

연조직 증강을 위한 세포치료 시 비계로서 키토산의 온도 감응성 및 섬유모세포의 증식에 미치는 영향에 관한 연구

김정호 · 최진영

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2009;35:146-152)

STUDY ON THERMOSENSITIVITY OF CHITOSAN SCAFFOLD AND ON ITS EFFECTS ON FIBROBLAST PROLIFERATION IN CELL THERAPY FOR SOFT TISSUE AUGMENTATION

Jung-Ho Kim, Jin-Young Choi

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of dentistry, Seoul National University

Traditional surgical method or injection using filler is performed for soft tissue augmentation. Surgical methods have disadvantage of surgical morbidity. Commercially available injectable materials have the disadvantages such as resorption, short-term effect, repeated application and hypersensitivity. Significant shortcoming of cell therapy using autologous fibroblasts is delay of treatment effect.

Chitosan/ β -glycerol phosphate (GP) solution has thermosensitive property and allows sol-gel transition at physiologic pH and temperature. These properties may resolve the delay of treatment effect.

The purposes of this study are to evaluate the viscosity and pH changes of chitosan/ β -GP solutions and to evaluate the effect of chitosan/ β -GP solution on fibroblast proliferation and production of collagen.

We measured the viscosity and pH as function of temperature, of the solution containing 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8 chitosan (1, 10, 100, 700 kDa) / β -GP. Fibroblasts from ears of 5 rats were cultured in chitosan/ β -GP solutions for 3 weeks. Cell proliferation and collagen contents were measured every week with WST (water-soluble tetrazolium salt) assay and Collagen assay respectively.

The Results are 1) Chitosan(100 kDa)/ β -GP solution (1:0.75) showed sol-gel transition at physiologic pH and body temperature and injectable properties. It will enable to resolve the delay in treatment effect 2) Cell proliferation and total collagen contents of the control group were increased with time. However, these decreased after the 1st week in experimental group 3) Collagen contents in the experimental group are higher than that of control group. Chitosan/ β -GP solution may provide favorable conditions for cell function

Key words : Soft tissue augmentation, Chitosan/ β -glycerol phosphate, Fibroblast, Thermosensitive, Scaffold

I. 서 론

연조직 증강술로는 크게 수술을 이용하는 방법, 충전제를 이용하는 주입식 방법이 있다. 주입식 방법은 시중에 판매 되는 충전제를 주로 30-gauge 주사침으로 원하는 부위에 주입하는 방법으로 안면의 주름, 반흔, 연조직 결손의 개선과 비순구, 입술의 증강에 널리 사용되고 있다¹⁾. 주입식 방법은 수술적 방법에 비해 시술이 간편하고 환자의 불편감이 최소한이고 주입하는 양과 위치를 정확하게 조절할 수 있는 장점들을 가지고 있다고 보고되고 있다²⁾.

이상적인 충전제의 요건들로는 (1) 생적합성 (2) 무독성, 무면역 반응, 무암유발성 (3) 저장의 용이성 (4) 시술의 용이 (5) 흡수에 대한 저항성과 지속적인 효과 (6) 낮은 가격 등이 있다^{3,4)}. 반면에 시중에 판매되는 많은 충전제들은 위에서 언급한 장점들의 일부를 가지고 있지만 과민증과 같은 면역 반응을 일으킬 수 있는 단점^{1,2,5,6)} 시간의 경과에 따른 충전제의 흡수로 치료 결과의 지속 시간이 짧은 점, 원하는 결과를 유지하기 위해 반복적인 시술이 필요한 단점도 동시에 가지고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

기존의 충전제가 가지고 있는 과민증 유발, 짧은 지속 시간, 광범위한 수술의 필요성 등의 단점을 보완하기 위한 방법으로 1990년대 중반 자가 피부 섬유모세포를 이용하는 세포치료법이 개발되었다. Isolagen (Isolagen Technologies; Houston, TX)이 대표적이다. 섬유모세포는 진피에서 가장 많은 세포이고 주요 기능이 콜라겐이나 하이알루론 산 같은 세포외 기질의 합성이므로 피부 조직의 증강술에 이론적으로 이상적인 치료법으로 보일 수 있다¹¹⁾. Isolagen을

최진영

110-768 서울특별시 중로구 연건동 275-1
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jin-Young Choi

Dept. of OMFS, College of dentistry, Seoul National University
275-1, Yeongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-768, Korea
Tel: 82-2-2072-3992 Fax: 82-2-766-4948

E-mail: jinychoi@snu.ac.kr

이용하는 세포치료법은 자가 섬유모세포를 이용함으로써 과민증이 없고 12-48개월간 비교적 지속적인 효과를 보인다고 보고되고 있다¹²⁻¹⁴). 또한 작은 펀치 생검만 필요하므로 광범위한 공여부가 필요치 않은 장점을 가지고 있다¹³). 반면에 2-4번의 주입이 필요하고 세포를 배양하는 시간이 필요하고 주입 즉시 효과가 나타나지 않는 치료 효과 발생의 지연이라는 큰 단점을 가지고 있다^{2,14}).

치료 효과 발생의 지연이라는 단점을 극복하기 비계(scaffold)의 사용을 고려해볼 수 있는데 이러한 비계는 공간 충전재, 생활성 물질의 전달체로 사용되기도 하며, 세포를 조직화 시키고 원하는 조직의 생성을 위한 자극을 줄 수 있는 삼차원적 구조를 제공하기도 한다¹⁵). 이러한 비계로 사용되어지는 여러 가지 물질 중에서 하이드로젤은 30% 이상의 수분을 함유하고 있고¹⁶), 상대적으로 쉽게 가공될 수 있고, 세포의 기질과 유사한 물리적 성질과 구조를 갖고 있으며 시술이 간편한 특성을 가지고 있다¹⁷). 특히, 주입이 가능한 물질들은 수술 과정이 필요 없고 치료 약제나 특정 세포를 같이 간단한 방법으로 섞어서 사용할 수 있고 흐르는 성질은 결손부에 잘 들어맞는 장점도 가지고 있다¹⁸).

최근 많이 사용되는 하이드로젤은 합성 물질로는 poly(ethylene oxide)(PEO), poly(vinyl alcohol)(PVA), poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)(P(PF-co-EG)), 천연 물질로는 알지네이트, 콜라겐, 하이알루론 산, 키토산 등이 있다¹⁹). 이 물질들이 생체 내에서 겔화되는 기전은 용매 교환, 자외선 조사, 이온의 교차 결합, pH 변화, 온도 변화 등이 있는데 최근에는 용매나 공중합체(copolymerization agent)를 이용하는 방법의 단점으로 이러한 것들이 필요 없는 온도 감응성 하이드로젤이 주목 받고 있다¹⁸).

키토산은 키틴의 deacetylation으로 얻어지는 aminopolysaccharide로서 분자량은 50-2000 kDa이고 deacetylation의 정도는 40-98%로 존재하며 산성 용매에 녹고 pH가 6.2 이상이면 겔화가 되는 특성을 갖는다^{20,21}). 특히, β -glycerol phosphate (β -GP)를 함유한 키토산 용액은 온도 감응성 고분자의 성질을 갖게 되고 온도와 pH에 따라 sol-gel 변환을 갖는 독특한 성질을 갖고 있는 것으로 알려져 있다^{18,20}).

이에 본 연구의 목적은 키토산의 분자량과 β -GP 용액의 양에 따른 온도 감응성 고분자의 겔화 특성과 키토산/ β -GP 용액의 온도에 따른 pH 변화를 살펴보고, 키토산/ β -GP 용액에 자가 섬유모세포를 접종시켜 세포의 기질인 콜라겐의 발현 양을 관찰함으로써 키토산/ β -GP 용액의 자가 섬유모세포에 대한 영향과 효과를 관찰하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 키토산의 분자량과 β -GP 용액의 양과 온도 변화에 따른 점도 측정

β -GP (Glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate, Sigma,

USA) 11.25 g과 증류수 13.75 g을 혼합한 45% (w/w) β -GP 용액 1.4, 1.5, 1.6 ml를 분자량이 1, 10, 100, 700 kDa인 2% (w/v) 키토산 (고려키토산, degree of deacetylation 95%, in 1N HCl, Korea) 2 ml와 4°C에서 각각 혼합하여 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8 비율의 키토산/ β -GP 용액을 제조하였다. 이 용액의 온도 상승에 따른 점도는 CP 1/40 mm disk와 지지대 사이에 시료 200 μ l을 가하고 1 Hz로 회전시켜주면서 1°C/분의 속도로 20°C에서 40°C까지 온도를 상승시키면서 점도계 (Bohlin Instruments Inc., CVO 100, England)를 사용해 측정하였다.

2. 키토산과 β -GP 용액의 온도 변화에 따른 pH 측정

온도 변화에 따른 pH 변화는 실험 1의 결과를 토대로 위 용액 중 분자량이 700 kDa인 키토산/ β -GP 용액만 1°C/분의 속도로 10°C에서 50°C까지 온도를 상승시키면서 pH 측정기 (Sato, SK-620PH, Japan)를 이용하여 측정하였다. 위 두 실험은 모두 2 번씩 시행하였으며 평균값을 취하였다.

3. 섬유모세포의 분리 및 배양

체중 250 g 내외의 12주령 Sprague-Dawley 중, 흰쥐 5 마리의 귀에서 표본을 채취하였다. 5% penicillin-streptomycin (P/S, Gibco, USA)가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS, Gibco, USA) 40 ml에서 잔털을 제거, 7-8회의 세척 후 잘게 잘랐다. 지방층 제거를 위해 4 mg/ml dispase (Gibco, USA) 20 ml를 첨가 후 4°C에서 overnight 배양 시켰다. 표피와 진피를 분리해서 잘게 자른 후 3 mg/ml collagenase Type I (Gibco, USA) 20 ml 첨가 후 2시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양 시켰다. 20 ml F-배지 [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) : F-12 = 3 : 1 + 10% Fetal Bovine serum (FBS, Gibco, USA) + 1% P/S]를 첨가 후 70 μ m 필터 (BD Falcon, USA)에서 필터링을 하고 1100 rpm으로 5 분간 원심 분리 (Hanil, UNION 32R PLUS, Korea)를 시행하였다. Pellet을 T75 플라스크 (Nunk, Denmark)에 20 ml F-배지를 첨가 후 37°C, 5% CO₂에서 배양 시켰다.

12일 동안 초대 배양한 섬유모세포를 3회까지 계대 배양을 실시하였다. 섬유모세포를 떼어낸 후 0.5 ml 키토산, 0.375 ml β -GP와 0.5 ml F-배지를 넣은 24 well plate (Nunk, Denmark)와 0.5 ml F-배지만 넣은 24 well plate의 5개의 well에 각각 1×10^4 /well 개의 섬유모세포를 접종시켰다. 키토산의 분자량과 β -GP의 양은 실험 1과 2의 결과를 토대로 700 kDa의 분자량과 1:0.75 인 용액을 사용하였다.

4. 섬유모세포의 증식 관찰

접종 한 섬유모세포를 37°C, 5% CO₂에서 0, 1, 2, 3주 배양 후 세포의 증식을 WST (water-soluble tetrazolium salt,

DOJINDO Lab, Cell Counting Kit-8, Japan) 검사로 관찰하였다. 이를 위해 배양한 세포에 배지 200 μ l와 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 20 μ l을 가하였다. WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4 disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]는 살아 있는 세포의 탈수소효소에 의해 환원되어 오렌지색을 띠는 WST-8 formazan으로 변하게 된다. 오렌지색으로 변한 시료를 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양 후 200 μ l씩 96 well plate (Nunk, Denmark)에 나누어 담았다. 배지와 CCK-8을 10:1로 섞은 blank 200 μ l를 만들어 450 nm에서 ELISA reader (BIO-TEK Instrument INC, Power Wave \times 340, USA)를 통해 흡광도를 측정하고 표준 곡선을 만들어 세포만 증식 시킨 결과와 키토산/ β -GP 용액과 함께 세포를 증식시킨 결과를 정량적으로 비교하였다.

5. 배양 기간에 따른 콜라겐 총발현양 측정

콜라겐 발현양 측정을 위해 Collagen assay (Bicolor, Sircol collagen assay, USA)를 시행하였다. 같은 방법으로 배양한 세포에서 콜라겐을 분리해 내기 위해 Sircol dye reagent 1 ml을 가하고 40분간 상온에서 방치 후 10분간 10000x g에서 원심분리를 시행 후 Alkali reagent 1 ml를 pellet과 반응 시켰다. 반응 후 노란색을 띠는 시료를 200 μ l씩 96 well plate에 나누어 담고 Alkali reagent 200 μ l를 blank로 하여 540 nm에서 ELISA reader를 통해 흡광도를 측정하고 표준 곡선을 만들어 세포만 증식 시킨 결과와 키토산/ β -GP 용액과 함께 세포를 증식 시킨 결과를 정량적으로 비교하였다.

6. 단위 섬유아세포 당 콜라겐의 발현양

실험 4와 5의 결과를 토대로 1 \times 10⁴ cells 당 콜라겐 발현양을 계산하여 세포만 증식 시킨 결과와 키토산/ β -GP 용액과 함께 세포를 증식시킨 결과를 정량적으로 비교하였다.

III. 결 과

1. 키토산의 분자량과 β -GP 용액의 양과 온도 변화에 따른 점도 측정

키토산 분자량이 1 kDa과 10 kDa에서와 같이 저분자량에서는 온도가 상승함에 따라 점도가 감소하는 양상을 보였고 β -GP 용액의 양에 상관없이 겔화가 일어나지 않았고 점도 값은 약 0.0012에서 0.0017 Pa.s의 범위를 보임으로써 온도 상승에 관계없이 액체 상태를 유지하였다. 즉, 온도 상승에 관계없이 sol-gel 변환을 보이지 않았다. (Fig. 1(a), (b))

100 kDa과 700 kDa의 경우 온도 상승에 따라 점도 값이 약 500 kPa.s 이상을 유지함으로써 겔화가 일어남을 관찰할 수 있었다. 즉, 온도 상승에 따라 sol-gel 변환이 일어나는 양상을 보였다. 100 kDa 키토산과 β -GP 용액의 비율이 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8일 경우 각각 약 37, 36, 34°C에서 겔화가 일어났다. 700 kDa 키토산과 β -GP 용액의 비율이 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8일 경우 각각 약 37.5, 36.5, 34°C에서 겔화가 일어났다. 특히 700 kDa 키토산과 β -GP 용액의 비율이 1:0.75일 경우 생체 온도와 비슷한 약 36.5°C에서 겔화가 일어남을 관찰할 수 있었다. (Fig. 1(c), (d))

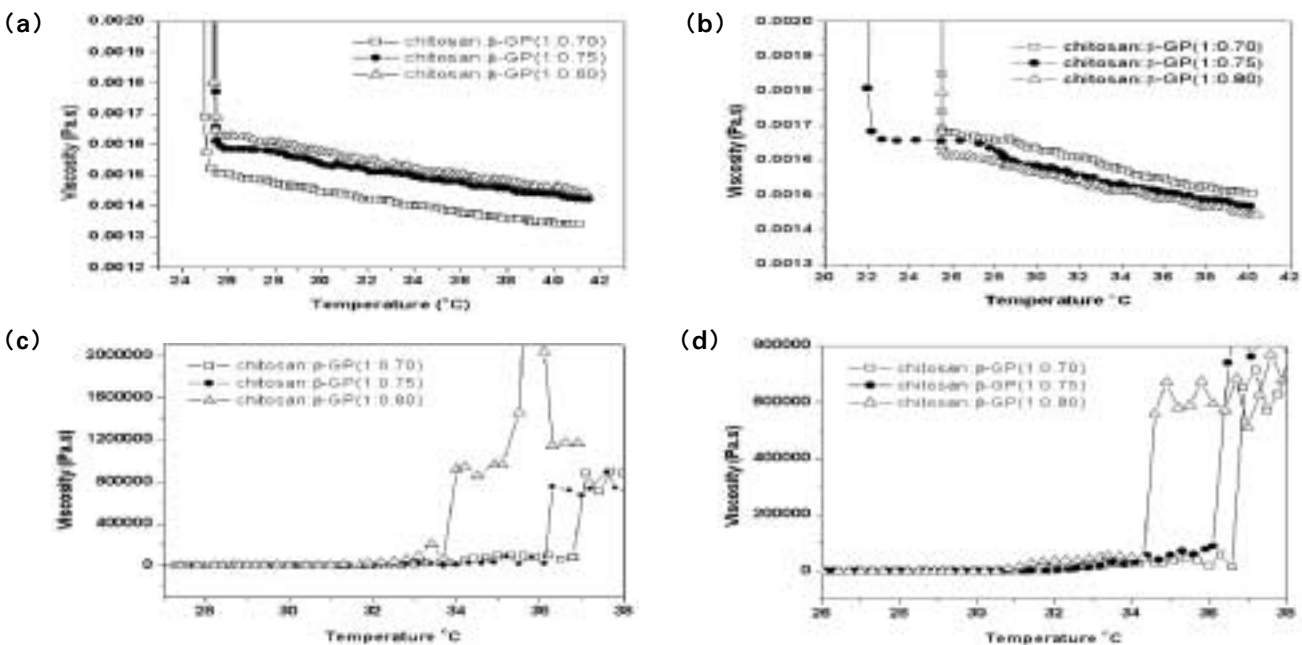


Fig. 1. Viscosity changes of chitosan/ β -GP solutions as function of molecular weight of chitosan and amounts of β -GP. (N=2) (rectangular: chitosan : β -GP=1:0.70 / dark circle: chitosan : β -GP=1:0.75 / triangular: chitosan : β -GP=1:0.80) (a) 1 kDa chitosan (b) 10 kDa chitosan (c) 100 kDa chitosan (d) 700 kDa chitosan

2. 키토산과 β -GP 용액의 온도 변화에 따른 pH 측정

700 kDa 키토산과 β -GP 용액의 비율이 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8 일 경우 온도 상승에 따라 pH가 다소 감소하는 양상을 보였고 1:0.8 키토산/ β -GP 용액의 경우가 1:0.7 키토산/ β -GP 용액의 경우보다 즉, β -GP의 양이 좀 더 많을수록 pH 변화가 좀 더 완만한 양상을 보였다. 또한 pH가 변하는 범위는 온도 상승에 관계없이 생리적 pH 범위인 7.25-7.46 정도가 유지되었음을 관찰하였다. (Fig. 2)

3. 섬유모세포의 증식 관찰

섬유모세포만 증식 시킨 경우는 시간에 비례해서 지속적으로 세포의 수가 증가하는 양상을 보인 반면 키토산/ β -GP 용액과 함께 섬유모세포를 증식 시킨 경우는 1주차까지는 섬유모세포의 개체수가 증가하였지만 1주차 이후부터 3주차까지 개체수가 점점 감소하는 양상을 보였다. (Fig. 3)

4. 배양 기간에 따른 콜라겐 총발현양 측정

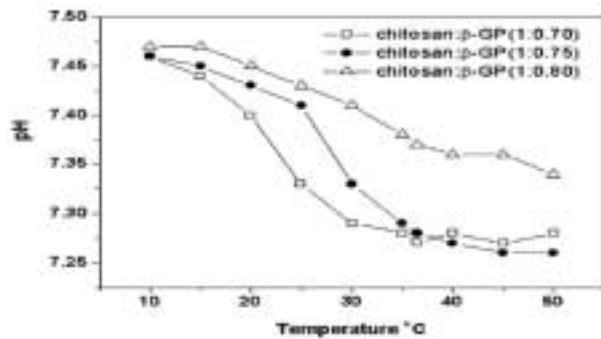


Fig. 2. pH changes of chitosan(700 kDa)/ β -GP solutions as function of temperature (N=2).
 (rectangular: chitosan : β -GP = 1 : 0.70
 dark circle: chitosan : β -GP = 1 : 0.75
 triangular: chitosan : β -GP = 1 : 0.80)

콜라겐의 발현양 역시 섬유모세포의 증식과 같은 양상이 관찰되었다. 즉, 섬유모세포만 증식 시킨 경우는 시간에 비례해서 지속적으로 콜라겐의 총발현양이 증가하는 양상을 보인 반면 키토산/ β -GP 용액과 함께 섬유모세포를 증식 시킨 경우는 1주차까지는 섬유모세포의 개체 수 증가에 따라 콜라겐의 총발현양이 증가하였지만 1주차 이후부터 3주차까지 개체수가 점점 감소함에 따라 콜라겐의 총발현양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 4)

5. 단위 섬유모세포 당 콜라겐의 발현양

단위 섬유아세포 (1×10^4 cells) 당 콜라겐의 발현양에서는 섬유모세포만 증식 시킨 경우는 2주차까지는 섬유모세포의 개체 수 증가에 따른 콜라겐 발현양의 증가가 관찰되었으나 3주차까지는 개체 수 증가와 관계없이 콜라겐 발현양이 더 이상 증가하지 않는 양상을 보였다. 반면에 키토산/ β -GP 용액과 함께 섬유모세포를 증식 시킨 경우는 1주차 이후부터 섬유모세포의 개체수가 감소하였지만 단위 섬유모세포 당 콜라겐의 발현양은 시간의 경과에 따라 지속적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. (Fig. 5)

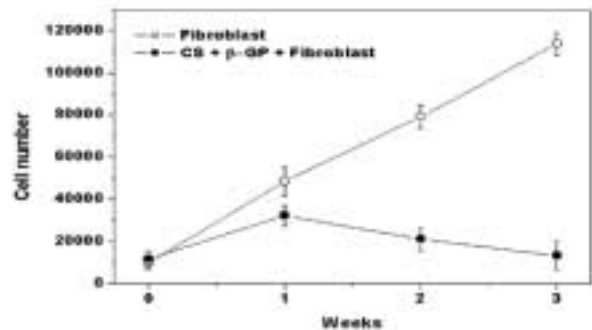


Fig. 3. Fibroblast proliferation as function of time (N=5).
 (blank circle: only fibroblast
 dark circle: fibroblast mixed with chitosan (CS)/ β -GP
 700 kDa chitosan, chitosan : β -GP = 1 : 0.75)

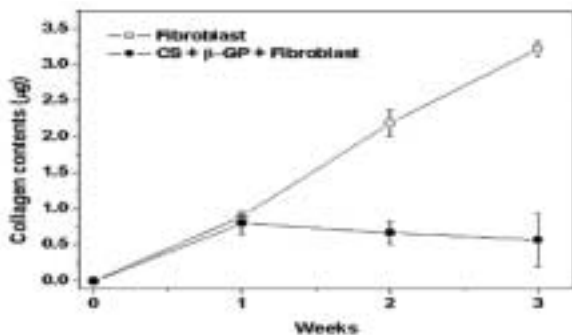


Fig. 4. Collagen contents as function of time (N=5).
 (blank circle: only fibroblast
 dark circle: fibroblast mixed with chitosan (CS)/ β -GP
 700 kDa chitosan, chitosan : β -GP = 1 : 0.75)

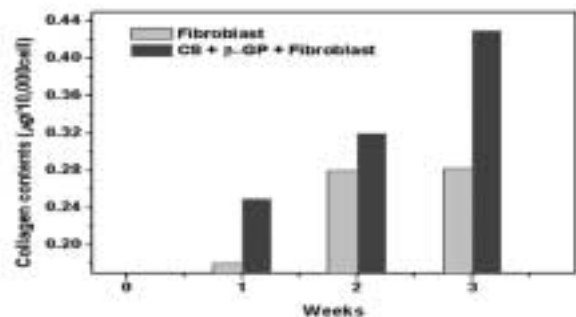


Fig. 5. Collagen contents/10,000 cell as function of time (N=5).
 (gray: only fibroblast
 black: fibroblast mixed with chitosan (CS)/ β -GP
 700 kDa chitosan, chitosan : β -GP = 1 : 0.75)

IV. 고 찰

비계의 사용은 연조직 증강 술에서 아주 중요한 위치를 차지하고 있으며 사용하고자 하는 용도에 맞는 재료를 찾고자 많은 연구들이 진행 중이다. 지금까지 연구된 많은 재료 중 키토산은 pH 6.2를 넘게 되면 겔화가 일어나서 즉, 생리적인 pH에서 주입이 가능한 sol 상태를 유지하지 못하는 것이 생의학적 적용, 예를 들면 살아 있는 세포나 pH 감응성 단백질과 함께 사용할 수 없는 점이 가장 큰 걸림돌이었다²⁰. 하지만 Chenite 등²⁰이 키토산에 polyol salt (예:β-GP)를 첨가함으로써 생리적 pH 범위 내에서도 주입 가능한 sol 상태를 유지할 수 있는 결과를 제시함으로써 키토산의 적용에 많은 관심이 더해지고 있고 키토산의 물성과 적용에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다²⁰⁻²⁸.

키토산/β-GP 용액은 분자량에 따라 다른 sol-gel 변환을 보이는데 Jarry 등^{24,29}은 분자량이 적어질수록 키토산/β-GP 용액의 점도가 감소되고 겔화 되는 속도가 느려지며 동시에 물리적 강도 또한 감소한다는 것을 보고하였다. 본 연구에서도 분자량이 작은 키토산의 경우는 β-GP 용액의 첨가나 양에 관계없이 온도상승에 따라 오히려 점도 값이 낮아져 액체 상태를 유지하는 현상을 보임으로써 Jarry 등의 결과와 같은 결과를 얻을 수 있었다. Chenite 등²⁰은 350 kDa의 2% 고분자량 키토산과 다양한 양의 β-GP 용액의 유성학 연구에서 온도 상승에 따라 키토산/β-GP 용액의 sol-gel 변환을 보고 하였고, Ruel-Gariepy 등²⁵은 420 kDa 1.8% 키토산과 45% (w/w) β-GP 용액을 이용한 연구에서 37°C에서 키토산/β-GP 용액의 sol-gel 변환을 보고 하였다. 본 연구에서도 100 kDa와 700 kDa의 경우 온도 상승에 따라 점도 값이 약 500 kPa.s 이상을 유지함으로써 겔화가 일어나는 양상을 보였다. 100 kDa 키토산과 β-GP 용액의 비율이 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8일 경우 각각 약 37, 36, 34°C에서 겔화가 일어났으며 700 kDa 키토산과 β-GP 용액의 비율이 1:0.7, 1:0.75, 1:0.8일 경우 각각 약 37.5, 36.5, 34°C에서 겔화가 일어났다. 특히 700 kDa 키토산과 β-GP 용액의 비율이 1:0.75일 경우 생체 온도와 비슷한 약 36.5°C에서 겔화가 일어남을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 키토산/β-GP 용액이 온도 상승에 따른 sol-gel 변환을 보이기 위해서는 일정량 이상의 키토산 분자량이 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 즉, 100, 700 kDa와 같은 고분자량 키토산에서 겔화가 일어날 수 있었고 Jarry 등^{24,29}이 분자량이 커질수록 물리적 강도가 증가한다고 보고한 바 본 연구에서는 100 kDa 보다는 700 kDa 키토산이 좀 더 임상적 의의를 가진다고 판단하여 700 kDa 키토산을 선택하여 세포에 접종시켰다. 그러나 분자량에 따른 주입시의 통증이나 세포 독성, 면역반응의 유발 정도에 대한 연구도 좀 더 필요할 것으로 생각된다.

β-GP 용액의 양에 따라 키토산/β-GP 용액이 겔화되는 온도가 달라지는데 β-GP 용액의 양이 증가할수록 겔화되는

온도가 감소하고, pH를 상승시키는 β-GP의 양이 많아지면 키토산/β-GP 용액의 pH가 상승하고 따라서 겔화되는 온도는 감소하는 것으로 보고되고 있다. 즉, β-GP의 양이 많을수록, pH가 상승할수록 겔화되는 온도가 감소하는 결과를 보이고 있다. 이유는 pH 상승에 따라 키토산의 아민그룹이 중성화되어 키토산 체인의 극성이 감소되어 겔화가 시작되는데 더 적은 에너지가 필요한 것으로 보고되고 있다^{30,31}. 본 연구에서도 고분자량의 키토산의 경우 β-GP 용액과의 비율이 1:0.7보다 1:0.8인 경우가 즉, β-GP의 양이 증가할수록 더 낮은 온도에서 겔화되는 양상을 관찰할 수 있었으며 분자량 700 kDa 키토산/β-GP 용액의 온도 상승에 따른 pH 변화에서 β-GP의 양이 많을 때 pH 변화가 다소 완만한 양상을 관찰할 수 있었다.

키토산/β-GP 용액에서 β-GP는 sol 상태를 유지하면서 생리적인 범위까지 pH를 상승시키고 상온에서 sol 상태를 유지하고 온도 상승에 따라 겔화가 일어나도록 하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{20,29}. 본 연구에서도 고분자량의 키토산/β-GP 용액은 sol 상태를 유지하면서 생리적인 범위까지 pH가 상승되었고 역시 상온에서 sol 상태를 유지하고 온도 상승에 따라 체온 부근에서 겔화가 일어남을 관찰할 수 있었다. 특히 분자량 700 kDa 키토산/β-GP 용액의 온도 상승에 따른 pH 변화에서는 모든 온도 범위에서 생리적인 pH를 나타내었다.

β-GP 용액의 존재 하에 키토산 용액이 상온에서 생리적 pH를 유지하면서 sol 상태를 유지할 수 있는 기전은 첫 번째는 β-GP 용액이 약염기의 성질 ($pK_a = 6.34$)을 갖고 있어서 강염기를 키토산과 혼합했을 때 나타나는 키토산 체인의 급격한 극성 감소가 없는 것이고 두 번째는 β-GP의 phosphate 부분이 키토산의 아민그룹과 결합 후 남아있는 glycerol 부분이 키토산 체인을 분리함으로써 상온에서 생리적 pH를 유지하면서 sol 상태를 유지할 수 있게 된다고 보고되고 있다²⁰.

양이온의 성질을 띠는 키토산과 음이온의 성질을 띠는 β-GP 용액은 분자간 다양한 상호 작용이 존재하는데 첫 번째는 같은 전하를 띠는 키토산 분자간, β-GP 분자간의 척력이 있고 두 번째는 반대 전하를 갖는 키토산, β-GP 분자간의 인력이 있고 세 번째는 키토산 체인간 서로 당기는 수소(hydrogen) 결합과 소수성(hydrophobic) 결합이 존재한다^{18,20}. 따라서 온도 상승에 따라 키토산/β-GP 용액이 겔화되는 것은 위의 세 가지 힘의 균형이 변함에 따라 일어나게 된다. 즉, 온도 상승에 따라 키토산 아민 그룹의 proton이 β-GP 분자의 phosphate 부분으로 전달되고 그 결과 키토산 체인의 극성이 감소하고 동시에 반대 전하를 갖는 키토산, β-GP 분자간의 인력이 감소함에 따라 상대적으로 키토산 체인간 서로 당기는 수소 결합과 소수성 결합이 우세하게 되어 겔화가 일어나게 된다^{18,20,32,33}.

본 연구에서 키토산 분자량 700 kDa의 경우 β-GP가 1:0.75 농도에서 인체의 체온과 유사한 36.5°C에서 겔화가

일어나서 온도감응성의 성질을 나타내었고 생체 온도에서 생리적 pH를 보였고 키토산에 β -GP를 첨가함으로써 생리적 pH에서도 주입이 가능한 sol 상태를 유지함을 관찰하였다. 키토산/ β -GP 용액이 온도 상승에 따른 sol-gel 변환을 보이는 현상은 중요한 의미를 가질 수 있다. 첫 번째 이유는 생체 내에서 겔화되는 기전이 용매의 교환에 의한 방법³⁴⁻³⁶은 불완전하게 겔화 되어서 국소적 또는 전신적 독성을 나타낼 수 있고, 유기 용매가 전달하고자 하는 단백질이나 약물을 변성시킬 수 있는 가능성이 있으며 자외선 조사를 필요로 하는 방법^{37,38}은 광원 투과율의 제한으로 적용 범위가 한정적이고 주위 조직에 열 손상을 줄 가능성이 있지만 온도 상승에 따라 겔화가 되는 온도 감응성 고분자는 이러한 문제점이 없는 것이 큰 장점으로 작용할 수 있기 때문이다. 두 번째는 겔화되기 전에 주입이 가능함으로써 수술적 방법보다 시술이 간편하고 환자의 불편감이 최소한이고 주입하는 양과 위치를 정확하게 조절할 수 있는 장점들을 가질 수 있기 때문이다^{2,18}. 세 번째는 특히 키토산/ β -GP 용액이 (700 kDa, 1:0.75) 생리적 pH를 유지하면서 체온 부근에서 즉각적인 겔화가 일어남으로써 세포치료 시의 큰 단점인 치료 효과 발현의 지연을 극복할 수 있는 가능성이 있기 때문이다. 또한 생리적 pH를 유지하는 성질은 살아있는 세포나 단백질을 함께 투여할 수 있는 비계의 중요한 요구 조건을¹⁹ 만족시켰으나 본 연구에서 키토산/ β -GP 용액과 함께 섬유모세포를 증식 시킨 경우 세포의 증식이 원활하지 않은 점으로 미루어 볼 때 생리적 pH를 유지하는 성질 외에 다른 요건을 충족시켜야 됨을 알 수 있었다.

조직 공학에 사용되는 비계가 갖추어야 할 요건 중의 하나는 세포에 대한 독성이 없어야 하고 물질 교환이 자유롭게 이루어지기 위해서 세공의 크기가 100-200 μ m이고 공극률이 90% 이상이어야 한다고 보고되고 있다^{19,39,40}. 키토산은 세포 독성이 없는 것으로 보고되고 있고⁴¹, glutaraldehyde와 콜라겐/키토산을 교차 결합 시킨 경우의 세공 크기는 100-200 μ m 정도로 보고되고 있는 반면²⁶ Mi 등⁴²은 glutaraldehyde로 교차 결합 시킨 키토산 겔의 확산 속도는 교차 결합이 증가할수록 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서는 키토산/ β -GP 용액에 섬유모세포를 접종 시키고 증식 시켜 본 결과 섬유모세포만 증식 시킨 결과에 비해 세포의 개체수가 1주차 이후부터 감소한 결과를 보였는데 이는 키토산/ β -GP를 통한 섬유모세포와 배지 간의 물질 교환의 효율이 감소한 것으로 추정된다. 확산 속도는 중합체의 분자량이나 크기, 교차 결합의 정도에 따라 달라지므로^{43,44} 키토산/ β -GP를 통한 섬유모세포와 배지 간의 물질 교환의 효율 감소로 인한 세포의 사망률 증가를 방지하기 위한 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각된다. 또한, 비계 내부와 표면간의 세포 생존율의 차이 유무를 관찰하여 비계 내부에서의 세포의 생존 확률 증가에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

키토산/GAG (glycosaminoglycan)로 구성된 비계는 이식된 세포로부터 분비된 성장 요소를 유지하고 농축시키는

것으로 보고된 바 있고⁴⁵, 알지네이트/자가 연골 세포를 요실금 (urinary incontinence) 치료를 위해 주입한 결과 한 번의 주입으로 80%의 환자에서 개선이 보고된 바⁴⁶ 3차원적 구조를 갖는 비계는 세포의 기질과 유사한 구조를 가짐으로써 세포가 부착, 증식, 분화를 할 수 있는 구조를 제공한다^{19,26}. 본 연구의 콜라겐 발현양 비교에서는 키토산/ β -GP 용액에서 섬유모세포를 증식 시킨 경우가 섬유모세포만 증식 시킨 경우 보다 단위세포 당 콜라겐의 발현양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과에서 고분자량 키토산/ β -GP 용액은 생리적 pH와 체온 부근에서 sol-gel 변환을 보임으로써 주입이 가능한 물성이 있으며 생체 온도에서 즉각적인 겔화가 일어남을 확인함으로써 세포치료 시의 단점인 치료 효과 발현의 지연을 극복할 수 있는 가능성을 보였으나 물질 교환의 효율 감소가 추정되는 바 이의 개선을 위한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

연조직 증강을 위한 세포치료 시 비계로서 온도 감응성 고분자의 적용에 관한 연구를 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다. 키토산의 분자량과 β -GP 용액의 양에 따른 온도 감응성 고분자의 겔화 특성과 키토산/ β -GP 용액의 온도에 따른 pH 변화를 살펴보고, 키토산/ β -GP 용액에 자가 섬유모세포를 접종시켜 세포의 기질인 콜라겐의 발현양을 관찰함으로써 키토산/ β -GP 용액의 자가 섬유아세포에 대한 영향과 효과를 관찰하였다. 결과는 다음과 같다.

1. 키토산 (100 kDa 이상)/ β -GP 용액 (1:0.75)은 생리적 pH와 체온 부근에서 sol-gel 변환을 보임으로써 주입이 가능한 물성이 있으며 생체 온도에서 즉각적인 겔화가 일어남을 확인 하였다. 이는 연조직 증강을 위한 세포치료 시 비계로서 온도 감응성 고분자를 적용함으로써 세포치료 시의 단점인 치료 효과 지연을 보완할 수 있는 가능성을 보였다고 생각된다.
2. 섬유모세포의 증식과 콜라겐 총발현양은 세포만 증식 시킨 경우에서는 시간에 비례해서 증가하였으나 키토산/ β -GP 용액과 함께 세포를 증식 시킨 경우에는 1주차 이후부터 세포의 개체수와 콜라겐 총발현양이 감소하였다.
3. 키토산/ β -GP 용액과 함께 세포를 증식시킨 경우가 단위세포 당 발현된 콜라겐의 양이 세포만 증식 시킨 경우 보다 증가함을 관찰하였다.

이로써 키토산과 β -GP를 이용한 배양이 세포의 기능 면에서 유리함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Homicz MR, Waston D. Review of injectable materials for soft tissue augmentation. *Facial Plast Surg* 2004;20:21-9
2. Cheng JT, Perkins SW, Hamilton M. Collagen and injectable filler. *Otolaryngol Clin North Am* 2002;35:73-85
3. Faigen S. Facial soft tissue augmentation with injectable autologous and allogenic human tissue collagen matrix (autologen and dermalogen). *Plast Reconstr Surg* 2000;105:362-73
4. Mak K, Toriumi D. Injectable filler materials for soft tissue augmentation. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27:211-22
5. Framer FM, Churukium MM. Clinical use of injectable collagen: a three-year retrospective review. *Arch Otolaryngol* 1984;110:93-8
6. Cooperman LS, Makinon V, Bechler G, Phariss BB. Injectable collagen: a six-year clinical investigation. *Asthet Plast Surg* 1985;9:145-51
7. Krauss M. Recent advances in soft tissue augmentation. *Semin Cutan Med Surg* 1999;18:119-28
8. Bousquet MT, Agerup B. Restylane lip implantation: European experience. *Operat Tech Oculoplast Orbital Reconstr Surg* 1999;2:172-6
9. Cantisano-Zilkha M, Bosniak S. Hyaluronic acid gel injections for facial rejuvenation: 3-year clinical experience. *Operat Tech Oculoplast Orbital Reconstr Surg* 1999;2:177-81
10. Maas C. Characteristics of implant materials. *Arch Facial Plast Surg* 2000;2:67
11. Parker F. Structure and function of the skin. In: Orkin M, Mailbach HI, Dahl MV, eds. *Dermatology*. San Mateo, CA:Appleton and Lange: 1991:1-14
12. Boss WK, Usal H, Fodor PB, Chernoff G. Autologous cultured fibroblasts: a protein repair system. *Ann Plast Surg* 2000;44:536-42
13. Waston D, Keller GS, Lacombe V, et al. Autologous fibroblast for treatment of facial rhytids and dermal depressions. *Arch Facial Plast Surg* 1999;1:165-70
14. Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli G. Autologous cultured fibroblasts injection for facial contour deformities: A prospective, placebo-controlled, phase III clinical trial. *Dermatol Surg* 2007;33:263-8
15. Yang S, Leong K-F, Du Z, Chua C-K. The design of scaffold for use in tissue engineering. Part I. Traditional factor. *Tissue Eng* 2001;7:679-89
16. Park JB, Lakes RS. *Biomaterials: an introduction*, 2nd ed. New York: Plenum Press; 1992
17. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001;101:1869-77
18. Ruel-Gariepy E, Leroux J-C. In situ-forming hydrogels - review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm and Biopharm* 2004;58:409-26
19. Drury JL, Mooney D. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003;24:4337-51
20. Chenite A, Buschmann M, Wang D, Chaput C, Kandani N. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers* 2001;46:39-47
21. Martini AD, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005;26:5983-90
22. Molinaro G, Leroux JC, Damas J, Adam A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials* 2002;23:2717-22
23. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann M, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan from biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000;21:2155-61
24. Jarry C, Chaput C, Chenite A, Renaud MA, Buschmann M, Leourx JC. Effect of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *J Biomed Mater Res* 2001;58:127-35
25. Ruel-Gariepy E, Chenite A, Chaput C, Guirguis S, Leourx JC. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *Int J Pharma* 2000;203:89-98
26. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/ chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4833-41
27. Hockin HK, Simon Jr CG. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005;26:1337-48
28. Ho MH, Kuo PY, Hsieh HJ, Hsien TY, Hou LT, Lai JY, et al. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials* 2004;25:129-38
29. Jarry C, Leourx JC, Haeck J, Chaput C. Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: Effect on thermogelling chitosan- β -glycero phosphate systems. *Chem. Pharm. Bull.* 2002;50:1335-440
30. Rwei SP, Chen TY, Cheng YY. Sol/gel transition of chitosan solutions. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2005;16:1433-45.
31. Cho J, Heuzey MC, Begin A, Carreau PJ. Physical gelation of chi-tosan in the presence of beta-glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*. 2005;6:3267-75.
32. Karlstrom G, Carlsson A, Lindman B. Phase diagram of nonionic polymer-water systems. Experimental and theoretical studies of the effects of surfactants and other cosolutes. *J Physical Chem* 1990;94:5005-15
33. Gekko K, Mighishima H, Koga S. Effects of sugars and polyols on the sol-gel transition of k-carrageenan: calorimetric study. *Int J Biologic Macromole* 1987;9:146-52
34. Shively ML, Coonts BA, Renner WD, Southard JL, Bennet AT. Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system. *J Control. Release* 1995;33:237-43
35. Haglund BO, Joshi R, Himmelstein KJ. An in situ gelling system for parenteral delivery. *J Control. Release* 1996;41:229-35
36. Eliaz RE, Szoka FC. Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants. *Gene Ther* 2002;9:1230-7
37. Ono K, Saito Y, Yura H, Ishikawa K, Kurita A, Akaike T, et al. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J Biomed Mater Res.* 2000;49:289-95
38. Burkoth AK, Anseth KS. A review of photocrosslinked poly-anhydrides: in-situ forming degradable networks. *Biomaterials* 2000;21:2395-404
39. Freyman TM, Tannas IV, Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progr Mater Sci* 2001;46:273-82
40. Chen GP, Ushida Y, Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Biosci* 2002;2:67-77
41. Lee KY, Ha WS, Park WH. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives. *Biomaterials* 1995;16:1211-6
42. Mi FL, Kuan CY, Shyu SS, Lee ST, Chang SF. The study of gelation kinetics of chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and drug release. *Carbohydr Polym* 2000;41:389-96
43. Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotech* 1990;8:71-8
44. Lu S, Anesth KS. Release behavior of high molecular weight solute from poly(ethylene glycol)-based degradable networks. *Macro-molecules* 2000;33:2509-15
45. Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1133-42
46. Bent AE, Tutrone RT, McLennan MT, Loyd LK, Kennelly MJ, Badlani G. Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocyte as a bulking agent. *Neurourol Urodynam* 2001;20:157-65