Polymer(Korea), Vol. 38, No. 2, pp. 156-163
http://dx.doi.org/10.7317/pk.2014.38.2.156

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

하이드록시아파타이트/락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체 조성에 따른 염증 완화 효과

장지은 · 김혜민 · 김형석 · 전대연 · 박찬흠* · 권순용** · 정진화**,† · 강길선†

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자 나노공학과, *한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과
**가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과

(2013년 9월 17일 접수, 2013년 10월 25일 수정, 2013년 11월 6일 채택)

Inflammatory Responses to Hydroxyapatite/Poly(lactic-*co*-glycolic acid) Scaffolds with Variation of Compositions

Ji Eun Jang, Hye Min Kim, Hyeongseok Kim, Dae Yeon Jeon, Chan Hum Park*, Soon Yong Kwon, Jin Wha Chung**,†, and Gilson Khang†**

Dept. of BIN Fusion Tech., and Dept. of Polymer-Nano Sci. & Tech. and Polymer BIN Research Center, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea
**Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea*
***Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, 62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea*

(Received September 17, 2013; Revised October 25, 2013; Accepted November 6, 2013)

초록: 하이드록시아파타이트는 골 전도가 우수하고 생체 적합성이 우수하며 염증 반응을 일으키지 않아 임상에서 골 이식재로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 하이드록시아파타이트를 함유한 poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) 지지체를 제조하였으며 생체 내/외의 실험을 통하여 골 이식재로서의 응용가능성을 평가하였다. 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체는 0, 10, 20, 40 및 60 wt%의 함량으로 제조하였다. 기계적 특성을 알아보기 위하여 압축강도, SEM, FTIR을 측정하였으며 MTT, RT-PCR, FACS, 조직학적 염색(H&E, ED-1)을 실시하였다. 그 결과 하이드록시아파타이트를 함유한 PLGA 지지체에서 염증 반응이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 골 이식재로서의 가능성을 보여주었다.

Abstract: Hydroxyapatite has osteoconductivity, biocompatibility and noninflammatory, and it has been used clinically as artificial bone. In this study, we prepared hydroxyapatite/poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) scaffolds using 0, 10, 20, 40 and 60 wt% of hydroxyapatite. We analyzed compressive strength, SEM analysis and FTIR for mechanical property of 3D hydroxyapatite/PLGA scaffolds. For biocompatibility tests, cell proliferation and viability were measured via MTT assay and SEM. We analyzed RT-PCR, FACS, histology (H&E, ED-1) for anti-inflammatory effect. This study showed that hydroxyapatite hybrid scaffolds have low inflammatory reaction compared with the PLGA. This result has a potential for the application of artificial bone graft material.

Keywords: hydroxyapatite, inflammatory reaction, scaffold, artificial bone.

서 론

최근 다양한 생체 재료가 임상적으로 널리 사용되고 있다. 특히 생체 재료를 이식하였을 경우 체내에서 주변 조직과 어떻게 상호작용이 이루어지는지 알아야 하며 체내 이식하는 재료로서의 적용 가능성을 판단하는 것이 필요하다. 생체 재료 이식의 성공을 결정하는 몇 가지 요인 중 하나는 염증 반응이다.[1,2]

염증 반응은 상처로 인하여 외부 감염체가 체내로 들어왔을 때, 백혈구가 몰려들어 면역 세포 및 염증 세포의 염증 반응을 유발하고 매개하는 염증성 사이토카인을 뿜어낸다.[3,4] 염증 반응을 일으키는 세포에 외부 자극이 가해지면 종양괴사 인자(TNF-α), 인터루킨-1β(IL-1β), COX-2 등의 염증성 사이토카인의 발현이 유도되고 호중구를 활성화하여 염증 관여 물질을 생성하게 된다. 이 염증 물질이 과량 생산되면 각종

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

염증성 질환을 유발시킨다.[5]

조직공학적 치료에 있어서 지지체는 세포의 부착과 증식, 분화 그리고 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 형성에 도움을 준다.[6-9] 또한 인체 내에서 생체 적합성을 가지며 안전하게 흡수, 분해되어야 한다.[10,11] 조직 공학용 지지체 제조에 사용되는 생분해성 합성 재료로서 폴리락타이드(polylactide, PLA)와 폴리글리콜라이드(polyglycolide, PGA) 공중합체인 PLGA(poly(lactic-*co*-glycolic acid))는 미국 식품의약품안전청(FDA)의 승인을 받는 합성고분자이며 생분해성과 생흡수성이 매우 뛰어나 조직공학적 지지체나 약물전달체계의 디바이스로 응용되고 있다.[12-14] 본 연구에서는 생체 적합성이 우수한 PLGA와 하이드록시아파타이트를 사용하여 지지체를 제조하였다. 하이드록시아파타이트는 생체 적합성이 우수하며 대체 가능하고 독성이 없으며 염증반응을 일으키지 않아 골 이식재로 대체하여 사용되고 있다.[15-17]

생분해성 고분자인 PLGA는 분해 과정 중 분해산물이 생성되어 조직 주변의 염증을 유발할 수 있는 단점이 있어 골 이식재로 적용하기 위해 인체 뼈의 구성성분이며 염증반응을 일으키지 않는 생체 재료인 하이드록시아파타이트를 첨가하였다. 또한 골 이식재로서 하이드록시아파타이트의 최적의 함량을 찾기 위하여 함량별 지지체를 제조하였다.

따라서 PLGA와 하이드록시아파타이트를 이용하여 지지체를 제조한 뒤 기계적 물성을 향상시키고 *in vitro* 테스트와 *in vivo* 테스트를 통해 염증 완화 효과를 확인하고 골 이식재로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 하이드록시아파타이트는 ㈜씨지바이오에서 제공받았으며 크기는 32 μm 이하를 사용하였다. PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 메틸렌클로라이드(methylene chloride, MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

하이드록시아파타이트/PLGA 다공성 지지체 제조. 하이드록시아파타이트/PLGA 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법에 의해 제조되었다.[18] PLGA를 MC에 용해한 후 하이드록시아파타이트를 PLGA 용액에 대한 10, 20, 40 및 60 wt% 함량으로 0.1, 0.2, 0.4 및 0.6 g을 첨가하였다. 다공형성물질인 염화나트륨은 250~355 μm로 선별하여 혼합하였다. 잔류용매인 MC를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 25 ℃ 진공오븐에서 건조, 70% 알코올에 멸균하였다.

세포 배양. 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658)와 쥐 단핵대식세포(Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line: RAW 264.7, KCLB40071)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았다. NIH/3T3는 Roswell Park Memorial Institute medium(RPMI 1640, Gibco)에 10% 우태아혈청, 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액과 RAW 264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, 고농도 글루코오스, Gibco)에 10% 우태아혈청, 1% 항생제(antibiotics/antimycotics)가 함유된 배양액을 제조한 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 ℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 배양액은 3일에 한 번씩 교체해 주었다.

하이드록시아파타이트/PLGA 다공성 지지체 표면 관찰. 제조한 다공성 지지체를 표면 및 내부의 다공 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경(SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다(각 지지체당 n=2). 각각의 지지체의 단면을 반으로 절단 후 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 200 Å의 두께로 백금코팅하여 하이드록시아파타이트의 분산 정도와 다공 형태를 확인하고자 하였다.

압축강도 측정. 직경 7 mm, 두께 3 mm의 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체를 각각 시료수 3 개씩 준비하였다. 만능물성측정기(FTC, Sterling, Virginia, USA)를 이용하여 기계적 강도를 측정하였으며 이 때 만능물성측정기의 설정 값의 측정거리는 1.5 mm, 시험 속도 1 mm/min, 압축력 0.5 N으로 동일하게 적용하였다.

FTIR. 함량별 하이드록시아파타이트와 PLGA의 화학적 변화를 분석하기 위하여 FTIR(GX, Perkin Elmer, 미국)을 이용하여 500~4000 cm^{-1}의 범위에서 측정하였다.

세포 부착도 및 형태 관찰. 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체에서 NIH/3T3의 부착양상 및 변화된 모폴로지를 확인하고자 주사전자현미경(SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다(각 지지체당 n=2). 하이드록시아파타이트를 첨가하지 않은 단독의 PLGA 지지체와 하이드록시아파타이트를 첨가한 지지체를 24웰에 넣었다. 여기에 NIH/3T3를 1×10^5 세포/지지체 농도로 파종하고 1, 2 및 3일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 글루타알데하이드(Sigma)로 24 시간 동안 상온에서 고정한 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 건조하였다. 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금 코팅한 후 각각의 시료를 1000배로 촬영하였다.

세포 증식률 측정. 하이드록시아파타이트 함량에 따른 세포 증식능력을 발색 측정으로 정량하기 위해 MTT(디메틸치아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석법을 시행하였다. NIH/3T3를 1×10^5 세포/지지체의 농도로 파종하고 상기의 배양액으로 정적 배양하였다(각 지지체당 n=2). 배양 4시간, 1, 2 및 3일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS)을 100 μL씩 넣고 4시간 동안 37 ℃ 인큐베이터에서 배양하였다.

그 후 보라색 결정이 생성되면 지지체를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma) 용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 1시간 동안 용해한 후 96 웰 플레이트에 시료를 각각 100 μL씩 분주하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

mRNA 발현도 확인. 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체에 대한 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다(각 지지체당 n=3). 양성 대조군으로 지지체에 파종한 세포의 배양액에 염증 유발 물질인 lipopolysaccharide(LPS)를 첨가하여 배양하였고 음성 대조군은 세포를 세포배양접시에 배양하였다. 세포 파종 후 1 및 3 일째에 회수된 지지체에서 RNA를 분리하여 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, TNF-α, COX-2, IL-6의 유전자를 확인하였다.[19]

FACS. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 측정하기 위하여 형광물질 DCF(dichlorofluorescein)를 이용하여 측정하였다. 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체에 RAW 264.7을 1×10^6 세포/지지체의 농도로 파종하고 3일 동안 배양하였다(각 지지체당 n=3). 양성 대조군으로 지지체에 파종한 세포의 배양액에 염증 유발 물질인 LPS를 첨가하여 배양하였고 음성 대조군은 세포를 세포배양접시에 배양하였다. DCF (dichlorofluorescein)는 세포 파종 후 배양액에 20 μM을 첨가한 후 40분 동안 incubation시킨 후, FACS(fluorescense activated cell sorter, Benton-Dickson, US)를 이용하여 측정하였다.

조직학적 평가. 조직학적 평가를 위하여 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체를 면역기관인 림프절이 주로 모여 있는 Wister rat의 겨드랑이 피하에 이식하였다(각 지지체당 n=4). 1 및 4 주 후 이식부위만을 잘라내어 지지체를 적출한 후 안락사하였다. 적출한 지지체는 4% 포르말린(Sigma) 용액에 고정시킨 후 파라핀 블록을 제조하였다. 이렇게 만들어진 파라핀 블록은 조직학적 염색이 가능하도록 박절기로 5 μm의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켜서 조직학적 염색 hematoxylin and eosin(H&E)와 면역조직학적 ED-1 염색을 실시한 후, 염색된 세포 및 세포외기질(ECM)에 근거하여 혈관형성, 염증 정도 등을 조직학적 분석을 통해 비교 분석하였다.

결과 및 토론

압축강도. 함량별 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체를 세포를 파종하지 않은 지지체와 세포를 파종한 지지체의 압축강도를 측정하였다. 세포를 파종하지 않은 지지체는 3일 동안 메디아에 담가둔 뒤 젖은 상태에서 측정하였으며 세포를 파종한 지지체는 NIH/3T3을 1×10^5 파종하여 3일 후에 압축강도를 측정하였다. 함량별 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 압축강도는 Figure 1에 나타내었다. 세포를 파종하지 않은 지지체에서는 하이드록시아파타이트의 함량이 증가할수록 압축강도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 PLGA 사이에 하이드록시아파타이트가 존재하여 응집력이 약해지고 공간이 생겨 압축강도가 낮아지는 것으로 사료된다. 또한 하이드록시아파타이트의 함량이 증가할수록 입자들간의 충돌로 인하여 지지체의 기계적 강도가 감소되는 것으로 사료된다.[20] 세포를 파종한 지지체에서는 하이드록시아파타이트의 함량이 20 wt%일 때 압축강도가 가장 높게 측정되었다. 이러한 결과는 지지체의 다공에서 세포와 세포간의 결합과 세포외기질의 생산이 촉진되어 높은 압축강도를 나타내었을 것이라고 사료된다.

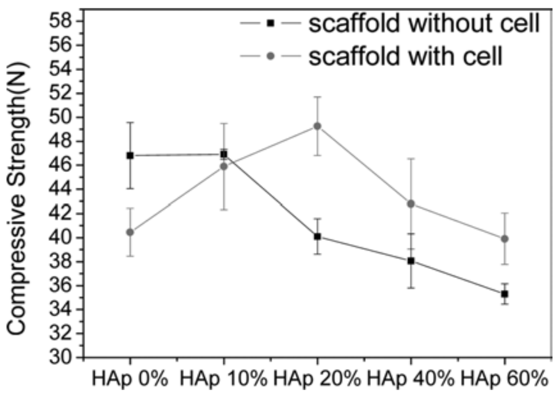

Figure 1. Compressive strength of PLGA scaffolds and hydroxyapatite/PLGA scaffolds immersed in media after 3 days.

FTIR. 하이드록시아파타이트 분말과 PLGA 지지체, 함량별 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 화학적 성분을 분석하기 위하여 적외선 분광기 분석법으로 측정하였다. PLGA의 특이적 피크는 카르보닐기와 에스터기로 1700-1800 cm^{-1} 영역에서[21,22] 나타나고 하이드록시아파타이트의 특이적 피크인 인산기는 1094, 1040, 962 cm^{-1} 영역에서[23,24] 확인할 수 있

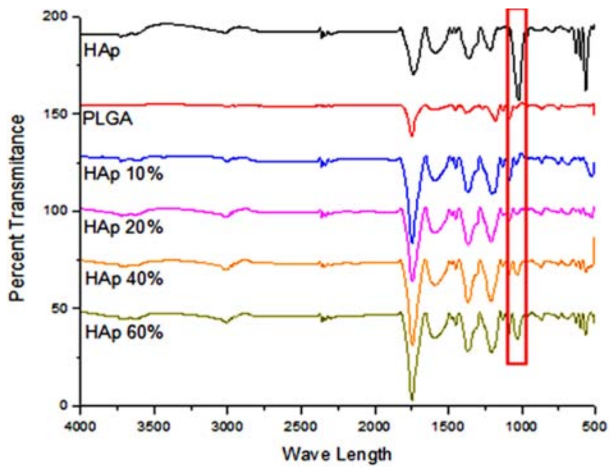

Figure 2. FTIR spectrum of hydroxyapatite powder, PLGA and hydroxyapatite/PLGA scaffolds.

다. Figure 2에서 볼 수 있듯이 PLGA 지지체에서는 카르보닐기와 에스터기가 나타남을 확인하였고 하이드록시아파타이트에서는 특정 피크인 인산기가 확인되었다. 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체에서는 PLGA에서 나타나는 카르보닐기와 에스터기 피크가 측정되었으며 하이드록시아파타이트에서 나타나는 특정 피크의 인산기가 모든 그룹에서 나타났다. 또한 하이드록시아파타이트 함량이 증가할수록 인산기 피크의 세기가 강해지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 카르보닐기와 에스터기, 인산기가 모든 그룹에서 나타나는 것으로 보아 각 재료의 화학적 특성이 유지되는 것을 확인함과 동시에 하이드록시아파타이트 분말이 지지체에 고루 분포되었다는 것을 알 수 있었다. 또한 인산기가 하이드록시아파타이트 함량이 증가함에 따라 강해지는 것으로 보아 하이드록시아파타이트가 비율에 따라 잘 첨가되었음을 보여주었다. 이러한 정성적 평가에 따라 인산기가 증가할수록 본 실험에 영향을 미친 것으로 사료된다.

지지체 표면 관찰. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조한 함량별 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 표면 관찰을 하기 위해 SEM 촬영을 하였으며 Figure 3에 나타내었다. 모든 지지체의 다공은 염 추출법으로 인하여 사각형의 모양을 나타내었으며 대부분이 일정한 모양을 유지하고 있었다. PLGA 지지체의 표면은 매끄러웠으며 하이드록시아파타이트의 함량이 증가할수록 표면의 거칠기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

세포 부착 및 형태 관찰. 하이드록시아파타이트 함량에 따른 지지체에서의 세포 부착도와 형태를 확인하기 위하여 NIH/3T3 세포를 1×10^5씩 파종하여 1, 2 및 3일 후에 SEM으로 분석하였으며 Figure 4에 나타내었다. NIH/3T3 세포는 일반적으로 초기에는 sphere 형태를 나타내며 단층을 이루고 부착되었을 때는 필로포디아 및 라멜리포디아 등이 뻗어 긴 방추형을 나타낸다.[25] PLGA 지지체와 함량별 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 세포 부착 및 형태를 관찰한 결과 PLGA 지지체에서는 NIH/3T3 세포가 시간이 지날수록 길게 뻗지 못하고 sphere 형태를 유지하였다. 그러나 하이드록시아파타이트가 첨가된 지지체에서는 NIH/3T3 세포의 형태가 길게 뻗어 있는 모양을 유지하고 있었고 특히 하이드록시아파타이트가 20 wt% 포함된 지지체에서 세포가 길게 뻗어 있었으며 지지체의 표면을 덮고 있었다. 이는 하이드록시아파타이트의 첨가로 인하여 지지체 표면의 거칠기가 증가하여 세포 부착과 증식에 도움을 준 것으로 사료된다.

세포 증식률. *In vitro* 상에서 함량별 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 초기 세포 부착도와 세포 증식률을 측정

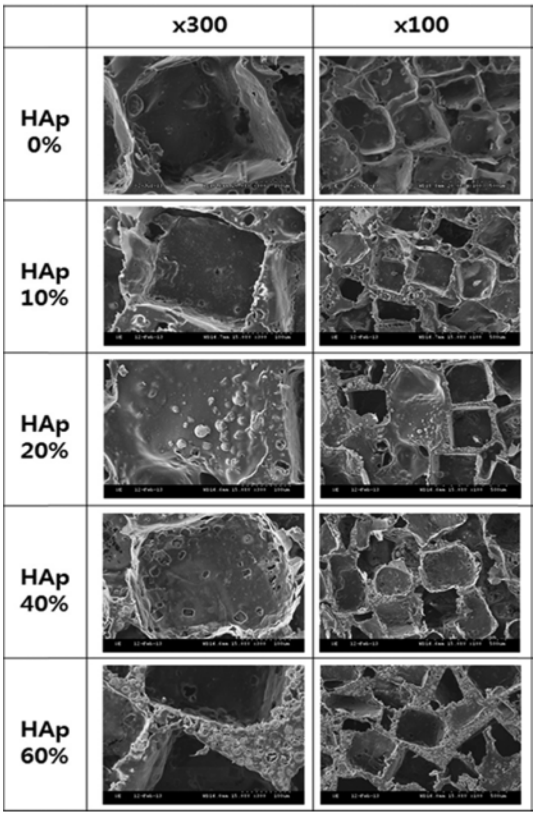

Figure 3. Surface characterization of PLGA and HAp/PLGA scaffolds by SEM microphotographs (magnification with ×300, ×100 scale bar = 100 μm, 500 μm).

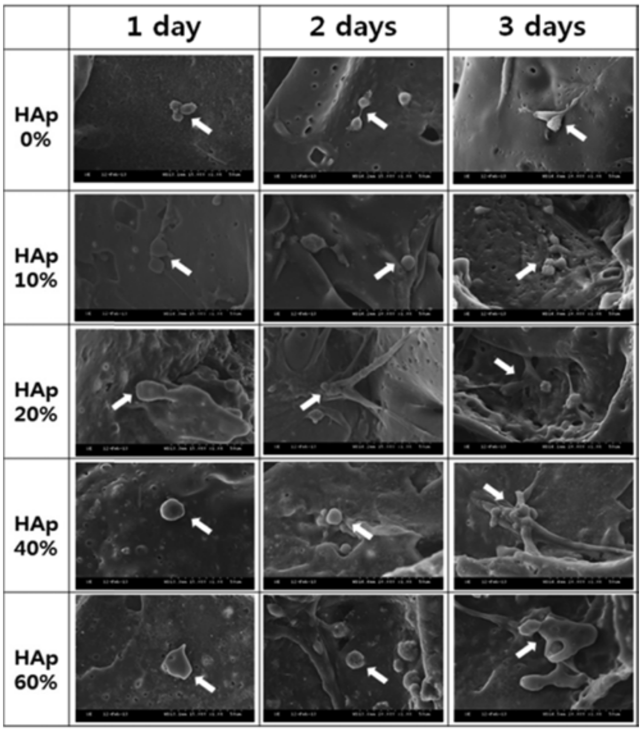

Figure 4. SEM microphotographs of NIH/3T3 cell morphology on PLGA and HAp/PLGA scaffolds after 1, 2 and 3 days (magnification with ×1000, scale bar= 50 μm, Blank arrows = NIH/3T3 cells).

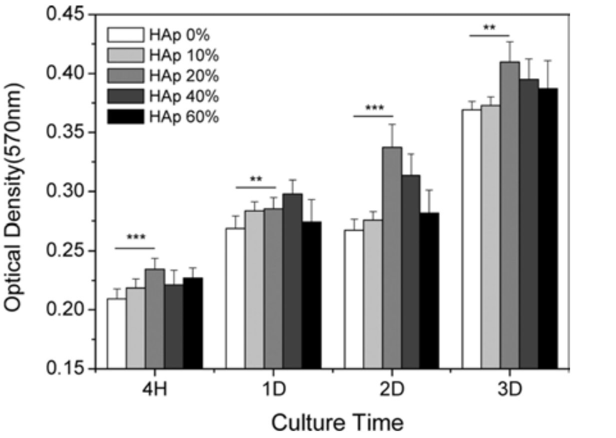

Figure 5. Cell viability of NIH/3T3 cell in PLGA and HAp/PLGA scaffolds analyzed by MTT assay after 1, 2 and 3 days ($p^{**}<0.005$, $p^{***}<0.0005$).

하기 위하여 MTT 분석을 하였다. 각각의 함량별 지지체에 NIH/3T3 세포를 1×10^5씩 파종하여 4시간 1, 2, 3일 후에 측정하였으며 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 그 결과 4 시간 측정 시 PLGA 지지체보다 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체에서 세포 초기 부착도가 좋은 것을 보여주었고 특히 하이드록시아파타이트 함량이 20 wt%인 지지체가 세포 초기 부착도가 가장 우수하였다. PLGA 지지체는 4시간, 1일 동안 세포 증식률이 증가하는듯 하였으나 2일째에서 감소하였다가 3일째에 다시 증가하는 것을 확인하였고 하이드록시아파타이트가 20 wt%인 지지체에서 시간이 지날수록 꾸준히 세포 증식률이 증가하였으며 특히 3일째에 가장 증식률이 좋았다. 이는 하이드록시아파타이트가 첨가됨에 따라 지지체의 표면 거칠도가 증가하여 세포 증식률이 좋은 것으로 사료된다. 지지체 표면 거칠도는 세포와 지지체간의 상호작용이 잘 이루어지도록 도와주며 거칠기가 증가할수록 세포의 부착도를 증가시켜준다.[26] 따라서 하이드록시아파타이트가 20 wt% 첨가하였을 때 세포가 잘 부착할 수 있는 거칠기를 제공한 것으로 사료되며 40과 60 wt%에서 세포 부착도가 좋지 않은 것은 소수성의 특징을 가진 하이드록시아파타이트의 함량이 증가되어 세포 증식에 좋지 않은 것으로 사료된다.

RT-PCR. TNF-α는 종양 괴사 인자로 염증과 면역반응의 중요한 매개물질이며 주로 활성화된 대식세포에 의해 분해되며 체내 열이 나게 유도하거나 감염을 유발하여 종양 생성과 바이러스 복제를 억제하는 능력을 가지고 있다.[27] COX-2가 종양에서 발현될 경우 혈관 내피 성장 인자의 생산을 촉진한다.[28] IL-6는 대식세포, 섬유아세포 등 여러 세포에서 생산되는 사이토카인이며 과잉 생산이 되었을 경우 여러 가지 면역 이상증, 염증성 질환, 림프계 종양의 발증을 일으킬 수 있다.[29] 하이드록시아파타이트의 함량에 따른 염증의 발현 정도를 측정하기 위하여 mRNA 관점에서 알아보았다. Figure 6은 지지체에 RAW 264.7 세포를 파종한 뒤 1, 3일 후에 염증사이토카인인 TNF-α, COX-2, IL-6 및 GAPDH mRNA 발현 여부를 본 결과이며 house keeping gene인 GAPDH로 표준화 시켜 나타내었다. 1일째와 3일째에 염증 사이토카인의 발현량을 비교하였을 때 tissue culture polystyrene(TCP) 군에서는 염증 사이토카인의 발현량이 거의 없었으며 TCP에 LPS을 처리한 양성 대조군에서는 염증 사이토카인의 발현량이 가장 많게 나타났다. PLGA 지지체보다 하이드록시아파타이트를 함유한 PLGA 지지체에서 발현 정도가 감소되었다. 3일째에서 모든 그룹의 염증사이토카인의 발현정도가 감소함을 나타내었으며 특히 하이드록시아파타이트가 20 wt% 첨가된 지지체에서 발현량이 가장 적게 나타났다. 이러한 결과로 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체는 시간이 지

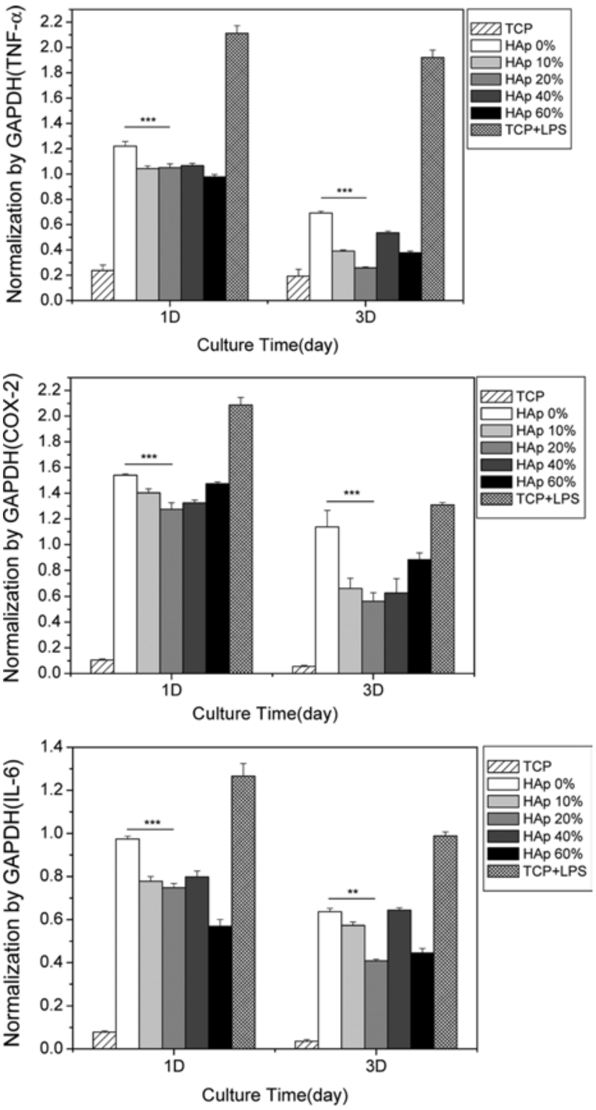

Figure 6. Gene expression profiles of TNF-α, COX-2 and IL-6 in PLGA and hydroxyapatite/PLGA scaffolds ($p^{**}<0.005$, $p^{***}<0.0005$).

남에 따라 전염증성 사이토카인인 TNF-α, COX-2, IL-6의 발현량이 감소됨으로 보아 하이드록시아파타이트를 첨가한 지지체를 골 이식재로 적용하기에 적합하다고 사료된다.

하이드록시아파타이트/PLGA 활성산소 측정. 활성산소(ROS)는 생체내에서 지속적으로 생성되나 과도한 생산은 염증을 유발하며 만성 질환을 일으킨다. 이에 하이드록시아파타이트/PLGA의 ROS 측정을 하기 위하여 RAW 264.7 세포를 2일 동안 배양한 후 측정하였다. ROS 측정을 위하여 DCFH-DA를 이용하여 유세포 분석기로 세포 내 ROS를 측정하였으며 Figure 7에 나타내었다. 음성 대조군으로 RAW 264.7 세포를 배양액에 배양한 것과 양성 대조군으로 RAW 264.7 세포를 배양액에 LPS를 첨가하여 배양하였다. ROS의 측정은 DCF의 형광 세기로 알 수 있으며 LPS를 처리하지 않은 음성 대조군은 형광의 세기가 가장 약했으며 LPS를 처리한 양성 대조군은 형광의 세기가 가장 강함을 확인하였다. PLGA 지지체와 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 피크는 대부분이 음성 대조군과 양성 대조군 사이에 나타났으며 그 중에 하이드록시아파타이트가 20 wt% 첨가된 지지체의 피크가 음성 대조군의 피크에 가장 가까운 위치에서 피크 값이 나타났다. 이는 하이드록시아파타이트의 양이 과도하게 첨가되었을 경우 ROS 생성이 증가함을 볼 수 있으며 적절한 양의 하이드록시아파타이트가 염증 완화 효과의 우수함을 보여주었다.

조직학적 평가. *In vivo*상에서 조직과 지지체의 상호작용과 염증 반응을 알아보기 위하여 지지체를 쥐의 겨드랑이 부위의 피하에 이식하여 1 주와 4 주 후에 적출하여 H&E를 하였으며 대식세포의 발생 정도를 확인하기 위하여 ED-1 면역조직화학적 염색을 실시하였으며 Figure 8(a)에 나타내었다. 그 결과 1 주 후에서 PLGA 지지지체의 표면에서는 심한 육아 종성 염증 반응으로 인해 대식 세포와 거대 세포가 축적되어 육아 종성 침윤과 섬유화로 인해 두꺼운 벽을 형성하였다. 4 주 후에는 염증 세포 및 거대 세포의 침윤으로 인한 벽의 두께는 감소하기는 하였지만 지지체의 표면에 염증 세포가 존재하고 있었다. 반면에 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체에서는 육아 종성 반응이 적어 PLGA 지지체에서보다 얇은 벽을 형성하였으며 대식 세포와 거대 세포의 적어 염증 반응의 정도가 감소하는 것을 보여주었다. 특히 하이드록시아파타이트를 20 wt% 첨가한 지지체에서 4 주 후에 염증 세포의 침윤이 적어 육아 종성 반응으로 인해 생긴 벽이 가장 얇았다. 육아 종성 염증 반응으로 인해 섬유화된 조

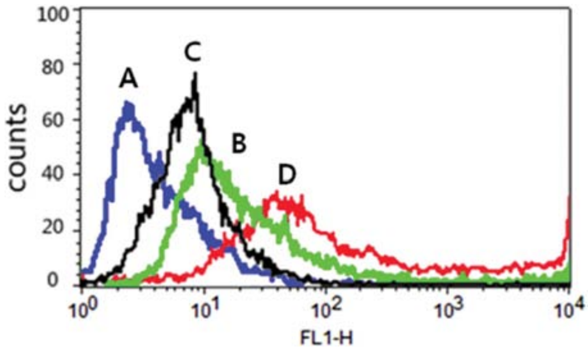

Figure 7. Antioxidant activity of PLGA and HAp/PLGA scaffolds. The flow cytometry analysis shows the effects of HAp/PLGA on the generation of ROS (A: TCP, B: cell cultured PLGA scaffold, C: cell cultured HAp 20% D: LPS).

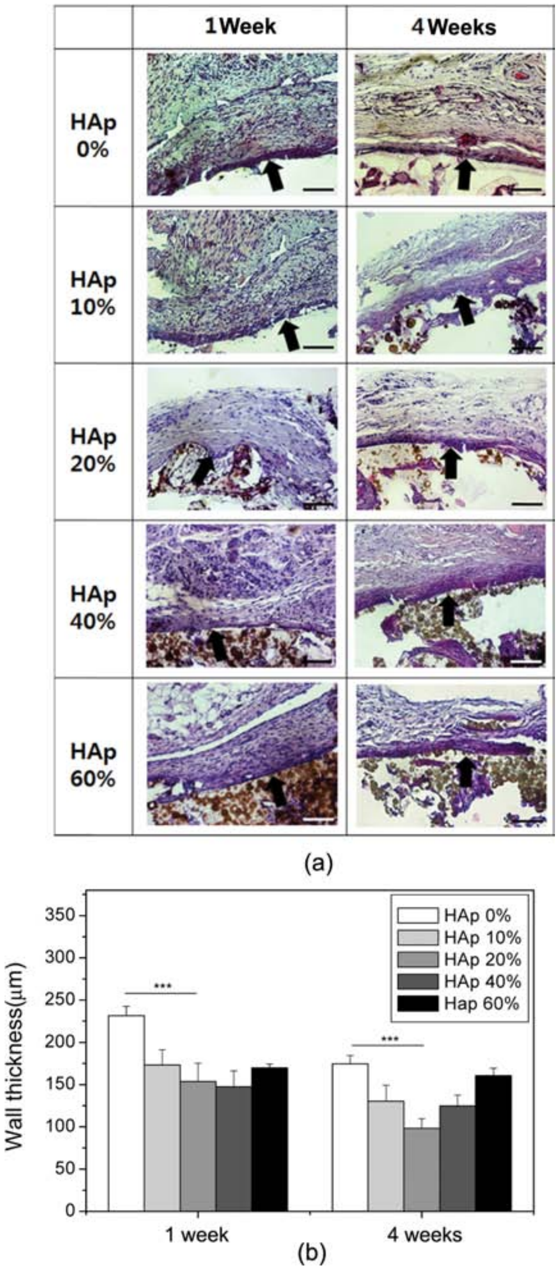

Figure 8. (a) Hematoxylin & Eosin stained histological section of tissue at PLGA scaffold and HAp/PLGA scaffolds 10, 20, 40 and 60% scaffolds after 1 and 4 weeks of implantation; (b) Fibrotic wall thickness (magnification with ×200, scale bar = 100 μm) (p***<0.0005).

직의 두께를 수치화하여 Figure 8(b)에 나타내었다. PLGA 지지체가 가장 두꺼운 벽을 형성하였으며 4 주 후에도 벽이 얇아지긴 하였지만 여전히 두꺼운 벽을 형성하고 있었다. 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체에 형성된 벽 두께는 PLGA 지지체보다 얇게 형성되었으며 특히 20 wt% 첨가한 지지체에서 벽의 두께가 가장 얇았다.

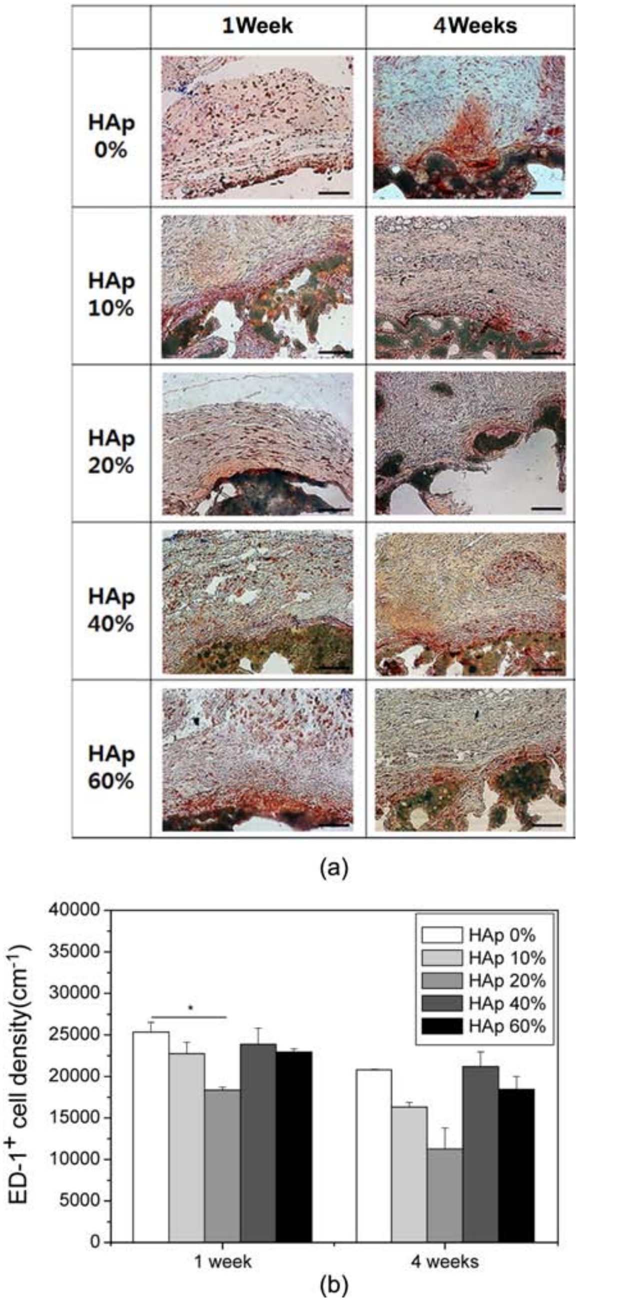

Figure 9. (a) ED-1 immunohistological section of tissue at PLGA scaffold and HAp/PLGA scaffolds 10, 20, 40 and 60% scaffolds after 1 and 4 weeks of implantation; (b) ED-1^{+} cell density (magnification with ×200, scale bar = 100 μm) (p*<0.05).

ED-1 면역조직화학적 염색 결과를 Figure 9(a)에 나타내었다. ED-1 염색은 단핵구나 대식 세포의 침윤 정도를 알아보기 위해 실시하였다. 1 주에서 PLGA 지지체는 표면에 대식세포의 조밀한 침윤이 생성되었으며 육아 종성 반응이 표면에서 관찰되었다. 4 주 후에는 대식 세포나 거대 세포가 감소하였으나 여전히 PLGA 지지체의 표면에 ED-1 양성 세포가 존재하는 것을 볼 수 있었다. 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체에서는 PLGA 지지체보다 ED-1 양성 세포의 수가 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 지지체 주위에 얇은 벽으로 둘러싸여 있는 것을 볼 수 있었다. H&E의 염색 결과와 마찬가지로 하이드록시아파타이트가 20 wt% 첨가된 PLGA 지지체에서 ED-1 양성 세포의 수가 감소되었으며 세포 수를 수치화하여 Figure 9(b)에 나타내었다. 그 결과 PLGA 지지체에서 가장 많은 ED-1 양성 세포 수가 존재하였고 하이드록시아파타이트가 20 wt% 첨가된 지지체에서 가장 적은 ED-1 양성 세포수가 존재하였다. 이로써 하이드록시아파타이트를 20 wt% 첨가된 PLGA 지지체가 조직 내에서 긍정적인 영향을 주는 것으로 확인하였으며 이는 *in vitro* 상에서 얻어진 결과와 유사하였고 이러한 결과를 통하여 생체 내 · 외에서 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체가 같은 작용을 하고 있음을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 하이드록시아파타이트를 첨가한 PLGA 지지체를 제조하여 순수한 PLGA 지지체보다 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 물성 강화와 생체 적합 지지체의 조건을 갖추기 위해서 염증 완화 효과를 *in vitro*와 *in vivo* 환경에서 비교 분석하였다. *In vitro* 환경에서는 함량에 따른 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체는 하이드록시아파타이트가 첨가됨에 따라 표면의 거칠도가 증가하는 것을 SEM 분석을 통하여 알 수 있었다. 또한 MTT와 SEM 분석 결과 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체에서 세포의 초기 부착률과 증식이 우수한 것을 확인하였으며 특히 20 wt%에서 우수하였다. 하이드록시아파타이트/PLGA 지지체에서의 전염증 사이토카인의 발현을 확인하고자 RT-PCR을 실시한 결과 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체에서 염증 인자의 발현 정도가 감소되었다. 또한 FACS를 통한 활성산소 측정 결과 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA의 지지체에서 세포내 활성산소의 생성을 억제시킴으로써 염증 반응이 PLGA 지지체보다 적음을 알 수 있었다.

하이드록시아파타이트/PLGA 지지체의 *in vivo* 환경에서 조직과 상호작용을 확인하고자 H&E 염색과 ED-1 염색을 실시한 결과 PLGA 지지체보다 하이드록시아파타이트가 첨가된 PLGA 지지체에서 염증 세포와 섬유 피막이 감소하였으며 특히 하이드록시아파타이트가 20 wt% 첨가된 PLGA 지

지체에서 항염증 효과가 좋은 것을 보여주었다. 이는 하이드록시아파타이트가 세포에 부착하고 증식하는데 유익한 환경을 제공하였으며 골 이식재로써 조직공학적 응용에 유용할 것이라고 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(112007-05-1-SB010)과 한국연구재단 바이오.의료기술개발사업(2012M3A9C6050204)의 지원을 받아 수행된 연구이므로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, *IChemE*, **85**, 1051 (2007).
2. Q. Ye, K. Ohsaki, K. Li, D.-J. Li, C.-S. Zhu, T. Ogawa, S. Tenshin, and T. Takano-Yamamoto, *Auris Nasus Larynx*, **28**, 131 (2001).
3. P. T. Thevenot, A. M. Nair, J. Shen, P. Lotfi, C.-Y. Ko, and L. Tang, *Biomaterials*, **31**, 3997 (2010).
4. Y. Zhang, C. Wu, T. Luo, S. Li, X. Cheng, and R. J. Miron, *Bone*, **51**, 704 (2012).
5. L. R. Buckner, M. E. Lewis, S. J. Greene, A. J. Q. Timothy, and P. Foster, *Cytokine*, **63**, 151 (2013).
6. Y. Woo and K. Na, *Int. J. Tissue Regen.*, **3**, 63 (2012).
7. R. M. Boehler, S. Shin, A. G. Fast, R. M. Gower, and L. D. Shea, *Biomaterials*, **34**, 5431 (2013).
8. S. C. Neves, L. S. M. Teixeira, L. Moroni, R. L. Reis, C. A. V. Blitterswijk, N. M. Alves, M. Karperien, and J. F. Mano, *Biomaterials*, **32**, 1068 (2011).
9. S. R. Caliari, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harley, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
10. D. H. Yang, H. N. Park, J. B. Lee, D. N. Heo, M. S. Bae, and I. K. Kwon, *Int. J. Tissue Regen.*, **2**, 125 (2011).
11. T. H. Kim, J. H. Ko, S. J. Kim, and Y. H. Park, *Int. J. Tissue Regen.*, **2**, 1 (2011).
12. Y. Yang, Y. Zhao, G. Tang, H. Li, X. Yuan, and Y. Fan, *Polym. Degrad. Stabil.*, **93**, 1838 (2008).
13. M. S. Kim, H. H. Ahn, Y. N. Shin, M. H. Cho, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **28**, 5137 (2007).
14. Z.-L. Mou, L.-J. Zhao, Q.-A. Zhang, J. Zhang, and Z.-Q. Zhang, *J. Supercrit. Fluids*, **58**, 398 (2011).
15. M. H. Fathi, A. Hanifi, and V. Mortazavi, *J. Mech. Sci. Tech.*, **202**, 536 (2008).
16. T. Koshino, T. Murase, T. Takagi, and T. Saito, *Biomaterials*, **22**, 1579 (2001).
17. C. Chang, N. Peng, M. He, Y. Teramoto, Y. Nishio, and L. Zhang, *Carbohydr. Polym.*, **91**, 7 (2013).
18. 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).
19. S. J. Kim, H. H. Hong, S. H. Kim, H. L. Kim, S. H. Kim, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 63 (2010).
20. S. Lee, B. Lee, H. Kim, S. Kim, and Y. G. Eom, *J. Korean Wood Sci. & Tech.*, **37**, 310 (2009).
21. H. Chen, W. Yang, H. Chen, L. Liu, F. Gao, X. Yang, Q. Jiang, Q. Zhang, and Y. Wang, *Colloid Surface B*, **73**, 212 (2009).
22. S. D. Nath, S. Son, A. Sadiasa, Y. K. Min, and B. T. Lee, *Int. J. Pharm.*, **443**, 87 (2013).
23. M. C. Chang and J. Tanaka, *Biomaterials*, **23**, 4811 (2002).
24. C. C. Wu, S. T. Huang, T. W. Tseng, Q. L. Rao, and H. C. Lin, *J. Mol. Struct.*, **979**, 72 (2010).
25. C. W. Lee, S. G. Kim, J. Y. Choi, B. D. Choi, C. S. Bae, S. J. Jeong, and M. J. Jeong, *Korean J. Electron Microscopy*, **35**, 121 (2005).
26. Y. Song, H. Yoo, S. Eum, O. Y. Kim, S. C. Yoo, H. E. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 189 (2011).
27. W. Qin, J. Feng, Y. Li, Z. Lin, and B. Shen, *Mol. Immunol.*, **44**, 2355 (2007).
28. R. E. Heravi, F. Hadizadeh, M. Sankian, J. T. Afshari, S. M. Taghdisi, H. Jafarian, and J. Behravan, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **44**, 479 (2011).
29. D. K. Kahlon, T. A. Lansdell, J. S. Fisk, and J. J. Tepe, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 3093 (2009).