

## 탈미네랄화된 골분/PLGA 지지체에서 늑연골 세포의 부착과 성장에 미치는 영향

조선아 · 송정은 · 김경희 · 고현아 · 이동원 · 권순용\* · 정진화\*<sup>†</sup> · 강길선<sup>†</sup>

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 나노공학과, \*가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과  
(2013년 5월 6일 접수, 2013년 6월 3일 수정, 2013년 6월 19일 채택)

## Effects of Demineralized Bone Particle Loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) Scaffolds on the Attachment and Proliferation of Costal Cartilage Cells

Sun Ah Cho, Jeong Eun Song, Kyoung Hee Kim, Hyun Ah Ko, Dongwon Lee,  
Soon Yong Kwon\*, Jin Wha Chung\*<sup>†</sup>, and Gilson Khang<sup>†</sup>

Dept. of BIN Fusion Tech., Polymer Fusion Res. Center & Dept. of Polymer Nano Sci. Tech., Chonbuk National Univ.,  
567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

\*Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,  
62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea

(Received May 6, 2013; Revised June 3, 2013; Accepted June 19, 2013)

**초록:** 늑연골세포는 초기 증식능력이 관절연골세포보다 우수하며, 또한 세포 채취에 용이하다는 장점이 있어, 관절연골의 대안으로 사용된다. FDA의 승인을 받은 합성고분자인 폴리락산-글리콜산 공중합체(PLGA)는 조직공학적인 생체재료로 사용되고 있으나, 세포 부착률이 낮고, 염증반응을 야기시킨다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 세포의 증식에 영향을 주며 염증반응이 감소된다고 보고된 탈미네랄골분(DBP)을 이용하여, 함량별 DBP/PLGA를 제조한 뒤, 세포를 파종하여 연구를 실시하였다. 세포의 부착 및 증식률을 측정하기 위하여 세포 파종 후 MTT와 SEM 분석을 수행하였으며, DBP가 세포의 기질 형성에 미치는 영향을 확인하고자 글리코사미노글라이칸(sGAG)과 콜라겐 함량을 측정하였다. 생체 내·외 환경에서 세포의 부착과 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 연구를 진행하여, PLGA 지지체보다 DBP/PLGA 지지체가 세포의 성장과 증식에 영향을 주는 것을 확인하였으며, DBP의 함량이 증가할수록 효과가 좋은 것으로 나타났다.

**Abstract:** It has been widely accepted that costal cartilage cells (CCs) have more excellent initial proliferation capacity than articular cartilage cells as well as the easiness for isolation and collection. This study demonstrated that CCs might be one of the substitutes for articular cartilage cells by tissue engineered cartilage. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) has been extensively tested and used as scaffold material but it was limited by the low attachment of cells and the induction of inflammatory cells. Base on previous our studies, we confirmed demineralized bone particle (DBP) had the power of the reduction of inflammatory reaction and the stimulation proliferation of cells. We fabricated PLGA scaffold loaded with 10, 20, 40 and 80 wt% DBP and then tested the possibility of the regeneration of cartilage using CCs. Assays of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and scanning electron microscope (SEM) carried out to evaluate the attachment and proliferation of CCs in DBP/PLGA scaffolds. Glycosaminoglycan (sGAG) and collagen contents assay were conducted to confirm the effects of DBP on formation of extracellular matrix. This study demonstrated that DBP/PLGA scaffolds showed significant positive effects on cell growth and proliferation due to the vitality of DBP as well as the possibility of the application of CCs for tissue engineered cartilage.

**Keywords:** demineralized bone particle, poly(lactic-co-glycolic acid), scaffold, costal cartilage, extracellular matrix.

### 서 론

연골은 연골기질과 연골세포로 구성되어있는 조직이며, 뼈와 함께 몸을 지지하는 조직이다. 연골을 형성하는 섬유질의

성질과 모양에 따라, 초자(hyaline cartilage), 탄성(elastic cartilage) 및 섬유 연골(fibrous cartilage)로 나누어진다.<sup>1,4</sup>

연골은 생체 내에서 기계적 압력이 가해져도 형태가 변화되지 않으며, 관절 연골의 경우 부드러운 표면과 탄력성을 가지고 있어, 충격을 흡수하고, 마모 및 탈구를 방지할 수 있게 한다. 그러나 연골에는 혈관, 신경, 림프관이 없어 노화, 외상, 운동 등의 손상을 받으면 세포를 공급받을 수 있는 경로

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: koreafoot@gmail.com; gskhang@chonbuk.ac.kr

가 제한적이게 된다. 따라서 연골은 한 번 손상되거나 퇴화되면 재생하기 어려워 초기에 재생시켜주지 않을 경우 손상된 연골이 기계적 압력에 의해 쉽게 부서지고 마모되며, 염증을 발생시켜 결손부위가 점차 증가된다. 그러므로 손상된 연골은 초기에 재생시켜주는 치료방법 개발이 매우 중요하다. 현재 연골이 손상되었을 경우 치료 방법에는 손상된 정도에 따라 여러 가지 방법이 있다. 대표적인 치료 방법에는 자가 연골세포이식술(*autologous chondrocytes implantation, ACI*), 골수의 줄기세포를 이용한 골수 자극술(*bone marrow stimulation technique*), 성체줄기세포와 배아줄기세포를 이용한 연골재생 치료법, 손상된 부위에 미세 구멍을 뚫어 골수 세포를 흘러나오게 하여 손상된 부위를 치료하게 하는 미세 골절술 등이 이용되고 있다.<sup>5,6</sup> 그러나 기존 연골 재생 방법은 재생된 조직이 초차 연골이 아닌 섬유 연골로 재생되거나 재생된 조직의 과다 성장, 주변조직과 물리적 특성이 달라 시간이 지나면 재생조직이 파괴되는 단점이 있다.<sup>7</sup>

따라서 이러한 문제점을 해결할 수 있는 세포원으로 늑연골 세포가 제시되고 있다. 늑연골 세포는 아주 적은 양의 세포를 채취하기 때문에 공여부의 손상이 매우 적으며, 관절연골세포보다 초기 분열능력이 우수하여, 많은 양의 세포를 얻을 수 있다. 또한 공여자의 나이가 많아도 손상되지 않고, 세포 채취에 용이하다는 장점이 있다. 또한, 늑연골 세포는 초자연골로 구성되어있어 관절연골의 잠재적인 대안으로 사용되고 있다.<sup>4,8-10</sup>

폴리글리콜라이드(PGA)와 폴리락타이드(PLA)의 공중합체인 PLGA는 FDA 승인을 받은 합성고분자로, 생분해성과 생체 적합성을 갖고 있으며, 조직공학 및 약물전달에 널리 이용되고 있다.<sup>11,12</sup> 그러나 낮은 세포 부착률과 분해산물의 산성으로 인하여 염증반응을 일으키므로, 전 연구에서 PLGA와 혼합시 염증반응 감소 효과를 입증한 탈미네랄화골분(DBP)을 PLGA에 첨가하였다.<sup>13-15</sup>

간류칼슘과 프로테오글리칸 등의 유기물질의 분해 성분, 콜라겐과 프로테오글리칸 등의 기질 및 골 형성 단백질(*bone morphogenetic protein, BMP*)로 구성된 DBP는 이식 시 조직과 반응 정도와 항원성이 낮아 동물에 이식했을 경우 유해한 숙주조직반응이 관찰되지 않았다고 보고되었고,<sup>16</sup> 세포의 분화 및 증식에 긍정적인 영향을 미치고, 염증반응을 감소시킨다고 보고되고 있다.<sup>17-19</sup>

본 연구에서는 함량별 DBP/PLGA 지지체를 제조하여 늑연골세포를 파종한 뒤, 생체 내·외 환경에서 세포의 부착 및 증식에 가장 적당한 DBP/PLGA의 함량을 확인하고, 연골 재생에 적용하고자 연구하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 평균분자량이 90 kg/mole인 PLGA(poly

(*lactic-co-glycolic acid*), Resomer® RG756, 락타이드 : 글리콜라이드 몰비=75:25, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)를 사용하였다. 다공성생물질로는 NaCl(염화나트륨, Orient Chem. Co., Korea)을 사용하였으며, 180~250  $\mu\text{m}$  크기의 입자를 사용하였다. 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였으며, 세포배양에 필요한 시약은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하여 사용하였다.

**DBP 제조 방법.** DBP는 소의 대퇴부를 사용하였으며 Urist 방법으로 제조하였다.<sup>20</sup> 대퇴부에 있는 근위골단부, 원위골단부, 골수, 골막, 및 연조직을 제거한 후 에탄올을 이용하여 세척하였다. 세척된 뼈는 분쇄하였으며, 메탄올과 클로로포름의 혼합용매에 1~2일 동안 담궈 지방을 제거시킨 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N HCl 용액으로 탈미네랄화시키고, PBS(인산완충용액)을 사용하여 pH 7.4로 조절한 뒤 동결건조시켰다. DBP는 동결분쇄(Freezer Mill, SPEX 6700, USA)하여, 입자는 체(sieve)에 걸러 180  $\mu\text{m}$  이하의 크기를 얻었다.

**DBP/PLGA 다공성 지지체 제조.** DBP/PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다. PLGA 1 g을 MC(메틸렌클로라이드, Tedia Co. Inc., USA) 4 mL에 용해시킨 후, PLGA 양의 0, 10, 20, 40, 및 80 wt%가 되도록 0, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 g의 DBP 분말을 첨가하였다. PLGA의 9배가 되도록 다공형생물질인 NaCl을 9 g 첨가하고, 직경 7 mm 및 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여, 24시간 동안 상온에서 60 kgf/cm<sup>2</sup>의 압력으로 가압하였다. 실리콘 몰드에서 지지체를 꺼내어 증류수에 담궈 주었으며, 6시간마다 증류수를 교체하여 염을 추출하였다. 이 과정을 48시간 동안 수행하였다. 5 mTorr, -80 °C 조건 하에서 24시간 동안 동결 건조하였다. 잔류 용매를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 25 °C 진공오븐에서 건조시킨 후, 70% 알코올에서 멸균하여 사용하였다.

**세포 배양.** 늑연골 세포는 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼 4주령으로부터 얻었다. 분리한 조직은 PBS로 2~3번 세척 후 기타 불필요한 조직을 제거하였다. 1~2 mm<sup>2</sup> 크기로 절단한 연골조직을 10% PS(페니실린/스트렙토마이신, Gibco BRL, USA, 100 units/mL)가 포함된 PBS로 세척하였다. 그 후 0.5 wt% 콜라게네이즈 A형(Roche, USA)용액에 넣어 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양한 용액을 70  $\mu\text{m}$  nylon mesh를 이용하여 여과한 후 세포를 75 cm<sup>2</sup> 플라스크에 분주하였다. 이 때, MEM-alpha(Gibco BRL)에 10% FBS(우태아혈청, Gibco BRL) 및 1% PS 그리고 1% ascorbic acid가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교체해 주었으며, 2계대째 사용하였다.

**세포 증식을 측정.** MTT(디메틸치아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma)분석법을 사용하여 세포 증식

를 측정하였다. 녹연골 세포를  $1 \times 10^5$  세포/지지체의 농도로 파종하고 상기의 배양액으로 정적 배양하였다. 배양 1, 3, 7 및 14일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100  $\mu$ L씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성된 지지체를 시험관에 옮겨 DMSO(디메틸설폭사이드, Sigma)용액을 1 mL씩 넣어 초음파 세척기로 1시간 동안 용해하였다. 그 후 96-well 플레이트에 시료를 각각 100  $\mu$ L씩 분주하여 ELISA 플레이트리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**세포부착 형태.** 제조된 지지체의 형태학적 특성과 녹연골 세포의 부착양상을 확인하기 위하여 SEM(전자주사현미경, Hitachi, S-2250N, Japan)으로 관찰하였다. 제조된 지지체에 녹연골 세포를  $1 \times 10^5$  세포/지지체의 농도로 파종하였다. 세포를 파종하여 7, 14일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5% 글루타알데하이드(Sigma)로 24시간 동안 고정시키고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수를 진행하였다. 시편을 폴더에 고정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금코팅을 하고 촬영하였다.<sup>21</sup>

**압축강도 측정.** PLGA 지지체와 함량별 DBP/PLGA 지지체에 녹연골 세포를 파종시켜 1, 3, 7 및 14일째에 지지체를 회수하였다. 만능물성측정기(FTC, Sterling, Virginia, USA)를 이용하여 기계적 강도를 측정하였다. 이 때 만능물성측정기의 설정 값의 측정거리는 2 mm, 측정 속도는 20 mm/min, 측정 힘은 0.5 N으로 하였다.

**글리코사미노글라이칸(sGAG) 및 콜라겐 양 측정.** sGAG 함량을 분석하기 위하여 DMMB(1,9-디메틸테틸렌 블루, Sigma)분석법을 사용하였다. 세포를 파종한 지지체를 7, 28일째 회수하여 급랭시킨 후 5 mTorr, -80 °C의 조건에서 동결 건조하였다. 건조된 지지체에 파파인 용액(125  $\mu$ g/mL Papain, 5 mM L-cystein, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, pH 6.8)을 1 mL씩 넣어 16시간 동안 60 °C에서 반응시켰다. 그 후 500  $\mu$ L를 취해 500  $\mu$ L DMMB 용액과 혼합하고 상온에서 20분 동안 천천히 교반한 후 96-well 플레이트에 100  $\mu$ L씩 분주하고 ELISA 플레이트리더를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐 함량 분석도 동일하게 샘플에 파파인 용액으로 처리된 용액을 250  $\mu$ L 취하여 105 °C에서 하루 동안 증탕하였다. 여기에 chloramine-T 용액을 450  $\mu$ L 첨가하여 실온에서 25분 동안 천천히 교반하고, Ehrlich's aldehyde 용액을 500  $\mu$ L 넣어 20분 동안 65 °C에서 반응시킨 후 96-well 플레이트에 100  $\mu$ L씩 분주하고 ELISA 리더를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>22</sup>

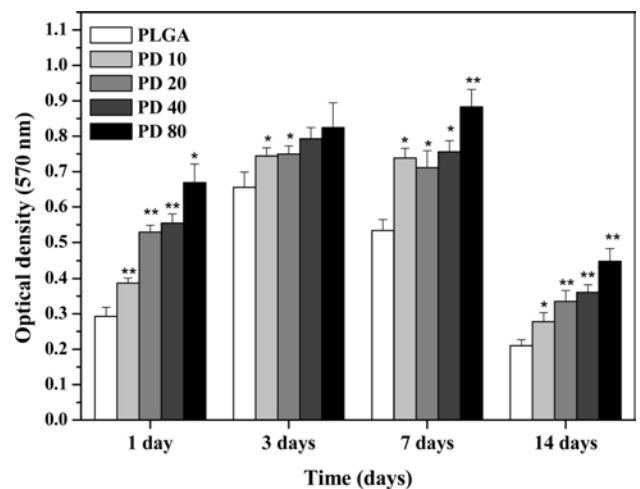
**조직염색분석.** 조직학적 평가를 위하여 제조된 PLGA, 함량별 DBP/PLGA 지지체에 녹연골 세포를 파종시켜 누드마우스에 이식한 후 7, 28일째에 회수하여 4% 포르말린(Sigma)으

로 고정하였다. 그 후 파라핀 조직처리를 하여 블록으로 제작한 후 4  $\mu$ m의 두께로 잘라 슬라이드에 고정하여 H&E, Safranin-O 및 Alcian blue 염색을 실시하였다.

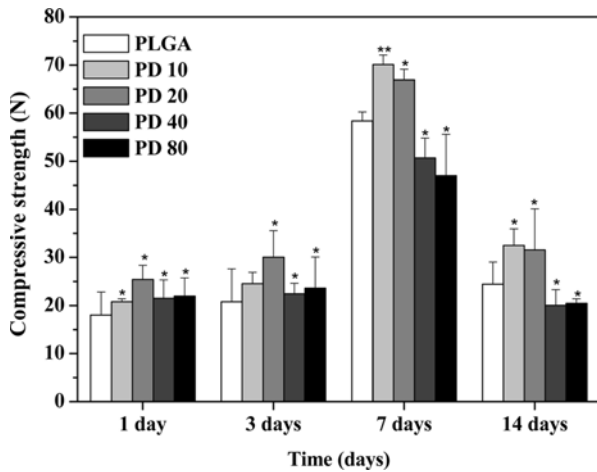
**통계.** 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

## 결과 및 토론

**PLGA 및 함량별 DBP/PLGA 지지체에서 세포 증식을 측정.** MTT 분석은 탈수소 효소 작용으로 인한 노란색 용해기질이 세포 속 미토콘드리아에 침투하여 적자색을 띠고 용해되지 않는 포마잔으로 환원시키는 능력을 이용한 방법으로 본 연구에서는 세포 증식을 측정하기 위하여 실시하였다. 함량별 DBP/PLGA 지지체가 녹연골세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 1, 3, 7 및 14일까지 관찰하였으며, 그 결과는 Figure 1에 나타내었다. PLGA 지지체에서 초기 부착률을 1일째 확인한 결과 0.29 nm의 값을 나타냈고, 3일째에서는 1일째보다 2배 이상의 증가를 확인하였다. 다음으로 높은 세포 부착률의 증가는 10 wt% DBP/PLGA 지지체에서 확인하였다. 반면, 20과 40 wt%의 DBP가 첨가된 지지체는 비슷한 증가율로 나타났으며, 80 wt% DBP/PLGA 지지체는 3일째에서 0.82 nm의 값으로 가장 높게 나타났다. 7일째에서는 80 wt% DBP/PLGA 지지체를 제외한 실험군에서는 3일째보다 세포증식률이 전체적으로 낮아지는 경향을 보였으며, 14일 후 모든 실험군의 세포 증식률이 급격히 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 녹연골세포의 증식이 잘 이루어져 지지체의 다공 속에 더 이상 증식할 공간이 부족하기 때문에 세포들이 사멸한 것으로 사료된다.<sup>23,24</sup> MTT 분석 결과, 실험 14일 동안 세포의



**Figure 1.** Viability of costal cartilage cells in DBP/PLGA scaffolds analyzed by MTT assay after 1, 3, 7 and 14 days *in vitro* (\*\**p* < 0.01, \**p* < 0.05).

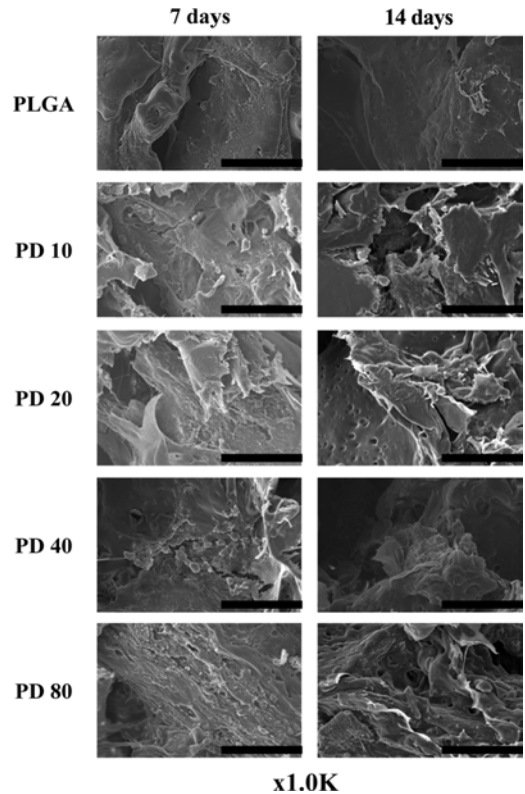


**Figure 2.** Compressive strength of DBP/PLGA scaffolds seeded costal cartilage cells after 1, 3, 7 and 14 days *in vitro* (\*\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.5$ ).

초기 부착과 생존율이 다른 군과 비교했을 때 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.

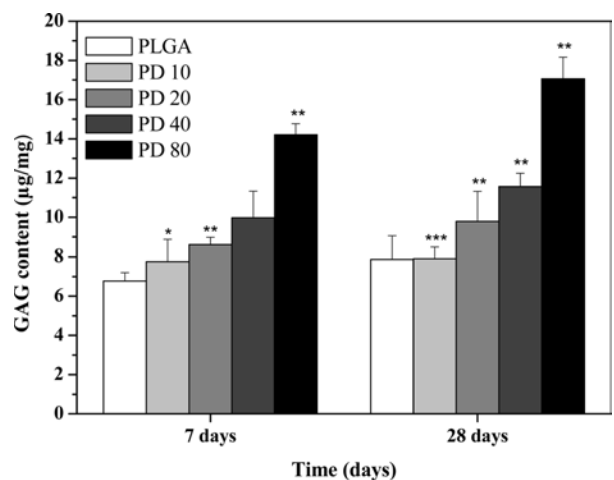
**지지체의 압축강도 측정.** 지지체를 조직공학용으로 사용하기 위해서는 기계적, 물리적인 특성을 가지고 있어야 한다.<sup>25,26</sup> 지지체 다공에서 세포의 기질화로 인한 물성 변화를 확인하기 위해 압축강도를 측정 한 결과를 Figure 2에 나타냈다. 함량별로 제조한 DBP/PLGA 지지체에 세포를 파종하여 배양시간에 따라 관찰한 결과 1일과 3일째에 비슷한 압축강도를 나타냈다. 그러나 3일에서 7일 동안 PLGA와 10 wt% DBP/PLGA 지지체의 경우 3배 이상, 20, 40 및 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서는 압축강도가 2배 정도 증가하였으며, 특히 10 wt% DBP/PLGA 지지체에서는 7일째 70.1 N으로 가장 높은 압축강도가 측정되었다. 이는 단위 면적당 PLGA의 함량이 많고, 세포 증식은 PLGA 지지체보다 DBP를 포함한 지지체에서 높으므로, 세포증식에 따른 세포의 기질이 다공 안에 형성되어 압축강도가 높게 나타난 것으로 사료된다. 그러나 14일째에 압축강도가 급감한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 MTT 결과와 같이 세포가 사멸하여 나타난 것으로 사료된다.

**SEM을 통한 세포 부착 관찰.** DBP 함량에 따른 지지체 표면에 늑연골 세포 부착과 증식의 영향을 확인하기 위해, 세포 파종 후 7, 14일째에 SEM 분석을 실시하였고, 이를 Figure 3에 나타내었다. 그 결과 PLGA 지지체와 DBP가 함유된 지지체에서 다른 양상으로 나타나는 것을 알 수 있었다. PLGA 지지체와 비교하였을 때 DBP가 첨가된 지지체의 표면에서 세포가 많이 부착되어있음을 확인할 수 있었으며, 7일보다 14일에서 세포가 많이 관찰된 것으로 보아 세포가 증식되었다고 사료된다. 늑연골 세포와 세포가 분비한 세포의 기질은 DBP의 함량이 증가할수록, 배양 시간이 길어짐에 따라 늑연골 세포와 세포가 분비한 세포의 기질의 양이 증가하는 것으로 사료된다.<sup>27,28</sup>



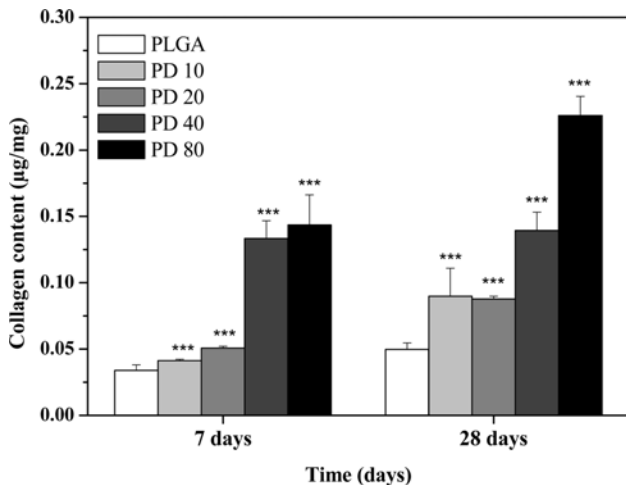
**Figure 3.** SEM microphotographs of costal cartilage cells morphology in DBP/PLGA surface depending on DBP contents (magnification with  $\times 1.0$  K, scale bar = 50  $\mu$ m).

**글리코사미노글라이칸(sGAG) 및 콜라겐 함량 분석.** 늑연골 세포를 파종한 함량별 DBP/PLGA 지지체에서 sGAG의 함량을 측정하기 위하여 7일과 28일째에 sGAG 분석을 수행한 결과는 Figure 4에 나타내었다. Figure 4에서 보여주는 것과 같이 7일째에 sGAG 함량이 80 wt% DBP/PLGA 지지체



**Figure 4.** GAG contents of PLGA and DBP/PLGA scaffolds *in vitro* (\*\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.5$ ).

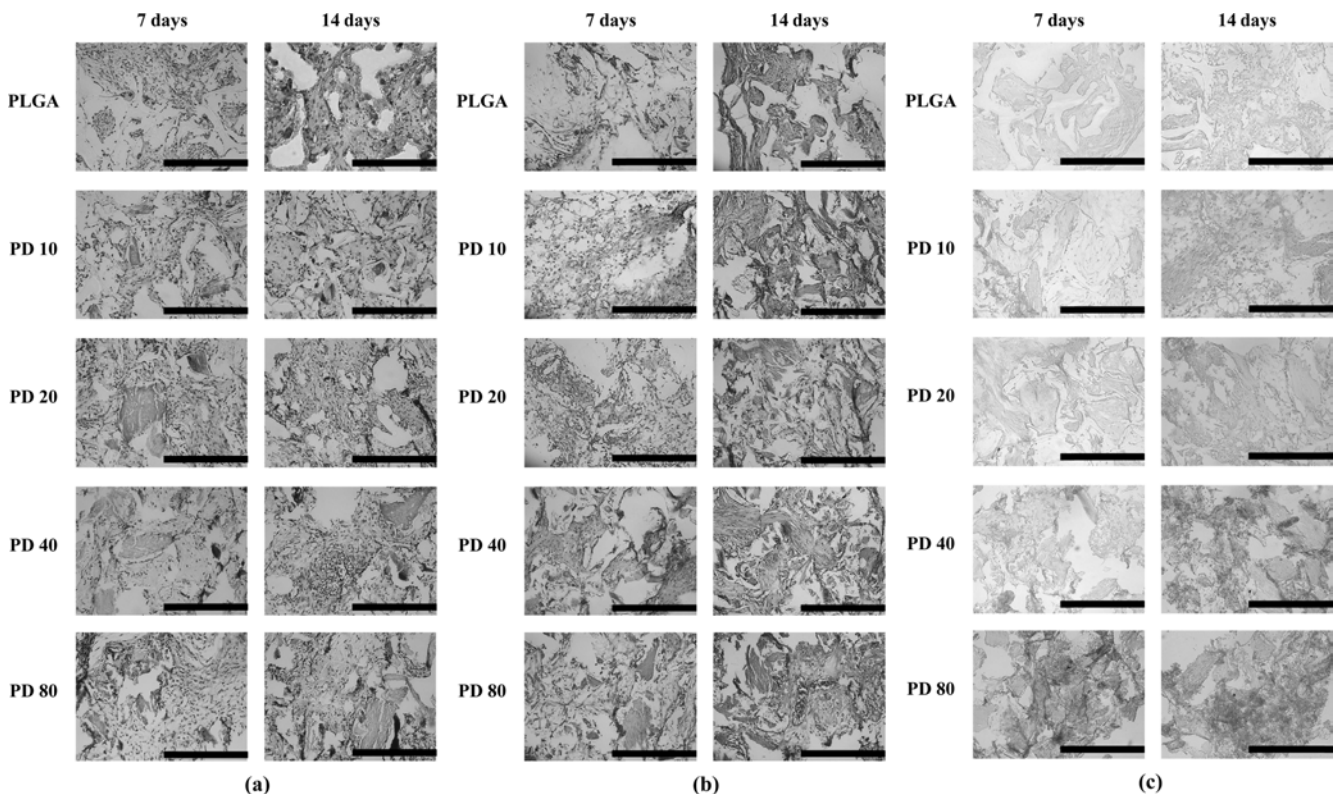
에서 가장 높게 나타났다. 28일째에서는 80 wt% DBP/PLGA 지지체를 제외한 실험군에서 7일째와 비교하였을 때 sGAG 함량이 비슷하게 나타난 반면, 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서는 1.2배 증가한 것으로 나타났다. 따라서 DBP가 함유된 지지체가 보다 나은 세포의 기질을 형성할 수 있을 것으로 사료된다. Figure 5에 나타낸 콜라겐 함량 측정 결과, 7일째



**Figure 5.** Collagen contents of PLGA and DBP/PLGA scaffolds *in vitro* (\*\* $p < 0.01$ ).

40, 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 콜라겐 함량이 가장 높게 나타났다. 28일째에서는 모든 실험군에서 콜라겐 함량이 증가한 것으로 나타났으며, 특히 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 1.5배 정도 증가하여 가장 높은 값을 보였으며, 이는 sGAG 분석과 유사한 결과로 나타났다. sGAG와 콜라겐 함량 분석 결과 DBP가 세포의 기질을 형성하는데 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.<sup>29</sup>

**조직염색평가.** 함량별 DBP/PLGA 지지체에서 늑연골 세포의 모폴로지와 세포의 기질 분포를 확인하기 위해 조직화학 염색을 수행하였다(Figure 6). 그 결과, 함량별로 DBP를 함유한 지지체에서 염색의 발현 정도가 서로 다른 것으로 나타났다. 핵과 세포질을 염색한 H&E염색 결과는 Figure 6(a)에 나타내었다. 7일에서 28일로 시간이 증가할수록 지지체의 다공 안에서 헤마톡실린으로 염색된 세포핵의 수가 PLGA 지지체보다 DBP가 함유된 지지체에서 증가하는 것을 관찰하였고, 특히 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 증식이 활발함을 알 수 있었다. 또한 28일째 에오신 발현이 증가한 것으로 조직화가 일어난 것을 확인하였다. sGAG 함량을 염색으로 확인하기 위해 Figure 6(b)와 같이 Safranin-O를 수행하였다. Safranin-O 염색 결과, DBP의 함량이 증가할수록 붉은색으로 염색되어 sGAG이 증가됨을 확인할 수 있었다. DBP의 함량이 증가할수록 늑연골 세포는 지지체의 다공 안에서 많은 세



**Figure 6.** Histological evaluation of costal cartilage cells constructs *in vivo* (a) H&E; (b) Safranin-O; (c) Alcian-blue (magnification with  $\times 200$ , scale bar = 300  $\mu\text{m}$ ).

포의 기질을 생성함을 확인할 수 있었으며, 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 두드러지게 높음을 확인하였다. 또한 시간이 지남에 따라 붉게 발현된 것으로 보아 지지체의 다공 안에서 세포간 상호작용이 활발히 일어난 것으로 사료된다. Alcian blue는 산성점액성 다당류를 검증하기 위해 사용되는 수용성 구리프탈로시아닌 유도체인 색소로 Safranin-O와 마찬가지로 sGAG을 확인할 때 사용하는 염색방법으로, Figure 6(c)에 나타났다. 모든 실험군에서 발현을 확인하였으며, 28 일 동안 모든 지지체에서 염색의 범위가 점차 넓어지는 것을 알 수 있었다. 조직화학 염색을 통하여 PLGA 지지체보다 DBP/PLGA 지지체에서 늑연골 세포의 활동이 활발하게 일어나는 것을 확인할 수 있었으며, 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 발현 정도가 가장 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.<sup>30,31</sup>

## 결 론

본 연구에서는 PLGA와 DBP를 사용하여 지지체를 제조한 뒤, 늑연골 세포를 과중하여 *in vitro* 상에서 세포의 증식과 부착에 미치는 영향을 MTT와 SEM을 통하여 분석하였고, sGAG와 콜라겐 함량 분석을 통해 세포의 기질 분비를 확인하였다. 그 결과, DBP 함량이 증가할수록 늑연골 세포의 증식률과 부착이 높아지고, 기질 형성 역시 증가됨을 관찰하였으며, 특히 80 wt% DBP/PLGA 지지체에서 우수한 것을 확인하였다. 또한 *in vivo* 환경에서 세포의 기질 분비량을 확인하기 위해 염색을 실시하였다. H&E 염색분석결과 시간이 지남에 따라, DBP함량이 증가할수록 지지체의 다공 안에 세포가 증식됨을 확인하였고, alcian blue 염색을 통하여 늑연골 세포에서 분비되는 산성물질을 관찰하였다. 또한 Safranin-O를 통하여 글리코사아미노글라이칸이 증가되는 것을 확인하였다. 이는 앞서 *in vitro* 환경에서 sGAG 함량 분석과 동일한 결과이다. 이러한 결과는 DBP가 PLGA의 소수성 성질을 보완하고, 세포의 부착, 증식에 긍정적인 영향을 제공하는 것으로 사료된다. 결과적으로 DBP/PLGA 지지체가 연골 재생을 위한 조직공학용 재료로 사용되는데 적합하다고 사료된다.

**감사의 글:** 본 연구는 MBC(A040003), 농림수산식품부(112007-05-1-SB010) 및 교육과학기술부(2012M3A9C6050204) 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. B. Kurz, C. Domm, M. Jin, R. Sellckau, and M. Schunke, *Tissue Eng.*, **10**, 1277 (2004).
2. N. Isogai, H. Kusuvara, Y. Ikada, H. Ohtani, R. Jacquet, J. Hillyer, E. Lowder, and W. J. Landis, *Tissue Eng.*, **12**, 691 (2006).
3. M. J. Stoddart, S. Grad, D. Eglin, and M. Alini, *Regen. Med.*, **4**, 81 (2009).
4. J. Lee, E. Lee, H. Y. Kim, and Y. Son, *Biotechnol. Appl. Bioc.*, **48**, 149 (2007).
5. P. Szeparowicz, J. Popko, B. Sawicki, and S. Wolczynski, *Folia Histochem. Cyto.*, **44**, 201 (2006).
6. M. Sittering, J. Bujia, W. W. Minuth, C. Hammer, and G. R. Burmester, *Biomaterials*, **15**, 451 (1994).
7. G. Schulze-Tanzil, *Ann. Anat.*, **191**, 325 (2009).
8. J. W. Dai, J. Wang, J. T. Lu, D. H. Zou, H. Sun, Y. F. Dong, H. B. Yu, L. Zhang, T. Yang, X. L. Zhang, X. D. Wang, and G. F. Shen, *Biomaterials*, **33**, 7699 (2012).
9. S. M. Lien, L. Y. Ko, and T. J. Huang, *Acta Biomater.*, **5**, 670 (2009).
10. W. S. Toh, E. H. Lee, and T. Cao, *Stem Cell Rev. Rep.*, **7**, 544 (2011).
11. R. P. F. Lanao, S. C. G. Leeuwenburgh, J. G. C. Wolke, and J. A. Jansen, *Acta Biomater.*, **7**, 3459 (2011).
12. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C.-H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
13. Y. Takashima, R. Saito, A. Nakajima, M. Oda, A. Kimura, T. Kanazawa, and H. Okada, *Int. J. Pharm.*, **343**, 262 (2007).
14. K. Uematsu, K. Hattori, Y. Ishimoto, J. Yamauchi, T. Habata, Y. Takakura, H. Ohgushi, T. Fukuchi, and M. Sato, *Biomaterials*, **26**, 4273 (2005).
15. S. C. Ji, J. S. Lee, D. H. Kim, C. H. Kang, J. H. Park, and B. J. Lee, *Polymer(Korea)*, **34**, 159 (2010).
16. E. S. Place, N. D. Evans, and M. M. Stevens, *Nat. Mater.*, **8**, 457 (2009).
17. S. J. Yoon, S. H. Kim, H. J. Ha, Y. K. Ko, J. W. So, M. S. Kim, Y. I. Yang, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Part A*, **14**, 539 (2008).
18. D. H. Yang, H. N. Park, J. B. Lee, D. N. Heo, M. S. Bae, and I. K. Kwon, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 119 (2011).
19. P. Supronowicz, E. Gill, A. Trujillo, T. Thula, R. Zhukauskas, T. Ramos, and R. R. Cobb, *Tissue Eng. Part A*, **17**, 789 (2011).
20. W. S. Pietrzak, S. N. Ali, D. Chitturi, M. Jacob, and J. E. Woodell-May, *Cell Tissue Bank.*, **12**, 81 (2011).
21. A. Y. Oh, S. H. Kim, S. J. Lee, J. J. Yoo, M. van Dyke, J. M. Rhee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **32**, 403 (2008).
22. E. M. Roos and L. Dahlberg, *Arthritis Rheum.-US*, **52**, 3507 (2005).
23. H. L. Kim, S. J. Kim, H. Yoo, M. Hong, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 81 (2010).
24. J. A. Cooper, H. H. Lu, F. K. Ko, J. W. Freeman, and C. T. Laurencin, *Biomaterials*, **26**, 1523 (2005).
25. B. B. Mandal and S. C. Kundu, *Biomaterials*, **30**, 2956 (2009).
26. J. Stojkowska, B. Bugarski, and B. Obradovic, *J. Mater. Sci.-Mater. M.*, **21**, 2869 (2010).
27. B. C. Cho and S. H. Lee, *Plast. Reconstr. Surg.*, **117**, 936 (2006).
28. H. J. Sung, J. Su, J. D. Berglund, B. V. Russ, J. C. Meredith, and Z. S. Galis, *Biomaterials*, **26**, 4557 (2005).
29. W. Y. Ahn, H. L. Kim, J. E. Song, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 499 (2011).
30. C. K. Hagandora, M. A. Tudares, and A. J. Almarza, *Ann. Biomed. Eng.*, **40**, 688 (2012).
31. L. Wang, M. Lazebnik, and M. S. Detamore, *Osteoarthr. Cartilage*, **17**, 346 (2009).