

소의 뇌 미세혈관 내피세포를 이용한 생체의 혈액뇌관문 모델의 확립

손동섭⁵, 김경용, 김대진, 김기정¹, 임인자²,
김성수, 이원복, 김대중³, 방승규⁴, 이희상

중앙대학교 의과대학 해부학교실, ⁵홍부외과학교실, ¹미생물학교실, ²생리학교실,
³강원대학교 의과대학 해부학교실, ⁴가톨릭대학교 의과대학 정신과학교실

간추림 : 소의 뇌 결실에서 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하여 형태학적, 기능적 관찰을 통해 생체의 혈액뇌관문 모델을 확립하였다. 배양을 시작한 후 뇌 미세혈관 내피세포는 방추모양으로 자랐으며 배양 후 6-7일 경에 세포들이 소용돌이치는 형태의 특징적인 단층을 형성하였다. 내피세포 사이에는 생체내에서와 같이 치밀이음부가 형성되어 있었으며 내피세포 단층의 전기저항은 배양 후 11일 경까지 증가하다가 그 후에 감소하는 양상을 나타냈다. γ -GTP 활성도 (1791.5 ± 397.8 nmol/min/mg protein)는 높은 편이었다. 형광면역염색에서 anti-vWF, anti-Zo-1, anti-vimentin, anti-fibronectin 항체에 대한 반응이 있었으나 별아교세포, 희소돌기아교세포, 신경세포에 각각 특징적으로 반응하는 anti-GFAP, anti-GalC, anti-neurofilament 160/200 kD 항체에 대한 면역반응은 없었다. 세포간이동모델약물의 이동도는 mannitol > sucrose > PEG-4000 순이었으며 세포막이동모델약물인 progesterone과 propranolol의 이동도는 10^{-5} cm/sec 대의 높은 이동도를 나타냈다.

이 연구의 결과로써 다공막에 배양된 소의 뇌 미세혈관 내피세포의 단층이 생체의 혈액뇌관문 모델로 충분히 이용될 수 있으며 향후 약물의 개발이나 혈액뇌관문을 통한 약물의 이동 기전을 연구하는데 유용하게 쓰일 수 있다고 판단된다.

찾아보기 낱말 : 혈액뇌관문, 생체외연구, 뇌, 미세혈관 내피세포, 세포배양

서 론

혈액뇌관문 (blood-brain barrier)은 혈액과 뇌 실질 사이에 존재하며 혈액으로부터 뇌로의 물질이동이나 뇌로부터 혈액으로의 물질이동에 중요한 역할을 담당하고 있다. 혈액뇌관문은 뇌 미세혈관 내피세포가 가장 주된 구성요소이며 그 외에도 혈관주위세포, 별아교세포로 구성되어 있다 (Shi와 Audus 1994, Eddy 등 1997). 다른 부위의 미세혈관 내피세포와 달리 뇌 미세혈관 내피세포는 흡수소포 (pinocytotic vesicles)가 거의 없으며 특징적으로 세포 사

이에 치밀이음부 (tight junction)가 발달해 있다 (Reese와 Karnovsky 1967, Bowman 등 1981). 이러한 특성 때문에 뇌 미세혈관 내피세포는 분자량이 큰 약물이나 극성을 띤 약물들이 혈액으로부터 뇌 실질 내로 이동하는 것을 제한한다. 또한 뇌 미세혈관 내피세포에 있는 P-당단백질 방류 펌프 (P-glycoprotein efflux pump)는 지방친화성 약물들이 혈액에서 뇌 실질 내로의 이동을 방해한다 (Audus와 Borchardt 1987). 뇌 미세혈관 내피세포에는 많은 대사효소가 함유되어 있어 (Partridge 1983) 혈액뇌관문은 물리적인 관문인 동시에 대사성 관문으로 작용한다.

혈액뇌관문의 생체내 실험은 시공간적인 해상력의 저하, 이동 속도가 느린 약물의 검출이나 뇌 미

*이 논문은 2003학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임
교신저자 : 이희상 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : skull@cau.ac.kr

세혈관 내피세포의 뇌 실질쪽 접근의 어려움 등으로 인해 그 이용이 제한되어 있다 (Takasato 등 1984, Abbott 등 1992, Dehouck 등 1992). 또한 분리된 뇌 미세혈관은 세포막에 존재하는 수용체의 연구에는 유용하지만 완충액이 혈액과 뇌 실질에 동시에 접촉되어 혈액뇌관문의 기능을 연구할 수 없다 (Abbott 등 1992, Dehouck 등 1992). 그러나 뇌 미세혈관 내피세포 단층을 이용한 실험은 이러한 단점들을 해결할 수 있으며 생체내 실험에서 나타날 수 있는 감염, 영양공급, 외상, 면역반응, 산소공급, 심혈관계 문제 등의 여러 변인을 제거할 수 있고 세포 수와 약물의 농도를 정확하게 조절할 수 있다는 장점이 있다 (Dehouck 등 1992, Grabb와 Gilbert 1995). 그리고 약물 개발의 초기 단계에서 많은 후보 약물들을 선별하는데 있어서도 생체의 모델을 사용하면 시간과 비용을 절감시킬 수 있다.

뇌 미세혈관 내피세포를 분리하는 방법은 효소를 이용한 방법과 조직분쇄기를 이용한 방법으로 구분할 수 있다 (De Bault 등 1979, Williams 등 1980, Bowman 등 1981). 이 중에서 효소를 이용하는 방법이 살아있는 내피세포를 더 많이 얻을 수 있으며 신경세포나 별아교세포의 오염을 줄일 수 있는 장점이 있다 (Williams 등 1980). 조직분쇄기를 이용하는 방법은 많은 세포를 얻을 수 있지만 분리 과정에서 세포막에 손상이 생겨 실제로 살아있는 세포의 수는 효소를 이용하는 방법에 비해 감소한다 (Williams 등 1980). 생체의 혈액뇌관문 모델은 사람, 소, 돼지, 고양이, 쥐, 생쥐의 뇌 미세혈관 내피세포로 만들 수 있으며 생리적인 특성이 비슷해서 유사한 실험결과를 보여주고 있다 (Cserr와 Bindgaard 1984, Audus 등 1990). 소의 뇌는 크고 쉽게 구할 수 있어 많은 양의 뇌 미세혈관 내피세포가 필요한 실험에 많이 이용되고 있다 (Audus와 Borchardt 1986, Meresse 등 1989, Audus 등 1990).

이 연구에서는 소의 뇌 겔질에서 효소를 이용한 방법으로 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하고 생체에서 나타나는 혈액뇌관문의 특성이 재현되는지 확인하여 실험적 혈액뇌관문 모델을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

[¹⁴C]sucrose (495.0 mCi/mmol), [¹⁴C]mannitol (53.0 mCi/mmol)은 Moravек biochemicals, Inc. (Brea, California)의 것을, [¹⁴C]PEG-4000 (15.2 mCi/g), [³H]propranolol hydrochloride (25.0 Ci/mmol), [³H]progesterone (95.0 Ci/mmol)은 Amersham pharmacia biotech, Inc. (Piscataway, New Jersey)의 것을 사용하였다. 배양액은 DMEM/F-12에 10% horse serum과 penicillin, streptomycin, heparin을 첨가하여 만들었다. Dispase와 collagenase/dispase 등의 시약들은 Sigma chemical Co.의 것을 사용하였다. 이중구조배양관 (0.4 μm 구멍, 12-well Transwell®)은 Corning costar corporation (USA)의 것을 사용하였다.

2. 소의 뇌를 이용한 뇌 미세혈관 내피세포의 분리와 배양

소의 뇌에서 큰 혈관과 뇌막을 제거하고 회색질을 분리하여 세절한 다음 dispase와 collagenase/dispase로 처리하였다. 그 다음 percoll로 미세혈관 내피세포만을 분리한 후, DMEM/F-12 세포배양액에 부유시켜 -80°C 냉동고에 보관한 다음 이튿날 배양하였다. 뇌 미세혈관 내피세포를 50,000개/cm²의 밀도로 배양하였다. 세포의 성장과정은 CK2 위상차현미경 (Olympus)으로 관찰하였다.

3. 뇌 미세혈관 내피세포 단층의 전기저항 측정

세포 단층의 전기저항 값은 이중구조배양관에 내피세포를 배양한 후 EVOM (World precision, USA)를 이용하여 측정하였다.

4. γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) 활성도 측정

Sigma Diagnostic Kit No. 545 (Orlowski와 Meister, 1970)를 이용하여 내피세포에서 γ -GTP의 활성도를 측정하였다. 대조군으로는 C₆ 신경아교종 세포를 이용하였으며 세포단백질의 양은 Lowry 등 (1951)의

방법에 의해 측정하였다.

5. 면역형광현미경 관찰

면역형광현미경 관찰을 위해 일차항체는 rabbit polyclonal anti-von Willebrand factor (vWF) antibody (Innogenex, San Ramon, CA), mouse monoclonal anti-vimentin antibody, mouse monoclonal anti-gial fibrillary acid protein (GFAP) antibody (Dako A/S, Copenhagen, Holland), mouse monoclonal anti-fibronectin antibody (Neomarkers, Fremont, CA), mouse monoclonal anti-galactocerebroside C (GalC) antibody (Chemicon international, Inc., Temecula, CA), mouse monoclonal anti-zonula occludens-1 (ZO-1) antibody, mouse monoclonal anti-neurofilament 160/200 kD antibody (Zymed laboratories, Inc., South San Francisco, CA)를 사용하였다. 대조군에서는 일차항체 대신 PBS를 사용하였다. 이차항체는 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 붙인 goat anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG (Zymed laboratories, Inc.)를 사용하였다. 12-well plate에 배양된 세포는 3% paraformaldehyde (0.01 M PBS)나 70% ethanol 에 10분간 고정하였고 PBS로 세척하고 0.1% Triton X-100 (PBS)으로 세포막의 이동성을 증대시켰다. bovine serum albumin (BSA, 0.5 g/ml)으로 10분간 blocking한 후 일차항체 (10 µg/ml)로 4°C에서 12시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBS로 세척하고 FITC가 붙은 이차항체로 1시간 반응시키고 PBS로 세척한 후 50% glycerol을 세포 위에 몇 방울 떨어뜨리고 IX70 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

6. 뇌 미세혈관 내피세포 단층을 통한 약물의 이동도 측정

뇌 미세혈관 내피세포 단층은 배양 시작 후 9일째와 13일 째에 약물이동 실험에 이용되었다. 약물 용액은 10 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES, pH 7.4)와 Hank's Buffer Salt Solution (HBSS, Gibco life technologies)으로 만들었다. 약물의 농도는 sucrose 100 µM, man-

nitol 100 µM, PEG-4000 100 µM, progesterone 5.26 µM, propranolol 100 µM로 하였다. 이중구조배양관의 위쪽 구획에는 다음과 같이 동위원소로 처리된 약물을 넣었다: [¹⁴C]sucrose 0.2 µCi/ml, [¹⁴C]mannitol 0.2 µCi/ml, [¹⁴C]PEG-4000 0.5 µCi/ml, [³H]progesterone 0.5 µCi/ml, [³H]propranolol 0.5 µCi/ml.

약물의 이동도는 정해진 시간에 시료를 취해서 약물이 다공막에 배양된 뇌 미세혈관 내피세포 단층을 통과하여 이동된 측정 용량을 구하여 계산하였다. 약물이동 실험 시작 후 30, 50, 70, 90, 110분에 이중구조배양관의 아래쪽 구획으로부터 각각 100 µl의 sample을 취하고 즉시 동일한 양의 HBSS로 채워주었다. 다공막 자체를 통과한 약물의 이동도는 실험 시작 후 30분 동안 매 5분마다 sample을 취하여 구했다. 모든 sample에 scintillation cocktail (Fisher scientific, USA.) 4 ml를 넣어 잘 흔들어 섞은 후 Wallac 1409 liquid scintillation counter (Wallac, Inc., USA)로 5분간 ³H와 ¹⁴C에 대해 분석하였다. 약물의 이동도(Papp)는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$Papp = [(dQ/dt) / (60 \times A \times CD_{(0)})] \text{ cm/sec}$$

위의 식에서 (dQ/dt)은 시간(분)에 따라 약물이 이중구조배양관의 아래쪽 구획으로 이동된 양을 나타낸다. A는 다공막의 표면적이고 CD₍₀₎는 이중구조배양관의 위쪽 구획에 넣은 약물의 초기 농도를 나타낸다. 뇌 미세혈관 내피세포 단층을 통한 약물의 이동도(Pm)는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$Pm = 1 / (1/Papp - 1/Pinsert)$$

위의 식에서 Papp는 실험에서 측정된 이동도이며 Pinsert는 세포가 없는 상태에서 다공막을 통한 약물의 이동도이다. 세포 단층이나 다공막을 통한 약물의 이동도 측정은 최소 3회 이상의 실험을 통해서 그 값을 얻었다.

7. 통계처리

모든 자료는 Student t-test를 통해 통계적 유의성을 검증하였다.

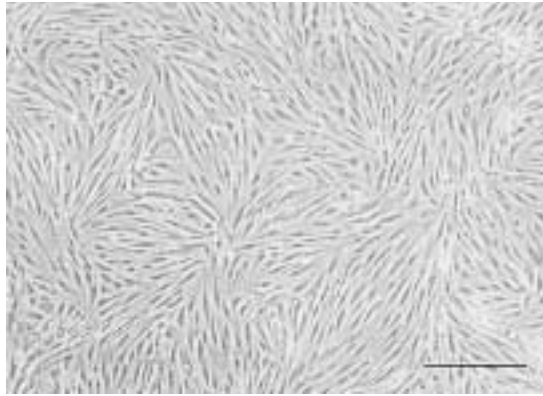


Fig. 1. Phase-contrast micrograph of bovine brain microvessel endothelial cells in primary culture for 7 days. The endothelial cells show typical spindle-shape approximately 5 μm in width across the broadest part, and around 50 μm in length. Bar equals 50 μm .

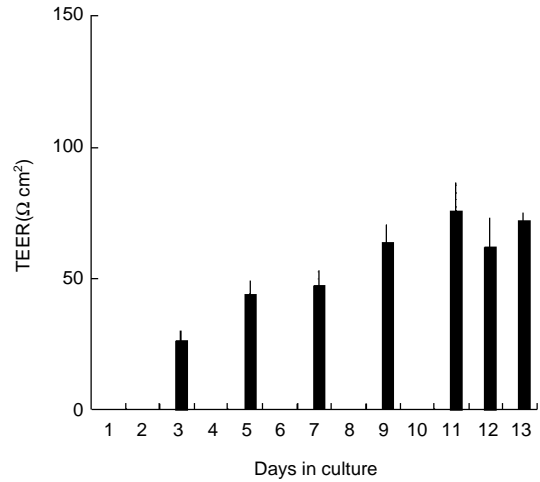


Fig. 2. Transendothelial electrical resistance of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers cultured on 0.4 μm polycarbonate membrane inserts. Each value is the mean and standard deviations calculated from 3 to 12 preparations.

결 과

1. 뇌 미세혈관 내피세포의 배양

뇌 미세혈관 내피세포는 배양 후 6~7일 경에 단층을 형성하였다. 내피세포는 폭이 약 5 μm , 길이가 약 50 μm 정도로 방추 모양으로 자랐으며 소용돌이치는 특징적인 모양을 나타냈다(Fig. 1).

2. 뇌 미세혈관 내피세포 단층의 전기저항

내피세포 단층의 전기저항은 배양 후 11일 경까지 시간의 경과에 따라 증가하다가 11일 이후에 감소하는 양상을 나타냈다. 최대 전기저항 값은 세포 배양 후 11일에 $76 \pm 11 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 로 나타났다(Fig. 2).

3. 면역형광현미경 관찰

배양 7일에 시행한 면역형광염색에서 anti-GFAP, anti-GalC, anti-neurofilament 160/200 kD antibody에 대한 면역반응을 찾아볼 수 없었다. 이 면역반응은 대조군의 결과와 비교할 때 의미 있는 결과를 보여주지 못했다. 따라서 별아교세포, 희소돌기아교세포 및 신경세포에 의한 오염은 배제할 수 있었다.

vWF 항원에 대한 면역반응은 내피세포의 세포질에 전반적으로 퍼져 있었으며 핵이 있는 부위에서는 일어나지 않았다(Fig. 3A). 그러나 면역반응의 정도는 다른 항체의 면역반응보다 약하게 나타났다. vimentin에 면역염색을 보이는 세포는 전형적인 세포내 섬유망을 보여주고 있으며(Fig. 3B) fibronectin에 의한 면역염색은 내피세포 밖의 바닥에서 세포 바깥기질을 형성하여(Fig. 3C) 세포를 바닥의 아교질과 연결시키고 있었다. 치밀이음부를 구성하는 ZO-1에 대한 면역반응은 내피세포의 접착부위에서 매우 특징적으로 나타나고 있었다(Fig. 3D).

4. γ -GTP 활성도

12-well plate에 배양된 내피세포의 γ -GTP의 활성도는 $1791.5 \pm 397.8 \text{ nmol/min/mg protein}$ ($n = 3$)이었다. 대조군으로 이용한 C_6 신경아교종 세포의 γ -GTP의 활성도는 $28.8 \pm 25.0 \text{ nmol/min/mg protein}$ ($n = 3$)로 내피세포의 활성도에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

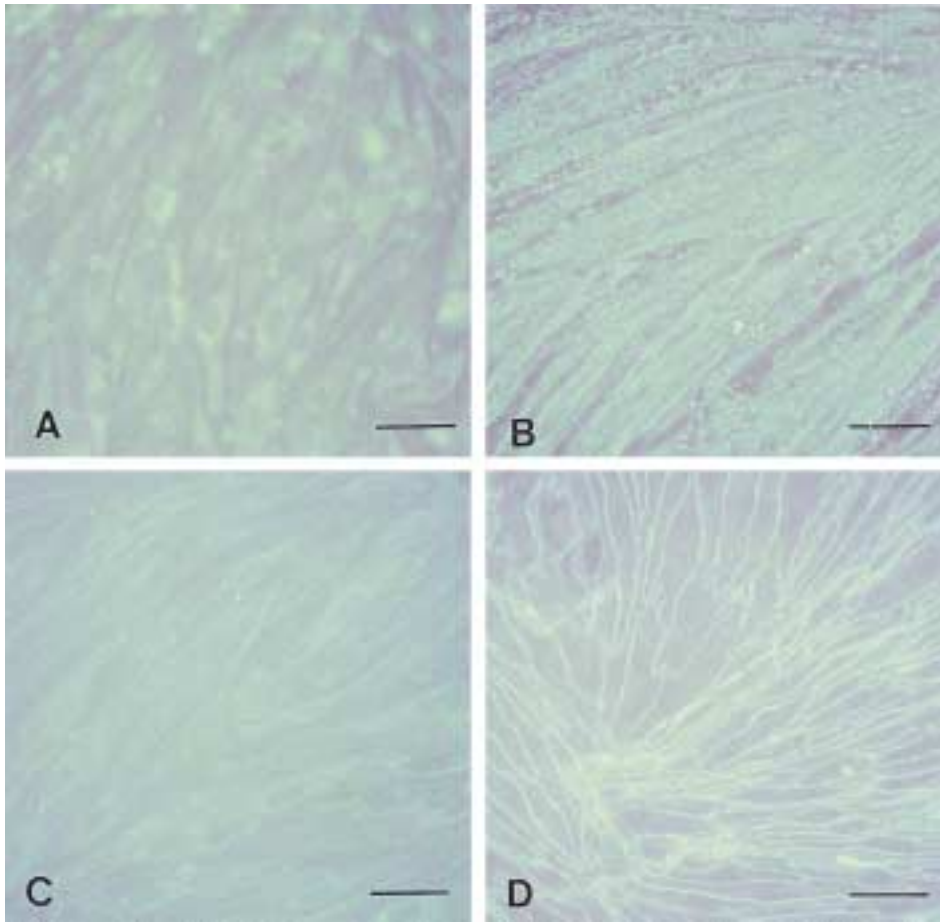


Fig. 3. Immunostaining of microvessel endothelial cell monolayers from bovine brain. Monolayers stained positive for: A) anti-vWF, B) anti-vimentin, C) anti-fibronectin, and D) anti-ZO-1. Bars equal 50 μm .

5. 뇌 미세혈관 내피세포 단층을 통한 약물의 이동도

세포간이동모델약물의 이동도는 mannitol > sucrose > PEG-4000 순이었다. 0.4 μm 다공막에 배양된 내피세포 단층을 통한 progesterone과 propranolol의 이동도는 각각 $53.16 \pm 6.25 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$, $52.68 \pm 2.98 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ 이었으며 sucrose 이동도 ($11.36 \pm 0.87 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$)의 약 5배 정도 높은 값이었다(Table 1).

Table 1. Permeability coefficients for sucrose, mannitol, PEG-4000, progesterone, and propranolol through BBMEC monolayers cultured on 0.4 μm pore size polycarbonate membrane inserts of the 12-well Transwell® plate

Compounds	Papp (10^{-6} cm/sec)	Pinsert (10^{-6} cm/sec)	Pm (10^{-6} cm/sec)
Sucrose	9.59 ± 0.62	61.92 ± 0.69	11.36 ± 0.87
Mannitol	19.44 ± 3.83	65.95 ± 9.36	28.00 ± 8.08
PEG-4000	3.25 ± 0.27	65.78 ± 3.94	3.42 ± 0.30
Progesterone	30.25 ± 2.06	70.54 ± 3.22	53.16 ± 6.25
Propranolol	31.03 ± 1.02	75.60 ± 5.04	52.68 ± 2.98

Values are means \pm SD (n = 3). Papp is the apparent permeability coefficient and Pinsert is the permeability coefficient through the collagen coated membrane only. Pm is the permeability coefficient of compounds through BBMEC monolayer only.

고 찰

뇌 미세혈관 내피세포는 배양 초기에는 세포집락을 형성하여 자라지만 이내 집락들의 서로 연결되어 세포단층을 형성하였다. 본 실험에서 이중구조배양관에서 측정된 전기저항은 배양시작 후 11일경이 가장 높았고 이후부터는 점차 낮아졌다. 이는 배양 후 11일 경에 혈액뇌관문모델의 기능이 가장 우수함을 뜻하며, 전기저항 값은 측정기구와 측정방법에 따라 심한 차이를 보이는 요소지만 이 값이 생체의 혈액뇌관문모델의 기능이 가장 우수한 시기를 예측할 수 있는 도구가 된다.

형광면역염색을 시도한 결과 내피세포는 GFAP, neurofilament 160/200 kD, GalC에 면역염색을 나타내지 않아 별아교세포, 신경세포, 희소돌기아교세포에 의한 오염을 배제할 수 있었다. 오염된 세포들은 또 다른 과정을 거쳐 제거할 수 있으며 내피세포를 배양하기 위한 조건에서는 다른 세포들이 생존하거나 성장하기에는 부적합하다(Banker와 Goslin 1991). 배양된 세포는 vWF 항원에 대해 핵을 제외한 세포질에서 면역염색반응을 확인할 수 있었지만 다른 항원들에 비해 면역반응이 약하였다. 이는 아마도 종간의 차이, 고정방법의 차이, 또는 세포의 처리방법의 차이에서 올 수 있는 것이라고 생각된다. 내피세포와 섬유모세포가 fibronectin을 생산하며 이들 세포와 함께 별아교세포가 vimentin을 생산하므로 예상했던 바와 같이 내피세포가 이들 항체에 대해 면역반응을 보였다. 그러나 vWF는 모든 내피세포가 생산하므로 면역염색의 결과만을 가지고 내피세포가 순수하게 뇌 결질에서 분리되었다고 볼 수는 없었다.

뇌 모세혈관에 특징적으로 많이 있는 γ -GTP의 활성도는 다른 연구자들(Audus와 Borchardt 1986, Dehouck 등 1990)의 결과 보다 더 높은 수치를 보여주고 있다.

Mannitol의 이동도는 sucrose의 이동도에 비해 약 2.5배 높은 것으로 나타났다. 생체내 연구에서는 mannitol의 이동도는 sucrose의 이동도에 비해 4배 정도 높은 것으로 보고 되었다(Ohno 등 1978).

Sucrose 보다 분자량이 큰 PEG-4000은 sucrose에 비해 4배 정도 낮은 이동도를 나타냈다. 이와 같은 결과는 친수성 약물이 혈액뇌관문을 이동하는데 약물의 분자량과 분자의 형태가 중요하다는 이전의 보고들(Ohno 등 1978, Levin 1980)과 일치하였다. Progesterone과 propranolol의 이동도는 sucrose에 비해 5배 정도 높은 것으로 나타났는데 이는 세포막이동모델약물은 세포간이동모델약물에 비해 훨씬 더 높은 이동도를 나타낸 이전 보고(Glynn와 Yazdanian 1998, Franke 등 1999)와 일치하였으며 progesterone이 sucrose에 비해 13배 정도 높은 이동도를 보인다는 보고도 있다(Glynn와 Yazdanian 1998). Sucrose의 이동도는 11.36×10^{-6} cm/sec였는데 다른 연구자들(Raub 등 1992, Sorensen 등 1997, Glynn와 Yazdanian 1998)의 결과에서 크게 벗어나지 않았다. Sucrose의 이동도가 훨씬 더 낮은 생체의 혈액뇌관문 모델은 세포배양액에 adenylate cyclase activator인 forskolin과 phosphodiesterase inhibitor인 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 첨가하여 세포를 배양하였고(Raub 1996) 다른 하나는 약물 이동 실험 전 2일 동안 혈청을 제거한 배양액으로 세포를 배양하는 방법을 사용하였다(Franke 등 1999).

약물의 이동도는 세포 단층의 배양기간과도 관계가 있어서 내피세포는 배양 후 11일이 지나면 세포들이 죽거나 형태적인 변형이 일어나서 약물의 이동도가 증가한다(Rim 등 1986). 결국 가장 좋은 혈액뇌관문의 기능을 보이는 시기는 실험실의 조건에 따라 다를 것으로 생각된다.

정상 상태에서의 생체내 혈액뇌관문을 통한 sucrose의 이동도는 상당히 낮아서 3.03×10^{-8} cm/sec(Ohno 등 1978) 내지 1.2×10^{-7} cm/sec(Levin 1980)로 보고 되었다. 따라서 현재까지는 생체의 혈액뇌관문 모델을 통한 약물의 이동도를 그대로 생체내 모델에 적용시키는 것은 조심해야 할 필요가 있다. 이와 같이 생체의 모델을 통한 sucrose의 이동도는 생체내 모델에 비해 훨씬 높기 때문에 생체의 모델이 혈액뇌관문을 통한 약물 이동 연구에 이용되려면 관문 기능이 더욱 강화된 모델이 개발되어야 할 것이다. 앞으로 이러한 이상적인 생체의 혈액뇌관문

모델은 내피세포 분리, 배양 방법이나 다공막 재질 등의 발전에 힘입어 가능하게 되리라 예상된다.

뇌혈관으로부터 내피세포를 분리하여 배양하는 것은 어렵고 힘든 과정중의 하나이다. 본 연구자들은 다양한 시행착오 끝에 소의 뇌 미세혈관 내피세포를 분리, 배양하는데 성공하였다. 또한 이것을 바탕으로 형태학적, 조직면역화학적 방법으로 내피세포의 특성을 확인하였고, 내피세포 전기저항과 약물의 이동도를 다른 연구자들의 결과와 비교해 봄으로써 이 생체의 혈액뇌관문 모델의 적절성을 입증하였다. 이렇게 성립된 생체의 혈액뇌관문 모델을 바탕으로 앞으로 약물의 개발과정에서 혈액뇌관문 이동도 측정이나 약물의 혈액뇌관문 이동 기전을 밝히는데 이용할 것이다.

참 고 문 헌

- 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, 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.
- 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.
- Banker G, Goslin K : *Culturing nerve cells*, Massachusetts. MIT Press, pp. 11-40, 1991.
- 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.
- 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, Meresse S, Delorme P, Fruchart J-C, Cecchelli R : An easier, reproducible, and mass-production method to study the BBB *in vitro*. *J Neurochem* 54 : 1798-1801, 1990.
- 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.
- 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.
- Franke H, Galla H-J, Beuckmann CT : An improved low permeability *in vitro*-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. *Brain Res* 818 : 65-71, 1999.
- Glynn SL, Yazdanian M : *In vitro* blood-brain barrier permeability of nevirapine compared to other HIV antiretroviral agents. *J Pharm Sci* 87 : 306-310, 1998.
- Grabb PA, Gilbert MR : Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an *in vitro* blood-brain barrier. *J Neurosurg* 82 : 1053-1058, 1995.
- Levin VA : Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem* 23 : 682-684, 1980.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 21 : 189-194, 1951.
- Meresse S, Dehouck M-P, Delorme P, Bensaid M, Tauber J-P, Delbart C, Fruchart J-C, Cecchelli R : Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* 53 : 1363-1371, 1989.
- Ohno K, Pettigrew KD, Rapoport SI : Lower limits of cerebrovascular permeability to non-electrolytes in the conscious rat. *Am J Physiol* 235 : H299-H307, 1978.
- Orlowski M, Meister A : The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino-acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 67 : 1248-1255, 1970.
- Pardridge WM : Brain metabolism: a perspective from the

- blood-brain barrier. *Physiol Rev* 63 : 1481-1535, 1983.
- Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA : Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells *in vitro*: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res* 199 : 330-340, 1992.
- Raub TJ : Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am J Physiol* 1271 : C495-C503, 1996.
- Reese TS, Karnovsky MJ : Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34 : 207-217, 1967.
- Rim S, Audus KL, Borchardt RT : Relationship of octanol/buffer and octanol/water partition coefficients to transcellular diffusion across brain microvessel endothelial cell monolayers. *Int J Pharm* 32 : 79-84, 1986.
- Sorensen M, Steenberg B, Knipp GT, Wang W, Steffansen B, Frokjaer S, Borchardt RT : The effect of β -turn structure on the permeation of peptides across monolayers of bovine brain microvessel endothelial cells. *Pharm Res* 14 : 1341-1348, 1997.
- Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR : An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol* 247 (Pt 2) : H484-H493, 1984.
- Williams SK, Gillis JF, Matthews MA, Wagner RC, Bitensky MW : Isolation and characterization of brain endothelial cells: Morphology and enzyme activity. *J Neurochem* 35 : 374-381, 1980.

K C I

Abstract

Development of In Vitro Blood-Brain Barrier Model with Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells

Dong-Suep Sohn⁵, Kyung-Yong Kim, Dae-Jin Kim, Ki-Jeong Kim¹,
In-Ja Lim², Sung-Su Kim, Won-Bok Lee, Dae-Joong Kim³,
Seung-Kyu Bang⁴, Hee-Sang Lee

*Department of Anatomy, ⁵Thoracic & Cardiovascular Surgery, ¹Microbiology,
²Physiology, College of Medicine, Chung-Ang University,
³Department of Anatomy, College of Medicine, Kangwon National University,
⁴Department of Psychiatrics, College of Medicine, Catholic University*

The *in vitro* blood-brain barrier (BBB) model was established with bovine brain microvessel endothelial cells (BBMECs). The characteristics of BBMECs were identified by morphological and functional studies. BBMECs began to grow as spindle shaped cells and distinctly formed the monolayer of whirling appearance by 6 to 7 days after plating. Transendothelial electrical resistance (TEER) of the monolayer increased through 11 days and then started to decrease. The γ -GTP activity (1791.5 ± 397.8 nmol/min/mg of protein) and alkaline phosphatase activity (15.0 ± 7.8 μ mol/min/mg of protein) were high. BBMECs in culture were characterized by the binding of anti-vWF, anti-ZO-1, anti-vimentin, and anti-fibronectin antibodies. They failed to react with anti-GFAP, anti-GalC, and anti-neurofilament 160/200 kD antibodies, markers for astrocyte, oligodendrocyte, and neuron, respectively. Decreasing order of the permeability through the BBMEC monolayers of paracellular transport model drugs was mannitol, sucrose, and PEG-4000. The permeability of transcellular transport model drugs, progesterone and propranolol was much higher than that of paracellular transport model drugs.

The BBMECs cultured on porous membrane have been qualified as an *in vitro* BBB model and also can be used for the BBB transport study in the drug development and for the BBB transport mechanism of drugs.

Key words : Blood-brain barrier, *In vitro*, Brain, Microvessel endothelial cell, Cell culture