조직공학적 골을 위한 이프리플라본을 함유한 다공성 지지체의 제조 및 그 특성

장지욱*, 이봉*, 한창환**, 이일우***, 이해방****, 강길선†
*부경대학교 고분자공학과, **가톨릭 의과대학 정형외과, ***가톨릭 의과대학 신경외과,
****한국화학연구원 생체고분자연구실, 전북대학교 고분자공학과
(2003년 2월 19일 접수, 2003년 4월 22일 채택)

Preparation and Characterization of Ipriflavone-Loaded Poly(L-lactide-*co*-glycolide) Scaffold for Tissue Engineered Bone

Ji Wook Jang*, Bong Lee*, Chang Whan Han, Il Woo Lee***, Hai Bang Lee****, and Gilson Khang†**
**Department of Polymer Engineering, Pukyong National University, San 100, Nam Ku, Busan 608-739, Korea*
***Department of Orthopedic Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 520-2, Daeheung 2 Dong, Jung Ku, Daejeon 301-723, Korea*
****Department of Neurosurgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 520-2, Daeheung 2 Dong, Jung Ku, Daejeon 301-723, Korea*
*****Biomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea*
Department of Polymer Science and Technology, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin Dong 1Ga, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea
†e-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr
(Received February 19, 2003;accepted April 22, 2003)

초록 : 이프리플라본은 이소플라본의 파생물로서 골의 재흡수를 방지하여 골의 재형성을 방해함으로써 골 형성에 도움을 준다. 이프리플라본은 칼슘의 양을 안정적으로 증가시킴과 함께 골수 줄기 세포의 작용으로 세포층에 칼슘을 침착시킨다. 조직공학적 골을 형성시키기 위해 락타이드-글리콜라이드 공중합체 (PLGA)에 이프리플라본을 함유시킨 지지체를 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조하였다. 수은 다공도계, 주사 전자 현미경, 시차 주사 열량계, X선 회절기를 이용하여 특성결정을 수행하였고, 이프리플라본이 함유된 지지체와 이프리플라본이 함유되지 않은 지지체를 면역이 결핍된 쥐의 피하에 삽입하여 이들의 골 형성을 비교하였다. 조직을 hematoxylin & eosin, 본쿠사 염색과 면역화학적 염색법인 콜라겐 I 형과 오스테오칼신 염색을 하였다. 이프리플라본이 함유된 담체의 다공도는 91.7% 이상이었고 평균 다공 크기도 101 μm였다. PLGA로만 제조된 지지체와 이프리플라본을 50% 함유시킨 지지체를 동물 실험을 수행한 결과 이프리플라본은 피하 층과 다른 연조직에서 미분화 줄기 세포가 칼슘 침착, 골아 세포, 골상으로의 유도에 더 많은 영향을 주는 것을 관찰하였다. 결론적으로 이프리플라본을 함유한 지지체에서 이프리플라본이 골형성에 중요한 요인으로 작용한다고 사료된다.

ABSTRACT : Ipriflavone (IP), a non-hormonal isoflavone derivative, has been shown to interfere with bone remodeling by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. IP consistently increased the amount of Ca incorporated into the cell layer by mesenchymal stem cells (MSCs). In this study, we developed the novel IP loaded poly(L-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) scaffolds for the possibility of the application of the tissue engineered bone. IP/PLGA scaffolds were prepared by solvent casting/salt leaching method and were characterized by porosimeter, scanning electron microscopy, determination of residual salt amount, differential scanning calorimetry, and X-ray diffractometer, respectively. IP/PLGA scaffolds were implanted into the back of athymic nude mouse to observe the effect of IP on the osteoinduction compared with control PLGA scaffolds. Thin sections were cut from paraffin embedded tissues and histological sections were stained H&E, von Kossa, and immunohistochemical staining for Type I collagen and osteocalcin. It can be observed that the porosity was above 91.7% and the pore size was above 101 μm. Control scaffold and IP/PLGA scaffolds of 50% IP were implanted on the back of athymic nude mouse to observe the effect of IP on the induction of cells proliferation for 9 weeks. The evidence of calcification, osteoblast, and osteoid from the undifferentiated stem cells in the subcutaneous sites and other soft connective tissue sites having a preponderance of stem cells has been observed. From these results, it seems that IP plays an important role for bone induction in IP/PLGA scaffolds.

***Keywords* :** *scaffold, ipriflavone, bone remodeling, bone resorption, tissue engineered bone.*

본 논문은 정년퇴임을 맞이하시는 조원제 교수님께 헌정합니다.

1. 서론

생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 담체를 생체조직에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 형성하게 하는 일련의 기법을 생체조직공학이라고 한다.[1] 이러한 조직공학 기법을 이용하여 연골세포와 골막세포로 연골조직과 뼈 조직을 얻을 수 있고 담체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 주조할 수가 있다. 생체조직공학에 사용되는 고분자담체의 역할은 분리된 세포를 집적화하여 생체 내에서 세포가 왕성하게 활성화하여 새로운 기질을 분비하게 함으로써 분화된 조직을 만들어 주는 것이다.[2,3] 분리된 세포를 인체에 해를 미치지 않으면서, 인체에서 완전히 분해되는 고분자에 심어주게 되는데 이때 사용되는 고분자의 구조는 화학적 형상이나, 미세구조학적 성상이 세포와 친화력이 있어야 한다. 세포를 포함한 고분자를 생체에 이식하면 체내에서 영양분과 산소를 공급받음으로써 조직의 생성을 가능하게 하는 생체조직공학은 세포 배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합으로 현대 산업사회에서 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 나이에 따라 골 밀도의 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골 형성 부전증 같은 질환에 의한 성장부진 등과 같은 다양한 문제들에 대한 효과적인 재건방법으로 대두되고 있다.[4-15] 전통적인 골 결손 처리방법으로는 자가 골 이식과 동종 골 이식 등이 있다. 자가 골 이식이 지금까지는 골 형성 측면에서 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으나, 골 채취 부위의 감염, 동통, 혈종 등과 같은 합병증이 발생할 수 있고 동종 골 이식은 공여자로부터 질병의 전염, 감염, 그리고 자가 골 이식에 비해 골 유합 및 골 형성 효과가 저조한 단점을 가지고 있다.[16-18]

조직공학적인 골 형성이 이런 단점을 해결하고 골 결손을 치료할 수 있도록 많은 연구가 진행되고 있는데, 골 조직공학의 목적은 골이 필요한 부위에 골 형성을 유도하고 실제 골 조직을 개발하는데 있다. 조직공학에 의한 골조직의 형성을 위해 골 생성을 유도하는 골아전구세포, 이런 세포들이 적당한 위치에서 증식 분화할 수 있는 담체, 그리고 골 조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도 성장인자들이 필요하다.[19,20] 이에 본 연구팀은 탈미네랄화된 골분이 혼합된 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA) 담체,[21] 소장점막하조직이 혼합된 PLGA 담체,[22] 항생제인 겐타마이신이 혼합된 PLGA 담체,[23] 신경성장인자가 혼합된 PLGA 담체,[24,25] 및 비타민 D_3가 함유된 PLGA 담체 등을[26,27] 제조하여 이들의 싸이토카인류가 조직성장에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

이러한 일련의 연구를 바탕으로 본 연구에서는 조직공학적 골 형성을 위해 골다공증 치료제인 이프리플라본(3-phenyl-7-isopropoxy-4H-1-benzopyrane-4-one, ipriflavone, IP)을 응용함으로써 골 형성 촉진을 꾀하려 하였다. 이의 약리작용 기전은 직접적인 골 흡수 억제 작용과 에스트로겐의 칼시토닌 분비 촉진작용의 증강에 의한 골 흡수를 억제하여 조골 세포의 성장을 촉진하고, 골 형성 자극활성을 갖는다.[28-31]

이러한 골다공증 치료 약물을 생분해성 고분자인 PLGA와 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 다공성 담체 형태로 서방형제제화하고[32] 특성결정 방법으로 주사 전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)으로 다공형태 및 크기를 관찰하였다. 수은 다공도계(porosimeter)로 다공도와 다공 분포도를 측정하였으며 다공 생성 메카니즘 등을 고찰하였고, 결정성은 X선 회절기(X-ray diffractometer, XRD)로 측정하였으며, 열적 특성은 시차주사 열량계(differential scanning calorimetry, DSC)를 이용하여 분석하여 물성을 측정하였다.[33] 또한 *in vivo* 환경에서 조직공학적 골 형성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐로 실험하여 조직학적 염색을 실시하였다.

2. 실험

시약 및 재료. PLGA (lactide/glicolide 몰비, 75/25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 염화나트륨(Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성물질로 사용하였는데 본 실험에서 요구되는 크기로 선별하기 위하여 각 크기별 분자체를 사용하였다. 골다공증 치료제 IP는 동방미래화학(Korea)으로부터 구입하였고, 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. PLGA와 IP의 화학 구조식은 Figure 1에 나타내었다.

용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조. PLGA 1 g과 IP (0, 0.1, 0.2, 0.3, 및 0.5 g)를 MC에 일정 농도로 용해한 후 체에 의해서 선별된 염화나트륨을 일정 비율로 혼합하였다(Table 1). 용해된 PLGA와 염의 혼합물을 직경 15 mm 및 두께 5 mm 크기의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스 (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kg/cm^{2}의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공형성물질인 염의 추출은 3차 증류수에서 48시간 동안 시행한 후, 8 mTorr, -55 ℃ 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25 ℃ 진공오븐에서

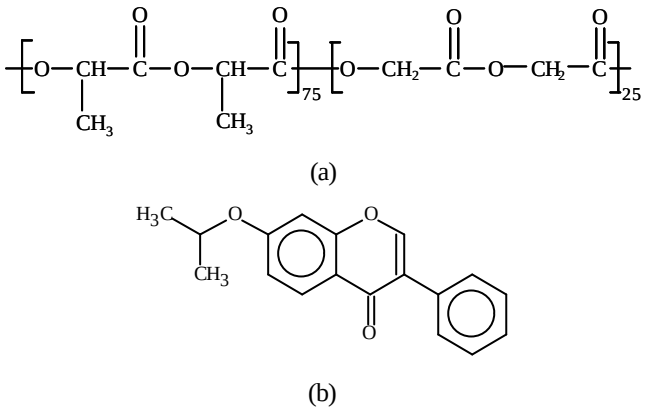


Figure 1. Chemical structures of (a) IP and (b) PLGA.

Table 1. Properties of Fabricated Porous IP/PLGA Scaffolds by means of Solvent Casting/Salt Leaching

PLGA concentration (w/v%)	IP content (%)	volume of PLGA to NaCl (w/w%)	porosity (%)	median pore diameter (μm)
20	0	90	91.7	101
20	10	90	82.3	116
20	20	90	87.1	140
20	30	90	84.8	147
20	50	90	79.8	123

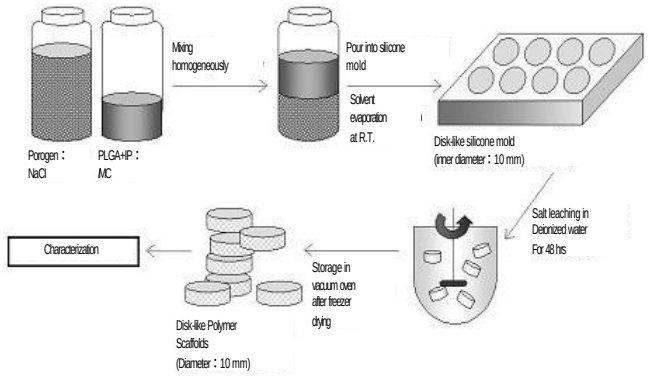


Figure 2. Schematic representation of the solvent casting/salt leaching method to fabricate IP/PLGA scaffolds.

건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 2에 나타내었다.

용매 캐스팅/염 추출법으로 제조된 다공성 지지체의 잔존 염 확인. 용매 캐스팅/염 추출법으로 다공성 지지체를 제조한 후의 잔존 염의 정도를 확인하기 위하여 염 추출 시간에 따른 염의 양을 이온크로마토그래피(Ion Chromatography, IC, Metrohm, Switzerland)를 이용하여 정량적으로 분석하였다(Table 2). 분석 조건은 이동상으로 4 mmol의 타타르산과 1 mmol 디파콜로닉을 사용하였

Table 2. Amounts of Residual NaCl

time (hrs)	residual NaCl
6	1.92 mg/ml
12	ND*
24	ND
48	ND

*ND : No Detection.

고, 유속은 1 mL/min으로 컬럼은 Shodex® (4 mm × 250 mm, Japan)을 사용하였다.

IP를 함유한 다공성 지지체의 특성. 상기의 방법들을 사용하여 제조한 다공성 PLGA 지지체의 표면, 옆면 및 내부의 다공형태를 분석하기 위하여 SEM (S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 5×5×1 mm의 크기로 절단하고 양면테이프를 이용하여 샘플 폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터 (Emitech, K575, UK)를 이용하여 200 ℃ 두께의 백금을 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태 및 크기를 확인하였다.

무정형 PLGA 고분자내에서의 IP의 결정성은 XRD (D/Max-IIIB, Rigaku, Japan)를 사용하여 5°/min의 속도로 2 q의 값을 0 60°의 범위에서 측정하였으며, 미분말의 열적 성질은 DSC (TA Instrument DSC 3100, du Pont, USA)를 이용하여 10 ℃/min의 승온 속도로 0 100 ℃의 범위에서 측정하였다.

수은 다공도계 분석. 상기의 여러 방법들을 사용하여 제조한 다공성 PLGA 지지체의 다공 크기 분포, 비다공 면적, 평균 다공 직경 및 다공도를 측정하기 위하여 수은 다공도계(Micromeritics Co., Model AutoPore II 9220, USA)를 이용하였다. 사용된 PLGA 지지체의 질량, 측정수은체적, 수은압력 및 최대압력은 각각 0.1 g, 6.7 7.3 mL, 3.4 KPa 및 414 MPa 이었다. 수은압력 P와 구멍 반지름 r의 관계는 다음의 Washburn 식[34]

$$r = -2g\cos q \cdot P \qquad (2)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 g은 수은표면장력으로 485 dyne/cm를 사용하였으며 q는 수은과 PLGA 표면의 접촉각인데 접촉각 측정기 (Model 100-0, Rame-Hart Inc., USA)를 이용하여 실측한 결과 160° 이었다.[35,36]

다공도 e는 다음의 식

$$\varepsilon = \frac{Vi}{Vi + \frac{1}{\rho}} \qquad (3)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 V_i는 전체 침투 체적이며 r는 밀도를 나타낸다.

In vivo 환경에서의 IP을 함유한 지지체에서의 골 형성. *In vivo* 환경에서의 조직공학적 골 형성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 생후 4주 된 쥐의 등쪽 부분을 2 3 ㎝ 정도 절개하고 IP가 함유된 지지체를 이식한 지 9주가 지난 후에 지지체를 4% 포르말린에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록을 제작한 후에 3 ㎛로 자른 후 슬라이드에 고정하고 조직학적 평가를 하기 위하여 H&E 염색, 본쿠사 염색, 콜라겐 I 형 염색 및 오스테오칼신 염색 등을 실시하였다.

3. 결과 및 토론

IP를 함유한 다공성 지지체의 제조. 용매 캐스팅/염 추출법으로 IP를 함유한 다공성 지지체를 제조하였다. 이는 물에 거의 녹지 않는 난용성 약물이지만 염 추출 과정 중에서 물에 의한 용해 및 염 추출 시 발생할 수 있는 동반소실을 확인하고자 HPLC로 정량을 하였다. 물에 의한 용해 및 염 추출 시 발생하는 동반 소실은 거의 없는 것으로 보아 IP와 같은 난용성 물질의 경우에는 용매 캐스팅/염 추출법으로 다공성 지지체의 제조가 효과적임을 확인하였다.

용매 캐스팅/염 추출법으로 제조된 다공성 지지체의 잔존 염 확인. Table 2에 나타난 결과와 같이 용매 캐스팅/염 추출법으로 다공성 지지체를 제조한 후 6, 12, 24 및 48시간 동안 이를 각각 3차 증류수에서 용출한 후 IC를 이용하여 정량적으로 분석한 결과 6시간 후부터는 잔존 염이 검출되지 않았으며, 48시간 동안 염을 추출하였기에 잔존 염의 위험이 없으며, 또한 최소 7일간 25 ℃ 진공오븐에서 건조시켰기에 잔류 용매의 위험도 없다고 사료되었다.

IP를 함유한 다공성 지지체의 특성. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조한 다공성 PLGA 지지체의 SEM 사진은 Figure 3에 나타내었다. 외형적 형태는 실리콘 몰드의 빈 공간과 똑같은 디스크 형태로 얻어졌으며 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 몰드의 형태에 따라 가운데가 빈 원기둥 형태도 제조가 가능했으며 몰드 직경에 따라 지지체의 직경도 조절이 가능했고, 두께 역시 조절이 가능함을 알 수 있었다.

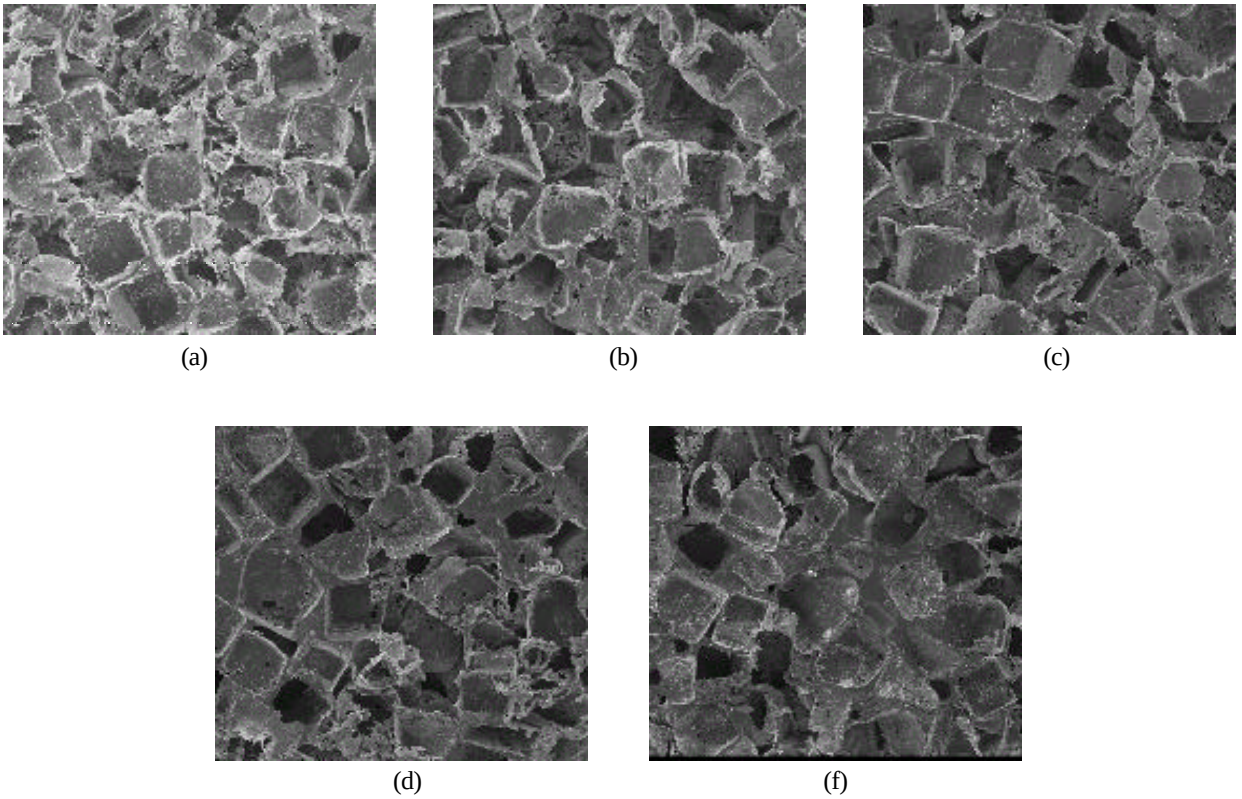


Figure 3. SEM micrographs of IP/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching (a) PLGA, (b) PLGA/IP (10%), (c) PLGA/IP(20%), (d) PLGA/IP(30%), and (e) PLGA/IP(50%).

염의 크기와 양을 조절함으로써 지지체의 다공 크기와 다공도를 조절할 수 있다. 지지체의 내부, 옆면의 다공 구조는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다. 하지만, 지지체 표면의 다공 구조는 거의 모든 샘플에서 대부분 닫힌 셀 구조를 나타내었다. 그 이유는 지지체의 내부 및 옆면과는 달리 표면은 몰드에서 받는 직접적인 압력으로 인해 다공이 약간 눌린 듯한 모양이 나타났다. 그러나 조직세포가 성장하여 내부로 이행하는데는 문제가 없을 것으로 예측된다. Figure 3을 보면 알 수 있듯이 IP의 함량이 증가하여도 다공 구조는 변화지 않았다.

XRD 분석. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조된 IP를 함유한 PLGA 지지체의 결정성을 분석한 결과, 난용성이며 동시에 결정성 약물인 IP의 결정도는 약물 포접양이 증가할수록 미미한 결정도를 관찰할 수 있었고, 결정이 큰 IP가 무정형 다공성 지지체내에서는 무정형화된 것으로 사료되며, 실제 임상 적용에 있어 생체 내 분해가 용이함을 알 수 있었다(Figure 4). 열적 특성은 59 ℃에서 PLGA 고유의 유리전이온도 (T_g) 피이크가 나타났고, IP가 20% 이상 지지체내에 함유될 때 120 ℃에서 IP의 고유한 용융온도 (T_m) 피이크를 관찰할 수 있었다 (Figure 5).

수은 다공도계 분석. 수은 다공도계로 다공도 및 다공 크기를 분석한 결과 (Figure 6), 다공도는 IP의 함량이 증가할수록 감소하는 경향이 나타났고, 다공 크기는 증가한 것으로 나타났다 (Table 1). 하지만 IP 함량이 지지체의 다공 크기와 다공도의 증감에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 사료되었다.

IP를 함유한 지지체내에서의 골 형성에 관한 조직학적 평가. IP가 함유된 PLGA 고분자 지지체가 조직공학적 골 형성에 도움을 주는지를 관찰하기 위해 지지체를 이식한지 9주가 지난 후 면역이 결핍된 쥐의 피하를 절개하여 지지체를 분리하고 (Figure 7), 분리된 담체를 4% 포르말린 수용액으로 고정한 후 3 μm로 절단하여 슬라이드에 고정시키고 H&E, 본쿠사, 콜라겐 I형

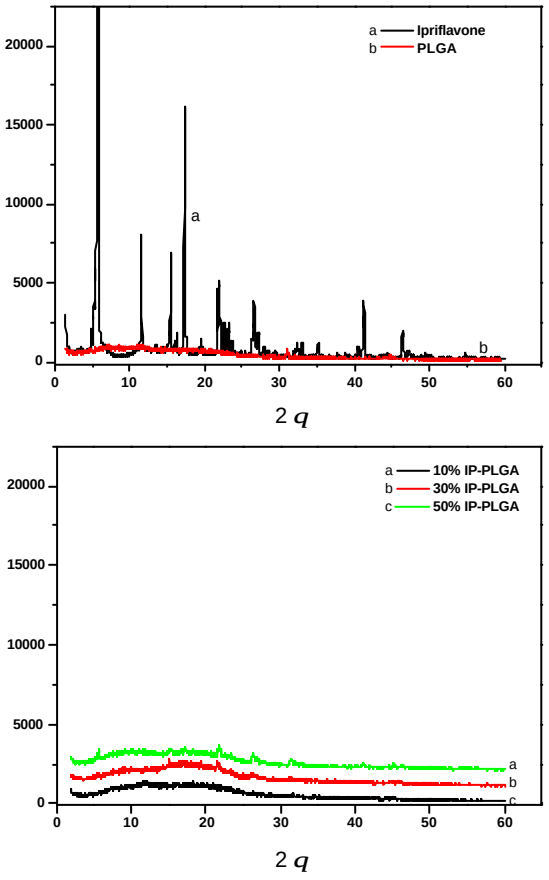


Figure 4. XRD analysis of IP/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching.

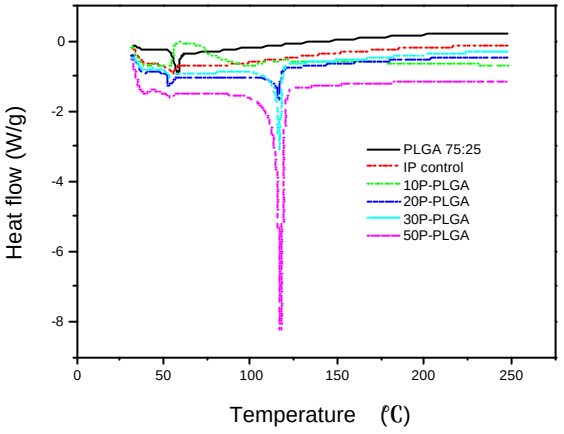


Figure 5. DSC analysis of IP/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching.

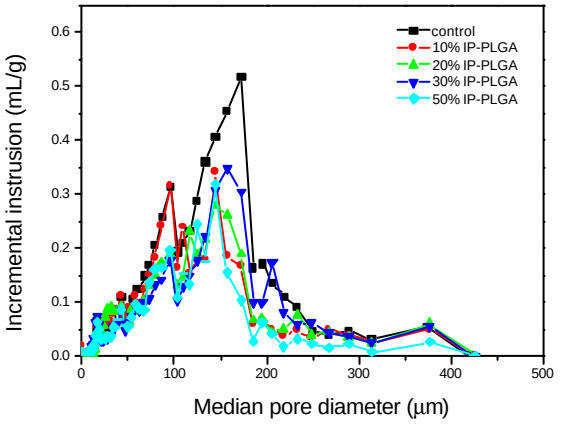
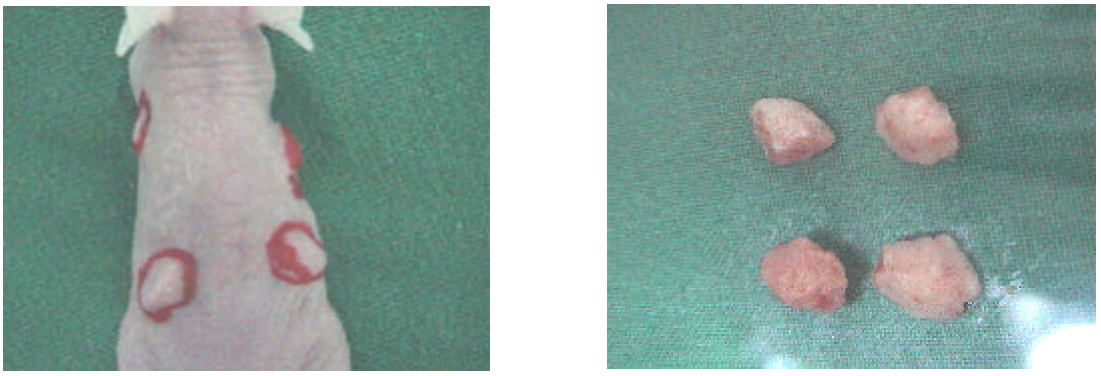


Figure 6. Pore size distribution of IP/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching.



(a) (b)

Figure 7. Photographs of (a) animal experiment of IP/PLGA scaffold and (b) bone formation after 9 weeks.

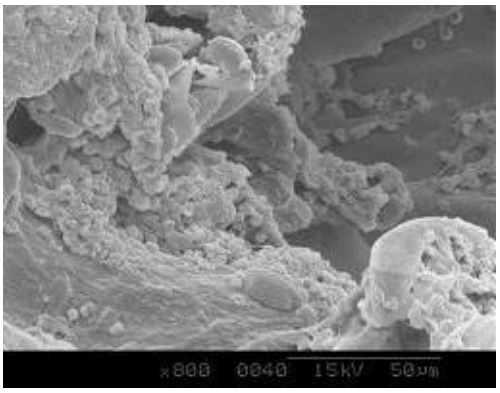


Figure 8. SEM micrograph of IP/PLGA scaffolds.

및 오스테오칼신 염색을 하였다. 우선, Figure 8에서 보는 것 같이 지지체에 파종한 세포들이 잘 부착되어 자라고 있음을 SEM으로 확인할 수 있었다. 골 형성을 확인하기 위하여 H&E 염색을 하였다. Figure 9의 화살표를 보면 뼈 세포들이 콜라겐 막을 중심으로 그 주위를 일정한 방향으로 배열하고 있음을 관찰할 수 있다. IP가 20% 함유된 것과 50% 함유된 것의 H&E 염색 사진을 비교해 보면 세포질이 IP가 50% 함유된 것에서 더 많이 나타나며 뼈 세포들 또한 더 많이 배열함을 알 수 있다. 즉, IP의 함량이 높은 지지체에서 더 많은 뼈 세포가 유도되어 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다.[37] 이는 IP이 함유된 지지체의 경우 뼈 형성을 유도하는 가능성을 가짐을 알 수 있다.

이를 더 정확히 확인하기 위하여 면역세포화학적 염색방법을 이용하였다. 면역세포화학적 염색법은 일정 세포에만 존재하는 특이적 단백질을 항원-항체 반응에 의해 염색함으로써 특정 세포를 증명하는 방법이다. 뼈는 1/3의 유기질과 2/3의 무기질로 이루어져 있는데, 유기질 95%는 콜라겐 I형으로 구성되어 있다. 뼈 조직에만 선택적으로 발현되는 콜라겐 I형 염색을 통해서 이의 선택적 발현을 확인할 수 있었다(Figure 10). 오스테오칼신은 뼈와 상아질에서 존재하는 비콜라겐성 단백질이다. 염색을 통해서는 뼈 조직을 형성할 때 생성되는 오스테오칼신의 선택적 발현을 Figure 11을 통하여 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 뼈를 형성할 때와 유사한 조직학적 소견 평가의 결과를 얻을 수 있었다.

난용성 약물인 IP가 다공성 지지체에 함유되어 직접 조직에서 사용하여도 그 약리 작용은 일어나는데, 이는 실험동물의 피하 층에 이식된 IP/PLGA 다공성 지지체의 다공을 통하여 피하 층에 분포되어 있던 미분화 간엽 줄기 세포들이 지지체 내부로 이동하여 접착하고 증식하였다고 사료된다.[22] 일부는 증식을 하고 나머지 일부는 지지체내에서 IP가 서방화되어 미분화된 간엽 줄기 세포를 뼈 세포로의 분화를 촉진하는 작용을 한 것으로 추측된다. 일반적인 뼈 형성과정은 조골 세포의 작용으로 칼슘을 침착시켜 뼈를 형성하고 파골 세포의 작용으로 칼슘을 해리하는 반복적인 작용으로 골 재형성을 하지만 IP의 약리작용인 직접적인 골 흡수 억제작용과 에스트로겐의 칼시토닌 분비 촉진작용의 증강에 의한 골 흡수를 억제하여 조골 세포의 성장을 촉진하고, 골 형성 자극활성을 가져 조골 세포의 칼슘침착은 활성화되지만 파골 세포의 칼슘해리 작용이 거의 일어나지 않아 뼈 형성이 보다 잘 일어났다고 사료된다.[31]

결론적으로 IP가 함유된 지지체가 직접적으로 뼈를 형성할 수 있는 성장인자와 뼈 형성 단백질 등과 마찬가지로 뼈 형성에 도움을 주는 약리작용을 가지므로 지지체에 함유시켜 사용함으로써도 기존의 PLGA로만 제조된 고분자 지지체보다 우수한 뼈 형성 효과를 가져오는 것이라 추측된다.

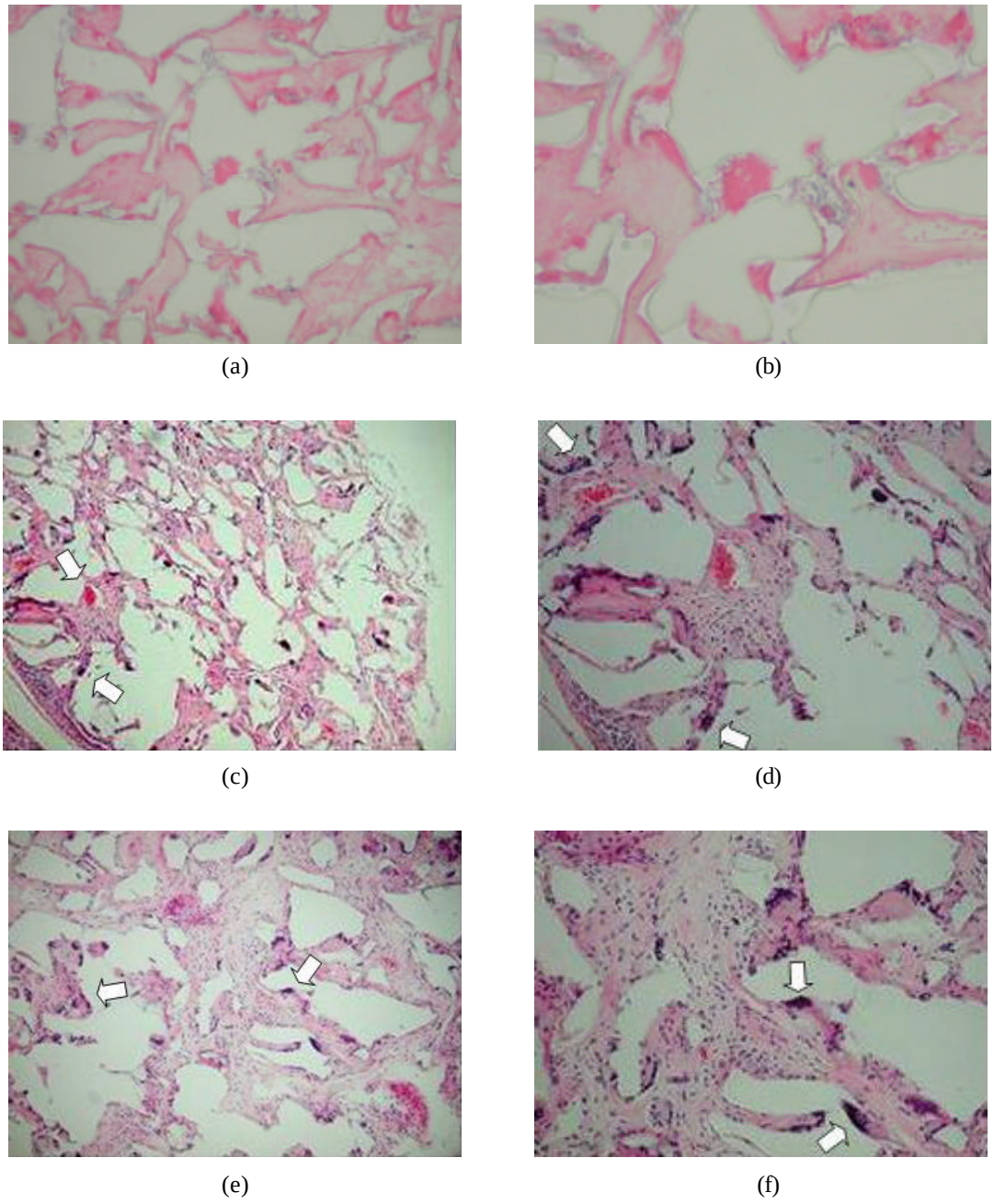
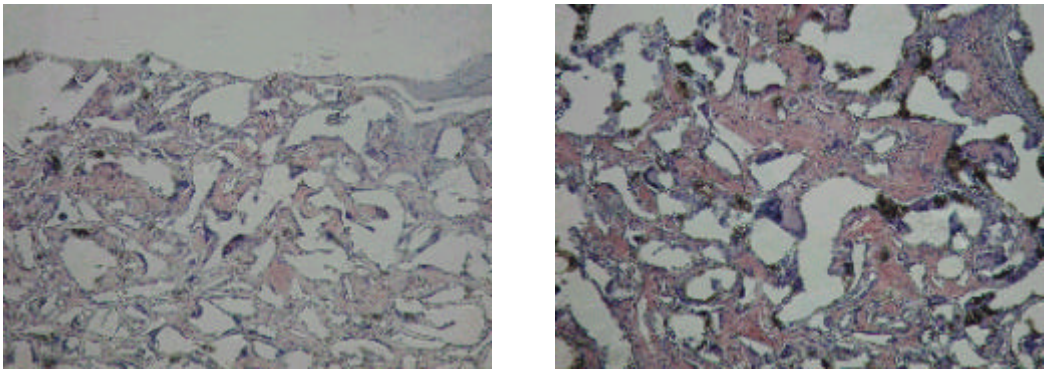


Figure 9. Photographs of histochemical staining for H&E (after 9 weeks). (a) PLGA (×100), (b) PLGA (×200), (c) PLGA/IP (20%) (×100), (d) PLGA/IP (20%) (×200), (e) PLGA/IP (50%) (×100), and (f) PLGA/IP (50%) (×200)

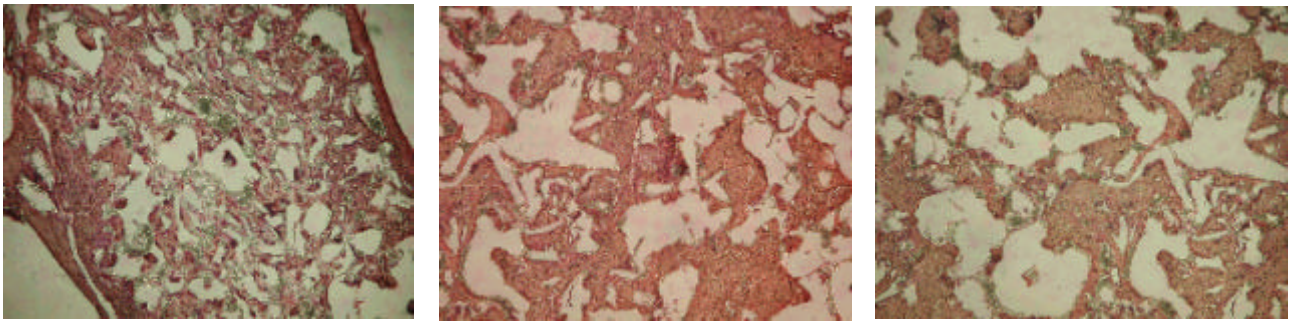
4. 결론

본 연구에서는 조직공학을 이용한 인공장기 재건에 있어 필수적인 생분해성 지지체로 IP를 서방화한 다공성 PLGA 지지체를 용매 캐스팅/염 추출 제조 방법에 의하여 제조하였다. 본 제조방법에 의하여 제조된 PLGA 지지체의 다공도는 79 91% 였으며, 다공 크기는 101 147 μm로 관찰되었다. 다공과 다공사이의 연결은 세포가 성장하기에 적합한 연결된 구조를 가지고 있었으며, IP의 함량에 따라 다공도가 감소하는 경향을 가지고 있으나 세포가 성장하기에는 적합한 것으로 사료된다. 본 방법에 의하여 제조된 PLGA 지지체는 좋은 물성을 가지고 있으며 염의 함량과 크기로 다공도와 다공 크기를 조절할 수 있다. 또한 48시간 동안 3차 증류



(a) (b)

Figure 10. Photographs of immunohistochemical staining for type I collagen (after 9 weeks). (a) PLGA/IP (50%) (×100), and (b) PLGA/IP (50%) (×200).



(a) (b) (c)

Figure 11. Photographs of immunohistochemical staining for osteocalcin (after 9 weeks). (a) PLGA/IP (50%) (×100), (b) PLGA/IP (50%) (×200), and (c) PLGA/IP (50%) (×200).

수에서 용출시키므로 잔존 염의 위험은 없다고 사료된다. 결정이 큰 IP는 다공 지지체내에서는 무정형화된 것으로 사료되며 실제 임상 적용에 있어, 생체 내 분해가 용이함을 알 수 있었다. IP를 서방화한 PLGA 지지체에서도 대조군과 마찬가지로 세포들이 잘 부착되어 자라고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 IP가 함유된 지지체가 직접적으로 뼈를 형성할 수 있는 성장인자와 뼈 형성 단백질 등과 마찬가지로 뼈 형성에 도움을 주는 약리작용을 가지므로 지지체에 함유시켜 사용함으로써도 기존의 PLGA로만 제조된 고분자 지지체보다 우수한 뼈 형성 효과를 가져오는 것이라 추측된다.

결론적으로 IP/PLGA의 지지체의 경우에 IP의 뼈 생성 작용에 있어 우수한 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 현재 본 실험을 바탕으로 PLGA 지지체의 다공 크기의 영향, IP의 함량에 따른 뼈 형성 효과, IP 함량에 따른 세포성장의 영향, 간엽 줄기 세포에서 골세포로의 분화에 미치는 IP의 영향, IP의 방출거동 등은 실험 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 보건복지부·정보통신부의 IMT-2000 (01-PJ11-PG9-01NT00-0011)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

1. G. Khang, S. J. Lee, and H. B. Lee, "Polymer-cell interaction", in *Tissue Engineering; Concepts and Application*, J. J. Yoo and I. Lee, Editors, Korea Med. Pub. Co., Seoul, p 297 (2002).
2. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **12**, 527 (2001).
3. G. Khang, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 782 (1999).
4. G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 640 (1999).
5. E. Wintermantel, J. Mayer, J. Blum, K. L. Eckert, P. Luscher,

and M. Mathey, *Biomaterials*, **17**, 83 (1996).
6. S. P. Baldwin and W. M. Saltzman, *Adv. Drug Deliv. Rev*., **33**, 71 (1998).
7. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **13**, 226 (2002).
8. E. Wintermantel, A. Bruinink, K. H. Eckert, K. Ruffieux, M. Petitmermet, and J. Mayer, "Tissue engineering Supported with Structured Biocompatible Materials; Goals and Achievements", M. O. Speidel and P. Uggowitzer, Editors, Mater. Med., p 1 (1998).
9. A. J.Putnam and D. J. Mooney, *Nat. Med.*, **2**, 824 (1996).
10. M. Minabe, *J. Periodontol*, **62**, 171 (1991).
11. G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **13**, 4 (2002).
12. G. Khang and H. B. Lee, *Regenerative Medicine*, **1**, 114 (2002).
13. K. Whang, C. H. Thomas, and K. E. Healy, *Polymer*, **36**, 837 (1995).
14. M. Sittinger, J. Bujia, N. Rotter, O. Reitzel, W. W. Minuth, and G. R. Burmester, *Biomaterials*, **17**, 237 (1996).
15. K. A. Athanasiou, G. G. Niederauer, and C. M. Agrawal, *Biomaterials*, **17**, 93 (1996).
16. M. B. Habal, *Clin. Orthop*., **188**, 239 (1984).
17. J. M. Lane and H. S. Sandhu, *Orthop. Clin. North Am*., **18**, 213 (1997).
18. H. E. Jergesen, J. Chua, R. T. Kao, and L. B. Kaban, *Clin. Orthop*., **268**, 253 (1991).
19. N. C. Rath and A. H. Reddi, *Nature*, **278**, 855 (1979).
20. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **12**, 239 (2001).
21. G. Khang, C. S. Park, J. M. Rhee, S. J. Lee, Y. M. Lee, I. Lee, M. K. Choi, and H. B. Lee, *Korea Polym. J.*, **9**, 267 (2001).
22. G. Khang, P. Shin, I. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
23. M. K. Choi, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 318 (2001).
24. E. K. Jeon, J. Y. Shim, H. J. Whang, G. Khang, I. Jo, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **5**, 23 (2001).
25. E. K. Jeon, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
26. H. S. Kim, I. Lee, J. M. Lee, C. W. Han, J. H. Sung, M. Y. Park, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Korea Soc. Endocrinology*, **17**, 206 (2002).
27. S. J. Lee, D. H. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 201 (2002).
28. M. D. Brandi, *J. Medicine*, **95**, 593 (1993).
29. I. Rondelli, D. Acerbi, and P. Ventura, *J. Clin. Pharm. Res.*, **4**, 183 (1991).
30. D. Agnusdei, S. Adami, and R. Cervetti, *Bone Mineral*, **19**(Suppl.), S43 (1992).
31. G. B. Melis, A. M. Paoletti, and R. Bartolini, *Bone Mineral*, **19**(Suppl.), S49 (1992).
32. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanual, A. G. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 27 (1993).
33. A. P. Marques, R. L. Reis, and J. A. Hunt, *Biomaterials*, **23**, 1471 (2002).
34. H. L. Ritter and L. C. Drake, *Ind. Eng. Chem.*, **17**, 782 (1945).
35. D. M. Smith, D. W. Hua, and W. L. Earl, *MRS Bull.*, **19**, 44 (1994).
36. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **14**, 323 (1993).
37. M. Martini, L. Formigli, P. Tonelli, M. Giannelli, F. Amunni, D. Naldi, M. L. Bradi, S. Z. Orlandini, and G. E. Orlandini, *Calcif. Tissue Int.*, **63**, 312 (1998).