

가교가 사람탯줄추출 교원섬유의 물성에 미치는 영향

°안 수진*, 이 하규*, 서 활**

*성심여자대학교 대학원 생물학과, **서울대학교 의공학연구소

Cross Link Effects on the Physical Properties of the Collagen purified from Human umbilical cords

Sue-Jin AHN*, Ha-Kyu LEE*, Hwal SUH**

* Department of Biology, The Graduate School, Songsim University

**Institute of Biomedical Engineering, Seoul National University

서 론

교원섬유는 신체조직의 구조를 형성하는 단백질로써 척추동물의 모든 조직에서는 조직의 형태를 유지하는 기능을 하는 자연단백질이며, 교원섬유분자에 존재하는 RGD (Arginine - Glycine - Aspartic acid) 펩타이드 배열은 세포접착성 기능을 가지고 있기때문에 조직내에서 세포는 교원섬유에 부착된 상태로 성장한다. 교원섬유는 분자의 양쪽 말단에 존재하는 텔로펩타이드들에 의해 고도의 민감한 면역반응이 나타나고 그 면역반응은 텔로펩타이드들의 제거에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다. 이 텔로펩타이드들이 제거된 교원섬유들을 atelocollagen이라 부른다.

본 연구는 교원섬유를 체내이식용 생체재료로서 사용하기 위하여 면역원이 비교적 적은 배의 교원섬유를 이용 하려는 목적으로 사람탯줄로부터 추출되어진 교원섬유를 인공적으로 가교화(cross link)한 다음, 물리적 성질을 조사하는 데 그 목적이 있다.

실험재료 및 방법

<1>교원섬유 준비

사람탯줄 절편들을 75% 에탄올에 24시간 침적한 후, 증류수로 24시간 씻어 낸 다음, 그 절편들을 분쇄기로 갈아서 0.5M 초산나트륨용액에 16시간동안 넣어 반응시키고, 그 상층액을 원심분리하여 젖은 침전물을 0.5M 초산용액에 넣었다. 초산용액 10ml마다 3mg의 펩신 (1:10,000, 520unit/mg, P-7000, Sigma Co., St.Louis, MO, U.S.A.)을 첨가하여 16시간동안 반응 시키고 이것을 27,000xg로 원심분리하여 얻은 침전물을 1.0M 염화나트륨용액에 24시간동안 반응시킨 후, 원심분리시키고 그 침전물을 0.05M Tris buffer용액을 함유하고 있는 2M 염화 나트륨용액에 용해시켰다. 그 용액을 다시 분리하고, 그 상층액을 pH 7.5 ± 1로 조절된 4.5M 염화나트륨 용액과 섞은 상태에서 원심분리 한 후에, 그 침전물을 pH 7.5 ± 1 의 0.7M 염화나트륨용액에 포함된 0.1N 초산용액에

24시간동안 용해시키고, 그 용액을 원심분리하여 Type I atelocollagen 침전물을 추출하였다. 모든 과정들은 4°C 에서 수행되어졌다.

<2>교원섬유의 가교화

0.001N 염산용액에 <1>의 방법으로 추출한 Type I atelocollagen 을 용해시켜 1%, 2%, 3%, 4% 및 5% 교원질용액을 준비한 다음 0.05N 수산화나트륨을 가하여 pH 7.4 로 조절하였다. 교원질용액을 0.25(높이)x10(폭)x50(길이)mm 의 유리로 제작한 주형에 넣은 다음, 한 실험군은 0.5%, 15%, 10%, 20%, 30%의 글루타르알데히드용액을 가하여 가교화한 다음 에탄올로 세정 처리하고, 다른 실험군은 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간동안 254nm파장의 자외선(UV ray)를 조사하여 가교화 하였다.

2일간 25°C에서 건조한 후에 가교가 형성된 것과, 형성되지 않은 교원섬유sheet의 인장강도들을 인장강도 측정기 (INSTRON MODEL 8511, Instron Crop., U.S.A.)로 측정하여 비교하였다. 그 실험 데이터들을 가지고 두가지 방법을 비교, ANOVA 방법으로 통계처리하였다. 각각의 실험군은 4개씩의 시편들을 사용하였다.

<3>교원섬유분해(Collagenolysis)측정

가교결합된 교원섬유의 분해정도를 알아보기 위하여 Neuman & Logan의 히드록시프롤린분석법을 응용하였다. 사람탯줄로부터 추출한 1% Type I 교원섬유용액을 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%의 글루타르알데히드 용액으로 처리하여 화학적 가교를 형성한 실험군과 자외선을 15 분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 동안 조사하여 가교를 형성한 실험군을 비교 조사하였다. 각각의 군은 4개의 시편을 사용 하였으며, Bovine 피부의 Type I 교원섬유 (C3511, Sigma chemical Co., St.Louis, MO, U.S.A.) 을 대조군으로 사용하였다. 2ml의 용액표본을 10, 20, 30, 40, 50unit/ml 의 교원섬유분해효소를 포함하는 10ml의 0.05N H₂NC (CH₂OH)₃ [tris (hydroxymethyl)amino methane] 용액에 넣고 5, 10, 15, 30, 60 분동안 37°C에서 배양한 후에 1ml의 에탄올을 넣어 교원섬유분해작용을 정지시켰다. 상층액 1ml를 실험 대

상용액으로 사용하여 6N 염산 0.2ml를 첨가한 후 24시간 동안 110°C에서 가수분해하였다. 실험 대상용액에는 교원섬유분해효소에 의해 용해된 교원섬유로부터 용출된 히드록시프롤린을 포함하고 있으며, 그 양을 560nm에서 UV spectrometer (UV-150-02, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) 를 사용하여 분석하였다. 표준시약으로 20 μ g/ml의 히드록시프롤린을 선택하였다.

결과 및 고찰

사람탯줄로부터 Type I교원섬유를 추출하는 방법은 Niyibizi등에 의해 발표된 방법을 응용하였다. 교원섬유는 포유동물에 함유된 전체단백질의 30%를 차지하며, 지금까지 type I 에서 type XI까지 10종류 이상 분리되었다. 교원섬유는 섬유상단백질 로써 3개의 폴리펩타이드사슬(α -사슬)들이 결합하여 교원섬유분자형성에 관여한다. 각각의 α -사슬은 길이가 대략 3,000Å이며 1,000개의 아미노산으로 되어있고, 교원섬유분자의 분자량은 약 360,000이며, α -사슬의 분자량은 약 120,000이다.

유전적으로 다른 특징이 있는 각각의 사슬들은 아미노산의 구성과 서열은 다르지만, 글라이신이 아미노산의 서열에서 매 세번째마다 위치하고 있다는 점에서 동일하다. 각각의 α -사슬은 전체길이의 96%가 아미노산이 나선형으로 배열되어있으며 나머지 비나선형인 텔로펩타이드들은 N말단과 C말단에 존재한다. 이들 텔로펩타이드들은 각각 선형의 아미노산사슬로 형성되어 있으며, 항원성은 이 부위에서 나타난다. 3 개의 α -사슬의 조합형태가 교원섬유분자들의 type을 결정하며, 교원섬유는 사슬들의 선형domain들만 절단하는 교원섬유분해효소에 의해 분해되어진다. 교원섬유는 섬유아세포내에서 생산되어 세포외로 배출되어 세포외로써 세포의 부착과 성장을 위해 좋은 환경을 제공한다. 펩신은 교원섬유중 텔로펩타이드부분을 끊어주며, 텔로펩타이드가 제거된 교원섬유를 항원성이 없는 것으로 알려진 atelocollagen으로 불린다.

본 실험에서 자외선을 조사하여 가교화한 교원섬유실험군은 조사되지 않은 실험군보다 높은 인장강도를 나타냈으며, 이는 분자간 결합이 형성된 결과로 사료된다. 교원섬유의 인공가교화의 방법으로는 글루타르알데히드, 에폭시 등과 같은 화학물질 및 감마선, 자외선 등과 같은 광에너지의 사용이 효과적인 것으로 발표되었으며, 상기 방법으로 인공적으로 가교화한 교원섬유는 본래의 생물화학적 성질에 영향을 주지 않으면서 교원섬유간의 가교만을 형성시키는 것으로 알려져 왔다. 글루타르알데히드와 자외선이 교원섬유가 교화에 미치는 물리적 효과를 인장강도 측정으로 조사하였다. 글루타르알데히드로 가교 형성된 실험군은 강도의 면에서 자외선으로 가교 형성된 것 보다 높은 인장강도를 나타내었다. 그러나, 조직내에 이식하였을 경우, 체액등과 반응하여 용출되는 알데히드 잔여기에 의한 생체위해성 때문에 자외선조사 방법이

더 유리할 것으로 사료되며, 본 실험에서는 자외선으로 4시간동안 조사한 실험군과 20%의 글루타르알데히드 처리한 실험군의 인장강도가 유사한것으로 나타났다.

히드록시프롤린은 교원섬유의 α -사슬에서 존재하는 전형적인 아미노산으로써, Neuman & Loagn's assay 는 교원섬유분해효소에 의한 교원섬유용해 동안 히드록시프롤린의 배출 되어지는 양을 결정하는 효과적인 방법으로 잘 알려져왔다.

본 연구에서 교원섬유용해도는 가교화정도가 증가할 수록 감소되는 것으로 나타났으며, 60분이상의 자외선 조사는 교원섬유용해 억제에 효과적인 방법으로 사료된다. Bovine 피부의 Type I 교원섬유(표준시약)과 사람탯 줄로부터 추출한 Type I 교원섬유 실험군 사이의 단백질용해정도는 유사하였다.

결론

- 1> 자외선조사는 교원섬유의 가교형성의 증가를 조절할 수 있는 효과적인 방법이다.
- 2> 인장강도와 교원섬유분해효소에 대한 교원섬유의 저항 정도는 가교화정도를 증가시킬수록 함께 증가되어진다.
- 3> 4시간이상의 자외선 조사는 교원섬유의 생물학적성질에는 영향을 미치지 않으면서 인장강도를 높일 수 있는 효과적인 방법이다.

참고문헌

1. Ohno M.: Ideal biomaterial - Embryonic collagen. Proceedings, The 25th International Biomaterials Symposium. p48, Birmingham, AL, April, 1993.
2. Niyibizi C, Fietzek PP, van der Rest M.: Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$ collagen molecule. J Biol Chem, 259 : 14170-14174, 1984.
3. Suh H : Method of type I collagen purification from human umbilical cord. Pat pend 94-9735, Korea Patent Bureau. 1994.
4. Nimni ME, Cheung D, Strates B, Kodama M, Sheikh K : biomaterial for tissue replacement. J Biomed Mater Res, 21 :741-771, 1987.

