

조직공학적 연골재생을 위한 *In Vitro* 환경에서의 탈미네랄화 골분용액을 함유한 PLGA 지지체의 효과

안우영 · 김혜린 · 송정은 · 이동원[†] · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과 고분자 융합소재 연구센터
(2010년 10월 4일 접수, 2011년 4월 20일 수정, 2011년 6월 14일 채택)

Effect of PLGA Scaffold Containing Demineralized Bone Solution for Articular Cartilage Tissue Engineering: *In Vitro* Test

Woo Young Ahn, Hye Lin Kim, Jeong Eun Song, Dongwon Lee[†], and Gilson Khang[†]

Department of BIN Fusion Tech., Department of Polymer · Nano Sci. Tech.,
Chonbuk National University, 664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea
(Received October 4, 2010; Revised April 20, 2011; Accepted June 14, 2011)

초록: 본 연구팀은 탈미네랄화 골분(DBP)이라는 천연재료를 졸(sol)화시켜 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)에 함침시킨 지지체를 개발하였다. DBP를 함침시킨 PLGA 지지체 상의 세포증식과 모폴로지를 평가하기 위해 MTT 분석과 SEM을 측정하였다. 또한 sGAG와 콜라겐 함량 측정과 파종된 연골 세포의 표현형 유지에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 PLGA에 DBP를 함침시킨 지지체가 PLGA 지지체보다 높은 세포 증식률을 보였다. 또한 파종된 연골세포의 표현형 유지에도 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이번 연구 결과를 토대로 PLGA에 DBP를 이용한 용액을 함침시킴으로써 DBP내의 성장인자와의 상호작용을 통해 연골세포의 성장에 긍정적 영향을 미쳐 안정되게 연골을 조직화할 수 있는 연골조직공학 지지체로 적합할 것으로 예상된다.

Abstract: Articular cartilage has an intrinsic difficulty in recovering damages, which requires its tissue engineering treatment. Demineralized bone particle (DBP) contains various bioactive molecules. It is widely used biomaterials in the field of tissue engineering. We developed the synthetic/natural hybrid scaffolds with poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and solution of DBP. The chondrocytes were seeded on the PLGA-DBP scaffolds and MTT assay, morphological observation, biological assay for collagen, sGAG, and RT-PCR were performed to analyze the effect of the DBP on cell viability and extracellular matrix secretion. In SEM observation, we observed that PLGA-DBP scaffolds had uniform porosity. As MTT assay showed scaffolds containing DB solution had higher cell viability than only PLGA scaffolds. The PLGA-DBP scaffolds had better ECM production than PLGA scaffold. It was proven by the higher specific mRNA expression in the PLGA-DBP scaffold than that in PLGA scaffold. These results indicated that PLGA-DBP scaffolds might serve as potential cell delivery vehicles and structural bases for *in vitro* tissue engineered articular cartilage.

Keywords: chondrocyte, PLGA, demineralized bone particle (DBP).

서 론

최근 병들고 기능이 정지되고, 적출된 장기 등의 역할을 대체하려는 일련의 연구인 생체조직공학적인 바이오장기의 연구분야가 각광받고 있다. 최근에는 레저활동과 스포츠 인구가 증가하면서 운동 외상으로 인한 연골 손상, 교통사고나 반복적인 충격, 잦은 경상 등으로 인한 연골 손상 등이 사회·경제적 전반적인 문제로 떠오르고 있다. 연골에는 혈

관, 림프관 및 신경의 분포가 없기 때문에 한번 손상받거나 퇴화되면 재생되기 어려운 특징이 있다.¹ 연골을 치료하기 위한 방법으로 골막 또는 연골막 등으로 손상부위의 표면을 치료하거나 연골화를 촉진시키는 성장인자의 투여 및 자가 연골을 체외에서 배양하여 손상부위에 넣는 방법 등으로 많은 발전이 거듭되고 있다.² 이식 후 환자들의 상당수가 호전됨이 보고되는데 불구하고 이들 대부분의 재료들이 알레르기 반응, 섬유화 반응에 의한 조직체적의 축소, 기계적 물성의 불안정, 원래모양의 변형, 인체내에서의 움직임 및 장기간이 지난 후에 흡수 등의 심각한 문제들이 보고되고 있다. 따라서 이러한 기증장기의 부족문제와 생체재

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mails: gskhang@jbnu.ac.kr, dlee@jbnu.ac.kr

료 단독으로 사용되었을 때 생체적합성이 결여되는 문제를 해결하기 위하여 세포와 생체재료를 하이브리드화한 이른바 생체조직공학이 제안되기에 이르렀다. 이러한 기술은 최근에 활발히 연구되고 있는 분야로 조직용 재료에 있어서 재료의 생체적합성은 연골세포 및 조직이 정상적인 활동을 하기 위해서 불가결하다. 또한 생체조직공학에 있어서 지지체는 다공성 구조내에 파종된 세포와 조직 주변으로부터 이동되는 세포의 성장에 중요한 역할을 하므로 3차원적인 지지체의 개발은 매우 중요하다. 지지체를 제조하는 방법으로 PGA 부직포 시트, 다공체 추출법, 용매 캐스팅/입자 추출법, 가스발포법 등 현재 30가지 이상의 방법이 제안되었다.^{3,4} 이러한 요건에 부합하는 지지체를 제조하는데 이용되는 생체재료들로는 합성고분자, 무기재료 및 천연재료 등이 사용된다.⁵

현재 가장 많이 사용되고 있는 생분해성 고분자 중의 하나는 폴리락타이드(PLA), 폴리글리콜라이드(PGA) 및 이들의 공중합체 PLGA 등인데 이들은 생분해성 고분자로는 유일하게 미국의 식품의약안전청에서 허가를 받았으며,⁶ 분지량과 화학적 구성 성분을 조절함으로써 분해기간을 조절할 수 있는 장점을 가지고 있다.⁷ 그러나 수용액 내에서 높은 경계면 자유에너지를 지닌 소수성 표면 특성으로 인해 접촉의 시작단계에서 그것들의 세포, 조직, 그리고 혈액 친화성에 좋지 않은 영향을 미치는 경향이 있다. 게다가, 이러한 소수성 성질은 지지체의 내부에 영양액이 투과하기 어려워 영양액 공급이 원활하게 되지 않는 단점이 있다.

DBP는 뼈채취를 위한 이치수술이 필요치 않으며 신속한 뼈유도 능력을 가지는 장점이 있다. 또한 탈회과정 중의 용매(에탄올, 염산 등)와 멸균에 의한 바이러스 활성이 떨어지며, 골 표면의 항원파괴로 인해 이식 거부 등과 같은 면역성을 감소시킬 수 있다. DBP는 많은 종류의 뼈형성 단백질(BMP)과 같은 뼈형성/연골형성 사이토카인을 함유하고 있으며 뼈 결손부위에 충전제로서 널리 임상적으로 사용되고 있다. 최근에는 이들의 조직은행 산업이 발전함에 따라서 이들의 원료인 인체유래 뼈를 얻기가 용이해졌다.^{8,9}

이에 본 연구팀은 조직공학적인 바이오 연골에 적용하기 위해 탈미네랄화된 골분(DBP)을 생체재료로 사용하여 PLGA에 생체활성과 친수성을 부여하고자 하는 연구를 수행하였다.^{10,11}

DBP는 세포의 증식과 분화에 영향을 주고,¹⁰ 염증반응을 감소시킨다고 보고되어¹² 광범위하게 임상용으로 사용되는 생체활성천연재료이다. 이전 연구에서 천연재료의 함유와 제조방법에 따라 다양한 지지체를 제조하여 조직공학 지지체로서의 응용가능성을 확인하였다.¹³

이러한 사실을 바탕으로 본 연구에서는 DBP라는 천연재료를 줄

(sol)화시켜 PLGA에 함침시키는 방법으로 지지체를 제조하였고 뉴질랜드 흰색 토끼의 무릎 관절에서 분리한 연골세포를 배양하여 *in vitro* 환경에서 조직공학적 골 형성을 관찰하였다.

실 험

시약 및 재료. 평균분자량이 90000 g/mole인 PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비: 75/25, Resomer RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd, Germany)인 것을 사용하였다. 또한 염화나트륨(Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성물질로 사용하였는데 250~355 μm 크기별 분자체를 사용하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

DBP 제조. DBP는 소의 대퇴부를 상용하여 Urist 방법으로 제조하였으며 제조과정 중의 모습을 Figure 1에 나타내었다.¹⁴ 소의 대퇴골과 경골을 채취하여 원위골단부, 근위골단부, 골막과 골수 및 연조직을 깨끗이 제거한 후 에탄올로 세척하여 잘게 파쇄하였다. 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매로 지방을 제거한 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, pH 7.3~7.4; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)으로 pH 7.4로 조절하여 동결건조시켰다. DBP는 액체질소 내에서 동결분쇄(SPEX 6700, USA)하여 약 180 μm 크기 이하의 분말형태로 얻었다.¹⁵⁻¹⁷

용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조. 천연재료인 DB 용액을 생체활성이 전혀없는 PLGA 지지체에 새로운 생체활성을 부여하기 위함과 동시에 생체 조직공학적 뼈를 응용하기 위해 용매추출 방법에 의해 제조하였다. PLGA(1 g)를 메틸렌클로라이드에 일정 농도로 용해한 후 250~355 μm 크기가 되도록 다공생성 물질인 염화나트륨을 분자체로 걸러 PLGA 무게의 10배가 되게 첨가하고 이들을 균일하게 혼합하였다. 용해된 혼합물을 직경 7 mm 및 두께 3 mm의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공형성 물질인 염의 추출은 3차 증류수에서 48시간 동안 시행한 후, 8 mTorr, -55 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 메틸렌클로라이드를 제거하기 위해 최소 1주일 동안 25 $^{\circ}\text{C}$ 진공오븐에서 건조시킨 후, 사용 전까지 진공상태에서 보관하였다.

DB 용액을 함침시킨 PLGA-DBP 지지체 제조. 3% 아세트산(Sigma Chim. Co.)에 0.1% 펩신(Sigma Chem. Co.)을 함유한 용액에 1 wt%

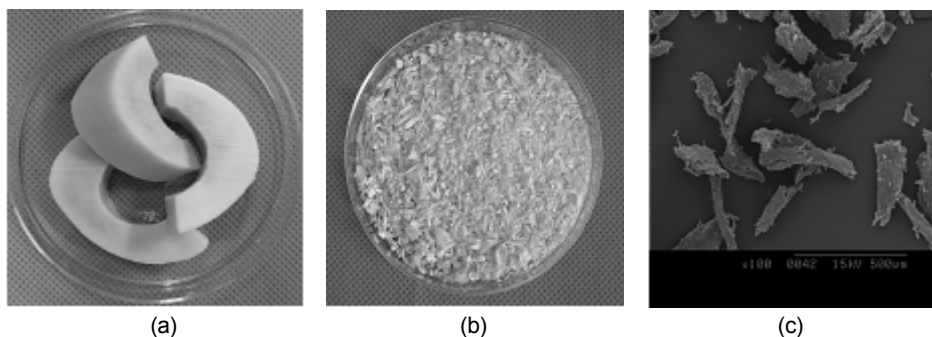


Figure 1. Processing of DBP fabrication: (a) femur; (b) bone after demineralization; (c) pulverized morphology of demineralized bone.

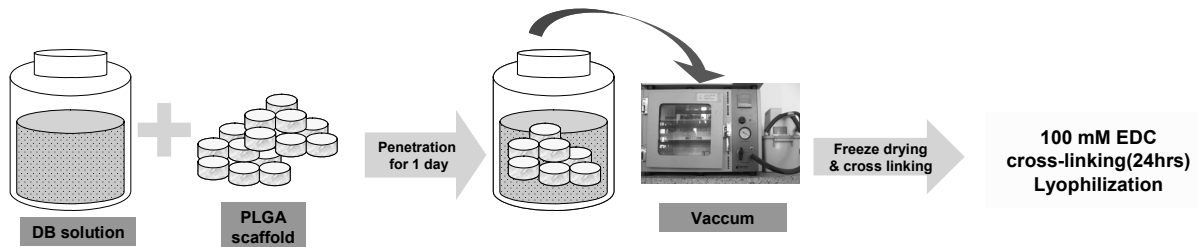


Figure 2. Fabricating process of PLGA-DBP scaffolds.

의 DBP 분말을 첨가시켜 상온에서 48시간 동안 교반시켜 용액(DB 용액)을 제조하였다. 위의 방법에 따라 제조된 PLGA 지지체 위에 DB 용액을 함침시킨 후 4 °C에서 24시간 동안 보관하고 24시간 동안 진공 건조하여 DB 용액이 PLGA 다공 안으로 잘 침투될 수 있도록 유도하였다. 건조된 지지체는 1-에틸-(3,3-다이메틸아미노프로필) 카보이미드 하이드로클로라이드(EDC, Sigma Chem. Co.) 용액으로 상온에서 24시간 동안 경화시켰고, 3차 증류수로 여러 번 세척하여 EDC 용액을 완전히 제거하였다. -80 °C에서 24시간 동안 급랭시킨 후 동결 건조하여 PLGA 다공 안에 가교된 스폰지 형태의 DBP 매트릭스가 형성 되도록 하였다(PLGA-DBP). 이들의 제조과정 모식도를 Figure 2에 나타내었다.^{17,18}

연골세포의 분리 및 배양. 연골세포는 4주령의 뉴질랜드 흰색 토끼(Damul Science, Korea, Daejeon)의 무릎관절에서 분리하여 사용하였다. 무균 상태에서 관절을 노출시켜 연골 조직만 취한 다음 인산 완충용액(PBS, pH 7.3-7.4; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)으로 여러 번 세척한 후 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, Lakewood, USA) 용액으로 12시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 하에서 조직을 분해시켰다. 조직이 담긴 용액을 70 μm의 나이론 매쉬로 거른 후 원심분리하여 DMEM과 F-12 혼합 배양액에 10% 우태혈청(FBS, Gibco), 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신), 200 mM L-글루타민(Gibco), 50 μg/mL ascorbic acid (Sigma, St. Louis, USA), 15 mM HEPES 완충용액 1 M(Gibco)이 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 3일에 한 번씩 교체해주었으며, 계대배양 1회째 것을 사용하였다. 연골세포부착도, 생물학적 및 조직학적 분석을 위하여 직경 7 mm 및 두께 3 mm의 지지체당 연골세포를 1×10⁶개씩 파종하였다.

PLGA-DBP 지지체의 세포부착 양상 분석. 점착된 세포의 형태를 확인하고자 주사전자현미경(SEM, JSM6400, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 지지체에 세포를 파종하여 배양 3일 후 2.5%의 글루타르알데하이드(Sigma)로 24시간 상온에서 고정된 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90, 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 건조하였다. 지지체는 표면과 가로축으로 절단한 후 단면을 시료폴더에 고정시켜 플라즈마 스퍼터(Emitch, K575, UK)를 이용하여 200 Å 두께의 백금코팅한 후 가속전압 5.00 KV에서 촬영하였다.

수분 흡수성 측정. 제조된 지지체에 세포를 파종하여 1, 2 및 3주 동안 배양하였다. 각 시기에 따라 지지체를 취하여 처음 젖은 무게(*W_{wet}*)를 측정된 뒤 동결건조시킨 후 건조 무게(*W_{dry}*)를 측정하였다. 무게를 측정된 값들을 이용하여 다음의 식에 대입하여 수분 흡수성을

계산하였다. 모든 실험은 동일 조건에서 두 번씩 수행하였다.

$$W(\%) = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100$$

세포 증식률 측정. 세포증식 능력이나 세포생존 능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 MTT(3-[4,5-다이메틸치아졸-2-일-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma] 분석법을 시행하였다. 제조된 지지체에 세포를 파종하여 배양한 후 1, 3, 7, 14 그리고 21일째에 MTT 용액(50 mg/mL)을 100 μL씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 세척하고 디메틸설폭사이드(Sigma) 용액을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파세척기로 1시간 동안 결정을 용해하였다. 그 후, 96웰 플레이트에 시료를 100 μL씩 분주하고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

황산 글리코사미노글리칸(sGAG) 및 콜라겐 함량 측정. 지지체 세포 파종 후 1, 2 및 3주에 회수된 지지체를 급랭시킨 후 5 mTorr, -70 °C 조건에서 동결건조하였다. 준비된 지지체에 파파인 용액(125 μg/mL 파파인, 5 mM L-시스테인, 100 mM Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, pH 6.8)을 300 μL씩 넣어 60 °C 온도에서 16시간 동안 반응시켰다. 지지체에서 sGAG 생산량은 1,9-다이메틸렌 블루(DMMB) 분석법을 이용하여 측정하였다. 파파인에 반응시킨 용액을 50 μL 취해 200 μL DMMB 용액과 혼합하여 상온에서 20분 동안 천천히 교반한 후 96 웰 플레이트에 100 μL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지지체에서 생산된 총 sGAG 양은 황산콘드로이틴(Sigma)을 기준으로 하여 계산하였다. 콜라겐의 생산량은 반응시킨 용액에 수산화나트륨을 첨가하여 2 N 농도로 만든 후 이 용액을 50 μL 취하여 120 °C 온도에서 20분 동안 오토클레이브한다. 여기에 클로라민-T 용액을 450 μL 첨가하여 실온에서 25분 동안 천천히 교반하고 500 μL Enrich's 알데하이드 용액을 넣어 65 °C 온도에서 20분 동안 반응시킨 후 96 웰 플레이트에 100 μL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지지체의 콜라겐 생산량은 하이드록시프롤린(Sigma)을 측정함으로써 계산하였다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 지지체 내에 파종된 연골세포의 특정 유전자 발현 정도를 확인하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 실시하였다. 세포 배양 후 TRIzol(Invitrogen™, USA)을 처리하여

Table 1. PCR Primers and Protocol for Thermal Cycling

Species	Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles
	β -actin	F: 5'-gcc atc ctg ctg ctg egac ctg gct-3'	D=94; 30 sec	25
		R: 5'-gtg atg acc tgg ccg tca ggc agc-3'	A=59; 1 min	
			E=72; 45 sec	
Rabbit	Type I collagen	F: 5'-gat gcg ttc cag ttc gag ta-3'	D=95; 30 sec	25
		R: 5'-ggt ctt ccg gtg gtc ttg ta-3'	A=65; 30 sec	
			E=72; 30 sec	
	Type II collagen	F: 5'-gca ccc atg gac att gga ggg-3'	D=94; 1 min	25
		R: 5'-atg ttt taa aaa ata cag ag-3'	A=57; 1 min	
			E=72; 45 sec	
Aggrecan	F: 5'-gag atg gag ggt gag gtc-3'	D=94; 45 sec	35	
	R: 5'-acg ctg cct cgg gct tc-3'	A=53; 30 sec		
		E=72; 1 min		

D: Denature, A: Annealing, E: Extension.

세포로부터 mRNA를 분리하고 SuperScript™ II, RT (Invitrogen™)를 사용하여 cDNA로 전사하였다. 이렇게 전사시킨 cDNA는 2유닛 Taq DNA 폴리머라제를 포함한 PCR 마스터키트(Roche, Germany)를 이용하여 각 프라이머(β -actin, collagen type I, collagen type II, aggrecan)를 신장시켜 원하는 DNA의 특정영역을 증폭시켜 PCR을 수행하였다. 각 프라이머 염기서열 조건은 Table 1에 나타내었다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.2%(w/v) 아가로스 겔에 넣어 100 V에서 25분 동안 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 자외선 투과조사기(Vilber Lourmat ETX-20.M, France)에 위치하여 관찰하였다.

결과 및 토론

세포부착 모폴로지. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조한 PLGA 지지체의 다공 안에 DB 용액을 함침시킨 PLGA-DBP 지지체 내에서 세포의 부착 및 형상을 확인하고자 SEM으로 분석하였으며, 이를 Figure 3에 나타내었다. 염의 크기(250~355 μ m)에 따라 지지체에서도 염과 유사한 크기의 다공이 나타났다. 지지체의 내부, 옆면의 다공 구조는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다. 또한 이 다공 안으로 가교된 스폰지 형태의 DBP 매트릭스(PLGA-DBP)가 형성되어 이 안에서 세포가 자리 잡고 있는 것을 확인하였다.

수분 흡수성. PLGA-DBP 지지체의 수분 함유량을 PLGA 지지체와 비교하여 Figure 4에 나타내었다. 수분 함유량은 세포의 부착, 퍼짐, 성장, 그리고 지지체 내부에 영양액 침투에 중요한 역할을 수행한다. 실험 결과 시간이 지날수록 두 지지체 모두 수분 함유량이 증가하였으나 특히 PLGA만 단독으로 있는 지지체보다 DB 용액을 함침시킨 지지체에서 더 높은 수분 함유량 증가를 보였다. 이 결과를 통해 PLGA-DBP에 파종된 연골세포가 생산한 GAG가 주변의 수분을 잘 담고 있음을 알 수 있었다. 특히 3주에서 PLGA만 단독으로 있는 지지체보다 DB 용액을 함침시킨 지지체에서 20% 이상 높은 수분 함유량을 보였다. 이로써 PLGA가 가지고 있는 소수성 표면이 DB 용액을 함침시킴으로써 친수화가 되어 지지체에 새로운 생체활성이 부여된 것이라 사료된다.

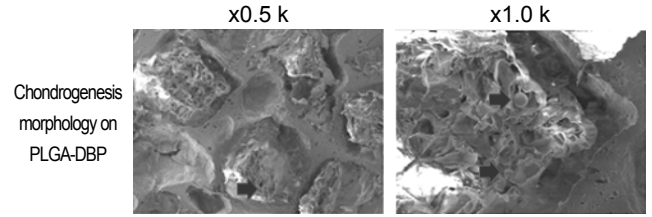


Figure 3. SEM micrographs of chondrogenesis morphology on PLGA-DBP scaffolds at cultivation time 3 days.

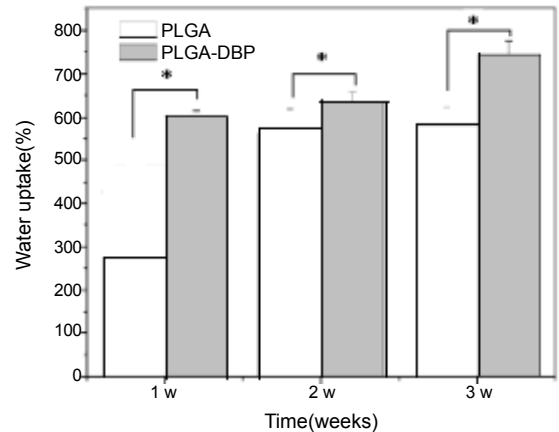


Figure 4. Water uptake ability of PLGA and PLGA-DBP scaffolds prepared by freeze-drying method. *Corresponds to $P < 0.05$ in comparison with PLGA scaffold for each day.

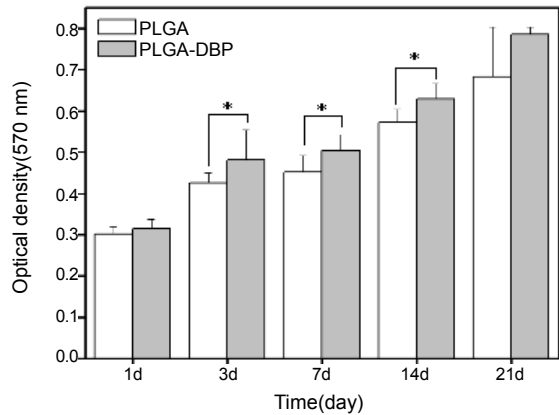


Figure 5. Chondrocytes proliferation in PLGA and PLGA-DBP scaffolds after 1, 3, 7, 14 and 21 days *in vitro*. *Corresponds to $P < 0.05$ in comparison with PLGA scaffold for each day.

세포 증식률. PLGA-DBP 지지체내에서의 세포 성장률과 증식률을 확인하기 위하여 세포 파종 후 3주 동안 배양시키고 MTT 분석을 수행하였으며 PLGA 지지체와 비교 분석하여 Figure 5에 나타내었다. 대사적으로 왕성한 활동을 하고 있는 세포는 미토콘드리아의 전자전달계 과정을 통하여 생존에 필요한 에너지를 생산하는데, 이때의 전자전달계에 존재하는 탈수소효소가 포마산이라는 발색물질을 생성한다. 여기에서의 포마산에 의한 발색 강도 증감을 측정하여 세포의 증식 능력을 분석한 결과 PLGA 지지체에서 보다 PLGA-DBP 지지체에서의 세포 성장률과 증식률이 훨씬 높게 나타났으며 3주 동안 관찰한 결과 20% 이상의

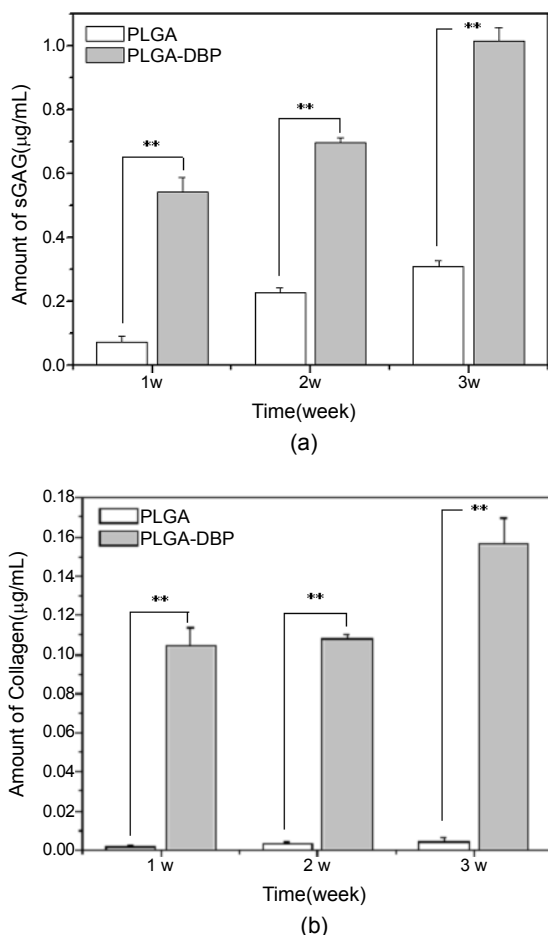


Figure 6. (a) sGAG; (b) collagen contents of PLGA and PLGA-DBP scaffolds after 1, 2, and 3 weeks of cultivation. **Corresponds to $P < 0.01$ in comparison with PLGA scaffold for each week.

성장률이 높게 나타났고 시간이 지날수록 꾸준한 속도로 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 천연재료인 DBP를 용액상태로 PLGA에 함침시켰을 경우 상기에서 도출된 결과에서 알 수 있듯이 다공의 특성을 향상시키고, 친수성을 증대시켜 수분 흡수성이 향상된 것으로 보인다. 이로써 DBP 내에 있는 다양한 성장인자 또는 사이토카인이 연골세포의 증식에 긍정적인 영향을 주었을 것이라 예상된다.

sGAG 및 콜라겐 함량 측정. 연골세포를 파종한 지지체에서 1, 2 및 3주 배양한 후 연골의 세포외기질의 대부분을 차지하며 배양 시 분비되는 당 단백질인 sGAG의 함량을 측정된 결과 보이는 바와 같이 PLGA 지지체보다 PLGA-DBP 지지체에서 sGAG 양이 확연히 높음을 확인할 수 있었다. 특히 1주와 3주에서는 단독으로 사용된 PLGA 지지체보다 PLGA-DBP에서 GAG 함량이 5배 이상의 차이를 보였다. 이는 상기의 수분 함유량 결과와 부합하는 것으로 지지체 내에 파종된 연골세포의 sGAG 기질과 수분 함유량과의 연관성을 제시한다. 또한 콜라겐 함량을 측정된 결과 sGAG의 함량보다는 낮은 값을 보이지만 이는 단백질당기질로 대부분 이루어진 연골자체의 특성에 기인하는 것으로 보이며 PLGA-DBP 지지체에서 10배 이상의 월등히 높은 콜라겐을 함유하고 있음을 확인하였다(Figure 6). 이로써 DB 용액이 함침

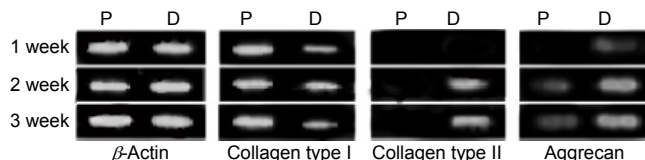


Figure 7. Result of agarose gel electrophoresis. Gene expression profiles of β -actin, collagen type I and collagen type II, aggrecan as analyzed by RT-PCR on week 1, 2 and 3 (P: PLGA scaffold, D: PLGA-DBP scaffold).

된 지지체가 연골기질의 형성에 적절한 환경을 제공해 주고 담체로서의 역할을 훌륭히 수행할 것으로 예상된다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. PLGA-DBP 지지체에 파종된 연골 세포의 표현형 유지에 미치는 영향을 mRNA 관점에서 확인하였다. 1, 2 및 3주 배양한 후 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하여 연골세포에서 나타나는 특이적 유전자인 제 2형 콜라겐과 연골의 퇴화에서 나타나는 유전자인 제 1형 콜라겐 그리고 연골의 구성 성분으로 정상적이고 건강한 연골에서 나타나는 어그리칸의 발현 정도를 확인하여 Figure 7에 나타내었다. Figure 7에 나타난 것 같이 모든 실험군에서 house keeping gene인 β -actin은 일정하게 발현됨을 확인할 수 있었으며 제 1형 콜라겐의 발현 정도를 보면 PLGA-DBP 지지체가 PLGA만 단독으로 있는 지지체보다 낮은 퇴화도를 보였으며 연골 세포의 특이 유전자인 제 2형 콜라겐의 발현 역시 PLGA-DBP 지지체에서 크게 발현된 것을 통해 확실히 확인할 수 있었다. 또한 어그리칸의 발현에 있어서도 PLGA-DBP 지지체에서 더 높게 발현이 되었는데 이는 DB 용액을 함침시킨 지지체에서 배양된 연골세포가 더 건강하고 정상적임을 증명시켜 준다. 이러한 결과를 통해 PLGA-DBP 지지체가 연골 조직이 충격을 흡수하고 무게를 지탱하며 압축되는 것을 막도록 돕는 역할을 충분히 수행할 수 있을 것이라 예상된다.

결론

DBP의 특성을 살려 본 연구에서는 제조된 지지체에 연골 세포를 이용하여 다양한 요인에 의해 발생하는 연골 손상의 재생을 위한 조직공학적 응용 가능성을 확인하였다. 본 실험에서 연골세포를 이용하여 부착된 모폴로지를 확인한 결과 PLGA 다공 안에 DB 용액이 함침되어 존재하고 있으며 이 DBP 매트릭스로 형성된 작은 다공 안에 세포가 자리 잡고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 MTT 분석 결과에서 본 세포 증식률을 통해 확실히 비교할 수 있었다. 시간에 따라 세포 증식률이 모두 점차적으로 증가는 했으나 특히 DB 용액을 함침시킨 지지체가 PLGA만 단독으로 있는 지지체보다 더 높은 증식률을 보이며 증가했다. 수분 흡수성 결과에서도 마찬가지로 이는 PLGA가 가지고 있는 소수성 표면이 DB 용액이 첨가됨에 따라 친수화되어 세포의 부착도를 높였을 것이라 사료된다.

또한 연골의 주요 성분인 GAG의 함유량을 비교해 보았을 때 시간이 지남에 따라 PLGA-DBP 지지체에서 더 높은 증가율을 보였다. 연골의 또 다른 주요 구성 성분인 콜라겐의 함량도 비교 분석해 본 결과 GAG의 양보다는 적은 양이지만 PLGA만 있는 지지체보다 DB 용액이 함침된 지지체에서 보다 눈에 띄게 높은 함량을 보였다. 이러한 결과로부터 PLGA-DBP 지지체에서는 DBP가 가진 BMP 등의 세포에 자

극을 주는 인자의 영향을 받아 연골기질을 구성하는 대표적 구조적 요소인 콜라겐 섬유를 풍부하게 해줌과 동시에 연골에 견고도 또한 제공해 주는 등 연골세포에 긍정적 영향을 미치는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구를 통하여 PLGA에 DBP를 이용한 용액을 함침시킴으로써 DBP 내의 성장인자와의 상호작용을 통해 연골세포의 성장에 긍정적 영향을 미쳐 연골 조직공학 지지체로의 응용에 적합할 것으로 예상된다.

현재 본 연구팀에서는 PLGA-DBP 지지체내에서 연골세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학염색 연구 및 *in vivo* 연구가 진행 중에 있다.

감사의 글: 본 연구는 세포융용사업단(SC4110), 보건복지가족부(0405-BO 01-0204-0006) 및 WCU(R31-20029)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. J. Mankin, *J. Bone. Joint. Surg. Am.*, **64**, 460 (1982).
2. V. M. Goldberg and A. I. Caplan, "Cellular Repair of Articular Cartilage", in *Osteoarthritic Disorders*, K. E. Kuettner and V. M. Goldberg, Editors, Chap 25, VM Goldberg, AAOS (1994).
3. B. L. Seal, T. C. Oterom, and A. Panitch, *Mater. Sci. Eng.*, **34**, 147 (2001).
4. A. L. Vinson, J. J. Hemperly, R. D. Guarino, C. A. Spargo, and M. A. Heidarani, "Bioactive Extracellular Matrices: Biological and Biochemical Evaluation", in *Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents, Scientific and Clinical Applications*, K. U. Lewandrowski, D. L. Wise, D. J. Trantolo, J. D. Gresser, M. J. Yaszemski, and D. E. Altobelli, Editors, Marcel Dekker, New York, Basel 709-764 (2002).
5. L. G. Cima, J. P. Vacanti, D. Ingber, and R. Langer, *J. Biomech. Eng.*, **113**, 143 (1991).
6. S. J. Holland, B. J. Tighe, and P. L. Could, *J. Control. Release*, **4**, 155 (1986).
7. G. Khang and H. B. Lee, *Methods of Tissue Engineering*, A. Atala and R. Lanza, Editors, Academic Press, SanDiego, California, Chap. **67**, p 771 (2001).
8. R. C. Squatrito, J. P. Connor, and R. E. Buller, *Gynecol. Oncol.*, **58**, 101 (1995).
9. P. Coegan, G. Jonson, and R. Vincent, *Toxic in Vitro*, **9**, 257 (1995).
10. S. H. Kim, K. S. Park, B. S. Choi, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **585**, 167 (2006).
11. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2006).
12. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yoon, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. S. Son, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).
13. S. H. Kim, S. J. Yoon, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 501 (2005).
14. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
15. R. G. Payne, M. J. Yaszemski, A. W. Yasko, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **23**, 4359 (2001).
16. M. Matsuoka, B. Wispriyono, and H. Igisu, *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1573 (2000).
17. H. S. Shin, J. S. Temenoff, G. C. Bowden, K. Zygourakis, M. C. Carson, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **26**, 3645 (2005).
18. G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **657**, 235 (2003).