

온도응답성 고분자의 패턴상 그래프트를 이용한 공배양법

배진숙 · 안창현 · 윤관한 · 권오형[†] · 강인규^{*} · Masayuki Yamato^{**} · Akihiko Kikuchi^{**} · Teruo Okano^{**}

금오공과대학교 고분자공학과, ^{*}경북대학교 고분자공학과

^{**}동경여자의과대학 선단생명과학연구소

(2005년 2월 28일 접수, 2005년 4월 7일 채택)

Cell Co-culture Method by Patterned Graft of Thermo-Responsive Polymer

Jin Suk Bae, Chang Hyun Ahn, Kwan Han Yoon, Oh Hyeong Kwon[†],
Inn-Kyu Kang^{*}, Masayuki Yamato^{**}, Akihiko Kikuchi^{**}, and Teruo Okano^{**}

Department of Polymer Science and Engineering, Kumoh National Institute of Technology,
1 Yangho-dong, Gumi, Gyeongbuk 730-701, Korea

^{*}Department of Polymer Science, Kyungpook National University,
1370 Sankyuk-dong, Puk-ku, Daegu 702-701, Korea

^{**}Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University,
8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

(Received February 28, 2005; accepted April 7, 2005)

초록 : 온도응답성 고분자인 PIPAAm을 포토마스크를 사용하여 전자빔조사에 의해 패턴상으로 세포배양용 폴리스티렌 접시표면에 그래프트하였다. 폴리스티렌 표면의 PIPAAm의 그래프트는 ATR-FTIR과 ESCA에 의한 표면분석을 통해 확인하였다. 이러한 표면에 간싯질세포를 37 °C에서 배양하였고, 균일하게 간세포가 배양된 배양접시를 PIPAAm의 LCST 이하인 20 °C로 배양온도를 낮추어 PIPAAm이 그래프트된 도메인에 접촉된 간싯질세포를 탈착시키고 배양접시를 다시 37 °C로 올린 후 두 번째 세포인 혈관내피세포를 파종하여 PIPAAm이 그래프트된 도메인에만 선택적으로 접착시킴으로써 같은 평면상에서 간싯질세포와 혈관내피세포를 공배양할 수 있게 되었다. 이러한 방법으로 생체에서 간싯질세포와 혈관내피세포를 장기간에 걸쳐 공배양할 수 있었다.

Abstract: Thermo-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) was covalently patterned by masked electron beam irradiation. Introduction of PIPAAm on tissue culture polystyrene dish was confirmed by ATR-FTIR and ESCA measurements. Hepatocytes were cultured at 37 °C on these surfaces. Cells adhered on PIPAAm-grafted domains were detached by reducing culture temperature to 20 °C. Endothelial cells were then seeded and cultured on the same surfaces. Seeded endothelial cells were selectively attached on hepatocytes detached and PIPAAm-grafted domains and could be co-cultured with hepatocytes on the same culture dishes with clear pattern. This co-culture method enabled long-term co-culture of hepatocytes with endothelial cells.

Keywords: patterning, thermo-responsive polymer, co-culture, endothelial cell, hepatocyte.

1. 서론

매년 전세계의 많은 사람들이 질환, 사고, 선천성 이상이나 결손 등으로 인하여 조직을 잃거나 말기 장기부전을 일으키고 있다. 새로운 면역억제제의 개발과 마취 및 수술기법의 발달로 인해 일부 장기이식이 급속도로 확산되어 인류의 건강증진에 매우 중요한 역할을 하고 있으나, 기증되는 장기의 숫자가 현저히 부족하고 이식 거부반응 등이 심각한 문제로 대두되고 있다. 따라서 최근 손상되었거나 기능을 상실한 환자의 조직이나 장기의 세포를 일부 채취하여 생체적합성 고분자 지지체를 이용해 체외에서 배양한 다음 체내의 원래 위치에 이식하여 조직이나 장기를 복원, 재생 또는 대체

하는 조직공학(tissue engineering)이 크게 각광을 받고 있다.¹

생체 내에서의 간은 매우 재생이 잘되는 조직의 하나로 전체의 70%를 절단하여도 2, 3개월 후면 원상태로 돌아온다. 반면 일단 체외로 나오게 되면 간조직은 잘 증식하지 않고 생존하더라도 분화되지 않아 그 기능을 다하지 못하는 특징을 가지고 있다.

현재 개발되고 있는 인공간은 합성물질로 만든 비생물학적 인공간, 간조직과 간세포를 이용한 생물학적 인공간 그리고 두 가지를 배합한 하이브리드 인공간으로 나눌 수가 있다. 비생물학적 인공간은 간의 해독기능과 같은 단일 간 기능을 대체하는 연구에 집중해 왔다. 이러한 접근의 예는 혈액투석, 혈액여과,² 고정화효소를 이용한 혈액정화법³ 등이다. 생물학적 인공간에는 크게 이식용 간세포계와 체외순환형 간세포 바이오리액터로 나눌 수 있다. 비생물학적 인공간과는 달리 간조직을 이루는 간싯질세포(hepatocyte)를 이용하는 시스템

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohkwon@kumoh.ac.kr

으로 광범위한 간특이적 대사기능의 대체가 가능할 것으로 기대할 수 있다. 생물학적 인공간에는 제공자의 하나의 간을 부분 절제하여 다른 여러 환자에게 이용하는 부분절제술에 의한 방법과 간세포의 현탁액, 피막형성 또는 미립구나 생분해성 고분자 섬유에 간세포를 부착하는 방법 등이 있다.⁴

인공간에서 간세포의 높은 기능을 유지하기 위해서 배양 환경의 최적화와 배지에 호르몬이나 성장인자 등을 첨가하는 등의 많은 연구가 진행 중이다. 그 중에서도 간조직의 실질세포(parenchymal cell)인 hepatocyte와 비실질세포(non-parenchymal cell) 간의 공배양(co-culture)법이 있다. 생체조직은 단일세포로만 구성되어진 것이 아니라 주된 기능을 맡은 실질세포와 그 주위를 둘러싸며 다양한 영향을 끼치는 비실질세포로 구성되어져 있다. 간조직에서도 총 세포수의 70% 만이 간실질세포(hepatocyte)로 이루어져 있고 나머지 30%는 간내의 혈관을 이루는 혈관내피세포(endothelial cell)나 면역을 담당하는 쿠퍼 세포(Kuffer cell)와 간세포 중간 중간에 위치해 비타민 A의 저장을 맡고 있는 이토 세포(Ito cell) 등 다양한 세포 종류로 이루어져 있다. 따라서 공배양 방법은 실제 생체를 구성하는 장기와 조직의 구조에 기인된 것이라 할 수 있다.

지금까지의 간실질세포와 다른 세포와의 공배양은 단층 배양계가 많으며 또한 쥐의 초대간세포를 이용한 연구 예가 대부분이다. 실질세포와 혼합하는 세포 종은 간비실질세포, 간유래 상피세포, 혹은 그 외의 다른 세포들이다. 공배양의 방법 중에서도 랜덤공배양(random co-culture)은 이중세포를 동시에 현탁하여 세포용액으로 한 후 세포 배양표면에 동시에 파종, 배양하는 방법으로서 그 결과 알부민 분비활성의 향상, DNA 합성 촉진 및 약물대사활성의 향상 등의 효과를 나타내었다. 하지만 랜덤공배양의 경우 두 종류 가운데 더 활성이 좋은 세포 종에 의해 배양표면 전체가 잠식되므로 두 가지 세포의 균형있는 배양이 어렵다. 따라서 장기간의 공배양이 어렵다는 단점을 가지고 있다.⁵ 이러한 단점을 보완하기 위해서 배양표면에 마이크로 패턴을 작성하는 방법이 개발되어졌는데 공배양시 두 종류의 세포가 각각 일정한 패턴상으로 특정 도메인을 형성하게 함으로써 두 가지 세포의 균형있는 배양이 가능하고 따라서 장기간의 공배양이 가능하게 되었다.⁶

마이크로 패턴(surface micropatterning)은 아주 다양한 방법으로 작성되어졌는데 세포의 접착을 조절하기 위해 표면 토폴로지의 변화,^{7,8} 표면 전하,^{9,10} 친수성기의 도입,¹¹ 그리고 자극응답성 고분자의 이용,¹²⁻¹⁵ 폴리다당의 고정화 등이^{16,17} 많이 이용되어지고 있고, 최근에는 세포의 성장이나 분화 또는 세포 자살(apoptosis) 등의 세포의 기능을 조절하기 위해 insulin^{18,19} 또는 epidermal growth factor(EGF) 등의²⁰ 생체 분자를 고정화하는 등의 다양한 방법이 이용되고 있다.

표면 토폴로그래피의 변화는 지름의 크기가 다른 기공의 도입이나 거칠기가 다른 표면의 작성 또는 에칭(etching) 등의 방법에 의해 도입이 가능하다. Lee 등의²¹ 결과에 따르면 크기가 다른 기공(0.2~0.8 μm in diameter)을 가진 track-etched polycarbonate membrane에서의 섬유아세포의 거동은 기공크기가 작을수록 더 좋은 접착과 성장을 보였다. 그리고 세포의 접착은 평활한 표면에 비해 다소 거친 표면에서 더 유리하다고 보고되고 있다. 따라서 이러한 표면 토폴로지에 대한 특정 세포의 성질에 의해서 동일 평면상에서의 패턴상의 세포접착이 용이하다.

또한 배양표면의 물리화학적 성질, 즉 표면 소수성이나 전하에 의해서도 세포의 접착유도가 가능하다. 세포벽은 부분적으로 음전하

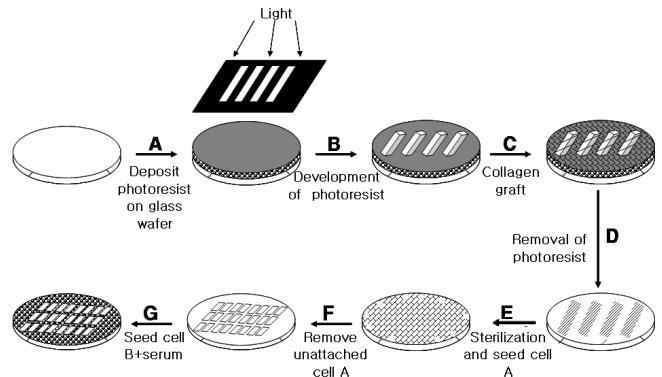


Figure 1. Schematic process for generating micropatterned co-culture of two distinct cell types reported by Toner group.⁶

(negative charge)를 가지므로 표면 전하가 양전하(positive charge)로 치환되어진 경우 정전기적 인력의 작용으로 더 좋은 접착을 나타내게 된다.

세포의 접착인자(cell adhesion factor) 혹은 성장인자(cell growth factor)의 고정화 방법은 laminin, extracellular matrix(ECM) proteins 등을 재료표면에 패턴상으로 그래프트 혹은 코팅함으로써 세포 또한 패턴상으로의 접착유도가 가능해진다. 공배양의 초기 모델인 Toner group의 공배양 시스템을 살펴보면 Figure 1과 같이 photolithography 방법을 이용하여 단백질을 패턴상으로 결합시키고 접착력이 좋지 않은 세포를 우선적으로 작성된 단백질 패턴에 접착시킨 후, 그 이외의 부분에는 접착성이 아주 우수한 세포를 파종함으로써 이중세포간의 공배양을 유도했다.⁶ 하지만 이러한 공배양 시스템에서는 접착성의 차이를 가지는 세포조합에 대해서만 공배양이 가능하다는 한계를 가지고 있다.

한편, 온도응답성 고분자인 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PIPAAm)는 lower critical solution temperature(LCST)를 가지는 특이한 고분자 재료로서 32 °C 이상에서는 소수성을 나타내고 그 이하의 온도에서는 친수성을 나타낸다.²² 이러한 온도응답성 고분자를 세포배양표면에 그래프트하면 세포배양온도인 37 °C에서는 그래프트된 PIPAAm이 소수성 성질을 나타내므로 세포의 접착이 가능하게 되고 표면에 접착한 세포는 PIPAAm의 온도응답성에 의해 저온처리 시 친수화 되어 접착한 세포의 탈착이 가능해지는 특성을 가진다.^{23,24}

본 연구에서는 이러한 온도응답성 고분자(thermo-responsive polymer)의 일종인 PIPAAm을 전자선 조사장치를 이용하여 세포배양 표면에 패턴상으로 그래프트함으로써 간단하면서도 어떠한 세포 종류의 조합도 공배양이 가능한 새로운 공배양법에 관해 조사하였다. 본 연구는 지금까지의 공배양시스템에서 널리 이루어져왔던 실질세포와 비실질세포의 조합에서 벗어난 실질세포들 간의 새로운 공배양 방법이라고 할 수 있겠다.

2. 실험

2.1 시약 및 재료

단량체인 *N*-isopropylacrylamide(IPAAm)는 Kohjin(Tokyo, Japan)으로부터 구입하여 *n*-hexane으로 재결정하여 사용하였으며, 조직배양용 폴리스티렌 접시는 Becton Dickinson Labware(Oxnard, CA, USA)에

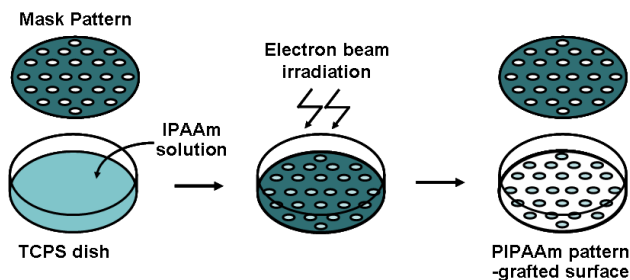


Figure 2. Schematic diagram for the preparation of PIPAAm pattern-grafted cell culture surfaces.

서 구입하였다. 혈관내피세포용 배지로서는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), 간세포용 배지로서는 William's E(WE) medium을 사용하였으며 모두 Gibco사의 제품을 구입하여 사용하였다. 또한 세포배양에 사용한 fetal bovine serum(FBS)과 penicillin G-streptomycin도 Gibco사의 제품을 사용하였다.

2.2 PIPAAm의 패턴상 그래프트 중합

단량체인 IPAAm을 60 wt%가 되도록 2-propanol에 녹이고 이 용액 60 μ L를 60 mm의 직경을 갖는 조직세포배양용 접시에 균일하게 전개한 후 전자선 조사장치(Area Beam Electron Processing System, Nissin High Voltage, Japan)를 이용하여 그래프트 중합하였다.^{23,24} 이때 금속제의 photomask를 활용하여 0.25 MGy 전자선량으로 세포배양 접시표면에 패턴상으로 IPAAm을 그래프트 중합하였다(Figure 2).

2.3 표면분석

온도응답성 고분자인 PIPAAm이 폴리스티렌 표면에 그래프트되었는지를 확인하기 위해서 ATR-FTIR(FT/IR 300E, Jasco)을 이용하였다. 프리즘으로는 MIRacle Ge crystal(Cat. No. 025-2050, MIRacle)을 사용하였다. PIPAAm이 그래프트된 폴리스티렌 표면과 그래프트하지 않은 표면을 ESCA(MT 500/1, VG Microtech)를 이용하여 각각 survey scan한 다음 각 표면의 화학조성을 정량화하였다. 표면의 친수/소수 특성을 조사하기 위해 세포배양표면의 물접촉각(water contact angle)을 측정하였다. 재료표면의 젖음성은 물방울과 재료 표면이 이루는 접촉각을 측정함으로써 비교적 간단히 알 수 있다. 준비된 배양용 접시를 1.5 $\times$ 0.8 cm 크기의 사각형 형태로 자른 다음 contact angle goniometer(model 100¹, Rame-Hart Inc., USA)를 이용하여 sessile drop method에 의한 방법으로 작은 물방울을 재료 표면에 떨어뜨린 후 각 표면마다 20 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에서 각각 5번 이상 위치를 바꾸어서 측정하였다.

2.4 혈관내피세포의 배양

소의 대동맥 혈관내피세포(P=3)는 Clonetics사로부터 구입하여 사용하였다. 냉동보존상태의 세포를 10% FBS와 1%의 항생제를 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 조직세포배양용 폴리스티렌 접시에서 계대배양하였으며, 0.25% trypsin-0.26 mM EDTA PBS 용액으로 탈착시킨 후 공배양에 사용하였다.

2.5 초대 쥐 간세포의 분리 및 배양

7주된 쥐(Sprague Dawley rat, male)를 데시케이터에 넣고 15 mL의 ethyl ether를 가하여 마취한 후 수술대로 옮겨 고정시켰다. 장에서 간으로 이르는 문맥을 찾아 실리콘 튜브에 연결된 환류용 바늘을 꽂은 후 봉합사를 이용하여 고정시키고 37 $^{\circ}$ C로 데워진 전관류 용액(perfusion solution) 100 mL를 pump를 이용하여 투입하였다. 하대정

맥을 절개하여 혈액을 제거하고 간 내부의 혈액이 모두 제거되면 콜라게네이즈 용액을 투입하여 간을 해리하였다. 해리된 간을 절개하여 glass dish에 옮겨 수술용 칼을 이용하여 잘게 자른 후 Hank's solution을 첨가하고 피펫팅하여 세포를 분산시키고 100 μ m 나일론 mesh에 세포용액을 여과한 후 간실질세포만을 회수하기 위해서 4 $^{\circ}$ C, 500 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 1%의 항생제가 첨가된 WE medium으로 3차례 더 원심분리하여 비실질세포와 죽은 세포들을 제거하였다. 마지막 원심분리 단계에서 상층액을 제거한 후 세포배양에 사용할 배지인 10% FBS와 1%의 항생제가 첨가된 WE medium을 첨가하여 세포를 분산시켜 5 $\times$ 10⁶ cells/dish가 되도록 배양접시에 파종하였다.

2.6 공배양

생체의 간조직에는 간세포와 혈관내피세포가 주를 이루고 있어 이를 모방하기 위해서 본 연구에서는 간세포와 혈관내피세포의 공배양을 시도하였다. 우선 photomask를 이용하여 패턴상으로 PIPAAm을 그래프트한 세포배양 표면에 hepatocytes를 5 $\times$ 10⁶ cells/dish가 되도록 seeding하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 24시간 배양 후, 배양중인 배양접시를 미리 20 $^{\circ}$ C로 맞추어진 세포배양기에 넣고 1시간 저온 처리를 행하였다. 이 온도에서는 PIPAAm이 소수성에서 친수성으로 변함에 따라 PIPAAm이 그래프트된 부분에 접촉한 간세포는 탈착하게 된다. 배지를 교환하면서 탈착된 hepatocyte를 제거하고 그 후 37 $^{\circ}$ C에서 소의 혈관내피세포를 5 $\times$ 10⁶ cells/dish가 되도록 seeding하여 hepatocytes가 탈착된 부분에 선택적으로 혈관내피세포를 정착시켰다. 세포의 정착 및 형태는 공배양 시간에 따라 위상차현미경을 이용하여 확인하였다.

3. 결과 및 토론

3.1 PIPAAm의 패턴상 그래프트 및 표면분석

온도응답성 고분자인 PIPAAm은 Figure 2에 나타난 바와 같이 photomask를 사용하여 전자빔조사에 의해 세포배양접시에 패턴상으로 그래프트하였다. 그래프트표면은 PIPAAm의 LCST 이하의 온도인 4 $^{\circ}$ C의 분류수를 분무기를 이용하여 강하게 수차례 세척하여 미반응 단량체 및 그래프트되지 않은 고분자를 제거하였다. 세척 후 건조한 배양접시는 EO 가스로 멸균하여 세포배양에 사용하였다. PIPAAm이 그래프트된 세포배양접시의 표면분석은 ATR/FTIR과 ESCA를 사용하였으며 그 결과를 Figure 3과 Table 1에 각각 나타내었다.

Figure 3에서 알 수 있는 바와 같이 PIPAAm이 그래프트된 표면에

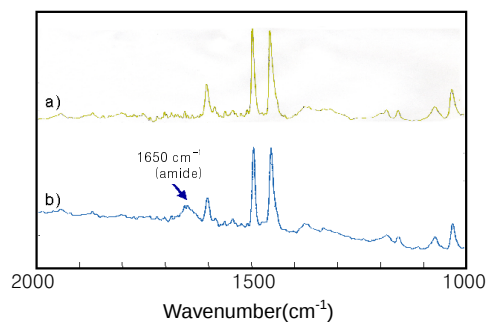


Figure 3. ATR-FTIR spectra of ungrafted (a) and PIPAAm grafted (b) cell culture surfaces.

Table 1. Surface Atomic Composition of Ungrafted and PIPAAm-Grafted TCPS Dishes Determined by ESCA Measurement

Substrate	Atom(%)		
	C	O	N
Ungrafted TCPS dish	87.85	10.85	1.30
PIPAAm-grafted TCPS dish	85.77	7.78	6.45

Table 2. Water Contact Angles (°) of Ungrafted and PIPAAm-Grafted TCPS Dishes at Different Temperature Measured by Sessile Drop Method (n = 5)

Substrate	20 °C	37 °C
Ungrafted TCPS dish	66.2°±0.8	66.4°±3.0
PIPAAm-grafted TCPS dish	54.0°±1.5	66.0°±2.2

서는 그래프트하지 않은 표면에서와 달리 1650 cm^{-1} 부근의 amide 결합에 기인하는 특성피크가 존재함을 알 수 있다. 이로서 폴리스티렌 배양접시 표면에 PIPAAm이 성공적으로 그래프트되었음을 확인하였다. 또한 ESCA에 의한 표면의 원소조성을 조사한 결과, PIPAAm에 존재하는 질소에 의해 PIPAAm이 그래프트된 표면의 질소함량이 1.30%에서 6.45%로 급격하게 증가하는 점으로부터 PIPAAm이 성공적으로 그래프트되었음을 확인할 수 있었다(Table 1).

전자빔조사에 의해 세포배양접시 표면에 그래프트된 PIPAAm의 정량은 ATR/FTIR 스펙트라를 이용하여 수행하였다. 폴리스티렌 배양접시는 1600 cm^{-1} 부근의 방향족에 기인하는 특성피크가 존재하며 이 피크의 강도와 PIPAAm에 기인하는 1650 cm^{-1} 부근의 아미드 그룹의 특성피크의 강도비를 활용하여 계산하였다. 검정곡선은 폴리스티렌 표면에 기지의 PIPAAm 양을 결합시킨 표면을 활용하여 각각의 피크 강도비($I_{1650/1600}$)로부터 작성하였다. 그 결과 폴리스티렌 배양접시의 표면에는 $2.0 \pm 0.3\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ 의 PIPAAm이 그래프트되었음을 알 수 있었다.

온도응답성 고분자인 PIPAAm이 그래프트된 표면의 온도변화에 따른 소수/친수 변화를 확인하기 위해 물접촉각을 측정하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 온도응답성 고분자인 PIPAAm은 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 부근에서 LCST를 나타낸다. Table 2에서 알 수 있는 바와 같이 그래프트하지 않은 폴리스티렌 세포배양 표면에서는 온도변화에 따른 물접촉각의 변화가 인정되지 않았으나 PIPAAm이 그래프트된 표면에서는 LCST 이상의 온도인 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 접촉각이 66° 로서 PIPAAm을 그래프트하지 않은 표면과 유사하였으나 LCST 아래의 온도인 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서는 접촉각이 54° 를 나타냄으로써 온도가 감소함에 따라 표면의 친수화가 일어남을 알 수 있었다.

3.2 패턴상 세포배양

온도응답성 고분자가 그래프트된 도메인에는 LCST 이상의 온도에서는 세포가 잘 접착하고 그 이하의 온도에서는 배양표면의 친수화가 일어나는 특성을 이용하여 원하는 모양의 패턴의 세포배양이 가능하게 된다.

Figure 4에 나타내는 바와 같이 세포배양 표면에 IPAAm 단량체용액을 전개하고 그 위에 TEM grid를 포토마스크로 사용하여 전자선 조사한 후 혈관내피세포를 배양해 보았다. LCST 이상인 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 세포가 잘 접착 및 성장하였으며 3일간 배양 후 배양중인 세포배양접시를 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 인큐베이터에서 30분간 방치한 결과 PIPAAm이 그래프트된 부분에서는 PIPAAm의 친수화에 의해 배양

중이던 세포가 모두 탈착되어있음을 알 수 있었다. 즉 사용한 포토마스크의 형상과 같은 패턴상의 세포배양이 가능함을 알 수 있다.

3.3 공배양

Figure 5에 본 연구에서 수행한 이종세포간 공배양법의 개념도와 그에 따른 위상차 현미경 사진을 나타내었다. PIPAAm을 패턴상으

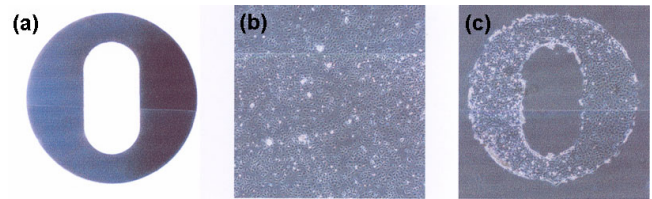


Figure 4. Patterned endothelial cell culture. (a) TEM grid as a photomask. (b) Endothelial cells were seeded and cultured on PIPAAm pattern-grafted dishes for 3 days at 37°C . (c) Then, culture temperature was reduced to 20°C to detach cells selectively adhered on PIPAAm-grafted domain.

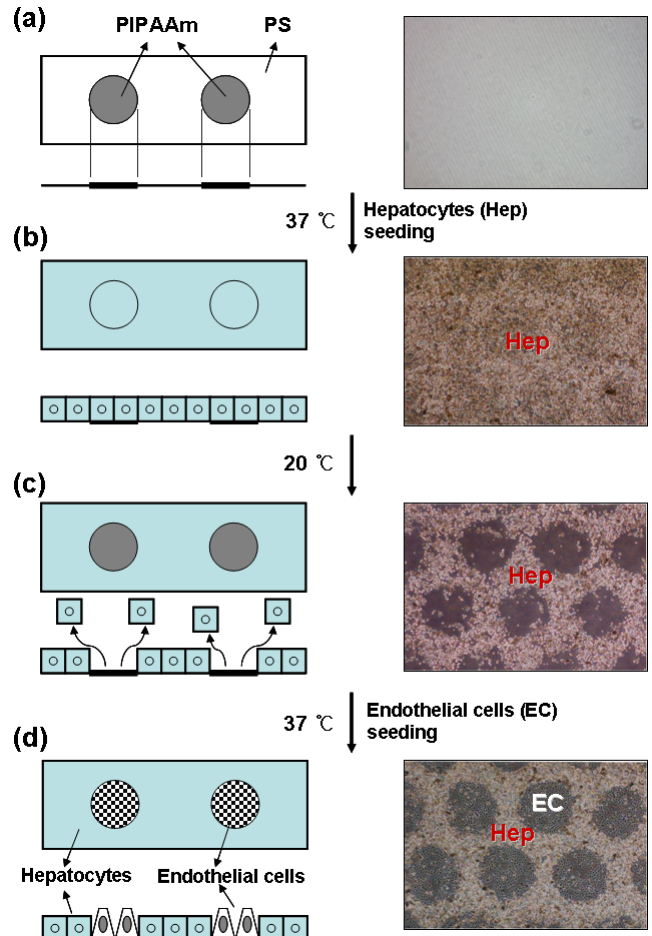


Figure 5. Schematic illustration and phase-contrast micrographs of patterned cell co-culture of hepatocytes(Hep) and endothelial cells(EC). (a) PIPAAm pattern-grafted cell culture surface. (b) Hepatocytes culture at 37°C . (c) Hepatocytes cultured on PIPAAm grafted domain were detached by reducing culture temperature to 20°C . (d) Endothelial cells of second cell type were seeded and co-cultured on patterned culture surface (c) at 37°C .

로 그래프트한 표면에 간세포를 피종하여 배양한 사진(Figure 5(b))에서 알 수 있는 바와 같이 PIPAAm의 LCST 이상의 온도인 37 °C에서 간세포는 PIPAAm을 그래프트한 도메인과 그래프트하지 않은 도메인 모두에 균일하게 접착하여 배양됨을 알 수 있었다. 그 후 세포배양온도를 LCST 이하인 20 °C로 낮추어 표면에 그래프트된 PIPAAm 분자들이 수화되어 PIPAAm이 그래프트된 도메인에 접착한 세포만 선택적으로 탈착되게 하였다(Figure 5(c)). 표면의 친수화로 인해 세포가 생산한 세포의 접착에 관여하는 세포외기질과 세포배양 표면과의 상호작용이 약해짐으로써 세포는 서서히 표면으로부터 탈착되게 된다.

그 이후에 배양온도를 LCST 이상의 온도인 37 °C로 올린 후 패턴상으로 간세포를 배양중인 표면에 두 번째 세포인 혈관내피세포를 피종한 결과 혈관내피세포는 간세포가 접착하지 않은 PIPAAm이 그래프트된 도메인에만 선택적으로 접착하게 됨으로써 동일 평면상에서 이종세포 간의 공배양이 가능하게 되었다(Figure 5(d)). 이러한 방법을 활용함으로써 다양한 형태를 갖는 패턴상에 다양한 조합의 이종세포간의 공배양이 가능하다. MIT의 Toner 그룹에⁶ 의해 발표된 초기의 공배양 시스템에서는 세포접착성의 차이가 큰 세포 조합에 대해서만 동일평면상에서 공배양이 가능한 치명적인 단점을 가지고 있으나 본 연구에서는 온도응답성 고분자를 패턴상으로 그래프트하고 한 종류의 세포를 균일하게 배양한 후 패턴상의 세포만 선택적으로 탈착시키고 그 빈자리에 새로운 세포를 배양시키는 방법을 채택함으로써 이론상 어떠한 세포조합에 대해서도 공배양이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 한편, 장기간에 걸친 공배양이 가능한지를 조사하여 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 간질질세포와 혈관내피세포의 공배양 결과를 위상차 현미경 사진으로 나타내었는데 공배양개시 후 4주간 모니터링한 결과 3주간의 공배양에서도 많은 수의 세포들이 패턴을 유지하며 배양되고 있음을 알 수 있었다. 그러나 4주째의 위상차 현미경 사진(Figure 6(d))에서 패턴을 거의 유지하면서 배양되고는 있으나 간세포 및 혈관내피세포의 피사가 증가하기 시작함을 알 수 있었다.

이러한 결과의 원인중에 하나로서 공배양시에 사용한 배지를 들 수 있을 것이다. 공배양에 사용한 배지는 WE medium으로서 혈관내

피세포의 배양에는 DMEM이 사용되었으므로 공배양에 WE medium을 사용한 것은 세포의 장기배양에 바람직하지 않을 수 있다. 따라서 먼저 혈관내피세포가 피사하면서 인접하여 배양중인 간세포에도 악영향을 미쳤기 때문으로 볼 수 있다. 이러한 결과는 3주째의 배양사진에서도 유추할 수 있다. 3주째 사진에서 보면 둥근 패턴내부의 혈관내피세포의 수가 다소 감소하고 있음을 알 수 있으며 인접한 간세포가 약해지는 양상을 확인할 수 있으며 이러한 경향은 4주째가 되어서 더욱 심해지는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 극복하기 위해서는 두 가지 방법을 들 수 있다. 우선 첫 번째로 간세포용 배지와 혈관내피세포용 배지를 적당히 섞은 각테일 배지를 사용함으로써 극복할 수 있으며, 두 번째로는 혈관내피세포를 간세포배양용 배지에 적응시키는 것을 들 수 있다. 우선 혈관내피세포 배양용 배지였던 DMEM에서 간세포배양용 배지인 WE medium의 양을 점차 늘려가며 적응시키다가 최종적으로는 WE medium에서 배양할 수 있는 혈관내피세포를 사용함으로써 궁극적으로 같은 종류의 배지에서 간세포와 혈관내피세포 간의 장기간 공배양이 가능하리라 생각된다.

4. 결론

본 연구에서는 온도응답성 고분자인 PIPAAm을 전자빔조사에 의해 간단히 세포배양 표면에 그래프트하였으며 이들은 온도변화에 의해 가역적인 친수/소수 표면특성의 변화를 나타내었다. 친수성의 재료 표면에서 상대적으로 세포의 접착이 억제되는 사실을 활용하여 소수성이던 재료표면이 상대적 친수성으로 바뀌어 접착되었던 세포가 탈착되고 탈착된 도메인에 새로운 세포를 배양함으로써 이종세포간의 공배양을 성공적으로 수행하였다. 평면상에서 이종세포간의 공배양은 간세포의 알부민 분비활성의 향상, DNA 합성 촉진 및 약물대사활성의 향상 등의 효과를 기대할 수 있으며, 지금까지의 랜덤공배양법에서는 얻을 수 없었던 장기간에 걸친 공배양이 가능하게 되었다. 현재까지 간질질세포만을 생체외에서 4주까지 배양한 예는 없으며 공배양으로 세포의 장기배양, 세포기능의 유지 및 향상을 도모할 수 있다면 간세포를 이용한 급성 간부전환자의 간기능 유지라는 관점에서 본 연구결과는 그 의미가 크다고 할 수 있다. 세포배양표면에 마이크로 패턴을 작성하여 공배양시 두 종류의 세포가 각각 일정한 패턴상으로 특정 도메인을 형성하게 함으로써 간세포에 국한하지 않고 다른 종류의 세포조합에서도 균형있는 장기간의 배양이 가능하리라 생각된다.

감사의 글 : 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-01222-0)지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
2. J. Stange, S. R. Mitzner, and S. Klammt, *Liver Transplantation*, **6**, 603 (2000).
3. J. Stange, S. R. Mitzner, and W. Ramlow, *ASAIO J.*, **39**, 621 (1993).
4. C. S. Cho, Y. H. Park, and I. K. Park, *Polym. Sci. Tech.*, **10**, 763 (1999).
5. M. Hirose, M. Yamato, O. H. Kwon, M. Harimoto, and T. Okano, *Yonsei Medical Journal*, **41**, 803 (2002).
6. S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, and M. Toner, *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**,

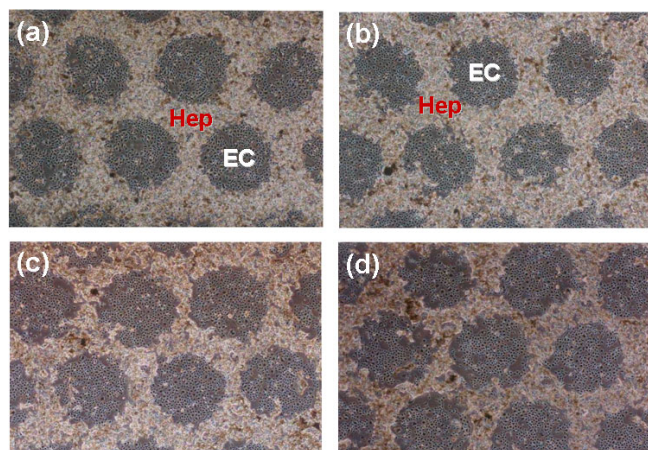


Figure 6. Phase-contrast micrographs of micropatterned co-cultures of hepatocytes and endothelial cells after (a) 1 hour, (b) 1 week, (c) 3 weeks, and (d) 4 weeks of co-culture.

- 189 (1997).
7. R. Singhi, G. Stephanopoulos, and D. I. C. Wang, *Biotechnol. Bioen.*, **43**, 764 (1994).
8. C. Oakley and D. M. Bruntt, *Cell Motility Cytoskei.*, **31**, 45 (1995).
9. J. S. Lee, M. Kaibara, M. Iwaki, J. Casabe, and M. Kusakabe, *Biomaterials*, **14**, 71 (1993).
10. A. Soekarno, B. Lom, and P. E. Hockberger, *NeuroImage*, **1**, 129 (1993).
11. T. Matsuda, T. Sugawara, and K. Inoue, *ASAIO J.*, **38**, 243 (1992).
12. M. Hirose, O. H. Kwon, M. Yamato, A. Kikuchi, and T. Okano, *Bio-macromolecules*, **1**, 377 (2000).
13. M. Yamato, O. H. Kwon, M. Hirose, A. Kikuchi, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 137 (2001).
14. M. Yamato, A. Kikuchi, S. Kohsaka, T. Terasaki, H. A. V. Recum, S. W. Kim, Y. Sakura, and T. Okano, *Tissue Engineering for Therapeutic Use 3*, Elsevier, Amsterdam, 99 (1999).
15. M. Harimoto, M. Yamato, C. Takanashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 464 (2002).
16. G. Chen, Y. Ito, Y. Imanishi, A. Magnani, S. Lamponi, and R. Barbucci, *Bioconj. Chem.*, **8**, 730 (1997).
17. F. Blankaert, D. Barritault, and J. P. Carucelle, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 63 (1999).
18. G. Chen, Y. Ito, and Y. Imanishi, *Bioconj. Chem.*, **8**, 106 (1999).
19. Y. Ito, T. Uno, S. Q. Liu, and Y. Imanashi, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1271 (1992).
20. Y. Ito, S. Q. Liu, and Y. Imanashi, *Biomaterials*, **12**, 449 (1991).
21. J. H. Lee, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **50**, 283 (1999).
22. M. Heskins and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A2**, 1441 (1968).
23. T. Okano, M. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, and Y. Sakurai, *Biomaterials*, **16**, 297 (1996).
24. O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 82 (2000).