

일반논문(Articles)

골수유래 간엽줄기세포와 점착성 단백질 및 폴리펩타이드가 흡착된 (락티이드/글리콜라이드) 공중합체 지지체와의 상호작용

최진산 · 이상진* · 장지욱** · 강길선[†] · 이영무* · 이봉** · 이해방***

전북대학교 유기신물질공학과, *한양대학교 화학공학과,

부경대학교 고분자공학과, *한국화학연구원 생체의료고분자팀

(2003년 2월 24일 접수, 2003년 7월 28일 채택)

Interaction of Bone Marrow Stromal Stem Cells with Adhesive Protein- and Polypeptide-adsorbed Poly(lactide-co-glycolide) Scaffolds

Jin San Choi, Sang Jin Lee*, Ji Wook Jang**, Gilson Khang[†],
Young Moo Lee*, Bong Lee**, and Hai Bang Lee***

Department of Advance Organic Materials Engineering, Chonbuk National University,

664-14, Dukjin-dong 1-ga, Dukjin-ku, Jeonju 561-756, Korea

*Department of Chemical Engineering, Hanyang University, 17, Haengdang-dong, Seongdong-ku, Seoul 133-791, Korea

**Department of Polymer Engineering, Pukyong National University, San 100, Nam-ku, Busan 608-023, Korea

***Biomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,

P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

[†]e-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr

(Received February 24, 2003; accepted July 28, 2003)

초록 : 조직공학적 지지체에서의 골수유래 간엽줄기세포의 점착과 성장에 있어서 세포 점착성 단백질과 폴리펩타이드와의 상호작용을 조사하였다. 세포 점착성 물질로 알려진 단백질이나 폴리펩타이드는 락타이드-글리콜라이드 공중합체인 PLGA 필름과 지지체에 흡착하여 코팅되었으며, 이에 골수유래 간엽줄기세포의 점착과 성장 거동을 비교하였다. 이들 단백질과 폴리펩타이드는 콜라겐 IV형과 피브리노겐, 라미닌, 젤라틴, 피브로넥틴, 폴리(L-라이신)이 사용되었다. 이중 폴리(L-라이신)을 제외한 단백질과 폴리펩타이드는 PLGA 필름 표면에 거의 단층으로 덮여져 흡착되었으며, PLGA 필름과 지지체에서 골수유래 간엽줄기세포가 1일과 2일, 4일간 배양되었다. 세포의 점착과 성장 거동은 sulforhodamine B법으로 평가하였다. PLGA 필름과 지지체에 단백질이나 폴리펩타이드가 흡착되지 않은 표면보다는 흡착된 표면에서의 세포의 점착과 성장이 우수하였다.

ABSTRACT : The interaction of cell adhesive protein and polypeptide with bone marrow stromal stem cells (BMSCs) grown in tissue engineered films and scaffolds were examined. Several proteins or polypeptide known as cell-adhesive were coated adsorption on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) films and scaffolds and adhesion and proliferation behavior of BMSC on those surfaces were compared. The protein and polypeptide used include collagen IV, fibrinogen, laminin, gelatin, fibronectin, and poly(L-lysine). The protein and polypeptide were adsorbed on the PLGA film surfaces with almost monolayer coverage except poly(L-lysine). BMSCs were cultured for 1, 2, and 4 days on the protein- or polypeptide-adsorbed PLGA films and scaffolds. The cell adhesion and proliferation behaviors were assessed by sulforhodamine B assay. It was observed that the protein- or polypeptide-adsorbed surfaces showed better cell adhesion and proliferation than the control.

Keywords : cell adhesive biomolecules, poly(lactide-co-glycolide), bone marrow stromal stem cell, cell interaction.

1. 서론

생체재료는 체내의 어느 부분의 장기를 대체하기 위하여 인위적으로 만들어진 재료를 말하는 것으로 체내에 이식되었을 때 조직과의 친화력이 있어야 하며 독성이 없고 암을 유발하지 않아야 한다. 또 화학적으로 안정하며 적당한 기계적 물성을 가져야 한다. 이 밖에도 여러 가지 복합적인 조건이 만족되어야 한다. 이러한 요구조건은 주로 재료의 표면성질에 기인하게 된다. 재료의 표면성질에는 표면의 젖음성, 화학, 전하, 거침성, 경직성 등을 포함하며 이 특성에 따라 특정 부위의 이식재료로 활용되어질 수 있고, 또 표면개질되어 극복되어질 수 있다.¹⁻⁹

최근, 조직공학 (tissue engineering)은 세포와 지지체를 이용하여 원하는 조직이나 기관을 복원하는 학문으로 혁신적으로 발전해 왔다. 이는 선택된 세포를 고분자와 같은 재료를 이용하여 일정 형태를 가지는 지지체로 제조하여 이에 파종한 후 일정한 조건하에서 장기를 복원하는 기술이다.¹⁰⁻¹⁶ 조직공학에서 가장 널리 쓰이는 재료로는 생분해성 고분자 재료이며 이는 poly(α -hydroxy acid)계의 고분자인 폴리글리콜라이드 (PGA)와 같은 부류의 폴리락타이드 (PLA)와 이들의 공중합체 (PLGA)이다. 이 고분자들은 생분해성이고 분자량과 성분비로 분해기간을 원하는 대로 조절할 수 있다는 장점을 가지고 있다.¹⁷⁻¹⁹ 그러나 고분자의 표면이 소수성을 가지고 세포와의 초기 점착이 부족해서 이를 극복하려는 실험이 진행되어지고 있다.

많은 연구에서 고분자 표면에서의 세포의 점착과 성장을 보다 우수하게 하기 위해서 세포 점착성 펩타이드류를 표면에 흡착시켜 코팅하였다. 대표적인 점착성 단백질에는 세포 영양액으로 사용되는 혈청에 존재하는 파이브로넥틴과 비트로넥틴 등이 있다. 이들은 세포의 점착과 뻗침, 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 연구되어져 왔다. Thomas는 패던닝된 표면에서 골유래 세포에 대한 비트로넥틴의 역할을 규명하고자 하였으며,²⁰ Mann은 세포-점착성 펩타이드인 RGDS와 KQAGDV, VAPG를 고분자 지지체의 표면에 흡착시켜 연근조직세포를 배양하여 세포의 점착과 성장, 이동, 단백질 합성을 연구하였다.²¹ Naito는 피브리노겐/피브린 등을 이용하여 혈관연근세포를 지지체에 배양하여 세포의 점착을 증진시켰고,²² Quirk는 PLA 고분자 표면에 폴리(L-라이신)-GRGDS를 도입하여 초기 세포점착력을 조절하고자 하였다.²³ 본 연구실에서도 콜라겐 IV형과 피브로넥틴, 라미닌으로 흡착된 폴리우레탄 표면에 혈관내피세포를 배양하고 자체제작된 장치로 생성된 전단 흐름 (shear flow)하에서의 점착력을 연구하였다. 물리적 표면처리 방법의 하나인 코로나 방전 처리되어 젖음성이 향상된 표면과 앞선 단백질로 흡착된

표면과의 세포점착력 실험에서 표면처리되지 않은 대조군에 비해 표면처리된 고분자 표면에서 월등한 세포점착력을 가졌으며, 코로나 방전처리보다는 단백질이 흡착된 표면에서의 점착력이 더 우수하게 관찰되었다.²⁴ 이러한 점착성 펩타이드류가 세포의 점착을 향상시키는 이유는 세포막에 존재하는 세포의 점착에 기인하는 요인 때문인데, 예로 폴리라이신의 경우에는 정전기적 인력이 그 요인으로 작용하는데 이는 표면에 흡착된 폴리라이신은 양전하를 가지고 일반적으로 세포막은 음전하를 가지고 있기 때문에 세포의 점착을 향상시킨다고 보고되어 있다.

본 연구에서는 소수성 표면을 가져 비교적 세포점착이 떨어지는 PLGA 고분자 표면에 세포와의 점착과 증식을 향상시키기 위해 점착성 단백질인 콜라겐 IV형과 라미닌, 피브로넥틴, 젤라틴, 피브리노겐과 폴리펩타이드인 폴리(L-라이신)을 흡착시켜서 표면을 코팅하였으며 각각의 단백질과 폴리펩타이드로 표면 개질된 PLGA 고분자 표면에 조직공학에 있어 최대의 세포원으로 다양한 세포로의 분화가 가능하다고 알려진 줄기세포인²⁵⁻²⁷ 사람의 골수유래 간엽줄기세포를 배양하여 세포의 점착과 성장 거동을 비교하고자 하였다. 단백질이 흡착된 조직공학용 지지체는 조직배양에 있어 세포의 점착과 성장뿐만 아니라 세포의 이동을 촉진하여 균일한 분포를 유도해 조직공학적 조직재생에 있어 중요한 역할을 하리라 사료된다.

2. 실험

골수유래 간엽줄기세포의 분리와 배양. 사람의 골수유래 간엽줄기세포는 기부자로부터 14 게이지의 바늘과 3000 U 헤파린을 포함한 수용액이 든 주사기를 사용하여 20~30 mL의 골수에서 채취하였으며 배양액으로 2배 희석하였다. 이 골수는 50% 퍼콜 (Percoll, Sigma, Chem. Co., USA) 점진구배용액에 천천히 낙하시켜 퍼콜 층과 섞이지 않도록 하였다. 이를 원심분리기로 500 g에서 25 분간 원심분리하여 적혈구층과 퍼콜층, 세포층, 혈장층으로 구분하였으며, 마이크로 피펫을 이용하여 세포층만을 분리하여 배양액으로 다시 희석하여 1000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 세포를 $10^3 \sim 10^4$ 세포/cm²의 농도로 배양 플라스크에 배양하였다. 세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco BRL, USA)에 10% 우태혈청 (FBS; Gibco BRL)과 항생제 (10 U/mL 페니실린 G 소디움과 10 μ g/mL 암프테리신 B; Gibco BRL)을 사용하였다. 배양된 세포는 3일에 한번씩 배양액을 교체하였으며 9일에 한번씩 계대배양

하였다.

고분자 필름과 지지체의 제조. 고분자 필름과 지지체에 사용되는 락타이드-글리콜라이드 공중합체인 PLGA (lactide/glycolide mole ratio; 75/25, Resomer RG 756, Boehringer Ingelheim, Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole 인 것을 사용하였고, 지지체의 다공을 생성하기 위한 물질로 염화나트륨 (Orient Chem. Co., Korea)을 사용하였다.

고분자 필름을 제조하기 위해, PLGA 고분자를 스텐레스 판과 PET 필름 사이에 넣고 120 °C로 1분간 열을 가해 용융시킨 후, 100 kg_f/cm²으로 0.5 분간 압력을 가한 다음 상온에서 냉각시켜 100±30 μm 두께의 필름을 제조하였다.

고분자 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법으로 다음과 같이 제조하였다. 먼저, PLGA를 메틸렌클로라이드 (Junsic Chem. Co, Japan)에 용해한 후 체에 의해 크기가 선별된 염을 일정 비율 (PLGA : 염=1 : 12)로 혼합하였다. 용해된 PLGA와 염의 혼합물을 직경 15 mm 및 두께 5 mm 크기의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스 (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kg_f/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공을 형성해내는 물질인 염을 추출하기 위해서 초순수에서 24시간 동안 교반시켰고 이를 30 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 잔류 용매인 메틸렌클로라이드를 제거하기 위해서 최소 1주일 동안 25 °C의 진공오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다.

단백질과 폴리펩타이드의 흡착. PLGA 고분자 필름과 지지체에서의 표면과 세포와의 점착과 성장을 향상시키기 위해 점착성 단백질인 콜라겐 IV형 (COL IV; Sigma Chem. Co., USA), 라미닌 (LM; Sigma Chem. Co.), 피브로넥틴 (FN; Sigma Chem. Co.)과 폴리펩타이드인 폴리(L-라이신) (PLL; Sigma Chem. Co.), 젤라틴 (GT; Sigma Chem. Co.), 피브리노젠 (FG; Sigma Chem. Co.)을 흡착시켜서 고분자 표면을 개질하였다 (Table 1). 단백질과 폴리펩타이드는 용액상태에서 고분자 표면에 흡착되어 코팅된 표면이 제조되는데 COL IV는 5-10 μg/mL의 농도로 상온에

서 3시간 동안 방치되었으며, LM은 10 μg/mL의 농도로 상온에서 1시간 동안 방치되었다. FN은 10 μg/mL의 농도로 36 °C에서 1시간 동안 방치하였고, PLL은 0.1 μg/mL의 농도로 상온에서 1시간 방치하였다. GT는 2 w/v%로 30분간 방치하였고, FG는 10 μg/mL의 농도로 36 °C에서 1시간 방치하였다. 사용된 단백질과 펩타이드는 멸균 여과되어진 제품을 사용하였으며 오염되지 않은 환경에서 작업을 수행하였다.

단백질과 폴리펩타이드가 흡착된 표면을 화학구조의 변화를 평가하기 위해서 ESCA (ESCALAB MK II, V. G. Scientific Co., UK)로 분석하였다. ESCA는 Al Kα radiation source로 하여 1487 eV와 300 W에서 분석하였다. 질소 1S 피크는 단백질과 폴리펩타이드가 흡착된 표면의 분석에 사용되었다.

고분자 표면에서의 세포의 배양. 먼저, PLGA 필름 표면에서 단백질 흡착에 따른 세포의 점착과 성장 거동을 관찰하기 위해 배양된 골수유래 간엽줄기세포를 0.25% 트립신-EDTA 용액 (Gibco BRL)으로 배양 용기로부터 떼어내어 원심분리기로 1400 rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 얻었고 1 cm×1 cm의 PLGA 필름에 4×10⁴개/cm² 씩 계산하여 파종하였다. 세포가 파종된 1일 후 배양액을 교체하였으며 4일 동안 배양하였다.

PLGA 지지체의 경우에서도 마찬가지로 처리하지 않은 PLGA 지지체를 대조군으로 하고 각각의 단백질과 펩타이드로 코팅한 지지체 (직경 5 mm×두께 2 mm)를 48-well 배양용 플라스크에 담았다. 배양중인 골수유래 간엽줄기세포를 같은 방법으로 분리하였으며, 이때 세포를 5×10⁶개/mL 씩 계산하여 각각의 용기에 담겨있는 지지체에 파종하였고 37 °C 세포배양기에서 8일간 배양하였다. 골수유래 간엽줄기세포를 배양한지 하루 후에 배양액을 교체해 주었고 3일마다 배양액을 교체하였다.

세포의 형태와 수 관찰. 고분자 필름과 지지체의 표면에서의 배양된 골수유래 간엽줄기세포의 점착과 성장 거동을 통해 여러 가지 흡착된 단백질들과 폴리펩타이드에 따른 세포의 수와 형태를 관찰하였다. 먼저, 세포가 배양된 시료에서 배양액을 제거하고 인산완충용액 (PBS; Gibco BRL)으로 수회 씻어 주어 이물질을 제거하였다. 그 다음 2.5% 글루타르알데히드 (Sigma Chem. Co.)로 세포를 고정하였다. PLGA 필름과 지지체의 표면과 단면을 잘라 양면 테이프를 이용하여 시료폴더에 고정시킨 후, 이온 스퍼터 (Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 200 μm 두께로 금코팅하였고 이를 주사전자현미경 (Hitachi Co., Model S-2250N, Japan)을 이용하여 PLGA 필름과 지지체 표면의 형태를 관찰하였고 PLGA 필름 표면에서 세포의 수를 측정하였다.

Table 1. Protein and Polypeptide Used for Pre-coating

proteins and polypeptides	source
Collagen Type IV (COL IV)	Human placenta; acid soluble
Fibrinogen (FG)	Human plasma; fraction I type III
Laminin (LM)	Basement membrane of emgelbreth-holmswarm mouse sarcoma
Gelatin (GT)	Porcine skin; powder, type A (acid-cured tissue)
Fibronetin (FN)	Bovine plasma; 0.1% solution
Poly(L-lysine) (PLL)	Hydrobromide; mol wt 70,000~150,000

SRB 법. 세포의 점착과 성장을 정량적으로 알아보기 위하여 sulforhodamine B (SRB; Sigma Co.) 법을 이용하여 분석하였다. 골수유래 간엽줄기세포가 점착된 고분자 지지체에 냉장 보관된 50% 트리클로로초산 (TCA ; Sigma Co.)을 천천히 가해 주었고 이를 4 °C에서 1시간 동안 충분히 고정시켰다. 고정된 샘플에서 TCA를 제거하고 증류수로 5회 이상 세척한 후, 0.4% SRB 용액을 가해 상온에서 30분 이상 염색하였다. 염색이 끝난 후에 1% 초산으로 5회 이상 세척하여 건조시켰으며, 이를 10 mM Tris 용액 (pH 10.5)으로 SRB를 잘 녹여내어 96-well 플레이트에 옮겨 microplate reader (Molecular Devices E-max, Sunnyvale, USA)로 490~590 nm의 범위에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

통계학적 분석. 각각의 실험군들의 평균값과 표준편차가 기록되었으며 통계학적 분석은 Student's t-test를 수행하였다. 결과는 $P < 0.05$ 일 때 충분한 유의성을 가졌다.

3. 결과 및 토론

PLGA 고분자 필름에서의 세포의 행동. 고분자 표면의 세포적합성을 향상시키기 위하여 점착성 단백질과 폴리펩타이드를 흡착시켜 코팅하고 사람의 골수유래 간엽줄기세포를 파종하여 점착과 성장 거동을 관찰하였다. 사람의 골수유래 간엽줄기세포는 조직공학에 있어 가장 중요한 세포원이며 다양한 세포로 분화하여 여러 조직으로 재생될 수 있어 본 연구에 부합하였다. 간엽줄기세포는 골수에서 분리되어 세포층과 혈액층으로 구분되어 비교적 손쉽게 세포배양기 내에서 배양되었으며 9일에 한번씩 계대배양하였다. 고분자 표면에서의 세포의 초기 점착 거동은 조직재생에 있어 매우 중요하다.

PLGA 필름에 흡착된 단백질이나 폴리펩타이드는 ESCA를 이용하여 분석하였다. ESCA 결과에서 순수한 단백질과 폴리펩타이드 분말의 질소의 양은 11%~15%로 알려져 있다.³⁰ Table 2에서 보는 것과 같이 대조군인 PLGA 필

름 표면에서는 질소가 검출되지 않았으나 단백질과 폴리펩타이드가 흡착된 표면에서는 질소가 검출되었다. 또한 순수한 단백질과 폴리펩타이드 분말의 질소의 %와 흡착된 필름 표면에서의 질소의 %를 비교할 때 대부분 최소 65% 이상으로 거의 단층으로 덮여 있음을 알 수 있으나, PLL은 20% 이하로 표면에 대한 흡착율이 낮았고 여러 논문에서도 이와 같은 결과를 나타내고 있다.^{30,31}

Figure 1는 PLGA 필름 표면에서 1일 배양된 골수유래 간엽줄기세포의 위상차 현미경 사진이다. 일반적으로 점착 거동을 나타내는 1일째에는 대조군 (control)과 비교하여 단백질과 폴리펩타이드가 흡착된 표면에서의 세포의 초기 점착이 매우 우수하였다. 대조군의 경우 점착된

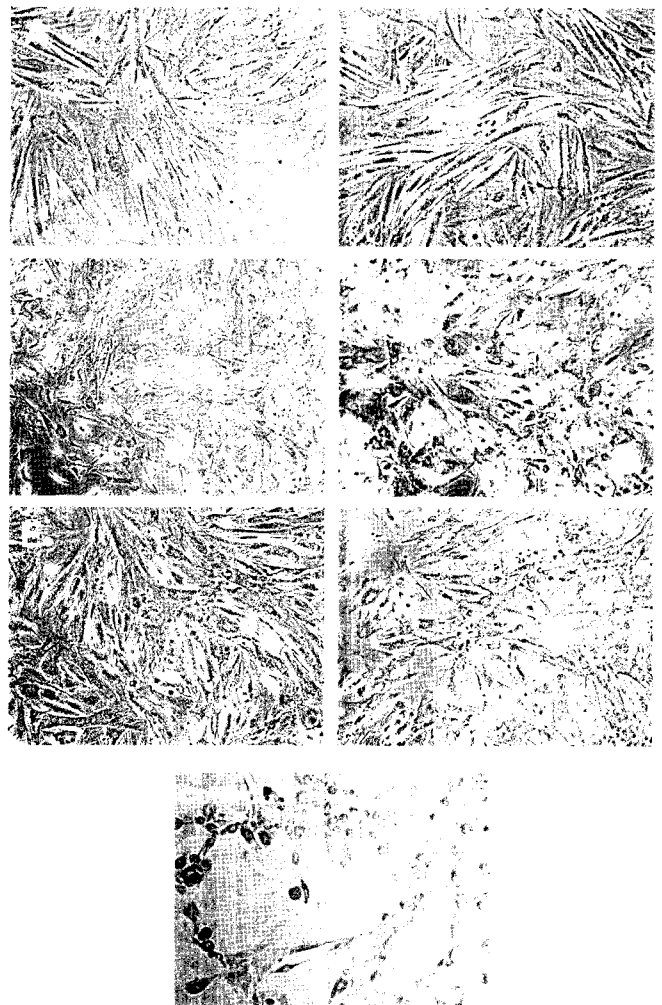


Figure 1. Appearance of human BMSCs adhered on control and protein- or polypeptide-adsorbed PLGA surfaces after 1 day culture; (A) COL IV, (B) FG, (C) LM, (D) GT, (E) FN, and (F) PLL-coated PLGA surfaces (original magnification, $\times 100$).

Table 2. ESCA Results of the Protein- and Polypeptide-adsorbed PLGA Film Surfaces

adsorbed protein of polypeptide	atomic%			N% of pure powder ³⁰
	C	O	N	
Control	65.7	34.3	0	-
COL-IV	48.4	41.4	10.2	14.4
FG	51.3	40.8	7.9	11.6
LM	4.2	42.6	11.2	15.1
GT	55.4	38.6	7.6	11.5
FN	54.3	37.2	8.5	12.5
PLL	64.5	32.9	2.6	13.4

세포의 수도 현저히 적었으며 filopodia 및 lamellipodia 등이 여전히 뻗어 나오지 않은 세포가 대부분이었다. 이에 비해 단백질이나 폴리펩타이드가 흡착된 표면에서는 세포의 점착이 우수할 뿐 아니라 filopodia 및 lamellipodia 등이 뻗어 나와 세포의 형태가 spindle한 형태를 나타냈다.

Figure 2은 PLGA 필름 표면에서 2일 배양된 골수유래 간엽줄기세포의 위상차 현미경 사진으로 세포의 성장 거동을 관찰할 수 있다. 배양된지 1일 보다 모든 표면에서 세포의 수가 증가하였으나, 대조군의 경우 여전히 filopodia 및 lamellipodia 등이 뻗어 나오지 않은 세포가 대부분이었으며 상대적으로 세포의 수도 월등히 적었다. 이에 비해 단백질이나 폴리펩타이드가 흡착된 PLGA 표면은 세포가 대부분의 표면을 덮어 단층을 형성하였으며 세

포의 수도 월등히 많았다.

세포의 수를 확인하기 위해서 주사전자현미경을 이용하여 PLGA 필름 표면에 점착된 세포를 촬영하였다. Figure 3은 PLGA 필름에 점착된 골수유래 간엽줄기세포의 1일과 2일 배양된 세포의 수를 나타낸 것이다. 골수유래 간엽줄기세포의 초기 세포점착 (1일째)과 성장거동 (2일째)에서 단백질과 폴리펩타이드가 흡착된 PLGA 필름 표면은 대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 의 값은 가져 통계적 유의성을 나타냈다. 결과적으로 PLGA 필름에서의 세포의 점착과 성장 거동을 살펴보면, GT나 FN, FG는 초기 점착과 성장이 모두 우수하였으며 LM의 경우에는 초기 점착에 비해 성장이 뒤떨어지는 것으로 관찰되었다. 그러나 모든 단백질이나 폴리펩타이드로 흡착된 표면은 대조군에 비해 월등히 우수한 세포의 점착과 성장 거동을 나타냈다.

PLGA 고분자 지지체에서의 세포의 거동. 조직공학용 지지체로 널리 쓰여지는 PLGA는 우수한 생체적합성 고분자 재료 중에 하나이지만 세포의 초기 점착은 금속이나 세라믹 재료에 비해 월등히 떨어진다. 이를 보완하기 위해서 물리화학적인 표면개질 방법, 예로 코로나 방전처리나 플라즈마 방전처리, 강산용액으로 처리하는 방법 등이 사용되었다. 그러나 조직공학용 지지체의 경우 다공성을 가지는 3차원적 형태를 가지고 있어 지지체 내부 깊숙이 세포가 침투하기 위해서는 내부의 표면을 처리해야 한다. 이러한 이유로 코로나 방전처리나 플라즈마 방전처리의 경우 내부 깊숙이 처리하기에는 한계가 있고, 화학적 방법의 경우 지지체의 물성을 저하시키기도 한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 Mikos는 에탄올로 전처리하여 물로 치환하는 방법을 이용하여 배양액

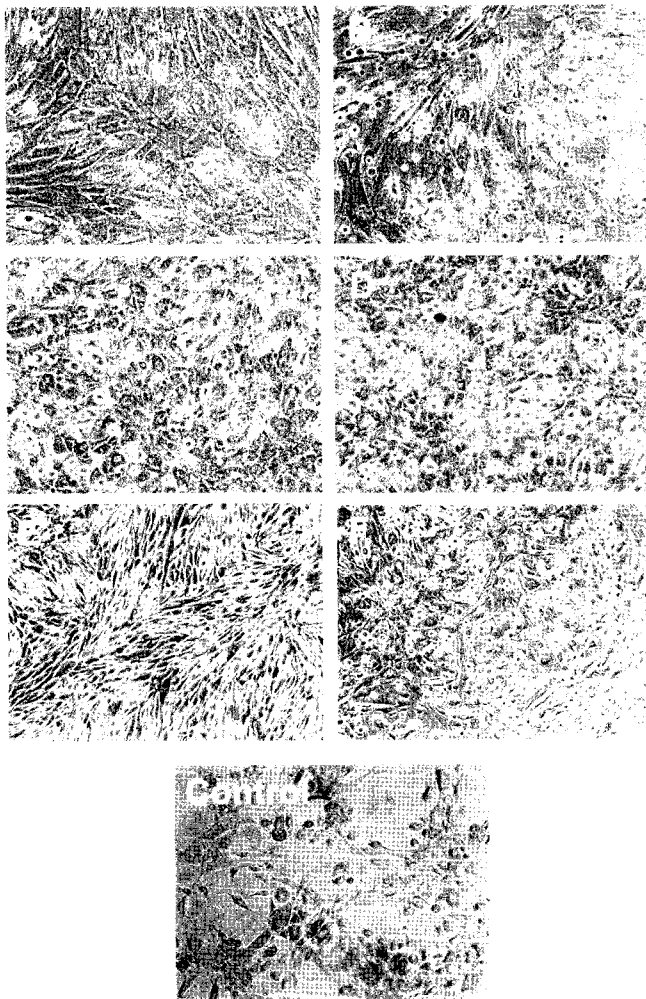


Figure 2. Appearance of human BMSCs proliferated on control and protein- or polypeptide- adsorbed PLGA surfaces after 2 days culture; (A) COL IV, (B) FG, (C) LM, (D) GT, (E) FN, and (F) PLL-coated PLGA surfaces (original magnification, $\times 100$).

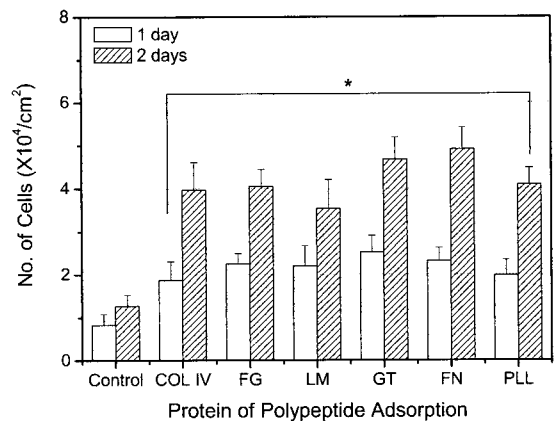


Figure 3. Numbers of human BMSCs adhesion and proliferation on control and protein- or polypeptide- adsorbed PLGA film surfaces ($*P < 0.05$ compared to control).

이 내부로 침투하여 세포가 들어가도록 유도하였으며,²⁸ Langer는 NaOH 수용액으로 처리해서 고분자 표면의 친수성을 증가시키고자 하였다.²⁹ 에탄올로 전처리하는 경우 잔여 용매의 독성을 배제할 수 없으며 고분자 표면이 개질되는 것이 아니기 때문에 세포의 점착이 증가하지는 않는다는 문제점을 가지고 있다. 이에 비해 단백질이나 폴리펩타이드의 흡착은 어느 정도의 소수성 표면을 친수화할 뿐만 아니라 세포와 고분자 표면과의 중개역할을 하여 세포의 점착과 성장을 향상시키고, 세포의 단백질 합성의 촉진에도 영향을 미친다고 보고되어져 있다.

PLGA 고분자 지지체에서의 세포의 점착과 성장 거동을 관찰하기 위해 SRB 법을 이용하였다. SRB 염색액을 이용하여 먼저 일정 세포수에 따른 흡광도를 나타내는 표준곡선을 그렸으며, 각 시료에 따른 흡광도를 관찰하여 세포수로 환산하여 Figure 4로 도식하였다. 대조군에 비해 단백질이나 폴리펩타이드로 흡착된 PLGA 지지체에서의 세포의 점착과 성장이 매우 우수하였으며 PLGA 필름 표면에서와 다르게 COL IV의 경우, 초기 점착과 성장은 저조하지만 꾸준한 성장을 보여 4일째는 FN과 더불어 가장 높은 성장율을 보였다. 모든 단백질이나 폴리펩타이드가 흡착된 표면은 대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 의 값은 가져 통계적 유의성을 가졌다.

Figure 5는 PLGA 지지체에서 배양된 골수유래 간엽줄기세포의 8일째 되는 주사전자현미경 사진으로 대조군과 LM, COL IV이 흡착된 고분자 지지체이다. 사진에서 보는 것과 같이 대조군의 경우에는 세포의 점착이 거의 이루어지지 않았다 (Figure 5(A)). 이에 비해 LM이 흡착된 PLGA 지지체에서는 많은 세포의 점착이 보이고 있

으며 대부분의 지지체의 다공이 세포로 가득차 있으며 세포의 윤곽이 관찰하였다 (Figure 5(B)). 그러나 COL IV이 흡착된 지지체의 경우에는 세포의 점착뿐 아니라 많은 기질이 형성되었음을 관찰할 수 있는데 이는 Figure 4에서의 결과와 같이 세포의 성장이 LM이 흡착된 지지체보다 우수하여 세포외기질이 생성이 원활하다고 사료된다 (Figure 5(C)).

결과적으로, 단백질들과 폴리펩타이드들이 흡착된 PLGA 고분자 표면에서의 골수유래 간엽줄기세포의 초기 점착이 증가되면서 성장이 촉진되었다. PLGA 고분자 필름의

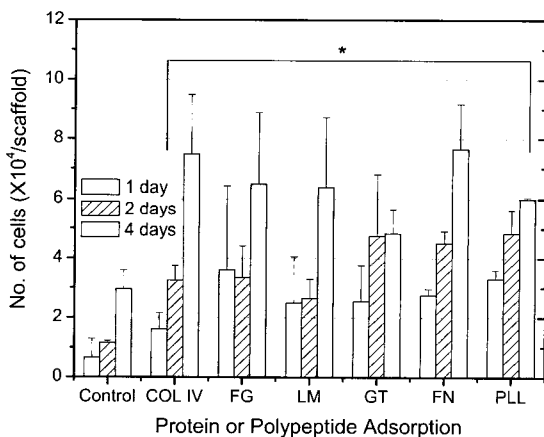


Figure 4. Numbers of human BMSCs adhesion and proliferation on control and protein- or polypeptide-adsorbed PLGA scaffolds; the cell numbers were determined by the SRB assay (* $P < 0.05$ compared to control).

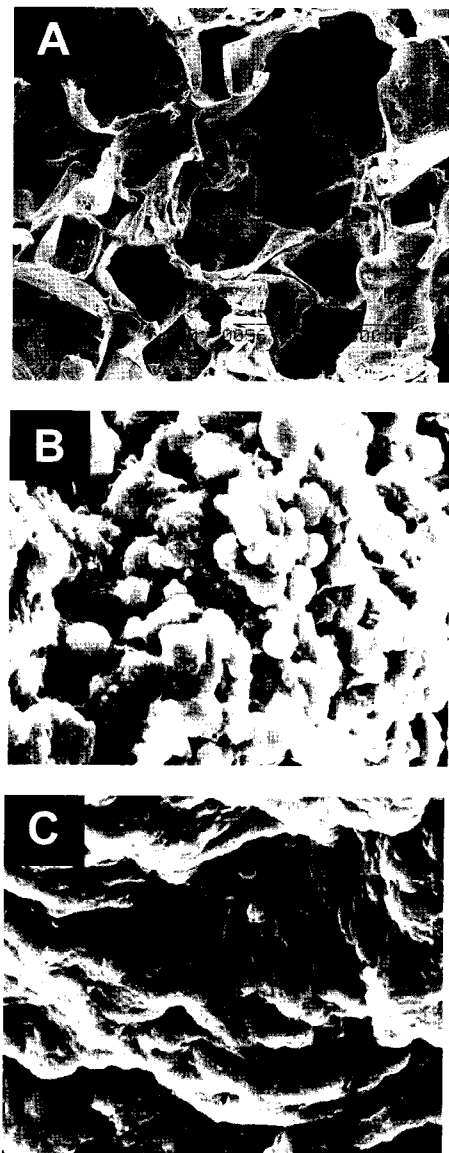


Figure 5. SEM pictures of BMSCs seeded (A) control (PLGA), (B) LM- adsorbed PLGA, and (C) COL IV- adsorbed PLGA scaffolds after 8 days culture (original magnification, $\times 100$).

경우에서는 세포의 초기 접착이 GT이 가장 높았고 이어 FN, FG, LM, PLL, COL IV 순으로, 이들은 모두 코팅을 하지 않은 대조군 보다는 현저하게 높은 접착을 보였다. 현미경 관찰에서도 알 수 있듯이 세포는 코팅을 한 고분자 표면에 잘 퍼져 있었으며 성장율이 우수하였다. PLGA 지지체에서는 FN과 COL IV가 흡착된 표면에서 더욱 우수하였다. FN과 COL IV로 코팅된 고분자 표면에서의 세포는 배양 4일째 높은 성장률을 보였다. 특히, 초기 접착이 낮았던 COL IV로 코팅된 표면이 시간이 지남에 따라 성장률이 가장 좋았다. 반면에 GT로 코팅된 표면은 2일째까지 세포의 성장이 좋다가 4일째 성장률이 낮았다. 이는 GT의 활성이 초기에는 매우 우수하지만 시간이 지남에 따라서 활성이 낮아짐을 알 수 있다.

앞선 결과에서 알 수 있듯이, PLGA 필름에서와 지지체에서의 단백질이나 폴리펩타이드가 흡착된 표면에서의 세포의 접착과 성장이 다른 양상을 가지고 있다. 이는 세포의 접착과 성장에 있어 기질의 입체적인 구조의 차이를 나타내는 것으로 사료되며, 세포의 종류나 미세 환경에 의해 차이를 가질 수 있다. 결과적으로 세포의 접착과 성장을 향상시키기 위해서는 세포의 종류나 기질의 형태, 환경 등을 고려하여 선택적인 표면 환경을 제시하여야 한다.

4. 결론

조직공학에서 고분자 지지체는 원하는 장기의 형태를 가지며, 세포가 성장하고 조직을 형성해 나갈 수 있도록 돕는다. 이러한 이유 때문에 고분자 지지체와 세포의 초기 접착이 매우 중요한데, 본 연구는 소수성 고분자 물질을 단백질과 폴리펩타이드를 흡착시켜 코팅하여 고분자 표면과 세포와의 친화력을 향상시켰다. 또한, 단백질과 폴리펩타이드는 수용액으로 사용되기 때문에 3차원 형태의 고분자 지지체 표면을 개질하기 쉬운 이점이 있어서 다양한 형태의 이식용 생체재료에 사용하기에 편리하다. 본 논문은 조직공학과 재생의학에서 가장 중요한 세포원인 성체줄기세포와 조직공학용 지지체로 가장 널리 사용되는 생분해성 고분자를 이용하여 세포의 접착과 성장 거동을 관찰하였으며, 본 연구결과를 토대로 하여 배양된 조직의 세포외기질을 정량화하고 세포의 활성도를 측정하는 실험과 동물실험이 진행 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 산업자원부 차세대사업 (N11-A08-1402-05-1-3)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

References

1. G. Khang, J. H. Jeon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **23**, 471 (1999).
2. J. H. Lee, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 283 (1999).
3. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Korea Polym. J.*, **7**, 102 (1999).
4. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Lee, Y. S. Kim, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 179 (1999).
5. J. H. Lee, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Colloid Inter. Sci.*, **230**, 84 (2000).
6. S. J. Lee, G. Khang, J. H. Lee, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 877 (2000).
7. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **13**, 197 (2001).
8. S. J. Lee, G. Khang, I. Y. Kim, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 150 (2002).
9. J. S. Choi, S. J. Lee, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomaterials Res.*, **6**, 17 (2002).
10. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
11. D. Ferber, *Science*, **284**, 422 (1999).
12. N. L'Heureux, L. Germain, and F. A. Auger, *Science*, **284**, 1621 (1999).
13. G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 640 (1999).
14. G. Khang, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 782 (1999).
15. J. J. Yoo and I. Lee, *Tissue Engineering: Concepts and Application*, Korea Med. Pub., Seoul, 1998.
16. G. Khang, S. J. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, "Polymer-Cell Interaction", in *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, J. J. Yoo and I. Lee, Editors, Gunja Pub., Seoul, p.297, 2002.
17. T. H. Kim, C. Jannetta, J. P. Vacanti, J. Upton, and C. A. Vacanti, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **394**, 91 (1995).
18. M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. Langer, T. B. Aufdemorte, and A. G. Mikos, *Tissue Eng.*, **1**, 41 (1995).
19. H. Miyoshi, K. Yanagi, H. Fukuda, and N. Ohshima, *Biotech. Bioeng.*, **43**, 635 (1994).
20. C. H. Thomas, C. D. McFarland, M. L. Jenkins, A. Reznia, and J. G. Steele, *J. Biomed. Mater. Res.*, **37**, 81 (1997).
21. B. K. Mann and J. L. West, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 86 (2002).
22. M. Naito, C. Funaki, T. Hayashi, K. Yamada, K. Asai, N. Yoshimine, and F. Kuzuya, *Atherosclerosis*, **96**, 227 (1992).
23. R. A. Quirk, W. C. Chan, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, and K. M. Shakesheff, *Biomaterials*, **22**, 865 (2001).
24. G. Khang, S. J. Lee, Y. M. Lee, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Korea Polym. J.*, **8**, 179 (2000).

25. P. Bianco and P. G. Robey, *Nature*, **414**, 118 (2001).
26. A. Banfi, A. Muraglia, B. Dozin, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, and R. Quarto, *Experimental Hematology*, **28**, 707 (2000).
27. A. Vats, N. S. Tolley, J. M. Polak, and L. D. K. Buttery, *Clin. Otolaryngol.*, **27**, 227 (2002).
28. A. G. Mikos, M. D. Lyman, L. E. Freed, and R. Langer, *Biomaterials*, **15**, 55 (1994).
29. J. Cao, L. Niklason, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 417 (1998).
30. J. H. Lee, D. K. Kim, G. Khang, and J. S. Lee, *Biomaterials Res.*, **2**, 8 (1998).
31. M. Shen and T. A. Hobett, *J. Biomed. Mater. Res.*, **57**, 336 (2001).