

자가혈청이 배양연골세포의 부착과 증식에 미치는 효과*

정 재 호

영남대학교 의과대학 성형외과학교실

The Effects of Autologous Serum on the Attachment and Proliferation of Human Primary Chondrocyte Culture

Jae Ho Jeong

*Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

Background : Culture method for expanding chondrocytes ex vivo is an important procedure in cartilage tissue engineering. In most laboratories related to tissue engineering, fetal bovine serum is widely used as supplement. However, the chondrocytes grown in a medium containing fetal bovine serum may cause infectious viral diseases such as Creutzfeldt-Jacob disease and/or unfavorable immune reaction to bovine proteins. As a way out of these problems, we examined whether a patient's autologous serum could support the growth and attachment of his/her chondrocytes.

Materials and Methods : Chondrocytes were isolated from microtia patients (age between 5 to 12) by enzymatic digestion and cultured in a medium supplemented with 10% autologous serum, 10% fetal bovine serum (FBS) and 10% banked allogenic serum respectively. Proliferation and attachment rate were assessed by Trypan blue staining and MTT assay. Attachment rate was checked at 6, 12, 24, 36, 48 hours after plating of cells and counting was done with hemocytometer after trypan blue exclusion. Proliferation rate was checked at 1, 3, 5, 7, 9 days after plating of cells and measurement was done with cell counting and MTT assay.

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호: R05-2000-000-00171-0) 지원으로 수행되었음.
책임저자 : 정재호, 대구광역시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 성형외과학교실
Tel: (053) 620-3482, Fax: (053) 626-0705, E-mail: jhjeong@med.yu.ac.kr

Results : As a result, chondrocytes which were cultured in the medium supplemented with 10% autologous serum, represented higher rate of both proliferation and attachment, which is comparable to the chondrocytes in the culture supplemented with 10% FBS. But, chondrocytes in the culture supplemented with 10% banked allogenic serum showed lower rate of proliferation and attachment.

Conclusion : The beneficial effect of autologous serum which has been confirmed in this study is another important progress for clinical application of tissue engineering. The possibility of banked allogenic serum is still remained. In this study, we used banked allogenic serum which containing anti-coagulants and this component may have affected on the result. Fresh allogenic serum should be utilized for next step of experiment.

Key Words : Cartilage tissue engineering, Autologous serum, Chondrocyte culture

서 론

배지에 첨가된 혈청은 세포의 기본 영양공급원이며, 성장을 촉진하는 호르몬과 성장인자 그리고 부착, 확산인자 등을 제공한다.¹⁾ 특정 세포부산물을 얻어야 할 경우에는 무혈청 배지 (serum free media)를 사용하지만 대부분의 경우 생리학적, 생화학적 기능이 다른 여러 가지 물질을 복합적으로 함유하고 있는 혈청을 이용한다.

현재 거의 모든 조직공학관련 연구기관에서 사용되는 배양방법에는 소태아혈청(FBS: fetal bovine serum)이 사용되고 있다. 소태아혈청을 이용하여 배양된 인체 연골세포에서 생물학적 특성의 변화가 나타날 수 있다는 어떤 증거도 발견되지 않았으나, 인체적용을 전제로 한 실험실에서의 조직공학적 배양과정에서 소태아혈청의 사용은 광우병 등의 전염성 질환을 인간에게 전파시킬 수 있는 잠재적 위험성이 있다. 소태아혈청의 사용을 피하기 위해서는 태우혈청의 각 성분으로 재구성된 동일한 첨가물을

사용하는 방법이 마땅하나, 불행하게도 아직도 그 성분에 대한 완전한 분석이 불가능하다. 최근에 몇몇 과학자들이 소태아혈청 없이 세포를 배양할 수 있는 배양액을 개발하여 발표하였으나 그 효과가 떨어져 광범위하게 사용되지 않고 있다.^{2, 3)}

1990년 Nijweide와 Burger 등⁴⁾은 소태아혈청으로 배양된 세포를 임상적으로 사용할 경우에는 광우병 등의 전염성 질환을 인간에게 전파시킬 수 있는 잠재적 위험성이 있으므로 자가혈청을 이용함으로써 감염을 예방할 수 있다고 발표했다. 그 후 1996년 Gruber 등⁵⁾은 연골세포의 배양증식과 분화에 자가혈청이 용이하다는 것을 보고하였고, 2001년에는 Hankey 등⁶⁾이 자가혈청을 이용하여 골세포를 배양함으로써 골세포의 증식과 분화에서 자가혈청의 효용성을 입증하였다.

본 연구는 이와 같은 문헌자료를 토대로 하여 임상적용을 전제로 한 연골조직공학에서 소태아혈청의 잠재적인 위험을 피하기 위해서는 자가혈청을 이용하는 방법이 타당하다고 판단

되어, 연골세포를 배양 증식하는 과정에서 자가혈청, 소태아혈청, 동종혈청(banked allogenic serum) 등을 이용하여 이들이 연골세포증식에 미치는 영향을 비교하였다.

재료 및 방법

가. 연골조직채취 및 배양

연골세포의 추출을 위해 5~12세 소이증(microtia) 환자의 귀에서 분리된 소량의 연골조직을 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)이 채워진 50 ml 원심분리용 튜브에 담아 clean bench에 옮긴 다음, 피부와 연골막을 제거하고 연골조직만을 분리하였다. 분리해낸 연골조직을 아주 작게 조각 내어 collagenase type II (Sigma chemical Co., USA)가 2 mg/ml의 농도로 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media, Gibco BRL, USA) 25 ml에 넣어 진탕하면서 37°C의 수조(water bath)에서 약 12시간 동안 연골조직분해를 시행하였다. 세포부유액(cell suspension)을 400 μ m의 나일론 망사(nylon mesh)로 걸러서 작은 연골 덩어리들을 제거하고 완충용액으로 2회 세척하였다. 자가혈청, 소태아혈청(Gibco BRL, USA),

동종혈청 등이 각각 10% 첨가된 세 가지 종류의 연골세포 배양액을 준비하고(Table 1), 채취된 연골세포를 10,000/cm²의 세포밀도로 각 배양접시에 뿌린 후 1차배양 하였다. 연골배양액은 매 3~4일마다 갈아주었다.

나. 연골세포의 부착율

10% 자가혈청, 10% 소태아혈청, 그리고 10% 동종혈청으로 1차배양 된 연골세포를 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C에서 5분간 넣어둔 후 세포가 배양액에 바닥으로부터 완전히 분리되었는지 현미경으로 확인하고 무혈청배양액을 첨가하여 잘 혼합한 다음, 6-well plate의 각 well에 각각 1.2×10⁵개의 세포를 첨가하여 무혈청배양액에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 경과 후 10% 소태아혈청, 10% 자가혈청, 그리고 10% 동종혈청이 들어간 배양액으로 바꾸어 6, 12, 24, 36, 48시간 동안 배양한 후에 hemocytometer와 trypan blue exclusion test를 통해 생존세포의 수를 확인하였다.

다. 연골세포의 증식율

10% 소태아혈청, 10% 자가혈청 그리고 10% 동종혈청이 포함된 연골배양액으로 1차배양 된

Table 1. The composition of the chondrogenic culture media used in the experiment

Components	Amounts
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media)	850 ml
Serum (FBS/Autogenous serum/Allogenic serum)	150 ml
Sodium bicarbonate	2.4 g/L
Antibiotics (penicillin-streptomycin)	100 μ g/ml
Nonessential amino acid	10,000 μ g/ml
Proline	0.046 g/L
Ascorbic acid	0.05 g/L
Chondrogenic media	1,000 ml

연골세포에 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C에서 3분 동안 세포를 분리시킨 후 hemocytometer에 의한 세포수 비교, MTT assay를 통해 증식율을 조사하였다.

1) Hemocytometer에 의한 세포수 비교

분리된 세포를 6-well plate의 각 well에 각각 1×10^5 개씩 첨가하고 무혈청배양액에서 24시간 동안 배양했다. 그 후 10% 자가혈청, 10% 소태아혈청, 그리고 10% 동종혈청이 들어간 배양액으로 바꾸어 1, 3, 5, 7, 9일 동안 배양한 후에 세포를 hemocytometer와 trypan blue exclusion test를 통해 생존세포 수를 확인하였다.

2) MTT assay

분리된 세포를 24-well plate에 2×10^4 농도로 부착시켜 무혈청배지에 24시간 동안 배양하였다. 그 후 10% 자가혈청, 10% 소태아혈청, 그리고 10% 동종혈청이 첨가된 배양액으로 바꾸어 1, 3, 5, 7, 9일 동안 배양하였다. MTT assay 측정을 위해서 측정 4시간 전에 새로운 배양액에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl M tetrazolium bromide, Sigma (0.5 mg/ml)]를 첨가하여 배양접시에 넣어 4시간 동안 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 하였다. 4시간이 경과한 후에 각 well의 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않도록 조심하여 상층액을 제거하였다. 각 well에 DMSO를 첨가하여 formazan이 용해되도록 한 후, 살아있는 미토콘드리아 내의 효소인 dehydrogenase가 노란 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하면 ELISA Reader (MR5000 DYNATECH)로 O.D 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. 통계처리 방법

실험 결과는 통계 처리하여 평균치±표준편차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 유의성 검정은 T-test를 이용하여 유의수준 5%에서 확인하였다.

결 과

가. 연골세포의 부착율 측정결과

10% 자가혈청, 10% 소태아혈청, 그리고 10% 동종혈청이 포함된 연골배양액에서 각각 배양된 세포의 부착율을 측정된 결과, 10% 자가혈청을 이용한 세포 부착율이 10% 태아혈청, 10% 동종혈청을 이용한 것 보다 높게 측정되었다. (Fig. 1).

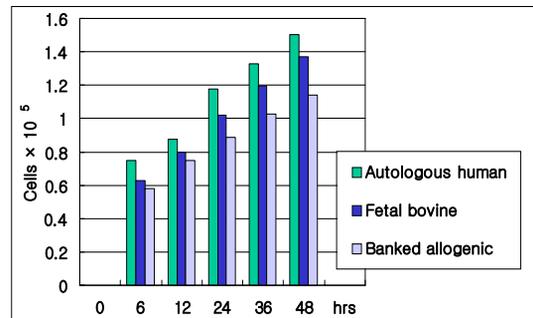


Fig. 1. Graph comparing attachment rate of human chondrocytes cultured in 10% autologous human serum, 10% fetal bovine serum and 10% banked allogenic serum (p<0.05).

나. 연골세포의 증식율 측정결과

10% 자가혈청, 10% 소태아혈청, 10% 동종혈청이 포함된 연골배양액에서 각각 배양된 세포의 증식율을 측정된 결과는, 자가혈청이 소태아혈청, 동종혈청보다 효과적이다.

1) Hemocytometer에 의한 세포수 비교

10% 자가혈청을 이용한 연골세포증식율이 10% 소태아혈청, 10% 동종혈청을 이용한 연골세포증식을 보다 높았다(Fig. 2).

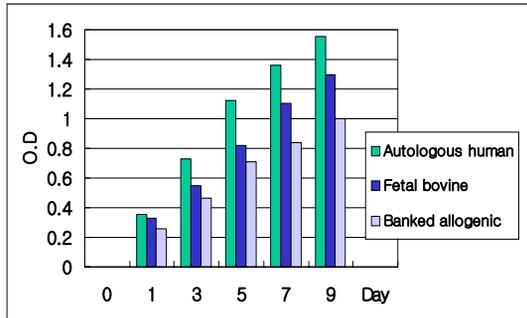


Fig. 2. Graph comparing daily MTT assay of human chondrocytes cultured in 10% autologous human serum, 10% fetal bovine serum and 10% banked allogenic serum ($p < 0.05$).

2) MTT assay

연골세포 부착율은 10% 자가혈청을 이용한 것이 10% 소태아혈청, 10% 동종혈청을 이용한 것보다 O.D값이 높게 측정 되었다(Fig. 3).

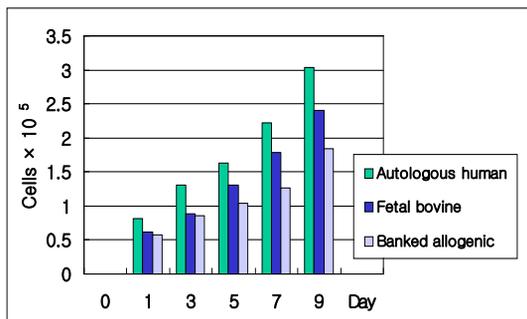


Fig. 3. Graph comparing trypan blue test of human chondrocytes cultured in 10% autologous human serum, 10% fetal bovine serum and 10% banked allogenic serum ($p < 0.05$).

고 찰

조직공학기법에서 중요한 세 가지 요소인 세포, 지지체(scaffold), 그리고 성장인자(growth factors, cytokines) 중에서 재생된 조직에 생명력을 불어넣는 가장 기본이 되는 것은 세포이며, 이러한 세포는 생체 내에서 요구되는 크기의 새로운 조직 및 장기를 형성할 수 있는 최소한의 세포 수를 얻기 위해 체외에서 배양 증식시킨 후 사용된다. 실험실에서 처치를 통해 배양되는 세포들의 배양 증식과정은 체내의 환경과 다르며, 조직공학적 기법이 임상적용을 전제로 할 경우에는 최대한의 안전성과 효율성이 요구된다. 그러나, 현재까지 실험실에서 사용되는 많은 방법들은 이러한 측면에서 볼 때 많은 문제점을 가지고 있고, 조직공학의 효과적인 임상적용이 가시화되고 있는 지금은 이런 문제점에 대한 적극적인 개선이 필요한 시점이라 할 수 있다.

현재 대부분의 조직공학관련 연구에서 사용되는 배양방법에는 소태아혈청이 사용되고 있다. 소태아혈청은 단백질과 결합된 상태의 기본 영양공급원이며, 세포의 성장 및 부착과 확산을 촉진시키는 필수적인 요소라 할 수 있다. 그러나 최근 광우병 등의 인수감염이 전 세계적으로 심각한 문제가 되고 있는 것을 고려하면, 배양과정에 소태아혈청의 사용은 잠재적인 위험성을 내포하고 있다. 뿐만 아니라, 소태아혈청을 사용한 배양과정에서 아직까지 밝혀지지 않은 기전에 의한 세포변성의 가능성이나 이종혈청(xenogenic serum)을 사용함으로써 발생할 수 있는 면역학적인 문제의 발생 가능성을 완전히 배제할 수 없다고 하겠다. 소태아혈청을 포함하지 않은 무혈청배양액이 개발되

었으나 그 효과가 떨어져 아직까지는 광범위하게 사용되지 않고 있으므로, 자가혈청이나 혈액은행에 저장된 혈액으로부터 채취한 동종혈청은 소태아혈청을 대체할 수 있는 재료이지만 아직까지는 그 효과가 검증된바 없거나 불확실하다. 본 연구원들이 사용한 자가혈청 및 동종혈청 등의 인체혈액추출물은 현재 임상에서 안전하게 사용되고 있으므로 안전성에 대한 논란을 피하면서 효과적으로 임상에 적용할 수 있는 좋은 방법으로 판단된다.

혈청재료가 연골세포의 배양과정 중에서 세포가 배양접시에 부착하는 과정에 영향을 미치는 것을 보기 위하여 약 48시간 동안의 부착율을 시간별로 측정하였고, 세포가 부착된 이후의 증식에 미치는 영향을 약 9일 동안 관찰하였다. 실험결과에서 자가혈청은 소태아혈청 및 저장 동종혈청 보다 훨씬 효과적이라 것을 알 수 있었다. 동종혈청 내에 포함된 성분이 자가혈청에 비해서 큰 차이가 없을 것으로 생각되는데도 불구하고, 저장 동종혈청을 사용한 경우에서 자가혈청은 뿐만 아니라 소태아혈청보다 오히려 효과가 떨어지는 것은 예상외의 결과라 할 수 있다. 저장 동종혈청에서 효과가 떨어진 원인을 찾기 위한 과학적 실험이 뒤따라야 할 것이며, 저자들은 혈액은행으로부터 구입한 저장 동종혈청 내에 포함된 항응고제나 기타 성분이 세포부착이나 세포증식에 악영향을 미칠 수 있을 것으로 생각하였다. 앞으로 항응고제가 포함되지 않은 신선한 동종혈청을 이용한 실험이 필요할 것이다.

부착율 및 증식율의 실험에서, 세포를 처음에는 무혈청배양액에 24시간 동안 넣어 두는 것은 사용되는 세포들을 G0(quiescence)기에 모두 모아 세포주기 시점을 같이 해 주므로써 좀

더 정확한 증식율을 얻을 수 있다⁷⁾.

세포배양 과정에 bFGF나 TGF- β 등의 여러 가지 성장인자가 지대한 영향을 미친다는 것은 잘 알려진 사실이며, 이들을 이용하면 연골세포의 증식을 더욱 효과적으로 이루어 낼 수 있으므로 자가혈청 등을 사용하여 효율성을 높이는 것이 필요한 지에 대한 의문을 제기할 수 있다. 그러나, 저자들은 임상적용을 목적으로 한 조직공학기법에서 이러한 성장인자를 사용하는 것의 안전성 또한 검증되어야 할 부분이라고 생각된다. 증식속도를 높이거나 세포의 기능을 조절할 목적으로 *in vitro*에서 다량의 성장인자에 노출되었던 세포들을 다시 인체에 넣어 주는 것이 정말 안전할지는 알 수 없기 때문이다. 과다한 성장인자에 노출되었던 세포에서 영구적인 변화가 일어난다면, 인체 내에 삽입된 후에 치명적인 위험이 될 수 있을 것이다. 그러므로 이러한 잠재적인 위험을 피하면서도 효율성을 높일 수 있는 자가혈청의 이용은 조직공학의 임상적용에 한 걸음 다가가는 하나의 진전이라 할 수 있겠다.

본 연구원들은 이 실험을 통하여 조직공학의 인체적용을 방해하거나 이 인체에 적용되기 위해서 자가혈청을 이용함으로써 조직공학의 궁극적인 목적인 임상적용에 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 더 나아가 배양과정에서 사용하는 여러 가지 cytokine 첨가물을 사용하나 임상적용을 전제로 할 경우에는 인체에 여러 가지 잠재적인 위험이 될 수 있으므로 이러한 cytokine의 사용을 피하고 적절한 수의 세포를 확보하는 방법도 연구되어야 하겠다.

요 약

본 연구는 자가혈청을 이용한 연골세포의 효과를 알아보기 위하여, 연골을 채취 및 분리한 후 10%의 자가혈청, 동종혈청 그리고 소태아혈청을 배양액에 섞어 연골증식율과 부착율을 측정하였다. 측정 결과 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

첫째, 10%의 자가혈청, 소태아혈청 그리고 동종혈청을 배양액에 섞어 연골세포의 증식율을 알기위해 Trypan blue Test, MTT assay를 실시한 결과 자가혈청이 가장 증식율이 높았으며, 소태아혈청이 동종혈청보다 증식율이 높았다.

둘째, 10%의 자가혈청, 소태아혈청 그리고 동종혈청을 배양액에 섞어 연골세포의 부착율을 알기위해 연골세포 부착 6, 12, 24, 36, 48시간 후 세포수를 확인한 결과 증식율과 같은 결과를 보였다.

따라서 본 연구를 통하여 기존에 사용하던 소태아혈청 대신에 환자의 자가혈청을 이용하는 방법이 더욱 효과가 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Maurer HR. Towards chemically defined serum-free media for mammalian cell culture. *Animal cell culture* 1992;2:15-19.
2. Verbruggen G, Verdonk R, Veys EM, Van Daele P, De Smet P, Van den Abbeele K, et al. Human meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1996;4(1):57-63.
3. Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 1995 Jul;219(1):211-22.
4. Nijweide PJ, Burger EH. Mechanisms of bone formation in vitro. In *The osteoblast* (Ed. B. K. Hall), Telford Press, Caldwell, New Jersey. 1990;1:303.
5. Gruber R, Sittinger M, Bujia J. In vitro cultivation of human chondrocytes using autologous human serum supplemented culture medium: minimizing possible risk of infection with pathogens of prion diseases. *Laryngorhinootologie* 1996 Feb;75(7):105-8.
6. Hankey DP, McCabe RE, Doherty MJ, Nolan PC, McAlinden MG, Nelson J, et al. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. *Acta Orthop Scand* 2001 Aug;72(4):395-403.
7. Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, et al. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* 1997 Nov;272(45):28479-84.