

기계적 자극이 다층 구조의 나노파이버 지지체의 평활근 세포에 미치는 영향

신지원¹, 김동화^{1,2}, 허수진¹, 김수향², 김영직³, 신정욱^{1,2,4}

¹인제대학교 의용공학과, ²인제대학교 BK21 사업단,
³부산 가톨릭 대학교 치기공학과, ⁴인제대학교 의생명공학원 FIRST 연구단

Effects of the Mechanical Stretch on Aligned Multi-Layered Nanofibrous Scaffolds Seeded with Smooth Muscle Cells

Ji Won Shin¹, Dong Hwa Kim^{1,2}, Su Jin Heo¹, Su Hyang Kim², Young Jick Kim³, Jung-Woog Shin^{1,2,4}

¹Department of Biomedical Engineering, Inje University,

²Team of BK21, Inje University,

³Department of Dental Laboratory Science, Collage of Health Science, Catholic University,

⁴FIRST Research Group, Institute of Biomedical Engineering, Inje University

(Received November 29, 2007. Accepted December 10, 2007)

Abstract

The object of this study is to investigate the effects of intermittent cyclic stretching on the smooth muscle cells (SMCs) seeded onto aligned multi-layered fibrous scaffold. To make multi-layered fibrous scaffold, polyurethane (PU) and poly(ethylene oxide) (PEO) were electrospun alternatively, then were immersed into distilled water to extract PEO. Various types of scaffolds were fabricated depending on fiber directions, i.e., aligned or randomly oriented. The direction of stretching was either parallel or vertical to the fiber direction for the aligned scaffolds. The stretching was also applied to the randomly aligned scaffolds. The duration of stretching was 2 min with 15 min resting period. During the stretching, the maximum and minimum strain was adjusted to be 10 and 7%, respectively with the frequency of 1 Hz. The bioactivities of cells on the scaffolds were assessed by quantifying DNA, collagen, and glycosaminoglycan (GAG) levels. And the cell morphology was observed by staining F-actin. SMCs under parallel stretching to the fiber direction responded more positively than those in other conditions. From the results, we could explain the morphological effect of a substrate on cellular activities. In addition the synergistic effects of substrate and mechanical stimuli effects were confirmed.

Key words : cyclic stretch, resting period, cell alignment, smooth muscle cell, vascular tissue engineering

1. 서론

생체 내 혈관은 정렬된 다층의 구조를 가지고 있다. 좀 더 세부적으로 보면, muscular artery의 중간막 (tunica media)은 평활근이 주를 이루고 있지만, elastic artery의 경우에는 평활 세포층 사이에 elastic lamina가 삽입되어 있다. 또한, 혈관의 외막과 중막의 바깥부분은 작은 혈관, elastic fiber와 collagen fiber로

구성되어 있다[1]. 인공혈관을 제작하기 위해서는 이러한 혈관 세포들이 정렬되어야 하며, 생체 내와 비슷한 물리적인 환경이 유지되어야만 한다[2-4].

나노파이버 섬유는 이러한 세포 정렬을 유도하는 데 유리한 것으로 알려져 있다. 지지체에서 나노파이버는 세포의 정렬뿐만 아니라 세포의 부착력과 증식에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

세포의 정렬에 영향을 줄 수 있는 또 한 가지의 요소는 물리적 자극이다. 여러 가지 종류의 자극이 혈관 내에 존재하게 되며, 본 연구에서는 평활근 세포에게 우세하게 작용하며, 직접적인 세포 정렬을 유도할 수 있는 인장에 초점을 맞추었다. 심장운동에 의해 순환되는 혈류는 혈관에 지속적인 인장을 일으키게 되고, 평활근 세포 역

2005 인제대학교 학술연구조성비 지원 사업에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다

Corresponding Author : Jung-Woog Shin
FIRST Research Group, Institute of Biomedical Engineering, Inje University, 607 Eubangdong, Gimhae, Gyeongnam
Tel : +82-55-320-3317 / Fax : +82-55-327-3292
E-mail : sjw@bme.inje.ac.kr

시 인장을 받게 된다. 평활근 세포의 변형은 세포의 증식, 이동, 그리고 분화에 영향을 주게 된다. 주기적인 인장 자극은 혈관 세포의 기능을 조절한다는 것은 이미 여러 연구에서 보고된 바 있다[5].

정렬된 나노파이버 지지체에서 세포들은 일반적으로 나노파이버의 방향을 따라 증식을 하지만 인장자극은 인장의 수직방향으로 세포들을 정렬하도록 만든다. 그래서 나노파이버 지지체에 인장자극을 동시에 세포에 부여할 경우, 세포의 정렬 방향이나 세포 외기질 분비에 영향을 줄 수 있다. Lee 등[6]은 나노파이버의 방향과 평행한 방향으로 섬유 세포에 인장 자극을 부여하였을 때 자극의 수직 방향으로 세포가 정렬하였으며, collagen이 더욱 활발히 생성되었다고 보고하였다.

세포에 부여하기 위한 자극으로 본 연구에서는 15분의 휴지기를 도입하였다. 절대 불응기의 개념에 근거하여 Hung 등[7]은 휴지기를 도입하여 골아세포에 fluid flow를 부여하였다. 골아세포는 3분 이상의 지속적인 자극에 대해서는 응답하지 않았으며, 10분에서 15분의 휴지기를 도입하였을 때 가장 효과적인 세포응답을 나타낸다고 보고하였다. 또한 김 등[8]은 calf pulmonary artery endothelial (CPAE) cells 와 porcine articular chondrocyte에 2분의 정수압을 부여한 후 5분, 10분, 15분, 20분의 휴지기를 각각 가졌을 때 모두 15분에서 가장 그들의 세포 부착력이 유의하게 증가하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 이전 연구에서 제작되었던 PEO/PU를 적층한 나노파이버 지지체 다양한 방향으로 정렬하여 간헐적인 주기적 인장 자극을 부여하였다. 그리하여 자극이 세포의 정렬 방향과 세포 외기질에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

본 연구들을 위하여 다음 세가지 사항을 가정하였다.

1) 인장 자극은 혈관 재생에 중요한 역할을 하고, 인장의 방향과 나노파이버의 정렬 방향은 세포 정렬이나 증식, 단백질 생성 같은 세포 응답에 영향을 줄 것이라 가정하였다. 즉, 세포들은 인장의 방향에 수직으로 정렬되었지만 세포의 증식이나 세포 활동은 인장 자극으로 인해 증가할 것이다.

2) 연구에서는 혈관에서의 인장은 혈압에 비례할 것이라는 가정 하에 혈압이 120mmHg 일 때 10% 정도의 인장이 일어난다 가정하였다. 생체 내 혈관에서는 원주의 방향으로 5~15%의 인장 자극이 존재하는 것으로 알려져 있다[15]. 휴식 상태에 있는 일반 어른의 경우, 수축기와 이완기의 혈압이 각각 120과 80mmHg 일 때를 정상 혈압이라 여긴다. 그리고 생체 내에서 15%이상의 혈압은 임상적으로 비정상적인 혈압이라 간주되고 있으며, 2% 아래의 인장은 세포에게 유의한 영향을 주지 못하는 것으로 알려져 있다[16]. 그래서 본 연구에서는 수축기에는 10% 정도의 인장이 일어나고 이에 따라 비례적으로 계산하여 이완기에는 7%의 인장이 일어날 것이라 보고 실험을 진행하였다.

3) 평활근 세포에도 불응기가 존재한다고 가정하여, 평활근 세포에 주기적인 인장 자극이 부여되는 동안 휴지기를 고려하였다.

II. 재료 및 방법

A. 정렬된 적층구조의 나노파이버 지지체 제작

적층 구조의 지지체를 제작하기 위하여 준비된 polyurethane (PU) (Pellethane 2102-75A Dow Chemical Corp., USA) 용액과 poly(ethylene oxide) (PEO) (MW: 100,000; Sigma, USA) 용액을 번갈아 가며 같은 collector에 방사하였다. PU 용액과 PEO용액은 20%(w/v)의 농도로 고정하여 준비되었으며, 용매로는 *N,N*-dimethylformamide (DMF; Junsei Chemical Co., Japan)와 증류수를 각각 사용하였다. PU용액에는 0.75 kV/cm, PEO용액에는 1.2 kV/cm의 전압을 각각 인가하였으며, 고압 전원 공급 장치 (SHV200 RD-40k, Converttech, Korea)를 사용하였다. 방사거리는 25 cm으로 고정하였고, PU 용액과 PEO 용액은 각각 30분 동안 방사되었다.

나노파이버를 정렬하기 위하여 실린더 타입의 콜렉터 (ϕ 8 cm, 길이: 8 cm)를 사용하였으며, 24 V에서 DC 기어 모터(WD6G 2415; Wonill Industrial, Korea)를 사용하여 3000 rpm으로 회전하도록 하였다. PU와PEO용액은 각각 40번씩 번갈아 가며 방사되었다.

그런 다음 PEO를 지지체로부터 적출해 내기 위하여 증류수에 12시간 동안 담그어 두었으며, 매 3시간마다 증류수를 교체하였다. PEO를 적출해 낸 지지체는 클린벤치에서 24시간동안 건조되었으며, 지지체의 모습을 관찰하기 위하여 SEM (SEM, JSM-6700; JEOL, Japan) 촬영을 실시하였다.

B. 평활근 세포 배양 및 파종

Human coronary artery SMCs(Cascade Biologics, USA)는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)와 1% 항생제(100 U/ml penicillin, 100 μ g/ μ l streptomycin, Gibco, USA)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM-HG; Gibco)에서 CO₂ 인큐베이터에서 7일간 배양되었다. 배지는 매 3일에 한번씩 교체하였다.

실험을 위해 PEO가 적출된 지지체는 0.5 cm \times 3 cm의 크기로 재단되었으며, UV를 이용하여 30분 동안 멸균하였다. 평활근 세포는 5×10^4 cells/cm²의 농도로 150 μ l의 세포 부유액으로 만들어 지지체의 표면에 파종하였다. 본 실험에서는 4번까지 계대배양된 평활근 세포를 사용하였다.

C. 인장자극 인가 장치

단축 인장 자극을 부여하기 위하여 modified Flexcell system (TT-4001U Uniaxial Stretch Unit; Flexcell International, Corp.)을 사용하였다. 인장 자극 시스템은 LabVIEW software (version 6.0; National Instrument Corp., USA)을 사용하여 조절하였다. 제작된 지지체는 Fig. 1에서 보여지는 바와 같이 Flexcell plate에 부착되었다.

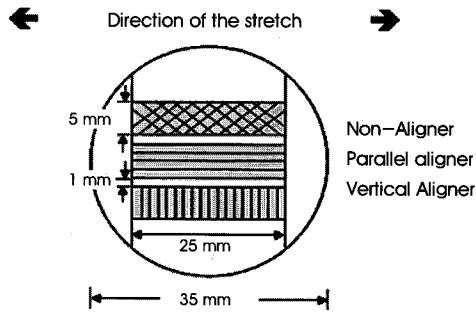


그림 1. Tissue trainer 내 지지체의 위치
Fig. 1. Tissue trainer with positioned scaffold

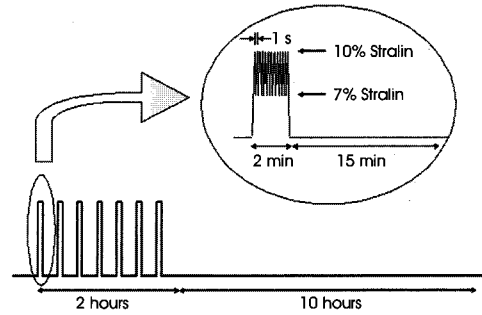


그림 2. 간헐적 인장 자극의 패턴
Fig. 2. Pattern of intermittent stretch

SMC를 파종한 후, 24시간 뒤에 1Hz 주기로 2시간동안, 하루에 두번, 이틀동안 자극을 부여하였으며, 2시간의 자극은 2분의 자극 부여 시간과 15분의 휴지기로 구성되었다. 자극의 크기는 10%와 7%로 번갈아 가며 부여하였다(Fig. 2)

D. F-actin 염색

세포 골격의 배열을 관찰하기 위하여 액틴 필라멘트를 rhodamine phalloidin (R415; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 을 사용하여 염색하였다. 염색 전 세포를 PBS로 두 번 세척하였으며 4% formalin 용액에 4 °C에서 10분 동안 고정하였다. 그런 다음, with 0.1% Triton X-100를 이용하여 4 °C에서 20분 동안 permeabilize 하였으며 nonspecific한 background를 제거하기 위하여 미리 데워진 1% BSA 용액으로 30분 동안 처리하였다. 그 후, rhodamine phalloidin을 PBS에 1:100으로 희석하여 20분 동안 실온에서 빛을 차단하고 반응 시켰다. 세포는 이미지 분석 형광 현미경 (Olympus DP70, USA)으로 관찰하였다.

E. DNA content

나노파이버 지지체에서 자라는 세포의 수를 결정하기 위하여 Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent and Kits (Molecular Probes, OR, USA)를 사용하였다. Lysis buffer로써 0.1% Triton X-100를 사용하였으며, PicoGreen reagent와 sample은 각각 100 µl 씩 96-well plate에서 빛을 차단 한 채로 5 분 동안 실온에서 반응하였으며, 480/520 nm에서 Multi-Detection Microplate Reader (Synergy™ HT; Bio-Tek, Winooski, USA)를 이용하여 형광도를 측정하였다.

F. Glycosaminoglycan(GAG) content 와 total collagen 측정

GAG의 양과 total collagen의 양을 측정하기 위하여 Blyscan Assay Kit (Biocolor, Northern Ireland)와 Sircol Collagen Assay kit (Biocolor, Belfast, UK)을 사용하였다. Sulfated GAGs 는 papain solution (1.25 M papain, 5 mM Na₂EDTA·2H₂O, 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 5 mM L-cysteine HCl)에 37 °C에서 24

시간 동안 incubation 하여 추출하였으며, collagen은 같은 조건에서 1M acetic acid를 이용하여 lysis 하였다. 분석은 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었으며 microplate reader (Original Multiskan Ex; Thermo Electron Corp., Shanghai, China)를 이용하여 GAG는 650 nm에서, collagen은 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 GAG와 collagen의 값은 DNA값의 평균으로 나누어 정량화한 그래프와 정량화하지 않은 그래프로 나타내었다.

G. 통계분석

본 연구에서 사용된 통계적 분석은SPSS를 이용하여 분석하였으며 일원배치분산분석 (one-way analysis of variance (ANOVA))을 사용하였다. 다중분산은 least-significant difference (LSD) 방식을 이용하였으며 p ≤ 0.05에서 유의 수준을 결정하였다.

III. 결과

A. Hybrid scaffold된 스캐폴드의 형태학적 분석

PEO를 추출해 낸 뒤의 스캐폴드의 윗면과 횡단면의 영상이 Fig. 3에 나타나 있다. 시편 중 PEO가 적출된 부분인 PU의 두 층 사이에 세포들이 거주하고 증식할만한 공간이 생성되었다 (Fig. 3B).

B. F-actin

자극이 존재하지 않을 때에는 평활근 세포는 지지체의 파이버 방향을 따라 증식하였다(Fig. 4). 자극이 인가되지 않았을 때의 평

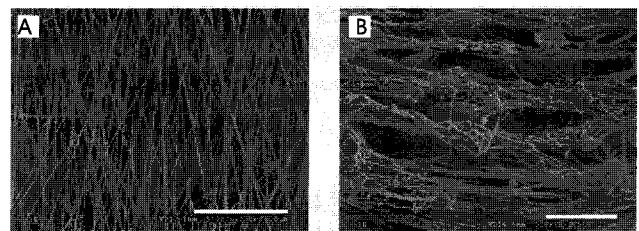


그림 3. PEO가 적출된 지지체에 SEM 사진 (A) 윗면 (B) 횡단면
Fig. 3. SEM images of the scaffold extracted PEO (A) Top (B) Sectional view

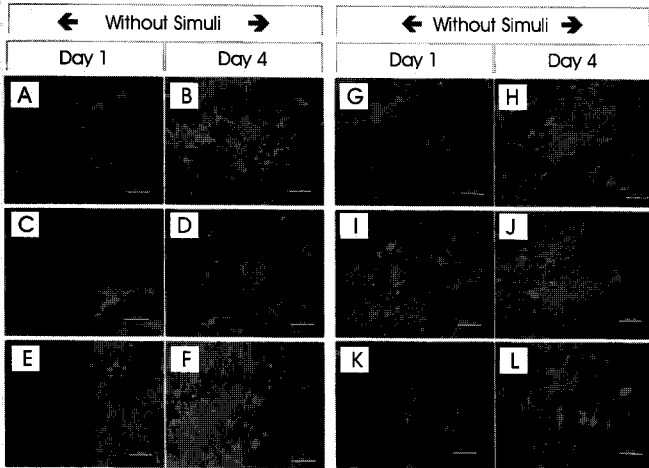


그림 4. 다양하게 배열된 지지체 윗면의 평활근 세포의 F-actin. (A,B,G,H: 정렬되지 않은 지지체; C,D,I,J: 자극의 방향에 평행하게 정렬된 지지체; E,F,K,L: 자극의 방향에 수직으로 정렬된 지지체)

Fig. 4. F-actin of SMCs on the differently aligned scaffold surface (A, B, G, H: Randomly aligned scaffold; C, D, I, J: Parallel aligned scaffold; E, F, K, L: Vertically aligned scaffold),

활근 세포는 지지체의 파이버 방향을 따라 증식하였다. 자극을 인가하면서 평활근 세포의 방향이 달라졌는데, 자극의 방향과 평행한 방향의 나노파이버 지지체에서의 평활근 세포는 한쪽으로 기울어진 반면, 수직인 방향의 나노파이버 지지체와 정렬되지 않은 나노파이버 지지체의 세포는 원래의 방향을 유지하였다.

C. 평활근 세포 증식

Fig. 5에서 그룹명의 첫번 째 글자는 자극의 유무를 나타낸다 (S: with stimuli, N: without stimuli). 또한, 두번 째 글자는 인장 방향에 대하여 정렬된 나노파이버의 방향을 가리킨다 (R: random,

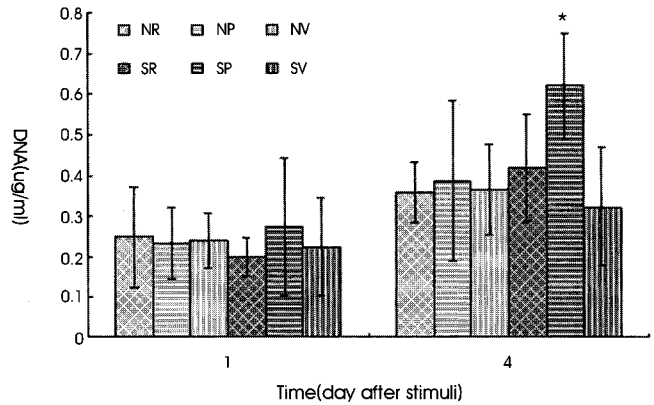


그림 5. 평활근 세포의 증식
Fig. 5. DNA contents.

P: parallel to stretch direction, V: vertical to stretch direction). 자극을 인가한 지 1일 뒤, 평활근 세포의 증식률은 자극을 인가한 군(S)이나 그렇지 않은 군(N)이 비슷하게 나타났다. 그러나 4일째의 DNA의 양은 자극의 방향과 평행한 나노파이버 지지체(SP 군)에서 가장 높게 나타났으며, 수직인 나노파이버 지지체(SV 군)은 자극을 주지 않은 군보다 낮게 나타났다. 자극을 부여하지 않은 모든 군에서는 DNA양이 비슷하게 나타났다.

D. GAG와 collagen 합성

4일째의 전체 GAG양은 자극의 방향과 평행한 방향의 나노파이

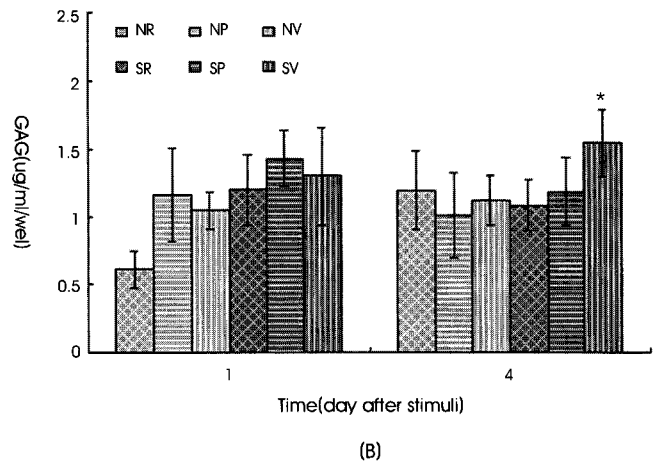
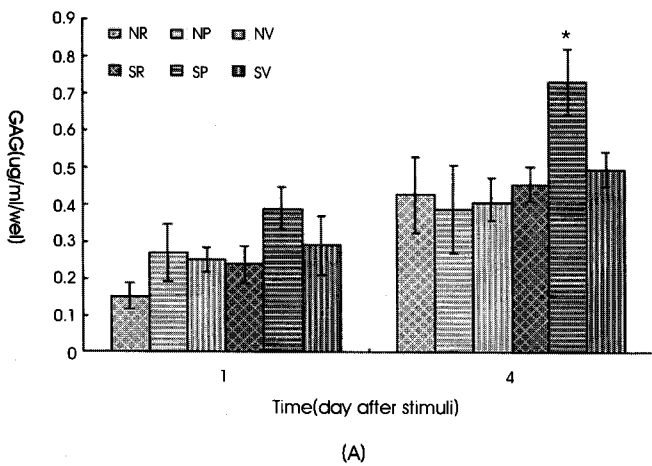


그림 6. 평활근 세포의GAG의 분비 (A) DNA로 정량화 되지 않은 GAG (B) DNA로 정량화 된 GAG
Fig. 6. Secretion of GAG on the differently aligned scaffold (A) Total GAG content (B) GAG content normalized with DNA

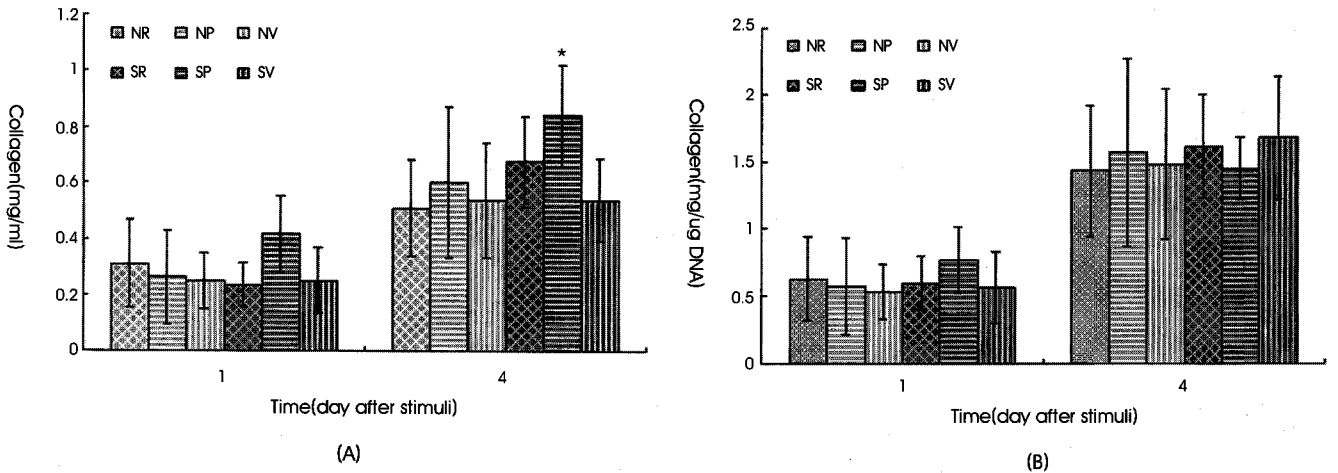


그림 7. 평활근 세포의 collagen 합성 (A) DNA로 정량화 되지 않은 collagen (B) DNA로 정량화 된 collagen
 Fig. 7. Collagen synthesis on the differently aligned scaffold (A) Total collagen content (B) Collagen content normalized with DNA

비 지지체를 사용한 군 (SP)에서 가장 높게 나타났지만, DNA로 정량화 한 값에서는 오히려 자극의 방향과 수직인 방향의 나노파이버 지지체 (SV)를 사용한 군에서 높게 나타났다. 전체 GAG의 양은 시간이 지남에 따라 증가하였으나 (Fig. 6A), DNA 값으로 정량화한 후의 GAG의 값은 비슷하거나 오히려 감소하는 경향이 나타났다 (Fig. 6B).

전체 collagen의 양은 시간이 지남에 따라 증가하였다 (Fig. 7). 전체 collagen의 양 또한 자극의 방향과 평행한 나노파이버 지지체 (SP)에서 가장 높게 나타났으나, DNA로 정량화한 후의 collagen 양은 그룹간의 별 차이가 없었다 (Fig. 7B).

IV. 토 의

세포에 대한 인장 자극의 영향은 파종된 세포의 수나 인장 자극의 크기에 따라 다르게 나타나지만 대부분의 연구에서는 10%의 자극을 4시간 동안 부여하였을 때 세포는 자극의 방향에 수직으로 정렬되었다[3,11]. 이러한 현상은 몇몇 연구자들은 barrier protective effect로 해석하기도 하지만 아직 뚜렷하게 밝혀진 바는 없다.

본 연구에서는 GAG와 collagen의 결과 그래프를 DNA로 나누어 정량화 한 그래프 (Fig. 6(B), Fig. 7(B))와 정량화하지 않은 그래프 (Fig. 6(A), Fig. 7(A))로 나누어 나타내었다. DNA로 정량화 한 그래프에서 collagen 합성에는 실험군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나왔으나 GAG의 분비에서는 자극의 방향으로 정렬된 나노파이버에서 GAG의 생성이 유의하게 활발한 것으로 나타났다. 그러나 DNA로 정량화하지 않은 GAG와 collagen의 그래프에서는 모두 자극의 방향에 평행하게 정렬된 나노파이버 지지체에서 모두 유의한 분비를 나타내었다. DNA로 정량화 된 그래프는 세포당 얼마나 기질을 생성해내느냐는 activity, 즉 개개 세포의 활성화 정도를 볼 수 있지만 실제 총 세포 내에 존재하는 양은 세포 및 지지체의 종합적인 환경을 반영하는 것으로 DNA로 정량

하지 않은 그래프를 참조하는 것도 의미 있는 것으로 사료된다. 그러므로 DNA로 정량화하지 않은 그래프에서 나타나는 결과 또한 고려할 사항으로서, 실제 생체 내에 이식되었을 때에는 재생에 필요한 충분한 세포의 수가 확보된 후에 의미가 있는 것이므로 4일 째에 세포의 수가 오히려 대조군에 비해 떨어진 SV 군이 정량화 후 GAG의 값이 다른 군에 비해 유의한 차이를 보인다고 해도 크게 의미를 둘 수 없다. 전체적인 결과로 자극의 방향과 평행하게 정렬된 나노파이버 지지체가 세포에게 좋은 영향을 주는 것으로 나타났으며, 비록 정량화 이후에는 값이 별 차이가 없었지만 거의 모든 실험에서 자극의 방향과 평행하게 정렬된 나노파이버 지지체가 세포의 증식이나 ECM 생성에서 좋은 결과가 나타났다. 그리고 자극의 방향과 수직으로 정렬된 나노파이버에서 나타나는 세포수의 감소는 인장 자극이 나노파이버를 이동하게 함으로써 세포가 나노파이버에 붙는 것을 방해하여 이러한 현상이 나타난 것으로 보인다. Yamamoto 등은[12] 세포가 일시적인 자극에 의해 재료로부터 떨어졌을 때 더 강하게 부착될 수 있는 시간을 충분히 주지 않으면 세포가 떨어져 나갈 수도 있음을 보고한 바 있다.

실험 결과에서 자극의 방향과 평행한 나노파이버 지지체의 평활근 세포는 30~50°로 기울어져 있었다. 다른 연구에서 세포들은 자극의 크기나, 빈도, 세포의 파종 농도에 따라 차이가 있지만 자극이 부여된 지 4시간 이후에 대부분 자극의 방향에 수직으로 정렬되었다[12-20]. 그러나 본 연구에서는 자극이 약 한 시간 (56 min) 정도만 지속되었으므로, 자극을 좀 더 오랜 시간동안 결국에는 자극의 방향에 수직으로 정렬될 것으로 사료된다.

생체 내 혈관에서 평활근 세포와 elastin fiber는 서로 수직으로 정렬되어 있지만 아직 정확한 mechanism은 밝혀진 바는 없다. 본 실험에서 PU fiber는 혈관 본래의 모습에 근거하여 contact guidance의 역할이 아니라 protective barrier로써 혈관에서의 elastic fiber의 역할을 할 수 있도록 하기 위하여 디자인되었다. 실험 결과로 미루어 보아, 좋은 세포 증식과 ECM 분비가 나타난 자

극의 방향과 평행한 나노파이버 지지체는 생체 내 혈관과 비교하였을 때 longitudinal 한 방향으로 정렬되어야 한다. 이에 맞추어 자극의 방향을 다시 생각해 보면 자극은 longitudinal 한 방향으로 작용하는 것이 된다. 그러나 생체 내에서 평활근 세포는 longitudinal 한 인장 자극이 아닌 circumferential 방향의 인장자극을 받는 것으로 알려져 있다[21]. 그러나 최근의 다른 연구 결과들은 longitudinal strain이 중요하다는 것을 제시하고 있다. 즉, Sikema 등[22]은 쥐의 renal artery에 있는 혈관 내피 세포가 longitudinal 한 방향으로 20%로 0.5 Hz 주기로 인장자극을 부여하였으나 정렬이 재배치되지 않았음을 확인하였다. 그들은 circumferential stretch가 없고 fluid shear stress가 시너지 역할을 하는 곳에서 longitudinal stretch가 중요한 역할을 할 수도 있다고 주장하였다. 그리고 Jackson 등[23]은 그들의 실험에서 longitudinal 인장 자극에 의해 arterial remodeling이 이루어지는 것을 관찰하였다. 실제로 생체 내 모든 혈관은 in situ 에서 40-65%의 longitudinal 한 인장 자극을 받고 있는 것으로 보고된 바 있다 [24]. 본 실험은 생체 구조적인 자극과 역학적인 자극이 삼차원적으로 조화된 환경을 이루어 좀 더 생체 내 환경과 유사한 환경을 in vitro로 구현하고 혈관에 적용하기 위한 tubular type의 지지체의 방향으로 만들어 지기 전에 나노 섬유들의 정렬 방향을 결정하기 위한 실험으로 이러한 in vitro의 실험 설계는 조직공학 분야에서 매우 중요하다. 그러나 본 실험에서는 circumferential 한 인장 자극이 평활근 세포에 dominant하다고 보고 10% 정도의 자극만이 시행되었으며 본 실험의 결과로부터 합리적으로 디자인된 지지체를 통하여 앞으로의 연구에서 생체 내 상황과 연관된 결과를 가져올 수 있을 것으로 사료된다. 다음 실험에서는 longitudinal한 요소들이 고려되어야 할 것이다. 또한, 평활근 세포의 물리적인 기능을 이해하고 조절하는 데에 있어 signaling pathway 가 어떻게 연관되는 지에 대해 좀 더 이해가 있어야 할 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 제작된 전기 방사법으로 적층되고 정렬되어진 나노파이버 지지체에 간헐적인 인장자극을 인가하였다. 본 연구의 결과로부터 자극의 방향에 평행하게 정렬된 나노파이버 지지체에서 좋은 세포 응답을 보였지만 자극 자체만으로는 효과가 없었지만 평행하게 정렬된 지지체와 결합되었을 때 synergistic한 효과를 발휘하였다. 결론적으로 평행하게 정렬되어 적층된 나노파이버 지지체가 조직공학용 혈관 지지체로서 유망할 것으로 생각된다. 그러나, 좀 더 물리적으로 생체 내와 비슷한 환경을 제공하기 위하여 평활근 세포는 내피세포와 함께 공동배양 되어야 할 것이며 다음 연구에서는 좀 더 세부적인 mechanism이 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

[1] Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*, 11th edition, McGraw

Hill, 2005, pp. 206.

[2] Chen Q, Li W, Quan Z, Sumpio BE. "Modulation of vascular smooth muscle cell alignment by cyclic strain is dependent on reactive oxygen species and P38 mitogen-activated protein kinase," *J Vasc Surg.*, vol. 37, pp. 660-668, 2003.

[3] Cha JM, Park SN, Noh SH, Suh H. "Time-dependent modulation of alignment and differentiation of smooth muscle cells seeded on a porous substrate undergoing cyclic mechanical strain," *Artif Organs.*, vol. 30, pp. 250-258, 2006.

[4] Standley PR, Camaratta A, Nolan BP, Purgason CT, Stanley MA. "Cyclic stretch induced vascular smooth muscle cell alignment via NO signaling," *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, vol. 283, pp. H1907-H1914, 2002.

[5] Stegemann JP, Helen H, Nerem RM. "Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype," *J Appl Physiol.*, vol. 98, pp. 2321-2327, 2005.

[6] Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang YM, Kim IA, Park KD, Shin JW. "Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast," *Biomaterials.*, vol. 26, pp. 1261-1270, 2005.

[7] Hung CT, Pollack SR, Reilly TM, Brighton CT. "Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow," *Clin Orthop Relat Res.*, vol. 313, pp. 256-269, 1995.

[8] Kim YJ, Park SA, Lee YJ, Shin JW, Kim DH, Heo SJ, Park KD, Shin JW. "Effects of intermittent hydrostatic pressure on cell adhesive forces and other related parameters under various resting periods," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/116833498/HTMLSTART>, 2007.

[9] Cross KS, Davies MG, el-Sanadiki MN, Murray JJ, Mikat EM, Hagen PO. "Long-term human vein graft contractility and morphology: a functional and histopathological study of retrieved coronary vein graft," *Br J Surg.*, vol. 81, pp. 699-705, 1994.

[10] Birukov KG, Jacobson JR, Flores AA, Ye SQ, Birukova AA, Verin AD, Garcia JG. "Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, vol. 285, pp. L785-L797, 2003.

[11] Mcknight NL, Frangos JA. "Strain rate mechanotransduction in aligned human vascular smooth muscle cells," *Ann Biomed Eng.*, vol. 31, pp. 239-249, 2003.

[12] Yamamoto A, Mishima S, Maruyama N, Sumita M. "A new technique for direct measurement of the shear force necessary to detach a cell from a material," *Biomaterials.*, vol. 19, pp. 871-879, 1998.

[13] Yang J, Motlagh D, Webb AR, Ameer GA. "Novel biphasic elastomeric scaffold for small-diameter blood vessel tissue engineering," *Tissue Eng.*, vol. 11, pp. 1876-1886, 2005.

[14] Nerem RM, Seliktar D. "Vascular tissue engineering," *Annu Rev Biomed Eng.*, vol. 3, pp. 225-243, 2001.

[15] Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI. "Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells," *Am J Physiol Hear Circ Physiol.*, vol. 278, pp. H748-H754, 2000.

[16] Birukov KG, Shirinsky VP, Stepanova OV, Tkachuk VA, Hahn

- AW, Resink TJ, Smirnov VN. "Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells," *Mol Cell Biochem.*, vol. 144, pp. 131~139, 1995.
- [17] Tock J, Putten VV, Stenmark KR, Nemenoff RA. "Induction of SM- α -actin expression by mechanical strain in adult vascular smooth muscle cells is mediated through activation of JNK and p38 MAP kinase," *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 301, pp. 1116~1121, 2003.
- [18] Wolfsgruber W, Feil S, Brummer S, Kuppinger O, Hofmann F, Feil R. "A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells," *Proc Natl Acad of Sci U. S. A.*, vol. 100, pp. 13519~13524, 2003.
- [19] Quinn TP, Schlueter M, Soifer SJ, Gutierrez JA. "Mechano-transduction in the lung cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, vol. 282, pp.L897~L903, 2002.
- [20] Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Wight TN. "Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells," *J Bio Chem.*, vol. 276, pp. 13847~13851, 2001.
- [21] Davis NP, Han HC, Wayman B, Vito R. "Sustained axial loading lengthens arteries in organ culture," *Ann Biomed Eng.*, vol. 33, pp. 867~877, 2005.
- [22] Sipkema P, van der Linden PJ, Westerhof N, Yin FC. "Effects of cyclic axial stretch of rat arteries on endothelial cytoskeletal morphology and vascular reactivity," *J Biomech.*, vol. 36, pp. 653~659, 2003.
- [23] Jackson ZS, Gotlieb AI, Lagnille BL. "Wall tissue remodeling regulates longitudinal tension in arteries," *Circ Res.*, vol. 90, pp. 918~925, 2002.
- [24] Learoyd BM, Taylor MG. "Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls," *Circ Res.*, vol. 18, pp. 278~292, 1966.