

고분자 표면의 혈관내피세포 부착력에 관한 연구

최진욱·유규하·민병구

Evaluation of Endothelial Cell Attachment on Polymer Surface

Jin Wook Choi, Gyu Ha Ryu, and Byoung Goo Min

- Abstract -

To improve antithrombogenicity of polymer that used in vascular graft and artificial organs, seeding of human endothelial cells on the polyurethane was studied. Human endothelial cells were isolated from human umbilical veins, using type I collagenase, and identified with goat anti vWF antibodies. Human endothelial cell seeding was tried upon the polyurethane which has good mechanical property and resists stresses. The hydrophobic polyurethane surface was changed hydrophilic by corona discharge treatment. Surface hydrophilicity was measured with Wilhemly plate method and the goniometer. To evaluate matrix protein adsorption, fibronectin adsorption test was done. To evaluate cell adhesion, human endothelial cell attachment forces were measured using a perfusion chamber of 5mm diamter. Less cells were detached from the hydrophilically treated polyurethane. This showed that corona discharge on the polyurethane could improve matrix adsorption and endothelial cell attachment.

1. 서론

1.1 인조혈관의 문제점 및 개발방향

현재 임상에서 널리 쓰이는 Dacron 및 PTFE는 혈류흐름이 빠르거나 혈관의 내경이 큰 경우에는 혈전현상이 심각한 문제가 되지 않으나, 혈관의 내경이 5mm 이하인 경우와 인체에서 슬와동맥처럼 접힐 수

있는 곳에서는 혈전현상이 생겨 혈류에 지장을 주는 경우가 빈번하다.¹⁾ 내경 5mm 이하의 인조혈관에서는 혈전현상이 초기에 급격하게 일어나서 이식된 인조혈관이 기능을 못하게 되는 것이 중요한 문제이며, 이를 해결하기 위하여 인조혈관 표면자체가 혈액응고 인자의 활성화를 막으며 혈소관의 활성화를 방지하여 혈소관의 점착을 최소한으로 줄이는 것이 필요하다.²⁾

현재 인조혈관의 개발은 크게 세가지의 방향에서 이루어지고 있다.³⁾ 첫번째는 Dacron (PET), PTFE 등이 개발된 것과 같이 고분자화합물 자체의 특성을 연구하여 혈액응고인자 활성 및 혈소관점착 효과가 적은 재료를 개발, 인조혈관에 이용하는 시도인데, 이는 언급한 바와 같이 소구경 인조혈관의

〈접수 : 1990년 5월 1일〉

Dept. of Biomedical Engineering, Seoul National University

(본 연구는 89년도 서울대학병원 임상연구비로 수행되었습니다.)

경우 한계성을 지니기 때문에 내경 5mm 이상의 혈관에서 주로 사용하고 있다. 두번째 방법은 기존의 인조혈관을 이용, 표면처리를 하여서 항혈전성을 높이려는 시도이다. 최근에는 PG 및 Heparin을 인조혈관 내면에 결합시켜 항혈전성을 높이려는 방법,⁴⁾ 5) 혈장단백질을 인조혈관 표면에 흡착시켜 혈액응고인자의 인조혈관 표면에 대한 흡착을 줄이는 방법, 6) 유로키나제 등 혈전용해효소를 인조혈관 표면에 고정시켜 혈전에 의한 폐색을 줄이려는 방법들이 시도되고 있으며, 이들의 시도는 내구성의 문제 및 효과의 지속성 문제가 해결되면 임상에 응용될 수 있으리라 생각된다. 세번째 방법은 인조혈관 표면에 혈관내피세포를 배양, 부착시킨 후 혈관내피세포의 PGI 및 혈소판 응집인자 분해효소(ADPase) 등의 분비를 통한 항혈전성 효과와 혈관내피세포 표면 자체특성에 의한 항혈전성을 기대해 보려는 방법이다.^{7~9)} Herring¹⁰⁾이 인체혈관내피세포를 인조혈관 위에 부착시키는 방법을 처음 시도한 이래 항혈전성을 높이기 위한 유사한 방법들이 많이 행하여졌으나, 혈관내피세포가 부착된 인조혈관의 시도가 비교적 근래에 행하여지고 있는 만큼, 그 효과 및 가능성에 대한 이론정립에는 어려움이 많다.

혈관내피세포를 인조혈관위에 부착시킬때 가장 큰 어려움은 인조혈관의 표면 자체가 혈관내피세포의 부착에 좋게 구성되어 있지 않고, 혈관내피세포를 유지시켜 주는 단백질매트릭스(ECM, extracellular matrix)가 충분치 못하여 부착이 어렵다는 점과 부착력이 약하면 혈류흐름에 쉽게 쓸려나가서 혈관내피세포의 효과를 기대할 수 없다는 점이다.¹¹⁾ 세포의 부착력을 높이는 것으로 알려진 파이프록틴이 혈관내피세포의 부착력을 높이는 하나 작은 양의 증가에 그치기 때문에 인조혈관 위에 지속적으로 남아 있는 혈관내피세포의 수는 매우 적게 된다. 이와 같은 결과는 세포배양시 높은 세포 부착력을 유지하는 폴리스틸렌의 경우와 대조적이며, 인조혈관 표면의 변화로 세포의 부착력을 높여 주어야만 혈관내피세포 부착효과가 의미 있으리라 여겨진다.

많은 논문에서 혈관내피세포의 부착후 긍정적인 결과를 보고하고 있으나 세포의 기원에 대해서는 논란이 없지 않다. 4주후에 발견되는 혈관내피세포의

기원에 대해서 부착된 혈관내피세포가 분열 번식하여 단일층을 이루게 되었다는 생각이 일반적이지만, 수혜자의 혈관내피세포와 혈중 근간세포(stem cell)들이 분화하여 혈관내피세포의 단일층을 이식된 인조혈관 위에 이루게 된다는 보고도 있다.¹²⁾ 인조혈관 이식 후 혈전현상은 초기에 가장 심하기 때문에 이식후 부터 7일간이 가장 위험한 기간이며, 최근의 연구방법은 이식당시부터 충분한 양으로 혈관내피세포의 단일층을 형성하는 방법으로 방향을 돌리고 있다.¹³⁾ 인조혈관 위에서의 혈관내피세포의 정상기능 유지 및 이종의 혈관내피세포가 보일 수 있는 면역반응 등은 실제 인체에 적용하려 할 때 해결해야만 하는 중요한 과제라 하겠다.

1.2 인조혈관 표면 성질과 혈관내피세포 부착력과의 관계

인조혈관이 오랫동안 혈액에 노출되면 세포로 구성된 neointima를 인조혈관 표면에 구성하게 되고 인조혈관이 결체조직과 오랫동안 접촉한 경우에는 섬유질의 막(fibrous encapsulation)을 형성하게 된다. 생체적합성 및 혈액적합성을 얻기 위한 하나의 방법으로 이 현상이 모방되어 이용될 수 있으며, 생체이식 당시부터 인조혈관 표면에 적합성을 유지시키면서 이식하여 이식 후 생기는 부작용을 줄이려는 노력을 할 수 있다.

단일층을 형성하는 다른 조직들의 세포와 마찬가지로 혈관내피세포도 단일층을 형성하고 부착력을 유지하기 위하여는 cement조직과 같은 단백질 매트릭스(extracellular matrix)의 역할이 필수적이다. 특히 파이프록틴은 혈장과 세포의 표면에서 존재하고 있는 분자량 200,000~250,000사이의 dimer glycoprotein으로, 세포의 부착 및 지혈에도 작용하고 있다. 섬유구조로 된 파이프록틴은 세포와 세포사이의 부착뿐만 아니라 세포와 인조혈관 표면과의 부착에 있어 꼭 필요하다. 파이프록틴중의 L-arginyl-glycyl-L-aspartyl-L-serine 구조가 특히 세포의 부착에 직접관련되는 것으로 알려져 있으며, 콜라겐과 라미닌등 다른 매트릭스 구성물질도 함께 관여하여 세포부착력을 높인다.

Gospodarowicz¹⁴⁾의 실험결과 혈관내피세포의 성

장은 인조혈관 표면 위에 단백질 매트릭스가 coating되어 있는 경우에서 좋은 결과를 보였고 단백질 매트릭스없이 섬유세포의 growth factor만 있는 경우에는 전자에 비해서 혈관내피세포의 성장이 느린 것을 보여주고 있다. 단백질매트릭스는 파이브로넥틴과 콜라젠, 라미닌등이 주성분을 이루고 있는데 세포의 부착력에 중요한 역할을 하고 있지만, 혈액과 접촉하였을때는 혈전형성을 촉진하기 때문에, 혈액과 접촉하는 인공재료를 사용시는 이러한 단백질매트릭스의 혈전형성 촉진 작용을 고려해야 한다.¹⁵⁾

인조혈관 표면의 성질 중 친수성이 세포부착력에 관여하는 기전 및 정도에 대해서는 아직 많은 연구가 되어있지 않으며 일반적으로 유리같은 친수성 표면이 소수성 표면보다 세포부착력이 높은 것으로 알려져 있다. 세포배양에 사용되는 폴리스티렌의 경우도 재질 자체로는 친수성이 높아져 재료인데 코로나처리 및 플라즈마처리를 하면 친수성이 높아져 세포배양용기로 사용할 수 있게 된다. 일반적으로 친수화는 인조혈관 표면에 이온단의 결합을 증가시킴으로 얻을 수 있으며 어떤 이온단에 의하여 친수화 되었는가가 또한 세포부착력에 관여하게 된다. 친수성과 세포부착결과의 정도는 세포마다 각기 다른 양상을 보이고 있는데 이는 친수성과 작용할 수 있는 세포막 구조가 지질이중막 사이사이에 있는 glycoprotein이고 이 glycoprotein의 함량 및 구성성분이 세포마다 다르기 때문이다.

2. 연구재료 및 방법

2.1 혈관내피세포의 배양

혈관내피세포의 배양은 혈관내피세포를 분리해 내는 혈관에 따라 대동맥에서 콜라젠분해효소(collagenase)를 이용하여 얻는 방법과, 복재정맥(saphenous vein) 또는 제대정맥(umbilical vein)등의 정맥혈관에서 얻는 방법, 모세혈관을 이용하여 주로 장간막 지방조직(omental fat tissue)에서 얻는 방법등이 있을 수 있다. 본 실험에서는 태아의 제대정맥에서 혈관내피세포를 분리배양하였다. 분만장에서 상처가 나지 않은 태아의 제대를 얻은 후 칼슘, 마그네슘이온이 제거된 돌베코스 생리식염수(Ca⁺⁺,

Mg⁺⁺ free Dulbecco's phosphate Buffered saline)로 제대정맥 내면을 세척한다. 태아의 제대는 2개의 동맥과 1개의 정맥으로 구성되어 있으며 절단면에서 보면 동맥은 구경이 약간 좁으며 절단면보다 조금 튀어나와 있는 모습을 보인다. 제대정맥내면을 0.05% 콜라젠 분해효소(Type I, Worthington Biochemical Co.)로 채운후 25분간 37°C에서 반응시킨다. 제대를 부드럽게 누르면서 제대정맥을 기울여 15ml 시험관에 콜라젠 분해효소와 반응시킨 용액을 받는다. 이때 제대를 쥐어짜는 것은 혈관내피세포외에 평활근세포 및 섬유아세포의 분리를 유도하기 때문에 가급적 피해야 한다. 특히 섬유아세포로 오염(contamination)이 된 경우에는 섬유아세포가 5~7일 후 주된 배양세포(dominant cell)가 되기 때문에 심각한 문제를 야기시킨다. 시험관에 받은 세포혼합용액은 약 300g에서 5분간 원심분리하면 세포덩어리를 얻을 수 있고 세포배양액을 준비하여 다시 세포혼합용액으로 만든다. 세포배양액의 구성은 표 1과 같다. 일반적으로 혈관내피세포의 배양에는 Bovine calf serum(BCS) 보다는 Fetal Bovine Serum(FBS)을 많이 사용한다. FBS에는 growth factor가 BCS보다 많으며 그의 소량의 물질들때문에 적절한 배양조건을 기대할 수 있기 때문이다.

2.2 혈관내피세포의 확인

혈관내피세포를 지름 35mm의 세포배양용기(pe-

Table 1 Composition of complete cell culture media

| Substance | Composition | |
|--|-------------|-----------|
| RPMI-1640(Hyclone, Logan Utah) | 80% (V/W)* | |
| 25mM HEPES(Research Organics Cleveland Ohio) | | |
| 2mM L-glutamine(GIBCO) | | |
| 100 U/ml penicillin | | |
| 100 ug/ml streptomycin(GIBCO) | | |
| Heat Inactivated Boine Calf Serum(Hyclone) | | |
| | | 20% (V/W) |
| | | |
| | | |
| | | |

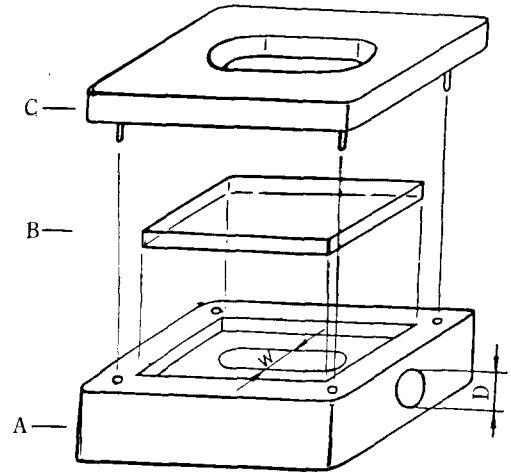
*volume percent

tridish, Falcon California)에 배양시킨후, 1% 우혈청알부민 DPBS로 부드럽게 세척한다. 15% 에탄올과 85% 아세톤을 포함한 고정액을 부어 실온에서 약 10분간 방치한다. 세포질 내에 있는 vWF를 노출시키기 위해서 0.5% 트라이톤(Triton X-100, Merck) 용액을 사용하여 실온에서 10분간 방치한다. 1% 우혈청알부민 DPBS로 수회 세척후 vWF에 특이하게 반응하는 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. 이때 대조군에는 혈관내피세포가 배양된 용기에 정상토끼 혈청글로부린 G (이하 IgG라 한다)를 반응시킨다. 1%우혈청알부민 DPBS로 세척하면 세포질내에 vWF와 반응한 특이항체는 남고, 대조군의 토끼 IgG는 세척되어 없어진다. vWF에 특이하게 반응하는 토끼 항체에 대하여 염소의 fluorescein isocyanate-labeled IgG (이하 FITC-IgG라 한다)로 다시 특이 결합시키고 이러한 FITC-IgG의 반응은 실온에서 30분간 암실에 방치한다. 그다음 수회 부드럽게 세척하고 글리세롤(glycerol)로 마운팅을 한 후 암실에서 형광현미경으로 관찰한다.

2.3 폴리우레탄 막의 제작 및 관류모형 장치의 제작

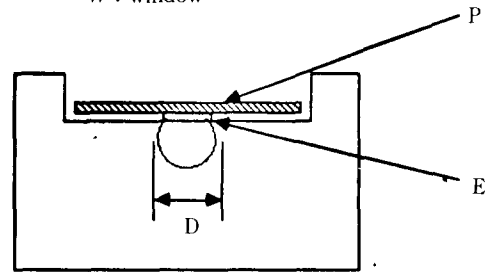
DMAC (dimethyl acetyl amide)를 용매로 한 8% pellathane (Dow Chemical, USA) 용액에 24×24 mm의 커버글라스를 담근 후 한쪽 방향으로 40도 가량 기울인 상태로 120volt 375W의 적외선 건조등을 이용하여 84℃로 유지하면서 클린벤취 아래서 건조시킨다. 이 방법을 4~5회 거듭한 후 40℃의 오븐안에 50분간 넣어둔다.

관류모형 장치는 upper face, rubber, perfusion block의 세부분으로 구성되어 있다.(그림 1) Upper face와 rubber는 유체의 흐름이 밖으로 새어 나가지 않도록 막아주는 역할을 하고 perfusion block에는 지름 5mm의 원통형 구멍이 나 있으며 perfusion block중간부분에 노출부위가 있어서 관상유체의 흐름이 전달되어 전단력(shearing force)을 지니는 유면과 접촉할 수 있게 구성 되어 있다. 폴리우레탄막을 제작하여 perfusion block의 노출부위에 놓고 위에 rubber와 upper face를 누름으로 유체의 흐름이 유지하도록 하였다.



(a) Composition of perfusion chamber

- A : perfusion block
- B : rubber
- C : upper face
- D : perfusion diameter 5mm
- W : window



(b) Cross section view

- P : polyurethane sheet
- E : endothelial cell lining

그림 1 관류모형장치의 구성

Fig. 1 Composition and Cross section of perfusion chamber.

2.4 폴리우레탄 표면의 친수화 및 측정

폴리우레탄 표면의 친수화는 화학연구소에서 제작한 corona 처리기로 시행하였다. 플라즈마 처리는 고압의 산소를 chamber내에 넣어준 후 방전처리를 통하여 oxygen radical (O₂)을 얻는 반면, 코로나 처리는 대기중의 산소를 이용하여 oxygen radical을

발생시켜 인조혈관 표면의 여러 분자단들과 결합하도록 하는데 플라즈마 처리에 비해 oxygen radical의 형성은 적지만 짧은 시간에 손쉽게 할 수 있다는 장점이 있다.

코로나 처리된 폴리우레탄막을 Wilhemly법과 goniometer를 이용하여 접촉각을 측정하였다. Wilhemly법에서는 시료의 양면이 동일조건을 갖고 있는 경우에만 사용할 수 있기 때문에 시료의 제한이 있지만, goniometer를 사용하는 경우보다 편리하고 reproducibility가 좋은 장점을 지니고 있다. Wilhemly법으로 측정시에는 시료를 집게에 넣고 Wilhemly plate장치 (Biomedical International Co. WET-TEK dynamic contact angle balance)와 plotter를 연결하여 plotter에서 상하로 움직인 변위를 측정하여 접촉각을 구한다.

코로나 처리가 한면만 된 폴리우레탄의 경우에는 goniometer를 이용하여 측정하는데, 폴리우레탄 표면을 잘 건조시킨 후 goniometer (Erm Inc. Tokyo) holder에 놓고 microsyringe를 이용하여 소량의 물을 떨어뜨린 후 현미경으로 각도를 직접 측정한다. goniometer의 경우 접촉각에 변화를 주는 요소가 많기 때문에 최소한 5회 이상 측정해야 한다.

2.5 폴리우레탄표면의 파이브로넥틴 흡착력 검사

혈장단백질과 파이브로넥틴의 흡착은 소수성 화합물 보다는 친수성 화합물의 경우에서 증가하기 때문에 친수성의 변화가 파이브로넥틴의 흡착에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 125I를 이용하여 동위원소 라벨링을 하고 흡착도를 비교, 관찰하였다.

일반적으로 125I 라벨링방법에는 iodogen method, chloramine T method, lactoperoxidase method 등이 있으며 본 실험에서는 chloramine T를 이용하여 125I를 라벨링시켰다.

파이브로넥틴 50 μ g을 0.02ml의 Tris buffer에 넣은 후 2mCi의 NaI를 가하고, 10 μ g의 chloramine T를 0.02ml 인산버퍼 (0.05M, pH7.4, Phosphate buffer; 이하 버퍼라 한다) 용액으로 만든 후 NaI와 함께 반응시킨다. 이때 chloramine T는 시간변화에 매우 불안정하기 때문에 반응시키기 바로전에 준비한다.

10~15초 동안 잘 섞은 후 20 μ g의 Sodium Metabisulfite를 0.02ml의 버퍼용액으로 만들어 넣어준다. 파이브로넥틴을 안정화하기 위해서 2mg/ml BSA의 버퍼용액 0.5ml을 가한 다음 파이브로넥틴에 표시된 125I와 125I (free form)를 분리하기 위하여 Sephadex G-75 column을 걸고 버퍼용액을 사용하여 elution한 후 시험관 별로 받아서 감마카운터로 측정하여 free 125I를 분리해낸다.

폴리우레탄막을 2분동안 코로나 방전처리한 후 표면을 잘 건조시킨다. 이때 표면의 무리한 세척은 oxygen radical의 결합을 약하게 하므로 피해야 한다. 지름 8mm의 원통을 준비한 후 각 폴리우레탄 위에 놓고 125I 라벨링된 파이브로넥틴을 각 원통마다 1×10^5 U.CPM 되도록 넣어 준다. 10, 15, 30분 동안 각 폴리우레탄을 반응시킨 후 PBS로 부드럽게 세척하고 표면에 남아 있는 파이브로넥틴의 CPM 값을 측정한다.

2.6 혈관내피세포 부착력 검사

혈관내피세포가 자라고 있는 T-25에 H^3 Thymidine을 20 μ Ci 넣고 48시간동안 배양시킨다. 폴리우레탄을 처리하지 않은 것과 코로나 방전처리를 10초와 2분동안 한 것을 각각 준비하여 접촉각을 측정해둔다. T-25에서 0.05% Trypsin (Gibco)을 이용하여 혈관내피세포를 떼어낸 다음 hemocytometer로 숫자를 측정하고 5×10^5 cells/ml의 농도로 RPMI 배양액으로 혼합용액을 만든다. 각 폴리우레탄 표면에 지름 8mm, 높이 5mm의 원통을 놓고 H^3 Thymidine로 자란 혈관내피세포를 각 원통마다 1×10^5 이 들어 가도록 200 μ l씩 넣는다. CO₂ incubator에서 30분간 배양시킨 후 꺼내어 warm DPBS로 부드럽게 세척한다. 이때 dehydration은 검사결과에 영향을 미치지므로 dehydration되지 않도록 주의한다. 내경 5mm의 관류모형 장치를 Infusion pump (SAGE Instrument, ORION Research USA)에 연결한다 (그림 2). 유속을 Calibration하여 결정하고 perfusion시키면서 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10min 후에 흘러나오는 용액을 받는다. 혈관내피세포를 분리하기 위해서 1200rpm (300g)에서 10분간 원심분리한다. 상층액을 버리고 100 μ l의 SDS solution (10mM Tris, 150mM NaCl, 2mM

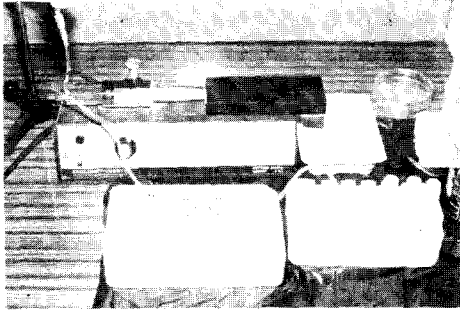


그림 2 관류모형장치 실험세트
Fig. 2 Photograph of perfusion chamber setting

EDTA, 0.5% SDS, pH7.5)으로 30분간 반응시켜 세포 막과 핵막을 분해시킨후 cocktail solution 3ml을 넣고 베타카운트한다.

3. 연구성적

3.1 혈관내피세포의 배양 및 확인

제대정맥에서 배양된 혈관내피세포들은 방추형모양의 단일층을 이루고 있었으며 배양을 시작한지 4일 정도면 T25표면에 가득 (confluent) 자란 것을 확인할 수 있었다(그림 3). 보고된 논문에 의하면 배양액성분으로 20% FBS를 사용하고 있으나, 20%

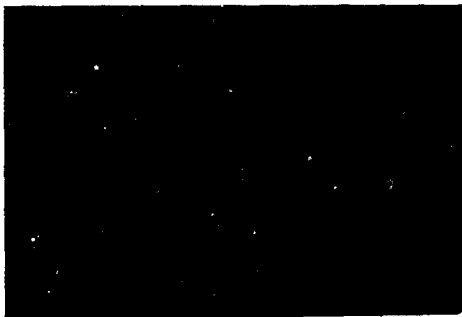


그림 3 배양용기위에 자란 혈관내피세포
Fig. 3 Photograph of endothelial cell grown on tissue culture dish

BCS를 사용하여 primary culture 및 4번째 계대배양까지 할 수 있었다.

콜라겐 분해효소와의 반응시간을 15분에서 25분사이로 선택하였으나 45분동안 반응 시킨 경우에서도 섬유아세포 및 평활근세포의 오염을 관찰할 수는 없었다.

FITC IgG를 이용하여 혈관내피세포의 vWF와 결합한 토끼 IgG를 검사하였다(그림 4). anti vWF IgG의 농도를 1 : 50에서 1 : 200까지 변화시켜 가면서 검사하였는데 농도에 따른 큰 차이는 보이지 않았다.

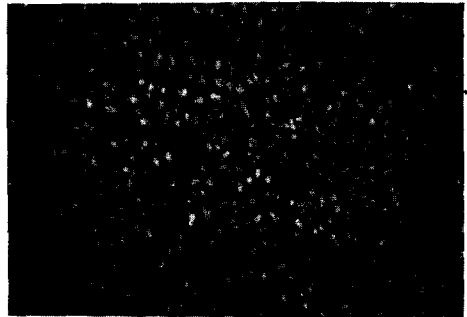


그림 4 vWF를 이용한 혈관내피세포확인
Fig. 4 Identification of endothelial cell with anti-vWF antibody
(Photograph using fluorescent microscope)

3.2 코로나 처리 시간에 따른 폴리우레탄의 친수화 변화

처리하지 않은 폴리우레탄의 경우 접촉각이 104° (Wilhelmy method) 내외를 이루고 있었으며 코로나 방전 처리를 한 결과 시간의 증가에 따라 접촉각이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다(그림 5). Wilhelmy method로는 처리하지 않은 폴리우레탄과 2분동안 코로나 방전처리한 폴리우레탄을 측정 하였고 전진접촉각의 경우 약 20도 정도 감소한 것을 관찰할 수 있었으며, goniometer로 측정한 경우 정지접촉각은 처리 시간에 따라 더 작은 값을 가짐을 알 수 있

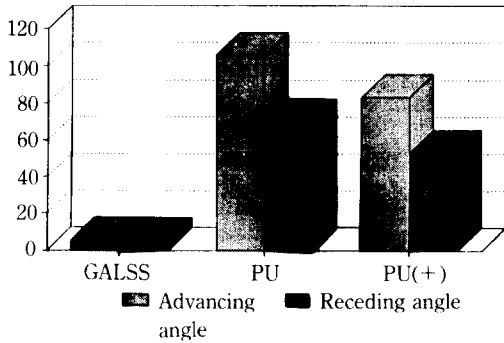


그림 5 Wilhelmy 법을 이용한 접촉각의 측정

Fig. 5 Contact angles using wilhelmy method

PU : untreated polyurethane

PU(+): corona-treated polyurethane

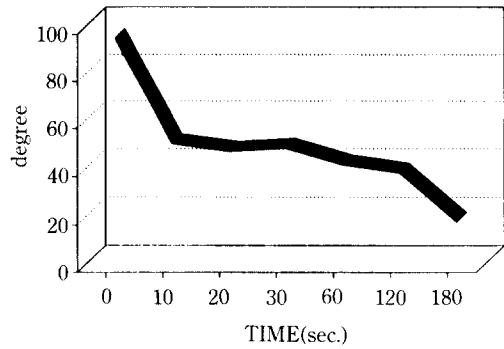


그림 6 코로나 처리시간에 따른 접촉각의 변화

Fig. 6 Contact angles according to treatment time, using goniometer

Table 2 Value of contact angles, using goniometer

| Time | Mean | SD | number of measure |
|---------|------|------|-------------------|
| Control | 94.7 | 1.10 | 7 |
| 10 sec | 50 | 2.66 | 7 |
| 20 sec | 46.8 | 4.52 | 7 |
| 30 sec | 48.1 | 1.64 | 7 |
| 1 min | 41.2 | 1.89 | 7 |
| 2 min | 37.5 | 3.17 | 7 |
| 3 min | 17.7 | 0.84 | 7 |

었다(표 2, 그림 6).

3.3 친수화에 따른 파이브로넥틴의 흡착도 변화

125I로 라벨링을 한후 free 125I를 제거하기 위하여 감마카운터하여 그림 5와 같은 곡선을 얻었다. 두개의 peak중 두번째 것은 free 125I에 의한 것이므로 검사시료로 취하지 않았다. 125I로 라벨링된 파이브로 넥틴을 코로나 처리한 폴리우레탄에 처리하지 않은 폴리우레탄에 각각 반응시킨후 시간에 따른 파이브로넥틴 흡착의 차이를 관찰하였는데, 처리

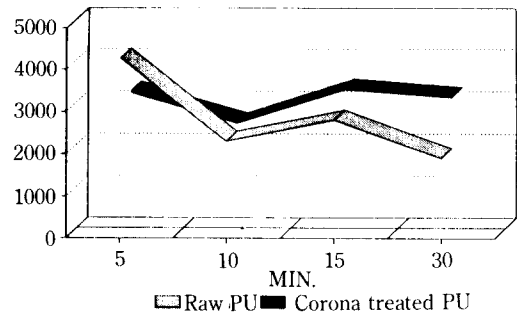


그림 7 폴리우레탄 표면의 파이브로넥틴흡착

Fig. 7 Fivronectin adsorption on polyurethane

한 경우에서 더 많은 흡착을 보여주었다(그림 7).

3.4 친수화된 표면에서 혈관 내피세포 부착력변화

관류모형장치를 이용한 실험에는 30분간 배양시킨 혈관내피세포를 사용하여 부착된 정도를 관찰하였는데, 처리한 폴리우레탄에 더 많은 혈관내피세포가 부착되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 8). 처리하지 않은 폴리우레탄과의 경우에는 처음 3분 동안에 혈관내피세포가 많이 탈락되는 것을 관찰할 수 있었으며, 처리한 폴리우레탄의 경우에는 10초 동안 처리한 실험군에서 2분 동안 처리한 실험군에 비해 혈관내피세포의 탈락이 많은 것을 알 수 있었다.

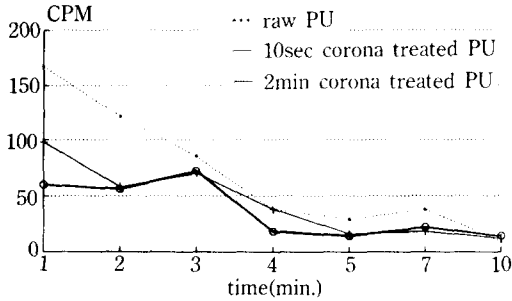


그림 8 폴리우레탄 표면으로 부터 혈관내피세포의 탈락, 유속 1ml/min의 유속에서 혈관내피세포
Fig. 8 Endothelial cell attachment test flow rate 1ml/min

유속을 1ml/min.로 유지시키면서 실험한 결과 코로나 처리한 실험군에서 혈관내피세포의 탈락현상이 적음을 관찰하였다.

4. 고 찰

인조혈관이식의 성공율을 높이기 위한 시도가 여러 방향으로 행해지고 있는데, 새로운 인조혈관을 개발하고 재질을 향상시키는 연구, 인조혈관의 내면을 항응고 약물등으로 처리하는 연구, 인조혈관의 내면에 혈관내피세포를 부착시키고자 하는 연구가 진행중에 있다.¹⁶⁾

코로나 방전처리를 약 2mm간격의 전극사이에 10 kV-15kV의 전압을 걸어줌으로써 방전에 의한 대기 중에 산소를 oxygen radical로 만든 후 표면에 결합시킬 수 있지만, 결합하는 원자단이 선택되는 것이 아니어서 결합은 산발적으로 이루어지고 micro domain의 특성에 의하여 전체표면의 반응 성질 및 친수성도 결정되게 된다. 코로나 방전처리에 의하여 생긴 oxygen radical이 표면에 결합하는데는 표면의 조성이 중요한 역할을 하게 되는데, 폴리우레탄의 경우에는 oxygen radical과 결합할 수 있는 -NH, -COO 등이 적어서 극도로 친수화된(wettable) 표면성질을 지닐 수 없으며, 처리 방법에 따라서 친수화 되는 정도에 한계가 있다. 코로나 처리에 의하면 친수성의 정도가 매우 급격히 증가한 후 곧 포화상

태에 이르게 되어 접촉각의 변화가 시간의 증가에 민감하지 않음을 알 수 있다.

코로나 방전처리 후 파이브로넥틴의 흡착도를 관찰하였다. 폴리우레탄표면에 파이브로넥틴이 결합할 때에는 단순흡착에 의한 결합으로 divalent ion에 의한 결합과 소수성패치에 의한 결합이 대부분을 구성하게 된다.

한편 Herring 등이 처음으로 개에서 혈관내피세포의 부착을 시도한 이래로 많은 연구가 진행되어 왔는데 이는 혈관내피세포에 의해 혈전형성의 감소와 혈소판응집의 감소, 혈관내피세포의 PGI분비, 감염에 대한 저항력의 증가 등을 기대할 수 있기 때문이다. 그러나 혈관내피세포를 체외에서 부착한후 이식하는 방법은 많은 문제점을 안고 있는데, 혈류에 의한 혈관내피세포의 소실, 부착력 증가를 위해 쓰는 단백질매트릭스의 혈전형성, 혈관내면에 최대로 부착시킬 수 있는 충분한 양의 세포확보 등이 해결해야 할 과제이다.

본 실험에서는 폴리우레탄에 대한 혈관내피세포의 부착을 시도하였는데, 혈관내피세포를 처리하지 않은 폴리우레탄위에서 배양시키면, 폴리우레탄의 소수성 때문에 세포가 표면에 접근하지 못하고 단일층을 형성하지 못하여 48시간이 지나도 둥근 모양으로 배양액에 떠 있는 것을 관찰할 수 있었다. 혈관내피세포는 단일층을 형성하며 자라기 때문에 배양액에 떠있게 되면 성장, 분열을 할 수 없게 된다.

관류모형 장치를 이용하면 관상혈류(tubular blood flow)를 모방할 수 있고 혈류에 의한 전단력(shear stress)이 혈관을 구성하고 있는 세포 및 지지조직에 미치는 영향을 예측할 수 있는 장점이 있다. 관류모형 장치를 사용한 이번 실험에서는 코로나 처리한 폴리우레탄에서 세포의 탈락현상이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 정상혈관에서 존재하는 생체지지조직이 폴리우레탄에는 없기 때문에 강한 지지력으로 세포를 부착시키지 못하는 단점이 있다. 이를 개선하기 위해서는 porous한 폴리우레탄을 개발하고 친수화시킨 후 이 위에 단백질매트릭스를 보강시키고, 섬유아세포등으로 지지조직을 만들어 주면 혈관내피세포의 부착력을 더욱 높일 수 있으리라 생각된다.

5. 결 론

혈관내피세포가 부착된 인조혈관을 개발하기 위한 첫단계로 혈관내피세포가 잘 부착될 수 있는 표면 성질을 관찰하였다. 폴리우레탄을 코로나 방전처리하여 친수성을 높인 결과 친수화된 표면위에서 세포의 부착을 촉진시키는 파이브로넥틴의 흡착이 증가되었고, 혈관내피세포의 부착력도 증가되었음을 관류모형장치실험을 통해서 관찰할 수 있었다. 본실험을 통해서 고분자 표면의 친수화 처리가 혈관내피세포를 인조혈관표면에 부착시키기 위하여 필요한 단계임을 확인하였다.

참 고 문 헌

- 1) Callow AD. Current State of vascular graft. Surg. Clin. N. Am. Vol. 62, p. 501, 1982.
- 2) Callow AD. Endothelial cell seeding: problems and expectations. J Vasc Surg. Vol. 6, pp. 318-319, 1987.
- 3) Yeager A, Callow AD, New graft materials and current approaches to an acceptable small diameter vascular graft. TASAIO, Vol. 34, pp. 88-94, 1988.
- 4) Kim SW. Platelet adhesion and prevention at blood polymer interface. Artificial Organs, Vol. 11, p. 228, 1987.
- 5) Nojiri C, Okano T, Park KD, et al. Suppression mechanism for thrombus formation on heparin-immobilized segmented polyurethane ureas. TASAIO, Vol. 34, pp. 386-398, 1988.
- 6) Mohammad SF, Olsen DB. Reduced platelet adhesion and activation of coagulation factors on polyurethane treated with albumin-IgG complex. TSAIO, Vol. 32, pp. 323-326, 1986.
- 7) Phillips DR. Biochemistry of Platelet. Academic press, New York. chap 2, 1986.
- 8) Kesler KA, Herring MB, Arnold MP, et al. Enhanced strength of endothelial attachment on polyester elastomer and polytetrafluoroethylene graft surfaces with fibronectin substrate. J Vasc Surg. Vol. 3, pp. 58-64, 1986.
- 9) Foxall tl, Auger KR, Callow AD, et al. Adult human endothelial cell coverage of small caliber dacron and polytetrafluoroethylene vascular prosthesis in vitro. J Surg Resc. Vol. 41, pp. 158-172, 1986.
- 10) Herring M, Gardner A. A Single stage technique for seeding vascular graft with autogenous endothelial cell. Surgery. Vol. 84, pp. 498, 1978.
- 11) Pratt KJ, Jarrel BE, Williams SK. Kinetics of endothelial cell-surface attachment forces. J. Vasc. Surg. Vol. 7, pp. 591-599, 1988.
- 12) Holler LH., Fowl PJ. Are seeded Endothelial cells the origin of neointima on prosthetic PTFE vascular graft? J. Vasc. Surg. Vol. 3, pp. 65, 1986.
- 13) Sentissi JM, Ramberg MS, Odonell TF, et al. The effect of flow on vascular endothelial cells grown in tissue culture on polytetrafluoroethylene grafts. Surgery, Vol. 99, pp. 337-43, 1986.
- 14) Gospodarowicz D. Extracellular matrix and control of proliferation of vascular endothelial cells. J. Clin. Invest. Vol. 65, pp. 1351, 1980.
- 15) Lelah MD, Cooper SL. Polyurethanes in Medicine. CRC Press, Florida, Vol. 85-106, 1986.
- 16) Anson Y, Callow AD. New graft materials and current approaches to acceptable small diameter vascular graft. Trans Am Soc Artif Intern Organs. Vol. 34, pp. 88-94, 1988.