자가 골수세포를 이용한 조직공학적 소구경 인공혈관 이식편의 생체실험

> 연세대학교 대학원 의과학과 임 상 현

# 자가 골수세포를 이용한 조직공학적 소구경 인공혈관 이식편의 생체실험

지도교수 장병철

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원 의과학과

임 상 현

# 임상현의 박사 학위논문을 인준함

심사위원	인
심사위원	<u>인</u>
심사위원	인
심사위원	인
심사위원	인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

# 감사의 글

많은 어려움 가운데서 이 논문이 완성될 수 있게 하여주신 하나님께 영광을 돌립니다.

부족한 저에게 의술을 가르치시고 연구에 대한 생각을 갖도록 지도해주신 장병철 교수님께 감사를 드립니다. 또한 좋은 논문이 될 수있도록 조언을 하시며 돌봐주신 안덕선 교수님, 결과를 분석하는데많은 도움을 주신 박종철 교수님, 그리고 실험의 전 과정에 함께 해준 한양대학교 김병수 교수님, 조직 검사에 대한 분석을 도와준 김세훈 교수님께 감사를 드립니다.

실험에 대한 아무런 지식도 없던 저에게 실험을 할 수 있도록 용기와 지원을 아끼지 않은 박현영 선생님께 감사를 드리고, 항상 모든 면에서 끝없는 지원과 도움을 아끼지 않은 홍유선 교수님께 감사를 드립니다. 또한 실험의 전과정에서 도움을 준 조승우 선생과 조수진 선생께 감사를 드립니다.

부족한 아들을 위해 기도로 뒷받침 해주신 어머니와 이옥희 전도사님, 그리고 장인과 장모님의 사랑은 너무 커서 감사의 말로 대신할수가 없습니다. 어려움 속에서 묵묵히 기도로 뒷받침 해준 사랑하는 아내와 밝게 자라나는 하영이와 하은이는 마음의 안식처가 되어 주었습니다.

어려움 속에서 도우시고 성실하게 인도하신 하나님께 감사를 드립니다.

# 차 례

국문요약1
I. 서 론3
II. 재료 및 방법6
1. 실험 동물6
2. 탈세포화된 혈관 스캐폴드의 제작6
3. DNA quantification — 7
4. 골수세포의 획득 및 배양7
5. 골수세포 특성 확인8
6. 골수세포 표시8
7. 혈관용 스캐폴드와 배양된 골수세포를 이용한 인공혈관의
제작9
8. 주사전자현미경 검사9
9. 봉합 유지력9
10. 제작된 조직공학적 인공혈관의 생체 이식 실험10
11. 이식된 혈관의 개통성 검사11
12. 이식된 인공 혈관들을 적출한 후의 검사11
13. eNOS의 측정 ·······12
14 통계적 부석12

III	[. 결 과	··· 13
	1. 탈세포화된 혈관용 스캐폴드	··· 13
	2. 골수로부터 분리된 혈관 세포들	16
	3. 배양된 골수세포들과 탈세포화된 혈관 스캐폴드로 만든	= 인
공		
	혈관	··· 19
	4. 혈관 봉합 유지력	··· 21
	5. 혈관 개통성	··· 22
	6. 생체 내에서의 혈관조직 재생	··· 23
	7. 이식한 골수세포의 생체내 생존 여부	··· 27
	8. eNOS의 측정 ·····	··· 29
IV	7. 고 찰	31
V.	. 결 론	40
참	고문헌	··· 42
영	문요약	50

# 그림 차례

	oss view of decellularized canine carotid
ar	tery13
	ogical analysis of decellularized canine carotid tery. ————————————————————————————————————
Figure 3. Scann	ing electron microscopic finding14
	size distribution of the decellularized matrix as etermined by mercury porosimetry 15
Figure 5. DNA	assay16
_	cterization of bone marrow-derived cells ultured in endothelial-like cell culture condition.
_	cterization of bone marrow-derived cells ultured in smooth muscle-like cell culture condition. ————————————————————————————————————
	eek after bone marrow cell seeding19

Figure 9. Scanning electron microscopic finding of the
luminal surface of the vascular graft 1 week
after cell seeding 20
Figure 10. H & E stanning of the vascular graft 1 week
after cell seeding
arter cen seeding.
Figure 11. Suture retention strength measurement of the
tissue-engineered vascular grafts21
Figure 12. Surgical implantation of the tissue-engineered
vascular grafts. ————————————————————————————————————
Figure 13. Carotid angiogram of implanted tissue-engineered
vascular grafts23
Figure 14. Photograph of retrieved tissue-engineered vascular
graft 4 weeks after implantation 23
·
Figure 15. Histologic evaluation of the bone marrow cell
seeded vascular grafts retrieved 8 weeks after
implantation. ······ 24
Figure 16. Immunohistochemical staining of the bone marrow

cell seeded vascular grafts retrieved 8 weeks

after implantation. ————————————————————————————————————	
Figure 17. Scanning electron microscopic finding of the lumen of the retrieved grafts for endothelium formation. ————————————————————————————————————	
Figure 18. Identification of implanted bone marrow cells in the tissue-engineered vascular grafts retrieved at 8 weeks after implantation. ————————————————————————————————————	
Figure 19. eNOS expression in tissue engineered artificial vessel. ————————————————————————————————————	

#### 국문요약

자가 골수세포를 이용한 조직공학적 인공혈관 이식편의 생체 실험

혈관 질환이 있는 환자들에 사용하는 인공 혈관들은 직경 5 mm 이하의 소구경 혈관에 사용될 때 혈전 형성에 의한 혈관 막힘과 장기간의 혈관 개통성이 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근에 조직 공학적 방법을 이용한 인공혈관의 개발이시도되고 있다. 이번 연구에서는 탈세포화한 동종 혈관 스캐폴드에자가 골수세포를 이식하여 제작한 조직공학적 인공혈관과 골수세포를 사용하지 않은 인공혈관을 각각 생체내에 이식한 후 혈관의 개통성을비교하였다. 조직공학적 인공혈관에서, 내피세포와 평활근 세포가 생성되었는지를 확인하기 위해 조직분석 및 면역조직 검사를 시행하였고, 혈관의 기계적 물성 및 eNOS의 발현정도를 관찰하였다. 이를 통해 조직공학적 인공혈관의 생체내 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

자가 골수세포를 이식하여 제작한 인공 혈관은 자가 골수 세포를 이식하지 않은 인공혈관에 비하여 우수한 8주간의 개통성을 나타내었다. 생체 이식 후 8주가 지난 후에 획득한 인공 혈관의 조직검사 소견은 정상의 혈관과 거의 유사하게 재생된 혈관의 모양을 나타내었다. 또한 면역 조직 검사상, vWF와 CD31에 양성인 세포들이 혈관 내면에 있는 것들을 확인하여 혈관 내피세포들이 재생된 것을 확인하였고, smooth muscle a-actin에 양성인 세포들이 혈관의 중막에 재생된 것을 확인하였다. 자가 골수세포에 미리 표지한 형광 물질을 통한 형광검사상 이식한 자가 골수세포는 생체 내에서 8주까지 생착하여 있었고, 혈관 스캐폴드의 다공성의 구조를 통하여 혈관 병으로도 이동한 것을 확인하였다. 기계적 물성을 확인하기 위한 혈관 봉합 유지력

검사에서 인공 혈관은 정상 혈관과 유사한 혈관 봉합 유지력을 나타내었다. 또한 생체에 이식하기 전에 인공혈관에서 측정한 eNOS의 발현량은 매우 적었으나, 생체에 이식후 3주 이상 지난 후에 제거한 인공혈관은 eNOS의 발현정도가 정상 혈관에 비해 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때, 자가 골수세포와 탈세포화된 혈관 스캐폴드를 이용하여 제작한 인공혈관은 기존의 고분자 물질로 제작한 인공혈관관 말리 에 비해 매우 우수한 생체 적합성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

\_\_\_\_\_

핵심되는 말: 인공혈관, 조직공학, 골수세포

# 자가 골수세포를 이용한 조직공학적 인공혈관 이식편의 생체 실험

#### <지도교수 장병철>

연세대학교 대학원 의과학과

#### 임 상 현

### 1. 서 론

관상동맥 질환 및 말초 혈관질환은 식생활의 서구화와 함께 점차로 증가하고 있는 혈관질환으로 수술적인 치료가 치료의 중요한 방법 중 하나로 정립되어있다. 수술은 다른 혈관 도관을 이용하여 병이 있는 혈관들을 치환하는 것으로, 이용할 수 있는 혈관으로는 자가 조직인 환자 자신의 내흉동맥이나, 요골동맥, 복재정맥들이 있으며, 그 외에 상품화 되어 있는 인조 혈관들을 사용할 수 있다. 혈관의 내경이 5mm 이하인 소구경 혈관의 수술에는 자가 동맥이나 정맥을 이용하는 것이 장기간의 혈관 개통율에 가장 좋은 것으로 보고 되어있다.<sup>1</sup> 그러 나 많은 환자들에서 다른 부위의 혈관에도 병이 있거나, 이전 수술시 혈관을 이미 사용함으로 인하여 적당한 혈관 이식편을 얻기가 쉽지 않다. 이러한 이유로 합성 고분자 및 천연 고분자인 polyethylene terephthalate와 expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)를 이용한 고분자 인공혈관들이 사용되고 있지만, 2 직경이 작은 경우에는 혈전 형성등으로 인해 쉽게 인공혈관이 막히는 것으로 보고되어 있어 소구 경의 혈관에서는 사용이 제한적이다. 3,4 혈전 형성에 의한 혈관 막힘을 해결하기 위하여 혈관 내부를 heparin으로 처리하는 방법, polyethylene oxide로 입히는 방법, 혹은 혈관 내피세포를 이식하는 방법<sup>7</sup>이 시도 되어 왔다. Huynh 등<sup>8</sup>은 토끼에 탈세포화된 조직기질 (tissue matrix)을 이식하였을 때 생체 내에서 성공적으로 세포가 붙어 있는 혈관이 재구성(remodeling)되는 것을 발견하였다. 그러나 사람에서는 혈관 도관 내에서 혈관 내피세포가 자라나는 속도가 토끼의 경우와 달리 느리기 때문에 이러한 결과를 사람에게 적용하는 것은 어려움이 있다. 9

최근에 조직공학적인 방법으로 소구경 인공혈관을 개발하려는 많은 연구가 있어왔다. 몇몇 연구에서 자가 혈관에서 획득한 내피 세포와 평활근 세포를 생분해성 고분자 폴리머 스캐폴드(scaffold)에 이식하여 소구경 인공혈관을 제작하였는데, 10-12 이 혈관들은 생체에 이식한후 곧 혈전이 발생하여 혈관이 폐쇄되었을 뿐 아니라, 11-12 이 같은 혈관을 제작하는데 필요한 내피세포 및 평활근 세포를 구하는데 많은 어려움이 있다. Kaushal 등 13은 말초 혈액에서 혈관내피 전구세포 (endothelial progenitor cell)를 얻어 배양한 후에 탈세포화된 혈관 도관에 이식하여 제작한 인공혈관의 경우, 생체 내에 이식하였을 때 130일간 혈관의 개통성을 유지하였다고 보고하였다. 이는 조직공학적 혈관 제작에 필요한 세포들을 자가 혈관조직 이외의 방법으로도 얻을수 있음을 의미한다. 그러나 혈관내피 전구세포만을 이식하여서는 동맥에서 특히 중요한 역할을 하는 혈관 평활근의 재생에 무리가 있을 것으로 생각되며, 또한 말초 혈액으로부터 분리하여 얻은 혈관 내피 전구 세포의 양 자체가 충분하지 못하다는 한계를 지니고 있었다.

골수에서 유래한 세포들은 조직공학을 이용한 혈관제작에 사용될수 있는 또 다른 줄기세포원이 될 수 있을 것으로 생각되는데, 골수세포들은 여러 가지 간엽 세포계열로 분화할 수 있는 것이 밝혀져 있다. 14,15 특히 최근에는 골수세포에서 내피세포와 유사한 세포

(endothelial-like cell)나, <sup>16-19</sup> 평활근과 유사한 세포(smooth muscle-like cell)로의 분화가 이루어짐이 보고 되었다. <sup>20-23</sup> Matsumura 등<sup>24</sup>은 골수에서 획득한 단핵 세포를 생분해성 스캐폴드에 이식하여 대구경 혈관을 제작한 경우 골수 세포들이 생체 내에서 혈관 내피 세포 및 혈관 평활근 세포들로 분화한다는 보고를 하였고, Bhattacharya 등<sup>25</sup>은 인공 혈관에 이식한 CD-34 양성인 골수세포들이 생체내에서 내피세포로 분화한다는 보고를 하였다. 이같은 보고들은 골수세포가 조직 공학을 이용한 혈관 제작에 사용될 수 있음을 의미한다.

본 연구에서는 자가 골수 세포와 탈세포화된 혈관 스캐폴드를 이용하여 내경 3 mm의 소구경 인공 혈관을 제작한 후, 골수 세포를 이식한 인공 혈관과, 골수 세포를 이식하지 않은 인공 혈관을 개의 경동맥에 이식하여 생체내에서의 혈관 도관의 개통성을 확인하고자 한다. 또한 자가 골수세포와 탈세포화된 혈관 스캐폴드를 이용하여 만든 인공혈관을 생체에 이식하였을 때 정상적인 혈관으로의 재생이 일어나는지를 확인하고, 혈관 도관에 이식된 골수 세포가 생체 내에 이식된 후에도 혈관 도관 내에서 생존하는지 여부를 관찰하여 자가 골수세포와 탈세포화된 혈관 스캐폴드를 이용한 조직 공학적 인공 혈관의 임상적용 가능성에 대하여 알아보고자 하였다.

#### Ⅱ. 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

몸무게 20 - 25 kg 되는 8 마리의 잡견을 이용하였으며, 동물의 취급은 연세대학교 의과대학 실험동물위원회 (Committee for the Care and Use of Laboratory Animals) 방침 및 동물실험 관련 법규에 따라 인도적으로 시행하였다. 실험동물은 동물실에 반입된 후 3-4일간의 순화 기간을 거친 후 이상이 발견되지 않은 동물들만 실험에 이용하였다. 먼저 피 실험동물의 장골에서 골수를 채취하여 조직 공학적방법으로 혈관 도관을 만든 후에, 만들어진 혈관 도관을 피 실험동물의 경동맥에 이식하였다. 피 실험동물은 모든 실험이 시행되기 전날밤부터 금식을 시행한 후 실험 당일에는 주사마취 및 전신마취를 시행하면서 실험을 시행하였고, 수술이 끝난 후에는 항생제와 진통제를 7일간 매일 투여하면서 동물의 회복을 도왔다.

#### 2. 탈세포화된 혈관 스캐폴드의 제작

탈세포화된 혈관 스캐폴드를 만드는 방법은 Kaushal 등<sup>13</sup>이 보고한 방법으로 제작하였다. 혈관 스캐폴드는 내경 3mm, 길이 40mm로 제작하였는데, 다음과 같은 과정을 거쳐 제작하였다. 혈관을 공여하는 개를 실험 전날부터 금식시킨 후 전신 마취 하에 목의 중앙부를 종으로 절개하여 양 측 경동맥을 약 10 cm 길이로 잘라내어 증류수에 담근 상태로 약 1시간가량 보관하면서 혈관내의 혈액 성분들을 씻어낸 후, 혈관을 증류수에서 꺼내어 0.5% (vol/vol) Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 과 0.05% (vol/vol) ammonium hydroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)가 섞인 증류수에 넣고 4°C에서 3일간 흔들어 주었다. 탈세포화 용액을 제거하기 위하여 혈관을

꺼내어 증류수에 넣고  $4^{\circ}$ C에서 3일간 흔들어 주면서 용액을 씻어내었다. 다 씻어내고 난 후에 혈관을 동결건조 하였으며, ethylene oxide가스로 실온에서 소독하였다.

#### 3. DNA quantification

개의 경동맥에 대한 탈세포화 과정이 완전히 이루어 졌는지를 확인하기 위하여 탈세포화된 혈관 스캐폴드의 총 DNA 함량을 측정하여 간접적으로 세포의 제거율을 측정하였다. 조직으로부터의 DNA 분리는 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI)을 이용하였다. DNA 함량은 자외선 흡수 spectrophotometry로 260nm에서 측정하였고, 개의 원래 경동맥의 DNA 함량과 비교하였다.

#### 4. 골수 세포의 획득 및 배양

혈관을 이식 받을 피 실험동물을 실험 전날 밤부터 금식시킨 후 주사 마취 후에 피 실험동물의 장골 부위를 깨끗하게 면도하고, 베타 단과 알콜로 깨끗하게 소독하고 무균적으로 준비를 한 후 골수 체취용 주사 바늘과 30cc 주사기를 이용하여 골수 세포를 약 30 mL정도 획득하였다. 획득한 골수 ml당 heparin 1000 unit을 섞어준 후, Ficoll-Paque density gradient (Amersham Pharmacia, Arlington Heights, IL, USA)에서 20분간 1500 rpm으로 원심분리 하였다. 혈장성분과 Ficoll 시약사이의 buffy coat 층에서 단핵세포들만을 분리해낸 후, 분리해낸 단핵세포층을 phosphate buffered saline solution (Sigma, St. Louis, MO)으로 3번 씻어 주었다. Smooth muscle a -actin 양성 세포들은 10% (vol/vol) fetal bovine serum(FBS) 혈청과 1% (wt/vol) penicillin과 streptomycin을 함유한 M199 배지

(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에서 배양하였다. 골수 단핵세포들 중에서 vWF와 CD31에 양성인 세포들은 1ug/cm2 의 human fibronectin (Sigma, St. Louis, MO)이 coating된 배양 접시에서 배양하였는데, human vascular endothelial growth factor (VEGF; 10ng/ml; Pepro Tech, Rocky Hill, NJ), human fibroblast growth factor (bFGF; 2ng/ml; Pepro Tech, Rocky Hill, NJ), human epidermal growth factor (10ng/ml; Pepro Tech, Rocky Hill, NJ), human insulin-like growth factor (5 ng/ml; Pepro Tech, Rocky Hill, NJ)와 ascorbic acid가 첨가된 EBM-2 (Clonetics, San Diego, CA) 배지에서 배양하였다. 배지는 2일에 한 차례씩 교체 해 주었다.

#### 5. 골수 세포 특성 확인

배양된 골수 세포들은 면역 조직화학 염색을 시행하였는데 혈관 평활근과 유사한 세포들을 확인하기 위하여 smooth muscle a -actin(DAKO, Carpenteria, CA)에 대한 항체를 이용하여 면역 조직 화학 검사를 시행하였고, 혈관 내피세포와 유사한 세포를 확인하기 위하여 von Willebrand factor (vWF; DAKO, Carpenteria, CA)와 CD 31에 대한 항체 (DAKO, Carpenteria, CA)를 이용하였다.

#### 6. 골수 세포 표지

배양된 골수 세포들을 표시하기 위하여 fluorescent carbocyanine 염료인 Cell Tracker chloromethyl-1,1'-dioactadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (CM-Dil; Molecular Probes, Eugene, OR) 1 ug/ml에 37°C에서 5분간, 그리고 4°C에서 15분간 배양하였다. 형광 염료로 표시된 세포들은 PBS 로 3 차례 씻어낸 후 혈관 스캐폴드에 이식되었다.

#### 7. 혈관용 스캐폴드와 배양된 골수 세포를 이용한 인공 혈관의 제작

골수 세포들로부터 분화된 smooth muscle α-action 양성인 세포와 vWF/CD31 양성인 세포들을 혈관 스캐폴드에 이식할 만큼의 충분한 세포를 얻기 위하여 혈관 스캐폴드에 이식하기 전에 3주간 배양하였다. 배양된 골수 세포들은 3주 동안에 2차례의 passage를 거쳤다. 3주간의 배양이 끝난 세포들은 혈관 스캐폴드에 이식하였는데, Smooth muscle α-actin 양성인 세포들을 세포 농도 3 x 10<sup>7</sup> cells/ml로 소구경 혈관 스캐폴드의 바깥쪽에 고르게 이식하였다. 2시간 후에 vWF/CD31 양성인 세포들을 세포 농도 1 x 10<sup>7</sup> cells/mL의 농도로 소구경 혈관 스캐폴드의 내부에 고르게 이식하였다. 골수세포들이 이식된 혈관 스캐폴드의 내부에 고르게 이식하였다. 골수세포들이 이식된 혈관 스캐폴드는 20% (vol/vol) FBS와 VEGF (10ng/mL), 그리고 bFGF (2ng/mL)가 섞인 M199 배지에서 1 주일간 배양 하였다. 배양 기간 동안에 배지는 매일 교체 해 주었다.

#### 8. 주사 전자 현미경 검사

골수 세포를 이식하고 1주일간의 배양을 마친 인공 혈관의 일부분을 잘라내어 1% (vol/vol) buffered glutaraldehyde와 0.1% (vol/vol) buffered formaldehyde에 각각 30분과 24시간 동안 고정하였다. 인공혈관조각에서 수분을 제거한 후 Scanning electron microscope (JSM-6330F;JEOL, Tokyo, Japan)으로 인공 혈관의 내부 표면에 대한 검사를 시행하였다.

#### 9. 봉합 유지력 (suture retention strength)

골수 세포를 이식하여 만들어진 인공 혈관의 봉합 유지력을 Instron 기계적 물성 검사기(mechanical tester; Instron 4465;

Instron, Canton, MA)를 이용하여 Hoerstrup 등<sup>26</sup>이 보고한 것과 같은 방법으로 측정하였다. 인공 혈관의 한쪽 끝을 Instron tester의 겸자에 고정한 후, 혈관의 다른 쪽 끝을 봉합사인 4-0 prolene (Ethicon, Somerville, NJ)을 이용하여 다른 겸자에 연결하였다. 측정은 cross-head 속도를 10 mm/min으로 하여 최대 압력 100-Newton으로 측정하였다. 인공 혈관이 완전히 찢어질 때 까지 장력을 가하였으며 혈관의 파열 강도를 기록하였다.

#### 10. 제작된 조직공학적 인공혈관의 생체 이식 실험

골수 세포를 공여하였던 피실험동물을 수술 전 날 밤부터 금식시 킨 후 ketamine을 이용하여 주사 마취 후 기관 삽관을 시행하고 인 공호흡기에 연결하여 기계 호흡을 시행하였다. 수술 중 마취의 유지 는 isoflurane을 이용한 호흡 마취로 유지하였다. 실험동물의 목부위 를 깨끗이 면도한 후 베타딘과 알코올로 수술 부위를 깨끗이 소독하 였다. 목중앙을 종으로 정중 절개하여 좌측 및 우측 경동맥을 노출시 킨 후, 혜파린(중외제약, 서울)을 kg당 100 unit로 정맥 주사하고 5분 후에 총경동맥의 근위부와 내,외 경동맥으로 분지 되는 부위를 혈관 겸자로 잡은 후 4 cm길이의 총경동맥을 제거하였다. 먼저 좌측에 제 거된 총경동맥 부위에는 골수 세포를 이식한 조직공학적 인공혈관을 이식하였고(실험군), 우측에는 대조군으로 골수 세포를 이식하지 않 은 탈세포화된 혈관용 스캐폴드만을 이식하였다. 혈관의 문합은 prolene 6-0 (Ethicon, Somerville, NJ)를 이용하여 연속 봉합 하였 다. 혈관 문합이 끝나면 공기를 제거한 후에 혈관 겸자를 풀고 혈류 를 개통시킨 후 상처를 봉합하고 항생제와 진통제를 투여한 후 사육 장에서 관찰하였다. 동물의 관리는 연세대학교 의과대학 실험동물위 원회 (Committee for the Care and Use of Laboratory Animals)의 방침에 따라 인도적으로 시행 하였다.

#### 11. 이식된 혈관의 개통성 검사

혈관 이식 후 매일 경동맥의 맥박을 촉지하여 혈관의 개존 상태를 간접적으로 확인하였으며, 1주일마다 혈관 조영술을 시행하여 혈관의 개존 및 협착 유무를 확인하였다. 경동맥 촉지상 혈관 폐쇄가의심이 되면 혈관 조영술을 시행하여 폐쇄 유무를 확인하였다.

#### 12. 이식된 인공 혈관들을 적출한 후의 검사

혈관 조영술로 혈관 폐쇄를 확인하면 헤파린을 5000 unit 정맥 주사한 후 피 실험동물을 안락사 시키고 자가 혈관을 포함한 이식 혈관을 적출 하였고, 8주까지 인공혈관의 개통성을 유지한 실험동물 들은 안락사를 시킨 후 자가 혈관을 포함한 이식혈관을 적출하였다. 적출한 혈관조직의 일부를 glutaraldehyde에 담가 보관한 후 주사 전자 현미경 검사를 시행하여 혈관의 내피 세포층을 관찰하였으며. 획득한 혈관조직의 나머지 부분은 10% (vol/vol) buffered formalin 에 고정하였으며 ethanol을 이용하여 탈수 시켰다. 포르말린에 고정 된 조직을 paraffin에 포매 하였으며, 파라핀에 포매된 조직을 4µm의 두께로 잘라서 조직 슬라이드를 제작하였다. 적출한 인공 혈관의 조 직학적 구조를 살피기 위하여 Hematoxylin and Eosin (H & E) 염 색을 시행하였고, elastin과 collagen성분의 확인을 위하여 van Gieson's elastin 염색과 Masson's trichrome 염색을 시행하였다. 또한 면역 조직화학 염색을 시행하였는데, avidin-peroxidase system (Vectastain Elite ABC kit)을 이용하여 vWF와 smooth muscle a-actin에 대한 염색을 시행하였고, CD31에 대한 검사를 시 행하였다. 또한 생체 이식 전에 CM-Dil로 표시하였던 세포들은 형 광 현미경(Eclipse E 800; Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 생체 내 이식전과 후를 비교 분석하였다. 획득한 인공 혈관의 모든 검사 는 인공 혈관의 가운데 부위에서 검체를 획득하여 시행함으로써, 주 변 정상 혈관으로부터의 세포 증식 가능성을 배제한 상태로 분석을 시행하였다.

# 13. eNOS의 측정

Han 등<sup>27</sup>이 밝힌 바와 같이 혈관에서 혈관 세포들을 분리해 낸후에 이로부터 단백질을 추출해내고, eNOS 단백질에 대한 Western blotting을 시행하여 혈관 내피 세포의 eNOS 발현을 조사하였다. <sup>28,29</sup> eNOS의 측정은, 생체에 이식하기 전에 정상의 경동맥과 조직공학적 인공혈관의 eNOS단백질 발현을 비교하고, 생체에 이식하기 전과 이식 후 4주가 지난 다음에 혈관을 획득하여 eNOS 발현량의 변화를 관찰하였다.

#### 14. 통계적 분석

결과는 평균 ± 표준 편차로 나타내었고, 통계적인 분석은 student t-test를 시행하였으며, InStat software (InStat 3.0; GraphPad Software Inc, San Diego, CA)를 이용하여 분석하였다. p값이 0.05 이하일때 통계적으로 의의가 있는 것으로 간주하였다.

# Ⅲ. 결 과

#### 1. 탈세포화된 혈관용 스캐폴드

개의 경동맥을 적출하여 탈세포화 한 후 내경 3mm, 길이 40mm의 혈관용 스캐폴드를 만들었으며(Fig. 1), 이를 실험에 이용하였다.



Fig. 1. A gross view of decellularized canine carotid artery (length = 40 mm, internal diameter = 3 mm). The scale is in centimeters.

탈세포화된 혈관 스캐폴드는 개 경동맥의 세포 성분들이 제거되고 원래 경동맥의 세포외 기질(extracellular matrix)만이 남아 있었다. H & E 염색에서 탈세포화 과정을 거친 혈관 기질은 세포 성분이 남아 있지 않았다(Fig. 2A). 또한 van Gieson's elastin 염색을 하였을 때 혈관의 세포외 기질이 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수가 있었다 (Fig. 2B).

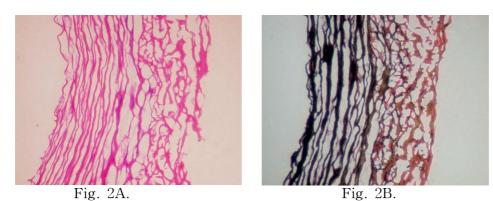


Fig. 2. Histological analysis of decellularized canine carotid artery. A: H & E staining showed complete removal of cellular components from canine carotid artery (x100). B: van Gieson elastin staining showed well-preserved elastin layers in the decellularized matrix (x100).

주사 전자 현미경을 이용하여 검사한 탈세포화 된 혈관 스캐폴드의 특징으로는 이식한 세포들이 부착하고 자라 들어가기 적합한 다공성의 구조를 나타내었다(Fig. 3A). 또한 주사 전자 현미경을 이용하여탈세포화 된 스캐폴드의 내면을 검사한 결과 혈관 내피 세포가 존재하지 않음을 확인하였다(Fig. 3B).

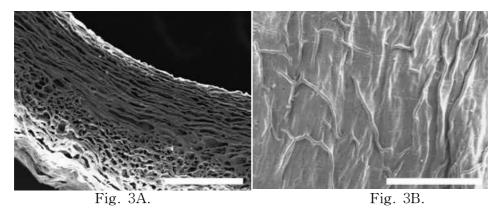


Fig. 3. Scanning electron microscopic finding.

A: Scanning electron microscope of the cross-section of the matrix

(x 200). B: Scanning electron microscopic finding of the luminal surface of the matrix (x 250). The scale bar indicate 200  $\mu$ m.

Mercury porosimetry를 이용하여 탈세포화 된 혈관용 스캐폴드의 다공성의 정도를 측정한 결과 탈세포화 된 스캐폴드의 66.8%가 다공성의 구조였으며, 구멍의 크기는 주로 직경 20 /m 이하였다(Fig. 4). 이러한 크기의 구멍은 세포들이 부착하여 이동하고 속으로 자라 들어가기 좋은 구조라고 생각하였다.

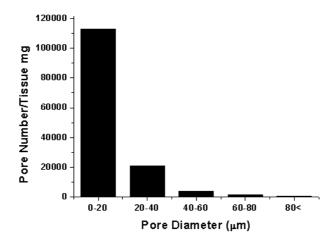


Fig. 4. Pore size distribution of the decellularized matrix as determined by mercury porosimetry. The average pore diameter of the matrix was approximately 17.3  $\mu$ m.

탈세포화 된 혈관용 스캐폴드의 DNA 함량을 측정한 결과, Triton-X로 처리하였을 때 거의 모든 세포 성분들이 제거된 것으로 나타났는데, 탈세포화된 혈관용 스캐폴드의 DNA함량은 정상 경동맥조직의 DNA 함량의 1.7% 밖에 되지 않았다(Fig. 5).

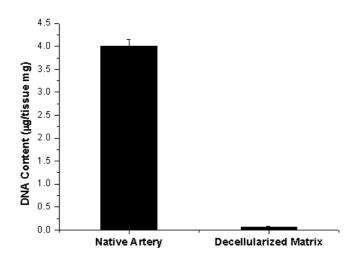


Fig. 5. DNA assay. DNA assay showed that the DNA content in the decellularized matrices (0.07  $\pm$  0.01 g/tissue mg) was about 1.7% of that in native carotid arteries (4.00  $\pm$  0.14 g/tissue mg), which indicated almost cellular components in the matrices were removed.

# 2. 골수로부터 분리된 혈관 세포들

vWF와 CD31 양성인 세포들을 EBM 배지에서 배양하였고, smooth muscle α-actin 양성인 세포들은 M199 배지에서 배양하였다. 각각의 배지에서 3주간 배양한 후에 EBM 배지에서 배양하였던 세포들은 혈관 내피세포의 특징적인 모습인 cobble stone 모양을 나타내었으며 (Fig. 6A), 이 세포들은 vWF(Fig. 6B)와 CD31(Fig. 6C) 항체를 이용한 면역 조직화학 염색에 양성 반응을 나타내었다.

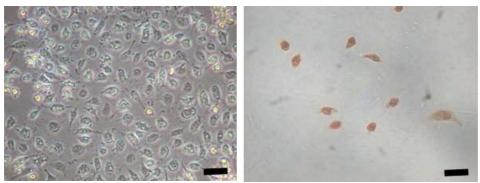


Fig. 6A. Fig. 6B.



Fig. 6C.

Fig. 6. Characterization of bone marrow-derived cells cultured in endothelial-like cell culture condition. A: Bone marrow cells expanded in endothelial-like cell culture condition showed cobblestone morphology of typical endothelial cells (x100). B: Cultured endothelial-like cells stained positively for vWF (x100). C: Cultured endothelial-like cells stained positively for CD31 (x100). The scale bars indicate 10  $\mu$ m.

3주간의 골수세포 배양 후에 M199 배지에서 배양하였던 세포들은 혈관 평활근과 유사한 모양을 나타내었으며(Fig. 7A), smooth muscle a-actin(Fig. 7B)과 smooth muscle myosin heavy chain(Fig. 7C) 항 체를 이용한 면역 조직화학 염색에 양성 반응을 나타내었다.

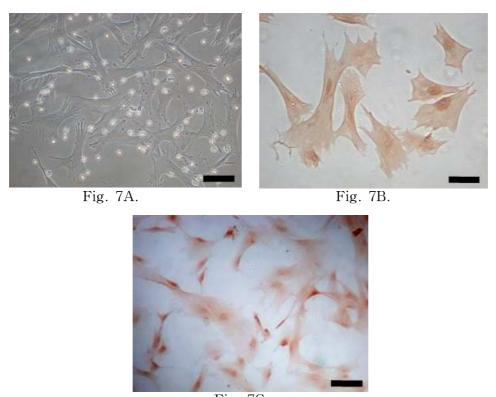


Fig. 7C.

Fig. 7. Characterization of bone marrow-derived cells cultured in smooth muscle-like cell culture condition. A: Bone marrow cells expanded in smooth muscle-like cell culture condition had morphologically similar to that of mature smooth muscle cells (x100). B: Cultured smooth muscle-like cells stained positively for smooth muscle  $\alpha$ -actin (x100). C: Cultured smooth muscle-like cells stained positively for smooth muscle myosine heavy chain (x100). The scale bars indicate 10  $\mu$ m.

이러한 결과들은 골수 세포들로부터 조직 공학적인 혈관 제작에 필 요한 혈관 내피 세포들 및 혈관 평활근 세포들의 분화가 가능함을 보 여주었다. 3. 배양된 골수 세포와 탈세포화된 혈관 스캐폴드로 만든 인공 혈관

골수 세포들로부터 분화한 세포들 중, 혈관 내피 세포로 분화하기를 희망하였던 혈관 내피 세포와 유사한 세포들은 탈세포화된 혈관스캐폴드의 내면에, 혈관 평활근세포로 분화하기를 희망하였던 혈관 평활근세포와 유사한 세포들은 탈세포화 된 혈관 스캐폴드의 바깥쪽에 이식한 후에 배지에서 1주일간 배양을 하면서, 세포들이 혈관 도관에 생착할 수 있도록 하였다(Fig. 8)



Fig. 8. A gross view of tissue-engineered vascular graft 1 week after bone marrow cell seeding. The scale is in centimeters.

생체 밖에서 1주간 배양한 후 주사 전자 현미경으로 검사하였을 때혈관 도관의 내면에 혈관내피 세포와 유사한 세포들이 풍부하게 붙어있는 것을 확인하였다(Fig. 9).

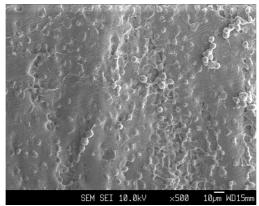


Fig. 9. Scanning electron microscopic finding of the luminal surface of the vascular graft 1 week after cell seeding (x500). The scale bar indicates 10  $\mu$ m.

또한 1주간 생체 밖에서 배양한 혈관 도관의 단면을 잘라서 H & E 염색을 하였을 때 대부분의 세포들이 혈관 내막과 외막 주위에 분 포되어 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 10).

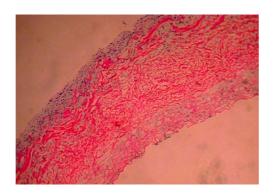


Fig. 10. H & E staining of the vascular graft 1 week after cell seeding indicate that most of the seeded cells were distributed near the intima and adventitia of the scaffold (x 100).

#### 4. 혈관 봉합 유지력 (vascular suture retention strength)

인공 혈관을 제작하여 1주간의 추가 배양기간이 지난 후에 생체 이식 직전에 인공 혈관의 일부를 떼어서 검사한 봉합 유지력 검사에서, 자가 골수세포와 탈세포화된 혈관 스캐폴드로 만든 인공 혈관은 606 ± 98g의 봉합 유지력을 나타내었으며(n=4), 이는 정상혈관의 평균값인 753 ± 112g 봉합 유지력 보다는 약하나(n=4) p 값은 0.07로 두 군간의 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 11). 이는 만들어진 인공혈관이혈관 문합 부위에서 충분한 봉합 유지력을 갖는다는 의미로, 실제적으로 개의 경동맥에 이식하였을 때 혈관 문합 부위의 파열은 일어나지 않았었다.

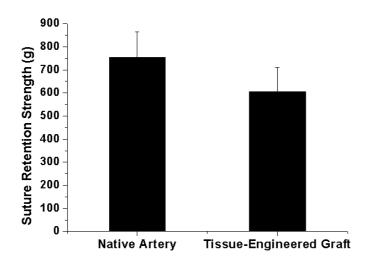


Fig. 11. Suture retention strength measurement of the tissue-engineered vascular grafts. The average value of the tissue-engineered vascular grafts (n=4) is slightly lower than that of the native canine carotid arteries (n=4), but the difference is not statistically significant (p>0.05).

# 5. 혈관 개통성

탈세포화된 혈관용 스캐폴드를 피실험동물의 경동맥에 이식한 후 (Fig. 12), 1주 간격으로 시행한 혈관 촬영상, 탈세포화 된 혈관 스캐폴드만을 이식한 대조군 6마리 중 4마리는 모두 1주 이내에 인공 혈관이 막힌 것을 확인 할 수 있었으며(Fig. 13A), 1마리는 스캐폴드가확장되어 동맥류를 형성하였고, 1 마리는 2 주에 혈관이 막힌 것을확인하였다. 그러나 자가 골수 세포를 이식한 실험군의 경우(n=6), 1마리는 2주에, 1마리는 6주에 막힌 것을 확인하였으나, 나머지 4마리는 8주까지 개통성을 유지하였다(Fig. 13B). 혈관의 막힘을 확인하고적출한 혈관들은 혈관이 다량의 혈전들에 의해 완전히 막혀 있음을확인할 수 있었다.

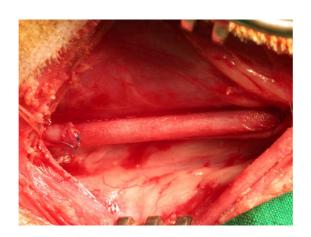


Fig. 12. Surgical implantation of the tissue-engineered vascular grafts. The grafts were interposed to common carotid artery by the end-to-end anastomosis in canine models.

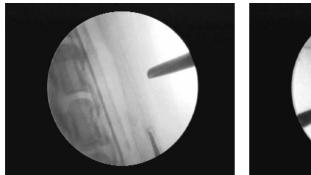


Fig. 13A. Fig. 13B.

Fig. 13. Carotid artery angiogram of implanted tissue-engineered grafts. A: Angiogram of the control graft(without bone marrow cell seeding) revealed occlusion of the graft 2 weeks after implantation. B: Angiogram of the bone marrow cell seeded vascular graft 8 weeks after implantation: the graft maintain patency without occlusion.

#### 6. 생체 내에서의 혈관 조직 재생

생체 내에서 개통성을 유지하였던 실험군의 혈관을 제거하였을때 대조군과 유사한 외견을 보였으며, 혈관의 단면도 정상의 혈관과 유 사하게 재생되어 있었다(Fig. 14).



Fig. 14A.

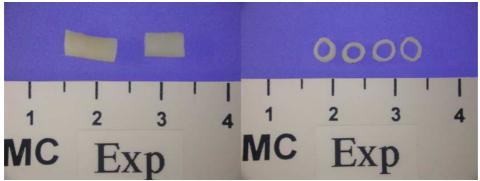


Fig. 14B.

Fig. 14. Photograph of retrieved implanted vessels 4 weeks after implantation. A: Control vessel – native canine carotid artery. B: Experimental vessel – tissue engineered artificial vessel.

획득한 이들 혈관에 대하여 시행한 조직학적 검사상 혈관의 내막, 중막 그리고 외막이 재생된 것을 확인할 수 있었다. 또한 일부에서는 H & E 염색상 정상과 거의 똑같은 모양으로 혈관이 재생된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 15A). van Gieson's elastin 염색을 시행하였을 때혈관의 중막 부위에서 elastin층이 잘 발달하여 있는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 15B), Masson's trichrome 염색상 collagen 층이 풍부하게 발달하여 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 15C).

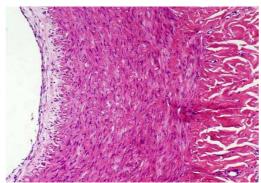


Fig. 15A.

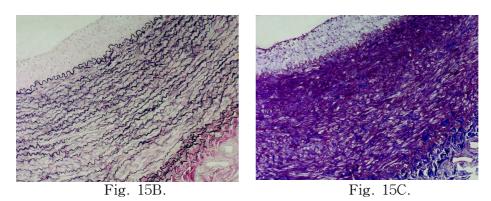


Fig. 15. Histologic evaluation of the bone marrow cell seeded vascular grafts retrieved 8 weeks after implantation. A: H & E staining of the retrieved grafts demonstrated regeneration of the 3 elements of artery(intima, media, adventitia) (x100). B: van Gieson's elastin staining showed well-preserved elastin layers (x100). C: Masson's trichrome staining showed confluent collagen (x100).

생체 내에서 재생된 혈관을 가지고 smooth muscle a-actin(Fig. 16A)과 smooth muscle myosin heavy chain(Fig. 16B) 항체를 이용하여 면역 조직화학 염색을 시행한 결과 혈관의 중막에 혈관 평활근 세포들이 잘 재생되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 H & E 염색상 혈관 내벽에 혈관 내피세포의 재생이 관찰되었으며, vWF에 대한 항체를 이용하여 시행한 면역 조직화학 검사상, 고르지는 않지만혈관 내벽의 군데군데에 강하게 양성으로 반응하는 부분들을 확인할수 있어서 혈관의 내피세포도 일부 재생된 것을 확인할수 있었다(Fig. 16C).

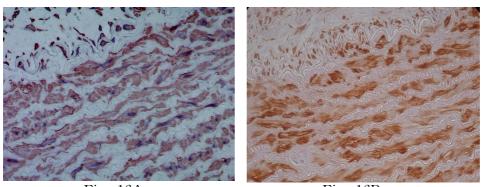


Fig. 16A. Fig. 16B.

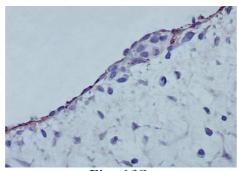


Fig. 16C.

Fig. 16. Immunohistochemical staining of the bone marrow cell seeded vascular grafts retrieved 8 weeks after implantation. A, B: Immunostaining for smooth muscle  $\alpha$ -actin and myosin heavy chain showed the presence of smooth muscle cells in medial layer (x400). C: Cells lining the lumen of the retrieved grafts stained positively for vWF (x400).

주사 전자 현미경을 이용하여 혈관의 내벽을 조사한 결과 혈관 내 벽에 혈관 내피세포로 생각되는 세포들이 재생되어 있는 것을 확인하 였다(Fig. 17).

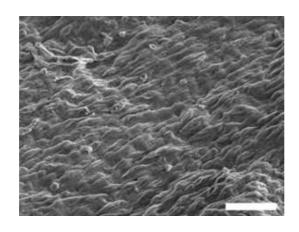


Fig. 17. Scanning electron microscopic finding of the lumen of the retrieved grafts showed for endothelial formation (x800). The scale bar indicates 30  $\mu$ m.

# 7. 이식한 골수 세포의 생체내 생존 여부

혈관 스캐폴드에 이식한 골수 세포가 생체 내에서 8주 후에 존재하는 지를 확인하기 위하여, 배양이 끝난 자가 골수세포들을 형광성을 띄는 지용성의 carbocyanine tracer (CM-Dil)로 표시한 후 탈세포화된 혈관 스캐폴드에 이식하여 인공혈관을 만들고 1주일간 추가 배양을 실시하였다. 인공 혈관을 생체에 이식하기 직전에 혈관의 일부를 잘라서 검사하였을 때, 형광으로 표시된 골수세포들이 인공 혈관 내에 존재함을 확인하였다(Fig. 18A). 인공 혈관을 생체에 이식한지 8주후에 혈관을 적출하여 확인하였을 때에는 형광으로 표시된 세포들이 혈관의 내면(Fig. 18B) 및 혈관의 중막 부위에서 고루 발견되었다(Fig. 18C).

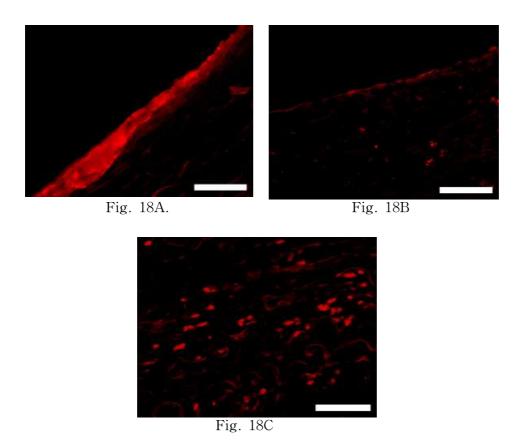


Fig. 18. Identification of implanted bone marrow cells in the tissue-engineered vascular grafts retrieved 8 weeks after implantation. A: Before implantation, the bone marrow cells labeled with fluorescent cell tracer (CM-Dil) were layered mainly on the luminal sides of the vascular grafts (x400). B: The CM-Dil labeled bone marrow cells were detected on the intimal parts of the grafts retrieved 8 weeks after implantation (x400). C: The CM-Dil labeled bone marrow cells were detected in the medial parts of the grafts retrieved 8 weeks after implantation (x400). The scale bars indicate  $50~\mu\text{m}$ .

# 8. eNOS의 측정

탈세포화된 혈관 스캐폴드에 자가 골수세포를 이식하여 1주간 배양한 후에 생체에 이식하기 직전에 측정한 eNOS의 발현도는 개의 정상경동맥에서의 발현도에 비하여 매우 적었다. 그러나 생체에 이식하여 2 개월이 지났을 때는 eNOS의 발현도가 생체 이식전에 비하여 훨씬 많이 발현됨을 알 수 있었고, 기준으로 삼아 측정하였던 개의 자가경동맥에서의 발현도보다도 오히려 많은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 19AB).

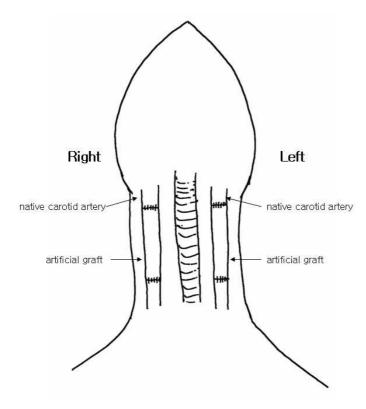


Fig. 19A.

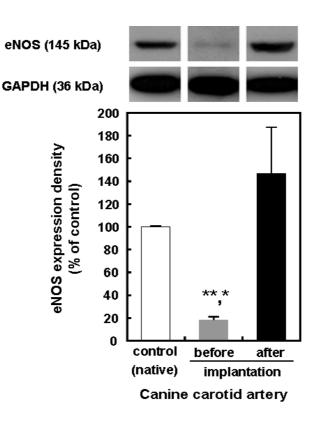


Fig. 19B.

Fig. 19. eNOS expression in tissue engineered artificial vessel.

A: Schematic diagram of implanted artificial vessel. Comparison of eNOS expression was performed between native canine carotid artery and tissue-engineered artificial graft. B: Comparison of eNOS expression between before implantation and after implantation. Eight weeks after implantation, eNOS expression was much more than pre-implantation. And also, eNOS expression was much more in artificial vessel graft than native canine carotid artery. (\*\* vs. control p< 0.005) (\* vs. artificial artery after implantation p < 0.01)

#### Ⅳ. 고 찰

현대 사회에서 관상동맥 질환이나 말초혈관 질환과 같은 혈관질환은 가장 흔한 질환으로 점차로 환자들이 증가하는 추세이다. 30 이러한 질환의 수술적인 치료는 병이 있는 혈관들을 다른 혈관으로 치환하는 것인데, 직경 5mm 이하의 소구경 혈관에는 자가 동맥이나 정맥을 이용하는 것이 장기간의 성적에 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 1 그러나 많은 환자들에서는 이미 다른 혈관들에도 병이 있거나 혹은 그 이전의 수술로 인하여 이식에 사용할 만한 좋은 혈관을 충분히 얻기가 쉽지 않다. 이러한 이유로 그 동안 소구경 인공혈관을 만들려는 많은 노력이 있었는데, 상품화 되어있는 polyethyleneterephthalate 나 polytetrafluorethylene은 직경이 6 mm 이상 되는 혈관에서는 성공적으로 사용되고 있지만, 직경이 5 mm 이하인 혈관에서는 인공 혈관내의 혈전생성 및 인공 혈관의 조기 폐쇄로 인해 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있다. 431.32

직경 5 mm 이하의 소구경 인공혈관을 개발하기 위한 많은 노력 중에서 조직공학적인 방법을 이용한 소구경 인공혈관의 제작은 또 하나의 가능성을 보여주고 있는데, 조직공학은 이미 화상이나 만성 상처를 치료하기 위한 재료를 생산하는데 성공하였으며, 실험적이나마 연골손상의 치료에도 효과적으로 사용될 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 혈관을 제작하기위한 조직공학적인 방법으로는 제품화된 도관에 내피세포화를 이루어주는 방법, collagen을 바탕으로 한 혈관의 제작, 섬유아세포와 혈관 평활근 및 내피세포를 이용하여 혈관의 세 층을 재생하는 방법, 생적합성 스캐폴드와 세포를 이용하여 혈관을 제작하는 방법등이 있다. Widmer 등<sup>33</sup>은 다공성의 생분해성 고분자 도관 (porous biodegradable polymer conduit) 을 이용하여 스캐폴드를 제작하였으며, Campbell 등<sup>34</sup>은 silastic 관을 쥐의 복강 내에 넣어 혈관

의 구조와 유사한 도관이 만들어지는 것을 보고하였다. Niklason 등<sup>12</sup> 은 소의 혈관을 일부 얻어 세포들을 생분해성 고분자 기질(matrix) 위에서 배양하여 생체 내에서 혈관의 기능을 일부 나타내는 혈관 도 관을 만든 후 이를 돼지에 이식하여 24일간 개통성을 유지하였음을 보고하여 혈관의 기능을 갖는 조직공학적 인공혈관의 가능성을 보고 하였다. 그러나 이러한 방법들로는 혈관의 물리적인 특성은 어느 정 도 갖출 수 있지만, 혈관의 생리적인 기능은 갖추기 어렵다. 따라서 이를 극복하기 위해 피 실험동물의 자가 세포를 얻어 이를 배양한 후 배양된 세포들을 제작된 혈관 스캐폴드에 입혀 세포가 생존하게 함으 로써 혈관의 생리적인 기능까지도 갖추도록 하는 연구들이 진행되었 는데, Zund 등<sup>35</sup>은 생흡수성 mesh위에 사람의 섬유아세포와 내피세포 를 부착하여 배양이 가능함을 보고하였고, Bhattacharya 등<sup>25</sup>은 polyester 도관위에 CD34+ 골수세포를 이식하였을 때 도관의 내피세 포화 및 미세 혈관생성이 촉진되는 것을 보고하였다. 또한 이러한 기 술을 입상에 응용한 예로는 Deutsch 등<sup>36</sup>이 대퇴동맥과 슬와동맥 사 이가 막힌 환자들에서 expanded polytetrafluoroethylene graft에 자가 내피세포를 이식한 후 이를 환자들에게 이식하여 내피세포를 이식한 인공도관을 사용한 환자군과 내피세포를 사용하지 않고 인공도관만을 이식하였던 환자군들의 9년 개존률을 비교하였을 때, 65% vs. 16%로 내피세포를 이식한 후 이식한 인공도관의 개존률이 월등히 우수함을 보고하였다. 또한 Laube 등<sup>37</sup>은 4 mm polytetrafluouethylene graft에 자가 내피세포를 이식한 후 14명의 환자들에서 관상동맥 우회로술을 시행하였는데, 평균 27.7 개월, 최장 48개월까지의 개통율이 90.5%로 만족할 만 하였다고 보고하였다. 그러나 그 이후의 장기간의 임상결 과는 보고된 바가 없으며, 일반적으로 아직까지는 직경 5 mm 이하의 인공혈관을 사용하였을 때 장기간의 개통율은 좋지 않은 것으로 알려 져 있다.

본 연구자가 고안하여 제작한 인공혈관은 자가 골수간엽 줄기세포와 조직 공학적 방법을 접목시켜서 제작한 것으로, 아직 자가 골수세포와 조직 공학을 이용한 방법으로 혈관을 제작한 예는 보고 된바없다.

본 연구에 사용된 탈세포화된 혈관 스캐폴드는 Kaushal 등<sup>13</sup>이 보고한 방법으로 제작하였는데, 혈관 조직을 탈세포화 시킨 후에 H & E 염색이나 van Gieson's elastin 염색과 같은 조직학적 검사를 시행하였을 때, 탈세포화 된 후에도 세포의 기질이 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 탈세포화를 시키기 위하여 Triton X-100이라는 비이온성 용매를 이용하였는데, Schmidt 등<sup>38</sup>이보고한 바와 같이 탈세포화 후에 elastin과 녹지 않는 collagen등으로 구성된 혈관용 스캐폴드가 만들어 졌는데 다공성의 구조를 가지고 있었다. Bader 등<sup>39</sup>에 의하면 탈세포환된 혈관의 이러한 구조적인 단백질들 및 다공성의 구조는 혈관 세포들이 자라 들어가는데 생리적으로 적합한 환경을 제공할 수 있다고 하는데, 생체내에 이식하기 전에 시행한 조직학적 검사와 주사 전자 현미경 검사상 골수세포들이 스캐폴드에 골고루 퍼져 있는 것을 확인함으로써 만들어진 혈관용 스캐폴드가 세포의 부착 및 생존에 효과적인 역할을 한다는 것을 확인하였다.

Allaire 등<sup>40</sup>은 생체 내에서 동종의 혈관을 이식하였을 때 세포외 기질이 낮은 정도의 면역 반응을 일으킨다고 보고하여 동종의 탈세포화된 혈관 스캐폴드도 면역 반응을 일으킬 수 있음을 보고하였다. 그러나 Hawkins 등<sup>41</sup>의 연구에서는 조직 내에서 세포들이 모두 제거된 탈세포화된 조직은 면역 반응을 일으킬 수 있는 항원 결정체가 없기 때문에 생체 내에서 면역 반응이 일어나지 않는다고 보고하였고, Kaushal 등<sup>13</sup>의 보고에서도 면역반응에 대한 염려는 없는 것으로 보고 되었다. 이론적으로는 탈세포화가 완전히 이루어진다면 이종의 조직을 이용한 혈관용 스캐폴드의 이용도 가능하지만, 혹시라도 면역반

응에 의한 효과가 나타나는 것을 줄이기 위하여, 본 연구에서는 동종의 조직만을 이용한 혈관용 스캐폴드를 제작하여 사용하였다. 본 연구에서 탈세포화된 혈관 스캐폴드와 자가 경동맥 조직의 DNA양을 비교하여 탈세포화의 정도를 확인하였을때, 탈세포화 된 혈관 스캐폴드의 DNA양은 정상 조직의 1.7%로 거의 모든 세포들이 제거되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 탈세포화된 동종 조직을 이용하여 혈관을 동종의 동물에 이식하는 것은 면역학적으로 큰 문제는 일어나지 않으리라고 생각된다. 그러나, 본 연구에서는 면역반응에 대한 검사는 시행하지 않았기 때문에 면역 반응에 대한 확실한 결론을 내리기는 어려우며, 향후 추가적인 검사를 통하여 탈세포화된 동종의 혈관 스캐폴드에 대한 면역학적인 검사를 시행하는 것이 안정성의 확보에 중요하리라 생각한다.

Treenwald 등<sup>42</sup>은 인공 혈관의 기계적인 물성이 혈관 도관의 장기간 개통성에 영향을 주는 매우 중요한 요소 중 하나라고 하였고, Ballyk 등<sup>43</sup>은 인공 혈관과 자가 혈관 조직간의 탄력성의 차이가 혈관 내막의 중식을 유발하고 인공 혈관의 폐쇄를 일으킨다고 하였다. Conklin 등<sup>44</sup>은 탈세포화 된 돼지의 경동맥과 정상 돼지 경동맥을 비교한 후 두 조직간에 유순도 및 파열압력이 유사하다고 하여 탈세포화 된 조직이 정상 혈관과 비슷한 기계적 물성을 보임을 보고하였다. 본 연구에서는 혈관의 봉합 유지력을 측정하여 기계적 물성을 측정하였는데, 탈세포화 된 혈관 스캐폴드에 배양된 자가 골수 세포를 이식하고 1주일간의 추가 배양기간을 거친 후에 생체에 이식 직전에 검사를 시행하였다. 봉합 유지력은 평균 약 600g로서 정상 조직의 봉합유지력인 753g보다는 적었지만 통계적인 차이가 없었고, Niklason<sup>12</sup> 및 Hoerstrup 등<sup>26</sup>이 보고한 생분해성 합성 고분자를 이용한 조직공학적 인공혈관들의 봉합 유지력에 비하여 훨씬 강한 혈관 봉합 유지력을 보여 주었다. 인공 혈관을 생체에 이식한 후에 혈관 스캐폴드에

이식한 세포들이 더 증식할 것으로 기대한다면, 혈관의 기계적인 물성이 대부분 혈관의 세포외 기질에 영향을 받는다고 생각할 때, 생체이식 후에 인공 혈관의 기계적 물성은 더 좋아질 수 있을 것이라고기대된다. 따라서 기계적 물성의 측면에서 볼 때 탈세포화된 혈관 스캐폴드를 이용한 혈관은 임상에 쓰기에 적합할 것이라고 생각된다.

혈관의 재생 및 허혈성 조직에 있어서의 혈관 재생에 관여하는 골 수세포의 역할에 대하여는 최근에 많은 연구들이 있어 왔는데, 동물 실험에서 골수 세포에 혈관내피세포 및 혈관 평활근 전구세포가 있어 cytokine등에 의해 자극되었을 때 혈관내피 전구세포들이 허혈성 조 직으로 이동하여 신생 혈관을 만든다는 연구의 결과들에 근거하여 골 수세포가 혈관 재생의 중요한 근본 세포로 사용될 수 있다는 연구결 과들이 제시되었다. 18,19,22,23 Tateishi 등 45은 골수에서 분리한 AC-133양 성인 세포들을 이용하여 허혈성 족부 질환 환자들에서 세포 치료에 이용하였을 때 신생 혈관들이 자라남을 보고하였고, Stamm 등<sup>46</sup>은 골 수 세포를 이용한 이러한 연구가 심근 경색의 심장에 사용되었을 때 신생혈관이 생겨난다고 보고하였다. 이러한 결과들은 골수세포들이 혈관을 형성하는 각각의 세포들로 분화할 수 있다는 것을 의미하는 것으로 이러한 결과들은 조직 공학적 혈관 재생에 그대로 응용될 수 있다. 이제까지의 연구 결과 몇몇 연구에서 혈관 내피세포와 유사한 세포 및 혈관 평활근세포와 유사한 세포들이 골수세포로부터 유도될 수 있다는 것들이 밝혀졌고,<sup>6,17,20,21</sup> 또한 Matsumura 등<sup>47</sup>은 조직 공학 적 방법으로 대구경 혈관을 만들어서 임상에 적용한 증례를 보고하여 자신의 골수세포를 이용한 조직 공학적 혈관 재생의 가능성을 보고하 였다. 본 연구에서는 골수의 단핵구들을 이용하여 체외에서 배양하였 을 때 혈관의 평활근 세포 및 혈관 내피세포의 표지 인자를 나타내는 세포들이 골수 간엽 줄기 세포로부터 분화하는 것을 확인할 수 있었 고, 이를 생체에 이식하였을 때 정상의 혈관과 유사한 구조를 형성하 는 혈관의 재생을 확인하여 자가 골수 세포가 조직공학적 혈관 재생 의 중요한 세포 공급원이 될 수 있음을 확인하였다. 또한 인공혈관의 생체내 이식 전과 8주 후에 확인한 형광 염색 검사에서, 이식 전에 혈관의 내측과 바깥쪽에만 위치하던 형광표시인자가 8 주후에는 혈관 의 중막으로도 이동한 것을 확인할 수 있었고, 이는 이식한 골수세포 들이 혈관의 벽을 이루기 위하여 이동하며 증식한다는 것을 의미하 며, 골수세포가 혈관의 재생에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 의미 한다. Kaushal 등<sup>13</sup>은 양의 말초 혈관에서 혈액을 뽑아서 이중 혈관 내피전구세포를 분리해 낸 후 탈세포화된 혈관에 이식하고, 이를 생 체내에 이식하여 130일간 혈관의 개통성이 유지됨을 보고하였다. 그 러나 실제적으로 혈관 내피 전구세포만을 이용하였을 때 혈관도관벽 내에서 혈관 평활근의 재생이 충분히 이루어지기 어렵고, 또한 말초 혈액 내에서 충분한 양의 혈관 내피 전구세포를 얻는 것이 어렵다. 따라서 자가 골수세포를 혈관 재생의 세포 공급원으로 사용한다면, 반복적인 세포의 획득이 가능하며, 한 번의 골수 채취로 혈관의 내피 세포와 평활근세포를 동시에 분화시킬 수 있고, 또한 분열 능력이 우 수한 줄기 세포를 사용하기 때문에 충분한 수의 세포를 얻을 수 있는 등, 기존의 연구에서 약점으로 제기된 여러 가지 문제점들을 동시에 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 사용한 탈세포화된 혈관 스캐폴드는 다공성의 구조인데, 대개 20µm 이하인 구멍들은 이식한 골수 세포들이 잘 자라 들어가서 부착 될 수 있는 환경을 제공하였다. 인공 혈관을 생체에 이식한지 8주 후에 적출한 혈관에서 형광으로 표시된 골수세포들이 혈관의 내면 및 혈관의 중막 부위에서 고루 발견되었는데, 이러한 결과는이식된 세포들이 살아서 혈관의 재생에 기여하며, 다공성의 구조를통하여 이동하면서 혈관의 재생에 기여함을 나타내는 것이라고 생각할 수 있다. 형광 염색의 강도가 감소하는 것은 이식된 세포들이 혈

관의 중막으로 이동하기도 하고, 일부는 혈관 벽에 함입된 형광물질이 세포 분열로 인하여 희석되는 것에 기인한다고 생각된다.

본 연구 결과에서 나타난 것처럼, 혈관 스캐폴드에 세포를 이식하여 만든 인공혈관은 혈관 스캐폴드만을 이식하였던 경우에 비하여 8주 간의 개통성이 월등하게 우수하였다. 이러한 결과는 Bhattacharya 등 <sup>25</sup>의 연구와 맥락을 같이 하는 것으로, 이들의 연구는 흡수되지 않는 고분자 혈관 스캐폴드에 CD34 양성인 골수세포들을 이식하였을 때 골수 세포들을 이식하지 않은 경우에 비하여 혈관 내피세포화가 우수 하였다는 것을 보고한 것으로 혈관벽의 내피세포화가 중요함을 강조 한 연구 결과이다. 그러나 혈관벽의 내피세포화는 이식한 세포들의 혈관내 생착 여부와 중요한 관련이 있는데, 이식한 세포들의 생착 여 부는 특히 세포의 이식 방법 및 이식 후 배양 조건에 많은 영향을 받 는 것으로 알려져 있다. Rosenman 등<sup>48</sup>에 의하면 ePTFE 인공혈관에 혈관 내피세포를 이식하였을 때, 전조건화(preconditioning)를 하지 않 는 상태에서 혈관 내피세포를 이식받은 인공혈관은 혈류에 노출되었 을 때 약 80%에 달하는 이식한 혈관 내피세포들이 씻겨져 나갔다고 보고하였다. 이러한 결과는 생체 밖에서 세포들을 이식한 후 정적인 배양상태(static culture condition)에서 혈관을 유지하는 것이, 높은 shear stress를 받는 생체내의 동맥에서 기능을 할 수 있는 혈관을 만 드는데 비효율적인 방법이라는 것을 의미한다. 많은 연구들에서 혈관 스캐폴드에 세포를 역동적으로 이식하는것(dynamic seeding)이,49 그 리고 세포가 이식된 혈관을 박동이 있는 생체반응기(bioreactor)에서 전처치 하는 것이 생체 밖에서 기능을 하는 혈관 내피세포를 만들고, 생체 내에서 혈관의 개존성을 향상 시키는 방법이라고 보고되고 있 다.<sup>13,50</sup> 이러한 연구 결과들은 생체 밖에서 조직공학적 방법으로 인공 혈관을 만들때 생체 내 환경과 유사한 환경을 만들어 줌으로써 이식 한 혈관 내피세포의 생착율을 높이는 것을 목표로 하고 있다. 혈관

내피세포의 생체내 생착율을 높이려는 노력의 일환으로 granulocyte colony stimulating factor(G-CSF)를 주사하였을 때 생체 내에서 혈관도관의 내피세포화가 증진되고, 51.52 골수로부터 말초 혈관으로의 혈관내피전구세포의 이동이 증가한다는 연구들도 진행 되고 있다. 53 따라서 조직공학적 방법과 자가 골수세포를 이용하여 혈관을 만들었을 때 G-CSF를 주사하는 것도 혈관의 개통성을 증진시키는 방법이 될 것으로 생각된다. 본 연구에서는 역동적인 세포 이식을 하지 못하고 혈관 스캐폴드에 골수세포 이식 후 1주일간 정적인 배양을 시행하였는데, 어느 정도의 이식된 혈관 내피세포들이 씻겨 졌는지는 알 수 없으나 세포를 이식하지 않은 군에 비하여 8 주간의 혈관 개통율이 우수하였고, 면역 형광 검사상 이식한 골수 세포들이 8주까지도 살아있는 것을 확인 할 수 있었으며, 또한 면역 조직검사상 혈관 내피세포화도 어느 정도 잘 이루어져 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 정적인 배양조건도 자가 골수세포 및 조직 공학적인 방법을 이용한 인공 혈관 제작에 효과적인 하나의 방법이라고 생각한다.

본 연구에서는 혈관 내피세포의 기능을 알기 위하여 eNOS를 측정하였는데 정상 혈관과 같이 조직 공학적 방법으로 만든 인공혈관에서도 eNOS 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 자가 골수세포를 탈세포화 된 혈관 스캐폴드에 이식하고 1 주일간의 정적인 배양을 거친 상태에서 생체에 이식하기 직전에 측정한 eNOS 발현정도는 정상 혈관의 수술 전 발현정도에 비하여 적었으나, 생체에 이식하고 4주가 지난 후에 획득한 혈관에서 측정한 eNOS 발현 정도는 정상 혈관과 유사하거나 오히려 훨씬 많은 eNOS의 발현을 확인할 수 있었다. 이는 인공 혈관에 이식한 혈관 내피세포와 유사한 세포들이 생체내에서 계속 살아 있으며 기능을 할 뿐만 아니라 혈관 내피세포의 꾸준한 증식이 일어나기 때문으로 생각된다. eNOS가 정상의 혈관과 유사하게 발현된다는 결과는, 자가 골수세포와 혈관 스캐폴드를 이용하

여 만든 조직 공학적 인공 혈관이 정상의 혈관과 모양 및 조직학적 구조뿐만 아니라 기능적으로도 유사하다는 것을 나타내는 결과라고 생각한다.

본 연구의 제한점은 탈세포화 된 혈관 스캐폴드에 골수세포를 역동적으로 이식하지 못하였고, 생체 반응기에서 전조건화를 시키지 못하였으며, 만들어진 인공혈관의 약물에 대한 반응 검사를 시행하지 못한 것이다. 또한 장기간의 혈관 개통성을 확인하지 못하고 단기간의 개통성만을 확인하였으므로 추가적인 연구를 통해 제한점을 극복한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

- 1. 비이온성 용매인 Triton-X를 이용한 동종 혈관의 탈세포화 결과 혈관의 세포외 기질만 남아있는 혈관 스캐폴드를 만들 수 있었으며, 탈세포화된 혈관 스캐폴드는 DNA검사결과 98% 이상의 세포들이 제거되었으며, 구멍의 크기가 20 $\mu$ m이하인 다공성의 구조를 하고 있어서, 골수세포들이 자라 들어가서 생착할 수 있는 좋은 환경을 가지고 있었다.
- 2. 골수세포의 단핵구들로부터 분리되어 EMB 배지와 M199 배지에서 증식 배양된 골수세포들은 각각 vWF와 CD31, 그리고 smooth muscle a-actin을 발현하였다. 모양도 혈관 내피세포 및 평활근세포와 유사한 모양을 나타내었다.
- 3. 탈세포화 된 혈관 스캐폴드 및 자가 골수세포를 이용하여 만든 조 직공학적 인공혈관은 생체 이식전 검사상 조직학적으로 정상 혈관과 유사한 형태를 나타내었고, 생체에 8주간 이식한 후에 제거하였을때 에도 조직학적 구조가 정상과 유사하였으며, 면역 조직화학 검사상 혈관 내피세포와 혈관 평활근세포가 잘 발달해 있는 것을 확인할 수 있었다.
- 4. 자가 골수세포를 이식한 인공혈관은 골수세포를 이식하지 않은 혈관 스캐폴드만을 이식한 군에 비하여 8주간까지의 비교에서 우수한 혈관 개통율을 나타내었다.
- 5. 탈세포화 된 혈관 스캐폴드 및 자가 골수세포를 이용하여 만든 조직공학적 인공혈관의 봉합 유지력은 정상의 혈관과 비교할 때 유사한 장력을 나타내었다.

6. eNOS의 발현정도는 생체에 이식하기 전에는 미약하였으나, 생체에 이식한 후 4주 후에 제거하였을 때 eNOS의 발현량은 정상 혈관에 비해 증가하는 경향을 보였으므로 인공 혈관의 혈관 내피세포의 기능도 정상과 유사하게 이루어짐을 알 수 있었다.

7. 형광 염색 검사상 이식한 자가 골수세포는 8주 후에도 인공 혈관 내에서 잘 생착하여 있었으며, 다공성의 구조를 따라 혈관 외벽에서 혈관벽 안으로 자라들어가는 것을 확인하였다.

8. 결론적으로 탈세포화 된 혈관 스캐폴드 및 자가 골수세포를 이용하여 만든 조직공학적 인공혈관은 만족할 만한 단기간의 생체 실험결과를 나타내었다. 그러나 추후 계속되는 실험을 통하여 골수세포를역동적으로 이식하고, 생체 반응기에서 전조건화를 시킴으로써 골수세포의 기능을 향상시키고, 생체 내에서 장기간의 혈관 개통성 및 약물에 대한 반응성을 확인하여야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1. Tu JV, Pashos CL, Naylor CD, et al. Use of cardiac procedures and outcomes in elderly patients with myocardial infarction in the United States and Canada. N Engl J Med 1997;336:1500-1505.
- 2. Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg 2002;23:475-485.
- 3. Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. J Vasc Surg 1986;3:104-114.
- 4. Chard RB, Johnson DC, Nunn GR, et al. Aorta-coronary bypass grafting with polytetrafluoroethylene conduits. Early and late outcomes in eight patients. J Thorac Cardiovasc Surg 1987;94:132–134.
- 5. Devine C, Hons B, McCollum C. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicenter trial. J Vasc Surg 2001;33:533-539.
- 6. Kidane A, Lantz GC, Jo S, et al. Surface modification with PEO-containing triblock copolymer for improved biocompatibility: in vitro and ex vivo studies. J Biomater Sci Polym Ed 1999;10:1089–1105.

- 7. James NL, Schindhelm K, Slowiaczek P, et al. In vivo patency of endothelial cell-lined expanded polytetrafluoroethylene prostheses in an ovine model. Artif Organs 1992;16:346-353.
- 8. Huynh T, Abraham G, Murray J, et al. Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. Nat Biotechnol 1999;17:1083-1086.
- 9. Davids L, Dower T, Zilla P. The lack of healing in conventional vascular grafts. In: Zilla P, Greisler HP, eds. Tissue Engineering of Prosthetic Vascular Grafts. Austin, Tex: RG Landes Co.; 1999:3-44.
- 10. Weinberg, CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. Science 1986;231:397-400.
- 11. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. FASEB J 1998;12:47-56.
- 12. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional arteries grown in vitro. Science 1999;284:489-493.
- 13. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. Nat Med 2001;7:1035-1040.
- 14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143–147.

- 15. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997;276:71–74.
- 16. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood 1998;92:362-367.
- 17. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest 2002;109:337–346.
- 18. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J 1999;18:3964-3972.
- 19. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al.Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med 1999;5:434-438.
- 20. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, et al. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22 promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. Circulation 2003;107:2078-2081.
- 21. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, et al. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. Blood 1993;82:66-76.

- 22. Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. Nat Med 2002;8:403-409.
- 23. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. Nat Med 2001;7:738-741.
- 24. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. Circulation 2003;108:1729-1734.
- 25. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. Blood 2000;95:581-585.
- 26. Hoerstrup SP, Zund G, Sodian R, et al. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. Eur J Cardiothorac Surg 2001;20:164–169.
- 27. Han DW, Park YH, Kim JK, et al. Effects of green tea polyphenol on preservation of human saphenous vein. J Biotech 2004;110:109-117
- 28. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, et al. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.

- 29. Park JC, Suh H, Sung HJ, et al. Liposomal entrapment of cefoxitin to improve cellular viability and function in human saphenous veins. Artif Org 2003;27:623-630
- 30. American Heart Association. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. (American Heart Association, Dallas TX:2001
- 31. Sayers RD, Raptis S, Berce M & Miller JH. Long-term result of femorotibial bypass with vein or polytetrafluroethylene. Br J Surg 1998;85:934-938
- 32. Veith, F.J. et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluroethlylene graft in infrainguinal arterial reconstruction. J Vasc Surg 1986;3:104-114
- 33. Widmer M, Guputa PK, Lu G, et al. Manufacture of porous biodegradablepolymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. Biomaterials 1998;19:1945–1955
- 34. Campbell JH, Efendy JL, Campbell GR. Novel Vascular Graft Grown Within Recipient's Own Peritoneal Cavity. Circ Res 1999;85:1173-1178
- 35. Zund G, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, et al. Tissue engineering: A new approach in cardiovascular surgery; Seeding of

human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh. Eur J Cardio-thoracic Surg 1998;13:160-164

- 36. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: A 9-year experience. Surgery 1999;126:847-55
- 37. Laube HR, Duwe J, Rutsch W, Konertz W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;120:134-41
- 38. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. Biomaterials 2000;21:2215–2231.
- 39. Bader A, Steinhoff G, Strobl K, et al. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. Transplantation 2000;70:7–14.
- 40. Allaire E, Bruneval P, Mandet C, et al. The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts. Surgery 1997;122:73-81.
- 41. Hawkins JA, Hillman ND, Lambert LM, et al. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. J Thorac Cardiovasc Surg 2003;126:247–253.

- 42. Greenwald SE, Berry CL. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. J Pathol 2000;190:292-299.
- 43. Ballyk PD, Walsh C, Butany J, et al. Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. J Biomech 1998;31:229-237.
- 44. Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. Med Eng Phys 2002;24:173–183.
- 45. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet 2002;360:427-435.
- 46. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2003;361:45-46.
- 47. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, et al. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. Biomaterials 200324:2303-2308.
- 48. Rosenman JE, Kempczinski RF, Pearce WH, et al. Kinetics of endothelial cell seeding. J Vasc Surg 1985;2:778-784.

- 49. Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, et al. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. Biotechnol Bioeng 1998;57:46–54.
- 50. Niklason LE, Abbott W, Gao J, et al. Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. J Vasc Surg 2001;33:628-638.
- 51. Bhattacharya V, Shi Q, Ishida A, et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor enhances endothelialization and microvessel formation in small-caliber synthetic vascular grafts. J Vasc Surg 2000;32:116-123.
- 52. Shi Q, Bhattacharya V, Wu MH, et al. Utilizing granulocyte colony-stimulating factor to enhance vascular graft endothelialization from circulating blood cells. Ann Vasc Surg 2002;16:314–320.
- 53. Natori T, Sata M, Washida M, et al. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 2002;297:1058-1061.

#### **Abstract**

In vivo test of small diameter artificial vessel made by tissue engineering technique using autologous bone marrow cell

Sang Hyun Lim

Department of Medical Science The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Byung Chul Chang)

Artificial vascular grafts are prone to thrombotic occlusion and reveal poor long-term patency when used in small vessels of less than 5mm in diameter. In an attempt to solve these problems, tissue-engineered vascular grafts are being developed recently. In this study, tissue-engineered vascular grafts using acellular allogenic vascular scaffold and autologous bone marrow cells were manufactured, and their patency were compared with vascular grafts made with acellular allogenic vascular scaffold without bone marrow cells. And in this tissue-engineered vascular grafts, we performed histological and immunological examination to confirm the regeneration of endothelial and smooth muscle cells. Furthermore, mechanical properties of vascular grafts and eNOS expression were also examined. Through this study, I want to confirm the feasibility of in vivo application of tissue-engineered vascular grafts.

Vascular grafts using autologous marrow stem cells showed better patency for 8 weeks. Microscopic examination of the vascular grafts at 8 weeks after implantation showed histological morphology of virtually normal vessel. In addition, the vascular lumens were lined by regenerated endothelial cells that were positive for vWF and CD31 immunohistochemical stains. And the vessel walls revealed smooth muscle a-actin immunoreactive smooth muscle cells in the tunica media layer. Immunofluorescence study revealed the viability of implanted autologous bone marrow stem cells and migration of implanted cells into the vessel wall through fenestrated supporting structure, up to 8 weeks. In terms of mechanical property, tissue-engineered vascular grafts showed nearly normal level of suture retention strength compared to normal carotid artery. Although the level of eNOS in vascular grafts before the engraftment was minuscule, its level raised to the same as that of normal vessel or even higher.

In conclusion, tissue-engineered vascular grafts using acellular vascular scaffold and autologous bone marrow stem cells showed superior bio-conformity than pre-existing polymer vascular grafts.

Key Words: artificial vessel, tissue-engineering, bone marrow cell,