

각막 내피세포 성장 거동에 대한 락타이드 글리콜라이드 공중합체 필름과 세포외 기질의 효과

김은영 · 김혜민 · 송정은 · 이현수* · 주천기* · 강길선†

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자BIN융합연구소

*가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 안과

(2014년 2월 11일 접수, 2014년 3월 25일 수정, 2014년 4월 25일 채택)

Effect of Extracellular Matrix on the Growth Behavior of Corneal Endothelial Cells to Poly(lactic-co-glycolic acid) Film

Eun Young Kim, Hye Min Kim, Jeong Eun Song, Hyun Soo Lee*, Choun-Ki Joo*, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech., Polymer Fusion Res Center & Dept. of PolymerNano Sci. Tech., Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

*Department of Ophthalmology and Visual Science, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Gangnam St. Mary Hospital 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

(Received February 11, 2014; Revised March 25, 2014; Accepted April 25, 2014)

초록: 각막 내피세포는 각막 가장 안쪽의 단일 세포층이며, 데스메막 위에 놓여있다. 데스메막은 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 단백당 등의 포함하는 세포외 기질이라 불리는 다양한 단백질들로 구성되어 있다. 본 연구에서, 조직공학에서 널리 이용되고 있는 락타이드 글리콜라이드 공중합체를 이용하여 투명한 필름을 제작하였으며, 표면에 다양한 부착 분자들(피브로넥틴, 콜라겐 타입 I, IV, 라미닌, FNC 코팅 믹스)을 코팅한 후, 세포 형태 관찰, 세포 증식 및 부착, ZO-1과 Na^+/K^+ -ATPase의 발현을 확인하였으며, RT-PCR을 통해 각막 내피세포의 인자들을 확인하였다. 실험 결과, *in vitro* 상에서 PLGA 필름은 각막내피세포 전달체로서 역할을 하며 코팅된 세포외 기질들은 각막 내피세포의 거동에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였다.

Abstract: Corneal endothelium is mono-inner cell layer of cornea and lay on Descmet's membrane which comprised of various proteins called extracellular matrix such as fibronectin, collagen, laminin, and proteoglycan, etc. In this study, we fabricated transparent poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) film because PLGA is widely used for tissue engineering based on their properties. We investigated the behaviors of rabbit corneal endothelial cells (rCEnCs) on PLGA film surfaces coated with various cell-adhesive molecules like fibronectin, laminin, collagen type I and IV and FNC coating mix. The morphologic images, proliferation and adhesion assay, immunofluorescence for ZO-1 and Na^+/K^+ -ATPase and RT-PCR for expression of specific markers were conducted. These results showed that PLGA film plays a role as CEnC carriers *in vitro* and the cell-adhesive molecules give positive effects on the behaviors of rCEnC.

Keywords: corneal endothelium (CE), PLGA, extracellular matrix (ECM).

서론

각막 내피세포는 각막의 가장 안쪽에 위치하는 육각형의 세포모양을 가지는 단일 세포층으로, 각막의 투명성 및 기능 유지에 매우 중요한 역할을 한다.¹ 하지만, 인간 각막 내피세포는 생체 내에서는 제한된 증식능력을 가지고 있으며,² 나이가 들어감에 따라 연간 0.3~0.6% 씩 평균적인 세포 손실이

일생동안 일어난다.^{3,4} 그리고 사고, 수술적 외상, 스트레스, 당뇨병, 녹내장 치료, 각막내피세포 장애 등은 세포의 손실을 일반적인 속도보다 더 빠르게 진행시킨다.³ 각막 내피세포의 극심한 손실은 기능 손상을 야기하며, 심한 경우 실명으로 이어지게 된다. 현재, 손상된 각막 내피세포를 복원할 수 있는 유일한 방법은 외과적 이식수술이지만 이식수술을 위한 기증 각막의 수는 전 세계적으로 제한적이기 때문에 현실적인 문제에 직면해 있다.⁵ 전 세계적으로, 이 문제를 극복하기 위해 생체적합성과 생분해성을 가진 적절한 생체재료를 이용하여 각막 내피세포를 전달할 수 있는 지지체를 제작하고, *in vitro*

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

와 *in vivo* 연구를 통해서 그 가능성을 타진하는 실험들이 진행되고 있으며,⁶⁻⁸ 이미 이식 가능한 조직공학적 각막을 제작하기 위해 실크, 젤라틴, 콜라겐, 탈세포화된 스트로마, 데스메막, 양막 등 다양한 지지체와 세포시트를 많은 연구자들이 제시하였으며,⁹⁻¹⁶ 조직공학적으로 각막을 제작 및 재현하고자 하는 연구들이 여전히 활발히 진행되고 있다.

이식 가능한 이상적인 각막 내피세포 지지체는 독성이 없어야 하며, 생체적합해야 하고, 생분해되어야 하며, 적절한 기계적 강도를 가져야 한다. 특히, 제작된 지지체는 투명해야 하며 수분의 유동이 쉽게 되어야 한다.¹¹ 또한 이식했을 때 주변 조직과도 잘 융합이 되어 이식된 각막 내피세포가 제대로 기능을 할 수 있도록 도와주어야 한다.

락타이드 글리콜라이드 공중합체(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)는 생체적합적이고 생분해성이며, 분해시간을 조절할 수 있다. 그리고 적절한 기계적 특성을 가지고 있으며,¹⁷ 필름으로 제작했을 때 투명하다는¹⁸ 장점이 있어, 본 연구에서는 각막 내피세포의 지지체 재료로 사용하기 위해 미국 식약청의 승인을 받은 고분자들 중 하나로 PLGA를 선택하였다.

각막 내피세포는 기저막인 데스메막 위에 놓여있다. 데스메막은 구조적으로 구별되며, 파이버넥틴, 라미닌, 콜라겐 타입 IV, 콜라겐 타입 VIII, 그리고 황산 헤파린, 황산 케라틴, 황산 데르마탄 등을 포함한 단백당들로 구성되어 있다.³ 데스메막의 이러한 세포의 기질들은 세포의 부착, 증식 및 이동에 영향을 미친다. 인공 기질에 부착 인자들을 적용한 지지체를 동물 모델에 적용한 Engler 등의 연구는 이러한 인자들이 없이 이식된 인공 기질보다 더 좋은 결과를 얻었다고 보고하였으며,¹⁹ 이와 관련된 많은 연구들이 진행되어 오고 있다.^{6,20,21}

따라서 본 실험에서는 PLGA를 이용하여 필름형태의 투명한 지지체를 제작하여 각막 내피세포 전달체로 사용하고 싶어 하였으며, 각막 내피세포의 성장거동을 위한 환경을 조성하기 위해 각막 내피세포의 성장 및 증식에 영향을 줄 것이라 기대되는 다양한 세포의 기질(콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 IV, 파이버넥틴, 라미닌, FNC 코팅 믹스[®])을 PLGA 필름에 코팅하여^{6,20-22} 적용한 후, 세포 형태, 세포 부착 및 증식, 특히 유전자 및 단백질 발현을 관찰하였다. 이 실험을 통해, PLGA 필름 상에서 배양된 각막 내피세포의 성장거동에 세포의 기질이 미치는 영향을 확인함으로써, *in vitro*에서 PLGA 필름의 이식 지지체로서의 가능성을 제안하고, 각막 내피세포의 *in vitro* 배양 환경조성을 위한 적합한 세포의 기질 조건을 제시하고자 하였다.

실 험

PLGA 필름 제작 및 세포의 기질 코팅. PLGA 필름은 용매 증발법을 이용하여 제조하였다. PLGA 0.3 g을 6 mL의 메

틸렌클로라이드에 넣어 용해시켜 5 w/v%의 PLGA 용액을 만든 후, 50 mm 디쉬에 부어 PLGA 필름을 제작하였다. 콜라겐 타입 I(Col I, BD Biosciences, USA)과 타입 IV(Col IV, Sigma, USA)를 각각 0.2 N 아세트산과 10 mM 아세트산으로 각각 5, 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 희석시켜 PLGA 필름 위에 부은 후 실온에서 1시간 동안 UV하에서 코팅하였다. 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 파이버넥틴(Fibronectin, FN, Santa cruz biotechnology, USA)과 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 라미닌(Laminin, LM, BD Biosciences, USA)은 각각 1 X PBS와 무혈청배지로 희석하여 실온에서 1시간 동안 UV하에서 코팅하였다. 0.2 mL/cm²의 FNC 코팅 믹스[®](FNC coating mix[®], FNC, a mixture of bovine serum albumin, COL I and FN, Athena Enzyme SystemsTM, USA)를 PLGA 필름 위에 부은 후 실온에서 30초 동안 코팅하였다. FNC 코팅 필름을 제외한 모든 세포의 기질이 코팅된 필름은 세포를 파종하기 전에 1 X PBS로 여러 번 조심스럽게 세척하여 준비하였다.

토끼 각막 내피세포의 분리 및 배양. 토끼 각막 내피세포는 4주된 뉴질랜드 흰 토끼의 안구에서 각막을 분리하여 사용하였다. 해부현미경 하에서 각막 내피세포가 놓인 각막의 안쪽의 데스메막을 조심스럽게 벗겨낸 후, 0.2% 콜라게네이즈 A(collagenase A) (Roche, Switzerland) 용액을 처리하여 데스메막으로부터 각막 내피세포를 분리한다.¹⁸ 분리한 각막 내피세포를 배양하기 위해 Endothelial cell growth media-2 (EGM-2, Lonza, USA)를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. EGM-2는 격일로 교체하였으며, 실험을 위해 passage 1 상태의 세포를 사용하였다.

세포의 부착 및 형태 관찰. PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에서 토끼 각막 내피세포의 부착 및 형태를 알아보기 위하여, 토끼 각막 내피세포는 밀도 200 cells/mm²로 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅되지 않은 PLGA 필름에 파종하여 세포가 가득 찰 때까지 배양하였으며, 배양된 세포는 광학 현미경(Eclipse TE 2000-U, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

세포 증식을 분석. PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에서의 토끼 각막 내피세포의 증식을 알아보기 위하여 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 청자색으로 발색되는 비수용성의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA)를 통해 확인하였다. PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에 토끼 각막 내피세포를 200 cells/mm² 밀도로 파종하고 1, 3, 그리고 5일 동안 배양하였다. 오래된 배양액은 제거하고 새 배양액을 1 mL씩 넣어준 후, MTT 시약(50 mg/mL)을 100 μL 씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고 각 웰에 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma, USA)를 1 mL씩 넣어 포마잔을 녹여낸 후, 그 용액을 96 웰에 100 μL 씩 분주한 후, 570 nm의 파장에서 마이크로플레이트

(SynergyMx™, BioTek, USA)를 통해 흡광도를 측정하였다 (n=3).

세포밀도 분석. 면적 mm² 당 세포밀도를 측정하기 위해서 PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에 토끼 각막 내피세포를 파종한 후, 세포가 꼭 찰 때까지 배양한다. 세포가 꼭 찼을 때 10%의 포르말린으로 20분 동안 고정한 뒤 1 X PBS로 세척하고 UltraCruz™ Mounting Medium (Santa Cruz, USA)를 이용하여 핵을 염색하였다. 염색된 핵은 형광현미경(Eclipse TE 2000-U, Nikon, Japan)을 통해 관찰되었으며, 얻은 이미지는 Image J 프로그램을 통해 세포수를 세어 밀도를 계산하였다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 각막 내피세포 관련 유전자의 발현 정도를 확인하고자 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다. 각 필름에 토끼 각막 내피세포를 파종하여 배양한 후, 세포가 가득 찼을 때 Trizol(Invitrogen, USA)과 클로로포름(Sigma, USA)을 사용하여, 4 °C, 12000 rpm 조건에서 15분 동안 원심 분리하여 얻은 상층액에 아이소프로판올(Sigma, USA)을 처리한 후 하루 동안 보관하였다. 이 후, 원심 분리하여 RNA 펠렛을 수확하였으며, 수확한 RNA 펠렛은 RNase-DNase free water(Gibco, USA)에 녹여 준비하였다. Reader Flatform Infinite 200 NanoQuant(Tecan, Switzerland)를 사용하여 추출한 mRNA를 정량한 후, TOPscript™ One-step RT PCR DryMix(+Dye) (Enzynomics, Korea)와 프라이머, 아쿠아포린 1(Aquaporin-1 (AQP 1)), 나트륨 펌프(Na⁺/K⁺-ATPase (NaK)), 염화물 채널 단백질(chloride channel protein 3(CLCN 3)), 전압 독립적 음이온 선택성 채널 2(voltage-dependent anion-selective channel 2(VDAC 2)), 전압 독립적 음이온 선택성 채널 3(voltage-dependent anion-selective channel 3(VDAC 3))를 사용하여 각막 내피세포 관련 유전자를 증폭하였다. 프라이머 염기서열 조건은 Table 1에 나타내었다. RT-PCR로 증폭된 유전자를 1.5 w/v% 아가로스 겔(Sigma, USA)에 100 V, 30분 조건으로 전기영동을 한 후, Flourescent® HD2(Alpha Innotech, San Leandro, USA)로

이미지를 얻었다. 얻은 이미지는 Image J 프로그램을 이용하여 베타 액틴(β-actin)에 대한 상대적 정량 값을 얻어 그래프로 나타내었다.

면역형광염색. PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에서 배양한 토끼 각막 내피세포의 기능 발현과 관련된 Na⁺/K⁺-ATPase와 Zonula occludens-1(ZO-1)의 발현을 확인하기 위해 면역형광염색을 수행하였다. PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에 토끼 각막 내피세포를 100 cells/mm² 밀도로 파종하여 배양한 후, 세포가 가득 찼을 때, 1 X PBS로 세척하고 10% 중성 포르말린으로 20분 동안 고정한 후 다시 1 X PBS로 세척하여 샘플을 준비했다. 1차 항체로 anti-rabbit Na⁺/K⁺-ATPase(1:150, Santa Cruz Biotechnology, USA)과 anti-mouse ZO-1(1:150, Invitrogen, USA)를 사용하여 4 °C에서 하루 동안 반응시킨 후, 2차 항체로 donkey anti-mouse/rabbit IgG-FITC(1:300, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였다. 그 후, UltraCruz™ Mounting Medium (Santa Cruz, USA)으로 핵을 염색한 후 형광현미경(Eclipse TE 2000-U, Nikon, Japan)을 통해 관찰하였다.

통계적 분석. 각 실험군들의 평균값과 표준편차를 확인하였으며, 통계학적인 분석을 위해 Student's t-test를 수행하였다.

결과 및 토론

세포 부착 및 형태 관찰. 코팅한 세포의 기질에 따른 토끼

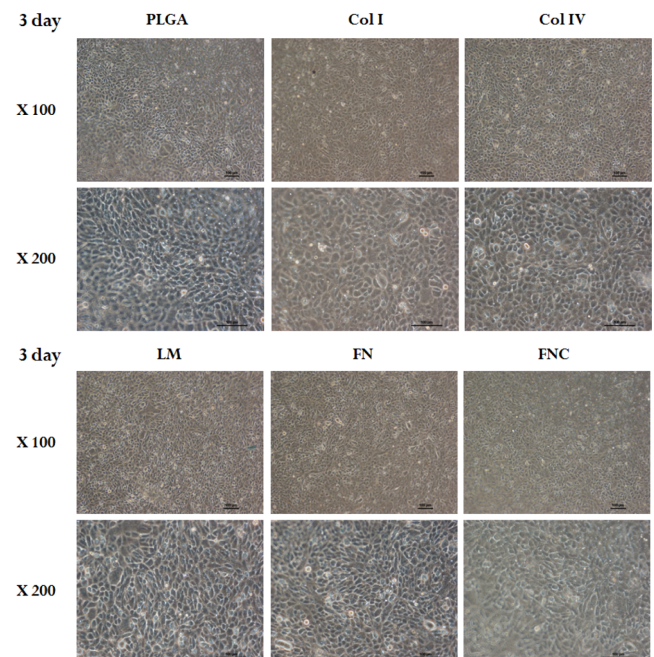


Figure 1. Morphology of rabbit corneal endothelial cells (rCEncs) on Col I, Col IV, LM, FN, FNC coated PLGA films and no coated PLGA film at 3 days after seeding (Magnification; ×100, ×200).

Table 1. Sequences of Primers

Gene	T _m (°C)	Sequences
AQP 1	61.4	F: TGCCACAGCCAGTGTAGTCG R: ACCTCGTCCCTGACCCTGAA
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	57.3	F: CTCTGTAAACAGGGCGGTTT R: ATTGGCGTTGAGGTTCTAT
CLCN 3	54.5	F: GCCTTAGTGCGTTATGGTAA R: CAGCTGATAGCACCTCCCTT
VDAC 2	57.3	F: GCAGTGGTGTGGAAATTCTCA R: TAGTGTGTAGCTGGAAGTCC
VDAC 3	57.3	F: ACAGGAAAAGCGTCAGGCAA R: TCAAAAAGCCAACACAGCCCA

각막 내피세포의 부착 및 세포 형태는 세포 파종 후 3일째 광학현미경을 통해 관찰되었다.

Figure 1은 파종 후 3일째, 가득 찬 세포의 부착과 세포형태를 보여준다. 이상적인 각막 내피세포는 *in vivo*에서 육각형의 세포 형태를 유지한다.³ 각 조건에서, 파종되어 증식한 각막 내피세포를 현미경으로 관찰한 결과, 토끼 각막내피세포가 잘 부착하여 증식하였으며, PLGA 필름과 Col I, Col IV, LM, FN, FNC가 코팅된 PLGA 필름에서 다각형의 세포 형태를 유지하는 것을 확인하였다. 하지만, 실험군 사이에서 각막 내피세포의 형태 차이에는 큰 유의성이 없음을 관찰하였다(Figure 1).²⁰

세포증식을 분석. MTT 분석을 통하여 PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름 표면에서 각막 내피세포의 증식률을 파종 후 1일, 3일, 그리고 5일째에 관찰하였고 그 결과를 Figure 2에 나타내었다.

그래프를 통해 시간이 경과할수록 세포가 5일째까지 꾸준히 증식한 것을 확인하였다(Figure 2). 하지만, 파종 후 5일째, 세포의 기질을 처리하지 않은 군보다 세포의 기질을 코팅한 군에서 잘 증식하였으며 (FNC 코팅군 제외), 세포 증식 정도는 PLGA 필름에 Col I, Col IV, LM, FN이 코팅된 조건 순이었다. 통계학적 분석을 통해, Col IV, LM, FN 코팅 조건 간 유의한 차이를 확인할 수 없었으나, Col I 코팅군과 코팅되지 않은 PLGA 필름($p<0.01$), Col I 코팅군과 Col IV, LM, FN이 코팅군($p<0.001$)에서 각각 각막 내피세포 증식률을 비교하였을 때는 유의성이 있음을 확인하였다(파종 후 5일째). 이 결과를 통해, 콜라겐 타입 I가 각막 내피세포의 증식에 대한 긍정적인 효과를 확인하였으며, 각막 내피세포를 *in vitro*에서 배양할 경우, 유리한 환경 조건으로 적용할 수 있을 것이라 제안한다.²⁰

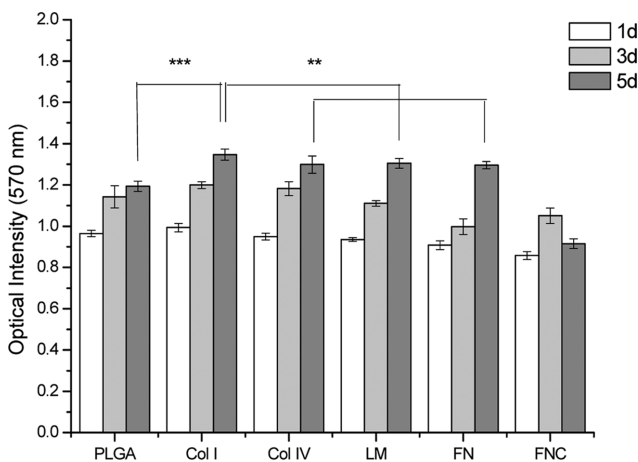


Figure 2. Proliferation of rCEncs (A) on PLGA, Col I, Col IV, FN, FNC, LM coated PLGA films at 1, 3, and 5 days after seeding (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

세포밀도 분석. 세포의 기질과 각막 내피세포의 밀도의 관계를 확인하기 위해 세포의 기질이 코팅되지 않은 PLGA 필름과 세포의 기질이 코팅된 PLGA 필름에서 토끼 각막 내피세포가 가득 찼을 때의 밀도를 확인하였으며, 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 배양 후 세포가 가득 찼을 때 밀도를 단위 면적(mm^2) 당 세포 수를 세어 각 코팅된 세포의 기질에 따른 영향을 확인하였다. Figure 3에서 확인할 수 있듯이 세포가 가득 찼을 때 밀도는 $1500\sim2200\text{ cells/mm}^2$ 이었으며, 또한 Col IV와 FNC가 코팅된 PLGA 필름에서 세포밀도가 높게 유지됨을 확인하였다. 성인의 평균 세포밀도는 평균 2000 cell/mm^2 정도이고, 펌프기능을 유지할 수 있는 최소한의 밀도는 500 cells/mm^2 이다.³ Armitage 등은 $1500\sim3500\text{ cells/mm}^2$ 의 밀도로 이식하였을 때, 이식 후 120개월 이상 480개월 이후까지 최소 기능 유지를 위한 밀도가 유지되고 있다는 실험결과를 보고하였으며, 그 중 약 2000 cells/mm^2 의 밀도로 세포를 이식했을 때 240개월 이상 최소 각막 내피세포 밀도가 유지되고 있음을 보여주었다.²³ 따라서 실험을 통해 얻은 밀도 분석 결과는 실험에 적용된 세포의 기질들이 각막 내피세포 증식에 있어 적합한 환경 조건이 될 수 있을것이라 보여진다.^{9,19,23,24}

mRNA 분리 및 RT-PCR. 세포의 기질이 세포 부착과 증식, 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고자 Col I, Col IV, FN, LM, FNC가 각각 코팅된 PLGA 필름에 세포를 파종한 후 세포가 가득 찼을 때 RNA를 분리하였다. 각막 내피세포에서 발견되는 AQP 1, $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$, CLCN 3, VDAC 2, VDAC 3의 발현 정도를 확인하여 하중 유전자(housekeeping gene)인 $\beta\text{-actin}$ 으로 표준화하여 그래프를 얻었다(Figure 4). AQP 1은 선택적으로 물 분자의 출입을 유도함으로써 물 분자의 투과성을 증가시키는 기능을 하며, CLCN 3은 다양한 주요 생리현상과 pH 조절, 유기물 수송, 세포 이동, 세포 증식과 분화 등 세포간 역할을 한다. 특히 세포막에 관련하여 적절한 세포 크기를 유지하는 중요한 역할을 한다.²⁵ $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 의 활성으로 기질의 부종을 조절하여 각막의 투명도를 유지하는데 역할을 하며,³ VDAC 2와 3를 통해 세포간 단

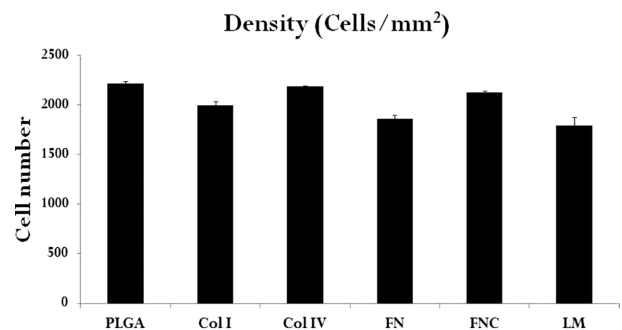


Figure 3. Confluent rCEncs on each conditions has the density (cells/ mm^2) between $1500\sim2200\text{ cells/mm}^2$.

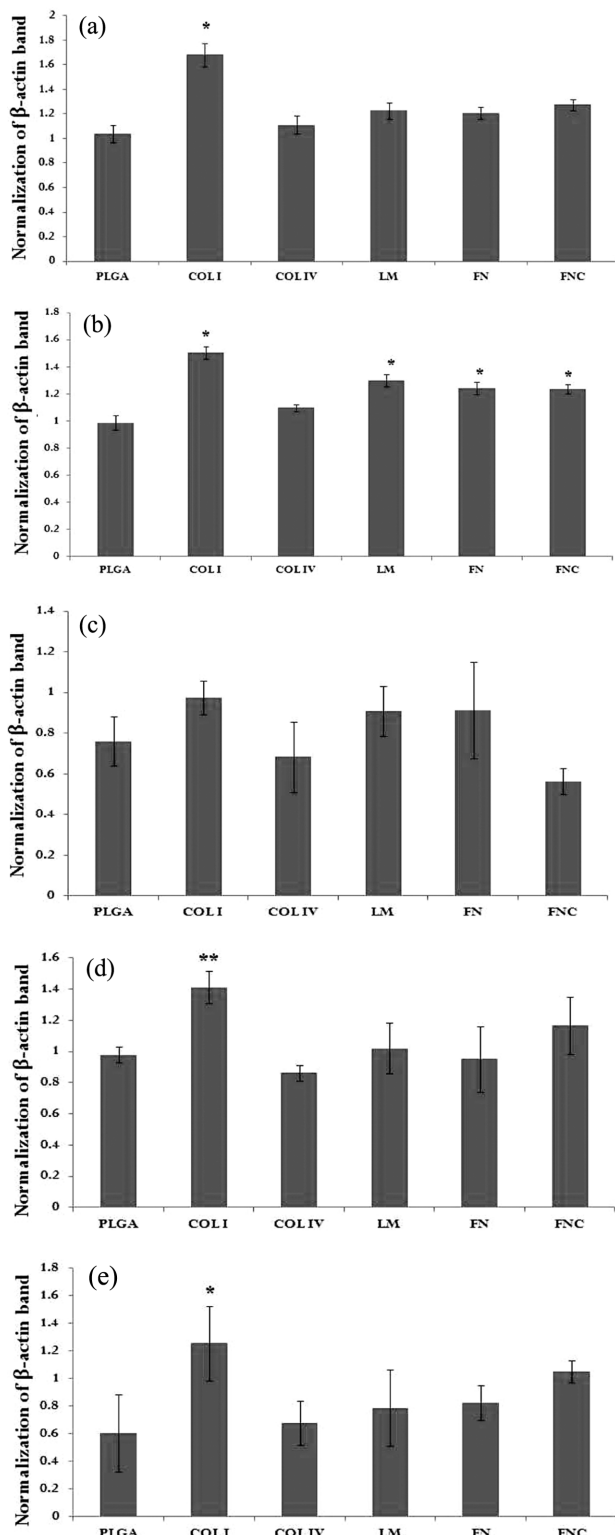


Figure 4. Normalization result by β -actin for AQP 1, Na^+/K^+ -ATPase, VDAC 3, VDAC 2, and CLCN 3 expression in rCenCs cultured in no coated PLGA film and Col I, Col IV, FN, LM, and FNC coated PLGA films (a) AQP 1; (b) Na^+/K^+ -ATPase; (c) VDAC 3; (d) VDAC 2; (e) CLCN 3 (* p <0.05, ** p <0.01).

백질과 소분자들의 상호작용을 조절해준다.²⁶ 각막 내피세포에서 기능성 유전자들을 각 군에서 얻어 확인함으로써, 각막 내피세포의 증식 및 유지에 유리한 조건을 확인하였다. Figure 4는 각 군에서 얻은 관련 유전자들의 표준 발현율을 나타내며, 특히 Col I을 코팅한 군에서 관련 유전자들의 발현이 높음을 관찰하였다. RT-PCR 결과 세포의 기질이 코팅된 환경에서 배양된 세포에서 얻은 유전자의 발현이 유의성 있음을 확인함으로써 다양한 세포의 기질들이 *in vitro*에서 각막 내피세포의 특이 성질들이 잘 유지될 수 있는 조건으로 유용할 수 있을 것이라 사료한다.²⁰

면역형광염색. 각막 내피세포는 밀착연접과 관련이 있는 필수 막 단백질인 occludin과 ZO-1을 포함하고 있다.^{3,27,28} 이 연접을 통해 세포간 상호작용을 확인할 수 있으며, 각막 내피세포의 특이 세포형태를 확인할 수 있다. 또한 각막 내피세포는 세포막에 위치하는 ATPase “이온 펌프”를 통해서 기질의 수분을 조절한다.^{2,3} ZO-1과 Na^+/K^+ -ATPase 등을 통해 장벽과 펌프 기능 모두 유지되고 있으며, 이러한 기능은 각막의 투명성 유지에 매우 필수적이다.³ Figure 5는 각막 내피세포의 기능 발현 및 유지와 관련된 필수 막 단백질인 ZO-1과 Na^+/K^+ -ATPase를 면역형광염색을 통해 확인한 결과이다. 면역형광염색 결과, 모든 군에서 배양된 각막 내피세포에서 ZO-1과 Na^+/K^+ -ATPase가 잘 발현하였으나(LM 결과 없음) 조건

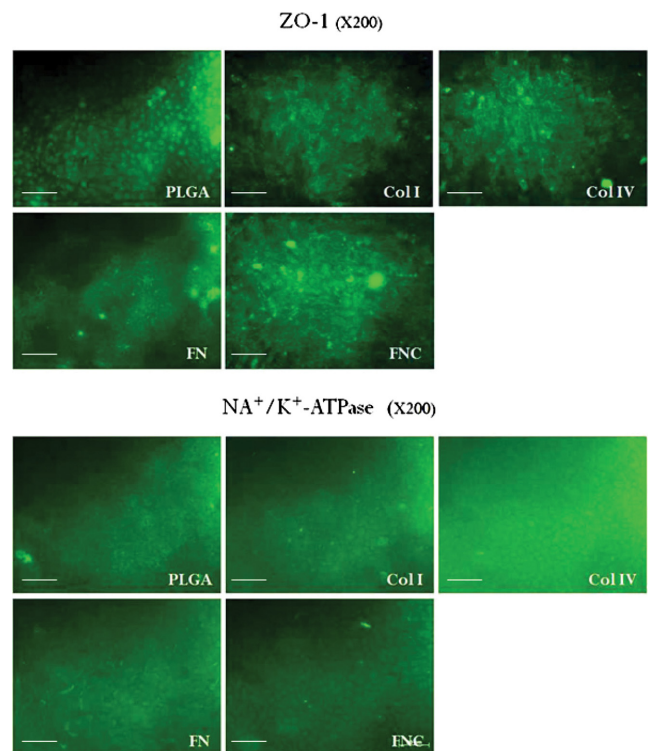


Figure 5. Expression on ZO-1 and Na^+/K^+ -ATPase in rCenCs on no coated PLGA film and Col I, Col IV, FN, and FNC coated PLGA films (Magnification; $\times 200$, Scale bar=100 μm).

간 ZO-1과 Na^+/K^+ -ATPase 발현에 있어 큰 유의성은 없었다. ZO-1과 Na^+/K^+ -ATPase의 발현을 확인함으로써, PLGA 필름과 세포의 기질로 코팅된 투명지지체에서 배양된 각막 내피세포가 *in vitro*에서 잘 성장·유지되고 있으며, 이 실험에서 적용된 세포의 기질들은 각막 내피세포의 *in vitro* 배양 환경을 위한 조건들로 적용할 수 있으리라 기대한다.

결 론

각막 이식에 필요한 세포 전달체로서, 미국 식약청의 허가를 받은 PLGA를 이용하여 필름 형태의 투명한 지지체를 제작하였으며, 세포의 성장에 영향을 미치는 기저막 성분인 다양한 세포의 기질을 적용하여 각막 내피세포의 증식 거동을 확인하고 이식 시 요구되는 세포의 밀도 및 기능 발현을 확인하였다. 본 연구에서 제작된 PLGA-세포의 기질-각막 내피세포 각막 이식체가 이식에 적용되기 위해서는 각막 이식체로서 요구되는 투과성, 투명성, 적절한 인장강도 등과 같은 특성들에 대한 연구가 필요함은 분명하나, 이 실험을 통해 PLGA 필름과 세포의 기질 코팅 PLGA 필름에 배양한 토끼 각막 내피세포 증식 거동을 확인함으로써, PLGA 필름을 각막 내피세포 전달체로서 사용할 수 있으며, 또한 적용된 세포의 기질들이 *in vitro*에서 각막 내피세포의 행동거동을 유지할 수 있는 환경 조건으로써 적용할 수 있을 것이라 제안하며, 본 연구를 통해 제작된 각막 이식체가 인공 각막 대체 물으로써 기능할 수 있을 것이라 기대한다.

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단 바이오, 의료기술개발사업(NRF-2012M3A9C6050204), BIN 고분자소재연구소, 그리고 한국연구재단 BK21플러스 사업의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. J. Tuft and D. J. Coster, *Eye*, **4**, 389 (1990).
2. N. C. Joyce, *Exp. Eye Res.*, **81**, 629 (2005).
3. N. C. Joyce, *Prog. Retin. Eye Res.*, **22**, 359 (2003).
4. J. Hollingsworth, I. Perez-Gomez, H. A. Mutalib, and N. Efron, *Optom. Vis. Sci.*, **78**, 706 (2001).
5. A. L. Sabater, A. Guarnieri, E. M. Espana, W. Li, F. Prósper, and J. Moreno-Montañés, *Regen. Med.*, **8**, 183 (2013).
6. G. Basky, *JAMC*, **162**, 558 (2000).
7. P. Fagerholm, N. S. Lagali, K. Merrett, W. B. Jackson, R. Munger, Y. Liu, J. W. Polarek, M. Söderqvist, and M. Griffith, *Sci. Transl. Med.*, **2**, 46 (2010).
8. Y. Liang, W. Liu, B. Han, C. Yang, Q. Ma, W. Zhao, M. Rong, and H. Li, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **22**, 175 (2010).
9. P. W. Madden, J. N. Lai, K. A. George, T. Giovenco, D. G. Harkin, and T. V. Chirila, *Biomaterials*, **32**, 4076 (2011).
10. Y. Ishino, Y. Sano, T. Nakamura, C. J. Connon, H. Rigby, N. J. Fullwood, and S. Kinoshita, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 800 (2004).
11. J. S. Choi, J. K. Williams, M. Greven, K. A. Walter, P. W. Laber, G. Khang, and S. Soker, *Biomaterials*, **31**, 6738 (2010).
12. C. K. Joo, W. R. Green, J. S. Pepose, and T. P. Fleming, *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **238**, 174 (2000).
13. S. Amano, *Cornea*, **22**, S66-74 (2003).
14. S. Yamagami, T. Mimura, S. Yokoo, T. Takato, and S. Amano, *Cornea*, **25**, S90-92 (2006).
15. M. Egami, Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, and T. Okano, *Arch. Pharm. Res.*, **37**, 96 (2014).
16. E. Y. Kim, J. E. Song, C. H. Park, C. K. Joo, and G. Khang, *Inflamm. Regen.*, **34**, 4 (2014).
17. K. M. Hirenkumar and S. J. Siegel, *Polymers*, **3**, 1377 (2011).
18. J. H. Lee, E. Y. Kim, C. J. Lee, C. K. Joo, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.*, **4**, 53 (2013).
19. C. Engler, C. Kelliher, C. L. Speck, and A. S. Jun, *Cornea*, **28**, 1050 (2009).
20. J. S. Choi, E. Y. Kim, M. J. Kim, M. Giegengack, F. A. Khan, G. Khang, and S. Soker, *Biomed. Mater.*, **8**, 014108 (2013).
21. M. Yamaguchi, N. Ebihara, N. Shima, M. Kimoto, T. Funaki, S. Yokoo, A. Murakami, and S. Yamagami, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**, 679 (2011).
22. A. Yamamoto and Y. Tabata, *Int. J. Tissue Regen.*, **4**, 36 (2013).
23. W. J. Armitage, A. D. Dick, and W. M. Bourne, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 3326 (2003).
24. M. Yamamoto and Y. Tabata, *Int. J. Tissue Regen.*, **4**, 29 (2013).
25. M. Suzuki, T. Morita, and T. Iwamoto, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 12 (2006).
26. M. J. Sampson, R. S. Lovell, D. B. Davison, and W. J. Craigen, *Genomics*, **36**, 192 (1996).
27. K. M. McCarthy, I. B. Skare, M. C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, R. D. Lynch, and E. E. Schneeberger, *J. Cell. Sci.*, **109**, 2287 (1996).
28. N. C. Joyce, D. L. Harris, and J. D. Zieske, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 2572 (1998).