

이종 항원 제거를 위한 무세포화와 알파-갈락토시다아제를 이용한 효과적인 우심낭 보존 방법에 관한 연구

김민석* · 박참진* · 김수환** · 임홍국* · 김용진*

Study on Effective Preservation of Bovine Pericardium Using Decellularization and α -galactosidase for Eliminating Xenoreactive Antigen

Min Seok Kim*, Cham Jin Park*, Soo Hwan Kim**, Hong-Gook Lim, M.D.*, Yong Jin Kim, M.D.*

Background: Effective decellularization and fixation process is critical, in order to use xenogenic valves clinically. In the present study, we decellularized bovine pericardium using sodium dodecyl sulfate (SDS) and N-lauroyl sarcosinate, treated with α -galactosidase, and then fixed in various manners, to find out the most effective tissue preservation & fixation procedure. **Material and Method:** Bovine pericardium was decellularized with SDS and N-lauroyl sarcosinate, and treated with α -galactosidase. Both groups were fixed differently, by varying glutaraldehyde (GA) or EDC (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide)/N-hydroxysuccinamide (NHS) treatment conditions. Thereafter, physical examination, tensile strength test, thermal stability test, cytotoxicity test, pronase test, pronase-ninhydrin test, purpald test, permeability test, compliance test, H&E staining, DNA quantification, and α -galactose staining were carried out to each groups. **Result:** GA fixed groups showed better physical properties and thermal stability than EDC/NHS fixed groups. EDC/NHS-GA dual fixed groups showed better physical properties and thermal stability than EDC/NHS fixed groups, and showed better thermal stability than GA fixed groups. In pronase test and pronase-ninhydrin test, GA fixed groups and EDC/NHS-GA dual fixed groups showed stronger crosslinks than EDC/NHS groups. Permeability and compliance tended to increase in EDC/NHS-GA dual fixed groups, compared to GA fixed groups. But, EDC/NHS-GA dual fixed groups had stronger tensile strength and lower cytotoxicity than GA fixed groups. **Conclusion:** We have verified that EDC/NHS-GA dual fixation can make effective crosslinks and lower the toxicity of GA fixation. Henceforth, we will verify if EDC/NHS-GA dual fixation can lower calcifications & tissue failure in vivo experiment.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:576-587)

Key words: 1. Tissue engineering
2. Glutaraldehyde
3. Pericardium
4. Xenograft

*서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

**서울대학교병원 이종장기이식센터

Seoul National University Hospital, Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

†본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A040004-006).

논문접수일 : 2010년 9월 6일, 논문수정일 : 2010년 11월 15일, 심사통과일 : 2010년 11월 15일

책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 중로구 연건동 28, 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.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

심장 판막 질환의 치료에 있어서 판막 이식은 중요한 치료법의 하나이다. 조직 판막은 기계 판막에 비해 지속적인 항응고치료의 필요성이 적고, 혈액학적으로 우수하다는 장점이 있으나, 퇴행성 변화나 석회화 등으로 인한 부전으로 그 사용 기간에 한계가 있다. 결국 이상적인 인공 조직 판막은 근래 판막 부전의 가장 중요한 기전의 하나로 알려진 급, 만성 면역 반응을 최소화 하면서 그 기계적 특성을 최대한 유지할 수 있어야 하겠다[1]. 이에 조직 판막의 제조와 처리 등의 분야에 있어서 여러 연구들이 시행되어 왔다[2,3]. 이중 조직 판막의 수명을 개선하고 안정성을 얻기 위한 방법으로서, Glutaraldehyde (GA) 등을 이용한 조직의 고정 및 무세포화 등이 알려져 왔다.

조직 판막의 고정에 흔히 사용되는 GA는 조직의 콜라겐의 교차 결합을 유도하여 조직을 견고하게 하지만, 석회화를 일으키는 원인이 될 수 있다. 따라서 GA의 독성을 보완하기 위해 유기용매를 첨가하여 사용하거나, 글라이신 등을 이용한 항독성화 처리가 필요하다. 또한, GA 고정에 추가적으로 카보다이아마이드(carbodiimide)를 이용한 이중 고정을 할 수 있으며, 이 경우에 저농도의 GA를 이용하여도, 조직의 고정을 견고하게 하면서 GA의 독성을 줄일 수 있다. 조직에 남아 있는 세포 성분은 환자의 면역 반응을 유도하여 조직의 퇴행성 변화 및 석회화를 일으키는 원인이 된다. 또한, 동물의 조직 표면에 존재하는 이중항원인 알파-갈 항원결정인자는 이식 받은 환자의 항-갈 항체와 반응하여 면역 반응을 유도하여 판막의 석회화의 원인이 될 수 있다[4]. 따라서 적절한 무세포화와 함께 조직에 존재하는 알파-갈 항원결정인자를 제거하는 과정이 조직 처리에 있어서 필요하다. 본 연구에서는 소심낭에 대해 각각 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 N-lauroyl sarcosinate (SLS)를 이용한 무세포화 및 알파-갈락토시다아제 처리를 시행한 후, GA와 카보다이아마이드를 이용하여 고정함으로써 지금까지 사용되어 온 조직 보존방법보다 효과적인 심낭조직 처리 방법에 대해 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 무세포화와 α -galactosidase처리

소심낭을 생리식염수로 세척하고, 0.1% Peracetic acid를 4% 에탄올이 포함된 증류수에 넣고 1시간 흔들어주고, 증

류수로 1시간 세척한다.

(1) **Sodium dodecyl sulfate (SDS)군:** 4°C에서 0.25% SDS가 포함된 저장성 완충용액에 24시간 처리하고, 1시간 증류수로 세척한다. 0.5% TritonX-100이 포함된 저장성 완충용액에 24시간 처리하고, 1시간 증류수에 세척한다. 0.1 U/mL α -galactosidase가 포함된 등장성 완충용액에 12시간 처리하고, 1시간 증류수로 세척한다. 고장성 완충용액 (II)에 4시간 처리하고, phosphate-buffered saline (PBS)로 1시간 세척하여 보관한다.

(2) **N-lauroyl sarcosinate (SLS)군:** 4°C에서 0.75% SLS가 포함된 저장성 완충용액에 24시간 처리하고, 1시간 증류수로 세척한다. 0.5% TritonX-100이 포함된 저장성 완충용액에 24시간 처리하고, 1시간 증류수에 세척한다. 0.1 U/mL α -galactosidase가 포함된 등장성 완충용액에 12시간 처리하고, 1시간 증류수로 세척한다. 고장성 완충용액 (II)에 4시간 처리하고, PBS로 1시간 세척하여 보관한다.

2) 고정

(1) **Glutaraldehyde (GA) fixation:** 0.25% GA용액에 72시간 고정한 후, 0.25% GA, 75% ethanol 및 5% octanol의 혼합액에 넣고 48시간 처리하였다. 이후 0.25% GA 용액에 넣고 120시간 고정하고, 0.2M Glycine용액에 넣고 37°C에서 24시간 처리하였다.

(2) **1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinamide (NHS)+GA fixation:** 0.05M 4-morpholinoethanesulfonic acid hydrate (MES)에 30 mM EDC/6 mM NHS를 용해시킨 EDC-NHS solution으로 24시간 처리한 후, 0.25% GA용액에 넣고 72시간 동안 고정하였다. 이후 0.25% GA, 75% ethanol 및 5% octanol의 혼합액에 넣고 48시간 처리하고, 0.25% GA 용액에 120시간 고정하였다. 이후 0.2M Glycine용액에 넣고 24시간 처리하였다.

(3) **EDC/NHS fixation:** 0.05M MES에 30 mM EDC/6 mM NHS를 용해시킨 EDC-NHS solution으로 24시간 동안 처리하였다.

3) Physical examination

측진은 신선한 심낭편을 0으로 기준하여 단계별로 1 (부드러움), 2 (약간 부드러움), 3 (보통), 4 (약간 뻣뻣함), 5 (뻣뻣함)로 점수를 매겼다. 봉합시 성상은 5-0 Polypropylene을 이용하여 심낭편을 꿰는 때의 저항 정도를 단계별로 점수 매겨 기술하였는데, 고정하기 전의 신선한 심낭편을 0으로 기준하여 단계별로 1 (잘 들어감), 2 (약간

잘 들어감), 3 (보통), 4 (약간 저항이 있음), 5 (저항이 심함)로 점수를 매겼다. 신장도는 5-0 Polypropylene으로 조직을 뚫은 후 적당한 힘으로 당겨보아 조직이 늘어나는 정도를 단계별로 점수 매겨 기술하였는데, 고정하기 전의 신선한 심낭편을 0으로 기준하여 단계별로 1 (잘 늘어남), 2 (약간 늘어남), 3 (보통임), 4 (잘 늘어나지 않음), 5 (거의 늘어나지 않음)로 점수를 매겼다. 한편, 조직을 신장시킬 때 균열(gap)이 생기는지의 유무도 함께 관찰하였다.

4) 장력 검사(Tensile strength test)

심낭편들을 5×20 mm의 절편으로 만들어 폭 5 mm에 대한 인장강도를 측정하였다. 장력의 측정은 Digital Force Gauge (DS2-200N, IMADA, Japan)을 이용하였고, 부하 속도(load speed) 100 mm/min로 측정하여 단위는 MPa (N/mm²)로 표기하였다.

5) 열 안정성 검사(Thermal stability test)

심낭편을 8×30 mm의 절편으로 잘라 95 g의 추로 지속적인 장력을 가하게 한 후 55°C의 증류수에 넣고 2°C/min의 속도로 물의 온도를 올리면서 심낭 절편이 급격하게 수축하는 시점, 즉 조직의 콜라겐 변성이 일어나는 시점의 온도를 군별로 각각 비교 측정하였다.

6) 세포독성 검사(WST-1 assay)

심낭편을 1% 항생제가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene)에 넣고 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 취한 다음, -20°C에 저장하였다. 돼지 동맥으로부터 평활근세포와 섬유모세포를 얻어 37°C, 5% CO₂의 환경에서 1% 항생제, 10% Fetal Bovine Serum가 첨가된 DMEM에 배양하였다. 세포 독성 실험을 위해 배양한 평활근세포와 섬유모세포를 96 well plate의 각 well마다 2.5×10³개의 세포를 심고 배양한 뒤, 배양된 세포가 80% 정도가 되면 1% 항생제만이 첨가된 DMEM에서 4시간 배양하였다. 배양한 평활근세포와 섬유모세포의 배양액을 제거한 뒤, 각각의 심낭편에서 용출한 상층액을 100 μL씩 처리하여 48시간 배양하였다. 이후 tetrazolium salt (WST-1)을 10 μL씩 처리하여 4시간 배양한 뒤, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 프로나아제 저항 시험(Pronase test)

심낭편을 건조한 후 무게(weight 1)를 측정한다. 0.05

mg/mL pronase 용액을 첨가한 뒤 심낭편을 넣고 반응시킨다. 세척 후 건조한 뒤 무게(weight 2)를 측정한다. 프로나아제에 대한 저항성을 잔여무게량% (=weight 2/weight 1×100)으로서 나타낸다.

8) Pronase-Ninhydrin 시험

0.1 mg/mL pronase 용액에 심낭편을 넣고 반응시켰다. 심낭 절편을 제거하고 남은 용액에 ninhydrin 50 μL를 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 흡광도로 용출된 아미노산의 질량을 계산하였다

9) Purpald 검사

심낭편을 Purpald에 반응시킨 후 공기중에 노출시켜 심낭편의 색이 변하는 데 걸리는 시간 및 보라색의 정도를 분석하였다.

10) Hematoxylin-Eosin (H&E) staining

심낭편을 10% 포르말린 용액에 고정 후 파라핀포매 조직을 만들어 2~4 μm 절편으로 박절하여 H&E 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

11) DNA 정량

SDS를 이용하여 탈세포화한 심낭편을 DNA 정량하였고, 탈세포화 처리 이전의 우심낭을 대조군으로 하였다. 심낭편을 lysis buffer와 proteinase K를 넣어 EP tube에 담고 incubater에서 55°C로 overnight하였다. 이후 centrifuge하여 상층액을 얻고 5 M NaCl을 각각 250 uL씩 첨가한 뒤 protein을 가라앉히기 위하여 centrifuge하였다. 다시 취한 상층액에 500 uL의 isopropanol을 첨가한 뒤 inversion을 하였고 DNA를 확인하고 다시 centrifuge하였다. 상층액을 버리고 얻은 DNA pellet을 70% Ethanol 500 uL로 washing하기 위하여 centrifuge 한 후 상층액을 버리고 말린 뒤 100 uL의 Elution buffer를 넣어 pellet을 dissolve하였다. 이후 NANODROP을 이용하여 DNA를 정량하였다.

12) 알파-갈 항원결정인자 염색

Protein 및 peroxidase의 blocking을 거쳐 washing 한 후, Biotin이 부착된 *Griffonia simplicifolia* I isolectin B4 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 염화칼슘 완충액에 1 ug/mL농도로 희석하여 슬라이드에 0.1 mL 떨어뜨린 후 이를 1시간 배양한다. 순차적으로 Horshradish peroxidase가 부착된 strep-

Table 1. Physical property of variously treated bovine pericardium

	SDS+GA	SDS+EDC+GA	SDS+EDC	SLS+GA	SLS+EDC+GA	SLS+EDC
Palpation	2	2	1	2	2	1
Suture	2	2	2	2	2	2
Extensibility (gap)	3 (no)	2.5 (no)	2 (no)	3 (no)	2.5 (no)	2 (no)

SDS+GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS+EDC+GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS+EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS+EDC+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS+EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS.

Table 2. Tensile strength of variously treated bovine pericardium

	SDS+GA	SDS+EDC+GA	SDS+EDC	SLS+GA	SLS+EDC+GA	SLS+EDC
N	10	10	10	10	10	10
Thickness (mm)	0.33±0.04	0.38±0.03	0.34±0.05	0.40±0.07	0.32±0.06	0.32±0.07
Ultimate strength (MPa)	11.18±3.02	11.85±2.92	13.45±2.12	10.35±2.77	12.02±2.27	13.08±6.10
Strain at fracture (%)	41.00±6.68	40.33±7.93	48.67±7.40	52.33±9.17	48.00±8.64	44.00±7.50

SDS+GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS+EDC+GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS+EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS+EDC+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS+EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS.

tavidin을 5 ug/mL 농도로 염화칼슘 완충액에 희석하여 0.1 mL 떨어뜨린 후 1시간 배양한다. 그 후 3,3'-diaminobenzidine을 0.1 mL 슬라이드에 떨어뜨린 1분 후 3차 증류수로 세척한 후, hematoxyline 1분, HCl과 ammonia와 에탄올, neo-clear의 일련의 과정을 거친 후 mounting medium을 떨어뜨린 후 coverglass를 덮고 관찰하여 알파-갈 염색 정도를 확인한다.

13) 투과도 검사 및 유순도 검사(Permeability test, Compliance test)

(1) **투과도검사:** 심낭편에 생리식염수를 이용하여 100 mmHg의 압력을 10분 동안 가한 뒤, 심낭편을 투과한 생리식염수의 양을 측정한다.

(2) **유순도검사:** 심낭편에 생리식염수를 이용하여 0, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mmHg의 정수압을 가하여, 심낭편의 변형된 부피를 측정한다.

14) 통계 방법

각 실험마다 군 간의 통계적 차이를 알아보기 위해서 일원배치 분산분석(one-way analysis of variances, ANOVA) 혹은 Kruskal-Wallis 분석을 시행하였으며, 사후분석으로는

Turkey b test 혹은 Dunnett의 T3 test를 이용하여 검증하였다. p<0.05를 유의한 결과로 간주하였다.

결 과

1) Physical property (Table 1)

축진, 봉합시의 정상, 신장도를 평가한 결과, 무세포화 방법에 의한 차이보다는 고정 방법에 따른 차이를 보였다. 축진의 경우, EDC/NHS로 고정한 군이 GA로 고정한 군이나 EDC/NHS와 GA로 이중 고정한 군에 비해 더 부드러웠다. 봉합시의 저항 정도는 모든 군에서 큰 차이 없이 비슷하였다. 바늘로 조직을 뚫은 후 조직이 늘어나는 정도를 비교해 본 결과, EDC/NHS로 고정한 군이 GA로 고정한 군에 비해 더 잘 늘어났으며, EDC/NHS와 GA의 이중 고정 군은 다른 두 군과 비교하여 중간 정도의 신장도를 보였다. 모든 군에서 조직을 신장시킬 때의 균열은 관찰되지 않았다.

2) 장력 검사(Table 2)

SDS로 무세포화한 군과, SLS로 무세포화한 군을 비교한 결과, 무세포화 방법에 따른 유의한 차이는 없었다. 또

Table 3. Thermal stability test results of variously treated bovine pericardium

	Fresh	SDS + GA	SDS + EDC + GA	SDS + EDC	SLS + GA	SLS + EDC + GA	SLS + EDC
N	15	5	5	5	5	5	5
Sharp deflection point	69.42±1.48	86.25±0	88.75±0	81.25±0	86.25±0	88.25±1.12	81.25±0
p-value*	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

SDS + GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS + EDC + GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS + EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS + EDC + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS + EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS. *=Kruskal-Wallis and Dunnett T3 analysis compared to fresh group.

Table 4. Absorbance (A450 nm) of fibroblast and smooth muscle cell, after treating with eluate of variously treated bovine pericardium

	SDS + GA	SDS + EDC + GA	SDS + EDC	SLS + GA	SLS + EDC + GA	SLS + EDC	Positive control	Negative control
Fibroblast								
N	3	3	3	3	3	3	3	3
Absorbance (450 nm)	0.955±0.11	0.710±0.02	0.752±0.21	0.857±0.10	1.033±0.25	0.989±0.26	1.839±0.04	0.440±0.00
Smooth muscle cell								
N	3	3	3	3	3	3	3	3
Absorbance (450 nm)	0.777±0.04	0.756±0.16	1.457±1.29	0.658±0.01	0.946±0.10	1.135±0.06	2.974±0.14	0.437±0.00

SDS + GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS + EDC + GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS + EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS + EDC + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS + EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS. Positive control group was treated with 100 μL DMEM containing 1% antibiotics; Negative control group was treated with 50 μL DMSO and 50 μL DMEM.

한, SDS로 무세포화한 실험군들 내에서 고정 방법에 따른 차이는 없는 것으로 나타났으며, SLS를 이용하여 무세포화한 실험군들에 대해 고정 방법에 따른 차이를 발견할 수 없었다. 비록 통계적으로 유의한 차이는 발견할 수 없었지만, 고정 방법에 따라 일정한 경향성을 관찰할 수 있었다. GA 고정군에서 가장 낮은 인장강도를 보였으며, EDC/NHS 고정군에서 가장 높은 인장강도를 보였다. EDC/NHS와 GA로 이중 고정군의 경우 중간 정도의 값을 나타내었다.

3) 열 안정성 검사(Table 3)

무세포화 방법에 따른 유의한 차이는 없었다. 고정 방법에 따라 신선한 소심낭에 비해 모든 처리군에서 콜라겐 변성이 일어나는 시점의 온도가 유의하게 높았다. SLS를

이용하여 무세포화 한 군들의 경우에는, EDC/NHS와 GA로 이중 고정군이 EDC/NHS 고정군에 비해 콜라겐이 변성되는 온도가 유의하게 높았으며(p=0.007), EDC/NHS와 GA로 이중 고정군과 GA 고정군 간의 유의한 차이는 발견되지 않았다. 비록 정확한 통계적 유의성을 밝히지는 못하였지만, EDC/NHS와 GA의 이중 고정군, GA 고정군, EDC/NHS 고정군의 순서로 콜라겐 변성 시점의 온도가 높게 관찰되는 경향이 있었다.

4) 세포독성 검사(Table 4)

섬유모세포 실험 결과에서, 무세포화 방법에 따른 유의한 차이는 없었다. 또한, SDS를 이용하여 무세포화한 군과, SLS를 이용하여 무세포화한 군 각각에서 고정 방법에 따른 차이도 관찰되지 않았다. 평활근세포 실험 결과에서,

Table 5. Pronase resistance (a) and the amount of eluted amino acid per unit mass after pronase treatment (b), of variously treated bovine pericardium.

(a)	Fresh	SDS + GA	SDS + EDC + GA	SDS + EDC	SLS + GA	SLS + EDC + GA	SLS + EDC
N	10	6	6	6	6	6	6
Residual weight %	3.19±6.86	88.47±5.52	87.36±5.15	80.28±4.21	95.64±5.10	93.70±1.90	92.15±6.54
p-value*	-	0.010	0.007	0.014	0.002	0.000	0.029
(b)	Fresh	SDS + GA	SDS + EDC + GA	SDS + EDC	SLS + GA	SLS + EDC + GA	SLS + EDC
N	3	5	5	5	5	5	5
Amino acid (μg/mg)	12.25±2.10	5.624±2.40	3.351±0.47	6.722±0.98	4.711±0.37	5.823±0.49	9.170±1.67
p-value*	-	0.155	0.000	0.015	0.000	0.003	0.385

SDS + GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS + EDC + GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS + EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS + EDC + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS + EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS. *=Kruskal-Wallis and Dunnett T3 analysis compared to fresh group.

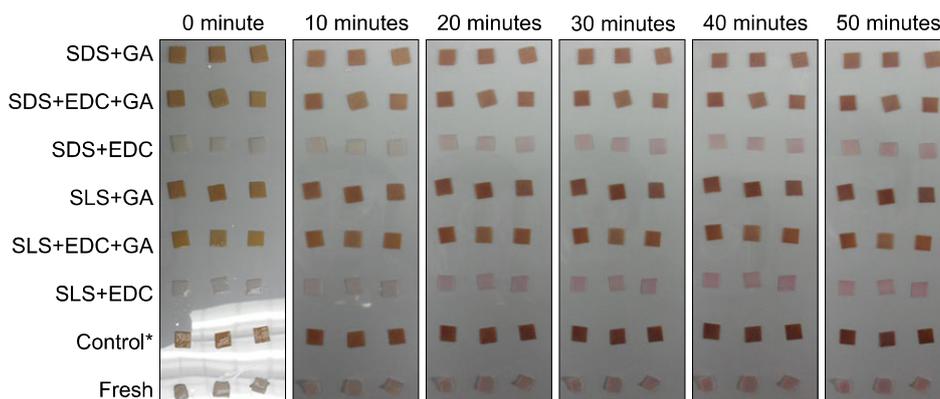


Fig. 1. The color change of variously treated bovine pericardium, after the reaction with purpald solution. SDS + GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS + EDC + GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS + EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS + EDC + GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS + EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS. *=Bovine pericardium treated with 0.625% GA for 72 hours was used as the control group.

무세포화 방법에 따른 차이는 없었으며, SDS로 무세포화한 군들의 경우, 고정 방법에 따른 차이는 없었다. SLS로 무세포화한 군들의 경우, GA 고정군에 비해 EDC/NHS와 GA의 이중 고정군(p=0.024), EDC/NHS 고정군(p=0.001)의 세포 독성이 낮은 것으로 나타났으며, EDC/NHS와 GA로 이중 고정군과 EDC/NHS 고정군 사이의 차이는 없었다. 통계적인 유의성을 관찰하기는 어려웠지만, GA 고정 보다는 EDC/NHS 고정 방법이 세포 독성이 낮은 경향을 보였다.

5) 프로나아제 저항 시험(Table 5a)

신선한 소심낭에 비해 모든 처리군에서 프로나아제에 대한 저항이 유의하게 높았다. 같은 방법으로 무세포화한 군들에서는 고정 방법에 따른 유의한 차이는 없었다. 한편, SDS에 비해 SLS를 이용한 무세포화 처리를 한 군에서 프로나아제 저항성이 유의하게 높게 관찰되었다(GA 고정군: p=0.037, EDC/NHS와 GA로 이중 고정군: p=0.010, EDC/NHS 고정군: p=0.025). 탈세포화 방법에 관계 없이

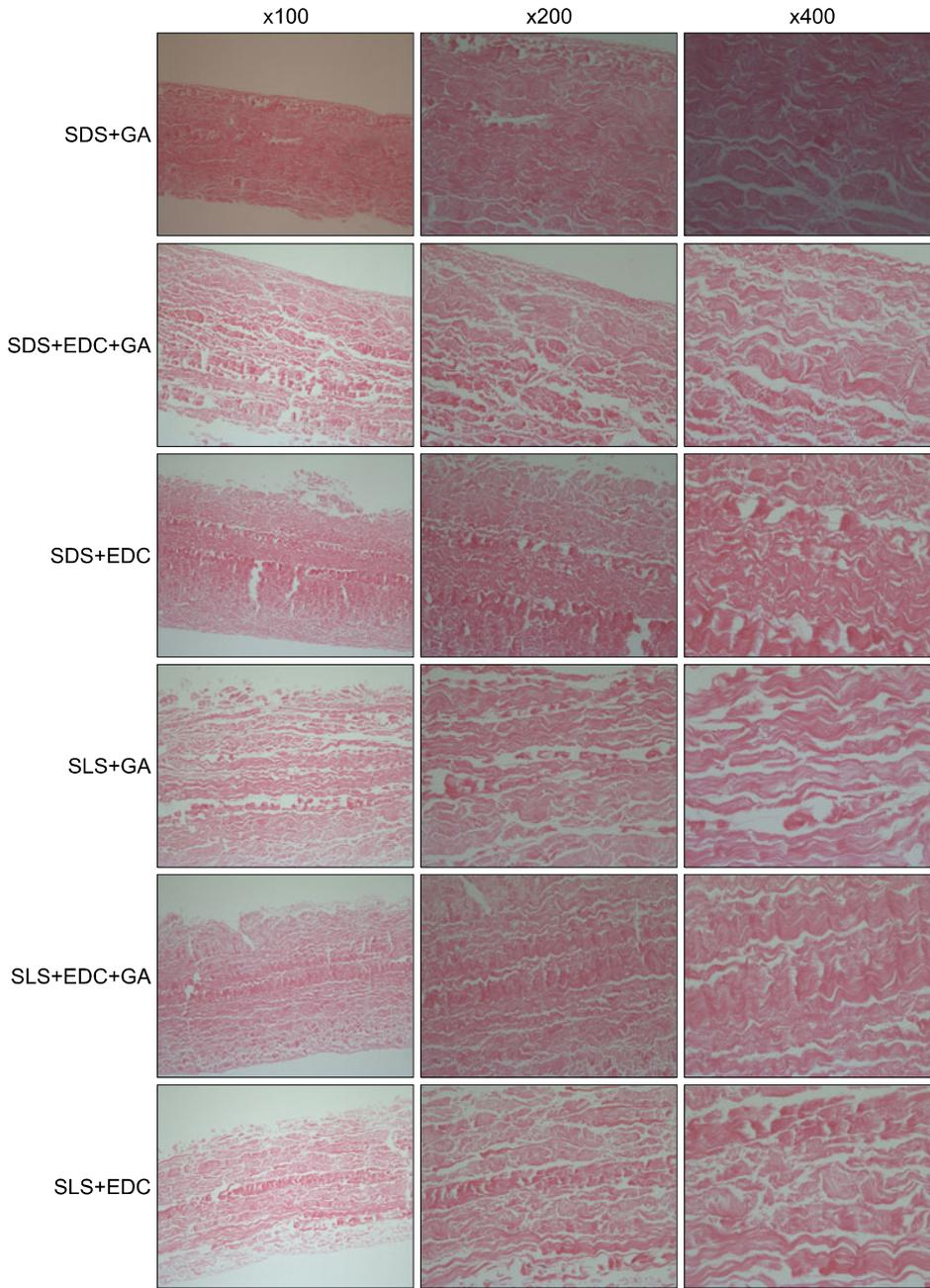


Fig. 2. H&E stain of variously treated bovine pericardium (x100, x200, x400). SDS+GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS+EDC+GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS+EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS+EDC+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS+EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS.

일반적으로 GA를 고정군에서 프로나아제 저항성이 가장 높았으며, EDC/NHS 고정군에서 프로나아제 저항성이 가장 낮은 경향을 보였다.

6) Pronase-Ninhydrin 시험(Table 5b)

신선한 심낭편에서 가장 많은 아미노산이 용출되었으며, SDS와 SLS를 이용한 실험군 모두에서 EDC/NHS 고정군에서 아미노산이 가장 많이 용출되었다. 무세포화 방법

Table 6. Amount of DNA per unit mass of fresh bovine pericardium, and bovine pericardium treated with SDS

	Fresh	SDS
N	2	5
DNA (μ g/mg)	1.71 \pm 0.37	0.05 \pm 0.08
p-value*	-	0.034

*=Kruskal-Wallis analysis compared to fresh group.

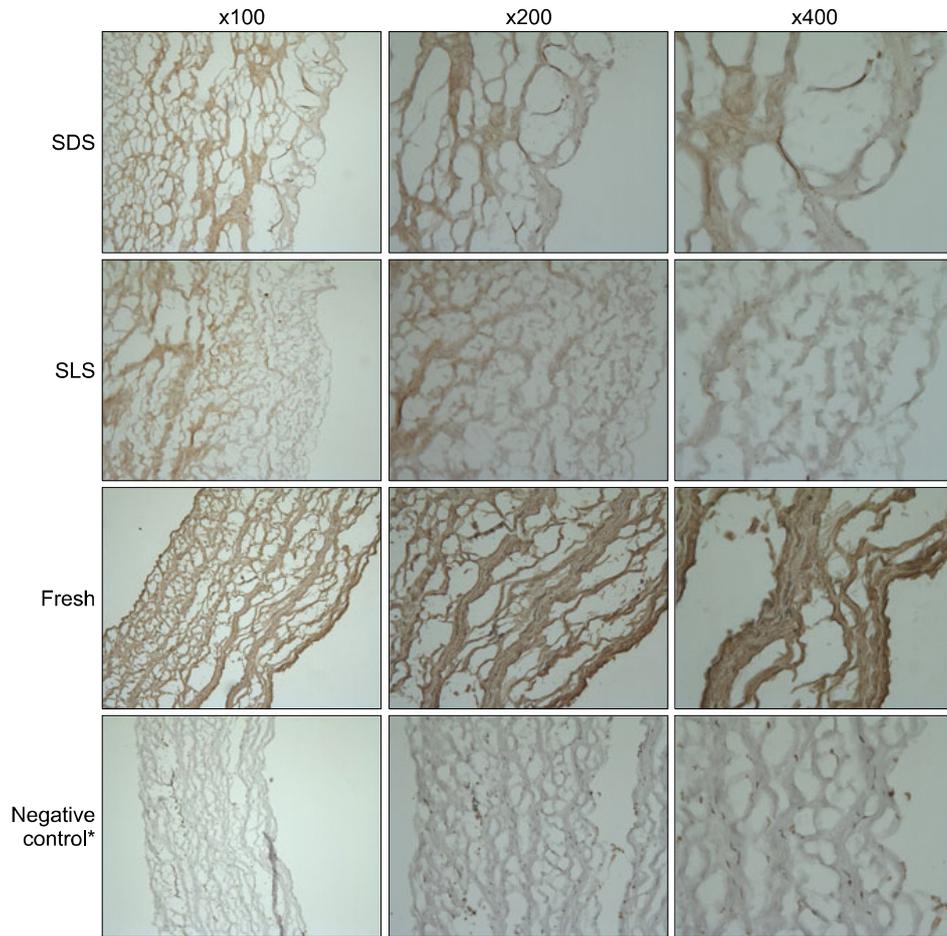


Fig. 3. α -gal stain of variously treated bovine pericardium (x100, x200, x400). *=Negative control group was not treated with GS-IB4 before streptavidin treatment.

에 따른 아미노산 용출량의 유의한 차이는 없었다. 또한, SDS로 무세포화 한 경우, EDC/NHS와 GA의 이중 고정군과 EDC/NHS 고정군 간의 유의한 차이가 있었다. SLS로 무세포화 한 경우, EDC/NHS 고정군에서 GA 고정군과 EDC/NHS와 GA 이중 고정군보다 유의하게 많은 아미노산이 용출되었다.

7) Purpald 검사(Fig. 1)

대조군은 반응 후 10분 경에 보랏빛을 띤 반면, 다른 군은 20분 경에 보랏빛으로 변색되었다. 반응 후 50분까지 경과 관찰한 결과, 모든 군이 대조군에 비해 보랏빛의 발색 정도가 연하였다.

8) H&E staining (Fig. 2)

SDS와 SLS를 이용한 군에서 모두 전반적으로 탈세포화

가 잘 이루어졌으며, 두 처리 간의 뚜렷한 차이는 없었다.

9) DNA 정량(Table 6)

SDS를 처리한 군이 아무런 처리를 하지 않은 신선한 소 심낭에 비해 유의하게 낮은 DNA 정량값을 보였으며 ($p=0.034$), 따라서 SDS를 이용한 무세포화가 효과적으로 이루어졌다고 할 수 있다.

10) 알파-갈 항원결정인자 염색(Fig. 3)

신선한 심낭편에 비해 SDS 처리를 한 군과 SLS 처리를 한 군 모두에서 알파-갈 염색 정도가 뚜렷하게 감소하였다. 두 군 모두에서 조직의 표면보다는 내부에서 염색 정도가 강했는데, 이는 알파-갈락토시다아제 효소와 접하는 조직 표면에서 알파-갈 항원결정인자의 분해가 더 많이 이루어졌기 때문으로 생각된다. SDS 처리를 한 군과 SLS

Table 7. Permeability (a) and Compliance (b) of variously treated bovine pericardium

(a)	SDS+GA	SDS+EDC+GA	SDS+EDC	SLS+GA	SLS+EDC+GA	SLS+EDC
N	5	5	5	5	5	5
Permeability (mL/hr · cm ²)	18.88±10.31	20.81±14.49	35.31±22.77	25.48±6.03	46.75±14.18	61.30±32.52
(b)	SDS+GA	SDS+EDC+GA	SDS+EDC	SLS+GA	SLS+EDC+GA	SLS+EDC
N	5	5	5	5	5	5
Compliance (μL/mmHg · cm ²)	11.90±4.94	18.05±13.72	21.28±17.72	12.42±3.29	20.27±11.23	20.25±5.47

SDS+GA=A group treated with SDS, and then fixed with GA; SDS+EDC+GA=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS and GA; SDS+EDC=A group treated with SDS, and then fixed with EDC/NHS; SLS+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with GA; SLS+EDC+GA=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS and GA; SLS+EDC=A group treated with N-lauroyl sarcosinate, and then fixed with EDC/NHS.

처리를 한 군 간의 염색 정도의 차이는 뚜렷하지 않았다.

11) 투과도 검사 및 유순도 검사

투과도 검사(Table 7a)에서, 같은 무세포화 처리를 한 군들 간의 고정 방법에 따른 유의한 차이는 없었으며, 같은 고정 방법으로 고정한 군들 간의 무세포화 방법에 따른 유의한 차이 역시 없었다. 무세포화 방법에 관계 없이 GA 고정군에서 가장 투과도가 낮았으며, EDC/NHS 고정군에서 투과도가 가장 높았고, EDC/NHS와 GA의 이중 고정군은 중간 정도의 투과도를 보였다. 유순도 검사(Table 7b)에서, 각 군 간의 유의한 차이는 없는 것으로 분석되었으나, 일반적으로 EDC/NHS 고정군에 비해 GA 고정군에서 유순도 값이 낮은 경향을 보였다.

고 찰

본 연구진들에 의해, 심장혈관계 이중조직의 개발과 향후 인체에 사용하기 위해 연구하고 실험된 조직 보존의 최적의 방법의 하나로써 SDS와 SLS를 이용하여 우심낭을 각각 무세포화하고, 알파-갈락토시다아제를 처리하여 이중항원을 제거한 후, GA와 EDC/NHS를 이용한 이중 고정의 유용성을 이 연구를 통해 검증하고자 하였다.

이중 조직의 세포와 세포 잔여물을 제거하는 것은 환자의 면역 반응을 최소화시킬 뿐 아니라[5], 무세포화를 함으로써 조직 지지체(scaffold)에 체내 혹은 체외에서 가능한 한 환자의 세포가 자라게 함을 기대함으로써 이 세포들로 하여금 지속적으로 세포 기질을 만들게 하여 그 내구성을 연장할 수 있는 효과도 있다. 따라서 무세포화를

통해서 면역반응을 최소화할 수 있도록 세포 성분을 완전히 제거하면서 조직의 물리적 성질을 유지하고 재생포화에 적합한 세포외 기질을 보존할 필요가 있다[1,3,6]. 또한, 면역반응을 유도하는 동물의 대표적인 이중항원(xenoantigen)인 알파-갈 항원결정인자(α -Gal epitope)를 제거하기 위해서 알파-갈락토시다아제라는 효소를 이용하여 세포표면과 기질 등에 존재하는 알파-갈 항원결정인자를 제거하는 방법이 있다[7,8]. 본 연구에서는 소심낭에 대해 각각 SDS와 SLS를 이용한 최적의 무세포화 및 알파-갈락토시다아제 처리를 시행한 후, 조직 고정을 시행하였다.

이중조직의 임상적 이용에 있어서 무세포화 과정이 중요하지만, 무세포화만으로는 모든 항원을 제거할 수 없으며, 실제로도 단백질 전기영동을 통해 확인해보면, 200여 가지의 서로 다른 항원들이 콜라젠 구조에 존재함을 알 수 있다[9]. 따라서 이중조직의 항원성과 면역원성을 감소시키기 위해서는 조직의 고정 과정이 필요하다.

조직판막의 고정을 위해 통상적으로 사용되는 GA는 단백질에 존재하는 lysine residue의 아미노기와 반응함으로써, 콜라젠과 같은 단백질 사슬 간의 교차결합을 유도하여 효소나 다른 화학 물질에 대해 조직을 안정화시키며, 한편으로는 이중 세포의 활성을 억제하고 단백질의 변성을 일으켜 면역원성도 감소시키는 것으로 알려져 있다[10]. 하지만, 교차결합 후 남게 되는 알데하이드기가 체내에서 산화를 거치며 산을 형성하며 이러한 산이 혈장 내 칼슘의 침착에 관여하여 이식판막 석회화의 중요한 요인이 될 수 있다[11,12]. 따라서 자유 알데하이드기를 제거하기 위해 아미노산을 이용한 항독소화(detoxification)처리를 시행하여, 아미노산에 존재하는 아미노기(amino group)가

GA 고정 후 조직 내에 남아있는 자유 알데하이드기와 결합함으로써 석회화를 방지할 수 있다[13,14]. 또한, 세포막에 다량으로 존재하는 인지질(phospholipids)이 석회화의 재료로서 중요한 역할을 하며[15], elastin이 조직의 석회화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[16]. 이중이식 보철편의 고정 처리시 short chain alcohol인 에탄올 및 long chain alcohol인 옥탄올(octanol)과 같은 용매의 첨가는 칼슘과 결합하는 근원이 되는 조직의 인지질 성분을 감소시키고 교원섬유, 콜라겐(collagen)의 크기와 수를 감소시켜 조직의 석회화 성향을 감소시키는 것으로 알려져 있다[17]. Short chain alcohol은 고농도에서 알데하이드기에 붙을 수 있는 인지질을 제거하고 조직 콜라겐의 입체형태를 변화시키고, short chain alcohol과 long chain alcohol을 같이 사용할 경우 long chain alcohol은 구조적으로 인지질과 유사하므로 더 효과적으로 인지질을 제거하는 것으로 알려져 있다[17]. GA 고정시 알코올계 용매의 첨가는 탄력섬유(elastin)의 교차결합에 도움이 되는 것으로 알려져 있다[18]. 따라서 본 연구에서는 GA의 독성을 보완하기 위해 여러 가지 방법 중 그 동안 본 연구실에서 실험되었던 75% ethanol과 5% octanol의 유기용매를 첨가하여 사용하고, 글라이신을 이용한 항독성화 처리를 시행하였다.

카보다이아미이드는 단백질 내의 glutamic residue 혹은 aspartic acid residue의 카르복실기와 반응하여 O-acylisourea 기를 만들어내며, 여기에 lysine residue 혹은 hydroxyline residue의 자유 아미노기가 nucleophilic attack을 함으로써 교차결합이 생성된다[19]. 또한, EDC에 NHS를 추가하면 교차결합을 증가시키는데 아주 효과적인 것으로 보고되고 있다[20]. Vasudev 등[21]은 소의 심낭을 탈세포화한 뒤 GA에 고정하고 이를 다시 카보다이아미이드를 이용, 이중으로 교차결합시킨 뒤 헤파린을 결합시킨 바 있다. Zilla 등[22]은 카보다이아미이드가 단독적으로 사용했을 때는 효과가 없을지라도, GA에 고정한 대동맥벽에 amino-oleic acid의 항석회화 효과를 높인다고 하였다[23]. 본 연구에서는 GA의 독성을 더 줄이기 위해서 통상적인 사용 농도보다 비교적 저농도의 GA 고정을 시행하고, 추가적으로 조직의 고정을 안정하게 하기 위해서 EDC/NHS로 이중고정을 시행하여 이중 고정의 안정성 및 독성 등을 평가하였다.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다. 조직의 최적의 보존 및 고정하는데 있어서 우선 무세포화 과정의 방법으로 SDS와 SLS를 이용하여 각각 무세포화하고, 알파-갈락토시다아제를 처리하여 이중항원을 제거한 소심낭에

서, GA 단독 고정군은 EDC/NHS 고정군에 비해 물리적인 성장과 열안정성에서 더 우수하였고, EDC/NHS와 GA의 이중 고정군은 EDC/NHS 고정군에 비해 물리적인 성장과 열안정성에서 더 우수하였으며, GA 단독 고정군과 비교해서 열안정성에서 더 우수하였다. 장력 검사에서, EDC/NHS와 GA의 이중 고정은 GA 고정에 비해 인장강도를 높이는 것으로 나타났다. 투과도와 유순도 검사에서, GA 고정군이 가장 낮은 투과도와 유순도를 보였으며, EDC/NHS와 GA의 이중 고정군은 GA 단독 고정군에 비해 투과도와 유순도 값이 약간 증가하였다. 프로나아제 저항 시험과 Pronase-Ninhydrin 시험에서 탈세포화 방법에 관계없이 GA 단독 고정군과 GA와 EDC/NHS의 이중 고정군이 EDC/NHS로 고정한 군에 비해서 crosslinking이 강한 것으로 관찰되었다. 또한, 평활근 세포를 이용한 세포 독성 실험에서, GA 단독 고정군에서 가장 높은 세포 독성을 보였고, EDC로 고정한 군이 가장 적은 세포 독성을 보였으며, GA와 EDC/NHS의 이중 고정군에서는 GA 단독 고정군에 비해 세포 독성이 감소하였다. 따라서 본 연구 결과에서는 탈세포화 및 알파-갈락토시다아제를 처리한 우심낭에 GA와 EDC/NHS의 이중고정을 통해서, GA고정의 독성을 줄이면서 효과적인 crosslinking을 시행할 수 있음을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 새로운 조직 보존 및 고정 방법으로 SDS와 SLS를 이용하여 각각 탈세포화하고, 알파-갈락토시다아제를 처리하여 이중항원을 제거한 우심낭에서, GA와 EDC/NHS의 이중고정을 통해서, GA고정의 독성을 줄이면서 효과적인 crosslinking을 시행할 수 있음을 확인하였다.

향후 생체내 시험을 통해서 탈세포화 및 알파-갈락토시다아제를 처리한 소심낭에 EDC/NHS와 GA를 이용한 이중고정이 석회화의 감소와 장기 내구성에 어떠한 영향을 미치는지 추가적인 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Park CS, Kim YJ, Sung SC, et al. Study on effective decellularization technique for xenograft cardiac valve, arterial wall and pericardium; optimization of decellularization. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:550-62.
2. Chang HW, Kim YJ, Kim SH, et al. The dynamic and histo-

- logic changes of variously fixed bovine pericardiums specimens after mechanical fatigue stimuli. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:148-56.
3. Sung SC, Kim YJ, Choi SY, Park JE, Kim KH, Kim WH. A study on an effective decellularization technique for a xenograft cardiac valve: the effect of osmotic treatment with hypotonic solution. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:679-86.
 4. Konakci K, Bohle B, Blumer R, et al. α -Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. Eur J Clin Invest 2005;35:17-23.
 5. Hui X, Hua W, Wenqi Z, et al. A porcine-derived acellular dermal scaffold that supports soft tissue regeneration: Removal of terminal galactose- α -(1,3)-galactose and retention of matrix structure. Tissue Engineering: Part A 2009;15:1807-19.
 6. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, Deruiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. J Thorac Cardiovasc Surg 2003;126:2003-10.
 7. LaVecchio JA, Dunne AD, Edge ASB. Enzymatic removal of alphagalactosyl epitopes from porcine endothelial cells diminishes the cytotoxic effect of natural antibodies. Transplantation 1995;60:841-7.
 8. Park SS, Kim WH, Kim KH, et al. Removal of α -gal epitopes in aortic valve and pericardium of pig using green coffee bean α -galactosidase. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:12-24.
 9. Somers P, De Somer F, Cornelissen M, et al. Genipin blues: an alternative non-toxic crosslinker for heart valves? J Heart Valve Dis 2008;17:682-8.
 10. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. Biomaterials 2000;21:2215-31.
 11. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Am J Pathol 1987;127:122-30.
 12. Grabenwöger M, Sider J, Fitzal F, et al. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. Ann Thorac Surg 1996;62:772-7.
 13. Jorge-Herrero E, Fernández P, Escudero C, García-Páez JM, Castillo-Olivares JL. Calcification of pericardial tissue pretreated with different amino acids. Biomaterials 1996;17:571-5.
 14. Weissenstein C, Human P, Bezuidenhout D, Zilla P. Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model. J Heart Valve Dis 2000;9:230-40.
 15. Schoen FJ. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. J Heart Valve Dis 1999;8:350-8.
 16. Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, Vyavahare NR. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. J Biomed Mater Res 2003;66A:93-102.
 17. Pathak CP, Adams AK, Simpson T, Phillips RE, Moore MA. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential. J Biomed Mater Res 2004;69:140-4.
 18. Gratzner PF, Pereira GA, Lee JM. Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials. J Biomed Mater Res 1996;31:533-43.
 19. Sung HW, Chang WH, Ma CY, et al. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. J Biomed Mater Res 2003;64A:427-38.
 20. Olde Damink LH, Dijkstra PJ, Van Luyn MJ, Van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials 1996;17:765-73.
 21. Vasudev SC, Moses LR, Sharma CP. Covalently bonded heparin to alter the pericardial calcification. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2000;28:241-53.
 22. Zilla P, Bezuidenhout D, Torrianni M, Hendriks M, Human P. Diamine-extended glutaraldehyde- and carbodiimide cross-links act synergistically in mitigating bioprosthetic aortic wall calcification. J Heart Valve Dis 2005;14:538-45.
 23. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Carbodiimide treatment dramatically potentiates the anticalcific effect of alpha-amino oleic acid on glutaraldehyde-fixed aortic wall tissue. Ann Thorac Surg 2005;79:905-10.

=국문 초록=

배경: 이중조직판막이나 조직이 임상적으로 이용되기 위해서는 조직의 장기간의 내구성이 동반된 효과적인 보존과 적절한 고정과정이 필요하다. 본 연구에서는 소심낭을 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 N-lauroylsarcosinate를 이용하여 무세포화하고, 알파-갈락토시다아제를 처리한 뒤, 이를 다양한 방법으로 고정함으로써 조직손상과 면역반응을 최소화할 수 있는 효과적인 우심낭 보존 방법에 대해 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** 우심낭으로부터 이중 이식 보철편을 채취한 뒤 SDS와 N-lauroylsarcosinate를 이용하여 무세포화 하였고, 알파-갈락토시다아제를 처리하였다. 이 두 가지 군에 대하여 각기 다른 조건 즉 glutaraldehyde (GA), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinamide (NHS)의 처리를 달리하여 고정하였다. 이후 각 군들의 물리적 성상, 인장강도, 열 안정성 검사, 세포독성 검사, 프로나아제 저항 시험과 Pronase-Ninhydrin 시험, 투과도와 유순도 검사, purpald 검사 등을 시행하였으며, H&E 염색과 DNA 정량, 알파-갈 항원결정인자 염색 등도 함께 시행하였다. **결과:** GA 단독 고정군은 EDC/NHS 고정군에 비해 물리적인 성상과 열안정성에서 더 우수하였고, EDC/NHS와 GA의 이중 고정군은 EDC/NHS 고정군에 비해 물리적인 성상과 열안정성에서 더 우수하였으며, GA단독 고정군과 비교해서 열안정성에서 더 우수하였다. 프로나아제 저항 시험과 Pronase-Ninhydrin 시험을 통해 알아본 crosslinking 정도는, GA 고정군과 EDC/NHS의 이중 고정군이 EDC/NHS 고정군에 비해 높은 것으로 관찰되었다. EDC/NHS와 GA의 이중 고정군은 GA 고정군에 비해 투과도와 유순도가 다소 증가하였으나, GA 고정군에 비해 인장강도가 높고 세포 독성이 감소하는 것으로 관찰되었다. **결론:** GA와 EDC/NHS의 이중고정을 통해서, GA단독 고정의 독성을 줄이면서 효과적인 crosslinking을 시행할 수 있음을 확인하였다. 향후 생체내 시험을 통해서 GA와 EDC/NHS의 이중고정이 석회화의 감소와 조직부전에 어떠한 영향을 미치는지 추가적인 연구와 검증이 필요하다.

- 중심 단어 :** 1. 조직공학
2. 글루타르알데하이드
3. 심외막
4. 이중이식