

Particulate Leaching 기법을 사용한 Polymer Scaffold 상의 세포증식에 있어서 젤라틴 입자의 효과

서수원¹, 신지연¹, 김진훈¹, 김진국², 길광현¹

¹성균관대학교 삼성서울병원 의공학과, ²삼성서울병원 흉부외과
(2003년 9월 13일 접수, 2004년 1월 7일 채택)

Effect of Gelatin Particles on Cell Proliferation in Polymer Scaffolds Made Using Particulate Leaching Technique.

Soo Won Suh¹, Ji Youn Shin¹, Jinhoon Kim¹, Jhingook Kim², Kwanghyun Kil¹

¹Department of Biomedical engineering, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

²Department of Thoracic surgery, Samsung Medical Center School of Medicine, Seoul, Korea

(Received September 13, 2003. Accepted January 7, 2004)

요약 : 조직공학은 생명과학, 의학, 공학의 기본개념 및 기술을 바탕으로 생체조직을 대체할 수 있는 인공조직 및 장기를 제작하여 이식함으로써 생체의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목표로 하는데 여기에 사용되는 기본 재료가 장거나 조직의 형태를 만들도록 돕는 scaffold이다. Scaffold를 만드는데 있어서 Solvent-casting과 particulate leaching 기법은 다공성 폴리머 scaffold의 제조에서 널리 쓰이는 방법인데 여기 쓰이는 particle에는 소금과 젤라틴 등이 사용되고 있다. 소금은 얻기가 쉽고 다루기에도 편리하다는 장점 때문에 가장 일반적으로 사용되고 있으며 젤라틴은 소금에 비하여 세포의 초기 부착과 증식에 유리하다는 이유로 최근에 많이 사용되고 있으나 이에 관한 비교실험은 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 소금과 젤라틴으로 만들어진 두 가지 scaffold를 비교해 보았으며 그 결과 젤라틴 scaffold가 초기상태의 세포 부착과 증식에 있어서 좋은 결과를 보였고 같은 공극율일 때 공극의 연결 상태가 훨씬 더 우수한 결과를 보였다. (주요단어 : PLGA, salt scaffold, gelatin scaffold)

Abstract : On the background of general idea and technique of bioscience, medicine and engineering, tissue engineering aim at maintenance, improvement and repair of human body function through manufacturing and transplantation of artificial tissue and organ exchangeable human body. Basic material used in the area is scaffold that aid tissue and organ formation.

Making scaffold, solvent-casting and particulate leaching technique is widely used in manufacturing of porous polymer scaffold. There are many types of particle including salt and gelatin. Salt is a most commonly used particulate because it is easily available and very easy to handle and gelatin particle is another candidate for this method because it is known as a material, which enhances cell attachment and proliferation. But there is no comparative study of two kinds of materials.

In this study we compared the biocompatibility of the two scaffolds made from salt (salt scaffold) and gelatin particle (gelatin scaffold).

These results demonstrated that gelatin scaffold showed better attachment of cells at the initial stage and better proliferation of cells. The better performance of gelatin scaffold is contributed to the better connection of pores in the same porosity.

Key words : PLGA, salt scaffold, gelatin scaffold

서 론

지난 수십 년간 이식기술은 공여 장거나 인공장기를 이식하여 장거나 생체기능을 대신할 수 있도록 발전해왔다. 그러나 장기를 이식할 경우 충분한 수의 장기가 없어서 다른 동물이나 인간의 시체에서 척출해서 사용하는 경우가 많으며 이렇게 장기를 이식하여도 기능성 및 면역 반응 등의 문제로 인해 다시 대처해야 하는 문제가 발생한다.[1],[2]

또한 인공장기들의 근본적인 생체적합성 한계 또는 손상된 장거나 조직의 생체기능상의 결핍성 때문에 기능성이 부

여된 장기를 개발하는데 많은 연구가 집중되고 있다. 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 대안으로 제시된 조직공학은 자가 세포를 이용하여 장기를 재생하는 방법을 사용하기 때문에 면역학적 거부반응이 없는 생체 장기를 만들 수 있다는 장점을 가지고 있어 집중적으로 연구되고 있다. 조직공학에 있어서 새로운 자가 조직으로 만들기 위해서는 환자로부터 얻은 세포를 많은 양으로 증식시키는 것이 필수적이다.[3]

조직에서 얻은 다양한 세포는 체외에서 배양하여 작은 조직으로 만들 수는 있지만 어느 정도 크기 이상의 조직으로 만들기에는 많은 어려움이 있다. 일정 크기 이상의 조직을 만들기 위해서는 세포를 지지해 줄 수 있는 구조체가 필요한데 조직공학에서 생분해성 폴리머가 새로운 조직을 만들기 위한 지지체로 많이 개발되고 사용되어 왔다.[4]

생분해성 폴리머 구조체는 이식된 세포와 숙주의 세포로 인해 조직으로 발달함에 따라 서서히 흡수되어 녹아버리면서

통신저자 : 서수원, Ph. D.(135-230)서울 강남구 일원동 50

성균관대학교 삼성서울병원 의공학과

Tel : 02)3410-3683

Fax : 02)3410-2639

E-mail : sswbme@smc.samsung.co.kr

조직의 재생을 효과적으로 돕는 역할을 하는데 이런 구조체는 높은 공극성과 표면 대 체적 비를 갖고 있으며 이는 세포와 구조물, 조직재생, 양분 확산에 있어서 중요한 인자이다.[3],[5],[7]

생분해성 폴리머의 내부에 있는 많은 공극은 세포가 성장, 분열함에 따라 서서히 채워지면서 조직을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 공극을 만드는 여러 가지 물질 중에서 소금과 젤라틴이 사용상의 용이성과 인체에 무해함으로 인해 가장 많이 사용되고 있지만 두 종류의 물질을 사용한 scaffold가 공극의 형상이나 특성에 차이를 보이며 특히 소금의 경우 적은 양이라도 scaffold내에 남아 있으면 세포의 성장에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다.

본 연구에서는 소금과 젤라틴 두 가지 물질을 사용한 scaffold를 비교함으로써 세포의 배양과 접합에 좀 더 효과적인 scaffold를 찾고자 하여 scaffold에서 연골세포와 평활근세포가 자라는 것을 조직학적 분석과 alamar blue assay를 사용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

Scaffold의 제작

PLGA(poly lactic and glycolic acids, Resomer, boehringer ingelheimite)와 chloroform(SIGMA, USA)을 섞어 50°C에서 교반하면서 녹여 10% PLGA 용액을 만든다.

젤라틴과 소금 입자를 채로 걸러 particle size가 100um에서 180um가 되는 것만 분리하여 PLGA용액에 젤라틴과 소금을 각기 섞어 95%의 공극률을 갖도록 만든 다음 일정한 크기를 갖는 Teflon mold에 부어 상온에서 굳힌다.

용액내의 solvent는 진공건조 방법으로 모두 증발시키고 내부의 젤라틴과 소금입자는 37°C 물에 48시간 동안 녹여내고 건조한 후 소독하여 사용한다. Salt/gelatin PLGA scaffold는 7mm X 7mm X 2mm 크기로 만들어졌다.

연골세포 배양

잡종견의 무릎관절 부분에서 연골조직을 외과용 도구를 사용하여 끊어낸 다음 항생제가 들어있는 배양액에 담가서 가져온다. 연골조직을 해부용 가위와 칼을 사용하여 잘게 자르고 0.02%의 type II collagenase (GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES)에 침지하여 37°C, 1000rpm에서 20분 동안 처리한다.

상층액을 털어내어 1500rpm에서 5분간 원심분리한 후 얻은 세포를 PBS로 여러 번 세척한 다음 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 배양하고(Figure 1) 일주일에 두 번씩 배양액을 교체하였다.

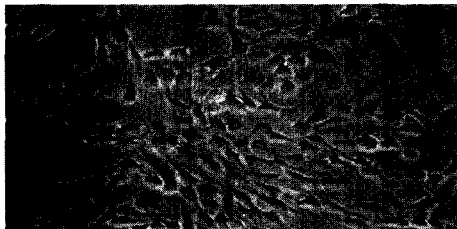


그림 1. 배양한 chondrocyte(X200).
Fig. 1. Cultured chondrocytes(X200)

평활근세포 배양

잡종견의 방광조직을 수술용 도구를 사용하여 3X3cm 크기로 잘라내고 점막과 근육 층을 분리한 다음 근육조직을 항생제가 들어있는 배양액에 담가서 가져온다. 근육조직을 해부용 가위와 칼을 사용하여 잘게 자른 후 0.02% collagenase type II 용액에 20-30분간 처리하고 4°C에서 5분 동안 1500rpm으로 원심 분리하여 세포를 얻는다.

분리한 세포는 DMEM(10% FBS, 1% penicillin-streptomycin) 배지에 배양하고(Figure 2) 일주일에 두 번씩 배양액을 교체하였다.

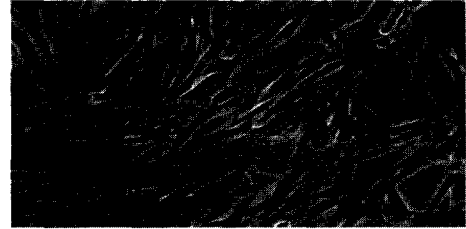


그림 2. 배양한 smooth muscle cell(X200)
Fig. 2. Cultured smooth muscle cell(X200)

세포이식

세균에 의한 오염을 방지하기 위하여 scaffold를 알코올에 미리 적신 후 UV하에서 3시간 동안 소독한다.

세포를 이식하기 전에 PBS로 세척한 다음 1.8x10⁶ 개의 세포를 50μl의 배양용액에 풀어 각각의 scaffold에 세포를 이식한 후 하루 정도 그대로 두어 많은 양의 세포가 scaffold에 접합하도록 한 다음 배지를 더한다.

Scaffold와 세포의 관찰

Scaffold의 pore 상태는 SEM으로 관찰하고 세포를 배양한 cell-polymer construct는 Hematoxylin/Eosin 염색과 Alamar Blue assay(SEROTEC U.K.)로 측정하여 성장정도를 비교하였다. Alamar blue assay는 세포의 산화-환원작용을 측정하여 발색정도에 따라 성장과 대사를 측정하는 방법으로 살아있는 세포에 영향을 주지 않고 사용할 수 있는 간단한 방법이다.

동물의 마취와 관리

실험에 사용한 동물은 15-20kg의 잡종견을 사용했으며 thiopental sodium을 사용하여 intravenous injection방법으로 마취하고 호흡기를 통한 가스흡입(O₂ 1l/min, N₂O 1l/min, halothane 1-1.5%)으로 마취를 유지하였다.

모든 실험동물의 관리는 institute of laboratory animal resources와 national institute of health에서 제정한 guide for the care and use of laboratory animals에 따라 엄격하게 사육 및 관리하였다.

결 과

근육세포와 연골세포는 분리 후 배양이 잘되었으며(Figure 1,2) scaffold 또한 원하는 형태와 크기로 잘 성형되었다. salt scaffold보다는 gelatin scaffold가 성형성이 더 뛰어나며 공극의 연결 상태를 보기 위해 scanning electron microscope로 찍어 본 결과 똑같은 공극률일 경우 gelatin PLGA scaffold가 salt PLGA scaffold보다 공극의 연결 상태가 훨씬 좋았으며 공극도 전반적으로 균일하게 분포되었다(Figure 3, 4).

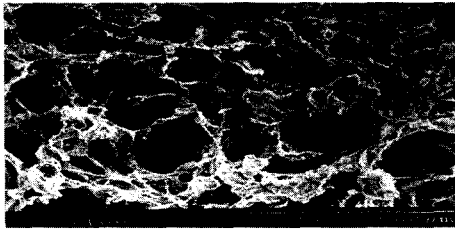


그림 3. Gelatin scaffold의 SEM 사진
Fig. 3. SEM for gelatin scaffold

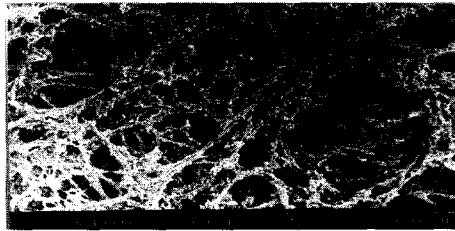


그림 4. Salt scaffold의 SEM 사진
Fig. 4. SEM for salt scaffold

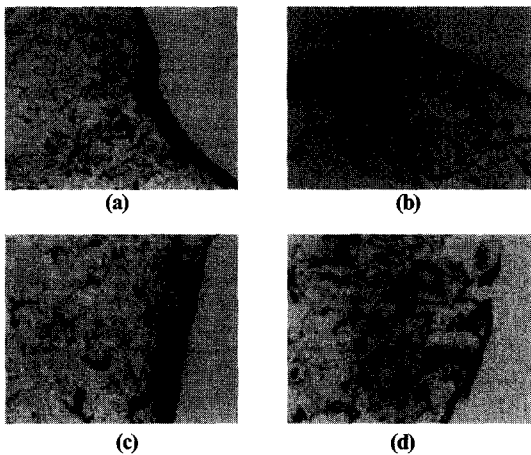


그림 5. In vitro histologies H&E 염색사진(X100):
(a) 젤라틴 scaffold상에 이식 후 3주된 Chondrocyte
(b) Salt scaffold 상에 이식 후 3주된 chondrocyte
(c) 젤라틴 scaffold상에 이식 후 3주된 smooth muscle cell
(d) Salt scaffold 상에 이식 후 3주된 smooth muscle cell
Fig. 5. H&E staining(X100)
(a) Chondrocyte on gelatin scaffold. 3 weeks after seeding
(b) Chondrocyte on salt scaffold. 3 weeks after seeding
(c) smooth muscle cell on gelatin scaffold. 3 weeks after seeding
(d) smooth muscle cell on salt scaffold. 3 weeks after seeding

세포는 형태학적 이상 없이 잘 자랐으며 세포를 scaffold에 이식한 직후에는 세포가 전체적으로 분산되어 있었으나 3주 후에는 전반적으로 고르게 퍼지고 덩어리를 만들며 일정한 형태를 형성하였고 H/E 염색을 통한 관찰에서도 scaffold 내부로 세포가 고르게 퍼지며 성장함을 알 수 있었다(Figure 5). Alamar Blue assay 결과는 세포가 배양되면서 초기에는 증식률이 높지 않았지만 일정수의 세포 수에서는 증식률이 증가하는 양상을 보였다(Figure 6).

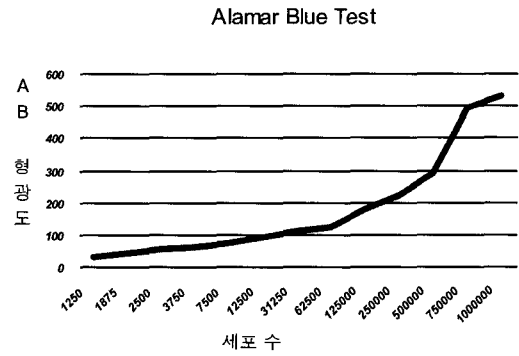


그림 6. Alamar Blue 형광강도, 세포수와 AB fluorescence 사이의 관계를 보여준다.
Fig. 6. Alamar Blue fluorescence intensity, It appear relationship between cell number and AB fluorescence

3주 동안 세포의 증식속도는 근육세포와 연골세포 모두 비슷하게 나타났으나 같은 세포의 scaffold에 따른 증식속도를 비교해보면 젤라틴을 사용한 scaffold가 salt를 사용한 scaffold보다 더 높은 AB assay 수치를 보여 젤라틴을 사용한 경우가 세포를 배양하는데 있어서 소금을 사용하는 경우보다 더 좋음을 알 수 있었다. 그리고 scaffold에 사용한 particle 종류에 따른 성장률의 차이가 연골세포에서보다는 근육세포에서 더 크게 벌어지는 결과를 보였다(Figure 7,8)

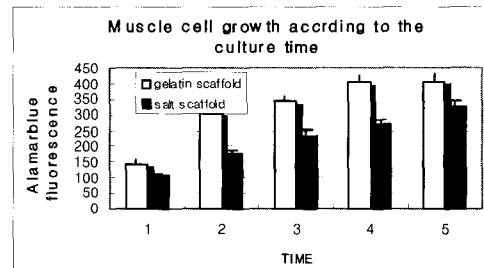


그림 7. 이식기간 동안 AB test 결과 배양시간에 따라 증가함 (time 1 = 4일)
Fig. 7. AB test result, it increase through culture time

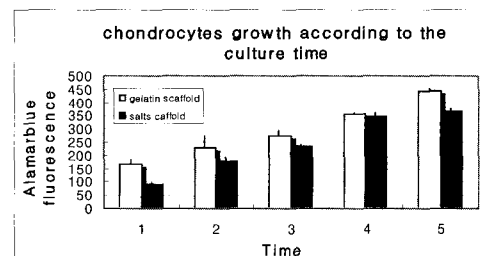


그림 8. 이식기간 동안 AB test 결과 배양시간에 따라 증가함 (time 1 = 4일)
Fig. 8. AB test result, it increase through culture time

고찰

결론

조직공학은 생명과학과 공학의 기본개념과 기술을 응용하여 생체조직의 구조와 기능사이의 상관관계를 이해하고 이를 토대로 인체조직의 대용품을 만들어 신체로 이식하여 인체의 기능을 유지, 향상 및 복원하고자 하는 학문으로 재료공학, 분자 및 세포생물학, 화학공학, 면역학, 세포유전학, 세포이식과 여러 의과학 분야 등 다양한 학문과 지식이 요구된다.[9]

여기에 기본적으로 필요한 것이 세포를 부착시키고 원하는 형태의 3차원 조직을 만드는데 사용되는 scaffold이다. Scaffold는 두 가지 중요한 특성을 가지고 있는데 그것은 조직의 완전한 재생을 위한 재료의 분해특성과 세포의 이동 성장 분화에 영향을 미치는 표면특성이다.[6],[7],[8]

분해특성은 재료가 이식 후 서서히 분해, 흡수되면서 세포가 조직으로써 제기능과 역할을 하는데 있어서, 또한 이식된 조직으로 양분과 산소가 이동함에 있어서 중요하며 표면특성은 세포가 흡착정도에 있어서 중요한 역할을 한다.[10]

또 다른 중요한 인자로 확산성질이 있는데 이는 생체 내 실험 시 생물학적 확산과 물질전달 등에서 중요한 요인으로 조직공학에 있어서는 다공성 생분해성 PLGA 고분자를 통하여 인체 내의 각종성분이 투과 및 확산되기 때문에 세포와 조직의 성장에 있어서 주요한 역할을 한다.

생분해성 scaffold를 사용하는데 있어서 잠재적인 이점은 임상적으로 사용할 수 있는 특정한 3차원 형태를 만들 수 있다는 것으로 세포기질의 분비에 따라 재료가 녹고 이식에 따른 숙주의 염증반응이 적다. 또한 이러한 합성재료는 원하는 기계적인 특성을 갖추도록 만들 수 있다는 장점이 있다.[6]

이러한 scaffold에 다공성을 주는 재료에 여러 가지 물질이 사용되는데 많이 사용되는 소금과 젤라틴에 대한 구체적인 비교자료가 없어 두 재료로 만든 scaffold를 비교하고자 본 실험을 수행하였다.

공극의 연결 상태는 세포의 성장에 있어서 중요한 역할을 하는 요소로 공극을 만드는 용매 및 제조공정에 의해 좌우된다. 본 실험에서 같은 용매와 제조공정을 사용하였음에도 젤라틴으로 만든 scaffold가 소금으로 만든 scaffold보다 더 좋은 공극 간 연결 상태를 나타낸 것은 공극을 만드는 물질의 차이가 원인이라고 사료된다. 그리고 PLGA의 비중(1.3-1.53)을 비교했을 때 젤라틴의 비중(0.9-1.2)이 소금(비중 2.16)에 비해 PLGA와 비슷하여 전체 scaffold 상에 고르게 분포되므로 젤라틴 scaffold가 더 일정한 형태를 보이고 공극 간 연결이 소금 scaffold에 비해서 더 좋았을 것으로 판단된다.

세포의 성장에 있어서도 젤라틴을 사용한 scaffold가 더 잘 성장하는 결과를 보였는데 이는 같은 공극률일 때 공극의 연결 상태가 더 좋으면 세포가 자라는데 있어서 충분한 공간이 확보되고 양분의 고른 확산이 일어나므로 세포가 성장하고 조직화하기에 더 좋은 조건을 갖추게 되므로 결과적으로 세포의 분산과 성장이 더 좋았다고 추측할 수 있다. 또한 근육세포에서 scaffold에 따른 성장률의 차이가 연결세포에서 나타나는 성장률의 차이보다 더 큰 것은 근육세포가 소금 scaffold에 더 민감하다는 것을 보여주는 것으로 사료된다.

세포의 재료표면 접합이라는 측면에 있어서도 재료의 표면에 세포의 성장에 좋지 않은 소금기가 남아 있는 것보다 세포배양기질로 사용되는 젤라틴이 남아 있는 경우 세포가 재료의 표면에 접합하는데 있어서 좀 더 효과적으로 작용했을 것이라고 추론할 수 있다.

생체재료에는 콜라겐 같은 천연재료와 각종 폴리머로 대표되는 인공재료가 있는데 어떤 종류를 사용하건 재료가 세포의 성장과 이동 및 효과적인 조직의 형성을 돕기 위해서는 재료의 공극률이 높아야 하고 동시에 공극간의 연결이 잘되어 있어야 하는데 본 연구에서는 젤라틴 scaffold가 공극의 연결에서 더 효과적으로 나타났으며 세포의 성장 또한 더 좋은 결과를 보였다. 이에 scaffold를 제조하는데 있어서 salt를 사용한 방법보다는 gelatin을 사용하는 방법이 세포의 접합과 성장에 있어서 더 유용하다는 결론을 얻었다.

참고 문헌

1. Janeway CA Jr, Travers P. "Immunobiology : The immune system in health and disease" Current biology vol 11, 30-48, 1994
2. Laura E. niklason, Robert langer "Prospect for organ and tissue replacement" JAMA 2001 FEB 7 ; 285(5) 573-576
3. "Biolaterilas for tissue engineering :summary", Tissue Enginnering vol3, num1, 71-76, 1997
4. L.E.Freed, J. C. Marquis "Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers", J. of Biomedical Materials Research, vol.27. 11-23 (1993)
5. Byung-Soo Kim, David J.Mooney "Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure",1997
6. Anthony Atala, "Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit muscle urothelium and human bladder muscle", J of Urology, vol.150. 608-612, 1993
7. Byung-Soo Kim, Andrew J.Putnam "Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices" Engineering Smooth Muscle, 46-54,1997
8. WALTER D.HOLDER,Jr.,M.D "Increased vascularization and heterogeneity of vascular structures occurring in polyglycolide matrices containig aortic endothelial cells implanted in the rat " TISSUE ENGINEERING ,vol 3, number 2, 1997
9. Langer R. Vacanti JP "Artificial organ" Scientific america" 273:130-133 1995
10. Andriano K.P. Tabata Y. Ikada Y. Heller J. "In vitro and in vivo comparison of bulk and surface hydrolysis in absorbable polymer scaffold for tissue engineering" J. Biomed mater res 1999;48(5):602-612