creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

농학석사 학위논문

3차원 배양 기질 특성이 RAW264.7 세포의 구조, 증식 및 분화거동에 미치는 영향

Effect of three-dimensional matrix properties on morphology, proliferation, and differentiation of RAW264.7 cells

2017년 8월

서울대학교 대학원

바이오시스템 · 소재학부

김 민 채

3차원 배양 기질 특성이 RAW264.7 세포의 구조, 증식 및 분화거동에 미치는 영향

Effect of three-dimensional matrix properties on morphology, proliferation, and differentiation of RAW264.7 cells

지도 교수 기 창 석

이 논문을 농학석사 학위논문으로 제출함

2017년 5월

서울대학교 대학원

바이오시스템 · 소재학부

김 민 채

김민채의 농학석사 학위논문을 인준함

2017년 6월

위 원 장 현 진 호 (인)

부위원장 기 창 석 (인)

위 원 이 기 훈 (인)

초 록

본 연구에서는 티올-노보닌 클릭광중합법(thiol-norborn-ene photo-click polymerization)을 이용하여 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol), PEG) 기반의 삼차원 세포 배양 기질을 제조하고, 대식세포의 한 종류인 RAW264.7을 캡슐 레이션하여 생리학적 거동을 살펴보고자 하였다. 이 때 하이드로젤의 분해성, 생활성 분자(콜라겐Ⅰ), 전단저장탄성율(G')을 조절하였으며 제조한 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 배양 1일차 Live/Dead 형광염색 결과를 통해 모든 조건에서 70-80% 이상의 초기 세포 생존율을 보임을 확인하였다. 기질의 분해성은 세포가 분비하는 여러 가지 단백질 분해효소에 의해 분해되는 펩타이드 가교제를 사용하여 조절하였다. 기질을 재구축 하는데 필요한 단백질 분해효소(MMP9, MMP14, CatK)의 발현양을 유전자 수준에서 관찰하여 2차원 TCP에 배양한 세포에 비해 3차원 하이드로젤 내에 캡슐레이션 하였을 때 발현양이 증가함을 확인하였다. 또한 생활성 성분인 콜라겐Ⅰ의 첨가는 배양 시간에 따른 세포회합체의 크기 증가에 영향을 다소 미치는 것을 알 수 있었다. 콜라겐 고정화 유무가 염증성 사이토카인(iNOS, COX2, TNF-α)의 발현에는 영향을 미치지 않았지만, 2차원 TCP에 배양한 경우보다 하이드로젤에 캡슐레이션된 세포에서 발현양이 4배이상 증가하는 것으로 보아 2차원 배양과는 다른 거동을 보임을 확인하였다. 마지막으로 하이드로젤의 전단저장탄성율은 가교제의 농도를 조절하여 가교밀도를 달리함으로써 조절하였다. 이 때 기질 분해성에 의한 영향도 함께 살펴보기 위해 각각 MMP 비민감성 가교제와 MMP 민감성 가교제를 이용하여 하이드로젤을 제조하였다. 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 증식과 형태, 분화능은 기질의 분해성보다는 탄성율에 더 큰 영향을 받음을

확인할 수 있었다. 기질의 분해성에 관계없이 탄성율이 낮은 하이드로젤에서 세포의 대사활성이 더 높게 나타나며 세포회합체도 보다 크게 형성함을 확인하였다. 염증성 사이토카인 발현양의 경우 2차원 TCP 대비 3차원 하이드로젤 내에 캡슐레이션된 세포에서, 그리고 분해성에 관계없이 High G' 하이드로젤에서 발현양이 증가함을 알 수 있었다. 이를 통해 다양한 삼차원 환경에서의 대식세포의 생리학적 거동을 예측할 수 있고, PEG 기반의 하이드로젤이 대식세포의 배양 플랫폼으로 적합함을 확인하였다.

주요어 : 대식세포, RAW264.7, 하이드로젤, 폴리에틸렌글리콜, 3차원 세포 배양
학 번 : 2015-23027

목 차

초 록 i
목 차 ii
List of Tables v
List of Figures vi

제 1 장 서 론 1

제 2 장 문헌 연구 4
2.1. 하이드로젤을 활용한 3차원 세포 배양 기질 4
2.2. 티올-노보닌 광가교 PEG 하이드로젤 6
2.3. 면역세포의 3차원 배양 8

제 3 장 재료 및 방법 12
3.1. 재료 12
3.2. 대식세포의 캡슐레이션 13
3.3. 세포 대사활성 분석 18
3.4. DNA 정량분석 18
3.5. 아데노신삼인산 정량분석 18
3.6. 형광현미경 분석 19
3.7. 역전사중합효소연쇄반응 20
3.8. 효소결합면역흡착측정법 21

3.9. 전단탄성율 측정 21
3.10. 통계 처리 23

제 4 장 결과 및 고찰 24
4.1. 하이드로젤의 분해성이 대식세포의 증식 및 기질 분해 효소 발현에 미치는 영향 24
4.2. 하이드로젤 내에 존재하는 콜라겐 I 이 대식세포의 증식 및 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향 35
4.3. 하이드로젤의 분해성 및 전단저장탄성율이 대식세포의 증식 및 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향 43

제 5 장 결 론 57

참고문헌 59
Abstract 74

List of Tables

[Table 1] Protease-insensitive and -sensitive dithiol cross-linkers for hydrogel formation. 15

[Table 2] Formulation of thiol-norbornene PEG hydrogels for RAW264.7 cell encapsulation. 16

[Table 3] Primer sequences of genes for RT-qPCR. ... 22

[Table 4] Cell viabilities of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability 1-h post-encapsulation. The viability value was obtained from the acquired Live/Dead fluorescence images ($n \geq 4$). 27

[Table 5] Cell viabilities of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability and stiffness 1-h post-encapsulation. The viability value was obtained from the acquired Live/Dead fluorescence images ($n \geq 4$) 50

List of Figures

[Figure 1] Schematics of RAW264.7 cell encapsulation in thiol-norbornene PEG hydrogels. (A) Formation of cell-laden hydrogels of different degradability with protease-sensitive dithiol cross-linkers in the presence of collagen I. (B) Stiffness control of hydrogel by altering the mixture ratio of dithiol cross-linker and L-cysteine (pendant norbornene-blocker) at a fixed PEG concentration (8 wt%). 17

[Figure 2] Live/Dead fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability 1-h and 4-day post-encapsulation (green: calcein-AM; red: ethidium homodimer-1, scale: 100 μm). 26

[Figure 3] (A) Phase-contrast images of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability 1- and 4-day post-encapsulation (scale: 100 μm). (B) Cell cluster size distributions 1- and 4-day post-encapsulation (mean ± SEM). 28

[Figure 4] (A) Metabolic activity and (B) DNA content of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability. Each value is presented in fold change compared to the

mean value measured on day 1 or day 0 for resazurin assay or total DNA content assay, respectively (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05, **p < 0.01). 29

[Figure 5] Stiffness changes of cell-laden PEG hydrogels of different degradability during 4-day culture. (A) Shear elastic moduli and (B) fold changes 1- and 4-day post-encapsulation (n = 3, mean ± SD). 32

[Figure 6] Protease gene expression levels of RAW264.7 cells encapsulated in protease-insensitive PEG hydrogel (DTT) 4-day post-encapsulation. 1-fold is an expression level of cells cultured on 2D TCP (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05, ***p < 0.001). 34

[Figure 7] Shear elastic moduli of PEG4NB hydrogels formed without or with collagen I for RAW264.7 cell encapsulation. The measu-rement was conducted after incubation in PBS for 24 h (n = 3, mean ± SD). 36

[Figure 8] (A) Phase-contrast images of RAW264.7 cells encapsulated in PEG secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I 1- and 4-day post-encapsulation (scale: 100 μm). (B) Cell cluster size distributions 1- and 4-day post-

encapsulation (mean ± SEM). 37

[Figure 9] Metabolic activity of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I. The values are presented in fold change compared to the mean fluorescence intensity on day 1 (n = 3, mean ± SD). 39

[Figure 10] (A) Live/Dead fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I 4-day post-encapsulation (green: calcein-AM; red: ethidium homodimer-1, scale: 100 μm). (B) Fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed with collagen I 1- and 4-day post-encapsualtion (red: rhodamine-phalloidin; blue: DAPI, scale: 50 μm). 40

[Figure 11] Inflammatory cytokine gene expression levels of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I 4-day post-encapsulation (A: iNOS; B: COX2; C: TNF-α). 1-fold is an expression level of cells cultured on 2D TCP in the absence of collagen I (n = 3, mean ± SD). 42

[Figure 12] Effect of presence of L-cysteine on shear modulus of PEG hydrogel and initial metabolic activity of RAW264.7 cells after encapsulation. (A) Shear elastic moduli of MMP-insensitive PEG hydrogels formed with or without L-cysteine (8 wt% PEG4NB; 5 mM DTT; 6 mM L-cys, n = 3, mean ± SD). (B) Metabolic activity measured by resazurin assay 1-day post-encapsulation (n = 3, mean ± SD). 44

[Figure 13] Shear elastic moduli of PEG hydrogels of different degradability and stiffness (n = 3, mean ± SD). 46

[Figure 14] ATP contents of RAW264.7 cells encapsulated in (A) MMP-insensitive and (B) MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness 1-h post-encapsulation. (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05). 47

[Figure 15] Live/Dead fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness 1-h and 4-day post-encapsulation (green: calcein-AM; red: ethidium homodimer-1, scale: 100 μm). 48

[Figure 16] (A) Phase-contrast images of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness

1- and 4-day post-encapsulation (scale: 100 μm). (B) Cell cluster size distributions 1- and 4-day post-encapsulation (mean ± SEM, **p < 0.01; ***p < 0.001). 51

[Figure 17] Metabolic activities of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness. The values are presented in fold change compared to the mean fluorescence intensity on day 1 (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). 52

[Figure 18] Inflammatory cytokine gene expression levels of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels 4-day post-encapsulation (A: iNOS; B: COX2; C: TNF-α). 1-fold is an expression level of cells cultured on 2D TCP (n = 3, mean ± SD, **p < 0.01; ***p < 0.001). 54

[Figure 19] Tumor necrosis factor-α (TNF-α) expression levels of RAW264.7 cells in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels 4-day post-encapsulation (n = 3, mean ± SD). 55

제 1 장 서 론

체내의 세포 및 조직은 복잡한 3차원 구조를 이루고 있다. 각각의 구성 성분들은 서로 물리적 및 화학적 상호 작용을 주고받으며 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다[4-6]. 그럼에도 불구하고 전통적인 세포 배양 연구에서는 2차원의 조직 배양 접시(tissue culture plate, TCP)가 활용되어 왔다. 하지만 2차원 세포 배양의 경우 생체 내의 3차원 구조를 모방하는데 어려움이 있을 뿐만 아니라 세포 사이의 상호작용이 평면적으로 인접한 세포 가장자리에서만 일어난다는 특징이 있다[6, 7]. 따라서 세포 내에서 유전자 발현이나 특정 물질에 대한 반응이 실제 생체 내에서의 생리학적 거동과 다를 수 있다는 한계점을 지니고 있다[8-10]. 때문에 최근에는 3차원 배양기질을 이용한 세포 배양 연구 방법이 주목 받고 있다[11-13]. 3차원 환경에서 세포를 배양할 경우 실제 체내의 구조 및 환경을 더 비슷하게 모방할 수 있고 세포간 상호작용도 실제와 유사하다는 장점이 있다[12, 14]. 이에 다공성 구조체나 세포가 제거된 생체조직(decellularized tissue), 하이드로젤 등의 다양한 배양기질이 3차원 세포 배양에 이용되고 있다[12, 15, 16].

하이드로젤은 다량의 수분을 함유한 3차원 고분자 네트워크로 이루어진 재료이다. 하이드로젤은 고유의 점탄성을 나타내며 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 구조적 및 물리적으로 유사하여 조직공학용 소재나 3차원 세포 배양 기질로 널리 활용되고 있다[17]. 네트워크 구조와 구성 성분을 조절함으로써 실험자가

내부에 배양된 세포의 생리학적 거동을 용이하게 제어할 수 있다. 또한 하이드로젤은 높은 공극도를 가지며 공극 구조의 조절이 쉽기 때문에 각종 생리활성 물질의 담지와 방출 거동의 조절이 용이하다[18-21]. 따라서 하이드로젤 기반 3차원 세포 배양 기질은 환경 변화에 따른 세포의 반응을 분석하기에 적합한 환경을 제공할 수 있다[22].

폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol), PEG)은 높은 친수성과 더불어 우수한 생체적합성 및 생체불활성(bio-inert)을 나타낸다. 또한 말단에 위치한 수산기(hydroxyl group, -OH)에 다양한 관능기를 도입함으로써 PEG에 기능성을 도입할 수도 있다[23, 24]. 따라서 PEG는 생체재료용 하이드로젤 제조에 널리 이용되고 있다. PEG를 이용한 하이드로젤 제조는 다양한 화학적 가교법에 의해 이루어 질 수 있다[25-27]. 그 중 최근에는 라디칼-매개 단계성장광중합법(radical-mediated step growth photo-polymerization)이 3차원 세포 배양 기질 제조에 널리 이용되고 있다[28-31]. 단계성장광중합의 경우 균일한 하이드로젤 네트워크 구조를 형성할 수 있으며 반응 과정이 빠르고 효율적이다. 대표적인 반응으로 티올-노보닌 광클릭(thiol-norbornene photo-click) 반응이 있다. 티올-노보닌 반응은 쉬운 하이드로젤 물성 조절이 가능하게 할 뿐만 아니라 반응 과정에서의 세포독성이 비교적 낮아 세포의 3차원 캡슐레이션에 적합한 하이드로젤 제조 기법이다[31-34].

면역세포는 항상성과 건강을 유지하는 신체의 면역 기능에서 핵심적인 역할을 맡고 있는 세포이다. 일반적인 세포가 단일 환경에서 생리학적 거동을 나타내는 것과는 달리 면역세포는

다양한 환경에 노출될 수 있다[35]. 예를 들어 단핵구는 혈관이나 림프절 내에서 부유하는 상태로 존재하다가 병원성 물질의 침입 등 자극을 받게 되면 자극원으로 이동하여 ECM 내로 들어간다. ECM을 통과하는 과정 중에 단핵구는 대식세포로 분화하게 되며 대식 작용과 염증작용을 제어하는 역할을 한다. 그런데 면역세포가 통과하는 조직의 종류에 따라 ECM을 구성하는 성분 및 탄성이 다르기 때문에 면역세포의 생리학적 거동은 다양한 3차원 환경에 의해 큰 영향을 받을 것으로 생각된다[36-38]. 그럼에도 불구하고 면역세포에 대한 대부분의 연구에서는 TCP를 이용한 2차원 표면배양 또는 현탁배양법(suspension culture)이 이용되고 있다[39, 40]. 한편, 최근 들어서는 배양기질 특성이 면역세포의 생리학적 거동에 미치는 영향에 대한 연구 사례가 보고되고 있다[41]. 뿐만 아니라 3차원 기질 내에서의 면역세포의 생리학적 거동에 대한 연구도 시도되고 있다[42]. 그럼에도 불구하고 3차원 배양 조건에서 다양한 환경 인자들이 면역세포의 거동에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 기초적인 단계에 머물러 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는 PEG 기반의 하이드로젤에 대식세포주인 RAW264.7을 캡슐레이션 하여 3차원 배양하고 기질의 분해성 및 구성 성분, 탄성이 대식세포의 생리학적 거동에 미치는 영향을 살펴보았다. 기질분해성의 경우 단백질 분해효소 민감성 가교제를 달리하여 조절하였으며 생활성 분자인 콜라겐을 기질 내에 고정화하여 콜라겐 유무에 따라 면역세포의 생리학적 거동을 관찰하였다. 마지막으로 가교밀도를 조절하여 하이드로젤 기질의 탄성을 달리함으로써 다양한 3차원 배양 환경이 대식세포에 미치는 영향을 고찰해 보았다.

제 2 장 문헌 연구

2.1. 하이드로젤을 활용한 3차원 세포 배양 기질

3차원 세포 배양을 위한 하이드로젤 제조에는 콜라겐[43], 히아루론산[44], 실크[45] 등과 같은 천연고분자 또는 PEG[2], 폴리-N-아이소프로필 아크릴아마이드(poly(N-isopropylacryl-amide, poly(NIPAAm))[46] 등의 합성고분자가 사용된다. 천연고분자 기반 하이 드로젤의 경우 생체적합성이 우수하다는 장점은 있지만, 물성 조절 에 한계가 있고 재료의 재현성이 낮다는 문제가 있다[47, 48]. 특히 ECM 유래 천연고분자 하이드로젤의 경우 생분해성이 높아 장기간 의 세포 배양에 적합하지 않다[49]. 반면 합성고분자 기반 하이드 로젤의 경우, 반응기 및 분자의 구조를 조절함으로써 하이드로젤의 물리화학적 특성을 쉽게 조절할 수 있다. 또한, 생분해성의 조절이 용이하고 재료 물성의 재현성이 높다는 장점을 지닌다[50, 51].

천연고분자 기반 3차원 세포배양용 하이드로젤 제조에는 주로 포유류 유래 콜라겐이 사용된다[43, 52, 53]. 콜라겐은 산성조건의 수용액에서 용해된 상태로 존재하지만 생리학적 조건(pH 7.4, 37℃)에서 삼중나선 구조로 회합되어 물리적 가교를 형성함으로써 하이드로젤 내에 세포를 캡슐레이션할 수 있다[54]. 콜라겐 기반의 하이드로젤은 다양한 세포(암세포[53], 연골세포[55, 56], 섬유아세포[57, 58])의 3차원 배양에 적합한 것으로 알려져 있다. 특히, Hong 등은 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cell, VSM-

C)를 콜라겐 하이드로젤에 3차원 배양한 경우 세포외기질의 구성 성분(예, collagen Ⅰ·Ⅲ, tropoelastin) 및 인테그린 아단위(integrin subunit, 예, integrin $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 3$)와 관련한 유전자의 발현이 2차원 배양에서보다 증가함을 확인하였다[11]. 합성고분자 기반 3차원 세포배양용 하이드로젤 제조에는 PEG가 널리 활용되고 있다. PEG는 생체적합성이 우수하고 생체불활성을 지녀 의용생체 분야나 조직공학용 지지체로 활용하기에 적합하다[59, 60]. 또한 합성 가능한 분자량 범위가 넓고 선형, 가지형, 빗형 사슬 등 다양한 구조의 구현이 가능하다[61, 62]. 뿐만 아니라 말단에 있는 수산기에 다양한 관능기를 도입함으로써 화학적 반응성을 조절하기에 용이하기 때문에 PEG는 하이드로젤 제조에 적합한 소재이다[63].

PEG 기반 하이드로젤은 다양한 물리화학적 가교법에 의해 제조될 수 있다. Peters 등은 Acryl-PEG 하이드로젤 내에 혈관내피전구세포(endothelial progenitor cell)와 혈관형성벽세포(angiogenic mural cell)를 공배양하여 삼차원 환경에서 미세혈관의 형성을 인공적으로 구현하였다[30]. Wang 등은 PEG 농도를 변화시켜 하이드로젤의 탄성을 조절함으로써 기질의 탄성이 악성뇌교종세포(glioblastoma cell)의 증식과 기질 내 이동, 형태에 미치는 영향을 보고하였다. 암세포가 증식하고 이동하기 위해 사용하는 여러 가지 단백질(예, HA receptor CD44, RHAMM, RhoA, ROCK1, MMP1, MMP2)을 유전자 수준에서 살펴봄으로써 기질의 탄성에 따라 발현량에 차이가 나타남을 확인하였다[27]. 또한 Tokuda 등은 세포 배양 기질의 차원이 달라지거나 세포 간의 상호작용을 다르게 하였을 때 악성흑색종 세포(melanoma cell)의

거동이 어떻게 달라지는지에 대해 연구하였다. 2D TCP에 배양했을 때 보다 하이드로젤 표면에 세포를 배양하거나(2D 하이드로젤) 하이드로젤 내에 암세포를 캡슐레이션했을 때 암세포의 대사활성이 증가하고 약물에 대한 민감성이 높게 나타남을 확인하였다[25].

2.2. 티올-노보닌 광가교 PEG 하이드로젤

3차원 세포 캡슐레이션을 위한 하이드로젤 제조에는 광중합을 이용한 가교법이 매우 유용하다[64]. 광중합은 간단하고 빠른 광개시 반응에 의해 사슬간 가교를 형성시키며, 조사광의 조건에 따라 가교도를 조절할 수 있다는 장점을 지니고 있다[65, 66]. 또한, 광조사를 시공간적으로 조절할 수 있기 때문에 이에 따라 하이드로젤의 물성 역시 시공간적으로 조절할 수 있다[67, 68]. 광중합 하이드로젤 제조에 있어 전통적으로 사슬성장중합(chain-growth polymerization)이 널리 이용되어 왔다[69-71]. 그러나 사슬성장중합은 비닐기(vinyl group)의 중합이 일어나는 동안 존재하는 라디칼에 의해 세포독성을 나타낼 수 있고 젤화 시간이 오래 걸리며 불균일한 네트워크 구조가 형성된다는 한계가 있다[72-74]. 한편 단계성장중합(step-growth polymerization)에 의해 제조되는 하이드로젤은 가교 후 잔여 라디칼이 적고 균일한 망상구조를 형성하기 때문에 일반적으로 사슬성장중합에 의해 제조된 하이드로젤보다 물성이 우수하다는 장점이 있다[73, 75]. 단계성장중합에 의한 네트워크 구조의 형성은 광개시 클릭반응(photo-initiated click-reaction)에 의해서 이루어질 수 있다. 다양한 클릭반응 중에서도 티올기(thiol group, -SH)와 노보닌의

이중결합 사이에 일어나는 티올-노보닌 광클릭 반응은 특히 생체재료용 하이드로젤 제조에 매우 유용하다고 알려져 있다[2, 26, 31, 32, 34, 73]. 티올과 노보닌이 일대일로 빠르게 반응하면서 광개시제에 의해 형성된 라디칼을 빠르게 소모하여 다른 반응들에 비해 상대적으로 낮은 세포독성을 가질 뿐만 아니라 생리학적 범위 내에서 반응이 일어나며 그 효율 또한 높기 때문이다[69, 76]. 최근에는 PEG 말단의 수산기에 티올 또는 노보닌을 도입하여 라디칼-매개 단계성장 광클릭반응으로 제조된 PEG 기반 하이드로젤이 주목을 받고 있다. 이 제조 방식은 하이드로젤 네트워크 구조의 조절이 용이할 뿐만 아니라 반응 효율이 높고 생체적합성이 우수하기 때문이다[33, 73, 77-79]. 실예로 McCall 등은 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트(poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA)를 이용한 사슬성장광중합과 PEG 기반 티올-노보닌 단계성장광클릭반응으로 하이드로젤을 제조하여 기질의 탄성을 비교하고, 폐상피세포(lung epithelial cell)를 캡슐레이션하여 생물학적 인자(예, lysozyme, TGF-β)들의 활성 등을 비교 평가하였다. 이를 통해 단계성장광클릭반응으로 제조한 하이드로젤이 더 적은 양의 라디칼을 생성하여 라디칼에 의한 생물학적 인자들(예, lysozyme, TGF-β)의 피해를 최소화할 수 있다는 것을 확인하였다[26]. 티올-노보닌 광중합 하이드로젤은 조직 공학 및 약물 전달용 지지체, 의용 생체 소재 등 다양하게 활용되고 있다[1, 73, 77, 78, 80-83]. 뿐만 아니라 최근에는 3차원 세포 배양을 위한 기질로 티올-노보닌 하이드로젤을 활용하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 하이드로젤 내에 간엽줄기세포 (MSC)나 암세포를 캡슐레이션하여 3차원 환경 변화에 따른 세포의 거동을

살펴보는 연구가 많이 진행되고 있다. Sridhar 등은 연골세포(chondrocyte)와 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)를 분해성이 다른 PEG 하이드로젤에 3차원 배양하여 세포의 기질 구성 성분의 발현의 차이를 관찰하였다[78]. Lin 등은 사슬성장중합법을 이용한 PEGDA 하이드로젤과 티올-노보닌 광클릭반응을 이용한 PEG 하이드로젤에 췌장 베타세포(pancreatic β-cell)을 3차원 배양하여 베타세포 구(spheroid)를 형성하였다[73]. 뿐만 아니라 Singh 등 역시 티올-노보닌 클릭반응을 이용한 PEG 하이드로젤에 암세포와 인간진피 섬유아세포(human dermal fibroblast, hDF)를 공생배양하여 암세포의 성장과 전이에 섬유아세포가 어떤 영향을 주는지 평가 하였다. 특히 고분자의 농도를 조절하여 적절한 기질 탄성을 가질 때 암세포의 세포회합체 크기 및 이동 속도가 증가함을 확인하였고, 인간진피섬유아세포를 공생배양 했을 때 암세포의 전이 속도가 빨라짐을 관찰하였다[77]. 이처럼 많은 연구자들이 다양한 세포를 캡슐레이션하여 배양 기질의 차이나 구성 성분에 따른 세포의 거동을 살펴봄으로써 티올-노보닌 PEG 하이드로젤이 3차원 배양에 효과적임을 확인하였다.

2.3. 면역세포의 3차원 배양

면역기능은 백혈구 내에 있는 면역세포를 통해 이루어지며, 면역세포는 다양한 질환의 예방 및 건강 유지에 가장 핵심적인 기능을 맡고 있다[84-86]. 면역세포는 기본적으로 골수나 혈관 내에서 부유하는 비부착성 세포로 존재하다가 병원성 물질의

침입과 같은 자극이 생기면 자극원으로 이동하는 과정에서 다양한 ECM을 통과 또는 내부에 머물게 된다. 이 때 면역세포는 ECM과 주위의 세포가 이루는 3차원 구조에 놓이게 되고, 이와 같은 3차원 환경 속에서 이동, 증식 및 분화를 통해 면역반응을 일으키게 된다. 실제 체내 ECM의 고분자 네트워크 구조는 콜라겐과 라미닌 및 엘라스틴 등 다양한 구성성분으로 이루어져 있고, 수십 Pa에서 수만 Pa에 이르기까지 넓은 범위의 전단 탄성율을 지니고 있다. 그렇기 때문에 여러 장기와 조직으로 이동 하는 면역세포는 다른 세포와 달리 극도로 다양한 3차원 환경에 노출된다. 따라서 면역세포의 생리학적 거동에 대한 연구는 매우 정밀하게 제어된 다양한 배양환경(3차원 환경 포함)을 적용하여야 하나 지금까지 현탁배양이나 TCP를 이용한 전통적인 2차원 표면 배양법이 주로 이용되어 왔다.

최근 3차원 세포배양 기법이 널리 보급되고 3차원 배양환경에서 세포의 생리학적 거동이 체내에서와 유사한 거동을 보인다는 흥미로운 연구결과가 속속 발표되고 있다. 이에 따라 하이드로젤을 활용한 면역세포 거동과 배양기질 특성 사이의 관계에 대한 연구가 시도되고 있다. 예를 들어, Previtera 등은 골 유래 면역세포(bone marrow-derived macrophage, BMM)를 탄성이 다른 하이드로젤 표면에 배양하여 기질의 탄성이 높을 경우 면역세포가 발현하는 전염증성 매개 물질(TNF-α, IL-1β, IL-6)의 발현이 증가함을 보고하였다[87]. 이 연구에서는 면역세포가 노출될 수 있는 다양한 조직의 강성을 모방하기 위해 고분자의 농도를 달리하여 하이드로젤의 영률(Young's modulds)을 300 Pa에서 230 kPa까지 넓은 범위로 조절하였다. Hanson 등은

하이드로젤 내부에 간엽줄기세포(MSC)를 3차원 배양하고 표면에 면역세포를 공생배양하여 상호 영향을 관찰하였다[88]. 하지만 이와 같은 연구는 하이드로젤 표면에 면역세포를 배양한 것으로 3차원 환경에서의 세포의 거동을 연구한 사례는 아니었다. 또한 Waldeck 등은 특정 효소가 단핵구(monocyte) 및 다형핵백혈구(호중구, polymorphonuclear leukocyte, PMN)의 부착성과 세포 사멸(apoptosis)/세포괴사(necrosis)에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다[89]. 이때 배양 기질로 2차원의 TCP 혹은 하이드로젤 표면에 세포를 배양하여 3차원과 비슷한 환경을 제공하였을 때 세포의 사멸 및 괴사가 더 낮은 수준으로 일어남을 확인하였다. 비록 이 연구에서도 하이드로젤 내에 세포를 캡슐레이션 한 것은 아니지만, 하이드로젤에서 2차원 TCP에서와는 다른 거동을 보임을 확인함으로써 배양 환경에 따라 세포의 거동에 차이가 남을 알 수 있었다. 한편, 최근 들어 3차원 기질 내에서의 면역세포의 생리학적 거동에 대한 연구도 시작되고 있다. Goethem 등은 매트리젤이나 콜라겐 하이드로젤을 제조하고 트랜스웰을 이용하여 혈액단핵구 유래인간대식세포(human macrophgaes derived from blood monocyte, MDM)에 3차원 환경을 제공하였다. 하이드로젤의 젤의 구성성분이나 구조, 전단탄성율을 조절하여 환경 변화에 따른 세포의 이동을 관찰하였다[90]. Bartneck 등은 패터닝(patterning) 기법을 이용하여 폴리염화비닐리덴(polyvinyl-idene fluoride, PVDF) 기질 표면에 과불소폴리에테르-다이메타크릴레이트(perfl-uoropolyether dimethacrylate, PFPE DMA) 입체구조를 형성 하고 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 배양하였다[91]. Grolman 등은 미세유체공학(microfluidics)으로

대식세포(macrophage)와 선암세포(adenocarcinoma cell)를 공생 배양하여 여러 가지 패턴을 가진 3차원 환경에서 두 세포의 상호작용을 연구하기도 하였다[42]. 그럼에도 불구하고 3차원 배양 환경 및 다양한 인자들과 면역세포의 생리학적 거동에 대한 연구는 아직 기초 단계에 머물러있다.

제 3 장 재료 및 방법

3.1. 재료

폴리에틸렌글리콜(4-arm poly(ethylene glycol), 4-arm PEG, Mn: 20 kDa)은 JenKem Technology에서 구입하였고, 4-arm PEG 말단의 하이드록시기에 노보닌을 도입하는 노보닌 개질 폴리에틸렌 글리콜(PEG4NB)의 합성 반응은 기존에 보고된 방법을 참조하였다[32]. 먼저, 파우더 형태로 건조한 4-arm PEG를 플라스크에 넣고 톨루엔을 넣고 2시간 동안 끓여 시료에 남아있는 습기를 제거하였다. 회전증발기를 이용하여 톨루엔을 제거하고, 무수다이클로로메탄(dichloromethane, DCM)에 용해하였다. 이어서 4-arm PEG의 하이드록시기에 대하여 5당량에 해당하는 피리딘(pyridine)과 0.5당량의 디메틸아미노피리딘(4-(dimethylamino)pyridine, DMAP)을 함께 넣어 용해하였다. 다른 플라스크에서 DCM에 용해시킨 2.5당량의 디시클로헥실카르보디이미드(N,N'-dicyclohexylcarbodiimid, DMAP)를 이용하여 노보닌카복실산(5-norbornene-2-carboxylic acid)을 활성화시켰다. 빛이 차단된 4℃ 질소공급 조건에서 PEG 용액에 활성화 시킨 노보닌카복실산 용액을 천천히 떨어뜨려 PEG4NB 합성 반응을 18시간 진행하였다. 반응이 완료된 용액을 감압여과를 하여 거른 뒤 에틸에테르(ethyl ether)에 침전시켰다. 이를 다시 유리필터로 걸러 진공 건조하였다. 건조시킨 PEG4NB를 증류수에 재용해하여 셀룰로오스 투석막(MWCO: 12-14 kDa)에 담아 3일간 초순수에 투석하였다. 투석 후 용액을 동결건조하여 스펀지 형태의 PEG4NB를 수득하였다. 광개시제인 리튬

아릴포스피네이트(lithium arylphosphinate, LAP)는 기존 논문에 수록된 방법을 그대로 이용하여 합성하였다[92]. 가교제로 사용한 펩타이드는 BeadTech(Korea)에서 구입하였으며, 콜라겐(bovine type I collagen)은 Gibco에서 구입하였다. 세포생사판별 키트와 4',6-디아미노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole, D-API)은 Invitrogen에서 구입하였다. 베타액틴 마우스 단일클론항체는 Thermo Scientific에서 구입하였으며 Nuclear factor-kappa b(NF-κB) p65단일클론항체와 hypoxia inducible factor 1-alpha(HIF-1α) 단일클론항체는 Santa Cruz에서 구입하였다. 그리고 겨자무과산화효소 결합 항마우스 면역글로불린 감마(anti-mouse IgG HRP-linked antibodies)는 BioActs에서, TNF-α 병소 감염 진단 테스트(enzyme-linked immunespecific assay, ELISA) 키트는 Life technologies에서 구입하였다. 이를 제외한 모든 시약들은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

3.2. 대식세포의 캡슐레이션

RAW264.7 세포는 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco)과 1%의 항생제(antibiotic-antimycotin, Hyclone)가 포함된 둘베코수정이글배지(high glucose Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM, HyClone)를 이용하여 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 배양 배지는 2-3일에 한 번씩 교체해 주었다. 기질금속단백질분해효소(matrix metalloproteinase, MMP) 민감성 하이드로젤이나 콜라겐이 고정화된 하이드로젤을 제조하기 위해 PEG4NB의 농도를 3 wt%로 고정하고 가교제의 티올기와

PEG4NB의 노보닌기의 몰농도를 동일하게 맞추었다([SH] = [NB]). 세포 캡슐레이션에는 디티올트레이톨(DTT, 비분해성), KCGPQG↓IWGQCK(S-MMP_{Linker}, 분비형 MMP 민감성), KCGPLG↓LYAGCK(M-MMP_{Linker}, 막고정형 MMP 민감성) 그리고 KCGHPG↓GPQGCK(CatK_{Linker}, cathepsin K 민감성)와 같은 디티올(dithiol) 가교제를 사용하였다(Table 1).

하이드로젤 내부에 세포를 캡슐레이션하기 위해 하이드로젤 제조에 사용된 모든 용액을 공극 크기가 0.2 μm인 주사기 필터에 통과시켜 멸균처리 하였다. 먼저 콜라겐이 함유된 하이드로젤 제조를 위해 콜라겐 용액을 5 mg/mL 농도로 전구용액 (precursor)과 섞어주었다. 또한 서로 다른 탄성을 지니는 하이드 로젤을 제조하기 위해 PEG4NB 농도를 8 wt%로 고정하였다. 특히 가교 밀도를 조절하기 위해 디티올 가교제와 L-시스테인(L-cysteine, L-cys, 노보닌 블로커)을 약 2:1, 5:1 비율로 첨가하여 각각 낮은 가교 밀도와 높은 가교 밀도를 가지는 하이드로젤을 제조하였다. 광개시제인 LAP의 농도는 모든 하이드로젤 제조 조건에서 1 mM로 사용하였다. 구체적인 하이드로젤 제조 조건은 Table 2에 도시되었다. 각 조건에 따라 전구용액을 준비하고 그 전구용액에 RAW264.7 세포를 $2x10^6$ cells/mL 농도로 분산시킨 후 직경 6 mm의 원통형 몰드에 25 μL씩 주입하여 자외선(365 nm, 5 mW/cm^2)을 2분간 조사하였다. 하이드로젤 제조 후 몰드를 제거하고 배지가 담긴 24-well plate에 옮긴 후 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다(Figure 1).

Table 1. Protease-insensitive and -sensitive dithiol cross-linkers for hydrogel formation.

Protease-insensitive	Protease-sensitive			Ref.
Dithiothreitol (**DTT**)	Secretion type MMP-sensitive	H_2N-KCGPQG↓IWGQCK-amide	**S-MMP$_{Linker}$**	[1]
	Membrane type MMP-sensitive	H_2N-KCGPLG↓LYAGCK-amide	**M-MMP$_{Linker}$**	[2]
	Cathepsin K-sensitive	H_2N-KCGHPG↓GPQGCK-amide	**CatK$_{Linker}$**	[3]

↓ protease-mediated cleavage site

Table 2. Formulation of thiol–norbornene PEG hydrogels for RAW264.7 cell encapsulation.

	Degradability control				**Presence of collagen I**		**Stiffness control**			
	Protease-insensitive	**Protease-sensitive**			**[-] collagen I**	**[+] collagen I**	**MMP-insensitive**		**MMP-sensitive**	
	DTT	**S-MMP$_{Linker}$**	**M-MMP$_{Linker}$**	**CatK$_{Linker}$**			**Low G'**	**High G'**	**Low G'**	**High G'**
PEG4NB (wt %)	3.0				3.0		8.0			
[ene] (mM)	6.0				6.0		16..0			
[SH] of linker (mM)	6.0				5.4	5.0	10.5	13.5	10.0	13.1
[SH] of L-cys (mM)	-				0.6	1.0	5.5	2.5	6.0	2.9
Collagen I (mg/mL)	5.0				0.0	5.0	-			
Cell density (cell/mL)	2.0 x 10^6				2.0 x 10^6		2.0 x 10^6			

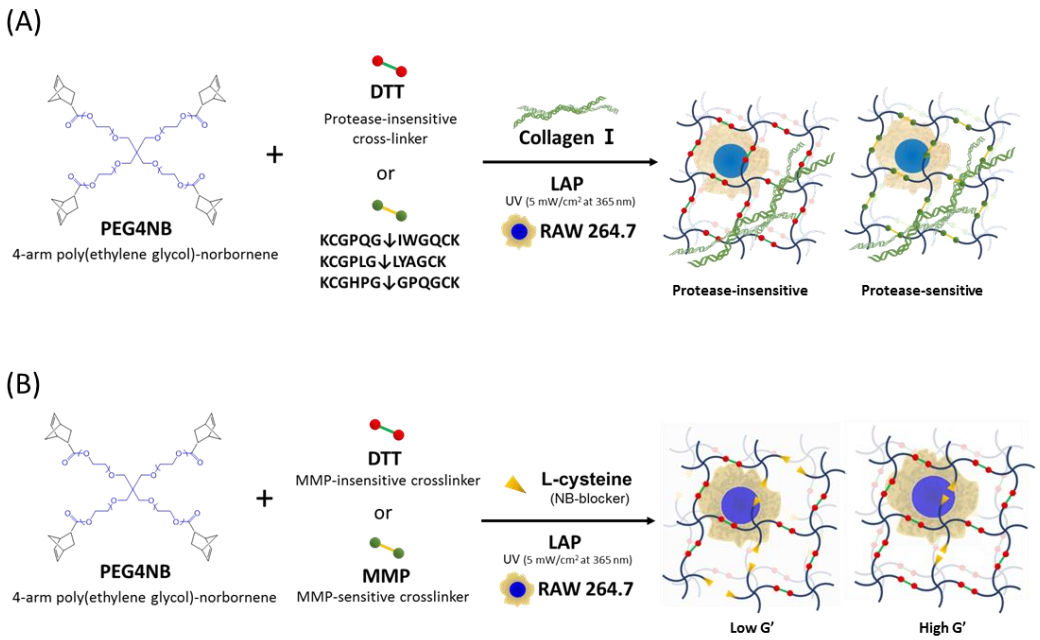

Figure 1. Schematics of RAW264.7 cell encapsulation in thiol–norbornene PEG hydrogels. (A) Formation of cell-laden hydrogels of different degradability with protease-sensitive dithiol cross-linkers in the presence of collagen I. (B) Stiffness control of hydrogel by altering the mixture ratio of dithiol cross-linker and L-cysteine (pendant norbornene-blocker) at a fixed PEG concentration (8 wt%).

3.3. 세포 대사활성 분석

세포의 대사활성은 레자주린(resazurin)분석법을 이용하여 측정하였다. 레자주린(Sigma)을 0.25 mg/mL 농도로 PBS에 용해하여 공극 크기가 0.2 μm인 주사기 필터에 통과시켜 멸균 처리하였다. 용해시킨 Resazurin 용액은 배지에 10배로 희석하여 사용하였다. 하이드로젤 내에 세포를 캡슐레이션한 후 1, 4, 7일마다 세포를 배양하던 배지를 제거하고, 희석된 레자주린 용액 500 μL씩 첨가하여 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 시료 별로 배양 용액 200 μL을 96 well plate에 옮긴 후 마이크로플레이트리더기(Synergy HT, BioTek)로 형광(ex: 560 nm; em: 590 nm)을 측정하였다.

3.4. DNA 정량분석

세포 캡슐레이션 후 1시간 또는 4일이 지난 세포에서 TIANamp Genomic DNA kit(TIANGEN Biotech)를 이용하여 DNA를 추출하고 정제하였다. DNA가 함유된 추출액 100 μL와 QuantiFluor dsDNA assay (Promega) 시약 100 μL를 96 well black plate에 옮긴 후 상온에서 5분간 반응시키고 마이크로플레이트리더기를 이용하여 형광(ex: 504 nm; em: 531 nm)을 측정하였다.

3.5. 아데노신삼인산(adenosine triphosphate, ATP)

정량 분석

ATP 생체발광분석(ATP bioluminescence assay)을 이용하여 하이드로젤 내에 캡슐레이션된 대식세포의 대사활성을 평가하였다. 세포가 캡슐레이션된 하이드로젤을 배양 배지에서 1시간 동안 배양하고, PBS로 10분 간 수세하였다. 하이드로젤을 48 well plate로 옮겨 각 well마다 ATP 혼합용액(CellTriter Glo® buffer:substrate = 1:1 혼합용액)을 150 μL씩 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 용액의 발광 세기를 마이크로플레이트 리더기로 측정하였다.

3.6. 형광현미경 분석

먼저 하이드로젤 내에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 분포 및 형태와 초기 생존율 등을 평가하기 위해 Live/Dead 분석을 실시하였다. 배양한지 1시간과 4일이 되었을 때 하이드로젤을 PBS로 수세하여 Live/Dead assay 용액에 담가 상온에서 1시간 동안 흔들어주며 염색을 실시하였다. 이 때 살아있는 세포는 칼세인AM(calcein AM, 0.25 μL/mL)에 의해 녹색으로, 죽은 세포는 에티디움 호모다이머-1(Ethidium homodimer-1, EthD-1, 2 μL/mL)에 의해 적색으로 염색된다. 염색 후 PBS에 10분간 수세하고 공초점레이저현미경(confocal laser scanning microscope, LSM710, Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였으며, 모든 하이드로젤 시료에 대해 네 군데 이상을 무작위로 선정하여 z-stack(두께 100 μm, 10 μm/slice) 형광 이미지를 얻었다.

하이드로젤 내에 캡슐레이션된 세포의 F-액틴과 세포핵을

관찰하기 위해 세포를 4일동안 배양한 후 하이드로젤을 4% (v/v)의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 45분간 침지시켜 세포를 고정화하였다. 고정화한 세포에 0.25% (v/v) Triton X-100 용액을 처리하여 세포 투과가 가능하도록 하였으며, 이후 1% (w/v)의 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA) 용액을 2시간 처리하였다. 이후 로다민팔로이딘(rhodamine phalloidin) (Molecular Probes)과 다피(4,6-diamidino-2-phenylindol, DAPI) (Molecular Probes) 용액을 처리하여 상온에서 1시간씩 반응시킴으로써 각각 F-액틴과 세포핵을 염색하였다. 이를 형광현미경(iRiS^{TM}, logos biosysntems)을 통해 관찰하였고, 모든 하이드로젤 시료에서 무작위로 선정한 영역에 대해 최소 8개 이상의 형광 이미지를 얻었다.

3.7. 역전사정량중합효소연쇄반응(Reverse transcription-quantification polymerase chain reaction, RT-qPCR)

하이드로젤 내에 캡슐레이션된 세포를 4일동안 배양한 후 PBS에 10분간 수세하여 액체질소에 급속 냉동하였다. RNA 추출 기구(NucleoSpin RNA kit, Macherey-Nagel)를 이용하여 세포 내 RNA를 추출하고, PrimeScript RT reagent kit(TaKaRa)를 이용하여 추출된 RNA으로부터 단일 가닥 상보 DNA(single-stranded complementary DNA)를 합성하였다. 이어서 SYBR Premix Ex Taq II kit(TaKaRa)를 사용하여 정량 PCR(quantitative PCR)을 실시하였다. 각 중합반응은 3단계 PCR 과정(변성: 95℃, 5초;

annealing: 55℃, 30초; 신장: 72℃, 30초)으로 총 40회 반복되었다. 반응 종료 후 60-95℃ 온도 범위에서 반응물의 융해온도를 검사하였다. 각 유전자의 상대적 발현량은 GAPDH의 양을 기준으로 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 법을 이용하여 결정되었다. qPCR에 사용된 각 유전자의 프라이머(primer)는 Table 3에 나타내었다.

3.8. 효소결합면역흡착측정법(Enzume-Linked Immuno -Sorbent Assay)

하이드로젤 내에 캡슐레이션된 세포를 4일동안 배양한 후, 무혈청 배지에 옮겨 37℃, 5% CO_2 조건에서 6시간 동안 배양하였다. 배지를 수득한 후 배지 내 종양괴사인자-알파(Tumor necrosis factor alpha, TNF-α)의 농도를 mouse TNF-α ELISA kit(Life technologies)를 이용하여 측정하였다. 항체처리에 이어 반응기질을 투입하여 처리하였고 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 분석키트에서 제공하는 기준시료를 이용하여 검량곡선을 얻은 후 각 시료의 TNF-α의 농도를 정량하였으며 각 실험군의 상대적 발현량은 DNA 함량을 기준으로 나타내었다.

3.9. 전단탄성율 측정

하이드로젤 제조를 위한 전구용액을 1 mm 두께의 간격으로 고정된 두 개의 글라스 슬라이드 사이로 70 μL씩 주입하고 자외선(365 nm, 5 mW/cm^2)을 2분간 조사하여 젤을 제조하였다. 평형상태에서의 전단저장탄성률(shear elastic modulus, G')을

Table 3. Primer sequences of genes for RT–qPCR.

Genes		Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward	TCA ACG GCA CAG TCA AGG
	Reverse	ACT CCA CGA CAT ACT CAG C
iNOS	Forward	TCC TAC ACC ACA CCA AAC
	Reverse	CTC CAA TCT CTG CCT ATC C
COX2	Forward	CCT CTG CGA TGC TCT TCC
	Reverse	TCA CAC TTA TAC TGG T
TNF-α	Forward	AAG GCC GGG GTG TCC TGG AG
	Reverse	AGG CCA GGT GGG GAC AGC TC
MMP-9	Forward	ACT ACT CTG AAG ACT TGC CG
	Reverse	GGT ACA GGA AGA GTA CTG CT
MMP-14	Forward	TAC CAC AAG GAC TTT GCC TCT G
	Reverse	ATC TAG CCG AAC TGC CAG CAC
Cathepsin K	Forward	CAG CTT CCC CAA GAT GTG AT
	Reverse	AGC ACC AAC GAG AGG AGA AA

측정하기 위해 하이드로젤을 pH 7.4의 PBS에 침지하여 37℃에서 24시간 동안 팽윤시켰다. 전단저장탄성률은 팽윤된 하이드로젤을 생검펀치를 이용하여 직경 8 mm의 원형으로 자르고 레오미터(MARSⅢ, Hakke)를 이용하여 진동모드(oscillatory mode)에서 변형률 0.1-5%, 진동수 1 Hz 조건으로 측정하였다. 이 때 직경 8 mm의 평행반 지오메트리를 이용하였으며, 수직항력은 0.2-0.3 N, 간격은 0.8 mm로 설정하였고 시료의 평균 전단저장탄성률 값은 선형 점탄성 구간(linear viscoelastic region, LVR)으로부터 도출하였다. 그리고 세포가 캡슐레이션된 하이드로젤의 측정을 위해 프리폴리머 용액에 세포를 섞어 전과 동일한 방법으로 하이드로젤을 제조하였다. 제조한 하이드로젤은 배양 배지에서 각각 1시간, 4일 배양 후 전단저장탄성률을 측정하였다.

3.10. 통계 처리

모든 실험은 세 번씩 반복 실험 하였고, 결과 값은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 시료 간의 통계적 유의성은 One-way ANOVA를 사용하여 확인하였다 (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 하이드로젤의 분해성이 대식세포의 증식 및 기질 분해 효소 발현에 미치는 영향

대식세포는 자극원으로 이동하기 위해 ECM을 분해해야 하며 이 때 기질 분해를 위한 다양한 효소를 합성한다[93-95]. ECM의 주요 성분인 콜라겐과 엘라스틴은 기질금속분해효소(e.g., MMP2, MMP9, MMP14)와 카텝신에 의해 분해되는데[96, 97], 그 중에서도 특히 MMP9는 섬유아세포, 상피세포, 호중구나 대식세포와 같은 면역세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다[98]. Fang 등은 단핵구가 조직으로 들어가는 과정에서 대식세포로 분화될 때 MMP9의 유전자 및 단백질 발현양이 증가함을 확인하였고[99], Le 등은 MMP9이 면역세포의 이동과 증식, 염증의 조절 및 작용 인자로 사용됨을 보고하였다[100]. 한편, MMP14은 주로 조직에 자극이 주어졌을 때 면역세포에서 발현된다고 알려져 있으며[98], Newby 등은 단핵구가 조직의 내피(endothelial monolayer)를 통과하면서 이동할 때 MMP14의 발현이 촉진됨을 확인한 바 있다[93]. 이러한 기질분해효소는 세포의 이동에만 사용되는 것이 아니라 비정상적인 면역세포의 활동에 의한 질병의 원인이 되기도 한다[101]. 그렇기 때문에 면역세포가 발현하는 분해효소에 의한 영향을 살펴보는 연구가 중요하다.

본 연구에서 사용한 가교제인 S-MMP_{Linker}는 세포가 분비하는 다양한 MMP(예, MMP2, MMP9)에 대해 민감성을 나타내며, M-MMP_{Linker}의 경우 세포막에 결합되어 작용하는

MMP(e.g., MT1-MMP(MMP14))에 의해, 마지막으로 $CatK_{Linker}$는 용골세포가 분비하는 카텝신K에 민감성을 나타내는 펩타이드 가교제이다[96].

Figure 2는 서로 다른 분해성을 지니는 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 1시간 후 및 4일 후 Live/Dead 형광염색 결과를 보여준다. 캡슐레이션 후 모든 하이드로젤에서 70% 또는 그 이상의 초기 세포 생존율을 확인할 수 있었다(Figure 2(A), Table 4). 캡슐레이션 후 4일간 배양한 세포는 구형의 세포 회합체(cell cluster)를 형성하였다(Figure 2(B)). $CatK_{Linker}$를 가교제로 사용한 하이드로젤을 제외한 모든 경우에서 형성된 구형 세포회합체의 크기는 거의 같았으며 대부분의 세포가 생존한 상태인 것으로 나타났다. Figure 3은 캡슐레이션된 RAW264.7 세포회합체의 위상차현미경 영상 및 이를 바탕으로 측정된 세포 회합체의 크기 분포를 나타낸다. 배양 1일차, 하이드로젤 내에서 세포는 이미 구형의 세포회합체를 형성하기 시작하였다. 하이드로젤 종류와 관계없이 세포회합체의 크기(지름)는 20 μm에 다소 못 미치는 것으로 나타났다. 그러나 4일간 배양한 뒤에는 $CatK_{Linker}$를 사용하여 제조된 하이드로젤을 제외한 나머지 하이드로젤에서 세포회합체의 크기가 통계적으로 유의미한 수준으로 증가하였다. 나머지 3가지 하이드로젤의 가교제 차이에 따른 세포회합체의 평균 크기 차이는 확인할 수 없었지만 $M-MMP_{Linker}$ 하이드로젤에서 상대적으로 큰 크기의 세포회합체가 더 많이 관찰되었다. 하이드로젤 내에서의 세포 증식을 확인하기 위해 대사활성분석 및 DNA 함량 분석을 실시하였다. 그 결과 하이드로젤 종류에 관계없이 배양 4일차까지 대사활성이 증가하였다(Figure 4(A)). $M-MMP_{Linker}$

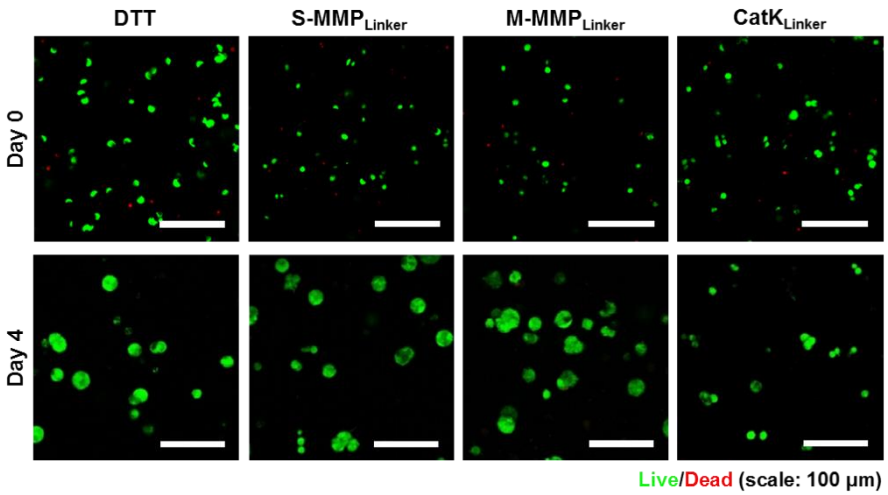

Figure 2. Live/Dead fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability 1-h and 4-day post-encapsulation (green: calcein-AM; red: ethidium homodimer-1, scale: 100 μm).

Table 4. Cell viabilities of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability 1−h post−encapsulation. The viability value was obtained from the acquired Live/Dead fluorescence images (n ≥ 4).

	DTT	S-MMP$_{Linker}$	M-MMP$_{Linker}$	CatK$_{Linker}$
Cell viability (%, mean ± SD)	78.0 ± 3.7	69.1 ± 4.0	71.2 ± 12.4	75.0 ± 5.3

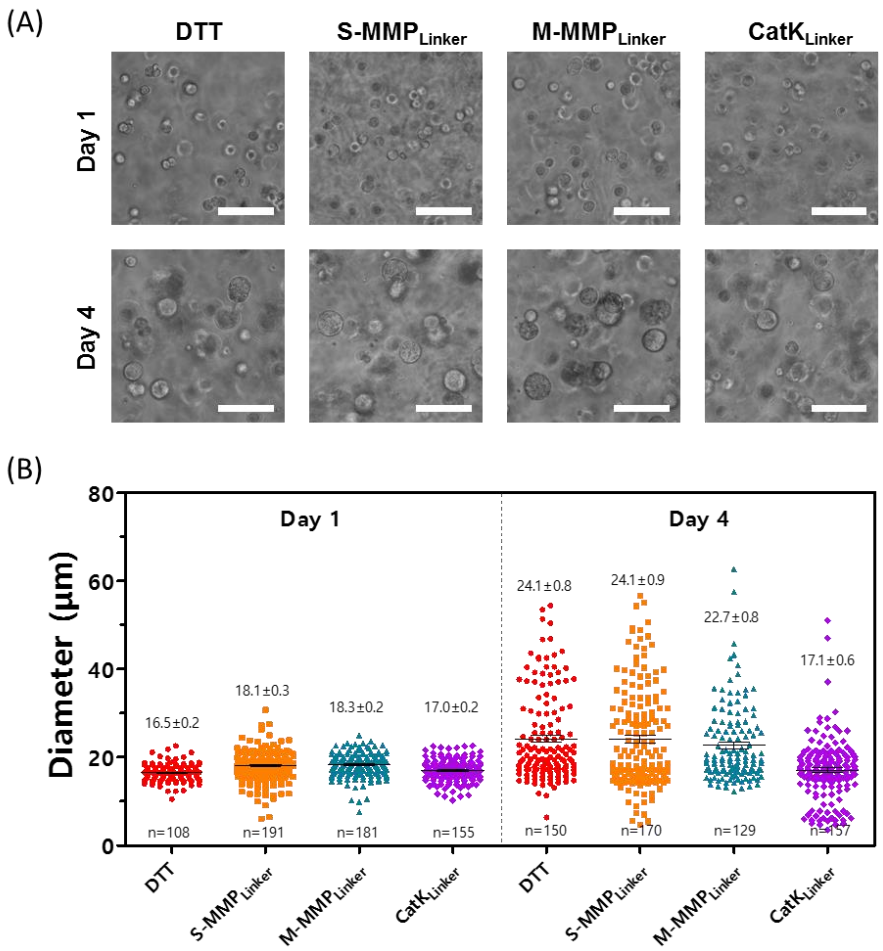

Figure 3. (A) Phase-contrast images of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability 1- and 4-day post-encapsulation (scale: 100 μm). (B) Cell cluster size distributions 1- and 4-day post-encapsulation (mean ± SEM).

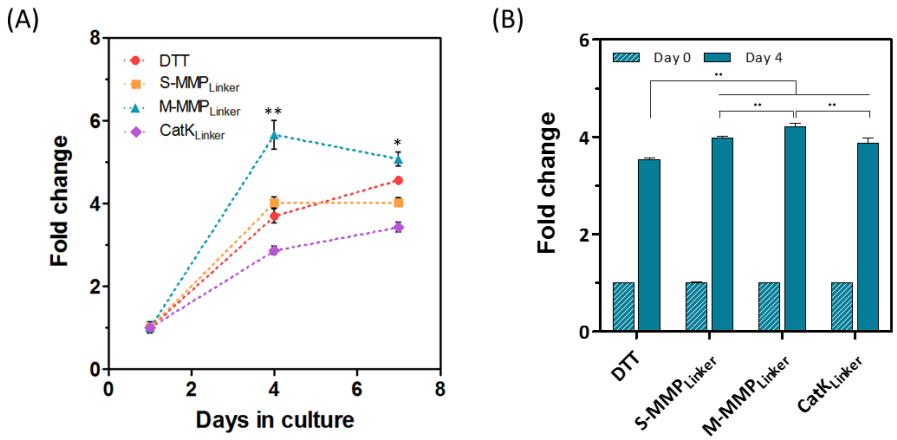

Figure 4. (A) Metabolic activity and (B) DNA content of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability. Each value is presented in fold change compared to the mean value measured on day 1 or day 0 for resazurin assay or total DNA content assay, respectively (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05, **p < 0.01).

하이드로젤의 경우 대사활성 증가가 가장 높았으나(~6배 증가) 7일차에는 대사활성이 다소 감소하였다. 나머지 하이드로젤에서는 7일차까지 지속적으로 대사활성이 증가하였다. DTT 및 S-MMP_{Linker} 하이드로젤의 경우에는 대사활성 증가 경향이 서로 유사했던 반면 $CatK_{Linker}$ 하이드로젤의 경우 대사활성의 증가가 가장 낮은 수준이었다. **Figure 4B**는 캡슐레이션 1시간 후 및 4일간 배양한 후의 DNA 함량의 상대적인 비율을 나타낸다. 하이드로젤의 종류에 관계없이 4일간 배양한 후 약 3.5~4배로 DNA 함량이 증가하였다. 단백질 분해효소의 기질을 가교제로 사용한 하이드로젤의 경우 비민감성 하이드로젤(DTT)과 비교하여 상대적으로 DNA 함량 증가 폭이 더 크게 나타났다. $CatK_{Linker}$를 제외한 단백질 분해효소 민감성 가교제를 사용한 하이드로젤에서 높은 대사활성능과 증식능을 나타내며 세포회합체 또한 크게 형성하였는데, 이와 같은 결과는 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포가 MMP를 분비하여 주변 환경을 분해 및 재구축해 나가면서 증식하여 회합체를 이룬다는 것을 의미한다. $CatK_{Linker}$를 사용한 경우에는 DNA 함량 분석을 통해 세포가 증식하고 있음을 확인할 수 있었지만 다른 가교제를 사용한 경우에 비해 대사활성이 낮고 세포회합체도 상대적으로 작게 형성되었다. 일반적으로 카텝신K는 RAW264.7 세포가 NF-κB 리간드의 수용체 활성화 물질(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)에 의해 자극되었을 때 발현되어 대식세포를 파골세포로 분화한다고 알려져 있으며[102, 103], 최근 Shinivasan 등은 저산소증과 과산화수소가 대식세포의 파골세포화를 촉진시키는 요인이 될 수 있다고 보고한바 있다[104]. 본 연구에서는 세포에

지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)나 인터페론감마(interferon gamma, INF-γ)와 같은 특정 자극을 주지 않고, 3차원 환경 내에서의 세포의 거동을 살펴본 것이기 때문에 카텝신K의 발현양이 적어 $CatK_{Linker}$의 네트워크 구조가 상대적으로 느리게 분해된 것으로 생각된다.

Figure 5는 3차원 배양 기간에 따른 하이드로젤의 전단저장탄성율(shear elastic modulus, G' (Pa)) 변화를 보여준다. 캡슐레이션 후 1일간 배양한 뒤 하이드로젤의 G'은 1600-1800 Pa 범위에서 모두 유사한 값을 나타내었다. 그러나 배양 4일차 S-MMP_{Linker} 및 M-MMP_{Linker}하이드로젤의 G'은 ~300 Pa 정도(1일차 G'의 약 0.2배)로 급격하게 감소하였다. 반면 배양 4일 후 $CatK_{Linker}$ 및 DTT 하이드로젤의 G'은 각각 약 0.5배와 0.3배 정도 감소하였다. 4일간 배양 후 RAW264.7 세포가 캡슐레이션된 하이드로젤의 G'은 전체적으로 감소하였는데, 이는 PEG와 노보닌기 사이에 있는 에스터기(ester group, -COO-)의 가수분해 때문이다[31, 83]. 한편 단백질 분해효소 민감성 가교제를 사용한 경우 비민감성 가교제와 비교하여 하이드로젤의 G' 감소가 더 크게 나타났는데, 이는 대식세포가 분비하는 효소에 의해 하이드로젤이 분해되는 것을 의미한다. 뿐만 아니라 펩타이드 가교제에 따라 하이드로젤의 분해 정도 차이가 나타남을 알 수 있었다. 그러나 이와 같은 결과가 하이드로젤의 분해성과 대식세포가 발현하는 분해효소의 양의 일정한 상관관계를 의미하는 것은 아니다. 각 가교제의 분해효소에 대한 분해반응상수(k)가 다르기 때문이다[97].

3차원 배양된 RAW264.7 세포에 의한 하이드로젤 네트워크 분해를 확인한 후, 기질분해효소 비민감성 하이드로젤(DTT)

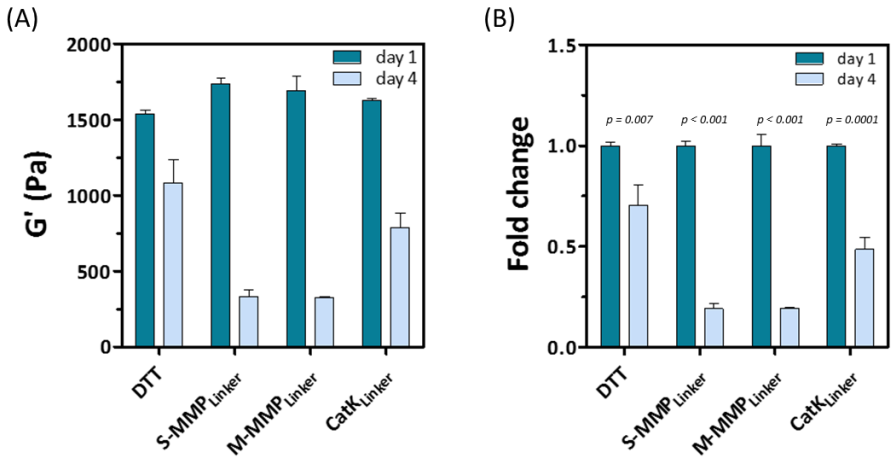

Figure 5. Stiffness changes of cell-laden PEG hydrogels of different degradability during 4-day culture. (A) Shear elastic moduli and (B) fold changes 1- and 4-day post-encapsulation (n = 3, mean ± SD).

에 3차원 배양된 RAW264.7 세포의 대표 기질분해효소(MMP9, MMP14, CatK)의 발현양을 유전자 수준에서 분석하였다(Figure 6). 그 결과 MMP9와 MMP14의 경우 TCP에 배양된 경우보다 발현양이 통계적으로 유의미하게 증가하였고, CatK 역시 증가하였으나 통계적 유의차는 확인할 수 없었다. 특히 3차원 배양조건에서 MMP9의 발현양은 약 25배 가량으로 큰 폭의 증가를 보여주었던 반면 MMP14의 발현양은 약 2.5배의 증가에 그쳤다. 대식세포가 분비하는 기질분해효소들의 경우 특정 조직으로 이동하면서 다양한 3차원 환경에 노출될 때 높은 수준으로 발현된다[37]. 이러한 이유로 실제 조직과 유사한 3차원 하이드로젤 내에서 기질분해효소가 더 높은 수준으로 발현된 것이라 생각된다.

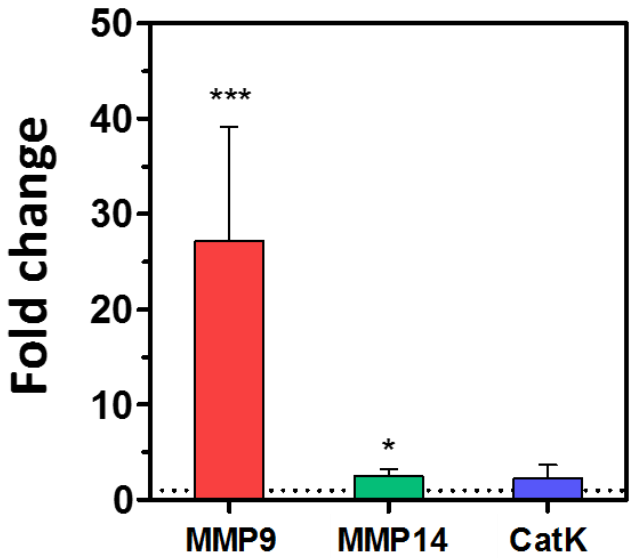

Figure 6. Protease gene expression levels of RAW264.7 cells encapsulated in protease-insensitive PEG hydrogel (DTT) 4-day post-encapsulation. 1-fold is an expression level of cells cultured on 2D TCP (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05, ***p < 0.001).

4.2. 하이드로젤 내에 존재하는 콜라겐 I 이 대식세포의 증식 및 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

콜라겐은 세포외기질의 구조 단백질 성분 중 가장 많은 비중을 차지하며 그 중에서도 1형 콜라겐이 가장 많은 부분을 차지한다[105]. 본 연구에서는 콜라겐I을 PEG 하이드로젤 내에 물리적으로 함입시킴으로써 복합 하이드로젤을 제조하였다. 이 때 기질의 탄성율에 의한 영향을 배제하기 위해 가교제의 농도를 조절하여 콜라겐 유무에 관계 없이 하이드로젤의 G'을 통계적 유의차가 없는 수준에서 ~1300 Pa 정도로 맞추어 세포를 캡슐레이션하였다(Figure 7).

Figure 8은 하이드로젤에 캡슐레이션 된 RAW264.7 세포의 위상차현미경 영상과 이를 이용하여 측정된 세포회합체 크기의 분포도를 나타낸다. 캡슐레이션 후 배양 1일차, RAW264.7 세포는 콜라겐 유무에 관계없이 평균직경 약 17 μm의 구형 세포회합체를 형성하였다. 그러나 배양 4일차에는 콜라겐이 함유된 하이드로젤에서 더 큰 세포회합체를 관찰할 수 있었다. 콜라겐이 없는 하이드로젤([−] Col I)에서 세포회합체의 평균 직경은 약 31.5 μm, 콜라겐이 존재하는 하이드로젤([+] Col I)에서 세포회합체의 평균 직경은 약 36 μm이었다. 대사활성분석 결과 배양 시간이 길어짐에 따라 세포의 대사활성이 증가하였다. 특히 [+] Col I 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 대사활성이 통계적 유의차가 나타나지 않는 수준에서 다소 높게 나타남을 확인하였으며, 배양 직후와 비교하여 약 3−4배 정도

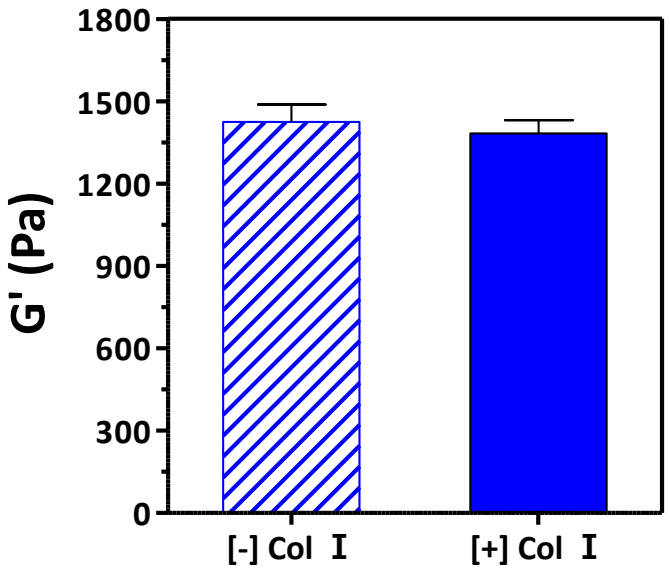

Figure 7. Shear elastic moduli of PEG4NB hydrogels formed without or with collagen I for RAW264.7 cell encapsulation. The measurement was conducted after incubation in PBS for 24 h (n = 3, mean ± SD).

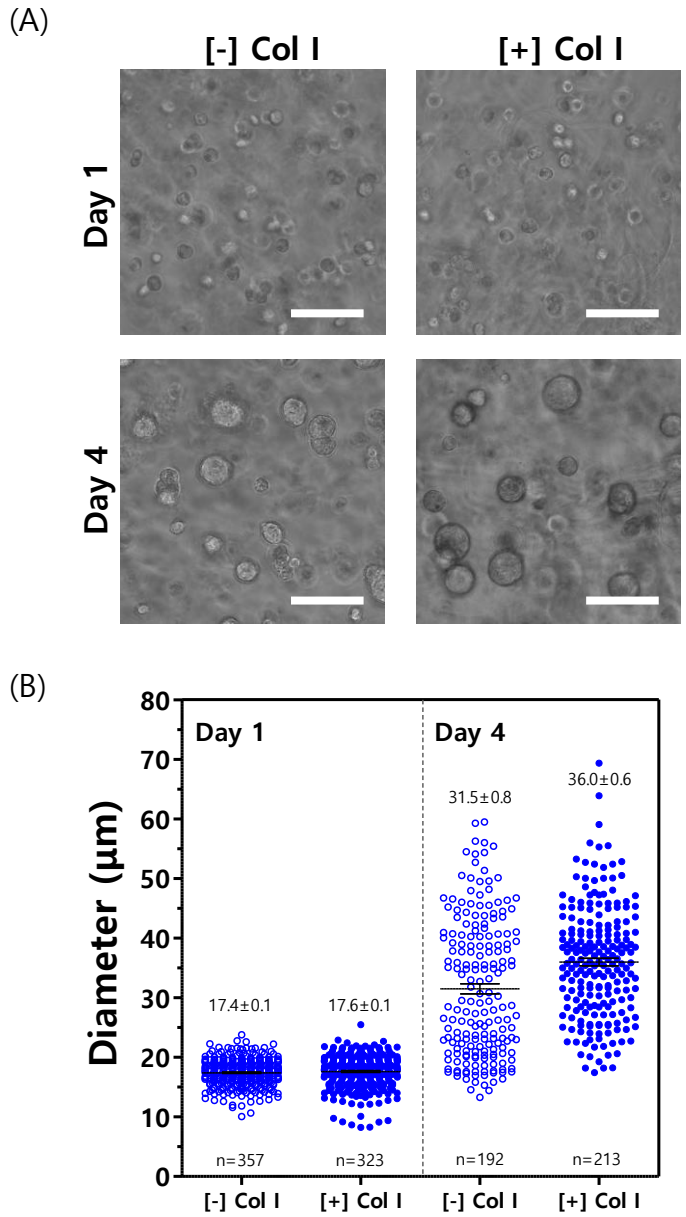

Figure 8. (A) Phase-contrast images of RAW264.7 cells encapsulated in PEG secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I 1- and 4-day post-encapsulation (scale: 100 μm). (B) Cell cluster size distributions 1- and 4-day post-encapsulation (mean ± SEM).

대사활성이 증가하였다(Figure 9). Figure 10A는 배양 4일 후, Live/Dead 형광염색 결과를 보여준다. 콜라겐 유무에 상관없이 세포회합체를 이루는 세포는 대부분 생존하는 것으로 나타났다. 일부 사멸 세포도 관찰되었으나 그 수가 상대적으로 적고 콜라겐 유무에 따른 차이는 확인할 수 없었다. 세포회합체의 구조를 관찰하기 위해 F-액틴 형광염색을 실시하였다. 배양 1일차에는 2-3개의 세포가 회합체를 형성하여 작고 둥근 형태를 나타내지만 배양 4일 후에는 많은 수의 세포가 모여 세포회합체를 형성하여 전체 크기가 증가하였고 F-액틴 구조도 더 발달되었다(Figure 10(B)). 배양실험 결과 콜라겐이 존재하는 경우 대사활성의 차이는 크지 않았음에도 불구하고 RAW264.7 세포의 증식 및 세포회합체의 성장이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 일반적으로 단핵구는 비부착성세포로써 기질에 대한 부착성이 세포의 증식에 미치는 영향이 거의 없다고 알려져 있다[106]. 예를 들어 대식세포에 대한 세포부착 펩타이드(RGDS)의 영향을 연구한 사례에서는 대식세포가 기질 표면에 부착된 RGDS에 의해 영향을 거의 받지 않음을 보고하였다[107]. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 나타난 콜라겐에 의한 RAW264.7 세포 증식 촉진 효과는 다음의 이유에 의한 것으로 추정된다. 실험에 사용된 RAW264.7은 단핵구와 대식세포의 성질을 모두 나타내는 세포주로 어느 정도 기질 표면에 대한 부착성을 나타낸다[108]. 따라서 일반적인 면역세포와는 달리 부착성의 차이가 생리학적 거동에 영향을 주었던 것으로 생각된다. 또한, 실험에서 사용된 콜라겐의 경우 짧은 아미노산 서열의 세포 부착성 펩타이드에 비해 세포부착 효과가

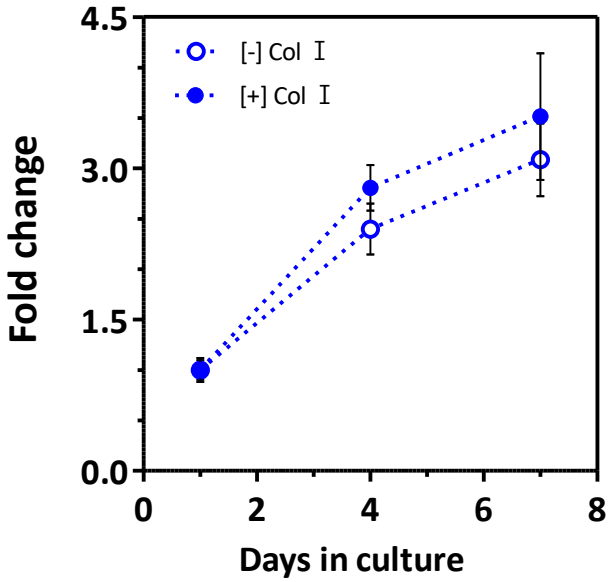

Figure 9. Metabolic activity of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I. The values are presented in fold change compared to the mean fluorescence intensity on day 1 (n = 3, mean ± SD).

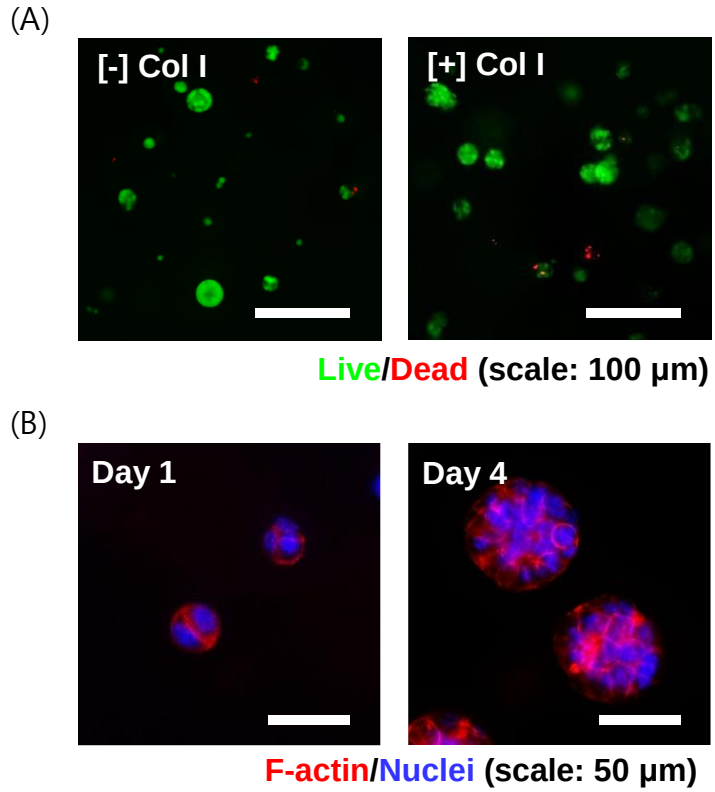

Figure 10. (A) Live/Dead fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I 4-day post-encapsulation (green: calcein-AM; red: ethidium homodimer-1, scale: 100 μm). (B) Fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed with collagen I 1- and 4-day post-encapsualtion (red: rhodamine-phalloidin; blue: DAPI; scale: 50 μm).

훨씬 우세하게 나타나기 때문에 콜라겐 유무에 따른 증식의 차이가 나타난 것으로 보인다[109]. 또 다른 이유로 콜라겐과 인테그린(integrin)과의 결합 작용 이외에 콜라겐이 RAW264.7의 특정 수용체와 결합하여 증식을 촉진하는 세포신호체계의 활성화를 들 수 있다. 최근 3차원 배양된 암세포에 대한 콜라겐의 영향을 연구한 논문에서는 콜라겐이 세포의 증식과 분화에 다양한 방법으로 활성을 나타낸다는 것을 보고하고 있다[2].

Figure 11은 콜라겐 고정화 유무에 따른 3차원 하이드로젤 내 RAW264.7 세포의 염증성 사이토카인(iNOS, COX2, TNF-α)의 상대적인 유전자 발현양을 보여준다. 그 결과 외부 자극 물질이 없는 조건에서 TCP에 세포를 배양한 경우보다 3차원 하이드로젤에 캡슐레이션된 세포에서 염증성 사이토카인의 발현양이 크게 증가함을 알 수 있었다. iNOS의 경우 TCP 배양 세포의 발현양 대비 약 6.5배(Figure 11(A)), COX2의 발현양은 약 4배(Figure 11(B)), TNF-α의 발현양은 약 5배(Figure 11(C)) 가량 높았다. 하지만 콜라겐 유무에 따른 발현양의 차이는 확인할 수 없었다. 이는 기질을 구성하는 기질의 조성보다는 배양환경의 구조적 차이가 면역세포의 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 기존 연구에서 3차원 배양환경에서 다양한 세포(예, 연골세포, 혈관내피세포, 섬유아세포)가 발현하는 염증성 사이토카인이 증가된다는 것이 보고되었다[110] [111] [112]. 이는 2차원 환경에 비해 3차원 환경에서 세포의 자극 수용체 증가에 기인하는 것으로 알려졌다 [111] [113]. 또한 Sung 등도 2차원 TCP와 3차원 매트리젤에 암세포를 배양하여 COX2의 발현양을 비교한 결과 매트리젤에서 발현양이 증가하였으며 이를 배양환경에

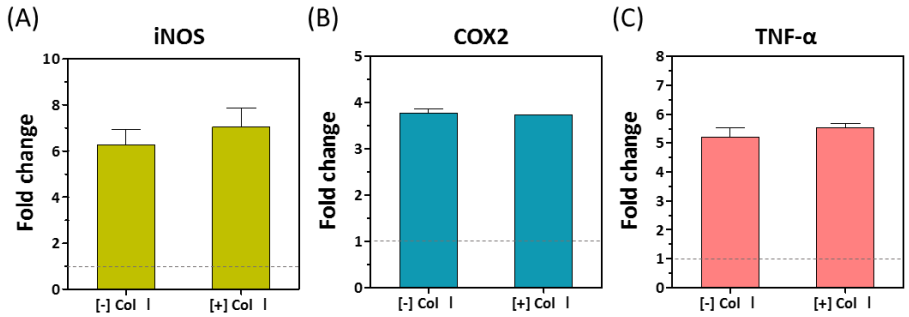

Figure 11. Inflammatory cytokine gene expression levels of RAW264.7 cells encapsulated in secretion type MMP-sensitive PEG hydrogels formed without or with collagen I 4-day post-encapsulation (A: iNOS; B: COX2; C: TNF-α). 1-fold is an expression level of cells cultured on 2D TCP in the absence of collagen I (n = 3, mean ± SD).

따른 신호전달물질 (signaling molecule) 양의 차이로 설명하고 있었다 [112]. 2차원 환경에서는 세포 사이의 상호작용이 서로 인접한 가장자리에서만 일어나는 반면, 3차원 환경에서는 세포를 둘러싼 모든 부분이 자극에 노출된다[6]. 이러한 이유로 3차원 하이드로젤에 캡슐 레이션된 세포에서 상대적으로 많은 자극 수용체가 작용 하게 되고, 그 결과 RAW264.7 세포의 염증성 사이토카인 발현이 2차원 표면 배양과 비교하였을 때 더 높은 수준으로 나타나게 된 것으로 생각된다.

4.3. 하이드로젤의 분해성 및 전단저장탄성율이 대식세포의 증식 및 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

생체조직은 종류에 따라 수십 Pa에서 수만 Pa에 이르기까지 탄성율의 범위가 넓기 때문에 다양한 탄성율 조건에 따른 대식세포의 거동을 살펴보고자 하였다.

하이드로젤의 전단저장탄성율(G')이 3차원 기질 내에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 거동에 미치는 영향을 살펴보기에 앞서 하이드로젤의 성형 시 가교제의 함량 조절에 따른 잔류 노보닌기의 잠재적 세포 독성을 제거하기 위해 첨가한 L-cys이 하이드로젤의 G'이나 하이드로젤 내에 캡슐레이션 된 세포의 대사활성에 영향을 미치는지 살펴보았다. Figure 12A에서 알 수 있듯이 L-cys 유무에 관계없이 하이드로젤의 G'이 1000 Pa 정도로 서로 유의차 없는 수준을 보였다. 또한 하이드로젤 내에

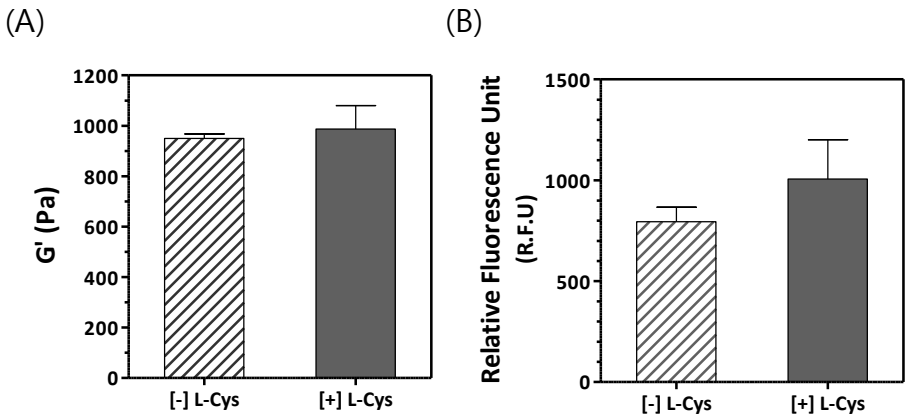

Figure 12. Effect of presence of L-cysteine on shear modulus of PEG hydrogel and initial metabolic activity of RAW264.7 cells after encapsulation. (A) Shear elastic moduli of MMP-insensitive PEG hydrogels formed with or without L-cysteine (8 wt% PEG4NB; 5 mM DTT; 6 mM L-cys, n = 3, mean ± SD). (B) Metabolic activity measured by resazurin assay 1-day post-encapsulation (n = 3, mean ± SD).

세포를 캡슐레이션하고 1일 배양 후 대사활성분석을 한 결과, [+] L-cys 하이드로젤에서 세포의 대사활성이 다소 높게 나타났다 (Figure 12(B)). 저밀도(Low G') 하이드로젤을 이용하여 L-cys 첨가 유무 및 잔류 노보닌기의 세포독성 유무를 평가한 결과 어떤 경우에도 유의할만한 세포독성이 나타나지 않아 하이드로젤 탄성율 조절에 활용된 구성성분 조성 조절법이 세포 배양에 적합함을 알 수 있었다.

Figure 13은 하이드로젤의 분해성 및 가교밀도에 따른 하이드로젤의 G'을 보여준다. 하이드로젤의 분해성에 따른 차이는 나타나지 않고, 가교밀도에 의한 차이만 나타났다. 가교밀도가 낮은 하이드로젤(Low G')의 G'은 1000 Pa에 다소 못미치는 것으로 나타났고, 가교밀도가 높은 하이드로젤(High G')의 G'은 약 4500 Pa로 4배이상 높은 값을 나타냈다. 연구에 적용된 전탄탄성율 범위는 실제 뇌 조직과 같은 체내 연조직(Young's modulus ~1 kPa) 및 평활근 조직(Young's modulus ~12 kPa)과 유사하다 [36].

하이드로젤 내에서의 초기 세포 증식을 확인하기 위해 하이드로젤에 세포를 캡슐레이션하고 1시간 배양 후 수득하여 ATP 정량 분석을 실시하였다(Figure 14). 그 결과, 분해성에 관계없이 High G' 하이드로젤에서 ATP 발광세기가 다소 낮게 나타났다. 하지만 비분해성 가교제를 사용했을 때에는 통계적으로 유의미하게 감소하였으나, 분해성 가교제를 사용한 경우 통계적 유의차는 확인할 수 없었다. 또한 분해성 가교제를 사용했을 때 비분해성 가교제를 사용한 경우보다 ATP에 의한 발광강도가 다소 높게 나타났다. Figure 15는 서로 다른 분해성과 G'을 가지는 하이드로젤에

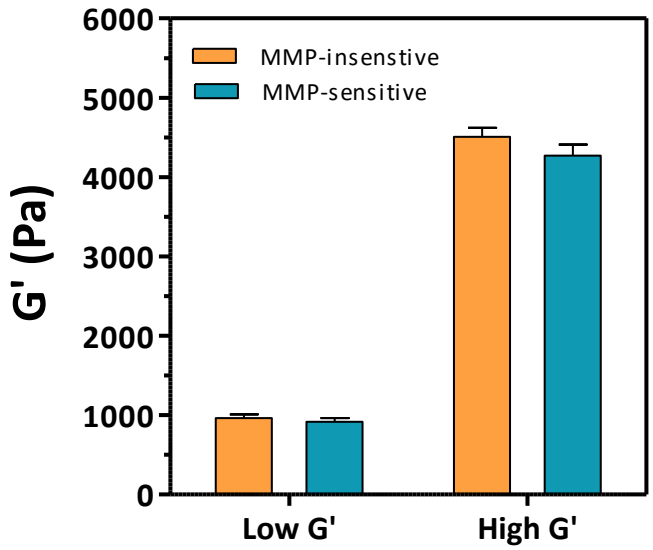

Figure 13. Shear elastic moduli of PEG hydrogels of different degradability and stiffness (n = 3, mean ± SD).

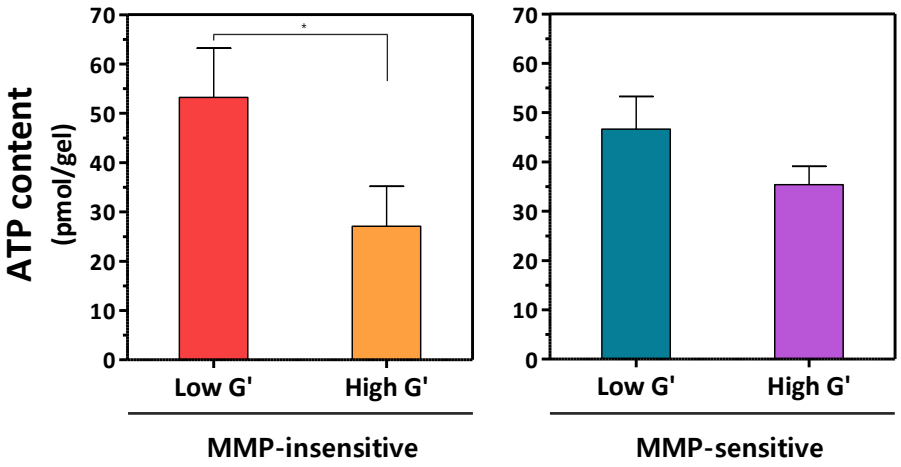

Figure 14. ATP contents of RAW264.7 cells encapsulated in (A) MMP-insensitive and (B) MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness 1-h post-encapsulation. (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05).

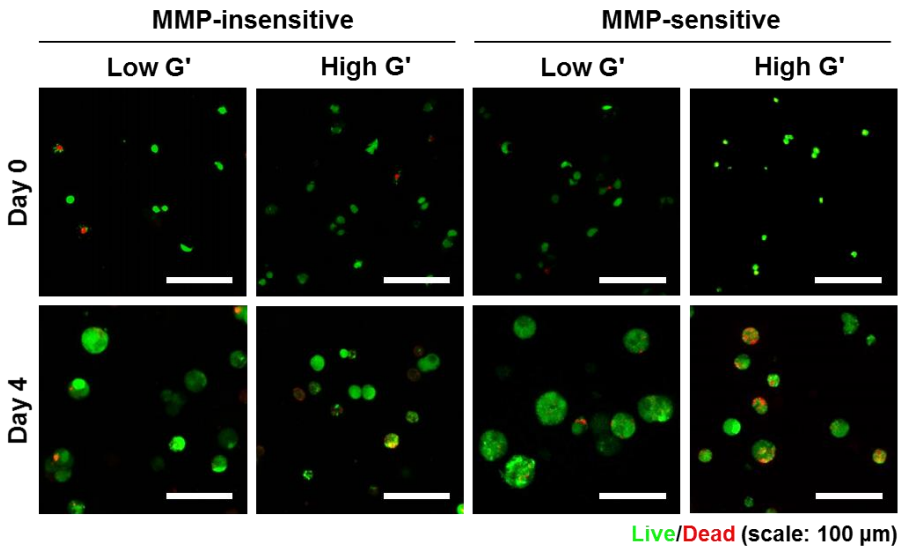

Figure 15. Live/Dead fluorescence images of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness 1-h and 4-day post-encapsulation (green: calcein-AM; red: ethidium homodimer-1, scale: 100 μm).

캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 1시간 및 4일 배양 후의 Live/Dead 형광염색 결과를 나타낸다. 분해성이나 G'에 관계없이 모든 하이드로젤에서 80% 또는 그 이상의 초기 세포 생존율을 확인할 수 있었다(Figure 15(A), Table 5). 캡슐레이션 직후의 RAW264.7 세포의 기질 분해성과 탄성율에 따른 초기 생존율을 통해 기질의 탄성율이 세포의 캡슐레이션 과정에서 세포의 사멸에 크게 영향을 줌을 알 수 있었다. 이는 네트워크 밀도가 높은 하이드로젤 내에서 세포가 물리적으로 더 많은 스트레스를 받기 때문으로 생각된다[114]. 그리고 캡슐레이션 후 4일간 배양한 세포의 경우 구형의 세포회합체를 형성하며 사멸한 세포 없이 증식하고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 15(B)). 또한 Low G' 하이드로젤에서 보다 큰 세포회합체를 형성하였고, 하이드로젤의 분해성에 따른 세포회합체의 크기 차이는 크게 나타나지 않았다. 이는 Figure 16의 위상차현미경 영상 및 세포회합체 크기 분포를 통해서도 확인가능 하다. 배양 초기에는 분해성이나 G'에 관계없이 세포회합체의 직경이 약 20 μm정도로 균일한 형태로 존재하다가 4일간 배양 후에는 세포회합체의 크기가 유의미한 차이가 있게 커지고 분포 또한 넓어졌다. 특히 Figure 16(B)를을 통해 분해성 가교제를 사용한 경우 비분해성 가교제를 사용한 경우보다 더 큰 세포회합체를 형성하였다. Figure 17은 하이드로젤에 캡슐레이션 RAW264.7 세포의 배양 시간에 따른 대사활성을 보여준다. Low G' 하이드로젤에서 4일간 배양했을 때 가장 높은 대사활성을 보이고 7일차가 됨에 따라 대사활성이 일정하게 유지되거나 감소하는 경향을 보이는 반면, High G' 하이드로젤에서는 배양 시간이 길어질수록 대사활성이 증가하였다. 특히 분해성 가교제를 사용한

Table 5. Cell viabilities of RAW264.7 cells encapsulated in PEG hydrogels of different degradability and stiffness 1-h post-encapsulation. The viability value was obtained from the acquired Live/Dead fluorescence images ($n \geq 4$).

	MMP-insensitive		MMP-sensitive	
	Low G′	High G′	Low G′	High G′
Cell viability (%, mean±SD)	82.6 ± 9.8	84.8 ± 10.3	82.0 ± 7.8	79.9 ± 16.7

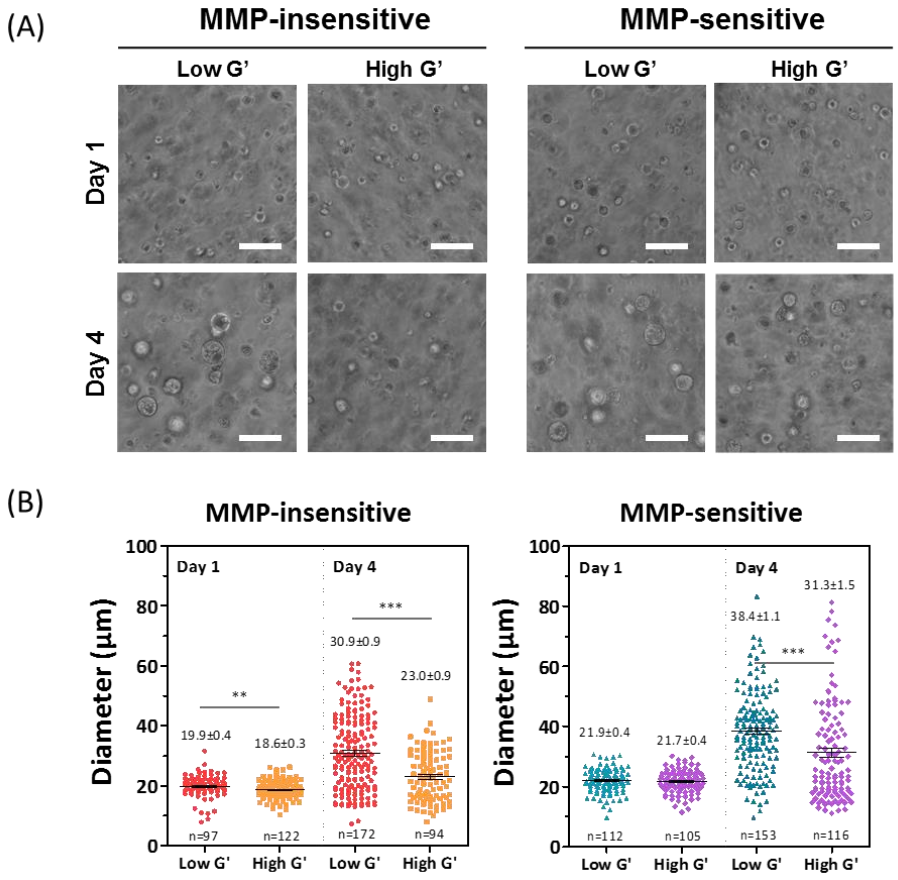

Figure 16. (A) Phase-contrast images of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness 1- and 4-day post-encapsulation (scale: 100 μm). (B) Cell cluster size distributions 1- and 4-day post-encapsulation (mean ± SEM, **p < 0.01; ***p < 0.001).

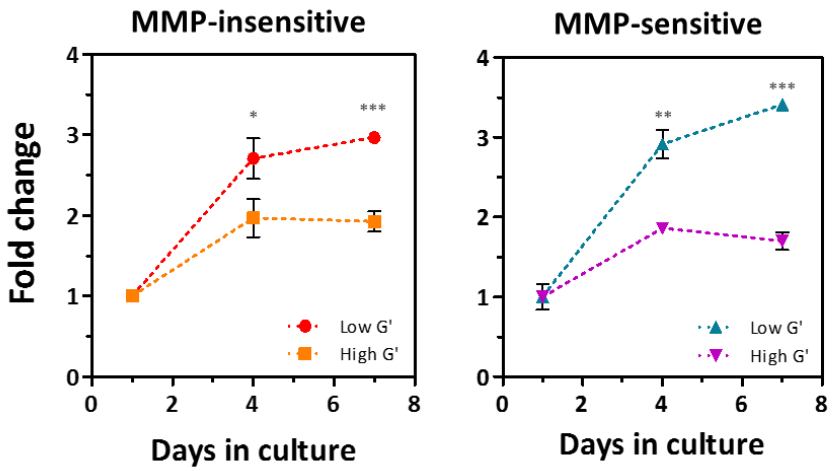

Figure 17. Metabolic activities of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels of different stiffness. The values are presented in fold change compared to the mean fluorescence intensity on day 1 (n = 3, mean ± SD, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

경우 그 차이가 확연히 나타났다. 이를 통해 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 증식은 기질 분해성보다 G'에 더 큰 영향을 받음을 알 수 있었다. 또한 기질 분해성에 관계없이 Low G' 하이드로 젤에서 높은 대사활성능과 증식능을 나타내며 상대적으로 큰 세포 회합체를 형성하였다. 이는 탄성율이 낮을 때 세포에 가해지는 물리적 스트레스가 덜하고, 산소나 영양분과 같은 물질들의 교환이 상대적으로 수월하게 일어나기 때문이다[114]. 특히 Low G' 하이드로젤에서 MMP 민감성 가교제를 사용하였을 때 세포 회합체 의 크기와 배양시간에 따른 대사활성이 증가하였다. 이는 MMP 민감성 가교제를 사용한 경우 세포가 분비하는 단백질 분해효소에 의해 기질이 더 많이 분해되기 때문이라고 생각된다.

Figure 18은 하이드로젤의 분해성 및 전단저장탄성율에 따른 3차원 하이드로젤 내 캡슐레이션 된 RAW264.7 세포의 염증성 사이토카인(iNOS, COX2, TNF-α)의 mRNA 발현양을 나타낸 것이다. 2D TCP에서 배양된 세포의 염증성 사이토카인의 mRNA 발현양을 기준으로 했을 때, 세 가지 종류의 염증성 사이토카인 모두 High G' 하이드로젤 내에 캡슐레이션된 세포에서 유의미한 차이를 나타내며 증가하였다. 특히 iNOS와 COX2의 경우 그 발현양이 현저히 증가함을 보였다(Figure 18(A), (B)). 그리고 ELISA 분석으로 통해 TNF-α의 발현을 정량하였다(Figure 19). 2D TCP에 배양된 RAW264.7 세포에서 발현된 TNF-α양과 비교했을 때, 3차원 하이드로젤 내에 캡슐레이션 세포에서 약 4배-9배 정도 발현양이 증가함을 확인하였다. 또한 기질 분해성에 관계없이 Low G' 하이드로젤보다 High G' 하이드로젤에서 TNF-α 발현양이 증가하였으나 MMP 민감성 가교제를 사용한 경우 통계적

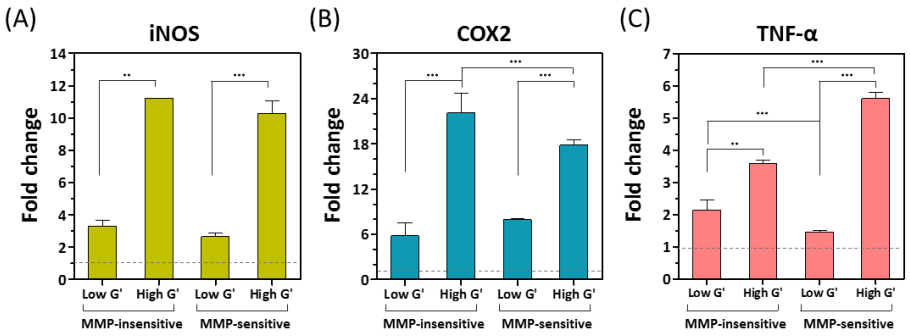

Figure 18. Inflammatory cytokine gene expression levels of RAW264.7 cells encapsulated in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels 4-day post-encapsulation (A: iNOS; B: COX2; C: TNF-α). 1-fold is an expression level of cells cultured on 2D TCP (n = 3, mean ± SD, **p < 0.01; ***p < 0.001).

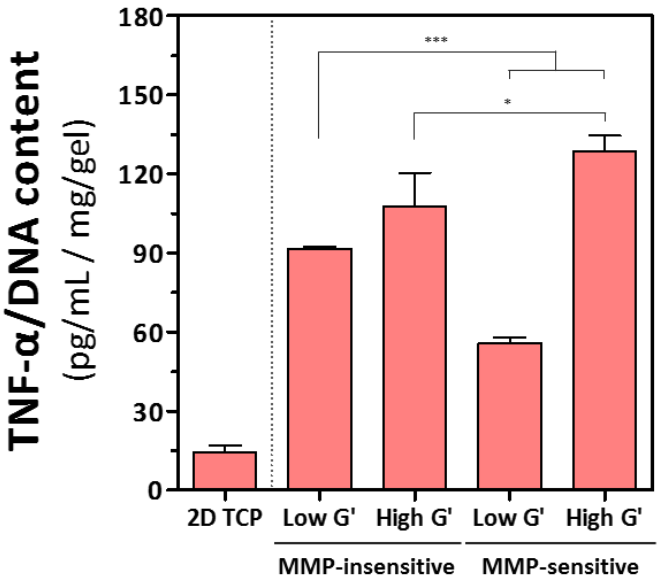

Figure 19. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) expression levels of RAW264.7 cells in MMP-insensitive and MMP-sensitive PEG hydrogels 4-day post-encapsulation (n = 3, mean ± SD).

으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 분해성에 관계없이 Low G' 하이드로젤보다 High G' 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포에서 염증성 사이토카인의 발현이 증가하는 것을 통해 분해성에 따른 영향보다는 G'에 의한 영향이 더 크게 작용함을 알 수 있었다. Blakney 등과 Patel 등은 기질의 탄성율이 높은 경우 면역세포의 F-액틴 발현이 증가함을 확인하였고, 이는 기질 탄성율에 따라 면역세포의 세포골격의 형성을 조절하여 환경 변화에 따른 반응을 나타낸 것이라 설명하였다[24, 115]. 또한 Previtera 등은 기질의 탄성율이 증가할수록 기질의 표면에 배양된 대식세포의 톨유사수용체 4(toll-like receptor 4, TLR4)와 같은 자극 수용체가 더 많이 활성화되어 염증성 매개물질이 증가되는 매커니즘을 보고하였다[87].

제 5 장 결 론

본 연구에서는 3차원 배양 환경에서 대식세포의 생리학적 거동을 살펴보기 위해 PEG 기반의 하이드로젤에 RAW264.7 세포를 캡슐레이션하여 배양하였다. 다양한 조직의 3차원 환경을 모사하기 위해 하이드로젤의 물성(분해성, 생활성, 전단탄성율)을 조절하였고 이에 따른 세포의 대사활성, 구조, 및 분화 특성을 분석하였다. 그 결과 3차원 배양된 면역세포의 분비형 및 막고정형 MMP 발현이 증가하여 이들 효소에 의해 분해될 수 있는 하이드로젤에서 캡슐레이션된 세포가 활발하게 증식하였고 비분해성 하이드로젤 조건과 비교할 때 상대적으로 더 큰 구형의 세포회합체를 형성하였다. 생활성 성분인 콜라겐 I 의 고정화는 통계적 유의차가 없는 수준에서 세포의 대사활성 증가를 유발하였으나 염증성 사이토카인의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 마지막으로 기질 분해성과 G'은 캡슐레이션된 RAW264.7 세포의 증식과 분화에 영향을 미쳤지만, 기질 분해성에 의한 영향보다는 G'에 의한 영향이 더 크게 나타났다. Low G' 하이드로젤에 캡슐레이션된 경우 대사활성이 높고 세포회합체의 크기가 크게 나타난 반면 염증성 사이토카인의 경우 High G' 하이드로젤에서 발현양이 증가하였다. 또한 2차원 TCP에 배양된 경우와 비교하였을 때 3차원 하이드로젤에 캡슐레이션된 RAW264.7 세포에서 기질분해효소 및 염증성 사이토카인의 발현이 증가하였으며 이는 배양 환경에 따른 세포의 부착 단백질이나 자극수용체의 양의 차이로 기인하는 것이라 생각된다.

위의 결과들을 바탕으로 PEG 기반 하이드로젤이 면역세포

의 3차원 배양을 위한 소재로 사용하기에 적합함을 확인하였다. 뿐만 아니라 하이드로젤의 물성을 조절하여 실제 체내에서 면역세포가 노출될 수 있는 3차원 환경을 모사할 수 있었다. 이러한 결과는 다양한 환경 변화에 따른 대식세포의 거동을 분석하기 위한 기초 자료로서 조직 공학 분야나 생체 의용 분야에서 활용할 수 있을 것이라 기대된다.

참고 문헌

[1] A. Raza, C.S. Ki, C.C. Lin, The influence of matrix properties on growth and morphogenesis of human pancreatic ductal epithelial cells in 3D, Biomaterials 34(21) (2013) 5117-5127.

[2] C.S. Ki, T. Y. Lin, M. Korc, C.C. Lin, Thiol-ene hydrogels as desmoplasia-mimetic matrices for modeling pancreatic cancer cell growth, invasion, and drug resistance, Biomaterials 35(36) (2014) 9668-9677.

[3] F.A. Jaffer, D. E. Kim, L. Quinti, C. H. Tung, E. Aikawa, A.N. Pande, R.H. Kohler, G.-P. Shi, P. Libby, R. Weissleder, Optical visualization of cathepsin K activity in atherosclerosis with a novel, protease-activatable fluorescence sensor, Circulation 115(17) (2007) 2292-2298.

[4] L.G. Griffith, M.A. Swartz, Capturing complex 3D tissue physiology in vitro, Nature reviews molecular cell biology 7(3) (2006) 211-224.

[5] J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, Tissue engineering part B: reviews 14(1) (2008) 61-86.

[6] B.M. Baker, C.S. Chen, Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues, Journal of cell science 125(13) (2012) 3015-3024.

[7] M. Li, A.M. Rezakhanlou, C. Chavez-Munoz, A. Lai, A. Ghahary, Keratinocyte-releasable factors increased the expression of MMP1 and MMP3 in co-cultured fibroblasts under both 2D and 3D culture conditions, Molecular and cellular biochemistry 332(1-2) (2009) 1-8.

[8] S. Breslin, L. O' Driscoll, Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery, Drug discovery today 18(5) (2013) 240-249.

[9] Y. Imamura, T. Mukohara, Y. Shimono, Y. Funakoshi, N. Chayahara, M. Toyoda, N. Kiyota, S. Takao, S. Kono, T. Nakatsura, Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer, Oncology reports 33(4) (2015) 1837-1843.

[10] M. Alemany-Ribes, C.E. Semino, Bioengineering 3D environments for cancer models, Advanced drug delivery reviews 79 (2014) 40-49.

[11] H. Hong, J.P. Stegemann, 2D and 3D collagen and fibrin biopolymers promote specific ECM and integrin gene expression by vascular smooth muscle cells, Journal of biomaterials science, Polymer edition 19(10) (2008) 1279-1293.

[12] M.W. Tibbitt, K.S. Anseth, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, Biotechnology and bioengineering 103(4) (2009) 655-663.

[13] X. Chen, S.L. Thibeault, Biocompatibility of a synthetic extracellular matrix on immortalized vocal fold fibroblasts in 3-D culture, Acta biomaterialia 6(8) (2010) 2940-2948.

[14] I.M. Adjei, S. Blanka, Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach, Journal of functional biomaterials 6(1) (2015) 81-103.

[15] Q. Yang, J. Peng, Q. Guo, J. Huang, L. Zhang, J. Yao, F. Yang, S. Wang, W. Xu, A. Wang, A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells, Biomaterials 29(15) (2008) 2378-2387.

[16] S. Schwarz, L. Koerber, A.F. Elsaesser, E. Goldberg-Bockhorn, A.M. Seitz, L. Dürselen, A. Ignatius, P. Walther, R. Breiter, N. Rotter, Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications, Tissue engineering part A 18(21-22) (2012) 2195-2209.

[17] S. Utech, A.R. Boccaccini, A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers, Journal of materials science 51(1) (2016) 271-310.

[18] N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology, Advanced materials 18(11) (2006) 1345-1360.

[19] H. Omidian, J.G. Rocca, K. Park, Advances in superporous hydrogels, Journal of controlled release 102(1) (2005) 3-12.

[20] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: progress and challenges, Polymer 49(8) (2008) 1993-2007.

[21] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, Advanced drug delivery reviews 64 (2012) 18-23.

[22] M. Guvendiren, J.A. Burdick, Engineering synthetic hydrogel microenvironments to instruct stem cells, Current opinion in biotechnology 24(5) (2013) 841-846.

[23] E. Bakaic, N.M. Smeets, T. Hoare, Injectable hydrogels based on poly (ethylene glycol) and derivatives as functional biomaterials, RSC advances 5(45) (2015) 35469-35486.

[24] P.N. Patel, A.S. Gobin, J.L. West, C.W. Patrick, Poly (ethylene glycol) hydrogel system supports preadipocyte viability, adhesion, and proliferation, Tissue engineering 11(9-10) (2005) 1498-1505.

[25] E.Y. Tokuda, C.E. Jones, K.S. Anseth, PEG–peptide hydrogels reveal differential effects of matrix microenvironmental cues on melanoma drug sensitivity, Integrative biology 9 (2017) 76–87.

[26] J.D. McCall, K.S. Anseth, Thiol–ene photopolymerizations provide a facile method to encapsulate proteins and maintain their bioactivity, Biomacromolecules 13(8) (2012) 2410–2417.

[27] C. Wang, X. Tong, F. Yang, Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using PEG–based hydrogels, Molecular pharmaceutics 11(7) (2014) 2115–2125.

[28] J.A. Benton, B.D. Fairbanks, K.S. Anseth, Characterization of valvular interstitial cell function in three dimensional matrix metalloproteinase degradable PEG hydrogels, Biomaterials 30(34) (2009) 6593–6603.

[29] M.W. Tibbitt, A.M. Kloxin, L.A. Sawicki, K.S. Anseth, Mechanical properties and degradation of chain and step–polymerized photo–degradable hydrogels, Macromolecules 46(7) (2013) 2785–2792.

[30] E.B. Peters, N. Christoforou, K.W. Leong, G.A. Truskey, J.L. West, Poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds containing cell–adhesive and protease–sensitive peptides support microvessel formation by endothelial progenitor cells, Cellular and molecular bioengineering 9(1) (2016) 38–54.

[31] C.C. Lin, C.S. Ki, H. Shih, Thiol–norbornene photoclick hydrogels for tissue engineering applications, Journal of applied polymer science 132(8) (2015) 41563–41573.

[32] B.D. Fairbanks, M.P. Schwartz, A.E. Halevi, C.R. Nuttelman, C.N. Bowman, K.S. Anseth, A versatile synthetic extracellular matrix mimic

via thiol-norbornene photopolymerization, Advanced materials 21(48) (2009) 5005-5010.

[33] S.B. Anderson, C.C. Lin, D.V. Kuntzler, K.S. Anseth, The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels, Biomaterials 32(14) (2011) 3564-3574.

[34] Z. Mũnoz, H. Shih, C.C. Lin, Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol–norbornene photochemistry for cell encapsulation, Biomaterials Science 2(8) (2014) 1063-1072.

[35] A.D. Foey, Macrophages—masters of immune activation, suppression and deviation, InTech (2014) 121-148.

[36] T.R. Cox, J.T. Erler, Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer, Disease models & mechanisms 4(2) (2011) 165-178.

[37] C. Vérollet, G.M. Charriere, A. Labrousse, C. Cougoule, V. Le Cabec, I. Maridonneau-Parini, Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough, European journal of immunology 41(10) (2011) 2805-2813.

[38] M.Y. Chang, C.K. Chan, K.R. Braun, P.S. Green, K.D. O'Brien, A. Chait, A.J. Day, T.N. Wight, Monocyte-to-macrophage differentiation synthesis and secretion of a complex extracellular matrix, Journal of biological chemistry 287(17) (2012) 14122-14135.

[39] M.P. Smith, H. Young, A. Hurlstone, C. Wellbrock, Differentiation of THP1 cells into macrophages for transwell co-culture assay with melanoma cells, Bio-protocol 5(21) (2015).

[40] K.A. Barth, J.D. Waterfield, D.M. Brunette, The effect of surface roughness on RAW 264.7 macrophage phenotype, Journal of biomedical

materials research part A 101(9) (2013) 2679-2688.

[41] S. Féréol, R. Fodil, B. Labat, S. Galiacy, V.M. Laurent, B. Louis, D. Isabey, E. Planus, Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties, Cytoskeleton 63(6) (2006) 321-340.

[42] J.M. Grolman, D. Zhang, A.M. Smith, J.S. Moore, K.A. Kilian, Rapid 3D extrusion of synthetic tumor microenvironments, Advanced materials 27(37) (2015) 5512-5517.

[43] L.A. Reis, L.L. Chiu, Y. Liang, K. Hyunh, A. Momen, M. Radisic, A peptide-modified chitosan-collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery, Acta biomaterialia 8(3) (2012) 1022-1036.

[44] Y.-I. Shen, H.E. Abaci, Y. Krupski, L.C. Weng, J.A. Burdick, S. Gerecht, Hyaluronic acid hydrogel stiffness and oxygen tension affect cancer cell fate and endothelial sprouting, Biomaterials science 2(5) (2014) 655-665.

[45] M. Kumar, J. Coburn, D.L. Kaplan, B.B. Mandal, Immuno-Informed 3D Silk Biomaterials for Tailoring Biological Responses, ACS applied materials & interfaces 8(43) (2016) 29310-29322.

[46] R. Tan, Z. She, M. Wang, Z. Fang, Y. Liu, Q. Feng, Thermo-sensitive alginate-based injectable hydrogel for tissue engineering, Carbohydrate polymers 87(2) (2012) 1515-1521.

[47] M. Endres, D. Hutmacher, A. Salgado, C. Kaps, J. Ringe, R. Reis, M. Sittinger, A. Brandwood, J. T. Schantz, Osteogenic induction of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer-hydrogel matrices, Tissue engineering 9(4) (2003) 689-702.

[48] I.M. El-Sherbiny, M.H. Yacoub, Hydrogel scaffolds for tissue

engineering: Progress and challenges, Global cardiology science and practice (2013) 38-64.

[49] S.J. Bryant, J.A. Arthur, K.S. Anseth, Incorporation of tissue-specific molecules alters chondrocyte metabolism and gene expression in photocrosslinked hydrogels, Acta biomaterialia 1(2) (2005) 243-252.

[50] A.C. Kumar, H. Erothu, Synthetic polymer hydrogels, Biomedical applications of polymeric materials and composites (2016).

[51] E.S. Place, J.H. George, C.K. Williams, M.M. Stevens, Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering, Chemical society reviews 38(4) (2009) 1139-1151.

[52] B. Chevallay, D. Herbage, Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy, Medical and biological engineering and computing 38(2) (2000) 211-218.

[53] A. Desai, W.S. Kisaalita, C. Keith, Z. Z. Wu, Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell culture and differentiation in 3-D collagen hydrogels for cell-based biosensing, Biosensors and bioelectronics 21(8) (2006) 1483-1492.

[54] L.E. O'leary, J.A. Fallas, E.L. Bakota, M.K. Kang, J.D. Hartgerink, Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel, Nature chemistry 3(10) (2011) 821-828.

[55] D. Bosnakovski, M. Mizuno, G. Kim, S. Takagi, M. Okumura, T. Fujinaga, Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis,

Biotechnology and bioengineering 93(6) (2006) 1152-1163.

[56] J.L. van Susante, P. Buma, G.J. van Osch, D. Versleyen, P.M. van der Kraan, W.B. van der Berg, G.N. Homminga, Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels, Acta orthopaedica scandinavica 66(6) (1995) 549-556.

[57] T. Mio, Y. Adachi, D.J. Romberger, R.F. Ertl, S.I. Rennard, Regulation of fibroblast proliferation in three-dimensional collagen gel matrix, In vitro cellular & developmental biology-animal 32(7) (1996) 427-433.

[58] T. Kobayashi, H. Kim, X. Liu, H. Sugiura, T. Kohyama, Q. Fang, F.-Q. Wen, S. Abe, X. Wang, J.J. Atkinson, Matrix metalloproteinase-9 activates TGF-β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels, American Journal of physiology-lung cellular and molecular physiology 306(11) (2014) L1006-L1015.

[59] J. Zhu, Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering, Biomaterials 31(17) (2010) 4639-4656.

[60] C.N. Salinas, K.S. Anseth, The influence of the RGD peptide motif and its contextual presentation in PEG gels on human mesenchymal stem cell viability, Journal of tissue engineering and regenerative medicine 2(5) (2008) 296.

[61] M.J. Joralemon, S. McRae, T. Emrick, PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems, Chemical communications 46(9) (2010) 1377-1393.

[62] J. Li, W.J. Kao, Synthesis of polyethylene glycol (PEG) derivatives and PEGylated-peptide biopolymer conjugates, Biomacromolecules 4(4) (2003) 1055-1067.

[63] C.C. Lin, Recent advances in crosslinking chemistry of biomimetic

poly (ethylene glycol) hydrogels, RSC advances 5(50) (2015) 39844-39853.

[64] N.E. Fedorovich, M.H. Oudshoorn, D. van Geemen, W.E. Hennink, J. Alblas, W.J. Dhert, The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels, Biomaterials 30(3) (2009) 344-353.

[65] B. Baroli, Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications, Journal of chemical technology and biotechnology 81(4) (2006) 491-499.

[66] D. Wang, M. Wagner, H.-J. Butt, S. Wu, Supramolecular hydrogels constructed by red-light-responsive host-guest interactions for photo-controlled protein release in deep tissue, Soft matter 11(38) (2015) 7656-7662.

[67] R. Sunyer, A.J. Jin, R. Nossal, D.L. Sackett, Fabrication of hydrogels with steep stiffness gradients for studying cell mechanical response, PloS one 7(10) (2012) e46107.

[68] R.A. Marklein, J.A. Burdick, Spatially controlled hydrogel mechanics to modulate stem cell interactions, Soft matter 6(1) (2010) 136-143.

[69] J.J. Roberts, S.J. Bryant, Comparison of photopolymerizable thiol-ene PEG and acrylate-based PEG hydrogels for cartilage development, Biomaterials 34(38) (2013) 9969-9979.

[70] S. Lin-Gibson, R.L. Jones, N.R. Washburn, F. Horkay, Structure-property relationships of photopolymerizable poly(ethylene glycol) dimethacrylate hydrogels, Macromolecules 38(7) (2005) 2897-2902.

[71] G.M. Cruise, D.S. Scharp, J.A. Hubbell, Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized

poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels, Biomaterials 19(14) (1998) 1287-1294.

[72] G.D. Nicodemus, S.J. Bryant, Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, Tissue engineering part B: reviews 14(2) (2008) 149-165.

[73] C.C. Lin, A. Raza, H. Shih, PEG hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell spheroids, Biomaterials 32(36) (2011) 9685-9695.

[74] I. Gibas, H. Janik, Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications, Chemistry & chemical technology 4(4) (2010) 297-304.

[75] S. Lee, X. Tong, F. Yang, Effects of the poly (ethylene glycol) hydrogel crosslinking mechanism on protein release, Biomaterials science 4(3) (2016) 405-411.

[76] W.M. Gramlich, I.L. Kim, J.A. Burdick, Synthesis and orthogonal photopatterning of hyaluronic acid hydrogels with thiol-norbornene chemistry, Biomaterials 34(38) (2013) 9803-9811.

[77] S. Singh, M. Schwartz, E. Tokuda, Y. Luo, R. Rogers, M. Fujita, N. Ahn, K. Anseth, A synthetic modular approach for modeling the role of the 3D microenvironment in tumor progression, Scientific reports 5 (2015) 17814-17822.

[78] B.V. Sridhar, J.L. Brock, J.S. Silver, J.L. Leight, M.A. Randolph, K.S. Anseth, Development of a cellularly degradable PEG hydrogel to promote articular cartilage extracellular matrix deposition, Advanced healthcare materials 4(5) (2015) 702-713.

[79] K.A. Kyburz, K.S. Anseth, Three-dimensional hMSC motility

within peptide-functionalized PEG-based hydrogels of varying adhesivity and crosslinking density, Acta biomaterialia 9(5) (2013) 6381-6392.

[80] C.S. Ki, H. Shih, C.C. Lin, Facile preparation of photodegradable hydrogels by photopolymerization, Polymer 54(8) (2013) 2115-2122.

[81] T. Y. Lin, C.S. Ki, C.C. Lin, Manipulating hepatocellular carcinoma cell fate in orthogonally cross-linked hydrogels, Biomaterials 35(25) (2014) 6898-6906.

[82] H. Shih, A.K. Fraser, C.C. Lin, Interfacial thiol-ene photoclick reactions for forming multilayer hydrogels, ACS applied materials & interfaces 5(5) (2013) 1673-1680.

[83] H. Shih, C.C. Lin, Cross-linking and degradation of step-growth hydrogels formed by thiol-ene photoclick chemistry, Biomacromole-cules 13(7) (2012) 2003-2012.

[84] T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, Nature immunology 11(5) (2010) 373-384.

[85] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, Nature 392(6673) (1998) 245-252.

[86] A.K. Abbas, K.M. Murphy, A. Sher, Functional diversity of helper T lymphocytes, Nature 383(6603) (1996) 787.

[87] M.L. Previtera, A. Sengupta, Substrate stiffness regulates proinflammatory mediator production through TLR4 activity in macrophages, PloS one 10(12) (2015) e0145813.

[88] S.E. Hanson, S.N. King, J. Kim, X. Chen, S.L. Thibeault, P. Hematti, The effect of mesenchymal stromal cell-hyaluronic acid hydrogel constructs on immunophenotype of macrophages, Tissue engineering

part A 17(19-20) (2011) 2463-2471.

[89] H. Waldeck, X. Wang, E. Joyce, W.J. Kao, Active leukocyte detachment and apoptosis/necrosis on PEG hydrogels and the implication in the host inflammatory response, Biomaterials 33(1) (2012) 29-37.

[90] E. Van Goethem, R. Poincloux, F. Gauffre, I. Maridonneau-Parini, V. Le Cabec, Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures, The journal of immunology 184(2) (2010) 1049-1061.

[91] M. Bartneck, V.A. Schulte, N.E. Paul, M. Diez, M.C. Lensen, G. Zwadlo-Klarwasser, Induction of specific macrophage subtypes by defined micro-patterned structures, Acta biomaterialia 6(10) (2010) 3864-3872.

[92] B.D. Fairbanks, M.P. Schwartz, C.N. Bowman, K.S. Anseth, Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility, Biomaterials 30(35) (2009) 6702-6707.

[93] A.C. Newby, Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability, Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 28(12) (2008) 2108-2114.

[94] S.D. Shapiro, Matrix metalloproteinase degradation of extra-cellular matrix: biological consequences, Current opinion in cell biology 10(5) (1998) 602-608.

[95] S.D. Shapiro, R.M. Senior, Matrix metalloproteinases: matrix degradation and more, American journal of respiratory cell and

molecular biology 20(6) (1999) 1100-1102.

[96] F. Lecaille, D. Brömme, G. Lalmanach, Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity, Biochimie 90(2) (2008) 208-226.

[97] J. Patterson, J.A. Hubbell, Enhanced proteolytic degradation of molecularly engineered PEG hydrogels in response to MMP-1 and MMP-2, Biomaterials 31(30) (2010) 7836-7845.

[98] A. Pujada, Matrix metalloproteinases as potential fecal biomarkers for ulcerative colitis-a function beyond their proteolytic activity, cancer (CRC) 12 (2016) 14.

[99] L. Fang, X.J. Du, X.M. Gao, A.M. Dart, Activation of peripheral blood mononuclear cells and extracellular matrix and inflammatory gene profile in acute myocardial infarction, Clinical science 119(4) (2010) 175-183.

[100] N. Le, M. Xue, L.A. Castelnoble, C.J. Jackson, The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation, Front bioscience 12(1) (2007) 1475-1487.

[101] J. Reiser, B. Adair, T. Reinheckel, Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease, The Journal of clinical investigation 120(10) (2010) 3421-3431.

[102] H. Ha, H.B. Kwak, S.W. Lee, H.M. Jin, H.M. Kim, H.H. Kim, Z.H. Lee, Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts, Experimental cell research 301(2) (2004) 119-127.

[103] H. Kim, I.Y. Kim, S.Y. Lee, D. Jeong, Bimodal actions of reactive oxygen species in the differentiation and bone-resorbing functions of osteoclasts, FEBS letters 580(24) (2006) 5661-5665.

[104] S. Srinivasan, N.G. Avadhani, Hypoxia-mediated mitochondrial stress in RAW264. 7 cells induces osteoclast-like TRAP-positive cells,

Annals of the New York academy of sciences 1117(1) (2007) 51-61.
[105] G. Riley, Tendon and ligament biochemistry and pathology, Soft tissue rheumatology 2053 (2004).
[106] M.K. Cho, S.H. Suh, C.H. Lee, S.G. Kim, Bovine type I collagen inhibits Raw264. 7 cell proliferation through phosphoinositide 3-kinase-and mitogen-activated protein kinase-dependent down-regulation of cyclins D1, A and B1, Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research 1744(1) (2005) 47-57.
[107] T. Collier, J. Anderson, Protein and surface effects on monocyte and macrophage adhesion, maturation, and survival, Journal of biomedical materials research 60(3) (2002) 487-496.
[108] Y.C. Shin, J.H. Lee, M.J. Kim, J.H. Park, S.E. Kim, J.S. Kim, J. W. Oh, D. W. Han, Biomimetic hybrid nanofiber sheets composed of RGD peptide-decorated PLGA as cell-adhesive substrates, Journal of functional biomaterials 6(2) (2015) 367-378.
[109] M. Binner, L.J. Bray, J. Friedrichs, U. Freudenberg, M.V. Tsurkan, C. Werner, Cell-instructive starPEG-heparin-collagen composite matrices, Acta biomaterialia (2017).
[110] D.R. Haudenschild, B. Nguyen, J. Chen, D.D. D'lima, M.K. Lotz, Rho kinase-dependent CCL20 induced by dynamic compression of human chondrocytes, Arthritis & rheumatism 58(9) (2008) 2735-2742.
[111] A. Papapetropoulos, K.M. Desai, R.D. Rudic, B. Mayer, R. Zhang, M.P. Ruiz-Torres, G. García-Cardeña, J.A. Madri, W.C. Sessa, Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro, The American journal of pathology 150(5) (1997) 1835.

[112] K.E. Sung, X. Su, E. Berthier, C. Pehlke, A. Friedl, D.J. Beebe, Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models, PloS one 8(10) (2013) e76373.

[113] S.S. Htwe, H. Harrington, A. Knox, F. Rose, J. Aylott, J.W. Haycock, A.M. Ghaemmaghami, Investigating NF-κB signaling in lung fibroblasts in 2D and 3D culture systems, Respiratory research 16(1) (2015) 144.

[114] C.S. Ki, H. Shih, C.C. Lin, Effect of 3D matrix compositions on the efficacy of EGFR inhibition in pancreatic ductal adenocarcinoma cells, Biomacromolecules 14(9) (2013) 3017-3026.

[115] A.K. Blakney, M.D. Swartzlander, S.J. Bryant, The effects of substrate stiffness on the in vitro activation of macrophages and in vivo host response to poly (ethylene glycol)-based hydrogels, Journal of biomedical materials research. part A 100(6) (2012) 1375.

Abstract

Effect of three-dimensional matrix properties on morphology, proliferation, and differentiation of RAW264.7 cells

Minchae Kim
Department of Biosystems & Biomaterials
Science and Engineering
The Graduate School
Seoul National University

Macrophages play an important role in both innate and adaptive immune systems. Macrophages undergo dramatic environmental changes in migration to the target tissue as well as phagocytosis. Especially, macrophages become to be surrounded by various types of three-dimensional extracellular matrices depending on organs or carcinoma. Nevertheless, conventional macrophage culture has largely relied on a traditional 2D surface culture platform using tissue culture plate

(TCP) or suspension system. In this study, a PEG hydrogel-based 3D culture platform for macrophage was investigated. RAW264.7 cells were encapsulated in thiol-norbornene PEG hydrogel niches of which diverse physical and physiological properties (i.e., degradability, stiffness, bioactive component) were modulated. It was observed that gene expressions of proteases that remodel matrix and inflammatory cytokines were markedly upregulated in 3D, resulting in rapid hydrogel network degradation. The incorporated collagen I promoted the growth of cell clusters while it did not significantly affect inflammatory cytokine expressions. In stiff hydrogel, the expressions of inflammatory cytokines were upregulated whereas the macrophage proliferation was relatively inhibited compared to hydrogel of a lower stiffness. These findings indicated that the physiological behaviors of macrophages can be dictated by surrounding 3D environment and PEG hydrogel would be a proper 3D culture platform for macrophage.

Keywords : Macrophage, RAW264.7, hydrogel, poly(ethylene glycol), 3D cell culture

Student Number : 2015-23027