

기능성 고분자의 세포특이성 재료로의 이용에 관한 연구

이정복[†] · 김재웅^{*}

국립기술품질원

*유한전문대학

(1996. 1. 8. 접수)

Application of Hepatocyte Specific Polymers with Functional group

Jung Bock Lee[†] and Jae Woong Kim

National Institute of Technology and Quality, Kwacheon 427-010, Korea

*Yuhan Junior College, Seoul 422-749, Korea

(Received Jan. 8, 1996)

요약 : 본 연구에서는 스티렌 폴리에 올리고당 및 비오틴 잔기를 결사슬에 갖는 새로운 세포 특이성 고분자 재료를 설계하여 합성하였다. 이를 고분자 재료를 간세포의 다점 인식 재료로서의 사용 가능성을 검토한 실험 결과를 보고하고자 한다. 간세포의 초기 접착 거동을 조사하기 위하여 합성된 고분자 재료 p(VLA-co-VBA) 90 : 10, p(VLA-co-VBA) 80 : 20 및 대조 물질로 PVLA의 농도가 각각 0.01% (w/v) 되도록 조절하여 1mL씩 폴리스티렌 페트리 접시에 넣고, 혈청 존재 및 비존재 하에서 Seglen법으로 단리한 간세포를 각각 첨가한 결과 60분 경과 후에는 혈청 비존재 하에서와 같은 70% 정도의 높은 접착률을 보여 주었다. 폴리머 p(VLA-co-VBA) 70 : 30에 함유된 비오틴 잔기와 아비딘과의 분자 회합에 의한 응집형상은 UV 투과율의 변화로 확인하였다.

Abstract : New hepatocyte specific copolymers, that have oligosaccharide and biotin residue on the side chain of styrene, were designed and synthesized to use as a multifunctional recognition. In order to measure initial adhesion efficiency, 1mL of copolymer solutions (0.01%, w/v) such as p(VLA-co-VBA) 90 : 10, p(VLA-co-VBA) 80 : 10 and PVLA as a standard were added to polystyrene petri dish, respectively. In the absence and presence of serum, hepatocyte solution of rat by method of Seglen was added. After 60 min, adhesion efficiency was 70%, that is similar to those of the absence of serum. Aggregation capacity between biotin residue in p(VLA-co-VBA) 70 : 30 and avidin was measured by using UV-transmittance.

Key words : Oligosaccharide, Biotin, Copolymer, Hepatocyte, VLA.

1. 서 론

하여 리간드를 형성하는 아시아로당단백질리셉터가 존재하고 있는 것이 알려져 있다.¹

간세포에는 갈락토스 말단형의 올리고 당쇄를 식별

락토스를 결사슬에 갖는 폴리스티렌 유도체

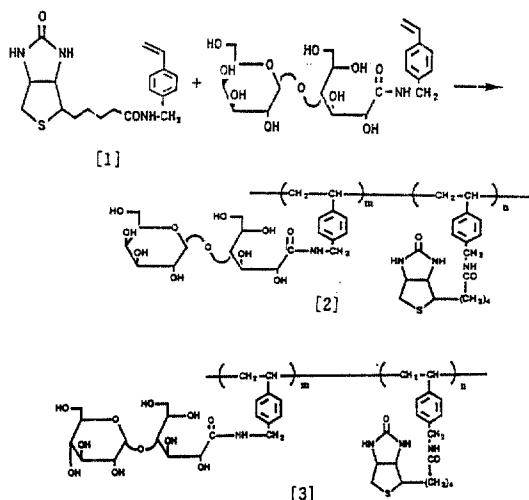
(PVLA)²를 개발하여 이들 중합체를 간세포 접착용 인공기질로 사용한 결과 rat의 간 실질세포는 PVLA상에 접착률 뿐만 아니라 특이적인 간기능 발현성이 우수한 것으로 밝혀졌다.³⁻⁵

세포가 향시 여러 형태의 인식을 동시에 수행하고 있다는 사실에 착안하여 분자 내에 얼마간의 리간드 분자를 갖는 인식성재료를 새롭게 설계하였다. 즉 간세포 및 그외 세포에 대한 다점인식 재료로 종래의 PVLA에 새로 비오틴 잔기를 갖는 공중합체를 합성하였다.

비오틴은 세포 수준에서 탄소의 전위 등에 관계하는 아세틸-CoA 카르복실라제의 보호소이고, Vesely 등^{6,7}에 의하면 성장촉진 인자로서 작용하여 RNA와 단백질의 생합성을 증가시키는데, 그 이유는 세포막에 존재하는 구아닐산 시크라제를 활성화시킴으로써 세포질 내에 사이클리구아노신 3', 5'-1인산(cGMP) 농도가 증가하는 것을 관찰하였다.

또한 비오틴은 아비딘과 강한 결합을 가지므로 비오틴-아비딘복합체의 결합력을 이용해서 생물학적 분자를 표지하거나 리셉터 연구 등에 널리 이용되고 있다.⁸

본 연구에서는 종래의 PVLA나 PVMA에 비오틴 잔기를 갖는 새로운 공중합체를 Scheme 1과 같이 합성하였다. 즉 이들 공중합체는 스티렌 폴리에 락토스와 비오틴 또는 말토스와 비오틴과의 잔기를 결사슬에 함께 갖고 있는 폴리스티렌 유도체인 공중합체 poly(vi-



Scheme 1. Structure of poly(vinylbenzylactonamide-co-vinylbenzylbiotinamide)[2] and poly(vinylbenzyl-malton amide-co-vinylbenzylbiotinamide)[3].

nylbenzylactonamide-co-vinylbenzylbiotinamide), p(VLA-co-VBA) [2] 및 poly(vinylbenzylmalton amide-co-vinylbenzylbiotinamide), p(VMA-co-VBA) [3]을 설계하여 이들 공중합체의 특성 및 간세포의 접착거동에 관해서 조사하였다. 또한 공중합체 중에 있는 비오틴잔기와 아비딘과의 상호작용을 유도하여 그 특성도 검토하였다.

2. 실험

2. 1. 기기 및 시약

합성물질의 확인에 사용한 IR 스펙트럼은 시료를 KBr pellet을 사용하여 Bruker IFS 120 HR FT-IR Spectrophotometer로부터 얻었고, ¹³C-NMR 스펙트럼은 TMS를 internal standard로 하여 일본 JEOL사의 JNM-EX 270 MHz을 이용하여 화학적 이동을 ppm 단위로 측정하였다. C, H, N 등 원소분석은 Perkin-Elmer 240 DS 원소분석기를 사용하였다. 아비딘과 상호작용은 Shimadzu제 UV-2201 분광광도계를 사용하여 측정하였다.

합성에 사용한 p-chloromethylstyrene, lactose 및 (+)-biotin은 Sigma사 제품을 그대로 사용하였고, 합성용매로 사용된 dimethyl sulfoxide(DMSO), dimethylformamide(DMF), diethyl ether, chloroform, methanol 등은 Wako사 제품을 정제하여 사용하였다.

2. 2. 중합체 재료의 합성

올리고당 치환 스티렌 단량체인 VLA(N-p-vinylbenzyl-D-lactonamide) 및 VMA(N-p-vinylbenzyl-D-maltonamide)의 합성은 Kobayashi 등²의 방법에 따라서 합성했다. 또한 새롭게 설계한 비오틴 치환 스티렌 단량체인 VBA(N-p-vinylbenzyl-biotinamide) [1]은 우선 Backer 등⁹의 방법에 준해서 활성화된 biotin-N-hydroxysuccinimide ester(BNHS)를 합성하여, 이들 BNHS(1.92g, 7.9mmol)과 p-비닐벤질 아민(1.25g, 9.4mmol)을 20mL의 DMF에 용해하여 60°C에서 24시간 반응시켜 비오틴 치환 스티렌 단량체를 합성하였다.

이들 스티렌 치환 중합체는 Table 1에서와 같이 소정의 혼합물비로서 VLA-VBA 및 VMA-VBA를 각각 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30의 몰%로 하여 azobisisobutyronitrile(AIBN)을 개시제로 dimethylsul-

Table 1. Copolymerization conditions^{a)}

Exp. No.	VLA (g)	VAM (g)	VBA (g)	Mol. Fr. of VLA or VMA in feed	AIBN ^{b)} (mol%)	(g)	Yield (%)
L-1	0.853	—	0.072	0.9	0.1	0.75	81.1
L-2	0.758	—	0.144	0.8	0.1	0.72	79.8
L-3	0.664	—	0.216	0.7	0.1	0.68	77.3
M-1	—	0.853	0.072	0.9	0.1	0.81	87.6
M-2	—	0.758	0.144	0.8	0.1	0.73	80.9
M-3	—	0.664	0.216	0.7	0.1	0.67	76.1

^{a)} In DMSO 2mL at 60°C^{b)} N-N'-Azobisisobutyronitrile

oxide(DMSO) 중에 녹였다. 이들을 각각 탈기록크가 부착된 앰플에 넣고 드라이아이스-메탄을 용액 속에 고화(동결)시키고, 진공펌프로 앰플 내의 공기를 제거시켰다. 이와 같이 동결 및 탈기의 조작을 3회 반복한 후, 관 내에 감압을 유지한 채로 앰플을 봉인하였다. 봉인한 앰플을 60°C의 항온수조에 넣고 24시간 동안 라디칼 중합에 의하여 공중합체인 p(VLA-co-VBA) 및 p(VMA-co-VBA) 등을 얻었다. 이와 같이 합성된 공중합체 중에서 Table 1의 실험번호 L-2인 p(VLA-co-VBA)은 전 연구보고서¹⁰⁾, 그리고 실험번호 M-2인 p(VMA-co-VBA)의 분석 결과는 다음과 같다.

p(VMA-co-VBA) : 0.8/0.2(VMA/VBA, mol%). Elemental analysis for $(C_{40}H_{56}N_4O_1S)_n$ Calcd. : C, 54.0% ; H, 6.65% ; N, 3.63% ; S, 0.7%. Found : C, 53.69% ; H, 6.78% ; N, 3.98% ; S, 0.82%.

IR(KBr, cm⁻¹) : 3392(O-H), 2925(C-H), 1648(C=O of amide group), 1543(N-H) (Fig. 1).

¹³C-NMR(DMSO-d₆). Primes designate the terminal α -D-glucopyranosyl residue) : δ 172.7 C=O, 163.3 -NHCONH-, 143.2 and 136.7 phenyl(ipso). 127.1 phenyl, 101.1 C-1', 83.4C, 70.1 C-4', 62.9 and 61.4 C(C-6, C-6'), 55.7 (C), 35.5 -CH₂CO, 28.3, 28.1 and 25.7 (-CH₂-)₃ (Fig. 2).

2. 3. 간세포의 접착성 평가¹⁵

중합체인 PVLA, p(VLA-co-VBA) : 90 : 10, p(VLA-co-VBA) : 80 : 20의 수용액(0.01%) 1mL를 폴리스티렌 페트리 접시에 주입하였고, 흰쥐의 세포는

시그램방법에 의하여 흰쥐의 간으로부터 간세포를 단리하였다.

혈청 존재하에, 혈청 비존재하에서 접착률을 각각 비교하기 위하여 혈청첨가 계와 비첨가 계에 3 × 10⁵cell / mL의 간세포의 혼탁액을 가해서 조제하였다. 이 간세포의 혼탁액을 중합체 코팅 접시에 각각 1mL 씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂하에서 15, 30, 60분 후 접착하지 않은 세포는 전부 회수하여 콜다 카운터를 사용하여 세포의 접착률을 산출하였다.

또한 공중합체에 대한 간세포의 접착저해 실험은 공중합체 용액(0.01%)을 전술한 방법에 따라 조제한 간세포를 냉장고에 아시아로페린(ASF)을 함유한 Williams E(0.1% BSA) 배지에 4 × 10⁵cell / mL의 간세포 혼탁액이 되도록 하여 37°C에서 1시간 동안 행하여 접착률을 산출하였다.

2. 4. 중합체의 비오틴 잔기와 아비딘과의 상호작용¹⁶

중합체 결사술에 비오틴 잔기와 아비딘과의 상호작용은 UV 분광기를 사용하여 측정하였다. 사용된 3종류의 중합체는 PVL과 p(VLA-co-VBA) : 7 : 3 및 p(VMA-co-VBA) : 7 : 3 mol%를 인산염 완충액(pH 6.88)을 사용하여 각각 5mL 되도록 녹인 다음 라텍스 비드에 도포하여 실온에서 10분간 고정화시켰다. 이를 비드를 PBS 용액(0.01M sodium phosphate 완충액, pH 7.2+0.15M NaCl)으로 충분히 세척하여 공중합체 코팅 폴리스티렌 라텍스 비드에 아비딘(50μg / mL)을 가하여 혼합한 혼탁액을 자외선 분광계(UV)의 측정 cell에 넣었다. 콘트롤로는 반응 초기의 UV 투과율을 100% 되도록 조절하여 이를 비드의 혼탁액을 반응시

간에 따라 투과율을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 공중합체의 합성

Scheme 1에 보인 바와 같이 단량체인 비닐벤질락톤아미드(VLA)와 비닐벤질말تون아미드(VMA)는 Kobayashi 등²의 방법에 따라 합성하였으며 비닐벤질비오틴아미드(VBA)¹⁰는 비닐벤질아미드와 비오틴을 디메틸설폐시드에 녹여 DCC하에 탈수 축합하여 합성하였다.

공중합체인 p(VLA-co-VBA) 및 p(VMA-co-VBA)은 소정 혼합비의 단량체를 디메틸설폐시드 용매 중에 녹여 AIBN을 개시제로 하여 라디칼 중합에 의하여 중합하였다. 이 때의 수율은 76~88%였다. Table 1에 공중합체의 반응조건을 제시하였다.

이들 공중합체인 p(VLA-co-VBA) 및 p(VMA-co-VBA)은 물, 디메틸설폐아미드 및 디메틸설폐시드에 가용성이었다.

공중합체의 IR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼 중에서 p(VLA-co-VBA)¹⁰, 그리고 p(VMA-co-VBA)은 Fig 1, 2와 같다. IR 스펙트럼에서 아미드 결합 형성은

1648cm⁻¹에 C=O의 신축진동, 그리고 3392cm⁻¹에 OH의 신축진동이 확인되었다. ¹³C-NMR 스펙트럼상에서 스티렌 골격의 결사슬에 아미드 결합과 비오틴 잔기의 monocyclic ureide에 의해 카르보닐 탄소의 2개가 172.7 및 163.3ppm에 각각 나타나 있다. 또한 당밀단인 α -D-glucopyranosyl 잔기를 프라임(')으로 표시한 피크 101.1ppm은 α -D-glucopyranosyl 잔기의 C-1', 83.4는 D-gluconamide의 nonterminal 잔기의 C-4에, 70.1은 말단 α -D-glucopyranosyl 잔기인 C-4'를 62.9 및 61.4는 C-6 및 C-6'를, 그리고 비오틴 잔기에서 유래한 35.5는 $-\text{CH}_2\text{CO}$ 이고, $(\text{CH}_2)_3$ 는 28.3, 28.1 및 25.7에 나타났다.

3. 2. 초기 접착성

공중합체의 간세포 인식성을 평가하기 위하여 간세포에 3종류의 중합체 코팅 접시에서 초기 접착성을 관찰한 결과는 Fig. 3 및 4와 같다. 혈청 비존재하에서 (Fig. 3) 접착률은 D-갈락토스 당류 말단을 갖는 PVLA, 갈락토스와 비오틴의 말단기를 함께 갖고 있는 공중합체인 VLA 90%, VLA 80%의 접착률은 모두 30분 경과 후에 아주 높은 접착률을 나타내었지만 중합체간에 큰 차이는 나타나지 않았다. 혈청 존재하에서

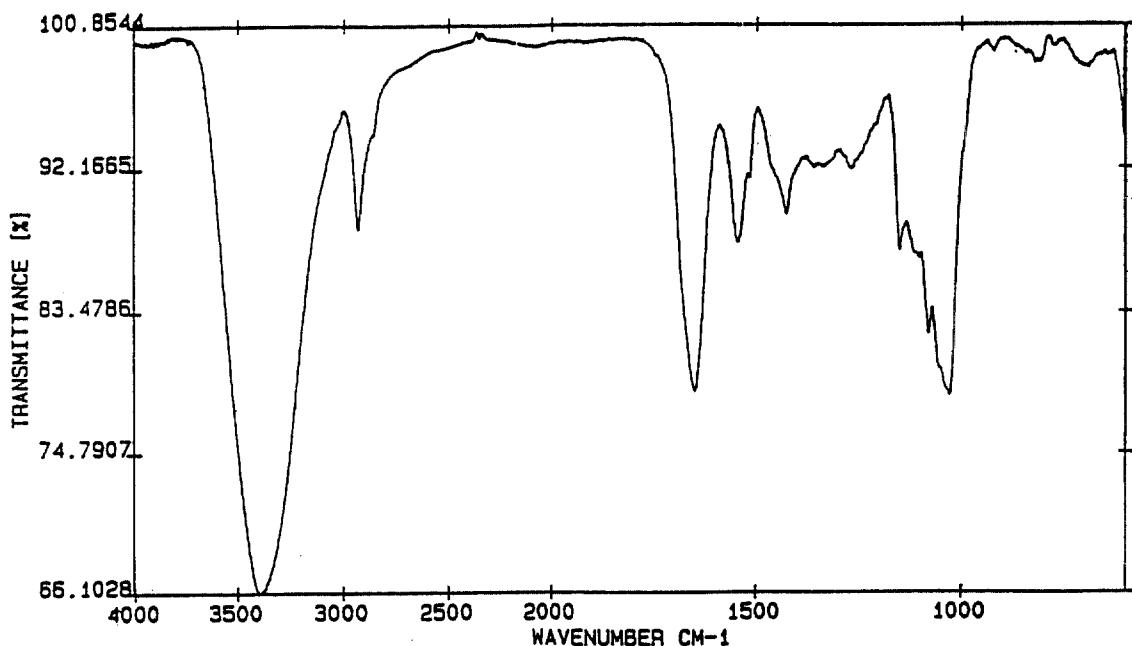


Fig. 1. IR Spectrum of poly(vinylbenzylmaltonamide-co-vinylbenzylbiotinamide)[3].

P(VLA-co-VBA)

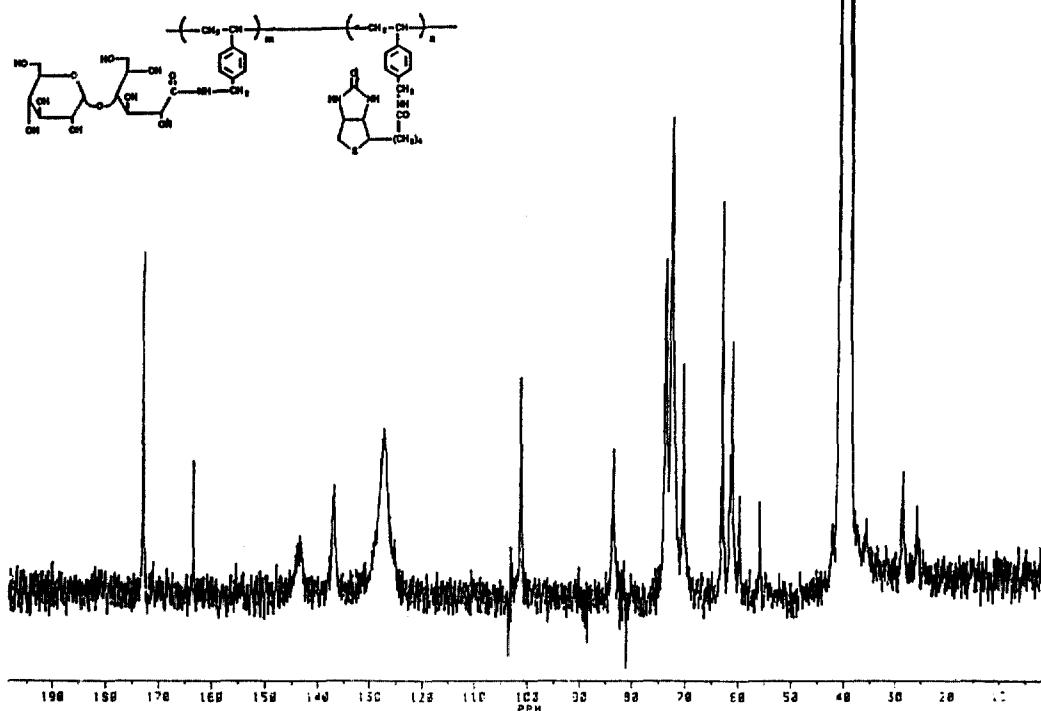


Fig. 2. ^{13}C -NMR Spectrum of poly(vinylbenzylmaltonamide-co-vinylbenzylbiotinamide)[3] in DMSO-d_6 .

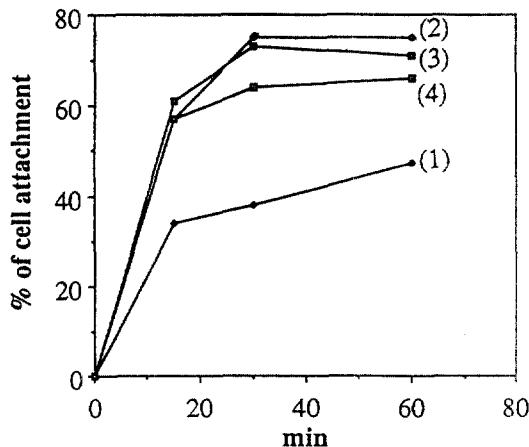


Fig. 3. Time dependency of hepatocytes attachment to control (1), PVLA (2), p(VLA-co-VBA) : 9 : 1 (3), p(VLA-co-VBA) : 8 : 2 (4) coated dish in the absence of serum

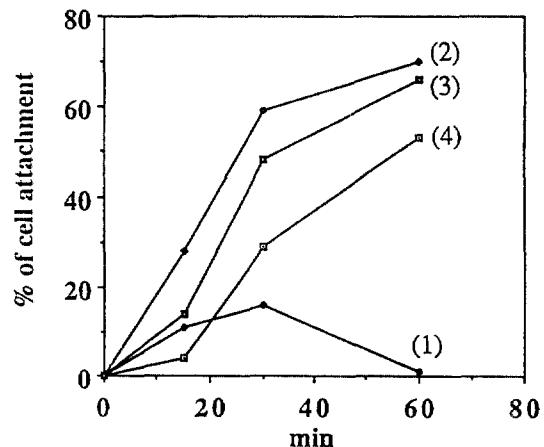


Fig. 4. Time dependency of hepatocytes attachment to control (1), PVLA (2), p(VLA-co-VBA) : 9 : 1 (3), p(VLA-co-VBA) : 8 : 2 (4) coated dish in the presence of serum

(Fig. 4) 접착률은 PVLA와 비교할 때 공중합체는 15, 30분에서 배양 초기에는 대체로 낮은 접착성을 나타내지만 60분 후에는 높은 접착률을 보여 주고 있다. 이들 결과로부터 각각의 중합체는 간세포와의 친화성을 갖는 것을 시사해 주고 있다.

3. 3. 접착 저해성

간세포 접착에 대한 중합체의 접착 특성을 밝히기 위하여 아시아로당단백질리셉터(ASGPR)에 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있는 생체 유래의 당단백질인 아시아로펙틴(ASF)과 3종류의 중합체 수용액 0.01%를 각각 가한 Williams E 배양액으로 간세포의 접착저해성을 실험하였다.

그 결과는 Fig. 5에 나타내었다. VLA가 70% 함유된 공중합체는 ASF의 농도가 0.1mg / mL일 때 대체적으로 저해되었다.

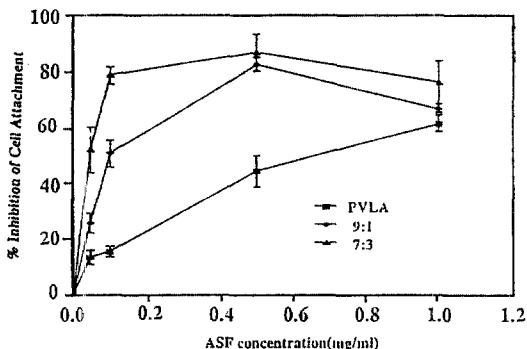


Fig. 5. Influence of ASF on Substratum Interaction with Hepatocyte in the presence of albumin for 1h in W. E.

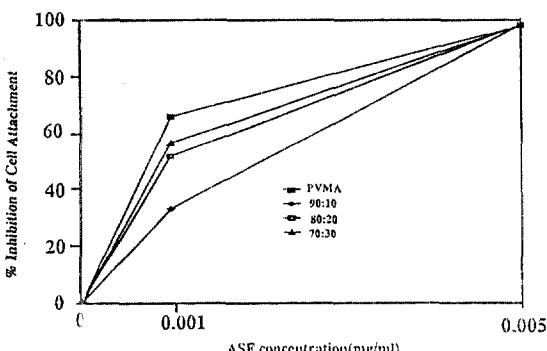


Fig. 6. Influence of ASF on Substratum Interaction with Hepatocyte in the presence of albumin for 1h in W. E.

한편, VLA 90%에서는 ASF의 농도가 0.5mg / mL일 때 PVLA와 거의 같은 수준의 저해효과를 확인하였다. 따라서 VLA 90%, ASF의 농도가 0.5mg / mL 이하에서 접착률이 좋다고 할 수 있다.

또한 비오틴 잔기가 간세포와 상호작용하는지의 여부를 검토하기 위하여 간세포와 상호작용이 적은 것으로 알려져 있는 말토스 잔기를 가지고 있는 VMA와 그것을 함유한 공중합체를 사용하여 검토하였다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이 VMA 90%, 80%, 70% 함유된 공중합체는 PVMA와 같이 0.005mg / mL의 ASF로 완전히 저해되었다.

3. 4. 아비딘과의 상호작용

공중합체 결사술의 비오틴 잔기가 생체 내에 여려한 기능성을 갖고 있는가를 검증하기 위하여 기초적인 단계로 비오틴 잔기와 아비딘과의 상호작용을 유도하였다.

아비딘은 4개의 같은 subunit로 구성된 4량체로서

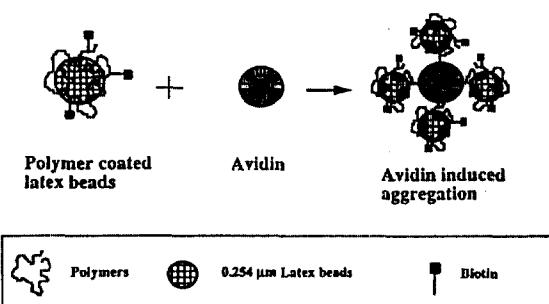


Fig. 7. Aggregation form of avidin-polymer coated latex beads.

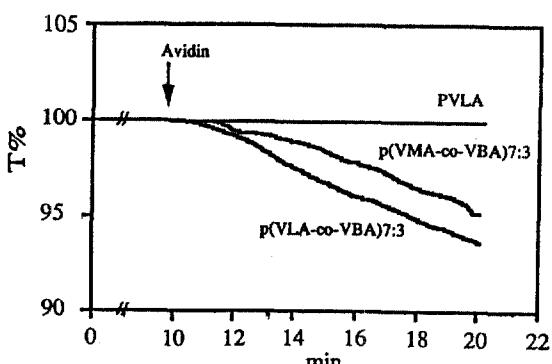


Fig. 8. Avidin Induced Aggregation of Polymer coated Latex Measured by UV Transmittance.

각 subunit에는 한 개 분자씩 비오틴과 강하게 결합하는 결합위치를 갖고 있다. 따라서 이들 공중합체의 결사술에는 비오틴 잔기를 함유하고 있으므로 공중합체와 아비딘간에 상호작용을 예측할 수가 있다. Fig. 7에서와 같이 중합체 비드와 아비딘과의 혼탁액에 대하여 투과율을 측정한 결과 Fig. 8과 같다.

PVLA에는 20분 이상 경과해서도 투과율이 그다지 변화가 없었다. 그러나 공중합체 L-3의 [2] VLA 70%의 경우에는 10분까지는 변화가 그다지 없었으나 그 이후로 투과율이 점점 감소되어 20분에는 7.2%가 감소되었다. M-3의 [3] VMA 70%의 경우에도 반응시간의 경과에 따라서 20분 후에 투과율이 4.8%로 감소되었다.

이들 결과는 폴리스티렌 골격에 비오틴 잔기를 갖지 않는 PVLA는 아비딘과 상호결합을 하고 있지 않기 때문에 비오틴 잔기를 갖고 있는 2종류의 공중합체-라텍스 비드는 용액에서 비오틴-아비딘과의 반응에 의해 회합을 일으켜 큰 응집을 형성하는 것으로 되어 투과율이 감소되어 UV의 투과도가 변화되는 것을 관찰할 수 있었다.

4. 결 론

스티렌 골격에 올리고당인 락토스나 말토스, 그리고 비오틴 잔기를 결사술에 갖는 dual 형태의 인식기능을 갖는 새로운 스티렌 공중합체 poly(vinylbenzyl-lactonamide-co-vinylbenzylbiotinamide), p(VAL-co-VBA)[2]와 poly(vinylbenzylmaltonamide-co-vinylbenzylbiotinamide), p(VMA-co-VBA)[3]을 합성하였다.

이들 공중합체를 기질재료로 이용하여 간세포 초기 접착거동을 조사하였다. 혈청 존재하에, 비존재에 따른 공중합체 VLA 90% 및 VLA 80%에 대하여 PVLA와 비교한 결과 60분 후에는 혈청 비존재에서와 같은 높은 접착률을 나타내었다.

또한 간세포의 접착 저해성은 공중합체 VLA 90%에서 ASF 0.5mg / mL로 PVLA와 거의 같은 수준의 저해효과가 있는 것을 알았다. 한편, VMA 90%, 80%

및 70%의 잔기를 함유하고 있는 공중합체에 있어서 PVM과 같은 0.005mg / mL ASF에 의해 완전히 저해되는 것을 알았다.

라텍스 비드에 의해 공중합체의 비오틴 잔기와 아비딘과의 분자회합에 의해서 응집되는 결과를 UV 투과율의 변화로 확인하였다. 비오틴 함유 공중합체는 아비딘을 결합시키므로 공중합체에 비오틴 함유 단백질을 결합시킬 수 있는 다기능 공중합체의 설계가 가능하여 생의학 재료 분야에 광범위한 응용성이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 유한산업과학기술연구소의 연구비 지원에 의한 것으로, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. L. J. Steer and G. Ashwell, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3008(1980).
2. K. Kobayashi, H. Sumitomo and Y. Ina, *Polym. J.*, **17**, 567(1985).
3. T. Akaike, A. Kobayashi, K. Kobayashi and H. Sumitomo, *J. Bioactive Compatible Polymer*, **4**, 51, (1989).
4. T. Akaike, A. Maeda, S. Tobe and H. Nomoto, *Nippon Pogeikagaku Kaishi*, **64**, 145(1991).
5. S. Tobe and T. Akaike, *The Cell*, **23**, 212(1991).
6. D. L. Vesely, *Science*, **216**, 1329(1982).
7. D. L. Vesely, H. C. Wormer and H. N. Abramson, *Mol. Cell. Biochem.*, **60**, 109(1984).
8. D. A. Fuccillo, *Bio. Technique*, **3**, 494(1985).
9. J. M. Backer, M. Wilchek and E. Katchalski, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 2604(1971).
10. J. B. Lee and C. B. Kim, *J. of Korean INd. & Eng. Chemistry*, **5**, 801(1994).
11. T. Kugumiya, A. Yagawa, A. Maeda, H. Nomoto, S. Tobe, K. Kobayashi, T. Matsuda, T. Onishi and T. Akaike, *J. of Bioactive and Comatible Polymers*, **7**, 338(1992).