대한성형외과학회지. 제 35 권, 제 1 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 35, No. 1, 1 - 6, 2008

지방줄기세포가 무세포 분쇄진피기질(Acellular Micronized Dermal Matrix) 부착에 있어 Avidin과 Biotin의 효과

유 결 · 이종원 · 임진수

가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실

Effect of Avidin and Biotin in Attachment of Human Adipose Stem Cells to Micronized Acellular Dermal Matrix

Gyeol Yoo, M.D., Ph.D., Jong Won Rhie, M.D., Ph.D., Jin Soo Lim, M.D., Ph.D.

Department of Plastic Surgery, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: In tissue engineering, it is important that the scaffolds have high affinity with cells for making efficient use of cells. The authors studied the binding affinity of human adipose stem cells(ASCs) to micronized acellular dermal matrix(alloderm) using biotin and avidin linkages.

Methods: Human ASCs were harvested from adipose tissue obtained by abdominoplasty. ASCs(1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6 cells) were attached to micronized alloderm(1 mg) in three groups; 1) control group in which no ASCs and alloderm was treated; 2) serum group in which alloderm was exposed to fetal bovine serum; and 3) biotin group in which biotinylated cells were attached to biotinylated alloderm. The binding affinities were determined 1 day after making ASC-alloderm complexes. The proliferation rates were determined by XTT assays in 4, 7, 14, and 21 days and scanning electron microscopic examination was performed in 7 and 21 days after culture of ASC-alloderm complexes.

Results: The binding affinities of the biotin group were significantly increased in all cell concentrations. Maximum binding affinity was observed at 5×10^4/mg of micronized dermal matrix in biotin group. The viabilities were lowest in biotin group in contrast to binding affinity, but the difference was not significant. SEM showed well attachment of cells to micronized dermal matrix in all groups.

Conclusion: The use of avidin/biotin facilitated human ASCs attaching to micronized acellular dermal matrix. This attachment would not disturb adipose stem cells viabilities. The present study suggests that avidin/biotin can be used as making efficient use of cells in adipose tissue engineering.

Key Words: Mesenchymal stem cells, Alloderm, Avidin, Biotin

Received August 23, 2007
Revised October 25, 2007

Address Correspondence : Jin Soo Lim, M.D., Ph.D., Department of Plastic Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, St. Vincent's Hospital, 93-6 Ji-dong, Paldal-gu, Suwon, Kyeongi-do 442-723, Korea. Tel: 031) 249-7206 / Fax: 031) 241-0005 / E-mail: prsdrlim@yahoo.com

I. 서 론

최근 들어 조직공학을 이용하여 생체조직을 대체하려는 연구가 매우 활발히 이루어지고 있다. 조직공학이란 공여부에서 극소량의 세포를 얻어 생체 밖에서 세포를 증식시킨 후 삼차원적 세포지지구조물에 부착시켜 이식함으로써 장기 이식이나 조직 이식을 대치할 수 있는 기법이다.

조직공학에서는 세포가 한정되어 있기 때문에 지지구조물에 세포를 부착시킬 때 부착력 및 성장을 증진시키기 위해서 여러 가지 연구가 이루어져 왔다. 그 중 avidin-biotin 결합은 매우 강력하고, 매우 특징적이며, 매우 특이적인 결합력을 가지고 있는데, Bhat 등은 이 avidin-biotin 결합이 내피세포가 인공혈관 외벽에 결합하는데 있어 결합력을 높여주고 내피세포가 퍼져나가는데 도움을 주어 인공혈관의 내피화에 도움을 준다고 하였다.[1]

또한 조직공학기법을 위해서는 세포를 부착하고 성장 시킬 수 있는 골격을 이루는 지지구조물이 필수적인데, 이는 생분해되고 여러 가지 모양을 만들 수 있으며 세포 고유성질을 유지시킬 수 있는 생물학적으로 안정된 물질이어야 한다.[2] 이 중 무세포 진피기질(acellular dermal matrix)은 상피세포를 같이 사용하여 인공 피부 제작에 있어 좋은 지지구조물의 역할을 하며,[3] 최근 들어 이를 가루화한 상품인 분쇄 무세포 진피기질(이하, 분쇄진피기질)은 연부조직의 보충을 위하여 많이 사용되는데 주사가 가능한 특성이 있다.[4]

이에 저자는 지방줄기세포와 분쇄진피기질을 이용하여 후에 지방줄기세포가 지방세포로 분화함으로써 지

방조직의 형태를 갖추게 되고, 주입이 가능한 이식물을 조직공학적으로 시도하는데 있어 지방세포를 분쇄진피기질에 부착과정에서 avidin-biotin 결합력이 세포 활용성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

가. 지방줄기세포 분리 및 증식

지방줄기세포는 복부지방제거술을 받은 환자로부터 얻은 지방조직에서 분리하였다. 먼저 얻은 지방조직에서 섬유조직과 혈관들을 박리 후, 작은 조각으로 만들어 0.1% type I collagenase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1% Fatty acid free bovine serum albumin (Sigma)과 1 × Penicillin-Streptomycin(Gibco)을 가진 DMEM/F-12 media(Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 1 mL 당 조각난 지방조직 2 g 비율로 넣고 37℃에서 30분간 휘저어주고 난 후 거즈로 걸러서 걸러진 용액을 1000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 얻은 침전물은 10% bovine calf serum(Hycolone, Lagan, UT)과 1 × penicillin-streptomycin(Sigma)을 가진 DMEM/F-12 media(Gibco)에 10^4세포/mL 농도로 부유시켜 배양 플라스크당 1 mL씩 넣고 3세대 계대배양시켜 증식시켰다.

나. 실험군과 분쇄진피기질 준비

실린지 내 들어있는 분쇄진피기질(Hans Biomed Co., Seoul, Korea)에 DMEM/F-12 media (Gibco) 6 mL를 넣고 30분간 두어 충분히 수화시켰다. 1000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, 배양액만 조심이 버리고 분쇄진피기질만 남긴 후, PBS 3 mL를 더하여, 재부유시켜 시험관 세 개에 균등히 나누어 세 실험군으로 사용하였다.

먼저 한 군은 아무런 처치를 하지 않은 대조군으로 사용하였다.

다른 하나는 원심분리하여 PBS를 제거하고 우태아 혈청 1 mL를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 배양하여 혈청 처치된 혈청군으로 하였다.

나머지 하나는 biotin군으로서 먼저 PBS로 세척 후, succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate(NHS-LC-biotin, Pierce, Rochford, IL)을 PBS에 0.577 mg/mL 농도로 희석한 용액 2 mL에 45분간 처치하여 biotin화시키고, PBS에 0.5 mg/mL 농도로 희석한 avidin을 1 mL 첨부하여 45분간 반응시키고, PBS로 세번 세척하여 avidin과 biotin이 결합된 분쇄진피기질을 준비하였다.

다. 지방줄기세포 준비

대조군과 혈청군에 사용할 지방줄기세포는 3세대 계대배양으로 증식 후에 분리하여 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6 cells/mL 농도로 DMEM/F-12 배지 1 mL에 부유하였다.

Biotin군을 위해 증식된 지방줄기세포를 NHS-LC-biotin 용액(0.577 mg/mL)에 45분간 biotin화 시킨 후, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6 cells/1 mL 농도로 DMEM/F-12 배지 1 mL에 부유하였다.

라. 지방줄기세포의 결합도 측정

각 군에서 각 농도의 세포 부유액 1 mL를 24-well culture plate에 각각 분주하였고, 각 군의 준비된 분쇄진피기질을 각각 1 mg씩 첨가하고 나서 배양기안에서 밤새 흔들면서 배양한 후, 70 μm 세포여과기(70 μm Falcon® cell strainer; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)로 각각을 걸러 분쇄진피기질에 부착하지 않고 여과기를 빠져 나오는 세포의 수를 hemocytomer를 이용하여 측정하여 세포 결합도를 계산하였다.

'세포 결합도 = (총 세포 수 - 부착하지 않은 세포 수) / 총 세포 수 × 100' 식으로 계산하였다.

마. 지방줄기세포−분쇄진피기질 복합체 배양

각 군별로 준비된 지방줄기세포를 준비된 분쇄진피기질 100 mg과 5×10^4 cells/mg 농도로 혼합하여 배양기에서 밤새 흔들면서 배양한 후, 복합체 10 mg(지방줄기세포 부착된 분쇄진피기질 10 mg) 씩을 10% 우태아 혈청 포함 DMEM/F-12 배지 1 mL씩 들어있는 24-well plate에 분주하고 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 21일간 배양하였다. 배양액은 3일마다 교환하였다.

바. 지방줄기세포의 증식도 측정

분쇄진피기질에 부착된 지방줄기세포의 증식도를 측정하기 위하여 배양 4, 7, 14, 21일에 Sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate labeling reagents (XTT; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) 200 μl를 electron-coupling reagent와 함께 각각의 well에 분주하고 24시간 후, 배지의 흡광도를 분광측광기로 490 nm과 690 nm에서 측정하여 세포 증식도를 계산하였다.

'세포 증식도=(대상 배지의 두 흡광도 차 - 기준 배지의 두 흡광도 차)'

사. 주사전자현미경

배양 7일과 21일에 채취한 복합체는 0.1 M cacodylate buffer에 3% glutaraldehyde과 4% paraformaldehyde를 포함하는 고정액에 1시간 동안 상온에서 고정하고, 0.1 M cacodylate buffer로 5분씩 3번 세척 후, 1% Osmium tetroxide 혼합된 0.1 M cacodylate buffer로 2시간 동안 고정하고 에탄올로 탈수하고 임계점 건조(critical point drying) 후, 마지막으로 스퍼터 코팅을 하고 JSM 5410 LV(Jeol LTD, Tokyo, Japan) 주사현미경으로 관찰하였다.

아. 통계처리

본 실험 결과로 얻은 성적은 산술 평균치와 표준편차로 표시하였고, 각 군의 결과를 비교함에 있어 통계적 유의성을 확인하기 위하여, SPSS for Windows 프로그램을 사용하여, 이원 배치 분산 분석과 Scheffe 다중비교법으로 검정하였으며, 유의수준은 5% 미만으로 하였다.

III. 결 과

가. 세포 결합도 변화(Fig. 1)

Biotin 군의 세포 결합도는 1 mg의 분쇄진피기질 당 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 그리고 5×10^6개 세포를 적용시켰을 때 84.87 ± 6.44%, 93.8 ± 2.57%, 86.88 ± 6.25%, 78.25 ± 6.30%, 81.81 ± 4.30%, 그리고 38.33 ± 24.08%로 대조군(55.56 ± 24.01%, 45 ± 12.42%, 45.63 ± 4.27%, 49 ± 11.61%, 54.3 ± 12.33%, 16.67 ± 11.79 %)과 혈청군(83.34 ± 8.18%, 76.83 ± 6.06%, 78.13 ± 3.15 %, 78.5 ± 5.92%, 60.63 ± 13.29%, 33.34 ± 28.06%)보다 통계적으로 유의하게 높았고, 혈청군이 대조군보다 높았다(이원배치 분산분석법, F=41.288, p=0.000). 세포 결합도는 첨가한 세포 수를 달리할 때 통계적으로 유의한 차이를 보였다(이원배치 분산분석법, F=20.367, p= 0.000)

세포 수에 따른 각 군의 결합도를 비교하였을 때 분쇄진피기질 1 mg 당 5×10^6 세포를 적용시킨 경우는 모든 군에서 공히 유의하게 낮은 결합도를 보였고, Biotin 군에서 5×10^4개 지방줄기세포를 부착시켰을 때 93.8 ± 2.57%로 모든 군 중 가장 높은 결합도를 보였다(p< 0.05).

나. 증식도 변화(Fig. 2)

대조군의 증식도는 배양 4, 7, 14, 21일에 0.58 ± 0.15, 1.21 ± 0.15, 1.44 ± 0.45, 2.70 ± 0.92로 가장 높았으며, 다음은 혈청군(0.59 ± 0.06, 1.00 ± 0.06, 1.14 ± 0.19, 2.64 ± 0.77)이 biotin군(0.48 ± 0.11, 0.82 ± 0.42, 0.95 ± 0.17, 2.22 ± 0.45)보다 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(이원배치 분산분석법, F=3.072, p=0.059). 증식도는 시간이 지나감에 따라 점차 증가하는 양상을 보였고 이는 통계적으로 유의한 차이가 있었다(F=47.913, p=0.000).

배양 4일, 7일, 14일, 21일 각 배양일에서 세 군간의 증식도는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 모든 군에서 배양 4일, 7일, 14일에 증식도는 조금씩 증가하였으나 유의한 차이가 없었다. 반면, 배양 21일에는 통계적으로 유의한 차이를 보이며 크게 증가하였다(p<0.05).

다. 주사전자현미경 소견

주사전자현미경 관찰에서 지방줄기세포 없이 분쇄진피기질만 배양한 경우에는 세포가 발견되지 않았으며 분쇄진피기질이 마른 나무뿌리 조각의 형태를 보였다

Fig. 1. The attaching efficiency of adipose stem cells(ASCs) with micronized acellular dermal matrix. The ASCs were attached to micronized acellular dermal matrix and cultured for 1 day. The attaching efficiency was calculated from the number of non-attached cells after removing ASC-allo-derm complex. The values represent mean ± standard deviation (error bar). *: p<0.05, compared with control group. †: p<0.05, compared with serum group.

(Fig. 3, Above, left). 지방줄기세포를 이식 후 7일간 배양한 지방줄기세포-분쇄진피기질 복합체는 분쇄진피기질 위에 지방줄기세포가 부착되어 일부 덮여 있는 모습을 보였고(Fig. 3, Above, right), 배양 21일에는 지방

Fig. 2. Changes in the proliferation rates of ASCs for 21 days. The ASCs(5×10^4 cells/1 mg of micronized acellular dermal matrix) were cultured in three groups: control group, serum group, and biotinylated group. The proliferation rates of ASCs were determined by XTT colorimetric assay. The values represent mean ± standard deviation(error bar). *: $p<0.05$, compared to the proliferation rates at 4, 7, 14 days in control group. †: $p<0.05$, compared to the proliferation rates at 4, 7, 14 days in serum group. +: $p<0.05$, compared to the proliferation rates at 4, 7, 14 days in biotin group.

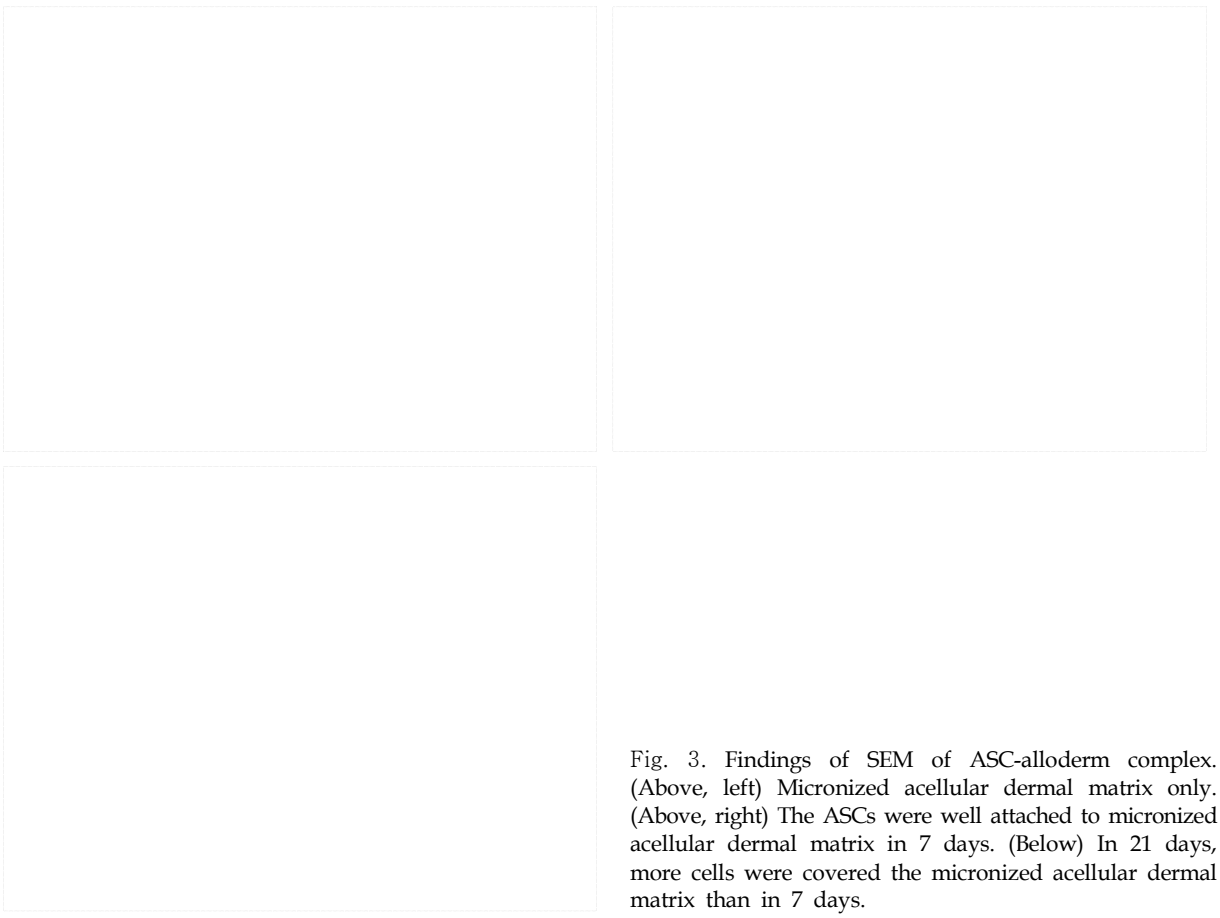

Fig. 3. Findings of SEM of ASC-alloderm complex. (Above, left) Micronized acellular dermal matrix only. (Above, right) The ASCs were well attached to micronized acellular dermal matrix in 7 days. (Below) In 21 days, more cells were covered the micronized acellular dermal matrix than in 7 days.

줄기세포가 매우 증식되어 분쇄진피기질을 거의 덮는 양상을 보여주었다(Fig. 3, Below).

IV. 고 찰

조직 공학에서 배양된 세포를 자가 조직 대신에 대체할 수 있는 조직으로 제작하기 위해서는 세포를 삼차원적 구조로 만들어 주는 지지체가 반드시 필요하다. 공여자로부터 얻은 세포는 증식하여 수를 늘린다 하더라도 무한정으로 많은 수를 얻을 수 없다. 그러므로 확보된 세포를 이용하여 조직을 제작할 때 그 활용도를 높이는 것이 중요한데 여기서 지지체에 대한 세포 친화력이 매우 중요한 요소이다.[5] 세포 친화력은 세포 부착과 세포 성장 두 가지 중요한 요인을 포함하는데 이들은 세포의 증식과 분화에 직접적인 영향을 준다.[6] 여러 연구에서 지지체 표면의 특성, 즉 친수성/소수성 정도, 표면 에너지 정도, 표면 전하 정도, 표면 거친 정도가 세포 부착과 성장에 큰 영향을 미치는 것을 보여주었는데, 일반적으로 지지체 표면이 적당히 친수성을 띄고, 양전하를 띄며, 높은 표면 에너지와 거친 표면을 가진 경우 세포 친화도가 좋다고 알려져 있다.[7,8] 콜라겐, 알부민, fibronectin 같은 단백질로 지지체를 코팅하는 것만으로 친화력을 증가시킬 수 있는데, Kral은 지방전구세포를 이용한 실험에서 코팅되지 않은 polytetrafluoroethylene mesh에는 세포가 부착되지 않지만, 단백질로 코팅하면 잘 부착한다고 했다.[9] 또 다른 방법으로 noncovalent bioreceptor- ligand 상호작용으로 지금까지 발견된 결합 친화력 중 매우 특이적이고 특징적이며 가장 강력한 결합력을 보여 주는 avidin과 biotin을 이용하여, Bhat 등은 biotin화시킨 우동맥 내피세포가 avidin을 매개로 부착하면 부착력이 증진된다는 것을 보여주었다.[1] 본 실험에서도 지방줄기세포를 분쇄진피기질에 부착시킬 때 biotin처리한 군에서 세포 결합도가 높게 측정되었다. 이는 앞선 보고와 같이 avidin-biotin결합이 분쇄진피기질에 대한 지방줄기세포의 친화력을 향상시킨다는 것을 의미한다.

지방줄기세포는 매우 빠르게 증식하고, 분화가 잘되며, 최소 침습적으로 얻을 수 있는 특징 때문에 지방조직공학의 이상적인 세포로 알려져 있어 최근 들어 지방줄기세포를 이용하여 많은 연구가 이루어지고 있다.[10,11] 본 연구에서도 지방조직공학을 연구의 일환으로 지방줄기세포를 선택했다.

무세포 진피기질은 피부와 구강 점막에 대한 조직공학에서 좋은 지지체로 사용되어 왔는데 배양된 상피세포와 진피기질을 이용하여 복층 구조를 갖는 인공피부와 인공점막을 제작한 보고가 있다.[3,12] 본 연구에서는 분쇄진피기질을 지지체로 사용하였는데, 분쇄진피기질은 주사 가능한 형태로서 연부조직 보충에 사용되어온 물질[4]로 지방조직공학에 접목하여 피브린 글루[13]나 알지네이트 겔[14]을 이용한 인공지방 연구에서처럼 주사가능 인공지방 연구하고자 하였다.

본 연구에서의 XTT 세포 증식도 측정에서 지방줄기세포가 분쇄진피기질에서 잘 생존하면서 활발히 증식이 일어나고 있다는 것을 보여 주었는데, 모든 군에서 증식도는 시간이 갈수록 현저한 증가를 보였다. 대조군에 비해 혈청군과 biotin화 군이 낮은 증식도를 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않아 avidin-biotin 결합력이 세포 증식에는 영향을 주지 않음을 보여주었으며, 이는 분쇄진피기질도 지방줄기세포의 지지체로 사용 가능하다는 것을 시사한다. 또한 분쇄진피기질은 주사 가능 형태의 재질로써 향후 분쇄진피기질 내 지방줄기세포의 분화 유도, 생체 실험 등 보다 더 많은 연구를 통하여 주사 가능한 연부조직 충전물 개발에 이용될 수 있을 것이다.

V. 결 론

조직공학의 목표 중 하나는 공여부에 최소의 결손을 남기면서 가능한 한 많은 양의 세포를 이용하여 대체조직을 만드는 것이다. Avidin-biotin의 사용은 지방줄기세포가 분쇄진피기질에 부착하는 것을 촉진시키며, 지방줄기 세포의 생존에 영향을 주지 않았다. Avidin-biotin 결합력은 조직공학에서 어렵게 확보한 세포의 활용도를 높일 수 있어, 이는 지방조직공학에서도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Bhat VD, Truskey GA, Reichert WM: Using avidin-mediated binding to enhance initial endothelial cell attachment and spreading. *J Biomed Mater Res* 40: 57, 1998
2. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R: Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 113: 143, 1991
3. Hickerson WL, Compton C, Fletchall S, Smith LR: Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage. *Burns* 20: S52, 1994
4. Maloney BP, Murphy BA, Cole HP 3rd: Cymetra. *Facial Plast Surg* 20: 129, 2004
5. Ryu GH, Yang WS, Roh HW, Lee IS, Kim JK, Lee GH, Lee DH, Park BJ, Lee MS, Park JC: Plasma surface

modification of poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) (65/35) film for tissue engineering. *Surf Coat Technol* 193: 60, 2005
6. Anselme K: Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667, 2000
7. Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ: Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Eng* 7: 55, 2001
8. Webb K, Hlady V, Tresco PA: Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J Biomed Mater Res* 41: 422, 1998
9. Kral JG, Crandall DL: Development of a human adipocyte synthetic polymer scaffold. *Plast Reconstr Surg* 104: 1732, 1999
10. Hong L, Peptan IA, Colpan A, Daw JL: Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs* 183: 133, 2006
11. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G: Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 255, 2004
12. Izumi K, Takacs G, Terashi H, Feinberg SE: *Ex vivo* development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg* 57: 571, 1999
13. Schoeller T, Lille S, Wechselberger G, Otto A, Mowlavi A, Piza-Katzer H: Histomorphologic and volumetric analysis of implanted autologous preadipocyte cultures suspended in fibrin glue: a potential new source for tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 25: 57, 2001
14. Yoo G, Yea BH, Rhie JW, Kwon H, Wee SS, Ahn ST: Growth and differentiation of preadipocytes in alginate and collagen gels. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 27: 386, 2000