

배양 혈청이 섬유아세포의 증식 및 교원질합성에 미치는 영향

이민아 · 서성익 · 한승규 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Effect of Serum Media on Fibroblast Proliferation and Collagen Synthesis

Min Ah Lee, M.D., Sung Ig Seo, M.D.,
Seung Kyu Han, M.D., Woo Kyung Kim, M.D.

Department of Plastic Surgery, Korea University College of
Medicine, Seoul, Korea

Expanding cells *ex-vivo* is very important in tissue-engineering. Culture medium is usually supplemented with fetal bovine serum(FBS) in most of the experiments. However, cells grown in bovine serum media may possess the possibilities of disseminating bovine diseases and/or stimulating the patient's immune reactions. To overcome these problems, autologous or homologous serum should be used instead of the FBS. The purpose of this study is to compare cell proliferation and collagen synthesis depending on the kind of sera mixed on media and to provide a guideline on applying established experimental data to clinical cases. Human dermal fibroblasts were obtained from four patients. Five thousand cells per well in 96-well plates were incubated DMEM/F-12 Nutrient with varying serum mixture; 10% autologous serum, 10% homologous serum, and 10% FBS. Five days after incubation fibroblast proliferation and collagen production were determined by MTT assay and C1CP enzyme immunoassay. The mean cell number were; 3.95×10^4 /well, 2.97×10^4 /well and 2.30×10^4 /well, respectively. The average amounts of collagen synthesized were; 238.13 ng/ml, 204.88 ng/ml, and 163.88 ng/ml in each. These results show that the use of human serum mixture may contribute to, not only preventing disseminated infection of bovine diseases. but also increase cell proliferation and collagen synthesis without simulating the patient's immune reactions.

Key Words: Serum, Culture medium, Fibroblast, Collagen

Received March 18, 2005

Revised May 24, 2005

Address Correspondence: Seung Kyu Han, M.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Guro Hospital, 97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea. Tel: 02) 818-6698 / Fax: 02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

* 본 논문은 2003년 제 54차 대한성형외과학회 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

I. 서론

최근 세포이식을 이용한 당뇨족부궤양 등 만성질환의 치료와 조직공학을 비롯한 생명과학과 관련된 여러 분야의 실험들이 전개되고 있다. 이들 대부분의 실험모델에서는 기본 배지에 태아우혈청(fetal bovine serum: FBS)을 혼합하여 배양을 시행하고 결과를 도출하고 있다. 그러나 태아우혈청을 임상 목적으로 사용할 경우 광우병 등의 질병 전파 가능성을 배제 할 수 없으며, 또한 소의 혈청 단백질에 대한 인간의 면역반응을 고려해야만 한다. 이러한 문제점 등으로 인하여 실제 생체 내 이식을 위해서는 자가혈청이나 동종혈청을 사용하게 된다. 그렇지만 이러한 자가혈청이나 동종혈청에 대한 실험 자료는 거의 없는 실정이고, 기존의 많은 실험 자료들은 태아우혈청 사용에 기초한 실험 조건에서 산출된 것들이다. 따라서 생체이식이 필요할 때마다 자가혈청이나 동종혈청을 이용한 선행 실험을 따로 할 수 밖에 없는데, 이는 비경제적일 수밖에 없다.

본 연구의 목적은 기본 배지에 혼합하는 혈청의 종류에 따라, 창상치유, 조직공학 등과 관련하여 성형외과 영역에서 가장 유용한 세포인 진피섬유아세포의 증식 및 교원질합성의 정도를 비교함으로써, 기존의 정보를 실제 임상에 적용할 때 중요한 참고자료를 제시하는 것이다.

II. 재료 및 방법

가. 섬유아세포 추출

부분층식피술을 시행받은 17-41세의 정상 성인 4명에서 식피술 후 남은 잉여 피부조직에서 표피를 제거한 후 진피만을 채취하였다. 이를 약 2 mm 정도 크기로 잘게 나눈 후 3개의 100 mm 배양용기에 따로 분주하고 50 µg/ml 농도의 gentamycin과 50% 자가혈청, 동종혈청, 태아우혈청(GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)을 포함한 4 ml의 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 Nutrient(DMEM/F-12; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)와 함께 5% CO₂와 100% 습도 하에 2시간 보관하였다. 진피조직이 배양용기에 달라붙은 후 50 µg/ml gentamycin과

5% 자가혈청, 동종혈청, 태아우혈청을 포함한 DMEM/F-12 10 ml를 추가하여 배양을 시작하였다. 모든 배양 과정에서 gentamycin 50 $\mu\text{g/ml}$, 5% CO₂, 100% 습도가 유지 되도록 하였으며, 2-3일마다 배양액을 교환하였다. 충분한 양이 배양되면 trypsinization으로 세포들을 유리하였다. 유리된 세포들은 Dulbeccos's phosphate buffered saline(DPBS)로 2.7배 희석한 후 17분 동안 450×g의 속도로 원심침전법을 시행하여 모집한 후 이를 다시 DPBS로 두 번 세척하고 재부유 시킨 후 100 μm 의 nylon mesh를 이용, 여과하여 추출하였다. 세포의 밀도는 hemacytometer(Neubauer-improved counting chambers, Superior Marienfeld, German)를 이용하여 Trypan blue dye exclusion 방법을 이용하였다. 그리고 이렇게 추출된 세포는 1회 계대배양한 후 본 실험에 사용하였다. 자가혈청은 식피술 전 환자의 동의를 얻어 20 ml씩 혈액을 채취한 후 제조하였고 동종혈청은 건강한 31세 남자 공여자(본 연구의 제 2저자)로부터 채취하여 사용하였다.

나. 서로 다른 혈청을 첨가한 배지에서 섬유아세포의 배양

본 실험에서는 96 well 배양기에 각 well당 5×10^3 개의 섬유아세포를 DMEM/F-12 배양액 180 μl 에 넣고 자가혈청, 동종혈청, 태아우혈청 등 서로 다른 3 종류의 혈청 20 μl 를 첨가하여 다음 배양을 시작하였다.

제 1군: DMEM/F-12 + 10% autologous serum

제 2군: DMEM/F-12 + 10% homologous serum

제 3군: DMEM/F-12 + 10% fetal bovine serum으로 각 환자 세포 당 2회 실시하였다.

다. 섬유아세포의 증식 비교

배양 5일째 되는 날 세포수를 MTT방법을 이용하여 spectrophotometer(Behring ELISA processor II, Behring diagnostics, German)로 측정하였다. 측정 원리는 세포 내의 mitochondrial dehydrogenase 효소가 노랑색의 수용성인 MTT기질을 균청색의 비수용성인 formazan crystal로 변화시키는 정도를 측정하는 것이다. 방법은 PH 7.5의 조건하에서 DPBS와 혼합하여 5 mg/ml의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT: Sigma, st. Louis, USA) 용액을 만든 후 이를 0.2 μl 의 filter로 소독하고 100 μl 세포배양액당 10 μl 의 양으로 96well 세포배양액에 첨가하고 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 0.04M HCl in propan-2-ol 용액 100 μl 를 첨가하고 shaker에서 5분간 흔들어 준 후 ELISA 판독기로 570 nm에서의 흡광도를 판독하였다. 흡광도 값을 실제 세포수로의 환산을 위한 표준곡선은 실험에 사용했던 세포를 well당 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 개로 처

리하여 만들었다.

라. 섬유아세포의 교원질합성 비교

각 군의 교원질합성 측정은 세포간 물질 중 가장 중요한 제 1형 교원질의 양을 collagen type I carboxy-terminal propeptide(CICP) assay방법을 이용하여 시행하였다. 이 방법은 교원질합성시 procollagen의 extension peptide가 떨어져 나간 후 collagen fibril로 변화해 가는 원리를 이용하여 교원질의 양을 측정하는 것이다. 사용한 kit는 Metra CICP assay(Quidel, CA, U.S.A.) EIA kit였으며 배양용기 코팅은 murine monoclonal anti-CICP 항체였고, 2차 항체는 rabbit polyclonal anti-CICP 항체, 효소접합체는 alkaline phosphatase에 접합된 goat anti-rabbit IgG 항체가 사용되었다.

표준곡선은 0, 1, 2, 5, 20, 80 ng/ml의 CICP로 제작되었고 405 nm 파장에서 흡광도를 ELISA 판독기로 측정하였다. 이렇게 측정된 교원질의 양은 각 군별로 평균치를 산출하여 비교하였다.

마. 통계처리 및 유의성 검증

결과는 중앙값 표준편차로 표시하였고 통계처리는 윈도우 통계프로그램 SPSS 10.0를 이용한 Kruskal-Wallis 통계 방법으로 p값을 산출하여 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 결 과

세포수의 평균은 자가·동종·태아우혈청군에서 각각 $3.95 \times 10^4/\text{well}$, $2.97 \times 10^4/\text{well}$, $2.30 \times 10^4/\text{well}$ 로, 10% 자가혈청 및 10% 동종혈청의 경우, 10% 태아우혈청을 기본 배지에 혼합하는 경우 보다 세포 증식이 각각 71.7%, 29.1% 증가되었다($p < 0.05$)(Fig. 1).

교원질 양의 평균은 각각 $238.13 \pm 15.6 \text{ ng/ml}$, $204.88 \pm 13.5 \text{ ng/ml}$, $163.88 \pm 9.9 \text{ ng/ml}$ 로, 자가 및 동종혈청군이 태아우혈청군보다 각각 45.3% 및 25.0% 높았다($p < 0.05$)(Fig. 2).

IV. 고 찰

세포배양은 이제 분자생물학이나 세포학뿐만 아니라 의학, 조직공학, 생체공학에 이르기까지 여러 학문 분야에서 널리 사용되고 있는 기술로써, 섬유아세포, 골세포, 연골세포 및 많은 종양세포 등 거의 모든 세포의 실험실 내 배양이 가능해졌다.

세포의 증식에는 적당한 조건이 필요하게 된다. 적당한

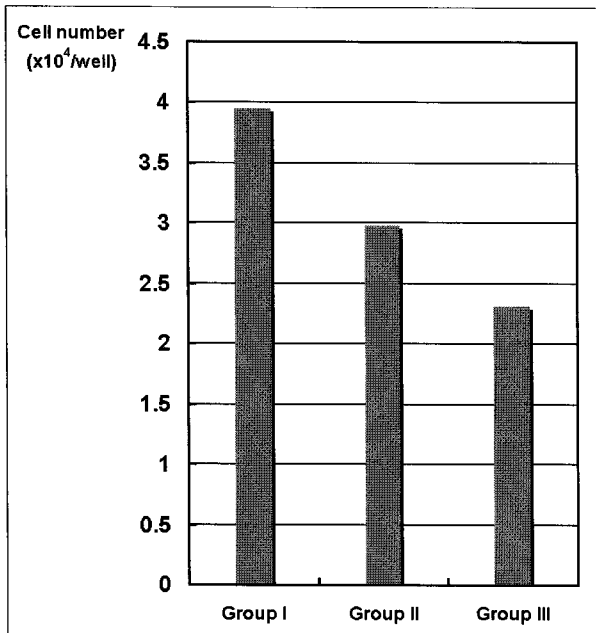


Fig. 1. Fibroblast proliferation. The means of cell number of fibroblasts incubated in DMEM/F-12 with varying serum mixture. Group I shows more cell numbers with statistically significant differences($p < 0.05$). Group 1: 10% Autologous serum. Group 2: 10% Homologous serum. Group 3: 10% Fetal bovine serum.

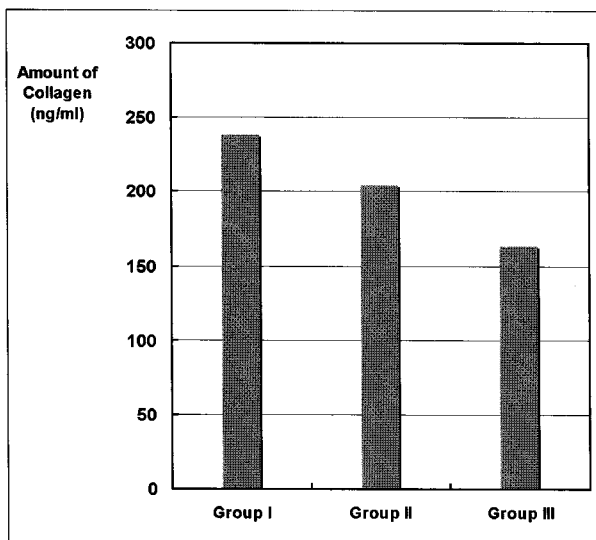


Fig. 2. Collagen concentration in a 96-well plate with various serum media. The average amounts of collagen synthesized from fibroblasts incubated in DMEM/F-12 with varying serum mixture. Group I shows more amounts of collagen synthesized from fibroblasts with statistically significant differences($p < 0.05$). Group 1: 10% Autologous serum. Group 2: 10% Homologous serum. Group 3: 10% Fetal bovine serum.

영양소와 물리적 특성, pH, 무기 염류 등이 필요한 것이다. 이렇듯 세포의 증식에 필요한 환경을 인공적으로 조성

한 것이 배지이다. 배지는 세포가 본래 조직에 있을 때와 같은 모든 환경적 조건을 제공해 주어야 하는 것이 가장 이상적이겠으나, 현실적으로 불가능한 일이므로 이에 가장 근접한 환경을 제공해 줄 수 있는 배양 배지를 선택하는 것이 중요하다. 그래야만 세포가 생존할 수 있고 나아가 증식과 분화가 가능해지는 것이다.¹ 본 연구에서는 시장에서 구매 가능한 배지 중 이전 연구를 통하여 인체 연골세포 배양에 가장 유리하였던 DMEM/F-12를 사용하였다.² 이 배지는 섬유아세포 배양에 있어서도 가장 우수한 결과를 얻은 바 있다(실험 자료 생략).

세포 배양에서 사용하는 배지는 각종 아미노산, 비타민, 무기질, 포도당 등 여러 가지 성분이 혼합되어 있다. 그러나 실제 세포의 배양시에는 혈청을 혼합하게 되는 경우가 대부분이다. 이는 기존 배지가 적당한 영양분과 조건들을 갖추고 있다고 하더라도, 실제 세포의 성장과 증식에는 이들 배지의 조성만으로는 공급할 수 없는, 혈청 성분을 통해서만 공급이 가능한 특정 요소들이 존재하기 때문이다.³ 혈청의 혼합 시 혈청의 농도도 세포의 배양에 영향을 줄 수 있다. 대부분의 세포배양에서는 5-20% 농도의 혈청을 배지와 혼합해서 사용하는데, 이 범위의 농도에서는 비례하지는 않으나, 농도가 높을수록 세포배양에 유리한 것으로 되어 있으므로, 이번 실험에서는 가장 일반적으로 사용되는 농도인 10% 혈청을 사용하였다.

혼합하는 혈청으로 기존의 실험 모델들에서는 대부분 태아우혈청을 사용하였다. 이는 일단 사람의 혈청에 비해 구하기가 쉽다는 장점이 있다. 또한 태아혈청이기 때문에 혈청 성분 중 세포가 바닥에 부착하는데 필수적인 요소인 fetuin과 hydrocortisone이 상대적으로 고농도로 존재하고 있다.⁴ 이 외에도 증식에 필요한 성장호르몬 등도 태아혈청에 더 많이 함유되어 있다. 하지만, 이러한 장점들에도 불구하고, 태아우혈청을 혼합하여 배양된 세포들은 생체 내로 다시 이식해 넣는 과정에서 몇 가지 해결해야 되는 문제점들을 안고 있다. 기존에 알려진 수인 감염 발생, 새로운 수인 감염의 창출, 광우병 등의 질병 전파 가능성, 소의 혈청 단백질에 대한 인간의 면역반응, 과민반응 등이 그것이다.⁵

현재의 연구 경향은 세포의 성장이나 증식을 단순히 연구하는 단계에서 진일보하여 이제는 이렇게 증식시킨 세포를 다시 인체 내로 재이식하는 조직 공학이 대두되고 있는 시점이다. 그래서 태아우혈청의 사용은 더욱 경계심을 불러일으키고 있고 그 대안으로 여러 가지 방법들이 제시되고 사용을 시도하고 있다.

우선 태아우혈청을 사용하되 문제를 일으킬 수 있는 물질을 제거하기 위한 방법들이 있다. 특수 필터를 사용하여 걸러낸 혈청을 사용하는 방법, 감마선이나 자외선 방사한

혈청, 화학약품처리 혈청 혹은 열처리 혈청을 사용하는 방법 등이 그것이다. 그러나 이러한 처리를 한 혈청은 완벽을 기하였다 하더라도 문제의 소지를 일으킬 수 있는 물질 모두가 제거되었다는 신뢰성에 문제가 있을 수 있고, 가장 중요한 세포의 성장 촉진 능력이 현저히 떨어지게 되며 비용 또한 만만치 않아 사용에 어려운 점이 있다. 두번째로 혈청 대체 물질을 개발하는 것인데 혈청의 특수 물질을 정제하여 생산해 낸 물질을 사용하는 것이다. 그러나 정제 과정에서 기본적으로 혈청을 이용하게 되기 때문에 혈청을 사용하는 한 생기는 문제들이 확률은 낮겠지만 완전히 제거될 수는 없다. 한편 아예 혈청이 없는 배지를 사용하는 방법도 있다. 이 방법은 비용면에서도 일정하고 항상 같은 배지를 재현할 수 있으며 혈청에서는 있을 수 있는 미지의 물질을 완전히 배제할 수 있다는 장점을 지닌다. 반면 배양 속도가 늦어지고 특정 세포를 배양할 때 각 분화 단계에서 원하는 특정 환경을 제시하지 못해 세포 분화를 일으킬 수 없게 되며 혈청에서는 부수적으로 제공되는 세포 보호 효과나 해독 효과도 기대할 수 없게 되는 제한점을 지닌다.⁶ 즉 아무리 이상적인 배지라 하더라도 세포 배양에 필요한 모든 조건을 인공적으로 갖출 수는 없으므로 결국 혈청을 혼합하여 부족한 성분을 보충 받아야 하는 것이다. 본 연구자들도 혈청을 첨가하지 않은 배지부터 농도를 달리한 배지로 실험을 수행한 적이 있으나 혈청을 첨가하지 않은 경우 실망스런 결과를 경험한 바 있다(실험자료 생략). 그래서 혈청의 사용은 완전히 배제될 수 없으며 태아우혈청은 자가혈청이나 동종혈청으로 대체되어야만 하는 것이다.

그러나 생체 이식이 필요할 때마다 자가 혈청이나 동종혈청을 이용한 선행 실험을 시행하는 것은 비경제적일 수밖에 없다. 따라서 기존 실험의 결과를 향후 임상 적용할 때 본 연구에서 나타난 결과치들의 상관관계가 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 생각한다.

특히 본 연구에서는 창상치유, 조직공학 등과 관련하여 성형외과영역에서 가장 유용한 세포인 진피섬유아세포를 사용했고, 세포외기질 합성의 지표로 교원질의 합성을 측정하였다. 삼중나선구조인 교원질은 처음에는 더 큰 분자구조의 전구물질인 procollagen의 형태로 합성된다. 즉 procollagen은 성숙된 교원질의 양쪽 끝의 amino-기와 carboxy-기에 extension peptide들이 붙어있는 형태인데 여기에 특이 protease들이 작용하여 extension peptide(혹은 propeptide)들을 끊어냄으로써 비로소 성숙한 교원질로 변화한다. 이때 떨어져 나가 배양액에서 순환하고 있는 이들 extension peptide들의 양을 측정하는 방법으로 실제 생성되는 교원질의 양을 측정하였다. 그 결과 자가혈청이나 동

종혈청 사용 시 기존의 태아우혈청을 사용했을 경우보다 세포의 증식과 교원질의 합성능이 월등히 증가되었는데, 태아혈청이 아님에도 불구하고 자가 혹은 동종혈청이 태아혈청이지만 이중혈청보다는 세포배양에 유리하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과에 대해서는 추가적인 연구가 더 필요하겠지만, 단백질, 영양소, 성장 호르몬, 무기질 등 세포 배양에 중요한 여러 요소들이 이중혈청보다는 자가혈청이나 동종혈청에서 구조적으로도 더욱 친숙하고 세포가 조직에 있을 때와 더 비슷한 환경으로 제공되기 때문이라 생각된다.

V. 결 론

본 실험에서 10% 자가 청 및 10% 동종혈청을 기본 배지에 혼합하는 경우에서 10% 태아우혈청을 사용한 경우보다, 섬유아세포의 증식능과 교원질합성능이 각각 71.7%, 29.1%와 45.3%, 25.0%로 증가됨을 알 수 있었다($p < 0.05$). 즉 자가혈청이나 동종혈청을 사용하는 것이 태아우혈청을 사용함으로 해서 우려되는 감염이나, 광우병 등의 질병 전파 가능성, 소의 혈청 단백질들에 대한 인간의 면역 반응 등에 대한 우려를 덜어줄 뿐 아니라 진피 섬유아세포의 증식 및 교원질합성능을 더욱 증가시키므로 향후 조직공학을 위한 세포배양에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 또한 본 연구가 태아우혈청에 기초한 기존 자료를 실제 임상 목적으로 적용하는데 유용한, 상관관계의 기준을 제시하여 이 분야에 관심 있는 연구자들에게 유용한 정보를 제공해 주리라 기대한다.

REFERENCES

1. ST Park: *Understanding of the cell culture*. 1st ed, Seoul, Jung-mun gak, 2002, p 24
2. Han SK, Kim WK, Mason ME: Evaluation of Medium Preparations for Temporomandibular Joint Disc Chondrocyte. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 26: 683, 1999
3. Yamada KM: Fibronectin and other cell interactive glycoproteins In Hay ED (eds): *Cell biology of extracellular matrix*. 2nd ed, New York, Plenum press, 1991, p 111
4. Fisher HW, Puck TT, Sato G: Molecular growth requirement of single mammalian cells: the action of fetuin in promoting cell attachment to glass. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 4, 1958
5. Yamamoto N, Isobe M, Negishi A: Effect of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci* 50: 63, 2003
6. Davis JM: *Basic Cell Culture*. 2nd ed, New York, Oxford University press, 2002, p 83