

이종 심장 판막 및 대혈관 이식편과 심낭에서 효과적인 탈세포화 방법에 관한 연구: 탈세포화의 최적화

박천수* · 김용진* · 성시찬** · 박지은* · 최선영* · 김웅한* · 김경환*

Study on Effective Decellularization Technique for Xenograft Cardiac Valve, Arterial Wall and Pericardium; Optimization of Decellularization

Chun Soo Park, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D., Ph.D.*, Si-Chan Sung, M.D., Ph.D**, Ji Eun Park*, Sun-Young Choi*, Woong-Han Kim, M.D., Ph.D.*, Kyung-Hwan Kim, M.D., Ph.D.*

Background: We attempted to reproduce a previously reported method that is known to be effective for decellularization, and we sought to find the optimal condition for decellularization by introducing some modifications to this method. **Material and Method:** Porcine semilunar valves, arterial walls and pericardium were processed for decellularization with using a variety of combinations and concentrations of decellularizing agents under different conditions of temperature, osmolarity and incubation time. The degree of decellularization and the preservation of the extracellular matrix were evaluated by staining with hematoxylin and eosin and with alpha-Gal and DAPI in some of the decellularized tissues. **Result:** Decellularization was achieved in the specimens that were treated with sodium deoxycholate, sodium dodesyl sulfate, Triton X-100 and sodium dodesyl sulfate with Triton X-100 as single-step methods, and this was also achieved in the specimens that were treated with hypotonic solution → Triton X-100 → sodium dodesyl sulfate, sodium deoxycholate → hypotonic solution → sodium dodesyl sulfate, and hypotonic solution sodium dodesyl sulfate as multi-step methods. **Conclusion:** Considering the number and the amount of the chemicals that were used, the incubation time and the degree of damage to the extracellular matrix, a single-step method with sodium dodesyl sulfate and Triton X-100 and a multi-step method with hypotonic solution followed by sodium dodesyl sulfate were both relatively optimal methods for decellularization in this study.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:550-562)

Key words: 1. Xenograft
2. Tissue engineering

서 론

현재까지 판막질환의 치료에 있어서 많은 부분에서 상용화된 기계 또는 이종 조직판막, 그리고 동종 이식편을 이용한 치환 술이 시행되고 있다. 그러나 이러한 판막들

은 성장잠재력의 문제, 기계판막의 경우 역시 성장의 제한 및 기계적 고장, 평생 항 응고치료가 필요하고 또한 이와 관련된 출혈성 합병증의 문제가 있으며, 이종조직판막이나 동종이식편의 경우 퇴행성 변화나 석회화에 의한 판막기능 손상으로 인해 그 사용기간에 한계가 있다. 결국

*서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교병원 임상의학 연구소, 바이오 이종장기개발사업단
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center
**부산대학교 의과대학 흉부외과학교실
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Pusan National University Hospital, Pusan National University College of Medicine
†본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 이루어진 것임(과제고유번호: A040004-008).
논문접수일 : 2008년 5월 14일, 심사통과일 : 2008년 7월 31일
책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 흉부외과
(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-745-5209, E-mail: kyj@plaza.snu.ac.kr
본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

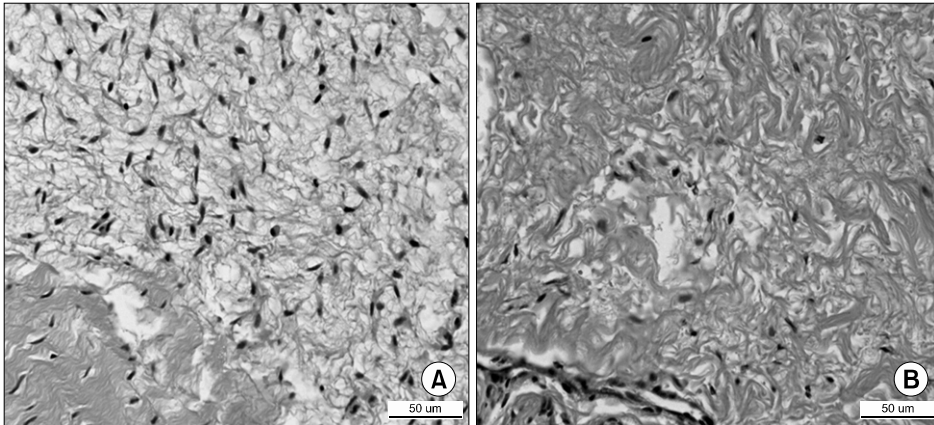


Fig. 1. Control specimens show distinct nuclei on whole area. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM $\times 400$. (A) Aortic valve. (B) Pulmonary arterial wall.

이상적인 인공조직판막은 조직의 퇴행성변화로 인해 판막부전으로 이어지는 가장 중요한 기전으로 알려진 급, 만성면역반응을 최소화 하면서, 특히 소아환자에 적용될 경우 성장 잠재력을 가지면서, 그 기계적인 특성을 최대한 유지할 수 있어야 하겠다. 이에 이중 장기를 이용한 조직판막의 제조나, 동종 조직판막의 처리, 더 나아가 조직공학분야에서 여러 연구들이 시행되어 왔다. 이중 가장 초기단계의 연구로서 이중조직의 세포성분에 대한 면역반응을 없애기 위한 탈세포화에 대한 연구가 여러 연구자들에 의해 시행되어 왔으며, 여러 가지 방법으로 다양한 연구결과들을 보고하고 있다. 탈세포화를 만족스럽게 이루기 위해서는 조직의 세포성분을 완전히 제거할 수 있어야 하고, 조직의 물리적인 성질을 유지하면서, 조직공학분야에서 조직 지지체로서 사용되는 세포 외 기질이 되도록 온전히 보존되어야 하며, 처리과정에서 사용된 여러 세정제나 화학물질들이 완전히 제거될 수 있어야 하겠다. 이에 저자들은 기존의 탈세포화 연구들에서 효과가 있다고 보고되었던 방법들을 변형, 재현해봄으로써 보다 단순하고 조직손상을 최소화할 수 있는 방법을 찾아, 이를 바탕으로 최적의 탈세포화를 얻을 수 있는 조건을 찾고자 하였다.

대상 및 방법

1) 실험조직채취

도살장에서 도살된 건강한 돼지의 심장과 심낭 및 소의 심낭을 수의사의 협조 하에 채취하여, 즉시 잔존 혈액을 세척한 후 4°C 생리식염수에 담아 냉장상자에 보관하여 실험실로 가져온다. 실험실에서, 채취된 신선한 돼지 심장을 박리하여 대동맥판막 도관과 폐동맥판막 도관을 얻고,

이미 채취된 돼지의 심낭절편과 소의 심낭절편을 생리식염수로 여러번 세척하여 복합항균제(1 cc/L, antibiotic & antimycotic solution, Sigma)를 섞은 인산염완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS pH 7.4)에 약 1~2시간동안 4°C에서 냉장 보관한 후 탈세포화 작업을 진행한다.

2) 탈세포화실험

(1) 일반적인 원칙: 일반적으로 탈세포화처리를 시작하기 전에 복합항균제(1 cc/L, antibiotic & antimycotic solution, Sigma, 100 U penicillin, 0.1 mg streptomycin, 0.25 g/mL amphotericin)에 의한 생체균주부담완화(Bioburden reduction)시도를 하였고, 이후 탈세포화 과정 중에는 항생제를 사용하지 않았다. 탈세포화실험은 각각의 처리과정 중 분당 최저 100회 이상속도로 회전 진탕기(rotating shaker)에서 배양(incubation) 하였고, 다른 용액에 옮길 때에는 잔존 용매나 세정제제의 잔류를 최소화하기 위해 생리용액(50 mL PBS)에 5~10분간 3회 이상 세척하였다.

기본적으로 탈세포화를 위해 사용되는 용액은 시료조직부피(무게)의 15~20배를 사용하는 것을 원칙으로 하였다. 일부 실험에서 이용되는 저장성 완충용액과 등장성 완충용액, 고장성 완충용액은 다음과 같은 조성 및 산도로 제작하여 사용하였다(저장성 완충용액: Tris, 10 mmol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; and aprotinin, 10 KIU/mL, neomycin trisulfate 100 mg/L; pH 8, 등장성 완충용액: Tris, 50 mmol/L; NaCl, 0.15 mol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL, neomycin trisulfate 100 mg/L; pH 8, 고장성 완충용액: Tris, 100 mmol/L; NaCl, 0.3 mol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL, neomycin trisulfate 100 mg/L; pH 8). 그 외에 사용된 용액제제들로는 사용 용매나 세정

제에 따라 인산생리용액(PBS), 증류수, 생리식염수 등이 사용되었다. 탈세포화 과정 후에는 조직을 생리식염수에 세척하고 10%포르말린에 고정하여 조직검사와 그 외 필요한 검사들을 의뢰하였다. 탈세포화와 세포 외 기질의 보존 정도는 hematoxylin-eosin (H&E)염색으로 표본을 만들고 100, 200, 400배율에서 관찰하였다. 탈세포화를 평가하기 위해 탈세포화 처리를 하지 않은 시료를 H&E염색하여 대조군 표본으로 사용하였다(Fig. 1). 일부 탈세포화 된 조직에서는 이중항원면역제거 정도를 파악하는 alpha-Gal 염색과 DAPI 염색을 함께 시행하였다.

(2) 단일단계(single step)방법: 단일단계의 탈세포화 과정을 거치는 방법

① Polyethylene glycol (PEG); 증류수에 각 1 g/mL, 0.5 g/mL, 0.3 g/mL로 다른 농도의 PEG가 섞인 용액(200 mL)에 실온상태에서 30분, 1시간, 3시간, 6시간으로 배양시간을 달리하여 검체를 손으로 부드럽게 여러 차례 누른 다음 회전 진탕기에 흔들면서 배양한다. 정해진 배양시간이 지나면 잔존하는 PEG제거를 위해 50 mL 인산완충용액에 (PBS) 3차례 행구고 항생제(100 U penicillin, 0.1 mg streptomycin, 0.25 g/mL amphotericin)가 포함된 PBS 50 mL에 4°C 및 실온에서 최소 12~24시간씩 부드럽게 흔들리는 상태(stirring condition)에서 행군다.

② Sodium deoxycholate (DOA); 0.5%에서 1% 농도를 가진 DOA가 포함된 PBS나 생리식염수에 각각 4°C, 15°C, 37°C에서, 배양시간을 3시간, 6시간, 14시간, 20시간으로 각각 처리한다. 이후 잔존하는 세정제와 세포 부스러기들을 제거하기 위하여 penicillin과 streptomycin (100 mg/mL, P/S, Biochrom)이 섞인 PBS에 각 12시간 동안 6차례 행군다.

③ Sodium dodesyl sulfate (SDS); 0.1% 및 0.25% SDS가 포함된 PBS에 24시간 동안 4°C에서 배양 후 PBS에 부드럽게 흔들리는 상태(stirring condition)에서 12시간 행군다.

④ Peracetic acid (PAA); 0.1%, 0.2% PAA를 4% 에탄올이 포함된 증류수에 검체와 함께 넣고 실온에서 3시간 동안 잘 흔들여준다. 그 후 PBS로 3차례, 탈이온수로(deionized water) 3차례 각 10분 동안 세척하고, 4°C에서 PBS에 최소 12시간 동안 부드럽게 흔들리는 상태(stirring condition)에서 행군다.

⑤ Triton X-100+SDS; 0.25% Triton X-100과 0.1%, 0.25%로 농도가 다른 SDS가 섞인 저장성 완충용액에 실온과 4°C에서 각각 6시간, 12시간, 18시간, 24시간 배양하고, 그 후 PBS에 4°C에서 12시간 행군다.

⑥ Triton X-100+DOA; 0.25% Triton X-100과 0.25% DOA가 섞인 PBS에 실온에서 6시간 및 12시간, 4°C에서 12시간, 18시간, 24시간 배양한 후 PBS용액(M-199 media)에 4°C에서 12시간 행군다.

(3) 다단계(multi-step)방법: 여러 단계의 탈세포화 과정을 거치는 방법

① Hypotonic solution → SDS; 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 4시간, 6시간, 8시간 처리한 후 0.1% 및 0.25%로 농도가 다른 SDS가 포함된 저장성 완충용액에 8시간, 10시간, 12시간, 16시간 배양한 뒤 등장성 완충용액에 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 16시간 각각 처리한다.

② Hypotonic solution → SDS → Triton X-100; 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 10시간 처리한 후, 0.1% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 12시간 배양하고, 0.25% Triton X-100이 포함된 PBS에서 12시간 배양한 후 PBS (M-199 medium)에서 12시간 행군다.

③ Hypotonic solution → Triton X-100 → SDS; 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 8시간 처리한 후 0.25% Triton X-100가 섞인 PBS에 실온 및 4°C에서 8시간 배양한다. 이후 4°C에서 0.1% SDS가 섞인 저장성 완충용액에 12시간 배양한 후 등장성 완충용액에 8시간 처리한다

④ Hypotonic solution → SDS → DOA; 4°C에서 저장성 완충용액에 10시간, 0.1% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 12시간 배양한 후 10분간 3차례 세척 후 0.25% DOA가 포함된 PBS에 12시간 배양하고 PBS (M-199 medium)로 12시간 동안 행군다.

⑤ Hypotonic solution → SDS → Triton X-100; 4°C에서 저장성 완충용액에 10시간, 0.1% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 12시간 배양한다. 10분간 3차례 세척 후 0.25% Triton X-100 가 포함된 PBS 에 12시간 배양한 후 PBS (M-199 medium)로 12시간 동안 행군다.

⑥ DOA → Hypotonic solution SDS; 4°C 및 15°C에서 0.5% DOA에 6시간 배양한 후 PBS에 10분간 3차례 행군다. 4°C에서 저장성 완충용액에 8시간 및 12시간 처리 후 0.1% 및 0.25% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 8시간 및 12시간 배양하고 등장성 완충용액에 8시간 처리한다.

⑦ Triton X-100 → Hypotonic solution → SDS; 4°C 및 15°C에서 0.25% Triton X-100에 6시간 배양한 후 PBS에 10분간 3차례 세척한다. 4°C에서 저장성 완충용액에 8시간 및 12시간 처리한 후 0.1% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 12시간 배양하고 등장성 완충용액에 8시간 처리한다.

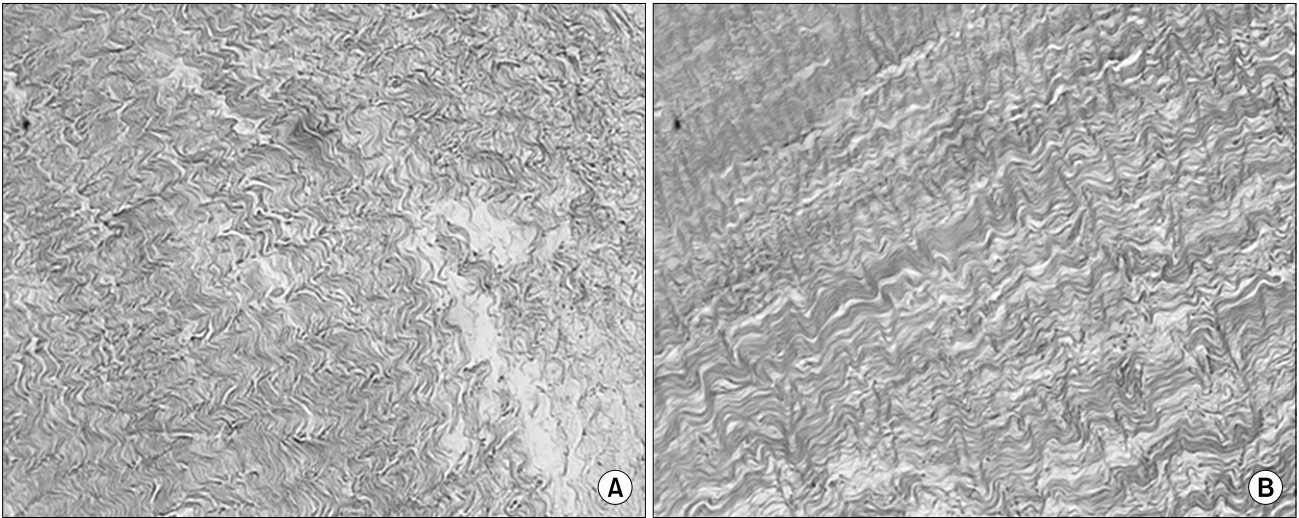


Fig. 2. 0.25% SDS in PBS for 24 hours at 4°C and wash for 12 hours. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM ×400. (A) Pulmonary valve. (B) Aortic valve.

⑧ PEG → Hypotonic solution → SDS; 실온에서 0.5 g/mL, 1 g/mL의 PEG를 포함한 증류수에서 검체를 부드럽게 손으로 누르며 3시간 배양한 후 PBS에 3차례 세척한다. 그 후 4°C에서 저장성 완충용액에 8시간처리하고 0.1% SDS가 포함된 저장성 완충용액에서 12시간 배양한 후 등장성 완충용액에 8시간 처리한다.

⑨ Hypotonic solution → PAA; 저장성 완충용액에 12시간 처리하고 0.25% 및 0.5% PAA와 4% ethanol이 포함된 증류수에 3시간 실온에서 배양한다. 이후 PBS에 3차례, 탈이온수에 3차례 각 10분간 행군다.

결 과

1) 단일단계(single step)방법: 단일단계의 탈세포화 과정을 거치는 방법

(1) **Polyethylene glycol (PEG)**: PEG의 농도, 처리시간, 행군시간을 달리하여 실험하였고, 모든 검체에서 탈세포화가 이루어 지지 않았다.

(2) **Sodium deoxycholate (DOA)**: 첫 번째 실험에서는 온도조건과 처리시간을 달리하였고, 4°C에서 시간이 증가될 수록 세포가 줄어들어 가는 경향이 보이거나 세포 외 조직이 현저히 손상되는 경향을 보였다. 15°C는 4°C에서 처리한 것보다 탈세포화가 상대적으로 더 잘 되는 양상으로 보였다. 37°C에서는 처리시간이 3시간을 넘게 되면서 세포 외 조직의 손상되는 정도가 두드러진다. 마지막으로 DOA의

농도를 0.5% 및 1%로 달리하여 4°C에서 실험한 시험에서는 1% DOA를 사용한 실험에서 대동맥 판막에서만 탈세포화가 이루어졌다.

(3) **Sodium dodesyl sulfate (SDS)**: 0.25% SDS를 PBS용액에 단독으로 4°C에서 24시간 배양하는 실험을 1차례 시행하였으며 대동맥 판막과 폐동맥 판막에서 탈세포화는 효과적이었으나 세포 외 조직의 손상을 보였으며(Fig. 2), 대동맥과 폐동맥 혈관에서는 탈세포화가 이루어지지 않았다.

(4) **Peracetic acid (PAA)**: 0.1%, 0.2% PAA로 농도를 달리하여 실온에서 실험을 시행하였으며, 핵잔유물질(azurophilic substance)을 제거하기 위해 DNase 처리도 시행하였으나, 탈세포화가 이루어 지지 않았다.

(5) **Triton X-100+SDS**: 0.25% Triton X-100과 0.25% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 4°C에서 24시간 처리했을 때 탈세포화가 전반적으로 잘 이루어 졌다(Fig. 3).

(6) **Triton X-100+DOA**: 모든 검체에서 탈세포화가 이루어지지 않았다.

2) 다단계(multi-step)방법: 여러 단계의 탈세포화 과정을 거치는 방법

(1) **Hypotonic solution SDS**: 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 8시간 처리한 후 0.25% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 12시간 배양한 뒤 등장성 완충용액에 8시간 처리한 실험에서 대동맥판막과 폐동맥판막에서 탈세포화가

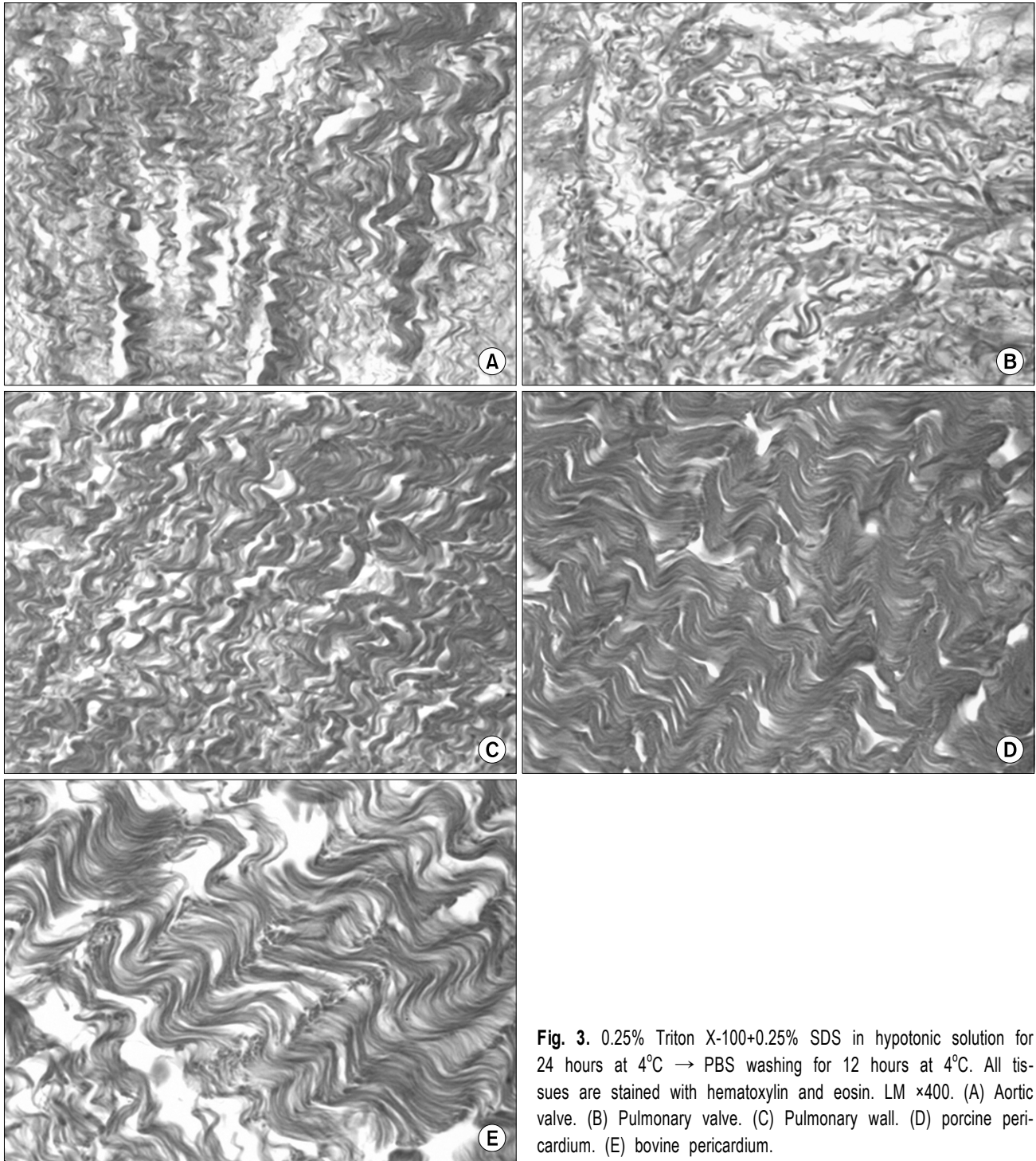


Fig. 3. 0.25% Triton X-100+0.25% SDS in hypotonic solution for 24 hours at 4°C → PBS washing for 12 hours at 4°C. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM ×400. (A) Aortic valve. (B) Pulmonary valve. (C) Pulmonary wall. (D) porcine pericardium. (E) bovine pericardium.

이루어 졌다(Fig. 4A~D). 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 8시간 처리한 후 0.1%로 농도를 낮춘 SDS가 포함된 저장성 완충용액에 시간을 늘려 16시간 배양하고 등장성 완충용액에 8시간 처리한 실험에서는 대동맥판막과 폐동맥

판막에서 탈세포화가 잘 이루어 졌다(Fig. 4E, F). 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 시간을 늘려 10시간 처리한 후 0.2%로 SDS농도를 높인 저장성 완충용액에 12시간 배양한 뒤 등장성 완충용액에 8 시간 처리한 실험에서는 대동

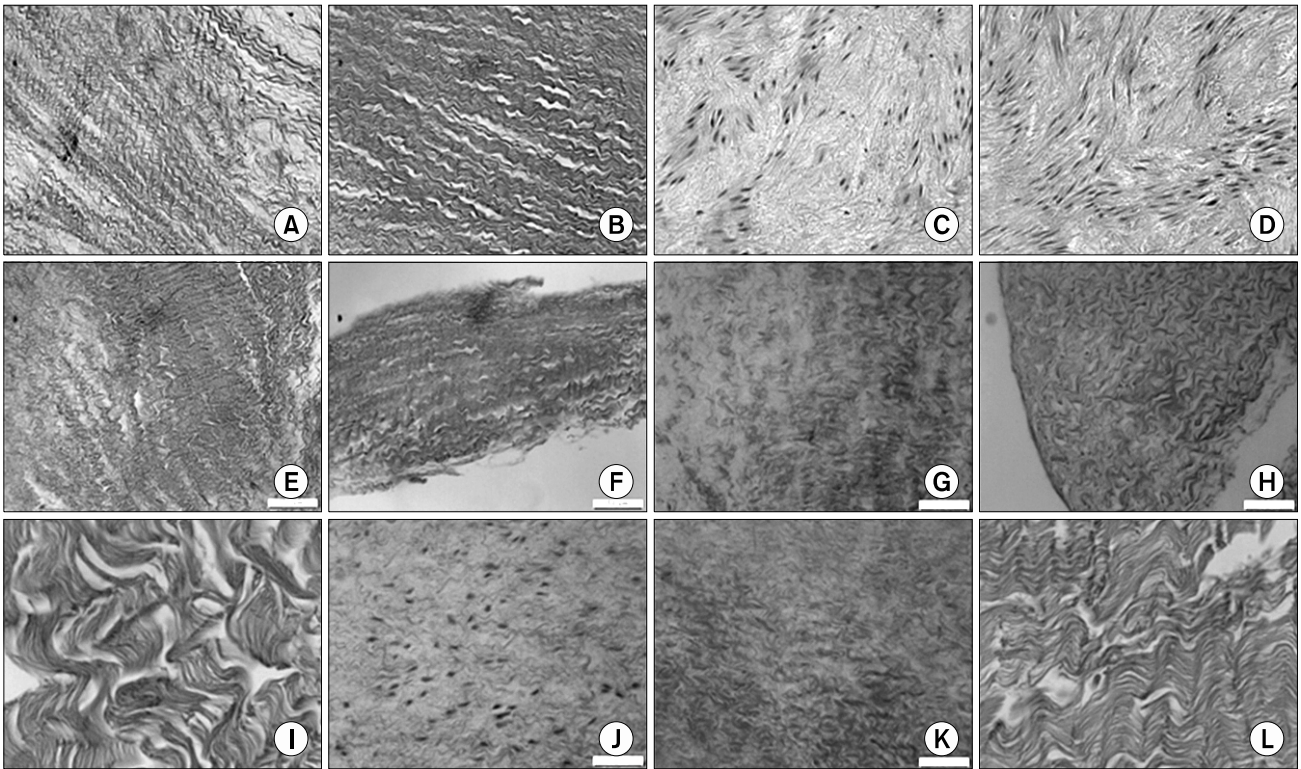


Fig. 4. Multi-step method based on hypotonic solution and SDS with different concentrations. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM $\times 400$. (A~D) Hypotonic solution for 8 hours \rightarrow 0.25% SDS in hypotonic solution for 12 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours at 4°C. (A) aortic valve. (B) pulmonary valve. (C) pulmonary wall. (D) aortic wall. (E, F) Hypotonic solution for 8 hours \rightarrow 0.1% SDS in hypotonic solution for 16 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours at 4°C. (E) aortic valve. (F) pulmonary valve. (G~I) Hypotonic solution for 10 hours \rightarrow 0.2% SDS in hypotonic solution for 12 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours 4°C. (G) aortic valve. (H) pulmonary valve. (I) pericardium. (J~L) Hypotonic solution for 10 hours \rightarrow 0.1% SDS in hypotonic solution for 18 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours at 4°C. (J) aortic valve. (K) pulmonary valve. (L) pericardium.

맥관막과 폐동맥관막 및 심낭에서 탈세포화가 잘 이루어졌다(Fig. 4G~I). 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 10시간 처리한 후 0.1%로 SDS 농도를 낮춘 저장성 완충용액에 시간을 늘려 18시간 배양한 뒤 등장성 완충용액에 8시간 처리한 실험에서는 폐동맥관막과 심낭에서만 탈세포화를 얻을 수 있었다(Fig. 4J~L).

위 결과에 비추어, 만족할만하고 지속적으로 재현 가능한(reproducible) 탈세포화를 이루기 위해서는 SDS 농도는 0.2% 이상, 저장성 완충용액에 배양시간은 12시간 이상은 되어야 할 것으로 생각되었다. 이를 바탕으로 4°C에서 저장성 완충용액에 6시간, 8시간 처리하고, 0.25% SDS용액이 포함된 저장성 완충용액에 16시간 처리한 후, 등장성 완충용액에 8시간 처리한 실험에서는 모든 검체에서 탈세포화가 잘 이루어졌다(Fig. 5).

(2) Hypotonic solution \rightarrow SDS \rightarrow Triton X-100: 모든

검체에서 탈세포화가 이루어지지 않았다.

(3) Hypotonic solution \rightarrow Triton \rightarrow X-100 SDS: 4°C 환경에서 저장성 완충용액에 8시간 처리한 후 0.25% Triton X-100에 8시간 배양한 뒤 0.1% SDS가 섞인 용액에 12시간 처리 후 등장성 완충용액에 8시간 처리한 실험에서 대동맥관막 및 폐동맥관막에서 탈세포화가 잘 이루어졌다(Fig. 6).

(4) Hypotonic solution \rightarrow SDS \rightarrow DOA: 심낭과 폐동맥관막에서 탈세포화가 이루어졌으나, 이외에는 탈세포화가 이루어지지 않았다(Fig. 7).

(5) Hypotonic solution \rightarrow SDS \rightarrow Triton X-100: 심낭과 폐동맥관막에서 부분적인 탈세포화가 이루어졌고, 이외에는 대부분 탈세포화가 이루어지지 않았다

(6) DOA \rightarrow Hypotonic solution \rightarrow SDS: 4°C 환경에서 0.5% DOA에 6시간 배양한 후 저장성 완충용액에서 8시

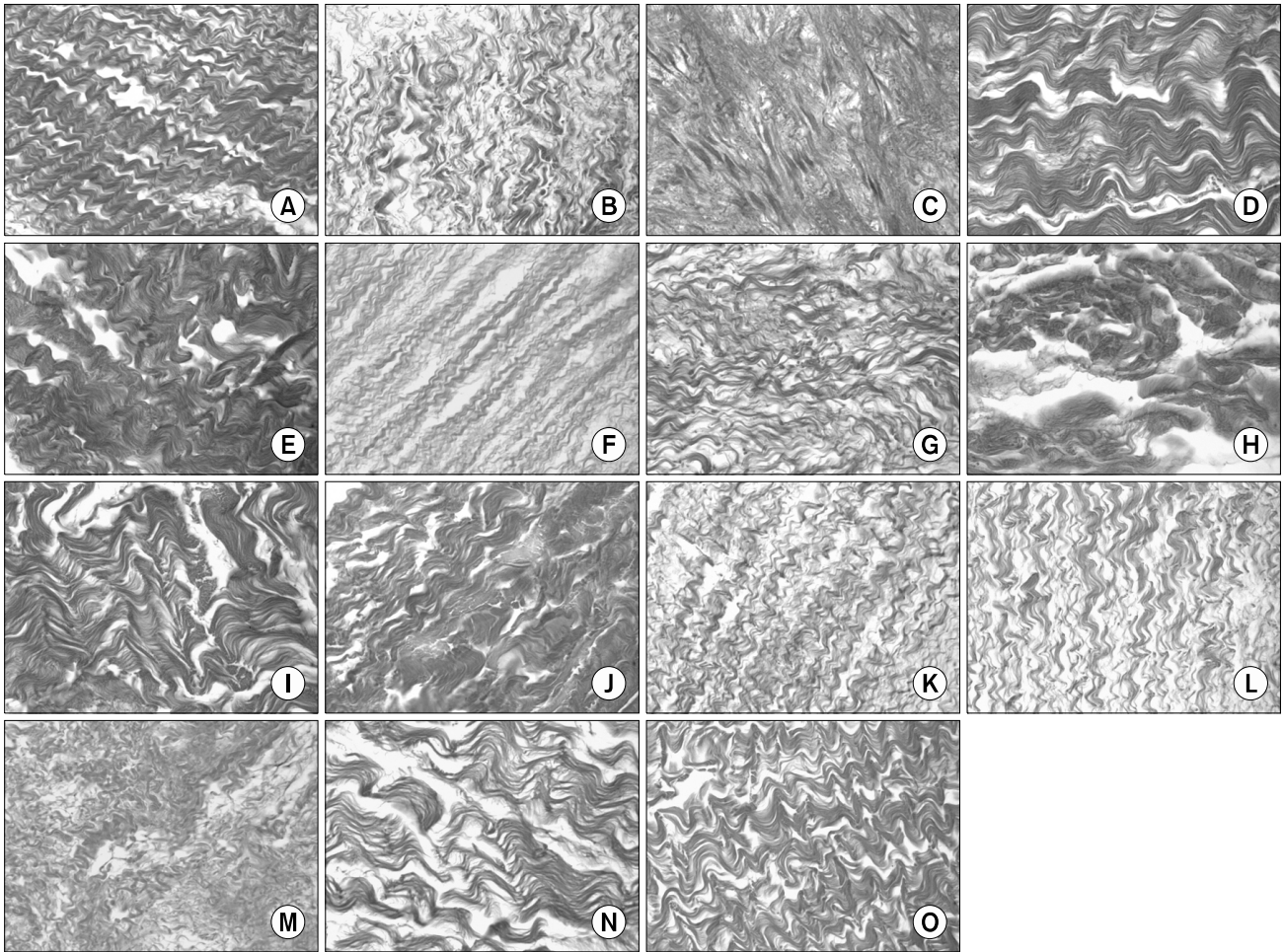


Fig. 5. Multi-step method based on hypotonic solution and 0.25% SDS. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM $\times 400$. (A ~E) Hypotonic solution for 8 hours at 4°C \rightarrow 0.25% SDS in hypotonic solution for 16 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours at 4°C . (A) aortic valve. (B) pulmonary valve. (C) pulmonary wall. (D) porcine pericardium. (E) bovine pericardium. (F ~J) Hypotonic solution for 6 hours at 4°C \rightarrow 0.25% SDS in hypotonic solution for 16 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours at 4°C . (F) aortic valve. (G) pulmonary valve. (H) pulmonary wall. (I) porcine pericardium. (J) bovine pericardium. (K ~O) Hypotonic solution for 6 hours at 4°C \rightarrow 0.25% SDS in hypotonic solution for 16 hours \rightarrow isotonic solution for 2 hours at 4°C . (K) aortic valve. (L) pulmonary valve. (M) pulmonary wall. (N) porcine pericardium. (O) bovine pericardium.

간 배양한 후 0.25% SDS가 포함된 저장성 완충용액에서 8시간 배양하고 4°C 에서 등장성 완충용액에 8시간처리한 실험에서 대동맥판막 및 폐동맥판막에서 탈세포화가 잘 이루어졌다(Fig. 8A, B). 또한 SDS가 포함된 저장성 완충용액 처리시간을 12시간으로 늘렸을 때에 대동맥판막, 폐동맥판막 및 폐동맥벽에서 탈세포화가 전반적으로 잘 되었다(Fig. 8C ~E).

(7) **Triton X-100 \rightarrow Hypotonic solution \rightarrow SDS:** 전반적으로 탈 세포화가 잘 이루어지지 않았다.

(8) **PEG \rightarrow Hypotonic solution \rightarrow SDS:** PEG의 농도에

따라 약간의 차이는 있으나 전반적으로 탈세포화가 이루어지지 않았다.

(9) **PAA \rightarrow Hypotonic solution:** 전반적으로 탈세포화가 이루어지지 않았다.

단일단계방법으로는 DOA, SDS, Triton X-100+SDS에서, 다단계방법으로는 저장성 완충용액 \rightarrow Triton X-100 \rightarrow SDS, DOA \rightarrow 저장성 완충용액 \rightarrow SDS, 저장성 완충용액 \rightarrow SDS에서 탈세포화가 효과적으로 이루어 졌다. DOA는 다른 탈세포화 방법에 비해 세포 외 기질의 파괴가 심하였고, 특히 실험온도가 높아질 수록 세포 외 기질의 파괴

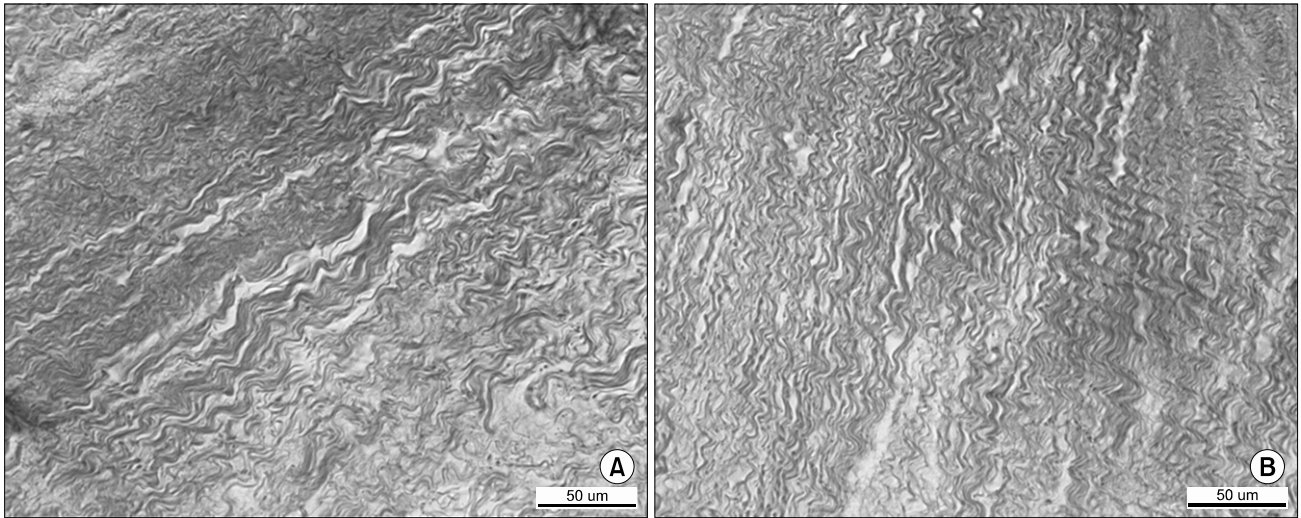


Fig. 6. Hypotonic solution for 8 hours at 4°C → 0.25% Triton X-100 +PBS at 4°C for 12 hours → 0.1% SDS in hypotonic solution for 12 hours → isotonic solution for 8 hours at 4°C. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM ×400. (A) aortic valve. (B) pulmonary valve.

가 더욱 현저함을 알 수 있었다. 사용되는 화학물질의 종류, 양, 처리시간 및 세포 외 기질의 파괴 정도를 고려하여 지속적으로 재현 가능한 탈세포화에 가장 적합한 조합 및 조건은 단일단계방법으로 4°C에서 SDS와 Triton X-100을 포함한 저장성 용액에 24시간 배양하는 방법과 다단계 방법으로 저장성 용액과 SDS를 연속적으로 사용하는 방법으로, 4°C에서 0.25% SDS가 섞인 저장성 완충용액에 16시간 배양하는 방법이 가장 유효하고 재현성과 탈세포화 정도가 완전하였다.

고 찰

탈세포화과정이 조직의 이중항원 면역을 완전히 제거하는 것은 아니지만, 특히 조직공학분야에서 세포성분에 대한 조직 항원을 없애기 위한 가장 효과적인 방법으로 사용되고 있다. 그 동안 알려진 탈세포화 방법으로는 크게 물리적인 방법, 화학적인 방법, 효소를 이용한 방법이 있다[1]. 지금까지의 연구에서는 각각의 방법에 따라, 사용되는 조직에 따라 그 결과가 매우 다양하게 보고되고 있으며, 아직 최적의 탈세포화 방법은 확립되지 못한 실정이다. 본 연구에서는 최적의 탈세포화를 위한 조건을 찾고자 하였으며, 이를 위해 기존에 여러 연구에서 사용된 방법들을 판막, 혈관조직 및 심낭조직에 적용하여 재현해 보고 이를 토대로 기존의 방법들을 변형한 추가적인

변수실험, 즉 온도조건, 처리시간, 농도 등을 달리하여 실험을 진행하였다. 탈세포화의 목표는 세포 외 기질(extracellular matrix)의 조성(composition), 생물학적 활성도(biological activity), 물리적 성질(mechanical integrity)에 최소한의 영향을 주면서 모든 세포와 세포핵 물질을 완전하게 제거하는 것이다. 이러한 효과적인 탈세포화를 확인하는 방법은 여러 가지가 있으나, 본 연구에서는 가장 기본이 되는 방법인 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 통해 세포 및 세포핵의 잔존여부를 확인하고, 세포 외 기질의 조밀성을 눈으로 확인함으로써 효과적인 탈세포화의 여부를 판단하였다.

Uchimura 등[2]이 세정제 없이 PEG을 단독으로 이용하여 효과적인 탈세포화를 보고하였고, 본 연구에서도 이 방법으로 탈세포화를 재현해 보았다. 그러나 Uchimura의 protocol 및 농도와 처리시간에도 변화를 준 추가적인 변수실험을 통해서도 탈세포화를 이루지 못했다.

PAA는 주로 비뇨기계 조직의 지지체를 만드는데 사용되어 왔으며, 대개 0.1~0.15%의 농도에서 세포 외 기질의 손상을 거의 시키지 않으면서 효과적인 탈세포화를 얻을 수 있는 것으로 보고되고 있다[3,4]. 그러나 본 연구에서는 전혀 탈세포화가 이루어 지지 않았으며, 이는 본 실험에서의 대상 조직이 이전 실험에서 사용된 비뇨기계 조직과는 차이가 있는 데에 기인하였을 것으로 생각된다.

DOA는 이온성 세정제로, 매우 효과적으로 세포 잔존물

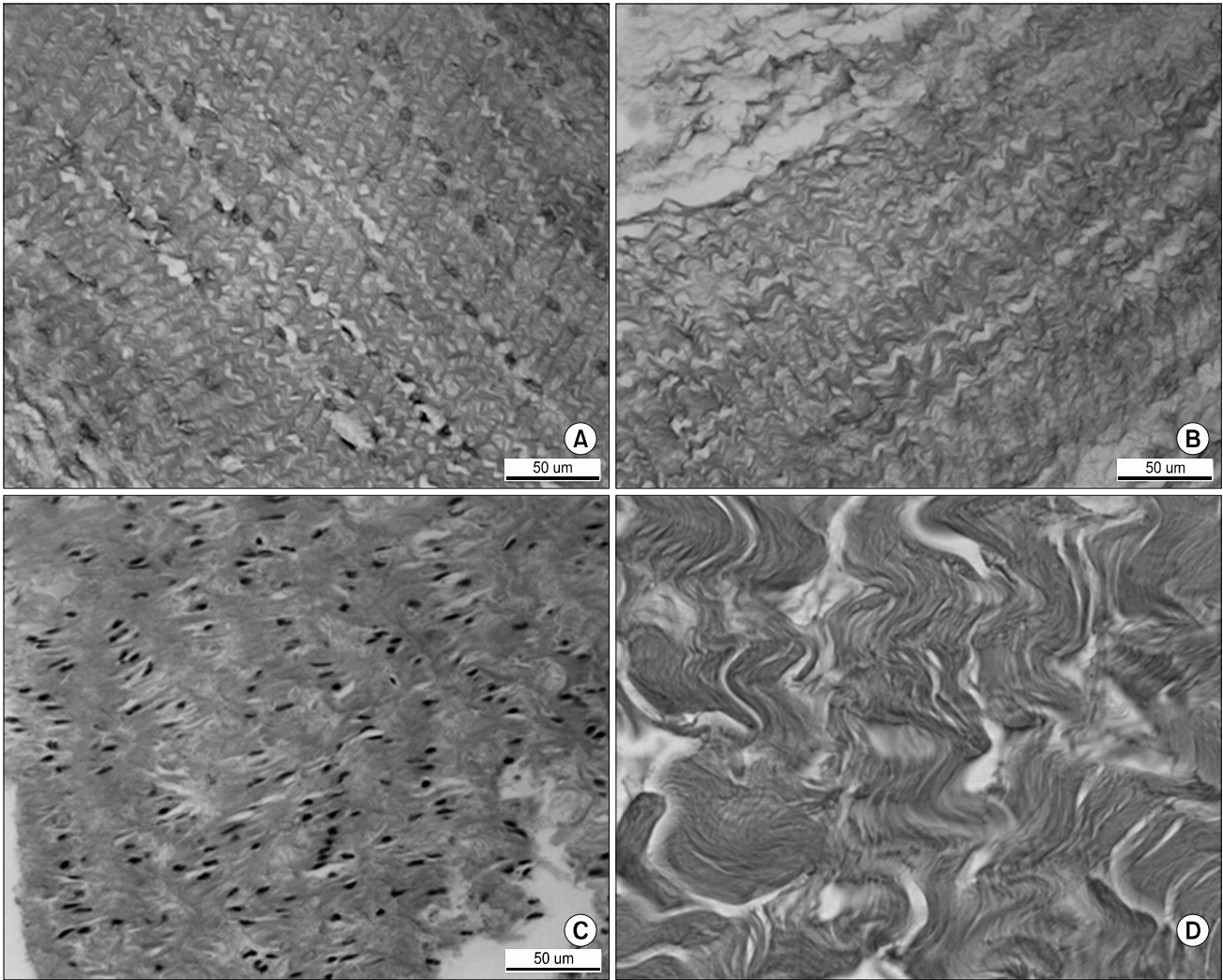


Fig. 7. Hypotonic solution for 10 hours → 0.1% SDS in hypotonic solution for 12 hours → 0.25% DOA in PBS for 12 hours at 4°C → PBS for 12 hours. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM ×400. (A) aortic valve. (B) pulmonary valve. (C) pulmonary wall. (D) pericardium.

을 제거할 수 있으나, 자가 조직 구성을 상당히 파괴하는 것으로 알려져 있다[1]. 그러나 보통 단독으로 사용되는 경우는 거의 없고, 타 세정제들과 함께 사용된다[5-8]. 본 연구에서는 먼저 DOA 단독으로 온도조건, 처리시간, 농도를 달리하여 실험을 진행하였고, 이후 다른 탈세포화에 사용되는 용액과 함께 단일 단계로 실험하거나, 여러 단계로 실험을 시행하였다. DOA 단독으로 시행한 실험에서 온도를 높이거나 처리시간을 연장할수록 세포의 제거는 잘 이루어졌지만, 이와 동시에 특히 온도가 높아질수록 세포 외 조직의 손상이 심해지는 경향을 보였다. DOA 농도가 높아질수록 세포 외 조직의 손상이 심해지는 것은

이미 알려져 있으나[1] 온도가 높아질수록 세포 외 조직의 손상이 심해지는 것은 고온에서 세포조직의 분해에 관계된 효소들의 활성도가 훨씬 강함을 시사하는 바이며, 이후 탈세포화 실험에서 충분히 반영되어야 할 것이다.

SDS는 탈세포 효과가 매우 강력한 이온성 세정제로서 세포의 세포막 구성성분인 산성인지질(acidic phospholipids)을 제거한다[9]. 이러한 기전을 통해 SDS는 다른 세정제들과 비교하여 잔존 핵물질(Azurophilic substance)이나 vimentin 같은 세포질 단백을 거의 완전하게 제거할 수 있다고 한다[10,11]. 그러나 SDS는 고유조직구조를 파괴하는 경향이 있어 glycoaminoglycan (GAG)의 감소나 콜라겐의

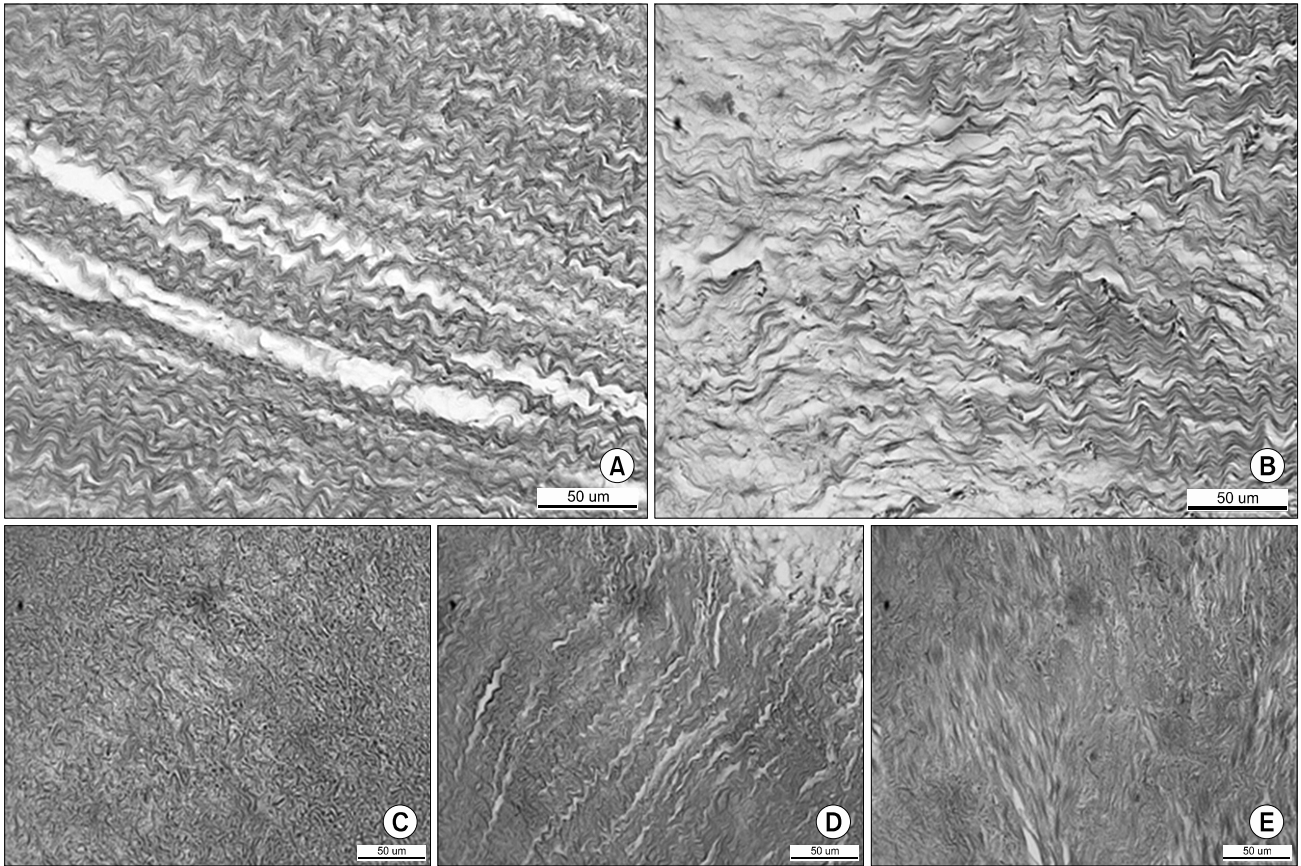


Fig. 8. Multi-step method based on DOA, hypotonic solution and SDS. All tissues are stained with hematoxylin and eosin. LM $\times 400$. (A~B) 0.5% DOA in PBS for 6 hours at 4°C \rightarrow hypotonic solution for 8 hours \rightarrow 0.25% SDS in hypotonic solution for 8 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours. (A) aortic valve. (B) pulmonary valve. (C~E) 0.5% DOA in PBS for 6 h at 4°C \rightarrow hypotonic solution for 8 hours \rightarrow 0.1% SDS in hypotonic solution for 12 hours \rightarrow isotonic solution for 8 hours at 4°C . (C) aortic valve. (D) pulmonary valve. (E) pulmonary wall.

구조(integrity)를 약화시킬 수 있다고 알려져 있다[11]. 대개 실험에 사용되는 SDS 농도는 0.03%에서 1%로 등장성 완충용액(isotonic buffer solution) 혹은 증류수에 섞어 쓰기도 하나 저장성 완충용액에 가장 많이 섞어 사용한다. 그 이유는 저장성 완충용액과 함께 사용함으로써 낮은 삼투압을 이용해 저장성 용액 함께 세포 내로 잘 들어갈 것이라고 생각되기 때문이다[12]. 본 연구에서는 0.25% SDS 단독으로 4°C 에서 24시간 처리하는 실험을 1차례 시행하였는데 탈세포화는 효과적이었으나, 세포외기질의 손상이 현저하였다. 이러한 세포 외 기질의 손상은 기존의 실험에서 사용된 가장 낮은 수준의 SDS 농도를 사용하였고, 효소활성이 낮은 온도조건에서 실험을 진행한 것으로 보아 처리시간이 길었기 때문으로 생각된다. 이 결과에 따라 이후 실험에서는 SDS 처리시간을 줄여 실험을 시행하

였고, 세포제거의 효과를 높이기 위해 다른 세정제나 중합체, 저장성 완충용액을 추가하여 비이온성 세정제인 Triton X-100, 이온성 세정제인 DOA, 중합체인 PEG 및 저장성 완충용액을 SDS와 섞어서 단일단계로 또는 함께 섞거나, 연속적으로 여러 단계로 탈세포화 실험을 시행하였다. 단일단계실험 중 Triton X-100를 섞어서 시행한 실험에서 24시간 처리하였을 때 탈세포화를 얻을 수 있었는데 본 연구에서 탈세포화의 적정성을 평가하기 위해 사용된 H&E 염색에서는 세포 외 기질의 구조가 비교적 잘 유지되는 것으로 보였으나, 앞서 SDS 단독 실험결과에서 세포 외 기질의 손상을 보였던 것을 고려하였을 때 향후 세포 외 기질의 보존에 대한 추가적인 평가작업을 통해 적절한 탈세포화인지 여부를 확인해야 할 것이다. 여러 단계의 실험 중에는 DOA와 저장성 완충용액에 연속적으로 배양

한 후 SDS에 배양하는 실험에서 탈세포화를 얻을 수 있었는데, 같은 조건에서 DOA를 빼고 저장성 완충용액에 처리한 후 SDS에 배양하는 실험에서의 탈세포화 결과와 차이가 없었다. 그래서 이후 실험에서는 DOA를 빼고, 저장성 완충용액에 처리한 후 SDS에 배양하는 실험방법을 농도, 시간변수를 달리하여 추가적인 변수실험을 시행하였고, 4°C에서 0.25%농도의 SDS로 16시간 배양 함으로서 지속적으로 재현 가능한 효과적인 탈 세포화를 얻었다.

SDS를 이용하여 탈세포화된 조직을 실제 사용할 경우 남아 있을 수 있는 미량의 SDS는 숙주세포(host cell)들의 정착을 방해하거나 세포독성 물질(cytotoxic agent)로 작용하여 세포를 파괴시킬 수 있다고 알려져 있다[13]. 그러므로 재세포화를 위한 조직 지지체로 사용하는 경우, 가능하면저 농도의 SDS로 짧은 시간 동안 배양해야 할 것이다. 본 실험에서는 단일단계방법으로 4°C에서 SDS와 Triton X-100를 포함한 저장성 완충용액에서 24시간 배양하는 방법과, 다단계방법으로 4°C에서 저장성 완충용액과 0.25% 농도의 SDS가 섞인 저장성 완충용액 16시간 동안 연속적으로 배양시키는 방법으로 지속적으로 재현 가능한 효과적인 탈 세포화를 얻었고, 일단 이러한 조건에 큰 변화가 생기기는 어려울 것으로 생각되므로, 앞서 지적한 대로 숙주세포의 정착을 방해하거나 세포독성물질로 작용하는 것을 최소화 하기 위해서는, SDS로 배양 후 세척단계에 대한 추가적인 연구도 함께 이루어져야 할 것으로 생각된다.

조직을 저장성 완충용액으로 처리하는 것은 삼투압을 이용하여 세포를 팽창시켜 세포막을 터트려 세포를 파괴하는 매우 간단한 방법이나, 탈세포화에 있어 저장성 용액의 효과에 대해서는 알려진 것이 많이 없다. 저장성 용액을 통한 삼투압 충격만으로는 세포를 완전히 제거할 수 없고[14], 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거하기 위해 효소적 혹은 화학적 처리가 필요하다[1]. 가장 보편적으로 사용하는 용액은 10 mM Tris 완충용액(buffer solution)으로 여기에 킬레이트 시약(chelating agent)인 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)를 섞어 세포와 세포 외 기질과의 결합(binding)을 약화 시켜 세포를 잘 빠져 나오게 하고 세포의 파괴 시 유출되는 세포 내 여러 효소의 활성을 방지하기 위해 Ph가 높은 완충용액(buffered solution)과, 단백질분해효소 억제제(protease inhibitor)인 phenylmethyl-sulfonylfluoride, aprotinin, leupeptin 등과 하이알루론산분해효소 억제제(hyaluronidase inhibitor)인 sulphated neomycin 등을 첨가하여 사용한다. 본 연구에서는 10 mM Tris 완충용액(buffer solution)에 EDTA와 aprotinin, neomycin trisulphate를 첨

가하여 사용하였다.

실제 임상에서 탈세포화 후 이식된 이종이식편(xenograft)의 면역반응에 의한 기능부전에서 보이듯이 완전한 탈세포화 후에도 조직의 세포 외 기질(extracellular matrix)에 잔존하는 당단백질(glycoprotein)내의 이종항원의 제거를 위해서도 적절한 처리가 필요하며[15,16], 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구에서 사용된 방법 중 PEG나 PAA를 사용한 방법은 탈세포화가 거의 이루어 지지 않았는데, 이는 기존 다른 연구에서 실험했던 대상 조직과 본 연구에서 사용된 조직의 종류가 다르기 때문일 것으로 생각된다.

실험과정 중간중간에 있는 흔들기(shaking)나, 헹굼(washing), 실험 기간 중 실험조건(온도, 시간)의 정확한 유지는 탈세포화의 성공에 매우 중요하다. 본 연구에서도 저장성 완충용액과 SDS에 검체를 연속적으로 배양하는 실험을 두 차례 반복적으로 시행하였고, 첫 실험에서는 탈세포화를 얻지 못했으나, 반복실험에서는 탈세포화를 얻을 수 있었다. 이 실험과정에 대한 검토과정 중, 첫 실험에서 조직을 대상 용액에서 흔들어주는(shaking) 과정이 적절하지 못했고, 배양시간이 정확히 지켜지지 못했다는 결론이 내려졌고, 재 실험에서 이 부분을 보완하여 진행한 후 탈세포화를 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 탈세포화를 평가하기 위해 H&E 염색법을 이용하였다. 이 비교적 간단한 방법으로 세포의 제거를 간편하게 확인할 수 있지만, 세포 외 기질에 대한 조직의 적절한 보전에 관한 평가방법으로서는 그 해석에 한계가 있으며, 향후 실험에서 이를 확인하기 위한 추가적인 보완평가가 이루어져야 할 것이다.

결 론

본 연구에서 탈세포화를 보였던 실험 방법 중 단일단계 방법으로 4°C에서 sodium dodesyl sulfate와 Triton X-100을 포함한 저장성용액에서 24시간 배양하는 방법과, 다단계 방법으로 저장성 완충용액과 SDS를 연속적으로 사용하는 방법(4°C의 배양조건, 0.25% 농도의 SDS, 16시간의 배양 시간)을 통해 세포 외 기질을 보존하면서 적은 수의 탈세포화 용액을 사용하여 비교적 효과적인 탈세포화를 얻을 수 있었다. 향후 위 방법을 더욱 적정화 하기 위한 세밀한 실험이 이루어져야 할 것이며, 좀더 완전한 탈세포화와 세포 외 기질(extracellular matrix)의 보존 및 완전한 이종면역제거를 이루기 위한 추가적인 처리(예. DNase,

RNase, α -galactosidase 등)가 필요하겠다. 또한 탈세포화의 궁극적인 목표인 항원성의 제거를 확인하기 위한 추가적인 조직학적, 면역학적 평가도 함께 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials 2006;27:3675-83.
2. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, et al. *Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly (ethylene glycol)*. J Biomed Mater Res 2003;67: 834-7.
3. Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. *Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds*. Biomaterials 2004;25:2353-61.
4. Hodde J, Record R, Tullius R, Badylak S. *Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix*. Biomaterials 2002;23:1841-8.
5. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications*. Biomaterials 2004;25:2679-86.
6. Hudson TW, Liu WY, Schmidt CE. *Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing*. Tissue Eng 2004;10:1346-58.
7. Woods T, Gratzner PF. *Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft*. Biomaterials 2005;26: 7339-49.
8. Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering*. Tissue Eng 2004;10:1046-53.
9. Hirsch D, Drader J, Thomas TJ, et al. *Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled released studies*. J Biomed Mater Res 1993;27: 1477-84.
10. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. Int J Artif Organs 2003;26:421-7.
11. Wilcox HE, Korossis SA, Booth A, et al. *Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix*. J Heart Valve Dis 2005;14:228-37.
12. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, et al. *Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold*. J Heart Valve Dis 2002;11:457-62.
13. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, et al. *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. J Thorac Cardiovasc Surg 2004;127:399-405.
14. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. *Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation*. Cell Transplant 2003;12:659-66.
15. Vesely I, Noseworthy R, Pringle G. *The hybrid xenograft/ autograft bioprosthetic heart valve: in vivo evaluation of tissue extraction*. Ann Thorac Surg 1995;60:359-64.
16. Galili U. *The α -gal epitope (Gal α 1-3Gal₁-4GlcNAc-R) in xenotransplantation*. Biochimie 2001;83:557-63.

=국문 초록=

배경: 조직공학분야에서 이종조직의 세포성분에 대한 면역반응을 없애기 위한 기본적인 과정으로 조직의 탈세포화에 대한 연구가 있어왔다. 본 연구는 기존에 탈세포화에 효과적이었다고 보고되었던 방법들을 변형 혹은 재현해 보고, 이를 통해 최적의 탈세포화를 얻을 수 있는 조건을 찾고자 하였다. **대상 및 방법:** 돼지의 대동맥 및 폐동맥판막, 대동맥 및 폐동맥벽, 심낭을 탈세포화 세정제(detergents)에 대한 농도 및 배양시간, 온도조건, 용질에 대한 삼투압 등을 달리하고, 여러 탈세포화용액 및 그 조합을 통해 단일단계 및 여러 단계의 방법으로 배양하여 탈세포화를 시행하였다. 이렇게 탈세포화 실험을 마친 조직은 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 통해 탈세포화의 정도와 세포 외 기질의 보존 정도를 평가하였고, 일부탈세포화된 조직에서는 이종항원면역제거 정도를 파악하는 alpha-Gal 염색과 DAPI 염색을 동시 시행하여 관찰하였다. **결과:** Polyethylene glycol이나 peracetic acid를 이용한 방법에서는 탈세포화가 되지 않았다. 단일단계방법으로는 sodium deoxycholate (DOA), sodium dodesyl sulfate (SDS), Triton X-100, SDS와 Triton X-100을 섞은 용액에서, 다단계방법으로는 저장성 완충용액 → Triton X-100 → SDS, DOA → 저장성 완충용액 → SDS, 저장성 완충용액 → SDS에서 탈세포화가 이루어 졌다. DOA는 다른 탈세포화 방법에 비해 세포 외 기질의 파괴가 심하였고, 특히 실험온도가 높아질 수록 세포 외 기질의 파괴가 더욱 현저함을 알 수 있었다. 사용되는 화학물질의 종류, 양, 처리시간 및 세포 외 기질의 파괴 정도를 고려하여 지속적으로 재현 가능한 탈세포화에 비교적 적합한 조합 및 조건은 단일단계방법으로 4°C에서 SDS와 Triton X-100를 섞은 저장성용액에서 24시간 배양하는 방법과, 다단계방법으로 저장성 완충용액과 SDS를 연속적으로 사용하는 방법으로, 4°C에서 6~8시간 이상 저장성 완충용액에 처리한 후, 0.25% SDS가 섞인 저장성 완충용액에 16시간 배양 후 등장성 완충용액에 처리하는 방법이었다. **결론:** 4°C에서 SDS 과 Triton X-100을 섞은 저장성 완충용액에서 24시간 배양하는 단일단계방법이나, 저장성완충용과 SDS를 연속적으로 사용하는 다단계 방법을 통해 세포 외 조직을 비교적 잘 보존하면서 적은 수의 탈세포화 용액을 사용하여 효과적인 탈세포화를 얻을 수 있었다.

중심 단어 : 1. 이종이식편
2. 조직공학