

## PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지를 이용한 추간판 조직 재생

박현우 · 김혜윤\* · 권순용\*\* · 강길선\* · 김용식\*\*\*†

단국대학교 의과대학 정형외과, \*전북대학교 BIN융합공학과 고분자나노공학과,  
\*\*가톨릭의과대학교 여의도성모병원 정형외과, \*\*\*가톨릭의과대학교 서울성모병원 정형외과  
(2014년 7월 1일 접수, 2014년 7월 25일 수정, 2014년 7월 31일 채택)

## Regeneration of Intervertebral Disc Using Gellan Sponge Loading PLGA Microspheres

Hyunwoo Park, Hye Yun Kim\*, Soon Yong Kwon\*\*, Gilson Khang\*, and Yong-Sik Kim\*\*\*†

Department of Orthopedic Surgery, Dankook University Hospital,  
201 Manghyangro, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do 330-715, Korea

\*Department of BIN Fusion Technology, Department of Polymer-Nano Science & Technology and Polymer BIN Research Center,  
Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin, Jeonju 561-756, Korea

\*\*Department of Orthopedic Surgery, Yeouido St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,  
62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea

\*\*\*Department of Orthopedic Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea,  
222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

(Received July 1, 2014; Revised July 25, 2014; Accepted July 31, 2014)

**초록:** 젤란검은 천연재료로써 내열성, 내산성, 내효소성 등이 우수하여 용도가 광범위하나 기계적 강도가 약하다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 기계적 성질을 개선하고자 젤란검 스폰지에 PLGA 미립구를 혼합하였다. PLGA 미립구의 다양한 함량의 젤란검 스폰지는 기계적 강도를 알아보고자 압축강도를 측정하였고, MTT 분석, SEM, 생체활성조직학적 평가 및 RT-PCR을 통해 세포의 증식 및 ECM 분비 효과를 확인하였다. 그 결과, PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 지지체에서 섬유세포의 꾸준한 증식과 세포외기질 분비가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이 연구를 통하여 PLGA 미립구가 함유된 젤란검이 디스크조직 재건을 위한 지지체로서 적합함을 알 수 있었으며, 젤란검의 다양한 응용가능성을 제시하였다.

**Abstract:** Gellan gum as a natural polysaccharide has good heat resistance, acid resistance and enzymes resistance. However, one of the drawbacks of gellan gum might be the lower mechanical strength. In this work, gellan gum scaffolds were mixed with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere in order to improve mechanical properties. The gellan gum scaffolds with various contents of PLGA microsphere were prepared for the regeneration of disc tissues. To evaluate the mechanical strength of hybrid structure of gellan gum and PLGA microsphere, compression strength of the fabricated scaffolds was measured. MTT analysis, SEM observation, histological evaluation and RT-PCR were performed to confirm the effect on the cell growth and extracellular matrix secretion. As a result, it showed the best cell proliferation and extracellular matrix secretion in gellan gum sponge containing 50% PLGA microspheres. In conclusion, this study confirmed that the hybrid structure of gellan gum and PLGA microspheres was found suitable in regeneration of the intervertebral disc.

**Keywords:** intervertebral disc, gellan gum, PLGA microsphere, cell proliferation, tissue engineering disc regeneration.

## 서 론

추간판 디스크(intervertebral disc, IVD)는 반유체상태 구조이며, 하이드로젤의 형태로 중심부를 구성하는 수핵조직

(nucleus pulposus, NP)과 그 주변을 고리모양으로 감싸고 있는 섬유륜조직(annulus fibrosus, AF)으로 구성되어 있다. AF 조직은 하중지지, 유연성, 몸의 균형을 유지하는 역할을 수행하고,<sup>1,2</sup> 척추에 가해지는 힘을 분산시킴과 동시에 인장강도를 지니고 있다. AF 조직의 주구성원은 제 I형 콜라겐으로 이루어져 있으며 라멜라 구조를 이루고 있다.<sup>3-6</sup> 하지만, 외상, 노상, 기계적인 힘, 영양손실, 유전적 기질의 영향으로 인하여

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: ikimyongsik@gmail.com

강한 외력이 반복적이거나 지속적인 약한 외력으로 인하여 섬유륜 조직은 찢어질 수 있다.<sup>4,7,8</sup> 이 뿐만 아니라 수핵 내의 수분분압 감소에 기인하여 나타나는 척추 추간판의 퇴행성 변화는 척추체 전반에 퇴행성 변화를 일으키게 된다. 이로 인하여 요통이 발생하고, 요통을 치료하기 위해 다양한 외과적 수술방법이 시행되고 있으며 장기적 치료가 되지 않으면 주변조직을 손상시키는 등 많은 문제점이 있으나, 척추 추간판의 퇴행성을 예방하거나 정상 조직으로 재생하는 방법이 되지 못하였다. 또한 성장인자를 이용하여 기질의 생성을 자극하는 연구가 진행되기도 하였으나 지속적인 치료효과를 기대하기는 어려웠다.

따라서 많은 연구자들은 조직공학적으로 척추추간판 재생을 위한 치료법을 연구 중에 있으며, 천연고분자나 합성고분자를 이용한 조직재생을 시도하는 연구가 활발하다.<sup>9-11</sup> 본 연구에서는 여러 가능성 있는 생체재료 중에 천연재료인 젤란검을 척추 추간판 재생에 있어 이용하려 하였다.

식품첨가제나 약물전달체 등과 같은 다양한 분야에서 응용되고 있는 젤란검은 엘로데아속 수초로부터 분리된 *Pseudomonas elodea*를 사용하여 순수 배양 발효하여 얻은 고분자 다당류로써 1978년 처음 발견되었다.<sup>12,13</sup> 젤란검은 글루콘산, 람노오스, 포도당이 1:1:2로 구성된 복합 다당류로써, 정제된 후 건조 및 분쇄 과정을 거쳐 얻어진다.<sup>14</sup>

무색투명한 젤란검은 산과 열에 우수하고 pH나 이온침가 등을 통하여 물성을 조절할 수 있으며, 에탄올에 녹지 않아 젤란검을 가교하는데 에탄올을 가교제로 사용하기도 한다.<sup>15,16</sup> 젤란검은 물에 잘 녹지 않아 열을 이용하여 용해시키는데 여러번 열을 가하여도 젤의 강도가 저하되지 않는 우수한 물리적 특성을 가지고 있다.<sup>17</sup>

이는 미국식품의약안전청의 승인을 받아 다양한 분야의 임상에 직접 응용되고 있으며 젤란검의 유동학적, 구조적 특성이 밝혀지면서 여러 가지 분야에서 각광받는 고분자로 인정받게 되었다.<sup>18,19</sup> 젤란검은 생체적합성이나 물리화학적 특성 또한 뛰어난 조직공학에서도 사용될 뿐만 아니라 제조 과정이 쉬워 필름, 하이드로젤, 미립구, 마이크로캡슐 및 스폰지 등 다양한 형태로 사용이 가능하다.<sup>19</sup>

그러나 젤란검의 약점 중의 하나가 기계적 성질의 결여인데 본 연구에서는 이를 보완하고자 젤란검 지지체에 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA) 미립구를 함유시켜 기계적 성질을 향상시키고자 하였다. 제조된 지지체는 *in vitro* 상에서 AF세포를 배양하였으며, 이들 세포의 생존과 증식 및 표현형 유지에 지지체가 미치는 영향을 연구하여 섬유륜조직 재생에 있어 응용가능성을 확인하고자 하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 저아실화 젤란검은 Gelzan<sup>TMCM</sup>(Sigma,  $M_w$ :

1000000 g/mole, G1910, low acyl gellan gum)을 사용하였고,<sup>12</sup> 생분해성 고분자인 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer RG756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mol인 것을 사용하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. 세포배양에 이용된 시약들은 Gibco(USA)사에서 구입하여 사용하였다.

**PLGA 미립구 제조.** PLGA 미립구의 제조는 O/W 용매증발법을 이용하여 제조하였다. 미립구의 제조는 PLGA를 MC를 이용하여 오일상을 제조하였다. 제조된 오일상은 호모지나이저(PRO Scientific PRO 200, Oxford, CT, USA)를 이용하여 10000 rpm으로 30초 동안 교반시켜 주었다. 그 후 수용액상인 10% 폴리비닐알코올( $M_w$ : 13000~23000 g/mol, Sigma-Aldrich) 용액에 일정속도로 적하시켜 600 rpm으로 5시간 동안 교반하여 PLGA 미립구를 제조하였다. 제조된 PLGA 미립구는 7500 rpm, 5분 동안 원심분리하고, 침전된 미립구를 제외한 상층액은 제거하는 방법으로 5회 이상 세척해주었으며, 이렇게 얻어진 PLGA 미립구는 동결건조한 후 사용 전까지 습기를 제거하여 진공에서 보관하였다(Figure 1).

**PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지 제조.** 증류수에 2 wt% 젤란검 분말을 녹여 상온에서 90 °C까지 서서히 가열하였다. 젤란검이 완전히 용해가 되도록 90 °C에서 30분 동안 200 rpm으로 교반 후 60 °C로 천천히 온도를 낮추었다. 젤란검 용액의 10% 만큼 빼내어 주고 동량의 인산완충용액(PBS, pH 7.4, Gibco)을 넣어준 후 50 °C로 서서히 온도를 낮추었다. 50 °C에서 미리 제조해 놓은 PLGA 미립구를 젤란검 분말질량의 0, 10, 50 및 80% 씩 넣어준 후 호모지나이저를 이용하여 2분 동안 혼합시켜 주었다. PLGA 미립구가 함유

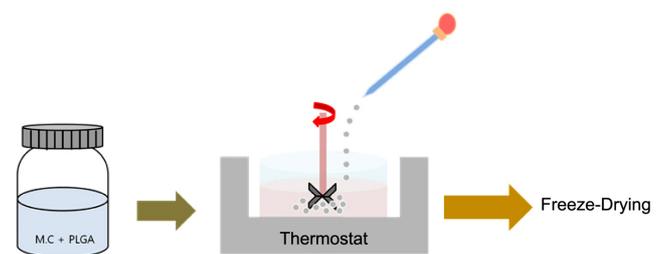


Figure 1. Fabrication process of PLGA microspheres.



Figure 2. Fabrication process of the gellan gum scaffolds containing PLGA microspheres.

된 젤란검 용액은 50 °C를 유지하면서 30분 동안 교반하였다. 그 후 동결건조하여 각각 PLGA 미립구가 함유되지 않은 젤란검 스폰지와, PLGA 미립구가 각각 10, 50 및 80% 함유된 젤란검 스폰지를 제조하였다(Figure 2).

**세포배양.** 실험에서 사용한 초대배양 섬유류 세포는 생후 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼(Damul Sci, Korea)에서 얻었다. AF 세포는 토끼의 허리척추 디스크판(L1-L5)에서 분리하였다. 분리한 AF 조직은 0.2 wt% 콜라게네이즈 A형(Roche, Indianapolis, USA) 용액에 용해시켜 100 µm의 나이론메쉬로 거른 후, 1500 rpm에서 5분 동안 3번 원심분리하였다. 초대배양 AF 세포는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco), 10% 우태혈청(FBS, Gibco), 1% 페니실린-스트렙토마이신(100 units/mL 페니실린 & 100 µg/mL 스트렙토마이신, Gibco)이 함유된 배양액으로 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하의 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었으며, 계대수가 2인 세포를 사용하였다.

**압축강도 분석.** 젤란검 스폰지에 PLGA 미립구의 함유량에 따른 기계적 강도의 변화를 확인하고자 압축강도를 측정하였다. 이때 만능물성측정기(TMS-pro, Food Technology Corporation, Sterling, Virginia, USA)를 이용하였으며, 시료거리는 1.5 mm, 테스트속도는 1.0 mm/min, 그리고 측정강도 0.5 N으로 동일한 조건 하에서 측정하였다.

**SEM 관찰.** PLGA 미립구가 함유된 젤란검 지지체 내에서 세포의 모폴로지 및 부착 양상을 확인하기 위하여 2.5 v/v% 글루타르알데하이드(Sigma)를 이용하여 4 °C에서 24시간 이상 세포를 고정하였다. 고정된 각각의 샘플은 에탄올(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 탈수하여 준비하였다. 준비한 샘플은 카본테이프를 이용하여 시료폴더에 고정시킨 후 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Model SC 500K, Emscope, UK)를 이용하여 백금 코팅한 후 SEM(Bio-LV SEM; Model SN-3000, Hitachi Co., Japan)을 통하여 관찰하였다.

**MTT 분석.** PLGA 미립구가 비율별로 함유된 젤란검 스폰지에서 세포의 증식률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma)분석을 통하여 확인하였다. PLGA 미립구가 비율별로 함유된 젤란검 지지체에 1×10<sup>5</sup> 세포의 수로 계산하여 세포를 파종하였다. 세포를 파종한 지지체는 배양 1, 3, 5, 7 및 14일 후에 MTT 용액(50 mg/mL) 100 µL씩 지지체 상부에 넣어주었다. 4시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 인큐베이션한 다음 보라색 결정이 생성되면 PBS 용액으로 세척한 후 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma) 용액을 1 mL씩 첨가하였다. 각각의 샘플은 96 웰플레이트에 100 µL씩 분주하여 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

**mRNA 분리 및 RT-PCR 분석.** PLGA 미립구가 비율별로 함유된 젤란검 스폰지에서 AF 세포의 유전자 발현정도를

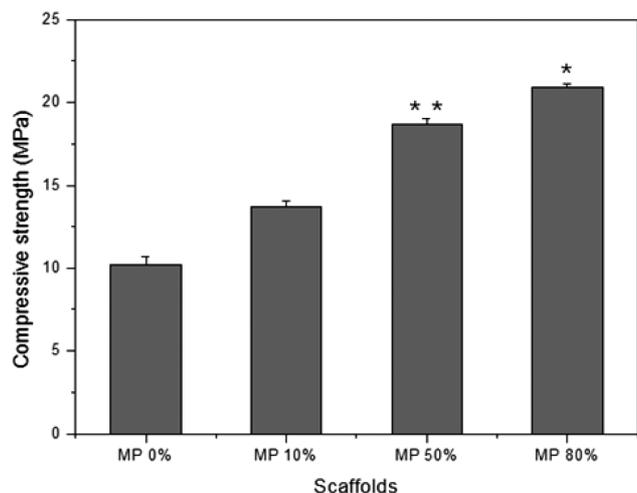
확인하고자 RT-PCR을 시행하였다. PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지에 AF 세포는 지지체 당 1×10<sup>6</sup>의 농도로 파종하였으며 파종 후 1 및 2 주 동안 배양하였다. 각각의 샘플은 1 mL의 Trizol(Invitrogen™, Life Technologies Co., Netherlands)을 이용하여 5분 동안 보관 후 피펫팅하여 세포막을 깨트린 다음, 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하여 4 °C에서 12000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 세포의 RNA 층은 이소프로판올(Sigma) 0.5 mL과 폴리알킬 케리어™(Molecular Research Center, Inc. USA) 5 µL를 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 침전시킨 RNA는 TOPscript™ one step RT-PCR kit(Enzynomics, Korea)를 이용하여 cDNA로 역전사하여 각각의 프라이머를 사용하여 DNA를 증폭하였다. 1%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 통하여, DNA를 전개시켰다. 전개된 겔은 자외선 투과조사기(Vilbrt Lourmat ETX-20.M, France)를 사용하여 시각화하였으며, β-actin, 제 I형 콜라겐 및 제 II형 콜라겐 mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다. 또한 Image J를 통하여 밴드광도를 확인하였으며, β-actin 밴드를 바탕으로 제 I형 콜라겐과 제 II형 콜라겐 밴드를 표준화하여 그래프화하였다.

**생체활성 조직학적 평가.** 4주령 balb-c 누드 마우스 (듀얼 바이오텍, Korea)에 근육주사를 통한 전신마취 하에 시행하였다. 세포가 파종된 PLGA가 함유된 젤란검 스폰지에서 세포의 분포와 세포외기질 생성 정도를 확인하고자 동결조직 절편기(Shandon Crytome FE)를 이용하여 조직학적 평가를 수행하였다. PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지에 섬유류 세포를 지지체 1개당 1×10<sup>6</sup>의 농도로 파종을 하였다. 세포파종 후 7일 동안 *in vitro* 환경에서 배양한 다음 누드 마우스 피하에 이식하였다. 각각의 샘플은 조직학적 평가하기 위하여 이식 1주 및 4주 후에 실험동물을 전신마취시킨 후 적출하였다. 적출한 샘플은 24시간 이상 10% 포르말린(Sigma) 용액에 고정한 후, 4 µm의 두께로 절편하여 PLL이 코팅된 슬라이드에 고정하였다. 모든 슬라이드는 4 °C에서 보관하였으며 조직학적 평가를 위하여 H&E와 세포외기질의 수분을 함유하는 글리코사미노글리칸의 발현 정도를 확인하고자 Safranin-O 염색을 시행하였다.

**통계.** 모든 실험은 통계학적 분석을 하였으며, student's t-test를 통하여 P 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 지표하였다.

## 결과 및 토론

**압축강도 측정.** 추간판 디스크내의 AF 조직은 수핵조직을 둘러싸고 있으며 자세에 따라 변하며 척추의 움직임으로 인해 발생하는 높은 압축응력을 견디는 역할을 한다.<sup>11,20,21</sup> 따라서 섬유류조직의 재생을 위한 지지체로 응용되기 위해 기계적 및 물리적 강도는 중요한 요인이 된다.<sup>22</sup> 이러한 높은 압



**Figure 3.** Compressive strength of the gellan gum scaffolds containing PLGA microspheres. Significant difference between groups is indicated (\*\* $P < 0.005$ , \* $P < 0.05$ ).

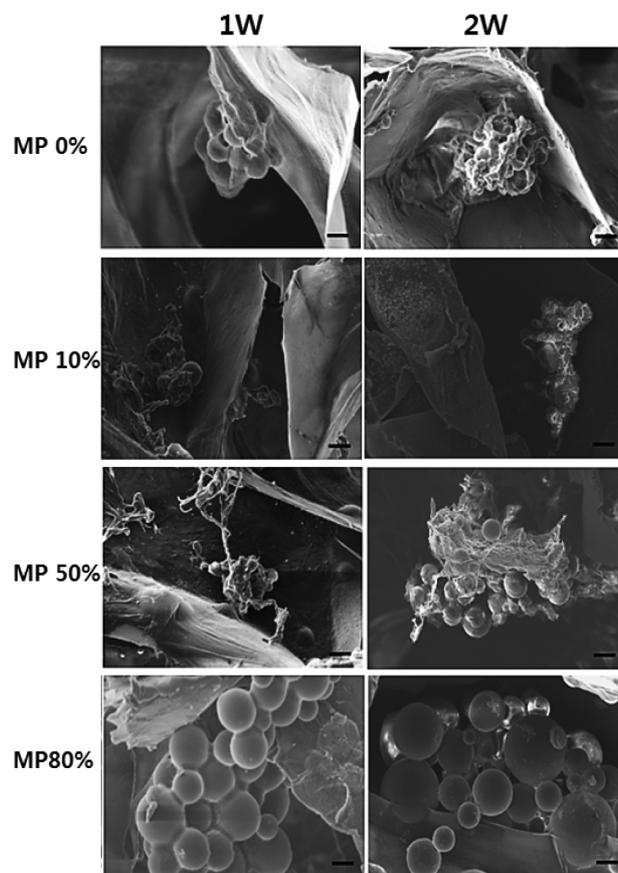
축응력과 인장강도를 증가시키기 위한 방법으로 젤란검 스폰지에 서로 다른 비율로 PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지를 제조하여 압축강도를 측정함으로써 PLGA 미립구의 함량이 지지체의 기계적 강도에 미치는 영향에 대해 알아보았다.<sup>11</sup>

2% 젤란검 스폰지에 PLGA 미립구 함량을 다르게 하여 제조한 후 압축강도를 측정한 결과는 Figure 3에 나타내었다.

그 결과 PLGA 미립구를 함유한 비율이 증가할수록 압축강도가 증가함을 알 수 있었다. PLGA 미립구가 80% 함유된 젤란검 스폰지는 비교군으로 사용된 PLGA 미립구가 함유되지 않은 2% 젤란검 스폰지보다 2배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 PLGA 미립구를 통하여 기계적 강도를 증가시킬 수 있음을 확인하였으며, 섬유륜 조직의 재생에 있어 우수한 환경을 제공할 것이라 사료된다.

**PLGA 미립구가 함유된 젤란검 지지체의 모폴로지 관찰.**

지지체 내에 형성된 공극은 세포와 영양분을 이동시키는 이동로 역할을 한다.<sup>23-25</sup> 지지체 내에 공극이 없을 경우 세포와 영양분의 이동이 용이하지 않아 세포증식이 원활하지 못하므로 지지체 내부로 세포의 증식과 기질분비를 위해서는 적절한 공극의 크기를 필요로 한다.<sup>26</sup> PLGA 미립구가 0, 10, 50 및 80%로 함유된 젤란검 스폰지에서 섬유륜 세포의 부착 및 세포기질 생성의 차이를 확인하기 위하여 SEM을 통하여 관찰하였다. Figure 4는 각기 다른 비율로 PLGA 미립구가 함유된 젤란검 지지체에서 AF 세포를 지지체 당  $1 \times 10^5$ 의 농도로 파종한 후 1주와 2주 동안 *in vitro*에서 배양한 후 관찰한 결과를 나타내었다. 배양 1주 후 모든 군에서 세포가 군집을 이루고 있음을 확인하였으며, 특히 PLGA 미립구를 중심으로 세포의 부착양상을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 PLGA 미립구는 지지체의 기계적 강도를 증가시키는 것 뿐만 아니라 세포의 부착에도 영향을 미치는 것을 확인할

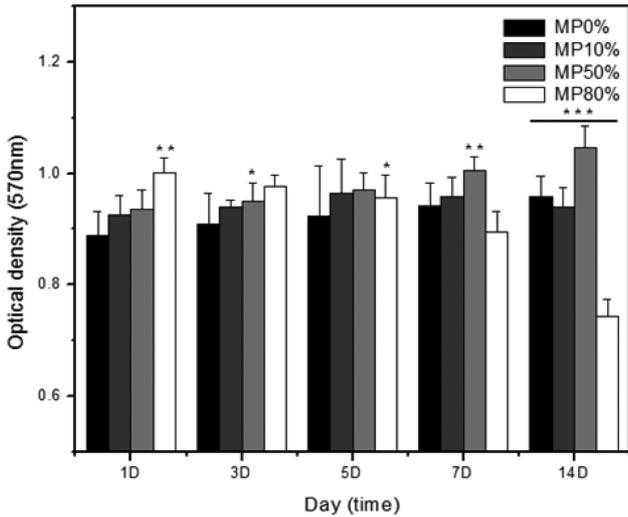


**Figure 4.** SEM microphotographs of AF cell morphology on surface of the gellan gum scaffolds containing PLGA microspheres at cultivation time 1 and 2 weeks (magnification,  $\times 500$ ).

수 있었다.

배양 2주 후에는 PLGA 미립구가 80% 비율로 함유된 젤란검 지지체군을 제외한 모든 젤란검 지지체에서 세포가 군집을 이루면서도 넓게 퍼져 기공벽을 뒤덮고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 PLGA 미립구가 50% 비율로 함유된 젤란검 지지체는 시간이 지날수록 세포의 증식과 기질 분비를 확인할 수 있었으며, 세포의 기질이 PLGA 미립구를 중심으로 방추형으로 뻗어 군집을 이루는 것이 관찰되었다.

이같은 결과는 배양초기에 PLGA 미립구가 80% 비율로 함유된 젤란검 스폰지는 다른 군보다 비교적 공극률이 낮기 때문에 세포의 밀도가 높아 세포간의 상호작용이 원활히 이루어졌지만, 시간이 지날수록 세포의 증식공간이 부족하여 결국 세포가 사멸되어 배양 2주 후에는 다른 비교군보다 세포의 증식이 원활히 이루어지지 않은 것으로 사료된다.<sup>27</sup> 결과적으로 PLGA 미립구를 통하여 기계적 강도를 높이기 위해 많은 함량을 함유하는 것보다는 적절한 기계적 강도를 지님과 동시에 세포의 증식과 기질분비를 고려해야 하는 것을 알 수 있었다.



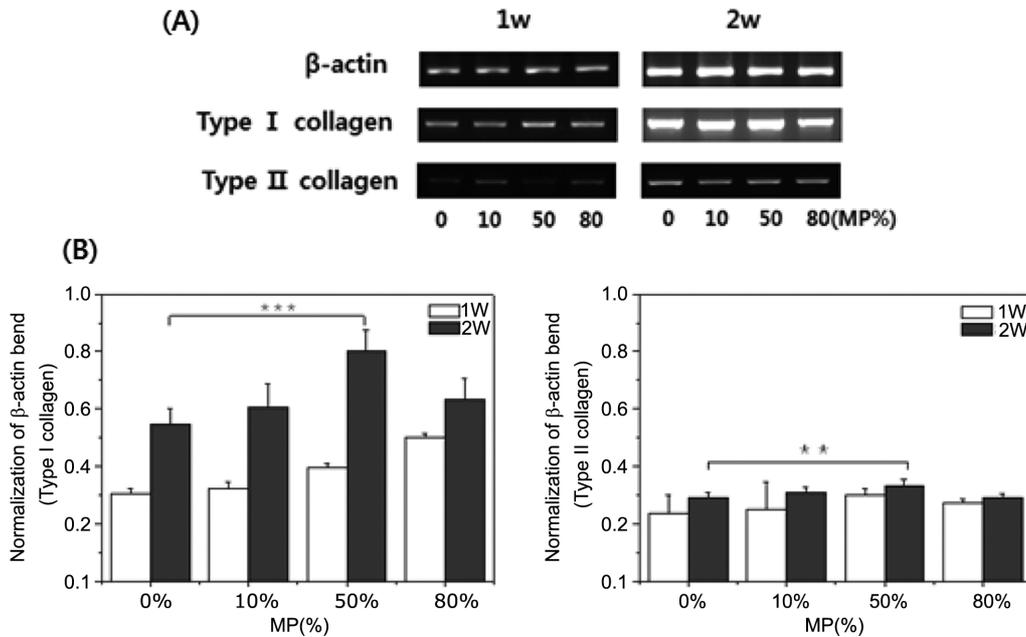
**Figure 5.** Cell viability of AF in the gellan gum scaffolds containing PLGA microspheres was analyzed by MTT assay after 1, 3, 5, 7 and 14 days post-seeding *in vitro*. Significant difference between groups is indicated (\*\*\*) $P < 0.0005$ , \*\*)  $P < 0.005$ , \*)  $P < 0.05$ .

**세포증식 분석.** PLGA 미립구가 0, 10, 50 및 80%로 함유된 젤란검 스폰지에서 세포의 생존능력을 분석하기 위하여 MTT 분석법을 이용하여 AF 세포의 증식률을 비교하고자 하였다. PLGA 미립구가 함량별로 함유된 젤란검 스폰지에 세포를 피종하고 1, 3, 7 및 14일 후 MTT 분석을 하였다(Figure 5). Figure 5에서 PLGA 미립구가 80% 함유된 젤란검 지지

체에서는 7일이 넘어가면서 증식률이 감소하는 결과를 보였으나 PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 스폰지에서는 증식률이 꾸준히 증가함을 보였다. 이러한 결과는 PLGA 미립구가 지지체의 기공의 크기에 영향을 주어 세포의 부착률을 높여주고 세포와 세포 및 세포와 매트릭스 사이의 상호작용에 도움을 주는 것으로 사료된다.

PLGA 미립구가 10% 함유된 젤란검 스폰지는 PLGA 미립구가 함유되지 않은 젤란검 스폰지와 기공의 크기에 있어 차이가 나지 않기 때문에 초기 세포부착률이 낮게 관찰되었다. 반면, PLGA 미립구가 80% 함유된 젤란검 스폰지에서는 높은 초기부착률을 보이지만 시간이 지남에 따라 세포의 증식공간이 줄어들기 때문에 14일에는 초기에 비해 가장 큰 폭으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세포부착 양상의 결과를 뒷받침할 수 있는 정량적인 증거로 세포가 증식하기 위해서는 적절한 기공의 크기를 가지는 지지체가 필요하며, 위의 결과를 바탕으로 섬유류 조직 재생에 있어 PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 스폰지가 가장 적합한 지지체라 사료된다.

**mRNA 분리 및 RT-PCR 분석.** 조직재생학적 관점에서 지지체는 적절한 기계적 강도는 물론 세포기능을 유지하거나 세포외기질을 생산하는데 긍정적인 영향을 주어야 한다.<sup>23,28</sup> AF 세포를 구성하고 있는 프로테오글리칸 및 sGAG와 같은 기질은 압축응력을 견디는 기계적 역할을 수행하기 때문에 세포외기질의 형성 및 유지가 중요하다고 보고되어 왔다.<sup>29,30</sup> PLGA 미립구가 여러가지 비율로 함유된 젤란검 스폰지에서



**Figure 6.** Gene expression profiles of  $\beta$ -actin, type I collagen, type II collagen as analyzed by RT-PCR at 1 and 2 weeks: (A) The result is agarose gel electrophoresis showing gene expression profiles of  $\beta$ -actin, collagen type I, collagen type II. (B) Normalization of  $\beta$ -actin expression by type collagen I and type collagen II; Significant difference between groups is indicated (\*\*\*) $P < 0.0005$ , \*\*)  $P < 0.005$ .

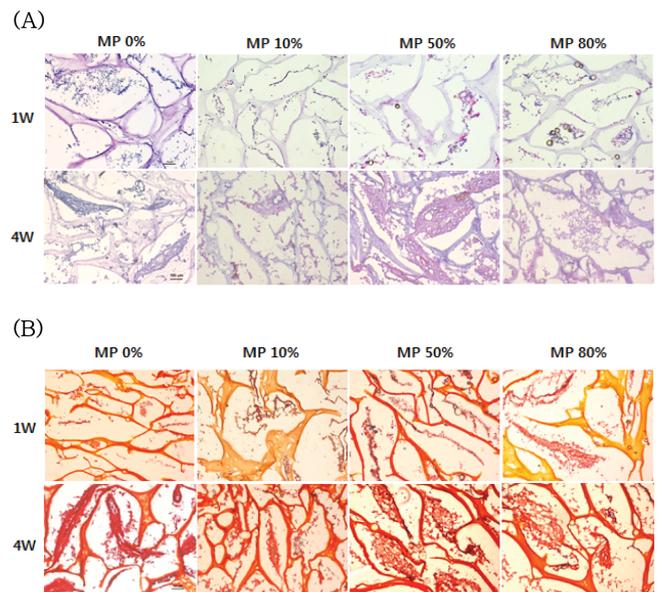
AF 세포의 표현형 유지에 미치는 영향을 알아보기로 mRNA 관점에서 RT-PCR을 수행하였다. AF 세포에서 나타나는 특이적인 유전자인 제 I형 및 제 II형 콜라겐 발현은 배양 1, 2 주 후에 확인하였다(Figure 6). 모든 실험군은 house keeping gene인  $\beta$ -actin의 발현을 확인하였으며,  $\beta$ -actin에 대한 밴드의 광도를 표준화하여 그래프화하였다. Figure 6(B)에서 보이는 것과 같이, 제 I형 콜라겐이 주를 차지하는 AF 세포는 시간이 지남에 따라 밴드의 발현정도가 증가하였음을 확인하였고 그 중 PLGA 미립구가 50% 비율로 함유된 젤란검 지지체에서 제 I형 콜라겐의 발현이 두드러짐을 확인할 수 있었다. 반면, PLGA 미립구가 80% 비율로 함유된 젤란검 지지체에서는 초기에는 높지만 배양 2주 후 다른 지지체군과 별다른 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 많은 양의 PLGA 미립구로 인하여 다른 지지체군보다 공극률이 줄어들어 세포의 증식과 세포외기질 분비에 있어 충분한 공간을 제공하지 못한 까닭으로 사료된다. 이러한 결과는 앞서 확인하였던 세포증식분석 결과에서 PLGA 미립구가 80% 비율로 함유된 젤란검 지지체에서 초기 증식률은 높지만 시간이 지날수록 감소함을 보이는 결과를 뒷받침해 준다. 제 II형 콜라겐 발현의 경우 모든 군에서 아주 미세하게 증가하였음을 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 젤란검 기반 지지체에서 기계적 강도를 향상시키기 위한 방안으로 PLGA 미립구를 함유되도록 적절한 기공 크기를 갖는다면 섬유륜 세포의 증식률을 향상시키는 것은 물론 특성 유지에 긍정적인 영향을 미치기 때문에 섬유륜 조직 재생에 응용가능 할 것이라 사료된다.

**생체활성 조직학적 평가.** PLGA 미립구가 서로 다른 비율로 함유된 젤란검 스폰지에서 AF 세포의 증식분포 및 기질 분비의 정도를 확인하고자 누드마우스 피하에 1 주와 4 주 동안 이식한 후 조직학적 평가를 수행하였다. 지지체 안에서 세포의 증식 분포를 확인하고자 H&E 염색과 연골성 조직으로 분류되는 섬유륜 조직의 세포외기질의 형성 정도를 확인하고자 Safranin-O 염색을 실시하였다(Figure 7).

H&E 염색을 통하여 지지체의 기공과 기공 사이의 상호작용을 확인할 수 있었다. Figure 7(A)를 보면, 1주보다 4주에서 AF 세포의 증식을 확인할 수 있으며, 세포의 증식으로 인하여 기공이 채워졌음을 확인할 수 있었다. Figure 7(B)는 Safranin-O 염색으로 PLGA미립구가 함유된 젤란검 지지체에서 1주보다 4주에서 지지체의 주변과 PLGA 미립구의 주변으로부터 세포의 증식이 활발해지면서 세포의 밀집형태가 조밀하게 형성되어 세포외기질의 분비의 증가로 인하여 기공이 채워지고 있음을 확인할 수 있었다.

이는 연골성 세포의 기질에 광범위하게 분비되어 붉은 색으로 염색된 부분을 통해 GAG의 축적과 프로테오글리칸이 풍부하게 형성되었음을 조직학적으로 증명해주었다. 또한 H&E 염색과 Safranin-O 염색결과를 바탕으로, 세포는 PLGA



**Figure 7.** Hematoxylin & Eosin (H&E) staining (A); Safranin-O staining (B) in the gellan gum scaffolds containing PLGA microspheres after 1 and 4 weeks of implantation *in vivo* (magnification,  $\times 200$ ).

미립구를 중심으로 증식이 되고 있음을 관찰할 수 있다. 특히 PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 스폰지에서 가장 활발한 AF 세포의 증식과 세포외기질 분비를 눈으로 확인할 수 있었다. 반면에, PLGA 미립구가 80% 함유된 젤란검 스폰지에서는 1주에는 다른 스폰지 군보다 세포의 증식이 더 좋음을 확인할 수 있었지만 4주에는 PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 스폰지보다 세포의 증식 및 세포외기질 분비에 있어서 적응을 조직학적 평가를 통하여 확인할 수 있었다.

이를 통하여 PLGA 미립구의 함량이 너무 많으면 세포의 정상적인 기능과 세포외기질 분비에 있어 충분한 환경을 제공하지 못한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 조직학적 평가를 통하여 섬유륜 조직의 재생에 있어서 PLGA 미립구가 적절하게 함유된 젤란검 지지체가 세포와 매트릭스간의 연결이 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.<sup>31</sup> 따라서 PLGA 미립구가 적절하게 함유된 젤란검 지지체가 *in vivo* 환경에서도 AF 세포 증식과 세포외기질 분비 등에 있어서 우수하기 때문에 재생에 매우 효과적일 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 조직공학적인 디스크재생을 위한 지지체 연구의 일환으로 AF 조직의 구조적 및 물리적 특성을 고려하여 조직재건을 위한 최적의 지지체 개발 연구에 초점을 맞추었다. 디스크재생에 많이 이용되는 천연재료인 젤란검을 이용하였으며, 지지체의 낮은 기계적 강도를 개선하고자 PLGA

미립구를 혼합하여 제조함으로써 기계적 강도를 향상시켰다. PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지에 AF 세포를 배양하여, *in vitro* 실험을 진행한 결과 서로 다른 비율로 함유된 젤란검 스폰지와 비교해보았을 때, PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 스폰지가 AF 조직재생에 적합하다는 결과를 얻을 수 있었다. 세포증식 및 모폴로지 관찰을 통해 PLGA 미립구가 50% 함유된 젤란검 스폰지에서 세포의 증식과 세포외기질 분비가 가장 활발함을 알 수 있었다. 이는 세포의 증식 및 세포외기질의 분비에 가장 큰 영향을 주는 기공의 크기와 기공과 기공간의 연결성이 좋아 기공을 통한 영양분과 산소 및 배설물과 노폐물이 원활히 이동되었다는 것을 증명하고 있다. 조직학적 분석과 RT-PCR을 통하여 알아본 표현형 유지나 기질분비에 있어서 PLGA 미립구가 50% 비율로 함유된 젤란검 스폰지에서 가장 우수한 환경을 제공한다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과를 종합하여 보았을 때, PLGA 미립구가 함유된 젤란검은 기계적 성질을 향상시키고 동시에 세포와 세포 사이의 상호작용에 영향을 주는 것을 시사한다. 안정적인 공간을 제공하는 지지체는 세포 활성화와 기질분비를 위한 중요한 요인으로 조직 재건 시 고려해야 할 사항으로 PLGA 미립구가 함유된 젤란검 스폰지는 섬유류 조직 재생에 있어서 유용한 지지체로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

## 참 고 문 헌

- J. Wollbold, R. Huber, D. Pohlers, D. Koczan, R. Guthke, and R. W. Kinne, and U. Gausmann, *Bmc. Syst. Biol.*, **3**, 77 (2009).
- A. T. Reza and S. B. Nicoll, *Acta Biomater.*, **6**, 179 (2010).
- A. K. Williamson, A. C. Chen, and R. L. Sah, *J. Orthopaed. Res.*, **19**, 1113 (2001).
- A. J. Hayes, M. D. Isaacs, C. Hughes, B. Caterson, and J. R. Ralphs, *Eur. Cells Mater.*, **22**, 226 (2011).
- N. T. Jacobs, L. J. Smith, W. M. Han, J. Morelli, J. H. Yoder, and D. M. Elliott, *J. Mech. Behav. Biomed.*, **4**, 1611 (2011).
- D. Wang, N. V. Vo, G. A. Sowa, R. A. Hartman, K. Ngo, S. R. Choe, W. T. Witt, Q. Dong, J. Y. Lee, L. J. Niedernhofer, and J. D. Kang, *Spine J.*, **11**, 139 (2011).
- A. C. Borges, C. Eyholzer, F. Duc, P. E. Bourban, P. Tingaut, T. Zimmermann, D. P. Pioletti, and J. A. Manson, *Acta Biomater.*, **7**, 3412 (2011).
- Y. H. Cheng, S. H. Yang, W. Y. Su, Y. C. Chen, K. C. Yang, W. T. Cheng, S. C. Wu, and F. H. Lin, *Tissue Eng., Part A*, **16**, 695 (2010).
- H. E. Gruber, K. Leslie, J. Ingram, H. J. Norton, and E. N. Hanley, *Spine J.*, **4**, 44 (2004).
- M. Yeganegi, R. A. Kandel, and J. P. Santerre, *Acta Biomater.*, **6**, 3847 (2010).
- D. R. Pereira, J. Silva-Correia, S. G. Caridade, J. T. Oliveira, R. A. Sousa, A. J. Salgado, J. M. Oliveira, J. F. Mano, N. Sousa, and R. L. Reis, *Tissue Eng., Part C*, **17**, 961 (2011).
- G. Khang, S. Lee, H. Kim, J. Silva-Correia, M. Gomes, C. Viegas, I. Dias, J. Oliveira, and R. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, DOI: 10.1002/term.1625 (2012).
- J. Silva-Correia, V. Miranda-Goncalves, A. J. Salgado, N. Sousa, J. M. Oliveira, R. M. Reis, and R. L. Reis, *Tissue Eng., Part A*, **18**, 1203 (2012).
- P. Matricardi, C. Cencetti, R. Ria, F. Alhaique, and T. Coviello, *Molecules*, **14**, 3376 (2009).
- J. T. Oliveira, T. C. Santos, L. Martins, M. A. Silva, A. P. Marques, A. G. Castro, N. M. Neves, and R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 493 (2009).
- J. T. Oliveira, T. C. Santos, L. Martins, R. Picciochi, A. P. Marques, A. G. Castro, N. M. Neves, J. F. Mano, and R. L. Reis, *Tissue Eng., Part A*, **16**, 343 (2010).
- M. Ahuja, S. Singh, and A. Kumar, *Inter. J. Biol. Macromol.*, **53**, 114 (2013).
- Q. Chen, Y. Zheng, Y. Li, Y. Zeng, J. Kuang, S. Hou, and X. Li, *Drug Deliv.*, **19**, 194 (2012).
- J. Silva-Correia, J. M. Oliveira, S. G. Caridade, J. T. Oliveira, R. A. Sousa, J. F. Mano, and R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, e97 (2011).
- A. C. Jones, C. H. Arns, D. W. Huttmacher, B. K. Milthorpe, A. P. Sheppard, and M. A. Knackstedt, *Biomaterials*, **30**, 1440 (2009).
- F. R. Rose and R. O. Oreffo, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **292**, 1 (2002).
- H. Kim, H. Kim, H. Yoo, J. Song, S. Jeong, Y. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Macromol. Res.*, **20**, 1044 (2012).
- B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
- Y. Woo and K. Na, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 63 (2012).
- J. N. Guanzon, J. R. Berg, M. Mizuno, S. Lee, Y. Jo, J. Yeo, B. Nam, B. Kim, Y. Koh, T. Takebe, and J. Lee, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 7 (2013).
- H. L. Kim, M. Hong, S. J. Kim, H. Jo, I. S. Yoo, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 378 (2011).
- K. E. Kuettner, *Clin. Biochem.*, **25**, 155 (1992).
- M. Sha'ban, S. J. Yoon, Y. K. Ko, H. J. Ha, S. H. Kim, J. W. So, R. B. Idrus, and G. Khang, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **19**, 1219 (2008).
- Y. X. Huang, J. Ren, C. Chen, T. B. Ren, and X. Y. Zhou, *J. Biomater. Appl.*, **22**, 409 (2008).
- H. Lu, T. Hoshihara, N. Kawazoe, and G. Chen, *Biomaterials*, **32**, 2489 (2011).
- H. Liu, F. Yao, Y. Zhou, K. Yao, D. Mei, L. Cui, and Y. Cao, *J. Biomater. Appl.*, **19**, 303 (2005).