

세포를 제거한 이종 심장 판막 이식편을 사용한 조직공학 심장 판막첨의 생체 적합성에 대한 연구

이 원 용* · 성 상 현*** · 김 원 곤**

Biocompatibility of Tissue-Engineered Heart Valve Leaflets Based on Acellular Xenografts

Weon Yong Lee, M.D.*, Sang Hyun Sung, M.D.***, Won Gon Kim, M.D.**

Background: Current artificial heart valves have several disadvantages, such as thromboembolism, limited durability, infection, and inability to grow. The solution to these problems would be to develop a tissue-engineered heart valves containing autologous cells. The aim of this study was to optimize the protocol to obtain a porcine acellular matrix and seed goat autologous endothelial cells on it, and to evaluate the biological responses of xenograft and xeno-autograft heart valves in goats. **Material and Method:** Fresh porcine pulmonic valves were treated with one method among 3 representative decellularization protocols (Triton-X, freeze-thawing, and NaCl-SDS). Goat venous endothelial cells were isolated and seeded onto the acellularized xenograft leaflets. Microscopic examinations were done to select the most effective method of decellularizing xenogeneic cells and seeding autologous endothelial cells. Two pulmonic valve leaflets of 6 goats were replaced by acellularized porcine leaflets with or without seeding autologous endothelial cells while on cardiopulmonary bypass. Goats were sacrificed electively at 6 hours, 1 day, 1 week, 1 month, 3 months, and 6 months after operation. Morphologic examinations were done to see the biological responses of replaced valve leaflets. **Result:** The microscopic examinations showed that porcine cells were almost completely removed in the leaflets treated with NaCl-SDS. The seeded endothelial cells were more evenly preserved in NaCl-SDS treatment. All 6 goats survived the operation without complications. The xeno-autografts and xenografts showed the appearance, the remodeling process, and the cellular functions of myofibroblasts, 1 day, 1 month, and 3 months after operation, respectively. They were compatible with the native pulmonary leaflet (control group) except for the increased cellularity at 6 months. The xenografts revealed the new endothelial cell lining at that time. **Conclusion:** Treatment with NaCl-SDS was most effective in obtaining decellularized xenografts and facilitate seeding autologous endothelial cells. The xenografts and xeno-autografts were repopulated with myofibroblasts and endothelial cells *in situ* serially. Both of grafts served as a matrix for a tissue engineered heart valve and developed into autologous tissue for 6 months.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:297-306)

*한림대학교 성심병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Hallym University Sacred Heart Hospital, Gyeonggi-do, Korea

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 심장연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Heart Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

***지방공사 강남병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kangnam General Hospital Public Corporation, Seoul, Korea

†이 논문은 2002년 과학재단 특정기초연구(R01-2002-000-00112-0) 연구비 지원에 의한 것임.

논문접수일 : 2003년 9월 24일, 심사통과일 : 2004년 1월 8일

책임저자 : 김원곤 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-760-2346, (Fax) 02-764-3664, E-mail: wongan@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

Key words: 1. Tissue engineering
2. Xenograft
3. Heart valve material
4. Cell transplantation

서 론

심장 판막 질환은 심각한 유병률과 사망률을 보이는 대표적인 심장 질환으로, 미국에서는 해마다 10,000명이 심장 판막 질환으로 사망하고 있으며, 매년 60,000명이 판막 치환 수술을 받고 있다[1]. 현존하는 인공 판막은 기계 판막과 조직 판막으로 나누어진다.

기계 판막은 혈색전증 발생과 항응고제 복용이라는 위험에 환자를 노출시키며, 조직 판막은 섬유화 및 칼슘의 침착으로 내구성이 떨어져, 일정 기간 경과 후 재치환을 해야 하며, 두 판막 모두 감염에 대한 저항력과 성장능이 결여되어 있다.

냉동 보관 동종 이식편(cryopreserved homograft)의 경우 생존하는 세포들을 포함하고 있을 가능성은 있지만, 공여 판막에 수적 제한이 있고, 면역 반응이 나타날 수 있으며, 내구성의 측면에서도 일부 단점이 지적되어 장기 관찰을 요하는 상태이다.

판막의 성능 및 재질에서 팔복할 만한 발전이 있어 왔음에도 불구하고, 기존의 인공 판막은 이상적인 판막과는 아직 거리가 있어, 최근 조직공학 기법을 이용하여 자가 조직으로 이루어진, 이상적인 심장 판막을 개발하려는 시도가 이루어지고 있다. 조직 공학이란 생물학적 또는 생분해성 합성 지지체(scaffold)에 살아있는 자가 세포를 파종하여 완전한 생체 적합성을 가진 조직 대체물을 만드는 기법을 말한다[2].

심장 판막 개발과 관련된 조직공학 기법은 크게 두 가지로 나누어진다. 첫째, 생분해성 합성 물질을 일시적인 지지체로 이용하면서, 자가 혈관에서 분리한 근섬유아세포와 내피 세포를 파종하여 인공 판막을 제작하는 방법과, 둘째, 이종 판막을 지지체로 하여, 이종 세포 성분을 제거해 면역 반응의 유인을 없앤 뒤, 자가 혈관에서 분리한 내피 세포를 파종하여 혈액 적합성과 생체 적합성을 해결하려는 방법(이종-자가 이식편을 이용한 조직공학적 방법) 등이다[3]. 이 중 첫째 방법은 다양한 동물 실험 등

비교적 구체적인 연구가 진행되고 있으나, 지지체의 유연성과 생분해 기간, 3차원 모델의 지지체 확립, 3차원 모델에서 세포 파종 등과 관련하여 어려움을 겪고 있고, 둘째 방법의 경우 그 개념의 도입도 상대적으로 최근일 뿐 아니라 아직까지 동물 실험에 이르는 구체적인 연구 결과가 별로 없다.

따라서 본 연구에서는 이종 판막을 지지체로 하여 이종 세포 제거 후 자가 내피 세포를 파종한 이종-자가 이식편으로 조직공학 심장 판막을 만들려는 시도로, 먼저 이종 판막첨에서 이종 세포를 균일하게 제거할 수 있는 방법과 자가 내피 세포를 분리, 배양하여 파종하는 방법을 확립하고자 하였다. 또한 적절한 방법으로 이종 세포를 제거한 후, 자가 내피 세포를 파종하여 만든 이종-자가 이식편과 내피 세포를 파종하지 않은 이종 이식편을 체내 이식하여 생체 적합성을 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1) 이종 세포 제거 방법

35 kg의 돼지 두 마리를 희생시키고, 각각에서 3개의 폐동맥 판막첨을 채취하여, 즉시 보관 용액에 저장하고, 두 쌍의 3개의 판막첨을 다음의 과정 중 한 과정으로 각각 처리한 후, 세포 제거 정도를 비교하였다.

(1) Triton-X 처리: 판막첨을 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후, 37°C, 5% CO₂/95% 대기의 조건에서 0.02% EDTA와 RNase A (20 pg/mL), DNase (0.2 mg/mL), 및 1% tertioctylphenylpolyoxy-ethylene (Triton-X, Biorad, Germany) 용액이 첨가된 PBS에 넣고 24시간 보관하였다.

판막첨을 PBS로 수차례 세척 후, 4°C에서 사용할 때까지 보관하였다[4,5].

(2) Freeze-thawing 처리: 판막첨을 PBS로 세척하고, PBS에 넣은 채로 영하 20°C의 냉장고에 4시간 동안 냉동(freeze) 보관 후, 실온에서 해동시켰다(thawing). 위의 냉동-해동 과정을 3번 반복하고서, 7% Dextran- 6% Sucrose- 1

1mL EDTA 용액에 넣고 영하 70°C에서 사용할 때까지 보관하였다[6,7].

(3) NaCl-SDS 방법: 판막첨을 PBS로 세척하고, 37°C의 0.5 M NaCl 용액에 넣고, 밤새 37°C 항온기에서 휘저으면서 보관하였다. 다시 PBS로 세척 후 0.5% SDS (Sodium dodecyl sulfate, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) 용액에 넣고 37°C 항온기에서 휘저으면서 30분간 보관하였다. 판막첨을 다량의 PBS로 세척하고, 7% Dextran-6% Sucrose-1 mM EDTA 용액에서 영하 70°C로 냉동시켜 사용 시까지 보관하였다[8,9].

2) 자가 내피 세포의 분리 및 파종 방법

염소를 Ketamine으로 마취 유도하고, 목 부위의 체모를 제거하고, 기도 내 삽관을 시행하였다. Enflurane으로 마취하면서 Povidone iodine으로 소독하고, 소독된 포로 감쌌다. 경정맥 주변에 5 cm 정도의 피부를 절개하고 주변을 박리하여 경정맥을 3 cm 가량 채취한 후, 절개 부위를 봉합하고, 염소가 마취에서 회복되면 사육장으로 돌려 보내 다음 단계의 생체 실험에 사용하였다.

채취한 경정맥은 0.2% collagenase (Worthington Biomedical company, 192 unit/mg)를 포함한 용액에서 37°C를 유지하면서 20분간 보존하였다. 이 때 생긴 내피 세포 부유물을 250 g에서 10분간 원심 분리한 후, 10 mL 조직 배양 배지에 펼쳐 놓았다. 이후 내피 세포 부유물을 표면적 75 cm²의 polystyrene 배양 용기에 넣어 37°C, 5% CO₂의 조건에서 정온 보관하였다. 배양액은 2, 3일 간격으로 갈아주었다.

내피 세포가 자라, 군락을 형성하면 0.05% trypsin이 첨가된 0.53 mM EDTA로 분산시켰고, 세포 부유물을 다시 태양액에 뿌린 후, 판막첨에 입힐 수 있을 정도로 충분한 양이 될 때까지 계속 배양하였다(Fig. 1).

배양된 내피 세포가 목적하는 내피 세포임을 확인하기 위하여 면역형광법 방식으로 factor VIII 관련된 항원을 감지하였다. 또한 내피 세포의 피복 여부를 주사 및 전파 전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 2).

세포 파종을 위해 판막첨의 한 면에 2백만 개의 배양된 내피 세포를 파종하고 3일간 배양한 후, 판막첨의 다른 면에 역시 2백만 개의 내피 세포를 파종하고 3일간 배양하였다[10].

3) 동물 실험

35 kg의 돼지 6마리를 희생시키고, 각각에서 폐동맥 판막첨 2개를 적출하였고, 적출된 판막첨에서 NaCl-SDS 방



Fig. 1. Endothelial cells from the vein of goats were grown to confluence, forming a typical cobblestone-shaped monolayer at day 5 (magnification, $\times 200$).

법으로 이종 세포를 제거하였다. 그중 6개의 판막첨을 이종 세포를 제거한 이종 이식편으로 준비하고, 다른 6개의 판막첨은 이종 세포 제거 후 염소의 자가 내피 세포를 파종하여 이종-자가 이식편으로 준비하였다.

35 kg의 염소 6마리를 Ketamine으로 마취 유도 후 체모를 제거하고 기도 내 삽관을 하였다. 마취제는 Enflurane을 사용하고, 구강을 통하여 위액 배출을 위한 삽관을 하였다. Povidone iodine으로 소독하고 소독 방포를 도배하고, 좌측 개흉술을 시행하였다. 제4늑간으로 접근하여 심낭 절개 후, Heparin (300 IU/kg)을 주사하였다. 하행대동맥과 우심방이를 통하여 삽관하고, 막성 산화기로 체외순환을 시행하였다. 체온은 36°C를 유지하면서 폐동맥을 절개하고, 폐동맥 판막첨 2개를 절제하였다. 절제된 판막첨과 크기를 맞춰 이종 이식편과 이종-자가 이식편을 재단하여 치환하였다. 판막첨 치환이 끝나면, 절개된 폐동맥을 봉합하고, 체외순환을 정지하였다.

Protamine (3 mg/kg)을 주사하고, 하행대동맥과 우심방이에 거치되었던 캐뉼라를 제거하였다.

출혈 부위를 지혈하고 흉관 삽입 후, 절개 부위를 봉합하였다. 염소가 마취에서 깨어나면 2~3시간 정도 관찰한 후, 흉관을 제거하고 사육장으로 보냈다. 3일간 항생제를 투여하였고, 항응고제는 투여하지 않았다.

6마리의 염소를 수술 6시간, 24시간, 1주, 1개월, 3개월, 그리고 6개월 후, 한 마리씩 희생시키고, 폐동맥 판막을 적출하여, 육안적, 현미경적으로 관찰하였다.

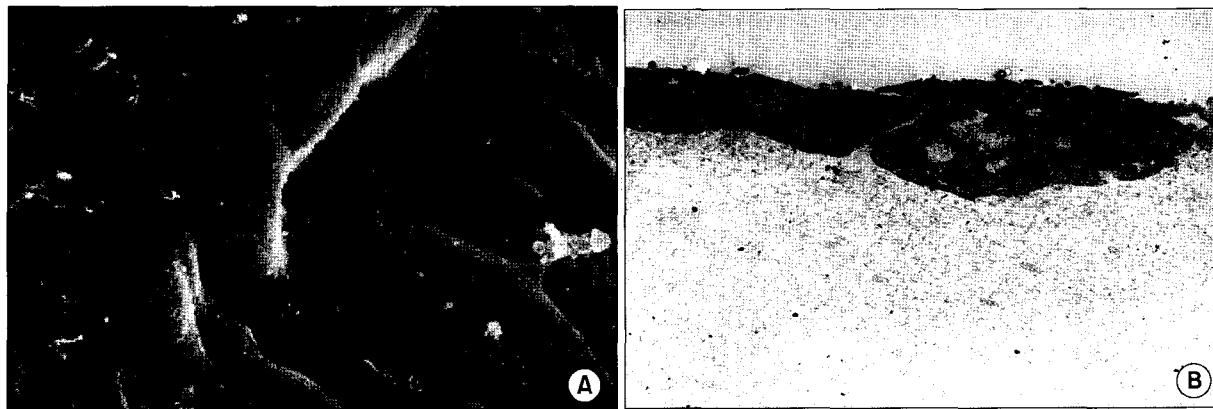


Fig. 2. Scanning (A) and Transmission (B) electron microscopic finding of the endothelial cell seeded leaflet (magnification, $\times 1,500$).

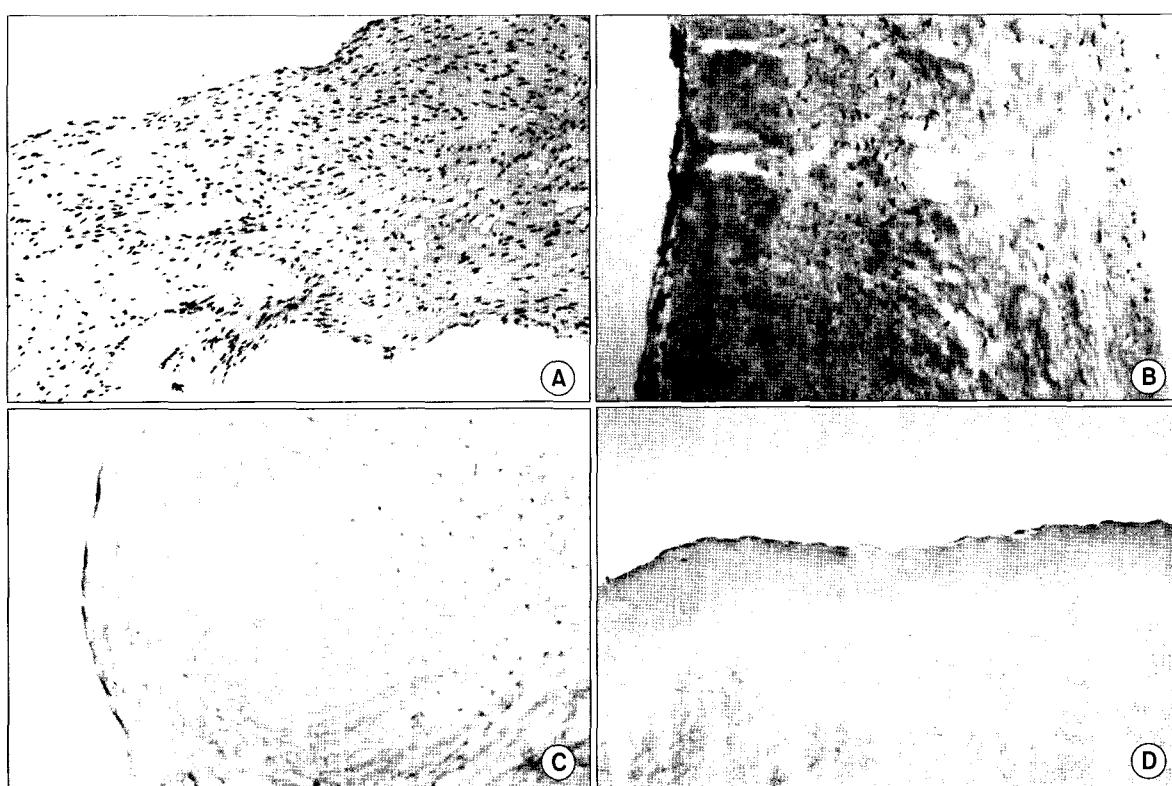


Fig. 3. Microscopic findings of the normal pulmonary leaflet (A), the leaflet treated by Triton-X (B), by freeze-thawing (C), and by NaCl-SDS (D). The cells are partly present in leaflets treated by Triton-X, and freeze-thawing. They are almost completely removed by NaCl-SDS method (hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

결과

1) 이종 세포의 제거

Hematoxylin-eosin (H-E) 염색상 NaCl-SDS 처리한 이종 판막첨에서는 세포가 완전히 제거되었으나, 다른 두 가지

처리를 한 이종 판막첨에서는 세포가 일부 남아 있었다 (Fig. 3).

Masson trichrome 염색에서 세포가 제거되어 콜라겐 사 이에 공간이 관찰되었고, 콜라겐 구조는 물결 모양을 형성하고 있었다.

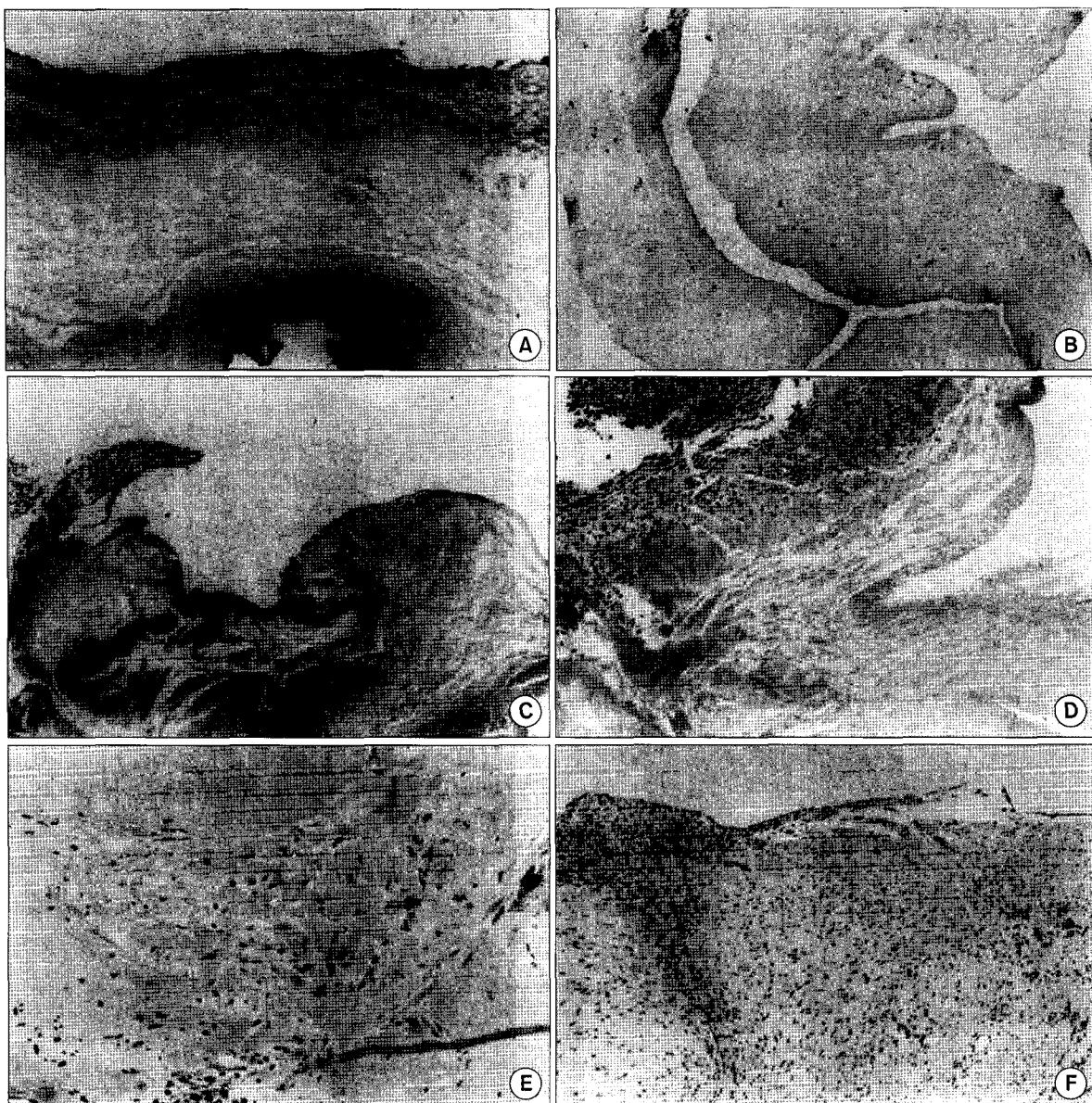


Fig. 4. Microscopic finding of xeno-autografts: 6 hours after operation (A), microscopic thrombi were seen. Fibroblasts and neutrophils were found at 1 day (B). Fibroblasts appeared around anastomotic sites at 1 week (C). Neovessles were formed and lymphocytes replaced neutrophils at 1 month (D). Macrophages and hemosiderin pigments appeared and fibroblasts proliferated up to the center of leaflets at 3 months (E). Cellularity was increased at 6 months (F) (hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

2) 자가 내피 세포의 파종

Masson trichrome 염색 후 관찰 시, NaCl-SDS 방법으로 세포를 제거한 돼지 판막에 파종된 염소의 내피 세포는 판막침 표면 전체에 걸쳐 비교적 잘 보존되어 있었으나, freeze-thawing 방법으로 세포를 제거한 후, 염소의 내피

세포를 파종한 판막침에서는 표면 일부에서 내피 세포가 유실되었다. 전파(transmission) 전자현미경으로 보면 NaCl-SDS 처리한 판막침에서는 파종된 염소의 내피 세포가 잘 보존되어 있었고, 세포가 제거된 세포간질이 관찰되었고, 콜라겐 구조가 잘 보존되어 있었다.

Freeze-thawing 처리한 판막침에서는 일부에서 핵파괴

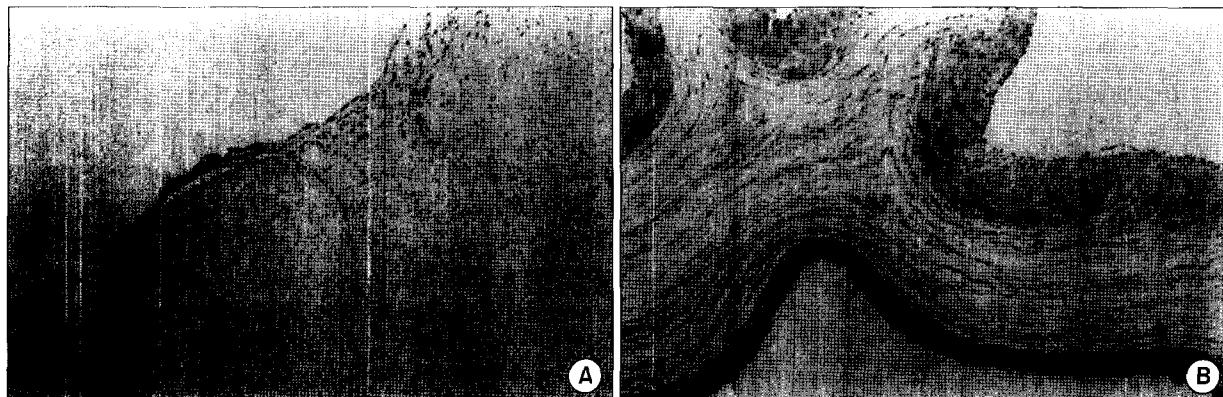


Fig. 5. Microscopic finding of xenografts (A), and native pulmonary leaflets (B) 6 months after operation: Cellularity was increased in xenografts compared to native leaflets. Endothelial cell linings were seen in both of leaflets (hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

(karyorrhexis)가 관찰되었으며, Triton-X 처리한 판막첨에서는 세포 간질 일부가 변성되었고, 파종된 내피 세포가 죽어있는 것이 관찰되었다.

결국 NaCl-SDS 처리한 판막첨에서 다른 두 가지 처리한 판막첨에서보다, 이종 세포인 돼지 세포가 잘 재생되었을 뿐 아니라, 콜라겐과 세포 간질이 잘 보존되어 있었고, 파종된 염소의 내피 세포도 전 표면에 걸쳐 잘 유지되고 있었다.

3) 이종-자가 이식편의 생체내 반응

심장 초음파 검사(SA-8800, Medison Co. Ltd., Seoul, Korea) 결과, 경미한 폐동맥 판막 폐쇄 부전이 관찰되었으나, 6마리 염소는 모두 합병증 없이 예정된 기간 동안 생존하였다.

염소를 정해진 시기에 회생시키고, 폐동맥 판막을 적출하여 이식한 판막첨을 대조군 판막첨과 비교하였다. 육안적으로 혈전의 형성은 관찰되지 않았고, 대조군에 비해 이종 이식편과 이종-자가 이식편 모두 판엽이 두꺼워져 있었다. 수술 6시간 후, 이종-자가 이식편 판막첨에서 육안으로는 관찰할 수 없었던 미세 혈전이 관찰되었다. 수술 1일 후, 이종-자가 이식편에서는 피복된 내피 세포가 보존되어 있었고, 호중구와 섬유아세포가 관찰되었다. 이종 이식편에서는 호중구의 수가 더 많았으며, 내피 세포는 관찰되지 않았다. 수술 1주 후, 이종-자가 이식편에서 역시 호중구가 관찰되었고, 판막첨의 접합부에서 섬유아세포가 관찰되었으며, 이종 이식편에서도 비슷한 소견이 관찰되었고, 내피 세포화(neoendothelialization)가 시작되고 있었다. 수술 1개월 후, 이종-자가 이식편에서는 호중구가

없어지면서, 판막첨 내에서 새로운 혈관이 형성되기 시작하였고, 이종 이식편에서는 미세 혈전이 관찰되었고, 역시 판막첨 내 새로운 혈관이 형성되고 있었으며, 두 판막첨 모두에서 임파구와 섬유아세포가 많아지면서 개형 과정이 진행되고 있었다.

수술 3개월 후, 두 이식편 모두에서 판막첨의 중심부까지 섬유아세포의 증식이 이루어졌고, 해모시데린 색소와 대식세포가 관찰되는 것으로 미루어 판막첨에 증식한 섬유아세포가 온전한 세포의 기능을 수행하고 있음을 알 수 있었다. 수술 6개월 후, 두 이식편 모두 섬유아세포의 증식이 활발하여 대조군에 비해 섬유아세포의 밀도가 더 높았고, 이종-자가 이식편에서는 물론 내피 세포를 파종하지 않은 이종 이식편에서도 내피 세포가 잘 피복되어 있었다 (Fig. 4, 5).

고 찰

기존의 인공 심장 판막은 기계 판막, 조직 판막과 동종 이식편으로 나눌 수 있다. 기계 판막은 혈전 형성과 항응고제의 복용과 관련하여, 이종 조직 판막은 내구성과 관련하여 문제점을 갖고 있다. 두 판막 모두 감염의 위험성이 있으며, 성장성이 결여되어 있다. 이종 판막은 생체 적합성 측면에서 기계 판막에 비해 우수하나, 수혜자에 대한 면역 반응을 줄이고, 수혜자의 분해 효소로부터 판막을 보존하기 위하여 글루타르알데하이드를 사용하여 세포 조직과 세포 외 조직의 교차 결합을 일으킨다. 그 결과 판막 내 세포의 생존성이 없어지고, 수혜자 세포의 침투를 불가능하게 하여 살아 있는 세포 또는 조직으로서의

의 할을 수행할 수 없어 판막의 개형, 치유와 성장 등이 이뤄지지 않는다[11,12].

또한 판막첨이나 도판이 경직되어 판막첨의 움직임에 제한이 생기고, 이로 인해 과도한 스트레스가 가해져 판막첨이 변성되고, 석회화 과정이 촉진되어 결국은 판막의 기능 부전으로 이어진다[13].

동종 이식편 조직 판막의 경우 살아 있는 세포의 영향으로 이러한 단점을 해결하여 줄 것으로 기대되었으나, 오히려 면역 반응을 일으켜 내구성과 성장성에 제한을 가해 아직도 연구 관찰을 요하는 상태이다[14].

최근 조직공학 기법을 이용하여 자가 조직을 만들려는 시도가 이루어지고 있는데, 자가 조직으로 이루어진 심장 판막은 기존의 인공 판막이 갖고 있는 단점을 극복할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

조직공학 기법을 이용한 심장 판막을 개발하기 위한 시도는 지지체에 따라 두 가지로 나누어진다.

첫째는 생분해가 가능한 합성물질을 지지체로 하여 수혜자의 근섬유아세포와 내피 세포를 파종하여 판막을 만드는 것이고, 둘째는 이종 조직 판막을 지지체로 하여, 이종 내피 세포와 근섬유아세포를 제거하고, 수혜자의 내피 세포를 파종하는 것이다.

첫째 방법은 적절한 시기에 생분해되는, 3차원 구조의 지지체의 개발이 관건이다. Stock 등[15]은 지지체가 생체 조직처럼 유연성을 갖추지 못하고 경직되어 3차원 구조의 판막 도판을 개발하는 데 어려움이 있으며, 또한 자가 세포가 침투하여 새로운 세포 간질을 형성하면서 지지체는 생분해되어야 하는데, 분해 시기가 적절하지 않으면 성장 속에 문제가 생긴다고 하였다. 따라서 최근 기존의 poly-glycolic acid (PGA)와 polylactic acid (PLA) 대신 polyhydroxyoctanoate (PHO)와 PGA의 혼성중합체를 사용하여 경직성 문제를 해결하려 하고 있으나, PHO는 분해되는 기간이 52주가 넘어 성장성에 문제가 생기고 있다.

따라서 합성 지지체의 유연성과 적정 생분해 기간과 관련된 문제가 향후 해결해야 할 과제이다[16]. 또한 3차원 모델에서 세포를 파종하는 데 따르는 어려움 등이 문제점으로 지적되고 있다[17].

둘째 방법에서는 지지체로, 돼지 같이 사람과 유사한 하부학적 심혈관 구조를 가진 동물의 판막을 이용한다. 먼저 소정의 세포 제거 처리를 통해 조직 내 이종 세포를 완전히 제거한 다음, 판막 수혜자의 혈관에서 채취한 내피 세포를 회복하여 완전한 자가 조직으로 기능하게 하고자 한다.

이 때 이종 세포의 완벽한 제거와 자가 세포의 파종과 유지가 관건이다.

따라서 이종 세포의 제거와 자가 세포의 파종과 관련된 방법의 개발과 얻어진 이종-자가 이식편의 생체 적합성에 대한 연구가 필수적이다.

이종 세포를 제거하기 위하여 Bader 등[18]은 Triton-X를 사용하여 좋은 결과를 얻었지만, 본 연구에서는 Triton-X 처리로는 만족할 만한 결과를 얻을 수 없었다. 이는 아마도 RNase와 DNase의 사용에 있어 문제점이 있는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 이종 세포 제거 방법으로 인공 피부의 개발에 사용된 freeze-thawing, NaCl-SDS 등 두 가지 방법을 원용하였다.

이 중 NaCl-SDS 방법은 두 차례 실험에서 판막첨의 전 층에 걸쳐 세포를 완전히 제거하였으나, 다른 두 가지 방법은 세포를 완전히 제거하는 데 실패하였다.

뿐만 아니라, NaCl-SDS 방법은 자가 내피 세포의 파종과 보존에서도 다른 두 방법보다 좋은 결과를 보였다. 본 연구에서는 NaCl-SDS 처리로 얻어진 이종 이식편과 이종-자가 이식편의 생체 적합성을 살펴보기 위해 폐동맥 판막 첨을 치환하였는데, 폐순환은 체순환과 달리 압력에 대한 노출이 심하지 않아, 치환된 판막첨에 가해지는 스트레스가 적어 판막의 기능에 이상이 생겨도 실험 동물이 잘 견딜 수 있는 장점이 있다. 판막 개발의 초기 단계 실험이 성공적으로 이루어지기 위해서는 실험 동물의 단기 또는 중기 생존이 필수적이라 판단되어, 폐동맥 판막을 치환하였다.

현미경 소견을 종합해 보면, 판막첨 치환 수술 후 24시간 만에 섬유아세포와 호중구가 관찰되었는데, 호중구의 존재는 급성 염증 반응으로 이해하고, 호중구의 수가 자가 내피 세포가 파종되지 않은 판막첨에서 더 많았다는 것은 내피 세포가 회복되어 있지 않아 염증 반응을 더 일으키는 것으로 해석하였다.

1주 후, 섬유아세포가 판막첨의 접합부에서 많이 관찰되었는데, 일반적으로 섬유아세포는 폐동맥이나 판막 등 인접 조직에서 들어와 증식하거나, 혈류에서 확산을 통하여 직접 들어올 수 있다. 본 연구에서 수술 접합부에서 섬유아세포가 많이 관찰된 것은 섬유아세포의 근원이 염소의 폐동맥과 판막첨 등 주변 조직일 가능성을 암시한다. 또한 내피 세포를 파종하지 않은 판막첨에서도 이 때부터 내피 세포가 관찰되기 시작하여, 새로운 내피 세포 형성 과정이 시작되고 있음을 알 수 있었다. 1개월 후, 호중구가 임파구로 대치되었고, 섬유아세포의 수가 증가하였으

며, 대조군의 판막첨에서는 볼 수 없는 혈관 조직이 이식 편 판막첨 내에서 발견되었다. 이는 급성 염증 반응이 만성 염증 반응으로 변화하면서, 개형 과정이 이루어지고 있음을 의미한다.

3개월 후, 섬유아세포가 판막첨의 중심부에서도 관찰되었고, 대식세포와 해모시데린 색소가 관찰되었는데, 이는 섬유아세포와 세포 간질이 온전한 세포 기능을 수행하고 있음을 의미하는 것으로 해석하였다. 6개월 후, 섬유아세포의 증식이 활발히 이루어져, 대조군으로 비교한 판막첨 보다 세포 밀도가 높았다. 이는 육안적으로 두 이식편으로 치환한 판막첨들이 대조군보다 두꺼워져 있었던 것과 일치하는 것으로 세포의 생성과 파괴 사이의 균형이 깨진 것으로 일시적인 현상인지, 섬유성 위축 등 퇴행성 변화로 진행할 것인지 아직 확실하지 않다.

Stock 등은 생분해성 합성 지지체에 자가 세포를 파종한 폐동맥 판막 도관으로 양의 폐동맥을 치환한 후 세포 간질 내 콜라겐 등의 단백질이 증가함을 발견하였다. 세포간질 내 단백질의 대사는 일련의 효소에 의해 이루어지는데, 이러한 효소 간의 불균형 때문으로 추정하였다.

인체 내에서 혈전 형성을 막기 위해서는 혈액 접촉면에 내피 세포가 피복되어 있어야 한다는 것이 지금까지의 정설이다. 따라서 이종 세포가 제거된 지지체의 개발에 있어, 자가 내피 세포의 파종이 완전히 이루어져야 함이 필수적이라 할 수 있다 그러나 본 연구에서 내피 세포의 파종 없이 치환한 이종 이식편 판막첨에서도 1주일 후부터 내피 세포가 발견되기 시작하여 6개월 후에는 판막첨을 거의 완전히 피복하고 있었다는 것은 수술 6개월 이내 초기에 혈전이 형성되는 것을 막을 수 있다면 자가 내피 세포를 파종하지 않아도 된다는 것으로 그 의미는 지대하다.

본 연구에서는 항응고제를 투여하지 않았음에도 육안적으로 혈전을 발견할 수 없었다. 따라서 6개월 정도 항응고제 복용으로 혈전을 예방하면, 내피 세포를 파종하지 않고, 이종 세포만 제거하여도 된다는 가정이 성립된다. 그러나 본 연구의 연구 기간은 최장 6개월 정도로 짧아 결론을 내리기에는 부족한 감이 있다.

Allaire 등[19]은 대동맥을 이종 이식편으로 치환 후 세포 간질 내 탄력소가 분해되면서 동맥류성 확장을 보이는 것을 관찰하고, 이를 이종간 면역 반응으로 해석하였다. 또 Cebotari 등[20]은 공여자의 세포를 제거하고, 내피 세포를 파종하지 않는 경우 혈관 내막의 비후, 콜라겐의 무질서한 배열, 평활근 세포의 비후 등이 발생한다고 하였다.

또한 본 연구에서는 내피 세포의 파종 여부와 관계없이

섬유아세포의 비후가 관찰되었는데, 섬유아세포의 비후가 퇴행성 변화와 관련되어 동맥류성 확장이나 섬유성 위축 등을 일으킬지에 대해서는 향후 장기간에 걸친 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 판막첨이라는 2차원 구조를 이용하였으나, 향후 폐동맥 판막 도관 등 3차원 구조에 대한 연구도 필요한 실정이다.

결 론

본 연구에서는 조직공학 기법 중 지지체로 이종 판막을 사용하는 방법을 채택하여, 이종 세포 제거 방법과 이종 세포 제거 후 자가 내피 세포 파종 방법을 확정하였고, 얻어진 이종 이식편과 이종-자가 이식편의 생체 내 반응을 살펴보았다.

이종 세포를 제거하기 위하여 Triton-X, freeze-thawing, NaCl-SDS의 3가지 방법을 비교하였는데, NaCl-SDS 처리를 하였을 때 세포 제거가 가장 완전하였다. 세포가 제거된 판막첨에 동종의 내피 세포를 파종하였는데, 역시 NaCl-SDS로 처리한 판막첨에서 내피 세포가 가장 잘 보존되어 있었다.

NaCl-SDS 처리로 이종 세포를 제거한 이종 이식편과 동종 내피 세포를 파종한 이종-자가 이식편을 이용한 생체 실험에서 두 이식편 모두 6개월간 지지체의 역할을 수행하면서 자가 세포의 증식을 가능하게 하였고, 자가 조직으로 발전할 가능성을 보여 주었다. 또 내피 세포를 파종하지 않은 이종 이식편에서도 6개월 후에는 내피 세포가 완전히 피복되어 있었다. 그러나 인체에 사용할 조직공학 심장 판막을 개발하기 위해서는 장기간에 걸쳐 혈전 형성과 퇴행성 변화 등에 대한 연구가 이루어져야 할 것이며, 폐순환에서의 실험뿐 아니라, 압력 부하가 심한 체순환에서의 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Breuer CK, Shinoka T, Tanel RE, et al. *Tissue engineering lamb heart valve leaflets*. Biotech Bioeng 1996;50:562-7.
- Vacanti CA, Vacanti JP. *Principles of tissue engineering*. 1st ed. Austin, Texas: R.G.Landes co. 1997;619-31.
- Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. *Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg 1998; 14:279-84.
- Takami Y, Matsuda T, Yoshitake M, et al. *Dispase/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute*. Burns 1996;22:

- 182-90.
- 5. Walter RJ, Jennings LJ, Matsuda T, et al. *Dispase/Triton treated acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats*. Curr Surg 1997;54:371-4.
 - 6. Grillo HC, McKhann CF. *The acceptance and evolution of dermal homografts freed of viable cells*. Transplantation 1964; 2:48-59.
 - 7. Fang CH, Robb EC, Yu GS, et al. *Observation on stability and contraction of composite skin grafts: xenodermis or allodermis with an isograft onlay*. J Burn Care Rehab 1990; 11:538-42.
 - 8. Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, et al. *Transplanted acellular allograft dermal matrix: Potential for the reconstruction of viable dermis*. Transplantation 1995;60:1-9.
 - 9. Walter RJ, Reyes HM, Walter JM. *Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods*. Burns 1998;24:104-13.
 - 10. Kim WG, Park JK, Park YN, et al. *Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method for seeding autologous cells on scaffolds*. Int J Artif Organs 2000;23:624-8.
 - 11. Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, et al. *Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1969;58:467-83.
 - 12. Grimm M, Eybl E, Grabenwoger M, et al. *Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium*. J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102:195-201.
 - 13. Goldstein G, Clarke DR, Walsh SP, et al. *Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft*. Ann Thorac Surg 2000;70:1962-9.
 - 14. Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, et al. *Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering*. J Thorac Cardiovasc Surg 1998;115:536-46.
 - 15. Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, et al. *Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation*. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;119:732-40.
 - 16. Shinoka T, Ma PX, Mayer JE, Jr., et al. *Tissue-engineered heart valvesautologous valve leaflet replacement study in a lamb model*. Circulation 1996;94[suppl II]:164-8.
 - 17. Kim WG, Cho SK, Lee TY, et al. *Tissue-engineered heart valve leaflets: An animal study*. Int J Artif Organs 2001; 24:642-8.
 - 18. Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. *Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg 1998; 14:279-84.
 - 19. Allaire E, Guettier C, Michel JB, et al. *Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats*. J Vasc Surg 1994;19:446-56.
 - 20. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, et al. *Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix*. Circulation 2002;106[suppl I]:63-8.

=국문 초록=

배경: 기존의 인공 심장 판막은 혈전 형성, 내구성, 세균 감염에 대한 저항력, 성장성 등에서 문제점을 가지고 있다. 최근 이상적인 심장 판막을 개발하기 위한 노력으로 조직공학 기법을 이용하고 있다. 본 연구는 이종 판막을 지지체로 하여 이종 세포 제거 후 자가 세포를 과종한 조직공학 심장 판막을 개발하기 위하여 이종 세포 제거와 자가 세포 과종 방법을 비교하였고, 얻어진 심장 판막첨의 생체 적합성을 살펴보았다. **대상 및 방법:** 이종 지지체로 두 마리의 돼지에서 각각 3개의 폐동맥 판막첨을 채취하여, Triton-X, freeze-thawing, NaCl-SDS 등 세 방법 중 하나로, 각각 두 개의 판막첨을 처리하고, 세포 제거 정도를 비교하였다. 염소의 경정맥에서 분리한 내피 세포를 배양하여, 상기한 방법 중 하나로 이종 세포가 제거된 돼지 판막첨에 과종한 후, 내피 세포의 보존 상태를 비교하였다. 생체 실험을 위해, 6마리 돼지에서 각각 2개의 폐동맥 판막첨을 채취해 이종 세포를 제거하였고, 6개의 판막첨은 염소의 내피 세포를 과종하고(이종-자가 이식편), 다른 6개의 판막첨은 내피 세포를 과종않고(이종 이식편) 6마리 염소의 폐동맥 판막첨 두 개와 치환하였다. 치환되지 않은 하나의 판막첨을 대조군으로 비교하였다. 염소는 수술 6시간, 24시간, 1주일, 1개월, 3개월, 그리고 6개월 후 희생시키고 폐동맥 판막첨을 채취하여 분석하였다. 결과: Triton-X와 freeze-thawing 처리한 판막첨에서는 이종 세포가 남아 있었으나, NaCl-SDS 처리한 판막첨에서는 세포가 완전히 제거되었고, 이종 세포 제거 후 과종한 자가 내피 세포도 NaCl-SDS 처리한 판막첨에서 다른 두 방법으로 처리한 판막첨에 비해 잘 보존되어 있었다. 6마리 염소는 혈색전증의 소견 없이 예정된 기간 동안 모두 생존하였으며, 희생 후 적출한 이종 이식편과 이종-자가 이식편 모두 대조군 보다 두꺼워져 있었다. 두 이식편 모두 24시간 후부터 섬유아세포의 증식이 관찰되었고, 1개월 후 세포의 개형(remodeling) 과정을 볼 수 있었고, 3개월 후 세포 기능을 수행하였고, 6개월 후 대조군보다 세포수가 더 많이 증가하였다. 과종한 내피 세포는 잘 보존되어 있었고, 이종 이식편도 6개월 후에는 내피 세포가 피복되어 있었다. 결론: 이종 세포의 제거와 자가 세포의 과종에 가장 적합한 방법은 NaCl-SDS 처리였다. 동물 실험에서 이종 이식편과 이종-자가 이식편 모두 6개월간 지지체의 역할을 수행하면서, 자가 세포의 증식을 가능하게 하였고, 자가 조직으로 발전할 가능성을 보여 주었다.

- 중심 단어 : 1. 조직공학
2. 이종-자가 이식편
3. 이종 세포의 제거
4. 내피 세포의 과종
5. 자가 조직