

다양한 단백질과 폴리펩타이드로 코팅된 PLGA 표면과 슈반세포와의 상호관계

박기숙 · 김수미 · 김문석* · 이일우** · 이종문 · 이해방* · 강길선†

전북대학교 BK-21 BIN 융합연구팀, *한국화학연구원 나노생체연구실, **가톨릭의과대학 신경외과
(2006년 7월 18일 접수, 2006년 9월 19일 채택)

Interaction of Schwann Cells with Various Protein- or Polypeptide-Coated PLGA Surfaces

Ki Suk Park, Su Mi Kim, Moon Suk Kim*, Ilwoo Lee**, John M. Rhee, Hai Bang Lee*, and Gilson Khang†

BK-21 BIN Fusion Research Team, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

*Nanobiomaterials Laboratories, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-506, Korea

**Department of Neurosurgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea,
520-2, Daeheung 2 Dong, Jung Ku, Daejeon 301-723, Korea

(Received July 18, 2006; accepted September 19, 2006)

초록 : 본 연구에서는 슈반세포와 다양한 세포 부착인자로 코팅된 고분자 표면과의 상호관계에 대해 연구하였다. 세포 부착인자로 알려진 피브로넥틴, 피브리노겐, 라미닌, 비트로넥틴, 폴리-D-라이신 및 폴리-L-라이신을 PLGA 필름에 코팅하고, 물 접촉각 측정과 ESCA 분석을 실시해 표면특성을 평가하고, 부착인자로 코팅하거나 하지 않은 PLGA 필름의 표면에 슈반세포를 배양한 후 세포 계수와 SEM 관찰을 통해 세포 부착과 성장을 알아보았다. 세포 계수 결과에서 세포 부착은 PLGA 표면의 단백질 흡착과 관련있음을 확인할 수 있었으며, 세포의 성장은 배양액의 우태아혈청 함량의 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 슈반세포의 부착과 성장이 특정한 세포 부착인자에 의해 영향을 받음을 알 수 있었다. 본 실험의 결과를 통해 조직공학적 신경 재생에 응용하기 위한 신경유도관의 개발에서 세포의 부착과 성장을 향상시키기 위해서는 세포의 종류 및 배양조건에 따라 신경유도관이 적절한 표면환경을 제공해야 함이 필수적임을 알 수 있었다.

Abstract : In this study, we investigated interaction of Schwann cells (SCs) with various cell-adhesive coated polymer surface. We used cell-adhesives that like a fibronectin (FN), fibrinogen (FG), laminin (LM), vitronectin (VN), poly-D-lysine (PDL), and poly-L-lysine (PLL) to coat PLGA film surface and evaluated the surface property of coated or not PLGA films by measurement of water contact angle and ESCA. SCs were cultured on coated or non-coated PLGA film surface, and then examined the cell adhesion and proliferation by cell count and SEM observation. Cell count results revealed initial cell adhesion related to protein adsorption on PLGA surface. In addition, serum content in media related to cell proliferation rate. In this result, we recognized that adhesion and proliferation of SCs were affected by specific cell-adhesives. In these results, we recognized that is important to provide the suitable surface environment according to cell types and culture condition for improvement of cell adhesion and proliferation.

Keywords : cell-adhesive, Schwann cell, PLGA, protein, peptide.

서 론

신경재생에 있어 고분자 재료를 이용한 신경 유도관의 개발이 최근 부각되고 있는데, 이러한 신경 유도관의 재료로서 생분해성 고분자인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA)와 이들의 공중

합체(PLGA)가 우수한 생체적합성 및 생분해성, 분해기간 조절 가능성으로 인해 여러 신경유도관 연구에 응용되어 왔다. 조직공학적 신경재생에서 세포-생체재료 사이 혹은 세포-세포외 기질간의 상호작용은 세포의 증식과 분화에 중요한 영향을 끼친다. 이러한 상호작용은 재료의 표면성질에 의해 결정되게 되는데, 재료의 표면성질에는 젖음성, 화학, 전하, 거침성, 경직성 등을 포함하며 이 특성에 따라 특정 부위의 이식재료로 활용될 수 있으며, 또한 표면개질

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

을 통해 재료의 표면성질의 한계를 극복하기도 한다.¹

일반적으로 합성고분자는 세포와 특이적인 상호작용을 하지 않는 경우가 대부분이다. 조직공학에서 널리 사용되고 있는 생분해성 고분자인 PGA, PLA 및 PLGA는 생체재료로서 생분해성 조절가능성의 장점을 가지고 있지만, 이들의 표면 소수성으로 인해 세포와의 초기 부착이 저하되어 이를 극복하기 위한 실험이 진행되고 있다. 세포는 리간드 즉 각종 호르몬, 사이토카인 또는 세포의 매트릭스에 대한 수용체를 세포막 상에 지니고 있어서 합성고분자에 이들 리간드를 고정화하면 세포는 리간드-수용체 상호작용에 의해 합성고분자 위에 정착된다고 알려져 있다.^{2,3} 따라서 많은 연구에서 고분자 표면에서의 세포의 부착과 성장을 보다 우수하게 하기 위해 리간드를 고정화하여 세포친화성을 부여하거나⁴⁻⁶ 혹은 강산이나 강염기를 처리한 친수성 부여,⁷⁻¹³ 플라즈마나 코로나 처리를 통한 표면개질,¹⁴⁻²⁴ 단백질 흡착을 통한 표면개질 등의^{25,26} 다양한 방법을 이용하여 고분자 재료에 세포친화성을 부여하는 실험들이 진행되고 있다. 일련의 실험결과를 통하여 고분자의 표면을 물리적 또는 화학적으로 처리하거나, 단백질을 흡착시켜 표면처리되지 않은 고분자 표면에 비해 세포 부착도가 우수해진다고 알려져 있으며, 코로나 방전 등의 방법에 비해 단백질이 흡착된 표면에서의 부착도가 더 우수하게 관찰된다는 사례가 있었다.

접착성 당단백질은 세포가 세포의 기질에 부착하는데 도움을 준다고 알려져 있으며, 이러한 접착성 당단백질로는 피브로넥틴, 라미닌, 테네이신, 비트로넥틴, 트롬보스폰딘 등이 대표적이며, 정착인자는 일반적으로 배양액속에 포함된 혈청에 의해 공급되지만 무혈청 배양에서는 이를 따로 공급해주시기도 한다.²⁷ 이들은 세포의 부착과 신장, 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 연구되어져 왔는데,²⁸⁻³⁵ 이러한 접착성 당단백질류가 세포의 부착을 향상시키는 이유로는 세포막에 존재하는 세포의 부착에 기인하는 인자들 때문인데, 예로 폴리라이신의 경우에는 정전기적 인력이 그 인자로 작용하는데 이는 폴리라이신의 경우 양전하를 띠고 있으며 일반적으로 세포막은 음전하를 가지고 있어 세포의 정착을 향상시킨다고 보고된 바 있다.

본 연구에서는 소수성 표면을 가져 비교적 세포 부착도가 떨어지는 PLGA 고분자 표면에 세포 부착 및 성장을 향상시키기 위해 세포 부착성 단백질인 피브로넥틴(FN), 피브리노젠(FG), 라미닌(LM), 비트로넥틴(VN)과 폴리펩타이드인 폴리-D-라이신(PDL) 및 폴리-L-라이신(PLL)을 흡착시켜 표면을 코팅하였다. 또한 그동안의 표면개질 연구에 있어서는 주로 결합조직이나 상피조직 혹은 세포와 개질된 고분자의 표면과의 상호관계에 대한 연구가 대부분이었다면, 본 연구에서는 신경교세포인 슈반세포와 고분자의 표면과

의 상호관계를 연구하였다. 이미 지난 연구에서 슈반세포를 이용하여 염소산 처리된 PLGA 필름의 표면과의 상호관계에 대한 연구가 진행된 바 있으나, 본 실험에서는 PLGA 필름에 정착인자를 코팅하여 슈반세포가 부착 및 성장하는데 가장 적합한 특성을 지닌 정착인자를 확인하고자 세포의 부착과 성장거동을 비교하였다.

실 험

시약 및 재료 필름의 재료인 PLGA(Resomer[®] RG 756, lactic acid:glycolic acid molar ratio=75 : 25, 90000 g/mole)는 Boehringer Ingelheim사(Germany)로부터 구입하였다. 정착인자로는 FN(Sigma Co., USA), FG(Sigma Co.), LM(Sigma Co.), VN(Sigma Co.), PDL(Sigma Co.), 및 PLL(Sigma Co.)을 사용하였으며, 세포 배양액으로는 Dulbecco's modified essential media (DMEM) 및 우태아혈청(FBS), 페니실린-스트렙토마이신(PS)를 Gibco BRL. (USA)사에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 메틸렌 클로라이드(MC, Tedia Co. INC., USA) 등의 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였고, 3차 증류수는 멸균하여 사용하였다.

PLGA 필름의 준비 및 단백질 혹은 폴리펩타이드 코팅. PLGA 1 g을 MC 20 mL에 용해시켜 5% PLGA 용액을 준비한 후 유리재질의 페트리접시에 6 mL씩 부어서 상온에서 건조시켜 용액 캐스팅하여 100±30 μm 두께의 필름을 제조하였다. 제조된 필름은 70% 에탄올로 멸균한 다음 3차 증류수로 세척, 건조하여 사용하였다. 건조된 필름에 FN, FG, LM, VN, PDL, PLL용액으로 37 °C에서 1시간씩 인큐베이션한 후 표면에 부착되지 않은 단백질 혹은 폴리펩타이드를 제거하기 위해 3차 증류수로 세척한 다음 건조하는 과정을 3회 반복 실시함으로써 PLGA 필름에 정착인자를 코팅하였다. 각 단백질과 폴리펩타이드의 농도는 Table 1과 같다.

PLGA 필름의 표면 분석. 코팅된 PLGA 필름과 코팅하지 않은 PLGA 필름표면의 친수성을 확인하기 위해 물과 배양액(FBS 포함)에서의 접촉각을 측정하였다. 이 방법은 필름표면에 물방울을 떨어뜨려 물과 표면이 이루는 각을 측정하는 방법으로, 일반적으로 접촉각이 클수록 소수성이 증가하고 접촉각이 작을수록 친수성이 증가한다. 물 접촉각 측정기(TantecTM, CAM-PLUS micro, USA)를 이용하여 시료에 10 μL의 증류수 혹은 배양액을 떨어뜨리고 각각의 물방울이 재료의 표면과 이루는 접촉각을 측정하였다. 각 시료의 표면에서 5회 이상 측정된 후 평균값을 취하여 물 접촉각으로 사용하였다. 또한 단백질 혹은 폴리펩타이드로 코팅된 PLGA 필름과 대조군인 코팅하지 않은 PLGA 필름의 표면을 관찰하기 위해

Table 1. Proteins and Polypeptides Used for Precoating

Kind	Code Name	Source	Concentration (μg/mL)
Fibronectin	FN	Bovine plasma; 0.1% solution	100
Fibrinogen	FG	Human plasma; Fraction I Type III; ~15% sodium citrate and 20% sodium chloride; Protein 68%, clottable protein 63%	100
Laminin	LM	Basement membrane of emglebreth-holm-swarm mouse sarcoma	100
Vitronectin	VN	Human plasma	5
Poly-D-lysine	PDL	Hydrobromide; Mol. wt., 70,000~150,000	100
Poly-L-lysine	PLL	Hydrobromide; Mol. wt., 70,000~150,000	100

SEM으로 관찰을 실시하였다. 또한 코팅된 PLGA 필름표면의 화학구조 변화를 확인하기 위해 ESCA(ESCALAB MK II, V. G. Scientific Co., UK)분석을 통해 질소 1S 피크값으로 상대적으로 흡착된 단백질 혹은 폴리펩타이드의 양을 확인하였다. 상대적인 단백질 혹은 펩타이드의 흡착량은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.²⁴

$$\text{상대적인 흡착량} = \frac{(\text{흡착된 단백질 혹은 폴리펩타이드 N\%})}{(\text{순수한 단백질 혹은 폴리펩타이드 분말의 N\%})}$$

단백질 혹은 폴리펩타이드로 코팅된 표면에서의 슈반세포 배양

본 실험에서는 이전의 실험에서 사용한 Morrissey의 방법에 기초한 슈반세포 분리방법을 사용하였다. 우선 F344 rat(Japan SLC INC., Japan)으로부터 분리한 좌골신경을 PBS로 세척한 다음 상피를 제거하고 혈관 및 여타의 조직을 제거한 다음, 잘게 자른다. 잘게 자른 신경조직을 well plate에 4~5조각 정도를 넣고 일주일마다 신경조직을 수거해 새로운 well plate로 옮겨 줌으로써 섬유아세포를 1차 제거한다. 5주 동안 배양한 신경조직을 수거한 다음 콜라게나아제와 트립신을 1:1 비율로 넣어 15분간 인큐베이션한다. 인큐베이션하는 중간에 조직을 살짝 흔들어준다. 이를 원심 분리하여 상등액을 제거한 다음, 다시 콜라게나아제와 트립신 혼합액을 넣어 다시 15분간 인큐베이션한 다음 원심 분리하여 상등액을 제거하고 배양액을 넣은 후 파스퇴르 피펫(혹은 주사기)을 이용하여 신경의 기질을 제거하고 단일세포로 분리하였다. 이 과정에서 얻어낸 슈반세포를 폴리-L-라이신으로 코팅한 배양용기에 옮긴 후, 신선한 DMEM/F12 배양액에 2 μM forskolin(Sigma Chem. Co., USA)과 20 μg/mL 뇌하수 추출물(Gibco BRL, USA)을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 배양하였다. 분리된 슈반세포는 특성결정을 위해 S-100 단백질 및 GFAP로 면역화학적 염색을 실시하였다.

세포수 측정. 앞서 분리한 슈반세포를 1~2회 계대 배양하여, 세포를 대량배양한 후 트립신-EDTA 처리하여 세포를 분리한 다음 사용하였다. 처리하지 않은 PLGA 필름을 대조군으로 하고 접촉인자로 알려진 단백질 및 폴리펩타이드로 코팅된 PLGA 필름에 각각 슈반세포를 2.5×10⁵ 세포수/필름(필름의 면적; 약 25 cm²)의 농도로 파종한 다음 FBS를 포함한 배양액과 무혈청 배양액을 공급해 주고 37 °C의 세포 배양기에서 배양하였다. 1, 2, 및 3일이 경과하면 배양액을 제거하고, 인산염완충식염수(PBS, Gibco BRL.)로 세척한 다음 세포를 트립신 처리해서 계수하여 배양액 내의 FBS 첨가 유무에 따른 각 군별 세포수를 측정하여 비교하였다.

SEM 관찰. 접착성 단백질 및 폴리펩타이드로 코팅된 고분자 필름 표면에서 배양된 슈반세포의 부착 및 성장거동을 통해 여러 가지 흡착된 단백질과 폴리펩타이드에 따른 세포의 수와 형태를 관찰하였다. 코팅된 PLGA 필름의 표면에 슈반세포를 2.5×10⁵ 세포수/필름의 농도로 파종한 다음 FBS를 포함한 배양액과 무혈청 배양액을 공급하여 하루 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 수회 세척하여 이물질을 제거하였다. 이를 10% 포르말린(Sigma Chem Co.)으로 하룻밤 동안 고정하고, 알코올 구배용액을 이용하여 각 10분씩 탈수과정을 진행하였다. 세포를 배양한 PLGA 필름을 잘라 양면테이프를 이용하여 시료폴더에 고정시킨 후, 아르곤 가스 하에서 2분 동안 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이

용하여 약 200 μm의 두께로 백금 코팅하였고 이를 주사전자현미경(Hitachi Co., Model S-2250N, Japan)을 이용하여 PLGA 필름표면의 세포를 관찰하였다.

통계학적 분석. 각각의 실험군들의 평균값과 표준편차를 확인하였으며, 통계학적 분석은 Student's t-test를 수행하였다. 결과 값이 P<0.05일 때 충분한 유의성을 갖는 것을 기준으로 하였다.

결과 및 토론

슈반세포의 배양과 확인. Morrissey 방법을 이용해 섬유아세포의 오염 없이 순수한 슈반세포를 확보할 수 있었다. 좌골신경으로부터 분리한 신경다발의 기질로부터 섬유아세포를 제거하고 약 95%의 순수한 슈반세포를 배양할 수 있었다. 슈반세포는 S-100 단백질과 GFAP의 면역화학적 염색을 통해 확인하였다. 현미경을 통해 양성반응을 보이는 세포를 확인한 결과 S-100에서 약 95%, GFAP에서 약 93%의 세포가 양성반응을 보이고 있었다. 이렇게 순수 배양된 슈반세포를 사용하여 접착성 단백질 혹은 폴리펩타이드로 코팅된 PLGA 표면과 슈반세포와의 상호작용을 관찰하였다.

코팅된 PLGA 필름의 특성 평가. 접착성 단백질 혹은 폴리펩타이드로 코팅된 PLGA 필름 표면의 친수성 정도를 확인하기 위해 접촉각을 측정하는 결과, Figure 1에서 보여주듯이 물이나 배양액과 필름의 표면과의 접촉각은 실험군에 따른 차이는 약 10도 내외로 크지 않은 것으로 관찰되었다. 그러나 FN, FG, LM의 경우 대조군을 포함한 나머지 군에 비해 접촉각이 상대적으로 작게 나타났다. 또한 물방울 적하 후 10분이 지난 후 접촉각을 측정하여 물방울이 퍼지는 정도를 관찰하였는데, 이 역시 FN, FG, LM의 경우 대조군보다 접촉각이 5~15° 정도 작게 나오는 것으로 미루어보아(Figure 2) 물방울이 퍼지는 속도 역시 빠름을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 초기 세포의 부착 및 퍼짐에 영향을 줄 것으로 사료되며, 이러한 차이가 나타나는 이유는 ESCA 분석 결과에 의해 설명된다. PLGA 필름에 흡착된 단백질이나 폴리펩타이드를 ESCA를 이용하여 분석하였다. 순수한 단백질과 폴리펩타이드 분말의 질소의 양을 ESCA로 분석한 결과 11~15%로 알려져 있다.²⁴ 본 실험의 ESCA의 결과에서 코팅하지 않은 PLGA 필름에서는 질소를 포함하지 않는 것을 기준으로 하여, 접촉인자로 코팅된 표면의 질소함

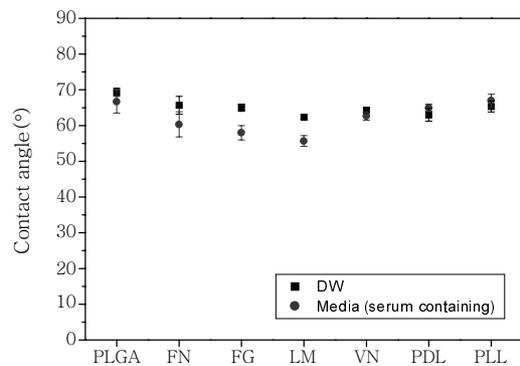


Figure 1. Water contact angle of protein- or polypeptide-adsorbed PLGA film surfaces.

량을 순수한 접착인자의 질소함량으로 나누어 상대적인 흡착량을 계산한 결과 FN, FG, LM의 경우 최소 80% 이상으로 흡착되었음을 확인할 수 있었으며, PDL과 PLL은 20% 이하로 흡착률이 낮았는데, 여러 논문에서도 이와 같은 결과를 나타내고 있었다(Table 2 and Figure 3).^{24,27} VN의 경우에는 순수한 분말의 양이 다른 접착인자에 비해 현저히 작아 측정이 되지 않았기에 상대적인 흡착량을 계산할 수 없었다. 또한 SEM으로 관찰한 결과 코팅하지 않은 PLGA 필름은 매끄러운 표면을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었는데, 코팅한 표면 역시 매끄러운 표면을 가지고 있어 차이를 관찰할 수 없었다(Figure 4).

필름표면에서의 슈반세포의 배양 FBS를 포함하는 배양액의 경우에는 세포의 부착 및 증식이 전체적으로 잘 이루어짐을 확인할 수 있었으며, 3일 정도 배양했을 때 거의 비슷한 세포수를 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 5). FG와 VN의 경우에는 2일째 급격한 세포성장을 확인할 수 있었다. 초기 부착도는 VN>LM≈FG≈FN≈

PLL>untreated>PDL 순이었으며, 각 실험군에 따른 차이는 별로 없었는데, 이는 배양액 내의 FBS에 함유된 알부민이나 FN 등이 필름에 흡착됨으로 인한 결과로 사료된다.

Table 2. ESCA Results of Protein- or Polypeptide-Adsorbed PLGA Surfaces

Adsorbed protein or polypeptide	Atomic %			N % of Pure powder ²⁵
	C	O	N	
PLGA	56.56	43.44	0	—
FN	60.49	23.84	15.67	12.5
FG	59.96	24.08	15.96	11.6
LM	60.11	25.96	13.93	15.1
VN	56.58	42.11	1.31	N.D.*
PDL	56.29	43.23	0.48	14.0
PLL	57	42.16	0.83	13.4

*Not determined.

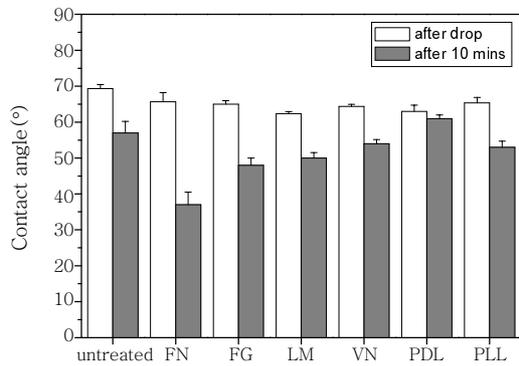


Figure 2. Changes in water contact angle of proteins or polypeptides coated PLGA film surfaces according to time.

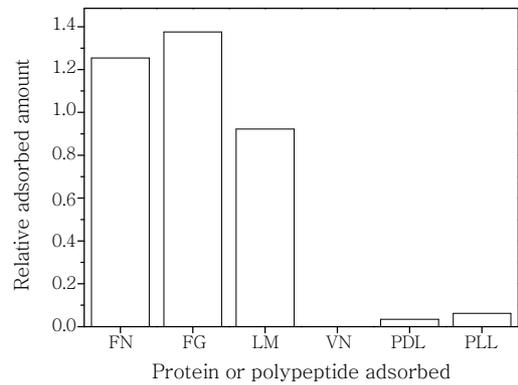


Figure 3. Relative adsorbed amount of protein or polypeptide on PLGA film surface.

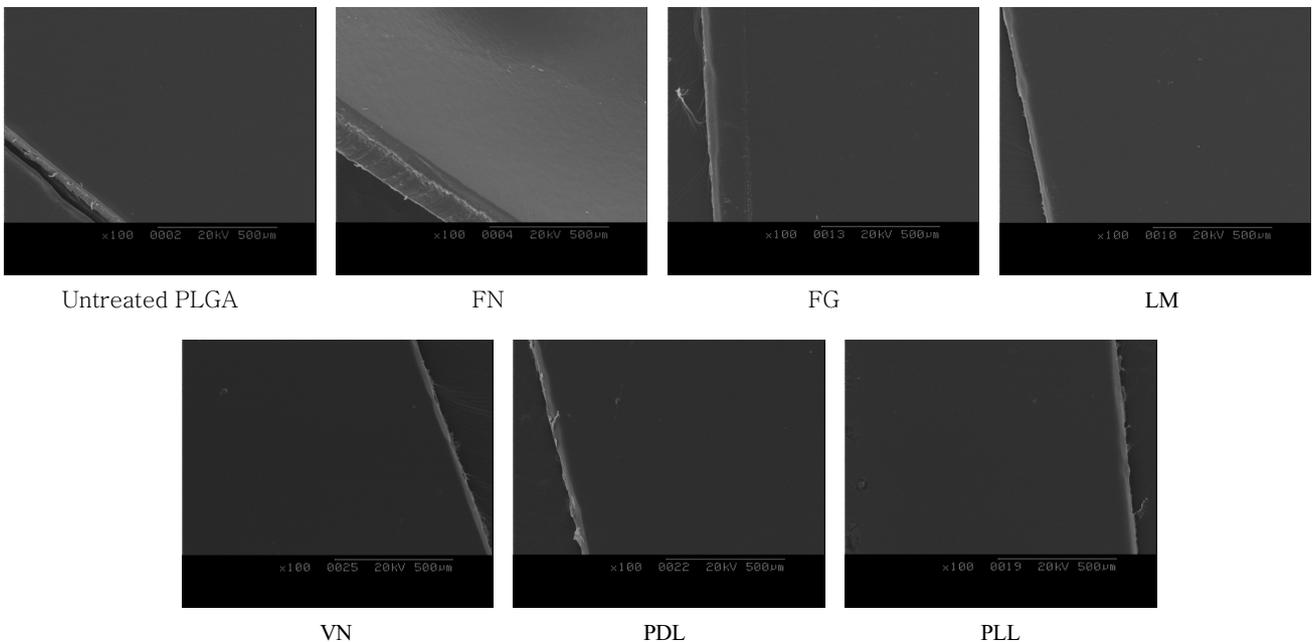


Figure 4. SEM microphotographs of proteins or polypeptides coated PLGA film surfaces.

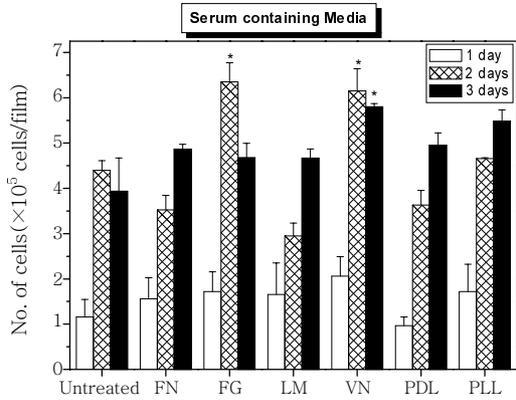


Figure 5. Number of Schwann cells adhered on proteins or polypeptides coated PLGA film surfaces cultured in serum containing media. * denotes significant difference compared with control (untreated) of each day (* p<0.05).

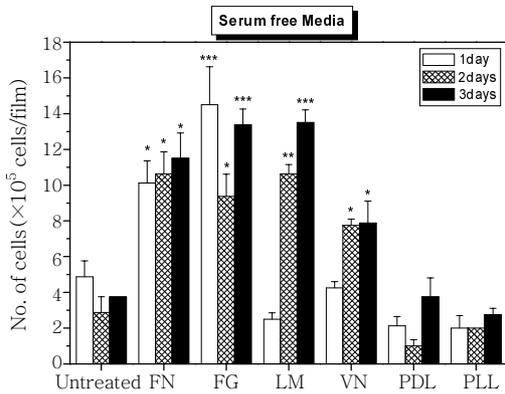


Figure 6. Number of Schwann cells adhered on proteins or polypeptides coated PLGA film surfaces cultured in serum free media. *, ** and *** denote significant difference compared with control (untreated) of each day (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.005).

FBS를 포함하지 않는 배양액의 경우 PDL과 PLL을 제외하고는 접착인자로 코팅한 것에서 세포 부착도가 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Figure 6). 이는 PLGA 필름의 표면에 흡착된 접착인자의 양과 관련이 있는 것으로 사료된다. 전체 세포수나 증식도의 경우에는 최고 세포수가 1.5×10^5 세포수/필름 정도로 최고 세포수가 6.5×10^5 세포수/필름인 FBS를 포함하는 배양액에 비해 매우 저조함을 확인할 수 있었다. 초기 부착도는 $FG > FN > untreated \approx VN > LM \approx PDL \approx PLL$ 의 순이었으며, 각 실험군 중에서 특히 FN과 FG의 경우 뚜렷한 차이를 보이고 있었다. 세포 성장률은 3일후의 세포수를 기준으로 볼때 대조군에 비해 FN, FG, LM, VN의 증가가 두드러짐을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 FBS의 첨가 유무에 따라 세포 부착도가 차이가 남을 확인할 수 있었는데, 이를 바탕으로 2, 5, 10%의 FBS를 포함하는 배양액을 이용하여 동일한 실험을 실시한 결과 초기 세포 부착도는 FBS의 첨가로 인해 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 이는 FBS 내에 세포 접착인자인 라미닌, 피브로넥틴, 비트로넥틴 등의 흡착에

따른 것으로 해석할 수 있다. 세포 성장률은 초기 세포 부착도의 영향뿐만 아니라, 배양액에서 FBS의 함량에 따라 크게 영향받음을 확인할 수 있었는데, 이는 FBS 내에는 세포 접착인자 뿐만 아니라 다양한 성장인자들도 포함되어 있기 때문으로 사료된다.

이러한 결과로 미루어 보아 특정한 접착인자는 초기 세포 부착도에 큰 영향을 끼치지만, 세포의 증식에 있어서는 접착인자보다는 배양액내의 영양인자인 FBS의 함량이 더 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

SEM을 통한 필름표면에서의 슈반세포의 거동 확인. SEM 관찰을 통해 세포 부착도 및 세포수의 양상을 살펴본 결과도 역시 앞서의 결과와 연관이 있는 비슷한 경향을 보임을 확인할 수 있었다. SEM 관찰은 FBS를 포함한 배양액과 무혈청 배양액을 각각 공급해 준 다음 슈반세포가 FBS의 유무와 흡착된 단백질 혹은 폴리펩타이드에 따라 부착 및 성장에 어떤 영향을 받는지 세포부착 형태를 통해 살펴보고자 실시하였다. 먼저 FBS를 함유한 배양액을 공급한 경우, 흡착된 단백질 혹은 폴리펩타이드에 따른 차이는 거의 나타나지 않았으며, 모든 군에서 부착된 세포는 filopodia 및 lamellipodia 등이 뻗어 나와 있는 형태를 보이며 세포의 부착, 성장, 이동 등이 잘 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 슈반세포의 신경돌기로 추측되는 돌기들이 세포로부터 잘 뻗어 있는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, FBS를 함유한 배양액을 공급한 경우 무혈청 배양액을 공급한 경우에 비해 부착된 세포수가 많음을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 반면에 무혈청 배양액의 경우 흡착된 단백질 혹은 폴리펩타이드에 따라 세포수와 부착형태에 차이를 보이고 있었는데, 세포 부착과 증식은 FN, FG, VN의 경우가 우수하였으며, filopodia와 lamellipodia 등 역시 FN과 FG에서 가장 왕성하게 뻗어있는 것으로 보아 세포가 활동적임을 확인할 수 있었다. 그러나 PLGA와 PDL, PLL의 경우에는 부착된 세포에서 filopodia나 lamellipodia를 뻗고 있는 형태를 관찰하기 어려웠다. 또한 신경돌기는 FG와 LM, VN의 경우 많이 관찰되었다. 각각의 실험군에 따라 세포가 분포하는 모습에도 차이가 있었는데, FN과 FG의 경우 균일하게 세포가 분포하고 있는 반면에, 나머지의 경우에는 선긴 콜로니를 이루며 세포가 분포함을 관찰할 수 있었다(Figure 8).

본 실험에서 앞선 결과에서 알 수 있듯이, PLGA 필름에서 단백질이나 폴리펩타이드가 흡착된 표면에서의 세포의 부착과 성장이 서로 다른 양상을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 우선, 초기 세포 부착은 PLGA 표면의 단백질 흡착과 관련있음을 확인할 수 있었으며, 세포의 성장은 배양액의 FBS의 함량의 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 슈반세포의 신경돌기의 성장은 흡착된 세포 접착인자의 종류에 따라 차이를 보이고 있었으나, 배양액에 FBS가 포함된 경우 비슷한 정도의 신경돌기 성장을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 슈반세포의 부착과 성장이 특정한 세포 접착인자에 의해 영향을 받음을 알 수 있었으며, 결과적으로 세포의 부착과 성장을 향상시키기 위해서는 세포의 종류나 배양 환경 등을 고려하여 적절한 표면환경을 제공해야 할 것이다.

결론

본 실험에서는 PLGA 필름에 접착인자를 코팅하여 슈반세포가

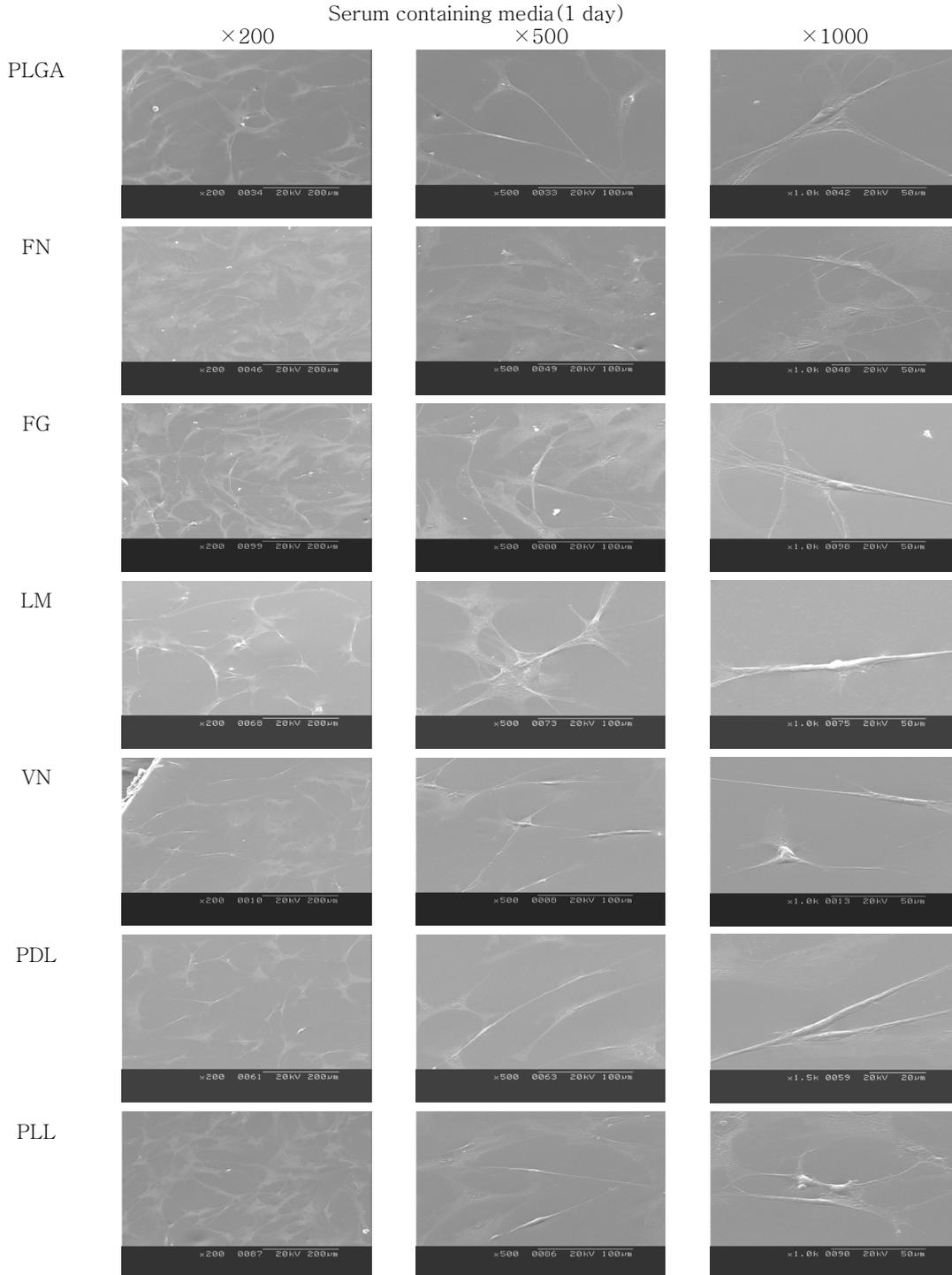


Figure 7. SEM microphotographs of Schwann cells growth on proteins or polypeptides coated PLGA film surfaces : 1 day cultured in serum containing media.

부착 및 성장하는데 가장 적합한 세포친화적 환경을 조성하여, 조직공학적 신경유도관으로 이용될 때 슈반세포의 부착, 성장 등이 용이하도록 하기 위해 접착인자를 코팅하여 슈반세포를 배양하여 실험하였다. 조직공학적 신경유도관의 개발에 있어 재생세포원과의 상호관계가 중요한 요소 중 하나인데, 본 실험의 결과를 통해 신경유도관에 재생세포의 종류에 따라 적절한 접착인자를 처리함으로

써 세포 친화적 환경을 제공할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 *in vitro* 환경에서 세포의 성장은 초기 부착도 뿐만 아니라, 성장인자 등의 세포 영양인자의 공급이 매우 중요하게 작용한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 본 연구진의 선행실험인 접착인자로 코팅된 표면과 골수간엽줄기세포 및 혈관내피세포와의 상호작용에 관한 연구의 결과와는 차이를 보이고 있었는데, 이러한 사실로부터 세포

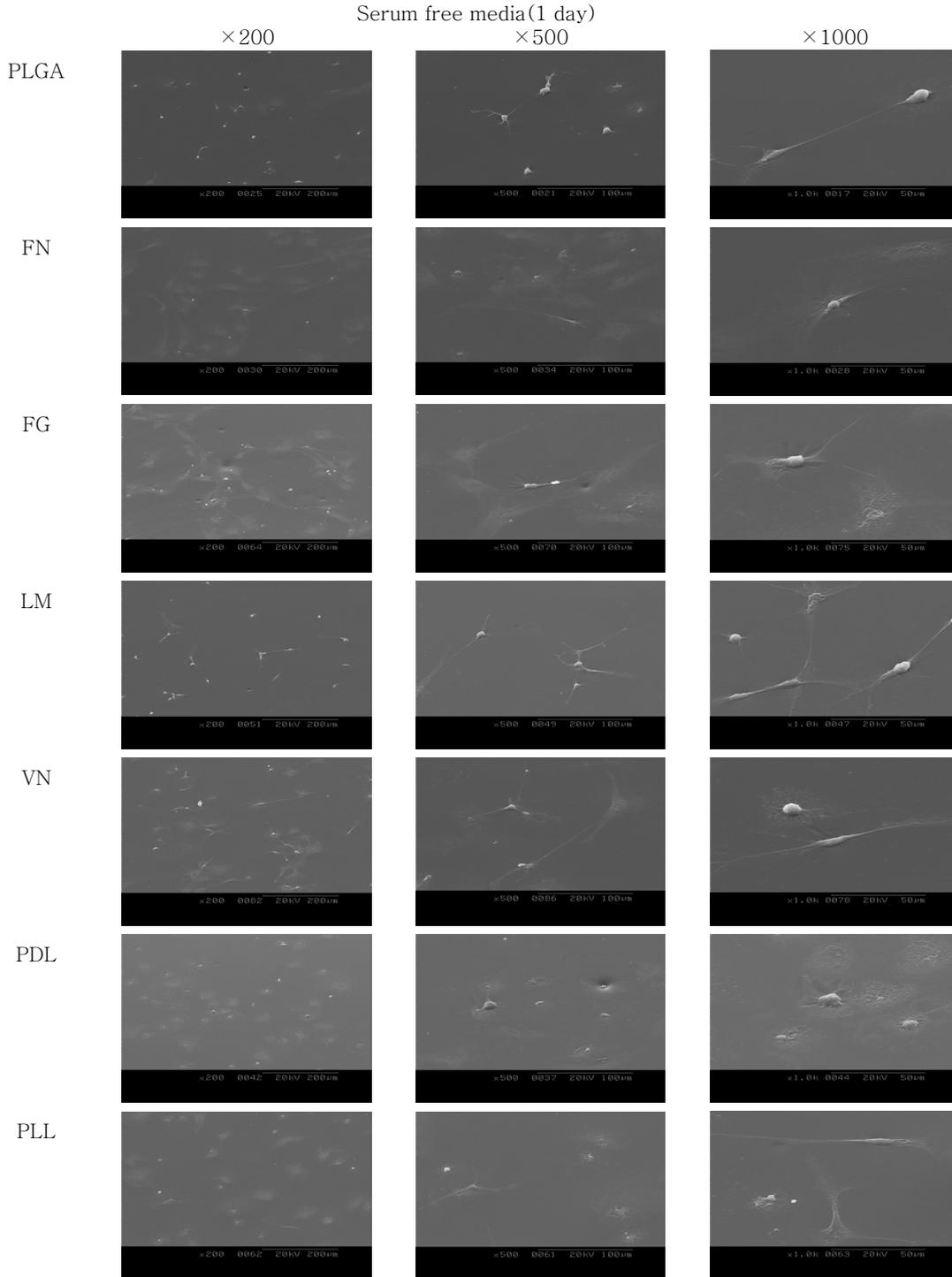


Figure 8. SEM microphotographs of Schwann cells growth on proteins or polypeptides coated PLGA film surfaces : 1 day cultured in serum free media.

의 종류에 따라 선호하는 표면접착기질이 다를 수 있었다. 현재 본 연구진은 접착인자가 코팅된 표면에 세포가 부착될 때의 세포의 분자생물학적 변화를 확인하기 위해 세포의 접착인자로 알려진 피브로넥틴, 트롬보스폰딘 등을 RT-PCR을 통해 확인하는 실험을 진행 중이며, 또한 본 실험의 결과를 신경유도관에 적용시켜 이를 이용한 동물실험이 진행 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 세포응용사업단(SC3100)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. G. Khang, S. K. Kim, K. D. Hong, W. Y. Jang, C. W. Han,

1. I. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 136 (2004).
2. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
3. G. Khang, E. J. Kim, S. H. Kim, K. S. Park, C. W. Han, Y. S. Yang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 20 (2005).
4. S. Sagnella, E. Anderson, N. Sanabria, R. E. Marchant, and K. Kottke-Marchant, *Tissue Eng.*, **11**, 226 (2005).
5. K. B. Lee, K. R. Yoon, S. I. Woo, and I. S. Choi, *J. Pharm. Sci.*, **92**, 933 (2003).
6. Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
7. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 179 (1999).
8. G. Khang, S. J. Lee, J. H. Jeon, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 869 (2000).
9. S. J. Lee, G. Khang, J. H. Lee, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 877 (2000).
10. G. Khang, J. H. Lee, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Korea Polym. J.*, **8**, 276 (2000).
11. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **13**, 197 (2002).
12. G. Khang, J. H. Choe, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, **85**, 1253 (2002).
13. J. S. Choi, S. J. Lee, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **6**, 17 (2002).
14. J. H. Lee, H. Kim, G. Khang, H. B. Lee, and M. S. Jhon, *J. Colloid Interf. Sci.*, **152**, 563 (1992).
15. J. H. Lee, J. W. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **18**, 351 (1997).
16. G. Legeay, F. Poncin-Epaillard, and C. R. Arciola, *Int. J. Artif. Organs*, **29**, 453 (2006).
17. M. Yamaguchi, T. Shinbo, T. Kanamori, P. C. Wang, M. Niwa, H. Kawakami, S. Nagaoka, K. Hirakawa, and M. Kamiya, *J. Artif. Organs*, **7**, 187 (2004).
18. G. Khang, J. W. Lee, J. H. Jeon, S. C. Cho, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **7**, 357 (1997).
19. J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 180 (1997).
20. J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee, and H. B. Lee, *J. Colloid Interf. Sci.*, **205**, 323 (1998).
21. Y. Iwasaki, K. Ishihara, N. Nakabayashi, G. Khang, J. H. Jeon, J. W. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **9**, 801 (1998).
22. D. J. Wilson, N. P. Rhodes, and R. L. Williams, *Biomaterials*, **24**, 5069 (2003).
23. F. Poncin-Epaillard and G. Legeay, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **14**, 1005 (2003).
24. E. J. Kim, J. S. Park, M. S. Kim, S. H. Cho, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 218 (2004).
25. J. H. Lee, D. K. Kim, G. Khang, and J. S. Lee, *Biomater. Res.*, **2**, 8 (1998).
26. J. S. Choi, S. J. Lee, J. W. Jang, G. Khang, Y. M. Lee, B. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **27**, 397 (2003).
27. S. K. Kim, K. D. Hong, J. W. Jang, S. J. Lee, M. S. Kim, C. W. Han, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 149 (2004).
28. J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, G. Khang, C. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2004).
29. M. Shen and T. A. Horbett, *J. Biomed. Mater. Res.*, **57**, 336 (2001).
30. C. Wenling, J. Duohui, L. Jiamou, G. Yandao, Z. Nanming, and Z. Xiufang, *J. Biomater. Appl.*, **20**, 157 (2005).
31. K. E. Schmalenberg and K. E. Urich, *Biomaterials*, **26**, 1423 (2005).
32. K. E. Schmalenberg, H. M. Buettner, and K. E. Urich, *Biomaterials*, **25**, 1851 (2004).
33. J. Marchand-Brynaert, E. Detrait, O. Noiset, T. Boxus, Y. J. Schneider, and C. Remacle, *Biomaterials*, **20**, 1773 (1999).
34. E. Detrait, J. B. Lhoest, P. Bertrand, and P. van den Bosch de Aguilar, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 404 (1999).
35. T. K. Morrissey, N. Kleiman, and R. P. Bunge, *J. Neurosci.*, **11**, 2433 (1991).