

소구경 폴리우레탄 인공혈관의 개발을 위한 세포외기질위의 혈관내피세포 배양

박동국* · 이윤신** · 김용배*** · 서정욱**** · 이규백** · 민병구**

=Abstract=

Endothelial Cell Seeding Onto the Extracellular Matrix of Fibroblasts for the Development of Small Diameter Polyurethane Vessel

Dong Kook Park*, Yoon Shin Lee**, Yong Bae Kim***
Jeong Wook Seo****, Kyu Back Lee**, Byoung Goo Min**

A variety of experiments of endothelial cell seeding onto artificial vessels have been performed. To improve endothelialization, one or two components of the extracellular matrix (ECM) have been used as an underlying matrix. In this study, the whole ECM excreted from fibroblasts was used as an underlying matrix. Fetal human fibroblasts were cultured on a polyurethane (PU) sheet. After a confluence was attained, the cytoskeleton and the nuclei of the fibroblast were destroyed using Triton-X, Mitomycin, or irradiation. Omental microvascular endothelial cells from adult human were seeded onto various substrates. After 12 days in culture, the cells were counted. It was observed that the ECM treated by irradiation had the highest cell number. In addition, the cells on this substrate exhibited the most typical endothelial cell morphology. For preliminary animal experiments the PU vessels (inner diameter, 1.5 mm) coated with ECM were implanted in the infrarenal abdominal aorta of rat. After the vessels had been implanted for 5 weeks, it was found that the surface of the PU vessels was completely covered with endothelial cells. In conclusion, we can state that the fibroblast-derived whole ECM makes a better underlying substrate for the endothelialization of small diameter artificial vessels.

Key words : Endothelial seeding, Extracellular matrix, Polyurethane (PU)

* 단국대학교 의과대학 일반외과학교실

* Dept. of General Surgery, College of Medicine Dankook University

** 서울대학교 의과대학 의공학연구소

** Institute and Department of Biomedical Engineering College of Medicine Seoul National University

*** 순천향대학 부속병원 성형외과학교실

*** Dept. of Plastic Surgery, College of Medicine Sooncheonhyang University

**** 서울대학교 의과대학 병리학교실

**** Dept of Pathology, College of Medicine Seoul National University

† 본 연구는 1992년도 교육부지원 : 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 과제학술연구조성비에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

통신저자: 박동국, (330-714) 충남 천안시 안서동 산 29번지 단국대학교 의과대학 일반외과, Tel. (0417) 550-3926, Fax. (0417) 556-6993

서 론

많은 연구자들이 인공재료 표면의 항 혈전성을 증가시키기 위하여 인공재료를 물리적 또는 화학적으로 변형시키거나, 또는 헤파린 같은 생체단백질 등을 인공재료의 내면에 고정시키거나, 인공혈관 내면의 내피세포화를 이루는 연구들을 해왔다.^{1,2)} 그러나 이런 연구들은 내경이 4mm 이상인 인공혈관에는 성공을 하였지만 내경이 4mm 이하의 인공혈관에는 만족 할 만한 결과를 얻지 못했다³⁾. 그래서 소구경 혈관이식에는 주로 자가복재정맥 (greater saphenous vein)으로 대체하고 있으나, 자가복재정맥을 항상 손쉽게 얻을 수 있는 것이 아니고 또 항상 100% 성공하는 것도 아니다.

지난 10년간 많은 연구자들은 소구경 인공혈관의 생체 적합성 (biocompatibility)을 향상시키기 위해 인공혈관 내면을 혈관 내피세포화 하는 방법을 개발하여 연구해 왔다^{4, 5, 6)}. 모든 정상 혈관 가장 안쪽에 존재하는 혈관내피세포들이 혈액응고와 지혈인자, 수축, 이완시키는 인자, 그밖에 여러가지 중요한 인자들을 합성함으로써 항상 정상적인 기능의 혈관을 유지하게 하는 중요한 역할을 한다⁷⁾.

인공혈관의 혈관 내피세포화를 위해서는 인공혈관 안쪽 표면이 내피세포의 부착 (adhesion), 이동 (migration), 증식 (proliferation)을 등이 높은 물질로 형성되어야 한다.

각종 세포들이 생성하는 세포외기질들의 성분과 성질은 아직 규명되어 있지는 않지만, 주로 collagen, glycosaminoglycan, proteoglycan, glycoprotein 등으로 구성되어 있다고 알려져 있다^{8, 9)}. 피부의 섬유아세포, 대동맥의 평활근 세포, 각막 내피세포 등에서 분비하는 세포외기질에는 주로 interstitial collagen type I, III를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다^{10, 11)}. Heparan sulfate와 chondroitin sulfate는 섬유아세포에서 분비하는 세포외기질의 주된 glycosaminoglycan으로써¹²⁾, 정상 혈관에서 혈액응고를 예방하는데 절대적으로 필요한 물질로 알려져 있다.

본 연구에서는 혈관내피세포의 부착과 성장을 도와줄 수 있는 기질로 증식력, 부착력과 이동력이 강한 섬유아세포가 생성한 세포외기질을 기본 기질로 선택했다. 또한 세포가 형성한 세포외기질을 손상시키지 않고 세포를 파괴하는 방법을 개발하기 위해서 Triton-X-100, Mitomycin, irradiation 방법을 비교 실험했다.

인공혈관의 재료로는 기계적 성질과 혈액 적합성이 좋아 인공심장에 많이 사용되고 있는 폴리우레탄을 사용했다.

이 연구의 목적은 소구경 폴리우레탄 (1.5mm) 내면의

내피세포화를 위해 섬유아세포에서 생성하여 분비한 전체 세포외기질이 유용한지를 알아보기 위한 것이다.

재료 및 방법

폴리우레탄 혈관 제작

폴리우레탄 혈관의 제작방법은 폴리우레탄 (Pellethane 2363-80AE, Dow Chemical Co., U.S.A)을 N, N'-dimethylacetamide (DMAC, Sigma)에 12 w/v%의 농도로 녹인 용액에 1.5mm 직경의 유리관을 담갔다 꺼내면서 유리관에 고르게 도포되도록 한 뒤, DMAC를 제거시키면서 40℃에서 2일간 건조시킨다. 폴리우레탄이 일정한 두께로 고르게 도포되도록 이 과정을 세번 반복한다. 인공혈관은 1.5mm의 내부직경과 0.3mm의 벽 두께를 지니도록 제조되었다. 폴리우레탄 막도 유리관에 상기 용액을 도포하고, 혈관제조 방법과 같은 순서로 제작하여 두께가 0.3mm가 되도록 하였다. 두께가 일정하게 된 후 불순물을 제거하기 위해서 메탄올에 하루동안 담가 놓았다.

본 연구에서는 세포의 부착 및 증식을 돕는 성질이 있는 것으로 알려진 gelatin을 비교 물질로 채택하였다. Phosphate buffer saline (PBS)에 녹인 5w/v% gelatin (derived from pig skin, Sigma) 용액을 폴리우레탄막위에 도포하여 실온에서 5시간 동안 건조시켰다. Gelatin을 가교결합시키기 위하여 가교결합제로 0.02M carbodiimide (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, Sigma) 용액을 gelatin이 도포된 폴리우레탄에 15분 동안 처리하였다. PBS로 여러번 씻어내어 잔여 carbodiimide를 제거시킨다. 모든 재료는 산화에틸렌 (ethylene oxide)으로 멸균하여 사용했다.

혈관내피세포 분리 및 배양

미세혈관 내피세포의 분리, 배양은 Kern의 방법¹²⁾을 이용했다. 건강상태가 좋은 환자 (암환자나 염증이 있는 경우는 제외)로부터 5~10g 정도의 대망을 복부 수술중에 채취하여 Cord Buffer (0.01 M glucose in Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free PBS, pH=7.4)에 넣는다. 눈에 보이는 큰 혈관을 제거한 후 대망을 2×2×2mm 의 크기로 잘게 자르고, 4% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 0.2% collagenase (collagenase/cord buffer [w/v], Type I, Worthington Biochemical Co., U.S.A.) 50~100ml와 37℃에서 20~30분 동안 반응시킨다. 지방세포를 제거하기 위하여 22℃에서 300g로 5분간 원심분리한다. Collagenase의 활성을 중화하기 위하여 아래 세포침전물에 10%의 fetal bovine serum

(Hyclone)이 첨가된 medium 199 (Sigma)를 첨가한 후 250 μm 의 스텐레스체에 걸러낸다. 다시 22 $^{\circ}\text{C}$ 250 g에서 5분간 원심분리하고 침전물에 10% FBS이 첨가된 medium 199를 첨가시킨 후 35 μm 나일론 망사체에 걸러낸다. Medium 199를 첨가시켜 250 g에서 다시 5분간 원심분리한다.

Medium 199에 10% FBS, 10 mM HEPES, 100U/ml Penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin을 첨가하여, 세포를 1×10^6 cells/25 cm^2 의 밀도로 Corning tissue culture flask (Corning, NY)에 넣어, 37 $^{\circ}\text{C}$, 가습된 5% CO_2 상태에서 배양한다. 배양액은 2~3일에 한번씩 갈아 준다. 세포들이 성장해서 합류되었으면, 배양액을 제거하고 Ca^{++} and Mg^{++} 가 제거된 PBS로 씻어 serum과 떨어진 세포들을 제거한다. 0.05% trypsin과 0.02% EDTA로 처리하여 계대 배양한다. 계대 배양한 세포들을 액화질소에 냉동, 보관하여 필요할 때 녹여서 사용했다.

혈관내피세포의 확인

6번째 계대 배양한 세포들이 합류되었을 때 배양액을 제거하고 PBS로 3번 세척한다. 영하 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한 메탄올로 세포를 5분간 반응시켜 고정시켰다. PBS로 세번 세척한 후에 첫번째 항체인 anti-von Willebrand factor (Boehringer, Mannheim, Germany) 15 μl 와 45분간 상온에서 반응시킨다. PBS로 30분 간격으로 5번 세척한 후에 두번째 항체인 anti-rabbit IgG-fluorescein (Boehringer, Mannheim, Germany) 30 μl 와 섭씨 37도에서 45분간 반응시킨다. 이 세포들을 PBS로 3번이상 세척한 후 mounting medium을 세포위에 놓고 cover glass를 덮어, 실온 암실에서 2시간 동안 건조시킨 후 형광현미경으로 관찰했다. 대조군에는 첫번째 항체와 반응시키지 않았다.

섬유아세포의 분리 및 배양

유산된 태아의 앞가슴에서 피부를 채취하여 cord buffer에 넣고 조직을 약 1 mm^2 크기로 자른후, 0.2% collagenase와 반응시켰다. 섬유아세포의 분리 및 배양방법은 혈관내피세포의 방법과 동일한 방법으로 시행했으며 배양액만 Iscove's (Sigma)를 사용했다.

세포외기질 형성

두 개의 Teflon 고리(15 mm inner diameter, Sam Sung Polymer, Seoul, Korea)로 구성된 것을 배양기로 사용했다 (Fig. 1). 멸균처리된 고리사이에 폴리우레탄막 또는 gelatin이 도포된 폴리우레탄막을 삽입하여 사용했다. 6~13 번째 계대배양한 섬유아세포를 폴리우레탄막과 gelatin이 도

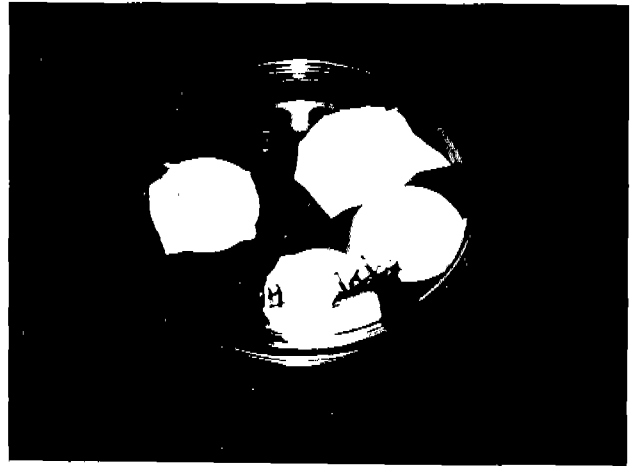


Fig. 1. Photograph of Teflon rings.

그림 1. 두 개의 Teflon 고리로 구성된 배양기

포된 폴리우레탄막위에 3×10^4 cells/ cm^2 의 밀도로 배양을 시작하여 섬유아세포들이 합류되면 PBS로 세척한 후 Triton-X-100, Mitomycin 또는 irradiation으로 세포골격과 세포핵을 파괴하여 제거했다. Triton-X-100의 경우, glycine buffer (20 mM glycine, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride [PMSF], pH = 9.6)로 두번 세척한 후, 1% Triton-X-100을 10분간 반응시켰다. 이렇게 생성된 세포외기질을 Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH = 7.5)와 PBS로 3번이상 세척했다. Mitomycin의 경우 세포를 PBS로 세척한 후 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Mitomycin을 15분간 반응시킨 후 형성된 세포외기질을 PBS로 3번이상 세척한다. Irradiation의 경우 세포를 Co^{60} 감마선 10,000 rad 선량에 노출시켰다. 이렇게 형성된 세포외기질의 형태를 주사전자현미경으로 관찰하였다.

세포외기질위에 혈관내피세포 배양

3가지 다른 방법으로 형성된 세포외기질위에 3~8번째 계대배양한 혈관내피세포를 4×10^4 cells/ cm^2 의 밀도로 부착시켰다. 12일 동안 배양한 후 Coulter counter[®] (Coultronics, U.S.A.)로 세포수를 측정하였고, 세포의 형태를 위상차 현미경으로 관찰하였다.

생체 (in vivo) 실험

소구경 인공혈관 (1.5 mm inner diameter; 0.3 mm wall thickness; 70 mm length)에 배양한 섬유아세포를 8×10^4 cells/ cm^2 의 밀도로, 세포외기질 형성때와 동일한 조건으로 배양을 시작하였다. 세포들이 합류되면 (약 5일) 섬유아

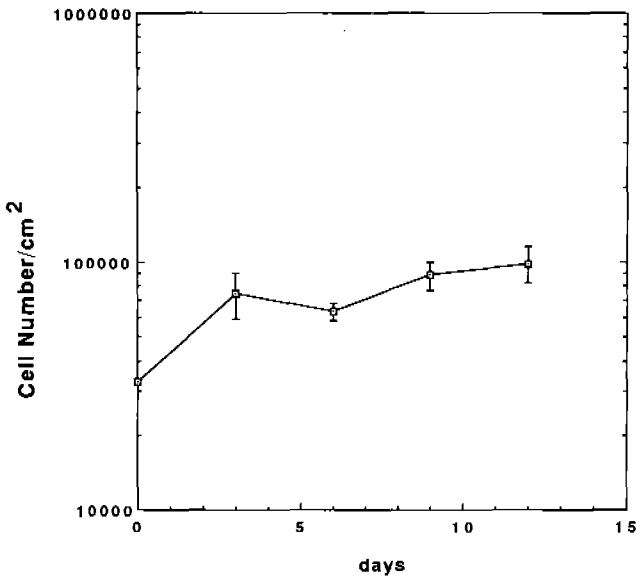


Fig. 2. Rate of proliferation of endothelial cells (6th passage) on tissue culture dishes (n = 4).

그림 2. 미세혈관 내피세포의 성장곡선(6번째 계대배양, n=4)

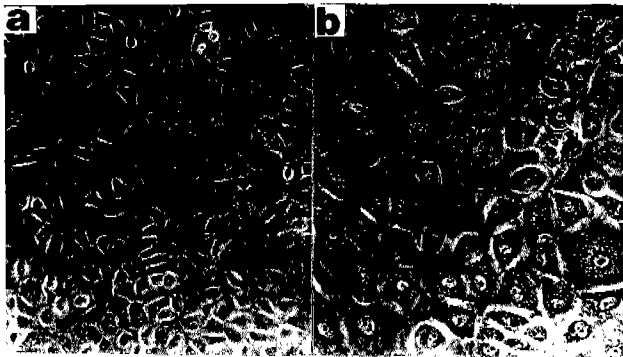


Fig. 3. Phase contrast micrographs of endothelial cells(2nd passage) on tissue culture dishes after 5 days in culture(a;x100, b;x200)

그림 3. 배양된 미세혈관 내피세포의 위상차 현미경 소견(2번째 계대배양, 5일 배양, 배양용기, a: ×100, b: ×200)

세포가 함유된 인공혈관을 10,000rad 선량의 Co⁶⁰ 감마선에 노출시켰다. 배양 조건은 세포외기질 형성때와 동일하였다. 세포외기질이 부착되어 있는 인공혈관을 PBS로 세척한 후, 0.04% glutaraldehyde로 15분간 처리하였다. PBS로 여러번 세척하였으며 잔여의 glutaraldehyde를 제거시키기 위해 1% glycine으로 한 시간 동안 처리한 후 PBS로 세번 세척하였다. 대조군으로는 세포외기질이 없는 폴리



Fig. 4. Fluorescence micrographs of human microvessel endothelial cells(6th passage) on tissue culture dishes after 6 days in culture (a;x100, b;x200)

그림 4. 혈관내피세포 확인;배양된 세포의 vWF형광 양성반응(6번째 계대배양, 6일 배양, 배양용기, a; ×100, b; ×200)

우레탄 인공혈관을 사용했다. 준비된 인공혈관을 동일 외과위가 수컷 쥐(weight; 250~300 gm)의 infrarenal abdominal aorta에 이식하였다. 이식 5주 후 쥐를 희생하여 얻은 인조혈관을 3개 표본(양측 봉합부분과 중앙부분)으로 나누었다. 표본들은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 조직학적 평가를 하였다.

결 과

미세혈관 내피세포 분리배양

(Fig. 2)는 미세혈관 내피세포의 성장 곡선이다. 배양이 시작된 3일 후 부터는 세포는 정지기(stationary phase)에 들어간다. 조직 배양기에 배양된 세포의 수가 두배로 늘어나는 기간은 배양 후 약 45시간 후이다. (Fig. 3)은 배양 플라스크에서 배양 5일 후의 세포의 형태이다. 전형적인 다각형의 혈관내피세포의 형태를 나타내고 있다. (Fig. 4)는 혈관내피세포의 특징인 vWF 양성 반응을 보이는 세포들의 형광 현미경 소견이다. 대조군에서는 전혀 형광성을 관찰할 수 없었다.

섬유아세포의 분리 및 배양

(Fig. 5)는 배양한 섬유아세포들의 현미경 소견이다. 3일째에 조직 배양기에서 배양된 세포의 형태는 전형적인 섬유아세포의 형태를 지니고 있으며, 폴리우레탄위에서 배양한 세포들은 더 긴 모양을 나타내고 있다. Gelatin이 도포된 폴리우레탄위에서 배양된 세포들은 다른 표본들보다 세포의 크기도 크고 더 퍼져 있으므로 배양된 세포들

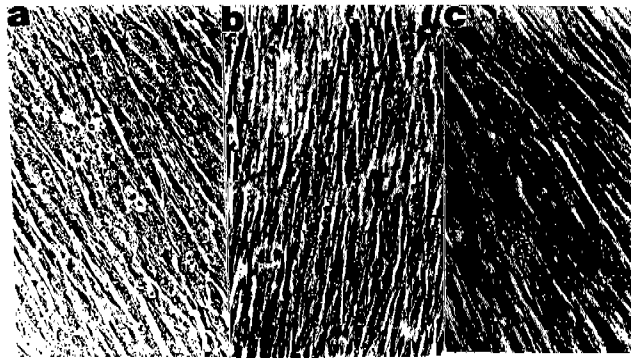


Fig. 5. Phase contrast micrographs of human fibroblasts (10th passage) after 3 days in culture (x200)
(a) Tissue culture dish. **(b)** PU. **(c)** Gelatin coated PU

그림 5. 섬유아세포의 위상차 현미경 소견(10번째 계대배양, 3일 배양, ×200)

(a) 배양용기, **(b)** 폴리우레탄, **(c)** 젤라틴이 도포된 폴리우레탄

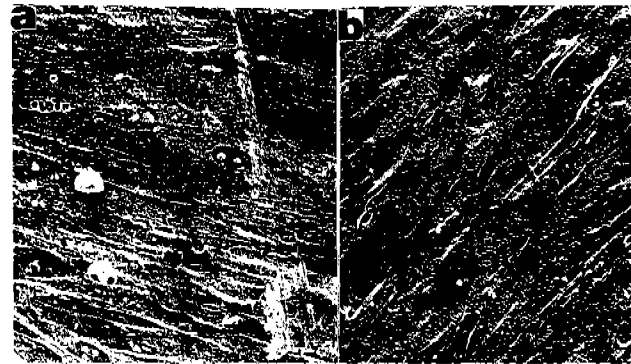


Fig. 6. Scanning electron micrographs of extracellular matrix excreted by fetal fibroblasts after irradiation on **(a)** PU and **(b)** gelatin coated PU.

그림 6. 섬유아세포에 의해 분비된 세포외기질의 주사 전자현미경 소견(방사선 조사 방법으로 처리) **(a)** 폴리우레탄, **(b)** 젤라틴이 도포된 폴리우레탄

은 배양 기질에 따라 형태들이 다르다는 것을 발견했다.

세포외기질 형성

(Fig. 6)은 폴리우레탄과 gelatin이 도포된 폴리우레탄위에서 형성된 세포외기질의 주사전자현미경 소견이다. 각 지지물이나 방법에 따른 형태학적 차이점은 발견하지 못했다.

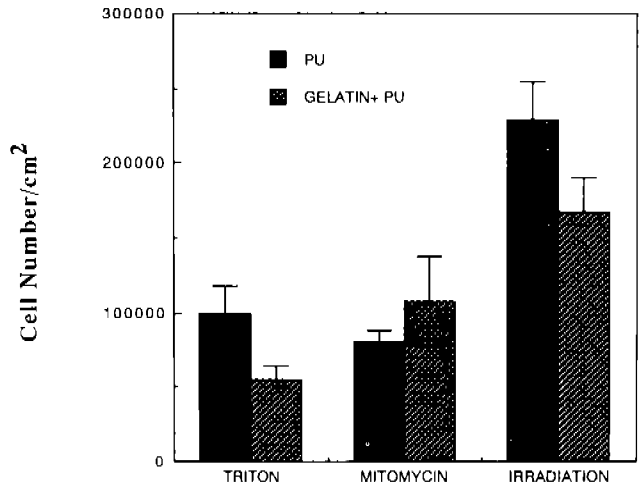


Fig. 7. Number of endothelial cells (7th passage) on different supports after 12 days in culture (n=4)

그림 7. 처리 방법에 따라 생성된 각 기질위에서 배양된 내피세포수(12일 배양, n=4)

세포외기질위에 혈관내피세포 배양

(Fig. 7)은 세 가지 다른 방법으로 처리된 세포외기질위에서 12일 동안 배양한 혈관 내피세포(7번째 계대배양)의 세포수를 나타낸다. 방사선 조사방법으로 처리된 세포외기질위에서 혈관 내피세포 수가 가장 많았다. Mitomycin으로 처리한 경우를 제외하고는 세포외기질이 있는 폴리우레탄이 가장 좋은 지지물이라는 것을 발견하였다. 세포외기질이 없는 조직 배양기와 방사선조사 방법으로 형성된 세포외기질이 있는 조직 배양기에서의 세포의 수는 각각 $161,700 \pm 24,640$ 과 $158,630 \pm 14,376$ 으로 통계학적으로 별 차이가 없었다. 반면 세포외기질이 없는 폴리우레탄에서는 세포의 부착력 및 성장이 아주 부진(10% 이하)한 것으로 관찰되었다. 위상차 현미경 관찰소견(Fig. 8)으로 이를 확인할 수 있다. 가장 좋은 세포의 형태는 방사선 조사로 처리된 세포외기질위에서 관찰할 수 있었다. 세포들의 형태는 일정하고 다각형이며 세포들이 합류하여 자랐다. 다른 경우에는 세포의 형태가 균일하지 못하고 세포의 밀도도 낮았다.

생체 (in vivo)실험

(Fig. 9)는 이식 5주 후의 인공혈관의 사진이다. 인공혈관의 내면이 완전히 새로운 내막(neointima)으로 덮여 있는 것을 발견했다. (Fig. 10)은 이식혈관의 중양 부분 및 봉



Fig. 8. Phase-contrast micrographs of endothelial cells(5th passage; x200) (a and b) Triton-X-100 (c and d). Mitomycin (e and f). Irradiation (a, c, and e). ECM coated PU (b, d, and f). ECM plus gelatin coated PU after 7 days in culture (g). PU after 9 days in culture.

그림 8. 각 기질위에서 배양된 혈관내피세포의 위상차 현미경 소견(5번째 계대배양, ×200)

(a, b) Triton-X-100으로 처리, (c, d) Mitomycin으로 처리, (e, f) 방사선 조사 방법으로 처리

(a, c, e) 세포외기질이 있는 폴리우레탄, (b, d, f) 세포외기질과 젤라틴이 도포된 폴리우레탄, (g) 폴리우레탄

합 부위의 사진으로 인공혈관의 내벽이 생체 혈관과 같은 형태를 갖추고 있는 것을 발견했다. (Fig. 11)은 봉합부위의 단면을 찍은 현미경 사진으로, 혈관 내면에 혈관내피세포가 형성되어 있는 것을 발견했다. (Fig. 12)는 봉합부위와 중앙부분사이 (Fig. 9)의 단면 현미경사진으로 내막비후가 발견되었으며 섬유화와 미세혈관의 형성도 보여주고 있다. 대조군-세포외기질이 없는 인조 혈관을 이식한 쥐는 이식 3주 후에 인공혈관의 폐쇄로 인하여 죽었다.



Fig. 9. Photograph of an open prosthesis after extirpation 5 weeks postoperatively (x6.6).

그림 9. 이식 5주후에 쥐를 희생하여 얻은 폴리우레탄 인공혈관의 내측소견(×6.6)

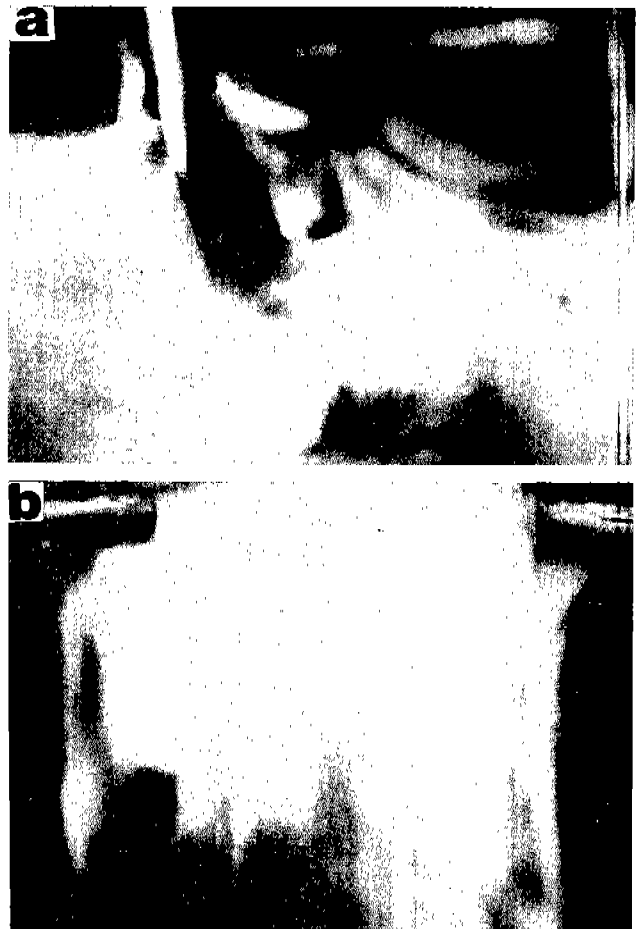


Fig. 10. Photograph of an open prosthesis (a; anastomotic site, b; mid-zone of the prosthesis)

그림 10. 이식한 폴리우레탄 인공혈관의 내측소견 (a; 봉합부위, b; 중간부위, ×10)

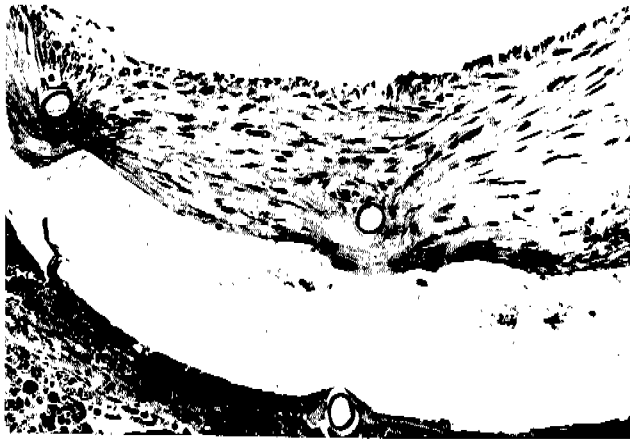


Fig. 11. Photograph of implanted graft in cross-section stained with hematoxylin and eosin (x100).

그림 11. 이식한 폴리우레탄 인공혈관 봉합부위의 단면소견 (H&E 염색, ×100)

고 찰

이 연구에서 저자들은 섬유아세포에서 형성된 세포외기질을 이용하여 생체외와 생체내 실험의 결과를 발표하였다. 여기에서 섬유아세포의 형태는 다른 지지물하에서 제각기 다르다는 것도 관찰되었다. 이 결과는 Ingber와 저자들의 이전 연구에서 보고된 바와 동일한 결과이다^{11, 13, 14}. 그러므로 다른 지지물하에서 섬유아세포는 다른 세포외기질을 생성할 것으로 생각되며, 그러한 세포외기질은 내피세포의 증식 및 부착력을 바꿀 수도 있을 것이다. 섬유아세포는 서로 다른 물질 하에서 다른 세포외기질을 생성할 수 있기 때문에 정확한 이유를 알기 위해서 각 기질의 분석이 필요할 것으로 생각된다. Gelatin은 일반적으로 세포의 접착 및 이동에 있어서 뛰어난 지지물로 알려져 왔다. 그러나 본 연구 결과에서는 폴리우레탄이 gelatin보다 더 훌륭한 지지물로 나타났다.

서로 다른 지지물 하에서 섬유아세포의 세포골격과 핵을 파괴하기 위해 방사선 조사 방법이 사용되었을 때 섬유아세포에서 형성한 세포외기질의 형태는 변화되지 않았고 과정 자체도 복잡하지 않았다. 이로써 세포외기질에 있는 대부분의 수용체들이 영향을 받지 않았을 것으로 생각된다. 저자들은 세포외기질이 도포된 폴리우레탄위에서 배양된 세포가 전단응력 (shear stress)에 노출되었을 때 세포 탈락의 정도에 대한 실험을 하고 있으며, 예비 결과로 세포들이 10분간 5 dyne/cm²의 shear stress를 받을 때 약 9.75%의 세포 탈락율이 관찰되었다. 또한 세포외기질위에 혈

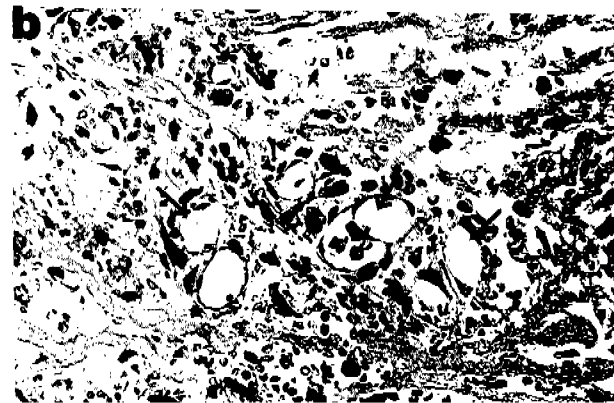


Fig. 12. Micrograph of the media at the anastomotic site stained with H & E (x400, arrow; neovascularization)

그림 12. 이식한 폴리우레탄 인공혈관 봉합부위의 단면소견 (H&E 염색, ×400, 화살표; 신생혈관)

관내피세포를 배양시킨 후 세포의 기능을 측정하기 위해서 혈소판의 유착을 억제하는 Prostacyclin (PGI₂)의 합성능력을 측정하여 대조군에 비하여 유의하게 높은 것을 관찰하였다 (21.97 ± 3.45 vs 4.93 ± 0.31 pg/1000 cells)¹⁵.

동물실험 결과, 양측 봉합부위가 중심 부분보다 더 두껍다는 것을 관찰하였다. 이식된 혈관에서 섬유화와 신생혈관들이 관찰되었으며 신내막과 중막이 형성되었고 외막은 폴리우레탄으로 이루어져 있었다. 이런 결과를 확인해 보기 위해서는 6개월 이상의 in-vivo 실험 관찰이 요구되며 또한 다양한 동물 모델들이 필요할 것으로 사료된다. 또한 세포외기질로 도포된 폴리우레탄의 소득법의 개발 등 다른 조치들도 요구될 것이다.

결론적으로 저자들은 섬유아세포에서 얻어진 전체 세포외기질이 소구경 인공혈관의 내피세포화를 위한 기초 물질로써 적합한 재료라고 본다.

참 고 문 헌

1. Bjorek CG, Esquivel CO, Bergentz CE, et al: *Reduced thrombogenic characteristics of expanded polytetra-fluoroethylene and polyurethane arterial grafts after heparin bonding.* Surgery 95: 102-107, 1984
2. Yamada KM, Olden K: *Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood.* Nature 275:179-184, 1978
3. Belden TA, Schmit SP, Falkow LJ, Sharp WV: *Endothelial cell seeding of small diameter vascular grafts.* ASAIO Trans 28 :173-177, 1982
4. Anson Y, Callow AD: *New graft material and current approaches to an acceptable small diameter vascular graft.* ASAIO Trans 34: 88-84, 1988
5. Callow AD: *Endothelial seeding: Problems and expectation.* J Vasc Surg 6:318-319, 1987
6. Anderson JS, Price TM, Hanson SR, Hanker LA: *In vitro endothelialization of small caliber vascular grafts.* Surgery 101: 577-586, 1987
7. Nossel HL and Vogel HJ: *Pathobiology of the endothelial cell.* Academic Press, 1982
8. Declerck YA, Jones PA: *The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth muscle cells.* Biochem J 186:217-225, 1981
9. Hedman K, Kurkinen M, Alitalo K, Vaheri A, Johansson S, Hook M: *Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures.* J Cell Biol 81: 83-91, 1979
10. Sage H, Pritzl P, Bornstein P: *Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: Comparison of aortic, venous capillary, and corneal endothelium.* Arteriosclerosis 1: 427-442, 1981
11. Lee YS, Park DK, Min BG: *Endothelial cell seeding onto extracellular matrix for development of polyurethane vascular prosthesis.* KOSOMBE 12:165-170, 1991
12. Kern PA, Kedler A, Eckel RH: *Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue.* J Clin Invest 71:1822-1829, 1983
13. Ingber DE, Mardi JA, Folkman J: *Endothelial growth factors and extracellular matrix regulate DNA synthesis through modulation of cell and nuclear expansion: In vitro cellular development biology.* 23:387-394, 1987
14. Warocquier-Clerout R, Lee YS, Penhoat J, Sigot-Luzard MF: *Comparative behaviour of L-929 fibroblast and human endothelial cell onto crosslinked protein substrates.* Cytotechnology 3: 259-269, 1990
15. Myung A Kim: *Antithrombogenic effect of endothelial cells cultured on extracellular matrix coated polyurethane: prostaglandin synthesis and platelet adhesion studies.* Thesis of Master, Seoul National University, Seoul, Korea, 1994