

혈관내피세포 재생과정에 관한 전자현미경적 연구

경북대학교 의과대학 병리학교실

장금미 · 김동훈 ·곽정식 · 손태중

서 론

내피세포는 혈관의 내벽을 이루는 세포로 혈관벽의 보호와 물질 이동에 중요한 기능을 담당하는 세포이다. 어떤 기계적 자극이나 약물등에 의해 내피세포의 손상이 일어나면 동맥경화증등의 혈관질환을 일으키는 요인이 될 수 있다^{1~10)}. 일단 내피세포는 손상을 받으면 재생되는 능력을 갖고 있는데¹¹⁾, Michael 등¹²⁾의 연구에 의하면 재생되는 내피세포는 재생이 일어나는 동안에 혈류, 내피세포의 세포골격의 배열, 내피세포 아래의 혈관벽 조직의 배열등의 복합적인 영향을 받아 그 형태적 특징이 규정된다고 하였다. 그리고 내피세포에 가해진 손상의 범위에 따라 재생되는데 걸리는 시간이 달라지고 혈관벽에 일어나는 반응도 달라지게 된다. Bjorkerud 등¹³⁾은 내피세포가 벗겨져 있는 시간과 혈관벽에서 일어나는 반응이 밀접한 관계가 있어서 과다한 내피세포의 손상으로 그 재생이 지연되면 내피세포 아래 조직의 노출이 지속되어 이 부위에 많은 혈소판들이 부착되고 혈소판으로부터 혈관 평활근세포 분열제가 분비된다. 분열된 평활근세포는 내벽으로 이동하고 다른 지지조직들도 가세하여 새로운 내벽을 이루는 성분이 되어 내벽의 비후가 초래된다고 하였다. 이런 과정으로 내벽의 비후가 일어나는 것은 다수의 다른 연구들에 의해서도 관찰되었다^{14~24)}. Magaret 등²⁵⁾은 실험에서 좁은 범위의 내피손상을 준 경우 내피세포가 손상후 7일이내에 재생되어 혈관벽을 덮을때는 내벽의 비후가 일어나지 않는 것을 관찰하고 내피세포 아래조직의 지속적인 노출이 혈관 평활근세포의 증식과 내벽으로의 이동을 일으키며 내벽의 비후를 초래한다고 주장하고 빠른 시간내에 내피세포가 재생되는 것 자체가 내벽의 비후를 방지하는데 중요한 작용을 한다고 하였다. 이처럼 빠른 시간내에 내피세

포의 재생으로 내벽의 비후가 방지되는 것은 다른 실험에서도 관찰되었다^{26~31)}. 그러나 Michael 등³²⁾은 polyethylene 관을 통한 나일론 필라멘트로 혈관내피를 긁는 방법을 사용하여 혈관벽의 손상을 표층에만 국한시킨 경우에는 광범위한 경우의 내피세포의 탈락으로 재생시간이 지연되어도 내벽의 비후가 일어나지 않는 것을 관찰하였다. 따라서 내벽의 비후가 방지되는 것은 빠른 시간내에 내피세포가 재생되는 것보다 손상이 표층에만 국한되어 혈관 내탄성막과 혈관 평활근세포에는 손상을 일으키지 않기 때문이라고 보았다. 즉 손상의 정도가 보다 더 중요한 인자라고 주장하였다. 이와같이 혈관 내벽의 손상시 혈관 평활근세포의 증식이 일어나고 내벽으로의 이동을 일으켜 내벽의 비후를 초래하는 주된 요인들에 대하여서는 아직도 논란이 많다. 이에 저자는 좁은 범위에 국한하여 내피세포의 탈락을 일으키되 손상이 표층에만 국한된 경우와 내탄성막 손상이 포함되는 각각의 경우 내피세포의 재생과정을 전자현미경적으로 관찰하여 제한된 범위의 손상시에 내벽의 비후를 방지하는데 중요하게 작용하는 요인을 규명하고자한다.

재료 및 방법

1. 재 료

체중 약 200 gm 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 일정기간 사육하여 건강하다고 인정되는 것을 골라 실험에 사용하였다.

2. 방 법

실험동물 24마리를 12마리씩 두군으로 나누어 장골동맥을 박리하고 21게이지 지침을 넣었다. 이를 통하여 직경은 0.5 mm 정도로 같으나 끝이 0.1 mm, 0.3 mm 정도로 다르게 구부러진 두 종류의 철사를 각각의 실험군

에 밀어넣고 이것이 흉부동맥에 이르는 즉시 아래로 당기면서 복부동맥의 내피세포를 탈락시키고 지침과 철사를 제거한 후 장골동맥을 결찰하였다. 술후 30분 4, 6, 24, 72시간, 1주일로 나누어 각군에 2마리씩 도살하여 투과 및 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

3. 표본제작 방법

각각의 동물이 도살되기 전에 주사 전자현미경적 검사를 위해서는 heparin을 심장으로 주사하여 혈관내 응고를 방지하고 흉부동맥을 통해 polyethylene 관을 삽관하여 생리식염수를 주입하여 혈관을 충분히 세척한 후 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 고정액으로 충분한 시간동안 관류고정(perfusion fixation)한 후 복부대동맥을 박리시킨 뒤 박리된 혈관을 종으로 열어서 코르크 판위에 편으로 편평하게 고정한 후 85 mm 정도의 절편을 만들어 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde 혼합고정액에 1일간 더 고정한 후 0.1 M phosphate buffered saline 으로 세척한 다음 1% OsO₄용액(0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4)에 2시간동안 후고정하였다. 다시 0.1 M phosphate buffered saline 으로 세척한 후 2% tannic acid 용액에 하룻밤을 지난 후 1% OsO₄용액에 1시간동안 도전염색하였다. 이어 계열 ethanol로 탈수하고 isoamyl acetate를 통과하여 Hitachi HCP-2형 임계점 건조기에서 액체탄산가스를 이용하여 임계점 건조를 하고 gold palladium 으로 증착한 다음 Hitachi S-520형 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

투과 전자현미경적 관찰을 위해서는 도살전에 역시 흉부대동맥에 polyethylene 관을 삽관하여 증류수로 세척하고 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer로 충분한 시간 관류고정하였다. 복부대동맥을 박리하여 외막의 지방을 제거하고 5 mm 간격으로 횡으로 세절하였다. 이를 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 전고정한 후 phosphate buffer로 세척하고 1% OsO₄용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 동안 후고정하였다. phosphate buffer에 세척한 후 계열 ethanol로 탈수하고, propylene oxide로 침투시켜 epon 혼합물에 포매하여 열증합을 시켰다. Porter-Blum MT-2B형 초박절기에 du-Pont diamond knife로 초박절하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 Jeol

100CX 전자 현미경으로 관찰하였다.

성 적

두가지 방법으로 손상의 정도를 달리하여 각각의 재생 과정을 주사 및 투과 전자현미경으로 비교하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

표층에 국한된 손상의 경우에는 야기조작 30분 후에는 주사 전자현미경상 3개에서 5개 세포범위의 내피세포 탈락과 이곳에 부착된 혈소판이 관찰되었다(Fig. 1). 이때 투과 전자현미경으로는 내피세포가 탈락되고 이곳에 혈소판이 일렬로 부착되어 있었다(Fig. 2). 손상 4시간 후에는 주사 및 투과 전자현미경적 관찰에서 내피세포의 탈락과 그 부위에 혈소판의 부착이 지속되었고 16시간후에도 위의 소견이 큰 변화없이 관찰되었다. 손상 24시간 후의 주사 전자현미경적 소견으로 손상 변연부로부터 크기가 크고 세포모양이 불규칙하며 내강으로 돌출된 세포가 나타났으며(Fig. 3) 이때 투과 전자현미경상으로는 손상 변연부에 크기가 크고 원형질이 풍부하며 세포내 소기관 특히 미토콘드리아, RER 등이 풍부한 세포가 보였다. 손상 72시간후에는 주사 전자현미경상 크기가 크며 경계부위가 명확하지 않으며 길쭉길쭉하게 늘어서는 세포가 정상내피세포 주위에 구별되어 나타나고(Fig. 4) 이때 투과 전자현미경상으로는 정상 내피세포(Fig. 5)들에 비하여 그 크기가 크고 입방형이며 세포내 소기관들이 잘 발달되고 원형질이 풍부하며 세포간 결합이 불완전한 형태의 세포들이 관찰되었다(Fig. 6). 1주일 후에도 72시간군의 소견과 큰 차이없이 같은 형태의 세포들이 관찰되었다.

손상이 혈관 내탄성막까지 포함된 경우에는 손상 30분 후에 주사 전자현미경상 3개에서 5개 내피세포의 탈락과 탈락된 부위에 부착된 혈소판이 관찰되고(Fig. 7) 투과 전자현미경상으로는 내탄성막이 몇개의 절편으로 분리되어 노출되고 여기에 혈소판이 일렬로 부착되어 있었다(Fig. 8).

손상 4시간 후에는 주사 전자현미경으로는 30분 군과 큰 차이가 없었고 투과 전자현미경적 관찰을 하니 여전히 몇개의 절편으로 분리된 내탄성막이 노출되어 있고, 이곳에 혈소판이 일렬로 부착되어 있었다. 손상 16시간 후에 주사 전자현미경상에는 30분과 큰 차이가 없었고 투과 전자현미경상으로는 몇개의 절편으로 나누어진 내

탄성막 사이로 혈관 평활근 세포가 약간 돌출되어 있었다. 손상 24시간후에 손상 변연부에 크기가 크고 경계부가 명확하지 않으며 내강으로 돌출된 세포가 나타났으며 (Fig. 9) 이때 투과 전자현미경상으로는 손상 변연부에 세포의 크기가 크고 원형질이 풍부하며 세포내 소기관이 잘 발달된 세포가 보였고 동시에 내탄성막의 단절된 부분을 통하여 혈관 평활근세포의 이동도 관찰되었다. 손상 중앙부에 혈소판의 부착도 관찰되었다(Fig. 10, 11). 손상 72시간 후에는 주사 전자현미경상 내벽이 확실하게 구분되어지는 곳이 관찰되지 않았으나 투과 전자현미경으로는 내탄성막의 손상과 더불어 혈관 평활근세포가 내벽으로 이동되어 있었다(Fig. 12). 1주일후에도 72시간의 소견과 큰 차이가 없었다.

고 찰

혈관의 내피세포에 좁은 범위의 손상을 가하되 표층에 국한시킨 경우와 내탄성막까지 포함시킨 경우를 비교하여, 재생과정을 전자현미경적으로 관찰하였다.

그 결과 표층에 국한된 내피세포의 손상시에는 24시간에 손상 변연부에서 재생세포가 나타나기 시작하고 72시간에는 전 손상부위가 재생세포로 덮히고 내벽의 비후는 동반되지 않았다. 이들은 형태적으로 그 크기가 큰 입방형의 세포가 점차 길쭉길쭉한 형태로 혈관의 주행방향을 따른 특정한 배열을 가지고 늘어서며 조밀하게 배열되나 세포간 결합은 불완전한 특징을 가졌다. 이와는 다르게 내탄성막까지 손상을 받은 경우에는 24시간에 재생세포가 손상 변연부에서 나타나기는 하나 동시에 혈관 평활근세포가 손상된 내탄성막의 절편사이로 이동되었다. 72시간에는 재생세포가 손상부위를 덮기에 앞서 이들이 혈관 내벽으로 완전히 이동하여 내벽의 비후를 일으켰다. 손상 1주일후에도 혈관 평활근세포가 내벽을 구성하며 내벽의 비후를 일으키고 있었다.

표층에 국한된 내피세포의 손상시에 재생세포가 완전히 내벽을 덮고 내벽의 비후가 일어나지 않으며 세포의 형태가 점차 혈관의 주행방향을 따라 길쭉길쭉하게 특정한 배열을 가지게 되는데, 이는 Michael 등¹²⁾이 언급한 재생과정에서 혈류, 내피세포골격의 배열, 내피세포조직의 배열등의 영향을 받아 그 형태적 특성을 이룬다고 한 것과 일치하며 본 실험의 경우에는 특히 혈류의 양이 많고 강한 대동맥이므로 그 영향이 큰 것으로 생각된다.

또 내탄성막의 손상이 포함된 경우에 내피세포의 재생이 일어나기 전에 이미 혈관 평활근세포의 내벽으로의 이동이 일어나고 내벽의 비후를 일으키게 되는 것은 Michael 등¹²⁾이 주장한 것과 같이 내벽의 비후를 일으키는 중요한 요인이 혈관벽에 가해진 손상의 정도라고 한 것과 일치한다.

즉 같은 범위의 내피세포가 탈락되어도 혈관벽의 손상 정도가 내벽의 비후를 일으키는데 매우 중요하다고 생각된다. 그러므로 내피세포의 손상후 혈관내벽의 비후가 일어나지 않는데에는 빠른 시간내에 내피세포가 재생되는 것도 중요하나 그 손상정도가 표층에 국한되어 내탄성막과 혈관 평활근세포에 손상을 주지 않는 것이 더욱 중요한 요인이라고 생각된다.

결 론

혈관의 내피세포는 혈관의 기능을 유지하는데 매우 중요하며 내피세포의 손상과 혈관벽의 반응에 대한 여러가지 연구가 있었다. 본 실험은 흰 쥐의 복부대동맥에 두 종류의 직경이 같은 철사를 삽입하여 표층에 국한된 내피세포의 탈락과 내탄성막까지 손상을 주는 내피세포의 탈락을 일으켜 재생과정을 비교 관찰함으로써 내벽의 비후를 방지하는데 중요한 요인을 규명하고자 하였다. 그 결과 표층에 국한된 손상시에는 72시간에 완전히 손상부위를 덮은 재생세포를 볼 수 있으나 내탄성막이 손상된 경우에는 손상부위를 통하여 혈관 평활근세포가 내벽으로 완전히 이동되어 내벽의 비후가 초래되었다. 1주일후에도 72시간 후와 같은 상태가 지속되었다. 이런 결과를 종합하면 내피손상시 내벽의 비후가 방지되는데 가장 중요한 요인은 그 손상의 정도가 표층에 국한되어 내탄성막과 혈관 평활근세포에 전혀 영향을 주지 않는 것이라고 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Schwartz SM, Benditt EP: *Aortic endothelial replication 1. Effects of age and hypertension in the rat. Circ Res 41:248-255, 1977*
- 2) Weber G, Losi M, Toti P, Vatti R: *Circulating endothelial-like cells in arterial peripheral blood of hypercholesterolemic rabbits. Artery 5:29-36, 1979*
- 3) Ross R, Glomset JA: *The pathogenesis of atherosclerosis*

- osis Part I. *N Engl J Med* 295:1199-1200, 1976
- 4) Ross R, Glomset JA, Harker L: *Response to injury and atherogenesis. Am J Pathol* 86:675-684, 1976
 - 5) Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH: *Replication of smooth muscle cells in vascular disease. Circ Res* 58:427-444, 1986
 - 6) Ross R: *The pathogenesis of atherosclerosis. N Engl J Med* 314:488-500, 1986
 - 7) Bjorkerud S, Bondjers G: *Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. Atherosclerosis* 13:355-363, 1971
 - 8) Reidy MA, Bowyer DE: *Scanning electron microscopic studies of rabbit aortic endothelium in areas of haemodynamic stress during induction of fatty streaks. Virchows Arch* 377:237-248, 1978
 - 9) Reidy MA, Langille BL: *The effect of local blood flow patterns on endothelial cell morphology. Exp Mol Pathol* 32:276-289, 1980
 - 10) Schwartz SM, Benditt EP: *Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. Am J Pathol* 66:241-264, 1972
 - 11) Schwartz SM, Benditt Ep: *Cell replication in the aortic endothelium: a new method for study of the problem. Lab Invest* 28:699-707, 1973
 - 12) Michael AR, Stephen MS: *Endothelial regeneration. Lab Invest* 44:301-308, 1981
 - 13) Bjorkerud S, Bondjers G: *Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. Part 5. Tissue response after induction of a large superficial transverse injury. J Atherosclero Res* 18:235-255, 1973
 - 14) Alexander WC, Robert EC, Morris JK: *A morphologic and permeability study of luminal smooth muscle cells after arterial injury in the rat. Lab Invest* 39:141-150, 1978
 - 15) Henryk T, Malczak BM, Robert CB: *Regeneration of endothelium in rat aorta after local freezing. Am J Pathol* 86:133-148, 1977
 - 16) SeanMoore MB: *Thromboatherosclerosis in normolipidemic rabbit. Lab Invest* 29:478-487, 1973
 - 17) Poole JCF, Sanders AG, Florey HW: *The regeneration of aortic endothelium. J Pathol Bacteriol* 75:133-140, 1958
 - 18) Clowes AW, Reidy MA, Clowers M: *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab Invest* 49:327-333, 1983
 - 19) Schwartz Sm, Stemerman MB, Benditt EP: *The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation. Am J Pathol* 81:15-42, 1975
 - 20) Spaet TH, Stemerman MB, Veith FJ, Leynieks I: *Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta: medial smooth muscle cells as a source of neointima. Circ Res* 36:58-70, 1975
 - 21) Clopath P: *Arteriosclerotic and atherosclerotic lesions induced in swine by single and repeated endothelial cell injury. Artery* 4:275-284, 1978
 - 22) Minick CR, Stemerman MB, Insull WJ: *Effects of regenerated endothelium and lipid accumulation in the arterial wall. Proc Natl Acad Sci USA* 74:1724-1728, 1977
 - 23) Stemerman MB, Ross R: *Experimental arteriosclerosis. I. Fibrous plaque formation in the primates. J Exp Med* 136:769-789, 1972
 - 24) Spact TH, Stemerman MB, Friedman RJ, Burns ER: *Arteriosclerosis in the rabbit aorta long term response to single balloon injury. Ann NY Acad Sci* 275:76-77, 1976
 - 25) Magaret MR, Louise NW, David EB: *Narrow superficial injury to rabbit aortic endothelium. Atherosclerosis*, 43:233-243, 1982
 - 26) Haudenschild C, Schwartz SM: *Endothelial regeneration. Lab Invest* 41:407-418, 1979
 - 27) Hirsch EZ, Robertson AL: *Selective acute arterial endothelial injury and repair. I. Methodology and surface characteristics. Atherosclerosis* 28:271-287, 1977
 - 28) Prescott MT, Muller KR: *Endothelial regeneration in hypertensive and genetically hypercholesterolemic rats. Arteriosclerosis* 3:206-214, 1983
 - 29) Toyohiro T, Michael AR: *Endothelial regeneration. Am J Pathol* 129:429-433, 1987
 - 30) Helin P, Lorenzen I, Garbarsch C, Matthiessen ME: *Repair in arterial tissue: morphological and biochemical changes in Circ Res* 29:542-554, 1971
 - 31) Buck RC: *Contact guidance in the subendothelial space repair of rat aorta in vitro. Exp Mol Pathol* 31:275-283, 1979
 - 32) Michael AR, Reidy MA, Mitchell S: *Endothelial regeneration. Am J Pathol* 118:173-177, 1985

— Abstract —

Ultrastructural Studies of Aortic Endothelial Injury and Regeneration

Gium-Mi Jang, M.D., Dong-Hoon Kim, M.D.
Jyung-Sik Kwak, M.D. and Tae-Joong Sohn, M.D.

*Department of Pathology, School of Medicine,
Kyungpook National University*

Author performed this experiment to define the most important factor preventing the intimal thickening. An endothelium of abdominal aorta in the rat was denuded by two different wires having same caliver. The degree of injury was limited to the endothelial cells in one, and

extended to the internal elastic lamina in another. The results showed that at 72 hours, in the case of superficial injury, the entire injury site was covered by new regenerating cells, but in the case of disruption of the internal elastic lamina, the migrating smooth muscle cell completely reached into the intima and resulted in intimal thickening. Similar findings persisted to 1 week later. Above results suggest the most important factor preventing the intimal thickening in endothelial injury is the depth of the injury which limited within the endothelial cells without extending into the internal elastic lamina and medial smooth muscle cells.

Key Words: Aorta Endothelial injury, Regeneration, Ultrastructure

Key for Abbreviation

P : Platelet	IEL : Internal elastic lamina
SMC : Smooth muscle cell	REC : Regenerating endothelial cell
En : Endothelial cell	

Legend for Figures

- Fig. 1.** Scanning electron micrograph of aorta, 30 minutes after superficial endothelial denudation, rat. Endothelial denudation of 3 cell widths and numerous platelets attached on these injury site having relatively sharp demarcation. ($\times 2,400$)
- Fig. 2.** Transmission electron micrograph of aorta, 30 minutes after superficial endothelial denudation, rat. Endothelial denudation and exposed internal elastic lamina with attached platelets in one layer are present. ($\times 10,000$)
- Fig. 3.** Scanning electron micrograph of aorta, 24 hours after superficial injury, rat. Regenerating cells appeared from the edge of the injury line. Platelets still attached at the center of the injury site. ($\times 4,000$)
- Fig. 4.** Scanning electron micrograph of aorta, 72 hours after superficial injury, rat. Regenerating cells cover the whole injury site. These cells are larger than the normal endothelial cell with the indistinct cytoplasmic border. The arrangement are parallel to the long axis of the vessel and slightly protrude into the lumen. ($\times 1,600$)
- Fig. 5.** Transmission electron micrograph of aorta without injury given to the endothelium, rat. The normal endothelial cell with flattened cytoplasm and scanty cellular organelles. ($\times 6,000$)
- Fig. 6.** Transmission electron micrograph of aorta, 72 hours after superficial injury, rat. The regenerating endothelial cells covered whole injury site. These cells are enlarged, cuboidal shaped and have abundant cytoplasm and well developed cellular organelles. The intercellular junction is incomplete. ($\times 6,000$)
- Fig. 7.** Scanning electron micrograph of aorta, 30 minutes after injury involving internal elastic lamina, rat. Exposed subendothelium with attached numerous platelets are present. ($\times 4,400$)
- Fig. 8.** Transmission electron micrograph of aorta, 30 minutes after injury involving internal elastic lamina, rat. Platelets attached in one layer on the exposed subendothelial tissue, and the fragmentations of internal elastic lamina (arrow head) are present. ($\times 8,000$)
- Fig. 9.** Scanning electron micrograph of aorta, 24 hours after injury involving internal elastic lamina, rat. Regenerating cells also present at periphery of the injury site, and exposed subendothelial tissues with scanty attached platelets are noted. ($\times 2,400$)
- Fig. 10.** Transmission electron micrograph of aorta, 24 hours after injury including internal elastic lamina, rat. Large round regenerating cell presents from the edge of the injury site, and this cell has abundant cytoplasm and well developed cellular organelles. Fragmentation of internal elastic lamina and migrating smooth muscle cell through this disruption site (arrow head) are present. ($\times 10,000$)
- Fig. 11.** Transmission electron micrograph of aorta, 24 hours after injury involving internal elastic lamina, rat. Migrating smooth muscle cell through disrupted internal elastic lamina (arrow head) are present and platelets still attached on exposed subendothelium in the center of the injury site. ($\times 10,000$)
- Fig. 12.** Transmission electron micrograph of aorta, 72 hours after injury involving internal elastic lamina, rat. The smooth muscle cells present in the intima without the regenerating cells and disruption of internal elastic lamina still present. ($\times 6,000$)











