

알지네이트 진피지지체 인공피부 개발: 예비보고

박대환¹ · 신정임²

대구가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실,¹ 조직공학센터²

An Developmental Study of Artificial Skin Using the Alginate Dermal Substrate: Preliminary Report

Dae Hwan Park, M.D.¹, Jeong Im Shin, M.D.²

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, ²School of Medicine & Tissue Engineering Center, Daegu Catholic University, Daegu, Korea

Alginate, a polymer of guluronic and mannuronic acid, is used as a scaffolding material in biomedical applications. The research was to produce highly-purified alginate from seaweeds and to evaluate the efficacy of alginate as dermal substrate. Our alginate purification method showed a production rate as high as 25%. The purified alginate contained little polyphenol contents and endotoxin, proteins. For study of wound healing, full thickness skin defects were made on the dorsal area of the animal models. And then alginate, fibroblast-growth-factor mixed alginate, alginate-collagen complex, vaseline gauze as control were applied on the wound, respectively, and were evaluated grossly and histopathologically. For biocompatibility test, alginate and alginate-collagen complex discs were implanted on the back of Sprague-Dawley rats. Four weeks after implantation, the animals were examined immunologically against alginate and collagen. Alginate and FGF-mixed alginate, alginate-collagen complex group showed statistically higher percentage of wound contraction and wound healing than control group ($p < 0.05$). Alginate-collagen complex group and FGF-mixed alginate group showed statistically higher percentage of wound healing than alginate group. The experiment of biocompatibility and immunologic reaction against impanted alginate or collagen needs

more investigation. Highly-purified alginate from seaweeds by our purification method, showed the effect of wound healing, and addition of FGF or collagen increases the alginate's wound healing effect. It shows the possibility of alginate as a dermal substrate.

Key Words: Alginate, Artificial skin

I. 서 론

인공피부를 비롯하여 화상 및 창상 드레싱재로서 이용될 수 있는 소재의 범위는 극히 한정되어 왔다. 그 동안 생체조직에 대하여 거부반응이 최소화되는 소재, 즉 생체조직에 대하여 불활성을 갖는 합성고분자 소재들이 주류를 이루어 왔다. 천연소재들은 합성소재들에 비하여 인체친화성이 우수하기는 하나 최종제품의 물리적 특성과 기계적 강도 등이 합성고분자 소재에 미치지 못하고 있다.

생체에 흡수되어 진피의 상처를 치유할 수 있는 기능을 가지는 고분자 재료 중 최근에 이르러 알지네이트가 위에서 제시되고 있는 여러 조건을 만족시킬 수 있다는 사실이 발견되면서 알지네이트를 인공피부와 화상 및 창상 드레싱재료로서 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 의료계에서 방대한 시장성을 지닌 조직재생에 우리나라 연근해에서 쉽게 얻을 수 있는 해조류로부터 추출한 알지네이트를 진피지지체로 인공피부의 가능성 유무를 알아보고자 개발하고자 본 실험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

가. 알지네이트의 분리, 정제 및 알지네이트 제재의 제조

1) 알지네이트 추출(alginate extraction)

본 연구는 국내산 미역과 다시마를 사용하여 실시하였다. 미역과 다시마의 건량을 측정 후 작은 입자로 분쇄하여 0.025% 황산 용액에서 1시간 침전 후 물로 수 차례 세척하였다. 5% Na_2CO_3 용액을 첨가한 후 60°C에서 3시간동안 열처리한 뒤 3배량의 물을 첨가하고 12시간 진동혼합한 다음 원심분리한 상등액에 같은 양의 50% 에탄올을 첨가하였다. 침전물에서 얻어진 알지네이트를 물에 녹여 0.05%

Received July 29, 2005

Revised November 2, 2005

Address Correspondence: Dae Hwan Park, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Daegu Catholic University, 3056-6 Dae Myung 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-720, Korea. Tel: (053) 650-4578 / Fax (053) 650-4584 / E-mail: dhpark@cu.ac.kr

* 본 논문은 제 58차 대한성형외과 학술대회에서 구연 발표되었음.

* 본 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-041-E00202).

활성탄을 첨가하여 탈색하였다. 알지네이트 용액의 pH를 2-3으로 낮추어 침전된 겔을 얻었다. 여기에 50% 에탄올을 첨가 후 12시간 동안 진동혼합하면서 pH를 중성으로 조정하고, 이들 겔을 60% 에탄올과 95% 에탄올로 두 차례 세척한 다음 원심분리 후 침전된 알지네이트 겔을 동결건조시켜 작은 입자로 분쇄시켰다. 이 분말을 이용하여 저분자 알지네이트를 만들기 위해 산가수, 열처리방법을 사용하였다. 알지네이트를 1 M HCl 용액에 0.5% w/v(weight per volume)의 농도로 첨가 후 1시간 30분에서 3시간동안 121°C에서 열처리하였다. 알지네이트 용액을 pH 7.0으로 보정 후 0.2% 활성탄을 첨가 후 12시간동안 진동혼합 한 뒤 0.2 μ m(pore-size) 크기의 반투막 여과기를 이용하여 2-3번 여과하였다. 이들 여과된 알지네이트를 2배량의 에탄올을 첨가하여 원심분리 침전물을 회수하였다(Fig. 1).

2) 고순도 알지네이트의 분리 및 폴리페놀(polyphenol) 및 내독소(endotoxin), 단백질 함량의 측정

위에서 얻어진 1단계의 알지네이트는 다양한 고분자량, 당배열, 화학적 당조성 등이 서로 다른 혼합물의 형태로 존재하고 이에 따라 여러 가지 생물학적 물리화학적 성질이 달라지므로 조직재생유도에 사용 시 균일한 성질의 알지네이트 비율(alginate fraction)을 사용할 필요가 있어 크기에 따른 크로마토그래피분리법(size exclusion chromatography)의 개발과 활용은 필수적이고, 염화 알지네이트는 이온성 다중합체이므로 분자간 및 분자 내 이온화 반발력에 의한 분자크기의 확장으로 겔상태 유지 시간이 변조

된다. 따라서 본 연구실에서 개발한 이온화 힘이 조절된 동적 상태(mobile phase)가 중요하다. 이 방법을 사용하여 크로마토그래피(chromatography column)의 온도를 고온으로(60°C 이상) 가열하지 않아도 되었다.

해조류(미역 및 다시마)로부터 알지네이트를 추출하여 인공피부에 사용하려면 먼저 알지네이트 시료 자체가 생체에 적합해야 하고 단백질이나 폴리페놀 또는 내독소가 없는 고순도이어야 면역학적 반응을 억제할 수 있다. 따라서 이 추출법과 순도 검색법을 기반으로 하여 알지네이트 내 불순물인 폴리페놀, 내독소 및 단백질의 존재유무를 형광광도계 등을 이용하여 측정하였다. 본 연구실에서 정제한 알지네이트의 폴리페놀 정도를 형광 스펙트럼으로 관찰해 해가면서 순도의 정도를 가늠하였는데 알지네이트 샘플들을 1% w/v로 물에 녹인 후 LS50B 형광광도계(Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 366 nm 파장에서 산란시킨 후 300 - 550 nm 파장에서 방출 스펙트럼(emission spectra)을 기록하였다.

3) 국내산 미역 및 다시마 유래의 고순도 알지네이트의 점도 및 M/G(mannuronic acid and guluronic acid) 비율의 측정

미역 및 다시마유래의 알지네이트와 산가수, 열처리(1시간 30분 및 3시간 열처리)된 미역유래의 알지네이트를 물에 0.5 및 0.1% 농도(w/v)로 녹여 회전식점도계(LVDV-E, Brookfield, USA)를 이용하여 각 샘플의 점도를 측정하였다.

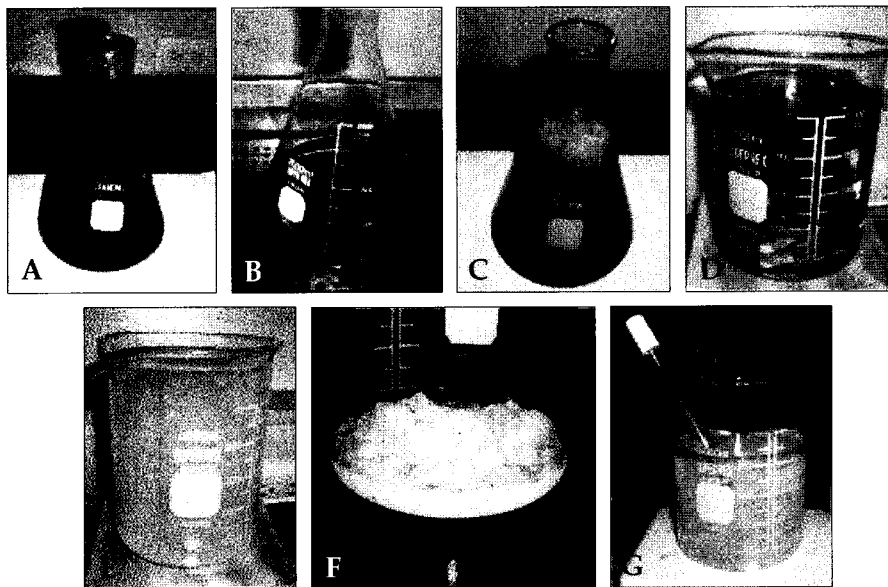


Fig. 1. Extraction and purification of alginate from seaweed. (A, digestion with H_2SO_4 ; B, Na_2CO_3 reaction; C, precipitation of crude alginate with ethanol; D, resolution of crude alginate; E, decoloration of alginate with $NaOCl$; F, withdrawal of fine alginate; G, neutralization of alginate).

알지네이트 샘플 50 mg을 0.3 M HCl용액에 첨가한 후 100°C에서 2시간 가열한 후 20분간 3000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 회수하여 MG(mannuronic acid-guluronic acid) block의 량을 측정하는데 이용하였다. 남은 잔사를 4 ml 물에 첨가 후 2% NaCl를 함유하는 0.2% Na₂CO₃로 중화하고 다시 0.1 M NaCl를 첨가한 후 필터하여 1 M HCl를 이용하여 pH 2.8 - 3.0으로 만든 다음 원심분리(3000 rpm에서 20분)하여 상등액을 회수하여 이를 MM(mannuronic acid-mannuronic acid) block의 량을 측정하는데 이용하였다. 남은 잔사는 NaCO₃로 중화, 용해하여 이를 GG(guluronic acid-guluronic acid) block의 량을 측정하는데 이용하였다. 이렇게 얻어진 MG block, GG block, MM acid block을 함유하는 각각의 샘플을 1 ml씩 test 튜브에 넣고 5% 페놀 1 ml와 96% 황산 5 ml를 첨가하여 잘 섞은 다음 30°C에서 20 분간 두었다. 이들 각각의 샘플 흡광도를 480 nm에서 측정하였다.

4) 공유결합된 알지네이트의 제조 및 특성비교

알지네이트의 화학적 구조를 변화시킬 경우 알지네이트의 구조적 특성이 변화되어 더 좋은 지지체로서의 기능을 가질 수 있다. 따라서 알지네이트를 화학적 방법으로 공유 결합의 수를 더 증가시켜 그 공유결합정도를 적외 흡광도계법(FT-IR)으로 조사하였다. 알지네이트의 공유결합 형성을 위해 Ethylenediamine(8 mM) 및 수용성 carbodiimide(80 mM)를 1% 알지네이트 용액에 반응시킨 후 2.5 mM CaCl₂ 용액으로 세척 후, 다시 143 mM NaCl 용액으로 반응 잔여물질을 세척, 제거하였다. 이들 샘플을 냉동, 건조하여 연구에 이용하였다. 공유결합형성을 확인하기 위해 알지네이트 샘플 1 - 2 mg를 100 - 200 mg의 KBr와 잘 섞어서 성형기에 넣고 압력을 가하여 디스크 상태로 만든 다음 FT-IR spectrophotometer(Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 여러 스펙트럼에서 흡수 최고치를 측정 후 참고치 흡수파장대의 결합양상 참고(3440 cm⁻¹부근, OH 진동; 2900 - 2800 cm⁻¹, CH 진동; 1600 cm⁻¹, COO, C=O 진동; 1024 - 1027 cm⁻¹, C-O 진동; 1049 cm⁻¹, C-O-C 진동)하여 결과를 동정하였다.

나. 동물실험

1) 실험동물

체중 350 - 400 gm의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐(Charles river, Japan)이며 총 38마리와 체중 1.5 - 2 kg의 흰색 토끼(New Zealand white rabbit) 수컷 20마리를 사용하였다.

2) 인공진피 대체물 제작

공유결합된 1% 알지네이트 용액 2 ml에 2 µg의 결합성

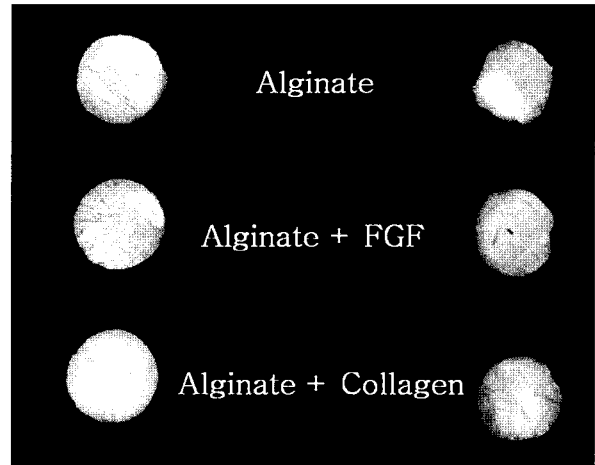


Fig. 2. Cross-linked lyophilized alginate sponge, FGF(fibroblast growth factor) mixed alginate sponge and alginate-collagen complex sponge.

유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, Sigma사, USA)를 첨가한 용액과 콜라겐(MatrixenTM-ASL, source: rat tail tendon, type: pepsin treated type I atelo collagen, content: 0.3% 100ml collagen solution, pH 3.0(Bioland사, 한국)을 1% 알지네이트 용액과 1:1의 비율로 섞어 물리적으로 혼합한 용액을 각각 96 well 배양용기에 3 ml씩 넣고 영하 0도에서 냉동시킨 후 24시간 동안 동결 건조하여 스폰지 형태로 만들어 모두 E.O 가스로 멸균 처리하여 사용하였다(Fig. 2).

3) 실험군 설정 및 실험과정

실험군은 알지네이트와 섬유아세포 성장인자가 첨가된 알지네이트, 그리고 알긴산-콜라겐 복합체의 창상치유 효과를 알아보기 위해서 흰쥐와 토끼의 등(back)에 각각 직경 2 cm의 원형의 피부전충창상을 3곳 만들어서 각 창상에 적용한 드레싱 재료에 따라서 고식적인 바세린 거즈 드레싱 군을 A, 공유 결합된 알지네이트 스폰지 드레싱군을 B, 그리고 흰쥐에서 알지네이트에 섬유아세포 성장인자를 첨가한 군과 토끼에서 알지네이트-콜라겐 복합체 드레싱군을 각각 C군이라고 정하였다. 20마리의 흰쥐와 16마리의 토끼의 등에 각각 3곳의 동일한 크기(지름 2 cm의 원형 창상)와 동일한 깊이의 피부전충창상을 3곳에 만들어서 각각의 창상에 3가지 드레싱 재료를 무작위로 할당하여 모든 창상이 치유될 때까지 관찰하였다(Fig. 3).

그리고 알지네이트 및 콜라겐의 생체적합성 및 면역검사를 위해 흰쥐 각 4마리씩 총 8마리를 실험에 이용하였다. 흰쥐의 등의 피부를 절개한 후 절개된 피부 내에 알지네이트 스폰지와 알지네이트-콜라겐 스폰지를 이식하였다.

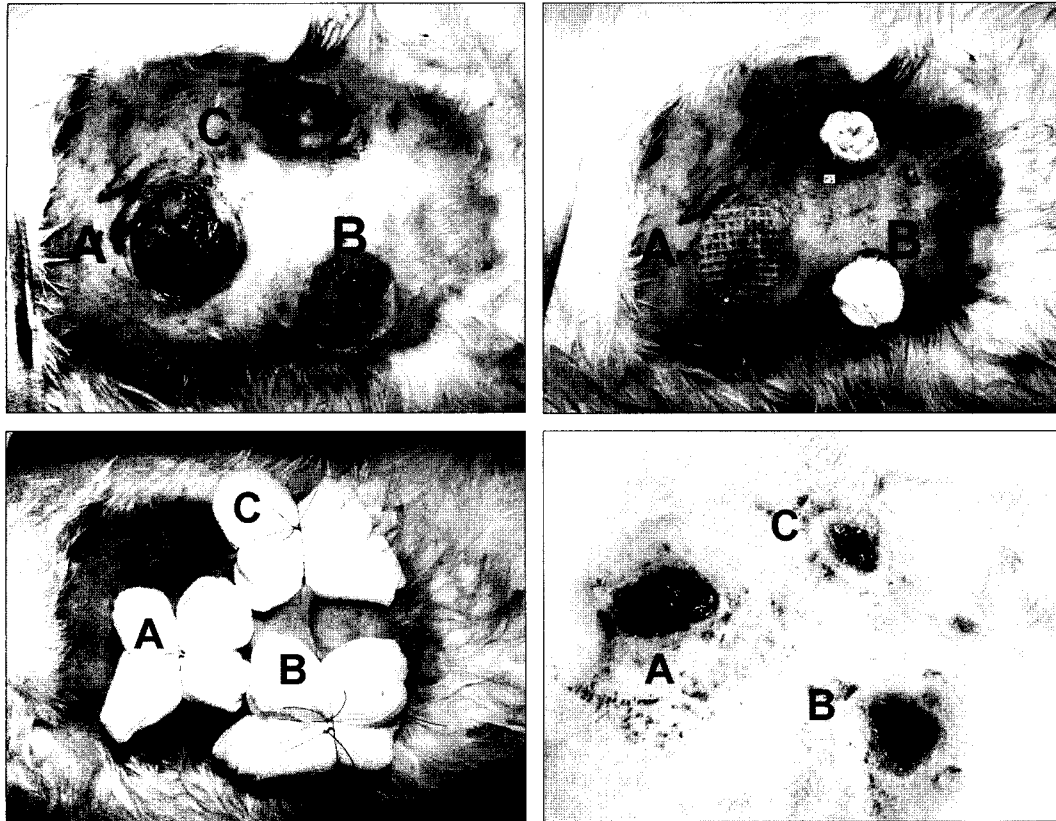


Fig. 3. (Above, left) Circular shape full thickness skin defect ($\varnothing=2$ cm) was made on the back of rat and white rabbit. (Above, right) Each dressing material was applied (A, fine mesh vaseline gauze; B, covalent cross linked alginate disc; C, fibroblast growth factor in rat, alginate-collagen complex disc in white rabbit) (Below, left) Above each dressing material, aseptic gauze was laid and sutured with Nylon 3-0 or Stapler. (Below, right) Change in wound size according to dressing materials at 10th day after operation. Most of the wounds were healed between 25th and 30th day after operation.

4) 실험 평가

먼저 창상치유 비교실험에 사용된 흰쥐 20마리와 토끼 16마리에 대해 육안적으로 평가하였다. 흰쥐에서는 피부 전층창상을 만든 후에 5, 10, 15, 20일째, 토끼에서는 술후 5, 10, 15, 20, 25일째 창상의 상태를 컴퓨터 스캔과 영상 분석장치(NIH image analysis system, Bio-Optics사, USA)를 이용하여 창상치유면적(size of wound healed), 창상상피화 면적(size of wound epithelization), 창상수축면적(size of wound contraction)을 구하였다(Fig. 4). 측정된 값들은 술후 측정된 시간에 따라서 각 드레싱 제재군간의 비교를 위해서 분산 분석법(ANOVA test)과 쉐페법(Scheffe's test)을 이용하여 평가하였다.

또 흰쥐 10마리와 토끼 4마리에 대해 조직학적인 평가를 위하여 창상을 만든 후 3, 7, 14, 21일째에 전체 창상을 적출하여 즉시 10% 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 후 6 μ m 두께로 잘라 헤마톡실린-에오진(Hematoxylin-Eosin) 및 마손의 트리크롬(Masson's trichrome) 염색을

하여 관찰한다. 각 사용물질들의 시간에 따른 창상치유 효과는 크게 네 가지 항목으로 나누어 관찰하였는데 재상피화, 섬유아세포의 증식, 다핵구와 림프구의 침윤 그리고 혈관생성의 정도를 관찰하였다. 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 복합체의 생체적합성 및 면역성 검사를 위한 실험에서는 이식 4주 후 이식부위의 임상증상을 관찰하고 조직을 채취하여 H&E 및 trichrome으로 염색 후 광학현미경으로 조직의 상태 및 면역세포의 유입 등을 관찰하였고, 역시 이식 4주 후 흰쥐의 눈정맥에서 혈액을 채취하고 비장을 적출하여 면역세포를 채취한 다음 각각 알긴산과 콜라겐에 대한 특이 IgG 항체 반응과 특이 세포면역반응의 생성유무를 관찰하였는데, 전자는 여러 농도로 희석한 쥐의 혈청을 각각 알긴산과 콜라겐에 코팅된 배양액에 첨가하여 ELISA를 이용, 발광정도를 검출하여 항체 생성유무와 희석된 혈액정도에 따른 차이를 보았고, 후자는 비장에서 채취한 면역세포에 알긴산 및 콜라겐 농도를 달리하여 배양한 후 MTT 방법으로 면역세포의 활성정도를 관찰하

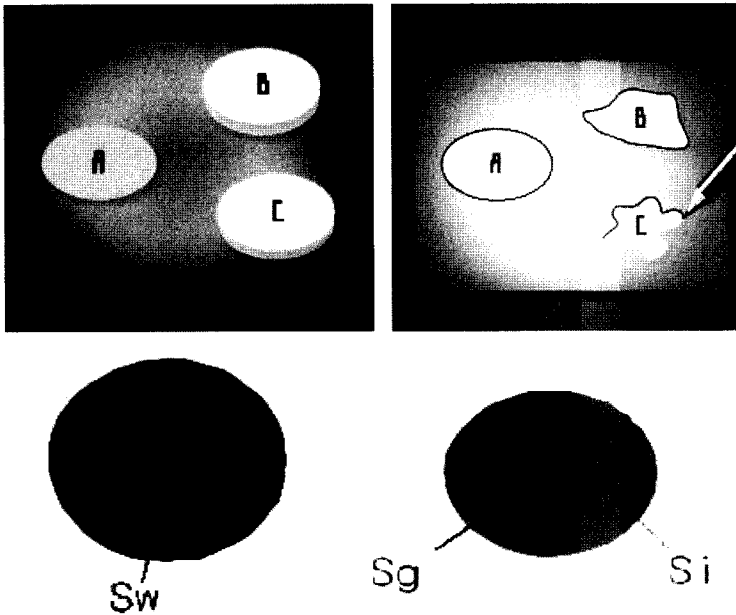


Fig. 4. Calculation of wound size. (Above, left) The initial size of each wound is same. (Above, right) Drawing of each wound on the OHP film. (Below, left) Sw=the initial wound. (Below, right) Si=the wound on the day measured. Sg= the area of granulation wound which is unepithelized on the day measured. Evaluation of each parameter associated wound healed can be found; Size of wound healed=Sw-Sg, Size of wound contraction=Sw-Si, Size of wound epithelization=Si-Sg.

였다. 앞의 두 방법 모두 분산 분석법(ANOVA test)을 사용하여 발광정도의 차이를 비교하였다.

III. 결 과

가. 알지네이트의 분리, 정제 및 알지네이트 제재의 제조

1) 알지네이트 추출(Alginate extraction)

본 연구실에서 개발한 알지네이트 분리, 정제에 이용된 방법으로 미역 또는 다시마 건량의 20-25% 수준에서 순수 알지네이트를 회수할 수 있었고 이는 다른 연구자에 발표된 회수율인 16%보다도 더 높은 수율을 보여 주었다.

2) 고순도의 알지네이트의 분리 및 폴리페놀 및 내독소, 단백질 함량의 측정

형광광도계(Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 366 nm 파장에서 산란시킨 후 300-550 nm 파장에서 방출 스펙트럼(emission spectra)을 기록한 결과 회사상품인 로진(Login)은 불순물이 내포되어 450 nm 부근에서 형광이 검출되었으나 본 연구실에서 분리한 알지네이트의 경우 형광수치가 거의 탐지되지 않았다(Fig. 5).

3) 국내산 미역 및 다시마 유래의 고순도 알지네이트의 점도 및 M/G 비율의 비교

0.1%의 농도에서 보면 미역유래의 알지네이트에서 가장 높은 점도수치를 보여 주었고 미역유래 알지네이트에 비교하여 다시마유래의 알지네이트는 상대적으로 훨씬 적은 수치, 즉 약 10배 정도 적은 점도수치를 보여 주었다. 또한 이들 미역유래의 알지네이트를 산가수 및 열처리 시 점도

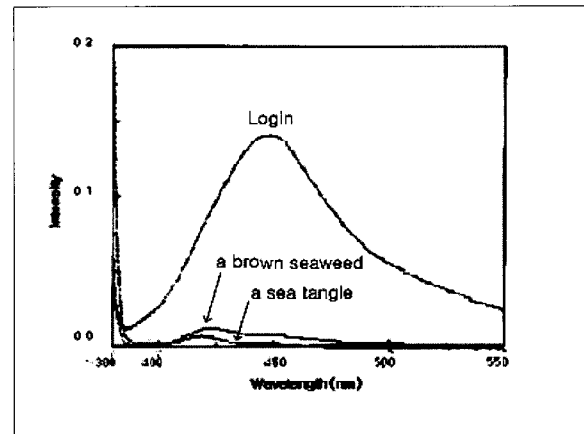


Fig. 5. The measurement of polyphenol about alginate extracted from a brown seaweed, tangle and commercial producing alginate(Login).

가 약 100배 정도로 감소하였다. 이들 점도의 경향은 알지네이트 농도가 0.5%일 때도 유사하게 나타났다(Table I).

미역유래 알지네이트에서는 mannuronic acid-guluronic acid block이 19%, mannuronic acid-mannuronic acid block이 34%, guluronic acid-guluronic acid block이 48%로 나타난 반면 다시마유래의 알지네이트에서는 mannuronic acid-guluronic acid block이 25%, mannuronic acid-mannuronic acid block이 41%, guluronic acid-guluronic acid block이 33%로 측정되었다(Table II).

4) 공유결합된 알지네이트의 제조 및 특성비교

알지네이트의 진동과장대와 공유결합된 알지네이트의

Table I. The Viscosity of Each Alginate Type

The types of alginate(% w/v)	CP(at 6 rpm)	CP(at 3 rpm)
A brown seaweed	> 500	> 1000
	153	191
A sea tangle	149	172
	16	16
Hydrolysis of a brown seaweed for 90 minutes		
(0.5%)	2.5	5.0
(0.1%)	2.5	3.0
Hydrolysis of a sea tangle for 200 minutes		
(0.5%)	2.0	4.0
(0.1%)	1.0	1.5

(CP, centi-poise)

Table II. The Comparison of Chemical Composition in Each Alginate's Type

The type of alginate	The type of block	OD	%	M/G ratio
A brown sea weed	MG	1.206	19	0.75
	MM	2.121	34	
	GG	2.737	48	
A sea tangle	MG	1.323	25	1.17
	MM	2.142	41	
	GG	1.724	33	
Hydrolysis of brown sea weed for 90 minutes	MG	1.542	26	1.02
	MM	2.173	37	
	GG	2.157	36	
Hydrolysis of brown seaweed for 3 hours	MG	1.104	19	1.04
	MM	2.301	41	
	GG	2.209	39	

M/G ratio=(% MM + % MG/2) / (% GG + % MG/2)

진동파장대를 비교한 실험에서는 공유결합 시 3440 cm⁻¹ 파장대에서 진동이 줄어드는 대신 1049 cm⁻¹ 파장대에서 진동이 증가하였다(Fig. 6).

나. 동물실험

창상치유 비교실험에서 창상면적은 창상치유기간 동안 서서히 감소하여 흰쥐에서는 술후 20일에서 25일 사이, 토끼의 경우에는 30일 전후에 대부분의 창상이 치유되었다.

먼저 흰쥐에 대한 실험에서 알지네이트군과 섬유아세포 성장인자를 넣은 알지네이트군이 술후 5일째 창상수축 정

도와 창상치유 정도가 대조군인 바세린 거즈군의 술후 5, 10, 15, 20일째보다 모두 통계적으로 유의(p<0.05)하게 높았다. 창상상피화 정도는 술후 5일째는 각군 간에 통계학적인 차이가 없었으나, 술후 10일째 섬유아세포 성장인자를 넣은 알지네이트군과 알지네이트군이 대조군인 바세린 거즈군보다 통계학적으로 유의(p<0.05)하게 높았으며 15일째도 알지네이트군과 섬유아세포 성장인자를 넣은 알지네이트군이 대조군인 바세린 거즈군보다 통계적으로 유의(p<0.05)하게 높았다. 토끼의 경우에는 창상치유 첫 7일 동안은 다량의 삼출물이 배출되었는데 삼출물의 양은 알

지네이트-콜라겐 복합체 군과 공유결합시킨 알지네이트군에서 빨리 감소하였다. 알지네이트군과 알지네이트-콜라겐 복합체 군이 술후 5, 10, 15, 20, 25일째에서도 모두 통계적으로 유의($p < 0.05$)하게 높았다. 창상상피화 정도는 술후 5일째와 10일째 알지네이트-콜라겐 복합체 군과 알지네이트군이 대조군인 바세린 거즈군보다 통계학적으로 유의($p < 0.05$)하게 높았다(Fig. 7).

조직학적 소견에서는 흰쥐와 토끼의 실험 모두에서 창상치유 초기에 모든 군에서 전층피부결손부 상층에 삼출물과 염증세포가 층을 이루어 관찰되었는데, 이 삼출물과

염증세포층이 알지네이트군과 섬유아세포성장인자를 넣은 알지네이트군, 그리고 알지네이트-콜라겐 복합체 군에서 대조군에 비해 소량이었다.

또 두 실험 모두에서 술후 3일째부터 알지네이트군과 섬유아세포 성장인자를 넣은 알지네이트군에서 염증세포의 침윤이 감소하기 시작하였고 술후 7일째부터는 창상의 경계부에서 신생혈관과 섬유아세포가 처음으로 나타나기 시작하였으나 대조군인 바세린거즈 군에서는 염증반응이 좀더 오래 지속되어서 술후 7일째에 염증세포의 침윤이 감소하고 신생혈관과 섬유아세포의 출현도 늦었다. 술후 10일 이후에는 각 군에서 유의할만한 특성은 없이 이미 이루어진 창상치유부가 성숙됨을 공통으로 보여주었다.

마지막으로 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 복합체의 생체적합성 및 면역성 검사에서 먼저 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지를 이식한 4주 후 흰쥐의 피부는 두 부위 모두에서 육안적으로 염증 등의 이상소견을 발견할 수 없었다. H&E 및 trichrome으로 염색 후 광학현미경으로 관찰한 조직 검사 상 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지를 이식한 부위의 조직 모두에서 폴리머의 흔적은 찾아보기 어려웠으나 약간의 염증세포의 침윤과 일부 다핵거대세포가 관찰되었다. 이러한 이물질 반응은 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지를 이식한 두 부위 모두에서 관찰되었으나 알지네이트-콜라겐 스폰지를 이식한 경우 염증세포의 침윤의 정도가 다소 경미하였으며 육아종의 형성등도 관찰되지 않았고, 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지를 이식한 4주 후 Sprague-Dawley 쥐의 눈정맥에서 채취한 혈액을 각각의 희석된 농도의 혈청에서 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. 각 희석된 농도의 혈청에서 알지네이트와 콜라겐 모두에서 통계학적으로 OD값의 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.561$)(Fig. 8).

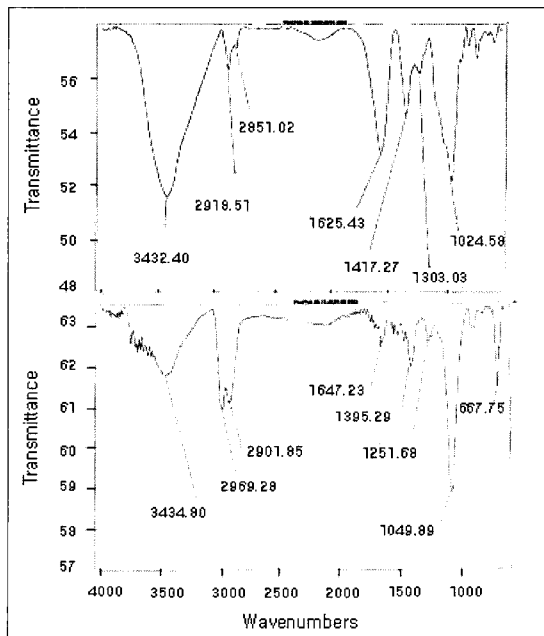


Fig. 6. The relationship between wavenumber and transmittance of alginate (Above) and covalent crosslinking alginate (Below) using the FT-IR spectrophotometer.

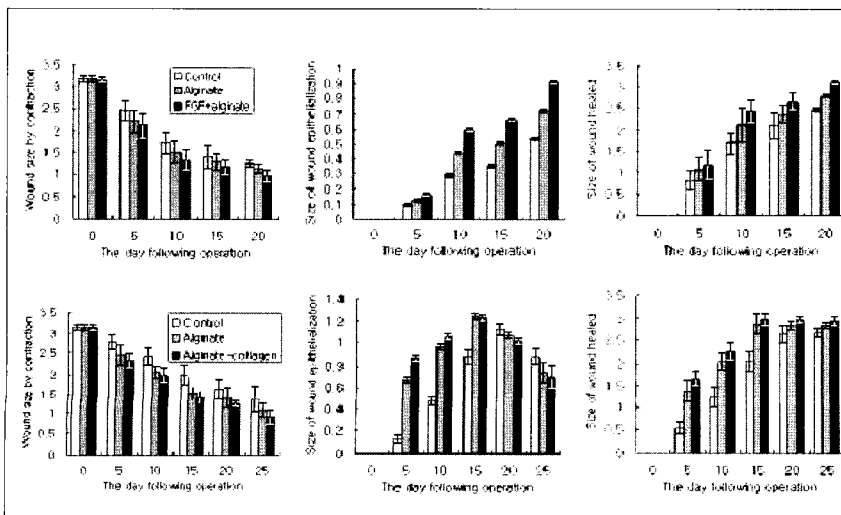


Fig. 7. The measurement of size of the healed wound and wound contraction, wound epithelialization. (A, change in wound size by wound contraction in rat's study; B, size of wound epithelialization in rat's study; C, size of the healed wound in rat's study; D, change of wound size by wound contraction in rabbit's study; E, size of wound epithelialization in rabbit's study; F, size of the healed wound in rabbit's study) The fibroblast growth factor mixed alginate group and alginate-collagen complex group show statistically higher degree of the healed wound than alginate group ($p < 0.05$). The alginate group show statistically higher degree of wound healing than control group, undoubtedly.

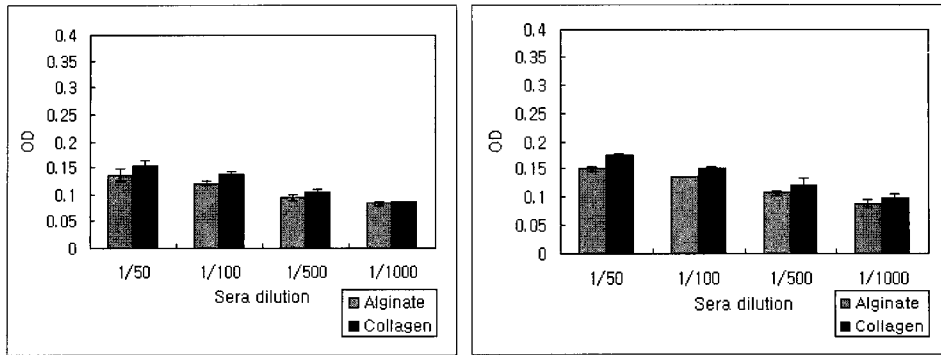


Fig. 8. Alginate (Left) and alginate-collagen discs (Right) was implanted on the dorsal area of rat. Four weeks following the implantation, each animal was bled and the sera of each concentration were reacted with collagen or alginate for ELISA to test specific antibody reacting with alginate and alginate-collagen. There was not statistically significant difference in OD values over increasing serum dilution($p=0.561$).

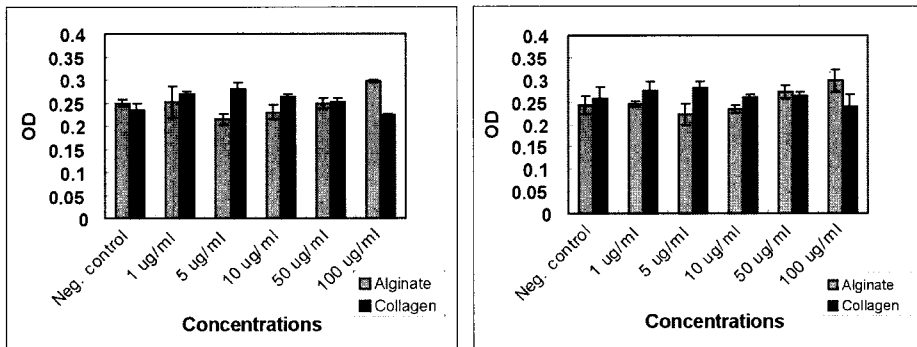


Fig. 9. Alginate (Left) and alginate-collagen discs (Right) were implanted on the dorsal area of rat. Four weeks following the implantation, each animal was sacrificed to obtain spleen cells. Splenic immune cells were reacted with an increasing dose of collagen or alginate. There was no statistically significant difference in OD values in T cell responses by addition of alginate or collagen($p=0.416$).

흰쥐의 비장을 적출하여 채취한 면역세포를 여러 농도의 알지네이트 및 콜라겐을 첨가한 후 4일간 배양한 다음 MTT 방법으로 세포생장의 정도를 측정 한 결과는 여러 농도의 알지네이트와 콜라겐 모두에서 통계학적으로 OD값의 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.416$)(Fig. 9).

IV. 고 찰

알지네이트는 갈색해조류의 세포벽을 이루는 성분이며 가지 사슬이 없는 β -1 결합의 mannuronic acid와 guluronic acid가 그 조성과 함량면에서 무작위로 결합되어 형성된 고분자이며, 각 성분의 구성비율은 대개 채취한 원료에 따라 달라진다.¹ 알지네이트의 구성성분 중에서 guluronic acid의 구성비가 증가하게 되면 알지네이트는 그 부피가 증가되는 성상을 띠게 되고 mannuronic acid가 증가하게 되면 점도가 증가하여 겔(gel)의 성상을 나타낸다. 알지네이트의 전체적으로 무독성과 점성용액 및 겔을 형성

하는 기계적 성질로 인해 그 동안 식품산업에서 강도를 주는 물질로서, 생명공학에서 세포나 효소를 고정하는 기질체로서, 의학, 농학에서는 약이나 살충제의 캡슐을 형성하는 물질로 많이 사용되어 왔으며 지속적으로 연구과제가 되어 왔다. 특히 조직재생의 경우에는 알지네이트의 단순한 겔 형성에 따른 결과로써 생물학적 효능이 발현되는 것이 아니고 알지네이트의 당으로서의 순서 배열, 순도, 분자량, 단당류의 구성, 생물리학적 기능 등에 따른 조직세포의 타 분자와의 상호작용에 근거한 면역학적조정 및 생리활성 작용의 결과로 여겨지고 있다. 이와 같은 알지네이트의 응용에서는 내독소나 폴리페놀이 없는 고순도의 알지네이트가 생체적합성의 선행조건이며 다음으로 알지네이트의 당배열, 당의 구성, 분자량, 크기의 균일성, 이에 따른 생물학적, 물리화학적 성질의 차이 등이 조직재생의 생리활성에 결정적 영향을 미친다고 보여진다.

본 연구실에서 개발한 알지네이트 분리, 정제에 이용된 방법으로 국내산 미역 및 다시마 건량의 20-25% 수준에

서 순수 알지네이트를 회수할 수 있었고 이것은 기존의 16%보다도 훨씬 높은 수준의 것이다. 추출한 알지네이트를 형광 분석기로 측정된 결과 파장-강도 그래프에서 평탄한 형상을 나타내는 것은 본 연구실에서 추출한 것이 그만큼 균일한 성질의 순수한 알지네이트인 것을 보여주었다. 나아가 폴리페놀 및 내독소의 경우도 탐지할 수 없는 수위 이하로 나타났다.

본 실험과정으로 생성된 고순도 알긴산의 점도 비교에서는 미역과 다시마 유래의 알지네이트에 있어 점도의 차이가 많으며 산가수, 열처리 시 알지네이트의 점도가 현저하게 감소함을 알 수 있다. 점도의 특성이 분자량과 연관이 있다는 보고를 기초로 하면 산가수, 열처리시 알지네이트가 분쇄되어 적은 분자량의 알지네이트로 바뀔을 나타내며 또한, 미역과 다시마사이의 알지네이트 분자량에 큰 차이가 있음을 의미한다. Mannuronic acid와 guluronic acid의 비교에서는 다시마유래의 알지네이트가 미역유래 알지네이트보다 더 많은 양의 mannuronic acid-guluronic acid 및 mannuronic acid-mannuronic acid block을 포함하고 있었고, 이는 다시마에서 미역보다 mannuronic acid 성분이 guluronic acid 성분보다 더 많이 존재하였고, 반대로 미역에서는 guluronic acid 성분이 mannuronic acid 성분보다 더 많이 존재하는 것을 의미하는 것으로 미역 및 다시마유래의 알지네이트가 그 성분에 있어 차이가 존재함을 의미하며 Table I에서의 점도 차이에서처럼 물리적 성질에 있어 차이가 있음을 증명한다. 또한, 높은 점도수치를 보이는 미역 알지네이트를 산가수, 분해시에서도 guluronic acid 및 mannuronic acid block의 차이에 변화가 있음을 알 수 있다.

화학적으로 안정된 알지네이트를 위해 공유결합을 유도한 뒤 시행한 진동과장대 실험에서 1049 cm^{-1} 의 파장대에서 진동이 증가한다는 것은 OH기가 줄어들고 C-O-C공유결합이 증가함을 의미하는 것으로 보다 안정성이 증가하여 좋은 지지체로서의 역할을 기대해 볼 수 있었다.

알지네이트는 농도에 따라 경화 및 경도에 영향을 미치며 칼슘과 같은 2가의 금속이온과 접하게 되면 신속하게 경화되는 특성을 가지고 있다. 알지네이트에 칼슘이온이 존재하면 교차 결합되어 중합체인 겔을 형성하는데,² 칼슘 알지네이트 겔은 약물 전달물질과 세포고정에 대한 연구를 통해 생물학적인 안전성이 입증되었으며, 세포배양에서 독성 없이 세포의 고유 형질을 유지시키기 때문에 세포배양을 위한 적절한 기질로 이용되고 있다.^{3,4} 알지네이트의 생체 적합성 및 조직공학 영역에서 세포지지체로서의 효능에 대한 연구는 그간 꾸준히 발전되어 왔는데 Grandolfo 등⁵은 알지네이트가 생체에 적합하고 친수성인 중합체로 세포를 성공적으로 배양할 수 있는 물질이라 하였고, 근래

에는 연골세포의 배양과 지방전구세포의 성장, 분화 등의 지지체로서의 알지네이트의 효용성이 입증되고 있다.^{1,5} 또 알지네이트-칼슘 겔과 폴리에틸렌 산화물(Polyethylene oxide)겔을 이용한 주입식 연골조직공학기술이 처음 소개된 이후, 알지네이트와 콜라겐 겔을 지지체로 이용하여 연골세포를 생성한 바 있다.^{4,6} 그러나 Thie 등⁷은 알지네이트가 세포와 친화력이 약하여 세포가 겔에 부착되지 못하고 형태가 원형을 이루며, 겔이 단순히 세포를 고정하는 기계적 감금(mechanical confinement)을 하므로 겔 내에서 세포 증식이 억제된다고 하였다. 또한 Susante 등⁶은 알지네이트가 세포와의 접착에 부적합한 음전하를 띠고 있어 초기세포의 성장에 많은 저해요인이 된다고 하였고 연골세포를 알지네이트겔 내에서 배양하는 실험에서 비교대상인 교원질 겔에서 배양한 것에 비해 알지네이트겔 내에서는 연골세포의 표현형(phenotype)이 잘 보존되고 점진적으로 프로테오글라이칸(proteoglycan)생성이 증가되어 연골이 식물의 제작에 적합하다고 하였다. 이에 반하여 조직배양을 위한 세포지지구조물(Scaffold)로 사용되는 세포외기질(extracellular matrix) 중의 하나인 콜라겐에 대하여 Hilliou 등⁸은 콜라겐 겔이 세포와 친화성이 높아 세포가 잘 부착하고, 또한 세포로부터 분비된 콜라겐 분해효소(collagenase)에 의해 콜라겐 섬유 사이로 세포들기를 쉽게 뺄 수 있어 세포의 증식에 좋은 환경을 형성한다고 하였고. Susante 등⁶은 콜라겐 겔 내에서 배양된 연골세포도 섬유모세포 모습이나 다각형(polygonal)의 모습을 띤 세포로 변화하며 잘 증식하여 수적으로 많은 성장을 한다고 보고한 바 있다.

최근 조직공학에서 세포지지체로 많이 쓰이는 이 두 물질의 물리적 합성만 잘 이루어진다면 세포의 분화 및 증식에 있어서 서로의 문제점을 보완할 수 있을 것이고 이는 결국 창상치유에 있어서 두 물질의 상승작용을 나타낼 수 있을 것으로 판단되어 진다. 본 실험에서 흰쥐의 전층창상치유에 있어서 대조군에 비해 알지네이트 단독으로 사용한 군과 섬유아세포 성장인자를 첨가한 군에서 빠른 삼출물 감소와 염증단계의 빠른 종결을 보여주었고 토끼의 전층 창상의 치유에 있어서, 알지네이트 단독으로 사용한 군과 알지네이트-콜라겐 복합체에서 창상의 염증단계가 빨리 종결되고 미상피육아조직의 면적감소가 대조군에 비해서 빨랐을 뿐 아니라 창상수축율에 있어서도 알지네이트-콜라겐 복합체 군에서 조직세포의 접근, 부착 및 생성을 촉진하여 근섬유모세포가 창상수축하는 작용을 유도하여 전체적인 창상치유율이 대조군에 비해서 높아졌다. 결국 창상치유 효과를 가진 알지네이트에 콜라겐이 가해짐으로써 진피지지체로서의 기능이 한층 강화되어 섬유아세포의 합입, 창상자체 내에서의 알지네이트의 빠른 소실의 감소

등 많은 장점을 주는 것으로 판단된다.

알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지를 흰쥐의 등에 각각 이식한 4주 후 육안적인 소견상 두 부위 모두에서 염증반응 등의 특이 소견은 발견되지 않았으며 조직학적 소견에서도 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지 이식부위 모두에서 경미한 염증세포가 발견되었으나 알지네이트-콜라겐 스폰지 이식부위에서 육아조직의 형성이 관찰되지 않았으며 염증 소견도 보다 경미하였다. 이러한 현상은 알지네이트 스폰지가 생체 내에서 분해가 지연되어 생체의 염증세포에 의한 면역 반응이 지속되기 때문으로 생각된다. 즉 콜라겐의 혼합이 알지네이트의 단점을 보완하고 보다 생체와 유사한 조건을 제공하는 것으로 생각되어 진다. 생체내에 이식된 알지네이트와 알지네이트-콜라겐 스폰지의 장기적인 생체적합성 판정을 위한 면역실험에서 이식 4주 후에 알지네이트와 콜라겐에 특이적인 항체 생성유무를 보았으나 OD값과 실제양의 차이, 실험개체수 등의 문제로 특이항체가 생성되지 않았다고 단정짓기는 어려웠다. 또한, 이식 4주 후 실험쥐의 비장을 적출하여 면역세포를 채취한 후 각 면역세포에 알지네이트 또는 콜라겐의 농도를 달리하여 배양한 후 MTT 방법으로 면역세포의 활성 정도를 관찰한 결과 알지네이트 및 콜라겐 복합체의 특이 면역반응 역시 같은 결과를 나타내었다. 위 두 경우 모두 항체의 생성 유무를 OD 수치 자체로 결정하는 것 자체가 무리가 있으나 상용화된 알지네이트 또는 콜라겐 특이항체를 구입할 수 없어 OD 수치만으로 자료를 비교분석하여 본 바로는 알지네이트가 생체에 해가 된다거나 콜라겐의 이물반응 때문에 콜라겐을 알지네이트와 혼합하여 사용할 수 없다는 단서는 발견하지 못하였다.

V. 결 론

본 교실에서 개발한 알지네이트 분리 및 정제에 이용된 방법으로 국내산 해조류로부터 순수한 알지네이트를 개발할 수 있었고 이것을 바탕으로 순수 알지네이트, 섬유아세포 성장인자를 첨가한 알지네이트, 세포에 더 친화적인 생

체 지지체인 콜라겐을 합성하여 만든 알지네이트-콜라겐 복합체 스폰지를 제작하여 바세린 거즈를 사용한 대조군과 육안적 그리고 조직학적으로 비교하는 실험을 시행하여 알지네이트가 염증세포와 다양한 성장인자를 유도하거나 활성화시키는 동시에 창상수축에 관여하는 세포들의 조직 내에서의 접근, 부착 및 성장을 촉진할 수 있을 것으로 판단되며 또한 창상치유에 도움이 있는 것으로 나타났고, 섬유모세포 성장인자 또는 콜라겐을 첨가했을 때 좀더 지속적이고 효과적으로 작용하였다. 알지네이트 또는 콜라겐에 대한 특이 항체와 특이 면역세포 생성에 대해서는 향후 좀 더 많은 실험을 실시하여 인공피부의 진피 대응물질로서의 가능성 유무를 조사해 보아야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Jeong JH, Kim KH, Kim HH, Moo YM, Lee DJ, Choi JH, Kim SY: Injectable cartilage tissue engineering techniques utilizing fibrin glue, liquid alginate and pluronic F-127. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 30: 465, 2003
2. Smidsrød O, Skjak-Bræk G: Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8: 71, 1990
3. Grandolfo M, D'Andrea P, Paoletti S, Martina M, Silvestrini G, Bonucci E, Vittur F: Culture and differentiation of chondrocytes entrapped in alginate gels. *Calcif Tissue Int* 52: 42, 1993
4. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vavanti JP, Vacanti CA: Injectable cartilage. *Plast Reconstr Surg* 96: 1390, 1995
5. Yoo G, Lee CH, Rhie JW, Wee SS: The role of alginate sponge on growth and differentiation of preadipocytes. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 28: 210, 2001
6. van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, Van der Berg WB, Homminga GN: Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 66: 549, 1995
7. Thie M, Schlumberger W, Rauterberg J, Robenek H: Mechanical confinement inhibits collagen synthesis in gel-cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 48: 294, 1989
8. Hilliou F, Pairault J, Dominice J, Redziniak G: Growth and differentiation of 3T3-F442A preadipocytes in three-dimensional gel of native collagen. *Exp Cell Res* 177: 372, 1988