

콘드로이틴설페이트가 함유된 젤란검 하이드로젤에서의 연골재생연구

최일남 · 김창현 · 송정은 · 백종선 · 전성현 · 전하안 · 이순영 · 강길선*

전북대학교, BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
(2017년 4월 4일 접수, 2017년 5월 13일 수정, 2017년 7월 11일 채택)

A Comprehensive Study on Cartilage Regeneration Using Gellan-gum/Chondroitin Sulfate Hybrid Hydrogels

Ilnam Choi, Changhyun Kim, Jeong Eun Song, Jongseon Baek, Sung Hyun Jeon,
HaYan Jeon, Soon Young Lee, and Gilson Khang†

Department of BIN Convergence Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University,
567 Baekje-daero, Jeonju 54898, Korea

(Received April 4, 2017; Revised May 13, 2017; Accepted July 11, 2017)

초록: 젤란검(Gellan gum, GG)은 람노오스, 글루콘산 및 포도당으로 구성된 헤테로다당류로서 에로디속의 수초로부터 추출하며, 무색의 무미, 무취한 분말로서 생체적합성이 좋아 현대 조직공학에 주로 이용되는 생체재료이다. 콘드로이틴설페이트(CS)는 골관절염(OA)의 임상증상을 천천히 완화를 유도시키고, 이런 효과들은 치료 후에도 장기간 지속시킨다고 알려져 있다. 실질적으로, 동물실험과 임상시험에서 관절염증을 회복, 지연 혹은 안정화할 수 있어서 장기치료에서 증상완화를 제공하는 구조개선 관절염 약으로 CS의 효능이 입증되고 있다. 따라서 본 연구에서는 연골재생에 있어, CS를 함유한 GG 하이드로젤의 효과를 확인하고자 *in vitro* 환경에서 실험을 진행하였다. CS의 함량은 젤란검 중량의 10, 20, 30 wt%로 설정하여 하이드로젤 형태로 제조하였고, 지지체의 특성분석을 위해 압축강도, SEM을 평가하였다. 세포부착과 증식률은 MTT, 유전자발현은 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 20%의 CS/GG가 세포부착 및 증식률, 유전자발현이 다른 군에 비해 가장 높았다. 그에 따라 20% CS/GG는 연골재생을 위한 하이드로젤로 응용가능성이 기대된다.

Abstract: Gellan gum is a heterosaccharide composed of rhamnose, glucuronic acid and glucose. It is a colorless tasteless odorless powder extracted from aquatic plants in Erodium. It is a biomaterial mainly used in modern tissue engineering. The chondroitin sulfate (CS) has been found to induce slow, sustained relief for osteoarthritis (OA) patients worldwide. It has been also proven a structurally improved arthritis drug that can relieve, delay or stabilize joint inflammation in many animal experiments and clinical trials, thus providing symptom relief in long-term. In this study, we investigated the effect of gellan gum scaffolds containing chondroitin for treating osteoarthritis *in vitro*. The content of chondroitin hybriide in the scaffolds was set to 10, 20 and 30%, and scaffolds was prepared by hydrogel type. SEM was performed to characterize the scaffolds. The cell adhesion and proliferation rate were confirmed by MTT assay and gene expression by RT-PCR. In addition, the compressive strength test were performed to confirm mechanical strength. Overall results showed that 20% CS/GG scaffolds was best suitable for adhesion, proliferation rate and gene expression and can be potentially applied for cartilage regeneration.

Keywords: chondroitin sulfate, gellan gum, hydrogel, scaffold.

서론

조직공학은 장기 결함 및 조직 재생과 같은 문제들을 해결하기 위해 새로운 방법을 제시해 왔으며, 오늘날 조직의 여

러 문제들을 해결하기 위한 도구로 연구되어 왔다. 연골은 조직공학 분야에서 가장 많이 연구된 조직 중 하나로서 퇴행하거나 외상을 입으면 정상적인 일상생활에 많은 제약이 따르고, 자가치유의 제한된 수복능력 때문에 매우 중요한 연구 주제로 부상되고 있다.

연골은 손상 시 약물 복용, 관절 내 주사, 물리치료, 수술 등으로 치료를 하지만, 큰 결함이 발생 될 경우, 치료가 쉽지 않아 새로운 방법을 연구하는 추세이다. 그 중 효과적인 방

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

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

법으로 대두되고 있는 방법 중 하나로, 체외에서 연골세포를 배양한 후 지지체에 세포 부착을 유도시켜, 증식 환경을 만들어주고, 이를 체내로 주입하는 방법이 있다.¹²

연골재생 재료로 가장 많이 사용되는 천연고분자로서는 콜라겐, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 그리고 젤란검 등이 있다.³⁻⁶ 본 실험에 사용된 고분자 재료는 젤란검(gellan gum, GG)으로, 글루콘산, 람노오스, 그리고 포도당(1:1:2)이 규칙적으로 배열된 복합다당류로, 무취, 무색, 내열성, 그리고 내효소성^{7,8} 등이 우수하다. 또한 이온 첨가 및 pH 조절 등을 통해 하이드로젤의 기계적 물성을 조절할 수 있으며, 세포 독성 또한 없어 연골 분야에서 생체 재료로 다양하게 연구되고 있다.⁹

콘드로이틴설페이트(Chondroitin sulfate, CS)는 D-glucuronic acid, N-acetyl-D-galactosamine과 황산으로 결합된 점질성 다당류(뮤코다당, mucopolysaccharide)이다. CS는 동물 결합조직의 기질, 장기, 체액 등에 분포하며,¹⁰ 성인병의 억제 및 예방, 항 산화 효과, 혈액응고작용, 동맥경화 억제 및 예방, 관절조직 보호, 그리고 세균감염 억제작용 등¹¹ 다양한 효과가 있다고 알려져 있다. 따라서 본 실험은 연골 재생적 측면에서 좋은 효과를 가진 CS와 GG를 비율 별로 혼합하여, 하이드로젤로 제조한 후 연골세포를 부착시켜 시간이 지남에 따른 연골세포의 양상을 알아보고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 젤란검(Gelzan™CM(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 평균 분자량 1000000 g/mole, G1910)), 콘드로이틴설페이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하였다. 그 외 이번 실험에 사용된 모든 화학약품 및 유기용매들은 HPLC 등급을 사용하였다.

젤란검 하이드로젤 제조. 열 교반기를 이용해 3차 증류수 40 mL에 젤란검 분말을 2 wt% 농도로 넣어준 후 90 °C 이상의 온도로 가열하여, 분말이 완전히 용해될 때까지 교반하였다. 그 후 CS는 젤란검 양의 각각 0, 10, 20, 및 30%의 농도로 넣어준 후 교반시키고, 가교제로 0.03%의 CaCl₂를 첨가하였다. 가열된 CS/GG 수용액은 패트리디쉬에 분주하여 굳히고, 바이옵시 펀치(biopsy punch)를 이용하여, 직경 8 mm, 높

이 4 mm의 하이드로젤 형태의 젤란검을 제조하였다(Figure 1). 그리고 젤란검의 다공 및 표면 거칠도 분석을 위해 제조된 하이드로젤은 냉장 4시간, 냉동 4시간 후에 -80 °C에서 24시간 동안 급랭시킨 후 동결건조기를 이용하여 2일 동안 진공상태에서 동결건조하여 스펀지 형태로 제조하였다.

압축강도 측정. 각각의 CS 함량에 따른 CS/GG 하이드로젤의 압축강도를 측정하기 위해 만능물성측정기(TMS-Pro, Food Technology Corporation, Sterling, USA)를 사용하였다. 만능물성측정기의 설정 값으로 측정거리는 2 mm, 측정 속도는 20 mm/sec, 측정 힘은 1 N으로 하였다.

SEM 관찰. CS/GG 하이드로젤의 다공 및 지지체의 표면 거칠도를 확인하기 위해 SEM 관찰을 실시하였다. 지지체를 아르곤가스가 충전된 플라즈마스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 백금으로 코팅하였고, 주사전자 현미경(Hitachi Co, Model S-2250N, Japan)을 이용하여 지지체 표면을 관찰하였다.¹²⁻¹⁵

연골 세포 분리 및 배양. 연골세포는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼(Hanil laboratory animal center, Wanju, Korea)의 무릎 관절에서 분리하여 추출하였다. 토끼를 희생시킨 후 뒷다리 털을 제거하고, 멸균된 수술용 칼로 무릎 관절을 절개해 연골 부위만 취한 다음 바로 인산완충용액(PBS, pH 7.4, Gibco, NY, USA)으로 3번 이상 세척하였다. 그리고 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, Applied Science, Germany) 용액으로 24시간 동안 인큐베이터(37 °C, 5% CO₂)에서 조직을 용해시켰다. 용해가 완료된 조직을 70 µm의 나일론 매쉬로 거른 다음 원심분리하여 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco)과 F-12 영양배지 혼합액(Ham's F-12, Gibco), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)와 200 mM L-글루타민(Gibco), 50 µg/mL 아스코르빈산(Sigma), 15 mM HEPES buffer 1 M(Gibco)로 혼합된 배양액을 사용하여 세포 배양 플라스크에 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 배양액은 3일에 1번 교체해 주었다.

세포 증식을 측정. 연골세포가 파종된 CS/GG에서의 증식 능력을 측정하기 위해 MTT(3-[4,5-디메틸치아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석을 각각 1, 4, 7, 14, 21 일째 시행하였다. 각 지지체에, 1.9×10⁵ 세포/하이드로젤의 농도로 연골세포를 파종하고, 상기에 사용된 동일한 배양액으로 정적 배양하였다(n=3). 그 후 MTT용액(5 mg/mL stock in PBS, Sigma)을 100 µL씩 넣고 4시간 동안 인큐베이터에서 37 °C 조건으로 배양을 한 후 보라색 결정이 형성되면 하이드로젤을 24-well plate에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 용해한 후 96-well plate에 용해된 용액을 각각 100 µL씩 분주하여 Microplate Reader(Thermomax, Molecular Device Co. USA) 570 nm의 흡광도로 세포증식을 측정하였다.

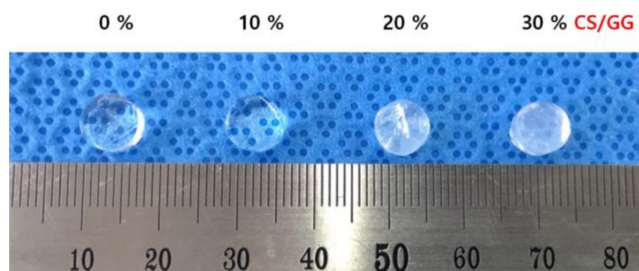


Figure 1. Fabricated CS/GG hydrogels.

mRNA 발현도 확인. 비율별로 제작한 CS/GG 하이드로젤에 파종된 연골 세포의 특정 mRNA 발현여부를 확인하기 위해 연골세포를 1, 2 및 3주 배양시킨 후 역전사 효소를 사용함으로써 RNA를 증폭시켜 RT-PCR 분석을 실행하였다. 연골 세포 파종 후 7, 14, 21일째에 CS/GG 하이드로젤에 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가시켜 5분 동안 인큐베이션시킨 후 1.5 mL EP 튜브에 넣고, 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가시킨 다음 원심분리(4 °C, 12,000 rpm, 15분)를 하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA는 bio spectrometer(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 정확한 mRNA 값을 정량한 후, Xenotech Oligo(dT)22-25 프라이머(Xenotech, Deajeon, Korea) reverse type, forward type을 각각 1 µL씩 넣어주고, free water(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)로 처리하여 authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통해 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, aggrecan, collagen Type II 및 collagen Type I PCR을 수행하였다. PCR로써 증폭된 DNA를 1%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 EtBr(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 넣어 시각화하였고, 300 nm 자외선 조사를 사용하여 aggrecan, GAPDH, collagen Type II 및 collagen Type I cDNA밴드의 발현 정도를 확인하였다.

통계학적 분석. 모든 실험에 적용된 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하였으며, p 값이 0.05 미만일 경우만 통계적으로 유의한 것으로 하였다(* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). 또한 모든 실험에 정확성을 높이기 위해 3번 이상에 걸쳐 진행하였다(n =3).

결과 및 토론

압축강도 분석. 각각 0, 10, 20, 30% 함량별로 제조한 CS/GG 하이드로젤의 기계적 물성을 관찰하기 위해 압축강도를 실시하였다. Figure 2는 CS/GG에 압력을 가했을 때 나타나는 그래프이다. 20 mm/min의 속도로 1 N의 압력을 가하여 압축시켰을 때, 하이드로젤의 균열과 파괴 시의 하중을 지지체의 단면적으로 나누었다. 그 결과 CS를 첨가하지 않은 하이드로젤에서 5 N/mm² 이상의 압축강도가 나타났고, 첨가한 그룹에서는 압축강도가 감소하는 경향성을 나타냈다. 이는 젤란검-젤란검 결합 사이에 CS가 결합되어, 기존 젤란검-젤란검 결합력이 가지는 기계적 강도에 영향을 미치는 것으로 사료된다.¹⁶ 압축강도 기기분석은 총 5번 반복 실험하여 데이터 값의 재현성을 높였다.

SEM 관찰. Figure 3은 CS/GG 단면을 SEM으로 관찰한 것이다. 관찰결과 4개의 지지체 각각 서로 다른 다공의 크기와 거침도를 확인할 수 있었다. 다공 크기는 Image J를 통해

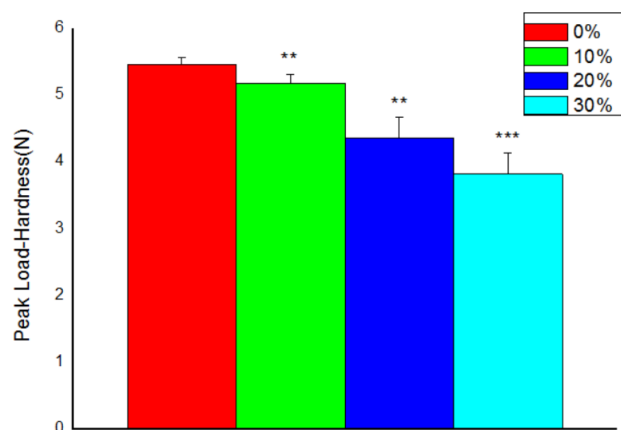


Figure 2. Compressive strength of CS/GG hydrogels (** p <0.01, *** p <0.001).

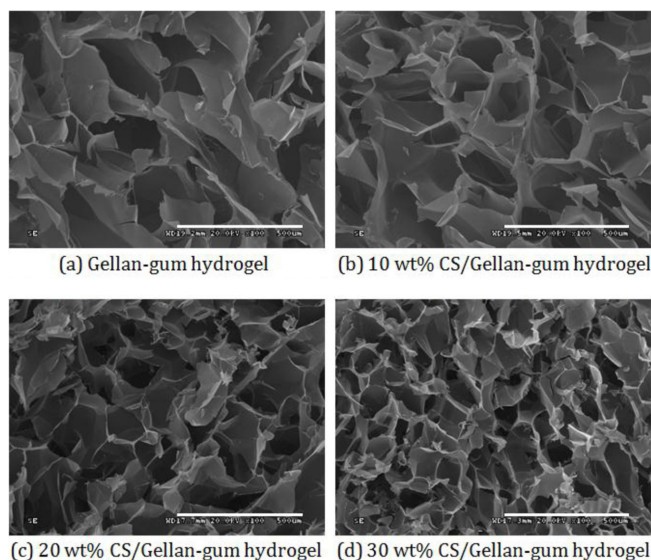


Figure 3. SEM microphotographs of 0, 10, 20 and 30% CS/GG hydrogels (magnification with $\times 100$, scale bar=500 µm).

서 측정하였으며, 0, 10, 20 및 30% CS/GG의 다공크기는 84.66 ± 23.10 , 64.53 ± 17.23 , 39.33 ± 20.52 , 33.12 ± 22.21 µm로 CS의 함량이 올라가면, 점차적으로 다공의 크기가 작아지는 대신 다공이 증가하고 뿐만 아니라 거침도 또한 증가함을 볼 수가 있었다. 다공의 크기와 거침도는 세포 초기 부착력과 세포 증식에 어떤 영향을 주는지, 후에 MTT 평가를 통해 초기 부착력을 확인하였다.¹²⁻¹⁵

세포 증식률. Figure 4는 CS/GG에 연골세포를 파종하여 세포 증식률을 측정하기 위해 *in vitro* 조건에서 MTT 분석을 시행하였다. 각각 함량이 다른 지지체에 세포를 1.9×10^5 개씩 파종하여 1, 4, 7, 14, 및 21일 후에 측정하였다. 각각의 지지체에서 세포 증식률을 확인한 결과, 모든 군에서 시간이 지남에 따라 세포 증식률이 증가함을 확인할 수 있었다. 그러

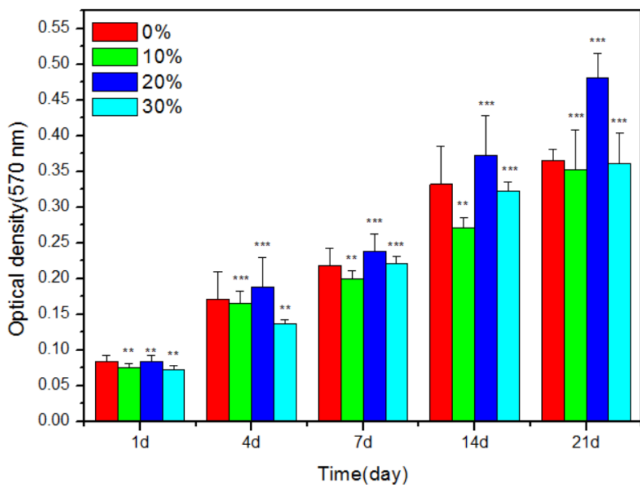


Figure 4. Cell viability of chondrocytes in 0, 10, 20 and 30% CS/GG scaffolds was analyzed by MTT assay after 1, 4, 7, 14 and 21 days post-seeding *in vitro*.

나 20% CS/GG 지지체는 0, 10, 및 30% CS/GG 지지체에 비해 세포 증식률이 모든 타임 포인트에서 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. 이는 SEM 이미지 관찰 결과, 20% CS/GG 지지체가 0, 10, 그리고 30% CS/GG 지지체들에 비해 보다 연골세포 증식의 적합한 다공의 크기를 갖기 때문으로 사료된다.¹⁷ 또한 천연 연골에서 추출한 콘드로이틴 설페이트의 함량이 17.94%를 보인다는 연구가 보고된 바 있다. 따라서 20% CS/GG 지지체가 천연 연골재생과 유사한 조성을 갖기 때문에 다른 군보다 연골 세포 증식률이 증가된 것으로 사료된다.¹⁸

PCR 분석. 0, 10, 20, 및 30% CS/GG 지지체에서의 연골 세포 유전자 발현 관찰을 위해 3주 동안 지지체에 배양시킨 연골세포를 분리한 후 mRNA를 채취하였다. 그 후 역전사효소를 사용하여 cDNA로 증폭시킨 후 연골기질의 주요 성분인 어그리칸(aggreacan), 연골조직의 세포간질 속에서 볼 수 있고 교원섬유(collagen fibers)를 구성하는 제1형 콜라겐(collagen Type I), 연골세포의 표지 분자인 제2형 콜라겐(collagen Type II) 프라이머들을 사용하여 전기영동(electrophoresis)한 후 각각의 나타난 발현도를, house keeping gene인 GAPDH를 사용하여 표준화하였다(Figure 5).¹⁹⁻²⁴ 그 결과 어그리칸, 제1, 2형 콜라겐의 발현도가 20% CS/GG 지지체에 파종한 군에서 모두 가장 높게 나왔다. 이는 연골세포 증식의 하이드로젤 지지체로서 20%의 CS를 첨가한 젤란검 지지체가 다른 지지체들보다 이상적인 연골세포 지지체임을 증명해준다. Figure 5(a), (b), (c)에서 0, 10, 및 30% CS를 첨가한 그룹들은 대조군 그룹보다 발현도가 모두 높거나 비슷하게 관찰되었으나, CS를 20% 첨가한 그룹은 대조군과 비교해 봤을 때 모든 군에서 발현도가 높게 나왔다. 이로써 CS는 연골세포 증식에 긍정적인 역할을 한다는 사실을 알 수 있지

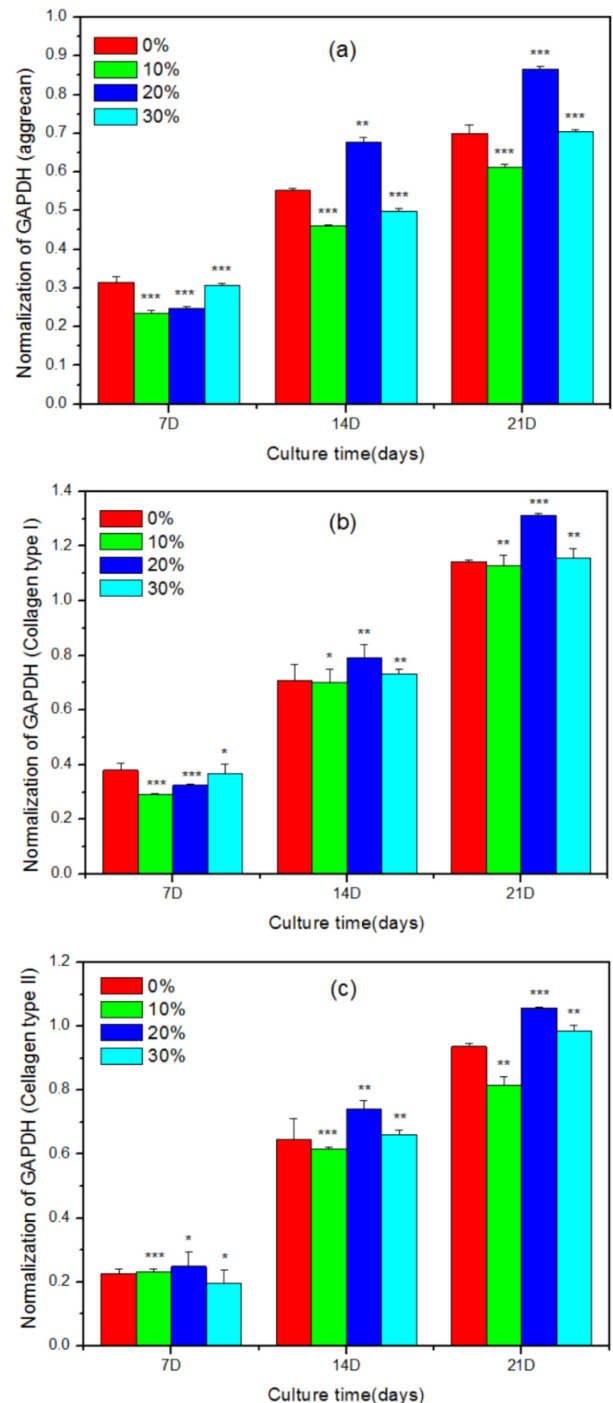


Figure 5. RT-PCR of aggrecan, collagen Type I, II of the 0, 10, 20 and 30% CS/GG scaffolds was analyzed for 7, 14 and 21 days post-seeding *in vitro*. Gene expression profiles of (a) aggrecan; (b) collagen Type I; (c) collagen Type II (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

만, 첨가한 양이 일정량 이상을 초과하게 되면 연골세포 증식이 최적일 때보다 저해되는 것을 확인하였다. 이는 MTT 분석 실험 결과와 유사함을 보인다.²⁵⁻²⁸

결 론

본 연구에서는 0, 10, 20, 30% CS/GG 하이드로젤을 제작하여, 물리적 특성 평가와 연골세포를 각 하이드로젤에 파종하여, 추후 연골 재생을 위한 지지체로서의 가능성을 확인하기 위한 연구를 진행하였다. SEM 분석을 통해 각각의 지지체의 다공 크기를 비교하였고, MTT를 통하여 연골세포의 초기 부착률과 증식률을 확인하였으며, RT-PCR을 통하여 유전자 발현도를 확인하였다. 이 모든 *in vitro* 결과에서 20% CS/GG 지지체가 가장 우수한 결과를 나타내었다. 이는 20% CS/GG 지지체가 천연 연골재생과 유사한 조성을 갖기 때문이라 사료된다.²⁸ 즉 20% CS/GG 지지체는 연골세포의 증식을 위한 우수한 환경을 제공하고, 연골세포의 증식과 세포 외 기질 분비가 우수한 것이 관찰됨으로 연골조직 재생을 위한 지지체로써 다양한 응용가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글: 이 논문은 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원(HI15C2996)을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. I. G. Kim, J. Ko, H. R. Lee, S. H. Do, and K. Park, *Biomaterials*, **85**, 18 (2016).
2. Y. C. Kuo and C. C. Wang, *Biointerfaces*, **93**, 235 (2012).
3. Z. Cheng and S. H. Teoh, *Biomaterials*, **25**, 1991 (2004).
4. W. F. Daamen, J. H. Veerkamp, J. C. M. van Hest, and T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials*, **28**, 4378 (2007).
5. A. D. Augst, H. J. Kong, and D. J. Mooney, *Macromol. Biosci.*, **6**, 623 (2006).
6. T. Segura, B. C. Anderson, P. H. Chung, R. E. Webber, K. R. Shull, and L. D. Shea, *Biomaterials*, **26**, 359 (2005).
7. G. Khang, S. K. Lee, H. N. Kim, J. Silva-Correia, M. E. Gomes, C. A. Viegas, I. R. Dias, J. M. Oliveira, and R. L. Reis, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **9**, 265 (2015).
8. H. Park, H. Y. Kim, S. Y. Kwon, G. Khang, and Y. S. Kim, *Polym. Korea*, **39**, 144 (2015).
9. J. T. Oliveira, L. Martins, R. Picciochi, I. B. Malafaya, R. A. Sousa, N. M. Neves, J. F. Mano, and R. L. Reis, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **93A**, 852 (2010).
10. S. Nadanaka and K. Sugahara, *Glycobiology*, **7**, 253 (1997).
11. Y. Ohtsuka, H. Nakae, H. Ade, and T. Obinata, *Zool. Sci.*, **11**, 409 (1994).
12. S. R. Caliali, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harely, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
13. T. Song, J. Ma, L. Guo, and P. Yang, *Cell Physiol.*, **10**, 1002 (2017).
14. J. E. Song, R. Kim, J. H. Lee, H. M. Kim, C. M. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 17 (2013).
15. J. Brinckmann, *Top. Curr. Chem.*, **247**, 1 (2005).
16. H. K. Hong, S. K. Lee, Y. S. Song, D. S. Kim, S. Eom, H. E. Kim, and G. S. Khang, *Polym. Korea*, **10**, 1 (2010).
17. K. S. Han, H. Ko, N. Jang, J. Song, and G. Khang, *Macromol. Res.*, **22**, 1253 (2014).
18. J. Einbinder and M. Schubert, *J. Biol. Chem.*, **85**, 725 (1950).
19. D. Sakloetsakun, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **14**, 10 (2016).
20. B. B. Mandal and S. C. Kundu, *Biomaterials*, **30**, 2956 (2009).
21. B. K. Gu, M. S. Kim, S. J. Park, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue Regen.*, **2**, 83 (2011).
22. S. Sahoo, S. L. Toh, and J. C. Goh, *Biomaterials*, **31**, 2990 (2010).
23. M. Rutgers, D. B. Saris, L. A. Vonk, M. H. Van Rijen, and V. Akrum, *Tissue Eng. Part A*, **19**, 59 (2013).
24. V. Perugini, A. L. Guildford, and J. Silva-Correia, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **10**, 1002 (2016).
25. M. H. Mahdi and B. R. Conway, *Int J. Pharm.*, **30**, 515 (2016).
26. S. Mobini, B. Hoyer, M. Solati-Hashjin, A. Lode, N. Nosoudi, A. Samadikuchaksaraei, and M. Gelinsky, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **101**, 2392 (2013).
27. H. J. Ha, J. E. Song, Y. Kang, E. Y. Kim, S. J. Yoon, Y. I. Yang, D. Lee, and G. Khang, *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.*, **26**, 1 (2014).
28. J. C. Kim, H. J. Song, E. Jang, S. H. Kim, and H. W. Park, *Polym. Korea*, **39**, 1 (2015).