

인조혈관재료 표면에 도포된 혈관내피세포의 생리적 변화에 관한 연구

이윤신**·김용배*·김명아***·김병상*

= Abstract =

Physiological Function of Endothelial Cells Cultured on Polyurethane Coated by ECM

Yoon Shin Lee**, Yong Bae Kim*, Myung A Kim***, Byoung Sang Kim*

Antithrombogenic surface is one of the most important things to the artificial vascular prostheses. This problem will be solved if the surface of prosthesis is covered with endothelial cells. The attachment and the growth of endothelial cells onto vascular prosthesis are very difficult. So many studies have been concentrated on the attachment of endothelial cell. But no good performance of the *in vivo* experiments has been shown until now. In this study, we used the whole extracellular matrix (ECM) excreted from fibroblasts as an underlying matrix, and the endothelial cells were seeded to obtain the long term patency of vascular graft(i.e., for the patent 8 week implanted grafts in the animal model of rat).

In order to study the antithrombogenic functions of cultured endothelial cells, prostaglandin(PGF_{1α}) synthesis and platelet adhesion were assayed. The concentration of PGF_{1α} of stimulated group was significantly higher than that of control group(21.97±3.45 vs 4.93±0.71 pg/1000 cells). The platelet adhesion of the polyurethane sheet covered with endothelial cells was lower than that of polyurethane sheet or sheet covered with ECM(1.04±0.28, 2.87±0.77, 2.89±0.70, % radioactivities, respectively).

Endothelial cells grew well on polyurethane coated with ECM, synthesized the prostacyclin and functioned well as antithrombogenic. Therefore the endothelialization onto the ECM excreted from fibroblasts may be a good method for the vascular prosthesis.

Key words : Endothelialization, Antithrombogenic function, Vascular prosthesis, Extracellular matrix

서 론

최근의 연구들 중 의료용 재료의 혈액 적합성을 향상시키는 방법은 혈액 적합성이 우수한 새로운 물질을 개발하거나, 기존 재료의 표면을 개질함으로써 혈액적합성을 향상시키는 쪽으로 대별된다. 그러나 일반적으로 새로운 물질의 합성을 통하여 우수한 기계적 특성과 혈액적합성

을 얻는 것이 매우 어려우므로, 표면의 개질을 통하여 혈액적합성을 향상시키려는 시도들이 많이 연구되고 있다^{1,2)}. 표면개질의 한 시도로서 혈관내피세포(endothelial cell)를 인조혈관의 표면에 도입하여 실제의 자연혈관을 모사하려는 노력이 세계적으로 널리 행하여지고 있다³⁾. 여러 고분자 재료표면에 혈관내피세포를 배양하여 혈액적합성을 향상시키려는 노력은 자연혈관과 가장 유사한 형태의

(속보논문)

- * 순천향 대학병원 성형외과
- * Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Soon Cheon Hyang University
- ** 서울의대 의공학 연구소
- ** Institute of Biomedical Engineering, College of Medicine, SNU
- *** 부천세종병원 내과
- *** Department of Internal Medicine, Sejong Hospital

+ 본 연구는 1994년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 진행되었음에 감사드립니다.
통신저자 : 김용배, (140-743) 서울시 용산구 한남동 657, 순천향 대학병원 성형외과

인조혈관을 만들수 있다는 장점 때문에 많은 연구가 진행되고 있다⁴⁾. Sipehia⁵⁾ 등은 polystyrene과 polytetrafluoroethylene(PTFE) 표면에 암모니아 가스 플라즈마 처리를 한 결과 혈관내피세포의 접착(adhesion)이 활성화된다는 사실을 발견하였고, Kesler⁶⁾ 등은 PTFE와 polyester elastomer 표면에 파이브로넥틴(fibronectin)을 코팅하여 혈관내피세포의 접착을 유도하였다. Mittermayer⁷⁾ 등은 폴리우레탄 표면 위에 콜라겐(collagen)과 라미닌(laminin)같은 혈관내피세포 접착 활성화 물질을 결합시켰고, Dekker⁸⁾ 등은 혈관내피세포 자체나 세포외기질(extracellular matrix) 단백질에 대한 항체를 이용하여 세포의 부착을 유도하였다.

이러한 일련의 연구들은 기본적으로 혈관내피세포를 인조혈관의 내벽에 부착하는데는 어느정도 성공하였으나, 부착된 혈관내피세포가 실제로 항혈전성을 높이는데 어떠한 기전으로 기여하는지, 인공물에 부착된 혈관내피세포의 어떠한 생리적인 반응을 보이는가에 대해서는 많은 연구가 수행되고 있지 않고 있다. 혈관내피세포의 생리학적인 연구는 많은 실험실에서 행하여지고 있으나, 이는 혈관내피세포가 인조혈관의 표면에 도입되어 겪게되는 혈류에 의한 전단응력이나, 혈압등을 고려하지 않은 상황이므로 이러한 실험을 통해서 인조혈관에 이식된 혈관내피세포의 생리를 고찰하기는 어렵다. 인조혈관에 부착된 혈관내피세포는 자연혈관에 부착된 혈관내피세포와는 다른 환경에 처하게 되므로 이에 대한 적절한 고려가 필요하다. 예를들면 자연혈관은 섬유아세포와 평활근세포-기저막(basement membrane)-세포외기질-혈관내피세포로 이루어지는 안정된 삼차원적 구조를 이루고 있으나, 인조혈관의 경우는 생체재료로 만들어진 인조혈관재료-세포의 접착을 증가시키기 위한 단백질(adhesive protein)-혈관내피세포의 단순 구조를 가지게 되므로 이러한 환경에 따른 혈관내피세포의 생리변화에 대한 고찰은 혈관내피세포를 성공적으로 인조혈관에 도입하기 위해서 반드시 선행되어야 한다.

본 연구는 섬유아세포로부터 얻은 세포외기질이 도포된 인조혈관재료에 접착된 혈관내피세포가 나타내는 생리적인 반응의 고찰을 목적으로, 배양된 혈관내피세포의 항혈전성기능에 관한 연구이다.

재료 및 방법

1. 혈관내피세포의 분리와 배양

혈관내피세포는 제대정맥(umbilical cord vein)으로부터 분리한다. 제대는 태반쪽에서 얻어 cord buffer가 들어있는 무균처리된 병에 담아 운반하고 운반과정 및 내

피세포 분리전까지는 4°C로 유지한다. Cord buffer는 phosphate buffer saline(PBS)에 0.01M glucose가 포함되어있고 Ca⁺⁺와 Mg⁺⁺ 이온들이 제거된 용액이다. 정맥의 양끝에 15 gauge의 바늘을 꽂고 clamping 한 후 한쪽 끝에 실리콘 튜브를 연결한다. 반대편 바늘을 통해 정맥내로 cord buffer를 통과시켜 내부에 남아있는 혈액을 모두 제거한다. 0.2% collagenase(Type 1, Worthington Biochemical Co., U.S.A.)를 통과시킨 후 양쪽 끝을 막고 37°C water bath에서 5분간 반응시킨다. 제대를 상온에서 가볍게 문지르면서 5분간 방치한 후, 50 ml의 cord buffer로 씻어내려 내용물을 원심분리관에 모은다. 이를 150x g 에서 5분간 원심분리한 후, 상층액은 버리고 배양액(M-199, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 100 units/ml penicillin-streptomycin, 20% fetal bovine serum, Sigma) 10 ml를 넣어 잘 혼합한 후 다시 원심분리한다. 침전물에 배양액 5 ml를 넣고 다시 혼합하여 T-25 배양용기에 넣어, 37°C, 가슴된 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 배양액은 2-3일에 한번씩 갈아 준다. 세포들이 성장해서 합류되면 배양액을 제거하고 Ca⁺⁺와 Mg⁺⁺가 제거된 PBS으로 serum과 떨어진 세포들을 제거한다. 0.05% trypsin과 0.02% EDTA로 처리하여 계대 배양한다. 계대 배양한 세포들을 액화질소에 냉동, 보관하여 필요할 때 녹여서 사용했다.

2. 혈관내피세포의 확인

혈관내피세포의 확인을 위해서 먼저 배양된 혈관내피세포들을 PBS로 세척한다. 세포들을 영하 20°C에서 메탄올과 5분간 반응시켜 고정한다. 혈관내피세포를 PBS로 3번 세척하고, 첫번째 항체인 15 I anti-von Willebrand factor(Boehringer Mannheim, German)을 상온에서 45분간 반응시킨다. PBS로 여러번 세척한 후 두번째 항체인 30 I anti-rabbit IgG-fluoresceine을 45분간 반응시킨다. PBS로 여러번 세척한 후 cover glass를 덮어 2시간 동안 방치한 후 형광 현미경을 이용하여 혈관내피세포를 관찰한다. 대조군으로서는 첫번째 항체를 반응시키지 않고 동일한 실험을 수행한다.

3. 섬유아세포의 배양

15주에 소파수술을 시행한 태아의 흉부전면 및 대퇴부의 피부를 박리하여 cord buffer로 세척한 후, 0.2% collagenase로 여과하여 여과된 용액에 배양액(ISCOVE's medium, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 200 units/ml penicillin-streptomycin, 10% FBS) 10ml를 첨가하여 300x g에서 5분간 원심분리한다. 상층액은 버리고 다시 배양액 10ml를 넣어 혼합한 후 34m Nylon mesh로 걸러낸다. 여과된 용액을 다시 150x g에서 5분

간 원심분리하여 상층액은 버리고 여기에 5ml 배양액을 넣어 잘 혼합한 후 T-25 배양용기에 넣고 배양기에서 배양한다. 배양액은 3일에 1번씩 갈아주고, 세포들이 성장해서 합류되면 계대배양한 후 세포들을 냉동, 보관해서 필요할 때 사용한다.

4. 폴리우레탄 쉬트 제작

폴리우레탄(polyurethane, PU) 쉬트(sheet)를 제작하기 위해서 펠레탄(Pellethane 2363-80AE, Dow Chemical Co., U.S.A.)을 N, N-dimethylacetamide(DMAC, Sigma)에 12 w/v%의 농도로 녹인 용액을 사용했다. DMAC가 제거되도록 40°C에서 2일간 건조시킨 후, 불순물을 제거시키기 위해서 methanol(Sigma)에 4시간 동안 담가 두었다. PBS로 여러번 세척한 다음에 ethylene oxide(EO) 가스로 소독한 후, 여분의 EO 가스를 제거하기 위해서 상온에서 2일간 방치한 후 사용했다.

5. 세포외기질 형성과 혈관내피세포 배양

폴리우레탄 쉬트에 7~10번 계대배양한 섬유아세포를 3×10^4 cell/cm²의 농도로 폴리우레탄 표면에 배양시킨다. 세포의 형태를 광학 현미경으로 관찰한다. 폴리우레탄 쉬트위에 섬유아세포가 합류하면 배양액을 버리고 PBS로 세척하여 cell debris를 제거하고 ⁶⁰Co 감마선 10,000 rad의 선량에서 조사시켰다. 형성된 세포외기질의 형태를 주사 전자 현미경으로 관찰하였다.

2~3 번째 계대배양한 혈관내피세포를 4×10^4 cell/cm²의 농도로 형성된 세포외기질위에 이식하였다. 광학 현미경으로 관찰하여 혈관내피세포가 고르게 퍼져 자라는 것을 확인했다. 9일 동안 배양한 후 Coulter counter(Coultronics, U.S.A.)로 세포수를 측정하였고, 세포의 형태를 위상차 현미경과 주사전자현미경으로 관찰하였다.

6. Prostacyclin(PGI₂) 합성능

세포외기질로 도포된 폴리우레탄 쉬트에 혈관내피세포를 배양했다. PGI₂ 합성 측정실험 전까지는 배양액을 매일 갈아주었다. 측정실험 1시간 전에 serum이 들어 있지 않은 배양액으로 갈아 준 후 20μM의 arachidonic acid를 실험군에 투여하고 37°C에서 20분간 반응시켰다. 배양액을 분리하여 시험관에 담고 불순물을 제거하기 위하여 1000x g에서 5분간 원심 분리한 후 상층액을 모아 6-keto-PGF_{1α}를 6-keto-PGF_{1α} assay kit (Amersham, England)를 사용하여 방사선 면역 측정법(radioimmunoassay)으로 측정하였다. Arachidonic acid를 첨가하지 않은 것을 대조군으로하여 비교하였다. 세포들의 숫자는 0.05% trypsin과 0.02% EDTA로 처리한 후 hemocytometer로 측정하였다.

7. 혈소판 정착

폴리우레탄군은 폴리우레탄만, 세포외기질군은 폴리우레탄위에 섬유아세포를 배양한 후 세포외기질을 노출시킨 것, 혈관내피세포군은 세포외기질위에 혈관내피세포들이 합류된 것으로 준비하였다. 혈소판분리반출법(Plateletpheresis)를 이용하여 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma, PRP)을 준비하였다. ^{99m}TcO₄⁻(50 mCi)를 d, 1-hexamethyl propylene amine oxide(HMPAO)와 반응시켜 ^{99m}Tc-d, 1-hexamethylpropyleneamine oxime (^{99m}Tc-HMPAO)를 만들었다. 앞에서 준비한 PRP에 ^{99m}Tc-HMPAO 용액을 첨가시켜 상온에서 10분간격으로 흔들어 주면서 30분간 반응시켰다. ^{99m}TcO₄⁻준비부터 혈소판과 반응시까지 30분을 넘지 않도록 하였다. 준비된 실험군에 ^{99m}Tc-HMPAO로 labelling된 혈소판이 들어 있는 PRP를 1ml씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 혈소판 기능을 보존하기 위하여 혈소판 분리로부터 각 실험군에 반응시킬 때까지 10시간을 넘지 않도록 하였다. 반응 후 각 실험군들을 PBS로 세척한 후, scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다.

결 과

1. 혈관내피세포 분리와 배양

Fig. 1에서는 시판되고 있는 T-25 조직 배양용기에서 배양 6일째에 혈관내피세포 형태를 위상차 현미경으로 관찰한 소견 사진이다. 사용된 혈관내피세포는 3번째 계대배양한 세포이다. 계대배양한 세포의 형태가 정형적인 혈관내피세포 형태인 다각형의 형태를 나타냄을 관찰할 수 있다.

2. 혈관내피세포의 확인

Fig. 2는 혈관내피세포들이 합성하는 von Willebrand factor(vWF)를 간접 면역 형광염색법으로 실험해서 형광현미경으로 관찰한 사진이다. 세포질에서 형광염색이 발현하는 것을 관찰했다. 세포질에 vWF의 존재를 확인함으로써 확립한 cell line이 혈관내피세포임을 확인했다. 대조군에서는 전혀 형광염색 발현을 관찰할 수 없었다.

3. 섬유아세포의 배양

Fig. 3은 T-25 조직 배양용기에서 10번째 계대 배양 섬유아세포들의 3일째에 관찰한 위상차 현미경 소견 사진이다. 3일째에 조직 배양기에서 배양된 세포의 형태는 정형적인 섬유아세포의 형태를 지니고 있으며, 폴리우레탄위에서 배양한 세포들은 더 긴 모양을 나타내고 있다.

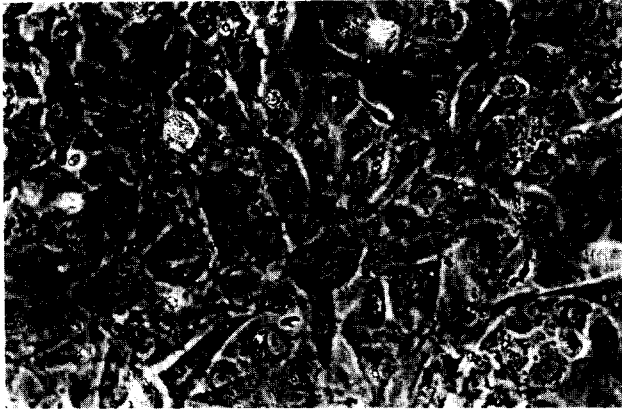


그림 1. 조직배양기에서 배양된 혈관내피세포의 위상차 현미경 소견(3번째 계대배양, 6일 배양, ×200)

Fig. 1. Phase contrast micrograph of endothelial cells(third passage) on tissue culture dishes after 6 days in culture (×200)

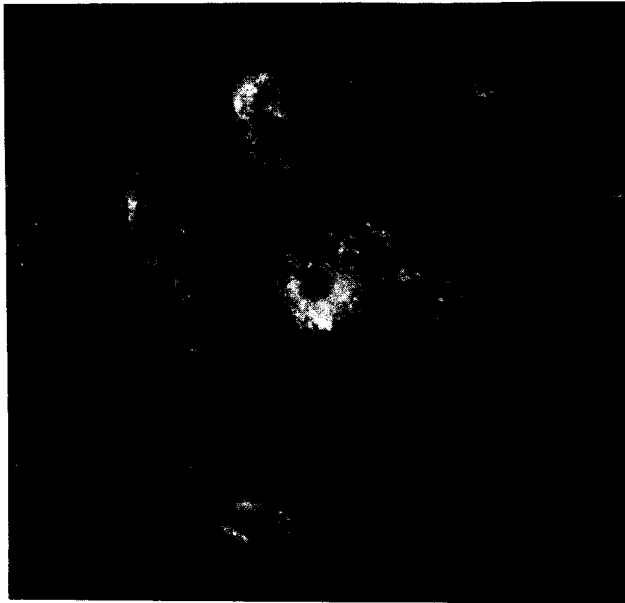


그림 2. 혈관내피세포 확인; 배양된세포의 vWF 형광 양성반응(6번째 계대배양, 6일 배양, 배양용기, ×200)

Fig. 2. Fluorescence micrograph of human endothelial cells (6th passage) on tissue culture dishes after 6 days in culture(×200)

배양된 세포들은 기질에 따라 형태들이 다르다는 것을 발견했다.

Fig. 4는 조직배양용기와 폴리우레탄에서 섬유아세포의 성장곡선이다. 초기에는 조직배양기에서 세포의 성장이 더 높았지만(83000 ± 5350 vs. 73000 ± 6580), 8일째에는 폴리우레탄에서도 높은 성장을 보였다(390000 ± 51000 vs. 340000 ± 15250).

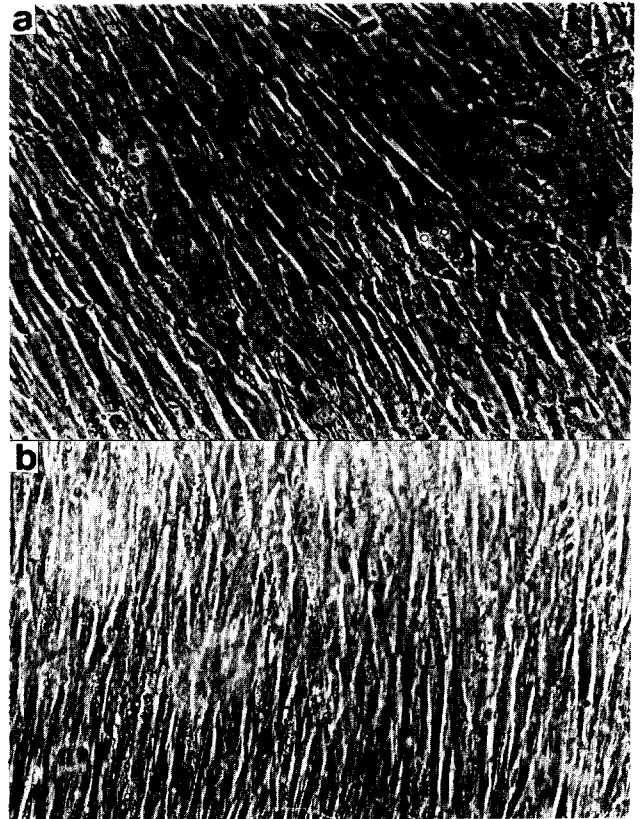


그림 3. 섬유아세포의 위상차 현미경 소견(10번째 계대배양, 3일배양, ×200) (a)배양용기 (b)폴리우레탄

Fig. 3. Phase contrast micrographs of human fibroblasts (10th passage) after 3 days in culture(×200) (a)Tissue culture dish. (b)PU

4. 세포외기질 형성과 혈관내피세포 배양

Fig. 5은 폴리우레탄위에 섬유아세포들을 배양한 후 gamma ray를 조사시킨 후 주사전자 현미경으로 관찰한 소견 사진이다. 세포외기질이 도포되어있는 형태를 관찰할 수 있다. Fig. 6은 세포외기질위에서 혈관내피세포(3번째 계대배양) 배양 6일째 위상차 현미경과 주사 전자 현미경으로 관찰한 소견 사진이다. 혈관내피세포의 특정한 형태인 다각형의 세포들을 관찰할 수 있다. Fig. 7은 조직배양용기와 세포외기질에서 혈관내피세포 배양 7일째에 세포숫자를 나타낸 것이다. 조직배양기에서보다 세포외기질에서 혈관내피세포의 숫자가 적었다(416300 ± 49990 vs. 306500 ± 32410).

5. Prostacyclin(PGI₂) 합성능

Arachidonic acid로 처리한 실험군의 6-keto-PGF_{1α} 농도는 21.97 ± 3.45 pg/1000 cells로 대조군에서 얻은 4.93 ± 0.71 pg/1000 cells에 비해 유의하게 높았다(Fig. 8).

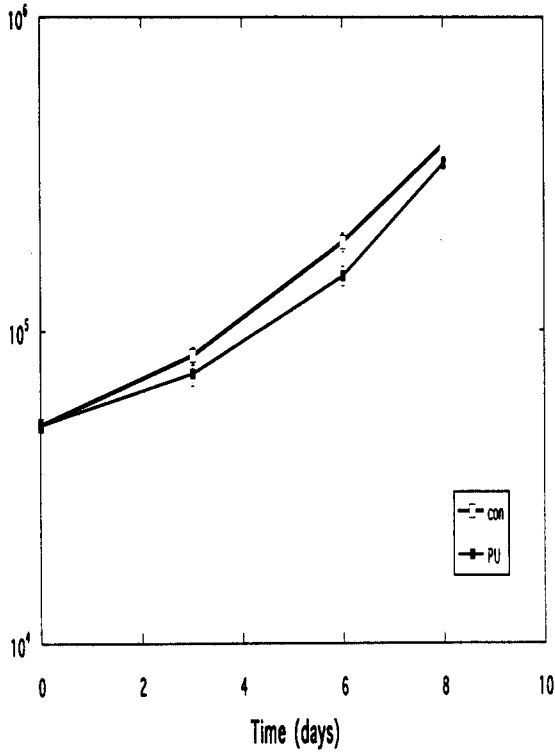


그림 4. 조직배양기와 폴리우레탄에서 섬유아세포의 성장곡선 (6번째 계대배양, n>3)
 Fig. 4. Rate of proliferation of fibroblasts on tissue culture dishes and PU(6th passage, n>3)

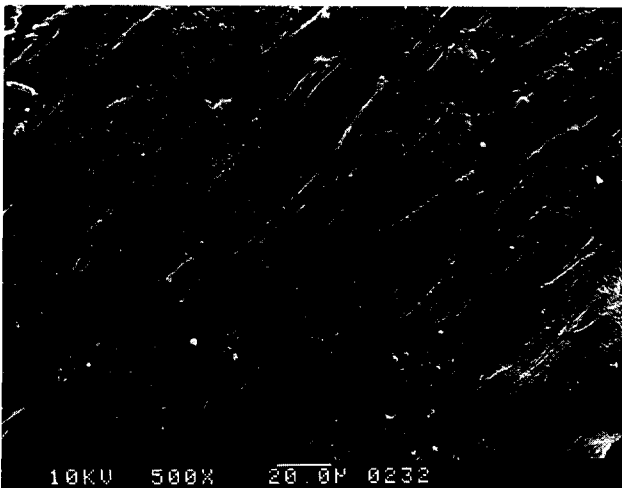


그림 5. 폴리우레탄에서 섬유아세포에 의해 분비된 세포외기질의 주사 전자현미경 소견
 Fig. 5. Scanning electron micrograph of extracellular matrix excreted by fetal fibroblasts after irradiation on PU

6. 혈소판 점착 실험

Plateletpheresis 방법으로 얻은 PRP의 혈소판수는

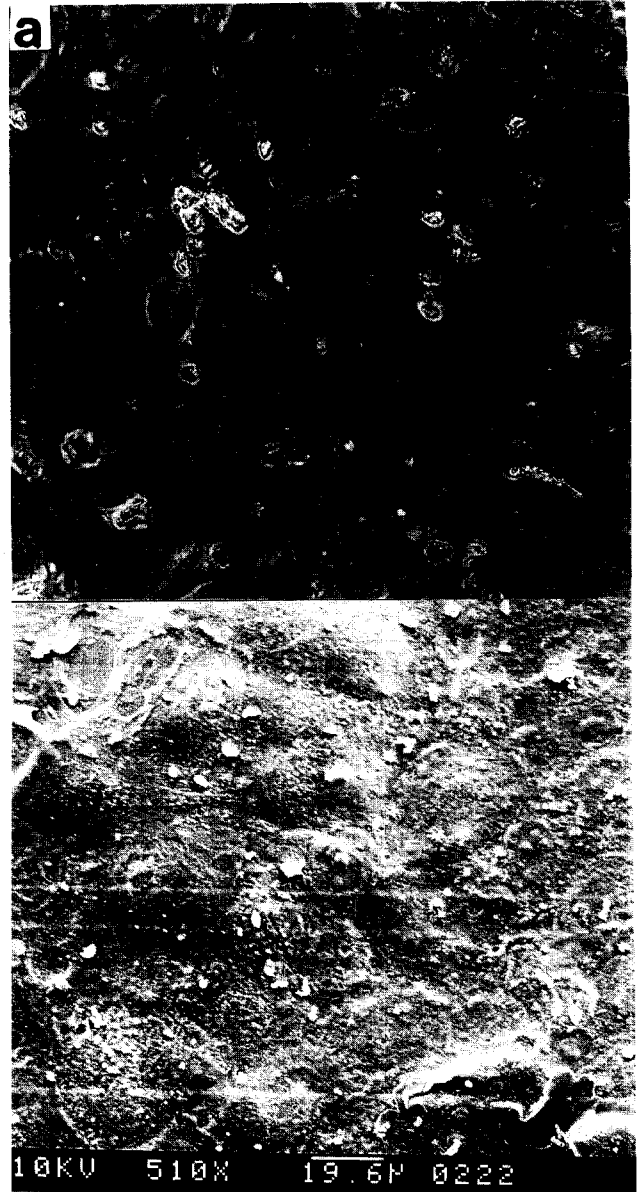


그림 6. 세포외기질이 도포된 폴리우레탄에서 배양된 혈관내피세포의 위상차 현미경(a)과 주사전자 현미경 소견(b)(3번째 계대배양, 7일배양, ×200)
 Fig. 6. Phase-contrast micrograph(a) and SEM(b) of endothelial cells(third passage; ×200) on PU coated by ECM after 7 days in culture

880,000 cells/ μ l 이였고, ^{99m}Tc-HMPAO와 반응하여 65%의 labelling efficiency를 보였다. 각 실험군에 넣어준 PRP의 radioactivity는 344 μ Ci/ml였다. 각 실험군의 radioactivity를 측정하여 비교한 결과, 폴리우레탄군은 2.87 \pm 0.77%, 세포외기질군은 2.89 \pm 0.70%, 혈관내피세포군은 1.04 \pm 0.28%의 radioactivity 보였다(Fig.9). 혈관내피세포가 배양된 실험군에서 혈소판 점착이 의미있게 낮음을 알 수 있었다.

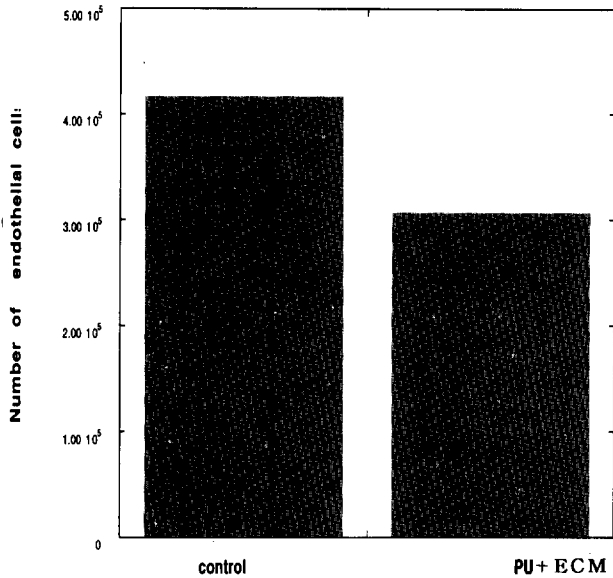


그림 7. 조직배양기와 세포외기질이 도포된 폴리우레탄에서 배양된 혈관내피세포수(7번째 계대배양, 9일배양, n>3)
 Fig. 7. Number of endothelial cells on tissue culture dishes and PU coated by ECM after 9 days in culture(7th passage, n>3)

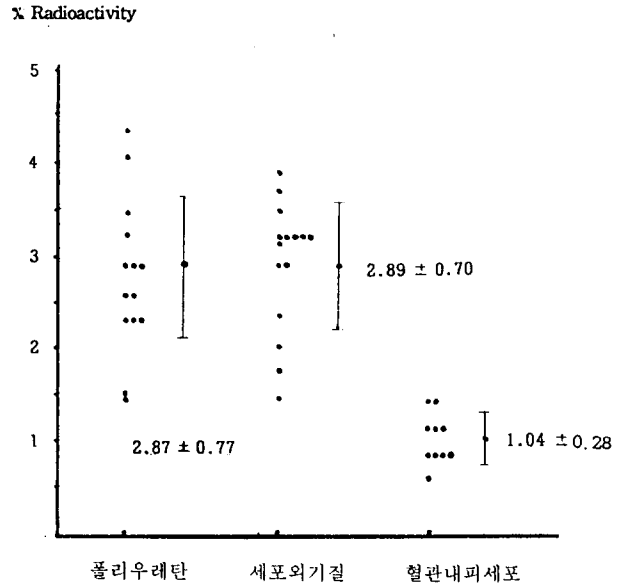


그림 9. 폴리우레탄, 세포외기질과 혈관내피세포에 부착된 혈소판들의 방사능
 Fig. 9. Radioactivity of adhered platelets onto different surfaces: polyurethane, ECM and endothelial cells

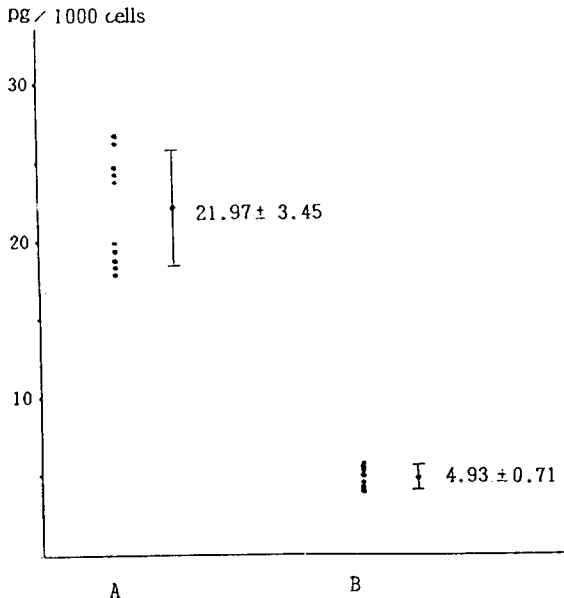


그림 8. Arachidonic acid 첨가했을 때(A)와 안했을때(B) 생성된 PGF_{1α}의 농도(n≥6)
 Fig. 8. Concentration of PGF_{1α} synthesized by ECs cultured onto ECM: A) stimulated with arachidonic acid, B) control(non stimulation), (n≥6)

고찰

내피세포화된 인공혈관은 혈전에 의한 폐쇄율이 낮을 뿐 아니라 세균에 의한 감염에도 높은 저항력을 보이는 등 여러가지 장점을 지니고 있다. 특히 내경이 작은 인공혈관에서는 장기 개통성(long-term patency)을 유지하기 위한 좋은 방법으로 많은 연구가 진행되었다. 그러나 내피세포화 작업 중 가장 난제로 떠오른것이 혈관내피세포의 부착력이다. 내피화된 인공혈관을 혈류에 노출시켰을 때 대부분의 세포가 탈락되어 내피세포의 부착력을 높이기 위한 시도로 세포외기질성분들 중에 collagen과 fibronectin 등이 사용되고 있다^{9,10}. 그러나 이러한 조건에서 생체재료에 이식된 혈관내피세포가 과연 생체 혈관내피세포와 똑같은 기능을 하느냐는 여전히 의문으로 남는다. 본 연구는 섬유아세포들이 형성한 세포외기질에 혈관내피세포들을 이식해서 그들의 기능들을 관찰하는 연구이다. 섬유아세포는 증식력, 부착력과 이동력이 강한 세포이며 그들이 형성한 세포외기질 성분 중에는 chondroitin sulfate, interstitial collagen type I와 III들이 다른 세포들이 형성한 세포외기질보다 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다¹¹. 본 연구팀에서는 세포가 형성한 세포외기질을 손상시키지 않고 세포를 파괴하는 방법에 관해서 연구했다¹². Irradiation 방법이 형성된 세포외기질의 형태가 변화되지 않았고 실험과정도 복잡하지 않았다. 방사선 조

사방법이 에너지를 줄 수 있으므로 세포외기질과 폴리우레탄표면의 결합을 강하게 해줄 수 있을 것으로 생각되므로 본 연구팀은 simulation을 하고있다. 폴리우레탄표면에 형성된 세포외기질위에 혈관내피세포들을 배양해서 세포들이 합류되면 5 dyne/cm²의 전단응력(shear stress)에 10분간 노출시켰을 때, 약 9.75%의 세포탈락율을 관찰했다. 생체에서 경동맥의 전단응력은 약 3 dyne/cm² 이므로 실험한 전단응력은 충분하다고 생각되지만 노출 시간과 전단응력을 높였을 때에 나타나는 현상들을 실험하고 있다. 혈관내피세포는 여러가지 생화학적 기능을 가지는 물질들을 합성 및 분비한다. 이중 PGI₂의 합성 및 분비능만 유지되어도, PGI₂ 합성에 의해 혈소판의 부착 및 응집을 강력히 억제하여 항혈전기능을 나타낼 수 있으며 혈관을 확장시켜준다. 이러한 성질들은 인조혈관의 장기 개통성에 중요한 영향을 미칠 것이다. 혈관내피세포가 어디서 분리되었느냐에 따라서 생성되어지는 prostaglandin(PG)의 종류도 다른 것으로 알려져 있는데, 예를 들면 제대정맥으로부터 분리된 혈관내피세포는 다량의 PGI₂를 합성하나 피부의 모세혈관으로부터 분리된 혈관내피세포는 dinoprostone(PGE₂)와 dinoprost(PGF₂)을 합성하고 PGI₂는 합성하지 않는 것으로 알려져 있으므로 위치에 따른 기능차이가 있는 것으로 본다³⁾. PGI₂는 안정성이 없어서 반감기가 3분 정도로 매우 짧아서 이물질 자체를 측정하기는 불가능하므로 대신 안정된 대사산물인 6-keto PGF_{1α}를 측정하였다. 세포의 phospholipid로부터 arachidonic acid를 사용하여 PGI₂를 합성하므로 외부에서 arachidonic acid로 자극 하였을때 다량의 PGI₂를 합성하게 된다. Arachidonic acid 외에도 thrombin이나 histamine 등도 PGI₂ 합성을 자극한다. PGI₂의 분비는 세포의 분열 및 성장이 왕성한 배양 초기에 가장 많이 합성되며 이후 급격히 감소하여 세포가 성장하여 confluence를 이루게 되면 매우 낮아진다. 본 실험의 결과는 PGI₂합성량에 있어서 자극전의 기저치는 Lee¹⁴⁾나 Hong¹⁵⁾의 보고와 별 차이가 없으나 자극 후 값이 차이를 보였는데, 이는 실험시 조건의 차이와 세포배양 기간등의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 또한 정상적인 생체혈관에서 PGI₂ 합성량을 측정하지 않아서 비교할 수 없지만 PGI₂ 합성량은 적을 것으로 예상된다. 왜냐하면 정상적인혈관내피세포는 PGI₂를 합성하지 않고 혈소판이 혈관내벽에 점착하거나 혈소판들이 응고할 경우에 제어하려고 PGI₂를 분비한다. 그러므로 PU에 형성된 ECM에서 배양된 혈관내피세포들의 PGI₂합성치가 낮은 것은 형성된 혈관내피세포들이 기능을 잘 수행하고 있다고 생각된다.

혈소판을 분리하는데는 plateletpheresis 방법이 월등히 우수하다. 적혈구나 백혈구의 오염없이 혈소판 수거가 가능하며 고농도의 혈소판을 다량 얻을수 있으나 특수장비

가 필요한 단점이 있다. 혈소판 분리시 원심분리에 의한 고전적 방법이든 pheresis에 의한 방법이든 간에 사용되는 항응고제는 acid citrate-dextrose(ACD) 이다. ACD는 calcium ion을 chelation함으로 항응고작용을 나타내나, 바로 이점이 혈소판 기능을 평가하는데 방해인자로 작용할 수 있다. 그러나 보고에 의하면 90mM의 고농도에서는 calcium ion을 depletion시켜 혈소판 점착을 억제시키나 흔히 사용되는 15-20mM 농도에서는 큰 문제가 되지 않는다. 혈소판 기능검사를 하는 대부분의 실험에서 항응고제로 ACD용액을 쓰어도 불구하고 calcium ion의 저하가 혈소판 기능에 미치는 영향에 대해서는 아직도 논란이 계속되고 있으며 최근에는 calcium ion에 영향이 없는 새로운 항응고 방법에 대한 연구가 진행 중이다¹⁶⁾. 혈소판 점착에 영향을 미치는 인자로는 calcium ion 외에도 혈청내 다른 성분들도 포함된다¹⁷⁾. 실험에서 pH가 미치는 영향은 매우 중요한 것으로 생각되어져 왔다. 혈소판 labelling 효율이 pH 6.5-8 사이에 좋은 것으로 보고 되었으며, 또 혈소판의 기능면에서 보더라도 인체내의 조건과 가급적 유사한 pH를 유지하는 것이 바람직 할 것이다¹⁸⁾. 본 연구에서는 ACD solution을 plateletpheresis 동안 들어간 것 이외에 더 첨가한 것이 없으며 이 상태에서도 혈소판 응집없이 실험이 잘 진행되었고, 또 보고된 것보다 훨씬 높은 labelling 효율을 얻을 수 있었다. 혈소판의 반응시간에 따른 점착정도를 측정한 여러보고에 의하면 대부분의 혈소판이 20-30분 내에 점착되며 1시간 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 보고되었다¹⁹⁾. 본 연구는 이러한 방법으로 활성화되지 않은 혈소판과 형성된 혈관내피세포의 점착을 관찰했다. 정상인 혈관내피세포와 혈소판은 둘 다 음전하를 띠므로 서로 붙지않지만, 혈관내피세포가 파손되어 혈관내막조직이 노출되면 혈소판이 점착되어 활성화되면서 adenosine diphosphate(ADP)을 분비하면서 혈소판끼리 엉키기 시작해서 혈전 현상이 일어난다고 알려져있다^{20,21)}. 본 연구에서 ECM위에 형성된 혈관내피세포와 혈소판의 점착이 다른 실험군들보다 낮음을 관찰할 수 있었으므로 혈관내피세포형성이 성공적으로 되어진 것을 의미한다고 생각된다.

본 연구에서는 세포외기질이 도포된 폴리우레탄에서 혈관내피세포의 여러가지 생화학적 기능은 유지되고 있었으나, 실제 이를 임상에 적용시킬 경우 풀어야 할 과제들이 많이 있다. 첫째로 면역학적 문제로 다른사람의 혈관내피세포를 사용할 경우 발생할 수 있는 면역반응에 대해서는 연구가 거의 없는 상태이다. 자가내피세포(autogenous)를 사용하고자 할 경우 내피세포를 얻는 방법상의 문제와 과연 필요량 만큼 얻을수 있는가 하는 의문이 제기된다. 둘째로 멸균처리 문제이다. 실험을 아무리 무균적으로 잘 시행하였다 하더라도 생체내에 삽입되기 위해선 멸균처리

를 거쳐야 하는데 살아있는 세포에 영향을 주지 않고 무균상태로 만드는 방법에 대한 연구가 과제로 남는다.

결 론

혈관내피세포가 세포외기질이 도포된 폴리우레탄 위에서 잘 배양되었고, 그 배양된 혈관내피세포가 본래의 기능을 유지하며, 특히 항혈전 능력이 있음을 확인되어 혈관내피세포화된 인조혈관의 사용 가능성을 보였다.

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*, vol. 95, pp. 102-107, 1984.
2. Yamada KM, Olden K, "Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood", *Nature*, vol. 275, pp.179-184, 1978.
3. Callow AD, "Endothelial seeding: Problems and expectation", *J Vasc Surg*, vol. 6, pp.318-319, 1987.
4. Belden TA, Schmit SP, Falkow LJ, Sharp WV, "Endothelial cell seeding of small diameter vascular grafts.", *ASAIO*, vol. Trans 28, pp. 173-177, 1982.
5. Sipehia R, "The chanced attachment and growth endothelia cells on anhydrous ammonia gaseous plasma modified surfaces of polystyrene and poly(tetra-fluorethylene)", *Biomat Art cells Art Org.*, vol. 18, pp. 437-446, 1990.
6. Kesler KA, Herring MB, Arnold MP et al., V "Enhanced strength of endothelial attachment on polyester elastomer and polytetrafluorethylene graft surfaces with fibronectin substrate", *Vasc surg.*, vol. 3, pp. 58-64, 1986.
7. Mittermayer C, Klee D, Richter H. Verfahren Zur, "Besiesding einer Polymeroberfiache mit menschlichen Gefassynnehautzellen", *Eur Pat Appl.*, 290, pp. 642 A1, 1986.
8. Dekker A, "Adhesion and proliferation of human endothelial cells on polymeric surfaces. Optimization studies", Enschede, The Netherlands, University of Twente, 119, Dissertation, 1990.
9. Yamada KM, Olden K, "Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood", *Nature*, vol. 275, pp. 179-184, 1978.
10. Lee YS, Park DK, Min BG, "Endothelial cell seeding onto extracellular matrix for development of polyurethane vascular prosthesis", *J Kor Med Bio Eng.*, vol. 12, pp. 165-170, 1991.
11. Hedman K, Kurkinen M, Alitalo K, Vaheri A, Johansson S, HooK M, "Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures", *J Cell Biol.*, vol. 81, pp. 83-91, 1979.
12. Lee YS, Park DK, Kim YB, Seo JW, Lee KB, Min BG, "Endothelial cell seeding onto the extracellular matrix of fibroblasts for the development of a small diameter polyurethane vessel", *ASAIO*, vol. 39, pp. 740-745, 1993.
13. Moncada S, Herman AG, Huggs EA, Vane JR, "Differatial formation of PGI2 by layers of arterial wall. An explanation for antithromboty propaties of vascular endothelium", *Thromb Res.*, vol. 11, pp. 323-344, 1977.
14. Lee YS, "Comparative behavior of human endothelial cells onto cross-linked protein substrate proposed for prosthetic vascular material", Thesis of Ph.D., UTC, France, 1989.
15. Hong SL, "Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical cord vein", *Thromb Res.*, vol. 18, pp.787-795, 1980.
16. Markwardt F, "Hirudin and derivatives as anticoagulant agent", *Thromb Hemostas*, vol. 66, pp. 141-152, 1991.
17. Harker LA, Zimmerman TS, "Measurement of platelet function", Edinburgh, Churchill-Livingstone, 64, 1983.
18. Becker W, Borner W, Borst U, Kromer EP, Gruner KP, "^{99m}Tc-HMPAO; A new platlet labeling compound", *Eur. J Nucl Med.*, vol. 13, pp. 267-268, 1987.
19. Becker W, Borst U, Krahe T, Borner W, "^{99m}Tc-HMPAO labeled platelets; in vivo and in vitro result", *Eur J Nucl Med.*, vol. 15, pp. 296-301, 1989.
20. Weiss HG, Turitto VT, Baumgartner HR, "Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood", *J. Lab. Clin Med.*, vol. 92, pp. 750-764, 1978.
21. Baumgartner HR, "Effect of acetylsalicylic acid, sulfipyrazone and dipyridamole on platlet adhesion and aggregation in flowing native and anticoagulated blood", *Haemostasis*, vol. 8, pp. 340-349, 1979.