

신생원쥐의 심장근육층내 혈관형성과 von Willebrand factor의 분포에 대한 연구

이방헌¹, 백두진, 김원규, 정호삼

¹한양대학교 의과대학 내과학교실, 해부·세포생물학교실

간추림 : 신생원쥐의 심장근육조직에서 최초의 혈관형성의 형태와 시기를 추적하기 위해 중간엽세포가 혈관내피 세포로 분화될 때 합성분비하는 von Willebrand factor (vWf)의 활성을 관찰하고자 하였다. 출생후 1일부터 7일까지의 신생원쥐를 실험동물로 사용하였으며, 심장조직을 전체를 동결하여 14~20 μ m 두께의 동결절편을 제작하고 vWf를 추적하기 위해 goat anti-von Willebrand factor와 biotinylated rabbit anti-goat IgG를 사용하여 면역염색을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 출생 제 1일의 신생원쥐의 심장조직에서 심장속막 및 바깥막의 세포밖바탕질에 중등도의 vWf 면역반응이 나타났고 심장근육층의 세포밖바탕질에는 약한 반응을 보였다.
2. 출생 제 2일의 신생원쥐 심장조직에 처음으로 소수의 혈섬이 형성되고 출생 제 4일의 심장의 대부분에서 혈섬이 형성되었으며 세포밖바탕질에도 중등도의 vWf 면역반응이 나타났다.
3. 출생 제 7일의 심장근육층에 소수의 혈관이 형성되어 있었고 혈관내피세포와 세포밖바탕질에 중등도의 vWf 면역반응이 관찰되었다.

이상과 같은 출생 초기의 심장조직은 중간엽세포에서 혈섬과 심장근육세포로 분화되면서 세포밖바탕질내 vWf 분포가 증가되고 이때 혈관 형성이 시작되는 것으로 생각되었다.

찾아보기 낱말 : 신생원쥐, 혈관형성, von Willebrand factor, 심장

서 론

사람의 혈관은 발생 3주가 시작될 때 배아밖 중배엽, 연결줄기 및 용모막에서 최초로 혈관이 형성된다고 알려져 있다. 이때 배자조직내 중간엽세포인 혈관모세포(angiolast) 수개가 응집되어 혈섬(blood island)이 형성되고 이 세포사이의 공간이 넓어져 혈관 내강이 되며 혈섬의 혈관모세포는 원시내피세포로 분화된다. 내피세포의 융합으로 내피도관의 틀이 형성되고 다른 혈섬과 융합되어 혈관이 형성되는 것

으로 알려져 있다(Moore와 Persaud 1993). 따라서 조직내 최초의 혈관 추적은 원시내피세포의 존재를 추적하면 가능할 것으로 생각되어 진다.

많은 학자들은 혈관의 내피세포와 거대핵세포(megakaryocytes)에서 당단백질인 von Willebrand factors (vWf)가 세포내 소기관인 rER에서 합성되고, Weibel-Palade body와 혈소판의 α 과립에 저장된다고 주장하였다(Gebrane-Younes 등 1988, Reinders 등 1988, Bahnak 1989, Meyer 등 1990, Mein-koth 등 1995, Zanetta 등 2000, Morange 등 2004).

한편 일부 학자들은 vWf는 혈장내 분포되어 있는 단백질로서 항상성에 미치는 몇가지 기능이 있다고 하였다. 그 하나는 혈액응고 작용으로, 혈소판응집을 조정하는 coagulation factor VIII를 수송 혹은 보

*이 연구의 일부는 2001년 한양대학교 교수연구비에 의해 이루어 졌음

교신저자: 정호삼(한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)

전자우편: junghs@hanyang.ac.kr

호하며, vWf는 혈관의 내피세포와 골수의 거대핵세포에서 합성된다고 주장하고 있다(Rand 등 1987, Wu 등 1987, Cho와 Ouriel 1995, Denis 2002, Sugimoto와 Miyata 2002).

심장병, 급성 혹은 만성 간질환을 앓고 있는 환자의 혈장내에서는 vWf의 함량이 증가되는데, vWf는 심장병 및 간의 손상을 회복하는 데 어떠한 역할을 할 것으로 믿고 있는 연구자가 많다. 심방세동(atrial fibrillation) 환자의 심장속막에 vWf가 증가되고, 심장의 재구성(atrial structural remodeling)과 간에서 조직재구성(tissue remodeling)시에도 글모세혈관(sinusoid)내 vWf 면역반응이 증가된다는 연구발표는 심혈관 질병시에 vWf의 증가는 혈액응고작용 외에도 여러 주요한 역할이 있다고 하였다(Reidy 등 1989, Knittel 등 1995, Baruch 등 2002, Kumagai 등 2004).

저자들은 흰쥐 심장의 심실벽내 혈관의 형성과정 시기를 측정하기 위해 신생흰쥐 심실의 중간근육층내의 중간엽세포의 변형에 의한 혈관형성의 형태와 중간엽세포가 원시내피세포로 변형될 때 내피세포에서 분비되는 vWf를 면역염색하여 혈관형성의 시기를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐 암수 3쌍을 합사시킨후 임신 및 출산시킨 후 각 연령에 따라 신생흰쥐 21마리를 출생 제 1일부터 제 7일까지 7그룹의 실험군으로 나누고 각 실험군에 신생흰쥐 3마리를 배정하였다.

2. 실험동물 처치

각군에 배치된 신생흰쥐를 희생시켜 심장조직을 절취하여 14~20 μ m 두께의 동결절편을 제작하였다.

3. 면역조직화학염색

14 μ m 두께의 동결절편을 실온에서 30분 건조시킨 뒤, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 세

척하고, 0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 용액에 30분 동안 고정하였다. PBS로 20분간 세척한 뒤 3% 과산화수소가 들어있는 메탄올 혼합용액에 5분간 처리하였다. PBS로 세척하고, blocking 용액으로 37°C에서 1시간 처리하였고, 일차항체 goat anti-von Willerbrand factor (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:50으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이차항체 biotinylated rabbit anti-goat IgG (Vector Lab., USA)를 실온에서 40분, ABC 용액(Vector)을 실온에서 30분 반응시킨 뒤, DAB kit(Vector)를 이용하여 발색시킨 다음 1% methyl green 용액으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다. 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조염색을 시행하여 면역반응의 특이성을 확인하였다.

결 과

1. 대조군

흰쥐 심장에서 vWf의 면역반응은 심실의 심장속막과 심장근육층의 세포밖바탕질(extracellular matrix, ECM)에서 중등도로 관찰되었고, 심장바깥막과 바깥막 아래층의 세포밖바탕질에도 중등도로 관찰되었으며, 심장의 바깥막에 분포되어 있는 혈관의 주위는 강하게 관찰되었다(Fig. 1).

2. 음성대조군

출생 제 2일군의 흰쥐 심장에서 심실의 근육층에서는 근육세포가 균일하게 분포되어 있으며 1차 항체를 제외하고 반응시켰을때 vWf의 면역반응이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 2).

3. 실험군

출생 제 1일군의 흰쥐 심장의 심실벽에서 vWf의 면역반응은 심장속막 및 심장바깥막에서 모두 중등도로 나타났고 심장근육층에서는 미약한 반응을 나타내었다(Fig. 3). 출생 제 2일군의 심장의 심실조직에서는 심장속막과 심장바깥막에서 vWf 면역반응이

중등도의 반응이 나타났고 심장근육층의 세포밖바탕질에서는 약하게 나타났으며, 포도송이 모양의 세포사슬(cell chain)이 소수 관찰되었다(Fig. 4). 출생 제4일근의 흰쥐 심장의 심실근육층에서는 다수의 세포사슬이 관찰되고 세포밖바탕질에는 중등도의 vWf 면역반응이 관찰되었다(Fig. 5). 출생 제7일의 흰쥐 심장에서는 심장근육층에 다수의 작은혈관이 관찰되었으며 작은혈관 주위의 혈관내피세포와 세포밖바탕질에 중등도의 vWf 면역반응이 관찰되었다. 이때 심장바깥막과 심장속막에서도 중등도 반응을 나타내었다(Fig. 6).

고 찰

많은 학자들은 vWf가 혈관의 내피세포와 골수내 큰핵세포가 합성하여 분비하는 물질이라고 여러 종류의 동물 실험을 통하여 증명하였다. 특히 Meyer 등(1990)은 혈관중에서도 정맥의 내피세포에서 동맥의 내피세포보다 더 많은 vWf를 합성한다고 주장하였다. Zanetta 등은 vWf는 내피세포에서 합성됨으로 혈관을 구분하는 데 주요한 요소로 활용할 수 있다고 하였다. 이것을 이용해 종양의 증식도 판별할 수 있다고 하였다. Reinders 등(1988)은 사람의 배꼽정맥을 배양하여 vWf의 분비와 저장에 대한 연구를 하였다. vWf를 내피세포의 진탕조직(homogenates)에서 분리하여 면역염색으로 확인하였다고 주장하였다. 이 염색현상은 정상적인 내피세포의 Weibel-Palade bodies의 것과 비슷하다고 보고하였다. 내피세포는 완전 생물학적으로 활성화된 vWf를 저장하고 있고, 저장과립의 크기와 수는 phorbol ester에 폭로되었을 때 더욱 증가된다고 하였다. Gebrane-Younes 등(1988) 그리고 Sugimoto와 Miyata(2002)는 vWf는 내피세포 외에 골수의 거대핵세포에서 합성되고 혈소판의 α 과립에 분포되며, α 과립은 Weibel-Palade 소체가 진화된 과립인 것 같다고 하였다. Bona(1989)는 von Willebrand disease는 vWf의 정량 및 정성적인 불량에서 기인된다고 하였다. Morange 등(2004)은 내피세포의 표식자로 내피세포가 분비하는 tissue factor pathway inhibitor, vWf 및 thrombom-

odulin 등을 지적한 바 있다. 특히 vWf의 혈장내 수치는 관상동맥 질병의 위험요소의 하나로 매우 중요하다고 하였다. Meyers 등(1990)은 면역조직학적 방법으로 정상적인 개와 Doberman pincher 개의 혈관내 vWf의 분포를 관찰한 결과 정맥, 소정맥, 소동맥 등의 내피세포에서 나타난다고 하였다.

Zanetta 등(2000)은 vWf는 내피세포가 합성하는 당단백의 일종으로 조직에서 혈관을 구분하는 데 주요한 요소로 활용한다고 하였다. 종양조직에서 혈관의 밀도는 충실성종양에서 예후인자로 이용되는 것은 아니지만 vWf의 mRNA 측정으로 혈관형성을 찾아낼 수 있다고 하였다. 따라서 종양에서 vWf mRNA의 양은 내피세포활성의 측정에 이용될 수 있다고 하였고, 이 방법의 신속성, 목적성, 감각성과 특수성은 혈관에서 일어나는 보다 급진적이고 높은 분화를 보이는 종양을 판별해내는 기본적인 일차적인 적용이 될 수 있다고 하였다. Wu 등(1987)은 젊고 정상적인 돼지의 폐동맥, 아래대정맥, 가슴대동맥 등에서 채취한 내피세포에서 vWf의 분포상태를 관찰한 결과 폐동맥의 내피세포에서는 관찰할 수 있으나 아래대정맥과 가슴대동맥의 내피세포에서는 관찰할 수 없었다고 하였다. Rand 등(1987)은 돼지의 혈관내 내피세포내에 vWf의 분포는 혈관에 따라 다르게 나타난다고 하였다. vWf는 건강하고 정상적인 혈관에도 모두 분포되는 것은 아니고, 폐정맥을 제외하고는 정맥에 지속적으로 분포하고 동맥에서는 폐동맥, 가슴대동맥의 맥관벽혈관 그리고 배대동맥의 끝부분을 제외하고는 분포되지 않는다고 하였다.

Denis(2002)는 vWf는 혈장단백질이며 2가지 주요기능이 있다고 하였다. 그 하나는 손상된 혈관벽에 혈소판응집을 조절하고, coagulation factor VIII를 수송하거나 보호하며, 내피세포에서 vWf는 자신의 저장과립인 Weibel-Palade 소체를 직접 형성할 뿐 아니라 다른 단백질에 직접 동반하는 분자로서 활동한다고 하였고, 내피의 자극으로 Weibel-Palade 소체는 원형질막으로 이동되고 이것의 내용물은 plasma milieu로 분비되고, vWf의 발현은 유전적 혹은 환경적인 요소에 의해서 여러 가지 다른 수위에서 조절될 수 있다고 하였다

Cho와 Ouriel(1995)은 동맥과 정맥에서 일어나는

혈액응고에는 차이점이 있으며 임상적인 증거도 있다고 하였다. 혈전의 형성은 방사선을 표시한 혈소판과 fibrin 침착에 의해 알 수 있으며, 이때 vWf의 역할은 항-vWf 항체로 효과를 억제하여 알 수 있다고 하였다.

Kumagai 등(2004)은 심방세동(atrial fibrillation) 환자의 심장속막에는 vWf가 증가되어 있다고 하였다. vWf의 심장속막에 과다출현은 심장질환이 일어나는 것과 연관되어 심방세동의 혈전초발(thrombotic predirection)에 연관이 있는 심방의 구조적 재구성(atrial structural remodeling)의 과정에서 관찰된다고 하였다.

Baruch 등(2002)은 vWf가 급성 및 만성 간질화 환자의 혈장에 높은 수치를 보이지만, vWf가 간의 손상과 회복에 어떠한 역할을 하는지는 알려져 있지 않다고 하였다. vWf의 혈장내 수치는 sham operation과 70% partial hepatectomy 직후 최고 수준으로 증가하고 vWf의 면역반응은 부분간절제후 4 시간내에 간의 글모양혈관의 내피에서 나타난다고 하였다. 따라서 글모양혈관의 vWf 면역반응 증가는 조직재구성(tissue remodeling)에서 어떤 역할을 하는 것으로 생각된다고 하였다.

Reidy 등(1989)은 내독소를 처리한 쥐와 balloon-injured 흰쥐에서 대동맥의 내피에서 vWf가 3배 증가되는 것을, 내피세포의 과립세포질세망에서 면역반응으로 증명하였다. 이들은 내피의 손상은 내피세포내 vWf의 함량을 증가시킨다고 하였다.

한편 vWf는 큰핵세포에서도 합성분비되는데 이것은 혈액응고에 직간접으로 관련이 있고 조직의 재구성에도 관련이 있다고 하였다. Kumagai 등(2004)은 vWf가 심방세동시에도 증가되어 심방구조 재구성에도 관련이 있다고 주장하였다.

본 실험에서는 정상적인 실험동물인 SD계 흰쥐를 사용하였고, 신생흰쥐를 사용하였기 때문에 질병에 의한 vWf의 역할인 혈액응고와 조직의 재형성은 본 실험에서는 대상에서 제외되었고, 오직 혈관 형성시 내피세포에서 분비되는 vWf의 면역반응으로 흰쥐의 심실근육층에서 모세혈관을 관찰한 결과 심실근육층의 세포밖 바탕질에 vWf 반응이 출생 제 1일부터 나타나기 시작하였고, 출생 제 4일의 흰쥐의 심실근육

층에 혈섬과 작은혈관이 관찰되는데 이때 vWf의 면역반응이 심장근육층에 고르게 관찰되는 바 vWf의 면역반응의 추적은 심장근육층의 모세혈관 혈성과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

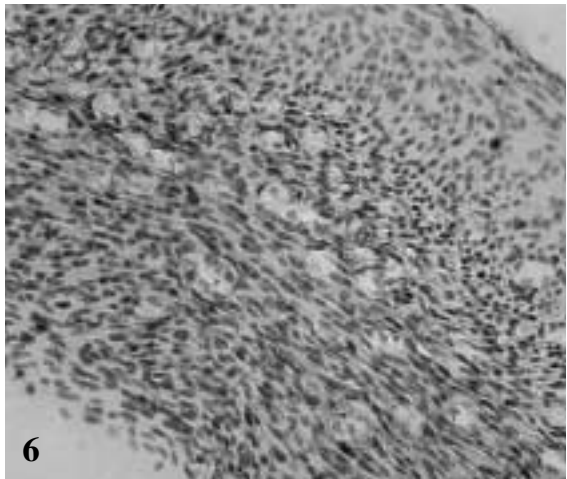
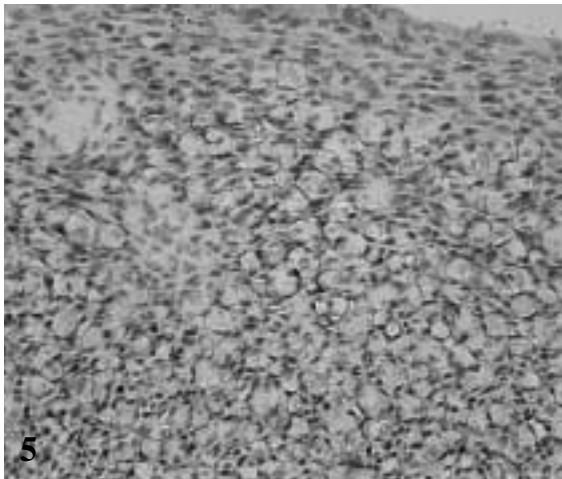
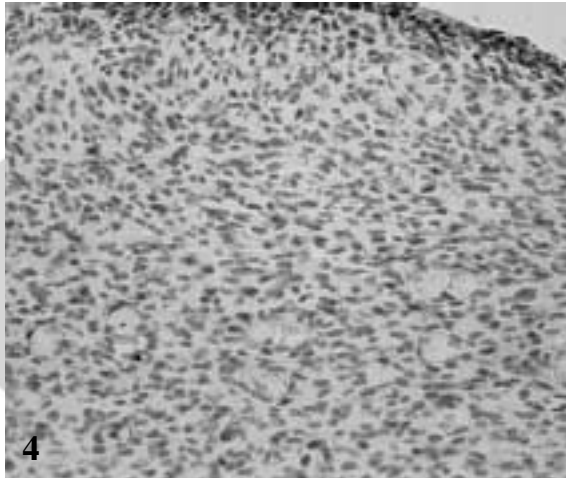
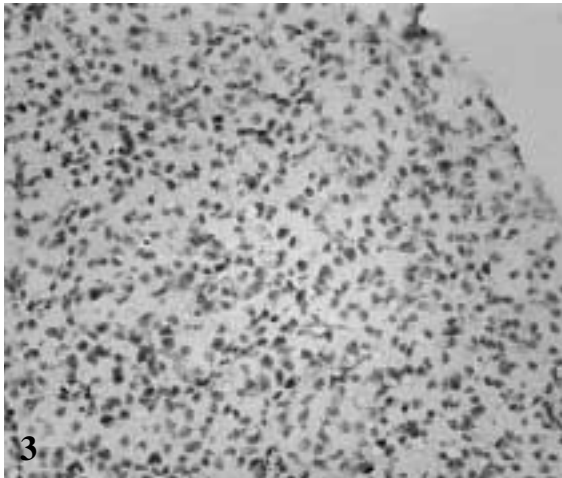
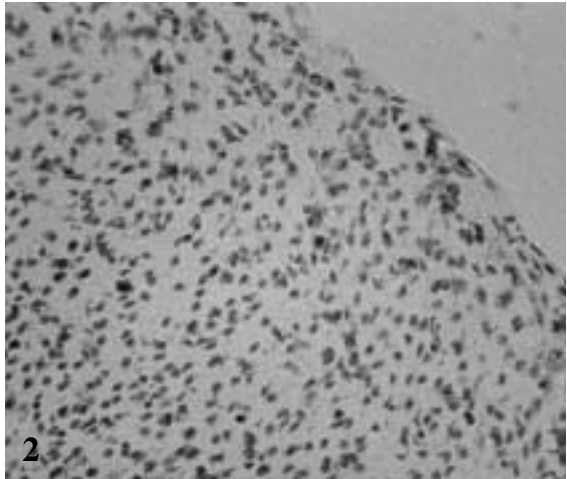
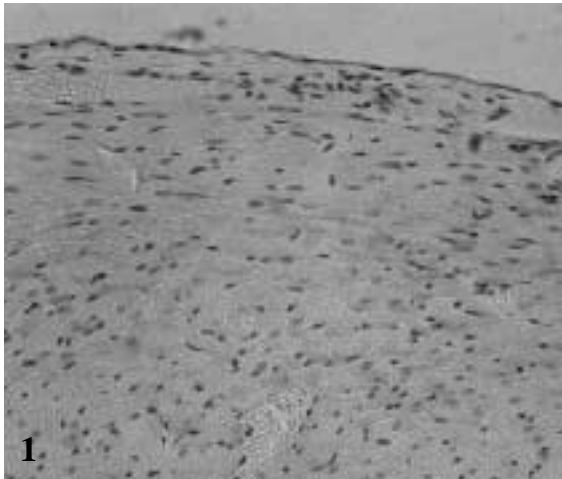
참고 문헌

- Bahnak BR, Wu QY, Coulombel L, Assouline Z, Kerbirou-Nabias D, Pietu G, Drouet L, Caen JP, Meyer D : Expression of von Willebrand factor in porcine vessels : heterogeneity at the level of von Willebrand factor mRNA. *J Cell Physiol* 138 : 305-310, 1989.
- Baruch Y, Neubauer K, Shenkar L, Sabo E, Ritzel A, Wilfling T, Ramadori G : von Willebrand factor in plasma and in liver tissue after partial hepatectomy in the rat. *J Hepatol* 37 : 471-477, 2002.
- Bona RD : Von Willebrand factor and von Willebrand's disease : a complex proein and a complex disease. *Ann Clin Lab Sci* 19 : 184-189, 1989.
- Cho JS, Ouriel K : Differential thrombogenicity of artery and vein : the role of von Willebrand factor. *Ann Vasc Surg* 9 : 60-70, 1995.
- Denis CV : Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol* 75 : 3-8, 2002.
- Grbrane-Younes J, Drouet L, Caen JP, Orcel L : Weibel-Palade bodies in pig megakaryocytes. *Biol Struct Morphog* 1 : 58-62, 1988.
- Knittel T, Neubauer K, Armbrust T, Ramadori G : Expression of von Willebrand factor in normal and diseased rat livers and in cultivated liver cells. *Hepatology* 21 : 470-476, 1995.
- Kumagai K, Fukuchi M, Ohta J, Baba S, Oda K, Akimoto H, Kagaya Y, Watanabe J, Tabayashi K, Shirato K : Expression of the von Willebrand factor in atrial endocardium is increased in atrial fibrillation depending on the extent of structural remodeling. *Circ J* 68 : 321-327, 2004.
- Meinkoth JH, Meyers KM : Measurement of von Willebrand factor-specific mRNA and release and storage of von Willebrand factor from endothelial cells of dogs with type-I von Willebrand's disease. *Am J Vet Res* 56 : 1577-1585, 1995.
- Meyers KM, Wardrop KJ, Helmick C, White F : von Willebrand factor is present in the vascular endothelium from normal dogs and from Doberman pinscher dogs with a pla-

- sma von Willebrand factor deficiency. *Thromb Res* 57 : 109–116, 1990.
- Moore KL, Persaud TVN : The developing human: clinically oriented embryology. 5th ed. Saunders Co. Philadelphia, U.S.A
- Morange PE, Simon C, Alessi MC, Luc G, Arveiler D, Ferreres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P, Juhan-Vague I : PRIME Study Group. Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation* 109 : 1343–1348, 2004.
- Rand JH, Badimon L, Gordon RE, Uson RR, Fuster V : Distribution of von Willebrand factor in porcine intima varies with blood vessel type and location. *Arteriosclerosis* 7 : 287–291, 1987.
- Reidy MA, Chopek M, Chao S, McDonald T, Schwartz SM : Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells. *Am J Pathol* 134 : 857–864, 1989.
- Reinders JH, de Groot PG, Sixma JJ, van Mourik JA : Storage and secretion of von Willebrand factor by endothelial cells. *Haemostasis* 18 : 246–261, 1988.
- Sugimoto M, Miyata S : Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol* 75 : 19–24, 2002.
- Wu, QY, Drouet L, Carrier JL, Rothschild C, Berard M, Rouault C, Caen JP, Meyer D : Differential distribution of von Willebrand factor in endothelial cells. Comparison between normal pigs and pigs with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis* 7 : 47–54, 1987.
- Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian P, Mignatti P : Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is upregulated by angiogenesis factors : a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 85 : 281–288, 2000.

Explanation of Figures

- Fig. 1.** Myocardium of control rat heart. Weak vWf immune-reactions are seen in endocardium and myocardium. Strong reactions are seen at periphery of blood vessels and epicardium. Immune stain, $\times 100$.
- Fig. 2.** Myocardium of day 2 neonatal rat heart. Numerous cells are seen. No vWf positive reactions are seen at extracellular matrix (ECM) of ventricle and epicardium. Immune stain, $\times 100$.
- Fig. 3.** Ventricle of day 1 neonatal rat heart. Weak immunoreactions of vWf are seen in myocardial ECM and moderate reactions at endocardium and epicardium. Immune stain, $\times 100$.
- Fig. 4.** Ventricle of day 2 neonatal rat heart. Moderate reactions of vWf are seen at endocardium and epicardium, but ECM of myocardium shows weak reactions of vWf. A few primitive blood islands are seen. Immune stain, $\times 100$.
- Fig. 5.** Myocardium of ventricles in day 4 neonatal rats. Numerous blood islands are seen in myocardium and moderate vWf immunoreactions are distributed in ECM of myocardium and epicardium. Immune stain, $\times 100$.
- Fig. 6.** Ventricle of day 7 neonatal rat heart. A few slender primitive blood vessels are seen in myocardium. Moderate vWf immune-reactions are seen at periphery of blood vessels, extracellular matrix and epicardium. Immune stain, $\times 100$.



Abstract

Distribution of von Willebrand Factor with Angiogenesis in Neonatal Rat Heart

Bang-Hun Lee¹, Doo-Jin Paik, Won-Kyu Kim, Ho-Sam Chung

Departments of ¹Internal Medicine, Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University

To investigate the process of angiogenesis in the cardiac tissue of neonatal rats, the levels of von Willebrand factor (vWf) produced by endothelial cells were observed. At days 1 to 7 after birth, whole heart obtained from neonatal rats was frozen sectioned, stained with anti-vWf and biotinylated rabbit anti-goat IgG antibodies, followed by immunohistochemical examinations. The results were as follows:

1. At day 1 after birth, extracellular matrix of endocardium and epicardium was stained with anti-vWf at the intermediate level, but that of myocardium was at the low level.
2. At day 2 after birth, a few blood islands were detected. At day 4 after birth, blood island was formed in most parts of heart and extracellular matrix was stained with ant-vWf at the intermediate level.
3. At day 7 after birth, a few blood vessels were formed, and endothelial cells and extracellular matrix was stained with ant-vWf at the intermediate level.

These results suggest that mesenchymal cells were differentiated to blood islands and myocardial cells, which are responsible for the distribution of vWf in extracellular matrix and for angiogenesis.

Key words : Neonate of rat, Angiogenesis, von Willebrand factor, Heart