

PLGA/피브린 지지체가 늑연골 세포의 부착과 성장에 미치는 영향

송정은 · 이유정[#] · 이윤미[#] · 조선아 · 장지은 · 이동원 · 강길선[†]

전북대학교 고분자나노공학과, BIN 융합공학과, 유기신물질공학과
(2012년 8월 29일 접수, 2012년 11월 26일 수정, 2012년 12월 7일 채택)

Effects of PLGA/Fibrin Scaffolds on Attachment and Proliferation of Costal Cartilage Cells

Jeong Eun Song, Yujung Lee[#], Yun Me Lee[#], Sun Ah Cho, Ji Eun Jang, Dongwon Lee, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Fusion Tech & Dept. of PolymerNano Sci Tech, Dept. of Advanced Organic Materials Engineering,
Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

(Received August 29, 2012; Revised November 26, 2012; Accepted December 7, 2012)

초록: Poly(lactide-co-glycolic acid)(PLGA)는 좋은 기계적 성질과 생분해성으로 약물전달시스템 또는 조직공학적으로 널리 이용되고 있으나 낮은 세포 부착률을 가지고 있어 피브린을 첨가하여 이를 보완하고자 하였다. 본 연구에서 사용된 지지체는 트롬빈과 피브리노겐, 그리고 세포를 혼합시킨 후 PLGA 지지체 위에 도포시켜 제조하였다. 세포의 부착 및 증식률을 측정하고자 PLGA/피브린 지지체에 늑연골 세포를 파종 후 1, 3일 및 7일 후 SEM과 MTT 분석을 통하여 측정하였으며, 세포외기질 형성에 미치는 피브린의 영향을 확인하고자 세포를 파종 후 누드마우스에 이식하여 GAG 및 콜라겐 합성의 효과를 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 피브린이 혼합된 PLGA 지지체가 생체 내의 환경에서 세포의 부착 및 증식에 미치는 영향을 확인하고자 연구를 진행하였다. 그 결과, PLGA/피브린 지지체가 기존의 PLGA 지지체와 비교하여 탁월한 세포 성장률을 나타내는 것으로 확인하였다.

Abstract: Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) has been widely used in the drug delivery and tissue engineering applications because of its good mechanical strength and biodegradation profile. However, cell attachment to the scaffold is low compared with that on fibrin although cells can be attached to the polymer surface. In this study, PLGA scaffolds were soaked in cells-fibrin suspension and polymerized with dropping fibrinogen-thrombin solution. Cellular proliferation activity was observed in PLGA/fibrin-seeded costal cartilage cells (CC) on 1, 3, and 7 days using the MTT assay and SEM. The effects of fibrin on the extracellular matrix (ECM) formation were evaluated using CC cell-seeded PLGA/fibrin scaffolds. The PLGA/fibrin scaffolds elicited more production of glycosaminoglycan (GAG) and collagen than the PLGA scaffold. In this study, fibrin incorporated PLGA scaffolds were prepared to evaluate the effects of fibrin on the cell attachment and proliferation *in vitro* and *in vivo*. In this result, we confirmed that proliferation of cells in PLGA/fibrin scaffolds were better than in PLGA scaffolds. The PLGA/fibrin scaffolds provide suitable environment for growth and proliferation of costal cartilage cells.

Keywords: fibrin, PLGA, scaffold, costal cartilage, extracellular matrix.

서 론

현대사회에 진입하면서 레저 활동과 스포츠를 즐기는 인구가 증가하여 운동외상, 교통사고나 반복적인 충격, 잦은 경상 등으로 인한 연골 손상이 전반적인 사회·경제적 문제로 대두되고 있다.

연골은 결합조직으로서 외부의 충격을 흡수하고 뼈와 뼈 사이에 충격을 완화시키는 중요한 역할을 한다. 이러한 연골은 연골기질을 구성하는 섬유의 종류에 따라 초자연골(hyaline cartilage), 탄성연골(elastic cartilage), 그리고 섬유연골(fibrocartilage)로 나눌 수 있다. 그 중 초자연골은 제 2형 콜라겐을 함유하고 있으며, 신체에서 가장 많이 존재하는 종류의 연골이다. 또한 탄성연골은 초자연골과 기본구조는 비슷하며 특히 긴장과 압력의 힘에 저항할 수 있고 휘어지는 성질을 가지고 있다. 마지막으로 섬유연골은 제 1형 콜라겐으로 이루어져 있어 높은 신장성을 가지고 있다. 이러한 연골 중에서

[#]These authors contributed equally to this works.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

무릎연골의 경우 운동이나 노화에 따라 연골로서의 기능 손상이 쉽게 발생한다. 연골은 혈관, 신경, 림프관이 없는 신체 조직으로 한번 조직손상을 받을 경우 세포 보충 및 재생할 수 있는 방법이 매우 제한적이기 때문에 상처부위가 조금만 커져도 자가 재생에 의한 상처 치료가 불가능하게 된다.¹ 이러한 연골의 문제점을 해결하고자 조직공학 연구분야에서 늑연골 세포를 이용하여 새로운 세포원으로 이용되고 있다.

늑연골 세포는 늑경골과 흉골 사이에 존재하며 호흡을 할 때 발생하는 압력을 완충시켜주는 역할을 한다. 또한 늑연골은 나이가 들어도 손상되지 않고 보존이 잘 되어 있어 나이에 관계없이 세포를 얻기가 용이하고 무릎연골과 같은 초자연골로 구성되어 있어 세포의 분열능력이 우수한 장점을 가지고 있다.²

본 연구는 3차원 poly(lactide-co-glycolic acid)(PLGA)/피브린 지지체를 제조하여 늑연골을 파종 후 연골손상 모델에 응용하고자 하였다. 연구에서 사용된 PLGA는 히드록시산 계열인 폴리락타이드(PLA)-폴리글리콜라이드(PGA) 공중합체(PLGA)를 이용하였다. PLGA는 미국 식품의약품안전청(FDA) 승인을 받은 합성고분자로서^{3,4} 높은 생체적합성과 생분해성 및 우수한 가공성으로 조직공학적 다공성 지지체, 약물전달 체계의 디바이스로 응용되고 있다.^{5,7} 그러나 분해산물인 산으로 인한 염증반응 및 독성물질을 생산하여 세포 증식률의 감소를 야기시킨다고 보고되고 있다.^{7,11} 본 연구에서는 이러한 PLGA의 문제점을 개선하고자 피브린을 이용하였다. 피브린은 자연계에서 가장 풍부하고 특성결정이 잘 되어있는 생체 유래고분자이며¹² 자가 조립특성과 부드러운 탄성력으로 주목받고 있는 생체 재료 중 하나이다. 또한 실제 임상에서 지혈제나 접착제 등에 널리 쓰이고 있으며, 기계적·생화학적 특성을 가지고 있어 조직공학과 재생의학에서 장래가 있는 잠재성이 우수한 재료로 주목받고 있다.³

따라서 용매 캐스팅/염 추출법으로 생분해성 합성 재료인 PLGA를 지지체로 제조한 후 피브린을 도포하여 늑연골 세포의 증식거동을 확인, 연골 손상 치료를 위한 가능성을 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 피브린(Greenplast[®])은 주식회사 Baxter AG에서 제공받았으며, PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비 75/25, Resomer[®] RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. NaCl(염화나트륨, Orient Chem. Co., Korea)은 다공성 물질로 사용하였는데, 분자체를 사용하여 입자의 크기를 180~250 μm 로 조절하였다. MC(메틸렌클로라이드, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. 또한 세포배양에 필요한 시약은 Sigma-

Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

PLGA/피브린 다공성 지지체 제조. PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법에 의해 제조되었다. 1 g의 PLGA를 4 mL의 MC에 용해한 후, 다공형성 물질인 NaCl을 PLGA의 9배가 되도록 9 g을 첨가하고, 직경 7 mm 및 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 24시간 후 다공형성을 위해 3차 증류수로 6시간마다 교체하여, 48시간 동안 NaCl을 용출하였고, 5 mTorr, -80 °C 조건에서 24시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 MC를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 25 °C 진공오븐에서 건조, 70% 알콜에 멸균 후 피브리노젠 20 μL 과 트롬빈을 30 μL 씩 도포해주었다.

세포 배양. 늑연골 세포는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼로부터 얻었으며 분리한 조직은 PBS로 3번 세척 후 기타 불필요한 조직을 제거하였다. 1-2 mm³ 크기로 세절된 연골조직을 10% 페니실린과 PBS로 세척하였다. 그 후 0.5 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, USA) 용액에 넣어 37 °C, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양한 용액을 50 μm nylon mesh를 이용하여 여과한 후 세포를 75 cm² 플라스크에 분주하였다. 이 때, MEM-alpha(GibcoBRL, USA)에 10% FBS(우태아혈청, GibcoBRL, USA) 및 1% 항생제(100 units/mL 스트렙토마이신) 그리고 1% ascorbic acid가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교체해 주었으며 상기 방법으로 배양된 세포들의 순수 배양정도를 현미경을 통하여 확인하였다.

세포 증식률 측정. 세포 증식능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 MTT(디메틸치아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma-Aldrich) 분석법을 시행하였다. 늑연골 세포를 2×10⁵ 세포/지지체의 농도로 파종하고 상기의 배양액으로 정적 배양하였다(각 지지체당 n=4). 배양 1, 3일 및 7일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100 μL 씩 넣고 4시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 보라색 결정이 생성되면 지지체를 시험관에 옮겨 DMSO(디메틸설폭사이드, Sigma-Aldrich) 용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 1시간 동안 용해한 후 96-well 플레이트에 시료를 각각 100 μL 씩 분주하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포부착 형태. 지지체에서 늑연골 세포의 부착양상 및 변화된 형태를 확인하고자 SEM(주사전자현미경, S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다(각 지지체당 n=2). 단독 PLGA 지지체와 피브린을 함유한 PLGA 지지체에 늑연골 세포를 2×10⁵ 세포/지지체의 농도로 파종하고 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 글루타랄데하이드(Sigma-Aldrich)로 24시간 동안 상온에서 고정된 후 에탄올

구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30 분씩 탈수한 후 건조하였다. 시료관찰이 용이하도록 시편을 잘라 시료폴더에 고정시킨 후, 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금코팅한 후 각각의 시료를 1000배의 배율로 촬영하였다.

세포 파종 및 3차원 지지체 이식. 제조된 지지체를 녹연골 세포는 2대 계대 배양재에 트립신(GibcoBRL)을 이용하여 수확하였으며 지지체당 2×10^5 세포/지지체 농도로 파종하였다. 지지체에 세포파종 후 7일간 배양 후 4주령된 balb-c/누드마우스 피하(Orient Animal, Korea)에 이식하고 1, 3주 후 지지체를 적출하여 실험하였다.

글리코사미노글라이칸(sGAG) 및 콜라겐 양 측정. DMMB(1,9-디메틸메틸렌 블루; Sigma-Aldrich) 분석을 사용하여 지지체 내의 sGAG 함량을 분석하였다. 지지체를 balb-c/누드마우스 피하에 이식 후 1, 3주 후에 회수된 지지체를 급랭시킨 후 5 mTorr, -80 °C의 조건에서 동결 건조하였다. 건조된 지지체에 파파인 용액(125 µg/mL Papain, 5 mM L-cystein, 100 mM Na_2HPO_4 , 5 mM EDTA, pH 6.8)을 500 µL 씩 넣어 60 °C 온도에서 16시간 동안 반응시킨 다음 50 µL 를 취해 200 µL DMMB 용액과 혼합하여 상온에서 20분 동안 천천히 교반한 후 96-well 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 리더(ELISA Plate Reader, E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐함량 분석도 동일하게 상기의 샘플에 파파인 용액으로 처리된 용액을 50 µL 취하여 120 °C 온도에서 20분 동안 오토클레이브(JEIO TECH, Korea)한다. 여기에 chloramine-T 용액을 450 µL 첨가하여 실온에서 25분 동안 천천히 교반하고 500 µL enrich's aldehyde 용액을 넣어 65 °C 온도에서 20분 동안 반응시킨 후 96-well 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 리더를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

압축강도 측정. PLGA, PLGA/피브린 지지체에 녹연골 세포를 파종시켜 누드마우스에 이식 후 1, 3주 후 지지체를 회수, 기계적 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(FTC, Sterling, Virginia, USA)를 이용하여 압축강도를 측정하였다. 이 때 만능물성측정기의 설정 값의 측정 거리는 2 mm, 측정 속도는 5 mm/min, 측정 힘은 1 N으로 하였다.

조직 염색 분석. 조직학적 평가를 위하여 제조된 PLGA, PLGA/피브린 지지체에 녹연골 세포를 파종하고 balb-c/누드마우스 피하에 주입된 1, 3주째에 회수하여 4% 포르말린(Sigma-Aldrich) 용액으로 고정하였다. 그 후 파라핀 조직처리를 하여 블록으로 제작한 후 4 µm의 두께로 잘라 슬라이드글라스에 고정하여 H&E 염색과 Safranin-O, 제 2형 콜라겐, Alcian Blue 염색을 실시하였다.

통계. 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

세포 증식률. *In vitro* 상에서 PLGA 지지체와 PLGA/피브린 지지체에서 녹연골 세포의 증식률을 확인하기 위해 MTT 를 분석하였다. 각각의 지지체에 녹연골 세포를 파종하고 1, 3 및 7일 후에 측정하였고, 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 1일차 결과를 통하여 PLGA 지지체보다 PLGA/피브린 지지체에서 세포의 초기 부착률이 우수함을 알 수 있었다. 또한 PLGA 지지체는 3일차 결과에서 증식을 확인하였고 7일차는 큰 변화가 없었다. 반면, PLGA/피브린 지지체는 지속적으로 증식하였음을 확인하였다. 이는 젤 형태를 가지고 있는 피브린이 지지체 내에 세포를 파종한 후 세포가 지지체 밖으로 빠져나가지 않도록 하며, 지지체 내에서 세포가 증식할 수 있는 환경을 제공했을 것이라고 사료된다.^{13,14}

세포 형태 관찰. 피브린 첨가에 따른 PLGA 지지체에서 녹연골 세포의 부착 양상을 확인하기 위해 지지체에 파종 후 3 일과 10일 후에 SEM으로 분석하였으며, 이를 Figure 2에 나

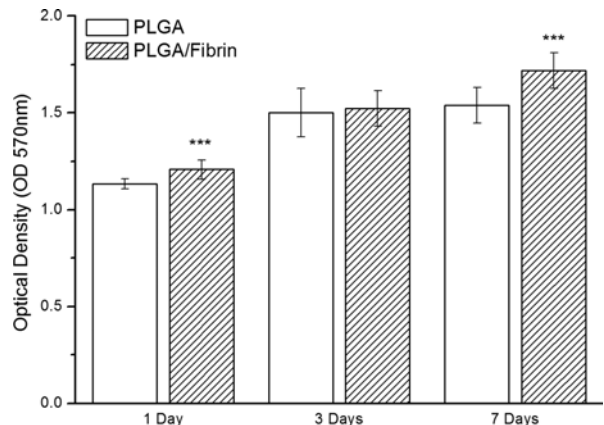


Figure 1. Measurement of cell proliferation activity of *in vitro* constructs (***)*p*<0.01, ***p*<0.05, **p*<0.5).

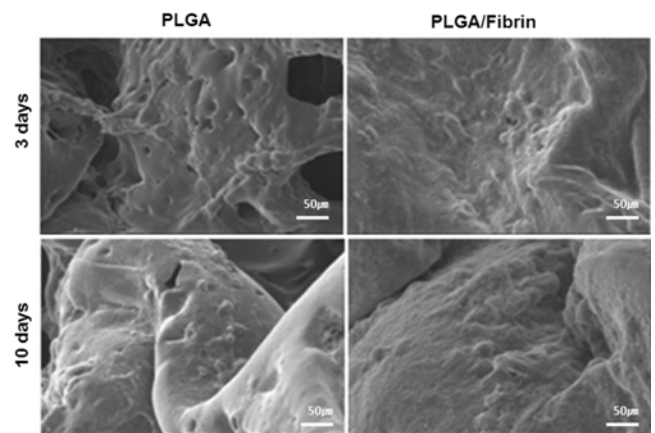


Figure 2. SEM micrographs of CCs after 3 and 10 days (magnification with $\times 1.0 \text{ K}$, scale bar = 50 µm).

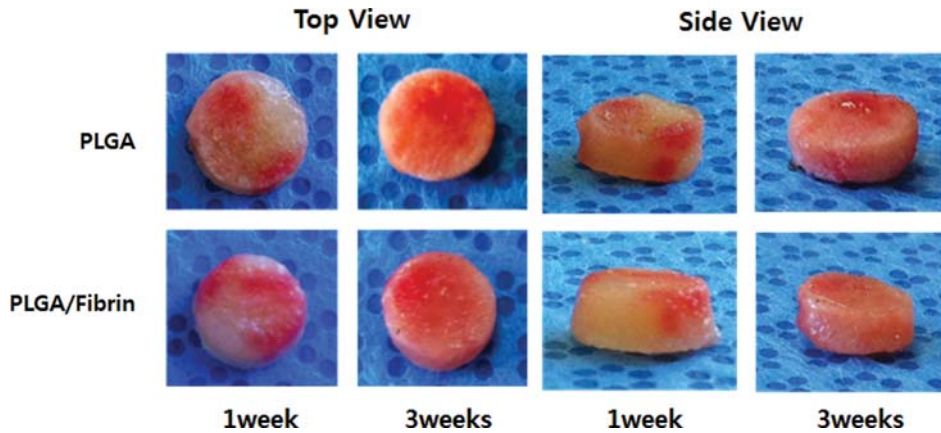


Figure 3. Gross morphology of PLGA and PLGA/fibrin scaffolds after *in vivo*.

타내었다. 그 결과 PLGA 지지체와 피브린이 함유된 PLGA 지지체의 표면이 다른 양상을 보임을 확인할 수 있었다. 또한 PLGA/피브린 지지체에서 세포가 많이 부착되어 있음을 확인할 수 있었다. 3일보다 10일에서 세포가 많이 관찰된 것으로 보아 세포가 증식되었다고 사료된다. PLGA/피브린 지지체의 특성은 PLGA 지지체보다 세포 배양시 조직세포가 성장하여 내부로 이행하는데 문제가 없을 것으로 예측되며, 세포부착 및 이식 부위의 재생조직과의 적합성을 보여주는데 충분할 수 있을 것으로 사료된다.¹⁵⁻²⁰

육안관찰. 늑연골 세포를 지지체에 파종시킨 후 *in vitro*에서 1주 동안 배양한 후 누드마우스 등 피하에 이식하고 1 및 3주 후에 적출한 육안사진을 Figure 3에 나타내었다. 그 결과 시간이 지남에 따라 PLGA 지지체와 PLGA/피브린 지지체의 크기가 감소되었지만 초기의 형태를 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 1주일 후보다 3주 후 지지체가 부드럽고 윤기있는 모폴로지를 띠었다. 이식 시간이 증가할수록 지지체와 이식부위의 조직과 좋은 생체적합성을 보임을 확인할 수 있었다. 이는 생분해성 고분자인 PLGA가 지지체 형태 유지

에 도움을 주고 세포외기질의 분비가 원활하게 일어났기 때문이라고 사료된다.²¹

압축강도 및 세포외기질 합성량. 누드마우스 피하에 이식한 지지체를 1주 및 3주 후에 적출하여 압축강도를 측정하였으며, 압축강도를 측정하기 위해 압축하중을 0.5, 1 N으로 달리하여 측정하였으며 1 N의 결과를 Figure 4에 나타내었다.²²

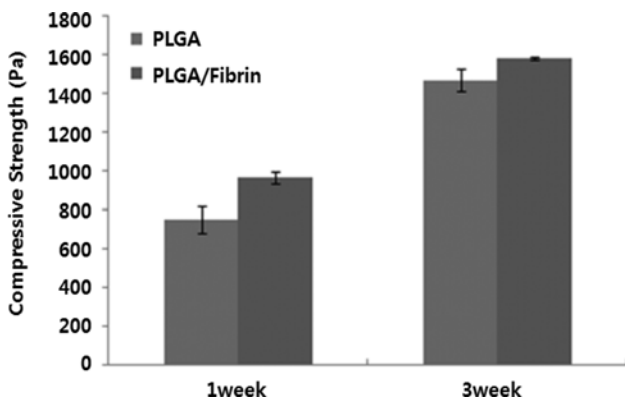


Figure 4. Compressive strength of PLGA and PLGA/fibrin scaffolds implants in nude mice after 1 week and 3 weeks (n=3, \pm SD).

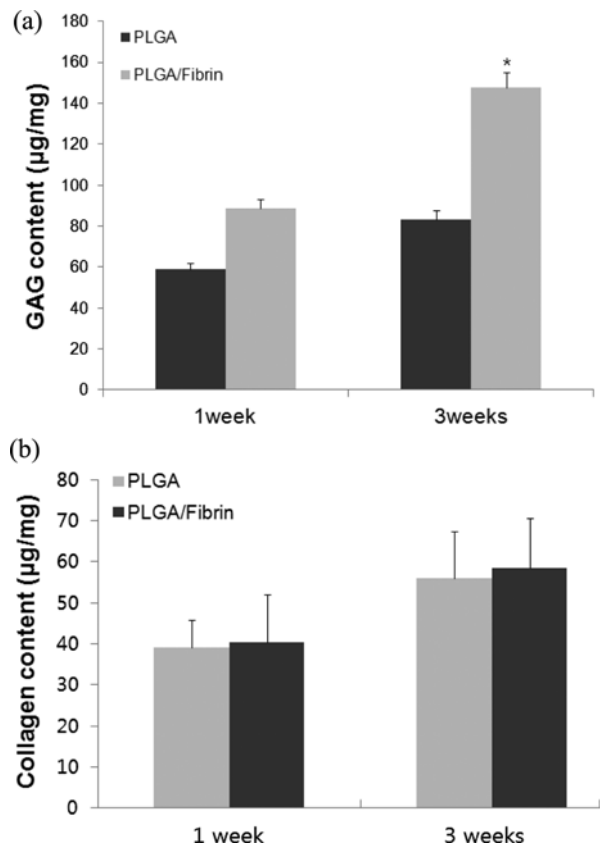


Figure 5. GAG and collagen contents of PLGA and PLGA/fibrin scaffold (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, * $p < 0.5$).

그 결과 PLGA보다 PLGA/피브린이 높은 압축강도를 보였으며, 시간이 지남에 따라 강도가 높아짐을 확인할 수 있는데, 이는 다공에서 세포와 세포간의 결합과 세포의 결합을 자극하여 세포외기질의 생산이 촉진되어 높은 압축강도를 나타내었을 것이라고 사료된다.

세포외기질과 압축강도와의 연관성을 분석하기 위하여 각 실험군의 sGAG와 콜라겐 합성량을 압축강도를 측정후 분석하였고, 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 그 결과 PLGA 지지체보다 PLGA/피브린 지지체에서 sGAG와 콜라겐의 함량이 높음을 확인하였다. 이것은 앞서 실험한 압축강도 결과와 같은 결과로서 지지체 내에 파종된 녹연골 세포의 sGAG 기질과 압축강도와의 연관성을 알 수 있게 해준다. 피브린을 함유한 지지체가 녹연골 증식에 적절한 환경을 제공해주고 지지체로서의 역할을 하는 것으로 사료된다. Figure 5(b)는 콜라겐 합성량을 분석한 결과이다. 녹연골 세포는 주로 제 2형 콜라겐을 분비한다. 1주보다 3주에 콜라겐 합성량이 많았으며 PLGA지지체와 PLGA/피브린 지지체에서 비슷한 합성량을 보였다. 이는 sGAG 합성량 결과와 유사한 결과를 보였다. 압축강도와 sGAG 및 콜라겐 합성량을 분석한 결과 피브린이 세포의 성장을 증가시키고 세포외기질을 효과적으로 분비함으로써 조직의 형태 및 높은 강도를 유지하도록 유도하였다.²³⁻²⁶ PLGA/피브린 지지체가 제공하는 3차원 배양 공간은 유기적으로 세포의 밀도 증가를 가져오게 하였고, 세포의 긴밀한 상호작용과 다공 안 세포외기질의 증식을 통해 지속적 세포 자극이 가능하였을 것이라고 사료된다.²⁷

면역조직학적 평가. PLGA 지지체와 PLGA/피브린 지지체에서 녹연골 세포의 모폴로지와 세포외기질 분포를 확인하기 위해 H&E, Safranin-O, 및 Alcian Blue 조직학적 염색을 이용하여 평가하고 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. Figure 6(a)는 H&E 염색 결과로써 핵과 세포질이 뚜렷하게 염색되었고 다공 안에 세포가 증식되었음을 확인할 수 있었다. 세포의 증식양상은 PLGA 지지체와 PLGA/피브린 지지체가 비슷하였다. sGAG의 생산을 확인하기 위한 Safranin-O 염색을 실시하였고 그 결과를 Figure 6(b)에 나타내었다. Safranin-O 염색은 세포외기질에서 수분을 함유하고 있는 GAG의 발현을 확인하는 염색법으로, 모든 지지체는 1주에서는 발현정도가 약했지만 3주에 조금 더 붉게 발현되어 GAG의 발현량이 증가한 것을 확인하였다. 따라서 3주 동안 지지체의 다공 안에서 세포와 세포, 지지체와 세포간의 상호작용으로 세포외기질 형성이 활발하였음을 확인하였다. 특히 피브린이 첨가된 PLGA 지지체에서 더 붉게 발현되었는데 이는 피브린이 지지체 내부로 흡입되면서 기계적 강도를 향상시키고, 세포와 지지체간의 통합을 유도해 세포외기질 형성에 긍정적인 효과를 주는 것으로 사료된다. Figure 6(c)는 연골세포가 분비하는 산성점액 물질을 확인하기 위한 Alcian Blue 염색 결과이다. 모든 지지체에서 발현을 확인하였으며 PLGA는 1 주

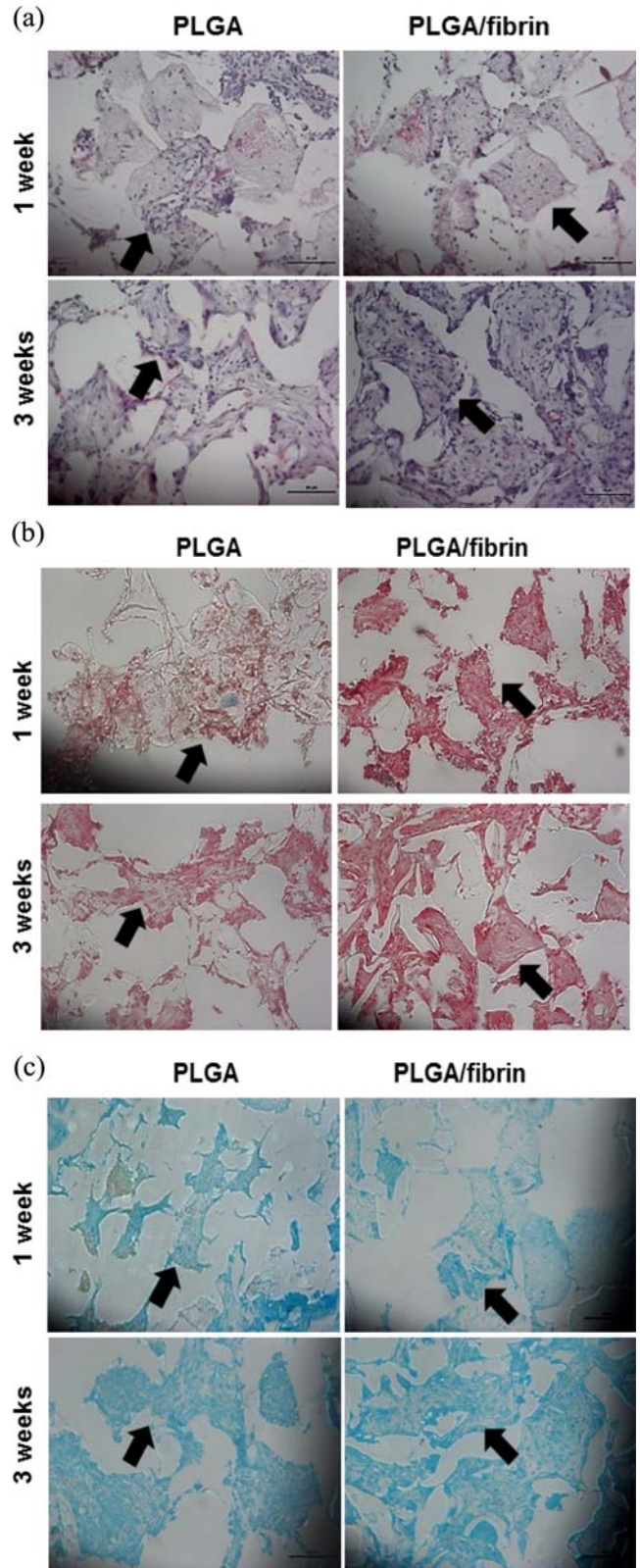


Figure 6. Histological evaluation of CCs constructs in (a) H&E; (b) Safranin-O; (c) Alcian Blue (magnification with $\times 200$, scale bar = 100 μm).

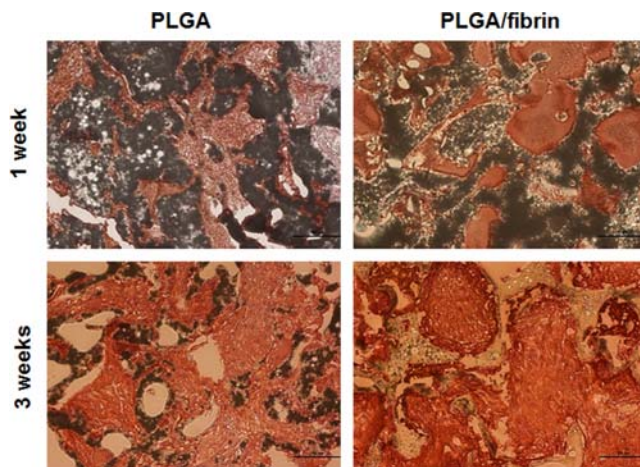


Figure 7. Photomicrographs from immunohistochemistry for type II collagen sectioning of nude mice subskin harvest site (magnification with $\times 200$, scale bar = 100 μm).

보다 3주 때 염색의 범위가 작아졌지만 PLGA/피브린 지지체는 3주 때 염색의 범위가 넓어졌다. H&E, Safranin-O, 및 Alcian Blue 염색 모두에서 PLGA 지지체보다 피브린이 첨가된 PLGA/피브린 지지체에서 다공 안에서의 연골세포의 활동이 활발함을 확인할 수 있었고 이는 세포외기질 발현량을 측정된 결과와 동일한 결과를 보였다.

늑연골 세포가 특이적으로 함유하고 있는 콜라겐을 확인하기 위해 제 2형 콜라겐 염색을 실시하였고 이를 Figure 7에 나타내었다. 그 결과 모든 샘플에서 면역 양성으로 검출되었다. 또한 지지체의 다공 사이에 빈틈없이 채워져 있는 것으로 보이며 PLGA 지지체보다는 PLGA/피브린 지지체가 염색의 발현이 뚜렷하고 1주보다 3주가 넓게 분포되었음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 세포외기질 발현과 일치하는 결과로 재확인할 수 있었다.²⁸

결 론

본 연구에서는 조직공학적 세포재생의 일환으로 늑연골 재생을 위한 기계적 성질과 세포의 활성이 우수한 다공크기를 선택하여 소수성 합성고분자인 PLGA에 피브린을 함유시킨 PLGA/피브린 하이브리드 지지체를 제작하였다. *In vitro* 상에서 세포의 부착양상과 증식률을 SEM과 MTT를 통해 확인한 결과 PLGA 지지체보다 피브린을 첨가한 PLGA/피브린 지지체에서 높은 증식률과 세포 형태를 관찰할 수 있었다. 이를 바탕으로 *in vivo* 상에서 실험을 진행한 후 압축강도, sGAG 및 콜라겐 함성량, 조직면역학적 염색을 통해 세포외기질을 확인하였다. H&E 염색을 통해 지지체의 다공 속에 세포들이 고루 분포되어 있음을 확인하였고, Alcian Blue를 통해 연골세포가 분비하는 산성 물질을 관찰하였다. sGAG와

콜라겐의 함성량을 측정된 결과 피브린이 함유된 PLGA 지지체가 단독의 PLGA 지지체보다 높은 함성량을 보였으며, 이는 Safranin-O와 제 2형 콜라겐 염색을 통해 다시 한 번 재확인하였다. 이와 같은 결과는 피브리노겐과 트롬빈으로 형성된 피브린이 늑연골 세포의 부착과 증식에 긍정적인 영향을 주어 적절한 세포외기질을 분비해 지지체의 형태를 유지해 주었을 것으로 사료된다. 이와 같은 결과를 통해 PLGA/피브린 지지체가 연골을 재생하기 위한 대체조직으로서 충분한 응용가능성을 확인하였다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지가족부(A040003) 및 WCU(R31-20029)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. T. Hardingham, S. Tew, and A. Murdoch, *Arthritis. Res.*, **3**, S63 (2002).
2. J. Lee, E. Lee, H. Y. Kim, and Y. Son, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **48**, 149 (2004).
3. S. J. Kim, H. H. Hong, S. H. Kim, H. L. Kim, S. H. Kim, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 63 (2010).
4. 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 (2007).
5. E. Shin, S. C. Yoo, B. J. Song, Y. K. Kim, H. J. Park, K. Y. Seong, Y. S. Song, D. Lee, and G. Khang, *Int. J. Tissue. Reg.*, **1**, 28 (2010).
6. G. Khang, S. J. Lee, and M. S. Kim, "Scaffold; tissue engineering", in *Weber's Biomedical Engineering Handbook*, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, Vol 1, p 336 (2006).
7. E. H. Jo, G. Y. Lee, S. J. Cho, H. Yoo, O. Y. Kim, K. Seong, Y. S. Kang, D. Lee, and G. Khang, *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.*, **23**, 119 (2011).
8. O. J. Lee, J. M. Lee, H. J. Jin, and C. H. Park, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 68 (2010).
9. H. N. Park, J. B. Lee, and I. K. Kwon, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 10 (2010).
10. D. Klose, C. Delplace, and J. Siepmann, *Int. J. Pharm.*, **404**, 75 (2011).
11. K. Fu, D. W. Pack, A. M. Klibanov, and R. Langer, *Pharm. Res.*, **17**, 100 (2000).
12. M. Sha'ban, S. J. Yoon, Y. K. Ko, H. J. Ha, S. H. Kim, J. W. So, R. B. H. Idrus, and G. Khang, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **19**, 1219 (2008).
13. F. Buyuklu, E. Hizal, Z. Yilmaz, F. I. Sahin, and O. Cakmak, *J. Craniomaxillofac. Surg.*, **39**, 225 (2011).
14. A. G. Lau, M. W. Kindig, and R. W. Kent, *Acta Biomaterialia*, **7**, 1202 (2011).
15. Y. Liu, X. Z. Shu, S. D. Gray, and G. D. Prestwich, *J. Biomed. Mater. Res.*, **68A**, 142 (2004).

16. H. S. Yoo, E. A. Lee, J. J. Yoon, and T. G. Park, *Biomaterials*, **26**, 1925 (2005).
17. H. J. Sung, C. Meredith, C. Johnson, and Z. S. Galis, *Biomaterials*, **25**, 5742 (2004).
18. W. Huang, X. Shi, L. Ren, C. Du, and Y. Wang, *Biomaterials*, **31**, 4285 (2010).
19. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
20. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, J. Y. Lim, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 505 (2007).
21. H. Lu, T. Hoshiba, N. Kawazoe, and G. Chen, *Biomaterials*, **32**, 2499 (2011).
22. Y. S. Song, H. N. Yoo, S. Eum, O. Y. Kim, S. C. Yoo, H. E. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 189 (2011).
23. H. Nogami and M. R. Urist, *J. Cell. Biol.*, **62**, 519 (1974).
24. W. Xia, W. Liu, L. Cui, Y. Liu, W. Zhong, D. Liu, J. Wu, K. Chua, and Y. Cao, *J. Bio. Mater. Res.*, **71B**, 380 (2004).
25. B. M. C. Gutiérrez, Z. Y. G. Carvajal, M. Jobbágy, F. Rubio, L. Yuste, F. Rojo, M. L. Ferrer, and F. Monte, *Adv. Funct. Mater.*, **17**, 3513 (2007).
26. S. H. Oh, S. G. Kang, and J. H. Lee, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **17**, 137 (2006).
27. W. L. Murphy, M. C. Peters, D. H. Kohn, and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **21**, 2521 (2000).
28. L. A. Solchaga, J. S. Temenoff, J. Gao, A. G. Mikos, A. I. Caplan, and V. M. Goldberg, *Osteoarthr. Cartil.*, **13**, 297 (2005).