대한성형외과학회지. 제 33 권, 제 1 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 33, No. 1, 46 - 52, 2006

인체지방유래 간질세포의 부착 및 연골분화유도를 위한 PLGA 지지체의 플라즈마 처리 효과

동춘희[1] · 전영준[1] · 조현미[1] · 오득영[1] · 한동근[2] · 이종원[1] · 안상태[1]

가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실[1], 한국과학기술연구원 생체재료연구센터[2]

The Effect of the Plasma Treatment on PLGA Scaffold for Adhesion and Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stromal Cells

Chun Ji Dong, M.D.[1], Young Joon Jun, M.D.[1], Hyun Mi Cho, B.S.[1], Deuk Young Oh, M.D.[1], Dong Keun Han, Ph.D.[2], Jong Won Rhie, M.D.[1], Sang Tae Ahn, M.D.[1]

[1]Department of Plastic Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea,
[2]Biomaterials Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

High-density micromass culture was needed to take three dimensions culture with ASCs(adipose derived stromal cells) and chondrogenesis. However, the synthetic polymer has hydrophobic character and low affinity to cells and other biomolecules. Therefore, the surface modification without changes of physical and chemical properties is necessary for more suitable condition to cells and biomolecules. This study was performed to investigate the effect of surface modification of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) scaffold by plasma treatment (P(+)) on the adhesion, proliferation and chondrogenesis of ASCs, and not plasma treatment (P(-)). ASCs were isolated from human subcutaneous adipose tissue obtained by lipectomy and liposuction. At 1 hour 30 minutes and 3days after cell seeding onto the P(-) group and the P(+) group, total DNA amount of attached and proliferated ASCs markedly increased in the P(+) group ($p<0.05$). The changes of the actin under confocal microscope were done for evaluation of cellular affinity, at 1 hour 30 minutes, the shape of the cells was spherical form in all group. At 3rd day, the shape of the cells was fiber network form and finely arranged in P(+) group rather than in P(-) group. RT-PCR analysis of cartilage-specific type II collagen and link protein were expressed in 1, 2 weeks of induction. Amount of Glycoaminoglycan (GAG) markedly increased in P(+) group($p<0.05$). In a week, extracellular matrix was not observed in the Alcian blue and Safranin O staining. However in 2 weeks, it was observed that sulfated proteoglycan increased in P(+) group rather than in P(-) group.

In conclusion, we recognized that plasma treatment of PLGA scaffold could increase the hydrophilic property of cells, and provide suitable environment for high-density micromass culture to chondrogenesis

Key Words: Stromal cell, PLGA, Plasma, Surface properties, Micromass culture

Received November 29, 2005
Revised December 14, 2005

Address Correspondence : Jong-Won Rhie, M.D., Department of Plastic Surgery, The Catholic University of Korea,College of Medicine Kang-Nam St. Mary Hospital, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea. Tel: 02) 590-1350 / Fax: 02) 594-7230 / E-mail: rhie@catholic.ac.kr

* 본 연구는 과학기술부 핵심역량심화사업(2V00940) 지원으로 수행되었음.

I. 서 론

줄기세포의 연골분화를 유도하기 위해 고밀도농축배양법을 이용하는데, 이 방법은 세포간 상호작용을 가능케 하여 연골분화를 유도한다고 알려져 있다.[1,2] 이러한 상호작용은 N-cadherin같은 세포부착분자와 인테그린(integrin)에 의해 매개되어 연골화가 진행되는 동안의 세포 응집(cell condensation)에 중요한 역할을 하며,[3,4] 이러한 조건이 생쥐 팔다리싹(mouse limb buds)의 간엽계세포가 연골세포로 분화되는 과정과 유사하고, 간엽세포의 고밀도농축배양법이 연골화 연구에서 적당한 방법으로 알려져 있다.[3]

최근, 인체 지방조직의 간질혈관분획(stromal vascular fraction, SVF)이 뼈, 지방, 연골, 근육 등으로 분화할 수 있는 지방유래 줄기세포(adipose-derived adult stem cells, ASCs)를 포함하는 것이 밝혀졌으며, 지방조직은 골수에 비해 비침습적이고 간편한 방법으로 많은 양을 얻을 수 있는 장점도 가지고 있다.[5,6] 인체지방유래 성체줄기세포(human adipose-derived adult stem cells)는 고밀도농축배양으로 단층 배양하여 연골분화배지로 분화유도하면 연골의 특징인 삼차원구조의 세포결절(nodule)을 형성한다.[7] 인체지방유래 성체줄기세포를 삼차원 배양하여 연골분화를 유도하려면, 세포지지체에 세포가 잘 부착되어 고밀도농축배양이 가능해야하고 이는 세포지지체의 세포친화력

이 다른 조직배양보다 우월해야 한다는 것을 말한다. 합성중합체는 물리, 화학적 구조의 우수성으로 인해 많은 생체조직의 부착 및 배양을 가능하게 하였으나, 세포나 체액과 맞닿는 표면구조의 취약성과 소수성으로 인하여, 고밀도 농축배양에서 세포가 잘 붙지 못하는 단점이 있다. Poly (lactic-co-glycolic acid)(이하 PLGA) 지지체에 플라즈마 처리(plasma treatment)를 하면, 합성중합체의 물리, 화학적 구조의 변화 없이 표면에만 음전하를 띄게 변화시켜 표면의 친수성을 높여 주고 세포 친화력과 생체내 적합성을 증가시킬 수 있으며, 합성중합체의 소독에도 유용하다.[8-10]

저자들이 PLGA 세포지지체를 플라즈마 처리하여 표면개질 함으로써 친수성을 증가시켜 더 많은 세포가 부착, 증식되어 고밀도농축배양이 가능하도록 환경을 제공하였을 때, 이러한 표면 변화가 인체지방 간질세포의 연골분화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보는 것이 이 연구의 목적이다.

II. 재료 및 방법

가. 실험방법

1) 인체 지방조직에서 간질세포의 분리 및 증식

사람의 체내에서 얻은 지방조직을 항세균-항진균제가 포함된 phosphate buffer saline(PBS; Sigma, St. Louis, MO)으로 세척한 후 아주 잘게 조각내었다. 조각으로 된 지방조직은 0.03% collagenase(Sigma)와 함께 37℃에서 1시간 진탕 후, DMEM-hg(Dulbecco's Modified Eagle's Media high glucose)에 10% fetal bovine serum(Gibco, Gaithersberg, MD), 100 units/ml penicillin과 100 units/ml streptomycin이 포함된 간질배양액으로 효소반응을 중화시킨 다음, 1000 rpm(200 g)으로 10분간 원심분리하여 상층에 부유된 지질과 지방세포층은 버리고 하부의 간질혈관분획의 세포층 침전물을 분리하였다. 하층 침전물을 PBS로 두 번 수세하고, 37℃/5% CO_2 배양기에서 간질배양액으로 배양하고, 3차례 계대배양을 하여 충분한 양의 간질세포를 얻었다.

2) 다공성 PLGA 스펀지 제작

실험에 사용된 스펀지는 85 : 15 PLGA(MW : 120000-140000, Medisorb, Alkermes, USA) 중합체를 사용하였으며, 스펀지의 구멍크기는 methyl chloroform에 녹인 PLGA 수용액에 200 - 300 ㎛ 크기의 sodium bicarbonate 입자를 섞어 실리콘 틀에 굳히고 동결 건조시킨 후, 50% 알코올에서 발포시켜 구멍크기가 200 - 300 ㎛이고, 직경 4 mm 높이 2 mm의 원판형태의 스펀지로 만들었다.

3) PLGA 스펀지의 플라즈마 처리

제작된 다공성 PLGA 스펀지의 플라즈마 처리는 Radio Frequency(RF) glow discharge apparatus(model PD-2, Samco. Ltd., Kyoto. Japan)를 사용하였다. RF plasma apparatus 장치는 유리관 속에 2개의 스테인레스 방전판으로 구성되어 있으며, 상부 방전판의 경우 13.6 MHz의 radiofrequency generator에 연결되어 있어서 일정한 전기에너지의 방출이 가능하게 제작되어 있다. 플라즈마 처리를 위해서, 다공성 PLGA 스펀지를 아래쪽의 방전판에 올려놓은 후, 음압을 가하여 유리관 내부의 압력이 10^{-3} torr가 되게 하였다. 유리관 내로 acrylic acid(AA) monomer gas를 50 sccm으로 주입하여 내부의 압력이 0.2 torr로 유지되게 하면서, 상부 방전판에서 50 W의 전기에너지를 30초간 방출시켜, PLGA 표면에 acrylic acid가 부착되게 하였다. 이렇게 제조된 acrylic acid grafted PLGA 스펀지를 같은 조건에서 산소하에 전기에너지를 방출시켜, poly(acrylic acid) grafted PLGA 스펀지를 제조하였다.

4) 간질세포의 PLGA 스펀지내 삼차원배양

수분 흡수율을 높이고 지지체를 소독하기 위해 지지체를 70% alcohol에 3시간 소독한 뒤, PBS로 20분씩 3차례 세척하였다. 2.5×10^7/ml의 간질세포 30 ㎕(7.5×10^5)를 PLGA 스펀지에 분주하고, 37℃/5% CO_2 배양기에서 1시간 30분 동안 세포를 부착한 뒤, 간질배양액으로 채워주었다. 3일 뒤, 연골분화유도 배양액으로 교체하였고, 배양액은 3일마다 교체하였다.

5) 연골분화유도 배양액

간질 배양액은 DMEM-hg에 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin과 100 units/ml streptomycin으로 구성하였고, 연골분화유도 배양액은 간질 배양액에 1 × ITS supplement(Gibco), 37.5 ㎍/㎖ ascorbate 2-phosphate (Sigma), 100 nm dexamethasone(Sigma)과 10 ㎍/㎖ hTGF-β1(Roche, Mannheim, Germany)으로 구성하였다.

나. 평가 및 분석

플라즈마를 처리한 PLGA 스펀지에 배양한 P(+)군과 플라즈마를 처리하지 않은 PLGA 스펀지에 배양한 P(-)군에 대하여 부착 및 증식능과 연골분화능을 비교하였다. 부착 및 증식능은 세포분주 후, 각각 1.5시간과 3일 동안 배양하여 표본을 수집하였고, 분화능은 각각 1, 2주 동안 연골분화유도 배양액으로 배양하여 표본을 수집하였다.

1) 부착능

a. PLGA 스펀지 내 세포부착 및 증식정도 측정

각 군의 스펀지 내에 부착 및 증식된 세포의 수를 측정하기 위해 Hoechst 33258 dye(Sigma)를 이용하여 DNA를

측정하였다. 부착이 안된 간질세포는 PBS로 세척하여 제거한 후, 스펀지를 phosphate saline buffer(0.05M $NaPO_4$, 2.0 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4)에 넣고 분쇄기(homogenize, SDT 1080, Tekmer, Germany)로 분쇄하고, 초음파로 파쇄(Ultrasonic Dismembrator, Branson, USA)하였다. 파쇄한 표본을 4℃에서 1시간 방치하여 부유물을 가라앉히고, 상등액을 Hoechst dye solution(0.1 ㎍/㎖)과 섞은 후, fluoremeter(Spectrofluorometer, Kontron instruments, Switzerland)를 이용하여 excitation 365 nm, emission 458 nm에서 형광량을 측정하였다. 표준곡선은 calf thymus DNA를 이용하여 DNA의 양을 환산하고 부착 및 증식능을 비교하였다.

b. PLGA 스펀지 내 부착된 간질세포의 형태 관찰

세포지지체 내에 부착된 간질세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여, 세포를 분주하고 1.5시간과 3일 후에 각 PLGA 스펀지를 PBS로 3차례 세척하여 1 mm 두께로 자른 후, 0.1% triton X-100과 4% Paraformadehyde로 고정하여 Phalloidin-TRITC(Sigma)와 DAPI(Sigma)로 각 세포의 Actin과 핵을 염색하였다. Confocal Microscopy(MRC 1024, Bio-Rad, USA)를 이용하여 세포질내의 actin을 관찰하여 형태학적 변화를 알아보았다.

2) 분화능

a. 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction)

세포구조물을 TRIZOL 시약(Gibco)을 이용하여 RNA전량을 분리하였으며, UV spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 이용하여 260 nm / 280 nm에서 흡광도의 비를 구하여 RNA의 순도를 검증하고, 전기영동으로 RNA의 파괴 유무를 확인하였다. 분리된 RNA로부터 cDNA의 합성은 First Strand cDNA Synthesis Kit(Life Technologies, Grand Island, NY)를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응은 link protein, collagen type II, 그리고 내부 대조군 유전자인 β-actin의 유전자 발현을 확인하였다. Oligonucleotide primer는 Table I과 같고, OLIGO Primer Analysis Software를 이용하여 적절한 온도에서 시행하였다.

b. Alcian Blue 염색

연골기질의 구성물질인 sulfated proteoglycan을 acidic pH에서 Alcian blue staining으로 확인하였다. 세포구조물을 4% paraform aldehyde에서 1시간 고정하고, 5 ㎛ 두께로 절편을 만든다. 절편을 0.1N hydrochloride(pH 1)에서 5분 반응시킨 뒤, 1% Alcian blue 8GX(Sigma)로 12시간 염색한다. 0.1N hydrochloride로 두 번 수세하고, 배경염색은 nuclear fast red(Sigma)로 5분 염색 후 봉입한다.

c. Safranin O염색

파라핀 포매하여 0.5 ㎛의 절편을 만들고, Weigert's iron hematoxylin으로 5분 염색하고, acid alcohol로 수세한 뒤, 흐르는 물에서 행군다. 0.02% fast green FCF로 3분 염색하고, 1% acetic acid로 30초 동안 수세하고, 0.1% Safranin O로 5분 염색 후 봉입한다. 디지털영상은 Zeiss Axioskop II microscope(Carl Zeiss, Munich, Germany)와 spot software(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI)로 분석하였다.

d. Dimethylmethylene blue를 이용한 Glycosaminoglycan (GAG)양 측정

전체 GAG양은 papain digestion과 dimethylmethylene blue dye를 이용하였다. 세포구조물은 125 mg/ml papain type III(Sigma)로 처리하고, 60℃에서 24시간 동안 중탕한다. Dimethylmethylene blue stock solution(dimethylmethylene blue, sodium chloride, glycine, 0.1 M hydrochloride)과 섞고 15초 후에 분광광도계로 525 nm에서 흡

Table 1. Oligonucleotide Primers for Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction and Expected Product Sizes

Gene	Primer	Product Size(base pairs)
Link protein	F CCTATGATGAAGGCGGTGC R GGTAACTTGCATGAGTTC	342
Collagen type II	F CTGCTCGTCGCCTCTGTCCTT R AAGGGTCCCAGGTTCTCCATC	IIA, 432; IIB, 225†
β-Actin	F GCCCCTCCATCGTCCACCGC R GGGCACGAAGGCTCATT	493

Accession numbers were obtained from the National Institutes of Health GenBank databank.
†: Collagen type IIA splice variant, prechondrocytes and mesenchymal chondrocytic precursors; collagen type IIB splice variant, mature chondrocytes.

광도를 측정한다. Chondroitin-6-sulfate(Sigma)를 표준곡선으로 이용하여 GAG의 양을 환산하였다.

e. 통계처리

본 실험 결과로 얻은 성적은 산술 평균치와 표준편차로 표시하였고, 각 군 결과의 비교는 통계적 유의성을 확인하기 위하여, SPSS for windows 프로그램의 Student's t test를 사용하였으며, 유의수준은 5%로 하였다.

III. 결 과

가. 간질세포 부착 및 증식정도 측정

세포를 분주하고 1.5시간과 3일 후에 측정한 각 세포구조물의 DNA측정에서 플라즈마를 처리하지 않은 PLGA 지지체에 배양한 P(-)군은 각각 4.5 ± 0.47 μg/scaffold, 6.56 ± 0.24 μg/scaffold이고, 플라즈마를 처리한 PLGA 지지체에 배양한 P(+)군은 각각 7.51 ± 0.63 μg/scaffold, 10.94 ± 0.82 μg/scaffold으로 P(+)군이 통계적으로 유의하게 많은 양의 DNA가 PLGA 지지체내에 존재하여, 많은 수의 간질세포가 부착되고, 증식되는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 1).

나. 부착된 간질세포의 형태

세포를 분주하고 1.5시간 후에 실시한 세포 형태의 관찰에서 P(-)군과 P(+)군의 간질세포는 거의 원형이었다. 세포

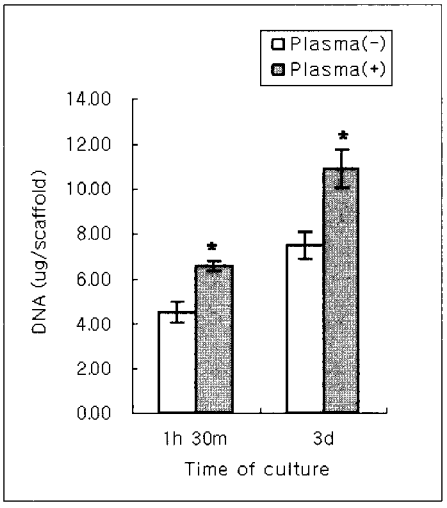

Fig. 1. The DNA amount of three-dimensional cultured adipose-derived stromal cells in PLGA scaffold without plasma treatment, Plasma (-) and with plasma treatment, Plasma (+) for surface modification. Adipose-derived stromal cells were maintained in control medium under PLGA scaffold for 1 hour 30 minutes and 3 days, respectively. Each value represents the mean of triplication. Data presented are mean ±SD(error bar).

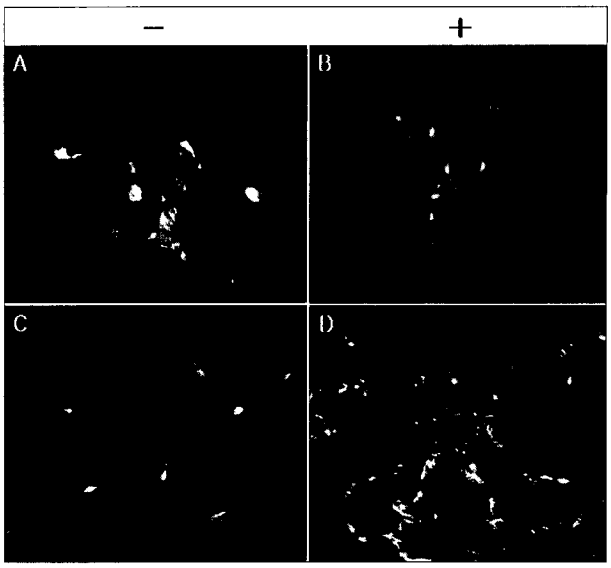

Fig. 2. Representative confocal laser microscopic images(original magnification, × 400) of adipose derived stromal cells in PLGA scaffold without or with plasma treatment for surface modification. Adipose-derived stromal cells were maintained in control medium. (Above, left) Plasma non-treatment group cultured for 1 hour 30 minutes. (Above, right) Plasma treatment group cultured for 1 hour 30 minutes. (Below, left) Plasma non-treatment group cultured for 3 days. (Below, left) Plasma treatment group cultured for 3 days. The actin, which was stained red with Phalloidin-TRITC, was not found in 3 dimensional structure for 1 hour 30 minutes. The shape of the cells was spreaded and the number of cell was markedly increased compared to plasma treatment group after 3 days. The actin of cytoplasm was constructed in 3 dimensional shape with finely arranged form.

분주 3일 후에는 Phalloidin-TRITC로 염색되어 붉게 보이는 세포질 내의 actin형태가 P(-)군에선 전반적인 세포의 모양이 원형이 아닌 펴져있는 형태로 관찰되었다. P(+)군은 보다 많은 수의 세포가 관찰되었고 세포질 내의 actin도 P(-)군과 달리 fiber network 형태로 세포질 내에 균일하게 3차원적 구조로 배열되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

다. Hematoxylin & eosin 염색

연골분화유도 1주에는 연골조직이 관찰되지 않았으며, P(-)군에 비해 P(+)군에서 더 많은 수의 세포가 관찰되었다. 연골분화유도 2주에 세포외기질 침전물이 증가된 연골조직의 형성이 관찰되었으며, P(+)군에서 보다 많은 연골조직이 관찰되었다(Fig. 3).

라. Alcian blue 염색과 Safranin O 염색

Alcian blue 염색은 연골의 세포외기질인 sulfated proteoglycan을 푸른색으로 염색하여 확인하는 것으로 1주에서

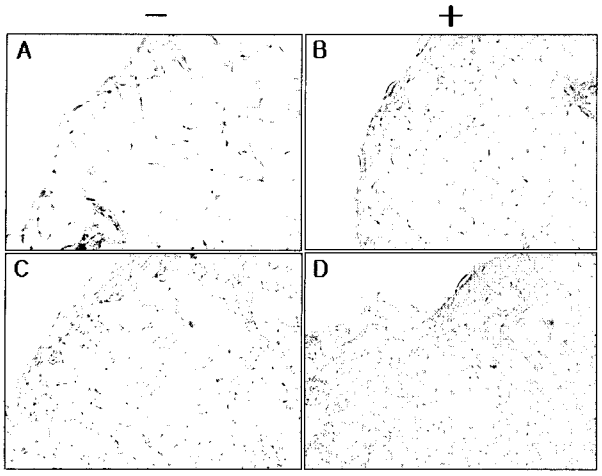

Fig. 3. Hematoxylin and eosin staining(× 100). Adipose derived stromal cells were cultured in PLGA scaffold without or with plasma treatment for surface modification. (Above, left) Plasma non-treatment group cultured for 1 week. (Above, right) Plasma treatment group cultured for 1 week. (Below, left) Plasma non-treatment group cultured for 2 weeks. (Below, left) Plasma treatment group cultured for 2 weeks.

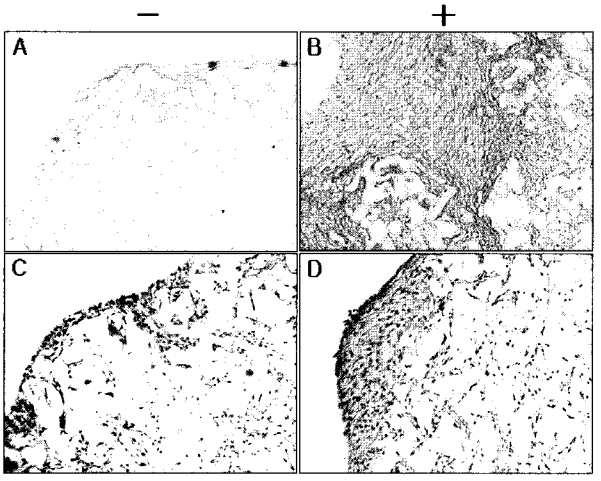

Fig. 4. Alcian blue staining(× 100) and Safranin O staining(× 100). Adipose derived stromal cells were cultured with chondrogenic medium for 2 weeks in PLGA scaffold without or with plasma treatment for surface modification. Sulfated proteoglycans shows green color with Alcian blue staining at pH 1 and red color with Safranin O staining. (Above, left) Plasma non-treatment group stained with Alcian blue staining. (Above, right) Plasma treatment group stained with Alcian blue staining. (Below, left) Plasma non-treatment group stained with Safranin O staining. (Below, left) Plasma treatment group stained with Safranin O staining.

는 관찰되지 않으나, 2주에는 P(-)군에 비해 P(+)군에서 sulfated proteoglycan이 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 4, Above). Safranin O 염색에서는 sulfated proteoglycan을 붉은색으로 염색하여 확인하는 것으로 P(+)군에서 sulfated proteoglycan이 증가한 것으로 나타났다(Fig. 4, Below).

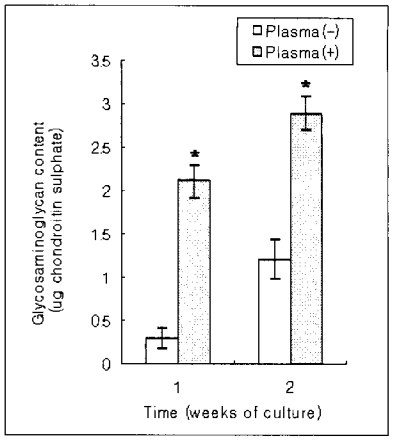

Fig. 5. Total glycosaminoglycan content in PLGA cell constructs. Adipose derived stromal cells were induced in chondrogenic medium for 1 and 2 weeks in PLGA scaffold without plasma treatment, Plasma(-) and with plasma treatment, Plasma (+) for surface modification. Each value represents the mean of triplication. Data presented are mean SD(error bar). *; $p<0.05$, compared with Plasma(-)

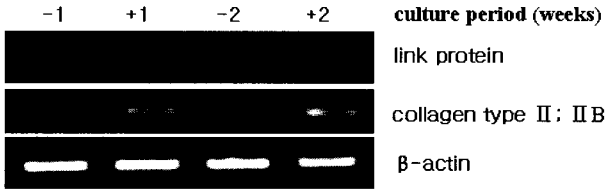

Fig. 6. Reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis shows the expression of cartilage-specific collagen type II and link protein. Adipose derived stromal cells were induced in chondrogenic medium for 1 and 2 weeks in PLGA scaffold without or with plasma treatment. -1, plasma non- treatment group cultured for 1 week; +1, plasma treatment group cultured for 1 week; -2, plasma non-treatment group cultured for 2 weeks; +2, plasma treatment group cultured for 2 weeks.

마. GAG 측정

Glycosaminoglycan의 양은 연골 분화유도 후 1주와 2주째에 시행한 P(-)군과 P(+)군 사이에 확연한 차이를 나타냈다. P(+)군이 1주에는 7배 이상, 2주에는 2.4배 이상으로 통계적으로 유의하게 많은 양이 측정되었다($p<0.05$)(Fig. 5).

바. 역전사 중합효소 연쇄반응

연골분화유도 1주와 2주 후에 시행한 역전사 중합효소 연쇄반응에서 연골 특이적인 유전자인 collagen type II와 link protein이 모두 발현되었고, 특히 collagen type II 유전자는 P(-)군에 비해 P(+)군에 상대적으로 많이 발현되었다(Fig. 6).

IV. 고 찰

최근 다양한 조직에서 추출해낸 성체줄기세포를 여러 가지 조직으로 분화유도하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 지방조직 내에 존재하는 간질세포를 이용하여 골, 연골, 신경, 혈관 및 지방조직으로 분화유도 하려는 연구가 상당한 진전을 보고 있다. 특히 지방조직은 배아기의 중배엽으로부터 유래하고, 지방조직에서 분리한 세포는 다능성(pluripotent) 줄기세포를 포함하고 있어서, 간엽계 줄기세포와 같이 다중분화능과 섬유세포형태를 가진다고 알려져 있다.[6,11] 또한, 지방조직은 성체로부터 얻어지기 때문에 윤리적인 문제점이 없고, 많은 양을 얻을 수 있으며, 골수채취 중 수반될 수 있는 감염, 출혈 및 만성통증 등의 부담이 없다.

줄기세포에서 연골로 분화 유도하기 위해서는 다른 조직과 달리 세포 상호간 신호전달체계와 세포농도가 중요한 분화조건이 되어 고밀도농축배양법이 이용되어 왔다.[3] 특히 조직공학에서 세포지지체로 이용되는 합성 중합체들은 표면이 세포친화력을 가지는 것이 연골 분화에 중요하다. 최근에 FDA에서 승인된 PLGA 합성 중합체는 표면 친수성이 한정되어 있어 세포친화력을 높이기 위해서는 아교질 피복, 피브린, RGD(Arginine-Glycine-Aspartic acid peptide) 세포접착분자 가교 등 다양한 처리가 필요하다. 이 실험은 지방유래 간질세포가 줄기세포로써의 연골분화능을 관찰하고자 한다. 이들 간질세포의 연골 분화에 적합한 고밀도 농축배양에 적합한 지지체의 환경을 유지하기 위해서는 무엇보다 지지체 표면에 많은 세포가 부착할 수 있도록 표면 친수성이 높이는 것이 중요하며 합성중합체에 사용되는 플라즈마 처리가 이 방법 중 하나이다.

저자들은 이미 PLGA 지지체에 플라즈마를 처리하여 표면을 개질함으로서 친수성을 증가시키고 세포친화력을 높여 연골세포를 삼차원 배양하여 조직공학적 연골을 합성한 바 있다.[10] 저자들이 고안한 방법의 플라즈마 처리는 유리기(free radicals)들과 각종 작용기(functional groups)들을 합성중합체의 표면에 만들어 친수성을 증가시키며,[8] 이때 생성된 유리기들은 물과 반응하면서 과산화물(peroxide)을 형성하게 되고 과산화물은 합성중합체의 표면에 상당수의 카르복실산(carboxylic acid)을 형성한다. 카르복실산은 생체 내 여러 가지 단백질을 합성중합체 표면에 고정해주는 역할을 한다.[12] 이러한 변화가 단지 몇 나노미터로 국한되어 합성중합체의 표면에만 영향을 미치므로 합성중합체의 물리적, 화학적 특성을 변화시키지 않고 표면 개질을 이룰 수 있는 방법이며,[13] 최근에는 합성중합체의 소독에서도 ethylene oxide 가스나 gamma-irradiation을 이용하는 타 방법에 비해 뛰어난 효과가 있다고 보고되었다.[9] Yang 등[14]은 플라즈마 처리 후 아교질을 부착시켜 세포친화력을 높일 수 있음을 보여 주었고, 플라즈마 처리 후의 전자현미경 사진비교에서 지지체 표면이 보다 거칠어져 이러한 표면의 변화가 세포부착력의 증가와 세포가 증식하는 동안 안정되게 세포지지체로 유지되는데 도움이 된다고 보고하였다.

저자들은 지방 간질세포를 PLGA 스펀지에 분주하고 1.5시간 후(부착성 측정)와 3일 후(증식성 측정)에 실시한 세포지지체내의 DNA 정량실험에서 플라즈마를 처리한 군에서 비처리군보다 유의하게 높게 측정되어 플라즈마를 처리할 경우 지지체의 표면이 세포의 부착 및 증식에 더욱 좋은 환경을 제공한다는 것을 알 수 있었다. 이에 대한 연구는 이미 저자들의 토끼 연골 세포배양 실험에서 인공합성 중합체의 표면처리가 지지체 표면의 친수성을 증가시킴으로 세포친화력이 높아짐을 보고 한 바 있다.[10] 부착 후 세포 내에서 생성되어 3차원적 구조를 가지는 세포골격(cytoskelecton)인 actin섬유는 세포가 부착된 지지체 표면의 세포적합성을 알 수 있는 좋은 지표가 된다. 저자들의 실험결과에서 분주 3일 후에 플라즈마 처리한 군에서보다 많은 수의 세포가 관찰되었고 세포질 내의 actin도 비처리군과 달리 섬유그물 형태로 세포질 내에 균일하게 3차원적 구조로 배열되어 있음을 알 수 있었다.

연골은 아교질원섬유(collagen fibril)와 proteoglycan으로 구성되어 있고, 고강도의 긴장을 견딜 수 있는 능력을 가지고 있는데, 저자는 조직학적 검사에서 연골분화표지자에 대한 대표적인 염색법인 Alcian blue염색과 Safranin O 염색으로 연골의 아교질과 proteoglycan을 포함한 기질의 형성을 확인하였고, Hematoxylin & eosin염색으로 세포충실성(cellularity)을 관찰하였다. 또한 GAG의 증가는 연골분화와 밀접한 관계가 있는데, 히드록시프롤린(hydroxyproline)과 상호작용을 한다고 알려져 있다.[15] II형 아교질(collagen type II)는 연골의 전형적인 구성물질이고, 인체지방유래 줄기세포에는 거의 발현되지 않는다고 알려져 있다. 이차원 배양에서 연골분화 1주째부터 II형 아교질이 발현된다고 보고되었고,[7] 저자는 세포지지체를 이용한 삼차원 배양에서도 II형 아교질이 1주째부터 발현되는 것을 확인하였으며 1, 2주째 모두 플라즈마 처리한 군에서 더욱 많은 양의 유전자가 발현된 것으로 보아 플라즈마 처리가 연골분화유도에 보다 안정적으로 작용할 수 있는 환경을 제공하였다. 또한 연골특이 유전자인 link protein발현도 확인하였다. 분화유도 1주째에 Alcian blue, Safranin O 및 Hematoxylin & eosin 염색에서는 연골표지자가 관찰되지 않고, 역전사 중합효소 연쇄 반응 결과에서 II형 아교질과 link protein 유전자가 발현된 것으로 볼 때, 조직학적으로 확인은 안 되지만, 1주째에 이미 연골 분화유도가 이루어

지고 있다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 삼차원 배양에서 줄기세포의 최종 분화과정은 유도된 세포 내 분화지표가 발현이 제일 우선할 것이며 이에 따른 분화유전자에 의한 세포외기질의 합성이 뒤이을 것이며 최종적으로 분화 최종 산물인 조직학적 그리고 육안적 변화가 관찰되는 것으로 생각할 수 있다. 줄기세포가 최종 간엽조직으로 분화과정은 조기에 분화 유도된 상태에서 비가역적인 변화를 막기 위해서는 분화 유도 환경이 조기부터 조성되고 그 환경이 지속적으로 유지되어야 할 것이다. 이와 같이 플라즈마처리로 인한 세포친화력의 증가는 분화 유도될 세포의 환경이 조기에 조성되어 연골조직화를 안정되게 유도하리라 본다. 이는 연골 분화를 위한 배양조건이 고밀도세포농도의 환경에서만 줄기세포가 연골화를 유지하는데 이러한 조건이 갖춰주지 않으면 여타 다른 환경의 조건에 맞는 다른 조직으로 변할 수 있음을 의미하며, 실지 임상에서 연골이나 이식 골편을 고유조직외적 환경에 이식되었을 시 흡수 또는 섬유조직화 등으로 변하는 사실 미루어 생각할 수 있다. 결국 줄기세포의 분화조건은 분화하려는 조직의 환경 요건이 장시간 유지되고 지속되어 다른 환경에서도 미치지 않는 비가역적인 변화를 유도시키는 것이 해결해야 할 과제이다.

V. 결 론

저자들은 인체지방조직으로부터 분리한 간질세포가 연골세포로 분화되어 성체줄기세포로써 다분화능을 확인할 수 있으며, PLGA 스펀지의 플라즈마 처리가 지지체 표면의 친수성을 증가시켜 초기에 인체지방유래 간질세포의 부착 및 증식을 높일 뿐만 아니라 보다 안정적으로 연골로 분화를 유도할 수 있는 고밀도세포배양 환경을 제공했음을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS: Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* 64: 67, 1999
2. Haas AR, Tuan RS: Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation* 64: 77, 1999
3. Shakibaei M: Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res* 240: 95, 1998
4. Hall BK, Miyake T: Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 39: 881, 1995
5. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F: Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 763, 2002
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211, 2001
7. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P: Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 113: 585, 2004
8. Gupta B, Hilborn J, Hollenstein CH, Plummer CJG, Houriet R, Xanthopoulos N: Surface modification of polyester films by RF plasma. *J Appl Polym Sci* 78: 1083, 2000
9. Holy CE, Cheng C, Davies JE, Schoichet MS: Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. *Biomaterials* 22: 25, 2001
10. Jeong JL, Shim HG, Park JG, Ju YM, Han DK, Rhie JW, Ahn ST: The effect of plasma treatment of poly(lactic-co-glycolic)(PLGA) scaffold on adhesion and bioactivity of cultured chondrocytes. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 30: 491, 2003
11. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P: Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 109: 1033, 2002
12. Kim YJ, Kang IK, Huh MW, Yoon SC: Surface characterization and *in vitro* blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials* 21: 121, 2000
13. Bae JS, Seo EJ, Kang IK: Synthesis and characterization of heparinized polyurethanes using plasma glow discharge. *Biomaterials* 20: 529, 1999
14. Yang J, Bei J, Wang S: Enhanced cell affinity of poly (D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials* 23: 2607, 2002
15. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F: Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25: 3211, 2004