

Alginate/PLGA 미립구에 대한 인간디스크 세포 부착 효과

이준희 · 장지욱 · 소정원 · 최진희 · 박종학 · 안식일 · 손영숙* · 민병현** · 강길선†

전북대학교 BK-21 고분자 BIN융합연구팀, *경희대학교 생명과학대학, **아주대학교 세포치료센터
(2008년 4월 24일 접수, 2008년 6월 4일 수정, 2008년 8월 6일 채택)

Adhesion of Human Intervertebral Disk Cells on Alginate/PLGA Microspheres

Jun Hee Lee, Ji Wook Jang, Jeong Won So, Jin Hee Choi, Jong Hak Park,
Shik il Ahn, Young Suk Son*, Byoung-Hyun Min**, and Gilson Khang†

BK21 Polymer BIN Fusion Res. Team, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

*College of Life Science, Kyung Hee University, Gyeonggi, Youngin 446-701, Korea

**Cell Therapy Center, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-721, Korea

(Received April 24, 2008; Revised June 4, 2008; Accepted August 6, 2008)

초록: PLGA미립구는 주사제형과 같은 형태로 조직공학적 응용에 이용할 수 있다. 본 연구에서는 미립구 제조시 에멀전 형성조건에 대한 영향과 미립구 표면에 세포를 부착시키는 방법에 대하여 연구하였다. BSA를 함유하는 PLGA미립구는 수중유형(O/W)과 수중유중수형(W/O/W) 용매증발법을 이용하여 제조하였다. 미립구의 초기방출효과제어와 PLGA분해의 과정에서 발생하는 지연시간을 개선시키기 위하여 알긴산나트륨을 수상에 용해시켜 사용하였다. 미립구에 부착된 세포의 형태를 전자주사현미경(SEM)을 이용하여 분석하였고 PLGA미립구에 배양된 인간디스크세포의 증식은 MTT분석을 이용하였으며 이를 통하여 PLGA미립구 표면에 세포가 부착되었음을 확인하였다. 본 연구는 BSA가 함유된 알긴산/PLGA미립구를 이용하여 조직공학적 응용이 가능한 주사제형으로서의 가능성을 제안하였다.

Abstract: PLGA microspheres have been known as an injectable system for tissue engineering. The purpose of this study was to investigate the condition of emulsion formation and cell adhesion on the microsphere surface. BSA-loaded PLGA microsphere was fabricated by oil-in-water (O/W) and water-in-oil-in-water (W/O/W) solvent evaporation method. Sodium alginate was dissolved in water phase to control initial burst release and to improve lag time by PLGA bulk degradation. In addition, the morphology of cells attached on the microspheres was studied using a scanning electron microscopy (SEM). Cellular proliferation behavior of human disc cells cultivated on PLGA microspheres was analyzed using a MTT assay. MTT assay revealed that the cells can attach and proliferate on PLGA microspheres. According to these results, we concluded that BSA-loaded alginate/PLGA microspheres can be used as an injectable system for tissue engineering application.

Keywords: alginate, PLGA, microsphere, cell adhesion, initial burst.

서 론

지난 이십 여년간 의학적 응용을 위한 생체재료의 특성이 생체안정성에서 생분해성으로 패러다임이 변화하고 있다. 이러한 연구동향을 기초로 일시적인 치료를 위해 사용되는 인공 보철물 등이 생분해성 장치로 대체될 수 있을 것으로 예상할 수 있다.^{1,2}

현재 조직의 재생과 치료에 효과가 있는 약물을 담지시켜 이용할 수 있는 방법으로는 생분해성 고분자를 이용한 지지체,³⁻⁵ 미립구⁶⁻⁸ 및 전기방사법에 의한 생분해성 고분자 나노섬유 등이⁹⁻¹¹ 있다. 이러한

방법들 중에서 생분해성 고분자를 이용하여 제조한 약물을 포함하는 미립구는 뼈나 연골 및 피부 등의 크게 손상된 조직 또는 기관에 적용하는 조직공학적 응용에 유망한 방법이 될 수 있다고 보고되고 있다.¹²⁻¹⁴

약물을 포함하는 고분자 미립구의 특성은 고분자의 분자량, 전하 및 용해도와 같은 약물의 물리화학적 특성, 수중유형(O/W; oil-in-water), 유중수형(O/W, water-in-oil) 및 수중유중수형(W/O/W; water-in-oil-in-water)과 같은 에멀전의 형성방법에 따라 영향을 받게 되며¹⁵ 특히, 이러한 에멀전을 형성시키기 위해서 사용한 유기용매의 용매제거 방법(증발 및 추출)에 따라서 미립구의 형태와 내부구조가 변화될 수 있다.^{16,17} 또한, 사용한 고분자의 농도 및 종류에 따라서

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

약물의 방출속도가 변화될 수 있으며 다양한 방법을 이용하여 수십 나노에서부터 수백마이크로까지 미립구의 크기가 조절되고 미립구의 크기에 따라 약물의 방출이 크게 변화될 수 있다.¹⁸ 본 연구에서는 미립구를 제조하기 위해 일차적으로 준비되는 에멀전의 형성방법에 따라서 미립구의 내부구조가 달라지며 이로 인해 미립구의 밀도가 달라지는 것을 확인하였다. 또한, 본 연구를 진행하면서 펩티드 약물이나^{19,20} 단백질약물^{21,22} 및 저분자량 약물 등^{17,18} 사용약물의 종류에 따라 에멀전을 형성하는 방법이 달라져야 한다는 것을 확인할 수 있었다.

전보에서는²³ 생분해성 고분자인 PLGA를 이용하여 O/W 에멀전 형성 방법을 이용하여 에멀전을 형성시키고 약물을 포함하지 않는 미립구를 제조하였다. 제조된 미립구는 다양한 분포의 크기를 가지므로 미립구의 크기에 따른 인간디스크 세포의 증식 및 표현형을 분석하였다. 본 연구에서는 미립구의 분자량이 증가함에 따라서 증가되는 밀도에 의해 세포배양액에 더 빨리 가라앉아 빠른 시간내에 미립구가 매트릭스를 형성시켜 미립구 매트릭스에 대한 세포의 부착능력이 증가하는 것을 확인하였다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 결과들을 바탕으로 모델 약물로서 단백질인 BSA를 포함하는 미립구를 제조하였다. 단백질 약물을 미립구 내에 포접시키기 위한 많은 연구들이 보고되고 있으나 미립구 제조시 유기용매의 사용으로 인해 단백질약물이 분해되어 효력을 잃게 되기 쉬우므로 포접시키기가 까다롭고 높은 함량으로 포접시켰다 하더라도 방출기간 동안 변성된 단백질 약물에 의하여 완전한 방출을 얻기 어려운 경우가 존재하였다.²⁴⁻²⁶ 이러한 문제를 해결하고 약물을 효과적으로 포접시키기 위해 천연 고분자인 알긴산나트륨을 이용하였다. 알긴산 나트륨은 미립구를 제조할 때 일차적으로 만들어야 할 에멀전을 형성시킬때 수용액내에 용해시켰으며 이때 단백질 약물이 용해되어 있는 수상(W₁상)의 점도를 증가시켜 유기용매가 포함되어 있는 유상(O상)과의 계면에 단백질 약물의 접촉을 감소시킴으로써 단백질약물의 변성을 감소시키기 위하여 사용하였다. 또한, 미립구를 제조할때 첨가제를 사용함에 따라서 미립구 내에 포접된 약물의 방출이 빨라지게 되므로 PLGA를 이용하여 제조한 미립구의 분해과정에서 발생하는 지연시간을 개선하였다.

실 험

시약 및 재료. PLGA는 Resomer™ RG 756(M_w; 33000 g/mole, lactide/glycolide mole ratio, 75/25, Boehringer Ingelheim, Germany) 과 RG 502H(M_w; 8000 g/mole, lactide/glycolide mole ratio, 50/50, boehringer ingelheim, Germany) 제품을 사용하였다. 알긴산 나트륨(Sodium alginate)은 Hayashi Pure Chemical Industries LTD. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 미립구 제조시 에멀전 형성을 위한 계면활성화제는 폴리비닐알코올(PVA, M_w; 85000-124000 g/mol, 87-89% hydrolyzed)로서 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 단백질 약물 모델로서 사용한 BSA(96%, Electrophoresis)는 Sigma에서 구입하여 사용하였고 단백질 정량은 BCA 분석법을 이용하였으며 SMART™ BCA Protein Assay Kit (Intron, Korea)를 사용하였다. 본 연구에 사용한 용매 및 기타 시약은 HPLC 등급을 이용하였다.

미립구의 제조. BSA를 함유하는 미립구는 Table 1에 제시한 알긴

Table 1. The Preparation Condition of Microspheres

Batch no.	BSA (w/v%)	Sodium alginate (w/v%)	8 K PLGA (w/v%)	33K PLGA (w/v%)	Method
a	4	0	10	-	O/W
b	4	0.05	10	-	W/O/W
c	4	0.05	-	10	W/O/W

산 나트륨 첨가여부, PLGA 분자량의 차이 및 제조 방법(수중유형; O/W, 수중유중수형; W₁/O/W₂)에 따라서 용매증발방법으로 제조하였다.^{27,28} 먼저 W/O/W의 경우, 0.5 w/v% PVA 용액에 알긴산 나트륨 0.5 w/v%와 모델 약물인 BSA를 첨가하여 W₁을 제조하고 PLGA 10 w/v%는 3 mL의 DCM을 이용하여 유기용액상을 제조하였다. 앞서 제조한 W₁을 0.5 mL 취하여 유기용액상에 첨가하고 초고주파 분쇄기(Sonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 출력 30%에서 30초 동안 초음파 분쇄하였다. 계속해서 형성된 W₁/O 에멀전을 0.5 w/v% PVA 100 mL로 구성된 W₂에 500 rpm으로 교반하면서 피펫을 이용한 적하를 통하여 에멀전을 형성시켰다. 본 실험에서 이용한 물리적 교반기로는 RZR 2102(Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany)을 사용하였으며 교반시간은 5시간 이상 실시하여 유기용매를 완전히 증발시키고자 하였다. O/W의 경우, BSA와 PVA가 용해된 수용액을 500 rpm으로 교반하면서 PLGA가 용해된 유기용액상을 적하시켜 제조하였다. 이렇게 얻어진 미립구는 표면에 존재하는 약물과 PVA를 제거하기 위하여 0.9 w/v% NaCl을 이용하여 수회 세척하였고 동결건조방법을 이용하여 건조하여 4 °C에서 보관하였다.²⁹

디스크 세포의 배양. 디스크 세포는 절제 수술을 하는 기부자로부터 0.5 g의 추간관 디스크조직을 제공받아 0.25 wt%의 콜라게네이즈A(Roche Indianapolis, IN, USA) 용액을 처리하여 섬유륜세포와 수핵세포가 혼합된 형태의 세포를 얻었다. 이들 세포를 10% 우태아혈청(FBS, Gibco BRL)과 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)가 함유된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco BRL, USA) 및 F-12 배지(Ham's F-12, Gibco BRL) 혼합액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었으며, 7일 마다 계대배양하였다.³⁰

디스크 세포 파종. 제조된 미립구는 70 v/v% 에탄올을³¹ 이용하여 1시간 동안 멸균한 후 미립구의 적심성 증가에 의한 빠른 침지를 위하여 24시간 동안 PBS를 이용하여 클린벤치에서 사전적심과정을 거쳤다. 배양한 디스크 세포를 7대 계대배양 후 8대 계대배양시에 트립신을 이용하여 수확하였으며 지지체당 1×10⁵ 세포/지지체의 농도로 파종하였다.

미립구의 모폴로지 관찰. LV-SEM(Model: S-3000N, HITACHI Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 제조된 미립구의 표면과 내부의 형태를 확인하였다. SEM 사진 촬영을 위하여 시료를 금속판 위에 고정시키고 백금 코팅을 실시하였다. 코팅이 완료된 시료는 전자현미경을 이용하여 5 kV에서 관찰하였다. 또한, 미립구 표면에 존재하는 세포를 관찰하기 위하여 글루타알데하이드를 이용하여 고정하고 에탄올을 이용하여 50%에서 100%까지 에탄올의 농도를 증가시키면서 탈수한

후 SEM 사진 측정에 이용하였다.³²

MTT 분석. 배양된 세포를 미립구에 과중한 후 1, 3, 7일 및 14일 시간 간격으로 5 mg/mL 농도의 MTT(3-[4,5-디메틸시아졸-2-일]-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma Co.) 용액을 첨가하고, 4시간 동안 5% CO₂하에 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma Co.) 용액을 2 mL씩 넣어 2시간 동안 교반하였다. 결정 용해액을 96 웰플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.³³

생체의 방출분석. 제조한 이중층 미립구는 완충용액에서 분산이 늦고 적십성이 낮은 현상이 존재한다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 0.02 w/v% Tween 80을 이용하여 미립구를 완충용액에 분산시키고 미립구와 완충용액간의 친화력을 증가시켜 빠른 시간 안에 가라앉게 하여 생체 외에서 14일 동안 BSA 방출을 관찰하였다.²⁸ 0.02 w/v% Tween 80을 포함하는 1 mL의 PBS 용액에 미립구 (10 mg 미립구/1 mL PBS)를 넣어 현탁하고 인큐베이터 안에서 37 °C와 70 rpm을 유지시키면서 일정 기간별로 시료를 취하여 BCA 분석법을³⁴ 이용하여 570 nm에서 방출되는 BSA를 정량하였다.

결과 및 토론

생분해성 미립구 제조. 본 연구에서는 Table 1에서 볼 수 있듯이 알긴산나트륨의 첨가여부, PLGA의 분자량에 대한 영향 및 제조 방법을 달리하여 미립구를 제조하였다. Figure 1은 본 연구에서 사용한 생분해성 및 생체적합성을 갖는 물질로서 천연고분자로는 알긴산나트륨, 합성고분자로는 PLGA를 이용하였다. 알긴산 나트륨은 미립구 제조과정에서 BSA가 용해된 수상에서 BSA의 안정성 증가를 위하여 첨가하였으며 생체의 방출 거동시 초기방출률과 PLGA 분해과정에서 발생하는 지연시간을 개선하기 위하여 첨가하였다.

세포가 배양된 미립구의 표면관찰. 8 K PLGA를 이용하여 제조한 미립구의 표면은 Figure 2(a)에 제시하였으며 33 K PLGA를 이용하여 제조한 미립구의 표면은 Figure 3(a)에 제시하였다. 분자량의 차이에 따라서 미립구의 크기에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었으며 크기는 100 µm 내외로 이루어져 있음을 SEM 사진을 통하여 분석하였다. 또한 제조한 미립구에 아무런 처리를 하지 않았

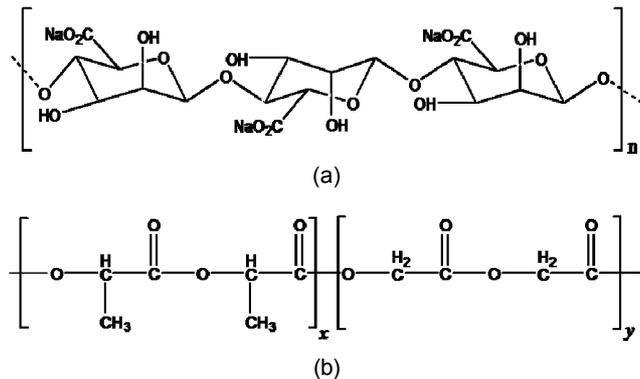


Figure 1. The chemical structure of materials: (a) Sodium alginate and (b) PLGA.

을 경우 각각 매끄러운 표면을 갖고 있었으며 구형을 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, Figures 2와 3(b),(c)에서 볼 수 있듯이 미립구와 세포를 함께 배양한 배양액을 제거하고 SEM 사진을 측정하기 위하여 에탄올을 이용한 탈수과정을 거칠 때는 에탄올을 이용한 탈수과정을 거치지 않은 Figure 2와 3(a)와 달리 미립구의 표면이 다소 일그러지며 다공이 생기는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 분

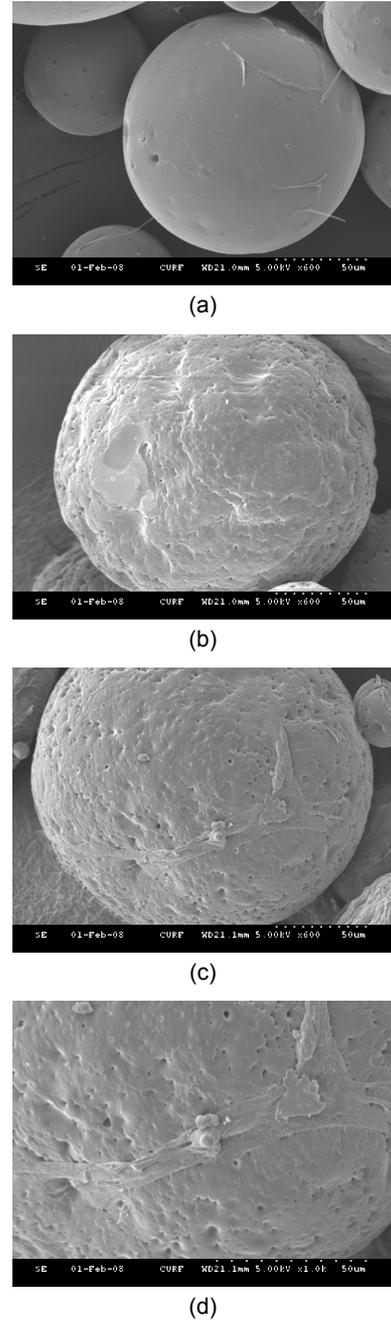
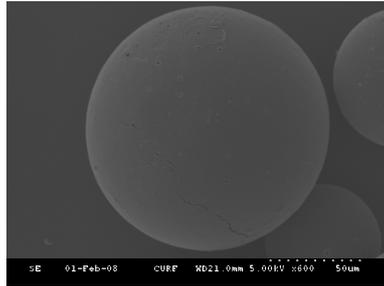
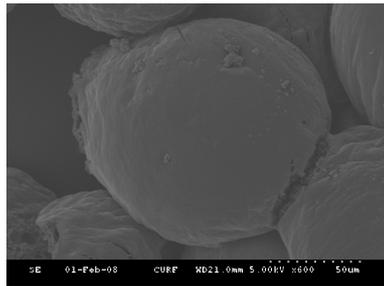


Figure 2. SEM image of human disc cell adhesion on 8 K PLGA microspheres after 3 days: (a) control; (b) microsphere dehydrated using ethanol after 3 days(only DMEM); (c) microsphere dehydrated using ethanol after 3 days(DMEM with human disc cell); (d) magnified image of microsphere dehydrated using ethanol after 3 days(DMEM with human disc cell).

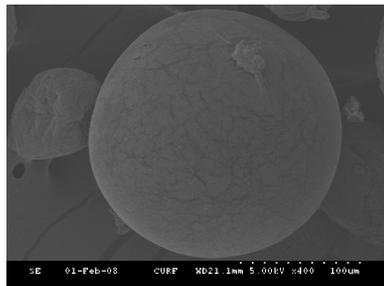
자량 8 K의 미립구는 33 K의 미립구보다 표면변화가 심한 것으로 보아 분자량이 작을수록 고분자의 밀도 및 물리화학적 특성이 상대적으로 낮아져 분자량이 낮은 미립구에서 표면변화가 더욱 크게 나타난 것으로 사료된다. Figures 2와 3(d)는 미립구와 인간디스크 세포를 함께 배양했을때, 미립구 표면에 인간디스크 세포가 부착된 모습을 보여주고 있다. Figures 2와 3의 결과에서 볼 수 있듯이 미립구와 세포를 함께 배양할때 33 K 이상의 분자량과 10 w/v%의 농도에



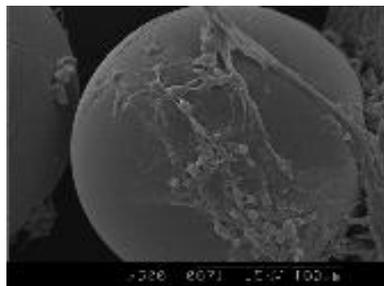
(a)



(b)



(c)



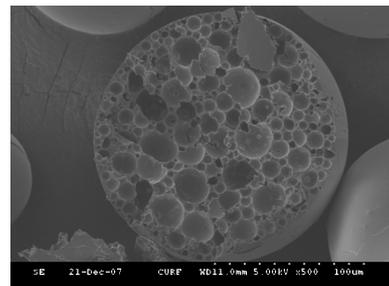
(d)

Figure 3. SEM image of human disc cell adhesion on 33 K PLGA microspheres after 3 days: (a) control; (b) microsphere dehydrated using ethanol after 3 days (only DMEM); (c) and (d) microsphere dehydrated using ethanol after 3 days (DMEM with human disc cell).

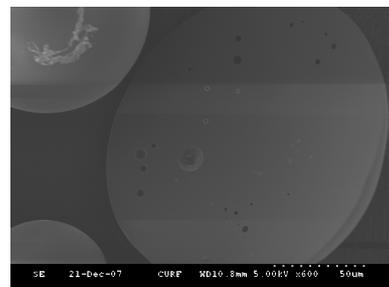
서 미립구에 세포가 보다 효율적으로 부착하게 되어 미립구를 조직 공학적으로 이용할 수 있을 것으로 확인하였다. 또한, 약물이 포접된 미립구를 이용하여 세포를 배양했을때 빠른 시간 내에 미립구표면에 다량의 세포가 부착되도록 하기 위하여 화학적인 표면개질과 같은 추가 연구가 필요하며 미립구와 세포를 함께 배양했을때 포접된 약물로 인하여 세포가 어떠한 영향을 받을지도 추가로 연구되어야 할 부분이다.

제조방법에 따른 미립구의 내부구조 분석. 본 연구에서는 수중유중수형(W/O/W)과 수중유형(O/W) 에멀전을 이용하여 BSA를 포접하는 미립구를 제조하였다. Figure 4의 SEM사진에서 볼 수 있듯이 W/O/W로 제조한 미립구는 내부가 높은 다공성 구조로 인하여 낮은 밀도를 갖고 있는 반면에 O/W로 제조한 미립구는 다공이 거의 존재하지 않는 고밀도로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. 미립구 내부가 다공성을 갖을수록 미립구의 방출기간 동안에 단백질 약물의 변성을 줄여주어 완전한 방출이 이루어질 수 있다고 보고되고 있다.^{35,38} 따라서, 에멀전 형성과정에서 H₂O₂와 같은 발포제나 유기상을 용해시킬 수 있는 폴록사머 유도체의 첨가 없이 미립구를 제조하기 위해서는 8 K 보다 상대적으로 높은 분자량을 갖는 33 K PLGA를 이용하여 W/O/W방법으로 에멀전을 형성시키는 것이 적합할 것으로 사료된다.³⁶⁻³⁸

세포증식을 분석. 미립구와 인간디스크 세포를 14일 동안 함께 배양한 이후에 미립구 표면에 존재하는 세포의 증식을 거동을 확인하기 위하여 1, 3, 7 및 14일에 각각 시료를 준비하여 MTT 분석을 실시하였다. 에멀전 형성 방법에 따른 세포증식률은 Figure 5(a),(b)에서 확인할 수 있다. 결과에서 볼 수 있듯이 초기 3일간 증가하다 다시 7일째 감소하였으며 14일째 다소 증가함을 확인할 수 있었다. 분자량 8 K의 미립구는 낮은 밀도로 인하여 초기 7일째까지는 적실성이 낮아 배양액에 잘 가라앉지 않으므로 세포의 증식이 어려우나 그 이후에는 미립구가 침전하여 매트릭스를 형성시키며 세포증식률이 다소 증가함으로 사료된다. 또한, 이러한 결과값은 오차범위를 고려하여



(a)



(b)

Figure 4. The crosssection image of microspheres fabricated with two different methods: (a) W/O/W method and (b) O/W method.

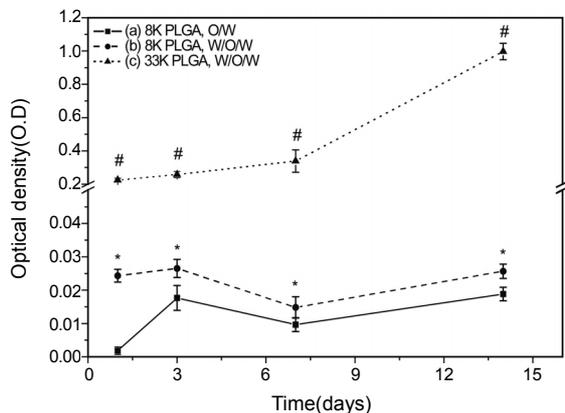


Figure 5. MTT assay of human disc cell culture on PLGA microspheres during 14 days: * denotes significant difference compared with (a) 8K PLGA, and O/W of samples; # denotes significant difference compared with (b) 8K PLGA, W/O/W of samples (* and #, $p < 0.05$).

Student t-test ($p < 0.05$) 수행결과 (a)와 (b) 사이에 유의성있는 차이를 나타내었다.^{23,39,40} 이러한 결과를 바탕으로 에멀전 형성방법에 따라 O/W보다는 W/O/W 방법을 이용했을 때 미립구와 세포의 친화력이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

한편 분자량에 따른 증식률의 차이는 Figure 5에서 (b)의 증식률 대비 (c)의 증식률의 Student's t-test ($p < 0.05$)를 통하여 알 수 있었다. (b)의 증식률 대비 (c)의 증식률에서는 고분자의 분자량에 따른 차이로 상대적으로 분자량이 높은 33 K PLGA가 8 K PLGA의 경우 월등히 높은 세포증식률을 확인할 수 있었다. 분자량을 33 K로 증가시키게 되면 증가된 분자량으로 인해 상대적으로 밀도가 높아지기 때문에 초기에 미립구가 세포배양액에 더 빨리 가라앉아 단일매트릭스를 형성하여 8 K PLGA 보다 더 높은 세포증식률을 갖는 것으로 확인되었다.

알긴산나트륨 첨가에 따른 초기약물방출 및 지연시간개선. Figure 6에 알긴산나트륨 첨가와 분자량에 따른 초기약물방출 및 지연시간의 변화를 나타내었다. Figure 6(a)와 (b)에서 볼 수 있듯이 O/W보다 W/O/W로 에멀전을 형성시켰을 때 14일 내에 PLGA 분해과정에서 발생하는 지연시간이 단축되어 BSA의 방출속도가 제어될 수 있음을 확인하였다. 또한, Figure 6(c)에서 볼 수 있듯이 33 K로 PLGA의 분자량을 증가시켰음에도 불구하고 저분자량인 8 K PLGA로 제조한 O/W형 미립구(Figure 6(a))보다 BSA 방출속도가 더 빠른 것을 알 수 있었다. 이는 알긴산나트륨을 첨가함에 의해 미립구내에 다공성 구조를 형성시켜 미립구의 지연시간을 개선시키고 지속적으로 높은 분자량을 갖는 BSA를 방출시키는 것으로 판단된다. 이러한 결과를 바탕으로 약물을 포함하고 있는 미립구를 제조하기 위해서는 W/O/W 에멀전 형성 방법이 적합하며 세포와 미립구의 친화력을 증가시키기 위해서는 PLGA의 물성을 변화시키지 않는 범위내에서 고분자 표면에 생물학적 표면처리, 공유결합성 코팅, 기상증착, 물리적 코팅, 화학적 처리방법 등⁴¹ 표면을 개질하는 방법이 필요함을 확인할 수 있었으며 알긴산 나트륨에 의하여 PLGA에서 존재하는 지연시간을 개선시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 상대적으로 낮은 분자량인 8 K와 33 K를 이용한 것

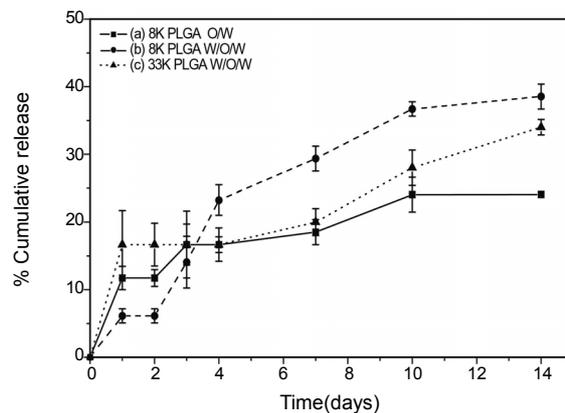


Figure 6. The initial burst and lag time in BSA release from PLGA microspheres: (a) 8 K PLGA microsphere (O/W); (b) alginate/8 K PLGA microsphere (W/O/W); (c) alginate/33 K PLGA microsphere (W/O/W).

은 높은 분자량의 PLGA를 이용하여 약물을 포접하는 미립구를 제조하면 PLGA의 벌크분해에 의해 분자량이 높을수록 길게는 한 달 이상 약물이 방출되지 않는 지연시간이 계속되기 때문에 이러한 단점을 개선하고자 낮은 분자량을 이용하여 제조하였다.²⁸ 낮은 분자량의 PLGA를 이용하여 단백질인 BSA의 지연시간과 방출을 개선할 수 있었던 반면에 낮은 물성으로 인하여 에탄올로 처리할 때 미립구의 형태가 일그러질 수 있음을 확인하였다.

결론

본 연구에서는 생분해성 합성고분자인 PLGA와 천연고분자인 알긴산나트륨을 이용하여 O/W 및 W/O/W 에멀전 형성 방법을 이용하여 미립구를 제조할 수 있었다. 제조된 미립구는 매끄러운 표면과 구형을 이루고 있었으며 에탄올을 이용하여 탈수시킬 때, 낮은 분자량의 PLGA에서는 미립구의 형태가 변형될 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 인간디스크 세포를 이용하여 미립구와 함께 배양하였을 때 14일간 증식률 거동을 확인한 결과 33K PLGA를 이용하여 W/O/W 방법으로 에멀전을 형성시켜 제조한 미립구가 더 높은 세포 친화력을 보임을 볼 수 있었다. 이는 미립구 제조시 미세한 차이, 표면구조 및 세포가 부착할 수 있는 표면적에 따라서 세포증식률이 변화된 것으로 사료된다.²³ 이러한 결과들을 바탕으로 주사제로서 미립구에 세포를 도입하게 할 경우 미립구의 외부와 내부의 형태학적 고찰이 필수적이며 에탄올을 사용할 때 미립구 표면이 변화되고 미립구간에 응집되는 성질을 이용하여 미립구로 이루어진 지지체를 제조하는 방법을 개발하는 중이다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부의 근골격계 바이오 장기센터 (0405-BO01-0204-0006), 교육과학기술부 (2008-0356, F104AA010006-07A0101-00610) 및 세포융용사업단(SC4110)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. Piskin, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **6**, 775 (1995).
2. L. S. Nair and C. T. Laurencin, *Pro. Polym. Sci.*, **32**, 762 (2007).
3. G. Khang, J. H. Jeon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **23**, 471 (1999).
4. M. K. Choi, G. Khang, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 318 (2001).
5. E. K. Jeon, H. J. Whang, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
6. T. G. Park, H. Y. Lee, and Y. S. Nam, *J. Control. Release*, **55**, 181 (1998)
7. S. H. Choi and T. G. Park, *Int. J. Pharm.*, **203**, 193 (2000).
8. H. J. Chung and T. G. Park, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **59**, 249 (2007).
9. B. Bondar, S. Fuchs, A. Motta, C. Migliaresi, and C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials*, **29**, 561 (2008).
10. S. Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, and K. W. Leong, *Biomaterials*, **29**, 653 (2008).
11. S. J. Lee, S. H. Oh, J. Liu, S. Soker, A. Atala, and J. J. Yoo, *Biomaterials*, **29**, 1442 (2008).
12. M. J. Mahoney and W. M. Saltzman, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1356 (1996).
13. J. P. Benoit, N. Faisant, M. C. Venier–Juliene, and P. Menei, *J. Control. Release*, **65**, 285 (2000).
14. S. M. Willerth and S. E. Sakiyama–Elbert, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **59**, 325 (2007).
15. N. Nihant, C. Schugens, C. Grandfils, R. Jerome, and P. Teyssile, *Pharm. Res.*, **11**, 1479 (1994).
16. C. Schugens, N. Laruelle, N. Nihant, C. Grandfils, R. Jerome, and P. Teyssie, *J. Control. Release*, **32**, 161 (1994).
17. F. Gabor, B. Ertl, M. Wirth, and R. Mallinger, *J. Microencapsul.*, **16**, 1 (1999).
18. P. Sansdrap and A. J. Moes, *Int. J. Pharm.*, **98**, 157 (1993).
19. P. Couvreur, M. J. Blanco–prieto, F. Puisieux, B. Roques, and E. Fattal, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **28**, 85 (1997).
20. R. Jeyanthi, R. C. Metha, B. C. Thanoo, and P. P. Deluca, *J. Microencapsul.*, **14**, 163 (1997).
21. S. Cohen, T. Yoshioka, M. Laucarelli, L. H. Hwang, and R. Langer, *Pharm. Res.*, **8**, 713 (1991).
22. L. Meinel, O. E. Illi, J. Zapf, M. Malfanti, H. P. Merkle, and B. Gander, *J. Control. Release*, **70**, 193 (2001).
23. J. W. So, S. H. Kim, M. O. Baek, Y. Y. Lim, H. W. Roh, N. R. Lee, M. S. Kim, G. H. Ryu, Y. Cho, S. J. Lee, B. H. Min, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 577 (2007).
24. H. Jeffery, S. S. Davis, and D. T. O'Hagan, *Pharm. Res.*, **10**, 362 (1993).
25. H. Sah, R. Toddywala, and Y. W. Chien, *J. Control. Release*, **30**, 201 (1994).
26. H. Marchais, F. Boury, C. Damge, J. E. Proust, and J. P. Benoit, *S.T.P. Pharma. Sci.*, **6**, 417 (1996).
27. J. Herrmann and R. Bodmeier, *Int. J. Pharm.*, **126**, 129 (1995).
28. J. S. Park, J. C. Yang, S. H. Yuk, H. S. Shin, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 189 (2007).
29. S. L. Lyons and S. G. Wright, US Patent 6,331,317, (2001).
30. S. K. Kim, S. H. Kim, H. R. Lee, M. H. Cho, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 388 (2005).
31. S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, G. A. Kim, I. W. Lee, J. M. Rhee, G. Khang, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 589 (2007).
32. S. M. Kim, S. H. Kim, C. M. Kim, A. Y. Oh, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 583 (2007).
33. 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).
34. A. Goraltchouk, V. Scanga, C. M. Morshead, and M. S. Shoichet, *J. Control. Release*, **110**, 400 (2006).
35. Y. Y. Yang, T. S. Chung, X. L. Bai, and W. K. Chan, *Chem. Eng. Sci.*, **55**, 2223 (2002).
36. H. Y. Lee, H. S. Lee, J. S. Kim, S. B. Kim, J. S. Lee, H. I. Choi, and S. G. Chang, International Patent WO 01/78687 A1 (2001).
37. K. G. Carrasquillo, A. M. Stanley, J. C. Aponte–carro, P. D. Jesus, H. R. Costantino, C. J. Bosques, and K. Grebenow, *J. Control. Release*, **76**, 199 (2001).
38. J. I. Lee and H. S. Yoo, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **61**, 81 (2008).
39. M. O'Mahony, *Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures*, CRC Press, p. 487 (1986).
40. H. William, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery, *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, p. 616 (1992).
41. G. Khang and H. B. Lee, *Biomedical Polymers*, p.19 (2001).