

## 2차원적 DBP/PLGA 하이브리드 필름이 디스크 세포의 부착과 증식에 미치는 영향

고연경 · 정재수 · 김순희 · 임지에 · 이종문 · 김문석\* · 이해방\* · 강길선†

전북대학교 BK-21 고분자 BIN융합연구팀, \*한국화학연구원 나노생체재료연구팀

(2007년 10월 16일 접수, 2007년 11월 22일 채택)

### Effect of 2-D DBP/PLGA Hybrid Films on Attachment and Proliferation of Intervertebral Disc Cells

Youn Kyung Ko, Jae Soo Jeong, Soon Hee Kim, Ji Ye Lim,

John M. Rhee, Moon Suk Kim\*, Hai Bang Lee\*, and Gilson Khang†

BK-21 Polymer BIN Fusion Research Team, Chonbuk National University,

664-14, Dukjin Dong 1 Ga, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

\*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,

P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

(Received October 16, 2007; Accepted November 22, 2007)

**초록 :** 탈미네랄화된 골분(DBP)은 사이토카인과 같은 다양한 생리활성분자를 가지기 때문에 조직공학분야에서 널리 사용되는 생체재료이다. 본 연구에서는 DBP를 함유한 2차원적 DBP/PLGA 필름이 추간판디스크 세포의 부착, 증식 및 표현형유지에 미치는 영향에 대해 연구하였다. DBP 함량에 따른 DBP/PLGA 필름은 용매증발법으로 제조하였으며 제조된 PLGA 및 DBP/PLGA 필름은 시차주사현미경을 통해 표면을 분석하였다. PLGA 필름은 매끄러운 표면을 가지며, DBP의 함량이 증가할수록 DBP/PLGA 필름의 표면은 거칠도가 증가하는 것을 확인하였다. 섬유륜(AF) 및 수핵(NP)세포를 PLGA 및 DBP/PLGA 필름 표면에 파종하여 배양한 후, 세포의 계수 및 SEM 관찰을 통하여 이들의 부착과 증식을 평가하였다. 세포 계수와 SEM 관찰 결과, DBP의 함량이 10 및 20%인 DBP/PLGA 필름에서 높은 초기부착도 및 증식률을 보였다. 세포 계수 결과를 바탕으로 RT-PCR을 통하여 DBP 10%와 20%의 DBP/PLGA 필름에서의 디스크 세포의 특이적 유전자 발현확인 결과, DBP의 함량이 20%인 DBP/PLGA 필름에서 세포의 표현형이 유지되며 지속적인 세포외기질이 발현될 것으로 예상되었다. 따라서 적절한 천연재료의 함량이 세포의 부착과 증식에 더욱 적합하며 이는 조직공학적 디스크 재생의 기초 자료로 사용될 것으로 사료된다.

**Abstract :** Because demineralized bone particle (DBP) contains various bioactive molecules such as cytokines, it is widely used biomaterials in the field of tissue engineering. In this study, we investigated the effect of 2-dimensional DBP/PLGA hybrid films on adhesion, proliferation and phenotype maintenance of intervertebral disc cells. PLGA films incorporated with different amount (0, 10, 20, 40 and 80 wt%) of DBP were prepared by the solvent evaporation method and characterized by scanning electron microscopy (SEM). PLGA film has a flat and smooth surface. According to the increase of content of DBP, the surface of DBP/PLGA film exhibited few agglomerates and increased the roughness of the surface. Annulus fibrosus (AF) and nucleus pulposus (NP) cells were cultured on PLGA and DBP/PLGA film surface, and then examined the cell adhesion and proliferation by the cell count and SEM observation. The result of cell count and SEM observation revealed that 10 and 20% DBP in DBP/PLGA films were superior to adhesion and proliferation of both AF and NP cells. We confirmed that specific gene expression of disc cells on DBP/PLGA film based on the cell count result. Disc cells seeded on 20% DBP/PLGA film expressed the gene of type I and II collagen continuously. Therefore, pertinent content of biomaterials could provide more appropriate condition on adhesion and proliferation of cell. And this results may be used as a basic data for the intervertebral disc regeneration using tissue engineering.

**Keywords :** PLGA, hybrid film, demineralized bone particle, annulus fibrosus, nucleus pulposus.

## 서 론

요통은 추간판디스크(IVD)의 손상 및 퇴화로부터 기인하며, IVD

의 퇴화는 유전적 요인, 노화현상 및 비만과 직업 등의 생활습관이 그 원인이 된다.<sup>1,2</sup> 이러한 디스크 질환으로 인한 요통을 치료하기 위한 척추융합술이나 수핵치환술 등의 다양한 외과적 수술요법이 수행되고 있으나 상기의 방법은 장기적인 치료효과를 기대하기 어렵고 주변조직의 괴사 등의 한계가 있어 조직공학 이론에 의한 추간판디스크의

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

재생이 시도되고 있다.<sup>1,3-6</sup>

조직공학 분야에 있어서 세포, 지지체 그리고 사이토카인 등의 생물학적 신호는 매우 중요한 요소이며, 세포는 담체와 상호작용으로 인해 성장하고 충분한 세포외기질(ECM)을 분비하기 때문에 담체를 제조하는 재료의 선택이 매우 중요하다.<sup>7</sup> 담체재료의 표면화학은 화학반응, 전하, 경직성 및 거침정도에 의존하며 재료와 세포의 상호작용을 중재하고, 세포의 부착, 증식, 이주 및 표현형을 유지할 수 있게 한다.<sup>8-10</sup> 이러한 이론을 바탕으로 표면의 소수성/친수성의 특성이 세포의 부착에 영향을 주는 것은 일반적인 개념이다.<sup>10-13</sup>

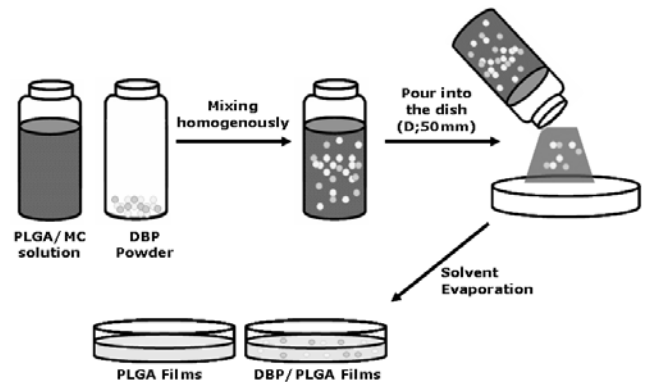
조직의 재생에 있어서 폴리( $\alpha$ -수산기) 계열의 생분해성 고분자재료는 가장 널리 사용되는 생체재료이며, 특히 락타이드 글리콜라이드 공중합체(PLGA)는 분자량과 단량체 비율의 조절로 분해기간을 원하는 대로 조절할 수 있고 비교적 우수한 생체적합성 때문에 널리 사용된다.<sup>13</sup> 하지만 상대적으로 소수성의 표면을 가진 단점으로 인해 PLGA는 세포의 초기부착도가 낮기 때문에, 에탄올 처리, 강산이나 강염기 처리, 리간드의 고정화, 단백질 흡착을 통한 표면의 개질 및 여러 방법을 이용하여 세포에 친화성을 부여하는 실험이 진행되고 있다.<sup>8,14-17</sup>

본 연구팀은 이전 연구에서 생체활성 천연재료인 탈미네랄화된 골분(DBP)을 이용하여 PLGA에 친수성 및 생리활성을 부여하고자 하였으며 2 및 3차원적인 다양한 형태(2, 3-dimension)의 지지체에서 세포 및 재료의 상호관계에 관한 연구를 수행하였다.<sup>18-21</sup> 따라서 본 연구에서는 수용액 내에서 높은 계면 자유에너지를 가져 소수성을 가지는 2차원적 PLGA 고분자 표면을 DBP라는 천연재료를 이용해 친수성 표면으로 개질하는데 그 목적이 있으며, 용매증발법을 통해 PLGA 및 DBP/PLGA 하이브리드 필름을 제조하여 분리배양된 추간판디스크 세포의 접착과 증식, 표현형 유지에 최적의 DBP 함량을 제시하고자 하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 필름의 재료인 PLGA(락타이드 : 글리콜라이드 몰비, 75 : 25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 고분자를 용해시키기 위한 용매는 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA)를 사용하였으며, MC 및 여타 유기용매는 HPLC 등급 이상의 것을 사용하였다. 소의 대퇴부로부터 획득한 DBP는 Urist 및 이전의 연구와 동일한 과정으로 분리하였으며,<sup>22,23</sup> 이를 동결 분쇄기(6700, SPEX Inc., USA)를 이용하여 약 180  $\mu$ m 이하의 크기의 분말 형태로 얻었다.

**PLGA, DBP/PLGA 필름의 제조 및 특성분석.** 용매증발법을 이용하여 PLGA 및 DBP를 함유한 PLGA 하이브리드 필름을 제조하였으며 이들의 제조모식도를 Figure 1에 제시하였다.<sup>9,18</sup> 0.3 g의 PLGA를 6 mL의 MC에 5 w/v%의 농도로 용해한 뒤, PLGA 중량의 10, 20, 40 및 80 wt%에 해당하는 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 g의 DBP를 첨가하여 고루 분산시켰다. 상기의 분산용액을 직경이 5 mm인 유리접시에 도포하고 잔존 유기용매를 제거하기 위해 상온에서 2~3일 방치하였다. 상기의 방법으로 제조된 PLGA 및 DBP/PLGA 필름의 표면 형태를 주사전자현미경(bio-SEM, SN-3000, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 샘플을 면도칼로 5×5 mm의 크



**Figure 1.** Schematic diagram of the fabrication process of DBP/PLGA hybrid films by solvent evaporation method.

기로 절단하여 샘플 폴더에 고정시켜, 플라즈마 스퍼터를 이용하여 백금코팅한 후 표면을 관찰하였다.

**디스크 세포의 분리 및 배양.** 4~5주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼를 희생시킨 후 등의 털을 제거하고, 멸균된 수술용 가위로 토끼의 척추부분을 절단하여 PBS로 세번 정도 세척한 후 근육을 제거하였다. 블레이드로 AF 조직과 NP 조직을 오염되지 않도록 조심스럽게 각각 분리한 후 PBS로 다시 세척하고, 0.1 wt%의 콜라게나제 A형(Roche, USA) 용액에 하루 동안 처리하였다. 조직이 담긴 용액을 원심분리하고 100  $\mu$ m의 나일론 메쉬로 거른 후, 25 cm<sup>2</sup> 플라스크에 플레이팅 하였다. 플레이팅 시 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco)과 F-12 nutrient mixture (Ham's F-12, Gibco) 배양액에 10% 우태혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(10 U/mL, 페니실린 G 소디움과 10  $\mu$ g/mL 암피테리신 B, Gibco)를 첨가한 성장배지를 사용하였다. AF 및 NP 세포는 각각 계대배양하였으며 3일에 한번 배양액을 교체해 주었다.<sup>21,24</sup>

**PLGA 및 DBP/PLGA 필름에서 세포의 배양 및 계수.** 상기의 방법으로 제조한 PLGA 및 DBP/PLGA 필름은 70% 에탄올에 30분 동안 방치하여 멸균을 수행하였으며, 그 후 PBS로 다섯 번 세척하여 상온에서 하루 동안 건조시켰다. 분리한 AF 세포와 NP 세포를 각각 계대배양한 후 3대 계대배양액의 세포를 0.05%의 트립신(trypsin-EDTA, Gibco)을 이용하여 세포를 수거한 후, 제조된 PLGA 및 DBP/PLGA 필름에 cm<sup>2</sup>당 10000의 농도로 각 세포를 파종하고 1, 2 및 3일 동안 배양하였다. 정해진 시간마다 배양접시안의 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 트립신 처리하여 혈구계산판을 이용하여 세포를 계수하였다.<sup>18</sup>

**RNA 분리 및 RT-PCR.** 앞선 세포계수 실험에서 가장 높은 수치를 보인 두가지 실험군을 선택하여 AF 및 NP 세포의 특이적 발현 유전자인 제 1, 2형 교원질의 발현정도를 RT-PCR을 수행하여 확인하였다.<sup>9</sup> 상기의 방법으로 제조 및 멸균된 DBP/PLGA 필름을 직경이 1 mm의 원형으로 자르고 그 위에 실리콘 몰드로 고정시켰다. 필름 당 1×10<sup>5</sup>개의 세포농도로 세포를 파종하고 배양한 1 및 3일째에 TriZol®(Invitrogen™, Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)과 클로로포름을 이용하여 RNA를 분리한 다음, 이소프로판올(Sigma-Aldrich Co.)로 RNA를 침전시킨다. 분리된 RNA는 SuperScript™ II RT(Invitrogen™, Life technologies Co.)를 첨

가하여 Authorized thermal cycler(TP 600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA를  $\beta$ -actin, 제 1, 2형 교원질 프라이머(Geno Tech, Korea)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 염기서열과 반응조건은 Table 1과 같다.<sup>24</sup> PCR 후 증폭된 DNA를 1.5 w/v% 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR<sup>TM</sup> Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 촬영하였고 이미지 분석 프로그램을 사용하여  $\beta$ -actin의 밴드의 광도로 일반화하였다.<sup>21,23</sup>

**PLGA 및 DBP/PLGA 필름에서 세포 모폴로지 관찰.** 상기의 방법으로 제조된 PLGA 및 함량별 DBP를 함유한 DBP/PLGA 필름을 직경 1 mm의 크기로 자르고 움직이지 않도록 실리콘 몰드로 고정시킨 뒤, cm<sup>2</sup>당 5000개의 세포를 파종하고 1 및 3일 동안 배양하였다. 시간이 경과한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 다음 2.5%

**Table 1. The Sequence and PCR Reaction Cycles of  $\beta$ -Actin, and Type I, II Collagen Primer. (d) Denaturation, (a) Annealing, and (e) Extension**

| Gene                         | Sequence                           | Cycle | Protocol                               |
|------------------------------|------------------------------------|-------|----------------------------------------|
| $\beta$ -Actin<br>(227 bp)   | F : 5'-gccatctgcgtctggacctggct-3'  | 25    | d : 34 °C, 30 sec                      |
|                              | R : 5'-gtgatgacctggccgtcaggcagc-3' |       | a : 52 °C, 30 sec<br>e : 72 °C, 30 sec |
| Type I collagen<br>(312 bp)  | F : 5'-gatgcgttccagttcgag-3'       | 35    | d : 95 °C, 30 sec                      |
|                              | R : 5'-ggtcttccggttggtcttg ta-3'   |       | a : 65 °C, 30 sec<br>e : 72 °C, 30 sec |
| Type II collagen<br>(394 bp) | F : 5'-gcacccatggacattggaggg-3'    | 35    | d : 94 °C, 45 sec                      |
|                              | R : 5' atgttttaaaaaatacgaag-3'     |       | a : 45 °C, 30 sec<br>e : 72 °C, 60 sec |

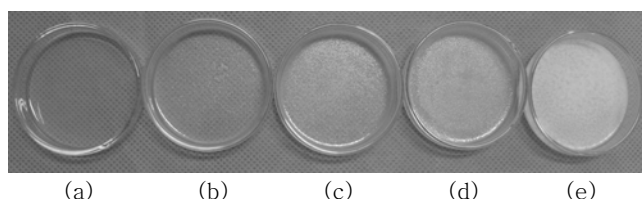
글루타르알데히드(Sigma Co.)로 하루동안 고정한 후 에탄올 구배용액으로 30분 동안 탈수를 실시하였다.<sup>9</sup> 준비된 시료는 SEM 관찰 전까지 수분이 침투하지 않도록 밀봉한 후 상온에서 보관하였다.

**통계학적 분석.** 각각의 실험군의 평균값과 표준편차를 확인하였으며, 통계학적 분석은 Student's T-test를 수행하였다. 결과 값이  $p < 0.05$ 일 때 충분한 유의성을 갖는 것을 기준으로 하였다.

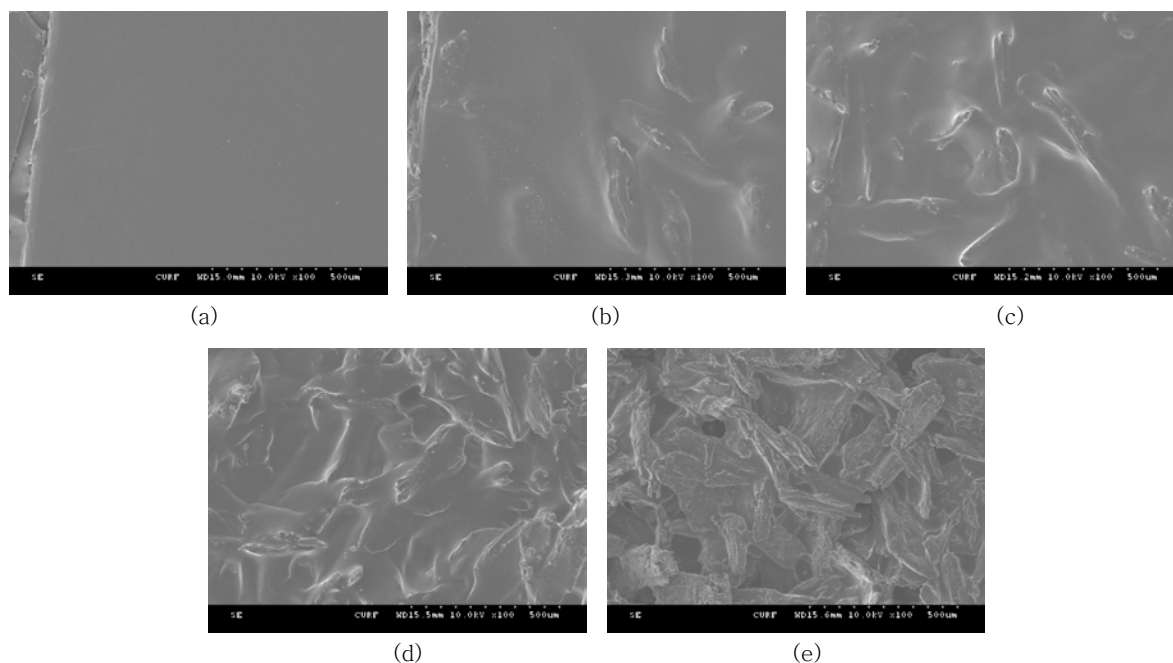
## 결과 및 토론

**PLGA 및 DBP/PLGA 필름의 표면 분석.** 용매증발법을 이용하여 PLGA 및 DBP를 함유한 PLGA 필름을 제조하였으며 제조된 필름을 Figure 2에 나타내었다. 제조된 필름은 두께가 약  $100 \pm 30 \mu\text{m}$ 을 보였으며 고분자 용액을 도포한 접시와 직경이 50 mm인 원형의 필름을 제조할 수 있으며 도포되는 접시의 크기 또는 고분자 용액의 양을 조절하면 형태 및 두께의 조절이 가능할 것으로 판단된다.

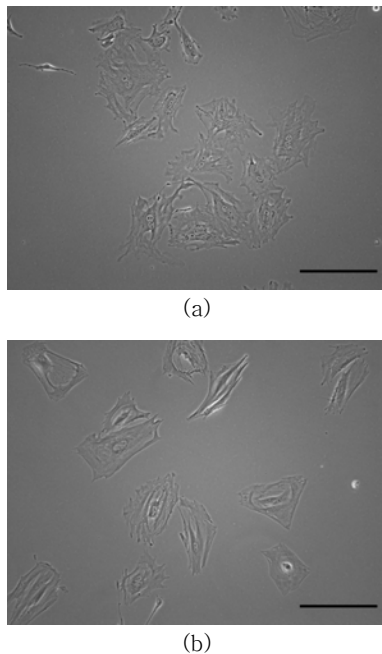
본 연구팀의 이전 연구인 3차원적 함량별 DBP/PLGA 담체에 관한 연구에서 DBP의 함량이 증가할수록 표면의 적심성이 증가함을 하였으며 다양한 변화요인을 포함한 3차원적 연구에서 이와 같은



**Figure 2.** Gross picture of PLGA and DBP/PLGA films. (a) PLGA only, (b) PLGA/DBP(10 wt%), (c) PLGA/DBP(20 wt%), (d) PLGA/DBP(40 wt%), and (e) PLGA/DBP(80 wt%).



**Figure 3.** Surface characterization of PLGA and DBP/PLGA films by means of solvent evaporation method. (a) PLGA only, (b) PLGA/DBP(10 wt%), (c) PLGA/DBP(20 wt%), (d) PLGA/DBP(40 wt%), and (e) PLGA/DBP(80 wt%) (magnification;  $\times 100$ , scale bar;  $500 \mu\text{m}$ ).



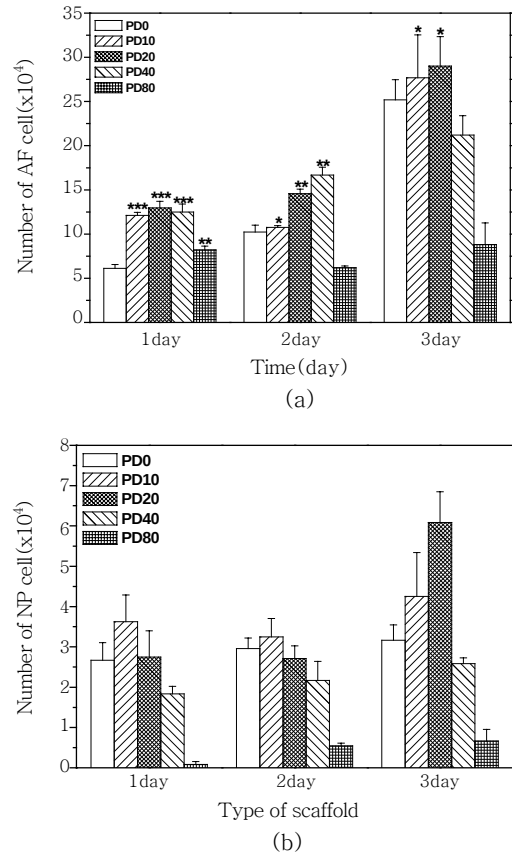
**Figure 4.** Typical cell morphologies of rabbit disc cells. (a) annulus fibrosus (AF) cell and (b) nucleus pulposus (NP) cell (Passage: 3, scale bar: 250  $\mu$ m).

결과를 얻은 것은 DBP가 천연재료인 콜라겐으로 구성되어 있고 높은 친수성을 가지기 때문으로 사료되며<sup>19,21</sup> 본 연구의 2차원적 DBP/PLGA 필름에서도 동일한 결과를 보일 것으로 예상된다. 또한 SEM을 통한 표면 모폴로지 관찰 결과를 Figure 3에 나타내었다. 먼저 PLGA 필름의 표면은 매끄러운 표면을 가짐을 확인하였고<sup>9</sup> DBP의 함량이 증가될수록 표면에 나타나는 DBP 입자의 수가 증가하며 표면의 거칠도가 증가하는 것을 확인하였다.

제조된 PLGA 필름은 재질이 부드럽고 유연성을 가지나 DBP의 함량이 증가할수록 이들의 정도는 낮아지는 경향이 있었으며, 80%의 DBP 함량을 가진 DBP/PLGA 필름에서는 약간의 굽힘에도 쉽게 균열이 생기는 현상이 나타났다. 과량의 DBP가 첨가된 DBP/PLGA 필름은 이러한 가공상의 단점을 가지므로 개선해야 할 부분으로 판단된다.

**AF 및 NP 세포의 배양.** 분리배양된 AF 및 NP 세포의 2회 계대배양액의 세포 형태를 위상차현미경으로 관찰하였다(Figure 4). AF 세포는 세포의 모양이 섬유아세포와 유사한 방추형 및 다각형의 모양을 가지며 NP 세포와 비교하여 볼 때 세포의 끝부분이 갈라진 형태를 보였다.<sup>24-27</sup> 그와 반대로 NP 세포는 파립세포질 및 큰 소포를 가지며 긴 돌기를 형성하고 있는 전형적인 NP 세포의 모폴로지를 보이며 전체적으로 넓은 세포외기질(ECM) 속에 핵을 포함한 세포소기관이 섬의 형태를 이루고 있으며 다각형의 모폴로지를 보였다. 또한 NP 세포는 AF 세포보다 세포의 크기가 크며 풍부한 ECM이 발현되는 것을 관찰하였다.<sup>28</sup>

**PLGA 및 DBP/PLGA 필름에서의 디스크 세포의 초기 부착 및 증식.** DBP 함량에 따른 PLGA 필름 표면에서 AF 세포의 부착 및 증식 정도를 세포의 계수를 통하여 확인한 결과를 Figure 5(a)에 나타내었다. 세포의 초기 부착을 관찰하기 위한 1일째의 세포 계수 결과,

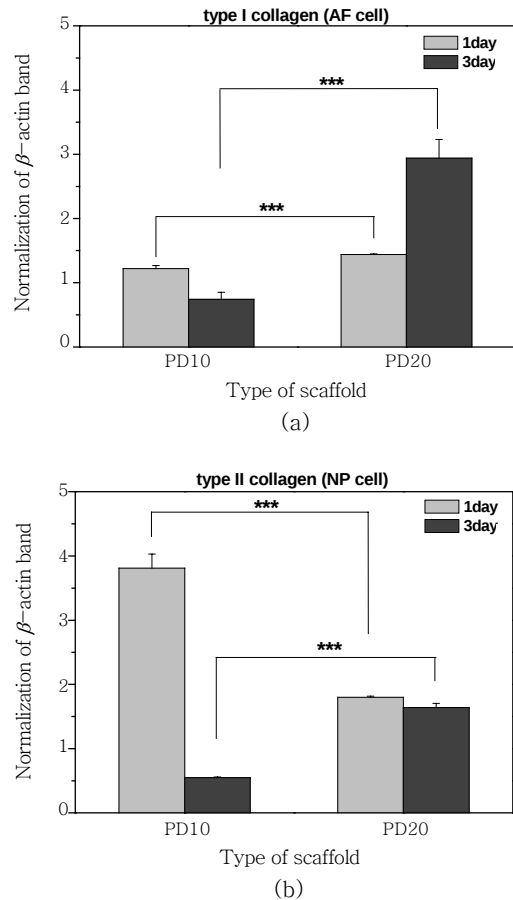


**Figure 5.** Intervertebral disc cells adhered on surface of PLGA and DBP/PLGA hybrid films. (a) number of AF cells and (b) number of NP cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ ).

PLGA 필름을 제외한 모든 DBP/PLGA 필름에서 높은 세포 부착을 보였으며 특히 DBP의 함량이 10, 20 및 40%의 DBP 함량에서 더 많은 세포수를 확인하였다. 3일동안 세포를 배양하여 계수한 결과, AF 세포는 10% 및 20%의 함량을 가진 DBP/PLGA 필름에서 더 많은 세포수를 보인 반면 DBP 함량이 80%인 경우에는 거의 증식이 일어나지 않는 결과를 보였다.

NP 세포를 분주하여 세포의 증식을 관찰한 결과를 Figure 5(b)에 나타내었다. AF 세포의 경우와 유사하게 DBP 10%와 20%의 DBP/PLGA 필름에서 초기부착과 세포의 증식이 PLGA 필름보다 높게 나타났다. DBP의 함량이 40% 및 80%인 경우에는 대조군인 PLGA 필름보다 저조한 세포 부착 및 증식을 보이는 양상 또한 같았다. 3일째의 계수 결과 20%의 DBP를 함유한 DBP/PLGA에서 가장 높은 수치를 보였으며 지속적인 세포의 증식이 예상되었다. 하지만 NP의 계수결과를 통계학적으로 분석한 결과  $p < 0.05$  범위에 포함되지 않는 유의성이 없는 결과를 보였다.

결과적으로 AF 및 NP 세포는 시간이 지날수록 모든 필름표면에서 세포수가 증가하였으며 특히, DBP의 함량이 10% 및 20%의 DBP/PLGA 필름에서 높은 초기부착과 증식을 보임을 확인하였다. 1일째와 2일째는 일부 실험군에서 세포수가 약간 감소하는 경향을 보였으나 큰 차이가 없으며, 전체적으로는 AF 세포에서 NP 세포보다 더 많은 세포수와 증식률을 보여 DBP/PLGA 하이브리드 필름은 NP



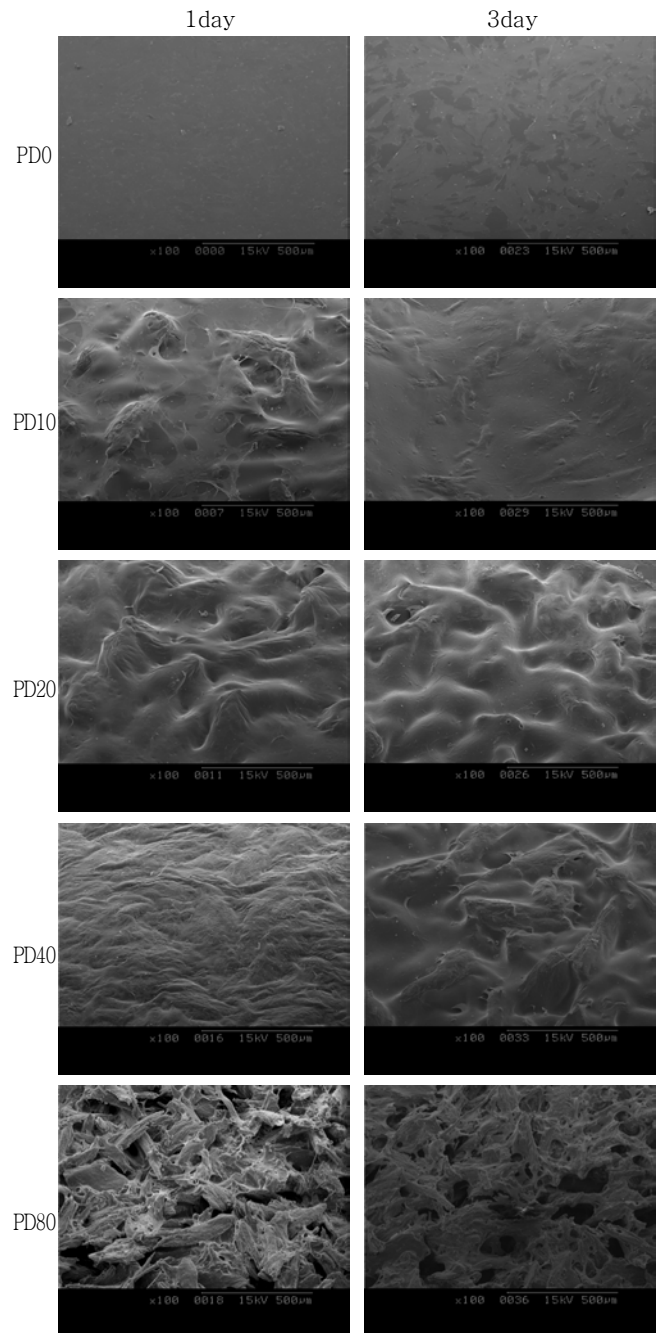
**Figure 6.** Relative gene expression amount of type I and II collagen normalized by the intensity of  $\beta$ -actin mRNA on DBP/PLGA film. (a) AF cell and (b) NP cell (\*\*p<0.0005).

조직보다는 AF 조직의 재생을 위한 지지체로의 역할이 기대된다.

**RT-PCR.** 상기의 세포 계수 실험결과, DBP의 함량이 10% 및 20%인 DBP/PLGA 필름의 경우에 다른 실험군보다 뛰어난 초기 부착 및 증식을 보임을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 10% 및 20%의 DBP를 함유한 DBP/PLGA 필름에서 1일 및 3일 동안 AF 세포의 특이적 유전자인 제 1형 교원질과 NP 세포의 특이적 유전자인 제 2형 교원질의 발현을 확인하였으며, 발현된 각각의 밴드의 광도를 측정하여  $\beta$ -actin의 밴드로 일반화한 결과를 Figure 6에 나타내었다.

우선 Figure 6(a)의 AF 세포의 제 1형 교원질 발현 확인 결과, 10%와 20% DBP/PLGA 실험군 모두 시간이 지남에 따라 밴드의 발현정도가 증가하였음을 확인하였으며 특히 20%의 DBP/PLGA 필름 실험군에서 밴드 발현의 증가 양상이 두드러짐을 확인할 수 있었다. NP 세포의 제 2형 교원질 발현 관찰 결과(Figure 6(b)), 1일째에는 10%의 DBP 함량을 갖는 DBP/PLGA 필름에서 매우 높은 밴드의 광도를 보였으나 3일째에는 큰 폭으로 감소한 반면, 20%의 DBP 함량을 가지는 DBP/PLGA 필름은 초기에 발현되는 정도는 적으나 3일째에 증가하는 것으로 보아 DBP의 함량이 20%인 DBP/PLGA 필름에서 지속적으로 세포외기질이 풍부히 발현될 것으로 예상된다.

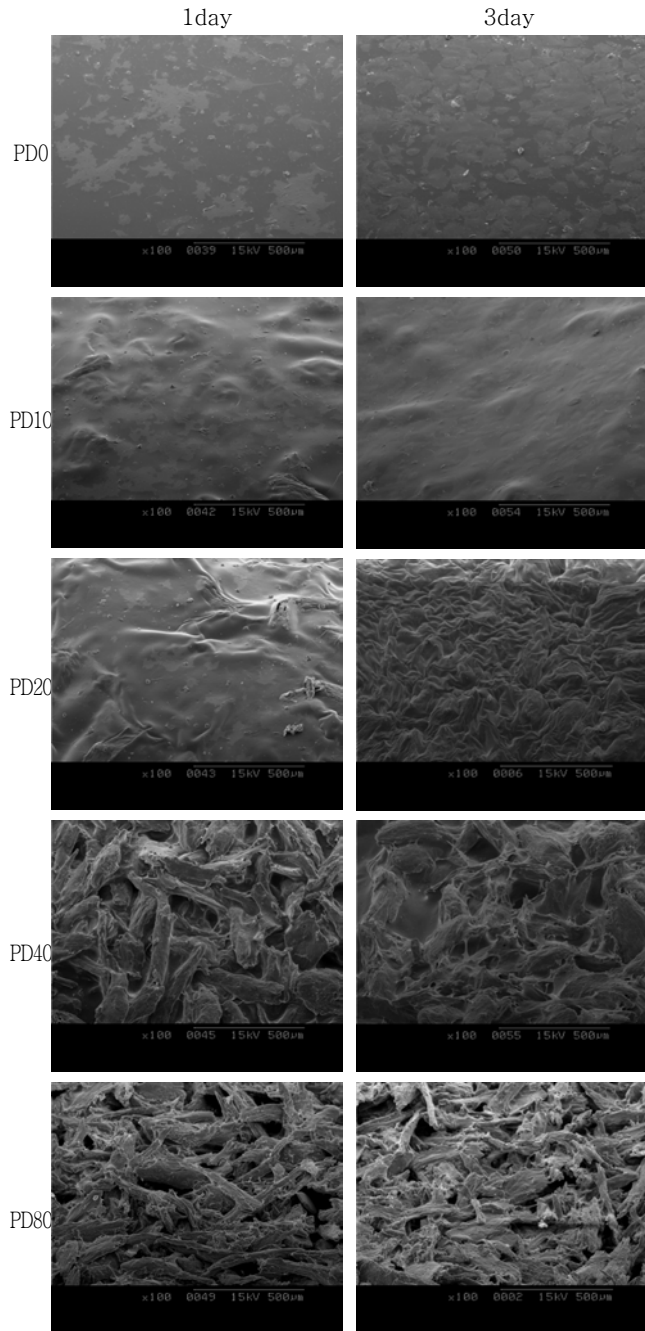
결과적으로 디스크 세포의 세포외기질에서 발생하는 제 1 및 2형



**Figure 7.** SEM microphotographs of annulus fibrosus (AF) cells on surfaces on PLGA and DBP/PLGA hybrid film (magnification;  $\times 100$ , scale bar; 500  $\mu$ m).

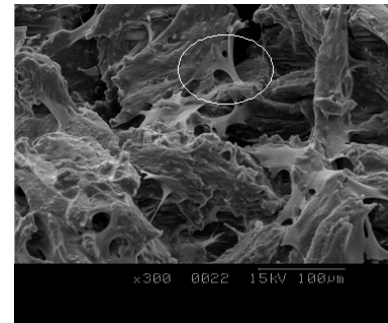
교원질과 같은 디스크 세포의 특이적 유전자의 발현은 1일째 발현 정도와 3일째의 발현정도를 미루어보면 지속적인 발현이 유지될 것으로 사료되며 장기적인 관점에서 볼 때 DBP의 함량이 20%인 DBP/PLGA 하이브리드 필름에서 더 우세한 디스크 세포 고유의 표현형을 유지하는 것을 확인하였다.

**PLGA 및 DBP/PLGA 필름에서의 디스크 세포의 거동 확인.** SEM을 통하여 DBP 함량에 따른 필름 표면에서 AF 및 NP 세포의 거동을 확인하였으며 이를 각각 Figures 7과 8에 나타내었다. AF 및 NP

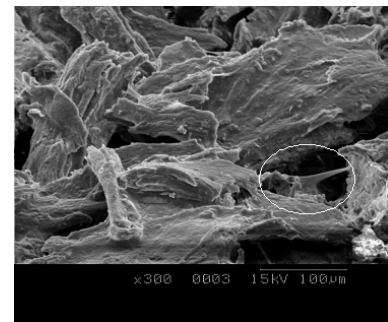


**Figure 8.** SEM microphotographs of nucleus pulposus(NP) cells on surfaces on DBP/PLGA hybrid film(magnification: x100, scale bar; 500 µm).

두 가지 세포 모두 세포의 부착도 및 세포수의 양상은 앞서 세포의 계수결과와 연관성 있는 경향을 보임을 확인하였으며 두 세포가 유사한 경향성을 보였다. 초기에는 두 세포가 모두 막 부착되기 시작하며 필름 표면에 완벽히 밀착하여 부착하는 양상을 보였다. 또한 계수결과와 같이 PLGA, 10% 및 20%의 DBP 함량을 가진 필름에서 더 많은 세포가 부착된 것을 확인하였다. 또한 3일째의 SEM 측정 결과도 DBP의 함량이 10% 및 20%인 DBP/PLGA 필름에서 많은 수의 세포 돌기와 세포의 운동 및 신장이 일어날 때 작용하는 세포 기관인



(a)



(b)

**Figure 9.** SEM microphotographs of (a)annulus fibrosus(AF) and (b)nucleus pulposus(NP) cells on surfaces on 80% DBP/PLGA hybrid film on culturing for 3 days.

filopodia 및 lamellipodia가 잘 발달되어 있어 세포의 상태가 다른 실험군에 비해 활동적임을 확인하였으며 뚜렷한 세포수의 증가를 확인하였다. 이는 적절한 양의 DBP가 세포에 제공하는 환경이 세포의 부착을 유도하여 세포의 이주 및 증식에 영향을 준 것으로 판단된다. 반면 DBP의 함량이 40% 및 80%의 DBP/PLGA 필름에서는 육안으로 관찰되는 세포의 수가 적게 나타났는데 이를 확인하고자 배율을 증가시켜 촬영을 하여 Figure 9에 나타내었다. 이는 80% DBP가 함유된 필름 위에서 배양 3일의 AF 및 NP 세포를 나타낸 것으로 DBP의 입자를 따라 세포가 부착되어 있고 간헐적으로 보이는 세포의 기질(흰 원으로 표시)이 세포가 부착되어 있음을 지시해주고 있다. DBP 자체가 세포의 부착을 증진시키지만 과량의 DBP는 표면에 강한 거침도와 굴곡을 제공하여 10% 및 20%에 비하여 세포의 부착을 불균형적이게 함을 알 수가 있었다.

## 결론

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLGA에 연골, 골 및 디스크의 재생을 유도하는 생체재료인 DBP를 함량별로 첨가하여 소수성의 특성을 개선하고 표면에 생활성을 부여하여 추간판디스크 세포의 초기 부착 및 표현형 유지에 최적환경을 설정하고자 하였다.

용매증발법으로 제조된 PLGA, DBP/PLGA 필름은 캐스팅하는 유리접시의 모양과 크기, 고분자 용액의 농도 및 양을 조절하면 손쉽게 필름의 두께와 모양, 크기를 조절할 수 있으며, 제조된 PLGA 필름은 매끄러운 표면을 가짐을 확인하였으며 DBP/PLGA 필름에서는 DBP

의 함량이 증가함에 따라 거침도가 증가하는 것을 확인하였다. 물리적인 관점에서 볼 때 DBP가 첨가되면 표면의 자유에너지가 증가하여 세포의 초기 부착에 영향을 줄 것으로 판단되었으며, 친수성의 특성을 제공하는 DBP는 상대적으로 낮은 계면에너지를 제공하여 높은 표면적심성과 수분 흡수율을 제공할 것으로 예상되었다. 하지만 80%와 같은 과량의 DBP 함량은 PLGA의 유연성 및 굽힘강도를 감소시키며 불규칙한 표면 거침성 정도는 세포의 부착 및 증식에 부정적 결과를 초래하는 것으로 드러났다.

따라서 세포의 초기 부착도 및 증식률은 과량이 아닌 10% 또는 20%의 적정수준의 DBP 함량에서 우세한 것을 확인하였고, 유전자 발현의 결과에서는 DBP의 함량이 20%인 경우에 특이적 유전자의 발현이 지속적으로 증가할 것으로 예상되어 이러한 결과는 향후 조직 공학적 DBP/PLGA 복합체의 설계에 있어서 중요한 인자로 작용할 것으로 사료된다. 현재 DBP/PLGA 하이브리드 필름에서의 AF 및 NP 세포의 교원질, 히드록시플로린 및 글루코스아미노글라이칸의 합성 정도 확인하는 등의 생화학적 분석을 통해 명확한 DBP 함유량의 최적조건 설정에 대한 연구가 진행중에 있다.

**감사의 글 :** 본 연구는 세포융용사업단(SC3100)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- H. G. Gruber, T. L. Johnson, K. Lesile, J. A. Ingram, D. Martin, G. Hoelscher, D. Banks, L. Phieffer, G. Coldham, and E. N. Hanley, *Spine*, **27**, 1626 (2002).
- Y. K. Ko, S. H. Kim, H. J. Ha, M. S. Kim, C. W. Han, Y. Son, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 67 (2007).
- B. A. Maldonado and T. R. Oegema, *J. Orthop. Res.*, **10**, 677 (1992).
- K. Chiba, G. B. Andersson, K. Masuda, and E. J. Thonar, *Spine*, **22**, 2885 (1997).
- H. E. Gruber, E. C. Fisher, B. Desai, A. A. Stasky, G. Hoelscher, and E. N. Hanley, *Exp. Cell Res.*, **235**, 13 (1997).
- H. Wilda and J. E. Gough, *Biomaterials*, **27**, 5220 (2006).
- W. B. Tsai, C. H. Chen, J. F. Chen, and K. Y. Chang, *J. Mater. Sci. Med.*, **17**, 337 (2006).
- S. J. Lee, G. Khang, J. H. Lee, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 877 (2000).
- K. S. Park, S. M. Kim, M. S. Kim, I. Lee, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **30**, 455 (2006).
- S. L. Ishaug-Riley, L. E. Okun, G. Prado, M. A. Applegate, and A. Ratcliffe, *Biomaterials*, **20**, 2245 (1999).
- K. C. Dee, T. T. Anderson, and R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 371 (1998).
- M. Lampin, L. C. Warocquier-Clerout, M. Degrange, and M. F. Sigot-Luizard, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 99 (1997).
- X. S. Wu, in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Marcel Dekker, New York, vol. **1**, p. 1015 (1995).
- A. G. Mikos, M. D. Lyman, L. E. Freed, and R. Langer, *Biomaterials*, **15**, 55 (1994).
- S. Sagnella, E. Anderson, N. Sanabria, R. E. Marchant, and K. Kottke-Marchant, *Tissue Eng.*, **11**, 226 (2005).
- Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
- G. Khang, M. S. Kim, B. H. Min, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2006).
- S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, M. S. Kim, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 179 (2007).
- J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 382 (2004).
- J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, J. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2005).
- 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).
- M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1981).
- B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yun, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. Son, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).
- H. J. Ha, S. H. Kim, S. J. Yoon, Y. K. Ko, E. K. Lee, Y. Son, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 416 (2006).
- H. Kranz, N. Ubrich, P. Maincent, and R. Bodmeier, *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1558 (2000).
- W. L. Webber, F. Lago, C. Thanos, and E. Mathiowitz, *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 18 (1998).
- S. H. Kim, K. S. Park, B. C. Choi, H. J. Ha, J. M. Rhee, M. S. Kim, Y. S. Yang, H. B. Lee, and G. Khang, *Adv. Exper. Med. Biology.*, **585**, 209 (2006).
- J. C. Gan, P. Ducheyne, E. J. Vresilovic, and I. M. Shapiro, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **411**, 315 (2003).