

천연 고분자가 함유된 락타이드 글리콜라이드 공중합체 필름에서 슈반세포의 부착과 증식 거동 비교평가

고현아 · 장지은 · 김형석 · 박찬흠* · 권순용** · 정진화**† · 강길선†

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 나노공학과,

*한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과, **가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과
(2013년 9월 17일 접수, 2013년 10월 23일 수정, 2013년 11월 6일 채택)

Comparison between Poly(lactic-co-glycolic acid) Films Contained Natural Polymers on Adhesion and Proliferation of Schwann Cells

Hyun Ah Ko, Ji Eun Jang, Hyeongseok Kim, Chan Hum Park*, Soon Yong Kwon**, Jin Wha Chung**†, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech., and Dept. of Polymer-Nano Sci. & Tech. and Polymer BIN Research Center,
Chonbuk National University, 567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea

*Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine,
Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

**Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,
62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea

(Received September 17, 2013; Revised October 23, 2013; Accepted November 6, 2013)

초록: 본 연구에서는 신경세포인 슈반세포(SC)의 증식에 가장 적합한 생체재료를 연구하였다. 락타이드 글리콜라이드 공중합체(PLGA)에 탈미네랄 골분(demineralized bone particle, DBP), 소장점막하조직(small intestine submucosa, SIS), 그리고 실크를 각각 20% 첨가하여, 용매 증발법으로 각각의 필름을 제조하고, SC세포의 부착과 증식을 확인하기 위해 MTT, SEM 그리고 RT-PCR 분석을 실시하였다. 또한 필름의 친수성을 확인하기 위해 접촉각을 측정하였다. 분석 결과, PLGA/DBP 20% 필름에서 높은 친수성을 보였으며, SC의 부착과 증식률이 다른 군에 비해 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 PLGA/DBP 필름은 중추신경재생 재료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: This study was designed to find an appropriate biomaterial to proliferate Schwann cell (SC). Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) films mixed with demineralized bone particle (DBP), small intestine submucosa (SIS), and silk were fabricated by a solvent casting method. Analysis of MTT, SEM and RT-PCR were performed to confirm adhesion and proliferation of SC. Contact angle of films was assayed for hydrophilicity of films. We confirmed that PLGA/DBP 20% film showed higher hydrophilicity, promoted adhesion and proliferation of SC than other films. It was concluded that PLGA/DBP film can be applied for the scaffold biomaterials for the regeneration of central nerve system.

Keywords: schwann cell, demineralized bone particle (DBP), small intestine submucosa (SIS), silk, PLGA hybridized film.

서론

중추신경의 재생을 위해 신경세포를 이용한 치료의 연구가 끊임없이 이어지고 있으며 그 기술과 효과 또한 연구를 바탕으로 지속적인 발전을 이루어 가고 있다. 이에 따라, 손상된 조직에서 이식된 세포의 치료적 역할을 더 효과적으로 유지할 수 있게 도와주는 생체재료의 연구도 함께 활발히 진행되

었으며 이미 많은 성과를 보이고 있다.

슈반세포(Schwann cells, SC)는 전기적인 신호를 신경에 전달하는 세포로서, 신경섬유성장에 영향을 주는 세포외 기질들을 많이 생성하고 항신경인자를 가지고 있어, 세포의 증식 분자를 발현시킨다.¹ 하지만, SC는 콜라겐으로 이루어진 기저막에서 단층으로 자란다. 때문에 SC를 이식하기 전 초기 배양의 세포 증식을 위해 콜라겐을 코팅한 층을 이용하여 배양한다.² 이런 SC를 중추신경재생을 위한 세포치료에 이용하기 위해 세포의 부착과 증식 그리고 그 기능이 세포의 이식 후 잘 이루어지고 보존되어야 하는^{3,4} 생체재료의 연구가 필

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: koreafoot@gmail.com; gskhang@jbnu.ac.kr

요하다. 따라서 이 연구에서는 콜라겐에서 단일층으로 증식하는 SC의 특징을 바탕으로 본 연구팀의 선행된 SC의 부착과 증식 연구들에서 사용된 탈미네랄화 골분(demineralized bone particle, DBP), 소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS) 그리고 실크의 생체재료들을 이용한 필름을 이용하여 그 중 가장 좋은 세포의 부착과 증식을 알아보고자 실행되었다.

먼저 락타이드 글리콜라이드 공중합체 poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)는 생체 적합성, 생분해성과 가공성이 우수한 미국 식품의약품안전청의 승인을 받은 생체재료의 고분자로서, 단량체를 조절하기 때문에 분해기간을 조절할 수 있다는 장점이 있다.⁵ 하지만, 초기 세포의 부착에 방해가 되는 소수성 재료로 리간드의 고정화, 단백질의 흡착 등을 통해 표면을 개질화하는 방법으로 세포 부착에 알맞은 연구가 필요하다.⁶⁻⁸ 따라서 이러한 PLGA의 문제점을 개선하고자 본 연구팀은 PLGA, DBP, SIS 그리고 실크를 이용하여 PLGA와 재료별 함량에 따라 SC의 부착과 증식을 연구하여 재료별 가장 좋은 함량을 찾아내었다.

DBP는 세포 분화를 자극하는 물질인 BMPs(bone morphogenic proteins)를 함유하고 있어,^{9,10} 신경보호와 시냅스 형성에 긍정적인 영향을 주며 성상교세포 생성을 촉진시키고 신경능선을 유도한다.¹¹⁻¹³ 이러한 생체재료적인 효과를 통해 본 연구팀에서 선행된 PLGA에 DBP를 첨가한 함량별 필름에서 SC의 부착과 증식에 관한 기초 연구 결과, DBP의 함량이 10과 20%인 필름에서 우수한 결과를 얻어내었다. 특히 3일째까지의 부착률을 관찰한 결과, 20%의 필름에서 가장 높은 결과를 나타내었다.

SIS는 90% 이상의 콜라겐 I, II로 구성되어 있고, 콜라겐의 친수성 특성으로 수분 흡수율이 높다. 또한 생분해성 기간이 60~90일 정도이며 글리코스아미노글리칸, 피브로넥틴, 헤파린, 신경성장인자 등의 여러 사이토카인이 존재하여 세포의 부착과 증식 등을 향상시킬 수 있어 조직공학적으로 유용하게 활용할 수 있다.¹⁴⁻¹⁶ 본 연구팀은 기초 연구를 통해 SIS 역시 SC의 성장에 있어 10과 20%가 가장 적합한 혼합비율임을 확인하였다. 특히 20%의 필름에서 SC의 mRNA 발현도가 현저히 높게 나타났다.

실크는 단백질 순도가 97% 이상의 천연고분자이며¹⁷⁻¹⁹ 실크섬유에 포함되어 있는 점성의 항원성 단백질인 세리신을²⁰ 제거하여 대식세포와 반응실험에서 종양괴사인자인 TNF- α 분석결과 염증반응이 낮음이 밝혀졌다.²¹ 또한 산소와 수분의 투과성이 우수하여 세포의 성장을 지지한다고 조사된 바 있다.²² 이런 실크를 이용하여 본 연구팀에서 PLGA/실크의 함량별 필름을 제조하여 SC의 부착과 증식을 확인한 결과, 이 역시 실크의 함량이 10과 20%가 가장 우수하게 나타났다.²³

하지만, SC와 같은 신경세포는 배양접시에 추가적인 폴리-L-라이신(PLL) 코팅을 해 배양을 해야 할 정도로 배양 조건이 까다로운 세포이다.²⁴

때문에 SC의 부착과 증식의 조건을 만족하는 지지체의 재료 선정에 있어서는 아직 많은 연구가 필요하다. 선행 연구 결과들은 각 재료에 따른 함량별 필름에서 SC의 부착과 증식에 가장 좋은 함량을 찾아내었다. 하지만, 이 재료들에서도 SC가 증식하기에 가장 적절한 재료를 선택하기 위한 추가적인 연구가 필요하다. 따라서 이 연구는 선행 연구들을 토대로 재료별 가장 우수하고 공통적 함량인 20% 필름을 제조하여 그 필름에서 SC의 부착과 증식을 관찰함으로써 SC가 성장하기에 가장 우수한 재료를 확인하고자 하였다.

SC의 부착과 증식에 가장 적합한 필름을 찾기 위해 필름의 인장강도를 측정해 필름의 PLGA와 재료간의 결합력과 세포의 부착과 증식 사이의 관계를 알아보았고, 접촉각을 측정해 세포의 초기 부착에 영향을 주는 재료 표면의 친수성을 확인하였다. 또한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, a yellow tetrazole)를 통해 세포의 부착과 증식률을 측정, SEM(scanning electron microscope)을 통해 SC의 모폴로지를 관찰하고 세포의 표현형이 유지되는지를 RT-PCR을 통해 알아보았다.

실 험

시약 및 재료. PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer® RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. Methylene chloride(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC(high performance liquid chromatography) 등급을 사용하였다.

SC의 분리 및 배양. SC의 배양 방법 중 안전하고 쉬우면서 순수한 세포 분리가 가능한 Morrissey의 방법을 이용하였다.²⁵ 먼저 3주령의 Fischer 쥐의 대퇴부에서 좌골신경을 분리하여 인산완충용액(PBS)이 담겨있는 페트리접시에 담고 상피를 벗겨내었다. 신경은 약 1 mm로 잘게 잘라서 배양액이 담겨있는 페트리 용기에 옮겨 놓았다. 3일에 한 번씩 배양액을 교체하고 7일에 한 번씩 새로운 용기로 신경조직을 옮겨 주면서 5주 동안 배양하였다. 세포 배양액으로는 10% 우태아혈청(FBS, Gibco) 및 항생제(100 unit/mL 페니실린과 100 μ g/mL 스트렙토마이신, Gibco, USA)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, 고농도 글루코오스, Gibco, USA)을 사용하였다. 이렇게 배양 용기를 옮겨주어 섬유아세포가 일차적으로 제거되면 신경조직을 수거하여 1.25 unit/mL 디스파제(Boehringer Mannheim, Germany)와 0.05% 콜라겐 나야제를 넣고 인큐베이터에서 6~10시간 동안 방치한 후, 파스퇴르 피펫을 이용해서 신경의 기질을 제거하고 단일세포로 분리하였다. 이 과정에서 얻어낸 SC를 새로운 용기에 옮긴 후 섬유아세포의 수를 감소시키는 역할을 하는 포스폴린(Sigma-Aldrich, USA)을 배양액에 2 μ M 농도로 첨가하여 슈

반세포의 순도를 높였으며, 성장 영양인자인 소 뇌하수체 추출물(Gibco, USA)을 20 µg/mL의 농도로 첨가하여 슈반세포의 증식을 높이고자 하였다.

DBP 제조. DBP는 소의 대퇴부를 사용하여 Urist 방법으로 제조하였다. 소의 대퇴골의 원위골단부, 근위골단부, 골막과 골수 및 연조직을 깨끗이 제거한 후 잘게 분쇄하였다. 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매로 지방을 제거한 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N의 HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, pH 7.4, Sigma Chem Co, St Louis, MO, USA)으로 pH 7.4로 조절하여 동결건조시켰다. DBP는 액체질소 내에서 동결분쇄기(SPEX 6700, USA)로 약 180 µm 크기 이하의 분말 형태를 얻었다.

SIS 분리. SIS를 분리하기 위하여 돼지공장에 있는 지방조직을 제거 후 3차 증류수로 깨끗이 공장 안과 밖을 5회 세척한 다음, 세척된 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라 아세트산에 담구어 붙어있는 세포를 모두 괴사시킨 후, 다시 식염수에 넣고 pH 7이 되도록 세척하였다. 잘라낸 공장을 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막근육층을 제거하여 SIS 층만을 분리하였다. 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고 -80 °C에서 보관한 SIS를 동결건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결분쇄기(SPEX 6700, USA)를 이용하여 약 180 µm 크기 이하의 분말 형태를 얻었다.

실크 준비. 실크생사는 동국대학교 생명과학연구원(Dongguk University Molecular Biology Laboratory)에서 제공받았으며, 세리신을 제거하기 위해 5% Na₂CO₃가 포함된 3차 증류수에서 1시간 동안 가열한 뒤 걸러내 3차 증류수로 헹구고 CaCl₂와 에탄올이 포함된 3차 증류수에 넣고 100 °C에서 2시간 동안 가열한다. 그 후에 2일 동안 투석막에 5번 걸러준 후 -80 °C에서 보관한 실크를 동결건조한 후 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결분쇄기(SPEX 6700, USA)로 약 180 µm 크기 이하의 분말 형태를 얻었다.

필름제조. 용매증발법을 이용하여 PLGA 및 DBP, SIS, 실크가 함유한 PLGA 하이브리드 필름을 제작하였다. 300 mg의 PLGA 양을 5 mL의 MC에 용해한 후, PLGA 중량의 20%에 해당하는 양의 천연재료를 첨가하여 고루 분산시켰다(Table 1). 이를 직경 30 mm인 접시에 도포한 후 잔존 유기용매를 제거하기 위해 실온에서 2~3일 건조시킨 후 70% 알코올 멸균과 PBS 세척을 통하여 실험에 사용하였다.

필름의 인장강도 평가. PLGA 필름 및 DBP 20%, SIS 20%, 실크 20% 필름(PLGA 필름을 제외한 나머지 필름은 wt%로 제조하였으나 본 논문에서는 %로 표기함)의 물리적 특성인 인장강도를 인장강도 측정기(UTM, LR 5K plus, Lloyd Instrument, UK)를 사용하여 측정하였다. 필름은 아령모양(표준 길이 = 25.4 mm, 좁은 폭의 길이 = 5 mm, 두께 = 대략 100~130 µm)으로 잘라 50 mm/min 빠르기와 0.5 N

Table 1. Contents of PLGA and PLGA/DBP, SIS, Silk Films

	PLGA (mg)	Natural material (mg)	MC (mL)
PLGA	300	0	5
DBP	300	60	5
SIS	300	60	5
Silk	300	60	5

의 힘으로 측정하였다. 측정 값은 BS EN ISO 527-1, BS2782 Part 3 Method 322과 다른 표준 결과들을 사용하여 확인하였다.

필름의 친수성 평가. 제조된 PLGA 필름 및 DBP, SIS, 실크 필름의 친수성을 확인하기 위해 증류수를 이용하여 접촉각을 측정하였다. 물 접촉각 측정기(Tantec™, CAM-PLUS micro, USA)를 이용하여 각각의 필름에 10 µL의 증류수를 떨어뜨려 시료의 표면과 물방울이 이루는 각도가 클수록 소수성이며 작을수록 친수성을 나타낸다. 각 시료에서 무작위로 영역을 선택하여 3회 분석을 실시 후 평균값을 계산하였다. 또한 시료의 물 흡수정도를 측정하기 위해 증류수를 떨어뜨리고 5분 간격으로 접촉각을 측정하여 물 흡수성 정도를 확인하였다.

PLGA 및 DBP, SIS, 실크 20% 필름에서의 세포증식률 확인. 분리된 슈반세포는 3회 계대 배양한 후 0.05%의 트립신을 이용하여 세포를 수거하여, 제조된 필름에 1×10⁵ 세포/필름의 농도로 파종하고 배양액을 공급하여 37 °C의 5% CO₂ 세포 배양기에서 1, 3, 7 및 10일 동안 세포를 배양하였다. 증식률의 확인은 MTT분석법을 이용하여 확인하였으며 세포가 파종된 필름에 1, 3, 7 및 10일 째에 MTT용액(50 mg/mL)을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 세척하고 디메틸설폭사이드(Sigma) 용액을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 분쇄기로 1시간 동안 결정을 용해하였다. 그 후 96웰에 샘플을 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 부착 확인. PLGA 필름과 PLGA/천연재료 20% 필름을 지름 1 cm로 잘라 세포배양용 24웰에 실리콘몰드로 고정시켰다. 여기에 SC를 1×10⁵ 세포/필름의 농도로 파종하고 1, 3 및 10일 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척후 2.5% 글루타르알데하이드로 24시간 고정한 후 알코올을 이용하여 탈수하고 동결건조 하였다. 각 시료를 잘라 샘플폴더에 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 200 µm의 두께로 백금코팅하고 주사전자현미경 Bio-LV SEM(SN-3000 Hitachi, Japan)을 이용하여 각각의 천연재료 20% 함량에 따른 필름에서의 세포의 부착정도를 관찰하였다.

Table 2. Primer Sequence

	Protein	Primer sequence
Rat	GAPDH	F : 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' R : 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'
Rat	NF	F : 5'-TGGAGAATGAGCTGAGAAGC-3' R : 5'-TTCGTAGCCTCAATGGTCTC-3'
Mouse	S-100	F : 5'-GACTCCAGCAGCAAAGGTGAC-3' R : 3'-CATCTTCGTCCAGCGTCTCCA-3'

PLGA 및 DBP, SIS, 실크 20% 필름에서 SC의 표현형 분석. PLGA 필름과 PLGA/천연재료 20% 필름에서 SC의 특성유지를 유전자 측면에서 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 배양액을 제거한 뒤 Trizol(InvitrogenTM, USA) 1 mL을 넣고 피펫팅하여 세포막을 녹인 후, 녹인 Trizol을 다시 석션, EP tube에 넣은 후, 클로로포름(Sigma)을 0.2 mL을 넣고 섞어주었다. 그 다음 4 °C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 분리 후 위의 상층액만을 0.5 mL 석션하여 새로운 EP tube에 넣고 이소프로판올(Sigma-Aldrich) 0.5 mL을 넣고 섞어 준 후 폴리아크릴 CarrierTM(Molecular Res Center, Inc)를 0.005 mL을 첨가하여 4 °C에 10분 보관하였다. 그 다음 4 °C, 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA를 얻었다. 이렇게 얻은 RNA는 one step PCR 키트(TOPscriptTM One-step RT PCR DryMIX(+Dye))를 이용하여 각각의 프라이머(GAPDH, NF, S-100)를 신장시켜 DNA 영역을 증폭시켰다. 증폭된 DNA를 1.2% 1.2%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 하여 300 nm 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20.M, France)로 촬영, 밴드의 발현정도를 관찰하였다. 프라이머는 제노텍(Korea)으로부터 구입하였으며 프라이머의 염기서열은 Table 2에 나타내었다.²⁶

결과 및 토론

필름의 인장강도 평가. DBP/SIS/실크를 함유한 PLGA 필름에서 천연재료와 PLGA 분자의 결합력과 SC의 부착, 증식의 관계를 확인하기 위해 필름의 인장강도를 측정하였다(Figure 1).

PLGA의 경우 7.87 MPa, DBP 20% 2.57 MPa, SIS 20% 1.2 MPa, 실크 20% 3.0 MPa으로 PLGA 필름과 비교하였을 때 1/3의 값으로 감소하나, DBP/SIS/실크의 실험군에서는 재료에 따른 응력의 큰 변화를 찾아 볼 수 없었으며, 하중에 의한 필름의 변형된 정도를 나타내는 strain(변형률)에 대해서는 PLGA 32.18%, DBP 20% 13.19%, SIS 20% 6.92%, 실크 20% 12.98%로 DBP와 실크의 변형률이 비슷한 값을 나타냈으며 PLGA에 대하여 약 1/2 값으로 감소되며, SIS 20% 필름에 대해서는 2배 증가된 값을 나타내었다. 이 결과로 PLGA의 필름에 DBP/SIS/실크가 분산되면서 순수한 PLGA 필름

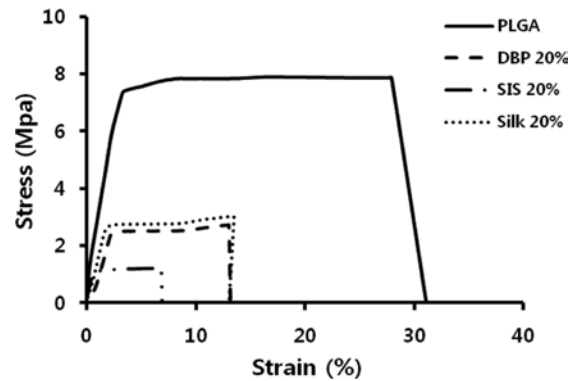


Figure 1. Strain percent of films.

에 불순물로 DBP/SIS/실크가 작용하여 긴 고분자 사슬을 갖는 PLGA의 분자사슬이 끊어져 DBP/SIS/실크가 첨가됨으로써 적은 힘으로 큰 변형을 나타냄을 확인할 수 있었다. 특히 SIS가 함유된 필름에서는 작은 힘으로도 필름이 끊어져, PLGA 분자와 SIS의 결합 정도가 가장 작은 것을 알 수 있었다.

필름의 친수성 평가. 세포의 초기 부착에 영향을 주는 표면의 친수성을 확인하기 위해 PLGA 필름과 DBP, SIS, 실크 20% 필름의 접촉각 측정을 실시하였으며 그 값을 Figure 2에 나타내었다. PLGA 필름과 SIS 20% 필름의 친수성을 접촉각을 통하여 측정한 결과 초기 접촉각과 30분 후의 접촉각의 크기가 비슷함을 보였으나 DBP 20% 필름과 실크 20% 필름에서는 시간이 지남에 따라 높은 수분 흡수율을 나타냄을 확인하였다. 측정 30분 후 DBP 20% 필름의 경우 접촉각이 27.3°였으며, 실크 20% 필름의 접촉각은 31.3°를 나타내었다. 이것으로 DBP와 실크에서 친수성을 확인할 수 있었으며 특히 DBP가 함유됨으로써 필름에 대한 높은 친수성을 부여하는 것으로 확인하였다.

세포 증식 확인. PLGA 필름 및 DBP, SIS, 실크 20% 필

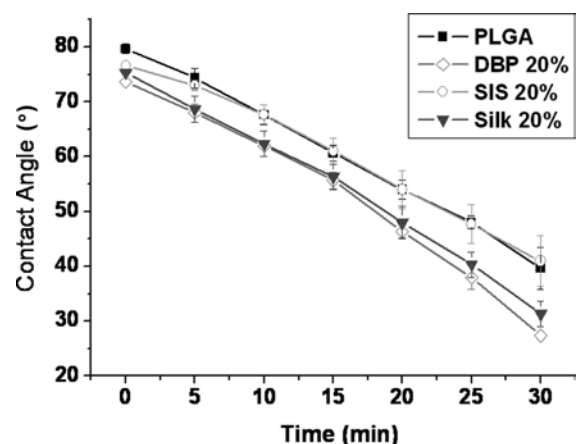


Figure 2. Contact angle of PLGA and DBP 20%, SIS 20%, silk 20% films (n=3).

름표면에서 SC의 증식정도를 확인하기 위해 MTT분석을 하였으며 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 초기 증식률인 1일째와 3일째에서 PLGA 필름보다는 모든 DBP, SIS, 실크 20% 필름에서 높은 증식률을 나타내었다. 하지만, SIS 20% 필름과 실크 20% 필름에서는 성장률이 저조한 반면 DBP 20% 필름에서는 세포의 증식이 활발함을 확인할 수 있었다. 시간이 지남에 따라서도 PLGA 필름보다는 DBP, SIS, 실크 20% 필름에서 높은 성장률을 나타내었지만 실크 20% 필름의 경우 DBP, SIS 20% 필름보다는 성장이 더디게 증식되는 것을 나타내었다. 이 결과 DBP 함량이 20%인 필름에서 SC의 세포수 증가 및 높은 증식률을 나타냄을 확인하였다. 이로써 PLGA가 가지고 있는 소수성인 부분을 DBP, SIS, 실크에 따라 친수성인 부분을 나타내어 세포의 증식을 유도하는 것을

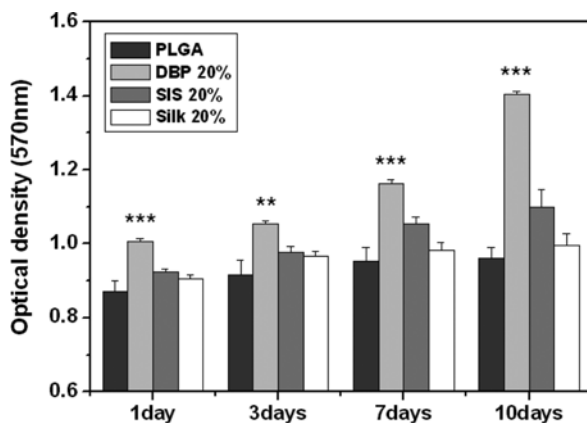


Figure 3. Cell proliferation of SC on PLGA and DBP 20%, SIS 20%, silk 20% films on 1, 3, 7, 10 days after cell culture (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

확인하였고, 그 중에서 슈반세포에 대한 긍정적인 영향은 DBP가 가장 우수하다고 사료된다.

세포의 부착거동 확인. PLGA 필름과 DBP, SIS, 실크 20% 필름 표면에서 슈반세포의 부착에 어떠한 영향이 있는지 알아보기 위하여 SEM 분석을 실시한 결과를 Figure 4에 나타내었다. 1일차 초기 부착률에서는 모든 실험군에서 구형인 세포의 모양을 나타내었음을 확인하였고 3일차 부터는 SC로부터 신경돌기가 뻗어나오름을 확인하였다. 하지만, 실크 필름에서는 구형의 세포의 모양을 유지하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 시간이 지남에 따라 PLGA 필름보다는 DBP, SIS, 실크 20% 필름에서 높은 세포의 부착률과 신경돌기의 뻗음이 확실하게 나타났으며 그중에서도 DBP 20% 필름에서 가장 활발히 일어났음을 확인하였다. 이는 앞선 세포의 성장률의 결과와 유익하며 모든 천연재료에서 SC의 성장과 부착에 도움을 주며 상호작용을 하지만 DBP 20% 필름이 SC의 성장 및 부착을 유도하며 신경계세포의 신경돌기의 뻗음과 형태를 유지하는데 가장 유익한 환경을 가짐을 확인하였다.

RT-PCR. PLGA 필름과 DBP, SIS, 실크 20% 필름에서 SC의 mRNA 발현의 영향을 확인하기 위해 각각의 필름에 세포를 파종하여 3일과 10일 후, RNA 분리하여 RT-PCR을 실행하여 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 신경 특정 마커인 NF를 확인해본 결과, 모두 10일 차에서 밴드의 발현도가 3일차 밴드의 광도보다 더 높게 나타났다. 특히 DBP 20% 필름에서 초기 발현정도가 다른 실험군에 비해 높게 나타났다. SC에서만 확인할 수 있는 S-100의 primer에서의 경우에도, NF에서와 마찬가지로 DBP 20% 필름에서 초기 발현이 높게 측정되었다. 또한 NF와 S-100 측정결과에서 공통적으로 SIS 20% 필름에서의 발현도의 증가 정도가 다른 필름에 비

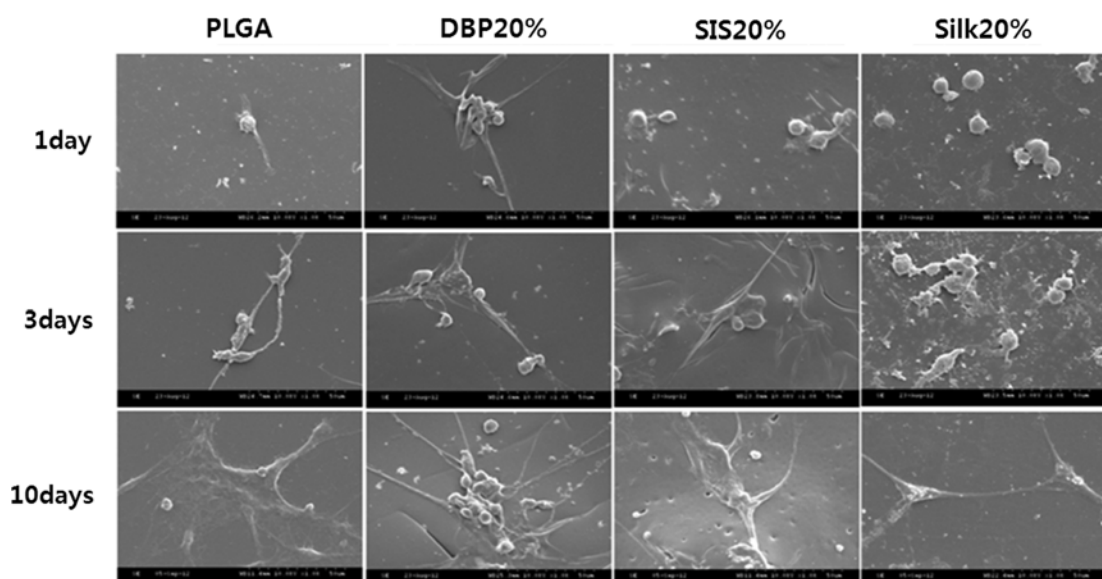


Figure 4. SEM microphotographs of SC cell morphology on PLGA and DBP 20%, SIS 20%, silk 20% films after 1, 3, 10 days ($\times 500$).

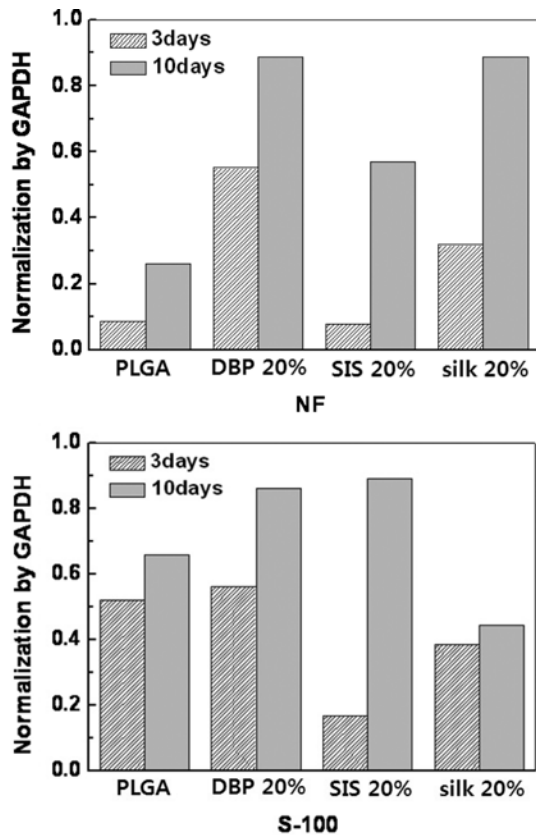


Figure 5. Gene expression of mRNA levels of SC on PLGA, DBP 20%, SIS 20% and silk 20% films using RT-PCR.

해 크게 나타났다. 이 실험 결과로 SCs는 PLGA 필름과 DBP, SIS, 실크 20% 필름 모두에서 표현형 유지와 세포의 기능을 유지하는 것으로 사료된다.

결 론

중추신경의 재생에 있어 신경세포의 부착뿐 아니라 세포의 기질이 정확히 나타나 세포들간 유기적인 연결과 성장이 중요하다.²⁷ 이러한 세포의 활동을 정상적으로 그리고 더욱 활발히 촉진시키는 작용을 하는 지지체의 역할 또한 세포의 활동에 못지않게 중요하다고 해야 할 것이다.²⁸

본 연구팀에서는 생체 적합성과 가공성이 우수한 PLGA에 세포의 부착과 증식을 더 증대할 수 있는 재료들인 DBP, SIS, 실크를 함량별 필름을 제조하여 SC의 세포적 특성이 잘 유지되는 %를 찾아내었다.

이번 연구에서는 찾아낸 %를 재료별로 비교하기 위해 각각 20%의 필름을 제작하여 SC를 파종, 필름의 수분 친화도와 세포의 증식확인을 위한 MTT 분석, 세포의 형태분석인 SEM을 실시하여 SC가 성장하기에 가장 좋은 환경을 가진 필름을 찾고자 하였다.

MTT 분석에서는 10일 이후에도 PLGA와 실크에 대한 세포증식이 비슷하였으나 DBP와 SIS 필름에 대해서는 그 증식 정도가 높았다. 특히 DBP 필름에서는 그 증식의 증가가 더욱 더 뚜렷하게 나타나 SC의 증식에 가장 효과적인 필름의 천연재료는 DBP라는 것을 알 수 있었다. SEM을 통해 알아본 SC의 부착 형태에서도 DBP 필름에서 1일째부터 다른 필름보다 세포의 형태가 필로포디아 및 라멜리포디아 등이 뻗어 긴 방추형이 나타남을 확인할 수 있었다. RT-PCR의 결과에서도 모든 필름에서 SC의 표현형이 유지된다는 것을 확인하였지만, 특히 초기 mRNA 발현도는 DBP 20% 필름에서 가장 높게 나타났다. 따라서 SC의 부착과 성장에 가장 유리한 조건을 가진 재료는 PLGA에 DBP의 함량이 20%인 것으로 나타났다.

필름의 특성을 평가하기 위해 인장강도와 접착각 측정을 하여 필름의 어떠한 특성이 SC의 부착과 증식에 도움을 주는지를 알아보았다. 인장강도 실험에서는 PLGA가 가장 높은 값을 보였고, SIS에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 이는 SC의 MTT와 SEM, 그리고 RT-PCR의 결과와 비교하였을 때, SC의 초기 부착과 증식에 PLGA 분자와 재료간 결합 정도는 관여하지 않는다는 것을 알아내었다. 또한 수분흡수율을 알아보기 위해 측정한 필름의 접착각은 천연재료가 첨가된 필름에서는 PLGA 필름보다 낮은 접착각을 보였으며, 특히 DBP가 첨가된 필름의 접착각(27.3°)이 PLGA 필름의 접착각(39.67°)과 비교하여 낮은 접착각을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이로써 PLGA의 초기 세포 부착을 방해하는 소수성의 특징이 천연재료를 첨가하면서 친수성으로 바뀐 것을 확인할 수 있었다. 접착각 측정 결과를 인장강도 결과 분석과 같은 방법으로 분석하였을 때, 필름의 표면 친수성은 SC의 초기 부착과 증식에 긍정적인 영향을 보이는 것으로 사료된다.

이러한 결과로 필름에 친수성을 부여하면서 세포 분화 자극과 신경보호 및 시냅스 형성에 도움을 주어 신경 능선을 유도하는 것으로 알려진 BMPs를 함유한¹¹⁻¹³ DBP가 신경세포인 SC의 부착과 증식에 가장 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(112007-05-1-SB010), 한국연구재단바이오 의료기술개발사업(2012M3A9C6050204)에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. X. M. Xu, A. Chen, V. Guenard, N. Kleitman, and M. B. Bunge, *Neurocytol*, **26**, 1 (1997).
2. J. L. Salzer and R. P. Bunge, *J. Cell Biology*, **84**, 739 (1980).
3. A. Atala, *J. Endourol.*, **14**, 49 (2000).
4. N. Zhang, H. Yan, and X. Wen, *Brain Res.*, **49**, 48 (2005).

5. G. Khang, J. H. Jeon, J. C. Cho, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **23**, 861 (1999).
6. S. J. Holland, B. J. Tighe, and P. L. Could, *J. Control. Res.*, **4**, 155 (1986).
7. Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
8. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Lee, Y. S. Kim, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **8**, 276 (2000).
9. C. B. Huggins and M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1970).
10. M. R. Urist, *Science*, **167**, 896 (1970).
11. B. L. Hogan, *Harvey Lect.*, **92**, 83 (1996).
12. T. Ebenbal, H. Bengtsson, and S. Soderstrom, *J. Neurosci. Res.*, **51**, 139 (1998).
13. P. Lonn, K. Zaia, C. Israelsson, S. Althini, D. Usoskin, A. Kylberg, and T. Ebendal, *Neurochem. Res.*, **30**, 753 (2005).
14. G. Khang, J. M. Rhee, P. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
15. S. F. Badylak, R. Record, K. Lindberg, J. Hodde, and K. Park, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 863 (1998).
16. K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 501 (2005).
17. J. Chen, G. H. Altman, V. Karageorgiou, R. Horan, A. Collette, and V. Volloch, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67**, 559 (2003).
18. H. J. Jin and D. L. Kaplan, *Nature*, **424**, 1057 (2003).
19. H. J. Jin, S. V. Fridrikh, and G. C. Rutledge, *Biomacromolecules*, **3**, 1233 (2002).
20. H. K. Soong and K. R. Kenyon, *Ophthalmology*, **91**, 479 (1984).
21. B. Panilaitis, G. H. Altman, J. Chen, H. J. Jang, V. Karageorgiou, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 3079 (2003).
22. L. Meinel, O. Betz, R. Fajardo, S. Hofmann, and A. Nazarian, *Bone*, **39**, 922 (2006).
23. H. L. Kim, H. Yoo, H. J. Park, Y. G. Kim, D. Lee, Y. S. Kang, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 7 (2011).
24. S. Porter, M. B. Clark, L. Glaser, and R. P. Bunge, *J. Neurosci.*, **6**, 3070 (1986).
25. T. K. Morrissey, N. Kleitman, and R. P. Bunge, *J. Neurosci.*, **11**, 2433 (1991).
26. H. L. Kim, S. J. Kim, H. Yoo, M. Hong, D. Lee, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.*, **1**, 81 (2010).
27. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. Kim, *Int. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
28. M. Yamamoto and Y. Tabata, *Int. J. Tissue Regen.*, **4**, 36 (2013).