

세포주도형 전달시스템을 위한 알지네이트 마이크로젤의 기계적 물성 제어

오승주 · 김희진 · 조성우 · 한사라 · 신성규 · 정재현[†]

숭실대학교 화학공학과

(2017년 8월 17일 접수, 2017년 9월 19일 수정, 2017년 10월 31일 채택)

Tuning the Toughness of an Alginate Micro-gel for Cell-instructed Delivery

Seung Joo Oh, Hee-Jin Kim, Sung Woo Cho, Sa Ra Han, Sung Gyu Shin, and Jae Hyun Jeong[†]

Department of Chemical Engineering, Soongsil University, 369 Sangdo-ro, Dongjak-gu, Seoul 06978, Korea

(Received August 17, 2017; Revised September 19, 2017; Accepted October 31, 2017)

초록: 세포전달체의 기계적 물성을 조절하여 세포의 분화 정도에 따라 방출 제어가 가능한 세포주도형 전달시스템을 설계하였다. 먼저, 알지네이트 분자에 메타크릴레이트를 도입하고 순수 알지네이트 분자와 혼합하여, Ca^{2+} 이온으로 가교된 마이크로젤을 제조하였다. 또한 PEGDA를 첨가하여 이온가교와 함께 화학적 가교가 추가된 마이크로젤을 제조하였다. 메타크릴레이트의 접목도 및 화학적 가교 정도를 조절하여 다양한 강도와 인성을 갖는 마이크로젤을 제조할 수 있었다. 213 J/m^2 의 W_f (work to fracture)와 7.5 kPa 의 E (elastic modulus)를 갖는 마이크로젤 시스템에서 신경세포로 분화가 진행된 세포가 젤을 깨고(hatching) 방출되는 것을 확인하였다. 본 연구에서 시도한 세포주도형 전달시스템은 세포견인력에 따라 젤의 기계적 물성을 체계적으로 제어한다면 다양한 세포에 적용 가능한 맞춤형 전달시스템으로 활용될 수 있으리라 기대된다.

Abstract: The cell-instructed delivery system was designed to control the release behavior of cell by tuning the mechanical properties of the cell delivery carrier. First, alginate molecules were substituted with methacrylates and mixed with pure alginate molecules to prepare micro-gel crosslinked with Ca^{2+} ions. Then, the poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) was added to incorporate interpenetrating covalent cross-links in an ionically cross-linked alginate micro-gel. Controlling the degree of substitution of methacrylates and chemical cross-links tuned the alginate micro-gel with varying stiffness and toughness. This study discovered that the cells differentiated into neurons were hatching and released in the alginate micro-gel with W_f (work to fracture) of 213 J/m^2 and E (elastic modulus) of 7.5 kPa . Overall, the results of this study will be highly useful in designing cell-instructed delivery devices by systematically controlling the mechanical properties of the gel according to the cell traction force.

Keywords: cell-instructed delivery, alginate micro-gel, work to fracture, elastic modulus, neuron cell.

서 론

면역세포, 줄기세포 등의 살아있는 자가(*autologous*), 동종(*allogenic*), 혹은 이종(*xenogenic*)의 세포를 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용하는 세포치료제(*cell therapeutics*)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹ 세포치료제의 효과를 극대화하기 위해, 세포를 안전하게 인체 내 목적부위로 전달 및 이식하는 세포전달시스템 연구도 새롭게 부각되고 있다.^{2,3} 일반적으로 세포전달시스템은 세포친화적 구조를 갖는 세포외기질(*extracellular matrix*) 유래 생체물질을 사용하

여 세포를 부착 또는 내부에 봉입하여 세포를 외부자극으로부터 보호하고 증식(*proliferation*) 및 분화(*differentiation*)시켜 인체 내로 전달하게 된다.⁴ 이를 위해, 면역세포, 줄기세포, 신경성장세포 및 망막세포 등 다양한 세포에 적합한 맞춤형 세포전달체 연구가 진행되고 있다.^{5,6} 최근에는 다공성 자성 하이드로젤에 세포를 부착하여 외부 자기장에 의해 세포전달을 제어한 연구가 보고되었다.⁷ 이와 같이, 세포는 일반 약물(*drug*)과는 달리, 성장, 증식 및 분화를 하기 때문에 전달체로부터 인체 내 목적부위로 최적의 때에 방출되도록 제어하는 기술이 요구된다.

이번 연구에서는 세포전달체의 기계적 물성을 조절하여, 세포의 분화 정도에 따라 방출 제어가 가능한 세포주도형(*cell-instructed*) 전달시스템을 설계하였다(Figure 1). Ca^{2+} 이온으로 가교된 알지네이트 마이크로젤(*microgel*, *alginate-*

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: nfej@ssu.ac.kr

©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

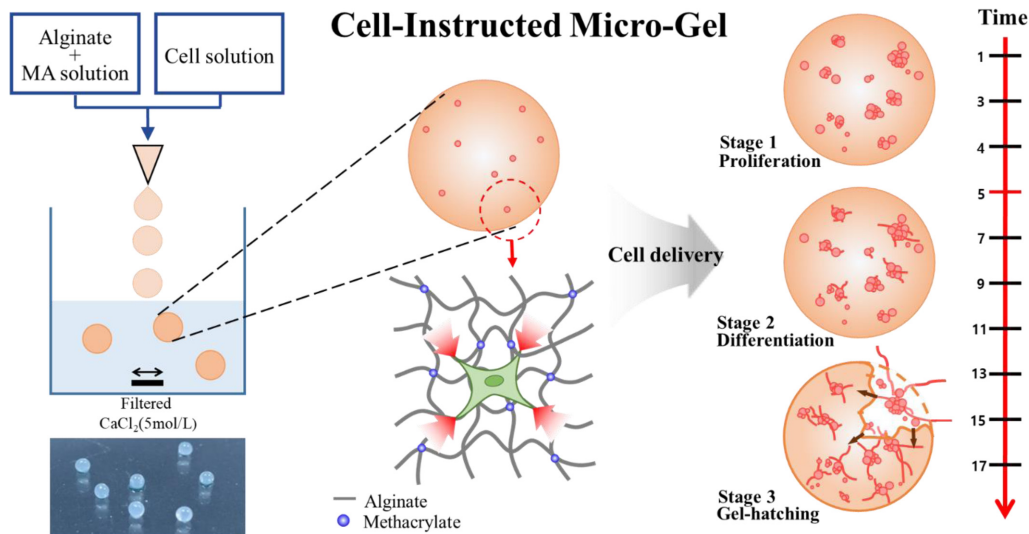


Figure 1. Schematic description of the cell-instructed delivery by tuning the toughness of an alginate micro-gel.

calcium chelate complex)을 사용하여 세포를 내부에 봉입하고 증식과 분화가 가능하도록 제조하였다. 고분자 또는 섬유 보강제 첨가,⁸ 고분자 필름으로 젤 외부 코팅,⁹ Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} 등 중이온 가교제 사용¹⁰ 및 젤 내부 IPN(interpenetrating network) 형성¹¹ 등의 다양한 방법으로 알지네이트 마이크로젤의 물성을 제어하는 연구가 진행되었다.

본 연구에서는 알지네이트 마이크로젤의 기계적 물성을 조절하기 위해, 알지네이트 분자에 메타크릴레이트(methacrylates)를 도입하고 순수 알지네이트 분자와 혼합하여 마이크로젤을 설계하였다. 나아가, 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(poly(ethylene glycol)diacrylate, PEGDA)를 첨가하여 화학적 가교도 가능하도록 하였다. 알지네이트 분자에 도입된 메타크릴레이트 분자의 점목도(DS, degree of substitution),^{12,13} 순수 알지네이트 분자와의 혼합비 및 화학적 가교 정도를 조절하여 다양한 강도(stiffness)와 인성(toughness)을 갖는 마이크로젤을 제조할 수 있었다. 마이크로젤에 봉입된 세포는 증식(proliferation)과 분화(differentiation) 과정 중에 젤에 작용하는 견인력(traction force)이 증가하게 된다. 성장 중에 있는 세포는 젤 내부에 안전하게 봉입되어 있다가, 세포의 증식 및 분화 정도가 일정 수준 이상이 되면 젤을 깨고(hatching) 방출될 수 있는 세포주도형 전달시스템을 제조할 수 있었다. 모델 세포로 신경세포주(PC12)를 사용하였고 알지네이트 기반 세포전달체의 기계적 물성 및 내부 구조는 만능재료시험기, 주사전자현미경과 형광현미경을 통해 분석하였다. 본 연구에서 제안한 세포주도형 전달시스템은 세포치료제의 효과적인 전달 연구뿐만 아니라 세포 및 조직 재생 연구 등 다양한 분야에 활용될 수 있다.

실 험

메타크릴 알지네이트(Methacrylic Alginate, MA)의 합성. 알지네이트(alginate, Sigma)를 pH 6.4인 0.1 M 2-(N-모르폴리노) 에탄설폰산(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES, Sigma) 완충용액에 1.0%(w/v)로 첨가하고 교반하면서 30~40 °C에서 충분히 용해하였다. 완전 용해되면 상온, 질소 대기 하에서 1-하이드록시벤조트리아졸(1-hydroxybenzotriazole, HOBt, Sigma), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC Sigma), 2-아미노에틸 메타크릴레이트(2-aminoethyl methacrylate, AEMA, Sigma)를 천천히 첨가하고 18시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 반응용액을 증류수로 3일간 투석(dialysis)해 준 후 동결건조하여 메타크릴레이트가 점목된 알지네이트 분자(MA)를 얻었다. 합성한 MA는 D_2O 에 녹여 400 MHz에서 ^1H NMR(Avance II, Bruker Biospin)로 구조를 분석하였다. MA의 점목도(DS)는 수산화나트륨(sodium hydroxide, NaOH, Sigma)으로 적정(titration)하여 반응하지 않은 COOH 관능기(free carboxylate groups)를 측정하여 계산하였다.¹⁴

알지네이트 마이크로젤 제조. 순수 알지네이트 분자 단독 또는 MA와 혼합하여 수용액상에서 1.5%(w/v)로 젤 용액(pre-polymer solution)을 제조하였다. 젤 용액을 0.5 M 염화칼슘(calcium chloride, CaCl_2 , 삼전화학) 용액에 주사기(26 gauge needle)를 사용하여 작은 물방울(droplets)로 떨어뜨려 알지네이트 마이크로젤을 제조하였다. 마이크로젤 내부에 화학적 가교를 통한 IPN을 도입하기 위해, 2%(w/v) PEGDA

(M_n : 575 g/mol, Sigma)와 광개시제인 Irgacure 2959(Sigma) 0.1%(w/v)를 첨가하여 동일한 방법으로 마이크로젤을 제조한 후, 10분간 UV(365 nm) 조사하였다.

알지네이트 마이크로젤의 구조 및 특성 분석. 알지네이트 마이크로젤의 기계적 물성은 만능재료시험기(universal testing machine, UTM, DrTech) 장치를 이용하여 수행하였다. 만능재료시험기의 설정 값은 시험 속도 0.5 mm/min, 하중 범위는 1.0 kg로 동일하게 적용하였다. 압축 강도(Young's elastic modulus, E)는 구형의 탄성체에 해당하는 Hertz contact theory 식(1)을 사용하여 측정하였다.¹⁵

$$F = \frac{4}{3} \left(\frac{E}{1-\nu^2} \right) R^{\frac{1}{2}} h^{\frac{3}{2}} \quad (1)$$

여기서, F 는 알지네이트 마이크로젤에 높이 별로 가해지는 힘(force), R 은 알지네이트 마이크로젤의 반지름(radius), h 는 이동변위, 그리고 ν 는 마이크로젤의 포아송 비(Poisson's ratio)를 나타내며 rubbery theory에 입각하여 0.5로 가정하였다.

알지네이트 마이크로젤의 인성은 마이크로젤이 파단(fracture)될 때까지 단축방향으로 압축하여 측정하였다. 가해진 힘(F)과 변위(displacement, ΔD) 곡선은 'pseudo' 응력(stress, σ)과 변형률(strain, ε) 곡선(식2, 3)으로 전환하여 사용하였다. 이는 마이크로젤에 큰 변형(high strain)이 주어지면 원기둥(cylinder) 형태로 간주할 수 있다는 가정에 기인한다.¹⁶

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (2)$$

$$\varepsilon = \left(\frac{\Delta D}{D_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

여기서, A_0 는 압축을 가하기 전 마이크로젤의 중심 단면적 값(area)이며, D_0 는 압축 전 마이크로젤의 직경(diameter)이다. 마이크로젤이 파단될 때까지(ΔD_f , ultimate displacement)의 응력과 변형률 곡선의 면적으로부터 W_f (work to fracture, J/m²) 값을 계산하여 인성을 측정하였다.

마이크로젤의 내부구조(microstructure)는 주사 현미경(FE-scanning electron microscope, JEOL-7001F)을 이용하여 관찰하였다.

신경세포 봉입 및 세포분화 관찰. 신경세포주(PC12, ATCC)는 75 cm² flask에서 Roswell Park Memorial Institute medium(RPMI-1640, Biowest)에 10% horse serum(HS, Biowest)와 5% fetal bovine serum(FBS, Biowest), 1% penicillin-streptomycin(P/S, Biowest)을 첨가한 배양액을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 환경에서 배양했다. 배양한 신경성장세포를 1.0 mL 알지네이트 젤 용액(pre-gel solution)에

2×10^5 cells 농도로 각각의 알지네이트 마이크로젤에 봉입하였다. 이때, 전처리된 콜라겐(collagen, 6.0 mg/mL, Advanced Bio-Matrix) 용액 0.3 mL를 젤 용액에 추가하여 봉입된 세포의 성장 환경을 제공하였다. 세포를 봉입한 마이크로젤은 phosphate buffered saline(PBS, Biowest)로 2번 세척하고 배양액에서 성장 및 증식시켰다. 배양 5일 후, 배양액에 1.0 μ M의 덱사메타손(Dexamethasone, BioReagent)과 50 ng/mL의 뉴런 성장 인자(Nerve Growth Factor- β , NGF, Sigma)를 첨가하여 신경세포로의 분화를 촉진시켰다.^{17,18} 이때, NGF는 0.1% bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 포함된 PBS에 녹여 사용하였다. 배양액은 2일 주기로 교체했으며, 광학현미경(optical microscopy, Nikon Eclipse TS100)으로 세포들의 증식과 신경돌기(neurite) 성장을 관찰했다. 세포를 봉입하고 14일간 배양한 마이크로젤을 PBS로 두 번 세척해 주고 상온에서 10분간 4%(v/v) 포르말데하이드 용액으로 고정(fixation)하였다. 0.2%(v/v) Triton-X 100(Sigma) 용액을 처리하여 세포 투과성을 높여주었다. 마이크로젤의 세포는 1%(w/v) BSA 용액으로 30분간 처리하여 억제(blocking)시켜주고 PBS로 다시 세척해 주었다. 이후, FITC가 태그된 phalloidin(Sigma), DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma)를 12시간 동안 처리하여 염색하였다. 염색한 세포는 형광현미경(fluorescent microscope, Nikon Eclipse Ti)을 사용하여 관찰하였고 이미지는 ImageJ로 분석하였다.

결과 및 토론

메타크릴 알지네이트(Methacrylic Alginate, MA) 합성. 메타크릴 알지네이트(MA)는 순수 알지네이트 분자에 AEMA를 도입하여 성공적으로 합성하였다(Figure 2(a)). Figure 2(c)의 ¹H NMR 분석결과에서 보는 것과 같이, acrylates가 알지네이트 backbone에 성공적으로 접목되었음을 확인할 수 있다. 알지네이트 분자의 반복 단위가 나타내는 특성 피크(A: -CH-)와 AEMA의 특성 피크(E: -CH₂-) 분석 값을 사용하면 접목도를 구할 수 있었다. 접목도(DS: degree of substitution)는 알지네이트의 반복 단위 분자 100개당 acrylate 분자로 치환된 분자수로 정의한다. 식 (4)에서 n 은 acrylate 분자로 치환된 단위 분자수, m 은 치환되지 않은 단위 분자수를 의미한다.

$$DS_{acryl}(\text{mol}\%) = \left(\frac{n}{m+n} \right) \times 100 \quad (4)$$

본 연구에서는 acrylates의 접목도가 각각 5 mol%, 30 mol%를 갖도록 두 종류의 MA-5, MA-30를 합성하였다. 합성한 MA를 NaOH로 적정하고 반응하지 않은 COOH 개수를 측정하여 알지네이트에 도입된 acrylates의 접목도가 각각 4.5 mol%(MA-5), 32.0 mol%(MA-30)임을 확인하였다.¹⁴

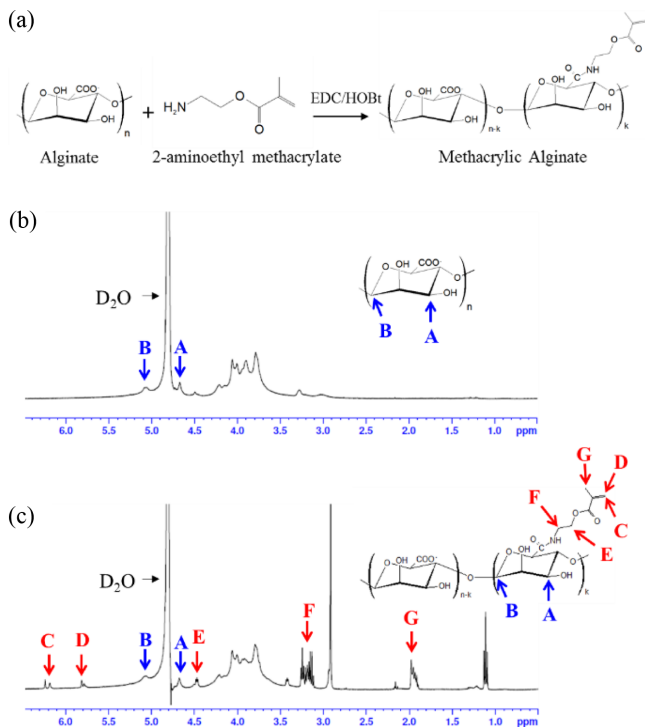


Figure 2. (a) Synthesis scheme of methacrylated alginate via EDC chemistry between carboxylate groups of alginate and primary amine group of 2-aminoethyl methacrylates; (b) ¹H NMR (D₂O) spectra of alginate; (c) MA-5.

알지네이트 마이크로젤 제조 및 물성 분석. 알지네이트 마이크로젤은 순수 알지네이트 분자 단독 또는 MA와 혼합하여 droplet 형태로 젤 용액을 CaCl₂ 용액에 떨어뜨려 제조하였다. Table 1에서 보는 것과 같이, 알지네이트 분자 단독으로 만든 마이크로젤은 alginate-G, MA와 혼합하여 만든 마이크로젤은 MA-G로 각각 명명하였다. 나아가, 광개시제와 PEGDA를 첨가하여 MA-G를 제조한 후, 추가적으로 젤 내부를 UV로 가교한 마이크로젤은 X-MA-G(cross-linked MA-G)로 명명하였다. 이때, MA분자는 acrylates 접목도가 5 mol%인 MA-5와 30 mol%인 MA-30을 사용할 수 있으나, 본 연구에서는 MA-5로 한정하여 마이크로젤(MA-G, X-MA-G)을 제조하였다. MA-30으로 MA-G를 제조한 경우, 마이크로젤의 기계적 물성이 세포를 봉입하는데 충분치 않은 결과를 보였다. 이는 acrylates로 치환된 MA의 단위 분자수가 증가

하여 이온 가교 결합할 수 있는 free COOH 개수가 감소하기 때문이다. 하지만, X-MA-G를 제조할 때에는 acrylates 수가 많은 MA-30 분자를 사용하면 UV 가교로 인한 젤의 기계적 물성을 증가시킬 수 있다.

이렇게 제조한 alginate-G, MA-G는 크기가 평균적으로 3.0 mm 정도로 큰 차이를 보이지 않았지만 X-MA-G는 크기가 2.7 mm 정도로 약간 감소하였다(Table 1). 이는 X-MA-G의 내부가 UV 가교에 의해 MA와 PEGDA 사이에 IPN이 형성되었기 때문이다. Figure 3(a)는 UTM으로 구형의 마이크로젤에 가한 힘(force)과 변형된 변위(displacement)를 나타낸 결과이다. 이를 토대로 Hertz contact theory(식 1)에 의해, 각 마이크로젤의 압축강도(E)를 계산하였다. Figure 3(b)의 압축강도 결과를 보면, MA-G의 E 값은 7.5 ± 1.1 kPa로 7.7 ± 0.4 kPa 결과를 보인 alginate-G와 큰 차이를 보이지 않는 것을 알 수 있었다. 이는 acrylates 접목도가 5 mol%인 MA-5를 사용하여 MA-5와 알지네이트를 동량으로 혼합하여 제조한 경우, 이온 가교 가능한 free COOH 개수가 alginate-G와 비교하여 97.5%로 큰 차이를 보이지 않기 때문이다. 하지만, X-MA-G의 경우 E 값이 10.9 ± 2.5 kPa로 상당히 증가하는 것을 확인할 수 있는데 이는 젤 내부가 Ca²⁺로 인한 물리적 가교뿐 아니라 MA와 PEGDA로 인한 화학적 가교가 일어났기 때문이다. 이번 연구에서는 접목도가 5 mol%인 MA-5와 2%(w/v) 양의 PEGDA를 사용하였는데, MA의 접목도와 PEGDA의 양을 조절하면 다양한 E 값을 갖는 마이크로젤을 제조할 수 있다.

Figure 4(a)는 마이크로젤에 가해 준 힘과 변위 곡선을 ‘pseudo’ 응력(σ)과 변형률(ϵ)로 전환한 곡선이다. 구형의 마이크로젤에 상당한 변형이 주어지면 Figure 4(a-1)과 같이 원기둥 형태로 간주할 수 있기 때문에, 식(2, 3)을 사용하여 전환하였다. 마이크로젤이 파단될 때의 응력과 변형률을 각각 ultimate strength, ultimate strain으로 명명하여 Table 1에 나타내었다. 또한 마이크로젤이 파단될 때까지의 응력과 변형률 곡선의 면적으로부터 W_f (work to fracture, J/m²) 값을 계산하여 젤의 인성을 측정하였다. Figure 4(b) 결과를 보면, X-MA-G의 W_f 값(159.5 ± 68.5 J/m²)이 가장 낮은 것을 알 수 있다. 젤 내부에 IPN으로 가교되어 압축강도(E)는 증가하지만, 화학적 가교가 증가함에 따라 상대적으로 plastic zone이 줄어들어 W_f 값은 낮아진 것이라 해석될 수 있다.¹⁹ 일반적으로 Maxwell model에 따르면, 이온 가교로 형성된 젤은 스

Table 1. Characteristics of Alginate-G, MA-G and X-MA-G

Sample	Diameter (mm)	Modulus (kPa)	Ultimate strength (kPa)	Ultimate strain (%)	Work to fracture (J/m ²)
Alginate-G	3.0±0.3	7.7±0.4	490.1±34.9	94.1±2.2	491.5±6.4
MA-G	3.0±0.1	7.5±1.1	242.5±9.7	87.1±3.1	213.3±15.7
X-MA-G	2.7±0.2	10.9±2.5	186.1±51.9	78.8±2.3	159.5±68.5

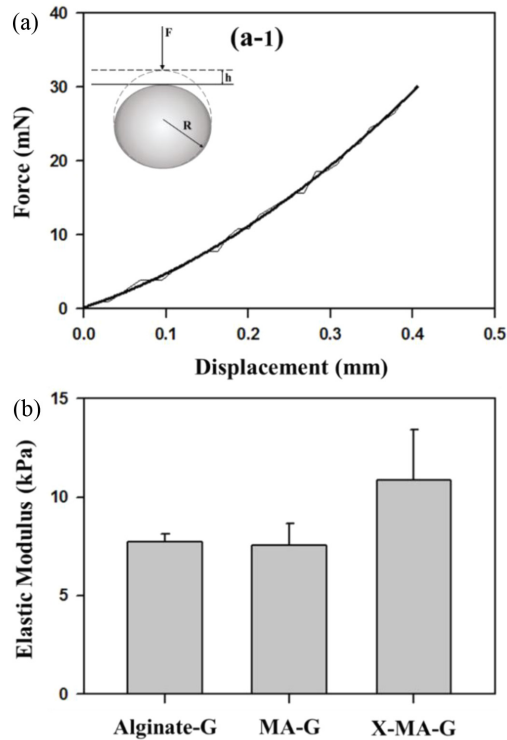


Figure 3. (a) Force-displacement curve of an alginate microgel measured by an UTM-assisted the uniaxial compression force; (b) elastic modulus (E) was calculated using Hertz contact theory (eq. 1) up to 10% strain.

프링-댐퍼(spring-damper) 거동을 보이지만, 공유결합 가교로 형성된 젤은 단순 스프링(elastic spring) 거동을 보이게 된다.²⁰ 때문에 alginate-G의 경우, 변형(deformation)에 따른 de-cross-linking과 re-cross-linking 과정을 거치며 에너지 분산(energy dissipation)이 용이하여 상대적으로 높은 인성을 갖게 된다. 그러므로 X-MA-G는 alginate-G와 비교해 볼 때, 압축강도는 높고 인성은 낮은 젤이라 할 수 있다. 또한 흥미롭게도, MA-G의 W_T 값($213.3 \pm 15.7 \text{ J/m}^2$)이 alginate-G의 W_T 값($491.5 \pm 6.4 \text{ J/m}^2$)보다 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있다. MA-5를 사용해서 MA-G를 만들었기 때문에 alginate-G의 E 값과 큰 차이를 보이지 않았던 것과 비교해 볼 때(Figure 4(b)), W_T 값은 alginate-G의 약 43% 정도로 크게 감소한 것을 알 수 있다. 비슷한 수준의 강도를 유지하면서도 인성은 낮은 마이크로젤을 제조할 수 있음을 의미한다. 이는 MA 분자 중, acrylates로 치환된 2.5%의 분자 단위가 defects로 작용하기 때문이다. 즉, alginate-G와 비교하여 볼 때, 변형이 MA-G에 작용하면 de-cross-linking 과정을 거치다 defects 부분을 만나면 변형을 가속화시키기 때문으로 해석될 수 있다. 결론적으로 본 연구에서는 세포 주도형 전달시스템에 적용하기 위하여, alginate-G, MA-G 및 X-MA-G를 제조하여, (1) 비슷한 수준의 강도를 갖지만 인성이 다른 젤 시스템과 (2) 강도

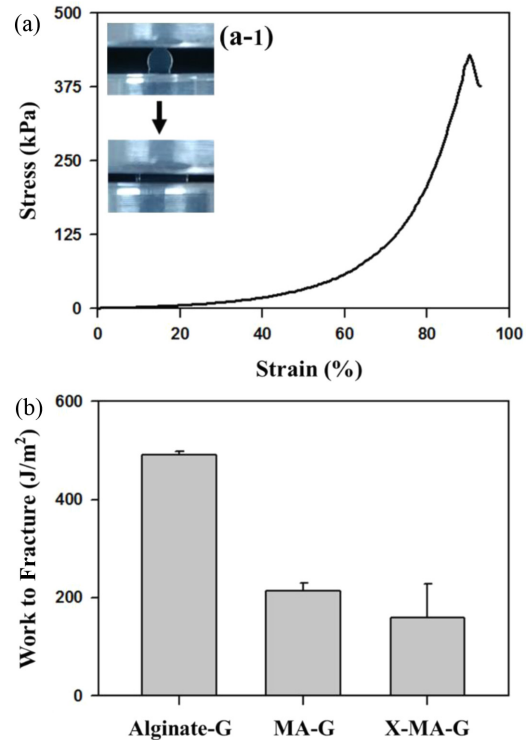


Figure 4. (a) Stress-strain curve of an alginate micro-gel was acquired with the uniaxial compression until fracture; (b) work to fracture (W_T) was calculated from the area under stress-strain curve divided by the diameter of the micro-gel. W_T was decreased with MA introduced and further cross-linked chemically.

는 높지만 인성은 낮은 젤 시스템의 모델로 각각 사용하였다.

세포주도형 전달시스템 제조. 신경세포를 1.0 mL 알지네이트젤 용액에 2×10^5 농도로 각각의 알지네이트 마이크로젤에 봉입하였다. 신경성장세포가 젤 내부에 봉입되어 성장하다가 일정 수준 이상의 분화가 진행되면 젤을 깨고 방출될 수 있는 세포주도형 전달시스템으로 설계하고자 하였다. 약 7.7 kPa의 E 와 491.5 J/m^2 의 W_T 를 갖는 alginate-G의 경우, 세포가 젤 내부에서 증식 및 분화 과정을 거치는 약 2주 동안 젤의 구조적 안정성이 유지되어 세포가 젤 밖으로 방출되지는 못하였다. 이는 alginate-G가 세포견인력에 비해 충분한 인성을 갖기 때문이다. 또한 낮은 159.5 J/m^2 의 W_T 값을 갖지만 상대적으로 증가된 $E(10.9 \text{ kPa})$ 를 갖는 X-MA-G의 경우도 세포의 성장 및 증식 자체가 저하되기 때문에 내부에 봉입된 세포가 젤을 깨고 방출될 수 없었다(Figure 5(d)). 반면에, alginate-G와 비슷한 수준의 강도를 갖지만 W_T 값을 43%로 낮춘 젤 시스템인 MA-G의 경우, 젤 내부에서 세포의 성장과 증식이 안정적으로 진행되었고(Figure 6(a)) 이후 일정 수준의 세포 분화가 진행되었을 때, 마이크로젤이 깨져 세포가 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 먼저, Figure 5(a)와 같이 MA-G 젤 한 개당 약 2×10^3 개의 신경성장세포를

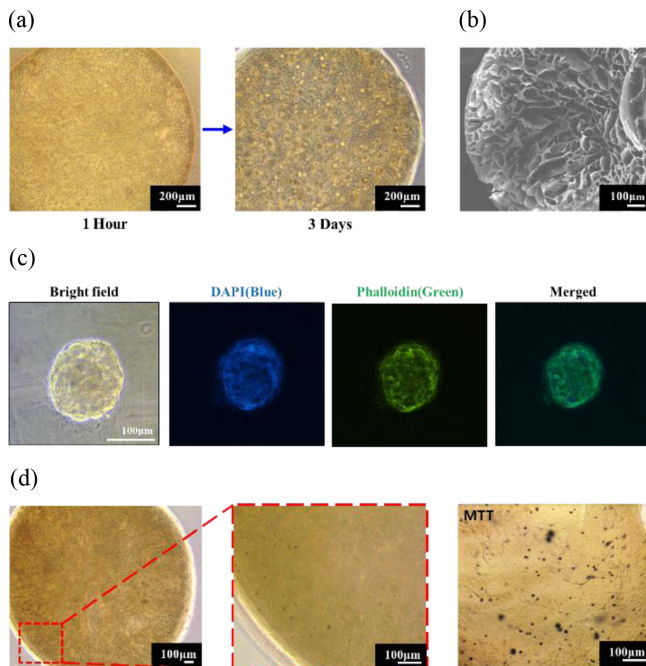


Figure 5. (a) Microscopic images of PC12 cells encapsulated in MA-G; (b) FE-SEM image of a MA-G freeze-dried; (c) fluorescent microscopic images of PC12 cells proliferated and clustered in the MA-G. For fluorescence microscopy, cells were fixed and stained with FITC phalloidin (cytoskeleton) and DAPI (nuclei); (d) microscopic images and MTT image of cells encapsulated in X-MA-G.

봉입하여 37 °C, 5% CO₂ 환경에서 배양했다. Figure 5(b)의 SEM 이미지에서 보는 것과 같이, 젤 내부가 3차원 네트워크 형태로 기공(pore)이 잘 발달되어 있기 때문에, 세포의 증식이 활발히 진행될 수 있었다. 신경성장세포는 Figure 5(c)의 염색 이미지에서 보는 것과 같이, 안정적으로 성장 및 증식하여 약 100 μm의 세포 클러스터(cluster)를 형성한다. 배양 5일차가 되면, 배양액에 텍사메타손과 NGF를 첨가하여 신경세포로의 분화를 촉진시켜 주었다. 그 결과 세포의 분화가 진행되면서 세포간인력이 증가하여 젤이 깨지기 시작하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 6(a)).²¹ 깨진 젤을 SEM 이미지로 확인하면 젤 내부로부터 파단이 진행된 것을 관찰할 수 있다(Figure 6(b)). 이는 Figure 6(c)에서 보는 것과 같이, 세포 클러스터로부터 신경돌기(neurite)가 성장하여 세포간인력이 증가하였기 때문이다(Figure 6(e)). 반면, 세포가 봉입되지 않은 젤은 배양액에서 구조적 안정성이 유지되었다. 즉, 세포의 증식 및 분화를 통한 총 세포간인력(total traction force)이 MA-G의 W_T 값보다 클 때, 젤의 hatching이 진행된다고 해석할 수 있다. 이렇게 분화된 신경세포의 전달은 목적부위에서 근육세포와 접촉하여 신경근 접합(NMJ, neuromuscular junction) 연구에 활용될 수 있다.²²

본 연구에서 시도한 세포주도형 전달시스템은 향후 줄기

세포, 면역세포 등과 같은 다양한 세포에 적용하여, 방출세포 상태에 따른 세포간인력과 젤의 기계적 물성을 측정 및 제어함으로써, 좀 더 효과적인 세포전달시스템으로 활용될 수 있으리라 기대된다. 또한 젤을 깨고 방출된 세포의 거동 및 목적부위로 이동 등에 대한 연구를 진행하여 통합적 세포전달체로 개발하고자 한다.

결론

세포전달체의 기계적 물성을 조절하여 세포의 분화 정도에 따라 방출 제어가 가능한 세포주도형 전달시스템을 설계하였다. 메타크릴레이트의 접목도 및 화학적 가교 정도를 조절하여 다양한 강도와 인성을 갖는 알지네이트 마이크로젤을 제조할 수 있었다. 알지네이트 마이크로젤과 비교하여 비슷한 수준의 강도를 갖지만 인성이 다른 젤 시스템과 강도는 높지만 인성은 낮은 젤 시스템을 제조하여 신경성장세포 전달체로 적용하였다. 213 J/m²의 W_T 와 7.5 kPa의 E 를 갖는 마이크로젤 시스템에서 신경세포로 분화가 진행된 세포가 젤을 깨고 방출되는 것을 확인하였다. 본 연구에서 제안한 세포주도형 전달시스템은 세포치료제의 효과적 전달 연구뿐 아니라 세포 및 조직 재생 연구 등에 다양하게 활용될 수 있다.

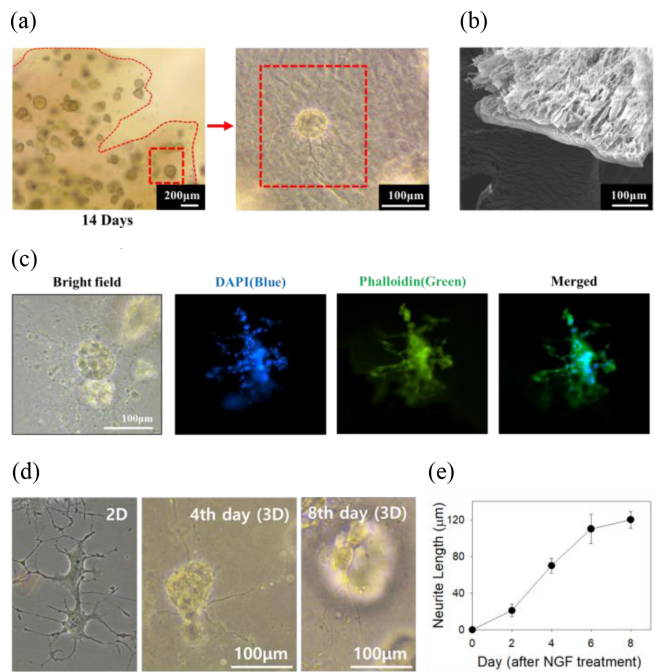


Figure 6. (a) Microscopic images of PC12 cells in the fractured MA-G at 14 days. PC12 cells were differentiated with NGF; (b) FE-SEM image of the fractured MA-G; (c) fluorescent microscopic images of PC12 cells in the MA-G; (d) phase contrast images of cells after NGF treatment; (e) neurite growth identified with the length of neurite in cells.

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단의 우주기술개발사업 (NRF-2016M1A3A3A02018239)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. A. Trounson and N. D. DeWitt, *Nature Cell Biology*, **14**, 331 (2012).
2. S. B. Stephan, A. M. Taber, I. Jileeva, E. P. Pegues, C. L. Sentman, and M. T. Stephan, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 97 (2015).
3. J. H. Jeong, V. Chan, C. Cha, P. Zorlutuna, C. Dyck, J. K. Hsia, R. Bashir, and H. Kong, *Adv. Mater.*, **24**, 58 (2012).
4. R. A. Perez, M. Kim, T. H. Kim, J. H. Kim, J. H. Lee, J. H. Park, J. C. Knowles, and H. W. Kim, *Tissue Eng. Part A*, **20**, 103 (2013).
5. S. J. Bidarra, C. C. Barrias, and P. L. Granja, *Acta Biomater.*, **10**, 1646 (2014).
6. N. C. Hunt, D. Hallam, A. Karimi, C. B. Mellough, J. Chen, D. H. W. Steel, and M. Lako, *Acta Biomater.*, **49**, 329 (2017).
7. X. Zhao, J. Kim, C. A. Cezar, N. Huebsch, K. Lee, K. Bouhadir, and D. J. Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 67 (2011).
8. P. R. Hari, T. Chandy, and C. P. Sharma, *J. Appl. Polym. Sci.*, **59**, 1795 (1996).
9. M. L. Huguet, R. J. Neufeld, and E. Dellacherie, *Process Biochem.*, **31**, 347 (1996).
10. Y. A. Morch, I. Donati, B. L. Strand, and G. Skjak-Braek, *Biomacromolecules*, **7**, 1471 (2006).
11. C. Cha, S. R. Kim, Y. S. Jin, and H. J. Kong, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 63 (2012).
12. H. J. Kim, Y. N. Cho, S. W. Cho, Y. G. Kim, H. W. Ryu, and J. H. Jeong, *Polym. Korea*, **40**, 321 (2016).
13. Y. N. Cho, H. J. Kim, S. W. Cho, S. G. Shin, and J. H. Jeong, *Polym. Korea*, **40**, 163 (2016).
14. J. J. Schmidt, J. H. Jeong, V. Chan, C. Cha, K. Baek, M. H. Lai, R. Bashir, and H. Kong, *Biomacromolecules*, **14**, 1361 (2013).
15. C. Cha, J. Oh, K. Kim, Y. Qiu, M. Joh, S. R. Shin, X. Wang, C. U. Gulden, K. Wan, R. Liao, and A. Khademhosseini, *Biomacromolecules*, **15**, 283 (2014).
16. Y. Tal, J. V. Rijn, and A. Nussinovitch, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 788 (1997).
17. L. Levi-Montalcini, *Science*, **237**, 1154 (1987).
18. N. Zilony, M. Rosenberg, L. Holtzman, H. Schori, O. Shefi, and E. Segal, *J. Control. Release*, **257**, 51 (2017).
19. H. J. Kong, E. Wong, and D. J. Mooney, *Macromolecules*, **36**, 4582 (2003).
20. V. C. Li and T. J. Hashida, *J. Mater. Sci. Lett.*, **12**, 898 (1993).
21. X. Tang, A. Tofangchi, S. V. Anand, and T. A. Saif, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003631(2014).
22. S. W. Cho, S. G. Shin, H. J. Kim, S. R. Han, and J. H. Jeong, *Polym. Korea*, **41**, 346 (2017).