

신경세포의 Outgrowth 향상을 위한 마이크로 파이버 지지체와 전단응력의 영향

김인애^{**}, 박수아⁺, 김영직^{**}, 김수향⁺, 신호준⁺, 이용재⁺, 신지원⁺, 신정욱^{***}

Effects of Microfiber Substrate and Shear Stress on the Outgrowth of PC-12 Cells

In Ae Kim^{*+}, Su A Park⁺, Young Jick Kim^{**}, Su-Hyang Kim⁺, Ho Joon Shin⁺,
Yong Jae Lee⁺, Ji Won Shin⁺, Jung-Woog Shin^{***}

Abstract

We introduced mechanical stimuli and micropatterned substrate with microfibers to investigate the effects of those on neurite outgrowth along with nerve growth factor (NGF) *in vitro*. Microfiber substrates were fabricated using an electrospinning process. And PC-12 cells cultured on substrates were simulated with nerver growth factor and laminar flow shear stress in a fluid flow system. The results suggest that microfiber substrates and fluid-induced shear stress are promising for simulating neuronal regeneration in a desired direction.

Key Words : Microfiber substrate, Neurite outgrowth, PC-12 cells, Electrospinning, Shear stress, Neuronal regeneration

1. 서론

대부분의 중추 혹은 말초신경의 손상은 가장 심각한 기능의 손실을 가져온다. 신경의 액손이 손상되었을 경우, 짧은 거리의 손상에서는 자동적으로 재생이 이루어지나, 10mm 이상의 큰 손상에는 재생이 어렵다. 비록 재생이 되더라도 항상 정확한 방향으로의 재생이 어려움으로써 완벽한 기능의 회복을 기대하기는 힘들다. 이렇게 손상된 액손의 기능복원을 위하여 다양한 지지체나 표면처리, 또는

성장인자 등의 조직공학을 이용한 많은 연구가 이루어지고 있다.^{1,2)}

신경세포를 포함한 다양한 세포들은 세포외기질과 세포 간의 신호전달이 세포의 성장과 생존에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 신경의 재생을 위해 세포외기질 구성을 이용한 다양한 지지체가 연구되고 있으나, 이러한 지지체들은 대부분 세포의 방향성을 유도하기 어렵다.³⁾ 따라서 본 연구에서는 전기 방사법을 이용하여, 마이크로 크기의 파이버로 패터닝 된 지지체를 제작하였다.

* 발표자 : 인제대학교 의용공학과 (inae99@bse.inje.ac.kr)
(621-749) 경남 김해시 어방동 607번지

** 교신저자 : 인제대학교 의용공학과 (sjw@bme.inje.ac.kr)

+ 인제대학교 의용공학과

++ 부산카톨릭대학교 치기공과

전기방사법은 높은 전기장을 이용하여 고분자 피이버를 만들어내는 기술로 최근 조직공학에 많이 이용되고 있다. 이 기술은 적은 양과 다양한 종류의 고분자로 지지체의 제작이 가능하며, 마이크로 크기에서 수십 나노크기의 피이버 제작이 손쉽게 할 수 있는 장점을 가지고 있다.⁴⁾

신경의 재생에 또다른 중요한 요소는 물리적 환경이다. 특히, 전단응력의 경우 이온채널 활동과 세포의 부착 및 반응에 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있다. Fluid-induced 전단응력은 골아 세포나 내피세포, 섬유아세포 등에서 세포의 배열을 증진시키고, 방향성을 유도함으로써 세포의 성장과 이동에 향상을 나타내었다.⁵⁾

따라서 본 연구에서는 전기방사법을 이용하여 제작된 마이크로 피이버 구조의 지지체와 fluid flow system을 통한 전단응력이 신경세포의 outgrowth와 guidance에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 마이크로 피이버 지지체의 제작

신경세포는 다른 세포에 비하여 지지체의 부착이 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 지지체의 부착력을 높이기 위하여 커버글라스(24×36 mm)에 0.1% laminin 용액으로 12h 동안 코팅하였다.

마이크로 피이버 지지체는 자체 제작된 전기방사시스템을 이용하여 제작되었다 (Fig.1). Laminin이 코팅된 커버글라스를 회전하는 집속부(원통형, 직경 : 80 mm, 높이 100 mm)에 부착하였고 전기방사 시스템의 분사구는 18g 주사바늘을 이용하였다. 전기 방사 시스템은 챔버 내에 위치하여 주변의 기류의 영향을 배제하였고 방사시 효과적인 용매의 증발과 용액의 일정한 점도 유지를 위해 챔버의 내부 온도를 40℃로 유지하였다. 마이크로 피이버는 PLGA(Poly(D,L-lactide-co-glycolic acid)) 50:50 (Alkamus Inc., USA) 폴리머를 DMF (N,N-dimethylformamide)와 THF(tetrahydrofuran) (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 1:1로 섞은 용매에 50wt%의 농도로 녹인 후, 폴리머 용액을 5ml짜리 주사기에 넣고 폴리머가 분사되는 분사구와 집속부 사이에 높은 전압 전원공급기(SHV200RD-40K, Conver-Tech, Korea)를 이용하여 1.5kV의 전압을 걸어 제작하였다. 이때 집속부의 원통을 4.2m/s의 표면속도로 회전시켜 피이버를 패턴링하였다. 이 집속부는 step motor로 정확한 속도를 제어하였고, 제어프로그램은 Turbo C (ver 3.0, Boland International, Inc.)를 이용하였다.

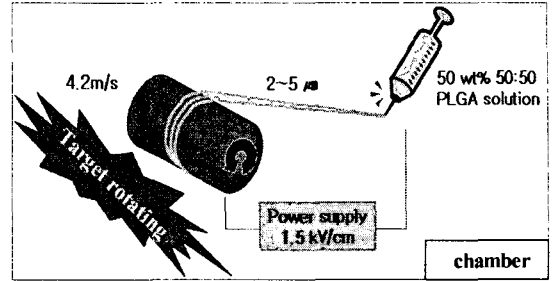


Fig. 1. Electrospinning system.

2.2 Fluid Flow System 제작

Fig 2와 같이 fluid flow 시스템을 이용하여 세포에 전단응력을 가하였다. Flow 시스템은 flow 챔버, 2개의 배지저장챔버, 그리고 roller 펌프로 구성되어 있다. 배지저장챔버 중에 1개는 95% air 와 5% CO₂를 유지하기 위하여 배지가 챔버 외부 공기와 순환 할 수 있도록 제작되었다. Flow 챔버는 높이 1mm(h), 너비30mm(b)로 제작되었다.

배지의 유량을 제어하는 펌프는 컴퓨터를 이용하여 제어되었고, 이때 LabVIEW® (ver. 6.1i National Instruments, USA) 프로그램을 이용하였다. 이때 유체의 유동은 Newtonian fluid, 완전 발달된 층류로 가정하였다. 세포에 가해진 전단응력은 다음과 같은 식으로 계산되었다.

$$\tau = 6\mu Q/h^2b$$

(μ : dynamic viscosity, Q : flow rate, h : height, b : width)

전단응력의 계산을 위하여, 배양배지의 동점성계수(μ)는 9.6×10^{-4} Pa·s 로 설정하였다.

본 실험에서는 Computation Fluid Dynamics(CFD)를 이용하여 fluid 챔버에 나타나는 유동패턴을 검증하였다.

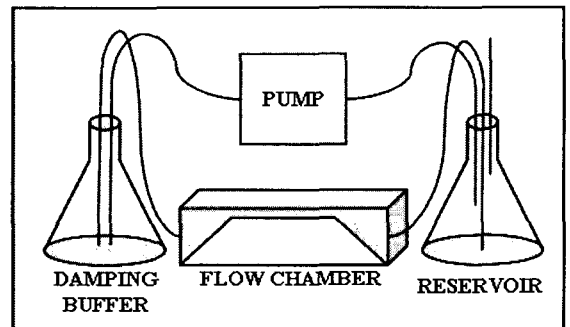


Fig. 2. Schematic diagram of the fluid flow system.

Flow 챔버를 2차원 유한요소모델로 제작하여, fluid flow의 유동형태, flow 속도, 전단응력 등을 관찰하였다. 일반적인 CFD 프로그램인 Fluent 6.0 (Fluent Inc., USA)을 이용하여 해석하였다.

2.3 물리적 자극

제작된 마이크로 파이버 지지체(그룹 F)와 laminin 코팅된 coverglasses(그룹 L) 위에 PC-12 세포를 2.5×10^4 cell/glass 농도로 seeding 하였다. 이때 배양액은 10% FBS가 포함된 DMEM h-glucose를 사용하였고, 인큐베이터에서 2일간 배양되었다. 배양 3일째 flow 챔버에서 물리적 자극을 가하였다(Table 1). 물리적 자극은 steady shear stress 를 하루에 3번 2시간씩 2일간 자극을 가하였다. 이때 세포의 증식을 줄이고 분화로의 유도를 위하여 배양배지의 FBS농도를 1%로 줄이고 nerve growth factor (NGF-7s, 50 ng/ml, Sigma, USA)를 첨가하였다. Table 1에서 보듯이, 전단응력의 크기를 5개로 나누어 실험하였다. 전단응력이 가해지지 않는 시간에는 배지와 산소의 공급을 위하여 6.79×10^{-4} cm/s의 속도로 배지를 순환하였다.

2.4 분석방법

2.4.1 SEM

패턴된 파이버의 모양을 관찰하기 위하여 SEM을 이용하였다. 각 시편은 배지를 제거하고 4% paraformaldehyde에 30분간 고정 후 phosphate-buffered saline (PBS)로 수차례 세척하였다. 고정 후 30, 60, 70, 80, 90, 100% 에틸알코올에 1분씩 세척하여 탈수 한 후, 상온에서 건조시켰다. 각 시편은 백금을 이용하여 코팅하였으며 5kV에서 SEM (JSM-5000, JEOL, Tokyo, Japan) 을 이용하여 촬영하였다.

2.4.2 신경세포의 검증 및 모양 관찰

PC-12 세포가 신경세포로 분화되었는지 검증하기 위하여, anti-Neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody (1:100; Chemicon, USA) 와 neuronal class III β -tubulin polyclonal antibody (1:2000; Covance, USA)를 이용하여 형광 면역염색법을 시행하였다. 각 샘플은 4% formaldehyde/PBS에 30분간 고정후 NeuN과 neuronal class III β -tubulin antibody 첨가 후 하룻밤 배양하였다. 2차 antibody인 mouse anti-goat IgG FITC (1:160; Sigma, USA) 와 alexa fluor 594 goat

anti-rabbit IgG (1:300; Molecular Probes, USA) 같이 넣고 30분간 배양하였다. slide를 mount 시킨 후 fluorescence microscopy (Axioskop2 Plus, Karl Zeiss, Germany)를 이용하여 측정하였다.

신경세포의 outgrowth 된 모양을 관찰하기 위하여 F-actin 염색을 시행하였다. 각 시편을 PBS로 세척 후 4% formaldehyde에 10 분간 고정하였다. 0.1% Triton X-100로 4°C에서 20분간 처리 후 1% BSA로 blocking 하였다. 그 후 rhodamine phalloidin (1:100, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 을 상온에서 20분간 처리한 후 slide에 mount 시킨 후 fluorescence microscopy로 관찰하였다.

2.4.3 이미지 프로세싱

신경돌기의 outgrowth 길이를 측정하기 위하여 F-actin 염색된 각 시편을 디지털 이미지로 저장하였다. 신경세포는 bipolar 또는 pseudo-unipolar 형상의 세포만을 뉴런으로 가정하였고, 신경돌기의 길이는 이미지 J 프로그램을 이용하여 세포체에서 신경돌기의 끝부분까지 측정하였다. 길이 측정의 평균오차는 $\pm 2 \mu\text{m}$ 로 나타났다.

PC-12 세포의 alignment 측정을 위해 MATLAB (ver. 6.0, MathWorks, Co.)을 이용하여 이미지 프로세싱 하였다. 세포의 alignment 정도는 angular deviation (AD)값을 이용하여 정량적으로 측정하였고, 이 AD값은 fisher에 의한 circular statistics를 이용하여 계산되었다.⁶⁾

형광 염색이 된 세포 이미지를 이용하여 신경돌기의 길이가 세포체의 1.5배 이상이 되는 세포를 outgrowth가 일어난 세포로 가정하여 outgrowth의 정도를 측정하였다.

우리는 다음의 식을 이용하여 각 그룹의 outgrowth 분포를 측정하였다 :

$$\begin{aligned} & \text{Percentage of cells outgrowth} \\ & = \text{cell count of outgrowth} / \text{cell count of all} \end{aligned}$$

또한, 신경돌기의 outgrown 된 분포를 outgrowth 길이에 따라 3개의 그룹으로 나누어 분석하였다.

2.4.4. 통계

결과의 통계적 신뢰성 확보를 위하여 일원배치 분산분석을 이용하였고 다중비교는 Fisher's LSD방법을 사용하였다. 범용 통계 프로그램인 SPSS 11.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

3. 결과

마이크로 파이버 지지체의 파이버 직경은 약 3~5 μm 이고, 파이버의 angular deviation(AD)은 9.14° 로 측정되었다 (Fig 3).

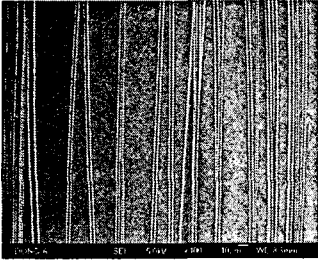


Fig. 3. SEM of Microfiber-based substrate.

본 연구에서는 Fluent[®] 을 이용하여 유량과 전단응력을 검증하였다. 실제 연구에 이용된 유량은 0.52~7.8 ml/min이었다. Fig 4에서 보듯이 0.85 ml/min의 유량을 가했을 경우, 전단응력은 수학적 계산 값과 유사한 0.16Pa로 측정되었다. 또한, 세포에 자극이 가해지는 부분의 유동에 와류는 형성되지 않았다.

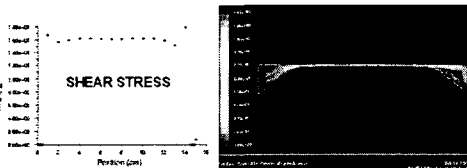


Fig. 4. Computer simulation to validate shear stress occurred on both walls due to the fluid flow.

PC-12 세포가 신경세포로 분화되었는지 형광면역염색을 시행한 결과, 뉴런의 marker로 사용되고 있는 NeuN과 β -tubulin III 모두 염색됨으로써 대부분의 세포가 신경세포로의 분화되었음을 알 수 있었다 (Fig. 5).

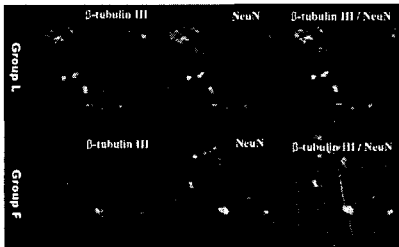


Fig. 5. Images obtained by double-immunostaining.

세포의 F-actin 형광염색 이미지를 이미지프로세싱하여 신경세포의 outgrowth 길이를 측정된 결과 파이버 패턴이 있는 F 그룹이 laminin만 코팅되어 있는 L 그룹에 비하여 더 길게 신경돌기가 뻗어 나간 것을 알 수 있었다. 그리고 그룹 F의 파이버에 세포 돌기가 붙어 따라 자라나는 것이 관찰 되었다. 세포의 배열정도를 측정된 결과 F그룹의 세포가 높은 배열정도를 나타내었다. 특히 0.5Pa의 전단응력이 함께 작용될 때 가장 높은 배열정도를 나타내었다(Fig. 6). 또한 1.5Pa의 그룹에서 높은 배열정도를 나타내었으나, 전단응력이 0.5 Pa 이상일 때 대부분의 세포는 지지체에서 떨어져 측정된 세포수가 매우 적었다.

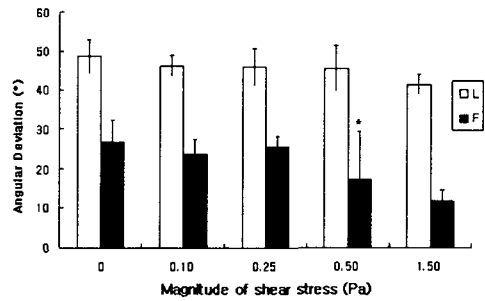


Fig. 6. Angular deviation of neurites on two types of substrates along with various shear stresses (six images for each case).

신경세포의 outgrowth 길이는 그룹 FS_0.25Pa, 즉 전단응력 0.25Pa과 파이버지지체가 함께 작용한 그룹에서 가장 길었으며, 그 이상의 전단응력에서는 감소하는 경향을 보였다 (Fig.7).

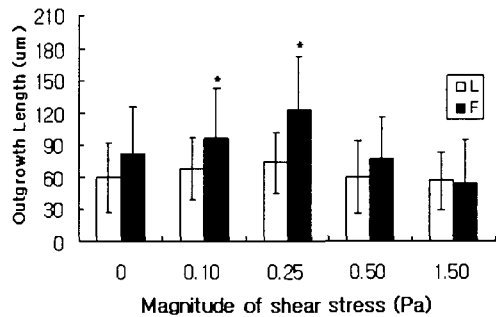
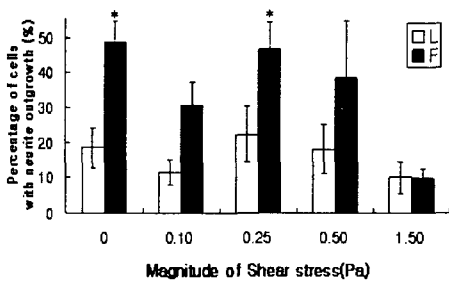
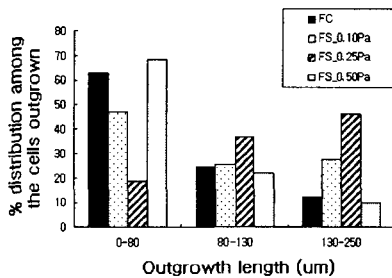


Fig. 7. The average outgrowth length of neurites on different substrates along with various shear stresses (n=100-120, approx.).

Outgrowth 된 세포의 수를 측정 한 결과, 그룹 F가 L에 비하여 유의하게 높은 outgrowth 율을 보였으며, 특히 FS_0Pa 과 FS_0.25Pa 그룹에서 세포가 많은 outgrowth가 일어났음을 알 수 있었다(Fig.8(A)). 그러나 각 그룹별로 outgrowth 길이에 따라 outgrowth 된 세포의 분포를 나타내어본 결과 FS_0Pa의 outgrowth 된 세포 그룹은 세포돌기의 길이가 대부분 80 μ m이하에 분포하는 반면, FS_0.25Pa의 그룹에서는 50%이상의 세포가 130 μ m이상의 긴 outgrowth 길이를 가짐을 알 수 있었다 (Fig. 8(B)).



(A)



(B)

Fig. 8. Percentage of cells with neurite outgrowth on different substrates and at different shear stresses : (A) Percentage of cells considered as outgrown within a group (B) The distribution of percentage of the cell outgrown based on the length outgrown.

4. 결론

본 연구에서는 전단응력과 마이크로 파이버 지지체가 신경세포의 outgrowth와 guidance에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다. 세포의 초기 부착과 outgrowth를 높이기 위하여 모든 그룹에 신경성장인자를 첨가하고 신경의 outgrowth를 증대시키는 ECM 요소로 알려진 laminin을 지지체에 코팅하였

다.³⁾

신경세포의 outgrowth를 높이기 위하여 마이크로 패턴이 이루어진 지지체를 이용한 많은 연구가 이루어져 왔다. Miller⁷⁾는 생분해성 폴리머를 이용하여 슈반세포의 orientation을 유도하였고, 지지체의 groove 너비와 간격이 슈반세포의 배열정도에 중요한 요소임을 보고하였다. 이처럼, 본 연구에서도 마이크로 패턴이 있는 지지체가 laminin 코팅만 이루어진 지지체보다 PC-12 세포의 배열정도가 높음을 알 수 있었다.

물리적인 자극은 다양한 세포의 신호전달이나 세포반응에 중요한 요소로 작용하는 것으로 알려져 있다. 특히 fluid induced 전단응력은 세포골격을 재형성시킴으로써 다양한 세포의 배열을 증진시키는 것으로 보고되고 있다. 물리적 자극의 신호 전달과 세포의 증식 및 이동, 분화에도 영향을 미치는 세포골격은 신경세포의 구조에도 밀접한 관련이 있다.⁸⁾ 따라서, 본 연구에서는 fluid-induced 전단응력이 뉴런세포를 배열시키는데 긍정적인 역할을 할 것으로 가정하였다.

예비실험의 결과, 세포에 48시간동안 전단응력을 가했을 때 세포의 부착이 이루어지지 않았다. 이것은 연속적인 자극은 세포에 좋지 않은 영향을 준다는 이전의 연구와도 일치한다.⁹⁾ 따라서 본 실험에서는 하루에 2시간씩 3번, 이틀간 자극을 가하였다.

본 연구 결과, 신경세포의 outgrowth와 alignment가 전단응력의 크기에 영향을 받는 것으로 나타났다. 0.5Pa 크기의 전단응력에서 세포가 가장 높은 배열정도를 보인 반면, 신경돌기의 outgrowth는 0.25Pa에서 가장 좋은 결과를 나타내었다. 흥미롭게도 0.25Pa 이상의 전단응력에서는 outgrowth가 감소하였고 0.5Pa 이상의 크기에서는 세포가 떨어지는 현상을 보였다. 이것은 신경세포의 부착력이 섬유아세포나, 내피 세포 등 다른 종류의 세포에 비하여 월등히 약한 것을 알 수 있었다. 또한 신경세포의 outgrowth 된 세포의 분포는 FS_0Pa과 FS_0.25Pa에서 높은 outgrowth를 보였으나, 실제 outgrowth의 길이를 고려해 볼 때 FS_0Pa 그룹은 대부분의 세포가 80 μ m이하의 길이를 보인반면, FS_0.25Pa의 경우 50% 이상의 세포가 130 μ m이상의 길이를 보임으로써, 신경세포의 outgrowth와 guidance에 긍정적인 역할을 할 것으로 사료된다. 즉, 특정한 크기의 전단응력이 마이크로 패턴 된 파이버 지지체와 함께 작용될 때, 신경세포의 성장에 좋은 영향을 보였고 이 현상은 마이크로 패턴된 파이버에 의해 세포골격이 재형성을 이루면서 물리적 자극이 그 효과를 증대시키는 것으로 사료된다.

본 연구 결과, 신경돌기의 outgrowth와 정확한 방향으로의

재생이 향상됨으로써 마이크로 패턴된 파이버 지지체와 fluid-induced 전단응력이 함께 작용될 때 신경재생 및 신경의 기능회복에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

Table 1. Classification of the experimental groups according to the pattern and shear stress magnitude (C: control, S: stimulation)

Substrate	Group L	Group F
Magnitude	LC (LS_0Pa)	FC (LS_0Pa)
	LS_0.10Pa	FS_0.10Pa
	LS_0.25Pa	FS_0.25Pa
	LS_0.50Pa	FS_0.50Pa
	LS_1.50Pa	FS_1.50Pa

Acknowledgement

This work was supported by funding from the "Nano Machining Equipment Development Using Ion Beam" of the Next Generation Technology Development Project of the Ministry of Commerce, Industry and Energy.

참고 문헌

(1) Rangappa, N., Romero, A., Nelson, K.D., Eberhart, R.C., Smith, G.M., 2000, "Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation", *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 51, pp. 625-634.

(2) Tsuji, H., Sato, H., Baba, T., Ikemura, S., Goroh, Y., Ishikawa, J., 2000, "Neuron cell positioning on polystyrene in culture by silver-negative ion implantation and region control of neural outgrowth", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B166-167*, pp. 815-819.

(3) Hynds, D.L., Snow, D.M., 2002, "A semi-automated image analysis method to quantify neurite preference/axon guidance on a patterned substratum", *J. Neurosci. Methods.* Vol. 121, pp. 53-64.

(4) Shin, Y.M., Hohman, M.M., Brenner, M.P., Rutledge, G.C., 2001, "Experimental characterization of

electrospinning: the electrically forced jet and instabilities", *Polymer* Vol. 42, pp. 9955-9967.

(5) Brown, T.D., 2000, "Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro", a review, *J Biomech.* Vol. 33, pp. 3-14.

(6) Fisher, N.I., 1993, *Statistical Analysis of Circular Data*, Cambridge University Press.

(7) Miller, C., Shanks, H., Witt, A., Rutkowski, G., Mallapragada, S., 2001, "Mallapragada, Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates", *Biomaterials.* Vol. 22, pp. 1263-1269.

(8) Choquet, D., Felsenfeld, D.P., Sheets, M.P., 1997, "Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages", *Cell.* Vol. 88, pp. 39-8.

(9) Karlon, W.J., Hsu, P.P., Li, S., Chien, S., McCulloch, A.D., Omens, J.H., 1999, "Measurement of orientation and distribution of cellular alignment and cytoskeletal organization", *Ann Biomed Eng.* Vol. 27, pp. 712-720.