(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0022575
(43) 공개일자 2014년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01) *A61L 27/14* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0088791
(22) 출원일자 2012년08월14일
심사청구일자 2012년08월14일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
신화성
인천 연수구 먼우금로 126, 215동 102호 (동춘동, 현대대림2차아파트)
정상명
서울 강남구 논현로51길 25, 304호 (도곡동, 현대그린아파트)
김대승
서울 관악구 관악로6길 28, 가동 201호 (봉천동, 현대아트빌라)
(74) 대리인
김순웅

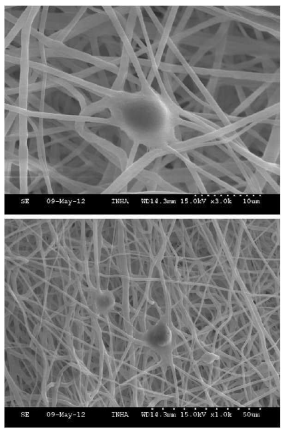
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체**

(57) 요 약

본 발명은 스피룰리나 (spirulina)를 포함하는 생분해성 세포지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체는 세포 독성이 없으며, 세포 부착 및 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있어, 3차원적으로 인공 피부 조직을 재구성하거나, 탈세포화를 통해 피부 세포 유래 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM) 바이오 소재의 개발에 이용될 수 있으며, 다양한 분야에서 조직공학용 세포지지체로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	D11013511H320000150
부처명	국토해양부
연구사업명	해양바이오산업신소재 기술개발
연구과제명	해양유래 동물세포 배양공학을 이용한 재생의학용 복합ECM 개발
기 여 율	1/1
주관기관	인하대학교산학협력단
연구기간	2010.12.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 세포지지체는 생분해성 고분자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 생분해성 세포지지체.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시 부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터(polyorthoesters), 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산 및 폴리-N-이소프로필아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 생분해성 세포지지체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 스피룰리나는 생분해성 세포지지체 총 중량에 대해 3 내지 10 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 생분해성 세포지지체.

청구항 5

(1) 스피룰리나 및 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시키는 단계; 및

(2) 상기 (1) 단계의 혼합물을 전기 방사하여 나노 섬유 매트를 제조하는 단계;를 포함하는, 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체의 제조 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 (1) 단계에서 생분해성 고분자는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시 부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터(polyorthoesters), 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산 및 폴리-N-이소프로필아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 생분해성 세포지지체의 제조 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 (1) 단계에서 유기용매는 테트라히드로퓨란, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 아세톤, 디옥산, 트리플루오르에탄, 헥사플루오로이소프로판, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 생분해성 세포지지체의 제조 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 (2) 단계에서 전기방사는 10~20 kV의 전압 세기하에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 생분해성 세포지지체의 제조 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스피룰리나 (spirulina)를 포함하는 생분해성 세포지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 지지체와 세포를 생체 조직에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 복원, 재생, 대체하여 정상적인 기능을 유도하는 일련의 기법이다. 이는 세포배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합이며, 이러한 조직공학기법을 이용하여 원하는 조직을 얻을 수 있고, 지지체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 주조할 수 있다. 조직공학분야에 있어서 세포 및 지지체의 생물학적 신호는 매우 중요한 요소이며, 사용되는 생체재료 지지체의 역할은 생체 내에서 세포가 잘 정착하여 배양될 수 있도록 도와줄 수 있어야 하고 고유의 표현형을 유지하면서 생체 재료 지지체에 골고루 분포되어야 하며, 분리된 세포가 생체 내에서 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM)을 풍부하게 분비함으로써 분화된 조직의 재생을 촉진시켜야 한다. 또한, 체내에 이식된 후에도 주변 조직과 융화가 잘 되고 일정 기간이 지나면 안전하게 흡수, 분해하는 생체 적합성을 가져야 한다.

[0003] 효과적인 조직 재생을 위한 이상적인 지지체에는 체내 하중을 견뎌내야 할 충분한 기계적 강조, 세포들의 접착 및 성장이 가능한 표면 화학적 성질, 기공의 마이크로와 매크로적인 구조, 크기 및 형태 등이 필수 조건으로 요구된다. 지지체는 파종된 세포와 조직 주변으로부터 이동되는 세포 성장에 중요한 역할을 수행한다. 인체 내 대부분의 세포는 부착세포로서 만일 부착할 곳이 없으면 세포는 성장하지 못하고 사멸한다. 이러한 세포의 특성으로 인하여 세포 치료에 많은 어려움이 있으며, 이를 해결하기 위해 지지체가 도입되어 널리 사용되고 있다.

[0004] 한편, 다양한 생분해성 고분자가 조직 공학에 광범위하게 이용되었다. 상기 조직공학 지지체에 이용된 고분자는 크게 천연 고분자와 합성 고분자로 나눌 수 있으며, 이들은 적합한 물리화학적, 생물학적, 기계적인 특성을 가지고 있다..

[0005] 천연 고분자는 콜라겐, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 잔탄검, 케라틴, 소장 점막하조직 (small intestinal submucosa) 등이 있으며, 이들은 우수한 생체 적합성과 이식 후 낮은 면역 반응을 가지고 있다. 그러나, 천연 고분자는 개별적으로 쓰일 경우 충분한 기계적 특성을 가지고 있지 못한 단점이 있다.

[0006] 합성 고분자는 PLA(poly(lactic acid)), PGA(poly(glycolic acid)), PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PCL(poly(e-caprolactone)) 등 주로 소수성 폴리에스테르이다. 그 중 α-하이드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA) 및 그들의 공중합체인 PLGA는 미국 FDA의 승인을 받은 합성고분자로서 조직공학적 다공성 지지체, 약물전달시스템 등의 생체재료로 널리 이용되고 있으며, 높은 생체적합성, 생분해성 및 가공성을 가지고 있다. 하지만, 생체활성물질의 결여와 소수성으로 인해 세포부착에 어려움을 가지며, PLGA의 가수분해 과정 중 생성되는 산분해물이 조직주변의 pH를 감소시켜 염증을 유발하는 단점이 있다.

[0007] 한편, 스피룰리나 (spirulina)는 조류(algae)로서 세포벽이 얇은 다세포 생물이다. 스피룰리나에 함유되어 있는 주요 성분에는 단백질, 탄수화물, 수용성 식이섬유를 비롯하여 항산화성 색소 성분(클로로필, 카로티노이드, 피코사이아닌), 항산화 효소(SOD), 감마리놀렌산(GLA) 등이다. 비타민으로는 베타카로틴, 비타민 B1 · B2 · B6 · B12, 비타민 E, 이노시톨, 엽산 등이 함유되어 있으며, 칼슘, 철, 칼륨, 마그네슘, 아연, 망간, 셀레늄, 게르마늄 등 무기질 성분도 함유되어 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 상기한 바와 같은 문제점을 해결한 새로운 세포지지체를 개발하기 위한 연구를 수행한 결과, 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체가 세포 독성이 없으며, 세포 부착 및 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 국내특허출원번호 : 10-2008-0005447

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체 및 이의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체는 세포 독성이 없으며, 세포 부착 및 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있어, 3차원적으로 인공 피부 조직을 재구성하거나, 탈세포화를 통해 피부 세포 유래 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM) 바이오 소재의 개발에 이용될 수 있으며, 다양한 분야에서 조직공학용 세포지지체로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 PCL 나노 섬유 매트를 SEM을 통해 관찰한 도이다.

도 2는 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트를 SEM을 통해 관찰한 도이다.

도 3 은 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트의 세포 독성을 나타낸 도이다.

도 4는 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트가 세포 부착에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 5는 스피룰리나 추출물의 세포 독성을 나타낸 도이다.

도 6은 스피룰리나 추출물이 세포 증식에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7 은 스피룰리나 추출물을 세포에 처리하고 5일 후, 세포의 생장을 관찰한 도이다 (스피룰리나 추출물 처리 농도 : A: 0.5 μg/mg, B: 1 μg/mg, C: 10 μg/mg, D: 100 μg/mg).

도 8은 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 내 세포 침투를 나타낸 도이다.

도 9는 PCL 나노 섬유 매트 내 세포 침투를 나타낸 도이다.

도 10은 탈세포화 과정을 거친 후, 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트를 알시안 블루 염색을 통해 관찰한 도이다.

도 11은 탈세포화 과정을 거친 후, 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트를 H&E 염색을 통해 관찰한 도이다.

도 12는 탈세포화 과정을 거친 후, 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트를 시리우스 레드 염색을 통해 관찰한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명은 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체를 제공한다.

[0016] 상기 세포지지체는 스피룰리나와 함께 생분해성 고분자를 함께 포함하는 것이 바람직하다.

[0017] 상기 생분해성 고분자는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시 부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터(polyorthoesters), 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리-N-이소프로필아크릴아미드 및 이들의 유도체 또는 이들의 공중합체 등을 포함하며, 바람직하게는 폴리카프로락톤(PCL)이다.

[0018] 상기 스피룰리나는 생분해성 세포지지체 총 중량에 대해 3 내지 10 중량%로 포함되는 것이 바람직하다. 스피룰리나의 함량이 3중량% 미만일 경우에는 세포지지체로서의 효과가 미미하며 10중량%를 초과할 경우에는 형태 안정성이 미흡하다.

[0019] 또한, 본 발명은 (1) 스피룰리나 및 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시키는 단계, 및 (2) 상기 (1) 단계의 혼합물을 전기 방사하여 나노 섬유 매트를 제조하는 단계;를 포함하는, 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지

지체의 제조 방법을 제공한다.

[0020] 보다 구체적으로는, 생분해성 고분자, 바람직하게는 PCL을 유기용매에 녹이고, 일정량의 스피룰리나를 첨가한다. 상기 용액을 충분히 혼합한 후, 전기방사 장치를 이용하여 나노 섬유 매트로 제작한다. 이때, 바늘은 15~20 게이지, 집전장치 (collector)와의 거리는 10~20 cm, 전기방사 전압 세기는 10~20 kV가 바람직하다.

[0021] 상기 유기 용매는 테트라히드로퓨란, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 아세톤, 디옥산, 트리플루오르에탄, 헥사플루오로이소프로판, 및 이들의 혼합 용매 등을 포함하며, 바람직하게는 테트라히드로퓨란 및 디메틸포름아미드의 혼합 용매이고, 보다 바람직하게는 테트라히드로퓨란 및 디메틸포름아미드의 혼합 비율이 5~10:1~5의 중량비이고, 더욱 바람직하게는 7:3 중량비의 혼합 용매이다.

[0022] 본 발명의 생분해성 세포지지체는 2차원 및 3차원 형태로 제조될 수 있다.

[0023] 본 발명의 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체는 세포 독성이 없으며, 세포 부착 및 고농도 배양 조건에서 세포 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있다. 또한, 본 발명의 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포 지지체는 세포 지지체가 구성하는 배양 환경에서 세포가 안정적으로 생장하며 조직을 만드는데 기여하기 때문에, 이를 이용하여 인공 조직 및 탈세포화 과정을 거쳐 복합 ECM으로 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 스피룰리나를 포함하는 생분해성 세포지지체는 조직공학용 세포지지체로 유용하게 이용할 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0025] **실시예 1. 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 제조**

[0026] PCL (Polycaprolacton, Mn 80,000, Sigma USA) 및 스피룰리나 (Nature's care, Australiria) 세포를 각각 15 중량% 및 1 중량%씩 THF(Tetrahydrofuran): DMF(Dimethylformamide)의 혼합 용매(7:3 (v/v))에 넣고 혼합하였다.

[0027] 상기 혼합물을 전기방사 장치를 이용해 나노 섬유 매트 (nanofiber mat)로 제작하였다. 이때, 바늘은 18 게이지, 집전장치 (collector)와의 거리는 15 cm, 전기방사장치의 전압의 세기는 15 kV이었다. 대조군으로는 15 중량% PCL을 이용하였다.

[0028] 용매가 제거된 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 내의 PCL 함량은 93.75 중량%, 스피룰리나 함량은 6.25 중량%이다.

[0029] **실험예 1. 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 특성 분석**

[0030] 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나를 포함하는 세포지지체가 세포에 부착되어 있는 모양을 관찰하기 위해, SEM (scanning electron microscope, Hitachi S-4300)을 이용하였다. 세포는 SD 랫트의 피부를 1차 배양 (primary culture)하여 이용하였다. 보다 구체적으로는, 1일령의 SD 랫트의 피부를 자른 후 (1cm*1cm), 디스파아제 (1mg/ml)를 포함하는 HBSS 배지에 넣고, 4° C에서 24시간 동안 반응시킨 후, 피부의 진피층과 표피층을 분리하였다. 이를 다시 콜라게나아제 2 (1mg/ml)를 포함하는 HBSS 배지에 넣고 4° C에서 24시간 동안 반응시켰다. 각각의 표피와 진피를 공극 크기가 70 μm인 세포 여과기에 거르고, 고농도 글루코오스-DMEM 배지 (10% FBS, 1% 항생제)에서 배양하였다. 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 또는 PCL 나노 섬유 매트를 넣고, $1X10^4$ cells/well의 농도로 세포를 심고, 5일 동안 배양하였다. 5일 후, 각 나노 섬유 매트 샘플을 PBS로 세척하고, 3% 글루타르알데하이드를 첨가한 후, 37℃에서 30 분 동안 배양하였다. 이 후, 에탄올의 농도를 25%, 50% 75%, 90%, 100%로 증가시키며 탈수하였다. 탈수된 각 나노 섬유 매트 샘플에 HMDS(hexa methyl di silazane)를 3방울 떨어뜨리고, 3분간 반응시킨 후, 진공 상태에서 30분간 증발시켰다. 이를 1~10 K의 배율로 관찰하였다. 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0031] 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, PCL 나노 섬유 매트에 비해서 본 발명의 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트에 세포가 더욱 안정적으로 부착되어 있는 것을 확인하였다.

[0032] **실험예 2. 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 세포 독성 분석**

[0033] 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 세포 독성을 확인하기 위하여, MTT 어세이 (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 를 수행하였다. 보다 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 또는 PCL 나노 섬유 매트를 넣고, DMEM 배지 (1% 항생제)를 첨가하여 1일 동안 우려내었다. 또한, 96 웰 플레이트에 $3x10^3$ cells/well의 농도로 세포를 심은 후, 미리 준비해놓은 각 나노 섬유 샘플을 처리한 배지를 첨가하고, 1일간 배양하였다. 이 후, 각 웰에 MTT 용액을 처리하고, DMSO로 녹인 후, OD 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0034] 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트를 처리한 배지는 이미 독성이 없다고 알려진 PCL 나노 섬유 매트를 처리한 배지와 유사한 값을 나타내므로, 독성이 없음을 확인하였다.

[0035] **실험예 3. 스피룰리나를 포함하는 세포지지체가 세포 부착에 미치는 영향 분석**

[0036] 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나를 포함하는 세포지지체가 세포 부착에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 또는 PCL 나노 섬유 매트를 넣고, $3X10^4$ cells/well의 농도로 세포를 심었다. 2, 8 및 24시간 후에 MTT 어세이를 수행하였다. MTT 용액은 세포의 대사 활성에 의해 보라색의 포르마잔으로 변하며, 본 실험은 세포 접종 후 24시간 이내까지는 세포 활성의 차이가 아닌 세포 부착의 수에 따라 MTT 값이 변하게 되는 것을 이용한 실험이다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0037] 도 4에 나타낸 바와 같이, 일반적으로 사용하는 세포 배양 플레이트의 재질인 TCPS(tissue culture polystyrene)의 결과가 시간이 갈수록 증가하는 것으로부터 세포 부착에는 하자가 없는 정상적인 세포가 실험에 이용되었음을 확인하였다. 또한, 기존의 PCL 나노 섬유 매트에 비하여, 본 발명의 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트가 세포 부착에 더 긍정적인 효과를 보임을 확인하였다.

[0038] **실험예 4. 스피룰리나 추출물의 세포 독성 분석**

[0039] 스피룰리나 추출물 자체의 세포 독성을 확인하기 위하여, MTT 어세이 및 BrdU 어세이 (Roche-applied science)를 수행하였다. 먼저, 스피룰리나를 5g/l의 농도로 물에 녹인 후, 상온에서 24시간 동안 교반 추출하였다. 이후 원심분리기를 이용하여 용해되지 않은 잔여물을 제거한 후, 동결건조하여 스피룰리나 추출물을 수득하였다. 또한, 96 웰 플레이트에 $3x10^3$ cells/well의 농도로 세포를 심은 후 1일간 배양하였다. 각 웰을 스피룰리나 추출물을 농도별(0~100 μg/mg)로 포함하는 DMEM 배지로 교환하고, 1, 3 및 5일 후, MTT 어세이 및 BrdU 어세이 (Roche-applied science)를 수행하였다. 그 결과를 각각 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0040] 도 5에 나타낸 바와 같이, MTT 어세이 결과, 스피룰리나 추출물을 처리한 세포에서 세포 활성의 감소 억제를 확인하였으며, 스피룰리나 추출물이 조직 구성에 긍정적인 효과를 미침을 확인하였다.

[0041] 또한, 도 6에 나타낸 바와 같이, BrdU 어세이 결과, 스피룰리나 추출물을 처리한 세포에서 그렇지 않은 세포에 비해 결과값이 높게 나타남을 확인하였으며, 이를 통해 스피룰리나 추출물이 세포 분열을 촉진함을 확인하였다.

[0042] 또한, 동일한 방법으로 스피룰리나 추출물을 처리하고 5일 후, MTT 어세이를 수행하고, 세포를 관찰하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0043] 도 7에 나타낸 바와 같이, 스피룰리나 추출물을 다양한 농도 (0.5~100 μg/mg)로 처리한 세포가 모두 정상적으로 잘 생장하고 있음을 확인하였다.

[0044] **실험예 5. 스피룰리나를 포함하는 세포지지체에 대한 세포 침투 분석**

[0045] 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 세포 침투를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 먼저 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 또는 PCL 나노 섬유 매트를 넣고, $1x10^4$ cells/well의 농도로 세포를 심은 후, 5일간 배양하였다. 배양 종료 후, 4% 파라포름알데하이드를 첨가하고, 20분간 배양하여 세포를 고정하였다. 상기 샘플을 H&E 염색한 후, OCT를 첨가하여 동결시키고, 초박막분리기를 사용하여 40 ㎛의 두께로 잘라냈다. 이를 역상 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[0046] 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트에 세포가 안정적으로 침투되는 것을 확인하였다.

[0047] **실험예 6. 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 탈세포화 분석**

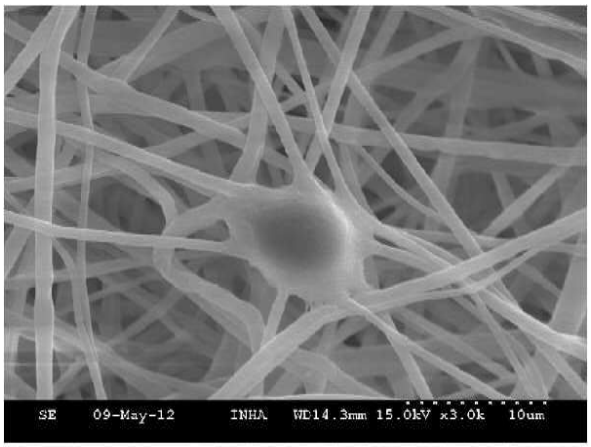
[0048] 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나를 포함하는 세포지지체의 탈세포화 분석을 수행하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 먼저 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 스피룰리나-PCL 나노 섬유 매트 또는 PCL 나노 섬유 매트를 넣고, $1x10^4$ cells/well의 농도로 세포를 심은 후, 5일간 배양하였다. 배양 종료 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 이 후, 액체 질소를 이용하여 20초간 냉동, 상온에서 5분간 용해하는 과정을 5회 반복하였다. 상기 샘플을 0.1 % (w/v) NH_4OH에서 1~2분간 처리한 후, 증류수에 세척하여 세포질 등 잔해물을 제거하였다. 최종적으로 동결건조를 이용하여 스피룰리나-PCL 나노 섬유를 회수한 후, 이를 알시안 블루 염색, H&E 염색 및 시리우스 레드 염색을 통해 관찰하였다. 그 결과를 각각 도 10 내지 도 12에 나타내었다.

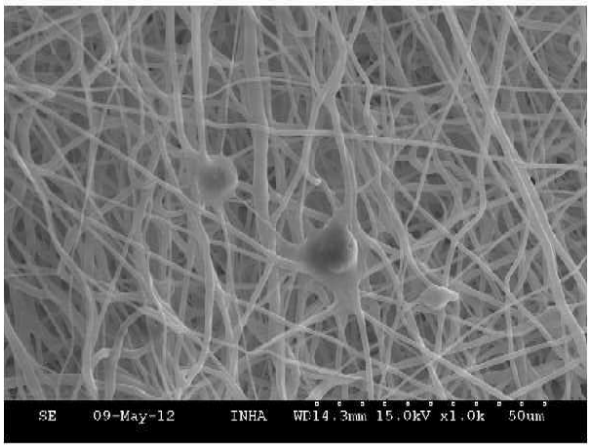
[0049] 도 10 내지 도 12에 나타낸 바와 같이, 탈세포화 과정 이후에도 나노 섬유 내 GAG가 남아있는 것을 확인하였으며, 세포는 거의 완전하게 제거된 것을 확인하였다. 또한, 탈세포에 의해서 세포핵이 제거되고, 콜라겐만이 남아있음을 확인하였다.

[0050] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명의 스피룰리나-PCL 나노 섬유 상에서 세포가 잘 분포하여 자라고, 세포 외 기질을 활발하게 만들어냄을 확인하였으며, 상기 스피룰리나-PCL 나노 섬유를 세포지지체로 이용하여 인공 조직의 형성이 가능하고, 세포 제거 시, 인체에 삽입물 등으로 이용할 수 있는 복합 ECM의 제작이 가능함을 확인하였다.

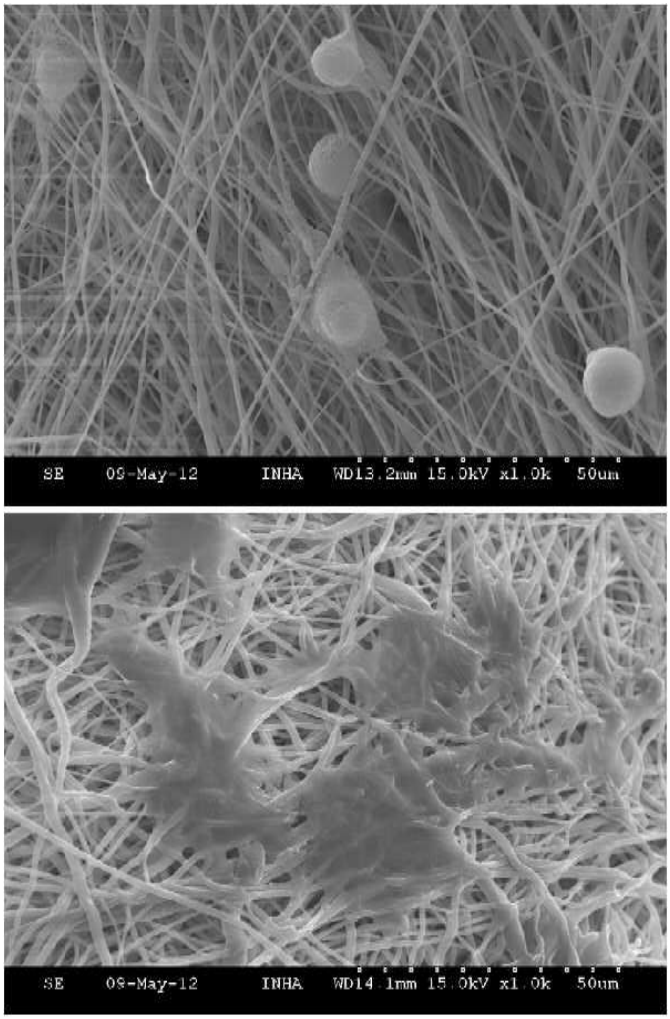
도면

도면1

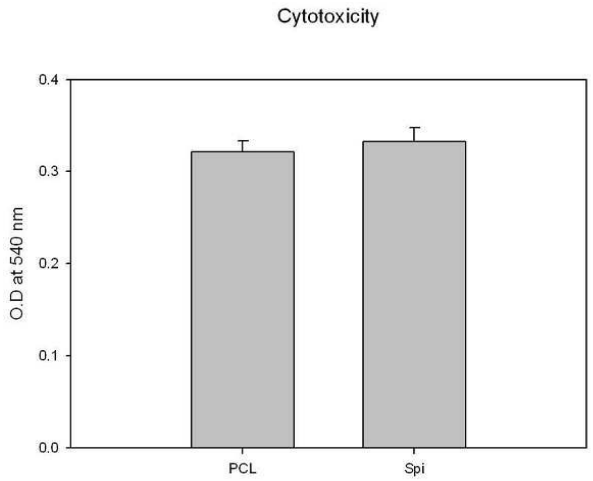

SE 09-May-12 INHA WD14.3mm 15.0kV x3.0k 10um


SE 09-May-12 INHA WD14.3mm 15.0kV x1.0k 50um

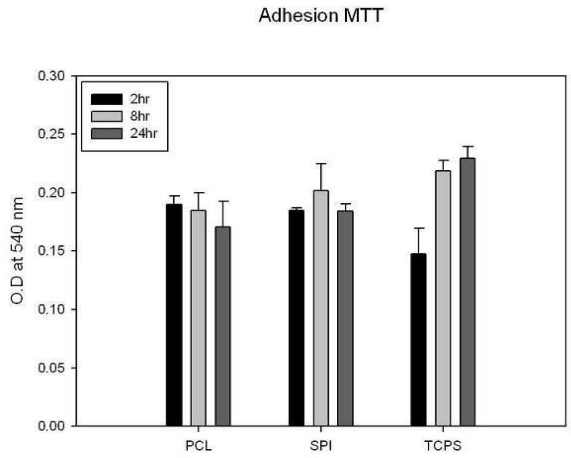
도면2


SE 09-May-12 INHA WD13.2mm 15.0kV x1.0k 50um
SE 09-May-12 INHA WD14.1mm 15.0kV x1.0k 50um

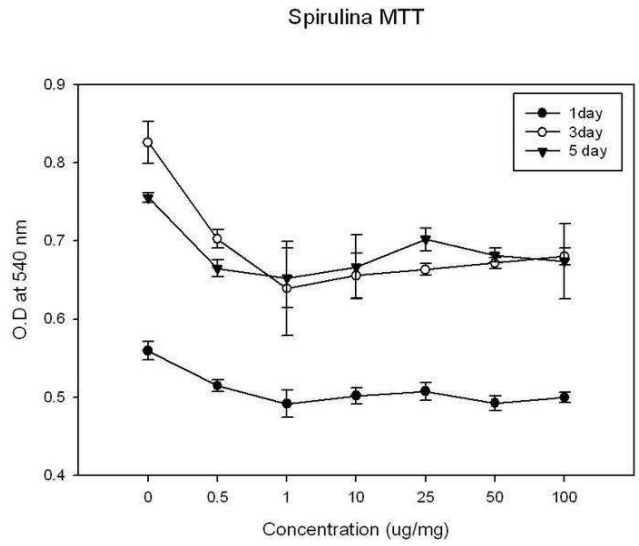
도면3


Cytotoxicity
O.D at 540 nm
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
PCL
Spi

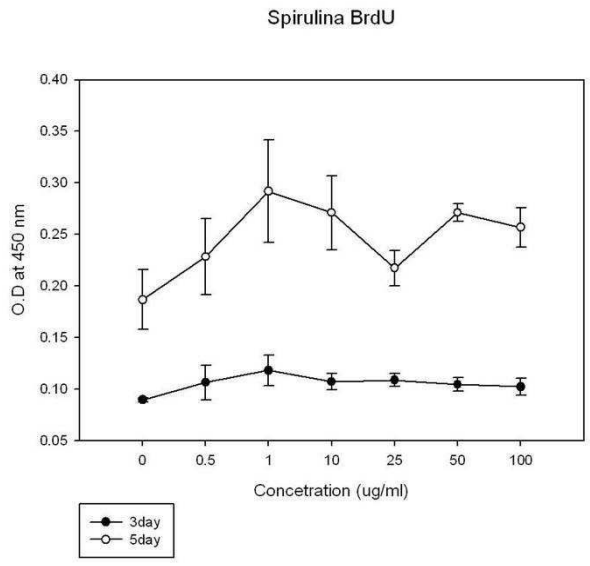
도면4


Adhesion MTT
2hr
8hr
24hr
O.D at 540 nm
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
PCL
SPI
TCPS

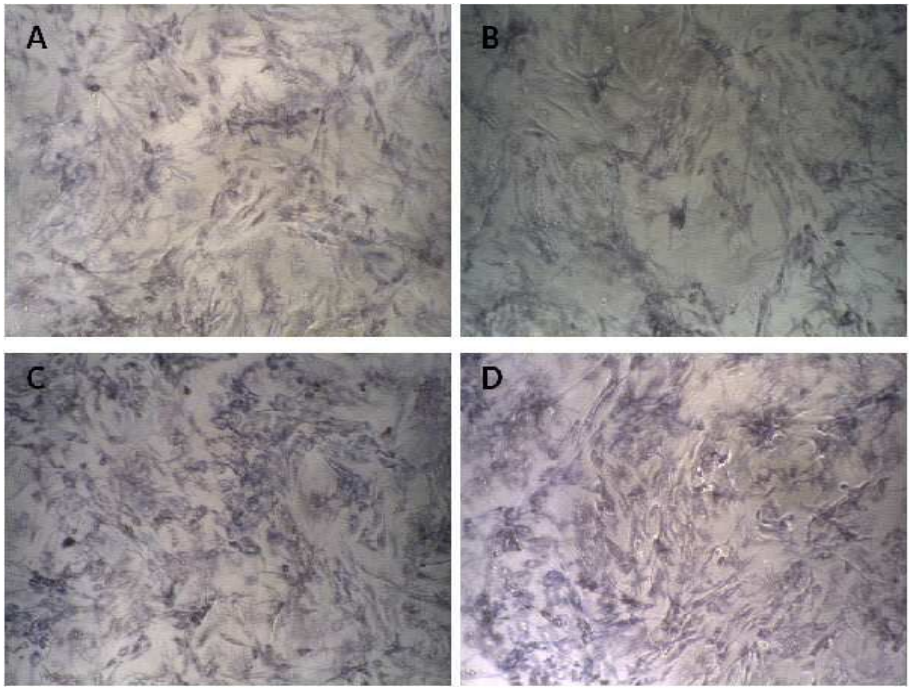
도면5


Spirulina MTT
1day
3day
5 day
O.D at 540 nm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0
0.5
1
10
25
50
100
Concentration (ug/mg)

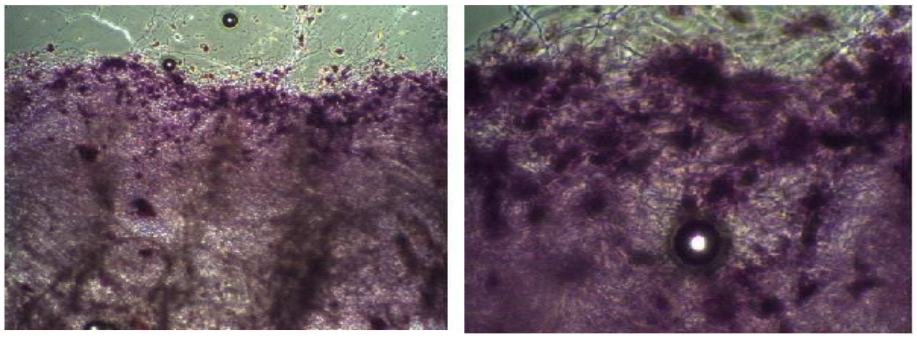
도면6


Spirulina BrdU
O.D at 450 nm
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
0.5
1
10
25
50
100
Concetration (ug/ml)
3day
5day

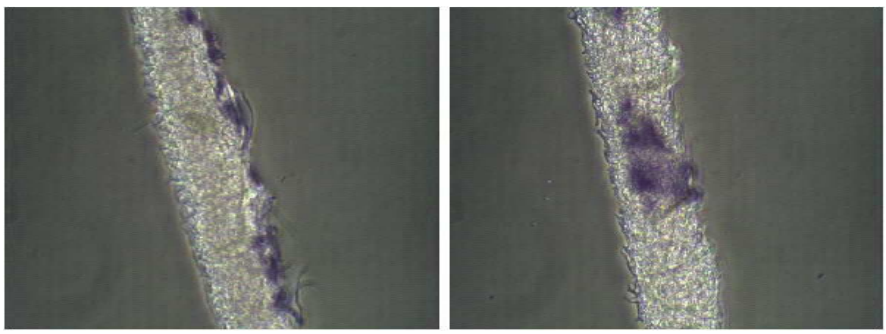
도면7



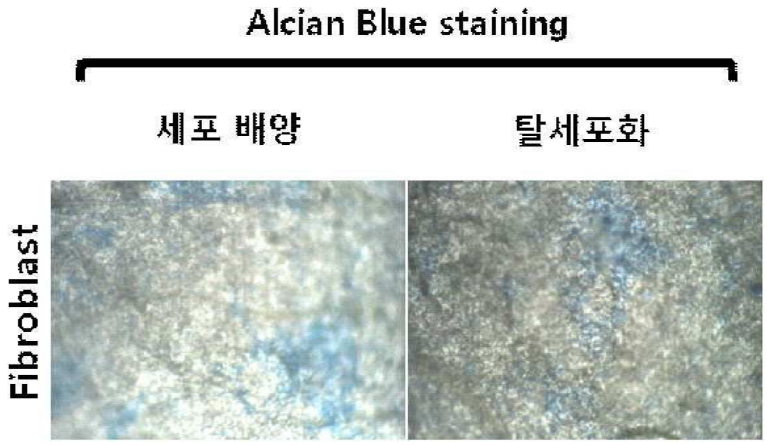
도면8



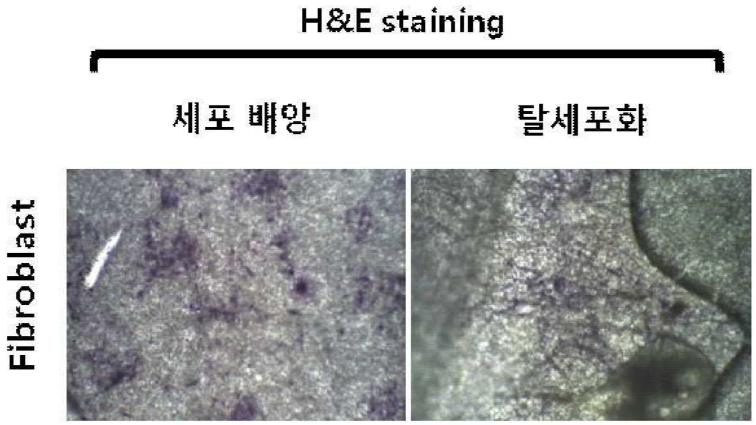
도면9



도면10



도면11



도면12

