

폴리우레탄 인공혈관을 위한 extracellular matrix 기질상의 내피세포이식

이윤신 · 박동국 · 민병구

= Abstract =

Endothelial Cell Seeding onto Extracellular Matrix for Development of Polyurethane Vascular Prosthesis

Yoon Shin Lee, Dong Kook Park and Byoung Goo Min

Many experiments about endothelial cell seeding on artificial vessels were studied and conducted. For this one or a combination of the extramatrix was used for the underlying matrix. But we used the whole ECM(extracellular matrix) that made excreted from fibroblast. In this study, we obtained human adult omental microvascular endothelium by collagenase digestion and used polyurethane sheets in order to make a new artificial vessel material. We cultured fibroblast on the polyurethane and gelatin-coated polyurethane. After confluent ingrowth we treated the polyurethane with triton in order to destroy the cytoskeleton and nucleus. We observed the preformed extracellular matrix on the polyurethane and cultured the isolated microvascular endothelium. We also observed the growth of microvascular endothelium on the polyurethane and gelatin.

We conclude that the use of the whole ECM is promising fair as a new underlying substrate for endothelial cell seeding on artificial vessels.

1. 서 론

현재 Dacron®, PTFE등이 인조혈관의 재료에 많이 사용되고 있지만 새로운 인조혈관의 재료로서 폴리우레탄의 사용에 대한 연구들을 하고 있다[1]-[3]. 그러나 인조혈관의 이식후에 초기의 급격한 혈전현상 때문에 인조혈관의 내면자체가 혈액응고 인자의 활성화를 막으며 혈소판의 활성화를 방지하여 혈소판의 침착을 최소한도로 줄이는 것이 필

요하다[4][5]. 그러므로 많은 연구들이 혈액의 성분인 알부민(albumin)과 세포외물질(extracellular matrix)의 성분들인 fibronectin, collagen, elastin과 laminin등을 인조혈관에 도포해서 사용했다[6]-[10]. 그러나 구경이 작은 인공혈관은 금방 막힘현상이 나타나고, 또한 인공혈관에 정상 혈관 유지에 중요한 역할을 하는 혈관내피 세포(endothelialcell)가 이식되어 성장하지 못했다.

혈관내피세포는 혈전을 예방하는데 중요한 역할을 하는 물질을 합성한다. prostacyclin(PGI₂)은 혈소판의 유착을 막고, plasminogen activator는 fibrin-clot을 녹이고, antithrombin III은 트롬빈을

〈접수 : 1991년 10월 24일〉

서울대학교 의과대학 의공학연구소

〈Institute and Department of Biomedical Engineering
College of Medicine Seoul National University.〉

비활성화하며, 또한 다른 활성화된 응고인자(XIIa, XIa, IXa, Xa)들도 억제하며, heparin sulfate는 antithrombin III의 반응력을 활성화시킨다. 반면에 adhesive cofactor인 von Willebrand factor를 생성하며 fibronectin과 thrombospondin을 생성한다. 또한 혈관내피세포는 이외도 많은 물질을 합성한다[11]. 그러므로 인공혈관에도 이 세포들이 존재한다면 혈전현상이 나타나지 않을 것이다.

그러나 혈관내피세포를 인조혈관위에 부착시킬 때 가장 큰 어려움은 인조혈관의 표면자체가 혈관내피세포의 부착에 좋게 구성되어 있지않아 혈관내피세포의 부착이 어렵다는 것과 부착력이 약하면 혈류 흐름에 쉽게 쓸려나가서 혈관내피세포의 부착이 어렵다는 것과 부착력이 약하면 혈류 흐름에 쉽게 쓸려나가서 혈관내피세포의 효과를 기대할 수 없다는 것이다¹²⁾. 지금까지는 많은 연구들이 전체 매트릭스 성분중의 일부 성분을 기질로 사용했는데, 일부보다는 세포외물질 전부를 이용하는 것이 혈관내피세포의 부착에 더 효과적일것으로 생각된다.

이연구에서는 세포외물질들을 많이 생성하며, 비교적 배양하기 쉬운 fibroblastcell(섬유아세포)을 배양시킨후, 폴리우레탄위에 섬유아세포를 배양해 핵만 제거하여 세포를 파괴시킨후 섬유아세포에서 생산해낸 세포외물질을 기본 매트릭스로 이용하여 그위에 미세혈관내피세포를 배양하여 단백질 매트릭스를 입히지 않은 폴리우레탄에서의 혈관내피세포의 성장과 부착력을 비교하였다. 폴리우레탄은 견고성과 유연성이 뛰어나서 인공장기재료로 많이 사용되는 재료이다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에서 사용한 재료는 Cord Buffer(PBS, 2 g/ml glucose), Collagnase, Trypsin, EDTA, Media ISCOVE's, Media 199, Rabbit antiserum, von willebrand factor(Behring), Fluorescein-conjugated goat IgG(Behring), Gelatin, CDI(carbodiimide), Corning T25, Pellethane 2363-80A(Dow chemical), Methanol, Glycine Buffer(20mM, PMSF1mM,

pH9.6), Triton-X-100(tris-HCl buffer 10mM, PMSF 1mM pH7.5), PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride), DMAC(N, N-Dimethyacteamide, Duksan pharmaceutical Co.). 표시한 회사들을 제외한 모든 시약은 Sigma제품을 사용했다.

2.2 방법

(1) 섬유아세포(fibroblast)분리 배양

15주에 소과수술을 시행한 태아의 흉부 전면 및 대퇴부의 피부를 박리하여 바로 cord buffer에 넣는다. 이것은 0.2% collagenase로 반응시킨다. 250 μ m mesh로 여과하여 섬유아세포 (fibroblast)만 분리하여 Media ISCOVE'S에 넣어 배양 플라스크에서 배양한다. Trypsin과 EDTA을 사용해서 세포를 분리해서 폴리우레탄 위에 배양시켰다.

(2) 미세혈관 내피세포의 분리배양

먼저 건강상태가 좋은(암환자, 염증이 있는경우 등은 제외) 젊은 환자에서 20g 정도의 대망을 채취하여 바로 cord buffer에 넣는다. 세포분리방법은 Kern이 사용한 방법을 이용했다¹³⁾. 효소분해가 잘되게 대망을 아주 작게 자른다((3mg). 이것을 10g에 7ml의 Collagenase(0.2%)와 혼합하여 shaking water bath에서 37도로 30분간 반응시킨다. 250 μ m mesh로 걸러낸다. 걸러 낸 것에 media 199 10ml를 넣어 300g로 10분간 원심분리 한다. 원심 분리해서 윗용액은 버리고 아래의 cell pellet에 media 199 10ml를 넣어 잘 섞어 혼합용액을 만든 다음 300g으로 10분간 원심분리한다. 위의 용액을 버리고 아래의 세포 덩치들에 5ml media 199를 첨가하여 혼합용액을 만든후 hemocytometer로 세포수를 세고 다시 300g로 10분간 원심분리한다. 아래의 세포 덩치에 5ml의 media 199를 첨가하여 25cm(106cells) 배양 플라스크에 넣어 37도, 가습된 5% CO₂, 95% air 상태에서 배양하며 배양액은 2-3일에 한번씩 갈아준다. 배양용기위에서 세포들이 성장해서 합류되었으면, 0.25% trypsin과 0.01% EDTA을 사용해서 계대배양 시킨다.

(3) 혈관 내피세포 확인

배양된 세포들을 PBS로 세척한다. 100도 alcohol에 15분간 방치해서 세포들을 고정시킨다. 세포질내에 있는 vWF를 노출시키기 위하여, 0.5% triton용액을 반응시키고 실온에서 약 10분간 방치한다. 1% 우혈청 알부민으로 수회세척후 vWF에 특이하게 반응하는 항체를 실온에서 1시간동안 반응시킨다. 이때 대조군에는 혈관내피세포가 배양된 용기에 정상 토끼의 혈청글로부린 G(이하 Ig G라 한다.)를 반응시킨다. 1% 우혈청 알부민으로 세척하고, 세포질내의 vWF와 반응한 특이항체는 남고, 대조군의 토끼 Ig G는 세척되어 없어진다. vWF에 특이하게 반응하는 토끼항체에 대하여 fluorescein-conjugated goat Ig G로 다시 반응시킨후 실온에서 30분간 암실에 방치한다. 그다음 수회 부드럽게 세척하고 글리세롤(glycerol)로 마운팅하여 암실에서 형광현미경으로 관찰한다.

(4) 폴리우레탄 Sheet 제작

Polyurethane(pellethane 2368-80A) 20g에 DMAC 100ml을 넣고 잘섞은후 0.3mm 두께 sheet를 만들어서 40도에서 건조시킨후, 불순물을 제거하기 위해서 하루밤동안 methanol에 담아둔다. 한편 sheet에 5% gelatin[w/v]을 coating한다. 이때 crosslinking시키기 위해서 CDI를 사용했다.

(5) 폴리우레탄 인조혈관위에 섬유아세포(fibroblast)배양

이미 제작된 폴리우레탄 sheet와 젤라틴고정 sheet에 media 199를 넣고 여기에 7-10번 계대배양한 섬유아세포(fibroblast)를 3×10^4 cell/cm²의 농도로 넣어 배양을 시킨다. 또한 비교하기 위해서 배양 용기에 섬유아세포(fibroblast)를 배양한다. 세포들이 합류(confluence)되었으면 pH 7.4인 PBS와 Glycine buffer로 세척한다. 1% triton-X-100으로 15분간 방치해서 세포를 녹인다. 핵과 cytoskeleton이 제거된뒤 tris-HCl buffer와 PBS로 세척한다. 이 각기 다른 matrix를 SEM으로 관찰했다.

(6) 세포외물질이 부착된 폴리우레탄 인조혈관위에 혈관내피세포 배양

남은 세포외물질을 기질로하여 그위에 2-6번째 계대배양한 미세혈관내피세포를 3×10^4 cells/cm²의 농도로 seeding을 시킨다. 10일 동안의 미세혈관내피세포의 성장과 부착여부를 조사한다. 비교하기 위해서 섬유아세포의 세포외물질을 입히지 않은 폴리우레탄 위에 혈관내피세포를 같은 조건으로 배양한다.

(7) 두 군의 내피화에 대한 형태학적 검사

성장시킨 세포들을 PBS로 잘 씻은 후, 3% glutaraldehyde가 포함된 reambeusolution으로 최소한 3시간 동안 방치해서 고정시킨 sample들을 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100도 알콜로 dehydrate 시킨후, 다시 Aklone P를 사용해서 수분을 제거시킨후 금을 coating해서 Joel JSH 840 electron microscope을 사용해서 관찰했다.

3. 결 과

3.1 섬유아세포 분리배양

분리된 섬유아세포는 6일 안에 계대배양을 시행했으며 12번까지 계대배양을 시행했다. 이 배양된 섬유아세포를 현미경 관찰한 결과 전형적인 섬유아 세포의 양상을 보였다(그림 1(a)).

3.2 혈관내피세포 분리배양 및 확인

상기 방법에 의해서 성인의 복부대망에서 미세혈관 내피세포를 쉽게 분리 배양할 수 있었다. 처음 배양시 4시간만에 배양플라스크에 부착되었으며 12시간안에 혈관내피세포의 형태학적 특징을 갖추게 되었으며 7일 안에 배양플라스크 전면에 가득 자랐다. 혈관내피세포들은 다각형적인 모양을 하고 있으며 둥글거나 타원형의 핵을 갖고 있다. 혈관내피세포는 평균 5-6번 passage시켰으며 8번 계대배양까지 혈관내피세포의 고유의 성질을 유지하고 있었다. 배양된 내피세포를 factor VIII antigen staining방법과 현미경사진을 통해서 관찰한 결과

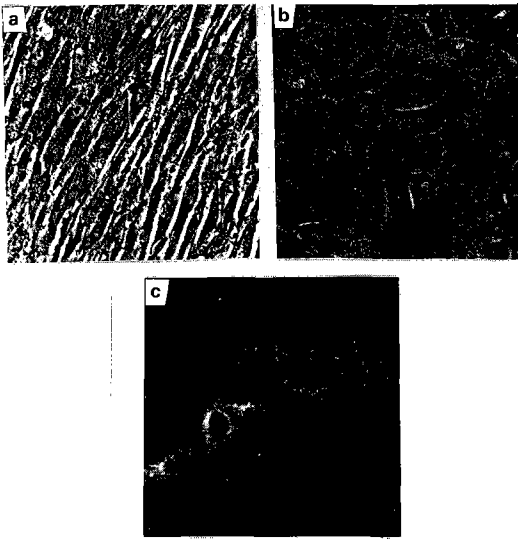


Fig. 1 배양용기 위에서 세포들의 형태 비교와 확인
 a) Fibroblast(배양용기, P10, 3days, 200×)
 b) Endothelial(배양용기, P2, 4days, 200×)
 c) vWF 확인(endothelial, 배양용기)

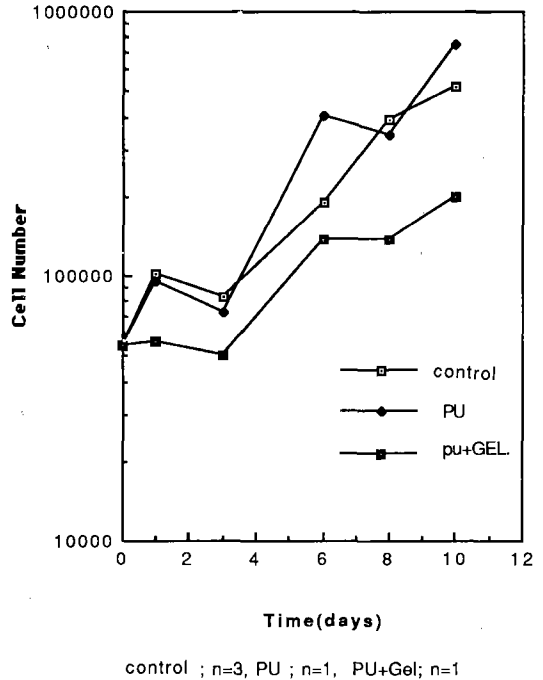


Fig. 3 Fibroblast cell 성장속도 비교(배양용기(control), Pu, Pu+GEL.)

구조적, 기능적인 면에서 큰혈관에서 분리배양한 혈관내피세포와 같은 양상을 보였다(그림 1(b), (c)).

3·3 폴리우레탄 인조혈관위의 섬유아세포 배양

그림 2(a), (b)는 세포들이 함유되었을 때 사진들이며 대조군인 배양플라스크에서의 섬유아세포 배양양상을 비교해볼때 다른 양상은 없었으나 전면적이 섬유아세포로 덮이는 데 걸리는 시간에서 차이가 있었다. 이 섬유아세포가 배양된 폴리우레탄을 triton-X-100을 15분간 처리를 하여 섬유아세포의 핵만 제거하여 폴리우레탄위에 섬유아세포가 생성 분비한 세포외물질의 형태학적으로 관찰한 결과 하나의 기질이 형성됨을 보여준다(그림 2(c), (d)). 또한 각기 다른 물질위에서 섬유아세포의 성장비교는 그림 3에 나타났다. 폴리우레탄과 배양용기 위해서 세포의 성장속도는 거의 비슷하고, gelatin 경우, 성장속도가 느리게 나타난다.

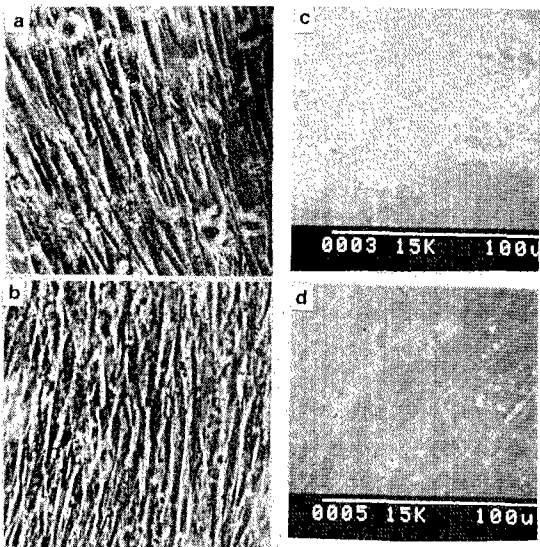


Fig. 2 폴리우레탄과 Gelatin sheets 위에서 Fibroblast 세포의 형태와 그들의 matrix 비교
 a) Fibroblast(Pu, P10, 3days, 200×)
 b) Fibroblast(Pu+Gel., P10, 3days, 200×)
 c) ECM(배양용기, P10)
 d) ECM(Pu+Gel., P10)

3·4 폴리우레탄과 세포외물질이 있는 폴리우레탄에서의 혈관내피세포 배양

그림 4는 섬유아세포에서 생성 분비된 세포외물질이 있는 폴리우레탄과 세포외물질이 없는 폴리우레탄 위에 배양한 혈관내피세포 모양들을 비교하기 위해서 현미경으로 관찰한것을 나타낸다. 배양용기(b)에서 ECM이 없는 곳에서는 혈관내피세포가 없었다. Gelatin이 coating되어진 (d)곳에서 다른 substrate에서 보다 세포의 크기가 크게 나타난다.

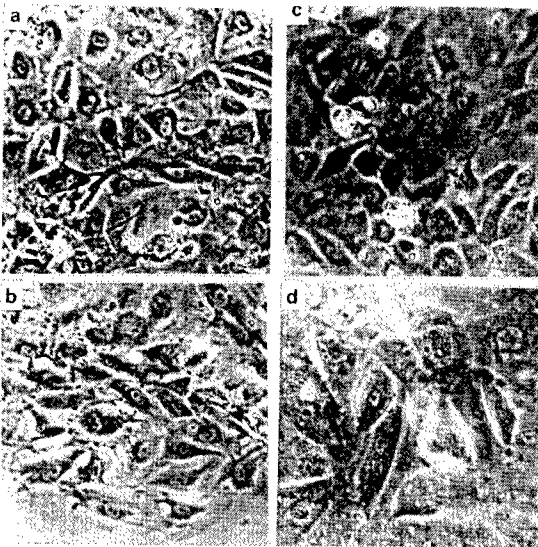


Fig. 4 각기 다른 기질에서 혈관내피세포의 비교

- a) 배양용기
- b) 배양용기+ECM
- c) Pu+ECM
- d) Pu+Gel.+ECM

4. 고 찰

이제까지 많은 사람들이 인공혈관의 적합성 측정과 혈관내피세포를 이식할 경우, 주로 큰혈관인 소나 돼지의 대동맥을 사용했고, 사람의 세포를 이용할 경우에는 쉽게 얻을 수 있고 또한 비교적 배양하기 쉬운, 제대 정맥에서 얻은 세포를 사용해왔다. 그러나 본 실험에서는 성인 복부대동맥 모세혈관

에서 혈관내피세포를 분리 배양하여 사용했다. 인공혈관이 사용되는곳이 태아가 아니므로, 이 세포들이 이식되면 환경에 더 잘 적응할 수 있을 것이다. 통계학적으로 비교 실험하지 않았지만 모세혈관에서 얻은 세포가 더 빨리 성장한다. 이 결과는 다음에 발표하겠다. 배양용기에서의 ECM은 잘 떨어지는것을 발견했다. 배양용기의 표면이 거칠지 않아서 붙어있는 힘이 덜한것 같다. 이 가정을 shear stress의 변화에 따른 반응을 측정해서 증명할 수 있을 것이다.

그림 4에서 기질에 따른 세포의 형태의 변화를 관찰했는데 이 결과는 Warocquier-clorout, R et al¹⁴⁾의 결과와 같다. Gelatin위에서 세포가 크다. 이 결론의 원인을 분석하기 위해서 각기 다른 기질에서의 ECM의 조성들을 알아보아야겠다. 또한 각기 다른 ECM기질위에서 혈관내피세포의 성장속도를 측정하고, 세포들이 합성하는 물질들을 측정하여 어떤 기질위에서 세포의 metabolism이 더 좋은지 관찰하여 폴리우레탄에 Gelatin을 coating 할 필요가 있는지를 결정해야 한다.

5. 결 론

모세혈관세포배양이 성공해서 이 세포들을 사용해서 인공혈관의 endothelialization을 도와줄 수 있게 되었다. 배양용기 위에서 ECM의 부착력이 다른것들보다 약하다. Gelatin coating 한경우 세포의 크기가 큰것 이외에 다른 성질들은 거의 비슷한결과를 얻었다.

Fibroblast가 형성한 세포의 물질이 endothelialization도울 수 있는 기질로 유망하다.

참고문헌

- 1) Hess F, Jerusalem C, Braun B et al : Evaluation of the patency rate of fibrous microvascular polyurethane prosthesis after implanation in the rat aorta. *Microsurgery*. 1983, 4 : 178-181.
- 2) How TV, Clarke RM : The elastic properties of apolyurethane arterial prosthesis. *J Biomech*. 1984. 17 : 597-608.

- 3) Anson Y, Callow AD : New graft materials and current approaches to an acceptable small diameter vascular graft. *TASAIO*. 1988, 34 ; 88-94.
- 4) Callow AD : Current state of vascular graft : *Surg. Clin. NA*. 1982, 62 ; 501-512.
- 5) Callow AD : Endothelial cell seeding : problems and expectation. *J vasc surg*. 1987, 6 : 318-319.
- 6) Anderson JS, Price TM, Hanson SR and Harker LA : In Vitro endothelialization of small caliber vascular grafts. *Surgery* 1987, 101(5) : 577-586.
- 7) Zhu L, Williams WG, Bellhouse B, Pugh Sand Rabinovitch M : Effective endothelialization of polyurethane surface. Response to shear stress and platelet adhesion. *TASAIO*. 1990. 811-816.
- 8) Gimbrone Jr MA : Vascular endothelium in hemostasis and thrombosis, Vol. II, Churchill Livingstone, New York, 1986.
- 9) Pratt KJ, Jarrel BE, Williams SK : Kinetics of endothelial cell surface attachment forces. *J. Vasc. Surg.*, 1988, 7 : 591-599.
- 10) Slimane SB, Guidoin R, Marceau D, Merhi Y, King MW, Sigot-Luizard MF : Characteristics of polyester arterial grafts coated with albumin : The role and importance of cross-linking chemicals. *Eur. Surg Res*. 1988, 20 : 18-28.
- 11) Slimane SB, Guidoin R, Mourad W, Hebert J, Merhi Y, King MW, Sigot-Luizard MF : Polyester arterial grafts impregnated with cross-linked albumin : The rate of degradation of the coating in vivo. *Eur. Surg. Res*. 1988, 20 : 12-17.
- 12) Slimane SB, Guidoin R, Mourad W, Hebert J, Merhi Y, King MW, Sigot-Luizard MF : in vivo Evaluation of polyester arterial grafts coated with albumin : the role and importance of cross-linking agents. *Eur. Surg Res*. 1988, 20, 66-74.
- 13) Kern Pa, Knedler A, Eckel RH. Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue. *J Clin Invest*. 1983, 71 ; 1822-1829.
- 14) Warocquier-clerout, Lee YS, Penhoat J and Sigot-luizard MF. : Comparative behaviour of L-929 fibroblastic and endothelial cell onto crosslinked protein substrates. *Cytotechnology*, 1990, 3 : 259-269.