

만성 신부전 환자에서 내피전구세포(Endothelial Progenitor Cells)의 감소와 혈관 형성능(Angiogenic Function)의 저하

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 순환기내과학교실,¹ 신장내과학교실,² 삼성생명과학연구소³
 천일석^{1,3} · 최진호^{1,3} · 김경리^{1,3} · 김성해¹ · 백경기¹ · 장신이^{1,3} · 성지동^{1,3}
 서원희^{1,3} · 변종회^{1,3} · 전은석^{1,3} · 김 범² · 허우성² · 오하영² · 김덕경^{1,3}

Decreased Number and Impaired Angiogenic Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Chronic Renal Failure

Il-Seok Cheon, MD¹, Jin-Ho Choi, MD^{1,3}, Kyoung Li Kim, MS^{1,3}, Sunghea Kim, MD¹,
 Kyungkee Back, MD¹, Shin Yi Jang, RN^{1,3}, Jidong Sung, MD^{1,3}, Wonhee Suh, PhD^{1,3},
 Jonghoe Byun, PhD^{1,3}, Eun-Seok Jeon, MD^{1,3}, Beom Kim, MD²,
 Woosong Huh, MD², Ha-Young Oh, MD² and Duk-Kyung Kim, MD^{1,3}

¹Division of Cardiology, ²Division of Nephrology, Samsung Medical Center, ³Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The increased risk of cardiovascular disease in patients with chronic renal failure (CRF) has been explained by accelerated atherosclerosis and impaired angiogenesis, where endothelial progenitor cells (EPC) may play key roles. It was hypothesized that : “an altered EPC biology may contribute to the pathophysiology of CRF”. **Subjects and Methods :** EPC were isolated from CRF patients on maintenance hemodialysis (n=44) and from a normal control group (n=30). After morphological and immunological characterization, the number and *in vitro* angiogenic function of the EPC were evaluated. **Results :** CRF patients showed markedly decreased numbers of EPC (44.6%) and colonies (75.3%) compared to the controls (p<0.001). These findings were corroborated by a 30.5% decrease in the migratory function in response to vascular endothelial growth factor (VEGF)(p=0.040) and by a 48.8% decrease in EPC incorporation into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)(p<0.001). In addition, The Framingham’s risk factor scores of both the CRF (r=-0.461, p=0.010) and normal groups (r=-0.367, p=0.016) were significantly correlated with the numbers of EPC. Indeed, under the same burden of risk factors the number of circulating EPC was significantly lower in CRF patients than in the normal group (p<0.001). A significant correlation was also observed between the dialysis dose (Kt/V) and EPC incorporation into the HUVEC (r=0.427, p=0.004). **Conclusion :** The EPC biology, which is critical for neovascularization and the maintenance of vascular function, was altered in CRF. Our data strongly suggest that dysfunction of circulating EPC has a role in the progression of cardiovascular disease in patients with CRF. (Korean Circulation J 2004;34(11):1033-1042)

KEY WORDS : Endothelial cell ; Chronic renal failure ; Coronary artery disease.

논문접수일 : 2004년 6월 2일

심사완료일 : 2004년 8월 31일

교신저자 : 김덕경, 135-710 서울 강남구 일원동 50번지

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 순환기내과학교실, 삼성생명과학연구소

전화 : (02) 3410-3419 · 전송 : (02) 3410-3849 · E-mail : dkkim@smc.samsung.co.kr

서 론

정상인에 비해 만성 신부전 환자는 수명이 짧고 관동맥질환의 유병률, 발생률 그리고 사망률 모두가 현저히 높음이 잘 알려져 있다.¹⁾²⁾ 경피적 관동맥 중재시술이나 관동맥 우회술과 같은 치료의 결과 또한 만성 신부전 환자에서는 시술 성공률과 장기 생존률이 모두 정상인보다 좋지 않다.³⁾⁴⁾

이와 같이 만성 신부전 환자들에서 심혈관 질환의 유병률과 사망률이 높은 원인은 주로 만성 신부전에서 동맥경화가 촉진되기 때문으로 설명되어 왔다.⁵⁾⁶⁾ 실험적 연구를 보면 경도의 신기능 저하에서 동맥경화의 진행이 급속도로 촉진된다.⁷⁾ 또한 심근허혈의 보상에 있어 필수적인 혈관신생(Angiogenesis) 역시 만성 신부전에서는 현저히 저하된다.⁸⁾ 그러나 왜 이와 같이 만성 신부전에서 동맥경화가 촉진되고 혈관신생이 저하되는가에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 만성 신부전 환자에서 고혈압, 탄수화물대사 이상, 지질대사 이상과 같은 심혈관계 위험인자의 유병률이 높은 것으로 어느 정도 이를 설명할 수 있으나, 심혈관질환의 중증도가 이들 위험인자만으로 설명하기에는 현저히 높다.⁹⁾¹⁰⁾ 이는 만성 신부전 환자에는 기존의 위험인자 외에 심혈관계 질환을 촉진시키는 다른 기전이 존재함을 암시한다.

최근 혈관 신생과 동맥경화의 진행에 있어서 내피전구세포의 역할이 중요시 되고 있다. 내피전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)는 정상인의 말초 혈액에 소량으로 존재하는 세포로서, 사이토카인의 자극을 받아 골수로부터 동원되어(mobilization) 허혈조직으로 회귀하여(homing) 혈관형성과 맥관신생에 기여한다.¹¹⁻¹⁴⁾ 또한 혈관내피 손상 시 복원세포(repair cell)의 역할을 하며,¹⁵⁻¹⁷⁾ 관동맥질환 환자에서 수가 감소되거나 기능이 저하됨이 알려져 있다.¹⁸⁻²²⁾

이에 본 저자들은 만성 신부전 환자와 정상인에서 내피전구세포의 수와 혈관형성 능력을 비교함으로써 만성 신부전 환자에서 내피전구세포의 수 또는 기능적 감소가 관동맥 질환의 발생에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

본 연구는 혈액 투석을 받고 있는 44명의 남자 신부

전 환자와 30명의 건강한 성인남자를 대상으로 하였다. 심혈관계 질환의 증상이 있거나 신생물, 외상, 최근의 수술력, 또는 당뇨병성 망막병증(retinopathy) 등과 같이 신생혈관형성 유발 가능성을 가진 사람들은 본 연구에서 제외되었다. 여성 또한 생리주기에 따른 혈관신생의 가능성으로 인하여 제외되었다.²²⁾ 연구기간 중 스타틴, 경구혈당강화제, 항고혈압제들의 복용은 기존대로 허용되었으나 비타민을 포함한 새로운 약물의 사용은 연구 시작 최소 2주 이전부터 중지하였다.

내피전구세포의 분리

투석 시작 직전 말초정맥에서 채혈된 혈액 30 mL을 Ficoll-Paque Plus(Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom)와 함께 원심 분리 하여 단핵구층을 얻었다. 이를 VEGF-A, Human FGF-2, Human EGF, IGF-1 등의 성장인자들과 아스코르빈산이 포함된 EGM-2 MV(Singlequot media Cambrex, East Rutherford, NJ) 각 well 당 4×10^6 cells씩, 2% gelatin(Sigma, St. Louis, MO)-coated 6 well plate(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 배양하였다. 배양 3일 후 착상되지 않은 세포들을 제거하고 배양액을 교체하였으며 7일간 배양하였다.

내피전구세포의 성상

혈관내피세포(Endothelial cell, EC) 표현형 분석은 배양 제 7 일에 시행하였다. 세포들을 1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(DiI)-labeled acetylated LDL(Molecular Probes, Eugene, OR)로 37°C에서 3시간 동안 배양한 후, 다시 fluorescein-isothiocyanate(FITC)-conjugated Ulex europaeus agglutinin(UEA)-1 lectin (10 μ g/mL, Sigma)에서 4시간 동안 배양 후 형광 현미경(Zeiss Jena, Germany)로 관찰하여 이중형광을 나타내는 내피전구세포를 확인하였다.²¹⁾²³⁾ 양성 및 음성 대조군으로는 인간제대정맥 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)과 NIH3T3 세포들을 사용하였다.

내피전구세포의 대표적인 특성인 세포 내 산화질소(nitric Oxide, NO) 생성 능력을 알아보기 위하여 내피전구세포를 calcium-free phosphate-buffered saline(PBS)로 2회 세척 후, DAF-2 DA(10 μ M)과 L-

arginine(1 mM)이 함유된 Kreb-Henseleit 완충액에서 15분 처리 후 37°C에서 15분 동안 배양하고 각 well에 50 ng/mL의 recombinant human VEGF₁₆₅(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 첨가하였다. Membrane NO-특이 형광 표식자인 diamino-fluorescein-2 diacetate(DAF-2 DA ; Daiichi, Japan)로 처리한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

세포 표면 항원은 유세포분석기를 이용하여 분석하였다.¹¹⁾²³⁾ 세포들을 trypsin/1 mM EDTA 용액에서 잠시 배양하고 피펫을 이용하여 분리한 다음 각각 1×10^5 개의 세포를 분석하였다. 1차 항체로서 VEGF receptor KDR에 대한 항체(1 : 1000, Sigma, St. Louis, MO)와 von Willebrand factor(1 : 2500, vWF ; BD Pharmingen, San Diego, CA) 및 VE-cadherin(1 : 1500, BD Pharmingen, San Diego, CA)에 대한 항체를 사용하였다. 음성 대조군으로는 말초 혈액 단핵구를 사용하였다. 또한 같은 방법을 사용하여, 내피전구세포를 배양한 6-well plate 상에서 KDR 및 vWF의 양성, NO 합성 여부를 확인하였다.

내피전구세포 수의 측정

내피전구세포 수와 집락(colony) 수는 현미경의 100 배 배율 시야에서 무작위적으로 선택한 12 부위에서 이들을 관찰하여 단위 mm² 당 세포 또는 집락을 산출하였다.

내피전구세포의 이동능(Migratory function) 분석

내피전구세포 이동능은 modified Boyden chamber 기법으로 측정하였다. 8 μM 크기의 미세공이 있는 6.5-mm polycarbonate 막(membrane)이 장착된 24-well Transwell apparatus(Coster, Corning, NY)의 각 well에 4×10^4 개의 내피전구세포를 분주 후 growth factor-free EBM-2 배양액 또는 human VEGF₁₆₅ 50 ng/mL이 함유된 EBM-2 배양액에서 24시간 배양하였다. Giemsa 염색 후 현미경 100배 배율 시야에서 무작위로 선택된 4부위에서 세포 수를 계산하여 이동능을 산출하였다.

내피전구세포의 편입능 분석(Matrigel tube formation assay)

신생혈관 형성에 있어 중요한 단계인 내피전구세포의

내피세포 혈관구조내로의 편입(incorporation) 능력은 Matrigel tube formation assay로 평가하였다. 형광염색액 Dil(molecular probes, Eugene, OR)로 표시된 Dil-labeled EPC(1×10^4)와 HUVEC(4×10^4)을 Matrigel(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)이 포함된 4개의 well chamber slide에 분주한 후 EGM-2 배양액에서 24시간 동안 배양하였다. 편입된 세포의 수를 현미경 100배 배율 시야에서 무작위로 선택된 4부위에서 산출하였다.

통계 분석

통계 소프트웨어로는 SPSS release 11.0(SPSS Inc, Illinois)를 사용하였다. 연속 변수 분석에는 Mann-Whitney test 또는 Wilcoxon signed rank test를, 비연속 변수 분석에는 Fischer's exact test를 사용하였다. 단순상관관계분석에는 Spearman's correlation coefficient를 사용하였다. 다변량 조건 하에 EPC Count 변화량 분석을 위해 다중회귀분석을 사용하였다. 모든 통계치는 p<0.05 수준에서 검증되었다.

Table 1. Characteristics of study subjects

	Normal	CRF	p
N	30	44	-
Age (year)	53.5±0.8	58.1±2.1	0.042*
BMI (kg/m ²)	24.7±0.4	20.6±0.4	<0.001*
Total cholesterol (mg/dL)	179.2±5.9	134.1±4.3	<0.001*
HDL-cholesterol (mg/dL)	42.4±1.5	36.7±1.3	<0.001*
Hypertension (%)	36.7 (11)	97.7 (43)	<0.001*
Diabetes (%)	3.3 (1)	52.3 (23)	<0.001*
Smoker (%)	36.7 (11)	18.2 (8)	0.104
Dialysis duration (year)	-	4.3±0.5 (44)	-
Use of statin (%)	0 (0)	18.2 (8)	0.018*
Use of erythropoietin (%)	0 (0)	100 (44)	<0.001*
Plasma VEGF (pg/mL)	32.2±3.8	32.6±3.2	0.934
WBC (/mm ³)	6434±228	6142±329	0.259

Data are means±SEM. Mann-Whitney test for continuous variables and Fischer's exact test for categorical variables. p are derived from the comparison of the normal and CRF group. Asterisk (*) denotes two-tailed p<0.05. CRF: chronic renal failure, DM: diabetes mellitus, BMI: body mass index, HDL: high density lipoprotein, VEGF: vascular endothelial growth factor, WBC: peripheral blood white blood cell

결 과

환자군의 임상적 특성

대상 환자군의 임상적 특성은 Table 1과 같다. 만성 신부전 환자군의 평균 연령이 정상 대조군 보다 4.6세 더 높았고, 평균 체질량지수(mean body mass index)는 더 낮았다. 총콜레스테롤과 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL-cholesterol)은 만성 신부전 환자군에서 의미 있게 낮았다. 신부전 환자들은 모두 erythropoietin을 투여받았으며 대부분(97.7%, n=43) 항고혈압제를 복용하고 있었다. 투석 평균기간은 4.3 ± 0.5 년이었다. ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정된 혈장 VEGF level은 양 군 간 차이가 없었다. 만성 신부전군 중 22명은 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy), 나머지 22명은 비당뇨성 신부전이였다.

내피전구세포의 성장

단핵구 배양 72시간 후에 원형 세포들로 구성된 집락과 여기서 방사되는 방추형 세포들이 관찰되었다(Fig. 1A, B). 이들 세포들은 acetylated LDL의 섭취, UEA-1 lectin의 결합(Fig. 1C-H) 및 vWF와 KDR의 발현(Fig. 1I-K), 산화질소의 생성(Fig. 1L, M) 등 혈관내피세포에 특징적인 성질을 보였으며, 이들 특성은 유세포분석에서도 확인되었다(KDR 23.9%, vWF 39.1%, VE-cadherin 53.5% 양성) (Fig. 1O).

내피전구세포 수

단핵구를 1주일 간 배양 후 생성된 내피전구세포의 집락 수는 정상 대조군에 비해 만성 신부전 환자군에서 유의하게 적었고(133.7 ± 21.6 versus 542.5 ± 64.1 per 10^3 mm², $p < 0.001$) (Fig. 2A-C), 내피전구세포의 수 역시 적었다($10.0 \pm 1.2 \times 10^3$ vs $17.8 \pm 2.0 \times 10^3$ per

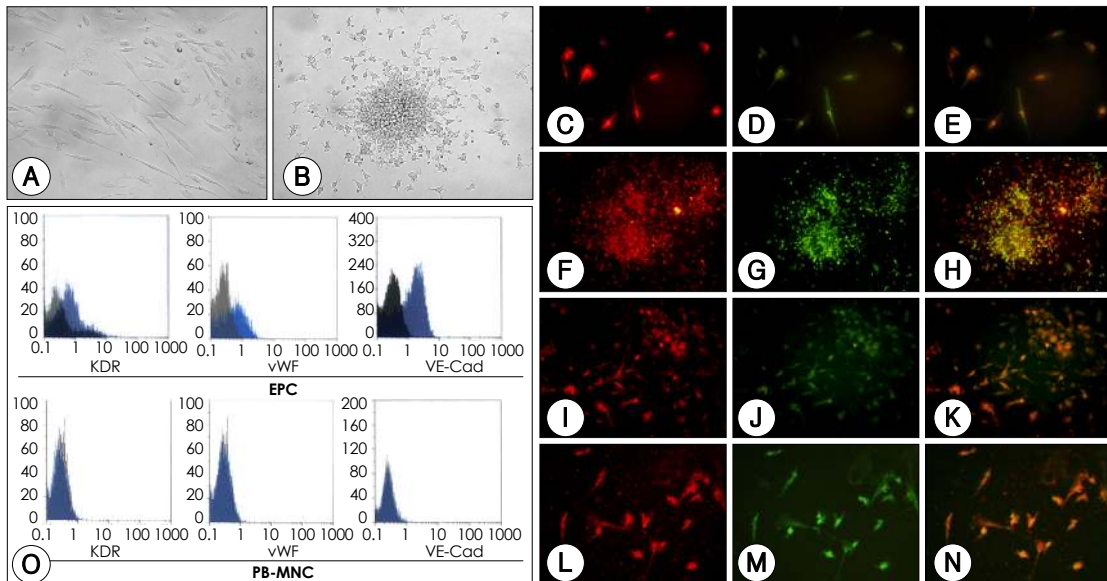


Fig. 1. Identification of the endothelial lineage phenotype of cultured EPC. A, B: culture of peripheral blood mononuclear cells resulted in the emergence of characteristic spindle-shaped EPCs (A) and EPC colonies characterized by a central cluster of rounded cells surrounded by radiating spindle-shaped cells (B). C-H: EPCs (C-E) and EPC colonies (F-H) were shown to uptake acetylated LDL (C, F) and bind UEA-1 (D, G). Merged images show that most cells are dual-positive (E, H). I-K: EPCs and EPC colony showed expression of endothelial lineage markers, vWF (I) and KDR (J). Merged image shows simultaneous expression of these markers (K). L-N: EPCs were both positive for vWF (L) and DAF2-DA, a NO synthesis indicator (M). Merged image shows specific NO synthesis in vWF-positive cells (N). O: FACS analysis of EPC cultured for one week showed that EPCs express markers consistent with endothelial lineage (KDR: 23.9%, vWF: 53.3%, VE-cadherin: 39.1%). Black and blue graph denote control and target, respectively. PB-MNC (peripheral blood mononuclear cell) served as negative controls. EPC: endothelial progenitor cell, UEA: *ulex europaeus* agglutinin-1 lectin, KDR: kinase insert domain-containing receptor, vWF: von willebrand factor, DAF2-DA: 4, 5-diaminofluorescein diacetate, FACS: fluorescence-activated cell sorter, VE: vascular endothelial.

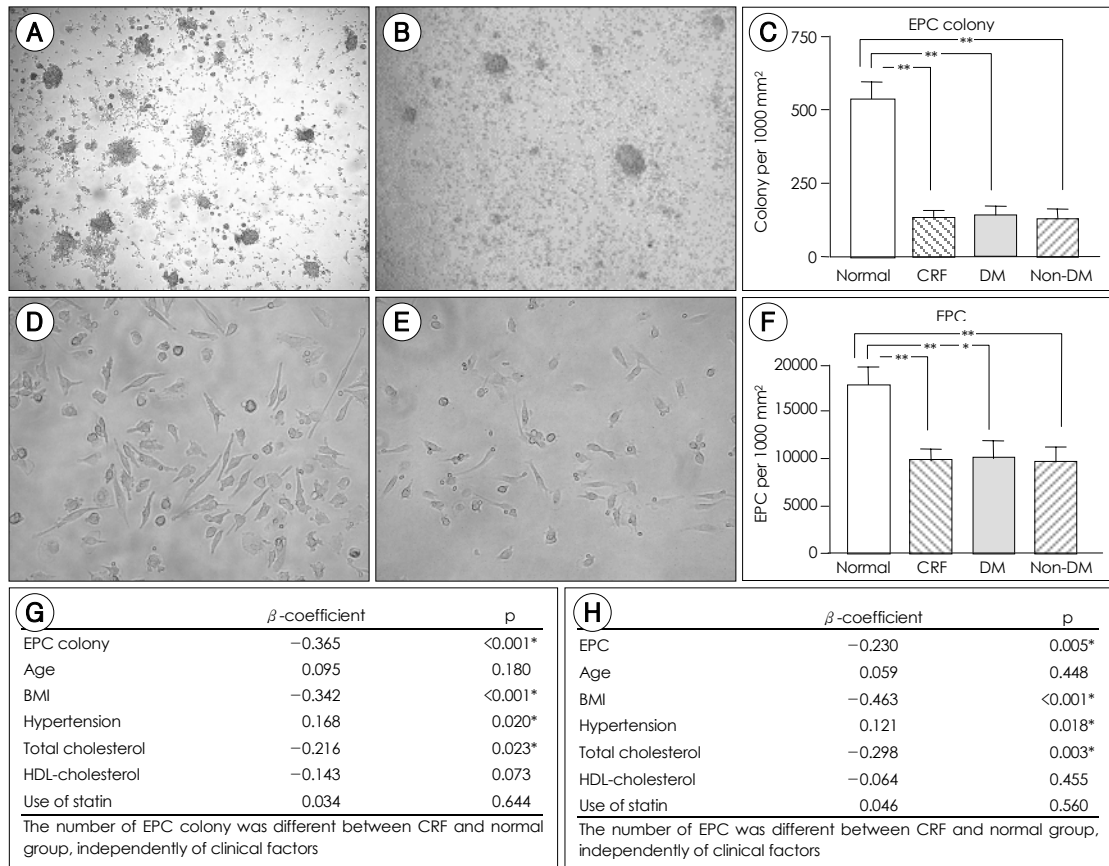


Fig. 2. The number of EPCs and EPC colonies counted after one week of culture is reduced in CRF. A, B: representative photos of EPC colony culture from the normal (A) and CRF group (B), demonstrating fewer colonies in the CRF group. C: EPC colonies were significantly reduced (by 75.3%) in the CRF group. D, E: representative photos of EPC cultures from the normal (D) and CRF group (E), demonstrating fewer EPCs in the CRF group. F: EPCs were also significantly reduced (by 44.6%) in the CRF group. G, H: the decrease in EPC colonies and EPC was independent of other clinical factors ($p < 0.05$). Asterisk (*) denotes statistical significance ($p < 0.05$). EPC: endothelial progenitor cell, CRF: chronic renal failure, BMI: body mass index, HDL: high density lipoprotein.

10^3 mm^2 , $p < 0.001$) (Fig. 2D–F). 이러한 양 군간의 차이는 내피전구세포 수에 영향을 주는 것으로 알려진 연령, 체질량 지수, 총콜레스테롤, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 고혈압, 스타틴 사용 등의 임상적 요소들로¹⁵⁾¹⁸⁾²⁴⁾ 보정한 후에도 유지되었다(EPC colonies of CRF *versus* normal; $p < 0.001$, EPC of CRF *versus* normal; $p = 0.005$) (Fig. 2G, H). 당뇨병성 신부전과 비당뇨병성 신부전군 사이에는 유의한 차이가 없었다.

내피전구세포의 이동능

혈관신생에 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 내피전구세포의 이동능은 기저값은 정상 대조군과 만성 신부

전 두 군간에 차이가 없었다. 이동능은 VEGF 50 ng/mL 투여 후 양 군 모두에서 증가하였으며(baseline *versus* VEGF-augmented migration, CRF patients; 14.9 ± 3.3 *versus* 22.4 ± 3.7 per $\times 100$ high power field (HPF); $p = 0.001$, normal group; 19.1 ± 3.2 *versus* 32.9 ± 5.3 per $\times 100$ HPF; $p = 0.016$) (Fig. 3A–E), 만성 신부전 환자에서는 이동능의 증가 정도가 정상 대조군에 비해 상대적으로 52.8% 저하되어 있었다(7.5 ± 1.4 *versus* 15.8 ± 3.5 per $\times 100$ HPF, $p = 0.036$) (Fig. 3F). 이 차이는 내피전구세포의 수나 임상적 인자에 대한 보정 후에도 유의하였다(22.4 ± 3.7 *versus* 32.9 ± 5.3 per $\times 100$ HPF, $p = 0.017$).

내피전구세포의 편입능 평가(Matrigel tube formation assay)

혈관내피세포에 의해 형성된 tubular network으로의

내피전구세포의 편입(incorporation) 정도는 혈관내피 세포의 분화 평가에 사용되는 Matrigel assay를 사용하여 측정하였다.²⁵⁾ 내피전구세포의 편입 정도는 정상

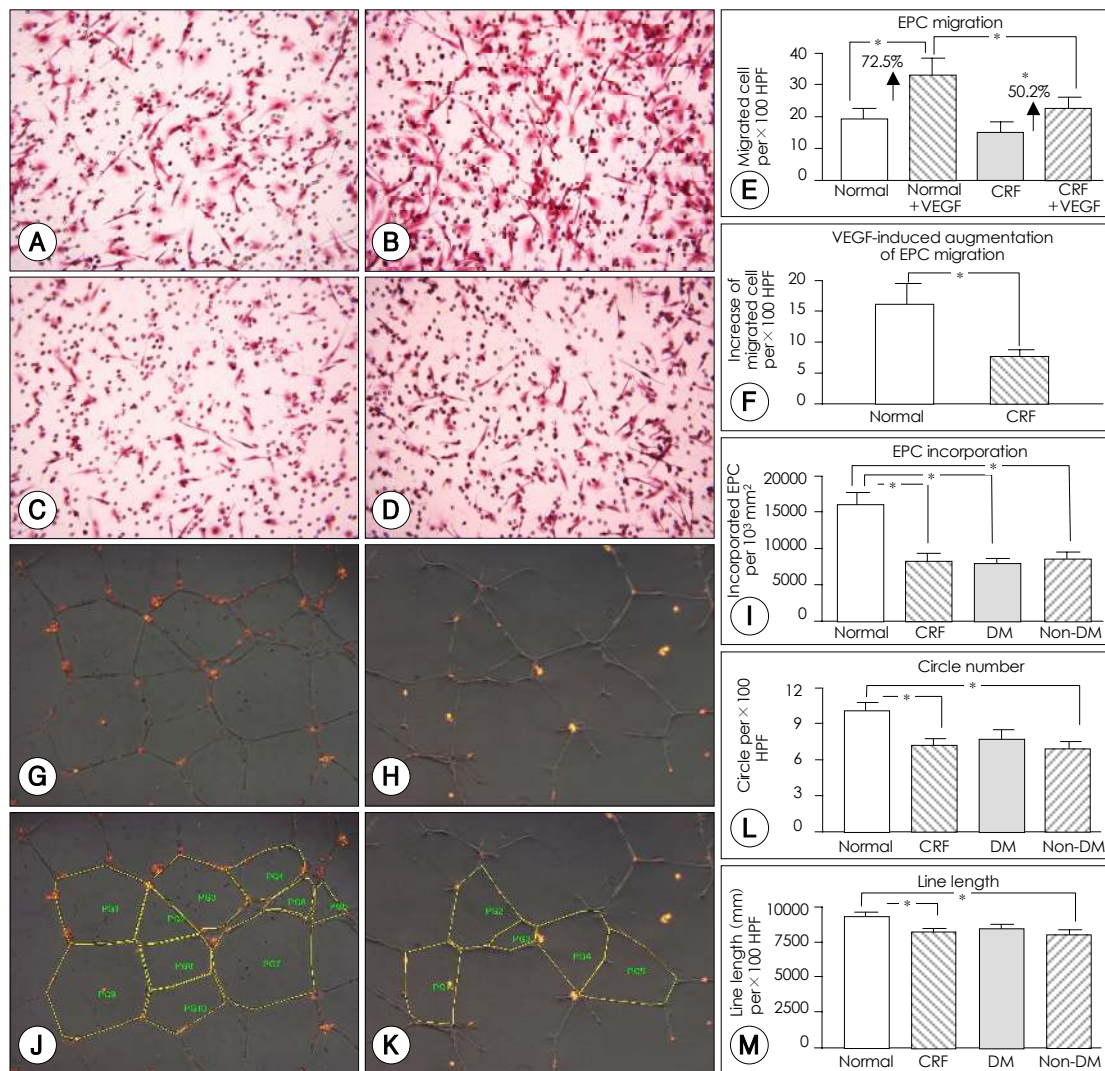


Fig. 3. The biological function of EPC is impaired in CRF. To evaluate EPC migration, a modified Boyden chamber assay was used with growth factor-free medium or VEGF supplemented medium. A, B: baseline (A) and VEGF-stimulated (B) EPC migration in the normal group. C, D: baseline (C) and VEGF-stimulated (D) EPC migration in the CRF group. The small dots are holes of the Boyden chamber membrane. E: baseline migratory function of EPC did not differ between two groups ($p > 0.05$). Supplementation with VEGF led to significantly augmented migration of EPCs in both groups (normal group; $p = 0.001$, CRF group; $p = 0.016$). However, EPC of the CRF group showed a reduced increase in the number of migrated cells (50.2% increase) relative to that of the normal group (72.5% increase). F: the reduced increase in EPC migration in CRF was statistically significant ($p = 0.017$). To evaluate EPC incorporation into EC and stimulation of EC tube formation, EPCs were labeled with Dil and co-cultured with HUVEC in Matrigel-coated four-well chamber slide for 24 hours. Fluorescence and light images of identical fields were merged. G–I: significantly fewer EPCs from CRF patients were incorporated into the tubules formed by HUVEC (G) than those of the normal controls (H). EPC incorporation in the CRF group was reduced by 51.9% (I). Significantly less tubule formation and shorter tubule line lengths were also identified in the CRF group (J) than in the normal group (K). The graphs show a 27.7% decrease in the number of circles ($p = 0.001$) (L) and a 16.6% decrease in the lengths of circle lines ($p = 0.029$) (M). *: $p < 0.05$. EPC: endothelial progenitor cell, CRF: chronic renal failure, VEGF: vascular endothelial growth factor, EC: endothelial cell, HUVEC: human umbilical vein endothelial cell.

대조군에 비해 만성 신부전 환자군에서 유의하게 적었으며(8.2 ± 0.5 per mm^2 versus 16.0 ± 1.1 per mm^2 , $p < 0.001$), 이는 임상인자들로 보정 후에도 유의하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 3G–I). 형성된 tubular network의 망(circle) 수와 길이도 감소하였다(Fig. 3J–M). 당뇨병성과 비당뇨병성 만성 신부전 환자군 사이의 차이는 없었다.

내피전구세포의 수와 관동맥 질환의 위험도와의 상관관계

저자들은 만성 신부전환자에서 촉진되는 동맥경화와 감소된 혈관 신생능의 임상적 기결인 관동맥질환의 위험도와 내피전구세포의 수의 상관관계를 조사하였다. 본 연구에 포함된 대상은 모두 임상적인 심혈관질환이 없었으므로, 관동맥질환 위험도는 Framingham risk score 계산식에 따라서 위험인자의 수와 가중치로서 10년간의 관동맥질환 위험도를 산출하였다.²⁰⁾²⁶⁾ 그 결과 관동맥질환 위험도는 만성 신부전 환자군($r = -0.367$, $p = 0.016$)과 정상 대조군($r = 0.461$, $p = 0.010$) 모두에서

유의한 역상관 관계를 보였다(Fig. 4A, B). 이는 내피전구세포 수가 감소된 경우 정상 신기능을 가진 사람뿐 아니라 만성 신부전 환자군에서도 관동맥 질환의 위험도가 증가한다는 것을 보여주는 결과이다.²⁰⁾

이에 동일한 관동맥 위험도하에서 양 군을 비교하기 위하여 연령으로 보정한 상대위험도를 계산하고 이에 따라서 내피전구세포의 수를 비교하였다.²⁶⁾ 그 결과 내피전구세포의 수는 만성 신부전 환자군($r = -0.422$, $p = 0.005$)과 정상 대조군($r = -0.399$, $p = 0.029$) 모두에서 연령으로 보정한 상대위험도와 유의한 역상관관계를 보였으며, 정상 대조군보다 만성 신부전 환자군에서 유의하게 더 감소되어 있었다($p < 0.001$) (Fig. 4C). 이에 이러한 차이가 관동맥질환의 저위험군과 고위험군 모두에서 나타나는가 알아보고자 대상군을 관동맥 위험도를 연령별 최적 위험도(optimal risk profile)의 2배 이하인 저위험군과 2배 이상인 고위험군으로 나누어 분석한 결과,²⁶⁾ 내피전구세포의 수가 양 군 모두에서 만성 신부전 환자군에서 유의하게 적었다(low risk group ;

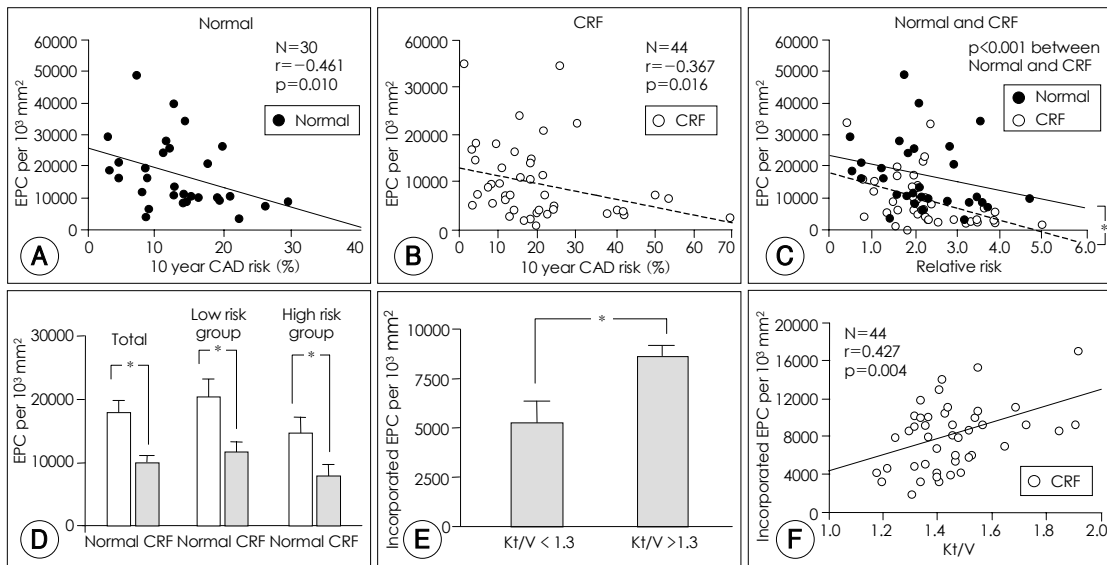


Fig. 4. The level of circulating EPC is inversely correlated with the risk factor score of coronary artery disease, and the EPC incorporation function is correlated with the dose of dialysis (Kt/V). A, B: the correlation between the number of EPC and the 10-year coronary artery disease risk estimated from the Framingham risk score was evident in both the normal group (A) and CRF group (B). C: the age-adjusted relative risk of coronary artery disease was calculated to compare the numbers of EPC under the same risk burden. The correlation was maintained in both the normal ($r = -0.399$, $p = 0.029$) and CRF group ($r = -0.422$, $p = 0.005$), and there were significantly fewer EPCs in the CRF group than in the normal group after correction for risk burden ($p < 0.001$). D: the number of EPC was significantly reduced not only in the total CRF group but also in the low risk ($p = 0.009$) and high risk subgroup ($p < 0.001$). E, F: the EPC incorporation function was significantly different between lower doses and higher doses of dialysis ($p = 0.015$) (E), and correlated significantly with the dose of dialysis ($r = 0.427$, $p = 0.004$) (F). EPC: endothelial progenitor cell, CRF: chronic renal failure, CAD: coronary artery disease.

CRF versus normal ; $11.7 \pm 1.6 \times 10^4$ versus $20.3 \pm 2.8 \times 10^4$ per 10^3 mm² ; p=0.009, high risk group ; $8.2 \pm 1.8 \times 10^4$ versus $15.3 \pm 2.8 \times 10^4$ per 10^3 mm² ; p<0.001) (Fig. 4D). 이들은 만성 신부전환자에서 내피전구세포가 위험인자의 유무에 관계없이 감소되어 있음을 보여주는 결과들이다.

내피전구세포의 이동 기능에 대한 투석의 영향

저자들은 본 연구에서 내피전구세포 수의 감소된 경우 관동맥질환의 위험도가 높았으며, 이에 내피전구세포의 수 또는 기능의 감소 정도가 만성 신부전환자의 사망률과 밀접한 관련이 있는 투석용량(Kt/V)²⁷⁾와 연관이 있을 것으로 추정하였다. 적정 투석 용량은 Kt/V \geq 1.3으로 간주되고 있으므로²⁷⁾ Kt/V 1.3 미만인 저용량투석 환자군과 Kt/V 1.3 이상인 고용량투석 환자군에서 내피전구세포의 기능과 수를 비교하였다. 그 결과 저용량투석 환자군에서 고용량투석 환자군보다 내피전구세포의 혈관내피세포로의 편입이 유의하게 감소하였으며 ($5.3 \pm 1.1 \times 10^3$ versus $8.6 \pm 0.5 \times 10^3$ EPC per 10^3 mm², p=0.015) (Fig. 4E), 또한 Kt/V로 계산된 투석용량은 편입 정도와 유의한 상관성을 보였다 (r=0.427, p=0.004) (Fig. 4F). 이는 요독물질을 보다 많이 제거하는 고용량의 투석이 내피전구세포의 기능을 호전시킬 수 있음을 시사하는 흥미로운 결과이다. 그러나 편입능 외에 내피전구세포의 수나 내피전구세포 집락 수, 또 내피전구세포의 이동능은 투석 용량과 상관관계를 보이지 않았다.

고 찰

저자들은 본 연구에서 내피세포기능과 혈관신생능력이 저하된 것으로 알려진 만성 신부전 환자에서 순환혈액 내 내피전구세포의 수가 감소되어 있고 혈관신생능력이 저하되어 있음을 보였다. 최근 동맥경화 과정 중 일어나는 혈관내피의 손상의 복원과정에 있어서 골수에서 유래한 내피전구세포가 관여한다는 사실이 밝혀지고 있다.¹⁵⁾¹⁶⁾²⁰⁾ 이 과정은 골수로부터의 동원, 혈관 손상 부위로의 회귀, 새로이 형성된 혈관 또는 손상된 혈관으로의 편입 등 세 가지로 나누어 볼 수 있다. 본 연구에서 양 군간 혈장 VEGF 농도 차이가 없음에도 불구하고 만성 신부전 환자에서 내피전구세포 수가 감소되

어 있는 것은 만성 신부전 환자에서 내피전구세포의 동원, 생성, 및 반감기 등에서 근본적인 문제가 있음을 암시한다.

현재 내피전구세포는 단독으로 새로운 혈관을 만들어나가기 보다는 기존의 혈관내피세포들과 함께 혈관신생에 관여할 것으로 생각된다.¹⁸⁻²⁰⁾ 본 연구에서 만성 신부전 환자의 내피전구세포의 이동능과 편입능 모두 정상 대조군에 비해 감소하였고, 내피전구세포와 공배양시 혈관내피 세포의 망 형성 역시 감소하였다. 이러한 결과들은 만성 신부전에서 내피전구세포가 손상된 혈관내피에 편입되거나 혈관신생 부위에 포함되는 정도가 저하되며, 또한 성숙된 혈관내피로의 분화도 억제될 것을 시사한다. 이는 만성 신부전에서 손상된 혈관내피세포의 회복이나 혈관 신생능이 감소함에 대한 설명이 될 수 있겠다.⁸⁾²⁸⁾

본 연구에서 동일한 관동맥 위험도를 가진 정상 대조군에 비해 만성 신부전 환자에서 내피전구세포의 수가 훨씬 적었고, 양군 모두에서 내피전구세포의 수와 관동맥 위험도는 유의한 역상관 관계를 보였다. 이는 만성 신부전 환자들이 실제 가지고 있는 관동맥 위험 인자에 비해 관동맥 질환의 유병률과 사망률이 상대적으로 더 높다는 기존의 임상연구 결과와 일치한다.⁹⁾¹⁰⁾ 즉, 본 연구의 결과는 노화, 당뇨, 고콜레스테롤혈증 등에서 밝혀진 것처럼 만성 신부전에서도 내피전구세포의 골수로부터의 동원이나 손상된 혈관내피로의 편입이 감소되어 있음을 보여 주며,¹⁸⁻²²⁾ 만성 신부전 환자에서 동맥경화가 급속히 진행되는 기전에 대한 새로운 설명이 될 수 있겠다.

본 연구에서 투석용량과 내피전구세포의 편입능은 역상관관계를 보였다. 투석 용량은 말기 신부전 환자에서 요독성 물질의 제거 정도를 나타내는 지표로 투석용량이 높을수록 생존율이 향상됨이 알려져 있다.¹⁾²⁷⁾ 따라서 투석 용량을 증가시켜 더 많은 요독성 물질을 제거한다면 내피전구세포의 혈관 형성능을 개선시키고 만성 신부전 환자들의 예후를 호전시킬 가능성이 있겠다.

만성 신부전 환자에서 왜 내피전구세포의 수와 기능이 저하되는가에 대해서는 기존에 발표된 연구들과 본 연구의 결과를 토대로 몇 가지 가능성을 추론해 볼 수 있겠다. 첫째로 만성 신부전에서 항진되는 산화스트레스가 내피전구세포가 혈관내피세포로 분화하는 것을 억제하거나 손상된 혈관내피세포의 재생을 억제하기 때문

일 수 있다. 둘째로 만성 신부전에서 저하되는 산화질소의 생성능이 원인일 수 있다. 만성 신부전에서는 내피전구세포의 동원에 필수적인 역할을 하는 산화질소합성효소의 기능이 요독 물질의 주요 성분인 구아니딘 화합물에 의하여 억제된다. 이러한 기전으로 골수에서의 내피전구세포의 동원이 감소할 수 있다. 세번째로 요독 물질 자체에 의한 영향이 있다. 만성 신부전에서 요독 물질에 의해 T나 B림프구의 기능이 감소되는데, 마찬가지로 요독성 물질이 내피전구세포의 기능을 저하시킬 수 있을 것이다. 실제 본 연구 결과 요독성 물질의 양을 대략 반영하는 혈액요소질소(BUN)과 내피전구세포 수와는 어느 정도 역상관계가 있었다($p=0.006$, data not shown). 그러나 혈액요소질소 값은 측정의 재현성이 낮고 요독성 물질을 정확히 반영하지는 못하므로 위 데이터는 저자들의 가설을 완전히 뒷받침한다고 보기에는 어렵다고 하겠다.

근래 골수 유래의 자가 줄기세포를 이식하여 심근재생이나 혈관신생을 촉진시키고자 하는 치료법이 각광받고 있다.²⁹⁾ 저자들의 연구 결과는 이러한 자가 줄기세포를 이용한 치료가 본 연구 및 기존의 연구 결과 골수 유래 세포인 내피전구세포의 기능이 저하된 것으로 밝혀진 고령, 당뇨, 또는 만성 신부전 환자들에서는 효과가 떨어질 수 있음을 시사한다. 그러나 만성 신부전에서 내피전구세포의 기능 저하의 원인이 제거될 수 있는 고용량투석 군에서 내피전구세포의 기능이 증가된다는 본 연구의 결과는, 내피전구세포의 생리적 기능을 호전시키는 치료전략이 줄기세포의 치료성적을 높이거나 또는 향후 관동맥질환의 위험도를 호전시킬 수 있음을 보여주는 획기적인 결과이다.

결론적으로 저자들은 만성 신부전 환자에서 정상인에 비해 내피전구세포수가 감소하고 기능이 저하됨을 보였으며, 이는 관동맥질환 위험도와 역상관계가 있음을 밝혔다. 이는 만성 신부전에서 관찰되는 동맥경화의 급속한 진행과 혈관신생 저하, 그리고 관동맥질환의 위험도 증가를 설명할 수 있는 새로운 지견이다.

요 약

배경 및 목적 :

이제까지 만성 신부전 환자에서 심혈관 질환의 위험 증가는 동맥경화 진행의 가속과 혈관신생의 저하에 기

인한다고 알려져 있다. 이에 저자들은 동맥경화 진행과 혈관신생에 중요한 역할을 하는 내피전구세포의 생물학적 변화가 만성 신부전에서 심혈관 질환의 증가에 기여하리라 가정하였다.

방 법 :

혈액 투석을 받는 만성 신부전 환자들($n=44$)과 정상 대조군($n=30$)에서 내피전구세포를 분리 후 배양하였다. 내피전구세포의 형태학적 및 면역학적 특성을 확인 후, 각 군에서 내피전구세포의 수 및 혈관신생기능을 평가하였다.

결 과 :

만성 신부전 환자들은 정상 대조군에 비해 혈관내피세포 수(44.6%)와 집락군의 수(75.3%)가 현저히 적었으며($p<0.001$), 내피전구세포의 이동능은 30.5% 감소하였고($p=0.040$), 혈관내피세포로의 편입능은 48.8% 감소하였다($p<0.001$). 만성 신부전군과 정상 대조군에서 Framingham 위험인자 점수로 추정된 관동맥질환의 위험도는 내피전구세포의 수와 유의한 역상관계를 보였으며($r=-0.461$, $p=0.010$; $r=-0.367$, $p=0.016$), 동일한 관동맥질환 위험도 하에서도 내피전구세포의 수는 만성 신부전군에서 정상 대조군 보다 유의하게 적었다($p<0.001$). 또한 만성 신부전 환자군에서 투석 용량(Kt/V)과 인간제대정맥내피세포로의 편입 사이에 유의한 상관관계가 있었다($r=0.427$, $p=0.004$).

결 론 :

만성 신부전에서 혈관신생과 혈관 기능 유지에 중요한 역할을 하는 내피전구세포가 수적 및 기능적으로 저하되어 있었다. 이는 순환혈액 내 내피전구세포의 수적 및 기능적 저하가 만성 신부전환자에서 촉진되는 심혈관계 질환의 진행에 중요한 역할을 할 것임을 강력히 시사하는 결과이다.

중심 단어 : 내피세포 ; 만성 신부전 ; 관동맥질환.

본 연구는 과학기술부/한국과학기술평가원의 국가지정연구실 사업(M1-0203-00-0048), 한국 보건복지부의 보건 의료인프라개발사업(01-PJ1-PG1-01CH06-0003) 및 한국과학재단의 우수연구센터사업(SRC-MTRC) 연구비로 수행되었다.

REFERENCES

- 1) Eknoyan G. *On the epidemic of cardiovascular disease in patients with chronic renal disease and progressive renal*

- failure: a first step to improve the outcomes. *Am J Kidney Dis* 1998;32:S1-4.
- 2) Pastan S, Bailey J. *Dialysis therapy. N Engl J Med* 1998; 338:1428-37.
 - 3) Sadeghi HM, Stone GW, Grines CL, Mehran R, Dixon SR, Lansky AJ, Fahy M, Cox DA, Garcia E, Teheng JE, Griffin JJ, Stuckey TD, Turco M, Carroll JD. *Impact of renal insufficiency in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. Circulation* 2003;108:2769-75.
 - 4) Liu JY, Birkmeyer NJ, Sanders JH, Morton JR, Henriques HF, Lahey SJ, Dow RW, Maloney C, DiScipio AW, Clough R, Leavitt BJ, O'Connor GT. *Risks of morbidity and mortality in dialysis patients undergoing coronary artery bypass surgery. Circulation* 2000;102:2973-7.
 - 5) Goldsmith DJ, Covic A. *Coronary artery disease in uremia: etiology, diagnosis, and therapy. Kidney Int* 2001;60: 2059-78.
 - 6) Ishimura E, Shoji T, Emoto M, Motoyama K, Shinohara K, Matsumoto N, Taniwaki H, Inaba M, Nishizawa Y. *Renal insufficiency accelerates atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. Am J Kidney Dis* 2001;38:S186-90.
 - 7) Bro S, Bentzon JF, Falk E, Andersen CB, Olgaard K, Nielsen LB. *Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2466-74.
 - 8) Amann K, Breitbach M, Ritz E, Mall G. *Myocyte/capillary mismatch in the heart of uremic patients. J Am Soc Nephrol* 1998;9:1018-22.
 - 9) Moeslinger T, Spieckermann PG. *Urea-induced inducible nitric oxide synthase inhibition and macrophage proliferation. Kidney Int Suppl* 2001; 78:S2-8.
 - 10) Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. *Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. Kidney Int* 2000;58:353-62.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) Joe YA, Baek SH, Park HE, Lee YH, Kwon HK, Kim YJ, Lee SY, Seung KB, Chae JS, Kim JH, Hong SJ, Choi KB. *In vitro differentiation of endothelial precursor cells derived from umbilical cord blood. Korean Circ J* 2002;32: 646-54.
 - 14) Yoon CH, Seo JB, Hur J, Choi JH, Kim JH, Park SJ, Jo SH, Lee JH, Hwang KK, Kim SH, Zo JH, Kim MA, Kim HS. *Characterization of two types of endothelial progenitor cells (EPC). Korean Circ J* 2004;34:304-13.
 - 15) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Circulation* 2002;105:3017-24.
 - 16) Rafii S, Lyden D. *Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. Nat Med* 2003;9:702-12.
 - 17) Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature* 1993;362:801-9.
 - 18) Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. *Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. Circulation* 2003;108:457-63.
 - 19) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res* 2001;89:E1-7.
 - 20) Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med* 2003;348:593-600.
 - 21) Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation* 2002;106:2781-6.
 - 22) Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. Circulation* 2003;107:3059-65.
 - 23) 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.
 - 24) Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. J Clin Invest* 2001;108:391-7.
 - 25) Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat Med* 2001;7:1194-201.
 - 26) Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation* 1998;97:1837-47.
 - 27) Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Stannard DC, Carroll CE, Daugirdas JT, Bloembergen WE, Greer JW, Hakim RM. *The dose of hemodialysis and patient mortality. Kidney Int* 1996;50:550-6.
 - 28) Jacobson SH, Egberg N, Hylander B, Lundahl J. *Correlation between soluble markers of endothelial dysfunction in patients with renal failure. Am J Nephrol* 2002;22:42-7.
 - 29) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. *Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet* 2002;360:427-35.