

소 심장의 무세포화에서 트립신이 이식편의 물리-역학적 및 조직학적 변화에 미치는 영향

성용원* · 김용진* · 김수환** · 민병주* · 이영옥* · 임흥국*

Effect of Trypsin on Physico-dynamic and Histological Changes after Decellularization of Bovine Pericardium

Yong Won Seong, M.D.*, Yong-Jin Kim, M.D.*, Soo Hwan Kim**,
Byoung-Ju Min, M.D.*, Young-Ok Lee, M.D.*, Hong-Gook Lim, M.D.*

Background: Various decellularization methods have been studied in order to develop tissue graft which is less immunogenic and more durable. This study was performed to investigate the physico-dynamic and histological effect of trypsin pretreatment on decellularization protocols. **Material and Method:** Two groups of bovine pericardium specimen each underwent decellularization process based on SDS and Triton X-100 or N-lauroylsarcosinate and Triton X-100. Two more groups additionally underwent pretreatment with 0.1% Trypsin/0.1% EDTA. After decellularization process, mechanical tensile strength was tested, then biomechanical test of permeability and compliance was tested before and after fatigue test. Light microscopy and electron microscopy was performed to observe histological findings. **Result:** There was no difference in mechanical tensile strength between groups, but permeability and compliance was decreased in trypsin pretreated groups. Light microscopic and electron microscopic findings revealed damage of the extracellular matrix in trypsin pretreated groups and in groups which underwent the fatigue test also. **Conclusion:** Trypsin pretreatment in decellularizing process of bovine pericardium damages extracellular matrix and increases permeability and compliance of the bovine pericardium, but did not decrease tensile strength. Further studies are needed to use enzymatic treatments in decellularization protocols.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:565-575)

Key words: 1. Biomedical engineering
2. Bioprosthesis
3. Pericardium

서 론

현재 단순 또는 복잡 심기형이나 심장 판막, 혈관 수술

의 방법이 다양하게 발전하고 있으며, 심장이나 혈관, 판막을 성형, 재건하는 데 있어서 여러 종류의 이식편이 요구되고 있고 현재에도 지속적으로 세계적으로 다양한 재

*서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital

**서울대학교병원 임상의학 연구소, 바이오 이종장기 개발 사업단

Seoul National University Hospital Clinical Research Institute, Xenotransplantation Research Center

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

논문접수일 : 2010년 8월 16일, 논문수정일 : 2010년 11월 20일, 심사통과일 : 2010년 11월 22일

책임저자 : 김용진 (110-744) 서울시 중로구 연건동 28번지, 서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3638, (Fax) 02-02-745-5209, 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.

료들로 구성된 이식편들이 각 장기와 조직에 최적화되게끔 연구 개발, 이용되고 있다. 본 흉부외과학교실에서도 이종 조직 이식편에 관한 연구와 개발을 지속하고 있으며, 이에 대한 연구결과를 발표하고 있다[1-7]. 현재 사용되고 있는 대표적인 이종 이식편들은, 이식 후 시간이 지남에 따라 면역반응이나 생물·화학적, 기계적 기전으로 인해 석회화되거나 파열되는 등 구조적인 변형을 일으켜 차후 재이식술 등을 요하게 하고 있다[8]. 이런 이유로, 보다 더 장시간동안 사용할 수 있으며 기계적-구조적 변형이 적은 이종 이식편을 개발하는 것을 목적으로 하여, 이종이식편을 이식한 후의 내구성 유지, 면역이나 물리·화학적 반응에 의한 석회화를 억제하기 위한 하나의 방법으로, 이종이식편에 대한 무세포화(decellularization)에 대해 연구가 진행되어 왔다. 무세포화의 목적은 세포외 기질(extracellular matrix)의 본래 구조와 내구성은 유지하면서 지질막, 세포내 물질, 그리고 이와 연관된 항체 등의 면역 반응을 일으키는 주 요소들을 제거함에 있다. 생체 조직 내에서 세포를 제거함은 용해 단백질의 변화를 가져옴으로써 조직의 물리적 특성이 최소한 어느 정도 달라질 것은 자명하여, 이러한 무세포화된 조직의 점성과 탄성의 성질, 적당한 강도검사, 굴곡 성능, 성장을 위한 작용기전, 기질의 퇴화와 재생성, 단백질 재생산 조절 등의 세포 외 기질(extracellular matrix, scaffolds)의 특성들을 최대한 유지하도록 하는 것이다[9,10].

조직의 무세포화는 여러 가지 방법들로 연구되고 있다. 지금까지 흔히 쓰이는 무세포화 과정들은 물리적, 화학적, 효소제, 삼투압충격 등의 사용 방법으로 크게 구별될 수 있다. 그러나 어느 하나 단독으로 무세포화에 사용되기보다는 여러 방법들을 겸용하거나 혼합하여 프로토콜화함으로써 시행되고 있다. 그러한 과정 중 대부분 화학적 세정제(detergents)가 큰 비중을 차지하고 있으며, 비이온성 세정제로 Triton X-100이 흔히 쓰이고, 이온성 세정제로는 sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium deoxycholate 등이 있으며, 양성이온성(zwitterions)은 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), sulfobetaine, tributyl phosphate 등이 사용되고 있다. 생물학적 효소제로는 트립신(trypsin)이 흔히 쓰이고, 핵산을 분해하기 위한 endonuclease나 exonuclease 등이 사용되고 있다. 그러나, 소화 효소인 trypsin은 사용 과정 중 세포외 기질(extracellular matrix)의 손상이 많은 것으로 보고되고 있다[10]. 또한 물리적 방법도 대부분 무세포화에 다소 이용되고 있으며, 냉동요법, 미세 기계적 충격이나 진동, 압력, 반복운

동, 회전, 파장, 전기충격방법 등을 가함으로써 세포 용해를 유도하고, 특히 세포성분이 화학적 세정제와 반응하는 것을 증대시키기를 기대하여 위에 열거한 여러 방법들이 혼용되어 함께 사용되고 있는 실정이다[9,10].

본 연구에서는 이종 소 심낭편을 사용하여 무세포화(decellularization)를 진행할 때 SDS (Sodium dodecylsulfate)와 Triton X-100, 또는 N-lauroylsarcosinate과 Triton X-100의 세정제(detergent)를 조합하여 사용하였을 경우, 그리고 강력한 소화효소인 트립신(trypsin)으로 먼저 처치를 한 후 세정제(detergent)로 무세포화를 진행하였을 경우 자체적으로 개발한 장치를 통한 기계적 장력검사(mechanical tensile strength test)를 시행하여 장력을 측정하고 피로도 검사(fatigue test)를 시행하여 피로도 검사 전·후의 생체-물리역학적(biomechanical) 변화를 측정하고 조직학적인 변화를 현미경으로 관찰하여 트립신 처치와 세정제의 종류가 이식편의 물리적, 조직학적 구조에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1) 이종 이식편의 채취

이종 소 심낭편 및 모든 이종 조직편은 도살장에서 수의사의 협조 하에 건강한 소를 도살한 후에 즉시 심낭을 무균적으로 적출하여 4°C의 phosphate buffered solution (PBS, 0.1 M, pH 7.4)에 넣어 아이스박스에 보관한 채로 실험에 사용하였다.

2) 무세포화(decellularization)

소 심낭편을 차가운 생리식염수로 세척한 후 0.1% PAA (peracetic acid)와 4% 에탄올(ethanol)이 섞인 용액에 1시간 동안 담가 둔 후 30분간 증류수로 철저히 세척하는 과정을 거친 후, 무세포화 과정 중 트립신 전처리 과정이 추가된 군을 1과 2군으로 하였고, 트립신 처치를 하지 않은 군을 3과 4군으로 하였으며 각 무세포화 과정은 다음과 같다. 각각의 세정제로 무세포화를 거친 후 모든 이식편은 등장성용액에 4°C에서 30분 세척, 1% Triton X-100이 혼합된 등장성용액에 4°C에서 18시간, 등장성용액에 4°C에서 30분 세척, 고장성용액(II)에 4°C에서 6시간, PBS 용액에 4°C에서 3시간 세척하는 과정을 거쳤다.

(1) 1군: 0.1% 트립신(trypsin)과 0.1% EDTA가 혼합된 PBS (phosphate buffered solution) 용액에 상온에서 3시간 → 고장성용액(IV)에 4°C에서 3시간 → 저장성용액에서

4°C에서 12시간 → 0.3% SDS (sodium dodecylsulfate)가 혼합된 저장성용액에 4°C에서 24시간

(2) 2군: 0.1% 트립신(trypsin)과 0.1% EDTA가 혼합된 PBS (phosphate buffered solution) 용액에 상온에서 3시간 → 고장성용액(IV)에 4°C에서 3시간 → 저장성용액에서 4°C에서 12시간 → 1% N-lauroylsarcosinate가 혼합된 저장성용액에 4°C에서 24시간

(3) 3군: 고장성용액(IV)에 4°C에서 3시간 → 저장성용액에서 4°C에서 12시간 → 0.3% SDS (sodium dodecylsulfate)가 혼합된 저장성용액에 4°C에서 24시간

(4) 4군: 고장성용액(IV)에 4°C에서 3시간 → 저장성용액에서 4°C에서 12시간 → 1% N-lauroylsarcosinate가 혼합된 저장성용액에 4°C에서 24시간

위의 전 과정에서 보조 물리적 방법으로 자체 고안한 진탕기(vibrator)를 이용하여 분당 300회 이상 회전 진동하였다.

3) 글루타르알데히드 고정(glutaraldehyde fixation) 및 보관(storage)

고정은 0.6% 글루타르알데히드(glutaraldehyde, GA) 용액에 상온에서 2일 → 0.5% GA용액과 75% 에탄올, 그리고 5% 옥탄올(octanol)이 혼합된 용액에 42°C에서 2일 유지한 후 0.25% GA 용액에 상온에서 1주일간 보관하였으며, 실험 전 등장액에 충분한 세척을 시행하였다.

4) 무세포화시 사용한 완충용액: 조성은 다음과 같다.

① 저장성 완충용액(증류수 1,000 mL; Tris 10 mmol/L; EDTA 0.05%; aprotinin 10 KIU/mL; Neomycin trisulfate 50 mg; pH 8.0)

② 등장성 완충용액(증류수 1,000 mL; Tris 50 mmol/L; NaCl 0.15 mol/L; EDTA 0.05%; aprotinin 10 KIU/mL; Neomycin trisulfate 50 mg; pH 8.0)

③ 고장성 완충용액 II (증류수 1,000 mL; Tris 200 mmol/L; NaCl 0.6 mol/L; pH 8.0)

④ 고장성 완충용액 IV (증류수 1,000 mL; Tris 800 mmol/L; NaCl 2.4 mol/L)

5) 역학적 피로도 검사(dynamic fatigue test)

직경 25 mm인 원 모양의 심낭편에 박동성의 압력을 반복해서 가할 수 있는 장치를 고안하였고, 이를 이용하여 각 처리과정을 마친 심낭편에 0.9% 생리식염수에 항생제 용액(antibiotic antimycotic solution (100×) stabilized, Sigma

를 희석하여 1 mL에 penicillin G 100 units, streptomycin sulfate 100 μg, amphotericin B 250 ng을 포함하도록 첨가를 첨가한 것을 이용, 내부압력은 평균 80 mmHg로 하여 240 rpm (4 Hz)에서 45일간 실험하였다. 정상인의 심박동수로 가정하여 기준이 될 심박동수를 60으로 가정하여, 60 rpm의 4배인 240 rpm으로 45일간 시행하여 6개월동안 관막이 움직인 결과와 같은 상태를 예상해 보았다.

6) 기계적 장력 검사(mechanical tensile strength test)

피로도 검사를 시행하지 않은 5×50 mm 크기의 심낭편에서 양 끝과 가운데 25 mm지점에서 심낭의 두께를 측정하고(Quick-Mini, PK-1012SU, MITUTOYO, Japan) 세 값의 평균값을 구하였다. 장력을 측정하는 데에는 스탠드(푸쉬풀 전동 스탠드, K-ML-1000N, M-TECH, Korea)와 계측기(디지털 포스 게이지, DS2-50N, IMADA, Japan)를 이용하였고, 심낭편이 파열되기까지의 장력(tensile stress at break point)을 MPa (N/mm²)로 나타내었다.

7) 피로도 검사(fatigue test) 전후의 검사

다음의 검사들을 피로도 검사 시행 전의 심낭편과 피로도 검사 시행 후의 심낭편에 각각 실험하여 피로도 검사 시행 후의 변화를 알아보려고 하였다.

(1) 투과도 검사(permeability test): 한 시간 동안 생리식염수로 심낭편의 한쪽에서 압력을 가한 후, 투과된 생리식염수의 양을 측정하여, 투과도로 정하였으며, 이를 mL/h×cm²로 표시하였다.

(2) 유순도 검사(compliance test): 각 처리과정을 마친 심낭편에 생리식염수를 이용하여 100, 120, 140, 160, 180, 200 mmHg의 압력을 한쪽 면에 가한 후 심낭편이 늘어남으로 인해 변형된 부피를 측정하였다. 100 mmHg에서 200 mmHg까지 압력이 변하였을 때 변화한 심낭편의 쏠림으로 늘어난 부피를 유순도로 정하였으며, 이를 일반적으로 μL/mmHg로 표시하였다.

(3) 조직학적 변화의 관찰(광학현미경 및 전자현미경): 피로도 검사 시행 전과 후의 조직학적인 소견을 hematoxylin-eosin 염색(H-E 염색) 후 광학현미경으로 관찰하였고, 전자현미경으로 조직학적인 변화를 관찰하였다.

8) 각 군 사이의 비교

SPSS 12.0 K for Windows를 사용, 기술통계를 시행하였고, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney 검정으로 트립신 처리를 한 무세포화군과 하지 않은 무세포화군을 서로 비교하였

Table 1. Tensile strength test results of variously decellularized bovine pericardium. Mean values of the samples are shown

Groups (bovine pericardium)	Sample size	Thickness (mm)	Tensile stress at break (MPa)	Strain at break (%)
0.1% trypsin + 0.3% SDS	n=9	0.38±0.08 (0.28~0.54)	10.78±2.73 (6.94~14.73)	28.75±7.56 (20.00~45.00)
0.1% trypsin + 1% N-lauroylsarcosinate	n=9	0.27±0.04 (0.21~0.36)	12.21±1.76 (8.61~14.26)	42.22±11.51 (28.33~63.33)
0.3% SDS	n=9	0.50±0.09 (0.36~0.69)	8.59±3.90 (3.44~14.24)	36.39±4.25 (28.33~41.67)
1% N-lauroylsarcosinate	n=9	0.45±0.06 (0.33~0.60)	10.29±2.96 (7.54~15.87)	32.50±6.34 (23.33~41.67)

Table 2. Permeability test before fatigue test

Groups (Bovine Pericardium)	Sample	10 min	1 hour	Mean	SD
0.1% trypsin + 0.3% SDS	1	8.84 mL	16.88 mL	29.22 mL	28.32
	2	4.50 mL	8.59 mL		
	3	10.66 mL	20.36 mL		
	4	37.20 mL	71.05 mL		
0.1% trypsin + 1% N-lauroylsarcosinate	1	17.74 mL	33.88 mL	37.25 mL	14.61
	2	15.75 mL	30.08 mL		
	3	13.80 mL	26.36 mL		
	4	30.72 mL	58.67 mL		
0.3% SDS	1	0.34 mL	0.64 mL	0.73 mL	0.11
	2	0.35 mL	0.66 mL		
	3	0.47 mL	0.89 mL		
	4	0.38 mL	0.72 mL		
1% N-lauroylsarcosinate	1	0.64 mL	1.21 mL	0.85 mL	0.25
	2	0.33 mL	0.62 mL		
	3	0.42 mL	0.80 mL		
	4	0.41 mL	0.77 mL		

고, Wilcoxon signed rank test를 이용하여 피로도검사 전과 후의 각각의 군을 비교하였다

결 과

1) 기계적 장력 검사(mechanical tensile strength test)

장력 검사에서는 각 군마다 샘플은 9개씩 총 36개였다 (Table 1). 같은 세정제를 이용한 군끼리 짝지어 트립신 처치를 한 1군과 트립신 처치를 하지 않은 3군을 비교하고, 마찬가지로 2군, 4군을 비교해 보았을 때, 트립신 처치군과 비처치군에서 장력의 차이는 없었다(p-value 0.26/0.13). SDS를 사용한 군과 N-lauroylsarcosinate를 사용한 군끼리 짝지어 1군-2군, 3군-4군으로 비교했을 때에도 장력에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value 0.26/0.55).

2) 역학적 피로도 검사(dynamic fatigue test)

피로도 검사 전의 투과도를 먼저 측정하였고, 각 군마다 샘플의 수는 4개씩 총 16개였다(Table 2). 1군과 3군, 2군과 4군을 짝을 이루어 비교해 봤을 때 통계적으로 유의한 차이를 보였으며(p-value 0.02/0.02), 트립신 처치를 한 군에서 투과도가 높게 나타났다. 이후 피로도 검사 후의 투과도를 측정하였고(Table 3), 여기에서도 1군과 3군, 2군과 4군을 비교해 보았을 때 트립신 처치를 한 군에서 투과도가 높게 나타났다(p-value 0.02/0.02). 피로도 검사 전·후의 투과도를 같은 군끼리 비교하였고, 오히려 피로도 검사를 시행한 후의 투과도는 피로도 검사를 시행하기 전의 투과도와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(p-value 0.144/0.456/0.068/0.068).

피로도 검사 전의 유순도를 먼저 측정하였고, 각 군마다 샘플의 수는 4개씩 총 16개였다(Table 4). 투과도 비교와 같은 방식으로 짝지어 비교하였을 때 트립신 처치를

Table 3. Permeability test after fatigue test

Groups (Bovine Pericardium)	Sample	10 min	1 hour	Mean	SD
0.1% trypsin+0.3% SDS	1	13.82 mL	26.39 mL	41.58 mL	16.56
	2	24.24 mL	46.29 mL		
	3	16.11 mL	30.77 mL		
	4	32.92 mL	62.87 mL		
0.1% trypsin+1% N-lauroylsarcosinate	1	12.78 mL	24.41 mL	63.14 mL	47.99
	2	11.56 mL	22.08 mL		
	3	45.36 mL	86.63 mL		
	4	62.54 mL	119.44 mL		
0.3% SDS	1	0.94 mL	1.80 mL	4.56 mL	3.16
	2	4.60 mL	8.79 mL		
	3	2.69 mL	5.14 mL		
	4	1.33 mL	2.54 mL		
1% N-lauroylsarcosinate	1	5.08 mL	9.70 mL	8.51 mL	4.16
	2	5.12 mL	9.78 mL		
	3	1.30 mL	2.48 mL		
	4	6.32 mL	12.07 mL		

Table 4. Compliance test before fatigue test

Groups (Bovine Pericardium)	Sample	0 mmHg	100 mmHg	120 mmHg	140 mmHg	160 mmHg	180 mmHg	200 mmHg	Note
0.1% trypsin+0.3% SDS	1	0.00 mL	0.15 mL	0.03 mL	0.05 mL	0.06 mL	0.06 mL	0.06 mL	Mild leak
	2	0.00 mL	0.15 mL	0.02 mL	0.03 mL	0.03 mL	0.04 mL	0.06 mL	Mild leak
	3	0.00 mL	0.20 mL	0.05 mL	0.06 mL	0.06 mL	0.05 mL	0.08 mL	Mild leak
	4	0.00 mL	0.20 mL	0.18 mL	0.16 mL	0.16 mL	0.15 mL	0.23 mL	Leak
	Mean	0.00 mL	0.18 mL	0.07 mL	0.08 mL	0.08 mL	0.08 mL	0.11 mL	
	SD	0.00	0.03	0.07	0.06	0.06	0.05	0.08	
0.1% trypsin+1% N-lauroylsarcosinate	1	0.00 mL	0.16 mL	0.09 mL	0.11 mL	0.12 mL	0.16 mL	0.15 mL	Leak
	2	0.00 mL	0.15 mL	0.12 mL	0.18 mL	0.20 mL	0.24 mL	0.41 mL	Leak
	3	0.00 mL	0.10 mL	0.07 mL	0.08 mL	0.12 mL	0.10 mL	0.15 mL	Leak
	4	0.00 mL	0.19 mL	0.10 mL	0.06 mL	0.05 mL	0.08 mL	0.07 mL	Leak
	Mean	0.00 mL	0.15 mL	0.10 mL	0.11 mL	0.12 mL	0.15 mL	0.20 mL	
	SD	0.00	0.04	0.02	0.05	0.06	0.07	0.15	
0.3% SDS	1	0.00 mL	0.28 mL	0.02 mL	0.01 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	
	2	0.00 mL	0.23 mL	0.02 mL	0.01 mL	0.02 mL	0.01 mL	0.02 mL	
	3	0.00 mL	0.20 mL	0.02 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.01 mL	0.02 mL	
	4	0.00 mL	0.27 mL	0.05 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.01 mL	
	Mean	0.00 mL	0.25 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	
	SD	0.00	0.04	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	
1% N-lauroylsarcosinate	1	0.00 mL	0.19 mL	0.07 mL	0.02 mL	0.03 mL	0.01 mL	0.03 mL	
	2	0.00 mL	0.21 mL	0.03 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.03 mL	0.03 mL	
	3	0.00 mL	0.19 mL	0.07 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.03 mL	
	4	0.00 mL	0.21 mL	0.02 mL					
	Mean	0.00 mL	0.20 mL	0.05 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.03 mL	
	SD	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	

Table 5. Compliance test before fatigue test

Groups (Bovine Pericardium)	Sample	0 mmHg	100 mmHg	120 mmHg	140 mmHg	160 mmHg	180 mmHg	200 mmHg	Note
0.1% trypsin + 0.3% SDS	1	0.00 mL	0.28 mL	0.10 mL	Leak				
	2	0.00 mL	0.18 mL	0.03 mL	0.06 mL	0.04 mL	0.05 mL	0.05 mL	Leak
	3	0.00 mL	0.16 mL	0.04 mL	0.04 mL	0.05 mL	0.06 mL	0.10 mL	Leak
	4	0.00 mL	0.18 mL	0.12 mL	0.13 mL	0.20 mL	0.15 mL	0.20 mL	Leak
	Mean	0.00 mL	0.20 mL	0.07 mL	0.08 mL	0.10 mL	0.09 mL	0.11 mL	
	SD	0.00	0.05	0.04	0.04	0.07	0.05	0.06	
0.1% trypsin + 1% N-lauroylsarcosinate	1	0.00 mL	0.23 mL	0.13 mL	0.13 mL	0.21 mL	0.15 mL	0.25 mL	Leak
	2	0.00 mL	0.18 mL	0.06 mL	0.06 mL	0.08 mL	0.10 mL	0.08 mL	Leak
	3	0.00 mL	0.25 mL	0.25 mL	0.20 mL	0.25 mL	0.25 mL	0.30 mL	Leak
	4	0.00 mL	0.20 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.10 mL	0.15 mL	0.15 mL	Leak
	Mean	0.00 mL	0.22 mL	0.12 mL	0.11 mL	0.16 mL	0.16 mL	0.20 mL	
	SD	0.00	0.03	0.09	0.07	0.08	0.06	0.10	
0.3% SDS	1	0.00 mL	0.16 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	
	2	0.00 mL	0.12 mL	0.04 mL	0.04 mL	0.04 mL	0.05 mL	0.05 mL	
	3	0.00 mL	0.25 mL	0.03 mL	0.03 mL	0.03 mL	0.03 mL	0.02 mL	
	4	0.00 mL	0.25 mL	0.02 mL	0.03 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.02 mL	
	Mean	0.00 mL	0.20 mL	0.03 mL					
	SD	0.00	0.07	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	
1% N-lauroylsarcosinate	1	0.00 mL	0.12 mL	0.02 mL	0.03 mL	0.05 mL	0.03 mL	0.04 mL	
	2	0.00 mL	0.10 mL	0.04 mL	0.03 mL	0.05 mL	0.04 mL	0.04 mL	
	3	0.00 mL	0.08 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.01 mL	0.02 mL	0.02 mL	
	4	0.00 mL	0.15 mL	0.05 mL	0.06 mL	0.07 mL	0.06 mL	0.06 mL	Mild leak
	Mean	0.00 mL	0.11 mL	0.03 mL	0.04 mL	0.05 mL	0.04 mL	0.04 mL	
	SD	0.00	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	

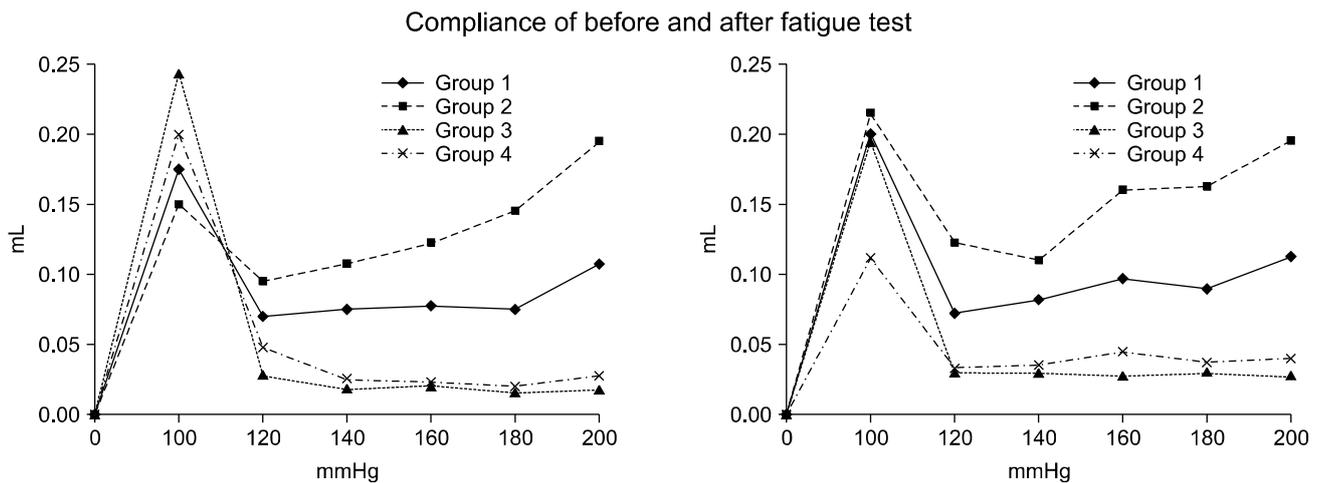


Fig. 1. Compliance test results presented as a graph. After fatigue test, curve change of group 1 and group 2 (which underwent trypsin pretreatment) is more evident.

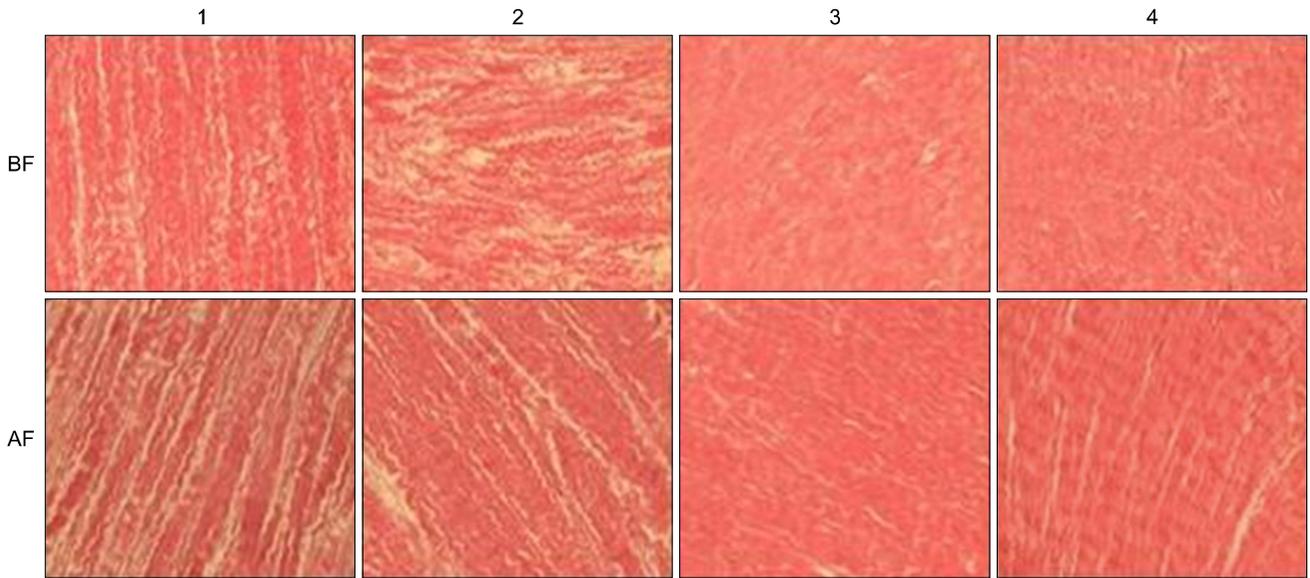


Fig. 2. H&E stain of each groups (1~4)(x100). BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

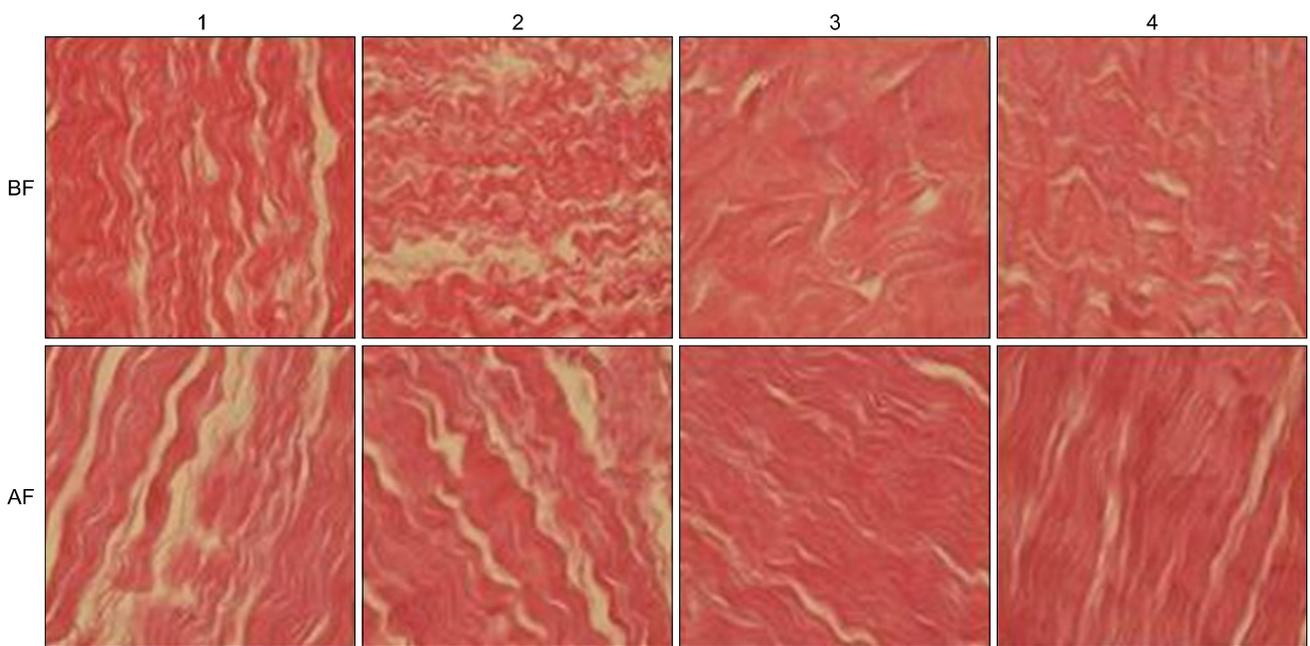


Fig. 3. H&E stain of each groups (1~4)(x400). BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

한 군에서 유순도가 높게 나타났으며(p-value 0.02/0.02), 피로도 검사 후에 시행한 유순도 검사(Table 5)에서도 트립신 처치를 한 군에서 유순도가 높은 것으로 나타났다(p-value 0.02/0.02). 그러나 피로도 검사 전과 후의 유순도를 서로 같은 군끼리 짝지어 비교해 보았을 때, 유순도는 의미있는 차이를 보이지 않았으나(p-value 0.71/0.46/0.85/

0.46) 여러 샘플에서 이식편을 통한 누수가 발생하였다. 또한 SDS 처리군과 N-lauroylsarcosinate 처리군을 1군과 2군, 3군과 4군으로 짝지어 피로도 검사 전과 후를 비교해 보았을 경우 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나, 적은 수의 샘플 수를 고려할 때 제시한 Table의 결과와 그림(Fig. 1)에서 보이듯이 저농도 SDS 세정제 처리군은 N-la-

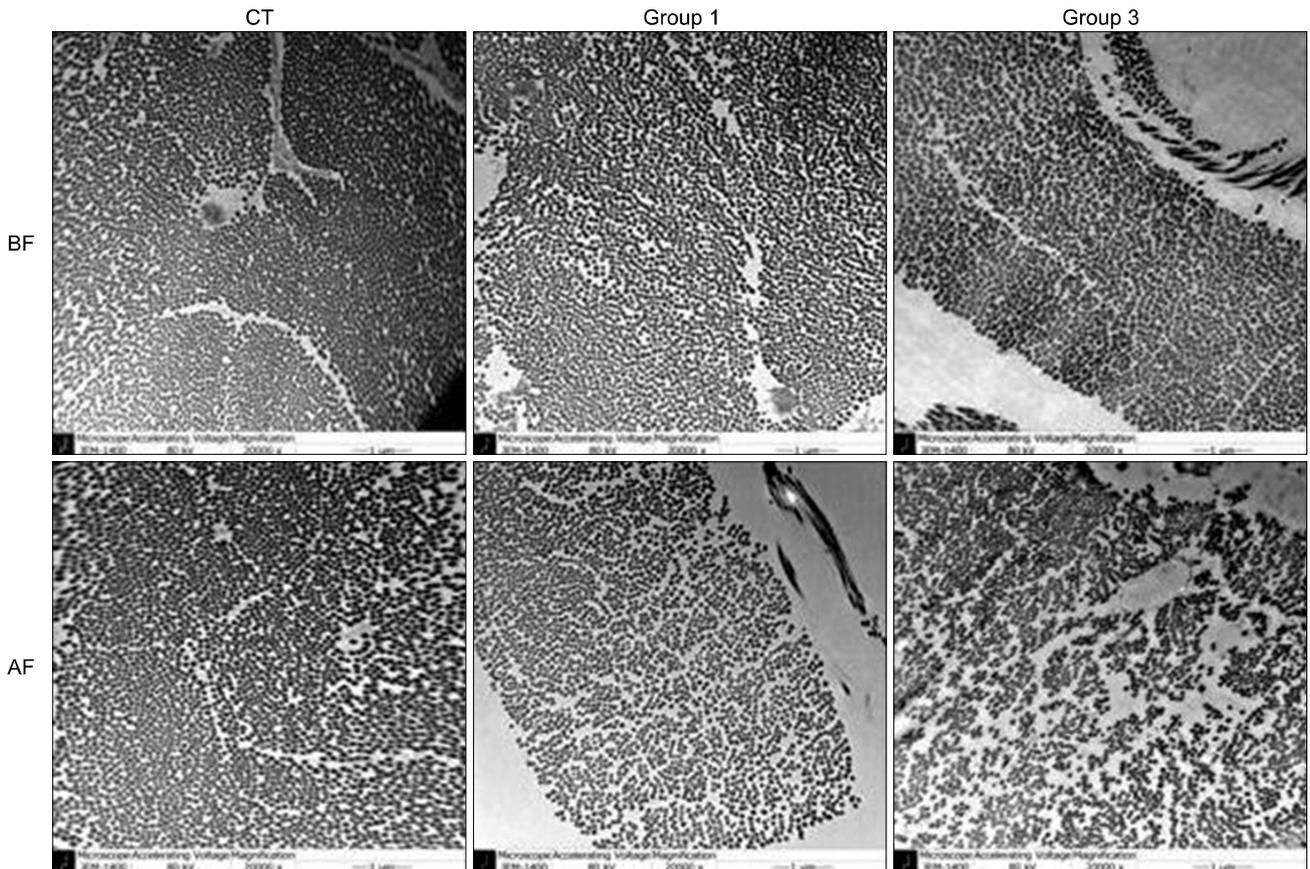


Fig. 4. Electron microscopy findings ($\times 20,000$), CT (control group, only after fixation). BF=Before fatigue; AF=After fatigue.

uroylsarcosinate 처리군에 비하여 피로도 검사 이후 투과도 및 유순도에서 약간 우수할 수 있을 것으로 생각된다.

3) 조직학적 관찰(광학현미경 및 전자현미경)

피로도 검사 시행 전·후의 조직학적 양상을 H-E 염색 후 관찰하였고, 100배의 배율과 400배의 배율에서 각각 관찰하였다(Fig. 2, 3). 모든 군에서 무세포화를 잘 시행되어 세포 성분이 관찰되지 않았고, 피로도 검사 시행 전 1군과 3군, 2군과 4군을 서로 비교해 보았을 때 트립신 처리를 한 1군과 2군보다 3군과 4군에서 조직이 더 치밀한 소견을 관찰할 수 있었다. 피로도 검사 시행 전과 후를 서로 같은 군끼리 비교해 볼 때, 피로도 검사 후에 조직의 치밀도가 더 떨어져 보임을 관찰할 수 있었다.

글루타알데히드를 이용하여 고정만 시행하고 무세포화 과정은 거치지 않은 심낭편을 대조군으로 하였고, 이 대조군과 SDS를 사용한 1군과 3군을 피로도검사 전·후로 전자현미경으로 20,000배 배율에서 관찰하였다(Fig. 4). 전

자현미경으로 관찰한 조직의 소견으로, 무세포화를 시행하지 않은 심낭편은 섬유소(collagen fiber)가 원래 모습대로 굵고 치밀하나, 무세포화 후에는 섬유소가 가늘어지고 치밀함이 감소하였고, trypsin 처리군과 trypsin 비처리군과의 큰 차이는 보이지 않았으나 피로도 검사 전과 후를 비교해 보았을 경우 치밀함이 떨어지고, gap이나 작은 미세공간이 관찰되어 micropore를 증가시킴으로써 조직의 투과도나 유순도를 증가시키고, 피로도검사에 취약하게 할 것으로 생각된다.

고 찰

조직이나 장기의 무세포화는 다방면의 이식조직 등의 의학분야에서 연구되어 왔고, 무세포화의 방법들도 조직이나 장기별로 다양하게 연구되어 왔다. 무세포화가 이루어지는 정도는 해당 조직에 따라서도 달라지고, 사용하는 무세포화의 방법들-물리적, 화학적, 효소적-에 따라서도

달라진다. 이러한 각각의 물리적, 화학적, 또는 효소적인 방법들은 생화학적 구조에 영향을 끼쳐 조직의 세부구조를 변화시키고, 세포외 기질의 조성을 변화시켜 기계적인 성질을 변화시키며, 숙주의 이식편에 대한 면역반응에 영향을 끼친다.

흉부외과적으로는 심혈관 수술에 사용될 적절한 이종 이식편을 제조하는 데 있어서, 최선의 처치법을 찾기 위한 많은 연구가 진행되고 있고, 효과적인 무세포화는 그러한 여러 처치법들 중의 하나이다[9]. 본 연구와 같은 무세포화에 대한 연구를 통해 얻고자 하는 것은, 최대한 간단하면서도 많은 시간을 요하지는 않으면서 보다 경제적이면서도 적절한 무세포화를 달성하고, 그러면서도 인체 내의 환경에서 물리적이거나 화학적으로 내구도가 높고 면역반응이 적은 이식편을 만들어내는 처치방법이다. 본 연구에서는 SDS 또는 N-lauroylsarcosinate와 Triton X-100을 이용하여 무세포화를 진행할 때 물리적, 기계적 장력을 측정하고 역학적 피로도 검사를 시행하여 각각의 무세포화 과정 후 피로도 검사 전·후의 투과도와 유순도, 조직학적인 변화를 측정하여 이러한 조직을 생체에 이식하여 시간이 경과하였을 때를 가정하여 트립신 처리 여부와 세정제의 선택이 무세포화의 과정에 끼치는 물리-기계적 및 구조 조직학적인 영향을 알아보려고 하였다.

트립신은 프롤린 잔여기가 없으면 탄소 쪽의 아르기닌과 라이신의 결합을 해체하는 매우 특이적인 효소이며, 최대로 활성화되는 환경은 37°C의 온도와 pH 8에서이다[11]. 여러 조직에서의 효소처리에 의한 무세포화작용에 대해 연구가 되어 왔고, 몇 연구들은 트립신으로 효과적인 무세포화를 보고하였고, 다른 몇 연구들에서는 트립신으로 시행한 무세포화는 효과적이지 못하다고 보고하였다. Schenke-Layland 등은 돼지 폐동맥 관막에서 0.05% 트립신/0.02% EDTA로 24시간 처리하여 완전한 무세포화를 보고하였고[11], Wang 등은 돼지 대동맥 관막에서 0.05% 트립신으로 48시간 처리하여 효과적인 무세포화를 달성했다고 보고하였다[12]. 반면, Grauss 등은 돼지 대동맥 관막에서 0.5% 트립신(Trypsin), 0.05% EDTA, 0.02% 겐타마이신(Gentamicin), 0.02 mg/mL DNase, 그리고 20 µg/mL RNase-A in Milli-Q water에서 37°C에서 17시간동안 처리하였으나 조직에서 효과적으로 세포 성분을 제거해 내지 못했다고 보고하였다[13]. 폐동맥관막 이식편을 트립신/EDTA에 장시간 노출시킬 때 세포외 기질의 구조는 변형되지만 조직의 콜라겐 함량은 변화하지 않으며, 세포외 기질의 라미닌(laminin)과 피브로넥틴(fibronectin)의 함량은

감소되고 시간이 지남에 따라 조직의 elastin content와 Glycosaminoglycans (GAGs)가 감소하여 세포 외 기질(extracellular matrix)의 조성을 변화시키고, 이는 조직의 장력을 50%까지 감소시킬 수 있기 때문에 세포 외 세부구조와 성분의 파괴를 최소화하려면 트립신/EDTA에 노출되는 시간을 제한하는 것이 바람직하다고 알려져 있다[10,13,14].

본 연구에서는 0.1% 트립신/0.1% EDTA에서 3시간동안 유지하였고, 기계적 장력검사결과에서는 트립신 전처치를 한 군에서 트립신 전처치를 하지 않은 군보다 오히려 높게 나타났고, 장력의 감소는 없는 것으로 나타났다. 하지만 투과도와 유순도에서는 트립신 처리를 한 군이 트립신 처리를 하지 않은 군보다 피로도 검사의 시행과 관계없이 더 높게 나타났으며, 트립신 처리를 한 군의 많은 샘플에서 유순도 검사시 누수가 있었던 점을 볼 때, 트립신 처리를 한 군에서 세포 외 기질의 변화가 더 심함을 알 수 있다. 트립신 처리를 한 1군과 2군에서의 투과도와 유순도는 많이 증가되어 sample간의 격차가 크게 나타났으며, 각 군마다 sample수가 4개로 부족한 점은 본 연구의 제한점으로 생각된다.

특정화된 무세포화 방법들에 있어서, 그 효과 및 효능은 무세포화를 시행한 조직에 따라 달라진다. Grauss 등은 동일한 노출 시간과 더 높은 트립신 농도에서도 쥐 대동맥 관막에서 효과적인 무세포화를 달성하지 못하였다고 보고하였고, 반면 Schenke-Layland 등은 같은 조건에서 돼지 폐동맥 관막에서 완전한 무세포화를 보고하였다[13,15]. 본 연구에서 사용된 세정제들 중 SDS와 N-lauroylsarcosinate는 이온성 세정제이며, Triton X-100은 비이온성 세정제이다. 이 중 특히 SDS의 경우 세포질과 핵막을 용해시키며, 단백질을 변성시키는 경향이 있어서 본래 조직의 구조를 파괴하는 경향이 있으며 글리코스아미노글리칸(GAGs)을 제거하며 콜라겐에 손상을 입힌다. N-lauroylsarcosinate는 이온성 세정제로, 세포질을 용해시키거나 그 작용이 SDS보다는 약한 것으로 알려져 있다. Triton X에는 비이온성인 Triton X-100과 이온성인 Triton X-200이 있으며, 본 연구의 무세포화 과정에서 사용된 Triton X-100은 무세포화 과정에 있어서 가장 널리 연구된 비이온성 세정제이다. Triton X-100은 지질-지질 사이 및 지질-단백질 사이의 결합을 파괴시키나, 단백질-단백질간의 결합엔 손상을 끼치지 않으며 여러 이식편에 따라 서로 다른 연구결과들이 보고되어 있다[10,16-25]. 본 연구에서는 고장성 및 저장성 처리, SDS 또는 N-lauroylsarcosinate, Triton-X의 무세포화 과정에 앞서서 0.1% 트립신으로 비교적 단시

간인 3시간동안 유지하여 이 처치과정이 여러 종류의 이식편들 중 소 심낭에 끼치는 영향을 보고자 하였다. Wang 등은 돼지 대동맥 판막에서 0.05% Trypsin 단독으로 48시간동안 무세포화를 실시하여 완전한 무세포화를 달성하고, 가열시 수축되는 온도, 장력과 연장률을 측정하여 큰 영향이 없음을 보고하였으나[12], Tudorache 등은 돼지 폐동맥 판막에서 0.05% trypsin/0.02% EDTA에 48시간 유지함으로써 완전한 무세포화가 이루어지긴 하였으나 광학현미경 및 전자현미경 소견에서 형태학적 구조가 손상되고 세포 외 기질의 단백질의 손상이 있다고 보고하였다[26]. 본 연구에서는 트립신 처치가 소 심낭편의 장력에는 큰 영향을 주지 않지만 피로도검사 전후의 투과도 및 유순도를 모두 증가시키고, 광학현미경 및 전자현미경 관찰에서 세포 외 기질을 손상시켜 조직학적인 치밀도는 감소시킴을 관찰할 수 있었다. 이는 트립신 처치로 인해, 그리고 이후의 세정제로 인한 작용이 더 강화되어 세포외기질의 구성 및 세부구조가 더 와해되었다고 볼 수 있겠다.

결 론

SDS, N-lauroylsarcosinate, Triton-X 등의 세정제를 이용한 무세포화 과정에 앞선 3시간의 0.1% 트립신/0.1%EDTA 처치는 소 심낭편의 기계적 장력은 감소시키지 않았으나 투과도나 유순도는 피로도 검사 전과 후로 증가시켰고, 조직학적 소견의 관찰에서 세포 외 기질의 손상을 확인할 수 있었다. 그러나 여러 방법으로 트립신 전 처치 과정을 조합하여 이후의 세정제들로 인한 무세포화 작용을 강화시킴으로써, 세정제들에의 노출시간을 감소시킴으로써 전체적인 무세포화 과정에 걸리는 시간을 단축시키는 데 이용해 볼 수 있을 것으로 생각된다. 트립신 처치를 세정제에 조합해서 피로도검사 전이나 후의 투과도나 유순도에 큰 영향이 없는 무세포화 과정을 만들기 위해서는 보다 더 저농도의 트립신을 사용하던가, 트립신에의 노출시간을 더 감소시키던가, 또는 세정제에의 노출시간을 감소시키는 등 여러 방법의 무세포화에 대한 연구가 필요하다. 또한 앞서 인용했던 연구들에서 보여졌듯이 무세포화의 효율은 각각의 조직에 따라서 다르기 때문에, 소 심낭 뿐만이 아닌 다른 조직들에서의 트립신 등의 효소 사용과, 서로 다른 세정제 종류와 선택에 따른 효과에 대해서도 추가적인 연구가 시행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Kim KC, Lee C, Choi CH, et al. *Development of porcine pericardial heterograft for clinical application (tensile strength-thickness)*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:170-6.
2. Song H, Kang SH, Ryu YG, et al. *Comparison of patency and viability in fresh and cryopreserved arterial and venous allograft conduits in dogs*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:149-59.
3. 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.
4. Sung SC, Kim YJ, Choi SY, et al. *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.
5. Cho SK, Kim YJ, Kim SH, et al. *Comparison of the uni-axial tensile strength, elasticity and thermal stability between glutaraldehyde and glutaraldehyde with solvent fixation in xenograft cardiovascular tissue*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:165-74.
6. Chang HW, Kim YJ, Kim SH, et al. *The dynamic and histologic changes of variously fixed bovine pericardiums specimens after mechanical fatigue stimuli*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2009;42:148-56.
7. Hwang SW, Kim YJ, Kim SH, et al. *Anti-calcification effects in decellularized and variously fixed bovine pericardium*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:235-45.
8. Dellgren G, Eriksson M, Brodin LA, et al. *The extended Biocor stentless aortic bioprosthesis. Early clinical experience*. Scand Cardiovasc J 1999;33:259-64.
9. Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, et al. *Tissue engineering of heart valves*. Circulation 2005;111:2792-7.
10. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials 2006;27:3675-83.
11. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of biochemistry*. 2nd ed. New York: Wiley. 2002.
12. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, et al. *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves*. J Struct Biol 2003;143:201-8.
13. Wang KX, Zhang JF, Zhan QP, et al. *Effect of trypsin and Triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves*. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao 2005;25:22-5.
14. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, et al. *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*. Eur J Cardiothorac Surg 2005;27:566-71.
15. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, et al. *Decellari-*

- zation of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:2003-10.
16. 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.
 17. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, et al. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials* 2004;25:2679-86.
 18. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng* 2004;10:1346-58.
 19. 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.
 20. Lin P, Chan WC, Badylak SF, et al. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng* 2004;10:1046-53.
 21. Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, et al. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg* 2005;79:888-96.
 22. Hudson TW, Zawko S, Deister C, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng* 2004;10:1641-51.
 23. Vanken P, Joshi S, Murray MM, et al. Triton-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res* 2009;27:1612-8.
 24. Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 14:279-84.
 25. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003;26:412-7.
 26. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, et al. Tissue engineering of heart valves: Biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis* 2007;16: 567-73; discussion 574.

=국문 초록=

배경: 이식편을 개발함에 있어서 숙주의 면역반응을 최소화하여 보다 더 오래 사용할 수 있게 하기 위한 방법으로 무세포화에 대한 연구가 시행되고 있다. 저자들은 소 심낭의 무세포화의 과정에 효소제인 트립신 전처치가 물리역학적, 조직학적으로 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 소 심낭편을 SDS와 Triton X-100 또는 N-lauroylsarcosinate와 Triton X-100으로 무세포화하는 것을 기본으로 한 군들과 0.1% 트립신/0.1% EDTA로 전처치를 추가한 군들에서 장력 검사를 실시하고, 생체 이식 후의 상태를 가정한 피로도 검사를 전후로 하여 투과도와 유순도를 검사하였고, 피로도 검사 전후로 조직학적인 변화를 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하였다. **결과:** 트립신 처치를 추가한 군과 아닌 군에서 기계적 장력의 차이는 없었으나, 투과도와 유순도는 피로도검사 전과 후로 트립신 처치를 하지 않은 군에 비해 증가하였으며, 조직학적으로도 세포외 기질이 더 손상된 소견을 보였다. **결론:** 소 심낭의 무세포화에서 트립신 전처치는 세포외기질의 손상을 유발하지만 기계적 장력에는 큰 영향을 미치지 않았으며, 피로도검사 전후 모두 투과도와 유순도를 증가시켰다. 무세포화과정에서 트립신과 같은 단백질 분해 효소제를 이용하기 위해서는 조직의 생체 물리적 손상을 최소화할 수 있는 다양한 방법을 조합한 연구가 더 필요하다.

중심 단어 : 1. 생체의공학
2. 생체이식편
3. 심낭