

자가 혈관 세포를 이용한 조직 공학적 인공 혈관 제조

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 혈관외과, ¹의공학과, ²삼성생명과학연구소

김동익 · 정현아 · 정연주² · 김지은² · 한진수² · 박정환² · 이병봉 · 허세호 · 서수원¹

Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts Using Autogenous Vein Cells

Dong Ik Kim, M.D., Hyeon A Jeong, M.D., Yeon Joo Jung², Ji Eun Kim², Jin Soo Han², Jung Hwan Park², Byung Boong Lee, M.D., Se Ho Huh, M.D. and Soo Won Suh¹

Purpose: To investigate bioartificial vessels capable of being used for vascular grafts, we studied cell-polymer constructs from venous smooth muscle cells (SMCs) and biodegradable scaffolds using the canine model.

Methods: Scaffolds constructed from 50/50 poly (D,L-Lactide-co-glycolide)(PLGA) were created with pores containing gelatin particles. Disk type scaffolds were used as templates of cell attachment and vascular tissue regeneration. SMCs were isolated from canine external jugular veins and primary SMCs cultures were produced with the explant-derived method. SMCs were seeded into the scaffolds and cultured statically for 4 weeks. The cell-polymer constructs were examined histochemically and using scanning electron microscopy.

Results: The SMCs obtained by the explant-derived method were confirmed with immunohistochemical staining using an anti-smooth muscle actin antibody. Four weeks after the SMCs were seeded into the scaffold, histological examination showed SMCs infiltration into the scaffold wall and scanning electron microscopy revealed the SMCs mass which resembled tissue on the scaffold surface.

Conclusion: This is a pilot study for the constructing artificial vessels using tissue engineering. The construction of the ideal scaffold for vessel and the improvement of culture methods *in vitro* are the most important parts in this field. (J Korean Surg Soc 2001;60:579-583)

Key Words: Tissue engineering, Graft, Scaffold

중심 단어: 조직공학, 이식편, 지지체

Division of Vascular Surgery, ¹Department of Biomedical Engineering, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, ²Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea

서 론

동맥 경화증에 기인한 동맥 폐색은 허혈 증상으로 인하여 통증을 유발하고 심한 경우는 조직의 궤사를 초래하며, 심한 경우는 심장의 관상동맥 폐색을 초래하여 사망에 이르기기도 한다.(1,2) 동맥 폐색에 대한 치료로 동맥 치환술에 사용되는 인공 혈관은 Dacron이나 polytetrafluoroethylene 같은 재질로 합성되어 만들어진 것으로 내경 6 mm 이하의 경우는 혈전 형성으로 인한 조기 폐색 및 문합부의 내막 비후에 의한 후기 폐색이, 직경 6 mm 이상에 비해 매우 높기 때문에 실제 임상적 적용은 불가능한 실정이다.(1,3) 이러한 문제의 해결을 위해 heparin, polyethylene oxide 또는 인공 혈관에 혈관 내피 세포를 도포하는 방법 등이 시도되었다. 소구경 동맥 대체술에 인공 혈관 대신 자가 정맥을 이용하는 경우, 정맥을 동맥 치환에 이용하기 때문에 생기는 성장인자들의 변화, 동맥 환경에서 증가된 물리적인 혈관 압력 차이 등의 요인에 의해 혈관 내막에 신성 내막 비후가 생겨 혈관 내경이 축소되고 시간의 흐름에 따라 혈관 폐색을 일으킬 수 있다.(2,4) 이러한 문제점의 해결 방안으로 혈관의 탄성을 증대시키거나 신성 내막 비후 현상의 특성 규명이나 억제 약제의 개발 등의 연구가 있으나 그 근본적인 해결은 제시되지 않고 있다.(5) 그러나 최근에는 혈관 세포의 분리 및 체외 배양 기술이 발달함에 따라 조직 공학(tissue engineering)을 이용한 인공혈관의 개발에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다.(1,2,6-8) 조직 이식에 이용되는 조직 공학 기술은 동일 개체의 특정한 조직의 일부를 적출한 후 이로부터 체외에서 분리 배양하여 다량 확보한 세포들을 생분해성 지지체(scaffold) 내에 담아 3차원적인 형체를 유지하는 새로운

책임저자 : 김동익, 서울시 강남구 일원동 50, ☎ 135-710
성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 혈관외과
Tel: 02-3410-3467, Fax: 02-3410-0040
E-mail: dikim@smc.samsung.co.kr

접수일 : 2001년 5월 2일, 게재승인일 : 2001년 5월 25일
본 연구는 삼성생명과학 연구소 연구비(C-A1-011-1)의 보조로 이루어졌음.

본 연구는 2001년 춘계외과학회에서 구연한 내용임.

조직을 재구성하도록 하는 기술이다. 조직 공학 기술에 의해 형성된 인공 혈관 조직은 자가 혈관에서 유래한 세포들을 이용하기 때문에 면역 거부 반응이 일어날 염려가 없으며, 지지체의 형태를 인위적으로 조작할 수 있으므로 대치 혈관의 굵기를 조정할 수 있어 소구경 혈관의 대치에 유리하다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 조직 공학 기술을 이용하여 인공 혈관을 제조하기에 앞서 잡종견의 정맥 조직으로부터 혈관의 근육성과 형태 구성에 중요한 역할을 하는 혈관 평활근 세포(smooth muscle cells, SMCs)를 분리해 내는 방법을 확립하고자 하였다. 혈관 조직에서 분리해 낸 혈관 평활근 세포층으로부터 혈관 평활근 세포만을 분리 배양하는 방법에는 두 가지 방법이 있는데, collagenase와 elastase 등의 효소들을 이용하여 혈관 조직으로부터 세포들을 분산시키는 enzyme-dispersed 방법과 혈관 조직으로부터 분리한 근육 조각을 그대로 culture dish 바닥에 배치한 후 이로부터 자라 나오는 세포들을 모으는 explant-derived 방법(9-11) 중, 본 연구에서는 체외 배양하는 동안 세포의 형태 유지가 더욱 우수한 후자의 방법을 택하였으며 이렇게 얻어진 혈관 평활근 세포를 3차원적인 생분해성 지지체인 scaffold 내에 담아 체외 배양하여 새로운 형태의 인공 혈관 조직의 제조 방법과 조건을 개발하고자 하였다.

방 법

1) 정맥 조직으로부터 혈관 평활근 세포의 분리 및 일차 배양

무균적 환경을 유지하면서 체중 15~20 kg의 잡종견으로부터 외경정맥을 약 6~8 cm의 길이만큼 적출하여 혈관 내면을 heparin-saline 용액으로 세척하였다. 혈관 평활근 세포의 분리와 배양은 Kirschenlohr등(9)의 방법을 변형하여 이용하였다. 적출한 외경 정맥 조직을 antibiotics-antimycotics (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10 mM HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 첨가된 serum free(SF)-Medium 199(M199)(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 담아 얼음으로 차게 유지하면서 세포 배양실로 운반해 온 후 culture dish에 옮긴 다음 혈관 주변 조직을 수술 기구를 이용하여 깨끗하게 제거하였다. SF-M199로 2~3회 세척한 후 혈관조직의 중막층과 외막층의 분리를 용이하게 하기 위하여 enzyme dissociation mixture (SF-M199, 1 mg/ml type 2 collagenase, Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ, USA, 0.25 mg/ml elastase, 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2 mg/ml bovine serum albumin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 조직 부피의 3배의 양이 되도록 넣고 37°C water bath에서 간헐적으로 흔들며 주면서 10분간 반응시킨 후 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이

포함된 M199-10% FBS를 동일량 넣고 조직을 세척하여 효소 반응을 중단시켰다. SF-M199로 다시 세척한 혈관을 종 방향으로 절개한 후 멸균된 면봉이나 수술용 칼을 이용해 내벽을 조심스럽게 긁어내어 혈관 내피 세포를 제거하였으며, SF-M199로 세척하였다. 혈관 평활근 세포가 많이 분포해 있는 중막층을 분리하기 위해 해부 현미경 하에서 forcep을 이용하여 근육의 결을 따라 외막층으로부터 벗겨 내었다. 이 근육 조각들을 SF-M199에 모으고 1~2 mm로 잘게 자른 후, 12 well culture dish (Nunc Co., Denmark)의 바닥에 각 well에 3~4조각이 되도록 고르게 배치하였으며, 한 두 방울의 SF-M199를 수시로 떨어뜨려 주어도중에 마르지 않도록 수분을 유지시켰다. Culture dish에 부착된 근육 조각이 떨어지지 않도록 주의하여 20%의 FBS가 포함된 M199 (M199-20% FBS)를 각 well 당 0.5 ml 씩 첨가한 다음 humidified 5% CO₂/37°C incubator에서 배양하였다. 이로부터 3일마다 새로운 M199-20% FBS 배지를 교환해 주었으며 culture plastic dish 바닥에 배치한 근육 조각들로부터 혈관 평활근 세포(explanted vascular smooth muscle cells)가 자라 나오기 시작하면 2일 간격으로 배지를 교환해 주었다.

2) 혈관 평활근 세포의 배양, 유지 및 동결

Explanted SMCs가 culture dish의 50~70%를 차지하였을 때 dish 바닥에 배치한 근육 조각을 forcep으로 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, Cambrex co., Maryland, USA)으로 세척하였다. 그리고 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA solution*으로 37°C, 10분 반응시켜 떼어낸 세포들을 1,400 rpm에서 4분간 원심 분리하여 모았다. 모은 cell pellet을 M199-10% FBS로 재부유 시킨 후 cell 수를 측정하였고, 1~1.5×10⁴ cells/cm²이 되도록 맞춘 후 culture dish에 plating하였다. 24시간 후 M199-20% FBS로 배지를 교환해 주었고 그 이후로 2~3일마다 배양액을 교환해 주었다. 배양한 세포가 완전히 또는 거의(80~100%) confluent 해지면 세포들을 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA solution으로 37°C, 10분 반응하여 떼어내고 원심분리 한 후 5~10×10³ cells/cm²이 되도록 새 culture dish에 seeding하였고 3~10번 계대 배양한 세포를 실험에 사용하였다. 3번 계대 배양한 혈관 평활근 세포를 M199, 20% FBS, 7.5% DMSO**를 5×10⁶ cells/ml~2×10⁷ cells/ml이 되도록 재부유 한 후 1 ml 씩 cryo-tube (Nunc Co., Denmark)에 담아 Cryo 1°C freezing container (Nalgene, NY, USA)를 이용하여 -70°C에서 동결시켰고 이를 질소 탱크에 옮겨 보존하였다. 동결한 세포는 필요시 37°C water bath에서 급해동하여 이용하였다.

3) 생분해성 지지체(Scaffolds)

사용된 scaffold의 기본 재질은 50/50 poly(D,L-Lactide-co-glycolide)(PLGA)이며 180~250 μm 크기의 gelatin 입자

에 의해 pore를 형성시켰다. Cell-polymer construct는 지름이 10 mm, 두께가 1 mm인 disk 형태를 이용하였다.

4) 혈관 평활근 세포의 seeding과 cell-polymer constructs의 배양

Scaffolds를 살균하기 위하여 75% alcohol에 완전히 잠기도록 담가 4°C에서 12~16시간 둔 후 clean bench 내에서 alcohol을 제거한 후 멸균된 냉장 보관한 증류수를 충분한 양 넣어 3회 세척하여 남아 있는 alcohol을 제거하였으며 마지막으로 SF-M199를 충분한 양을 넣어 2회 세척한 후 용액을 완전히 제거하였다. 혈관 평활근 세포로 seeding하기 약 30분 전에 6 well culture plate (Nunc Co., Denmark)에 옮겨 놓고 clean bench 내에서 건조시켰다. 이때 완전히 건조되지 않도록 주의하고 약간 축축한 상태가 되도록 하였다. 혈관 평활근 세포가 culture plate에 70% 이상 confluent해지면 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA solution으로 37°C에 10분간 반응하여 떼어낸 cell들을 모으고 cell 수를 측정하였다. Cell pellet을 M199-20% FBS로 5×10^7 cells/ml이 되도록 조심스럽게 재부유시켰고 1회 seeding시의 volume은 100 μ l이 되도록 맞추어 주었다. Disk 형태의 scaffold 표면에 100 μ l씩 2회에 걸쳐 seeding하여 전부 10^7 cells이 되도록 하였고 첫 번째 seeding한 후 37°C에서 4시간 동안 incubation하고 두 번째 seeding을 하였다. 이후 수분을 유지할 수 있도록 조심스럽게 0.5 ml의 M199-20% FBS를 첨가하여 humidified 5% CO₂/37°C incubator에 두었고 15시간 후 완전히 잠기도록 4 ml의 M199-20% FBS를 더 첨가하여 주었다. 4주 배양하는 동안 2일마다 새로운 배양 배지로 교환해 주었다.

5) 조직 병리학적 관찰 방법

분리 배양한 세포가 혈관 평활근 세포인지 확인하기 위해 면역 염색을 시행하였다. Poly-L-lysine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 표면 처리한 coverslip 위에 2~3회 계대 배양한 혈관 평활근 세포를 배양하였고 일차 항체로는 anti-smooth muscle α actin antibody(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 발색 반응에는 labelled streptavidin biotin 기술(LSAB kit, DAKO Co., CA, USA)을 이용하였고 peroxidase의 반응물로 DAB (Research Genetics, Huntsville, USA)를 사용하여 α -actin fiber의 발색 결과를 보았다. Cell-polymer constructs의 조직학적 검사를 위해 4주 배양 후 절반을 잘라 내어 10% neutral buffered formalin (pH 7.4)에 담가 12~16시간 실온에 두어 세포를 고정하였고 paraffin embedding 하였으며 이를 3~4 μ m 두께로 자른 것을 hematoxylin (DAKO Co., CA, USA)과 eosin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 염색하여 scaffold 내에 자란 혈관 평활근 세포의 분포를 관찰하였다.

6) 주사 전자 현미경 관찰

4주 배양 후 cell-polymer constructs의 나머지 절반 부분을 sodium phosphate (pH 7.4)로 희석한 2.5% glutaraldehyde solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 12~16시간 두어 세포 고정한 다음 표면의 혈관 조직 형성의 정도를 관찰하였다.

결 과

1) 혈관 평활근 세포의 분리 및 일차배양

Explant-derived culture 방법을 이용하여 혈관 조직으로부터 중막층의 혈관 평활근 세포를 분리 배양한 후 monoclonal anti- α smooth muscle actin을 이용한 면역염색법을 통해 분리 배양된 세포가 혈관 평활근 세포임을 확인하였으며(Fig. 1), 일차 배양 결과 1×10^5 cells에서 4.6×10^6 cells의 혈관 평활근 세포가 얻어졌다. 이 방법은 기존의 enzyme-dispersed 방법에 비해 혈관 평활근 세포의 초기 습득량은 적으나 계대 배양을 통해 체외 배양을 함에 따라 분리 배양된 세포의 형태가 건강하게 유지되었고 동결 보존 후 해동시켰을 때에도 세포의 형태가 크게 변하지 않음이 확인되었다.

2) Scaffold의 조직 병리학적 관찰

Scaffold에 혈관 평활근 세포를 심고 배양한 4주 후에 cell polymer constructs를 수직 절단하여 H&E 염색을 통해 조직 병리학적인 결과를 관찰하였다(Fig. 2). Scaffold의 분포에 차이를 보이기는 하지만 체외 배양한 혈관 평활근 세포가 scaffold 내에 부분적으로 많이 증식되어 있음을 확인할 수 있었다.

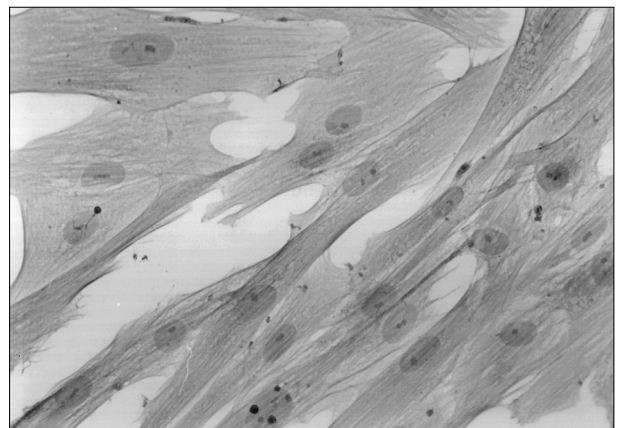


Fig. 1. Immunohistochemical staining of subcultured vascular smooth muscle cells after primary culture using anti-smooth muscle α actin ($\times 400$). The α -actin fibers were actively stained to brown color.

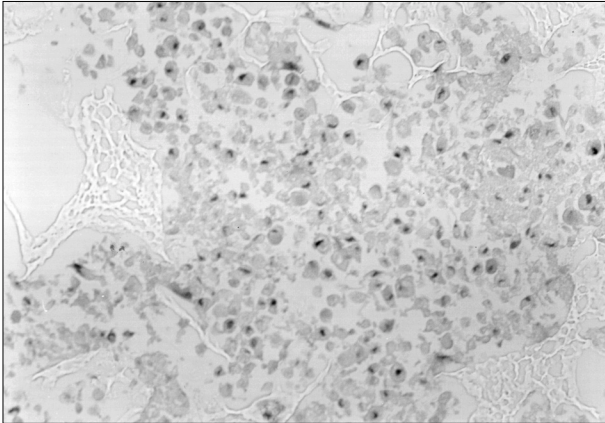


Fig. 2. Histochemical staining of the cell-polymer constructs after culturing *in vitro* for 4 weeks ($\times 200$). The vascular smooth muscle cells in the cell-polymer constructs were stained with hematoxylin and eosin.

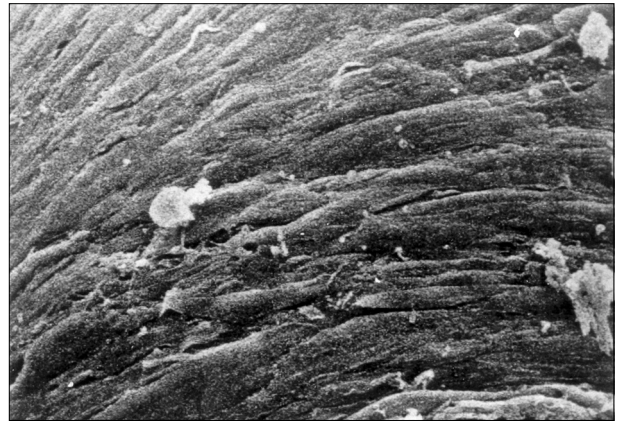


Fig. 4. Photomicrographs from scanning electron microscope 4 weeks after cultivation *in vitro*. The vascular muscle-like tissue was formed partially.

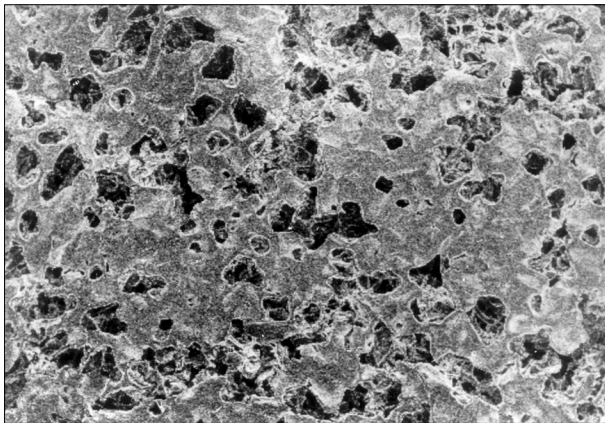


Fig. 3. Photomicrographs from scanning electron microscope examination of polymer scaffolds before the vascular smooth muscle cells were seeded. Polymers were made from PLGA and pores were created by gelatins.

3) Scaffold의 주사 전자 현미경 관찰

Scaffold 표면을 주사 전자 현미경을 통해 조사한 결과 혈관 평활근 세포가 침투 될 수 있는 크기의 pore들이 충분히 존재한다는 소견을 보여 주었다(Fig. 3). 체외 배양한 scaffold와 혈관 평활근 세포의 유기적인 결합 상태를 확인하고자 4주 배양 후에 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과 그 표면에는 혈관 평활근 세포들이 서로 결합되어 조직화된 소견을 보여 주었다(Fig. 4).

고 찰

기존의 동맥혈관 폐색증에 대한 동맥 우회로 술식에 사

용되는 인공 혈관이 가지는 조기 폐색과 임상적 적용 가능한 직경의 제한 등의 문제점을 해결하고자 다양한 시도가 지속되어 왔다. 최근 조직공학의 발달로 인하여 자가 혈관 세포 배양을 통한 혈관 조직의 합성은 기존의 이러한 문제점을 해결할 가능성이 매우 높게 예견되고 있다. Niklason등(12)은 동맥 혈관에서 분리한 혈관 평활근 세포를 polyglycolic acid (PGA)로 이루어진 scaffold에 심고 이를 bioreactor 내에서 형태적으로 혈관 모양을 갖추고 기능적으로 탄력성을 지니는 조직 공학적 혈관 제조를 성공시킨 바 있다. 이처럼 인공 혈관의 제조에 있어서 형태적인 모양을 갖추고 원하는 구경에 맞추어서 만드는 과정도 중요하지만 실제 임상적으로 혈관 대치술에 이용하기 위해서는 이와 더불어 체외 배양한 혈관 평활근 세포가 물리적인 탄력성을 가질 수 있는 배양 환경이 제공되어야 한다. 이를 위해서는 신축성을 지니는 혈관 평활근 세포의 사용과 collagen, elastin 등과 기타 extracellular matrix를 구성하는 단백질들과의 유기적인 결합이 요구되며,(12-14) 생체내 혈관 맥박과 유사한 환경이 되도록 배양 기간 동안 규칙적인 진동을 주는 bioreactor에서 배양(pulsatile culture conditions)함으로써 제조한 혈관의 신축성을 자극시킬 수 있다.(2,12) 그러나 국내에서는 이러한 조직 공학 기술을 이용하여 실제 혈관 대치술에 응용하기 위한 인공 혈관의 제조에 관한 연구는 외국에서의 활발한 연구에 비해 미흡한 실정이다. 혈관 장애를 가지는 환자의 정상 정맥 조직의 일부로부터 혈관 평활근 세포를 분리하고 알맞은 소구경 혈관으로 재생산하기 위해서는 체외 배양을 통해 만들어진 인공 혈관을 외국에서 시도된 인공 혈관과 같이 형태학적으로나 기능적인 면에서도 혈관의 특성을 지닐 수 있도록 개발해야 한다. Scaffold의 재질면에 있어서 본 연구에 이용된 PLGA 형태는 현재 많이 응용되고 있으며 제조 방법에 따라 fiber 형태로 짜여지거나 고체물

을 이용하여 pore를 형성시키는 방법 중 저자들은 후자의 방법에 의해 만들어진 scaffold를 이용하였다. 고체물을 이용하여 pore를 형성하는 데에는 salt나 gelatin 등을 이용할 수 있는데 저자들은 이 두 경우에 의해 제조된 scaffold에 대해 혈관 평활근 세포의 부착 능력을 조직 병리학적 방법과 주사 전자 현미경 관찰법에 의해 확인한 결과 salt를 이용한 경우에 비해 gelatin을 이용하여 pore를 형성한 scaffold를 사용한 경우가 훨씬 세포의 부착능이 좋음을 확인하였다. 이는 gelatin을 scaffold 제조에 이용함으로써 녹여 없앤 후 잔존하는 gelatin들이 pore를 코팅해 주는 효과가 있고 이것이 혈관 평활근 세포가 scaffold에 좀 더 잘 붙을 수 있도록 했을 것으로 사료된다. 그리고 Kim등(6)의 보고에 따르면 혈관 평활근 세포가 PGA fiber내에 붙어 자라는 정도가 seeding하는 방법에 따라 달라짐을 알 수 있다. Static 배양 방법에 비해 shaker 위에서 규칙적으로 흔들어 주거나 교반 배양기(spinner flask)를 이용해 seeding 한 경우 혈관 평활근 세포가 scaffold 내에서 더 좋은 부착력을 보였다.(6,15)

본 연구에서 만들어진 cell-polymer constructs는 완전하게 혈관 조직화가 이루어진 것으로 볼 수 없으나 위와 같이 외국의 보고된 기술을 도입하여 응용하려는 단계에 있는 국내 연구 실정에 미루어 볼 때 배양 방법상의 문제점을 보완한다면 혈관 대치에 이용될 수 있는 완전한 인공 혈관 생산의 가능할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
- 2) Ratcliffe A. The engineering of vascular grafts. *Matrix Biol* 2000;19:353-7.
- 3) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
- 4) Kim DI, Lee SY, Han JS, Lee BB. Differential protein expression of neointima after autologous vein grafting in monrel dogs. *Korean J Vasc Surg* 1998;14:18-22.
- 5) L'Heureux N, Palquet S, Lacoë R, Germain L, Auger FA. A

- completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12:47-56.
- 6) Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, Mooney DJ. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng* 1998;57:46-54.
- 7) Ye Q, Zund G, Jockenhoewel S, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, Grunenfelder J, et al. Tissue engineering in cardiovascular surgery: new approach to develop completely human autologous tissue. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:449-54.
- 8) Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, et al. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 1999;64:580-9.
- 9) Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Grainger DJ. Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta. In: Jones GE, editor. *Methods in molecular medicine: Human cell culture protocols*. Totowa, NJ, Humana Press Inc.; 1996. p.319-34.
- 10) Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Grainger DJ. Proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells in culture is modulated by active TGF. *Cardiovasc Res* 1995;29:848-55.
- 11) Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci* 1993;85:501-13.
- 12) Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999;284:489-93.
- 13) Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986;231:397-400.
- 14) Ogle BM, Mooradian DL. The role of vascular smooth muscle cell integrins in the compaction and mechanical strengthening of a tissue-engineered blood vessel. *Tissue Eng* 1999;5:387-401.
- 15) Seliktar D, Black RA, Vito RP, Nerem RM. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng* 2000;28:351-62.