



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](#)

공학석사 학위논문

근육 fiber 를 모사한 scaffold 제작과
전기 자극을 통한 근육 재생에 관한 연구

A study on the fabrication of scaffolds mimic muscle
fibers and muscle regeneration using electrical
stimulation

울 산 대 학 교 대 학 원
의 과 학 과
문 정 우

근육 fiber 를 모사한 scaffold 제작과
전기 자극을 통한 근육 재생에 관한 연구

지도교수 최재순

이 논문을 공학석사 학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교대학원
의과학과
문정우

문정우의 공학석사 학위 논문을 인준함

심사위원장 황 창 모 (인)

심사위원 문 영 진 (인)

심사위원 최 재 순 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022 년 2 월

국문요약

근육은 신체의 항상성 유지와 물질대사 등에 관여하는 중요한 조직이다. 하지만 근육이 과도한 손상이 입었을 때 스스로 완전히 회복되지 못함에 따라 근육 재생을 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 그 중 조직공학적 접근 방법으로 3D 프린팅이나, 전기방사, 표면 patterning 등을 활용하여 scaffold를 제작한 후에 Myoblast와 결합하여 Myoblast-patch를 손상된 부위에 이식하여 근육 재생을 촉진하는 방법이 있다. 또한 제작된 Myoblast-patch에 물리적 자극을 가하여 Myoblast의 분화를 촉진시키는 연구가 보고된 바가 있다. 따라서 본 실험에서는 생분해성 특성을 가진 생체적합성 재료를 사용하여 scaffold를 제작하고 immortal cell line Myoblast인 C2C12를 scaffold에 seeding하여 Myoblast-patch를 제작하였다. 그 후, 전기 자극을 주어 결과를 분석하였다.

본 연구에서는 생체적합성 재료 PCL과 유기용매인 HFIP를 사용하였고, 전기방사 기법을 활용하여 scaffold를 제작하였다. 이 때, 근육fiber를 모사한 Align한 형태의 scaffold와 Random한 형태의 scaffold로 두 그룹으로 나누어 제작하였다. 제작된 Myoblast-patch의 인장강도를 측정된 결과 Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch에서 더 크게 나타났다. 또한 전자주사현미경(SEM)을 사용하여 Aligned scaffold의 표면을 관찰하고 fiber의 각도를 측정된 결과 $\pm 10^\circ$ 내로 정렬된 것을 확인할 수 있었다.

제작한 Myoblast-patch의 세포 증식 정도를 확인하기 위해 CCK-8 assay를 통해 두 그룹의 Myoblast-patch의 세포 증식능을 비교하고 면역형광법을 이용하여 세포 분화능을 확인한 결과, Aligned Myoblast-patch에서 세포 증식능 및 분화능이 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 Myoblast-patch에 Ca^{2+} 을 넣고 세포가 수축과 이완을 반복하여 운동할 때 나타나는 intensity를 비교한 결과, Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch에서 intensity 값이 더 크게 나오는 것을 확인하였다. 운동 시 발생하는 Myokine 인자를 관찰한 결과 전기 자극을 주지 않았을 때와 주었을 때에 육안으로 비교한 결과, 추가적인 실험 및 분석이 필요할 것으로 생각된다. 결론적으로, 본 연구를

통하여 근육 fiber를 모사한 Aligned Myoblast-patch에서 세포 증식능, 분화능, Ca^{2+} imaging 결과 모두 더 높게 나타났다.

따라서 Aligned Myoblast-patch가 세포배양에 더 적합하다고 판단되며, 본 연구는 근육 재생과 Biohybrid 로봇의 기초연구로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

차례

국문 요약	I
표 목차	IV
그림 목차	V
서론	1
연구 방법	8
연구 결과	17
고찰	30
결론	32
참고문헌	33
영문요약	36

표 목차

표 1. Align 된 scaffold 와 Random 된 scaffold 제작을 위한 전기 방사 조건 . . .	13
표 2. Myoblast marker, Myokine 과 Actin 의 형광 염색을 위한 재료 목록	14

그림 목차

그림 1. 근육의 역할	3
그림 2. 근육 치료 방법 예시	4
그림 3. Myoblast-patch 제작 모식도	5
그림 4. Myoblast 의 성장 및 분화 과정	6
그림 5. 본 실험의 목적 및 연구 방법	7
그림 6 제작한 scaffold 의 실제 모습	15
그림 7. 전기 자극을 위한 셋팅	16
그림 8. SEM 으로 촬영한 scaffold 의 표면	20
그림 9. Aligned scaffold 와 Random scaffold 의 방향성을 나타낸 그래프	21
그림 10. Aligned scaffold 와 Random scaffold 의 탄성을 나타내는 그래프	22
그림 11. Aligned & Random Myoblast-patch 의 CCK-8 결과	23
그림 12. Actin 발현 확인	24
그림 13. Differentiation marker 4 일차 Aligned & Random Myoblast-patch 비교	25
그림 14. Differentiation marker 10 일차 Aligned & Random Myoblast-patch 비교	25
그림 15. Differentiation marker Aligned Myoblast-patch 의 일자 별 분화능 비교	26
그림 16. Differentiation marker Random Myoblast-patch 의 일자 별 분화능 비교	26
그림 17. 전기 자극 시 Ca^{2+} 이동에 따른 밝기 변화	27
그림 18. 전기 자극 시 Aligned Myoblast-patch 와 Random Myoblast-patch 의 비교	28
그림 19. 전기 자극 준 patch 와 주지 않은 patch 의 Myokine 발현	29

서론

근육은 근세포들이 결합하여 이루어진 집단으로, 신체를 유지할 뿐만 아니라 신체 에너지 항상성 조절에 중요한 역할을 하고 신체 활동에 대한 대사 반응 매개체 역할, 등 다양한 역할을 수행한다 (그림 1) [1]. 하지만, 노화나 불의의 사고, 또는 비만으로 인한 각종 질병, 등으로 인하여 근육의 손실 및 손상이 발생하게 된다. 예를 들어, 질환 중 한 가지인 Duchenne Muscular Dystrophy(DMD, 근이영양증)는 운동 기능을 약화시키는 근육질환이다 [2]. 대부분 유전적 질환으로, 특히 5000명 1명 꼴로 유년기 남자아이에게 많이 발생된다고 알려진 이 질병은 점차 골격근이 약화되고, 근육단백질이 손실되는 등 근육 세포 및 조직에 치명적인 영향을 미치는 특징이 있다 [2]. 이 질환은 완치가 불가능한 질병이며 약물 복용과 치료를 통해 질병의 진행을 늦추는 정도의 치료만 가능하다. 이처럼 마땅한 치료가 없는 질병의 경우나 외부 근육의 손상 정도에 따라 심한 경우 (Volumetric Muscle Loss, VML) 스스로 완전히 회복되지 못하는 경우가 있다. 따라서, 손상된 근육을 회복시키기 위해 지금까지 다양한 연구들이 진행되어 왔다 [3]. 근육 재생을 촉진시키기 위한 연구를 나누어 보면 세포치료를 통해 골격근을 재생하는 방법 [4], 조직 공학적 근육 구조체를 이용한 방법 [5], 등으로 나눌 수 있다 (그림 2). 먼저 세포치료를 이용한 방법은 자가 Myoblast나 근육유래 줄기세포를 손상된 근육에 직접 주사하여 세포를 이식하는 방법이 있고 [6], CD 133+와 같은 전구 세포를 동맥으로 주입하여 체순환을 통해 손상된 근육으로 접근시키는 방법 등이 연구 중에 있다 [7]. 하지만 근육에 직접 주사하는 방법은 주입 지점으로부터 최대 200 μm 이상 이동하지 못한다는 제한점이 있다 [8]. 동맥에 근육세포를 주입하는 방법의 경우에는, 원하는 부위 뿐만 아니라 세포가 다른 장기에 생착된다는 단점이 있다 [9]. 또한, 충분한 양의 자가 전구세포를 어렵고, 동물실험을 통한 윤리적 문제, 등 여러 제한점이 있다. 따라서 세포치료법 이외에도 조직공학적으로 접근하여 연구를 진행하고 있다 [10]. 조직공학적인 치료 방법은 생물학적 기능을 가진 scaffold와 세포를 결합하여 이를 손상된 부위에 이식하는 방법이다 [11]. 즉, 생체적합성 재료를 사용하여 3차원의 scaffold를 제작하고 그 위에 근원세포나 전구세포를 배양하여 제작된 근육 모사 구조물을 이용하여 근육 재생을 유도하는 접근법이다 [12]. 여기에 사용하는 생체

적합성 재료에는 여러 종류가 있는데 그 중 대표적인 것이 천연고분자와 합성 고분자가 있다 [13]. 생체 적합성 재료를 사용하여 scaffold를 제작할 때, scaffold의 강성이나, 탄성, 형태학 등 여러 요인들을 고려하여 근육 세포가 잘 자라기 적합한 환경을 조성해주기 위해 적절한 재료를 선택하는 것이 중요하다 [14]. 위 조건들을 확인하여 본 연구에는 생분해성 성질을 가진 생체 적합성 재료 Polycaprolactone (PCL)을 사용하였다. 또한, 제작된 scaffold나 Petri Dish에 근육세포를 배양할 때, 외부자극을 가하여 세포의 성장 및 분화를 유도하는 다양한 방법이 연구되고 있다 [15, 16]. 외부자극의 종류는 화학적 자극과 물리적 자극으로 나눌 수 있다. 그 중, 화학적 자극의 경우, 근육 세포를 배양할 때 특정 Growth factor, Cytokines, Small molecules, mRNA 등과 같은 bio-factor 양이나 반응 시간을 조절하는 방법이 있고, 물리적 자극의 경우는 배양되는 세포에 전기 자극 [17]이나 세포를 배양 중에 있는 scaffold를 일정한 강도의 힘을 주어 성장 및 분화를 유도하는 방법이 연구되고 있다 [18].

따라서 본 연구에서는 PCL을 전기 방사하여 align된 fiber를 가진 2.5차원 scaffold를 제작하였고, 그 위에 세포를 배양하여 Myoblast-patch를 제작하였다 (그림 3). 앞서 제작된 Myoblast-patch에서 근육세포의 발현단계에 따라 나타나는 단백질을 확인하기 위해 면역 형광법을 이용하여 염색한 후 관찰하였다 (그림 4) [19]. 또한 제작된 Myoblast-patch에 전기 자극을 주어 세포의 증식 및 분화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 실험을 진행하여 결과를 분석하였다 (그림 5).

<근육의 역할>

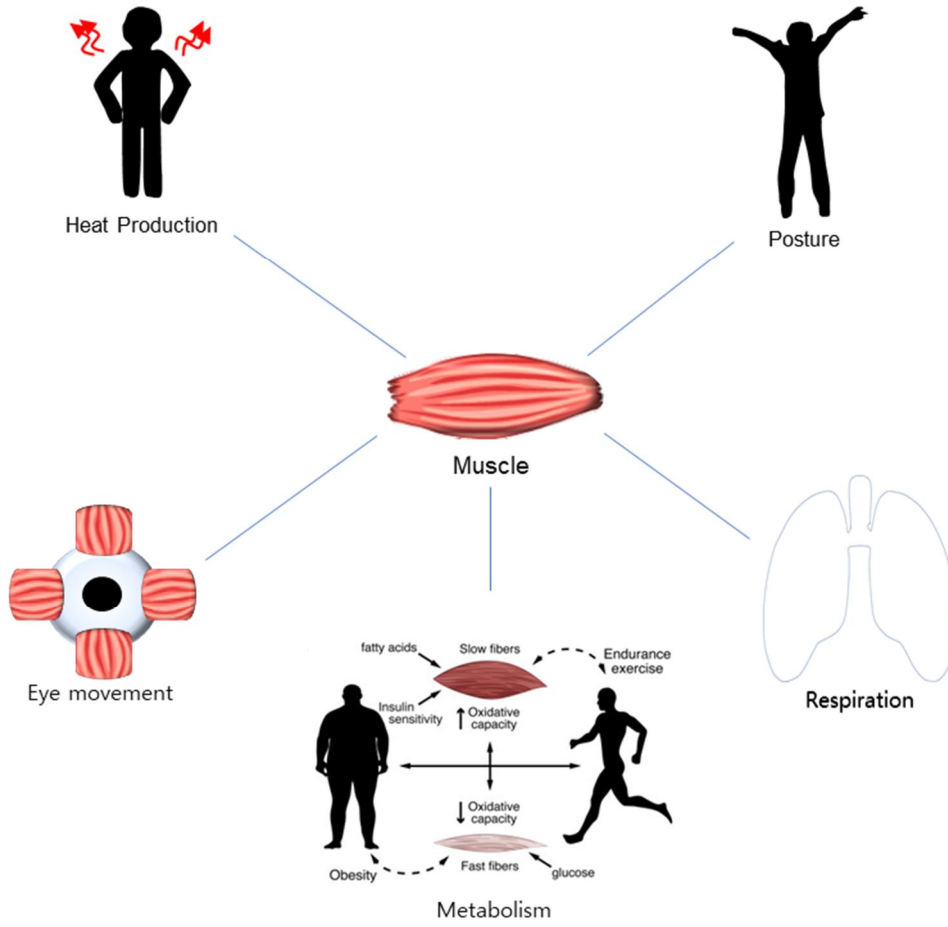


그림 1. 근육의 역할

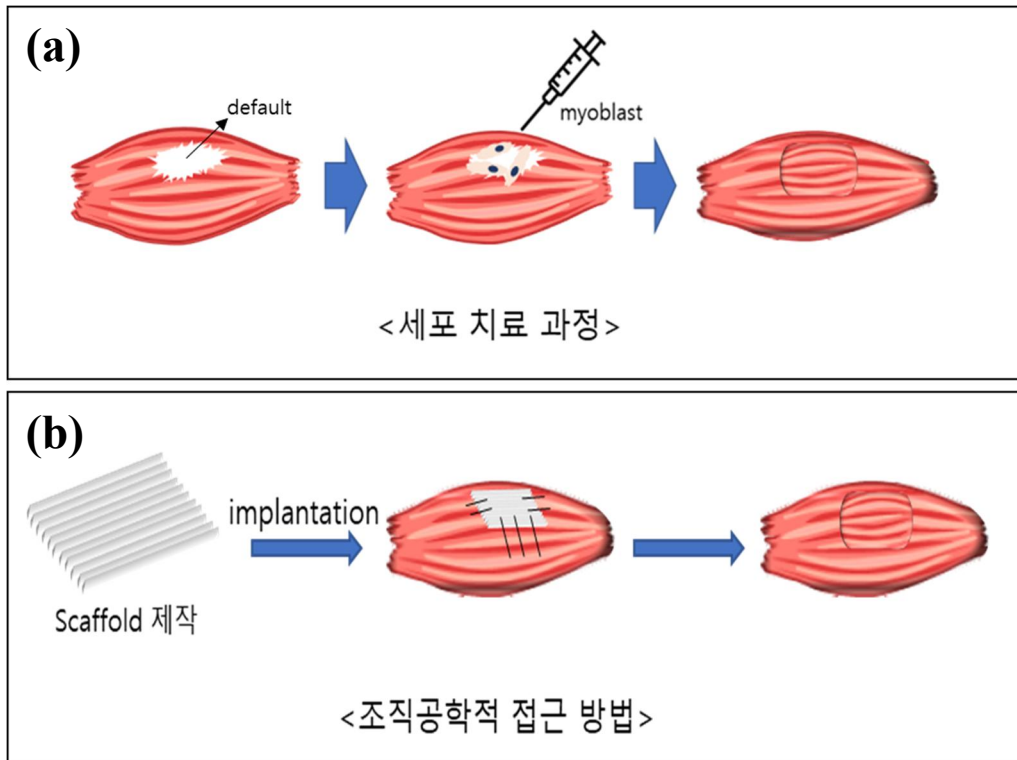


그림 2. 근육 재생을 위한 치료 및 연구 (a)근육 재생 부위에 직접 세포 주입, (b)조직공학적 방법

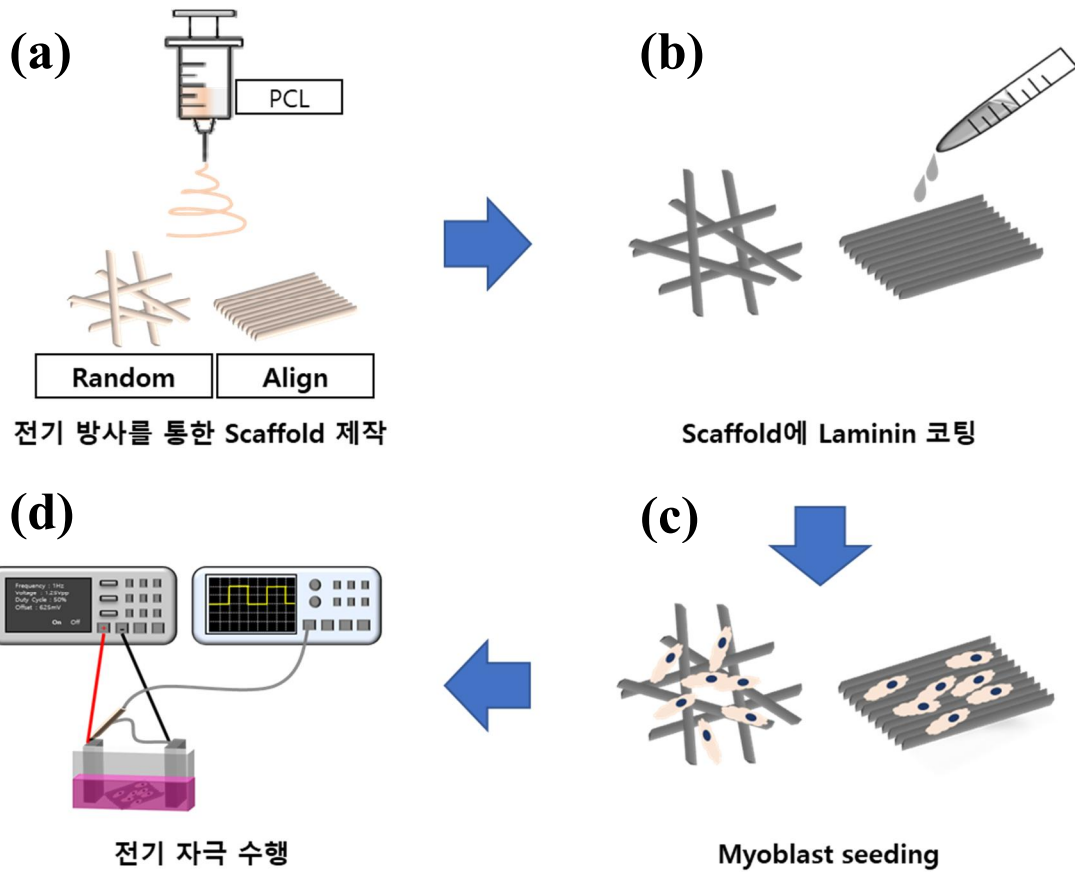


그림 3. Myoblast-patch 제작 과정 및 전기자극 모식도 (a) 전기 방사를 이용하여 두 가지 그룹의 scaffold 제작, (b) 근육과 유사한 환경을 조성하기 위하여 Laminin-8 코팅, (c) Myoblast-patch 제작, (d) 함수 발생기 및 오실로스코프를 이용한 전기 자극 및 측정

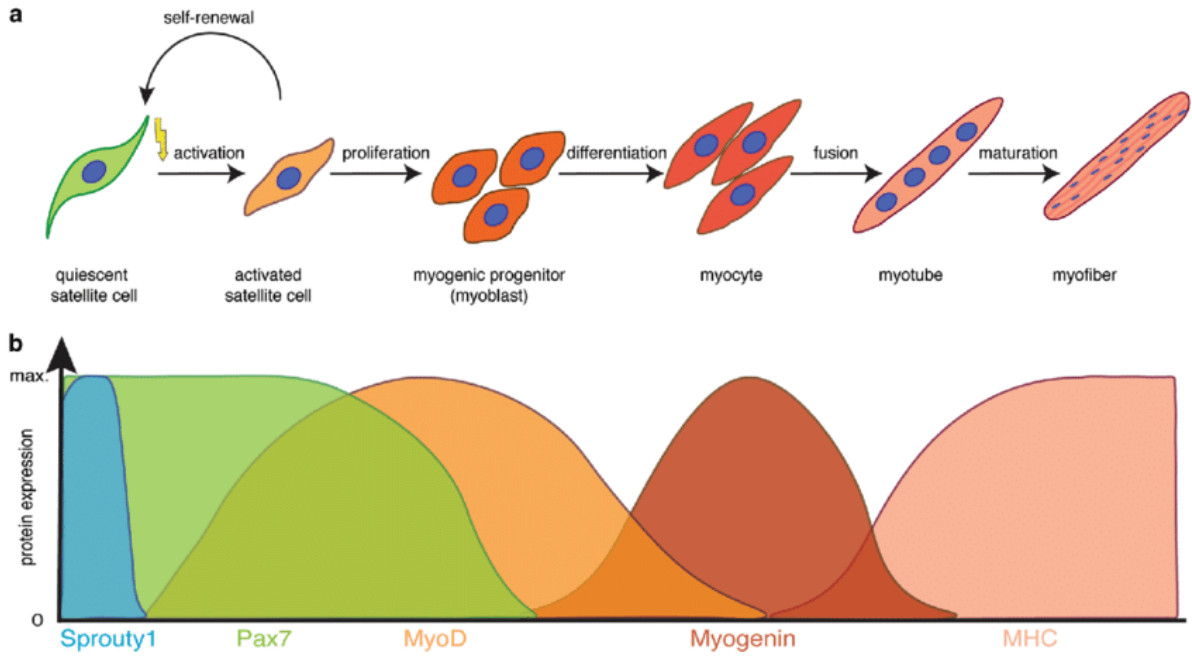


그림 4. Myoblast 의 성장 및 분화 과정 [9].최초 satellite cell 에서 Pax 7 및 MyoD 가 주로 나타남. 분화 과정을 거치면서 Myocyte 에서 Myogenin 이 주로 나타나고, 분화가 더 진행되면서 Myotube, Myofiber 단계에서는 MHC 가 많이 발현함

-
- 전기방사 후 제작된 Scaffold의 특성 파악
 - Myoblast-patch의 각 조건에 따른 세포 증식능 확인
 - Scaffold의 Topology에 따라 세포의 Morphology 확인
 - 근육세포의 분화단계에 따른 단백질 발현 확인
 - Myoblast-patch 전기자극 시 근육세포 반응 확인



- ✓ 인장강도 시험
- ✓ 표면확인을 위한 SEM 관찰
- ✓ CCK-8 assay 수행
- ✓ Actin 염색
- ✓ 면역 형광염색
- ✓ Fluo-4로 Ca²⁺ 이동 확인

-
- SEM : Scanning Electron Microscope, 높은 분해능-표면 관찰
 - CCK-8 : Cell Count Kit-8 assay, 세포의 증식률 확인
 - 면역 형광염색 (Immuno-fluorescence staining) : 특정 단백질과 반응하는 Antibody를 부착하여 단백질 발현 확인
 - Fluo-4 : "Ca²⁺ Imaging"을 위한 Ca²⁺ 과 binding하는 indicator

그림 5. 본 실험의 목적 및 연구 방법

연구 방법

1. 근육 fiber를 모사한 2.5차원 scaffold 제작

1.1 전기 방사

Polycaprolactone (PCL, MW 80,000, Sigma, in Seoul, Korea)과 용매로 쓰이는 유기화합물인 Hexafluoro - 2 - Isopropanol (HFIP, GEORGIACHEM, USA)을 12.5%의 농도로 20 mL의 병에 섞는다. 이 화합물에 마그네틱 바를 넣은 뒤, 교반기에 올려 두고 온도를 80 °C, 700 rpm으로 5시간 동안 stirring 한다.

제작된 12.5% PCL solution을 10 mL syringe에 옮겨 담은 후 전기 방사기 (Nano NC, Seoul, Korea) 펌프에 거치한다. 전기 방사조건에 따라 Aligned scaffold와 Random scaffold로 나누어 두 가지 조건으로 제작하였다 [표 1].

1.1.1 Aligned scaffold 제작

전압을 13 kV로 인가하고, inject rate을 0.2 mL/h, roller의 회전속도를 2300 rpm, needle의 tip과 roller 사이의 거리를 10 cm로하여 총 1 ml을 방사하였다.

1.1.2 Random scaffold 제작

전압을 13 kV로 인가하고, inject rate을 4.0 mL/h, roller의 회전속도를 800 rpm, needle의 tip과 roller 사이의 거리를 10 cm로하여 총 1 ml을 방사하였다.

1.2 주사 전자현미경을 이용한 scaffold의 표면 관찰

제작된 scaffold를 carbon 테이프를 사용하여 stub에 고정한 뒤, Ion coater (HYC15H008, HOYEON tech Co.)를 이용하여 백금으로 코팅하였다. 이후 전자현미경 (AIS2000C, Seron Technologies, Uiwang-si, Gyeonggi-do, Korea)을 통해 scaffold의 표면을 관찰하였다. 제작된 시트의 표면을 촬영한 뒤, Image J (Fiji, National Institutes of Health, Maryland, USA)를 사용하여 fiber의 각도와 두께를 측정하였다.

1.3 scaffold의 인장강도 시험

제작한 scaffolds를 10cm x 1cm의 크기로 일정하게 자른 뒤 Random scaffold와 Aligned scaffold를 각각 10개씩 준비하여 한국고분자 시험연구소 (Seoul, Korea)에서 American Society for Testing and Materials (ASTM) D882 시험규격에 맞추어 인장강도를 측정하였다.

2. C2C12 cell-line을 이용한 Myoblast-patch 제작 (그림 6)

2.1 Laminin coating

자체 제작한 frame에 의료용 본드 (SILASTIC[®], DOW Corporation, in Midland, USA)를 이용하여 scaffold를 부착한다. 실온에서 30분 동안 경화시킨 뒤, clean bench에서 70% EtOH을 사용하여 scaffold를 소독한다. 그 다음 Phosphate Buffer Saline (PBS, Ca-, Mg-, Sigma)로 세척해준 뒤, scaffold의 앞, 뒷면 모두 20분씩 Ultraviolet(UV)멸균을 시행한다. Laminin (100ug/mL)과 Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS, Ca+, Mg+, Sigma, USA)를 1:20으로 희석하여 solution을 제작한 뒤, 시트위에 골고루 분주하여 4°C에서 하루 동안 보관한다.

2.2 Myoblast (C2C12) seeding & culture

Laminin solution이 코팅된 scaffold 위에 5×10^5 개 Myoblast (C2C12, ATCC, USA)를 각각 분주한다. 세포가 scaffold에 부착될 때까지 CO₂ 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂, 80% humidity)에 약 1시간 동안 넣어둔다. 이후, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, USA)에 Fetal Bovine Serum (10% v/v, FBS, Thermo Fisher Scientific)과 Antibiotic-Antimycotic (1% v/v, AA, Thermo Fisher Scientific)을 첨가한 Growth medium을 넣어주어 세포를 배양한다. Growth medium으로 3일간 배양한 뒤 DMEM + P/S (2%, Thermo Fisher Scientific) + Horse Serum (2%, Thermo Fisher Scientific)을 첨가한 Differentiation medium로 교체하여 배양한다.

2.3 Cell Count Kit-8 assay

CCK-8 (Cell Count Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Inc., in Maryland, USA) 은 제조사의 매뉴얼 대로 Growth medium과 섞어 solution을 제작한다. Myoblast-patch에 solution에 넣어준 뒤, CO₂ 인큐베이터에 약 2시간 넣어준다. 이후, Myoblast-patch에서 96well에 100 μ L씩 4개의 well에 옮겨 담고 Microplate Reader (Sunrise, Tecan, in Männedorf, Switzerland)을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 제작된 Myoblast-patch를 각각 2일차, 3일차, 7일차에 CCK-8 분석을 수행하였다.

3. Immuno-fluorescence Staining

Myoblast-patch를 PBS로 3회 세척한 뒤, Paraformaldehyde (4%, PFA, Sigma)를 분주하여 상온에서 30분 동안 scaffolds에 부착된 C2C12를 고정한다. 0.1% BSA in PBS (PBSA solution)로 3회 세척한 뒤, triton X-100 (0.1%, Biosesang, in Seongnam-si, Kyunggi-do, Korea)를 담아 상온에서 30분 간 보관한다. 다시 0.1% PBS로 3회 세척한 뒤, PBSA solution (1%)를 담고 30분 간 반응시킨다. 배양 후 2일차부터 5일차까지 모두 F-Actin staining을 수행하였다.

F-Actin staining 방법은 다음과 같다.

먼저, 0.1% PBSA로 3회 세척한다. 다음, Alexa Fluor 488 phalloidin (Thermo Fisher Scientific)과 0.1% PBSA solution을 1:40으로 희석하여 sample에 분주하고 실온에서 30분간 염색한다.

Differentiation marker인 MyoD, Myogenin, MHC, α -actinin의 경우, 각각 1st antibody [표 2]를 0.1% PBSA solution으로 1:100 희석하여 sample에 분주하고 4 °C에서 24시간 보관한다. 다음, 0.1% PBSA solution으로 3회 세척한 뒤, 2nd antibody를 0.1% PBSA solution으로 1:100 희석한 후 각 sample에 분주하여 실온에서 30분간 염색한다. Myokine인 BDNF, IL-6의 경우, 각각 1st antibody를 0.1% PBSA solution으로 1:100 희석한 후 각 sample에 분주하여 실온에서 30분간 염색한다. 다음, 0.1% PBSA로 3회 세척한 뒤, Alexa Fluor 594을 0.1% PBSA solution으로 1:100희석한 후 각 sample에 분주하여 실온에서 30분간 염색한다. 다음으로, 염색한 모든 시트들에 DAPI nucleic

acid stain (Thermo Fisher Scientific)를 0.1% PBSA solution으로 1:100 희석하여 sample에 분주하고 실온에서 30분간 염색한다.

이후, 0.1% PBSA solution으로 3회 세척한다. 염색된 sample의 세포를 형광현미경 (Evos, Invitrogen, USA)으로 관찰하였다.

4. Electrical stimulation

4.1 Calcium 이동을 관찰하기 위한 Fluo-4 solution 제작

Myoblast-patch에 전기 자극을 가할 때의 Ca^{2+} 의 이동을 확인하기 위한 solution 제작과정은 다음과 같다.

Fluo-4 AM ($3\mu M$, Thermo Fisher Scientific) $50\mu g$ 에다가 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Thermo Fisher Scientific) $44\mu L$ 와 Pluronic[®]-127 (Thermo Fisher Scientific) $9\mu L$ 을 넣고 vortexing 한다. 이 solution을 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Thermo Fisher Scientific) $14.3mL$ 에 넣고 vortexing하여 최종 Fluo-4 solution을 완성한다.

4.2 전기자극을 통한 Ca^{2+} imaging

앞서 제작한 Myoblast-patch를 C-dish (8 well, Ion Optix, Westwood, USA)에 옮겨 담은 후, Fluo-4 solution을 C-dish well의 탄소 전극이 잠길 만큼 담고 실온에서 15분간 보관한다. 이후, C-dish에 함수발생기 (Agilent Technologies, Inc., in Santa Clara, California, USA)와 오실로스코프 (Tektronix, Inc., in Portland, Oregon, USA)를 연결하였다. 전기 자극은 교류 구형파를 이용하였으며, 주파수는 1Hz, 진폭은 2.5Vpp (peak-to-peak), Duty cycle은 50%을 주었다. 오프셋 전압을 조절하여 V_{min} (최소값)을 0V에 수렴하도록 하고, V_{max} (최대값)을 2.5V로 맞춘 뒤 20초 동안 전기 자극을 실시하였다 (그림 7). 동영상은 전기를 주지 않았을 때 녹화를 시작하여, 20초 동안 전기 자극을 주고 다시 전기 자극을 주지 않았을 때를 EVOS를 이용하여 촬영하였다. 촬영한 동영상을 image J를 이용하여 Fluo-4 solution에 반응하는 Ca^{2+} 의 형광 intensity 값을 그래프로 나타내었다.

5. 통계분석

측정된 데이터는 Microsoft Excel 365 (Redmond, Washington, USA)를 이용하여 두 집단씩 2-표본 T-검정을 통해 비교하였으며, 평균값 (AVG)과 표준편차 (SD)를 그래프로 나타내었다.

	Align scaffold	Random scaffold
Inject Rate	0.2 mL/h	4 ml/h
Roller speed	2300 RPM	800 RPM
Voltage	13 kV	
Needle Tip & Roller distance	10 cm	
Total Vol.)	1 mL	
PCL	MW 80,000	
Concentration	12.5 %(w/v)	

표 1. Align scaffold 와 Random scaffold 제작을 위한 전기 방사 조건

Name	Type	Dilution	Company, No.	비고
MyoD	mono	1:100	Thermo MA1-41017	Myoblast marker
Myogenin	mono	1:100	Abcam ab1835	Myocyte marker
MHC	mono	1:100	Thermo MF20	Myotube marker
α -actinin	mono	1:100	Sigma A7811	α -actinin
BDNF	poly	1:100	Thermo PA5-85730	Myokine marker
Interleukin-6	mono	1:100	Thermo 701028	Myokine marker
Phalloidin	-	1:40	Thermo R415	F-actin
Alexa Fluor 488	Mouse	1:100	Thermo A11001	2nd Antibody
Alexa Fluor 594	Rabbit	1:100	Thermo A11012	2nd Antibody

표 2. myoblast marker, Myokine 과 Actin 의 형광 염색을 위한 재료 목록

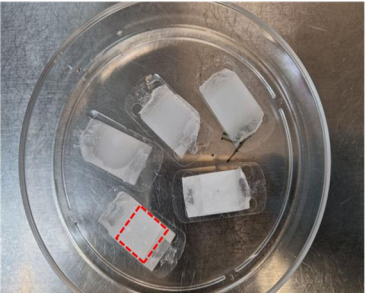
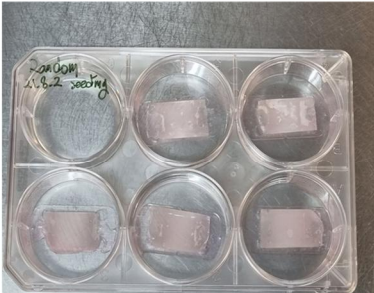
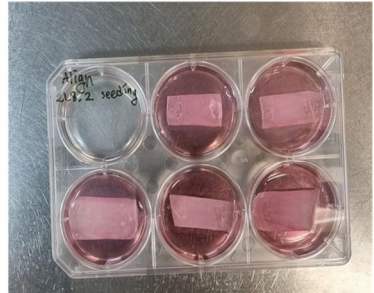
Preparation of polymer scaffold	Preparation of scaffold for myoblast culture	Myoblast culture with polymer scaffold
		
<ul style="list-style-type: none"> • Thickness: <100 um • Window size: 1.2 cm * 1.2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> • Surface coating: 5 µg/ml laminin coating 	<ul style="list-style-type: none"> • Myoblast cell line: C2C12 (ATCC) • Cell number: 5 *10⁵ cells/sample

그림 6. 제작한 Myoblast-patch 의 실제 모습. Scaffold 의 중심(붉은 점선)에 같은 면적(1.2cm x 1.2cm)에 Myoblast seeding

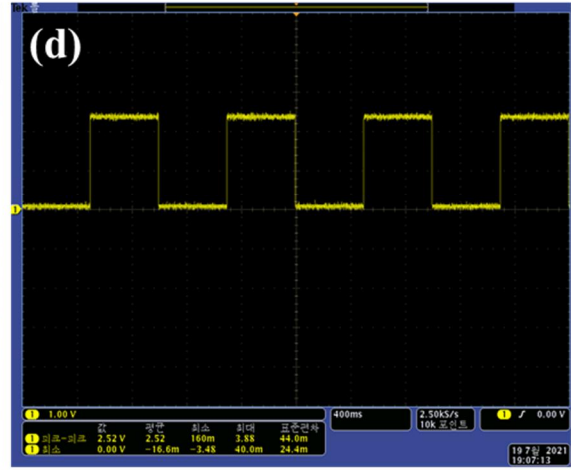
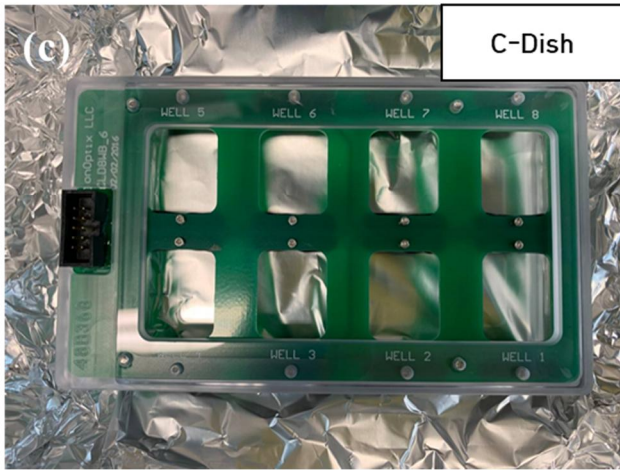
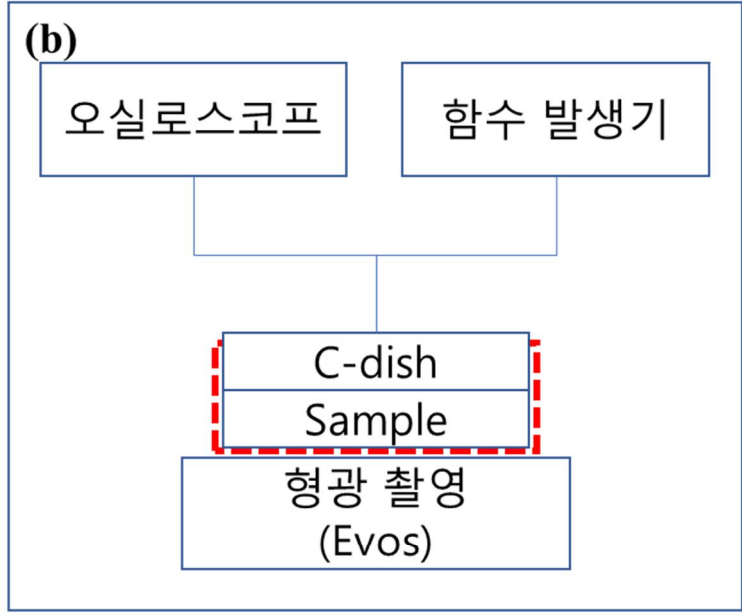
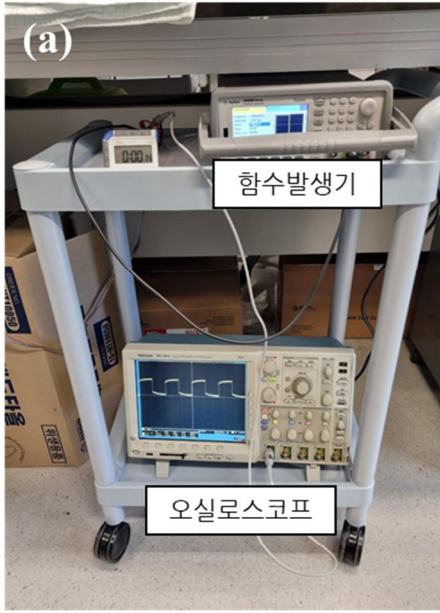


그림 7. 전기 자극을 위한 셋팅 (a) 전기 신호를 발생시키는 함수발생기와 전기 신호를 측정하는 오실로스코프 (b) 전기 자극 모식도 (c) 전기 신호를 받아드리고 세포 배양을 위한 dish (d) 오실로스코프에 측정된 전기 신호 파형

연구 결과

1. scaffold 특성 분석

1.1 Alignment

SEM을 이용하여 각 scaffold의 표면을 촬영한 이미지 (그림 8)를 Image J로 Align된 정도를 측정한 결과 (그림 9), Aligned scaffold의 경우 각도가 ± 10 도 안팎으로 일렬로 잘 정렬된 것을 확인할 수 있었고, Direction은 -0.01 도, 분산은 1.85 도로 측정되었다. Random scaffold의 경우는 각도가 다양하게 분포하여 엷혀 있는 형태인 것을 확인할 수 있었고, Direction은 -20.78 도, 분산은 37.74 도로 측정되었다.

1.2 Tensile strength

제작된 두 종류의 시트의 인장강도를 시험한 결과 (그림 10), align된 PCL 시트의 경우 평균 38.57 N/mm^2 표준편차 4.76 으로 측정되었으며 Random patterned PCL 시트의 경우 평균 6.17 N/mm^2 표준편차 1.06 으로 측정되었다. Align된 PCL 시트의 인장강도가 약 6배 정도 큰 것을 확인할 수 있었고, 수축과 이완을 반복하는 muscle fiber와 같이 더 탄성이 있는 scaffold를 제작하였다.

2. C2C12 Myoblast-patch 제작

2.1 CCK-8

CCK-8 assay 결과 (그림 11), 전체적으로 Aligned Myoblast-patch에서 Random Myoblast-patch보다 높게 측정되었다. 2일차 aligned Myoblast-patch에서 배양된 3개의 세포의 CCK-8 평균값 (AVG)은 0.78 , SD는 0.047 로 측정되었고, Random Myoblast-patch의 경우 AVG는 0.64 , SD는 0.053 로 측정되었다. 3일차의 경우 aligned Myoblast-patch의 AVG는 1.09 , SD는 0.044 로 측정되었다. Random Myoblast-patch의 AVG는 0.7 로 측정되었으며, SD는 0.066 으로 측정되었다. 두 그룹의 Myoblast-patch 모두 2일차보다 증가하였다.

7일차의 경우 aligned Myoblast-patch의 AVG는 1.10, SD는 0.043으로 측정되었고, Random Myoblast-patch의 AVG는 0.64, SD는 0.066으로 측정되었다. day3의 대비 aligned Myoblast-patch는 CCK-8의 수치가 비슷한 수준으로 나타났고, 반대로 Random Myoblast-patch의 경우는 3일차 대비 감소된 것을 확인하였다.

2.2 F-actin

분화 배지 교체 시점을 파악하기 위하여 Actin을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다 (그림 12). 그 결과, 4일차의 경우 세포가 가득 찬 모습을 볼 수 있었다. 따라서 분화 유도를 위해 분화배지로 교체하는 시점을 세포 seeding 후 D +4일로 정하였다.

3. Immuno-fluorescence Staining

3.1 Myoblast-patch의 분화능 확인

총 4가지의 단백질을 형광 현미경을 통해 확인하였다 (그림 13-16). 근육세포의 성장 초반기에 나타나는 MyoD는 10일차보다는 4일차에서 더 많이 발현된 것을 확인할 수 있었고, Align Myoblast-patch보다는 Random Myoblast-patch에서 더 잘 발현된 것을 확인하였다. Myogenin은 마찬가지로 10일차보다는 4일차에서 더 많이 발현되었으나, Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch에서 더 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. MHC는 4일차보다 10일차에서 더 많이 발현되었으며, Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch에서 더 많이 발현된 것으로 보아 aligned Myoblast-patch에서 분화가 더 잘 진행된 것을 확인할 수 있었다. α -actinin의 경우 4일차나 10일차에서 세포의 발현이 비슷하게 나타났고, Aligned Myoblast-patch와 Random Myoblast-patch 또한 비슷한 경향이 나타나, 조건에 크게 상관없이 잘 발현된 것을 확인할 수 있었다.

4. Electrical Stimulation

4.1 전기 자극 시 Myoblast-patch의 Ca^{2+} 이온 이동 확인

Myoblast-patch의 경우 재질이 불투명하여 일반 현미경으로는 관찰하기 어렵기 때문에 Ca^{2+} 을 형광 현미경을 사용하여 실시간으로 관찰하였다. 전기 자극을 가하며 형광 현미경으로 관찰해본 결과, 전기 자극 준 Myoblast-patch에 부착된 세포들의 Ca^{2+} 이온이 이동하는 것을 확인할 수 있었다. Aligned Myoblast-patch의 경우 세포의 Ca^{2+} 이 동시에 여러 개의 Aligned myo-fiber에서 움직이는 것을 확인하였고, Random Myoblast-patch의 경우 일부 myo-fiber에서 Ca^{2+} 이 이동하는 것을 확인하였다 (그림 17).

Image J로 형광 발현 Intensity를 분석한 결과 Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch의 경우에 intensity가 더 높게 나타났다 (그림 18).

4.2 24h 전기 자극 후의 Myokine 발현 확인

분화배지로 교체한 후 6일차에서 7일차까지 두 가지 그룹 (Align, Random) 모두 24시간 동안 전기 자극을 주었다. 전기 자극을 준 그룹과 주지 않은 두 그룹에서 모두 Myokine의 종류인 Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)와 Interleukin-6 (IL-6)가 발현된 것을 확인하였다 (그림 19).

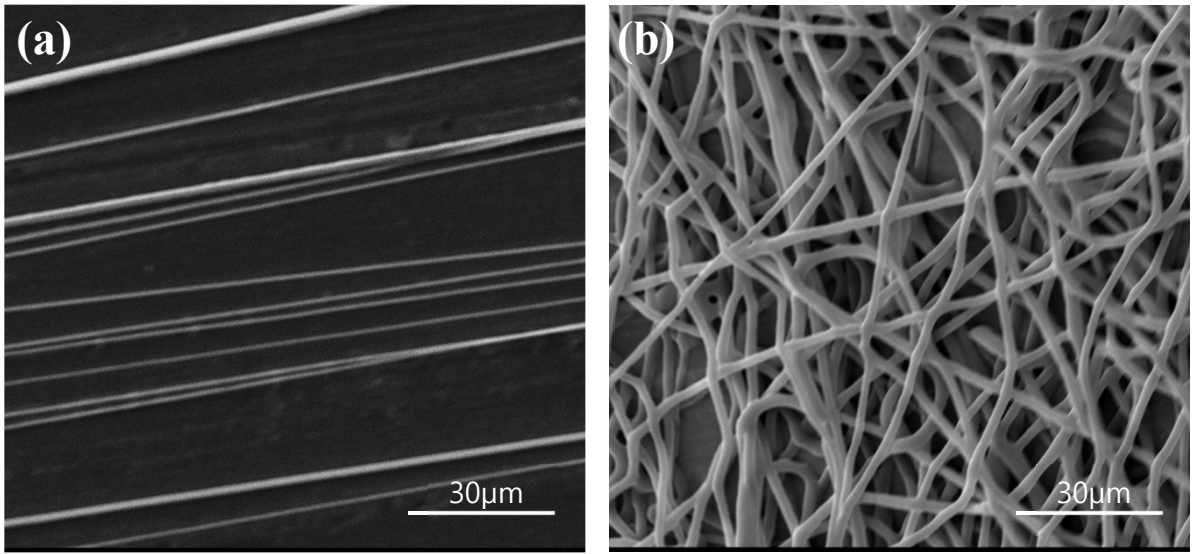


그림 8. SEM 으로 촬영한 scaffold 의 표면. (a) Aligned scaffold 표면, (b) Random scaffold 표면

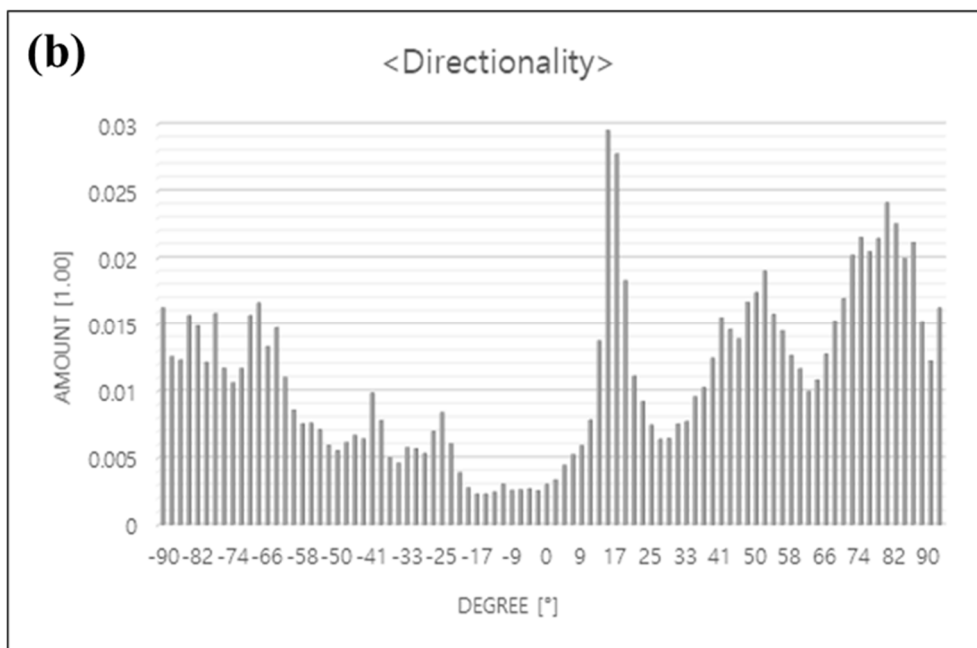
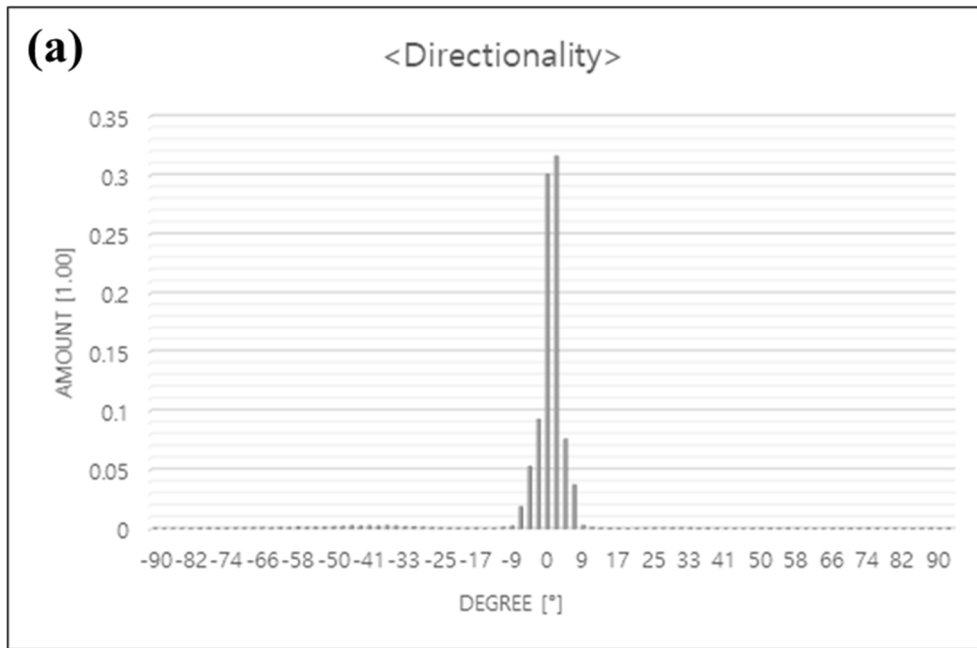


그림 9. 제작된 scaffold 의 directionality. (a) Aligned scaffold 의 방향성을 나타낸 그래프, (b) Random scaffold 의 방향성을 나타낸 그래프

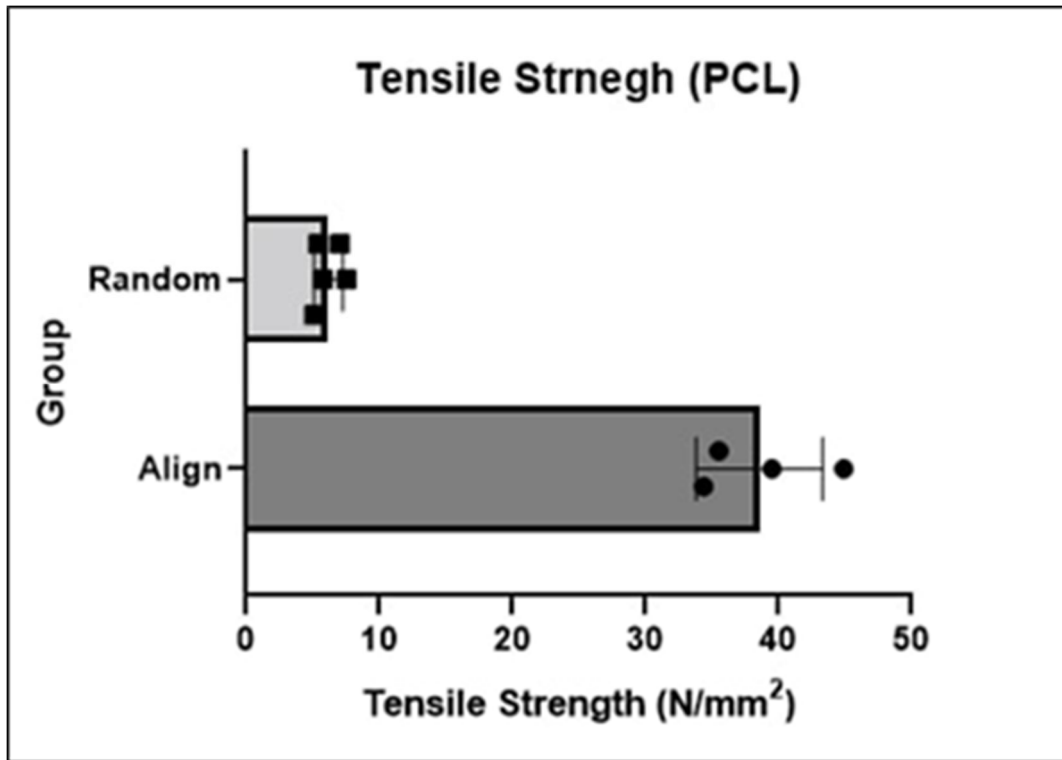


그림 10. Aligned scaffold 와 Random scaffold 의 탄성을 나타내는 그래프

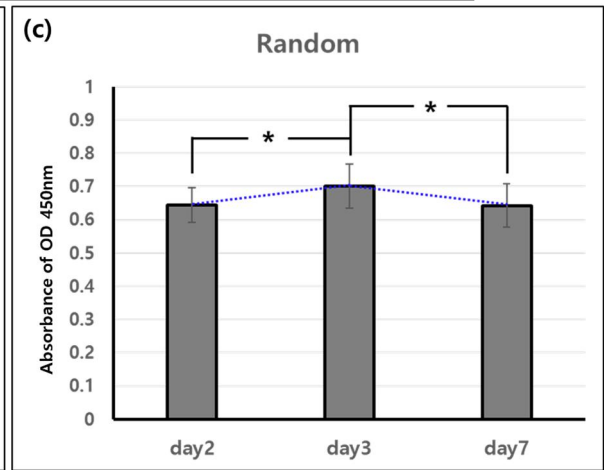
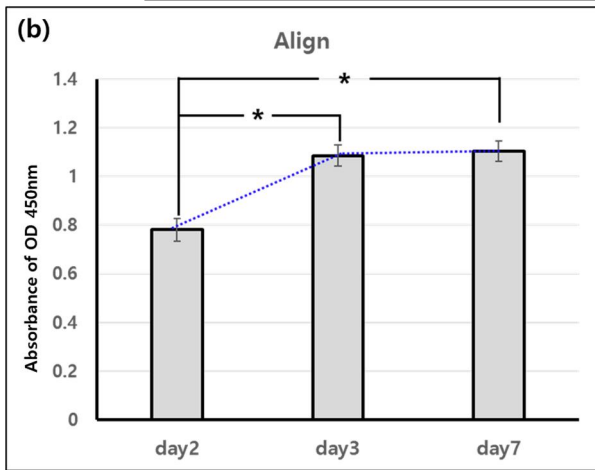
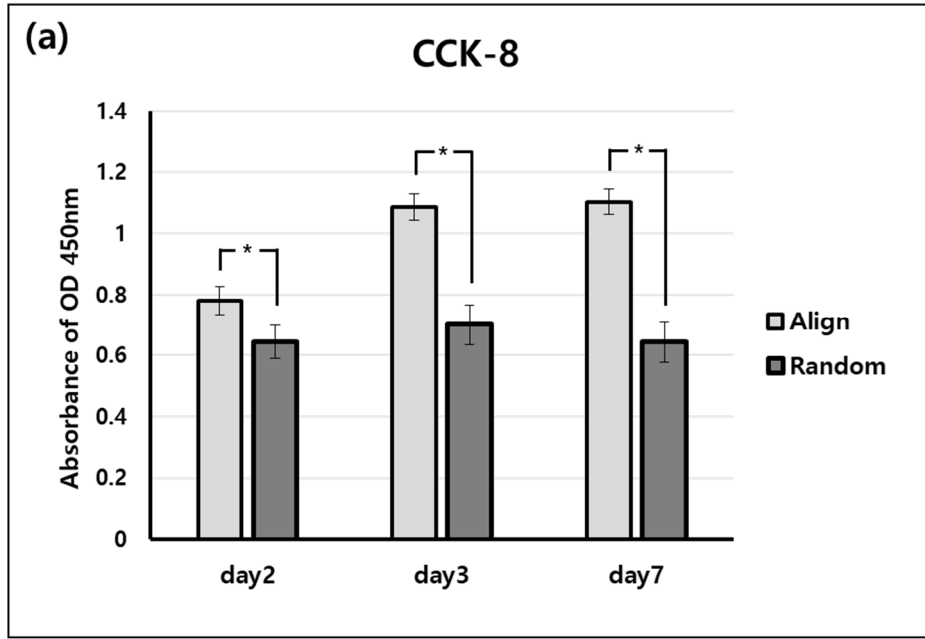


그림 11. Aligned & Random Myoblast-patch 의 CCK-8 결과. (a) Myoblast-patch 별 세포 증식능 비교, (b) Aligned Myoblast-patch 의 날짜 별 세포 증식능 비교, (c) Random Myoblast-patch 의 날짜 별 세포 증식능 비교

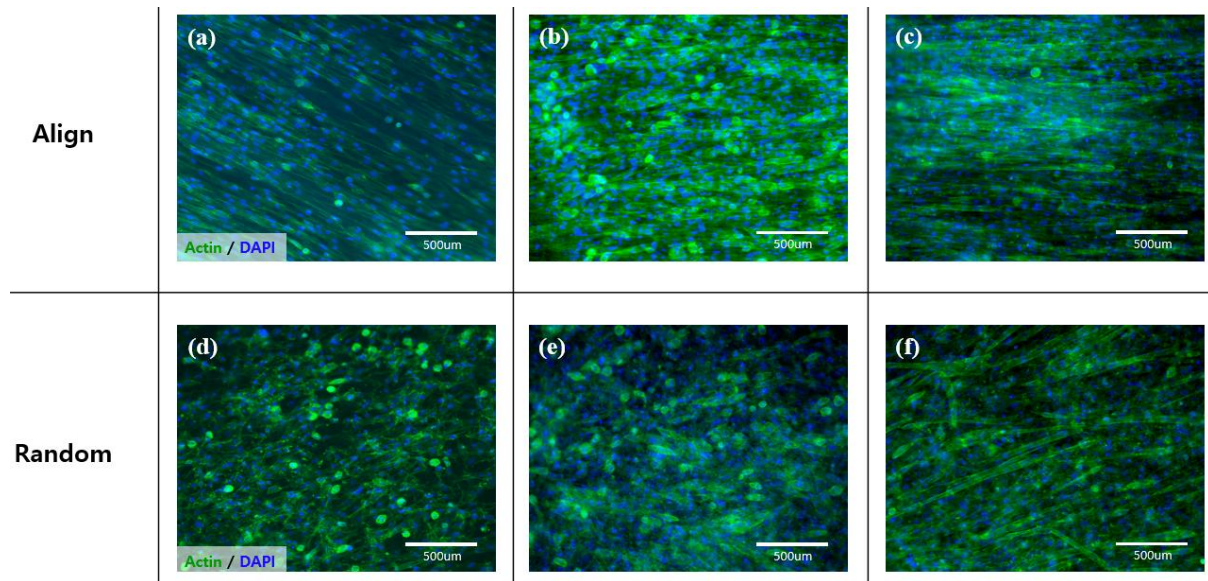


그림 12. Actin 발현 확인. (a) 2 일차 Aligned Myoblast-patch, (b) 2 일차 Random Myoblast-patch, (c) 3 일차 Aligned Myoblast-patch, (d) 3 일차 Random Myoblast-patch, (e) 5 일차 Aligned Myoblast-patch, (f) 5 일차 Random Myoblast-patch

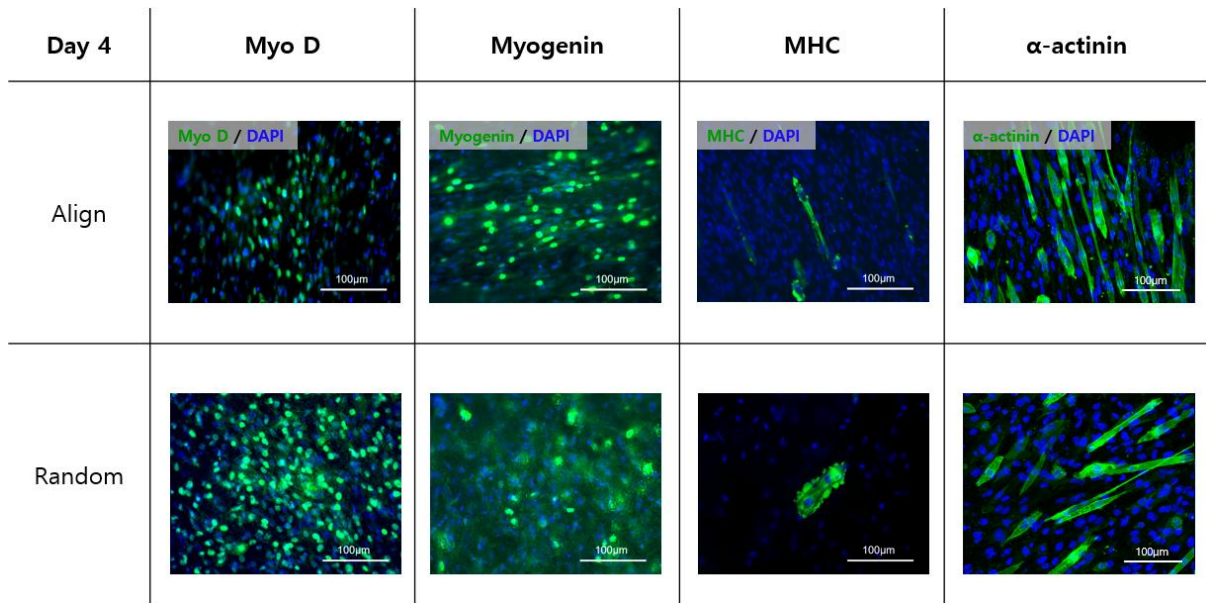


그림 13. Differentiation marker 형광염색 후 4 일차 Aligned & Random Myoblast-patch 비교

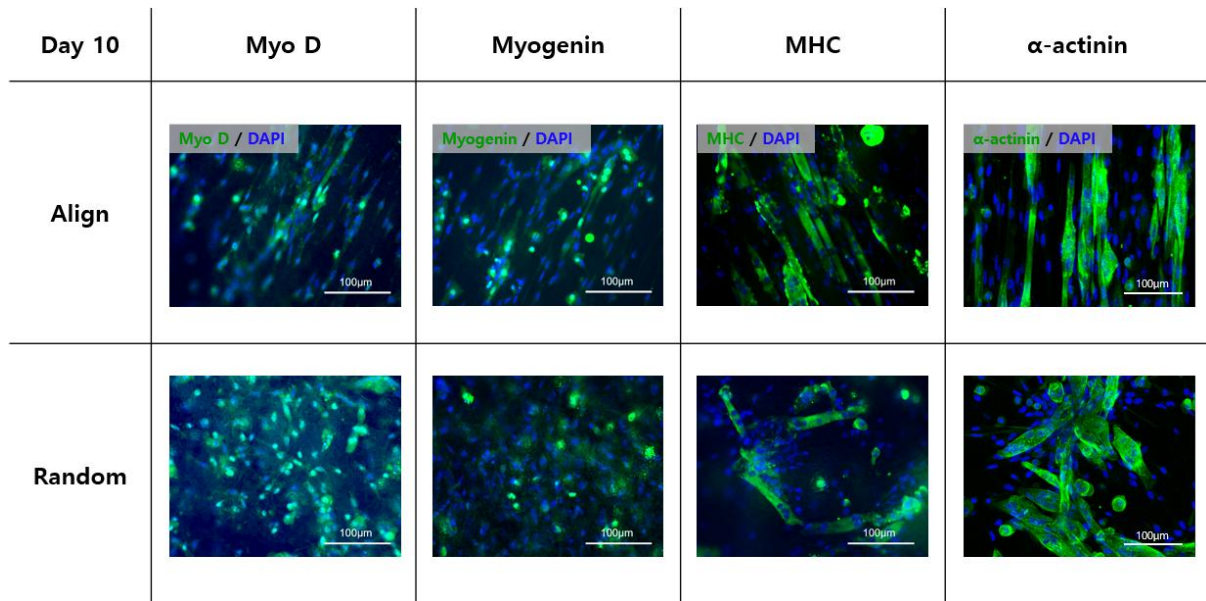


그림 14. Differentiation marker 형광염색 후 10 일차 Aligned & Random Myoblast-patch 비교

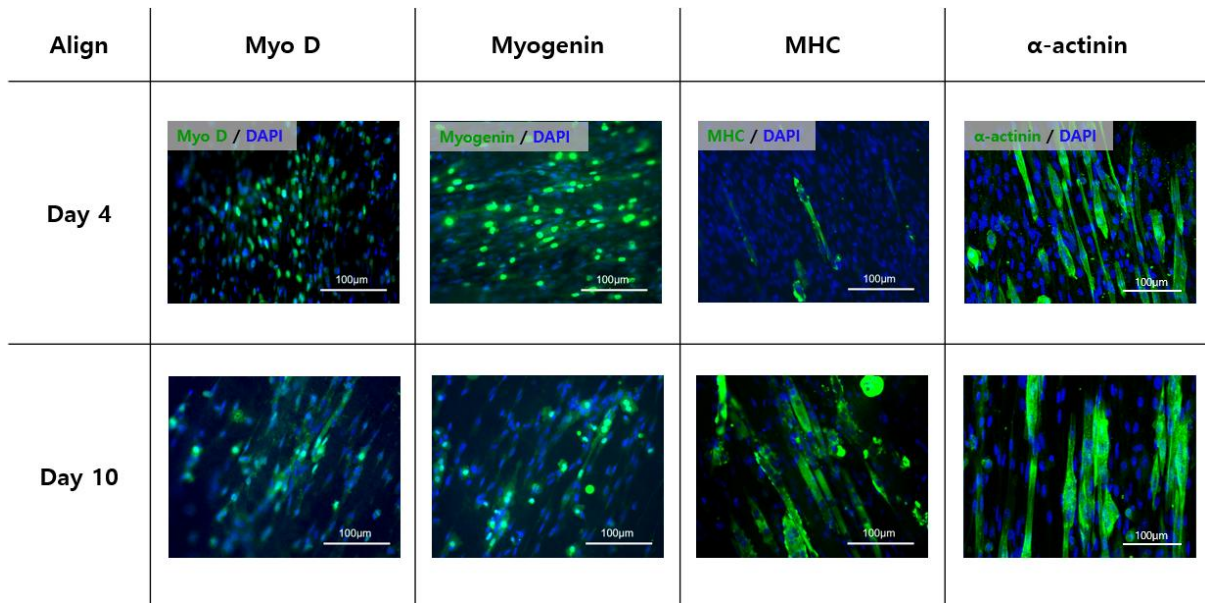


그림 15. Differentiation marker 형광염색 후 Aligned Myoblast-patch 의 4 일차 & 10 일차 분화능 비교

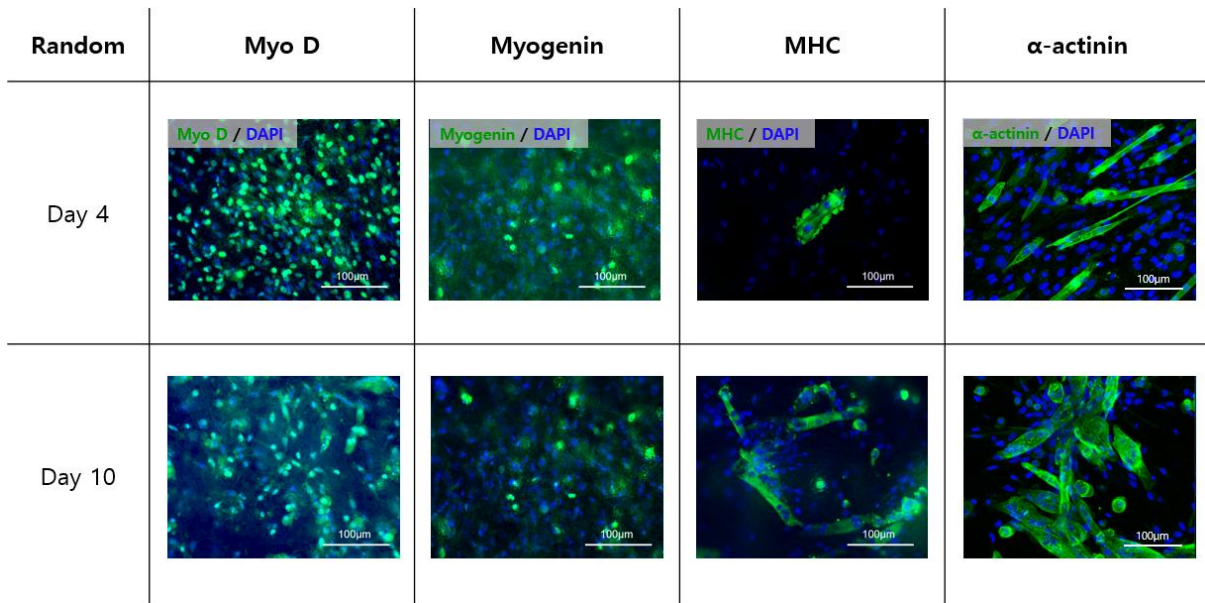


그림 16. Differentiation marker 형광염색 후 Random Myoblast-patch 의 4 일차 & 10 일차 분화능 비교

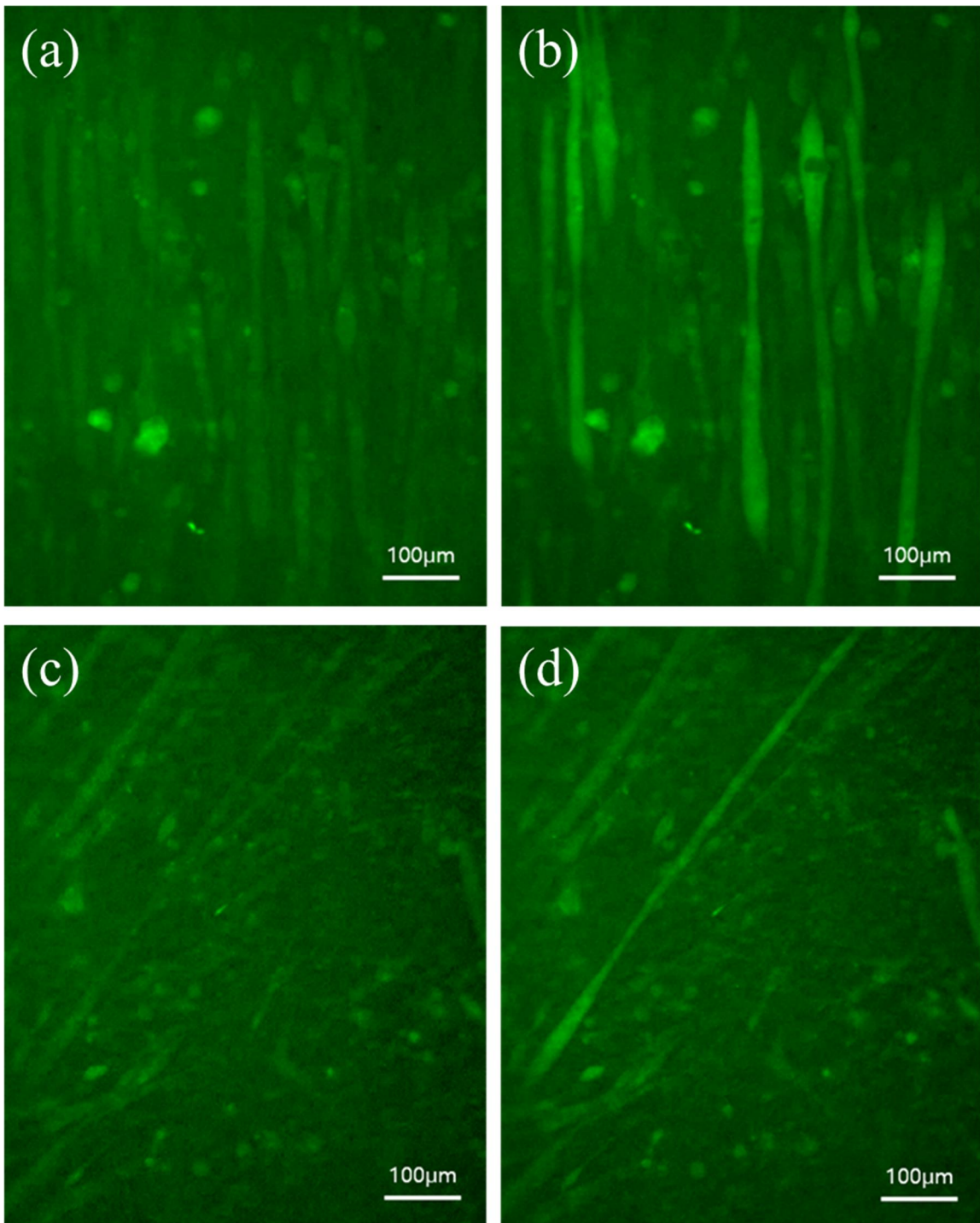


그림 17. 전기 자극 시 Ca²⁺ 이동에 따른 밝기 변화 (a) Aligned Myoblast-patch 에 전기 자극 전 모습 (b) Aligned Myoblast-patch 에 전기 자극 시 모습 (c) Random Myoblast-patch 에 전기 자극 전 모습 (d) Random Myoblast-patch 에 전기 자극 시 모습

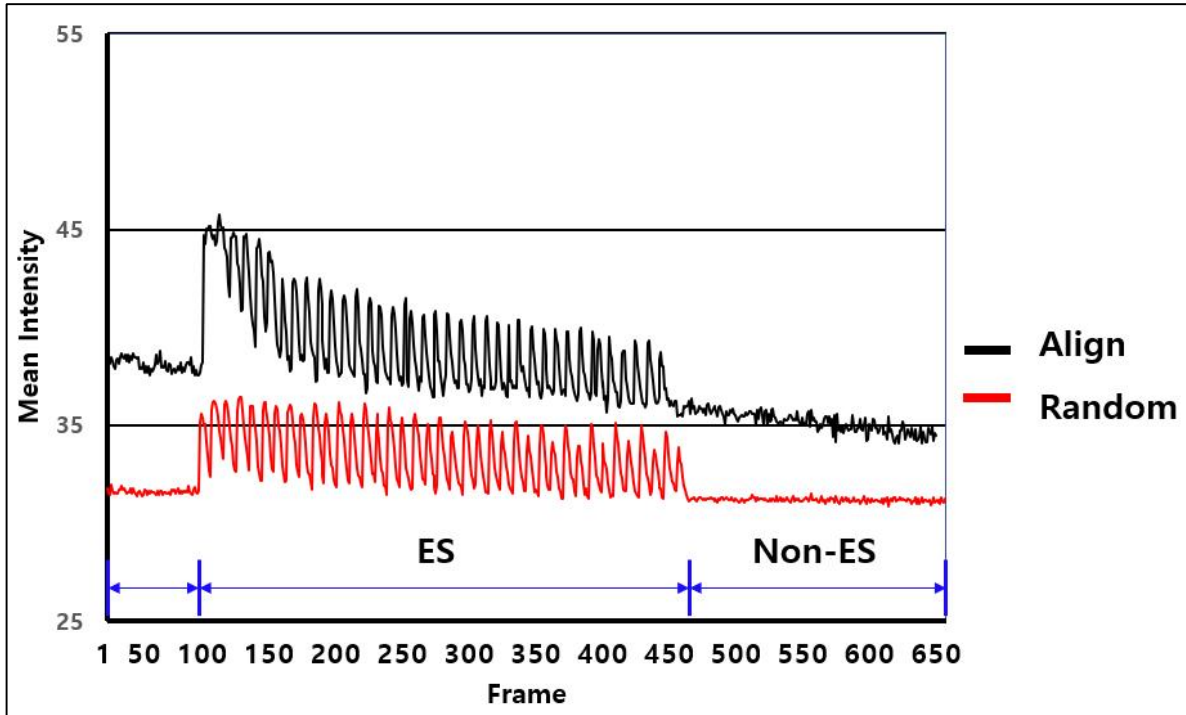


그림 18. Image J 를 활용하여 전지 자극 시 동영상에서 Ca^{2+} 이 이동할 때 발생하는 Intensity 를 분석한 결과

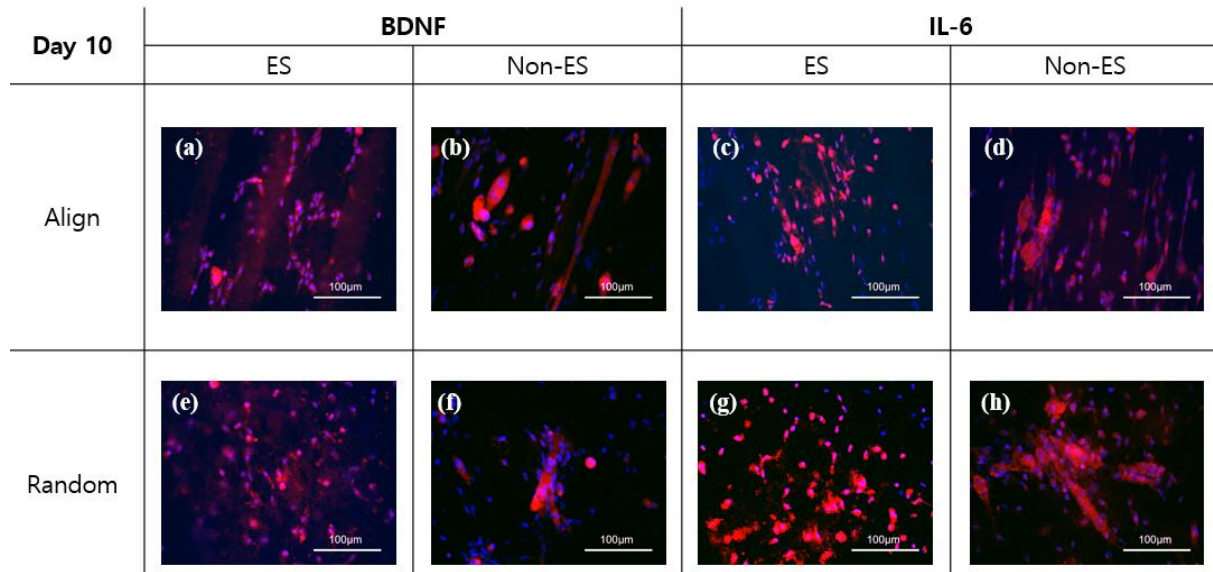


그림 19. 전기 자극 준 Myoblast-patch 와 주지 않은 Myoblast-patch 의 Myokine 발현정도를 형광 현미경을 사용하여 관찰한 모습

고찰

본 연구에서는 근육 fiber와 같이 align된 형태의 scaffold를 제작하고 실제로 align된 상태에서 세포의 증식 및 분화가 더 잘 이루어지는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 먼저 생체 적합성재료인 PCL과 유기용매인 HFIP를 사용하여 만든 PCL solution을 전기방사를 통해 Aligned scaffold를 제작하였다. 이와 비교하기 위해 Random scaffold를 제작하였다.

전기방사 제작 과정에서 Aligned scaffold의 경우 전기 방사 조건을 최적화하기 위해 다양한 조건으로 실험을 진행하였다. PCL의 분자량을 45,000 Da으로 전기 방사하였을 때, membrane에 비즈가 생성되어 fiber의 형태가 제대로 이루어지지 않은 반면, PCL의 분자량을 80,000 Da으로 membrane을 제작했을 때, fiber 형태가 나오는 것을 확인하였다. 또한 전기방사 시, PCL solution이 분출되는 syringe의 needle tip과 회전하는 롤러의 간격이 20cm인 경우와 비교하였을 때 10cm일 때 fiber가 align되는 것을 확인하였다. Aligned scaffold를 제작하기 위해서 PCL solution의 inject rate를 0.2ml/h로 낮추었고, Random scaffold의 경우 inject rate를 4ml/h로 높여서 방사하였을 때, 방사속도가 빠를수록 fiber가 align되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Aligned scaffold의 경우 롤러의 회전속도를 2300 rpm으로 높였고, Random scaffold의 경우 800 rpm으로 낮추어 제작하고 이를 비교했을 때, 롤러의 회전속도가 빠를수록 fiber가 align되는 것을 확인할 수 있었다.

PCL은 세포가 잘 부착되지 않는 성질이[20] 있기 때문에 제작된 scaffold에 Laminin으로 코팅하여 [21, 22] 근육과 유사한 미세환경 구조를 조성함으로써 세포 배양의 조건을 최적화 하였다. 이후 Laminin이 코팅된 PCL scaffold에 Myoblast를 부착하여 Myoblast-patch를 제작하였다. 이 실험에서 사용된 세포는 유전자 조작을 통해 제작된 immortal cell line으로 in vitro 세포 생물 의학 연구에 적합하다고 알려진 [23] 쥐의 근육에서 분리한 C2C12 Myoblast cell line을 사용하였다.

두 그룹의 Myoblast-patch를 제작한 후 세포를 배양 중, 분화시점을 판단하기 위하여 Actin 염색을 수행하고 세포의 형태를 관찰하여 scaffold의 Topology에 따라 세포가

증식하는 것을 알 수 있었고, 배양 4일차에 세포가 가장 잘 증식되었다고 판단하여 분화배지로 변경하는 시점을 실험 4일차로 설정하였다.

골격근의 수축기전을 살펴보면 ATP를 소모하는 반응으로 근육의 Troponin이라는 단백질에 Ca^{2+} 이 결합하여 Myosin과 Actin 사이에 강한 결합이 발생되고, Troponin이 Tropomyosin의 위치를 비튼다 [24]. 이 때 Myosin과 Actin의 결합부위에 강한 결합이 발생하고, Myosin분자들과 Actin의 미끄러짐에 의해 굵은 필라멘트가 가느다란 필라멘트를 안으로 끌어당기는 Power stroke가 일어난다 [25]. 이 과정을 통하여 골격근의 수축이 발생하게 된다. 따라서, 제작된 Myoblast-patch에 Ca^{2+} 을 넣고 전기 자극을 주어 근육세포가 수축하는 것을 관찰하여 Random Myoblast-patch에 비해 Aligned Myoblast-patch에서 더 많은 양의 Ca^{2+} 이 이동하는 것을 확인하였다. 또한, 골격근의 근육세포가 수축과 이완을 반복하며 운동함에 따라 Myokine이라는 인자들이 분비된다는 연구결과 [26, 27]가 있다.

따라서 Myokine의 발현을 확인하기 위해 분화배지로 교체해준 시점으로부터 6일 후, 24시간 동안 Myoblast에 전기자극을 주어 세포를 관찰하였다. 전기자극을 통하여 근육세포들을 자극하면 전기자극을 주지 않은 근육세포들에 비해 Myokine이 비교적 더 잘 발현할 것이라고 예상하였으나, 추가적인 실험 및 분석을 통해 결과를 정량화 해야 할 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 전기방사 조건을 최적화하여 Aligned Scaffold와 Random Scaffold를 제작하였다. 또한 CCK-8 assay를 통하여 Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch에서 세포 증식능이 증가하는 것을 확인하였고, Actin 형광염색을 수행하여 Aligned scaffold에서 Myoblast가 정렬된 것을 확인하였다. 면역 형광법을 통해 Random Myoblast-patch보다 Aligned Myoblast-patch에서 세포 분화능이 증가하는 것을 확인하였고, 전기 자극을 주어 근육세포 내 Ca^{2+} 이 움직이는 것을 확인하였으며, Aligned Myoblast-patch에서 Ca^{2+} 이동 더 증가하는 것을 확인하였다. 결과적으로 Random Myoblast-patch보다 근육 fiber를 모사한 Aligned Myoblast-patch에서 세포 배양 환경이 적합하다고 판단하였고 추후 근육 재생 및 Bio-actuator 분야의 기초 연구로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

참고문헌

1. Baskin Kedryn K, Winders Benjamin R, Olson Eric N. Muscle as a "Mediator" of Systemic Metabolism. *Cell Metabolism*. 2015;21(2):237-48.
2. Emery AEH. The muscular dystrophies. *The Lancet*. 2002;359(9307):687-95.
3. Yoo JJ. *Regeneration Medicine*. 4th ed: 군자 출판사; 2018.
4. Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84(1):209-38.
5. Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, Pins GD. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomaterialia*. 2015;25:2-15.
6. Partridge T. Myoblast transplantation. *Neuromuscular Disorders*. 2002;12:S3-S6.
7. Negroni E, Riederer I, Chaouch S, Belicchi M, Razini P, Di Santo J, et al. In Vivo Myogenic Potential of Human CD133+ Muscle-derived Stem Cells: A Quantitative Study. *Molecular Therapy*. 2009;17(10):1771-8.
8. Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, et al. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(4):371-86.
9. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, et al. Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. *Molecular Therapy*. 2007;15(5):867-77.
10. Reid G, Magarotto F, Marsano A, Pozzobon M. Next Stage Approach to Tissue Engineering Skeletal Muscle. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(4).
11. Jin Y, Shaiari D, Jeon EJ, Park S, Choi YS, Back J, et al. Functional Skeletal Muscle Regeneration with Thermally Drawn Porous Fibers and Reprogrammed Muscle Progenitors for Volumetric Muscle Injury. *Advanced Materials*. 2021;33(14):2007946.

12. Chen H, Zhong J, Wang J, Huang R, Qiao X, Wang H, et al. Enhanced growth and differentiation of Myoblast cells grown on E-jet 3D printed platforms. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:937-50.
13. He W, Benson R. 4 - Polymeric Biomaterials. In: Modjarrad K, Ebnesajjad S, editors. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. Oxford: William Andrew Publishing; 2014. p. 55-76.
14. Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(4):213-22.
15. Lee MH, Park YJ, Hong SH, Koo M-A, Cho M, Park J-C. Pulsed Electrical Stimulation Enhances Consistency of Directional Migration of Adipose-Derived Stem Cells. *Cells*. 2021;10(11):2846.
16. Ito A, Yamamoto Y, Sato M, Ikeda K, Yamamoto M, Fujita H, et al. Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation. *Scientific Reports*. 2014;4(1):4781.
17. Bajaj P, Reddy B, Jr., Millet L, Wei C, Zorlutuna P, Bao G, et al. Patterning the differentiation of C2C12 skeletal Myoblasts. *Integrative Biology*. 2011;3(9):897-909.
18. Yu H-C, Wu T-C, Chen M-R, Liu S-W, Chen J-H, Lin KM-C. Mechanical stretching induces osteoprotegerin in differentiating C2C12 precursor cells through noncanonical Wnt Pathways. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(5):1128-37.
19. Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(13):2559-70.
20. Hajiali F, Tajbakhsh S, Shojaei A. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. *Polymer Reviews*. 2018;58(1):164-207.

21. Leino M, Astrand C, Hughes-Brittain N, Robb B, McKean R, Chotteau V. Human embryonic stem cell dispersion in electrospun PCL fiber scaffolds by coating with laminin-521 and E-cadherin-Fc. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2018;106(3):1226-36.
22. de Siqueira-Santos R, Sardella-Silva G, Nascimento MA, Teixeira de Oliveira L, Coelho-Sampaio T, Ribeiro-Resende VT. Biological activity of laminin/poly(laminin)-coated poly- ϵ -caprolactone filaments on the regeneration and tissue replacement of the rat sciatic nerve. *Materials Today Bio*. 2019;3:100026.
23. Wikipedia. C2C12 2021 [Available from:
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=C2C12&oldid=1021983163>.
24. Khodabukus A, Prabhu N, Wang J, Bursac N. In Vitro Tissue-Engineered Skeletal Muscle Models for Studying Muscle Physiology and Disease. *Advanced Healthcare Materials*. 2018;7(15):1701498.
25. 위키백과. Muscle Contraction 2021 [Available from:
<https://ko.wikipedia.org/w/index.php?title=%EA%B7%BC%EC%88%98%EC%B6%95&oldid=29419091>.
26. Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2000;83(6):512-5.
27. Pedersen BK. Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(3):392-6.

Abstract

Muscles are an important tissue involved in maintaining the body's homeostasis and metabolism. However, since excessive muscle damage does not cure itself, various studies are being conducted to regenerate muscles. Among them, there is a method of inducing muscle regeneration by producing scaffolds using 3D printing, electrospinning, and surface patterns with a tissue engineering approach and then implanting a Myoblast-patch to the damaged muscle. In addition, studies have been researched to promote differentiation of the Myoblast by applying physical stimulation to the generated Myoblast-patch. Therefore, In this study, a scaffold was manufactured using biocompatible materials, and Myoblast C2C12, an immortal cell line Myoblast, was seeded on the scaffold to manufacture Myoblast-patch.

In this study, PCL and HFIP were used, and the scaffold was produced using electrospinning techniques. At this time, the scaffolds were manufactured by dividing them into two groups: an aligned scaffold that mimics muscle fibers and a Random scaffold.

As a result of measuring the tensile strength of the fabricated scaffold, it was found that the aligned scaffold was larger than the Random scaffold. In addition, when the surface of the aligned scaffold was observed using a scanning electron microscope (SEM) and the fiber angle was measured, it was confirmed that the alignment was within ± 10 degrees. A Myoblast-patch was prepared by seeding the immortal Myoblast cell line, C2C12, on the fabricated scaffold. The cell proliferation ability of the two groups of Myoblast-patch was compared through CCK-8 assay and the cell differentiation ability was confirmed using immunofluorescence. As a result, the cell proliferation and differentiation ability were more increased in the aligned Myoblast-patch. In addition, the contraction and relaxation movements of cells were observed by adding ca^{2+} , and the intensity of reaction with ca^{2+} was

confirmed. Thus, it was confirmed that the intensity value of the Aligned Myoblast-patch was larger than that of the Random Myoblast-patch. As a result of observing the myokine factor occurring during exercise, it is thought that additional experiments and analysis are needed to compare the with or without electrical stimulation. In conclusion, through this study, cell proliferation, differentiation, and Ca^{2+} imaging results were all higher in Aligned Myoblast-patch simulating muscle fibers.

Therefore, it is thought that Aligned Myoblast-patch is more suitable for cell culture, and this study can be used for muscle regeneration and basic research of biohybrid robots.