성장인자가 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 영 수

성장인자가 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향

지도 나 동 균 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 영 수

김영수의 석사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기 까지 저를 이끌어 주신 피부과 이광훈 교수님, 의학공학과 박종철 교수님, 성형외과 나동균 교수님께 깊이 감사드립니다. 학교를 떠나 외부에서 대학원과정을 병행하는 것이 힘들 것이라 예상했지만 세미나 등을 통해 격려와 질책을 해주신 박병윤 주임교수님과 성형외과학 교실원 모두에게도 진심으로 감사를 드립니다.

항상 나에게 힘이 되어 주고 지치고 힘들었을 때 용기를 북돋워준 아내에게 다시 한번 고맙다는 말을 전하며 나를 지켜 보아준 형제들, 저 세상에서 지켜보고 계실 어머니와 노심초사 자식들 걱정만 하시는 아버님께도 진심으로 감사 드립니다.

또한 말없이 언제나 저를 응원해주시는 장인, 장모님께도 지면을 빌어 감사하다는 인사를 드립니다. 이것이 또 하나의 시작을 위한 발걸음이라 생각하며 그 동안 제가 세상을 살아가며 늘 힘이 되어 주셨던 모든 분께 감사와 사랑의 마음을 전합니다.

2002년 12월

저자 씀

차 례

그 림 차 례

국문요약

성장인자가 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향

세포의 이동성은 창상치유, 염증반응, 태자발생 등의 중요한 생체변화에 필수적인 조건이며, 특히 혈관 내피세포의 이동에 따른 혈관신생은 종양, 망막혈관증, 창상치유, 조직이식, 피판의 생존 및 심근경색 등에서 매우 중요한 분야이다.

세포의 이동속도는 세포막의 확장 (extension), 접촉 (attachment), 분리 (detachment)와 세포 외 기질과의 유착도 (adhesiveness)가 세포의 이동에 중요한 영향을 미치는데, 유착도는 세포의 배양시기 (seeding time), confluency, 배지의 입체적인 구조, 세포의 표현형 (phenotype of cells)에 따라 다르게 변화한다. 또한 혈관 내피세포의 이동에는 fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등의 성장인자가 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

혈관 내피세포의 이동에 대한 이해는 혈관신생 기능을 조절하여 임상적으로 종양, 망막혈관증, 관절염 등에서 혈관신생을 억제하고, 심근경색, 피판 등에서는 혈관신생을 촉진시킬 수 있는 일이 가능하다고 생각되며

또한 최근의 조직 공학 발달에 기인하여 생체 재료내의 혈관신생을 촉진하여 주변 조직과의 친화력 촉진 등에 이용될 수도 있을 것이다. 그러므로 본 연구에서는 bFGF, TGF-β_1, VEGF가 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향을 밝히고자 하였다. 사용된 미세혈관 내피세포는 human neonatal dermal microvascular endothelial cell (CC-2505, BioWhittker Inc., Walkersville , MD, USA)로 3~4번의 계대 배양한 세포들을 사용하였으며 배지는 basal medium과 single Quots가 함유된 상태의 endothelial cell basal medium-2 MV (EGM-2 MV) Bullet kit system (CC-3202, BioWhittker Inc., Walkersville, MD, USA)을 사용하였다.

세포의 이동성에 영향을 미치는 적정량의 성장인자의 농도를 확인하기 위해서, 각각의 성장인자의 농도를 5가지 (0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml)로 하여 실험하였고, 배양된 내피세포는 이동성 평가를 위해 약 380㎛ 직경의 홀을 가진 실리콘 고무 (두께 0.5 mm)가 표면에 덮여진 well plate위에 2×10^2 개 이하가 되게 세포를 주입한 후 CO_2 배양기에서 24시간 배양하고, time-lapse video microscopy를 이용해서 24시간 실시간으로 세포의 이동을 관찰하고 이를 평가하였다. 성장인자를 투여한 실험군에서 대조군에 비해 세포의 이동속도가 증가되었으며 bFGF와 TGF-β_1는 1 ng/ml에서 VEGF에서는 10 ng/ml에서 혈관 내피세포의 이동속도가 가장 빨랐다. 각각의 성장인

자에 따른 이동속도는 bFGF는 1 ng/ml에서 8.736 ± 0.948 μm/hr, TGF-β_1은 1 ng/ml 에서 9.859 ± 1.904 μm/hr, VEGF는 10 ng/ml에서 10.293 ± 1.612 μm/hr로 VEGF가 이동속도를 가장 빠르게 증진하는 것으로 나타났으며, TGF-β_1와 bFGF의 순으로 이동속도에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

본 실험을 통해, 세포의 이동을 객관적으로 측정할 수 있었으며 이는 종양, 망막혈관증, 조직이식, 피판 및 심근경색 등에서 혈관신생의 제어 가능성을 제시하였으며 또한 인조혈관 등의 조직 공학과 결합하여 혈관신생을 촉진시키는 등의 임상적 응용이 가능하다고 생각되어지며 특히 단순한 성장인자의 세포 이동에 끼치는 영향의 유무 뿐만 아니라, 배양한 인체 미세혈관 내피세포와 같은 특정 세포에 대한 성장인자 별로의 이동성을 수치화해서 그 차이를 확인할 수 있었다는데 그 의의가 있겠다.

핵심 되는 말: 인체혈관내피세포, 이동속도, bFGF, TGF-β_1, VEGF

성장인자가 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향

<지도 **나 동 균** 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 영 수

I. 서 론

세포의 이동성은 창상치유, 염증반응, 태자발생 등의 중요한 생체변화에 필수적인 조건이며, 특히 세포의 이동에 기인한 혈관신생은 창상치유, 조직이식, 피판의 생존 및 심근경색 등에서 매우 중요한 생물학적 반응이다. 이런 혈관신생에 필수적인 미세혈관 내피세포의 이동에는 많은 인자들이 관여하여 동물계의 세포 외 기질을 형성하는 단백질중 가장 많은 것으로 알려진 교원질은 세포의 분화, 성장, 이동 등에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있고 세포의 이동속도는 세포막의 확장 (extension), 유착 (attachment), 분리 (detachment)와 세포 외 기질과의 유착도 (adhesiveness)가 중요한 영향을 미치는데, 유착도는 세포의 배

양시기 (seeding time), confluency, 배지의 입체적인 구조, 세포의 표현형 (phenotype of cells)에 따라 다르게 변화한다.[1, 2] 또한 세포의 이동에는 fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF),vascular endothelial growth factor (VEGF) 등의 성장인자가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[3] 이러한 성장인자 들 중에서 어떠한 성장인자가 혈관신생에 주된 역할을 하는지 많은 보고가 있으나, 대부분 미세혈관 내피세포의 성장이나 분화에 대한 연구에 국한되어있다.[4-8] 따라서 다양한 특성을 가지며 세포의 이동과 증식에 영향을 미친다고 알려진 성장인자들이 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향을 평가하는 것은 임상적으로 매우 의의가 있으며 이러한 미세혈관 내피세포의 이동에 대한 이해는 혈관신생 기능을 조절하여 임상적으로 종양, 망막혈관증, 관절염 등에서는 혈관신생을 억제하고, 심근경색, 피판 등에서는 혈관신생을 촉진시킬 수 있는 일이 가능하다고 생각한다.[9-14] 또한 최근의 조직 공학의 발달에 기인하여 생체재료 내의 혈관신생을 촉진하여 주변의 조직과 친화력을 높이려는 노력에도 이용될 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구에서는 bFGF, TGF-β_1, VEGF 등의 성장인자가 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포 (Human dermal microvascular endothelial cell, HDMEC)의 이동에 미치는 영향을 확인하고자 아래와 같이 실험하였다.

Ⅱ. 연구방법

1. 세포배양

사용된 미세혈관 내피세포는 human neonatal dermal microvas--cular endothelial cell (CC-2505, BioWhittker Inc., Walkersville, MD, USA)로 3~4번의 계대 배양한 세포들을 사용하였다. 배지는 basal medium과 single Quots가 함유된 상태의 endothelial cell basal medium-2 MV (EGM-2 MV) Bullet kit system (CC-3202, BioWhittker Inc., Walkersville, MD, USA)을 사용하였다.

2. 실험군

실험군은 대조군으로 배지에 성장인자를 포함하지 않는 군 (HDMEC only)과 배지에 bFGF 성장인자를 포함하는 군 (HDMEC with bFGF), 배지에 TGF-β_1를 포함하는 군 (HDMEC with TGF-β_1), 배지에 VEGF를 포함하는 군 (HDMEC with VEGF)의 4군으로 나누어 각각의 성장인자에 따른 세포의 이동을 평가하였다.

3. 이동성 측정

세포의 이동성 평가를 위해서 실시간으로 세포의 성장과 이동을 확인할 수 있는 video-microscopy system을 이용하였다. 세포 이동

성 평가에 이용될 video-microscopy system은 세포를 현미경 위에서 배양할 수 있는 소형 CO_2 배양기와 실시간으로 세포의 이동을 확인하기 위해 영상을 전달할 수 있는 color charge-coupled device (CCD) camera가 부착되어 있고, 영상을 녹화할 수 있는 video-tape recorder (VTR) system과 CCD camera를 통해 받은 영상을 처리할 수 있는 computer system으로 구성되어 있다. 세포의 이동성 평가를 위해서 4배의 phase contrast lens를 이용하여 영상을 확인하고, CCD camera를 이용하여 8 bit mode의 영상을 받아 영상처리를 함으로써 세포의 이동을 평가하였다.

세포의 이동성을 측정하기 위하여 사용될 내피세포는 37℃, 5% CO_2 환경에서 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose와 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여 75㎠의 배양용기 (Nunc, Naperville, IL, USA) 내에서 배양하였다. 배양된 내피세포는 이동성 평가를 위해 약 380㎛ 직경의 홀을 가진 실리콘 고무 (두께 0.5 mm)가 표면에 덮여진 유리 위에 2×10^2 개 이하가 되게 세포를 주입하여 37℃, 5% CO_2 환경에서 1시간 동안 배양을 하였다. 1시간 후 실리콘 고무를 조심스럽게 제거하고 나서, 세포가 부착된 유리를 현미경으로 확인하여 내피세포가 알맞게 부착이 되어 있는지를 확인했다.

4. 적정농도 및 세포이동 측정

사용된 성장 인자는 bFGF (F0291, Sigma, St.Louis, MO, USA)와 TGF-1(T7039, Sigma, St.Louis, MO, USA), VEGF121 (V3388, Sigma, St.Louis, MO, USA)로서 *Esherichia Coli*에서 재조합 발현된 성장인자다. 세포의 이동성에 영향을 미치는 적정량의 성장인자의 농도를 확인하기 위해서, 각각의 성장인자의 농도를 5가지 (0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml)로 하여 실험을 하였다. 사용된 내피세포는 37℃, 5% CO_2 환경에서 5% FBS, 0.2 ml의 hydrocortisone, 2 ml의 hb-FGF, 0.5 ml의 VEGF, 0.5 ml의 R3-IGF-1, 0.5 ml의 ascorbic acid, 0.5 ml의 hEGF, 0.5 ml의 GA-1000이 포함된 endothelial cell basal medium-2 MV (EGM-2 MV)에서 배양하였다.

성장인자에 따른 세포의 이동성을 비교, 측정하기 위하여 예비실험 결과를 토대로 본 실험에서는 3가지 성장인자 (bFGF, TGF-β_1, VEGF)의 농도를 bFGF: 1 ng/ml, TGF-β_1 : 1 ng/ml, VEGF : 10 ng/ml로 각각 선택하였다. 상기의 방법과 동일한 방법으로 well plate에 세포를 부착시킨 후, 선택된 농도의 성장인자를 각각 주입하고 time-lapse video-microscopy system과 연동된 mini-incubator에 넣어 24시간 배양을 하면서 실시간으로 세포의 이동을 관찰하고 이를 평가하였다.

5. 통계학적 처리 방법

각각의 성장인자에 대한 실험군에서 16개의 n수를 가지고, 그래프 상에서는 각각의 평균값과 표준편차를 나타냈다. 통계학적 처리를 위해 Excel 2000 (Microsoft, Seattle, WA, USA)을 이용해서 student t-test를 시행했으며, 배지만을 사용했을 경우와 비교하여 각각의 실험군에 대해 $p < 0.01$ 인 경우에는 ★★★, $p < 0.05$ 인 경우에는 ★★, $p < 0.1$ 인 경우에는 ★로 통계학적 유의성을 표시하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 적정농도 측정

성장인자 bFGF, TGF-β_1, VEGF의 농도 별로 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동성에서 차이를 보이는지를 확인하고 적정한 농도를 결정하기 위한 실험에서 각각의 성장인자의 농도에 따라 미세혈관 내피세포의 이동속도 및 거리에서 차이를 보였으며, 3가지 성장인자 모두 농도가 높아짐에 따라 이동속도가 높아지다가, 다시 하강하는 종 모양의 그래프를 나타내는 것으로 확인되었다.

각각의 성장인자에 따른 이동속도는 bFGF는 1 ng/ml에서 8.736 ± 0.948 μm/hr (그림 1), TGF-β_1은 1 ng/ml 에서 9.859 ± 1.904 μm/hr (그림 2), VEGF는 10 ng/ml에서 10.293 ± 1.612 μm/hr (그림 3)로 bFGF와 TGF-β_1는 1 ng/ml에서, VEGF는 10 ng/ml에서 미세혈관 내피세포의 이동속도가 가장 높았다. 또한 성장인자 별로는 VEGF가 이동속도를 가장 빠르게 증진하는 것으로 나타났으며, 다음으로 TGF-β_1과 bFGF의 순으로 이동속도에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 각각의 성장인자를 처리한 경우 배지만 넣어준 대조군에 비해 모두 이동속도가 높아지는 것을 확인하였고, 통계적 유의성을 보였다. ($P<0.01$)

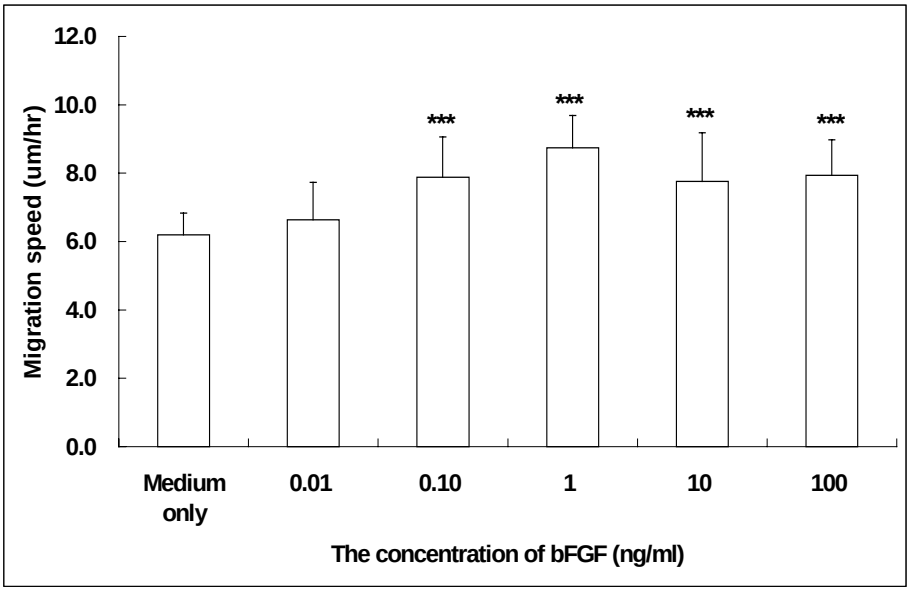

그림1. bFGF의 농도에 따른 HDMEC의 이동 속도.

37℃, 5% CO_2 환경에서 5% FBS, 0.2 ml의 hydrocortisone, 2 ml의 hb-FGF, 0.5 ml의 VEGF, 0.5 ml의 R3-IGF-1, 0.5 ml의 ascorbic acid, 0.5 ml의 hEGF, 0.5 ml의 GA-1000이 포함된 endothelial cell basal medium-2 MV (EGM-2 MV)에서 배양된 인체진피 미세혈관 내피세포를 well plate에 부착시킨 후 적정량의 성장인자의 농도를 확인하기 위해 성장인자의 농도를 달리하면서 세포의 이동속도를 측정하였다. bFGF 1 ng/ml의 농도에서 8.736 ±0.948 μm/hr로 미세혈관 내피세포의 이동속도가 가장 높았다. (*** : $p < 0.01$에서 통계적으로 유의함.)

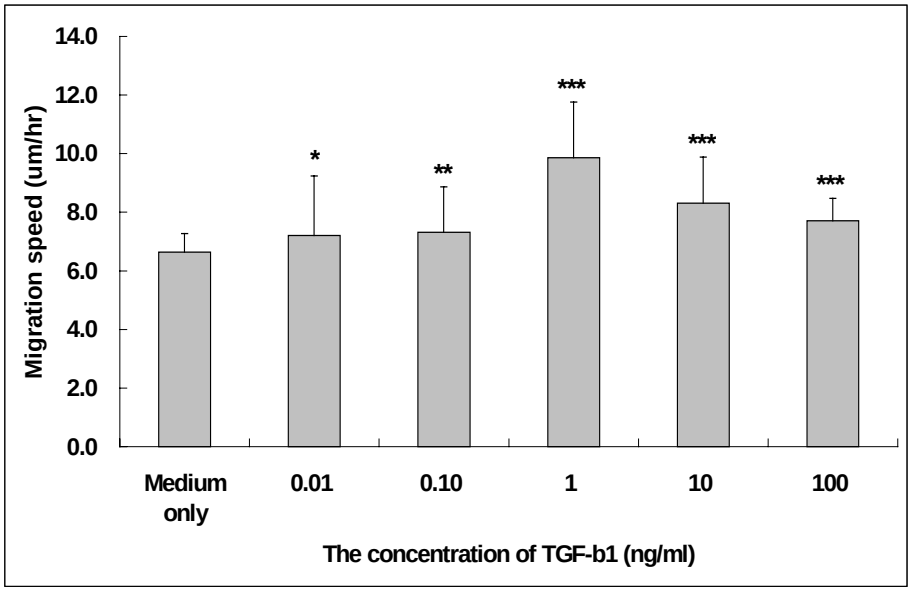

그림 2. TGF-β_1의 농도에 따른 HDMEC의 이동 속도.

37℃, 5% CO_2 환경에서 5% FBS, 0.2 ml의 hydrocortisone, 2 ml의 hb-FGF, 0.5 ml의 VEGF, 0.5 ml의 R3-IGF-1, 0.5 ml의 ascorbic acid, 0.5 ml의 hEGF, 0.5 ml의 GA-1000이 포함된 endothelial cell basal medium-2 MV (EGM-2 MV)에서 배양된 인체 진피 미세혈관 내피세포를 well plate에 부착시킨 후 적정량의 성장인자의 농도를 확인하기 위해 성장인자의 농도를 달리하면서 세포의 이동속도를 측정하였다. TGF-β_1 1 ng/ml의 농도에서 9.859 ±1.904 μm/hr로 미세혈관 내피세포의 이동속도가 가장 높았다. (*: $p<0.1$, **: $p<0.05$, *** : $p < 0.01$에서 통계적으로 유의함.)

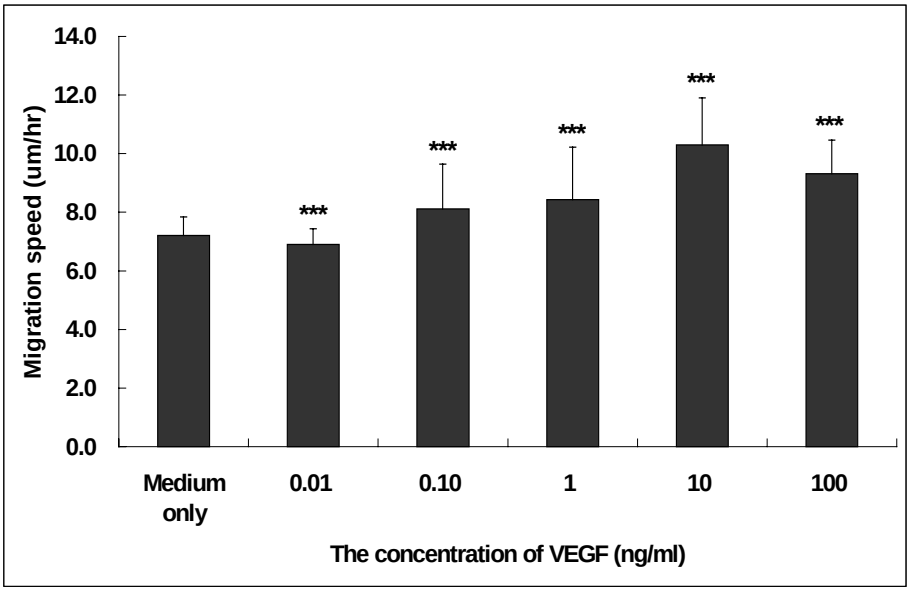

그림 3. VEGF의 농도에 따른 HDMEC의 이동 속도.

37℃, 5% CO_2 환경에서 5% FBS, 0.2 ml의 hydrocortisone, 2 ml의 hb-FGF, 0.5 ml의 VEGF, 0.5 ml의 R3-IGF-1, 0.5 ml의 ascorbic acid, 0.5 ml의 hEGF, 0.5 ml의 GA-1000이 포함된 endothelial cell basal medium-2 MV (EGM-2 MV)에서 배양된 인체진피 미세혈관 내피세포를 well plate에 부착시킨 후 적정량의 성장인자의 농도를 확인하기 위해 성장인자의 농도를 달리하면서 세포의 이동속도를 측정하였다. VEGF 10 ng/ml의 농도에서 10.293 ±1.612 μm/hr로 미세혈관 내피세포의 이동속도가 가장 높았다. (*** : $p < 0.01$에서 통계적으로 유의함)

2. 세포이동 측정

미세혈관 내피세포가 성장인자 별로 이동성에서 차이를 보이는가를 확인하기 위한 예비실험의 결과를 토대로 bFGF와 TGF-β_1은 1 ng/ml의 농도에서 실험을 하였고, VEGF는 10ng/ml의 농도에서 video-microscopy system을 이용하여 본 실험을 진행하였다.

실험 결과 각각의 성장인자 별로 시간이 지남에 따라 이동거리가 증가하는 것을 확인하였으며 (그림 4), 예비실험에서와 같이 미세혈관 내피세포의 이동속도의 빠르기가 VEGF, TGF-β_1, bFGF의 순인 것으로 확인이 되었다 (그림 5).

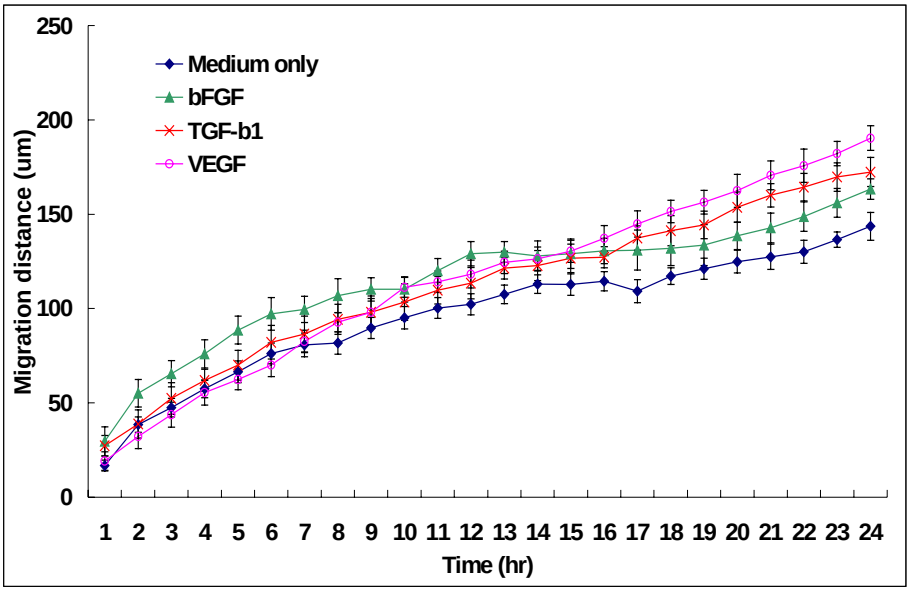

그림 4. 성장인자에 따른 시간별 HDMEC의 이동 거리.

37℃, 5% CO_2 환경에서 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose와 10% FBS가 포함된 DMEM배지를 이용하여 배양된 인체진피 미세혈관 내피세포를 well plate에 부착시키고 선택된 농도의 성장인자를 각각 주입한 후 (bFGF: 1 ng/ml, TGF-β_1: 1 ng/ml, VEGF: 10 ng/ml), time-lapse video microscopy system과 연동된 mini-incubator에 넣어 24시간 배양을 하면서 실시간으로 세포의 이동을 관찰하고 이를 평가하였다. 각각의 성장인자별로 시간이 지남에 따라 이동거리가 증가하였으며 이동 거리는 VEGF, TGF-β_1, bFGF의 순이었다.

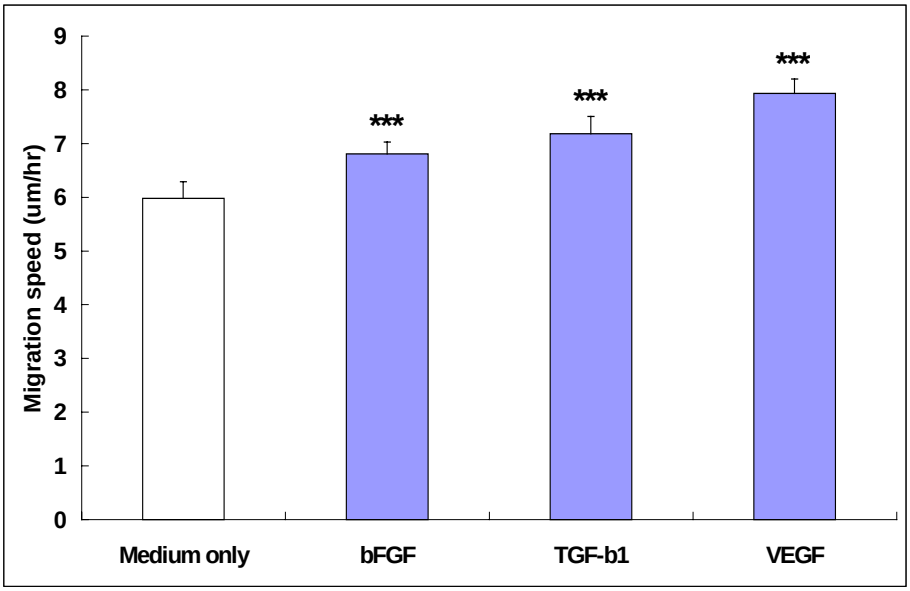

그림 5. 성장인자에 따른 HDMEC의 이동 속도.

37℃, 5% CO_2 환경에서 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose와 10% FBS가 포함된 DMEM배지를 이용하여 배양된 인체진피 미세혈관 내피세포를well plate에 부착시키고 선택된 농도의 성장인자를 각각 주입한 후 (bFGF: 1 ng/ml, TGF-β_1: 1 ng/ml, VEGF: 10 ng/ml), time-lapse video microscopy system과 연동된 mini-incubator에 넣어 24시간 배양을 하면서 실시간으로 세포의 이동을 관찰하고 이를 평가하였다. 배양된 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동속도의 빠르기가 VEGF, TGF-β_1, bFGF의 순인 것으로 확인이 되었다. (*** : $p < 0.01$에서 통계적으로 유의함.)

Ⅳ. 고찰

세포의 이동성은 창상치유, 조직이식, 피판의 생존, 태반형성 등의 중요한 생물학적 변화에 필수적인 조건이며 특히 혈관 내피세포의 이동은 혈관신생과 혈관손상 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[15] 이런 혈관 내피세포의 이동에 따른 혈관신생은 혈관확장 및 침투성 (permeability)의 증가에 의하여 시작되고 혈관 벽의 불안정과 세포 외 기질의 퇴행, 혈장 단백의 혈관 밖 유출은 혈관의 신생과 억제의 엄격한 평형의 조절아래에서 혈관 내피세포의 증식, 이동의 조건을 제공하게 된다.[9] 또한 혈관 내피세포의 이동에는 FGF, TGF, VEGF 등의 성장인자가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[16]

FGF는 거식세포와 혈관 내피세포에서 분비되며 주로 acidic FGF (aFGF), basic FGF (bFGF) 의 2가지 형태로 존재하고 fibroblast와 keratinocyte의 증식과 이동을 촉진하는 작용이 있다.[17-19] 특히 bFGF는 aFGF에 비해 강력한 작용을 가지며 혈관 내피세포 이동 중에 세포내 위치와 분비가 조절되며 외부에서 bFGF를 투여하였을 때 혈관 내피세포의 이동과 증식을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[20] TGF는 혈소판, 거식세포, 섬유아세포에서 분비되여 TGF-β_1, β_2, β_3의 세가지 형태로 존재하며 섬유아세포의 이동, 성숙과 세포

외 기질의 합성에 관여하고 그 중에서도 잘 알려진 TGF-β_1 은 여러 가지 세포의 이동을 촉진한다고 알려져 있다.[21]

혈관 내피세포의 투과성, 성장과 이동을 증가시키는 것으로 알려진 VEGF는[22] 종양세포가 혈관의 투과성을 증가시키기 위해 분비하는 단백질로 처음 발견이 되었고 태자형성과 혈관신생에 중요한 역할을 하며 특별히 혈관 내피세포에 작용하는 것으로 알려졌다.[23-26] VEGF는 세포 외 기질을 통하여 혈관 내피세포 이동을 자극함으로써 혈관신생을 향상시키는데 VEGF에 의해 혈관 투과성이 증가되면 thrombin이 혈관 내 공간으로 들어가 유착 glycoprotein인 osteopontin을 활성화시키고 활성화된 osteopontin은 혈관 내피세포 표면의 integrin 수용체인 $alpha_v$ $beta_3$와 결합하여 혈관 내피세포의 이동을 촉진시킨다.[22] 또한 VEGF는 다른 세포표면의 분자인 intercellular adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)의 표현에 영향을 미쳐 혈관 내피세포의 이동에 관여하기도 한다.[27] VEGF의 분비는 불충분한 혈액공급으로 조직 내 산소분압이 낮아진 저 산소증인 상태나[28], epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF)같은 cytokine에 의해서도 유도된다.[29] 또한 glucose가 VEGF 활성의 조정 역할을 하여 각막 혈관 내피세포에서 세포 외 glucose의 농도가 급격히 낮아지면 VEGF mRNA의 발현이 증가되어 결국 VEGF가 증가되고

혈류공급을 증가시켜 glucose농도가 올라가게 된다.[30,31] VEGF는 창상 치유나 수정란의 착상을 위한 자궁벽의 탈락과 재생 같은 정상적인 상태에서 뿐 아니라 psoriasis, rheumatoid arthritis, proliferative retinopathy, tumor같은 병적인 상태에서 발현이 증가되어 혈관신생을 촉진시킨다.[32-34] VEGF의 수용부위는 혈관내피세포의 표면에 존재하는데, 수용체는VEGF/R1과 R2가 있고, 특히 종양과 망막혈관증과 같은 질병의 혈관형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 VEGF는 VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206의 4개의 다른 isoform을 갖고있다.[35] VEGF의 항체는 동물 실험에서 안구 내의 혈관신생을 억제하고 반대로 관상동맥이나 하지의 허혈에는 collateral vessel의 형성을 촉진시키는 것으로 밝혀져 있어[10-12] 임상에서 관상동맥이나 말초혈관 장애가 있는 환자에서 VEGF로 치료를 시도하여 좋은 결과를 얻었다는 보고가 있다.[13] 한편 성장인자의 일종인 connective tissue growth factor (CTGF)는 cysteine rich mitogenic peptide로 integrin $alpha_v beta_3$ 를 통하여 혈관 내피세포의 유착 및 이동을 조절하는 기능이 있다고 알려지고 있다.[36] 또한 백서의 puromycin insentive leucyl-specific aminopeptidase (mPILSAP)도 세포의 integrin을 통한 유착으로 혈관 내피세포의 증식 및 이동을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

혈관 내피세포의 이동에 따른 혈관신생은 창상치유, 태자형성 등과 같이 임상적으로 긍정적인 면과 악성 종양, 망막혈관증 등과 같이 부정적인 양면성을 가지고 있다.

태자형성에는 두 가지의 다른 과정이 있는데 angioblast가 분화되어 새로운 혈관이 생기는 vasculogenesis와 기존의 혈관에서 새로운 혈관 배아가 형성되는angiogeneisis가 있다. 내배엽 (ectoderm)과 중배엽 (mesoderm)의 상호작용이angioblast의 분화 및 vasculogenesis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 angiogeneis는 다른 경로로 조절된다.[4] 즉 수용성 혈관 형성인자가 신장이나 뇌 같은 태자 장기를 형성하는데, 태자의 뇌에서 bFGF가 분리되었다. 더욱이 특정한 혈소판에서 유리되는 platelet-derived endothelial cell growth factor나 VEGF도 혈관 내피세포의 이동에 관여하여 태자의 혈관신생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며[5] 이러한 혈관신생은 태반의 형성과정에서도 매우 중요하다. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)은 세포의 이동과 filamentous actin formation에 기여하고, 혈관 내피세포의 이동을 조절하여 혈관신생에 기여한다. VASP는 혈관 내피 전구세포 (pre-endothelial cell)에 강하게 발현하여 혈관 내피세포 발아에 주로 관여하며,[6] 태자형성에는 VEGF와 VEGF 수용체 체계가 혈관신생의 결정적인 역할을 한다. VEGF와 VEGF 수용체인 Flt-1 (VEGFR-1),

Flk-1 (VEGFR-2), angiopoietin-1과 수용체, Tie-2 등은 태자성장을 조절하는 관건 전달체계로 추정하고 있다. 또한 태반의 implantation과 성장에는 과다한 혈관신생이 요구되는데, VEGF를 in tissue hybridization 하여 m-RNA을 확인한 결과 임신 초기에는 villous trophoblast에, 임신 말에는 extravillous trophoblast에 발현되었다. 태아의 거식세포는 villi에, 산모의 거식 세포는 decidua에 다량 분포하는 것으로 미루어 VEGF는 거식세포에서 생성된다고 추측된다.[7] 동물실험에서 이러한 성장인자 및 수용체의 결핍은 혈관형성의 부족으로 임신 중기에 사산이 유도된다.[8]

혈관 내피세포의 이동에 따른 혈관생성의 부정적인 면으로 종양의 경우 혈관신생은 종양의 성장 및 진행에 필수적이며 종양의 크기가 1-2mm 이상으로 커질 때에는 새로운 혈관의 유발이 요구되는데 혈관의 신생은 혈관 내피세포의 이동, 증식 및 맥관 형성에 많은 내적 (endogenous) 자극이나 억제에 의하여 조절된다. 정상 상태에서는 혈관 내피세포 성장을 유도하는 전해체에 의하여 성장이 조절되지만 종양의 성장 및 진행에는 혈관신생 전해체의 혈중 농도와 상관관계가 있고, 대부분의 종양의 맥관 밀도는 예후와 밀접한 관계가 있으며 이러한 전해체로 angiopoietin 1, angiopoietin 2, mikine, pleiotropin, leptin, 그리고 maspin 등이 밝혀져 있다.[2] 또한 망막혈관증의 경우 망막에 혈관 내피세포의 이동에 따른 혈관신

생은 시력을 잃게 되는데 collagen type I cryptic epitope를 HUIV2의 monoclonal 항체로 확인한 결과 혈관 싹 (bud)이 확인되었고 혈관이 자라나가는 초기의 구조를 확인할 수 있었는데, HUIV2와 작용한 혈관 내피세포는 내피세포의 이동이 촉진되었고, HUIV2의 monoclonal 항체로는 억제되었다.[3]

이와 같이 양면성을 가지는 혈관신생은 많은 인자들이 관여하며 특히 혈관신생에 필수적인 혈관 내피세포의 이동에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 이동하는 혈관 내피세포를 증명할 수 있는 것으로서 세포 외 단백질 분해에 중요한 매개체인 urokinase-type plasminogen activator (u-PA)가 표현되는 것이다. 혈관 내피세포에 손상이 있을 때 이동하는 세포의 표면에 u-PA에 특이적인 수용체가 빠르고 현저하게 증가되는 것이 관찰되었고 이런 u-PA의 증가는 bFGF에 의해 매개된다고 알려지고 있다.[37] 세포가 이동 중일 때 세포 외 기질에 bFGF는 고갈되고 혈관 내피세포의 cytoplasm에 bFGF immunoreactivity가 증가되기 시작한다.[20] 한편bFGF는 bovine arterial endothelial (BAE) cells에서 oncostatin M (OSM)이란 cytokine에 의해 합성이 증가되어 세포의 이동을 촉진한다고 알려져 BAE 세포에 OSM처리를 하면 증가된 bFGF에 의해 세포의 이동이 촉진된다.[38] 또한 bFGF가 수용체에 결합하는 것을 방해하는 protamine sulfate나 suramin을 투여하면 혈관 내피세포의 이동이

제한된다.[39] 이러한 bFGF에 대한 혈관내피세포의 이동반응은 G-protein-coupled phospholipase A_2 활성에 의해 매개되어 G-protein의 일종인 pertussis toxin은 bFGF에 의한 내피세포의 이동을 약 80%정도 감소시킨다.[40] 혈관 내피세포의 이동에는 bFGF, TGF-β_1, VEGF 등의 성장 인자들 뿐 아니라 high-density lipoprotein (HDL)도 성장인자와는 다른 경로로 세포의 이동을 촉진시키며[15], 세포막의 microviscosity는 세포이동에 영향을 미쳐 대동맥 내피세포에 alpha-tocopherol, cholesterol, lysophospholipids와 같은 세포막 활성물질을 처리하면 세포의 이동이 증가하며 bFGF, VEGF도 microviscosity를 증가시킨다고 알려져 있다.[41]

혈관 내피세포의 증식과 이동에 영향을 미치는 bFGF와 VEGF를 각막 미세혈관 내피세포에 투여했을 때 bFGF는 VEGF에 비해각막 혈관 내피세포의 증식을 더 촉진시키며 VEGF는 bFGF에 비해 훨씬 효과적으로 혈관내피세포의 이동에 영향을 미치고 두 성장인자는 혈관신생의 여러 단계에서 synergistic effect가 있는 것으로 나타났다.[42] 한편 배양된 소의 각막 혈관 내피세포의 이동과 증식에 여러 가지 성장 인자의 효과를 비교하는 연구에서 EGF, bFGF, aFGF는 세포 이동 뿐 아니라 세포의 증식도 촉진시킨 반면에 VEGF는 세포증식에는 영향이 없이 세포의 이동만을 촉진시켰다.[43]

이와 같이 다양한 특성을 가지며 세포의 이동과 증식에 영향을

미친다고 알려진 성장 인자들을 배양한 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향을 평가하는 것은 임상적으로 매우 의의가 있다 하겠다. 그래서 본 연구에서는 bFGF, TGF-β_1, VEGF등의 성장인자가 인체진피 미세혈관 내피세포의 이동에 미치는 영향을 computer-aided time-lapse video-microscopy를 이용하여 세포의 이동과 속도를 정확하고 역동적으로 분석하였다. 본 실험에서 미세혈관 내피세포의 이동 속도면에서 video-microscopy system을 이용한 실험이 예비 실험때의 적정농도 측정시 보다 다소 늦은 것으로 확인이 되었는데, 이는 time-lapse video-microscopy system를 이용한 실험에서는 실시간으로 세포의 이동을 관찰하기 위해 현미경의 대물대에 소형 배양기를 설치하고, 소형 배양기 안에서 세포를 배양하면서 실험을 해야 하는 특성 때문에 일어나는 현상인 것으로 사료된다. 즉, 현미경의 조명을 계속적으로 세포에 조사를 하면서 관찰하여야 하는 특성 때문에 세포가 빛의 영향을 받아 이동속도에 차이를 나타내는 것으로 추측 된다.

실험 결과 성장인자별로는 VEGF가 가장 이동속도를 빠르게 증진하는 것으로 나타났으며, 다음으로 TGF-β_1와 bFGF의 순으로 이동속도에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이런 사실은 다른 성장인자와는 달리 VEGF는 특이적으로 세포의 이동에 관여한다는 결과와 연관이 있으며[43] 임상적으로 중요한 의미가 있다고 하겠다.

실제로 성형외과 영역에서 많이 이용이 되는 조직 확장술의 경우 확장된 조직에서 VEGF의 농도가 확장되지 않은 조직에 비해 훨씬 증가하였고 이는 확장된 조직의 혈관신생과 관계가 있다는 보고가 있다.[44] 조직 허혈의 경우 치료제로 VEGF의 투여는 동물 실험에서 입증이 되었고[45] 최근에는 VEGF을 encoding한 gene을 허혈세포에 transfection시켜 VEGF의 분비를 증가시키는 노력이 이루어 지고 있다.[46]

본 실험을 통해, 세포의 다양한 생화학적이고 세포외적 환경 영향을 간접적으로 보여주는 미세혈관 내피세포의 이동성을 측정할 수 있었으며 특히 단순한 성장인자의 세포 이동에 끼치는 영향의 유무 뿐만 아니라, 미세혈관 내피세포와 같은 특정 세포에 대한 성장인자에 따른 이동성을 수치화해서 그 차이를 확인할 수 있었다는 데 그 의의가 있다 하겠다.

기존의 Boyden chamber[47], wound healing[48], micro-carrier bead[49], fence assays[50]를 이용한 방법 들은 세포 고유의 이동과 더불어 세포의 증식활동이 함께 측정되기 때문에 실험 데이터가 정확히 세포 이동의 결과로 해석되기 어려웠다. 반면 이 실험과 같은 time-lapse video-microscopy system을 이용하면 세포증식과의 혼란이 배제되어 하나의 세포의 위치와 형태의 변화를 동태(動態)적으로 관찰할 수 있기 때문에 보다 정량적으로 세포의 이동현상을

분석할 수 있었다.

V. 결론

혈관 내피세포의 이동에는 FGF, TGF, VEGF등의 성장인자가 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그래서 본 연구에서는 각각의 성장인자에 따른 배양한 인체 미세혈관 내피세포의 이동을 측정하기 위하여 computer-aided time-lapse video-microscopy system을 이용하여 미세혈관 내피세포의 이동 속도를 측정하였다. 각각의 성장인자에 따른 이동속도는 bFGF는 1 ng/ml에서 8.736 ± 0.948 μm/hr,TGF-β_1은 1 ng/ml 에서9.859 ± 1.904 μm/hr , VEGF는 10 ng/ml에서 10.293 ± 1.612 μm/hr로 bFGF와 TGF-β_1는 1 ng/ml에서 VEGF에서는 10 ng/ml에서 혈관 내피세포의 이동속도가 가장 높았다.

또한 24시간 배양하면서 실시간으로 세포의 이동을 평가한 결과 성장인자 별로는 VEGF가 이동속도를 가장 빠르게 증진하는 것으로 나타났으며, 다음으로 TGF-β_1와 bFGF의 순으로 이동속도에 영향을 미치는 것으로 나타났다. ($p< 0.01$) 이와 같이VEGF, TGF-β_1, bFGF등의 성장 인자들은 미세혈관 내피세포의 이동속도를 촉진함으로써 허혈 조직에 혈류공급을 향상시킬 수 있는 강력한

도구로서 앞으로 당뇨족과 같은 허혈성 질환을 치료하고 유리피판의 혈류을 향상시킬 수 있으며 더 나아가 종양세포의 성장를 멈출 수 있는 치료제로서의 가능성도 있고 또한 조직 공학의 발달에 기인하여 인조혈관의 개발 및 인공조직과 주변 정상 조직과의 친화력 촉진 등에도 유용한 제재로 이용 될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Akada T, Yamazaki T, Miyashita H, Niizeki O, Abe M, Sato A, et al. Purimycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is involved in the activation of endothelial integrins. J Cell Physiol 2002;193:253-62.
2. Beeken WD, Kramer W, Jonas D. New molecular mediators in tumor angiogensis. J Cell Mol Med 2000;4:262-9.
3. Hangai M, Kitaya N, Xu J, Chan CK, Kim JJ, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. Am J Pathol 2002;161:1429-37.
4. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell derived embriod bodies. Development 1988;102:471-8.
5. Risau W. Embryonic angiogenesis factors. Pharmacol Ther 1991;51:371-6.
6. Kayisli UA, Demir R, Erguler G, Arici A. Vasodilator-stimulated phosphoprotein expression and its cytokine-mediated regulation in vasculogenesis during human placental development. Mol Hum Reprod 2002;8:1023-30.
7. Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. J Reprod Fertil 1993;99:609-15.
8. Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W. Angiogensis in embryos and ischemic disease. Thromb Haemost 1997;78:678-83.
9. Distler O, Neidhart M, Gau RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. Int Rev Immunol 2002;21:33-9.
10. Ferrara N, Bunting S. Vascular endothelial growth factor, a specific

regulator of angiognesis. Curr Opin Nephrol Hypertens 1996;5:35-44.
11. Kvanta A. Vascular endothelial growth factor. A vascular factor of high specificity. Lakartidnigen 1995;92:1765-6.
12. Breir G. Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. Semin Thromb Hemost 2000;26:553-9.
13. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. Semin Cancer Biol 1999;9:211-20.
14. Leavesley DI, Ferguson, GD, Wayner EA, Cheresh DA. Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. J Cell Biol. 1992;117:1101-07.
15. Murugesan G, Sa G, Fox PL. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. Circ Res 1994;74:1149-56.
16. Risau W. Angiogenic growth factors. Prog Growth Factor Res 1990;2:71-9.
17. Adzich, N. Wound healing: Biologic and clinical features. In: Sabiston DC, Lylery HK, editors. Textbook of Surgery and the Biological Basis of Modern Surgical Practices. 15th ed. Philadelphia: Saunders; 1997. p. 207-20.
18. Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Growth factor induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. J Clin Invest 1991;87:694-703.
19. Hebda PA, Klingbeil CK, Abraham JA, Fiddes JC. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. J Inves Dermatol 1990;25:626-31.
20. Biro S, Yu ZX, Fu YM, Smale G, Sasse J, Sanchez J, et al. Expression and subcellular distribution of basic fibroblast growth

factor are regulated during migration of endothelial cells. Circ Res 1994;74:485-94.

21. Samuel SK, Hurta RA, Spearman MA, Wright JA, Turley EA, Greenburg AH. TGF-beta 1 stimulation of cell locomotion utilize the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. J Cell Bio. 1993;123:749-58.
22. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $alpha_v$ $beta_3$ integrin, osteopontin, and thrombin. Am J Pathol 1996;149:293-305.
23. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophage and angiogenesis. J Leukoc Biol 1994;55:410.
24. Bikfalvi A, Sauzeau C, Moukadiri H. Interaction of vasculotropin /vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothealial cells: Binding, internalization, degradation, and biological effects. J Cell Physiol 1991;149:50-9.
25. Berse B, Brown LF, Van der Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene in expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. Mol Biol Cell 1992;3:211.
26. Tisher E, Mitchell R, Hartman T. The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem 1991;266:11947-54.
27. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Monn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. Nat Med 1996;2:992-7.
28. Shweiki D, Itin A, Soller D, Keshet E. Vascular endothelial growth

factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992;359:843-5.

29. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. J Biol Chem 1995;270:12607-13.
30. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. Mol Cell Biol 1995;15:5363.
31. Sone H, Kawakami Y, Okuda Y. Vascular endothelial growth factor I in induced by longterm high glucose concentrations and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. Biochm Biophys Res Commun 1996;221:193-8.
32. Detmar M, Brown LF, Claffey KP. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med 1994;180:1141-6.
33. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): Accumulation and expression of human synovial fluids and rheumatoid synovial tissues. J Exp Med 1994;180:341-6.
34. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. Cancer Res 1996;56:2013-6.
35. Amoroso A, Del Porto F, Monaco C, Manfredini P, Afeltra A. Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neoangiogenesis: A review. Eur Rev Med Pharmacol Sci 1997;1:17-25.

36. Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinase in angiogenesis. Cell Res 1998; 8: 171-7.
37. Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Upregulation of urokinase receptor expression on migration endothealial cells. J Cell Biol 1993;122:673-84.
38. Wijelath ES, Carlsen B, Cole T, Chen J, Kothari S, Hammond WP. Oncostatin M induces basic fibroblast growth factor expression in endothelial cells and promotes endothelial cell proliferation, migration and spindle morphology. J Cell Sci 1997;110:871-9.
39. Sato Y, Rifkin DB. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. J Cell Biol 1988;107:1199-205.
40. Sa G, Fox PL. Basic fibroblast growth factor-stimulated endothelial cell movement is mediated by a pertussis toxin-sensitive pathway regulating phospholipase A_2 activity. J Biol Chem 1994;269:3219-25.
41. Ghosh PK, Vasanji A, Murugesan G, Eppell SJ, Graham LM, Fox PL. Membrane microviscosity regulates endothelial cell motility. Nat Cell Biol 2002;4:894-900.
42. Yan Q, Li Y, Hendrickson A, Sage EH. Regulation of retinal capillary cells by basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2001;37-45.
43. Thalmann-Goetsch A, Engelmann K, Bednarz J. Comparative study on the effects of different growth factors on migration of bovine corneal endothelial cells during wound healing. Acta Ophthalmol Scand 1997:75:490-5.
44. Lantieri LA, Martin-Garcia N, Wechsler J, Mitrofanoff M, Raulo Y, Baruch JP. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue: A possible mechanism of angiogenesis in tissue

expansion. Plast Reconstr Surg 1998;101:392-8.
45. Padubidri A, Brown EJ. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. Ann Plast Surg 1996;37:604-11.
46. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX. Locally administered vascular endothealial growth factor (VEGF) cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. Plast Reconstr Surg 1998;102:2033-9.
47. Henry TD, Abraham JA. Review of preclinical and clinical results with vascular endothelial growth factors for therapeutic angiogenesis. Curr Interv Cardiol Rep 2000;2:228-41.
48. Garrigues J, Anderson J, Hellstrom KE, Hellstrom I. Anti-tumor antibody BR96 blocks cell migration and binds to a lysosomal membrane glycoprotein on cell surface microspikes and ruffled membranes. J Cell Biol. 1994;125:129-42.
49. Jozaki K, Marucha PT, Despins AW, Kreutzer DL. An in vitro model of cell migration: evaluation of vascular endothelial cell migration. Anal Biochem. 1990;190:39-47.
50. Madri JA, Pratt BM, Yannariello-Brown J. Matrix-driven cell size change modulates aortic endothelial cell proliferation and sheet migration. Am J Pathol. 1988;132:18-27.

Abstract

The Effects of Growth Factors on Motility of Cultured Human Dermal Microvascular Endothelial Cell

Young Soo Kim

Deparatment of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dong Kyun Rah)

Cell migration is essential for many important biological events, including embryonic development, wound healing, inflammatory response, and tumor metastasis. As a result of endothelial cell migration, angiogenesis is very important factor in embryogenesis, wound healing, tumor development, flap survival. Angiogenesis is dependent on endothelial cell proliferation, migration and motility is one of the most essential for many important biological events. The speed of cell migration is regulated by extension, attachment, detachment of cell membrane and ahhesiveness of cell to extracellular matrix. Growth factors such as FGF, TGF, VEGF is well known to play a major roles in the migration of endothealial cells.

This study was designed to compare the motilities of human dermal microvascular endothelial cell (HDMEC) in growth factors such as bFGF, TGF-β_1 & VEGF. The motility of cultured HDMEC was compared using a video-microscopy system that was developed in combination with a self-designed CO_2 mini-incubator. To determine migration speed, cells were viewed with a 4 phase-contrast lens and video recored. Images were captured using a color CCD camera and saved in 8-bit full-color mode.

Experimental Groups were divided into four groups: group I (with a Control,

HDMEC only), group II (HDMEC with bFGF), Group III (HDMEC with TGF-β_1), Group IV (HDMEC with VEGF). At the concentration of 1 ng/ml (bFGF), 1 ng/ml (TGF-β_1), and 10 ng/ml (VEGF) as the most effective dose for cell migration through preliminary study, the speed of migration is 8.736 ± 0.948 μm/hr, 9.869 ± 1.904 μm/hr, 10.293 ± 1.612 μm/hr, respectively. These data shows that groups with growth factor accelerate the HDMEC migration than a control group, and the VEGF is most effective growth factor in the HDMEC migration than bFGF and TGF-β_1

Key Words: HDMEC, cell migration, bFGF, TGF-β_1 and VEGF