

## *In vivo* 상에서 탈미네랄화된 골분이 함유된 PLGA 지지체를 이용한 추간판 디스크 재생

장지은 · 김혜윤 · 송정은 · 이동원 · 권순용\* · 정진화\*<sup>†</sup> · 강길선<sup>†</sup>

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, \*가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과  
(2013년 5월 6일 접수, 2013년 6월 3일 수정, 2013년 6월 12일 채택)

### Regeneration of Intervertebral Disc Using Poly(lactic-co-glycolic acid) Scaffolds Included Demineralized Bone Particle *In Vivo*

Ji Eun Jang, Hye Yoon Kim, Jeong Eun Song, 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 PolymerNano 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 12, 2013)

**초록:** 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particle, DBP)은 연골 형성의 유도인자로 사용되기 때문에 조직공학에서 널리 사용되는 생체재료이다. 본 연구에서는 *in vivo* 환경에서 디스크 재생 효과를 연구하기 위해 DBP를 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)에 첨가하여 다공성 지지체를 제조하였다. 디스크의 섬유륜 조직을 반으로 절개한 후, 수핵 조직을 제거하여 디스크 결손을 유발시켰다. 빈 공간에 PLGA, DBP/PLGA 지지체를 이식하여 *in vivo* 환경에서 조직공학적 디스크 재생을 관찰하였다. 1, 2 및 3개월 후 디스크를 적출하여 글리코사미노글라이칸(glycosaminoglycan, sGAG) 및 콜라겐 합성 정도를 측정하였으며 조직학적 평가로 H&E, Safranin-O, Alcian blue 염색과 면역조직학적 평가로 제 I형 콜라겐, 제 II형 콜라겐 염색을 수행하였다. 그 결과 DBP/PLGA 지지체에서 sGAG 및 콜라겐 함량이 높은 것을 확인하였으며 추간판 디스크 재생의 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** Demineralized bone particle (DBP) is a biomaterial used widely in the field of tissue engineering. In this study, in order to study the effect of DBP/poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffold on disc regeneration *in vivo* environment, we prepared the porous DBP/PLGA hybrid scaffold. Disc defect was induced by removing the nucleus pulposus tissue after incision the annulus fibrosus tissue in half and scaffolds were transplanted. After 1, 2 and 3 months later, the extracted discs were confirmed by collagen synthesis and glycosaminoglycan (sGAG). We conducted histology (H&E, Safranin-O, Alcian blue, Type I Collagen, Type II Collagen). From the results, it was confirmed that collagen and sGAG content were high in DBP/PLGA scaffold, and the regeneration of intervertebral disc was possible.

**Keywords:** demineralized bone particle, poly(lactic-co-glycolic acid), scaffold, disc regeneration.

## 서 론

추간판 디스크(intervertebral disc, IVD)는 중심에 위치하는 수핵(nucleus pulposus, NP)과 그 주변을 감싸고 있는 섬유륜(annulus fibrosus, AF)으로 되어 있다.<sup>1-3</sup> 수핵은 몸의 유연성과 균형을 유지해주는 중요한 부위이며 반유체 상태의 하이드로젤과 유사하여 높은 수분함량을 가지고 있으며 추간판

디스크에 걸리는 하중을 견디는 역할을 한다.<sup>4,5</sup> 섬유륜은 대부분 제 I형 콜라겐으로 존재하고 라멜라 구조를 가지고 있으며 인장강도를 제공해 줌으로써 척추 뼈의 충격을 흡수해주는 역할을 한다.<sup>6,7</sup>

추간판 디스크는 현대인에게 빈번히 발생하는 질환이며 노화로 인해 퇴화가 되는 것이 일반적인 과정이다. 디스크 퇴화는 방사성 파열, 디스크 탈출증, 골단판 손상, 섬유륜 또는 수핵이 무너지거나 디스크가 축소되는 등 구조적인 결함이 함께 동반된다. 또한 유전적인 요인, 비만, 흡연, 생체 역학적 하중과 활동, 당뇨병을 포함한 여러 요인으로 디스크 퇴화가

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

일어날 수 있다. 디스크 퇴화에 주요 특징은 수핵의 탈수가 일어나며 프로테오글리칸의 양이 감소되고 세포표현형이 변한다.<sup>8-11</sup> 최근 체외에서 섬유륜과 수핵의 재생 목적을 위하여 디스크 세포를 알지네이트 비드와 젤,<sup>12,13</sup> 소장점막하조직 (small intestinal submucosa, SIS),<sup>14</sup> 탈미네랄화된 골분 (deminerallized bone particle, DBP)<sup>15</sup> 등의 3차원 지지체에서 배양한 연구가 보고되고 있다.

생체조직공학은 생체 내에서 흡수, 분해되며 세포와 친화력을 가지는 생체재료 지지체를 생체 내에 이식함으로써 인공 장기 및 새로운 조직을 재생, 대체하고 적절한 생화학적 요소를 결합하여 정상적인 기능을 유도하는 것이다.<sup>16,17</sup> 조직공학에 사용되는 생체재료 지지체는 체내 이식 시 충분한 기계적 강도를 가지고 다공을 통한 영양 공급과 세포 물질의 순환, 지지체 내로의 세포 이동을 촉진시켜 새로운 조직형성에 도움을 준다.<sup>18</sup>

폴리글리콜라이드(polyglycolide, PGA), 폴리락타이드(poly lactide, PLA), 락타이드 글리콜라이드 공중합체(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)는 현재 합성고분자로서 생체재료에 널리 사용되고 있으며 생체 적합성과 생분해성이 잘 이루어지는 특성과 뛰어난 가공성으로 인해 생체조직공학 지지체와 약물전달체계로 응용되고 있다.<sup>19,20</sup> 그러나 PLGA는 소수성 성질로 이루어져 있어 초기의 세포부착이 어렵고 생체에 적합하지 않으며 가수분해 과정 중 생성되는 분해산물로 인하여 염증과 세포 독성을 일으켜 세포증식률을 감소시키는 단점을 가지고 있다.<sup>21,22</sup> 이러한 단점을 보완하고자 천연 유래 고분자 재료 중의 하나인 DBP를 사용하였다. DBP는 잔류갈슘과 프로테오글리칸 등의 유기물질로 분류할 수 있으며 콜라겐과 프로테오글리칸의 기질 및 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)로 구성된다. 또한 탈회과정을 통하여 바이러스 활성이 떨어지고 골 표면의 항원을 파괴하여 생체 내 이식 시 유해한 숙주 조직반응이 관찰되지 않는다고 보고된 바 있다.<sup>23-25</sup>

이러한 사실을 바탕으로 전 연구에서는 DBP를 이용하여 지지체를 제조하였다.<sup>15,18,26</sup> 또한 세포 성장에 좋은 조건을 파악하였으며 DBP가 디스크 세포 성장에 긍정적인 영향을 주는 것을 확인하였다.<sup>27,28</sup> 본 연구에서는 추간관 디스크의 형상과 유사하게 지지체를 제조하였고 이전 연구를 통하여 DBP의 함량을 20 wt%로 정하였으며<sup>29</sup> 토끼의 손상된 추간관 디스크에 PLGA, DBP/PLGA 지지체를 이식하여 재생 여부를 알기 위하여 글리코사미노글라이칸(glycosaminoglycan, sGAG)과 콜라겐의 함량과 조직학적 분석을 실시하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 생분해성 고분자인 PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비, 75/25, Resomer® RG 756S, Boehringer Ingelheim

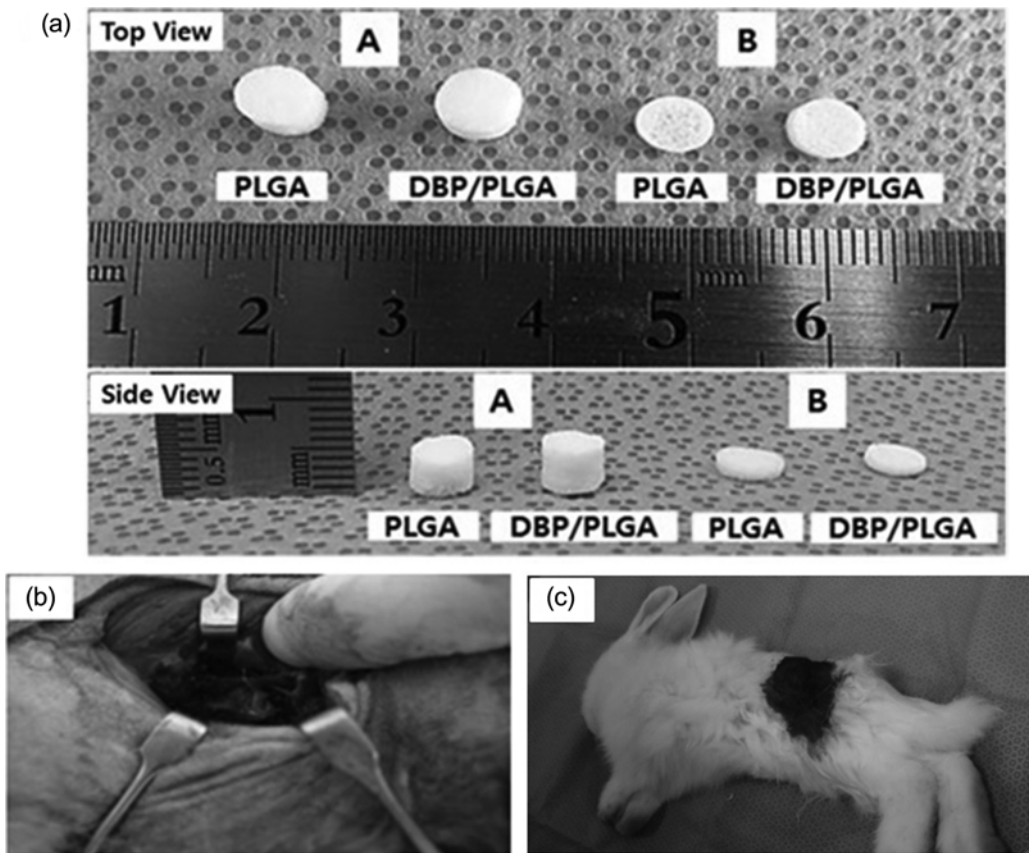
Chem, Germany)는 분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 다공 형성을 위해 사용한 염화나트륨의 크기는 180-250  $\mu\text{m}$ 로 사용하였다. 또한 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co In, Phillipsburg, USA)와 같은 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

**DBP 제조.** 소 대퇴부 또는 정강이 부분을 구입하여 연골 부분을 절단하고 곧은 부분을 세로로 절단한 뒤 잘게 잘랐다. 뼈를 세척하고 클로로포름과 메탄올의 혼합용액으로 지방제거를 하고 아세톤에 담근 뒤 후드아래에서 건조하였다. 건조된 뼈를 탈미네랄화시키기 위하여 0.5 N HCl 용액을 사용하였다. 탈회 후 PBS 1X로 세척을 하고 pH 7.4로 맞춘 뒤 -80 °C에서 동결 건조한 후 동결분쇄(SPEX 6700, USA)하였다.<sup>30</sup>

**DBP/PLGA 지지체의 제조.** DBP/PLGA 지지체는 용매캐스팅/염 추출법으로 제조하였다. 먼저 1 g의 PLGA를 4 mL의 MC에 용해한 후, PLGA양의 20 wt%가 되도록 0.2 g의 DBP를 첨가하였다. 여기에 다공을 형성하기 위하여 NaCl을 PLGA 무게의 10배인 10 g을 첨가하여 이들을 균일하게 혼합하였다. 용해된 혼합물을 직경 5 mm, 두께 3 mm의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm<sup>2</sup>의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 염의 추출은 3차 증류수를 6시간 마다 교체하여 48시간 동안 수행하였고 5 m Torr, -80 °C 조건에서 24시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위해서 최소 1주일 이상 4 °C 상태의 진공 건조기에 보관하여 사용하였다. 제조한 PLGA, DBP/PLGA 지지체의 형태는 Figure 1(a)에 나타내었다.

**디스크 손상 모델 제작.** 생후 6주된 뉴질랜드 화이트 토끼를 Domitor와 Zoletile를 1:2로 혼합한 마취제를 4 cc 주입하여 마취시켰다. 마취시킨 뒤 측면으로 눕힌 후 L5-7 디스크 중 한 부분의 디스크의 섬유륜 조직부분을 반으로 절개한 후, 수핵 조직을 제거하여, 디스크 결손 부위를 유발시켰으며 이는 Figure 1(b), (c)에 나타내었다. 두께가 3 mm, 직경 5 mm인 둥근 기둥 모양의 지지체는 수평으로 약 1-2 mm 정도로 잘라 디스크 결손 부위에 이식하였다. 그룹은 수술을 하지 않은 군(control), 그 빈 공간에 지지체를 이식하지 않은 군(blank), PLGA 지지체를 이식한 군(PLGA), DBP/PLGA 지지체를 이식한 군(DBP/PLGA)으로 나누었다.

**글리코사미노글라이칸 (sGAG) 및 콜라겐 함량 분석.** sGAG의 함성 정도를 확인하기 위하여 지지체 이식 후 1, 2, 3개월 후에 수술 부위의 섬유륜과 수핵의 조직을 채취한 뒤 동결 건조한 후 파파인용액(papain 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma), L-cystein 5 mM(Sigma), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM(Fisher Scie. Ltd), EDTA 5 mM(Duksan Pharma Co., Ltd)을 300  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 60 °C에서 16시간 동안 반응시킨 후 DMMB(1,9-dimethylmethylene blue) 분석을 이용하여 sGAG 농도를 분석하였다. 파



**Figure 1.** (a) Macroscopic images of prepared PLGA and DBP/PLGA scaffolds (A type is uncut scaffold, B type is cut scaffold for surgery). upper image shows the top view of fabricated scaffolds and bottom image shows the side view of them; (b) defected disc image before implantation; (c) appearance of rabbit after surgery.

파인용액에서 반응시킨 각각의 샘플을 50  $\mu$ L에 DMMB 용액 200  $\mu$ L을 첨가하고 상온에서 20분간 교반시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 sGAG 농도는 동결건조시킨 각각 샘플의 무게로 정상화하였다. 콜라겐 함량은 상기의 샘플에 파파인 용액으로 처리된 용액을 6N의 HCl을 가하여 24시간 동안 120  $^{\circ}$ C에서 가수분해한 뒤 50  $\mu$ L를 취한다. 여기에 chloramine-T 용액을 450  $\mu$ L 첨가하여 실온에서 25분 동안 천천히 교반하고 500  $\mu$ L enrich's aldehyde 용액을 넣어 65  $^{\circ}$ C 온도에서 20분 동안 반응시킨 후 96 웰 플레이트에 100  $\mu$ L씩 분주하고 ELISA 리더를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**조직학적 분석.** 수술한지 1, 2 및 3개월이 지난 후에 지지체가 삽입된 디스크 부분을 채취하여, 10% 포르말린에 2일 동안 고정하였다. 고정된 디스크 조직을 탈회시키기 위하여 포름산, 포르말린, 증류수를 혼합한 용액에 2일 동안 디스크 조직을 탈회시켰다. 탈회된 디스크 조직을 70, 80, 90 그리고 100%에 담가두어 탈수를 한 뒤 조직 처리하여 파라핀으로 블록을 제작한 뒤 5  $\mu$ m의 두께로 잘라 슬라이드글라스에 고정하였다. Hematoxylin & Eosin(H&E), Safranin-O, Alcian

blue, 제 I형 콜라겐, 제 II형 콜라겐 염색을 실시하였으며 현미경 사진(Nikon TE-2000, Japan)은 100배에서 촬영하였다.

**통계적 분석.** 각 실험군 들의 평균값과 표준편차를 확인하였으며, 통계학적인 분석은 Student's t-test를 수행하였다.

### 결과 및 토론

**DBP/PLGA 지지체 제작.** PLGA, DBP/PLGA 지지체를 제조하고자 용매 캐스팅/염 추출법으로 다공성 지지체를 제조하였고 완성된 지지체의 모습은 Figure 1(a)에 나타내었다. 두께가 3 mm, 직경 5 mm인 원기둥 형태의 다공성 지지체를 얻을 수 있다. DBP와 혼합하여 제조한 지지체의 물성은 크게 변화하지 않았으며 원하는 형태의 다공성 지지체를 제조할 수 있었다.<sup>15</sup> 또한 제조한 PLGA, DBP/PLGA 지지체는 수평으로 1 mm 높이로 잘라, 토끼 디스크를 1~2 mm 정도 결손한 뒤 준비한 지지체를 이식하였으며 Figure 1(b), (C)에 나타내었다.

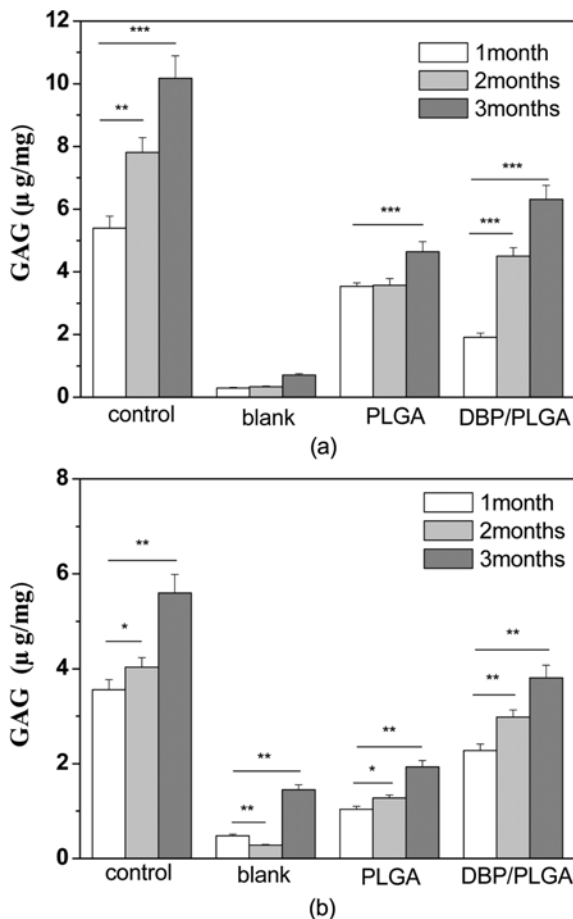
**sGAG 및 콜라겐 측정.** 디스크 퇴화의 주된 특징은 sGAG와 콜라겐 합성이 감소되는 것이다.<sup>31</sup> 디스크의 섬유륜과 수

핵의 재생 여부를 알아보기 위하여 sGAG와 콜라겐의 합성량을 측정하였다. Control군, blank군, PLGA군, DBP/PLGA군으로 토끼 디스크의 섬유륜과 수핵을 채취하여 sGAG와 콜라겐의 합성량을 분석하였고 Figures 2 및 3에 나타내었다. 측정 결과 Figure 2에서 볼 수 있듯이 섬유륜의 경우 blank군에서 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후  $0.29\pm 0.37$ ,  $0.33\pm 0.46$ ,  $0.70\pm 0.71$ 의 합성량이 측정되었고 시간이 지날수록 디스크의 재생이 미미하게 일어났지만 크게 증가되지 않은 것으로 보아 디스크가 거의 퇴화된 것으로 사료된다.

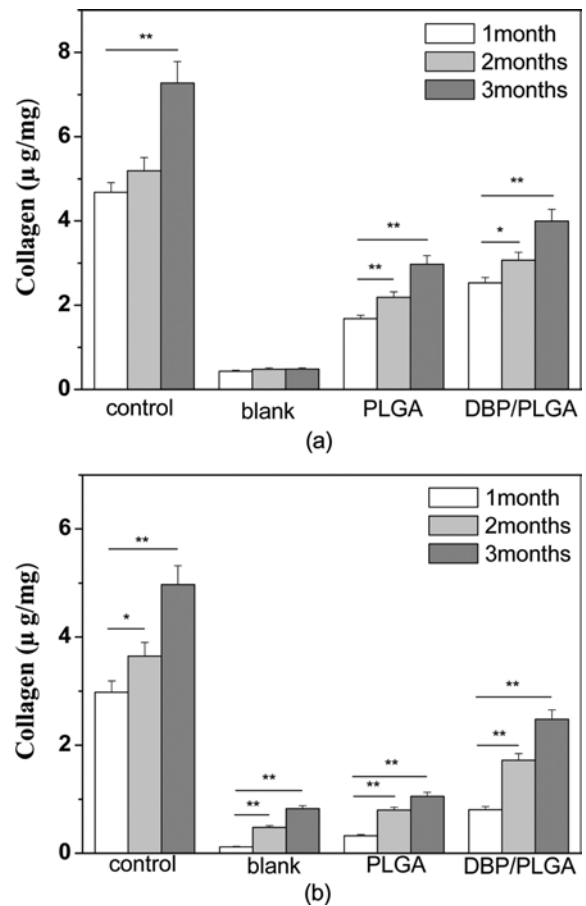
PLGA군에서는 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후  $3.54\pm 0.02$ ,  $3.57\pm 0.02$ ,  $4.63\pm 0.04$ 의 합성량을 나타냈으며 blank군과 비교하였을 때 GAG 합성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. DBP/PLGA군에서는 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후  $1.91\pm 0.10$ ,  $4.5\pm 0.21$ ,  $6.3\pm 0.32$ 의 합성량을 나타냈으며 1달이 지났을 때 PLGA군보다 GAG 합성량이 적게 측정되었지만 2달째에서 2배 이상 합성량이 증가하는 것을 확인하였으며 3달째에서도 2배 증가하는 것을 확인하였다. 수핵은 blank군에서 수술 1,

2 및 3개월이 지난 후  $0.48\pm 0.21$ ,  $0.28\pm 0.20$ ,  $1.45\pm 0.39$ 의 합성량을 나타내었으며 섬유륜과 비교하였을 때 2달째에 sGAG의 합성량이 감소하는 듯 하였으나 3달째에 증가하는 것을 확인하였다. PLGA군에서는 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후  $1.03\pm 0.02$ ,  $1.27\pm 0.01$ ,  $1.92\pm 0.10$ 의 합성량을 나타내었다. DBP/PLGA군에서 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후  $2.27\pm 0.06$ ,  $2.98\pm 0.06$ ,  $3.80\pm 0.13$ 의 합성량을 나타내었으며 1달째에서도 다른 실험군에 비해 sGAG의 합성량이 많았으며 또한 시간이 지남에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

콜라겐 합성량은 Figure 3에 나타내었다. 섬유륜의 경우 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후 blank군에서  $0.43\pm 0.23$ ,  $0.48\pm 0.31$ ,  $0.48\pm 0.50$ , PLGA군에서  $1.68\pm 0.02$ ,  $2.18\pm 0.02$ ,  $2.96\pm 0.03$ , DBP/PLGA에서는  $0.80\pm 0.02$ ,  $1.72\pm 0.05$ ,  $2.48\pm 0.07$ 의 값을 나타내었다. 수핵은 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후 blank군에서  $0.11\pm 0.20$ ,  $0.47\pm 0.25$ ,  $0.82\pm 0.34$ , PLGA군에서  $0.32\pm 0.01$ ,  $0.79\pm 0.03$ ,  $1.05\pm 0.05$ , DBP/PLGA군에서  $0.80\pm 0.02$ ,  $1.72\pm 0.05$ ,  $2.48\pm 0.07$ 의 값을 나타내었다. 섬유륜과 수핵의 콜



**Figure 2.** sGAG contents of blank, PLGA and DBP/PLGA scaffolds at 1, 2 and 3 months of implantation *in vivo*. (a) AF; (b) NP. Differences were considered statistically significant when  $*p<0.05$ ,  $**p<0.005$ ,  $***p<0.0005$ .



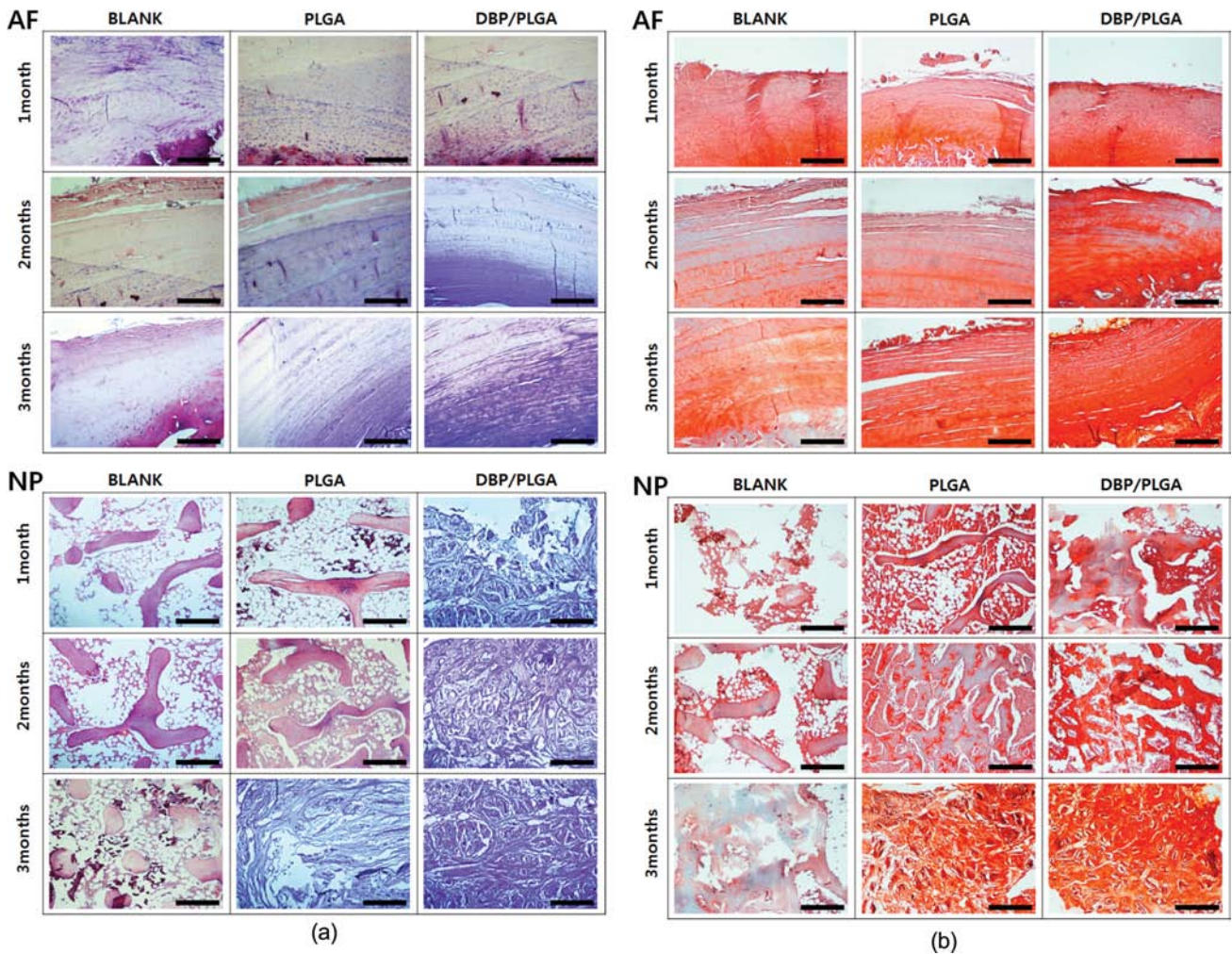
**Figure 3.** Collagen contents of blank, PLGA and DBP/PLGA scaffolds at 1, 2 and 3 months of implantation *in vivo*. (a) AF; (b) NP. Differences were considered statistically significant when  $*p<0.05$ ,  $**p<0.005$ .

라겐 합성량을 봤을 때 DBP/PLGA군이 blank군과 PLGA군에 비해 수술 1, 2 및 3개월이 지난 후 콜라겐 합성량이 높게 측정되는 것을 확인할 수 있었다. DBP/PLGA군은 blank군과 비교하여 수치상으로 약 2배 이상 콜라겐 합성량이 증가했다. sGAG와 콜라겐 합성량 측정의 결과로 DBP가 높은 수분 함량과 프로테오글리칸으로 구성된 추간판의 디스크 세포외기질의 형성에 긍정적인 영향을 주고 DBP/PLGA 지지체가 연골기질 형성에 도움을 주는 담체로서 역할을 하는 것으로 사료된다.<sup>32</sup>

**조직학적 평가.** 추간판 디스크는 sGAG, 제 I형 콜라겐, 제 II형 콜라겐 성분이 유기적으로 연골 기질을 구성하고 있다.<sup>33</sup> 사람의 섬유륜은 다층의 층상 구조를 가지고 있으며 제 I형 콜라겐의 섬유가 일정한 패턴으로 동심원을 이루고 있다. 수핵은 젤라틴의 형태로 다양한 형태의 세포가 존재하는 섬유성 기질로 구성되어 있고 노화가 진행될수록 섬유성 연골로 대체되고 섬유륜 주변으로 척삭 세포들이 연골 세포로 변화

는 특성을 가지고 있다.<sup>34</sup> 앞서 sGAG와 콜라겐 합성량 측정 결과 DBP/PLGA군에서 높은 함량을 확인하였다. 이러한 결과를 증명하기 위하여 수술 부위의 디스크를 적출하여 H&E, Safranin-O, Alcian blue, 제 I, II형 콜라겐 염색을 실시하였다. H&E, Safranin-O, Alcian blue 염색을 실시하여 Figure 4에 나타내었다.

H&E 염색은 가장 널리 사용되는 염색법으로 hematoxylin으로 핵을 염색한 뒤 eosin으로 세포질이나 세포 바깥 구조를 대비시키기 위해 대조 염색을 하였다. Figure 3(a)에서 볼 수 있듯이 H&E 염색에서 섬유륜의 경우 blank, PLGA군에서는 섬유륜 형성하고 있는 섬유륜이 동심원 형태를 나타내지 않았고 불규칙한 모양으로 형성되어 있는 것을 확인하였다. DBP/PLGA군에서는 시간이 지날수록 섬유가 균일하게 형성됨에 따라 라멜라 구조를 잘 형성하고 있었다. 수핵 부분은 blank군에서 1, 2 및 3개월 동안 수핵 내에 존재하는 연골성 세포가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 DBP/PLGA



**Figure 4.** Histological evaluation of AF and NP constructs *in vivo*: (a) H&E; (b) Safranin-O; (c) Alcian-blue (magnification with  $\times 100$ , scale bar=300  $\mu\text{m}$ ).

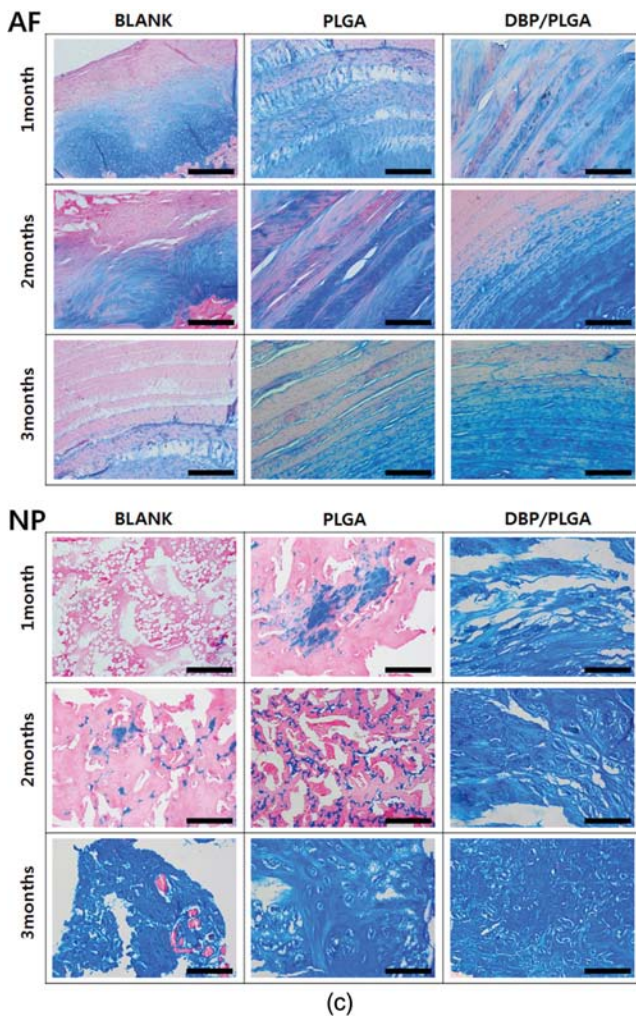


Figure 4. Continued.

군에서는 3개월이 지난 후에도 다른 실험군에 비해 수핵이 재생됨을 확인하였으며 수핵 내에 존재하는 연골성 세포도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Safranin-O 염색은 연골성 조직에서 많이 발견되는 세포외 기질의 수분을 함유하는 sGAG의 발현 정도를 확인할 수 있는 염색법이다. 따라서 sGAG의 생성이 증가할수록 붉은색의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있다. sGAG는 붉은색으로 염색이 되며 세포질은 카키색, 핵은 검은색으로 염색이 된다. Figure 3(b)에서 볼 수 있듯이 blank군과 PLGA군에 비해 DBP/PLGA군에서 붉은색이 진하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 DBP로 인하여 섬유륜과 수핵의 재생에 도움을 주어 sGAG를 분비해 세포외기질을 형성하게 되어 섬유륜과 수핵의 재생을 유도하였을 것이라고 사료된다.

Alcian blue 염색은 산성점액성 다당류를 검증하기 위한 염색법으로 sGAG의 검출과 시알산함유의 당단백질의 조직 내 분포를 알아보기 위해 사용된다. 산성점액은 파란색으로 염

색이 되며 핵은 붉은색으로 나타나고 세포질은 분홍색으로 염색이 된다. Figure 4(c)에서 볼 수 있듯이 H&E와 Safranin-O 염색과 같이 시간이 지남에 따라 파란색의 발현정도가 점차적으로 증가함을 보였으며 특히 DBP/PLGA군에서 더 높은 발현을 확인할 수 있었다. PLGA군에서도 blank군에 비해 재생이 되는 것을 확인할 수 있었지만 DBP/PLGA군에서 시간이 지남에 따라 섬유륜과 수핵이 재생됨을 확인할 수 있었다.

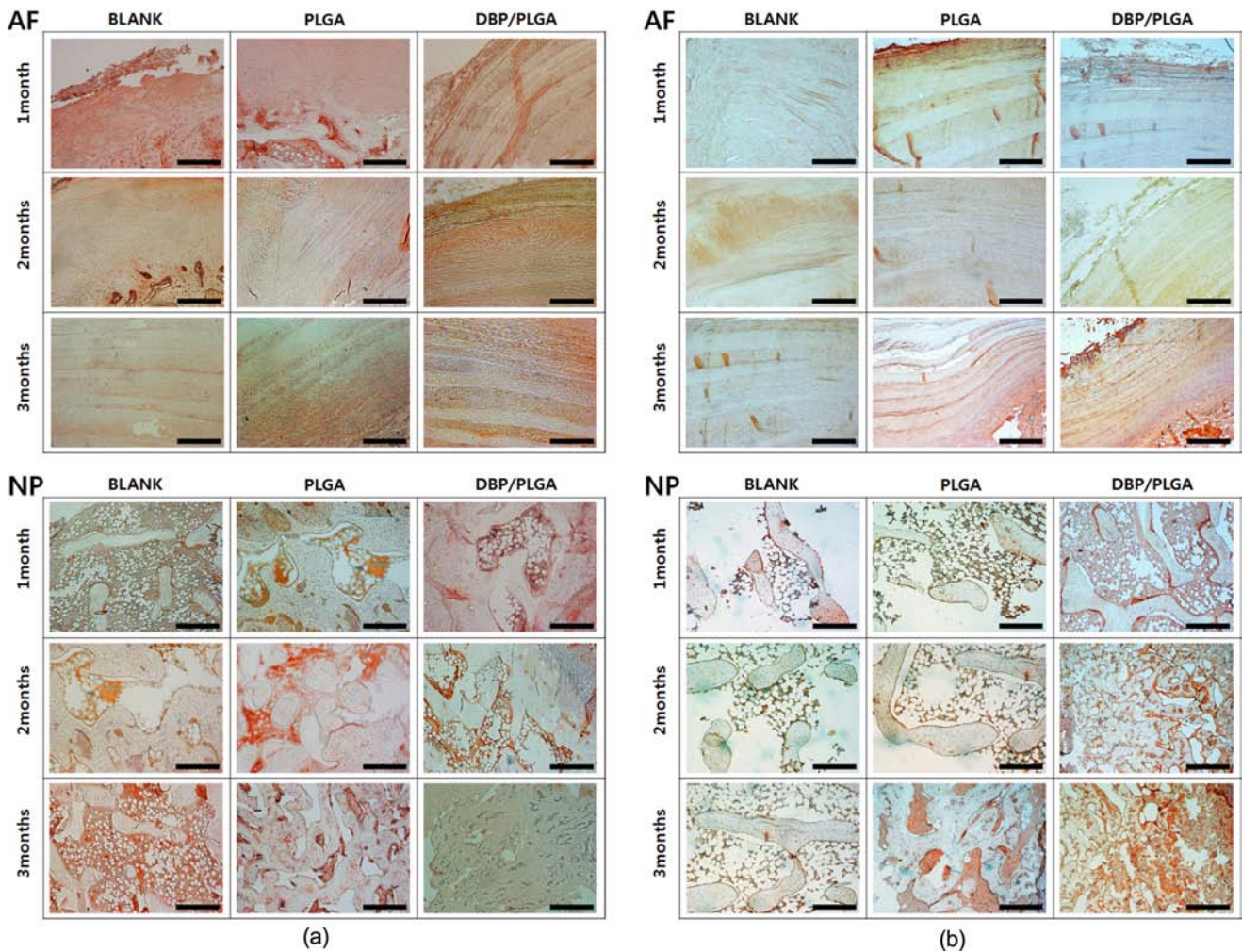
추간관 디스크의 섬유륜은 주요 성분이 제 I형 콜라겐이고 수핵은 제 II형 콜라겐으로 구성되어<sup>35</sup> 있기 때문에 각각의 콜라겐의 발현도를 확인하기 위하여 면역조직화학염색을 실시하였으며 Figure 5에 나타내었다. 염색결과 blank, PLGA군에서는 섬유륜이 불균일한 섬유 형태와 라멜라 구조를 나타내었으며 DBP/PLGA군에서는 시간이 지날수록 발현 정도가 진해졌고 균일한 라멜라 구조를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 수핵은 손상을 입었을 경우 세포 사멸로 인하여 sGAG가 소실되고 디스크 콜라겐의 표현형이 변하게 된다. 또한 디스크 내에 콜라겐으로 이루고 있는 제 II형 콜라겐은 급격히 감소되며 수핵 부분에서 나타나지 않은 제 I형 콜라겐이 나타나기 시작하였다.

Figure 5(a)에서 볼 수 있듯이 제 I형 콜라겐 염색의 경우 blank, PLGA군에서는 수핵의 경우 시간이 지날수록 발현도가 증가하는 것을 볼 수 있었으며 Figure 5(b)에서 볼 수 있듯이 제 II형 콜라겐 염색의 경우 점점 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 수핵 부분에 존재하는 제 II형 콜라겐이 감소하고 존재하지 않았던 제 I형 콜라겐이 증가한 것으로 확인할 수 있었다. 반면에 DBP/PLGA군에서는 제 II형 콜라겐의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

이전 연구에서는 *in vitro*상에서 PLGA 지지체보다 DBP/PLGA 지지체에서 섬유륜 세포와 수핵 세포의 성장과 증식이 좋은 것을 확인하였으며 *in vivo*에서도 DBP의 첨가로 인하여 주변 조직과의 융합이 더 잘 일어나고 지지체 내에서의 세포외기질의 발현정도가 증가하는 것을 확인하였다.<sup>36</sup> 이러한 결과와 마찬가지로 본 연구에서도 PLGA 지지체보다는 DBP/PLGA 지지체가 섬유륜과 수핵의 재생 정도가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이는 생체조직공학적 바이오 디스크에 있어서 중요한 기초 데이터가 될 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 *in vivo* 환경에서 PLGA와 연골 및 디스크 재생을 유도하는 DBP를 첨가하여 추간관 디스크의 재생 효과를 확인하고자 하였다. 토끼의 손상된 추간관 디스크에 PLGA, DBP/PLGA 지지체를 이식한 부분의 섬유륜과 수핵을 적출하여 sGAG와 콜라겐 함량을 측정된 결과, 지지체를 이식하지 않은 blank, PLGA군에서보다 DBP/PLGA군에서



**Figure 5.** Immunohistochemistry evaluation of AF and NP constructs *in vivo*: (a) Type I Collagen; (b) Type II Collagen (magnification with  $\times 100$ , scale bar=300  $\mu\text{m}$ ).

더 높은 수치를 나타내었다. 이는 DBP/PLGA 지지체의 표면이 친수성을 가지며 높은 물 흡수율을 제공할 뿐만 아니라 여러 사이토카인의 작용에 의한 것으로 사료된다.<sup>37</sup> 또한 조직학적 평가를 통하여 sGAG, 제 I형 콜라겐, 제 II형 콜라겐의 발현도를 확인한 결과 DBP/PLGA 지지체를 이식한 추간판 디스크에서 sGAG 발현도가 증가함을 보였으며 특히 수핵 부분에서 blank, PLGA군은 제 I형 콜라겐의 발현이 증가하고 제 II형 콜라겐의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며 이에 비해 DBP/PLGA군은 제 II형 콜라겐의 발현도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 DBP로 인하여 더 풍부한 세포외기질의 발현으로 섬유류과 수핵의 재생에 긍정적인 영향을 준 것으로 사료된다.

이로써 DBP/PLGA 지지체가 추간판 디스크 재생에 도움을 주는 것으로 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 DBP/PLGA 지지체가 디스크 재생을 위한 대체조직으로써의 응용 가능성을 확인하였다.

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

### 참 고 문 헌

1. M. Endres, A. Abbushi, U. W. Thomale, M. Cabraja, S. N. Kroppenstedt, L. Morawietz, P. A. Casalis, M. L. Zenclussen, A. J. Lemke, P. Horn, C. Kaps, and C. Woiciechowsky, *Biomaterials*, **31**, 5836 (2010).
2. H. Shankar, J. A. Scarlett, and S. E. Abram, *Tech. Reg. Anesth. Pain. Manag.*, **13**, 67 (2009).
3. A. H. Hsieh and J. D. Twomey, *J. Biomech.*, **43**, 137 (2010).
4. M. A. Adams, P. Dolan, and D. S. McNally, *Matrix Biology*, **28**, 384 (2009).
5. S. R. S. Bibby, D. A. Jones, R. B. Lee, J. Yu, and J. P. G. Urban, *Joint Bone Spine*, **68**, 537 (2001).
6. M. Endres, A. Abbushi, U. W. Thomale, M. Cabraja, S. N.

- Kroppenstedt, L. Morawietz, P. A. Casalis, M. L. Zenclussen, A. J. Lemke, P. Horn, C. Kaps, and C. Woiciechowsky, *Biomaterials*, **31**, 5836 (2010).
7. S. K. Lee, H. K. Hong, S. J. Kim, Y. K. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 398 (2010).
  8. G. Q. Zhou, F. Yang, V. V. L. Leung, and K. M. C. Cheung, *Curr. Orthopaed.*, **22**, 267 (2008).
  9. M. A. Adams and P. J. Roughley, *Spine(Phila Pa 1976)*, **31**, 2151 (2006).
  10. L. Jin, G. Feng, D. L. Reames, A. L. Shimer, F. H. Shen, and X. Li, *Spine J.*, **13**, 235 (2013).
  11. H. E. Gruber, K. Leslie, J. Ingram, H. J. Norton, and E. N. Hanley, Jr., *Spine J.*, **4**, 44 (2004).
  12. J. Melrose, S. Smith, P. Ghosh, and T. K. F. Taylor, *Cells Tissues Organs*, **168**, 137 (2001).
  13. X. Shao and C. J. Hunter, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **82A**, 701 (2007).
  14. H. K. Hong, S. K. Lee, Y. S. Song, D. S. Kim, S. Eom, H. E. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 282 (2010).
  15. 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).
  16. Y. Woo and K. Na, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 63 (2012).
  17. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
  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. D. Kolse, C. Delplace, and J. Siepmann, *Int. J. Pharm.*, **404**, 75 (2011).
  20. A. F. Carballido, P. Pastoriza, E. Barcia, C. Montejo, and S. Negro, *Int. J. Pharm.*, **352**, 50 (2008).
  21. E. H. Jo, S. J. Kim, S. J. Cho, G. Y. Lee, O. Y. Kim, E. Y. Lee, W. H. Cho, D. W. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 289 (2011).
  22. F. L. Mi, Y. M. Lin, Y. B. Wu, S. S. Shyu, and Y. H. Tsai, *Biomaterials*, **23**, 3257 (2002).
  23. H. W. Bae, L. Zhao, L. E. A. Kanim, P. B. S. Pamela, R. B. Delamarter, and E. G. Dawson, *Spine*, **31**, 1299 (2006).
  24. S. Mizuno and J. Glowacki, *Cells Tissues Organs*, **180**, 151 (2005).
  25. S. J. Yoon, S. K. 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).
  26. A. R. Kim, H. M. Kim, J. K. Lee, J. H. Lee, J. E. Song, K. H. Yoon, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **36**, 768 (2012).
  27. Y. M. Lee, C. R. Shim, Y. J. Lee, H. N. Kim, S. A. Jo, J. E. Song, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **36**, 789 (2012).
  28. Y. K. Ko, J. S. Jeong, S. H. Kim, J. Y. Lim, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **32**, 109 (2008).
  29. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
  30. J. C. Iatridis, S. B. Nicoll, A. J. Michalek, B. A. Walter, and M. S. Gupta, *Spine. J.*, **13**, 243 (2013).
  31. H. E. Kim, H. N. Kim, H. Yu, J. E. Song, S. Y. Jeoung, Y. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Macromol. Res.*, **20**, 1044 (2012).
  32. A. A. Hegewald, S. Zouhair, M. Endres, Mario, Cabraja, C. Woiciechowsky, C. Thome, and C. Kaps, *Tissue and Cell*, **45**, 68 (2013).
  33. Y. H. Kang, *J. Korean Spine Surg.*, **8**, 264 (2001).
  34. B. R. Whatley and X. Wen, *Mat. Sci. Eng. C*, **32**, 61 (2012).
  35. S. H. Moon, *J. Korean Spine Surg.*, **14**, 120 (2007).
  36. S. K. Lee, H. K. Hong, S. J. Kim, Y. K. Kim, Y. S. Song, Y. Ha, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 398 (2010).
  37. 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).