

DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에서의 인간 디스크세포 거동분석 비교

이선경 · 홍희경 · 김수진 · 김용기 · 송이슬 · 하 윤* · 이동원 · 강길선†

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 나노공학과, *연세대학교 의과대학 신경외과

(2010년 1월 14일 접수, 2010년 4월 16일 수정, 2010년 5월 3일 채택)

The Comparison of Sponges and PLGA Scaffolds Impregnated with DBP on Growth Behaviors of Human Intervertebral Disc Cells

Seon Kyoung Lee, Hee Kyung Hong, Su Jin Kim, Yong Ki Kim,
Yi Seul Song, Yoon Ha*, Dongwon Lee, and Gilson Khang†

Department of BIN Fusion Technology & Department of Polymer · Nano Science & Technology,
Chonbuk National University, 664-14, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

*Department of Neurosurgery, Spine & Spinal Cord Institute, College of Medicine,
Yonsei University, Shinchon-dong, Seodaemon-ku, Seoul 120-750, Korea

(Received January 14, 2010; Revised April 16, 2010; Accepted May 3, 2010)

초록: 본 연구팀은 DBP를 함침시킨 물성이 서로 다른 스폰지와 PLGA 지지체를 제작한 후 세포 부착, 증식 및 형태 유지를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. WST 분석법과 SEM 관찰을 통하여 스폰지에 비해서 PLGA 지지체에서의 세포의 증식이 활발한 것을 확인하였고, RT-PCR을 통해 디스크세포에서 특이적으로 발현하는 제 2형 콜라겐과 어그리칸의 발현을 확인하였다. WST 결과, 세포 증식률은 DBP/PLGA 지지체가 DBP를 함침시킨 스폰지보다 세포 증식률이 높음을 확인하였다. 본 연구팀은 스폰지보다 PLGA 지지체가 인간디스크의 표현형 유지 및 증식에 있어서 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

Abstract: We fabricated sponge and poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds impregnated demineralized bone particle (DBP) (DBP/PLGA) and investigated proper condition to proliferation and phenotype maintenance of intervertebral disc (IVD) cells by comparison between DBP/PLGA scaffold and DBP sponge. DBP/PLGA scaffolds were prepared by solvent casting/salt leaching. Human IVD cells were seeded in scaffolds of two types. Cell viability and proliferation according to scaffolds were analyzed by WST assay and SEM. RT-PCR was assessed to measure mRNA expression of aggrecan and type II collagen of human IVD cells. In WST assay results, cell viability in scaffolds impregnated DBP/PLGA scaffold were higher than DBP sponge. We could observe that disc cell mRNA expressed better in DBP/PLGA scaffold than DBP sponge. We concluded that the using of DBP/PLGA in terms of scaffold fabrication for bio-disc with human IVD cells is helpful growth of disc cells maintenance of phenotypes.

Keywords: DBP, PLGA, scaffold, sponge, H-disc.

서론

척추의 퇴화는 발생하는 시기에 있어서 연령대가 중장년층으로 제한되어 있지는 않지만 나이가 들면서 나타나는 일반적인 현상으로 현재 널리 발생되고 있는 사회적인 문제이다.¹ 특히, 추간판디스크(IVD)의 퇴화는 척추의 중요한 기계적인 기능을 방해하고 만성적인 요통을 일으키는 원인이 되며, 유전적인 요인과 노화현상, 그리고 비만, 직업, 흡연과 음주 등의 생활 습관 또한 그 원인이 된다.²

디스크의 해부학적 생체역학적인 구조는 반유체 상태의 하이드로젤인 수핵세포(NP)와 척추에 가해지는 하중을 분산시키는 섬유륜(AF) 세포로 이루어져 있다.³ 또한, 추간판 디스크는 척추 뼈 사이에 있는 연골로서 인접한 척추 뼈와 일정한 간격을 유지하며, 일상생활에서 발생하는 외력을 흡수하고 분산시켜 척추분절의 유연성 및 기계적인 안정성을 유지하고, 척추 뼈의 충격을 흡수하는 역할을 한다. 추간판 탈출증은 디스크내의 압력이 증가하면 디스크내 NP가 AF를 파열시켜 척추관내로 돌출되는 질병으로서 척추 신경을 압박하여 극심한 통증을 유발시킨다.^{4,5} 이러한 고통을 치료하기 위하여 골융합술, 경피수핵전단술, 화학적수핵용해술 및 레이저감압술 등 여러 방법이 수행되고

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

있는데,⁶⁻⁸ 이러한 방법은 일시적으로 고통을 감소시킨다 하더라도 융합된 부분의 활동성이 감소하고 인접한 부분의 퇴화를 가속화시키는 단점이 있다.^{8,9} 따라서, 이러한 외과적인 치료법의 한계를 극복하기 위하여 최근 조직공학적 기술에 의한 연구가 시작되었다.^{10,11}

조직공학 분야에 있어서 세포, 지지체 그리고 사이토카인 등의 생물학적 신호는 매우 중요한 요소이며, 세포는 지지체와의 상호작용을 통해 충분한 세포외기질(ECM)을 분비하기 때문에 지지체를 제조하는 재료의 선택이 매우 중요하다.¹² 또한 생체재료는 세포가 본래의 기능을 할 수 있도록 도와주며 세포이식을 위해서는 세포의 유착과 증식이 잘 되어야 하고 세포의 기능이 잘 보존되어야 한다.^{13,14}

천연 골조직으로부터 유래된 탈미네랄화된 골분(DBP)은 골형성을 촉진한다고 Urist에 의하여 보고된 이후 치과,¹⁵ 약안면,¹⁶ 척수 및 뼈 등 광범위하게 임상용으로 사용되고 있는 생체활성천연재료로서 새로운 뼈의 성장에 강력한 유도제로 작용한다.¹⁷ DBP의 성분은 콜라겐과 프로테오글리칸 등의 기질 및 많은 종류의 뼈 형성 단백질(BMP)로 분류되는데, DBP는 이러한 뼈 및 연골형성을 위한 사이토카인을 함유하고 있어 뼈 결손부위에 충전제로 널리 사용되고 있으며,¹⁸⁻²² 염증반응을 감소시키는 것으로 알려져 있다.²³

이에 본 연구에서는 조직공학적 바이오디스크 재생에서 많이 연구되고 있는 DBP를 함침시킨 스폰지와 PLGA 지지체를 비교 분석함으로써 보다 효과적인 지지체를 사용하여 디스크재생에 응용하고자 하였다.

실 험

DBP 제조. DBP는 소의 대퇴부를 사용하여 Urist 방법으로 제조하였다. 소의 대퇴골과 경골을 채취하여 원위골단부, 근위골단부, 골막과 골수 및 연조직을 깨끗이 제거한 후 에탄올로 세척하여 잘게 분쇄하였다. 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매로 지방을 제거한 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N의 HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, pH 7.4, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)으로 세척하여 DBP의 pH를 7.4로 조절한 후 -80 °C에서 동결건조 시켰다. DBP는 액체질소 내에서 동결분쇄(PEX 6700, USA)하여 약 180 μ m 크기 이하의 분말 형태로 얻었다.

DBP를 함유한 스폰지 제조. 3% 아세트산(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)에 0.1% 펩신(Sigma)을 함유한 용액에 2 wt%의 DBP 분말을 첨가시켜 상온에서 48시간 동안 교반시켰다. 4 °C에서 24시간 동안 보관한 후 48-웰 플레이트에 1 mL씩 분주하였다. 4 °C와 -20 °C에서 각각 5시간 동안 보관하고 -80 °C에서 24시간 동안 급랭시킨 후 동결건조하여 DBP 스폰지를 제조하였다. 100 mM의 *N*-(3-다이메틸아미노프로필)-*N'*-에틸카보다이이미드 염산(EDS Sigma)용액을 제조하여 DBP 스폰지를 상온에서 24시간 동안 경화시켰고, 3차 증류수로 여러 번 세척하여 EDC 용액을 완전히 제거하였다. -80 °C에서 24시간 동안 급랭시킨 후 동결건조하여 경화된 DBP 스폰지를 제조하였다. 완성된 스폰지는 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다.

DBP를 함유한 PLGA 다공성 지지체 제조. DBP/PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였으며, 본 실험에서는 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비, 75/25, Resomer RG

756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 1 g의 PLGA를 5 mL의 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA)에 용해한 후 PLGA 양의 20 wt%가 되도록 0.2 g의 DBP를 첨가하였다. 그후 다공형성물질인 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co., Korea)은 분자체를 사용하여 입자 크기를 180~250 μ m로 얻어 PLGA의 9배가 되도록 9 g을 첨가하고, 직경 5 mm 및 높이 5 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 염의 추출은 3차 증류수를 6시간마다 교체하여 48시간 동안 수행하였고, 8 mTorr, -80 °C 조건에서 24시간 동안 동결건조 하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위해서 최소 1주일 이상 25 °C의 진공오븐에서 건조시킨 후 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다.

인간 디스크세포의 배양. 추간판 디스크조직은 절제 수술을 하는 기부자로부터 0.5 g을 획득하여 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A(Roche, Indianapolis, USA)용액을 36시간 동안 처리하여 섬유를 세포와 수핵 세포가 혼합된 형태의 세포를 획득하였다. 콜라게네이즈를 처리한 세포는 100 μ m 메쉬(Falcon, USA)를 이용하여 거르고 75 T 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 성장배지로는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco BRL, USA)와 F-12 nutrient mixture(Ham's F-12, Gibco BRL)의 비가 1 대 1이 되도록 혼합하고, 여기에 10% 우태아혈청(FBS, Gibco BRL)과 1%의 항생제(100 U/mL의 페니실린과 100 μ g/mL의 스트렙토마이신)를 첨가하여 사용하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었으며, 계대 배양 2회째까지 배양한 후 지지체 당 1×10^5 세포/지지체 농도로 파종하여 상기의 배양액으로 정적 배양하였다.

수분 흡수성 측정. DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체의 수분흡수능력을 측정하기 위해서 처음 젖은 무게(W_{wet})를 측정한 뒤 동결건조시킨 후 건조 무게(W_{dry})를 측정하였다. 무게를 측정한 값들을 이용하여 다음 식 (1)에 대입하여 수분 흡수성을 계산하였다.

$$W(\%) = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100 \quad (1)$$

지지체의 압축강도 측정. 물성이 서로 다른 두 지지체의 강도를 측정하기 위해서 만능물성측정기(FTC, Sterling, Virginia, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 만능물성측정기의 설정 값은 target distance는 1.5 mm, test speed는 1 mm/min, trigger force는 0.5 N으로 모두 동일 시 하였다.

WST 분석. 세포증식 능력이나 세포생존 능력을 발색측정으로 정량화하기 위해서 WST[2-(4-요도페닐)-3-(4-나이트로페닐)-5-(2,4-다이설포페닐)-2H-테트라졸리움모노소다움] 분석법을 시행하였다. DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에 세포를 파종한 후(n=4) 배양 1, 3, 7 및 14일에 회수된 지지체에 WST용액을 100 μ L씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 그후 WST는 96-웰 플레이트에 시료를 각각 100 μ L씩 분주하여 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SEM 관찰. 지지체 내에서의 세포의 부착 및 증식 정도를 확인하고자 주사현미경(SEM; S-2250 N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 지지체에 세포를 파종한 후 1, 2, 4 및 6주 동안 배양한

후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 글루타르알데하이드(Sigma)로 24시간 상온에서 고정한 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90, 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 지지체를 완전히 건조하였다. 지지체 관찰이 용이하도록 지지체를 잘라 시료폴더에 고정시킨 후 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금코팅한 후 각각의 시료를 가속전압 5.00 kV에서 촬영하였다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 지지체 내에서 인간 디스크세포의 표현형 유지를 확인하고자 RT-PCR을 실시하였다. 지지체에 세포를 파종한 후 1, 2 및 4주째에 회수된 지지체에 1 mL의 Trizol (InvitrogenTM, Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션 한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4 °C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 이소프로판올(Sigma-Aldrich Co.)과 폴리아크릴 carrierTM (Molecular Research Center, Inc.)로 RNA를 침전시켰다. 분리된 RNA를 Oligo(dT) 12-18 프라이머(InvitrogenTM), 5×first strand buffer (InvitrogenTM), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco BRL, Co.), RNase inhibitor (InvitrogenTM), SuperscriptTM RNaseH역전사 트랜스크립타제(InvitrogenTM), DNase/RNase free water (Gibco BRL, Co.)를 첨가하여 Authorized thermal cycler (TP 600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 이렇게 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, 제 2형 콜라겐 및 어크리칸 프라이머(Geno Tech, KOREA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 프라이머의 염기서열과 반응 조건은 Table 1에 나타내었다. PCR후 증폭된 DNA를 1.5 w/v% 아가로스겔(Sigma)에 전기영동을 한 후 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBRTM, Green Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 촬영하여 밴드의 발현정도를 확인하였다. 또한, Adobe 포토샵 프로그램을 이용하여 밴드의 광도를 측정하고 GAPDH로 표준화하였다.

항산 글리코사미노글리칸(sGAG) 및 콜라겐 함량 분석. DMMB (1,9-디메틸메틸렌 블루) 분석을 사용하여 지지체 내의 sGAG 함량을 분석하였다. 지지체에 세포를 파종한 후 1, 2, 4 및 6 주째에 회수된 지지체를 급랭시킨 후 5 mTorr, -70 °C의 조건에서 동결건조하였다. 건조된 지지체에 파파인 용액(125 µg/mL 파파인, 5 mM L-시스테인, 100 mM Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, pH 6.8)을 넣어 60 °C에서 16시간 동안 반응시키고 각 샘플을 50 µL씩 취하여 200 µL의

DMMB 용액과 혼합하였다. 20분 동안 천천히 교반한 후 96-웰 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐의 생산량은 파파인 용액을 반응시킨 용액에 수산화나트륨을 첨가하여 2 N 농도로 만든 후 이 용액을 50 µL 취하여 120 °C 온도에서 20분 동안 오토클레이브 한다. 여기에 클로라민-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-웰 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지지체에서 생산된 콜라겐의 양은 히드록시프롤린(Sigma)을 측정함으로써 계산하였다.

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

결과 및 토론

DBP를 함유한 다공성 지지체의 제조. 본 연구에서는 조직공학적인 바이오디스크 재생에 응용하고자 DBP를 함유시킨 스폰지와 PLGA 지지체를 제조하였다. 육안관찰 결과 지지체의 형태는 실리콘 몰드 형태와 같게 얻어졌으며 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 완성된 지지체의 표면에 대한 SEM 관찰 결과는 Figure 1에 나타내었다. 두 지지체 모두 다공과 다공 사이의 상호연결이 우수하며 열린 다공을 확인하였고, 특히 스폰지의 다공과 다공 사이의 상호연결이 우수하였으며, 다공 또한 조밀한 것을 확인하였다.

인간 디스크세포의 배양. 초기 배양한 인간 디스크세포와 두 번째 계대 배양 후 시간에 따른 인간 디스크세포의 배양 사진은 Figure 2에 나타내었다. 배양한 인간 디스크세포는 방추형의 모폴로지를 가짐을 확인하였는데, 계대 횟수가 늘어남에 따라 세포의 모폴로지가 길다란 형태로 변하는 것을 확인하였다. 또한, 토끼모델의 디스크세포는 7일마다 계대 배양하였지만 인간 디스크세포는 이와 다르게

Table 1. PCR Primers and Protocol for Thermal Cycling

Species	Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles
	GAPDH	F: 5'-acc aca gtc cat gcc atc a-3'	D=95 °C; 1 min	24
		R: 5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'	A=56 °C; 1 min	
			E=72 °C; 1 min	
H-DISC	Aggrecan	F: 5'-gtg ggc ggt gag gac atc ac-3'	D=94 °C; 1min	38
		R: 5'-ggg ccg ggt ggc ctc ttg agt c-3'	A=60°C; 30 sec	
			E=72 °C; 30 sec	
	Type II collagen	F: 5'-gca ccc atg gac att gga ggg-3'	D=94 °C; 1 min	38
		R: 5'-gac acg gag tag cac cat cg-3'	A=58 °C; 30 sec	
			E=72 °C; 30 sec	

D: denature. A: annealing. E: extension.

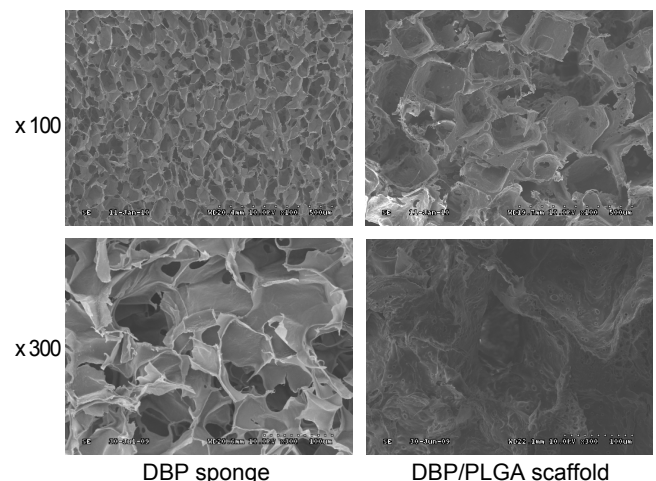


Figure 1. SEM microphotographs of DBP sponge and DBP/PLGA scaffold.

21일 마다 계대 배양하였다.

수분 흡수성 측정. 세포에게 좋은 성장 환경을 제공해야 하는 생체 적합성 지지체의 조건중 하나가 친수성이며 물성이 서로 다른 두 지지체의 친수성의 정도를 비교하기 위해서 수분 흡수성을 측정하였다. Figure 3(a)에서 보는 것과 같이 DBP/PLGA 지지체보다 DBP 스폰지가 수분 흡수율이 높음을 확인하였다. 이 실험은 두 지지체가 가지

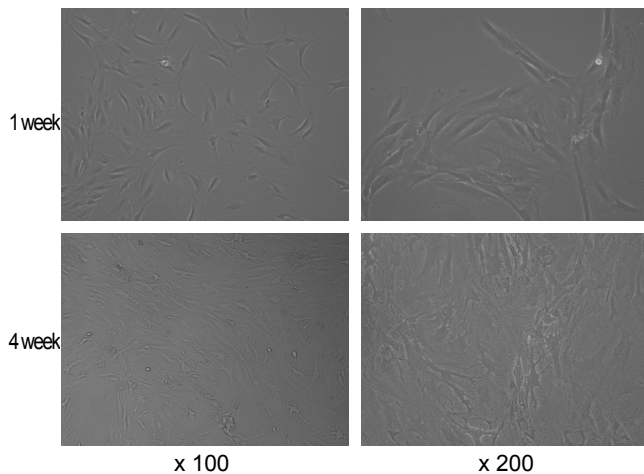


Figure 2. Typical human disc cell morphology by inverted microscopy.

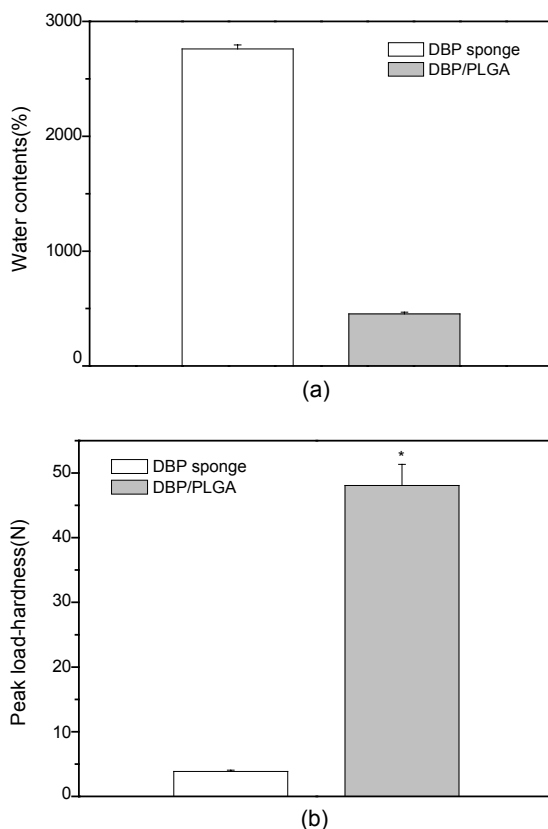


Figure 3. (a) The water uptake ability of DBP sponges and DBP/PLGA scaffolds; (b) Compressive strength of DBP sponges and DBP/PLGA scaffolds.

는 특성을 비교해보고자 실행한 것으로써 두 지지체 모두 친수성인 지지체이지만 PLGA 지지체보다 스폰지가 더 강한 친수성을 가짐을 알 수 있었다.

압축강도 측정. 조직공학적 바이오디스크 재생에 응용하는 지지체로 사용하기 위해서는 기계적, 물리적 특성을 가진 지지체이어야 한다. 이는 디스크 조직의 특성상 하중을 견뎌야 하므로 지지체는 어느 정도의 강도를 가지고 있어야 한다는 것을 의미한다. 그렇기 때문에 지지체에 디스크세포를 배양하기에 앞서 물성이 서로 다른 두 지지체를 비교 분석하기 위해서 압축 강도를 측정하였다. 이 결과는 Figure 3(b)에 나타내었고 DBP 스폰지보다 DBP/PLGA 지지체의 강도가 강한 것을 알 수 있었다.

WST 분석. DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에서의 인간디스크 세포생존 능력이나 증식능력을 알아보기 위해 WST 분석을 수행하였다. WST 분석은 테트라졸리움 성분을 배양액에 첨가한 후 발색을 정량화하여 세포의 수, 증식정도 및 활성 등을 알 수 있는데, 이는 테트라졸리움 성분이 세포내의 미토콘드리아가 가진 탈수소 효소에 의해서 특정 색으로 변화하게 되고 발색 정도에 따라서 세포내의 미토콘드리아의 활성도를 알 수 있다. 각 지지체에서의 세포 생존 능력을 분석한 결과는 Figure 4에 나타내었고, 시간이 지남에 따라 DBP/PLGA 지지체내의 세포의 증식이 활발히 이루어진 것을 확인할 수가 있었다. 하지만, Figure 4에서 나타낸 것과 같이 DBP 스폰지에서 시간에 따른 증식률이 증가했으나 그의 정도가 DBP/PLGA 지지체에 비해 월등히 낮음을 확인할 수 있었다. 또한, 이 두 지지체를 비교해보면 세포의 생존 능력이나 증식 능력이 스폰지에 비해서 PLGA 지지체에서 월등히 높았으며 이는 인간 디스크세포가 생존 및 증식하는데 있어서 PLGA 지지체가 좋은 환경을 제공함을 알 수 있었다.

SEM 관찰. DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에서의 인간 디스크 세포의 부착 및 증식 정도를 확인하고자 SEM으로 관찰하였고 그 결과는 Figure 5에 나타내었다. 지지체 안에서의 세포의 부착 형태를 확인해 보면 DBP/PLGA 지지체에서는 긴 방추형의 형태로 필로포디아 및 라멜리포디아 등이 뻗어나와 본연의 모폴로지를 유지하며 증식이 이루어지고 있지만, DBP 스폰지에서는 구형 상태를 유지하여 증식하는 양상을 보였다. 또한, 1주에서 6주까지 지지체 안에서의 세포의 증식정도를 확인해 본 결과 WST 분석에서 확인한 것과 같은 결

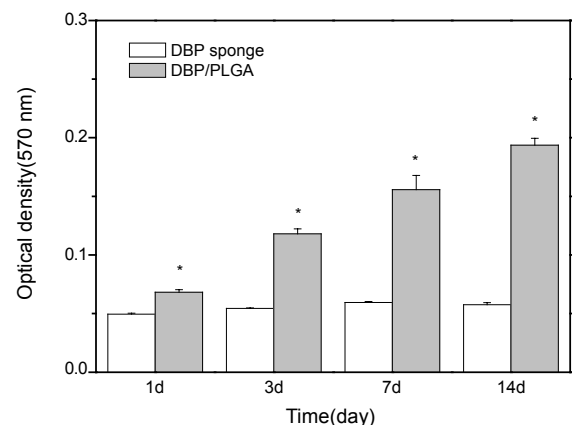


Figure 4. Measurement of cellular viability in DBP sponges and DBP/PLGA scaffolds by WST assay on 1, 3, 7 and 14 days.

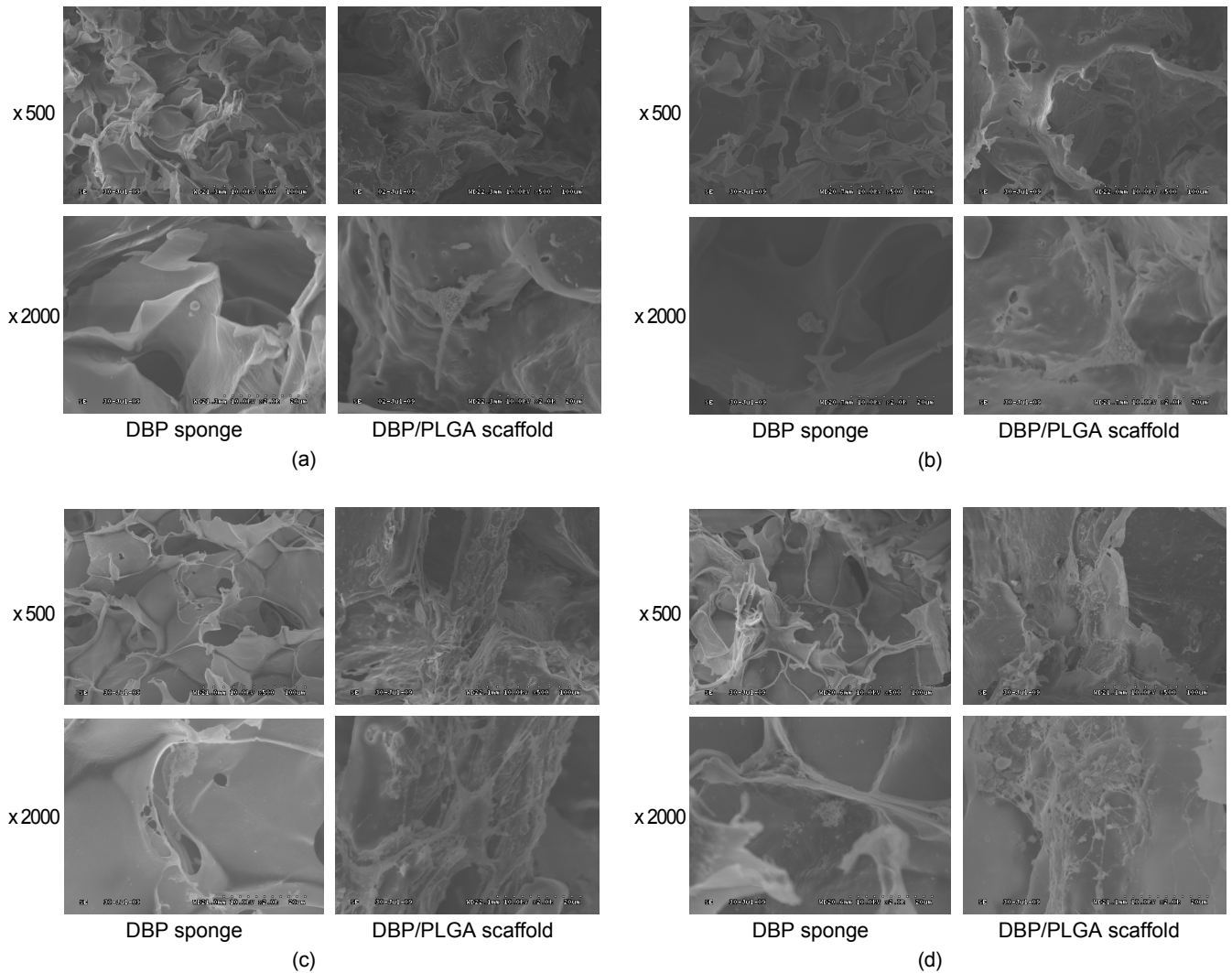


Figure 5. SEM microphotographs of human disc cells morphology on DBP sponge and DBP/PLGA scaffold surfaces at (a) 1; (b) 2; (c) 4; (d) 6 weeks post cultivation.

과로 스폰지보다 PLGA 지지체에서 월등하게 세포의 증식이 활발한 것을 확인할 수 있었다. 시간에 따른 세포의 증식정도 및 부착정도를 확인해 보면 1주째에서는 두 지지체에서 특별한 차이점을 확인할 수 없지만, 2주째의 PLGA 지지체에서 세포가 방추 형태로 확실히 뻗어 있고 증식 또한 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 4, 6주째의 지지체를 비교해 보면 그 차이를 명확하게 알 수 있는데, 스폰지는 1주째와 크게 다르지 않는 반면 PLGA 지지체는 표면의 대부분을 세포가 덮고 있는 모습을 확인할 수 있었다. 이로써 PLGA 지지체가 인간 디스크세포의 부착, 형태유지 및 증식에 좋은 영향을 미친 것을 확인할 수 있었다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에 파종된 인간 디스크세포의 표현형 유지에 미치는 영향을 mRNA 관점에서 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 디스크세포에서 나타나는 특이적인 유전자인 제 2형 콜라겐과 어그리칸의 발현을 1, 2 및 4주에서 확인하여 그 결과를 Figure 6(a)에 나타내었다. 모든 실험군은 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 확인하였으며, 디

스크세포의 주요 마커인 제 2형 콜라겐은 스폰지보다 DBP/PLGA 지지체에서 높게 발현됨을 확인하였다. Figure 6(b)에 GAPDH에 대한 밴드의 광도를 표준화하여 그래프로 나타내었고, 제 2형 콜라겐의 발현이 두 지지체에서 모두 시간이 지남에 따라 차츰 증가하는 양상을 보임을 알 수 있었다. 또한, Figure 6(a)에서 알 수 있었듯이 스폰지보다는 PLGA 지지체에서의 발현이 1주에서는 2배, 4주에서는 5배 가량 높음을 확인하였다. 두 지지체의 어그리칸의 발현정도를 비교했을 때 큰 차이는 없지만, PLGA 지지체에서 발현정도가 높은 것을 확인하였다. 이로써 PLGA 지지체 내에서 인간 디스크세포가 특성을 유지하는데 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다.

sGAG 함량 분석. 디스크세포의 세포외기질 대부분을 차지하는 GAG의 함성량을 측정하기 위하여 sGAG 함량 분석을 수행하였고, DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에서 배양한 디스크세포의 GAG 함량은 그래프화하여 Figure 9에 나타내었다. Figure 7에 나타난 것과 같이 두 지지체 모두 시간이 지남에 따라 GAG 함량이 증가함을 알 수 있으며, 스폰지보다 PLGA 지지체에서의 함량이 높은 것을 확인하였

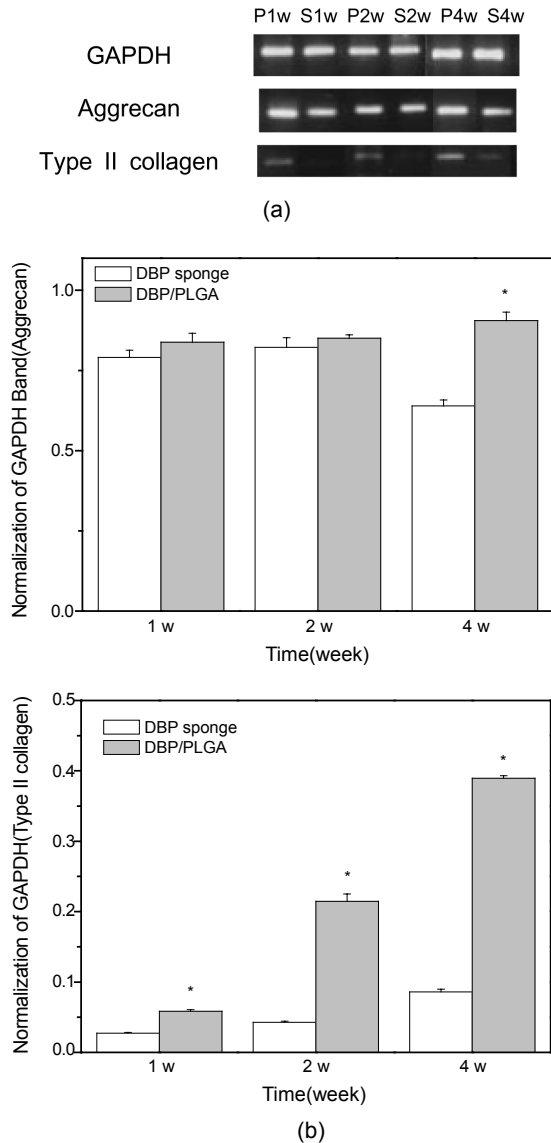


Figure 6. Gene expression profiles of GAPDH, aggrecan and type II collagen as analyzed by RT-PCR at 1, 2 and 4 weeks: (a) The result of agarose gel electrophoresis (P: DBP/PLGA scaffold, S: DBP sponge); (b) Normalization of GAPDH expression by aggrecan and type II collagen.

다. 6주째에서는 두 지지체에서 모두 GAG 함량의 감소가 나타나는데 감소율이 PLGA 지지체보다 스폰지에서 더 높음을 확인하였다. 따라서, 스폰지보다 PLGA 지지체가 세포의 기질을 형성할 수 있는 적절한 환경을 제공하였을 것이라 사료된다.

콜라겐 함량 분석. DBP 스폰지와 DBP/PLGA 지지체에서 배양한 디스크세포의 콜라겐 합성량을 비교 분석하기 위하여 콜라겐 함량을 분석하여 그 결과를 Figure 8에 나타내었다. 1주째에서는 콜라겐 함량이 스폰지가 PLGA 지지체보다 4배 정도 높지만 시간이 지남에 따라서 2, 4주째에서는 스폰지보다 PLGA 지지체의 콜라겐 함량이 약 4배 정도 높음을 확인하였다. 이결과는 WST와 SEM 분석을 통해서 얻어진 세포의 성장 및 부착의 결과와 상응되는 결과로서 인간 디스크세포

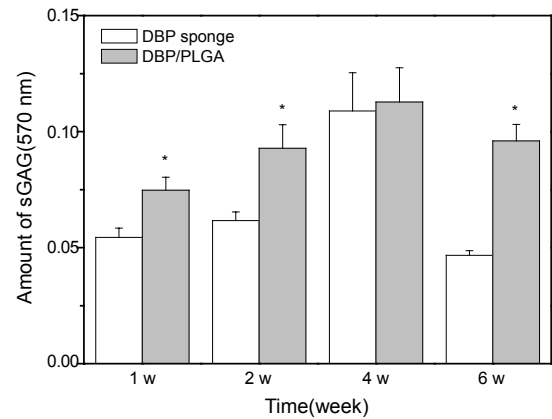


Figure 7. Sulfated glycosaminoglycan(sGAG) content(μ g) after 1, 2, 4 and 6 weeks in DBP sponges and DBP/PLGA scaffolds.

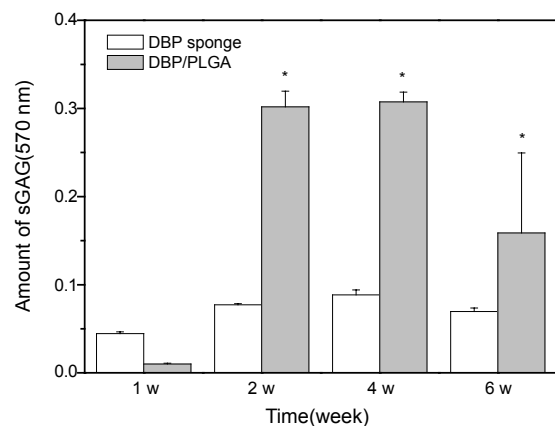


Figure 8. Collagen content after 1, 2, 4 and 6 weeks in DBP sponges and DBP/PLGA scaffolds.

가 성장할 수 있는 틀을 유지하는 콜라겐 함유질의 합성에 스폰지보다 PLGA 지지체가 좋은 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

결론

본 연구에서는 디스크 탈출증에 대한 이식물로서 조직공학적인 디스크의 이용에 많은 관심이 집중되고 있는 가운데 디스크재생에서 많이 연구되어지고 있는 DBP를 함유시킨 물질이 서로 다른 스폰지와 PLGA 지지체를 비교 분석하였다. 제조한 지지체의 특성을 비교하기 위하여 물 흡수성과 압축강도를 측정하였고, 지지체의 표면의 형태는 SEM을 통해 관찰하였다. 이로서 DBP를 함유한 스폰지와 PLGA 지지체가 서로 다른 특성을 지님을 확인하였으며 이 다른 특성을 가진 두 지지체에 인간 디스크세포가 부착, 성장하는데 있어서 적합한지를 알아보기 위해 인간 디스크세포를 각각의 지지체에 배양한 후 여러 가지 실험을 통해 그 적합성을 알아보았다. 그 결과 PLGA 지지체가 스폰지에 비해서 인간 디스크세포의 부착, 증식 및 형태 유지에 우수함을 보였으며 콜라겐 및 GAG 생산량도 더 높음을 알 수 있었다. 이로서 스폰지의 다공의 형태가 더 안정적이며 수분 흡수율 또한 높지만 조직공학적인 디스크재생에 이용되는 지지체로서는 PLGA 지지체가 더욱 적합한

것을 확인하였다. 이는 스폰지를 제조 시 첨가하는 펩신이 콜라겐 사슬에 좋지 않은 영향을 주고 사슬 내 존재하는 BMP 등의 단백질에 손상을 주어 인간 디스크세포가 부착, 증식하는데 있어서 부정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.²⁴ 또한, 기계적 물성을 향상시키기 위해 EDC로 가교한 후 세척하는 과정에서 스폰지 내에 함침되어 있는 DBP가 빠져 나와 DBP가 세포의 부착 및 증식에 도움을 주지 못한 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029)과 세포응용사업단(SC4110)연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. F. Hochschuler, R. G. Rashbaum, D. Johnson, V. Ohnmeiss, H. Moo, B. L. Vanharanta, M. A. Sachs, R. D. Spivey, and S. H. Guyer, *Spine*, **12**, 295 (1987).
2. H. E. Gruber, T. L. Johnson, K. Leslie, J. A. Ingram, D. Martin, G. Hoelscher, D. Banks, L. Phieffer, G. Coldham, and E. N. Hanley, *Spine*, **27**, 1626 (2002).
3. J. A. Buckwalter, *Spine*, **20**, 1307 (1995).
4. E. Hedbom and D. Heinegard, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6898 (1989).
5. E. Hedbom and D. Heinegard, *J. Biol. Chem.*, **268**, 27307 (1993).
6. K. Nishida, J. D. Kang, L. G. Gilbertson, S. H. Moon, J. K. Suh, M. T. Vogt, P. D. Robbins, and C. H. Evans, *Spine*, **24**, 2419 (1999).
7. J. Mochida, K. Nishimura, T. Nomura, E. Toh, and M. Chiba, *Spine*, **21**, 1556 (1996).
8. C. K. Lee, *Spine*, **12**, 357 (1988).
9. J. D. Schlegel, J. A. Smith, and R. L. Schleusener, *Spine*, **21**, 970 (1996).
10. H. Mizuno, A. K. Roy, C. A. Vacanti, K. Kojima, M. Ueda, and L. J. Bonassar, *Spine*, **29**, 1299 (2004).
11. C. A. Seguin, M. D. Gryn timer, R. M. Pillar, S. D. Walden, and R. A. Kandal, *Spine*, **29**, 1299 (2004).
12. W. B. Tsai, C. H. Chen, J. F. Chen, and K. Y. Chang, *J. Mater. Sci. Med.*, **17**, 337 (2006).
13. A. Atala, *J. Endourol.*, **14**, 49 (2000).
14. N. Zhang, H. Yan, and X. Wen, *Brain Res. Rev.*, **49**, 48 (2005).
15. M. R. Urist and L. F. Peltier, *Science*, **150**, 893 (1965).
16. J. Glowacki, L. B. Kaban, J. E. Murray, J. Folkman, and J. B. Mulliken, *Lancet*, **1**, 959 (1981).
17. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
18. P. Gogan, G. Johnson, and R. Vincent, *Toxic in Vitro*, **9**, 257 (1995).
19. K. S. Kim, M. H. Cho, H. H. Ahn, S. B. Song, S. J. Seo, M. S. Kim, B. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 168 (2007).
20. W. Huang, B. Carlsen, I. Wulur, G. Rudkina, K. Ishidaa, B. Wuc, D. T. Yamaguchia, and T. A. Miller, *Experimental Cell Res.*, **299**, 325 (2004).
21. H. G. Sun, C. Wu, K. Dai, J. Changc, and T. Tang, *Bio-materials*, **27**, 5651 (2006).
22. S. H. Kim, S. J. Yoon, B. S. Choi, H. J. Ha, J. M. Rhee, M. S. Kim, Y. S. Yang, H. B. Lee, and G. Khang, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **585**, 167 (2006).
23. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yoon, 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).
24. J. W. Jang, M. O. Baek, S. H. Kim, J. H. Choi, J. C. Yang, H. H. Hong, H. K. Hong, J. M. Rhee, B. H. Min, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **33**, 104 (2009).