



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098483
(43) 공개일자 2018년09월04일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12M 1/00</i> (2006.01) <i>C08J 7/04</i> (2006.01)
 <i>C08L 27/06</i> (2006.01) <i>C09D 165/02</i> (2006.01)
 <i>C12N 5/0793</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12M 23/20</i> (2013.01)
 <i>C08J 7/04</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0096059(분할)
 (22) 출원일자 2018년08월17일
 심사청구일자 2018년08월17일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2017-0018132
 원출원일자 2017년02월09일
 심사청구일자 2017년02월09일</p> | <p>(71) 출원인
 인천대학교 산학협력단
 인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자
 이미수
 경기도 성남시 분당구 수내로 181 우방아파트 311-701
 변재철
 서울특별시 서초구 잠원로 46-38, 브라운스톤 301</p> <p>(74) 대리인
 차준용</p> |
|--|---|

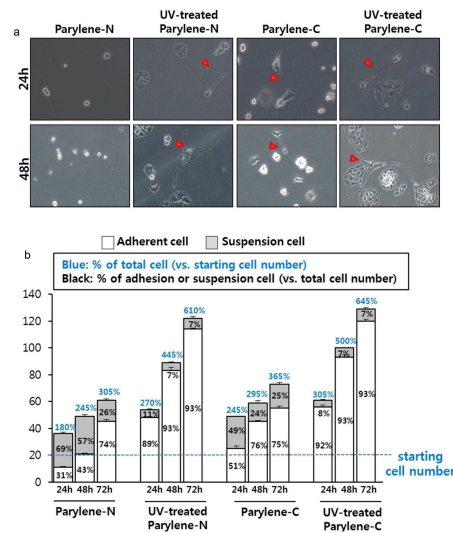
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은 신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 모체에 코팅된 파릴렌-N 박막을 자외선으로 표면처리하여 다양한 화학 기능기 도입에 의해 그 표면을 친수성화시킴으로써, 종래 요구되던 단백질의 흡착 과정 없이도 세포 부착성을 크게 향상시켜 신경세포(PC-12)의 빠른 증식을 유도하고, 동시에 분화촉진 인자의 처리 없이도 신경세포에 특이적인 신경돌기(Neurite)의 발생을 효과적으로 유도하여 분화를 촉진할 수 있는, 신경세포 증식 및 분화용 세포배양용기와 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08L 27/06 (2013.01)

C09D 165/02 (2013.01)

C12N 5/0619 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 기재에 파릴렌-N 박막을 코팅하는 단계;
- 2) 상기 파릴렌-N 박막을 자외선 조사에 의하여 표면 처리하는 단계; 및
- 3) 상기 표면 처리된 파릴렌-N 박막에 신경세포(PC-12)를 부착하여 배양하는 단계;를 포함하고,
상기 표면 처리된 파릴렌-N 박막은 신경세포(PC-12)의 증식 마커 단백질 Ki67을 발현시키고, 동시에 신경세포(PC-12)의 신경돌기의 발생을 유도하는 것을 특징으로 하는,
신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 기재는 폴리스타이렌과 같이 파릴렌이 증착가능한 재료의 기재인 것을 특징으로 하는,
신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 자외선 처리에 의해 파릴렌-N 박막 표면에 하이드록실기, 포르밀기 및 카르복실기 중에서 선택된 1종 이상의 산소 함유 기능기가 도입되는 것을 특징으로 하는,
신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
신경세포(PC-12) 배양 후 24시간 동안, 세포 주기의 G0/G1 상이 미처리된 박막 대비 감소하고, S상이 미처리된 박막 대비 증가하는 것을 특징으로 하는,
신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 자외선 처리에 의해 파릴렌-N 박막 표면이 친수성화되어 세포의 부착성이 향상되는 것을 특징으로 하는,
신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 자외선 처리에 의해 친수성화된 파릴렌-N 박막 표면의 세포 부착율이 미처리된 경우 대비 증가하는 것을 특징으로 하는,

신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 파릴렌-N 박막이 자외선 처리되지 않은 경우 신경세포(PC-12)의 신경돌기의 발생을 유도하지 못하는 것을 특징으로 하는,

신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 모세에 코팅된 파릴렌-N 박막을 자외선으로 표면처리하여 다양한 화학 기능기 도입에 의해 그 표면을 친수성화시킴으로써, 종래 요구되던 단백질의 흡착 과정 없이도 세포 부착성을 크게 향상시켜 신경세포(PC-12)의 빠른 증식을 유도하고, 동시에 분화촉진 인자의 처리 없이도 신경세포에 특이적인 신경돌기(Neurite)의 발생을 효과적으로 유도하여 분화를 촉진할 수 있는, 신경세포 증식 및 분화용 세포배양용기와 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뉴런유사 PC-12 세포는 신경모세포로부터 유래한 것으로, 교감신경-유사 세포로 분화되는 능력을 지녀, 신경분화 및 형태발생과 관련된 분자 프로세스의 연구를 위한 유용한 도구로 여겨지고 있다. 신경분화는 보통 신경돌기(Neurite)의 발생과 관계되며, 신경돌기는 다른 뉴런과 기능성 연결을 형성하는 축삭돌기 및 수상돌기가 된다.

[0004] PC-12 세포에서 신경분화를 촉진하기 위한 통상적인 접근법은 신경 성장 인자(NGF)의 보충, 혈청 기아(Serum starvation), 및 세포 부착을 위한 라미닌- 또는 콜라겐 IV-풍부 기질을 첨가하는 것이다. PC-12 세포의 신경분화를 위해 이러한 처리하면 신경돌기의 발생과 함께 모폴로지가 변하고, 세포가 세포 주기의 G1 상(Phase)에 축적되어 PC-12 세포의 증식 속도가 감소된다. 또한 NGF로 더욱 처리하면 PC-12 세포가 G1 상에서 정지하고, G2/M 상의 비율도 증가한다. NGF에 장기간 노출된 후, 최종 분화가 유도되고, PC-12 세포는 다중 신경돌기의 발생을 포함하여 교감신경의 여러 특성을 획득하게 된다.

[0006] 최근, Kato 등은 PC-12 세포가 파릴렌-H 및 파릴렌-AM 박막 표면 상에서 높은 부착성을 나타내고, 또한 NGF 처리 없이도 신경돌기의 발생이 관찰되었다고 보고한 바 있다.

[0007] 파릴렌-H 및 파릴렌-AM은 특별히 기능화된 파릴렌 박막으로 분류되며, 파릴렌 전구체의 방향족 고리 상에 화학적으로 기능성을 지닌 포르밀 및 아미노메틸기를 지닌다.

[0008] 한편, 파릴렌-C 박막은 낮은 부착성을 지니지만, 이를 산소 플라즈마로 처리하면 부착성이 20배 이상 증가하는 것으로 보고된 바 있다.

[0010] 일반적으로, 파릴렌 박막은 p-자일릴렌의 중합체이며, 파릴렌-C(파릴렌 전구체의 방향족기에 클로라이드를 포함) 및 파릴렌-N(파릴렌 전구체의 방향족기에 기능기가 없음) 박막이 구조적 목적으로 널리 사용되고 있다.

[0011] 상기 2가지 파릴렌 박막은 화학적으로 불활성이고, 비-생분해성이며, 생체적합성이 있고, 편축이 없으며, 약한

수팽창성을 지니기 때문에, 스텐트, 신경 전극, 심장 박동기 및 구강내 자석과 같은 이식가능한 생체의료 장치의 절연 코팅 재료 내지 생체 분자의 고-충실도 마이크로패터닝을 위한 코팅 재료로 광범위하게 사용되고 있다.

[0012] 통상적으로, 이러한 파릴렌 박막은 증착을 통해 복잡한 3차원 구조에도 균일한 코팅을 형성할 수 있으며, 이후 산소 플라즈마에 의해 건식-에칭되어 세포 배양용으로 이상적인 마이크로스케일의 특징과 패턴을 획득할 수 있다.

[0014] 플라즈마 및 자외선(UV) 광 처리는 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 표면을 변화시켜 친수성으로 만들 수 있고, 이러한 파릴렌 박막은 폴리다이메틸실록산(PDMS) 및 폴리스타이렌(PS) 등 다른 폴리머보다 상대적으로 장기간 친수성 특성을 보유했을 수 있다.

[0015] 특히, UV-처리된 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 친수성을 증가시키고, 처리된 박막 상에서의 단백질 고정화 효율을 높일 수 있다.

[0016] 단백질의 고정화 후, 세포는 인공 폴리머 표면 위에도 부착될 수 있기 때문에, 파릴렌 박막의 UV-처리된 친수성 증가를 통한 세포의 부착성 개선에 있어 매우 유용한 수단이 될 수 있다.

[0018] 이와 관련하여, 높은 단백질 고정화 효율을 갖는 기능화된 특수한 박막을 적용하여 신경세포(PC-12)를 보다 효과적으로 부착시켜 증식을 촉진하고, 동시에 신경돌기의 발생을 효과적으로 유도하여 신경세포(PC-12)의 분화를 함께 촉진할 수 있는 새로운 기술에 대한 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0020] (비특허문헌 0001) E.O. Johnson, A.B. Zoubos, P.N. Soucacos, Regeneration and repair of peripheral nerves, Injury 36 (2005) S24-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 상기와 같은 요구를 충족시키기 위한 것으로, 종래 요구되던 단백질 및 분화촉진 인자의 처리 없이도 신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 효과적으로 촉진할 수 있는 새로운 형태의 신경세포 배양용 세포배양 용기를 제공함을 기술적 과제로 한다.

[0022] 이를 위해, 본 발명자들은 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 상의 PC-12 세포를 대상으로 증식 및 분화 특성을 분석하였다.

[0023] 먼저, 모폴로지 분석과 부착 세포 및 부유 세포의 계수에 의해, 파릴렌-N 및 파릴렌-C가 코팅된 배양용기의 자외선 표면처리 유무에 따른 증식 및 신경돌기의 발생을 조사하였다.

[0024] 또한, 접촉각 측정, 푸리에-변환 적외선(FT-IR) 분광법 및 X-선 광전자 분광법(XPS)에 의해, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 화학적 환경(표면 화학 기능기) 변화를 비교분석하였다.

[0025] 아울러, 형광 염색 테스트 및 웨스턴 블로팅에 의해 PC-12 세포의 증식 및 분화와 관련된 바이오마커를 각각 분석하고, 이어서 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에서 배양된 PC-12 세포의 세포 주기 분석을 수행하였다.

[0026] 그 결과, 자외선으로 표면처리된 파릴렌-N 및 파릴렌-C가 코팅된 배양용기에서 월등히 높은 신경세포의 흡착, 세포 증식 속도 및 신경돌기의 성장이 구현됨을 확인하였다.

과제의 해결 수단

- [0028] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은
- [0029] 1) 기재에 파릴렌-N 박막을 코팅하는 단계;
- [0030] 2) 상기 파릴렌-N 박막을 자외선 조사에 의하여 표면 처리하는 단계; 및
- [0031] 3) 상기 표면 처리된 파릴렌-N 박막에 신경세포(PC-12)를 부착하여 배양하는 단계;를 포함하고,
- [0032] 상기 표면 처리된 파릴렌-N 박막은 신경세포(PC-12)의 증식 마커 단백질 Ki67을 발현시키고, 동시에 신경세포(PC-12)의 신경돌기의 발생을 유도하는 것을 특징으로 하는,
- [0033] 신경세포(PC-12)의 증식 및 분화를 동시에 촉진시키는 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명에서는, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 미세환경이 PC-12 세포의 세포 부착 및 신경돌기형성 능력에 미치는 영향을 조사하였다.
- [0036] 구체적으로, 72시간 동안 인큐베이션한 후의 총 세포 수, 부유 세포에 대한 부착 세포의 비율, UV-노출 후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에서의 신경돌기 발생 계수를 분석한 결과, 본 발명에 따라 처리된 박막은 PC-12 세포의 증식 및 분화용으로 매우 적합한 것으로 확인되었다.
- [0037] 또한, 접촉각 측정, FT-IR 분광법 및 XPS 분광법에 의해, UV-노출 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 표면 특성 차이를 분석한 결과, UV-처리 후 당해 박막 표면에 산소-관련 화학적 기능기가 도입되어 친수성 및 단백질 고정화 효율이 증가된 것으로 파악되었다.
- [0038] 아울러, 형광 염색, 웨스턴 블로팅 및 세포 주기 분석을 수행한 결과, UV-처리 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막은 PC-12 세포의 증식(Proliferation)과 더불어, 신경돌기 발생을 동반한 PC-12 세포의 분화(Differentiation)를 효과적으로 촉진할 수 있음이 확인되었다.
- [0039] 즉, 신경세포의 분화를 촉진하기 위해서는 일반적으로 일련의 세포 증식과정으로 세포의 표면밀도를 높인 후 분화촉진 인자를 가하는 과정이 필요한데, 본 발명에서 제공하는 자외선으로 표면처리된 파릴렌-N 또는 파릴렌-C가 도포된 세포배양용기는 분화촉진 인자를 가하지 않아도 신경세포의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 신경세포 배양용 세포배양용기에 있어서, 상기 기재는 폴리스타이렌 재질로 이루어진 기재일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 파릴렌의 증착이 가능한 임의의 재질로 된 기재를 사용할 수 있다.
- [0043] 또한, 자외선 처리 대상인 상기 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막은, 예를 들어 100 nm 이상의 두께로 코팅되는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서는, 상기 자외선 처리에 의해 기재에 코팅된 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막의 표면에 소정의 산소 함유 기능기가 도입되며, 이때 산소 함유 기능기는 하이드록실기, 포르밀기 및 카르복실기 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0046] 즉, 상기 자외선 처리에 의해 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막 표면에 다양한 산소 함유 기능기가 도입되고, 그 결과 당해 표면이 친수성화되어 세포 부착성이 크게 향상된다.
- [0047] 일 실험예에서, 상기 자외선 처리에 의해 친수성화된 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막 표면의 물에 대한 접촉각은 76° ~ 80° 의 수준으로 장기간 유지되는 것일 수 있고, 당해 박막 표면은 89% 이상의 높은 세포 부착율을 구현하는 것일 수 있다. 다만 이러한 수치가 세부적인 실험 조건에 따라 변동될 수 있음은 물론이다.
- [0048] 나아가, 본 발명에 따라 자외선 처리된 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막을 포함하는 세포배양용기는 PC-12 세포의 증식 속도를 크게 향상시킬 수 있는바, 예를 들어 세포 배증 시간(Cell doubling time)을 미처리된 경우 대비 약 2배 단축시킬 수 있다.

[0050] 특히, 본 발명에 따라 자외선 처리된 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막을 포함하는 세포배양용기는 전술한 바와 같은 우수한 세포 증식 특성과 동시에, 신경세포(PC-12)로부터 신경돌기(Neurite)의 발생을 효과적으로 유도하여 세포의 분화 또한 함께 촉진할 수 있는 차별화된 장점을 지닌다.

[0052] 본 발명의 다른 측면에 따르면,

[0053] 신경세포(PC-12)의 배양에 사용되는 세포배양용기의 제조방법으로서,

[0054] S1) 폴리스타이렌과 같이 파릴렌이 증착가능한 재질의 모재를 사출성형하는 단계;

[0055] S2) 상기 모재 상에 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막을 증착시키는 단계; 및

[0056] S3) 상기 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막에 자외선을 조사하여 표면처리하는 단계;를 포함하는,

[0057] 신경세포 배양용 세포배양용기의 제조방법이 제공된다.

[0059] 상기 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막의 증착은 열증착법에 의해 수행되는 것이 바람직하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 상기 자외선 조사에 의한 파릴렌-N 또는 파릴렌-C 박막의 표면처리는 소정 조건의 UV-처리를 실시하여 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0063] 본 발명에 따른 신경세포 배양용 세포배양용기는 종래 요구되던 단백질(콜라겐, BMP 등) 처리 과정 없이도 신경세포(PC-12)의 흡착을 효과적으로 수행할 수 있어, 신경세포의 부착성을 크게 향상시킬 수 있다.

[0064] 그 결과, 신경세포의 빠른 증식을 유도하여 신경세포 배양에 소요되는 시간을 단축할 수 있다.

[0065] 동시에, 종래 요구되던 분화촉진 인자의 처리 없이도 신경세포에 특이적인 신경돌기(Neurite)의 발생을 효과적으로 유도하여 분화를 촉진할 수 있다.

[0066] 즉, 본 발명은 종래기술과 비교할 때 고가의 단백질 및 분화촉진 인자 등의 처리 없이 신경세포 증식 및 분화를 효율적으로 촉진할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 상 PC-12 세포의 배양 결과로서, (a) UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 상 PC-12 세포의 모폴로지 특성(* PC-12 세포의 현미경 이미지는 씨딩 24 및 48시간 후 확보함. 발생된 신경돌기를 화살표로 표시함); (b) UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에서 배양된 부착 세포 및 부유 세포의 수(* 각 그래프의 숫자는 처음 씨딩된 세포 수(20,000/플레이트)에 대한 총 PC-12 세포 수의 비율과 부유 세포에 대한 부착 세포의 비율을 나타냄);를 보여주는 도면이다.

도 2는 접촉각 측정에 의해 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 친수성을 비교한 결과로서, (a) UV-처리 전/후 파릴렌-N 박막의 접촉각 측정 결과($n = 3$)(* A 및 B는 5일째 ~ 30일째 접촉각의 평균 및 표준편차로서 각각 $87.6^\circ \pm 1.0^\circ$ 및 $78.0^\circ \pm 1.4^\circ$); (b) UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막의 접촉각 측정 결과($n = 3$)(* A 및 B는 5일째 ~ 30일째 접촉각의 평균 및 표준편차로서 각각 $89.4^\circ \pm 0.5^\circ$ 및 $77.8^\circ \pm 0.8^\circ$);를 보여주는 그래프이다.

도 3은 모델 단백질인 HRP(Horseradish peroxidase)에 의한 단백질 고정화 효율의 비교 결과로서, (a) UV-처리 30일 동안 관찰된 파릴렌-N 박막의 단백질 고정화 효율; (b) UV-처리 30일 동안 관찰된 파릴렌-C 박막의 단백질

고정화 효율;을 보여주는 그래프이다. (* UV-처리 1일(24시간) 동안, 고정된 HRP의 활성을 삽입된 그래프로 나타냄)

도 4는 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 표면 분석 결과로서, (a) UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 원자 조성 XPS 분석 결과; (b) UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 상 화학적 기능기의 FT-IR 분석 결과;를 보여주는 그래프이다.

도 5는 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 상 PC-12 세포의 분화 및 증식 중 신경돌기 발생 분석 결과로서, (a) UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 표면 상 PC-12 세포에서 관찰된 NF-H(적색) 및 Ki67(녹색)에 대한 면역형광 염색 이미지; (b) UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 표면 상 PC-12 세포에서 관찰된 신경미세섬유 중쇄(NF-H), 사이클린 D1 및 액틴의 웨스턴 블로팅 결과;를 보여주는 그래프이다.

도 6은 UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에서 배양된 PC-12 세포의 세포 주기 분석(FACS) 결과로서(* 세포 주기 상의 비율은 FlowJo 분석 소프트웨어를 이용하여 계산함), (a) PI 염색 후 PC-12 세포의 세포 주기 분석 결과; (b) PC-12 세포의 증식 및 분화와 관련된 세포 상 비율 분석 결과;를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0071] 실시예

[0072] (1) 재료

[0073] Ham's F-12 K(Kaighn's) 배지 및 HRP(Horseradish peroxidase)는 Sigma-Aldrich Korea(Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea)로부터 입수하였다.

[0074] 말 혈청(HS), 소태아혈청(FBS), 트립신/EDTA 용액 및 트라이판 블루 용액은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)로부터 입수하였다.

[0075] 페니실린, 스트렙토마이신 및 파라포르말데하이드는 Sigma-Aldrich Korea(Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea)로부터 입수하였다.

[0076] 파릴렌-N 및 파릴렌-C의 다이머는 Femto Science Co.(Suwon Si, Gyeonggi-Do, Korea)로부터 입수하였다.

[0077] 생세포-계수 키트(CCK-8)는 Dojindo Laboratories(Kumamoto, Japan)로부터 입수하였다.

[0078] 항-NF-H 1차 항체는 Cell Signal(Tokyo, Japan)로부터 입수하였다.

[0080] *항-Ki67 항체(clone: SP6), 항-사이클린 D1 항체, 항- α -액틴 항체, 및 모든 2차 항체들은 Abcam(Seoul, Korea)로부터 입수하였다.

[0081] 프로피디움 아이오다이드(PI)는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)로부터 입수하였다.

[0082] 화학발광 기질 및 BCA(Bicinchoninic acid) 분석 키트는 Thermo Fisher Scientific(Seongnam-si, Gyeonggi-Do, Korea)로부터 입수하였다.

[0084] (2) 파릴렌-코팅 플레이트의 제조

[0085] 상업적으로 입수가 가능한 파릴렌 증착 시스템(Kisco, Japan)을 사용하여 파릴렌이 코팅된 플레이트를 제조하였다.

[0086] 먼저, 파릴렌-N 및 파릴렌-C의 다이머를 160℃에서 증발시킨 후, 650℃에서 열분해하여 파릴렌 다이머를 고도 반응성 자유 라디칼로 변환시켰다.

[0087] 이어서, 얻어진 고도 반응성 자유 라디칼을 중합 및 기관 상에 증착하였다. 이러한 공정은 25℃로 진공 하에서 수행하였다.

- [0088] 파릴렌 박막의 두께는 파릴렌 다이머의 초기량에 의해 조절하였다.
- [0089] 고정된 UV-출력 23 mW/cm^2 및 파장 254 nm (from OS-1k 노출)(Seoul, Korea)의 조건으로 UV-리소그래피 시스템을 이용하여 파릴렌 박막 표면을 UV-처리하였다.
- [0091] **실험 방법**
- [0092] (1) 파릴렌 박막의 표면 분석
- [0094] *UV-조사 유무에 따른 파릴렌 박막의 표면 특성을 분석하였다.
- [0095] 접촉각 측정은 자동 접촉각 측정 시스템(Smartdrop from FEMTOFAB Co., Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Korea)을 이용하였다. 접촉각 측정을 위해, 처음에는 한 방울(부피 $5 \mu\text{l}$)을 파릴렌 표면 위에 적용하였다($n = 3$).
- [0096] 파릴렌 박막 상의 기능기 분석은 정반사율 액세서리(VEEMAX III, PIKE Technology, Madison, WI, USA) 및 액체-질소-냉각 수은-카드뮴-텔루라이드(MCT) 검출기를 이용한 푸리에-변환 적외선(FT-IR) 분광법(Spectrum-100, PerkinElmer Co., Waltham, MA, USA)에 의해 수행하였다. FT-IR 분광 분석을 위해, 100 nm 의 파릴렌 박막을 샘플 홀더의 Au-코팅층 위에 형성하였다.
- [0098] (2) 세포 배양 및 증식 테스트
- [0099] 뉴런유사 PC-12 세포를 한국세포주은행(KCLB)으로부터 입수하고, 15% HS, 2.5% FBS 및 항생제 용액(페니실린 100 units/ml , 스트렙토마이신 $100 \mu\text{g/ml}$)을 함유하는 Nutrient Mixture F-12 Ham 배지에서 배양하였다.
- [0100] 모든 세포는 클린 벤치 위에서만 다루었고, 5% CO_2 를 포함하는 가습 분위기에서 37°C 의 조건으로 배양하였다.
- [0101] 세포의 밀집도(Confluence)가 약 90%에 도달하였을 때, 원하는 용도로 사용하기 위해 세포를 계대배양하였다.
- [0102] 세포 이미지는 PC-12 세포($20,000$ 세포)의 씨딩 24 및 48시간 후, 도립 현미경(Eclipse TS100, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 확보하였다.
- [0104] (3) 면역염색 및 웨스턴 블로팅
- [0105] PC-12 세포의 분화 및 증식을 특성화하기 위해, 신경미세섬유 중쇄(NF-H) 및 Ki67 단백질에 대해 면역형광 염색을 수행하였다.
- [0106] PC-12 세포를 파릴렌이 코팅된 96-웰 플레이트에 씨딩하고, 24시간 동안 인큐베이션한 다음, 세포를 PBS로 세척하고, 2% 파라포름알데하이드로 30분 동안 고정시켰다.
- [0107] 이어서, PC-12 세포를 0.1% triton X-100으로 처리하여 투과성으로 만들고, PBS 내 10% 염소 혈청(v/v)으로 30분 동안 차단시켰다.
- [0108] 항-NF-H(PBS 중 5% 소혈청알부민에서 1:100 희석) 및 항-Ki67(PBS 중 5% 소혈청알부민에서 1:300 희석) 1차 항체를 세포 샘플과 4°C 에서 밤새 반응시켰다.
- [0109] PBS로 세척한 후, PC-12 세포를 2종의 2차 항체, FITC(Fluorescein isothiocyanate)-conjugated anti-rabbit IgG 항체 및 CY3-conjugated anti-mouse IgG 항체로 각각 인큐베이션하였다.
- [0110] 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, PC-12 세포를 3회 세척하고, Olympus Co.(Tokyo, Japan)로부터 입수한 형광 현미경(모델: IX71/IX81) 하에서 분석하였다.
- [0111] 단백질 추출을 위해, PC-12 세포를 PBS 내에서 2회 세척한 후, RIPA 버퍼(150 mM NaCl , $50 \text{ mM Tris-HCl pH } 8$, NP-40 1%, Sodium deoxycholate 0.5% 및 SDS 1%)에서 *in situ* 제조된 프로테아제 억제제로 용해시켰다.
- [0112] 단백질 농도는 BCA 분석 키트를 이용하여 평가하였으며, 총 단백질 추출물을 SDS-PAGE 처리하였다.

- [0113] 마커 단백질의 웨스턴 블로팅을 위해, 단백질 밴드의 트랜스퍼 프로세스를 4℃에서 밤새 수행하였다.
- [0114] 비특이적 결합은 실온에서 완만하게 교반하면서 TBS-T 내 5%(w/v) 탈지유로 1시간 동안 차단시켰다.
- [0115] TBS-T에서 3회 세척한 후, 희석된 1차 항체(NF-H 1:100 및 α-액틴 1:5,000) 용액을 4℃에서 밤새 완만하게 교반하면서 샘플들로 인큐베이션하였다.
- [0116] 3회 세척하여 비특이적으로 결합된 1차 항체를 제거하였다.
- [0117] 이어서, 세척 용액 내 5%(w/v) 탈지유에서 희석된 HRP-conjugated 2차 항체를 멤브레인과 실온에서 1시간 동안 반응시켰다.
- [0118] 3회 세척한 후, 실온의 어두운 곳에서 5분 동안 인큐베이션하면서 화학발광 시약을 첨가하였다.
- [0119] X-선 박막을 멤브레인에 노출시켰다(Kodak, Rochester, NY, USA).

[0121] (4) 세포 주기 분석

- [0122] 세포 주기 분석을 위해, PC-12 세포를 파릴렌 박막이 형성된 배양 플레이트 위에 씨딩 밀도 1.5×10^5 세포/60 mm²로 씨딩하였다.
- [0123] 24, 48 및 72시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수집하고, 4℃에서 70% 에탄올을 이용하여 인큐베이션하였다.
- [0124] PBS로 세척한 후, 신경세포(PC-12)를 프로피디움 아이오다이드(PI)(농도 5 μg/ml) 및 RNase A(농도 1 mg/ml)로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.
- [0125] PC-12의 DNA 함량은 FlowJo 소프트웨어(Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0127] 실험예

[0128] (1) UV-처리 파릴렌 박막 상에서 PC-12 세포의 배양

- [0129] PC-12 세포는 신경모세포에서 유래하며, 뉴런유사 세포로 분화되는 능력을 지닌다. NGF로 처리한 후, PC-12 세포는 증식을 멈추고, 분화하여 다중 신경돌기를 발생시키기 시작한다. 이러한 이유로, PC-12 세포는 신경분화의 연구에 널리 사용되고 있다. PC-12 세포는 소정 유형의 파릴렌 박막에 부착될 수 있고, 이러한 파릴렌 박막은 NGF 없이 신경돌기의 발생을 도울 수 있다.
- [0130] 본 발명에서는, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막을 대상으로 미세환경이 PC-12 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석하였다.
- [0132] 24 및 48시간 인큐베이션한 후, 다양한 파릴렌 박막에 대해 PC-12 세포의 세포 모폴로지를 조사하였다.
- [0133] 도 1(a)에서 보듯이, 24시간 동안의 인큐베이션 후, PC-12 세포는 UV-처리 파릴렌-N, 파릴렌-C, 및 UV-처리 파릴렌-C 박막 표면에서 신경돌기를 형성하기 시작하였다.
- [0134] 그러나, UV-처리 전 파릴렌-N 박막 표면에서는 신경돌기가 형성되지 않았다.
- [0135] 48시간 동안 인큐베이션한 후, UV-처리 파릴렌-N, 파릴렌-C, 및 UV-처리 파릴렌-C 박막에서의 PC-12 세포는 신경돌기의 수 및 길이가 증가하였다.
- [0136] 반면, 파릴렌-N 박막에 부착된 PC-12 세포는 매우 적었으며, 48시간 동안 인큐베이션한 후에도 신경돌기가 형성되지 않았다.
- [0138] 도 1(a)에서 보듯이, 24 및 48시간 동안 인큐베이션한 후, 동일한 수로 플레이팅된 PC-12 세포에서 부착 세포의 수는 각 파릴렌 박막별로 서로 달랐다. 따라서 서로 다르게 제조된 파릴렌 박막에 대해 부착 세포 및 부유 세포의 수를 계수하였다.

- [0139] 도 1(b)에서 보듯이, 24 및 48시간 후, 파릴렌-N 박막에서 PC-12 세포의 총 수는 다른 3종의 파릴렌 박막의 경우보다 훨씬 적었다.
- [0140] 또한, UV-처리 전 파릴렌-N 박막에서 부착 세포의 비율도 다른 3종의 파릴렌 박막의 경우보다 훨씬 작았다.
- [0141] 그러나, UV-처리 파릴렌-N 박막의 경우, 총 세포 수 및 부착 세포 수가 급격하게 증가하였다.
- [0142] 72시간 동안 인큐베이션한 후, UV-처리 파릴렌-N 박막에서 총 세포 수는 UV-처리 전 파릴렌-N 박막(305%)의 2배(610%)로 평가되었다.
- [0143] 이러한 총 세포 수 및 부착 세포의 수의 증가는 파릴렌-C 박막에서도 관찰되었다.
- [0144] 72시간 동안 인큐베이션한 후, UV-처리 파릴렌-C 박막에서의 총 세포 수는 UV-처리 전 파릴렌-C 박막(365%)의 2배(645%)로 평가되었다.
- [0145] UV-처리 파릴렌 박막에 대한 세포 부착성 개선은 단백질 고정화가 증가되었기 때문으로 여겨진다. 즉 파릴렌 박막의 UV-처리는 파릴렌 박막의 친수성 및 파릴렌 박막 상의 단백질 고정화 효율을 증가시킨다. 단백질 고정화에 의해 세포는 폴리머 인공 표면에도 부착될 수 있는 것으로 알려져 있는바, 파릴렌 박막의 UV-처리가 친수성 증가를 통해 PC-12 세포의 부착성을 개선한 것으로 파악된다.
- [0146] 이러한 결과는 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 UV-처리에 의해 세포 증식 및 신경돌기 형성이 개선될 수 있음을 보여주는 것이다.
- [0147] 부착 세포 및 부유 세포를 계수하여, PC-12 세포 부착 및 증식 거동 간의 관계를 조사하였다.
- [0148] 도 1(b)에서 보듯이, 24시간 동안 인큐베이션한 후 부착 세포의 비율을 평가한 결과, 파릴렌-N 박막의 UV-처리 전/후에 각각 31% 및 89%로서 매우 큰 차이를 보였다.
- [0149] 한편, 72시간 동안 인큐베이션한 경우, 부착 세포의 비율은 각각 74% 및 93%로 변화였다.
- [0150] UV-처리 전/후 파릴렌-N 박막에 대해, 증식 속도를 계산하였다.
- [0151] 72시간 동안 인큐베이션한 후, UV-처리 전 파릴렌-N 박막에서의 세포 배증 시간(Cell doubling time)은 24시간 이었고, UV-처리 파릴렌-N 박막의 경우는 12시간이었다.
- [0152] 이러한 결과는 초기 인큐베이션 기간(인큐베이션 24시간)에서의 부착 세포 수 차이가 각 파릴렌-N 박막에서 (1) 72시간 동안 인큐베이션한 후의 총 세포 수 및 (2) 증식 속도에 큰 차이를 불러옴을 보여준다.
- [0153] 파릴렌-C 박막의 경우도, UV-처리 전/후에 증식 속도 차이가 관찰되었다.
- [0154] 도 1(b)에서 보듯이, 48시간 동안 인큐베이션한 후, UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막에서 부착 세포의 비율은 각각 76% 및 93%였다.
- [0155] 또한, 72시간 동안 인큐베이션한 경우, UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막에서 부착 세포의 비율은 각각 75% 및 93%로 변화였다.
- [0156] 72시간 동안 인큐베이션한 후, UV-처리 전 파릴렌-C 박막에서의 세포 배증 시간(Cell doubling time)은 24시간 보다 조금 짧았고, UV-처리 파릴렌-C 박막의 경우는 12시간보다 조금 짧았다.
- [0157] 이러한 결과는 표면의 UV-처리를 통해, 파릴렌-N 및 파릴렌-C 모두 PC-12 세포의 부착 비율 및 증식 속도를 개선하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 보여준다.
- [0159] (2) 파릴렌 박막의 표면 특성
- [0160] PC-12 세포의 부착성 및 증식 속도 증가를 설명하기 위해, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 표면 특성 차이를 분석하였다.
- [0161] 먼저, 접촉각 측정에 의해 파릴렌 박막 표면의 친수성을 비교하였다.
- [0162] 도 2(a)에서 보듯이, 30일 동안의 UV-처리 전/후 파릴렌-N 박막의 접촉각을 측정한 결과, UV-처리 전에는 평균 87.6° , 표준편차 1.0° ($n = 3$)로 평가되었는바, 30일 동안의 샘플 간 편차는 $\sim 1.1\%$ 에 불과하였다.
- [0163] UV-처리 파릴렌-N 박막의 경우, UV-처리 직후 접촉각이 65° 로서, UV-처리 전 파릴렌-N 박막(85°)과 큰 차이를

보였다.

- [0164] 한편, UV-처리 파릴렌-N 박막의 접촉각은 5일 후에 75° 로 변하였고, 이어서 30일 동안 접촉각이 유지되어 평균 78.4° , 표준편차 1.4° ($n = 3$)로 평가되었는바, 30일 동안의 샘플 간 편차는 1.6%에 불과하였다.
- [0166] 도 2(b)에서 보듯이, UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막 또한 장기간 접촉각 측정에 있어 비슷한 결과를 나타내었다.
- [0167] UV-처리 전 파릴렌-C 박막의 경우, 접촉각이 평균 89.4° , 표준편차 0.45° ($n = 3$)로서, 30일 동안의 샘플 간 편차는 0.5%에 불과하였다.
- [0168] UV-처리 파릴렌-C 박막의 경우, UV-처리 직후 최초 5일 동안은 접촉각이 증가하였으나, 이어서 30일 동안 접촉각이 유지되어 평균 77.8° , 표준편차 0.84° ($n = 3$)로 평가되었는바, 30일 동안의 샘플 간 편차는 1.1%에 불과하였다.
- [0169] 이러한 결과는 UV-처리 후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 접촉각이 UV-처리 전보다 >10% 더 높은 친수성을 보임을 의미한다.
- [0171] 통상적으로, 인공 표면 상의 세포 부착은 이온 및 물 분자의 결합과 이어지는 단백질의 부착에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다.
- [0172] 본 발명에서는, PC-12 세포의 부착과 연관된 파라미터로서, HRP를 모델 단백질로 사용하여 UV-처리 전/후 파릴렌 박막의 단백질 고정화 효율을 평가하였다.
- [0173] HRP는 7.0의 등전점(pI)을 지니며, 이는 HRP의 순 전하가 pH 7.0에서 중성이 됨을 의미한다.
- [0174] 잘 알려진 HRP의 발색성 기질인 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)을 이용하여 고정된 HRP의 양을 측정하였다.
- [0175] 도 3(a)에서 보듯이, HRP는 UV-처리 파릴렌-N 박막 위에 고정되었고, 이어서 UV-처리 후 30일 동안 고정된 HRP의 활성을 측정하였다.
- [0176] 그 결과, 고정된 HRP의 활성 $OD_{450nm} = 0.77(n = 3)$ 로서, 고정된 HRP의 양이 UV-처리 후 30일 동안 유지되는 것으로 나타났다.
- [0177] 또한, UV-처리 후 최초 1일(24시간) 동안 고정된 HRP의 활성이 유지되었다(도 3(a)의 삽입 그래프).
- [0178] UV-처리 전 파릴렌-N 박막 및 폴리스타이렌의 경우, 고정된 HRP의 활성이 각각 $OD_{450nm} = 0.10(n = 3)$ 및 $OD_{450nm} = 0.02(n = 3)$ 로 매우 낮게 평가되었다.
- [0179] 이러한 결과는 파릴렌-N 박막의 UV-처리가 UV-처리 전 파릴렌-N 박막 및 폴리스타이렌 표면과 비교할 때 단백질 고정화 능력을 급격하게 증가시킴을 의미한다.
- [0181] *UV-처리 파릴렌-C 박막의 경우, 고정된 HRP의 활성 $OD_{450nm} = 0.77(n = 3)$ 로서, 고정된 HRP의 양이 UV-처리 후 30일 동안 유지되는 것으로 나타났다.
- [0182] 또한, UV-처리 후 최초 1일(24시간) 동안 고정된 HRP의 활성이 유지되었다(도 3(b)의 삽입 그래프).
- [0183] UV-처리 전 파릴렌-C 박막의 경우, 고정된 HRP의 활성이 $OD_{450nm} = 0.25(n = 3)$ 로 매우 낮게 평가되었다.
- [0184] 이러한 결과는 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 모두에 있어 UV-처리 전과 비교할 때 단백질 고정화 효율이 크게 개선됨을 의미한다.
- [0185] 따라서, UV-처리 파릴렌 박막에서 PC-12 세포의 부착성이 개선된 것은 파릴렌 표면의 친수성 향상에 의한 단백질 고정화의 증가 때문으로 이해할 수 있다.
- [0186] 본 발명에서는, PC-12 세포를 배양하기 직전에 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막을 UV-처리하였는바, 이는 단백질 고정화 효율(친수성)의 변화가 적어도 30일 동안 유지되는 것으로 평가되었기 때문이다.
- [0187] 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 UV-처리가 양 파릴렌 표면의 친수성을 개선하고, 단백질 고정화 효율 또한 증가시

졌다. 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 이러한 변화로 인해 PC-12 세포의 부착성이 개선되고 증식 속도가 증가한 것이다.

[0189] XPS에 의해 UV-처리 후 파릴렌 박막의 화학적 개질을 분석하였다.

[0190] 도 4(a)에서 보듯이, UV-처리 전 파릴렌-N 박막은 C1s 전자만을 나타내었다.

[0191] 그러나, UV-처리 후 파릴렌-N 박막은 C1s 전자와 함께 O1s 및 O2s 전자의 피크를 나타내었다.

[0192] 표 1에서 보듯이, UV-처리 결과, 탄소 함량이 99.3%에서 97.3%로 감소하고, 산소 함량이 0.7%에서 2.9%로 증가하였다.

[0193] 파릴렌-C 박막의 경우도, UV-처리 전에는 C1s 전자를 나타내었으나, UV-처리 후에는 C1s 전자와 함께 O1s 및 O2s 전자의 피크를 나타내었다.

[0194] 표 1에서 보듯이, UV-처리 결과, 탄소 함량이 88.4%에서 83.3%로 감소하고, 산소 함량이 0.7%에서 7.8%로 증가하였다.

[0195] 이러한 결과는 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 UV-처리에 의해 산소-관련 기능기가 도입되었음을 의미한다.

[0196] [표 1] UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 원자 조성

	Parylene-N		Parylene-C	
	As-deposited	UV-treated	As-deposited	UV-treated
C1s	99.29	97.03	88.47	83.27
O1s	0.71	2.97	0.69	7.77
Cl2p	-	-	10.84	8.95

[0197]

[0199] FT-IR 분광법에 의해 파릴렌 박막의 UV-처리 후 화학적 기능기의 도입을 분석하였다.

[0200] UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에 대한 FT-IR 스펙트럼 차이를 도 4(b)에 나타내었다.

[0201] UV-처리 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 경우, 파수 1020, 1700, 및 3200 ~ 3800 cm^{-1} 에서 3종류의 차이가 관찰되었는바, 이는 각각 C-O 스트레치, C=O 스트레치 및 카르복실 O-H 스트레치를 나타낸다.

[0202] 특히, 변화 중에서 C=O 스트레치의 도입이 많이 발생하였다.

[0203] 이러한 결과는 하이드록실, 포르밀 및 카르복실기와 같은 산소-관련 화학적 기능기가 도입되었음을 적시해 주며, 이러한 기능기들은 UV-처리 후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 친수성 및 단백질 고정화 효율 증가의 원인이 된다.

[0205] (3) 파릴렌 박막에서 PC-12 세포의 세포 생리학

[0206] 전술한 바와 같이, PC-12 세포는 NGF 및 텍사메타손 처리 후 뉴런유사 세포로 분화되는 능력을 지닌다.

[0207] PC-12 세포는 분화하여 다중 신경돌기를 발생시키기 시작하면서 증식을 멈추는 것으로 알려져 있다.

[0208] 도 1(a)에서 보듯이, PC-12 세포는 4종의 파릴렌 박막 모두에서 증식하고, 3종의 파릴렌 박막(UV-처리 파릴렌-N 박막 및 UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막) 표면에서 PC-12 세포의 분화에 의해 신경돌기를 발생시키는 것으로 확인되었다.

[0209] 이에, 본 발명에서는 파릴렌 박막이 PC-12 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 탐구하였다.

[0210] 통상적으로, 일부 미세소관-연관 단백질 및 중간 섬유가 신경돌기 발생 프로세스와 연관이 있고, 핵심적인 세포 골격 단백질은 NF-H인 것으로 알려져 있다.

- [0211] 따라서, 48시간 동안 인큐베이션한 후, 서로다른 파릴렌 박막 상의 PC-12 세포에서 분화 마커 단백질인 NF-H를 면역염색하였다.
- [0212] 도 5(a)에서 보듯이, UV-처리 파릴렌-N, 파릴렌-C, 및 UV-처리 파릴렌-C에서 배양된 대부분의 PC-12 세포에서 NF-H의 강한 발현이 관찰되었다.
- [0213] 그러나, UV-처리 전 파릴렌-N 박막에서 배양된 PC-12 세포의 경우, 상대적으로 매우 낮은 형광 신호가 관찰되어 낮은 NF-H 발현을 나타내었다.
- [0215] 또한, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 표면에서 배양된 PC-12 세포로부터 얻은 전-세포 추출물의 웨스턴 블로팅에 의해 NF-H의 발현을 분석하였다.
- [0216] 도 5(b)에서 보듯이, UV-처리 전 파릴렌-N 박막에서 배양된 PC-12 세포의 경우, 매우 낮은 NF-H 발현을 나타내었다.
- [0217] 그러나, UV-처리 파릴렌-N, 파릴렌-C, 및 UV-처리 파릴렌-C 박막에서는 쉽게 NF-H의 발현을 탐지할 수 있었다.
- [0218] 파릴렌-C 박막에서 PC-12 세포의 신경돌기 발생은 24시간 동안의 인큐베이션 후에 일어났다(도 1(a) 참조).
- [0219] 도 5(a)에서 보듯이, UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막의 경우, 형광 염색에 따라 NF-H의 발현이 관찰되었고, 웨스턴 블로팅 결과(도 5(b)) 또한 NF-H의 발현을 확인시켜 주었다.
- [0221] 또한, PC-12 세포의 NGF-매개 분화 도중 사이클린 D1의 발현이 급격하게 증가하는 것으로 보고된 바 있다.
- [0222] 따라서, PC-12 세포 분화의 또 다른 마커로서, 4종의 파릴렌 박막으로부터 얻은 PC-12 세포 추출물에서 사이클린 D1을 프로브하였다.
- [0223] 도 5(b)에서 보듯이, 4종의 파릴렌 박막으로부터 얻은 PC-12 세포 추출물에서 사이클린 D1의 발현이 탐지되었다.
- [0224] 그러나, UV-처리 전 파릴렌-N 박막의 경우, UV-처리 파릴렌-N 박막 및 UV-처리 전/후 파릴렌-C 박막보다 웨스턴 블로팅 신호가 상대적으로 더 약하였다.
- [0225] 액틴으로 불리는 하우스키핑 단백질의 경우, 4종의 파릴렌 박막에서 배양된 PC-12 세포에 대해 동등하게 높은 발현 수준을 나타내었다.
- [0226] 이러한 결과는 24시간 동안의 인큐베이션 후, 3종의 파릴렌 박막(UV-처리 전 파릴렌-N 박막은 제외)에서 PC-12 세포의 분화가 진행됨을 보여준다.
- [0228] 또한, 세포가 증식할 때 Ki67로 불리는 단백질이 발현되는 것으로 알려져 있다.
- [0229] 따라서, NF-H와 함께 Ki67도 면역염색하여, 신경돌기 발생을 동반한 분화 도중 PC-12 세포의 증식이 일어나는지 여부를 결정하였다.
- [0230] 도 5(a)에서 보듯이, 4종의 파릴렌 박막에서 배양된 PC-12 세포에서 Ki67가 발현되는 것으로 확인되었다.
- [0231] 모든 세포 중 Ki67-포지티브 세포의 백분율은 파릴렌-N, UV-처리 파릴렌-N, 파릴렌-C, 및 UV-처리 파릴렌-C 박막에 대해 각각 $51.3\% \pm 9.9\%(n = 4)$, $86.3\% \pm 9.9\%(n = 4)$, $65.9\% \pm 11.0\%(n = 4)$, 및 $89.6\% \pm 4.0\%(n = 4)$ 였다.
- [0232] 병합된 형광 이미지 결과, 동일한 PC-12 세포에서 증식 마커 단백질(Ki67) 및 분화 마커 단백질(NF-H)이 모두 발현되는 것으로 밝혀졌다.
- [0233] 특히, UV-처리 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에서 UV-처리 전 파릴렌 박막보다 Ki67이 강하게 발현되었다.
- [0234] 이러한 결과는 UV-처리 파릴렌 박막이 PC-12 세포의 증식 및 분화를 동시에 유발함을 의미한다.

- [0236] PI 염색 및 형광 활성 세포 분류기(FACS)에 의해 세포 주기를 분석하고, 이어서 4종의 파릴렌 박막에서 배양된 PC-12 세포 중 세포 상 비율을 계산하였다.
- [0237] 4종의 파릴렌 박막에서 24, 48 및 72시간 동안 배양된 PC-12 세포의 세포 주기를 분석하여, 그 결과를 도 6(a)에 나타내었다.
- [0238] 24, 48 및 72시간 동안 배양된 각 PC-12 세포 집단에 대해 세포 주기 상 G0/G1, S 및 G2/M의 비율을 평가하였다.
- [0239] PC-12 세포의 증식 도중, G0/G1 상보다 세포 주기 상 S 및 G2/M의 출현율이 증가한 것으로 나타났다.
- [0240] PC-12 세포가 분화할 때는, PC-12 세포의 정지상으로서 G0/G1 상의 출현율이 증가하고, G2/M상의 출현율은 감소한 것으로 관찰되었다.
- [0241] 도 6(a)에서 보듯이, 배양 기간 0 ~ 24시간 동안, 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막은 UV-처리 전/후에 따라 현저하게 상이한 G0/G1 및 S상 비율을 나타내었다.
- [0242] 파릴렌 박막의 UV-처리 후, 양 파릴렌 박막의 경우 모두 G0/G1 상이 감소하고, 동시에 S 상은 증가하였다.
- [0243] UV-처리 전/후 파릴렌-N 박막에 대한 G0/G1 상 세포 및 S 상 세포의 비율은 각각 42%:36% 및 37%:44%로 평가되었다.
- [0244] 파릴렌-C 박막의 경우, G0/G1 상 세포 및 S 상 세포의 비율은 각각 40%:37% 및 31%:47%로 평가되었다.
- [0245] 따라서, UV-처리 파릴렌 박막 2종의 박막 모두에 있어, 세포 주기 상의 비율이 [G0/G1 상 > S 상]에서 [G0/G1 상 < S 상]으로 변화하였다.
- [0246] 배양 기간 24시간 후, 세포 주기 상의 비율은 여전히 [G0/G1 상 > S 상] 패턴을 따랐으며, G0/G1 상 세포의 비율은 배양 시점 72시간까지 점차 증가하였다.
- [0247] 배양 기간 0 ~ 48시간 동안, 모든 파릴렌 박막에서 G2/M 상 세포의 수가 증가하였고, 이러한 세포 수는 일정하게 유지되었다.
- [0248] 이러한 결과는 증식 속도가 48시간까지 증가하고, 이어서 72시간까지 유지될 수 있음을 보여준다.
- [0249] 따라서, 배양 기간 0 ~ 24시간 동안 서로다른 세포 증식 속도를 갖는 UV-처리 전/후 파릴렌 박막은 배양 기간 72시간 후 총 세포 수에 있어서 상당한 차이를 유발하였다.
- [0250] 도 1(a)에서 보듯이, 배양 기간 24시간 동안 PC-12 세포로부터 신경돌기의 발생이 관찰되었다.
- [0251] 세포주기 분석 결과를 볼 때, 배양 시점 24시간 후 PC-12 세포의 분화가 급격하게 증가한 것으로 여겨진다. 이는 PC-12 세포의 G0/G1 정지상 출현율이 배양 시점 24시간 후에 급격하게 증가하고, 배양 시점 48시간 후에는 유사분열 상의 비율이 유지되었기 때문이다.
- [0252] 이러한 결과는 UV-처리 전/후 파릴렌-N 박막 상의 PC-12 세포가 계속해서 증식하고, 또한 동시에 분화가 일어남을 의미한다.
- [0254] 도 6(b)에서 보듯이, 배양 시점 24시간까지 증식이 급격하게 증가하고, 이어서 증식 속도가 일정하게 유지되었다.
- [0255] 이러한 결과는 배양 기간 0 ~ 72시간 동안 증식이 계속해서 발생할 수 있음을 보여준다.
- [0256] 반면, 배양 시점 48시간 후에 유사분열 상(G2/M 상)의 비율이 변화였고, 배양 시점 24시간 후에 정지상의 출현율이 증가하였다.
- [0257] 이러한 결과는 배양 시점 48시간 후에 분화가 증가되었음을 의미한다.
- [0258] 따라서, UV-처리 파릴렌-C 및 파릴렌-N 박막은 신경돌기 발생과 더불어 PC-12 세포의 증식 및 분화를 동시에 촉진할 수 있는 매우 적합한 소재가 될 수 있다.

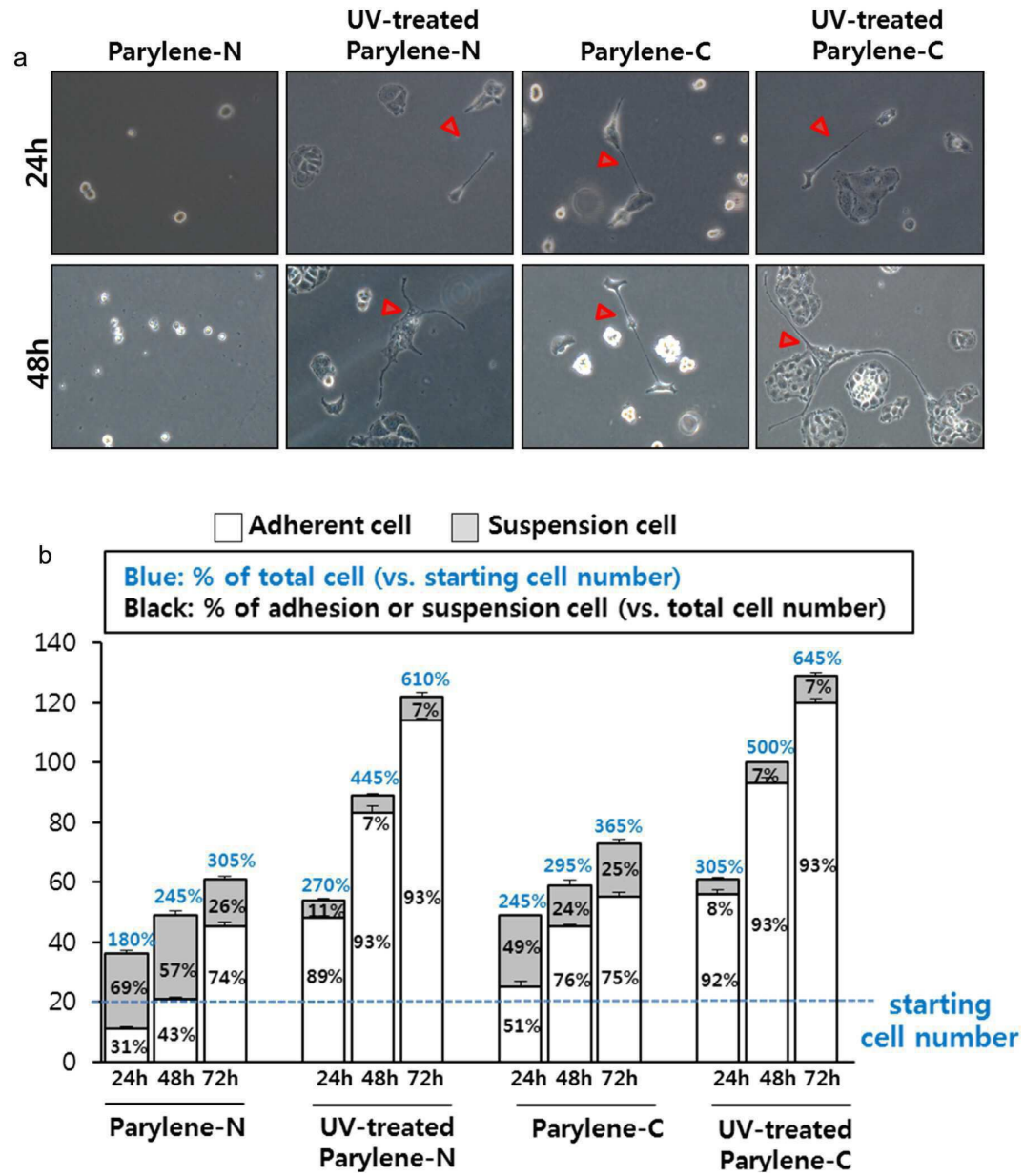
- [0260] UV-처리 전/후 파릴렌 박막의 차이점은 산소-관련 기능기의 존재이다.
- [0261] 이러한 산소-관련 기능기는 파릴렌 박막의 친수성을 증가시키고, 그 결과 단백질 흡착 및 세포 부착이 더욱 잘 되게 하였다.
- [0262] 산소 플라즈마 처리와 달리, UV-처리 파릴렌 박막은 장기적인 안정성이 뛰어나다.
- [0263] 산소 플라즈마 처리는 산소 원자의 충돌에 의해 수행되는데, 이러한 충돌이 파릴렌 표면을 거칠게 만드는 반면, UV-처리는 파릴렌 표면의 거칠도에 거의 영향을 주지 않는다.
- [0264] 또한, 산소 플라즈마 처리는 파릴렌 박막의 에칭을 유발하는바 두꺼운 파릴렌 박막에만 사용할 수 있는 반면, UV-처리는 얇은 파릴렌 박막에도 사용이 가능하여 관련 분야의 처리방법으로서 더욱 적합한 프로세스가 된다.
- [0266] **결과 검토**
- [0267] 본 발명에서는, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막을 대상으로 화학적 환경이 PC-12 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 조사하였다.
- [0268] 파릴렌-N 박막의 경우, UV-처리에 따라 부착 세포의 비율이 31%에서 89%로 변하였고, 72시간 동안 인큐베이션 후 총 세포 수는 305%에서 610%로 2배 증가하였다.
- [0269] 파릴렌-C 박막의 경우, UV-처리 전/후 부착 세포의 비율은 각각 74% 및 93%였고, UV-처리에 따라 총 세포 수는 365%에서 645%로 2배 가까이 증가하였다.
- [0270] 이러한 결과는 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막 모두에 있어, 표면의 UV-처리가 PC-12 세포의 부착 비율 및 증식 속도를 개선하는데 매우 효과적인 수단임을 보여주었다.
- [0271] 또한, 세포 부착 및 증식 속도의 증가를 설명하기 위해, UV-처리 전/후 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막의 표면 특성 차이를 분석하였다.
- [0272] 그 결과, UV-처리에 의해 파릴렌-N 및 파릴렌-C 박막에 산소-관련 기능기가 도입되고, 이로 인해 친수성 및 단백질 고정화 효율이 증가되는 것으로 확인되었다. 즉 UV-처리 파릴렌 박막에서 PC-12 세포의 부착성이 개선된 것은 파릴렌 표면의 친수성이 증가함에 따라 단백질 고정이 많아졌기 때문이다.
- [0273] 또한, 형광 염색 테스트 결과, 동일한 세포에서 증식 마커 단백질(Ki67), 분화 마커 단백질(NF-H), 및 사이클린 D1의 발현이 모두 관찰되었다.
- [0274] 아울러, PI 염색 후 FACS를 이용하여 세포 주기를 분석하고, 증식하는 PC-12 세포의 비율을 통계적으로 평가하였다.
- [0275] G0/G1, S 및 G2/M과 같은 세포 주기 상의 비율을 통계 분석한 결과, UV-처리 파릴렌-C 및 파릴렌-N 박막은 신경 돌기 발생과 더불어 PC-12 세포의 증식 및 분화를 동시에 촉진하는데 매우 적합함이 판명되었다.

산업상 이용가능성

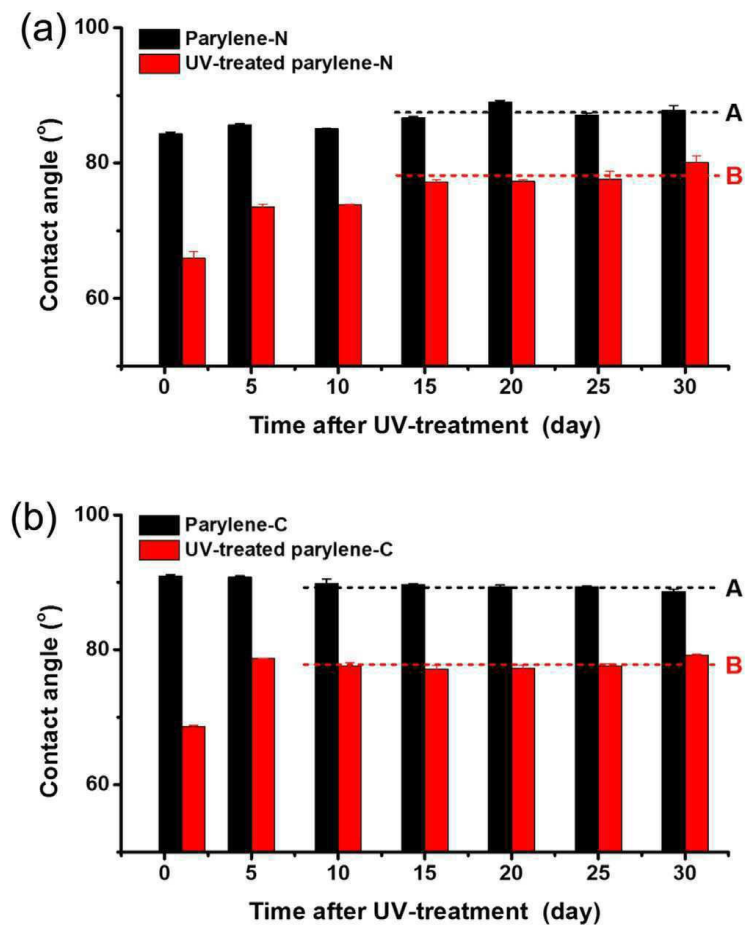
- [0277] 본 발명에서 제공하는 신경세포의 배양(증식 및 분화) 기술은 인체이식용 신경세포의 확보를 위한 미래기술에 해당하여 높은 시장 잠재성을 가지고 있다.
- [0278] 또한, 본 발명은 개별 세포의 배양에 최적화된 표면처리된 세포배양용기를 국내 자체적으로 공급할 수 있는 활로를 제공할 수 있다.
- [0279] 또한, 본 발명에서 제공하는 자외선으로 표면처리된 파릴렌-N 또는 파릴렌-C가 도포된 세포배양용기는 신경세포 뿐만 아니라 의학활용성이 높은 기타 세포의 배양에도 활용이 가능한 세포배양 관련 원천기술로 판단되며, 향후 넓은 분야에 응용이 가능할 것으로 기대된다.

도면

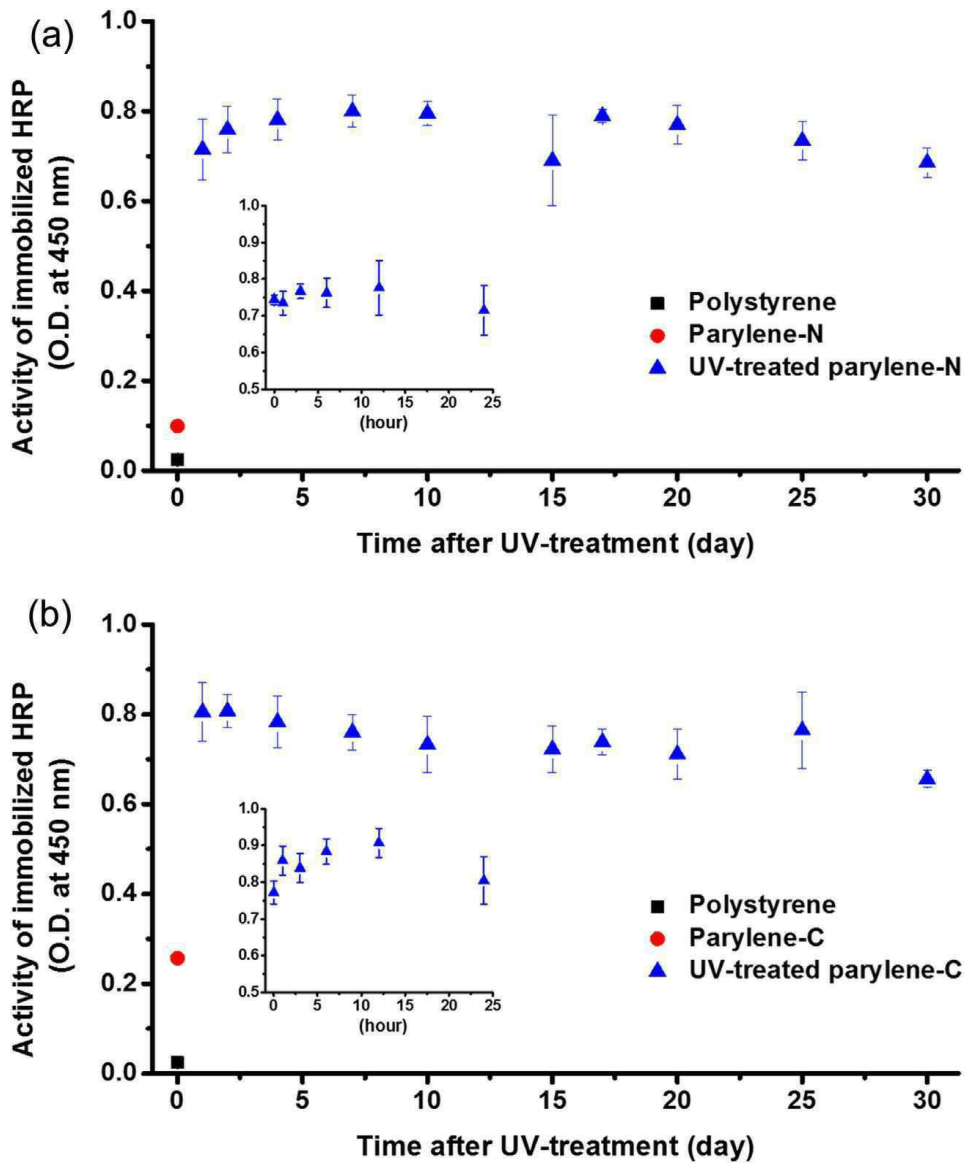
도면1



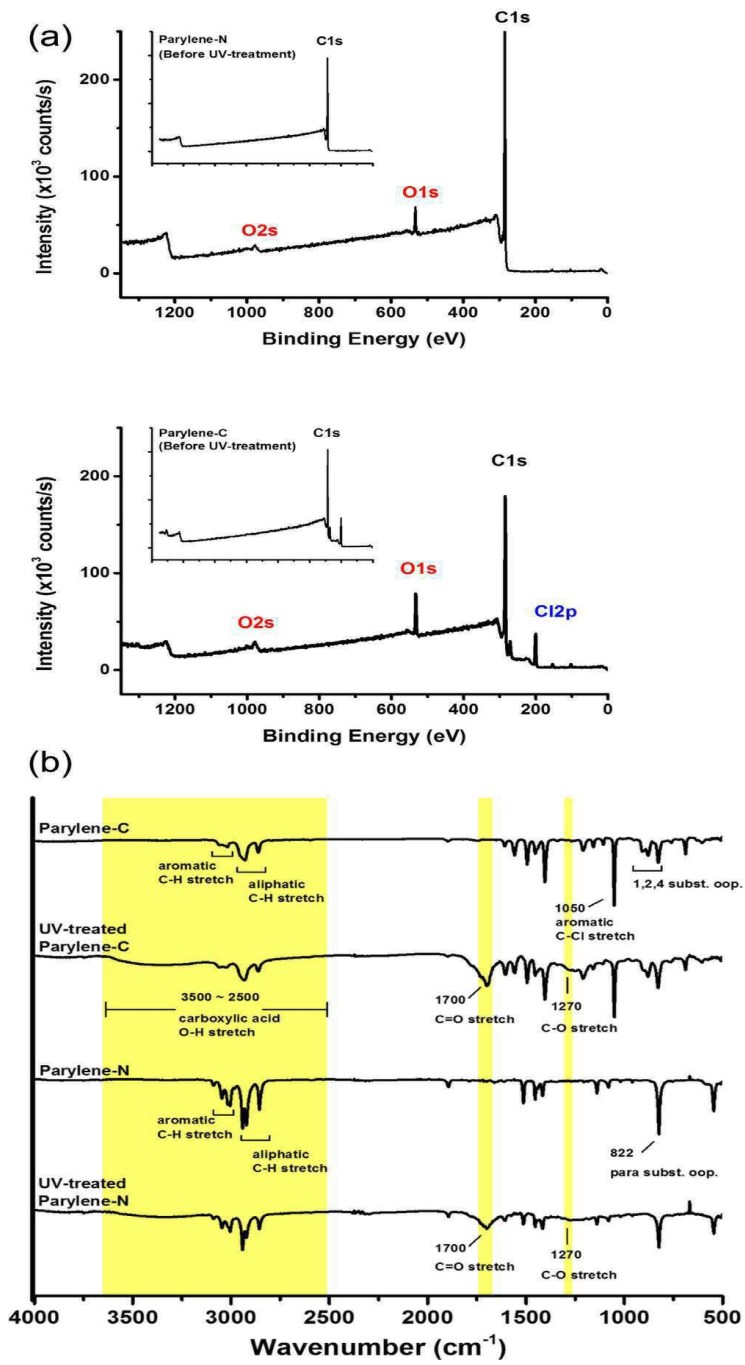
도면2



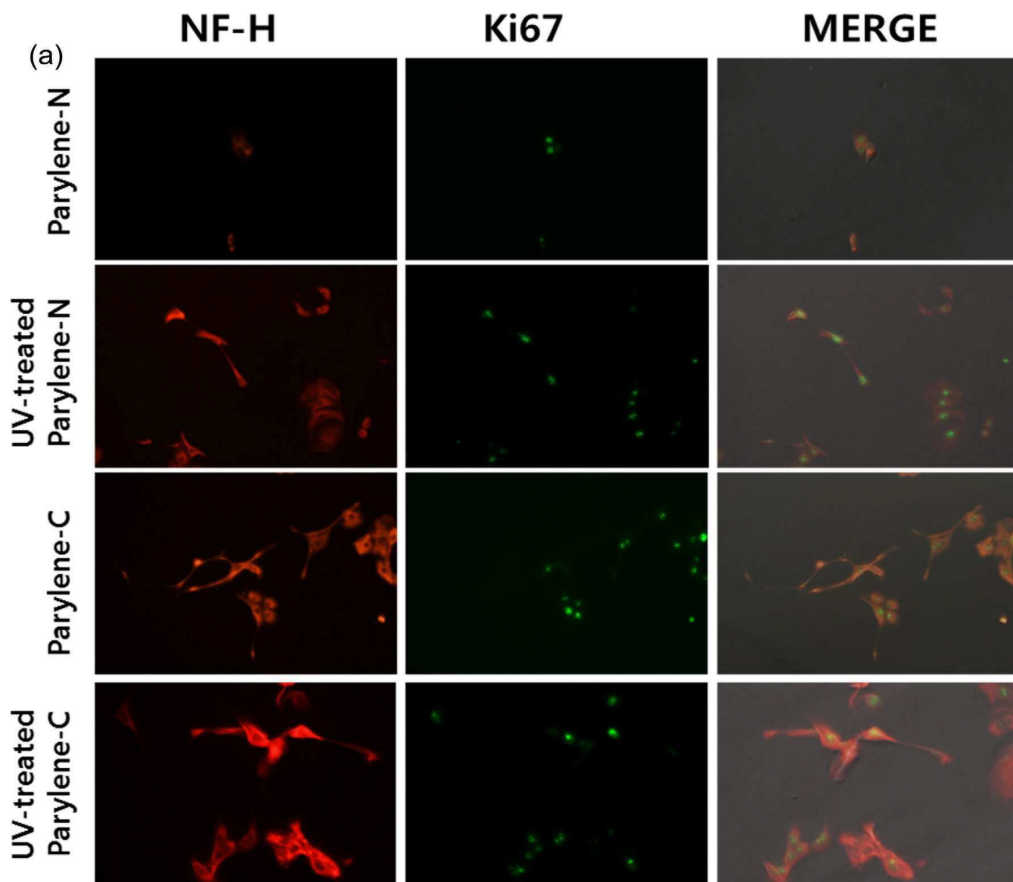
도면3



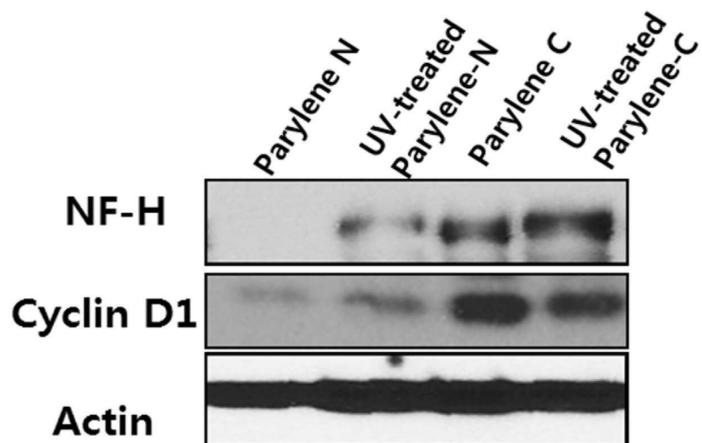
도면4



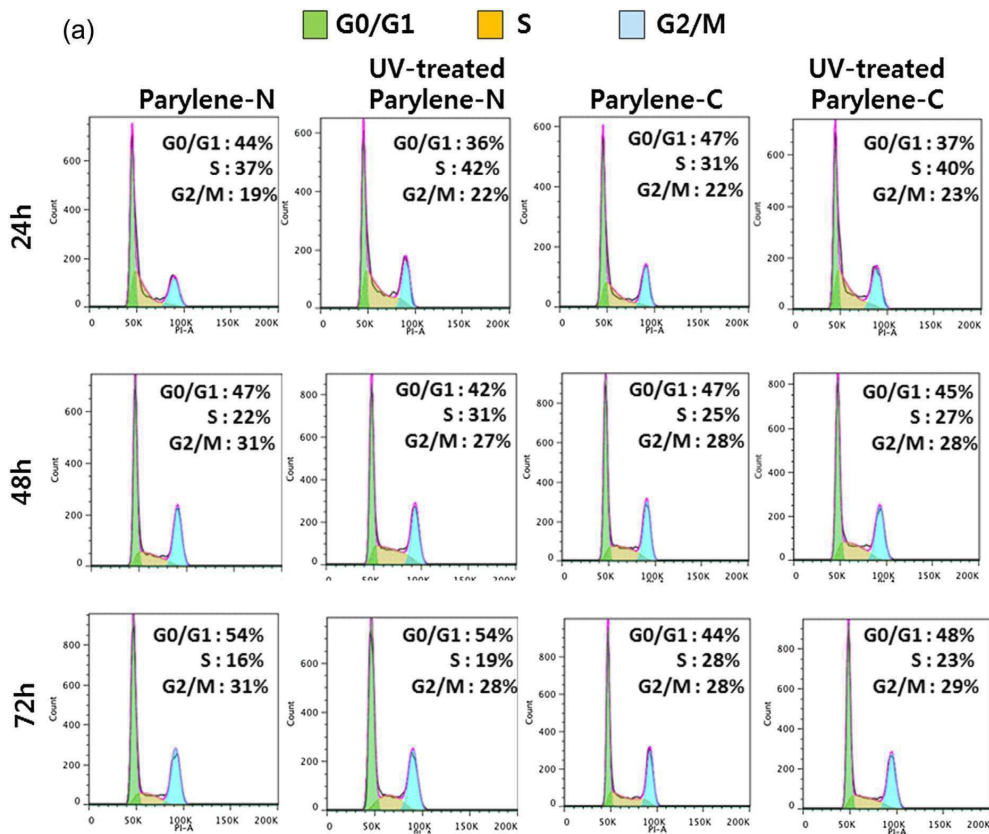
도면5



(b)



도면6



(b)

Incubation time (h)	Influence of UV-treatment		Common effects of parylene films
	Before UV-treatment	After UV-treatment	
0 - 24 h	G0/G1 > S	G0/G1 < S	Increase of G2/M
24 - 48 h	Increase of G0/G1, G0/G1 >> S		
48 - 72 h			Maintenance of G2/M