

폴리스티렌 나노섬유상에서의 간세포의 3차원 배양

김영진* · 안창현** · 오환희 · 김영진 · 윤관한 · 강인규*** · 권오형†

금오공과대학교 고분자공학과, *대구가톨릭대학교 의공학과,

나노부품실용화센터, *경북대학교 고분자공학과

(2007년 11월 8일 접수, 2008년 1월 21일 채택)

3-D Rat Hepatocytes' Culture on Polystyrene Nanofibrous Scaffold

Young-Jin Kim*, Chang Hyun Ahn**, Hwan Hee Oh, Young-Jin Kim,
Kwan Han Yoon, Inn-Kyu Kang***, and Oh Hyeong Kwon†

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

*Department of Biomedical Engineering,
Catholic University of Daegu, Daegu 712-702, Korea

**Nano Practical Application Center, Daegu 704-801, Korea

***Department of Polymer Science,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
(Received November 8, 2007; Accepted January 21, 2008)

초록 : 전기방사법에 의해 폴리스티렌 나노섬유 부직포를 제조하였고, 간세포의 접착을 유도하기 위해 간세포접착 리간드인 poly [*N*-*p*-vinylbenzyl-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-gluconamide] (PVLA)를 나노섬유의 표면에 코팅하였다. 얻어진 나노섬유는 평균직경이 500 nm이었고 분광학적인 방법을 통해 PS 나노섬유 표면의 개질 여부를 확인하였다. 장기간 배양시의 간세포 생존율을 MTT법으로 조사한 결과 기존의 세포배양접시에서는 급격하게 세포생존율이 감소함에 비해 PVLA가 코팅된 나노섬유상에서는 생존율이 서서히 감소하였으며 약 3주간에 걸쳐 간세포가 생존율이 유지되었다. 간세포의 대표적인 기능인 알부민분비 및 요소분해능을 측정한 결과 기존의 세포배양접시에서는 급격하게 간세포기능이 저하되었지만, PVLA가 코팅된 나노섬유상에서는 약 3주정도 초기의 간세포기능을 유지하는 것이 밝혀졌다.

Abstract : We have fabricated polystyrene (PS) nanofibrous scaffold for hepatocyte culture by electrospinning method and subsequently coated with specific ligand of poly [*N*-*p*-vinylbenzyl-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-gluconamide] (PVLA) to enhance hepatocytes attachment. Rat hepatocytes behavior on the PVLA-coated and non-coated PS nanofibrous matrices have been investigated. Electrospun PS nanofiber structures revealed randomly aligned fibers with average diameter of 500 nm. It is observed that PS nanofibrous matrix could incorporate many cells into the interior of the matrix probably due to the suitable pore size. Cell viabilities cultured on PVLA-coated PS nanofibrous mats were maintained for 3 weeks, while it was decreased rapidly on PVLA-coated PS dishes. High hepatic functions especially for albumin secretion and ammonia removal were maintained at least for 2 weeks on nanofibrous mats but rapidly decreased on flat PS dishes. These results indicate that nanofibrous structure enabled 3-D culture with high level of cell-cell contact results in providing cell-cell communications and subsequent long-term maintenance of specific cell functions.

Keywords : electrospinning, nanofiber, hepatocyte, 3-D culture, specific hepatic functions.

서 론

조직공학은 손상된 생체조직의 복원을 위하여 적절한 지지체에서 조직 세포를 체외 배양하여 실제의 장기와 유사한 구조와 기능을 가진 인공 조직을 형성하고 이를 체내에 이식하여 생체내의 결손 장기나 조직을 재생하거나 대체하고자 하는 분야로, 이를 위해서는 체내

에서 분리된 조직 세포를 체외에서 조직의 형태로 재구성하기 위한 지지체가 필수적이며 이러한 지지체는 삼차원 망상 구조를 가졌을 때 가장 좋은 효율을 보인다.¹⁻⁵ 세포를 사용하여 무기물이나 합성 고분자 등에는 결여되어 있는 생물학적 기능을 제공함으로써, 인체 내에 삽입된 무생물 생체 재료와 주위 조직 사이에 더 나은 생체 적합성을 지닐 수 있는 환경을 제공하고 더 나아가 천연 조직과 동일한 신생조직의 역할을 할 수 있도록 만드는 것을 목적으로 한다.

최근에는 생체적합성을 지닌 생분해성 고분자를 사용하여 다공성

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

지지체를 제조하여 조직 세포를 지지체에 포집하여 삼차원 구조의 세포/지지체 복합체를 체내에 이식하고자 하는 연구들이 주를 이루고 있다.^{4,6,7} 조직공학에 있어서 중요한 연구분야 중의 하나는 조직 세포가 잘 접착하고 적응하여 성장 및 분화를 통해 조직으로서의 기능을 발휘할 수 있도록 생체 내부와 유사한 조직 환경을 제공할 수 있는 인공기질의 개발과 이를 이용한 세포 담체의 개발이라고 할 수 있다.⁸

조직공학용 지지체의 특성은 그 특성상 실제 생체내 ECM과 유사한 구조와 형태 즉, 약 50~150 nm 직경을 갖는 복잡한 섬유형태의 3차원 망상구조를 가지는 생체적합성 재료가 이상적인 지지체라 할 수 있다.⁹ 이러한 형태학적 유사함으로 인해 가장 널리 쓰이는 재료들의 대부분이 섬유 혹은 스펀지 형태의 다공성 재료들이다. 이러한 재료 중 초극세사를 제조하는 방식기술로는 복합방사, 펄트블로운 방사, 플래시 방사, 전기방사 등이 알려져 있으나 적용고분자의 다양성, 제조공정의 단순성, 상용화의 가능성, 다양한 기술로의 응용성을 고려할 때 전기방사가 가장 우수한 초극세사 제조기술로 인정되고 있다.¹⁰⁻¹²

한편, 생체 내에서의 간은 매우 재생이 잘 되는 조직의 하나로 전체의 70%를 잘라 내도 2, 3개월 후면 원상태로 회복되는 반면, 일단 체외로 나오게 되면 간 조직은 잘 증식하지 않고 생존하더라도 분화가 이루어지지 않아 그 기능을 다하지 못하는 단점을 가지고 있다. 현재 개발되고 있는 간세포를 이용한 생물학적 인공간에서는 간세포의 높은 기능을 유지하기 위해서 배양 환경의 최적화와 배지에 호르몬이나 성장인자 등을 첨가하는 등의 많은 연구가 진행중이다.¹³⁻¹⁵

Akaike 그룹은 간세포가 당단백질 결사슬에 있는 특정 당(galactose형 올리고당)을 인식하는 기능에 착안하여 그의 모델 물질로서 주사슬을 단백질로부터 합성 고분자인 PS로, 결사슬을 올리고당에서 유당(lactose)으로 이주 단순화한 고분자 재료인 poly[*N*-*p*-vinylbenzyl-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamine] (PVLA)를 설계하였다.^{15,16} 이 PVLA를 PS에 코팅하여 간세포 특이적 기능발현이 있는 것을 보고하였다. 또한 PVLA에는 폴리스티렌 주사슬이 존재하여 PS의 주사슬과 소수성 응집력에 의해 쉽게 표면을 개질할 수 있다.

본 연구에서는 전기방사법으로 PS 나노섬유를 제조하고 간세포를 특이적으로 인식하는 리간드를 함유하는 합성고분자인 PVLA를 이용하여 나노섬유 표면을 개질한 후, 간세포를 장기 배양하여 배양 기간 동안의 간세포의 활성화와 세포기능의 변화를 관찰하였다.

실 험

시약 및 재료. 나노섬유 제조를 위해 사용한 폴리스티렌(PS)은 단 분산성으로 수평균분자량이 1250000 g/mol(Polymer Source, USA)인 제품을 사용하였다. 간세포 특이적 인식리간드인 poly[*N*-*p*-vinylbenzyl-*O*- β -D-galactopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamine] (PVLA)는 일본생화학(주)에서 구입한 중량평균분자량이 50000 g/mol인 제품을 사용하였다. 간세포용 배지로서는 William's E(WE) medium을 사용하였으며 Gibco사의 제품을 구입하여 사용하였다. 또한 세포배양에 사용한 fetal bovine serum (FBS)과 penicillin G-streptomycin도 Gibco사의 제품을 사용하였다.

PS 나노섬유 제조 및 표면개질. 전기방사에 이용되는 PS의 용액

제조를 위해 다양한 용매 하에서의 PS의 용해성을 조사한 결과, 전기적 성질이 우수한 *N,N*-dimethyl formamide(DMF)와 methyl-ene chloride(MC)의 6 : 4 혼합 용매를 사용하였고, 나노섬유 형성에 필요한 점도를 확인하기 위해 농도에 따른 용액점도를 측정하였다. 나노섬유를 제조하기 위해 사용한 전기방사장치는 0-40 kV의 전압공급이 가능한 고전압 공급장치(high voltage DC power supply unit, 청파 EMT), 평판형태(200×200 mm, stainless steel)의 집전판(collector), 고분자용액을 일정하게 토출해 줄 수 있는 주사기 펌프(syringe pump, KDS220), 주사기(gastight and needle lock type 10 mL, Hamilton), 금속주사기바늘(22 G, Hamilton) 등으로 구성하였다.¹⁷⁻¹⁹ PVLA의 코팅은 Akaike 등의 연구결과를 바탕으로 이루어졌다.¹⁶ PVLA를 PS 나노섬유상에 코팅하기 위하여 PVLA를 3차수에 100 μ g/mL의 농도로 녹인 수용액을 제조하고 전기방사로 제조된 PS 나노섬유를 이 수용액에 하루 동안 침지시켰다. 나노섬유 내부에 들어있는 공기를 제거하기 위해 3분간 초음파 처리를 하였으며 처리가 끝난 PS 나노 섬유를 30 mg의 중량으로 나누어 48-well tissue culture plate에 넣어 보관하였다.

표면분석. 섬유 직경 및 직경분포를 조사하기 위해 field emission scanning electron microscope(FE-SEM, S-4300, HITACHI)와 영상분석기(TDISE V3.1.73, TECHSAN Co., Ltd.)를 이용하였다. 먼저 FE-SEM을 통해 얻어진 나노섬유의 사진 이미지를 영상분석기 프로그램을 이용하여 평균직경, 표준편차, 직경분포 등을 얻어내었다. 간세포를 특이적으로 인식하는 고분자인 PVLA가 PS 나노섬유 표면에 코팅되었는지를 확인하기 위해서 ATR-FTIR(FT/IR 300E, Jasco)을 이용하였다. 프리즘으로는 MIRacle Ge crystal (Cat. No. 025-2050, MIRacle)을 사용하였다. PS 나노섬유 표면과 PVLA가 고정화된 PS 나노섬유 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 재료표면이 이루는 접촉각을 측정함으로써 비교적 간단히 알 수 있다. PVLA로 개질된 PS 나노섬유와 미처리된 PS 나노섬유, 대조군으로 nontreated PS dish와 PVLA를 표면에 코팅한 PS dish를 1.0×1.0 크기로 자른 다음 contact angle goniometer(model 100-1, Rame-Hart Inc., USA)를 이용하여 sessile drop method에 의한 방법으로 작은 물방울을 재료 표면에 떨어뜨린 후 각 표면마다 각각 5번 이상 위치를 바꾸어서 측정하였다.

초대 쥐 간세포 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 °C로 데워진 전관류 용액(perfusion solution) 100 mL를 pump를 이용하여 투입하였다. 하대정맥을 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 °C, 500 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 1%의 항생제가 추가된 WE medium으

로 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 분산시켰다. 지름 22 mm의 원형으로 자른 PVLA-coated PS 나노섬유를 24-well cell culture plate에 놓고 그 위에 분리한 10^6 cells을 seeding하였다. 유리링을 사용하여 배지가 나노섬유막으로 흘러내리지 않도록 하였으며, 37 °C, 5% CO₂ 분위기인 인큐베이터 내에서 최초 24시간 후에 배지를 교환하고 이후 48시간마다 교환해 주었다.

간세포의 활성 측정. 세포의 증식과 살아있는 세포를 정확하게 측정할 수 있는 기법은 생명과학 분야 특히 중앙 생물학에서 필수적인 기법 중의 하나이다.^{20,21} 현재 많이 사용되고 있는 방법 중의 하나는 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 법으로 96-well plate를 사용하고 검사결과를 microplate reader를 이용하여 측정하므로 많은 시료를 간단히 빠르게 객관적으로 관측할 수 있다. 이러한 MTT 검사법의 원리를 살펴보면 대사과정이 온전한 세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 570 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

이 실험에서는 10배의 MTT stock solution을 제조하여 사용하였다. 먼저 5 mg/mL MTT를 PBS(-)에 녹인 후 4 °C에서 냉장보관하였다. 측정방법은 24-well cell culture plate에 간세포가 포함된 PS 나노섬유를 넣고 MTT stock solution을 1 mL를 넣고 4시간 동안 배양한 다음 여기에 0.04 N HCl-isopropanol 1 mL를 넣어 세포막을 녹여내었다. 측정은 570 nm에서의 흡광도를 ELISA microplate reader로 측정하였다.

간세포 특이적 기능평가. 간의 특이적 기능 중의 하나로서 중요한 대사 기능의 하나인 알부민 분비능을 측정하였다. 간세포가 분비한 알부민의 양은 항원-항체법으로서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 의해 측정하였다. Bicarbonate coating buffer(Na₂CO₃ 0.04 M, NaHCO₃ 0.06 M)를 사용하여 1차항체(IgG fraction to rat albumin, Cappel)를 5 µg/mL의 농도로 희석하여 96 well plate(NUNC-Immunoplate, Maxisorp)의 well당 100 µL씩 넣고 4에서 18-24시간 동안 정치하여 1차항체를 바닥에 흡착시킨다. 그런 후 plate를 0.1% tween 20/PBS(-) (PBST) 200 µL 용액으로 3회 세척한다. Blocking 용액인 1% BSA/PBS(-) 용액을 well당 100 µL씩 넣고 1시간 실온에서 정치한 후 PBST로 3회 세척 과정을 반복하였다. 여기에 배양액 표본과 표준알부민 용액(1, 2.5, 5, 10 µg/mL)을 각 well에 100 µL씩 넣고 37 °C, 1시간 반응시키고 다시 PBST로 세척하였다. 여기에 2차 항체(peroxidase-conjugated IgG fraction to rat albumin, Cappel)를 0.0625 mg/mL in PBS(-)로 희석하여 well당 100 µL씩 넣고 37 °C에서 1시간 정치한다. 여기에 0.4 mg/mL OPD(*o*-phenylenediamine)와 0.4 µL/mL H₂O₂(28%)를 포함한 citrate-phosphate buffer(0.1 M C₆H₈O₇·H₂O 48.5 mL+0.2 M Na₂HPO₄ 51.5 mL)를 well당 100 µL 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 각 well의 흡광도를 microplate reader(Labsystems, multiskan MS version 4.0)로

492 nm에서 측정하여 표준곡선으로부터 배양된 간세포가 분비한 알부민의 양을 산출하였다.

한편, 단백질 대사로 인한 암모니아가 생성되는데 간은 암모니아를 요소로 변환시켜 체내 암모니아 축적을 방지한다. 실제로 간 질환이 심하여 간 부전에 빠지면 암모니아 축적으로 간성혼수라는 위독한 상태에 빠질 수 있다. 이러한 간세포의 해독 작용을 알아보기 위해서 암모니아농도는 Wako kit(berthelot-indophenol method, 아산제약)을 사용하여 측정하였다. 배양 시작 1일 경과 후부터는 배지에 1 mM NH₄Cl을 첨가하여 시간에 따른 암모니아 분해속도를 측정하였는데 그 방법은 다음과 같다. 정색저해 성분을 제거하고 배지내 효소를 고정시키기 위한 제단백시약(팅스텐 나트륨)에 간세포 배양배지와 표준액을 넣고 잘 섞은 후에 발색시약 A(페놀), B(수산화나트륨), C(10% 차아염소산나트륨)를 각각 1, 0.5, 1 mL를 차례로 넣은 후 37 °C에서 20분간 반응시키고 630 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 간세포의 암모니아 제거량을 산출하였다. 이 연구에서는 간세포의 ammonia 분해 능력을 정량하기 위해서 Shimadzu사의 UV-2401PC를 사용하였다.

결과 및 토론

나노섬유 제조. Viscometer(LVDV II⁺, Brookfield)를 이용하여 온도 25 °C에서 PS 용액의 점도를 측정하였다. Figure 1에는 PS (1250000 g/mol)-DMF/MC(6 : 4) 용액에서의 농도변화에 따른 점도곡선을 나타내고 있다. 용액농도 약 2 wt% 부근에서 점도곡선의 전이를 볼 수 있는데, 이것은 이 용액에서 PS 사슬의 얽힘(entanglement)에 의한 급격한 점도변화에 기인한 것이며 전기방사 시 섬유화가 가능한 적정농도를 시사하고 있다.

분자량이 125만인 PS 용액에서 전압 19 kV, 방사거리 25 cm, 유체속도 1.2 mL/h로 고정시켜 농도(2~4 wt%)만을 변화하여 방사하였다. 전체적으로 농도가 감소할수록 섬유직경이 감소하는 경향이 나타났으며 2 wt%에서는 약간의 비드와 섬유가 혼재하는 양상을 나타내었고 3, 4 wt%에서 직경 500 nm 전후의 섬유를 형성하였다. 3 wt%에서 보다는 4 wt%에서 좀 더 균일한 형태의 섬유를 관찰할 수 있었다(Figure 2). 농도가 증가할수록 섬유직경이 증가하는 현상은 농도에 따른 고분자 사슬의 얽힘 정도에 기인하는 것으로

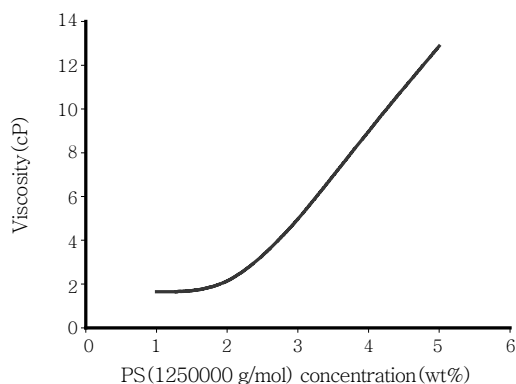


Figure 1. Viscosity of PS solutions dissolved in DMF/MC as a function of PS solution concentration.

설명할 수 있다. 다양한 농도 조건 중 분자량이 125만인 PS-DMF/MC 4 wt% 용액에서 제조된 섬유가 가장 균일하고 직경이 작은 섬유가 얻어졌다.

제조된 나노섬유의 직경 및 직경분포는 영상분석기를 이용하여 FE-SEM 이미지를 분석하여 조사하였다. 최적화된 나노부직포의 평균직경은 약 522 nm로 측정되었고 약 300~700 nm 사이의 분포를 가지는 것으로 조사되었다.

표면분석. PS 나노섬유의 표면에 PVLA가 잘 고정화 되었는지를

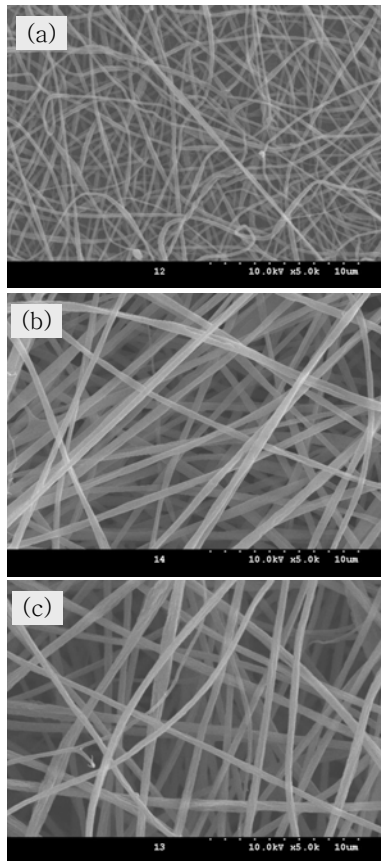


Figure 2. SEM micrographs of electrospun PS nanofibers from (a) 2, (b) 3, and (c) 4 wt% of PS(1250000 g/mol) solution.

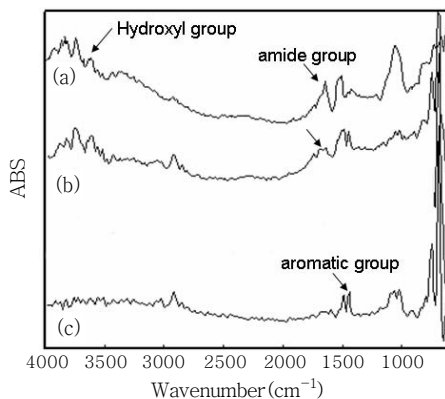


Figure 3. ATR-FTIR spectra of (a) PVLA, (b) PVLA-coated PS nanofiber, and (c) untreated PS nanofiber.

확인하기 위해 각각 PVLA, PVLA를 고정화한 PS 나노섬유, 그리고 PVLA를 고정화하지 않은 PS 나노섬유의 ATR-FTIR 스펙트리를 비교해 보았다(Figure 3). PVLA를 고정화한 PS 나노섬유에서 PVLA에 존재하는 amide group과 간세포의 특이적 인식 리간드로 도입된 galactose group에 많이 존재하는 hydroxyl group에 의한 특성피크가 나타나는 것으로 보아 PS 나노섬유 표면에 PVLA가 잘 고정화되었다는 것을 확인할 수 있었다.

PVLA를 고정화한 PS 나노섬유와 고정화하지 않은 PS 나노섬유에서의 표면원소조성을 ESCA를 이용하여 측정하였다. 표면 survey scan의 결과를 통해 구한 표면원소분석 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 알 수 있는 바와 같이 PVLA를 고정화한 PS 나노섬유 표면에서 산소 함량이 미량 증가하였으며, 특히 질소원소가 2.7% 검출되었음을 알 수 있었다. 이것은 PVLA 내의 amide group과 hydroxyl group에 의한 결과라고 할 수 있으며, 이는 앞서 나타난 ATR-FTIR 스펙트럼의 결과와도 잘 일치함을 알 수 있다.

PVLA를 PS 나노섬유 표면에 고정화함으로써 표면에서의 친수화도 변화를 확인하기 위해 물접촉각을 측정하였다. 상대적인 표면 친수화도를 비교하기 위해 untreated PS dish와 PVLA를 코팅한 PS dish, 그리고 PVLA를 고정화하지 않은 PS 나노섬유를 같이 측정하였다. 이 때 모든 샘플은 상온에서 측정하였으며 각각 5개의 측정결과를 평균하여 Table 2에 나타내었다.

그 결과, untreated PS dish와 PVLA를 고정화하지 않은 PS 나노섬유에서는 86° 내외의 접촉각이 측정되어 표면이 소수성이라는 것을 보여 주었다. 한편, PVLA가 코팅된 PS 나노섬유 표면과 PVLA가 코팅된 PS dish에서는 PVLA가 가진 친수성의 galactose group이 존재함으로써 접촉각이 각각 53°, 45° 내외로 전반적으로 친수성을 나타내게 되었다. 나노섬유의 경우, PS dish에 비해 불규칙한 표면 특성으로 인해 접촉각이 약간 더 크게 나온 것으로 생각된다.

나노섬유 상에서의 간세포배양. Figure 4는 PVLA가 고정화된 PS 나노섬유와 PVLA를 고정화하지 않은 PS 나노섬유의 간세포 접착을 비교한 SEM 사진이다. 사진에서 볼 수 있는 바와 같이 PVLA가 고정화된 PS 나노섬유의 경우에서 보다 많은 세포가 접착된 것을 볼 수 있었다. 이는 PVLA가 고정화됨으로써 생긴 기질의 표면 친수화와 PVLA 내부의 간세포 특이 인식 리간드가 PS 표면에 잘 고정

Table 1. Surface Atomic Compositions of Untreated PS Nanofiber and PVLA-Coated PS Nanofibers Determined by ESCA

Substrates	Atom(%)		
	C	O	N
Untreated PS nanofiber	91.2	8.8	—
PVLA-coated PS nanofiber	88.0	9.3	2.7

Table 2. Water Contact Angle(°) of Each Surface Measured by Sessile Drop Method (n=5)

Substrates	Contact angle(°)
Untreated PS dish	85.3±0.9
PVLA-coated PS dish	45.3±2.1
Untreated PS nanofiber	87.4±2.4
PVLA-coated PS nanofiber	53.5±3.7

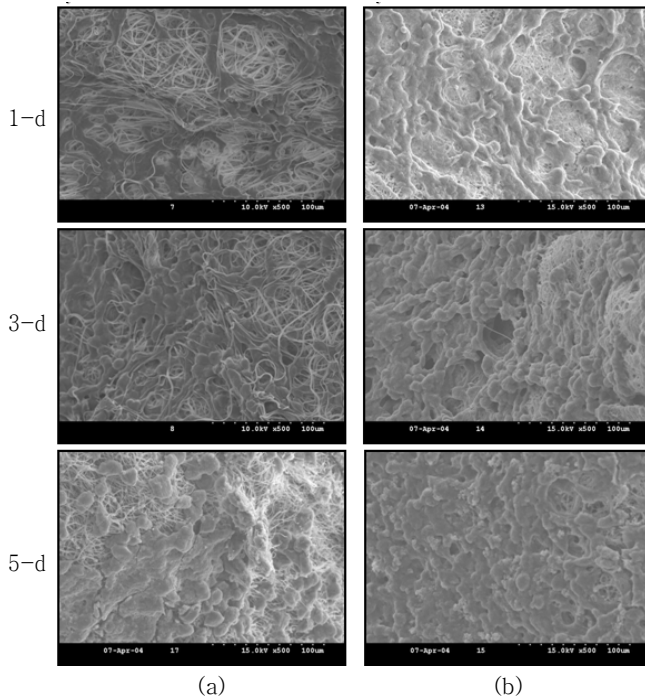


Figure 4. SEM micrographs of hepatocytes cultured on (a) untreated PS nanofiber and (b) PVLA-coated PS nanofiber after 1, 3, 5 days of culture, respectively.

화되어 높은 접착률을 보인 것으로 판단되어진다. 세포의 접착은 세포-세포간의 접착과 세포-기질간의 접착으로 나눌 수 있다. 따라서 인공 재료를 매트릭스로 이용하여 세포-기질 사이의 상호작용을 이해하는 것은 무엇보다 중요하다. 세포가 기질에 접착하는 데에는 두 가지 요인을 생각할 수 있는데 하나는 기질의 구조와 화학적 성질이 세포접착에 중요한 영향을 미친다는 것이고, 두 번째는 배지 중의 단백질 혹은 세포자신이 생산한 단백질류가 기질에 흡착함으로써 이들의 부착성분의 화학적 성질에 의해 세포접착능이 결정되어진다는 것이다. 일단 세포가 기질에 접촉하게 되면 접착력을 나타내게 되며 이때 단백질이 흡착되지 않은 기질과 세포사이의 결합은 비특이적이라 할 수 있다. 반면에 단백질이 흡착된 기질과 세포사이의 결합은 ligand-receptor와 같은 특이한 상호작용에 의해 영향을 받을 수 있다.^{15,16}

또한 파종된 간세포가 나노섬유 내부에까지 잘 접착하였는지를 확인하기 위해 나노섬유의 파단면을 관찰하였다. Figure 5에서 볼 수 있는 바와 같이 간세포가 나노섬유 안쪽으로 들어가 배양되고 있음을 확인할 수 있고, 지지체의 내부에까지 접착하고 있는 것을 볼 수 있다. 나노섬유 상에서는 일반적으로 3차원 배양이 어렵다고 알려져 있으나 본 연구에서 제조한 나노섬유는 섬유간 결합점이 없으며 탈지면과 같은 형태를 가지고 있어서 손쉽게 3차원 배양을 실현할 수 있었다. 이것은 추후 배양시간에 따라 간세포들이 3차원적으로 서로 접촉하며 모여 있을 가능성이 평면 배양에 비해 훨씬 높다는 것을 의미한다. 즉 지지체 내부에서 간세포들간에 상호작용이 평면에서 보다 더 활발히 일어날 수 있고 이로 인해 더 높은 세포기능과 활성을 보일 것이라고 기대할 수 있다.

MTT Assay를 이용한 간세포의 활성 측정. 배양시간에 따른 간세

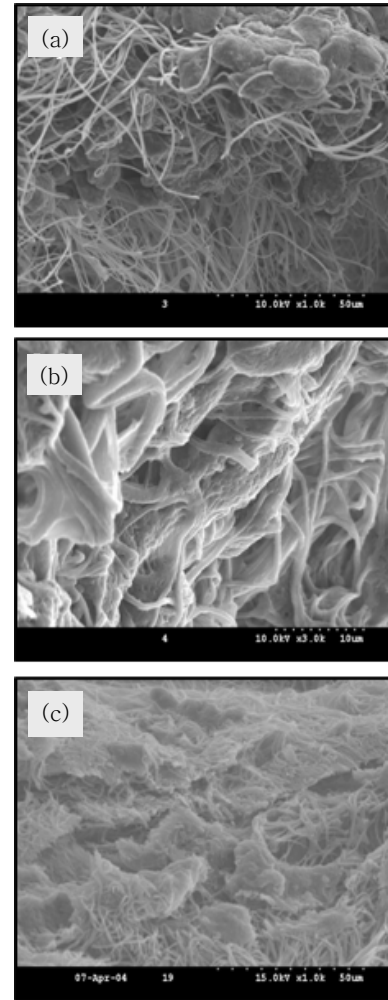


Figure 5. SEM micrographs of hepatocytes cultured on (a) surface, (b) inside of matrix, and (c) cross section in PVLA-coated PS nanofiber after 3 days of culture.

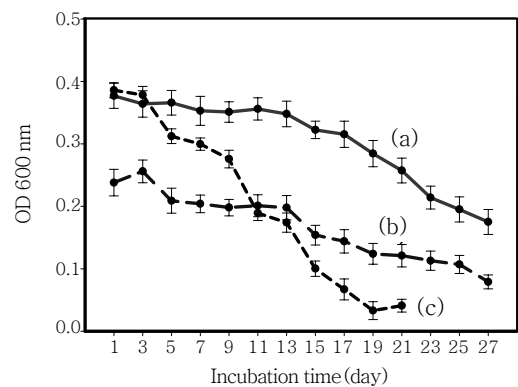


Figure 6. MTT assay of rat hepatocytes cultured on (a) PVLA-coated PS nanofibers, (b) untreated PS nanofibers, and (c) PVLA-coated TCPS dishes.

포의 활성을 MTT Assay로 측정하여 그 결과를 Figure 6에 나타낸다. Figure 6에서 알 수 있는 바와 같이 PVLA의 존재 유무는 초기 접착에 상당히 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

나노섬유가 가지는 생체 유사 환경 보다 PVLA의 존재에 의한 세포와 기질 사이의 상호작용에 의해 초기 접착이 크게 향상된 것을 관찰할 수 있었다. 한편, 배양일수가 길어짐에 따라 PVLA가 코팅된 2차원 평면의 배양접시에서는 급속한 세포활성의 감소를 나타내는 반면, Figure 4의 SEM 사진과 Figure 6의 세포활성 측정결과에서 관찰할 수 있는 바와 같이, PVLA가 코팅된 나노섬유상에서 간세포는 배양 초기부터 세포간의 원활한 세포접촉을 통하여 약 15일에서 19일까지 활성을 유지하는 것으로 관찰되며, 나노섬유상에서의 세포활성은 서서히 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 PVLA가 코팅되지 않는 표면에서도 관찰되었으며, 이는 나노섬유상에서의 3차원 배양이 평면에서의 세포배양 결과보다 장기간의 세포활성 유지에 유리함을 보여주는 것이라 할 수 있다. 그 이후에서 활성이 떨어지는 것은 간세포의 내부에 점차 사멸한 세포들이 늘어나고 이것이 전체적인 세포의 활성을 떨어뜨리는 것으로 짐작된다.

알부민 분비 및 암모니아 제거능 평가. 간세포의 대표적인 기능인 알부민 분비능과 암모니아 제거능을 조사하였다. 우선 암모니아 제거능의 결과를 Figure 7에 나타낸다. 그 결과 앞에서 언급한 MTT에서의 자료와 마찬가지로 초기에서의 분해능은 거의 동일한 수준이었으나 배양시간에 따라 PVLA를 표면에 처리한 TCPS dish의 경우 약 5일 정도 경과 후에는 나노섬유들의 절반 수준으로 분해능이 떨어지고 그 이후로도 기하급수적인 감소를 보인다.

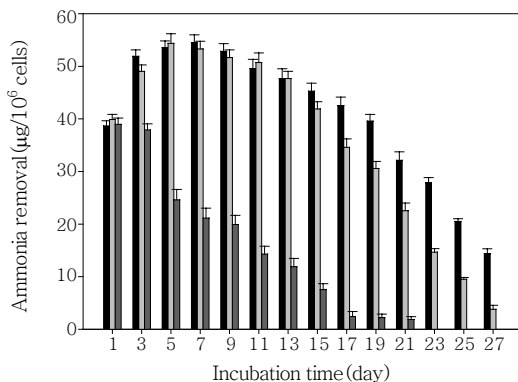


Figure 7. Ammonia removal of rat hepatocytes cultured on PVLA-coated PS nanofibers (■), untreated PS nanofibers (■), and PVLA-coated TCPS dishes (■).

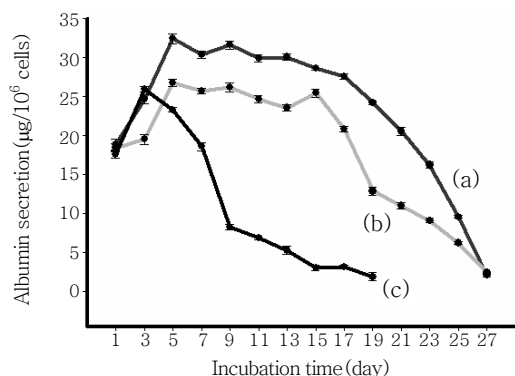


Figure 8. Albumin secretion of rat hepatocytes cultured on (a) PVLA-coated PS nanofibers, (b) untreated PS nanofibers, and (c) PVLA-coated TCPS dishes.

어지고 그 이후로도 기하급수적인 감소를 보인다.

이를 바탕으로 나노섬유상에서 간세포들이 세포간의 활발한 세포접촉을 통하여 세포간의 커뮤니케이션이 원활하게 유지됨으로써 암모니아 제거능을 장기간 유지하는 것으로 볼 수 있다. 나노섬유의 경우, 약 3주 배양 후부터 그 기능이 초기값보다 감소하는 것을 볼 수 있는데 이 역시 MTT에서의 결과와 동일하게 내부로의 산소와 배지 공급의 어려움 때문에 사멸한 세포들에 의한 영향인 것으로 추측된다.

알부민의 분비능을 조사한 결과, 앞에서 조사한 MTT, 암모니아 제거능과 유사한 결과를 얻을 수 있었다(Figure 8). 나노섬유의 경우에는 PVLA의 고정화 유무에 관계없이 높은 수치를 기록하는 것을 볼 수 있는데 이는 나노섬유 자체에서의 환경이 세포의 생장에 좋은 영향을 주는 3차원 미세 망상 구조이기 때문일 것이라 생각된다. PVLA를 코팅한 TCPS dish의 경우 PVLA의 영향으로 인해 초기접착이 우수하고, 약 5일 정도까지 좋은 알부민 분비능을 보여 주었다. 그 이후에 급격하게 기능이 저하되는 것은 MTT, 암모니아 제거능의 결과와 같은 경향을 나타내고 있다. 나노섬유의 경우에서도 PVLA를 도입한 경우가 도입하지 않은 경우보다 좀 더 나은 분비능을 보여주었으며, 3주간에 걸쳐 초기의 분비기능을 유지하고 있는데 이는 PVLA에 의한 초기 접착의 우수성과 더 많이 접착된 간세포들간의 활발한 상호작용 때문에 알부민 분비능의 유지가 더 용이했을 것이라 생각된다.

Akaike 등은 PS dish 상에 PVLA를 코팅하고 EGF를 첨가함으로써 세포의 이동이 활발해지며, 간세포덩어리인 multicellular aggregates(spheroid)가 형성됨을 발표하였다. 아울러 간세포를 2차원적인 평면에서 배양하였을 때 급격한 알부민 생산능의 감소를 관찰하였으나, spheroid의 형태로 배양함으로써 알부민의 생산을 약 2주정도 유지할 수 있었다고 보고하였다.¹⁶ 본 연구에서는 나노섬유를 활용하여 간단히 3차원적으로 간세포를 배양함으로써 간세포간의 커뮤니케이션이 증가되어 spheroid상의 배양에서 얻을 수 있는 효과를 얻을 수 있었다.

결론

단분산성의 PS를 용해성과 유전율이 우수한 DMF/MC 혼합용매를 사용하여 전기방사법으로 평균직경 500 nm 전후의 PS 나노섬유를 제조하였다. 우수한 다공성과 생체내 ECM과 유사한 형태를 가지는 나노섬유에 간세포를 특이적으로 인식하는 합성리간드인 PVLA를 도입하여 세포의 초기 접착과 3차원 배양을 유도하였다. ATR-FTIR, ESCA, 물접촉각의 측정을 통해 PS 나노섬유 표면의 개질을 확인하여 PVLA가 성공적으로 도입되었음을 확인하였다.

초대 쥐 간세포를 분리하여 파종하였고 PVLA와의 상호작용으로 월등한 초기 접착의 증가를 관찰할 수 있었다. 뿐만 아니라 나노섬유의 형태학적 특성은 간세포의 장기적 배양을 유지하는데 커다란 기여를 하는 것으로 확인되었다. 또한 MTT를 통해 배양 기간 동안 간세포의 활성을 측정하고 암모니아 분해능과 알부민 합성능을 조사한 결과 나노섬유가 간세포의 지지체로서 유용한 재료임을 확인할 수 있었다. 결과적으로 나노섬유가 가지는 장점과 PVLA의 초기접착 유도작용이 시너지 효과를 일으켜 생체 외에서의 간세포의 장기간 배양 및 세포기능 유지 기간을 상당히 연장할 수 있었다.

이러한 결과가 기존의 생인공간용 생체 반응기의 설계에 있어 유용하리라 생각하며 PVLA 외의 다른 생리 활성 기질의 합성 및 응용에도 많은 도움이 될 것이라 생각된다.

감사의 글 : 본 연구는 한국과학재단(한국학술진흥재단 이관)의 지역대학우수과학자지원사업(R05-2003-000-11962-0)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. P. Vacanti, *Craniofacial Growth Series*, **34**, 171 (1998).
2. B. Fuller, *J. Hepatol.*, **7**, 368 (1988).
3. P. Rivas and A. Fabrega, *Transplant. Proc.*, **24**, 1833 (1992).
4. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **14**, 323 (1993).
5. A. G. Mikos, A. J. Thorsen, L. A. Gzerwonka, Y. Bao, R. Langer, D. N. Winslow, and J. P. Vacanti, *Polymer*, **35**, 1068 (1994).
6. S. H. Cho, S. H. Oh, and J. H. Lee, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **16**, 933 (2005).
7. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2007).
8. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
9. Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Comp. Sci. Technol.*, **63**, 2223 (2003).
10. H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, *Polymer*, **40**, 4585 (1999).
11. X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, *Polymer*, **43**, 4403 (2002).
12. I. S. Lee, O. H. Kwon, W. Meng, I.-K. Kang, and Y. Ito, *Macromol. Res.*, **12**, 374 (2004).
13. S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, and M. Toner, *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 189 (1997).
14. M. Yamato, O. H. Kwon, M. Hirose, A. Kikuchi, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 137 (2001).
15. T. Hoshiba, M. Wakejima, C. S. Cho, G. Shiota, T. Akaike, and J. Biomed, *Mater. Res. A*, in press.
16. T. Akaike, S. Tobe, A. Kobayashi, M. Goto, and K. Kobayashi, *Gastroenterol. Jpn.*, **28**, 45 (1993).
17. X. Geng, O. H. Kwon, and J. Jang, *Biomaterials*, **26**, 5427 (2005).
18. Y. Ito, H. Hasuda, M. Kamitakahara, C. Otsuki, M. Tanihara, I.-K. Kang, and O. H. Kwon, *J. Bio. Bioeng.*, **100**, 43 (2005).
19. O. H. Kwon, I. S. Lee, Y.-G. Ko, W. Meng, K.-H. Jung, I.-K. Kang, and Y. Ito, *Biomedical Materials*, **2**, S52 (2007).
20. H.-J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **25**, 1039 (2004).
21. W. Meng, S.-Y. Kim, J. Yuan, J. C. Kim, O. H. Kwon, N. Kawazoe, G. Chen, Y. Ito, and I.-K. Kang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **18**, 81 (2007).