진들 간에 차이를 보인다.¹¹⁾¹⁰⁻¹²⁾ 이러한 사실은 초기 EPC가 이질적인 세포군이며 줄기세포에서 성숙한 세포로 분화하는 과정의 많은 세포들이 섞여있는 집합체일 수 있음을 시사한다. 대조적으로 후기 EPC는 HUVEC과 많은 유전형을 공유하여 상당히 분화된 동질적인 세포군임을 알 수 있다.

시험관 내에서의 두 가지 EPC간의 기능상의 차이

위에서 살펴본 유전자 발현형의 차이가 실제 혈관신생능력의 차이로 나타나는 것을 몇 가지 시험관내 실험을 통해서 살펴 볼 수 있었다.

혈관세포 성장인자인 VEGF는 KDR 수용체를 통하여 내피세포에서 nitric oxide를 생산하게 한다.¹⁵⁾ 두 가지 EPC의 nitric oxide의 생산이 서로 다른 이유는, KDR 수용체 발현양이 서로 다른 것에서 기인하는 것으로 설명될 수 있다. 뿐만 아니라, 그러한 내피세포에서의 KDR

수용체의 발현이 VEGF 매개에 의한, Matrigel에서의 모세혈관형성에 중요한 영향을 미친다는 사실은 잘 알려져 있다.¹⁶⁾ 따라서, 후기 EPC에서의 Matrigel에서의 뛰어난 혈관생성능력은, 높은 수준으로 발현하는 KDR 수용체가 그 역할의 일부를 담당할 것으로 생각된다.

VE-cadherin은 혈관내피세포의 밀착접합(adherens junction)부위에 특이적으로 발현되며, 세포간의 접합에 매우 중요한 기능을 한다.¹⁷⁾ 따라서, 후기 EPC에서 VE-cadherin의 높고, 지속적인 발현으로 인하여, 초기 EPC보다 뛰어난 HUVEC 단층배양으로의 편입능력을 보인 것으로 추정된다.

요 약

배경 및 목적 :

이전의 연구를 통하여 혈관내피전구세포(EPC)가 하나의 세포군이 아니라는 것을 추정하였다. 본 연구는 이러한 서로 다른, 혈관내피전구세포를 규명하기 위하여 수행되었다.

방 법 :

동일 혈액제공자로부터, 두 가지 종류의 혈관내피 전구세포를 순차적으로 얻기 위하여, 인간 말초혈액으로부터 전체 단핵구를 혈관신생조건하에서 배양하였다. 각 세포들의 발생시간에 따라 초기와 후기 혈관내피전구세포라 명하였다.

결 과 :

초기 EPC는 spindle 모양으로 2~3주까지 증식 후 약 4주 이후부터 사라져 가는 반면, 후기 EPC는 cobblestone 모양으로, 2~3주에 처음 나타나서 4~8주까지 폭 발적으로 증가하여 약 12주까지 증식한 후, 사라져 간다. 후기 EPC는 VE-cadherin, Flt-1, KDR을 초기 EPC보다 높은 수준으로 발현하였고, CD45는 초기 EPC와 달리 발현하지 않았다. 후기 EPC는 초기 EPC에 비해 뛰어난 Nitric oxide 생산능력과 HUVEC 단층배양으로의 편입, 시험관 내 모세혈관형성능력을 가진다.

결 론 :

이전의 EPC에 관한 연구들은 두 가지 세포 중 한 가지씩만을 보고하였으나, 본 연구는 성인 말초혈액으로부터 두 가지 형태의 EPC를 동시에 배양하고, 각 세포의 특성을 분석한 첫 번째 연구이다. 저자들은 서로 다른 형태의 두 가지 혈관내피전구세포를 성인으로부터 분리하

였으며, 그것들은 서로 다른 유전적, 기능적 차이로 인하여 성인의 혈관신생에 각각 다른 역할을 할 것으로 추정된다.

중심 단어 : 줄기세포 ; 혈관내피 전구세포 ; 혈관세포 ; 혈관신생 ; 세포 치료요법.

■ 감사문

This study was supported by a grant from the Korea Health 21 R & D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea(02-PJ10-PG8-EC01-0026 [Dr. Hyo-Soo Kim]) and a grant from Stem Cell Research Center, Republic of Korea (M102KL010001-02K1201-01810 [Dr. Young-Bae Park]).

REFERENCES

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science* 1997;275:964-7.
- 2) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM, Asahara T. *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med* 1999;5:434-8.
- 3) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J* 1999;18:3964-72.
- 4) Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. *Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. Ann NY Acad Sci* 2001;938:36-45
- 5) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation* 2001; 103:634-7.
- 6) Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood* 1998;92:362-7.
- 7) Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. *Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J Clin Invest* 2000; 105:71-7.
- 8) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest* 2002;109:337-46.
- 9) Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM. *Mouse model of angiogenesis. Am J Pathol* 1998;152:1667-79.
- 10) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3422-7.
- 11) Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. *CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. Stem Cells* 2001;19:304-12.
- 12) Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. *Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in matrigel under angiogenic conditions. Cardiovasc Res* 2001;49:671-80.
- 13) Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. *Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. Circulation* 2002;106:1133-9.
- 14) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. Circulation* 2001;103:2776-9.
- 15) He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. *Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. J Biol Chem* 1999;274: 25130-5.
- 16) Murota SI, Onodera M, Morita I. *Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. Ann NY Acad Sci* 2000;902: 208-12.
- 17) Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. *A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. J Cell Biol* 1992;118:1511-22.