

# 엑소좀 및 티모신베타4를 이용한 혈관생성 가능성 탐구

안성민\*, 윤석환\*

\*한국산업기술대학교 기계공학과

e-mail : yuntobi@kpu.ac.kr

## Vessel generation by use of exosome and thymosin $\beta$ -4

Seongmin An\*, Seokhwan Yun\*

\*Dept. of Mech. Eng, Korea Polytechnic University

### 요약

현재 재생의료분야의 주류인 줄기세포 치료술은, 줄기세포를 이식 후 생착률이 0.4%에 불과하고 생착한 세포마저도 표적기관 특이적 세포로 제어조절이 쉽지 않아, 줄기세포의 잠재적 치료능력을 발휘하지 못하고 있다. 이를 극복하기 위한 대안으로서 대표적인 방법이 줄기세포를 바이오잉크로 활용하여 3D 바이오프린팅을 통해 이식용 장기를 직접 생산하는 방법이다. 현재 전세계에서 다양한 세포와 바이오잉크를 통해 다양한 인공장기를 개발하고 있으나, 상용화단계로 진입한 연구는 오가노이드와 organ on a chip에 집중되어 있고, 이식가능한 장기의 개발은 상용화 단계로 접어들지 못하였다. 이는 제작된 인공장기 내에 모세혈관 네트워크를 만들기 어려울 뿐만 아니라, 이식시 숙주의 혈관시스템과 통합되어 연결되는 것이 곤란하기 때문이다. 엑소좀은 세포에서 분비되어 다른 세포로 miRNA, 단백질, 사이토카인, 케모카인, 성장인자를 전달하는 이동수단으로서 공여세포의 특징을 대상세포로 전달할 수 있어서, 이식한 줄기세포를 제어조절할 수 있는 물질이다. 본 연구에서는 중간엽줄기세포에서 추출한 엑소좀이 혈관전구세포인 HUVEC 세포주의 혈관생성능력을 촉진하는 것을 확인하였다. 티모신베타4 단백질은 눈, 심장, 신경보호, 간 등에 보호 및 치료효과가 있음이 여러 논문에서 보고되었고, 특히 혈관형성 작용이 1997년에 보고되었으나, 그 효능이 충분하지 않았으나, 본 연구에서는 유전자 재조합 기술을 통해 거대분자를 세포 안으로 운반시킬 수 있는 TAT 펩타이드와 융합시킨 형태로서 강력한 혈관형성능력을 확인하였다. 따라서 엑소좀과 티모신베타4를 줄기세포와 함께 바이오잉크로 활용할 경우, 모세혈관망이 구성되는 인공장기를 3D 바이오프린팅 할 수 있을 것으로 기대된다.

### 1. 서론

질병관리본부의 장기이식건수를 지난 1년 동안 살펴보면, 간 1660건, 신장 2393건, 심장 189건, 안구 182건, 췌장 60건, 폐 148건으로 무려 4,632건에 달한다. 중증의 환자만 장기이식 대상이 되고, 장기기증 공여자가 부족한 실정으로 미루어 보아, 장기이식 수요는 이보다 훨씬 많을 것으로 예상할 수 있다. 이식 가능한 장기를 기증자에게서 획득하지 않고, 3D 바이오프린팅으로 제작할 경우 상기의 이식수요를 모두 흡수할 수 있을 뿐만 아니라 비중증의 환자에게도 적용이 가능하다. 하지만 모든 인체 장기는 혈관을 통해 혈액을 공급받으며, 이를 통해 산소와 이산화탄소를 교환하고 포도당 및 필수단백질을 공급받아 조직의 항상성을 유지하는데, 현재 인공장기 내에 모세혈관망을 제대로 조성하지 못해 인체유사도가 높은 장기를 생산했어도 숙주의 혈액흐름네트워크에 인공장기가 편입되지 못하는 문제가 있다. 현재 3D 바이오프린팅 기술로는 심근패치나 피부패치만이 이식가능한 성과물이며, 이

마저도 모세혈관망이 없어, 생착하여 손상부위를 대체하는 것이 아닌 치료효과를 일부 보이고 손상부위에서 탈락하는 반창고 정도의 역할만 수행한다. 결국 이식하는 인공장기가 완전한 기능을 수행하기 위해서는 기능적인 모세혈관 네트워크가 포함된 인공장기를 제작하여야 한다. 본 연구에서는 3D 바이오프린팅 시 바이오잉크에 포함 가능한 혈관형성 효과 있는 다양한 후보물질 약 100여개 검토 적용하였고, 이를 통해 중간엽줄기세포 유래 엑소좀과 인간유전자재조합 티모신 베타4가 효과 있다고 결론지었다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2.1 엑소좀 및 재조합 티모신베타4

엑소좀은 중간엽줄기세포 (Promo cell 사, 독일)을 소유래 엑소좀이 완전제거된 혈청을 10% 포함한 배지에서 3일 배양한 후 배양액에서 분리하였다. 재조합

티모신베타4는 원형DNA를 제한효소와 T4 ligase를 활용합 유전자 재조합 기술로 세포통과신호단백질인 TAT 과 티모신베타4 단백질의 DNA를 합성 후, 이를 대장균에 도입하여, 재조합 단백질 생산을 유도한 후 분리정제하였다.

2.2 혈관형성능력 확인

혈관형성능력은 혈관전구세포인 HUVEC 세포주(ATCC사, 미국)을 활용한 tube formation assay를 통해 진행되었다. HUVEC 세포는 exosome 및 재조합 티모신베타4와 함께 배양되었을 때 우수한 혈관생성 효과를 보였다.

2.3 분자생물학적 기작 확인

혈관형성능력의 분자생물학적 기작을 확인하기 위하여 Thermo-Fisher 사에서 제공하는 Western blotting protocol guideline 방법대로 단백질 분석을 실시하였다. 세포를 용융하여 얻은 단백질을 SDS-PAGE를 통해 크기별로 분해한 후, cell signaling 사에서 구매한 1차 항체와 2차 항체를 차례대로 가하여 단백질 밴드를 얻었다. 단백질 밴드는 ImageJ 소프트웨어를 통해 정량적으로 분석하였다.

2.4 통계분석

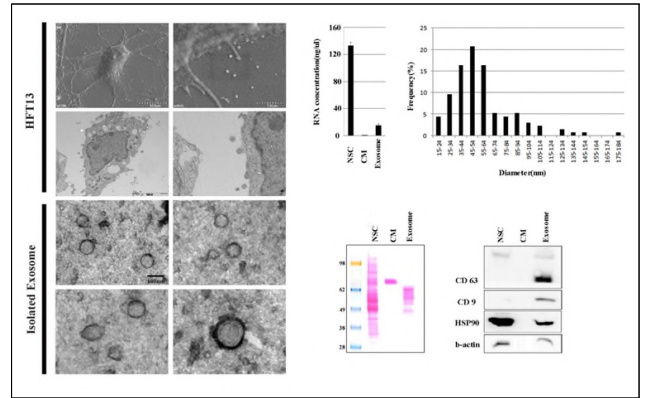
통계분석은 SPSS18.0 소프트웨어를 활용하였다. 정확한 분석을 위해 모든 실험샘플은 최소 5개씩 준비하여 실험하였으며, 정규분포를 따르지 않는다고 가정하여 비모수 분석방법인 Kruskal Wallis test를 실시하여 p 값이 0.05 이하인 경우에 유의하다고 판단하였다.

3. 결론 및 고찰

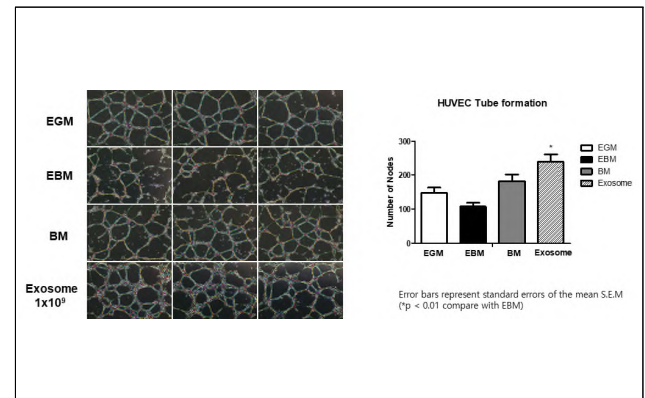
세포를 전자현미경으로 촬영할 경우 세포 주변으로 분비되는 엑소좀이 관찰되며, 분리된 엑소좀은 둥근 형태로 약 100nm의 사이즈가 보인다(그림1). 엑소좀 특이 단백질인 CD63, CD9, HSP90 이 관찰된다(그림 1). 이를 HUVEC 세포 배양액에 첨가하여 HUVEC 세포를 배양하였을 때 혈관형성능력이 증가함을 확인하였다(그림2).

재조합 티모신베타4 역시 혈관형성능력이 증가함을 보였다(그림3). 엑소좀과 티모신 베타4 모두 기존에 알려진 혈관형성인자인 VEGF와 Angiotensin이 증가된 것을 확인할 수 있었는데, 이를 통해 혈관형성능력

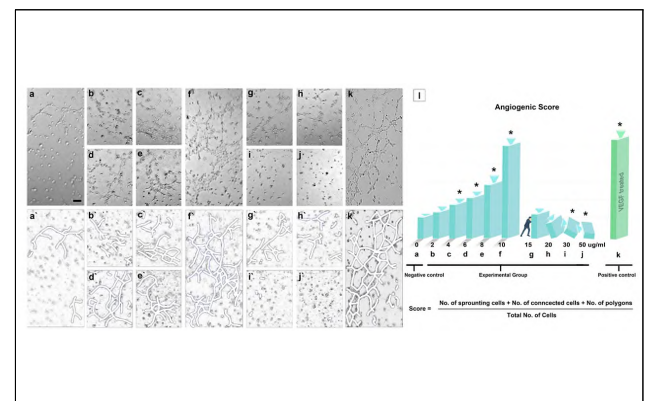
이 증가되었을 것으로 짐작된다.



[그림 1] 엑소좀의 분리 및 검증



[그림 2] 엑소좀의 혈관형성 능력 증명



[그림 3] 티모신베타4의 혈관형성 능력 증명

참고문헌

- [1] 전호준 등, “Fabrication and characterization of 3D-printed biocomposite scaffolds based on PCL and silanated silica particles for bone tissue regeneration”, Chemical engineering지, 제 360권, pp519-530, 2월 2019년.
- [2] 강동구 등, “Pre-set extrusion bioprinting for multiscale heterogeneous tissue structure fabrication”, Biofabrication지, 제 10권, pp00-01-, 5월, 2018년.
- [3] 윤석환 등, “Desining of magnetically labeled cells for in vivo control of stem cell migration and differentiation”, Nano letters지, 제 18권 2호, pp838-845, 2월 2018년
- [4] 윤석환, “자성나노입자를 이용한 표적지향성 암치료”, 대한정형외과학회지, 제 27권 1호, pp58-59, 4월, 2017년.
- [5] 이슬기림 등, “Sliding fiber: Slidable, Injectable, and Gel-like electrospun nanofibers as versatile cell carriers”, ACS nano지, 제 10권 3호, pp3282-3294, 2월 2016년.
- [6] 신태현 등, “T1 and T2 dual-mode MRI contrast agent for engancing accuracy by engineered nanomaterials”, ACS nano지, 제 8권 4호, pp3393-3401, 3월 2014년