

탈미네랄골분이 첨가된 알지네이트 스펀지에서 조직공학적 연골 재건

김혜민 · 박진영 · 김은영 · 송정은 · 권순용* · 정진화*[†] · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과 *가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과
(2013년 10월 22일 접수, 2013년 12월 2일 수정, 2013년 12월 6일 채택)

Tissue Engineered Catilage Reconstruction with Alginate Sponge Containing Demineralized Bone Particles

Hye Min Kim, Jin Young Park, Eun Young Kim, Jeong Eun Song, Soon Yong Kwon*,
Jin Wha Chung*[†], and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Fusion Tech, Polymer Fusion Res Center & Dept. of PolymerNano Sci Tech, Chonbuk National University,
567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea

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

(Received October 22, 2013; Revised December 2, 2013; Accepted December 6, 2013)

초록: 알지네이트와 탈미네랄골분(DBP) 하이브리드 스펀지는 각각 DBP가 0, 10, 20, 40 및 80% 첨가된 스펀지로, 연골 재건을 위해 제작되었다. 세포의 증식은 MTT를 통해 관찰했으며, 형태학적, 조직학적, 생물학적 관찰 그리고 RT-PCR을 1, 2, 및 3 주에 실시하였다. 세포생존율에 있어서 20% DBP/알지네이트 스펀지에서 다른 스펀지보다도 가장 좋은 결과를 보였으며, 광학전자현미경 관찰에서 또한 20% 스펀지에서 가장 좋은 세포부착률과 증식률을 확인하였다. 마지막으로, 조직학적 평가에서 20% 스펀지에서 연골세포의 표현형이 가장 잘 유지됨과 동시에 산성뮤코다당류와 제2형 콜라겐이 잘 형성된 것을 확인하였다. 이로써 DBP/알지네이트 하이브리드 스펀지는 연골 조직공학을 위한 지지체로써 활용될 수 있을 것이다.

Abstract: Demineralized bone particles (DBP) and alginate hybrid sponges were fabricated at 10, 20, 40 and 80% DBP/alginate hybrid ratios for seeding chondrocyte. Cell proliferation was measured via MTT assay. Morphological observation, histology, biological assay and RT-PCR were performed at each time point 1, 2 and 3 weeks. The cell viability was better in 20% DBP/alginate sponges than in other sponges. SEM results showed that more attached and more proliferated cells in the 20% DBP/alginate sponges with the lapse of time. Finally, histochemical assay results showed that the phenotype of chondrocyte was well maintained and both acidic mucopolysaccharide and type II collagen was well formed at 20% sponges. This study suggested that DBP/alginate sponge may serve as a potential cell delivery vehicle and a structural basis for tissue engineered articular cartilage.

Keywords: alginate sponge, DBP (demineralized bone particle), chondrocyte, reconstruction.

서 론

조직공학은 생명과학과 공학을 융합하여 생체 조직을 만들어 이식함으로써, 인체 장거나 조직의 기능을 복원하고 유지, 향상시켜 인간 삶의 질을 향상시키는데 목적이 있다. 조직공학은 생물학적인 기능을 하는 세포와 세포 주변 환경을 조절할 수 있는 공학적인 기술을 이용하여 세포의 기능을 조절하고 손상된 조직에 이식하여 원하는 기능을 구현할 수 있는

포괄적인 의미로 최근에 재생의학으로 통칭된다. 재생의학에 의해 새로운 조직을 재건하기 위해서는 생체재료, 세포, 성장 인자의 3가지 요소들이 반드시 요구된다.¹⁻³

연골은 생체 내에서 기계적 압력이 가해져도 형태가 변화되지 않으며, 관절 연골의 경우 부드러운 표면과 탄력성을 가지고 있어, 충격을 흡수하고, 마모 및 탈구를 방지할 수 있게 한다. 그러나 연골에는 혈관, 신경, 림프관이 없어 노화, 외상, 운동 등의 손상을 받으면 세포를 공급받을 수 있는 경로가 제한적이게 된다.^{4,5} 따라서 연골은 한번 손상되거나 퇴화되면 재생하기 어려워 초기에 재생시켜주지 않을 경우 손상된 연골이 기계적 압력에 의해 쉽게 부서지고 마모되며, 염

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

증을 발생시켜 결손부위가 점차 증가된다. 그러므로 손상 연골은 조기에 재생시켜주는 치료 방법 개발이 매우 중요하다. 현재 연골이 손상되었을 경우 치료 방법에는 손상된 정도에 따라 여러 가지 방법이 있다. 대표적인 치료 방법에는 자가연골세포이식술, 골수의 줄기세포를 이용한 골수 자극술, 성체 줄기세포와 배아줄기세포를 이용한 연골재생 치료법, 손상된 부위에 미세 구멍을 뚫어 골수세포를 흘러나오게 하여 손상된 부위를 치료하게 하는 미세 골절술 등이 이용되고 있다.^{4,6,7} 그러나 기존 연골 재생 방법은 재생된 조직이 초차 연골이 아닌 섬유 연골로 재생되거나 재생된 조직의 과다 성장, 주변조직과 물리적 특성이 달라 시간이 지나면 재생조직이 파괴되는 단점이 있다.⁸⁻¹¹

연골세포는 단층 배양 시 제 I, III, 그리고 V 형의 콜라겐이 합성되고, 황산콘드로이틴의 변종인 더마탄이 발생하여, 탈분화 현상이 일어난다.¹² 이러한 탈분화는 3차원 배양을 하면 재분화되어 연골세포 표현형을 회복할 수 있다고 알려져 있다. 또한 3차원 구조는 연골세포로의 분화를 촉진시키므로 연골재생을 위해서는 3차원 지지체에 대한 연구가 수반되어야 한다.¹³⁻¹⁶

알지네이트는 미역, 다시마 같은 해양 갈조류에서 추출되는데,¹⁷ 생체적합성이 뛰어나고, 세포 독성이나 면역반응을 일으키지 않아 조직공학 뿐 아니라 다양한 분야에 이용되고 있다. 알지네이트 구조는 α -L-guluronic acid(글루론산)과 β -D-mannuronic acid(만뉴론산) 단량체로 된 블록 공중합체 형태로 비율과 조성은 추출원의 종류나 성장 환경에 따라 다르며, 분자량도 50~1000000 g/mol에 이르기까지 매우 다양하다.¹⁸⁻²⁰ 또한 2가 양이온과 결합시 α -L-guluronic acid는, 수화젤을 형성시키므로 물리적 성질을 결정하는 요소가 된다.²¹

천연 뼈 조직으로부터 유래된 생체활성재료인 탈미네랄골분(DBP)이 뼈 형성을 유발해줄 수 있다고 Urist에 의하여 보고된 이후 생체활성천연 재료로서 신생 뼈의 성장에 강력한 유도체로 작용한다.^{22,23} DBP는 콜라겐, 프로테오글라이칸과 같은 뼈형성단백질 등과 같이 연골과 뼈의 형성에 영향을 주는 많은 사이토카인을 함유하고 있어 연골과 뼈의 결손부위에 충전제로 널리 사용되고 있다. 또한 염증반응을 감소시킨다고 보고되어 광범위하게 임상용으로 사용되고 있다.²⁴⁻²⁶

이에 본 연구에서는 DBP를 펩신을 첨가한 산에 용해시켜 아텔로 콜라겐화 시킴으로써 염증반응을 줄이고 조직공학적 재료로써 사용하고자 하였다. 그러나 콜라겐화 시킨 DBP는 생체 내에서 급속도로 분해되어 분해도를 조절하기 어렵다는 단점이 있기에 이를 보완하고자 생체 내에서 분해도를 조절할 수 있을 뿐만 아니라 생체적합성이 우수한 알지네이트 겔과 혼합하여 DBP/알지네이트 3차원 스펀지를 제작하였다.

본 연구에서는 조직공학적 담체로써 기능이 우수한 알지네이트 겔과 연골의 증식을 도울 수 있는 여러 사이토카인을 함유한 DBP를 혼합하여 3차원 스펀지 형태로 제조하여 조

직공학적으로 연골 조직의 형성을 유도하여 연골 재건용 담체로써 사용될 수 있는지 가능성을 평가하여 보았다.

실 험

시약 및 재료. 사용된 알지네이트는 평균분자량이 75000~200000 g/mole인 것을 사용하였으며, 글루론산의 함량이 ~60%인 알지네이트(Pronova UP- LVG, Novamatrix, Norway)를 사용하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

DBP 제조. DBP는 소의 대퇴부를 사용하여 Urist 방법으로 제조하였다. 대퇴부의 골막과 속막을 제거한 후 에탄올로 세척하여 잘게 분쇄하였다. 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매로 지방을 제거한 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 이렇게 얻은 DBP를 다시 인산완충용액(PBS, pH 7.3-7.4, Sigma, USA)으로 pH 7.4로 조절하여 동결건조 시켰다. 이를 -80 °C에서 보관한 DBP를 동결건조한 뒤, 액체질소 내에서 동결 분쇄기(6700, SPEX Inc, USA)를 이용하여 180 μ m 이하의 고운 분말을 얻었다.

DBP/알지네이트 스펀지 제작. DBP를 5% 아세트산(Sigma) 수용액에 녹여 콜라겐화 된 겔을 만든 뒤, 0.2%의 펩신(Sigma)을 첨가하여 아텔로 콜라겐화 시켜 염증의 가능성을 감소시켰다. 그 후, pH를 7에 맞추어 콜라겐화 된 DBP가 분산된 수용액을 얻었다. 2% 알지네이트 수용액에 DBP 수용액을 비율별로 혼합하여 혼합수용액을 제조하였다. DBP/알지네이트 수용액을 48-웰플레이트에 넣은 후, 이를 4 °C 냉장고에서 4시간, 영하 20 °C 냉동고에서 4시간, 영하 75 °C 냉동고에서 24시간 동안 보관한 뒤, 동결건조기에 48시간 건조시켰다. 이를 10 mM BaCl₂ 용액에 24시간 가교시킨 뒤, 50 mM EDC(Sigma) 용액에 24시간 더 가교시켰다. 가교 후, 증류수로 충분히 세척해 준 뒤 4 °C 냉장고에서 4시간, 영하 20 °C 냉동고에서 4시간, 그리고 영하 75 °C 냉동고에서 24시간 동안 보관한 뒤, 동결건조기에서 48시간 동안 건조시켜 하이브리드 스펀지를 완성하였다. 완성된 스펀지는 수분이 없는 상태로 실험 전까지 데시케이터에 보관하였다.

이 때, 알지네이트 중량의 0, 10, 20, 40 및 80 wt% 해당하는 양의 DBP를 첨가하여 스펀지를 제조하였으며, 0 wt% DBP/알지네이트 스펀지는 0%로, 10 wt% DBP/알지네이트 스펀지는 10%로, 20 wt% DBP/알지네이트 스펀지는 20%로, 40 wt% DBP/알지네이트 스펀지는 40%로, 그리고 80 wt% DBP/알지네이트 스펀지는 80%로 표기한다.

스펀지의 화학적 구조 분석. DBP/알지네이트 스펀지의 화학적 변화를 분석하기 위하여 FTIR(GX, Perkin Elmer, USA)을 이용하여 400~4000 cm⁻¹의 파장범위에서 분석하였다.

스펀지의 열적 분석. DBP/알지네이트 스펀지의 열적 거동

을 분석하기 위하여 DSC(TA Instrument DSC 3100, Dupont, USA)를 사용하여 승온속도 20 °C/min, 0~600 °C 범위에서 측정하였다.

압축강도 측정 분석. DBP/알지네이트 스펀지의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, Food Technology Corporation, Sterling, USA)를 이용하였다. 만능물성측정기의 설정 값으로 측정거리는 3 mm, 측정 속도는 20 mm/sec, 측정 힘은 1 N으로 하였다.

연골세포의 분리 및 배양. 연골세포는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼(n=6)의 무릎 관절에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후 등의 털을 제거하고, 멸균된 수술용 가위로 무릎 관절을 절개해 연골 부위만 취한 다음 인산완충용액(PBS, pH7.4, Gibco, USA)으로 여러 번 세척 후 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche Applied Science, Germany) 용액으로 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 하에서 조직을 용해시켰다. 조직이 담긴 용액을 70 µm의 나이론 매쉬로 거른 후 원심분리하여 PBS로 3회 세척하였다. 분리된 연골은 5000 cells/cm²의 밀도로 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)이 함유된 배양액에 분주하여 인큐베이터(Optima Model 560, Optima Inc., USA)에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었다.

스펀지에서의 연골세포 배양. 10 µL의 연골세포(2×10^5 cells/mL)를 알지네이트 스펀지의 중앙에 놓은 뒤 37 °C, 5% CO₂의 조건에서 1시간 동안 유지시켜 세포가 지지체 내로 스며들게 한 다음 배지를 넣고 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었다.

세포생존율 분석. DBP/알지네이트 스펀지에 파종된 연골세포의 생존율을 분석하기 위하여 MTT(3-[4,5-디메틸치아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석을 각각 1, 3, 5, 7, 10, 14일째 시행하여 주었다. MTT(Sigma) 용액(5 mg/mL)을 100 µL를 넣어준 후, 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸설폭사이드

(DMSO, Sigma)를 1 mL 첨가 후, 샘플을 각 100 µL씩을 채취하여 Microplate Reader(Thermolux, Molecular Device Co. USA) 570 nm의 흡광도를 이용하여 세포부착률과 생존율을 분석하여 주었다.

mRNA 발현도 확인. DBP/알지네이트 스펀지에 파종된 연골세포의 특정 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 파종 1, 2 및 3주째에 회수된 알지네이트를 55 mM의 구연산나트륨과 150 mM의 염화나트륨 및 30 mM의 EDTA(Sigma) 용해용액에 1.5 mL씩 담아 20분 동안 처리하여 알지네이트를 제거해준 후, PBS로 두 번 세척하여 세포만 수거해준다. 그 후, 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4 °C, 12000 g에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™, 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen™, Superscript™ RNase H 역전사 트랜스크립타제(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 역전사시킨 cDNA를, β-actin, Type I collagen, Type II collagen, 및 aggrecan을 확인하기 위해 PCR을 수행하였다. PCR후 증폭된 RNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 EtBr(Sigma)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 β-actin, Type I collagen, Type II collagen 및 aggrecan 밴드의 발현정도를 확인하였다. 각 프라이머에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다.

SEM 관찰. DBP/알지네이트 스펀지의 다공크기와 연골세포를 파종하여 지지체의 표면과 세포를 파종하였을 때의 연골세포의 부착과 세포외기질(ECM) 생성의 차이를 관찰하기 위하여 SEM 관찰을 실시하였다. 각 1, 2 및 3주 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5% 글루탈알데하이드(Sigma)로 24시간 동안 고정하고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 연골세포를 배양한 스펀지를 고

Table 1. Sequence of Primers

Species	Protein	Primer sequence	PCR product (bp)	Reference
Rabbit	β-actin	F: CCGGCTTCGCGGGCGACG R: TCCC GGCCAGCCAGGTCC	227	27
	Type II collagen	F: GCACCCATGGACATTGGAGGG R: ATGTTTTAAAAATACGAAG	394	27
	Aggrecan core protein	F: ATCAACAGAGACCTACGATGT R: GTTAGGGTAGAGGTAGACCGT	289	28
	Type I collagen	F: GATGCGTTCAGTTCGAGTAA R: GGTCTTCCGGTGGTCTTGTA	312	28

정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 백금 코팅하였고 이를 주사전자 현미경(S-2250N, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 표면 변화를 관찰하였다. 또한 다공의 형태와 다공의 크기를 관찰하기 위하여 연골세포를 배양하지 않는 DBP/알지네이트 지지체를 위와 같이 주사전자 현미경으로 관찰한 뒤, Image J 소프트웨어를 사용하여 각 스펀지(n=6) 그리고 각 스펀지당 30개의 이미지 그리고 이미지 당 10개의 다공의 가로 세로 지름을 측정하여, 각각 다공의 평균 지름을 측정하였다.

연골세포를 파종한 스펀지 이식 및 조직학적 평가. DBP/알지네이트 스펀지에서의 연골세포의 가능성을 확인하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 비울별로 제조한 DBP/알지네이트 스펀지에 연골세포를 스펀지 1개당 2×10^5 농도로 파종하여 *in vitro* 환경에서 일주일 동안 배양하여 스펀지를 안정화시킨 후, 생후 4주된 balb-c 마우스 등 쪽에 2~3 cm 정도 절개하고 이식을 하였으며, 1주 및 4주가 지난 후에 스펀지를 적출하여 10% 포르말린(Sigma) 용액에 고정하였다. 고정된 스펀지를 파라핀 블록으로 제작하여 8 μ m의 두께로 잘라 PLL 코팅 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편을 탈파라핀 과정을 거친 후 조직학적 평가를 위하여 H&E와 Alcian blue 염색을 실시하였다.

면역조직화학적 염색. DBP/알지네이트 스펀지에서 Type II collagen과 Type I collagen 염색을 실시하기 위하여 8 μ m 두께로 유리슬라이드에 고정된 샘플을 60 °C 오븐에 24시간 동안 처리하여 파라핀을 녹여준 뒤 자일렌에 5분 동안 3회 처리하여 지지체와 조직 주위의 파라핀을 완전히 제거하였다. 지지체와 조직의 함수를 위해 100, 90, 80, 70% 그리고 PBS에 5분씩 처리하였다. 증류수 9 mL에 0.01 N HCl 1 mL 을 넣고 희석해 준 뒤 펩신 0.03 g을 녹여 20분간 처리한 뒤 PBS에 5분간 2회 세척해주었다. 3%의 과산화수소에 10분간 처리하여 조직 내 과산화 효소의 작용을 억제시켜 주었다. Blocking Agent(Ultra Tec HRP kit Protein Blocking Agent, Immunotech, France)를 처리하여 조직 내의 항원과 비특이적 단백질의 결합을 억제시켜 주었다. 일차 항체인 Type II collagen과 Type I collagen은 Antibody Diluent(Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako, USA)와 각각 1:200으로 희석하여 2시간 30분 동안 부착시킨 뒤 PBS로 5분간 2회 반복하여 세척하였다. 그 후 이차 항체인 Bio-Tinylated Secondary Antibody에 20분간 반응시킨 뒤 Streptavidin Peroxide Reagent를 30분간 처리하였다. Chromogen Substrate(Ultra Tech AEC kit Substrate, Immunotech)를 이용하여 3분간 반응시킨 후 Mayer's Hematoxylin으로 대조 염색하였다. 관찰은 광학현미경(Nikon Eclipse TE2000-U-Inverted, Japan)으로 관찰하였다.

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

결과 및 토론

화학적 성분 분석. FTIR 분석으로 스펀지 내의 화학적 성분을 분석하여 Figure 1에 나타내었다. 알지네이트는 보통 카르복실기 진동 밴드인 1412 cm^{-1} (symmetric), 1596 cm^{-1} (asymmetric vibration)에서 피크가 나타난다. 콜라겐은 아민 그룹인 1587과 1647 cm^{-1} 에서 피크(amide I)가 보여진다. 콜라겐과 알지네이트가 함께 가교된 후 새로운 피크가 1547~1616 cm^{-1} 에 걸쳐 넓게 나타났다. 이러한 넓은 형태의 피크는 DBP 콜라겐의 asymmetric NH_3 가 알지네이트와 함께 가교시 나타난 변형에 의해 amide I 피크와 겹쳐져 나타는 것으로 사료된다. 또한 알지네이트에 DBP가 첨가되는 양이 많아질수록 카르복실기의 진동에 의해 나타나는 1407 cm^{-1} 피크가 줄어들고 있다. 그리고 3000~3700 cm^{-1} 부근에서 알지네이트는 OH기의 피크가 DBP 콜라겐은 OH와 겹쳐진 NH_2 피크가 보여진다. 이에 알지네이트에 DBP 콜라겐이 첨가됨에 따라서 OH 피크가 좁아지면서 NH_2 피크가 약하게 나타나는 것

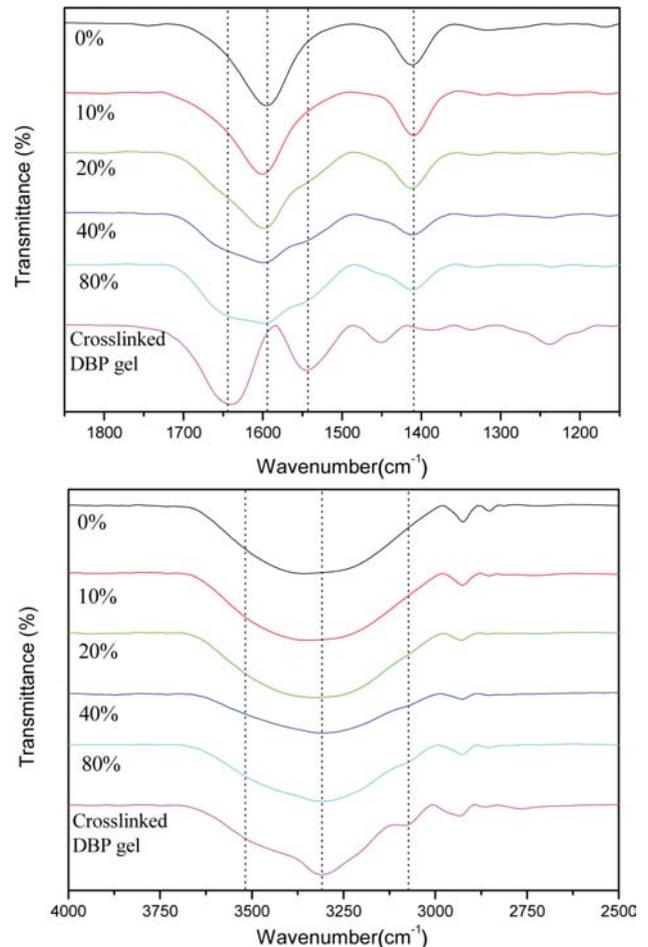


Figure 1. FTIR spectra of 0, 10, 20, 40 and 80% DBP/alginate sponges.

을 알 수 있다.^{29,30}

열적 거동 분석. DBP/알지네이트 스펀지의 DBP 함량에 따른 열적 거동을 관찰하기 위해 시차 주사 열량을 분석한 결과를 Figure 2에 나타내었다. 100°C 부근의 흡열 피크는 탈수온도를 나타내며, 260~280 °C에서는 발열 피크가 나타나는 데 이는 천연고분자가 분해되기 때문에 나타나는 것으로 사료된다. 전체적으로 비슷한 양상의 피크가 나타났으며, 이러한 결과로 볼 때, 알지네이트에 DBP가 첨가 되어도 안정하여 조직 공학적 지지체로 적용시에도 안정할 것으로 사료된다.^{31,32}

압축강도 분석. DBP/알지네이트 스펀지의 조직공학적 적용을 위해 압축강도를 측정하여 Figure 3에 나타내었다. 0, 10, 20, 40 및 80% DBP/알지네이트 스펀지의 압축강도 값은 각각 43.1±2.16, 44.9±2.25, 47.5±2.38, 53.3±2.67 그리고 64.5±3.23 N 값을 가졌으며, DBP의 비율이 높아짐에 따라 큰

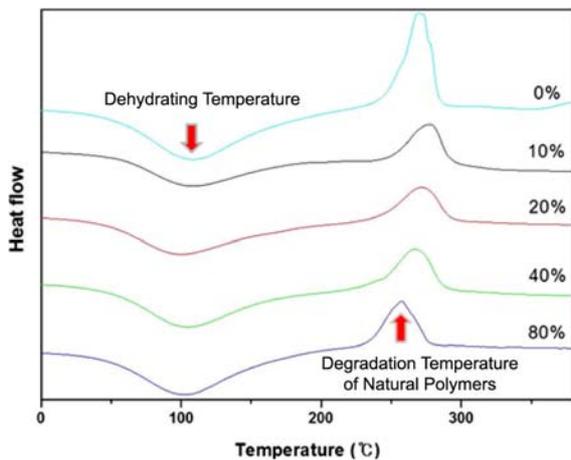


Figure 2. DSC thermograms of 0, 10, 20, 40 and 80% DBP/alginate sponges.

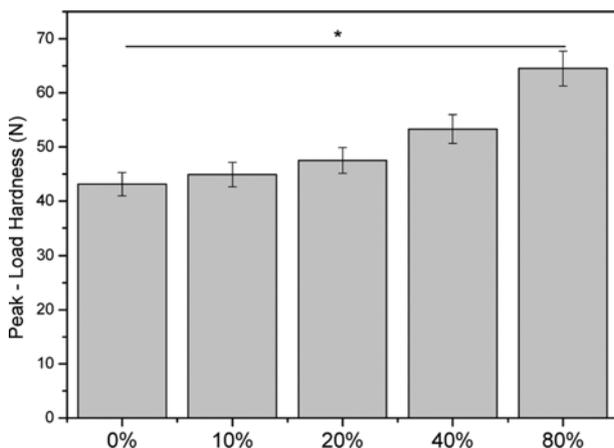


Figure 3. Compressive strength of 0, 10, 20, 40 and 80% DBP/alginate sponges (**p*<0.5).

차이는 없지만 압축강도가 점차 증가하는 것을 볼 수 있다. 특히 80%군은 0%군과 20 N의 강도 차이를 나타내었다. 이러한 결과로 보았을 때, DBP가 알지네이트 스펀지에 강도를 제공한다는 것을 알 수 있었다.

SEM 분석. DBP/알지네이트 스펀지의 다공과 표면을 확인하기 위하여, SEM을 통해 관찰하였다. 각각의 스펀지의 가로 단면 상 부분을 SEM 이미지를 통하여 Figure 4에 나타내었다. 각각의 스펀지에서 다공이 잘 형성되어 있었으며, 다공 대부분이 상호 연결되어 있고, 다공구조를 가지고 있는 3차원적 구조가 스펀지 매트릭스 전반에 형성되어 있는 것을 확인하였다. 다공 크기는 Image J를 통해서 측정하였으며, 0, 10, 20, 40 및 80% DBP/알지네이트 스펀지의 다공크기는 각각 182.90±20, 152.76±15.88, 114.50±8.46, 80.38±8.62, 62.23±10.09 μm로 DBP의 함량이 증가할수록 다공크기가 작아짐을 확인하였다. 이는 알지네이트 스펀지의 다공 내에서 EDC에 의한 DBP 젤의 2차 가교의 결과로써, 알지네이트 스펀지 다공 내에서 DBP의 함량이 높아질수록 밀도가 높아진 결과로 사료된다. 다공은 스펀지와 세포간의 상호작용과 스펀지 내의 영양소 운반에 중요한 역할을 하며, 조직 재생을 하기 위한 최적의 다공크기는 일반적으로 100~400 μm 사이라고 알려져 있으므로, 다공크기로 보았을 때 DBP 함량이 0, 10 및 20%인 DBP/알지네이트 스펀지가 적합하다고 사료된다.

연골세포 파종 후 1, 2 및 3주 뒤 세포의 부착과 모폴로지 변화를 관찰한 결과를 Figure 5에 나타내었다. 초기 1주에서는 모든 군에서 연골세포들이 균집을 이루면서 둥근 형태로

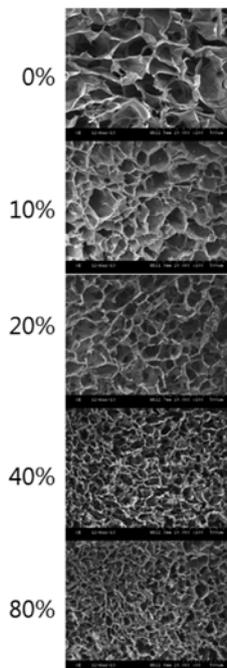


Figure 4. Pore size of 0, 10, 20, 40 and 80% DBP/alginate sponges (magnification ×100, scale bar = 500 μm).

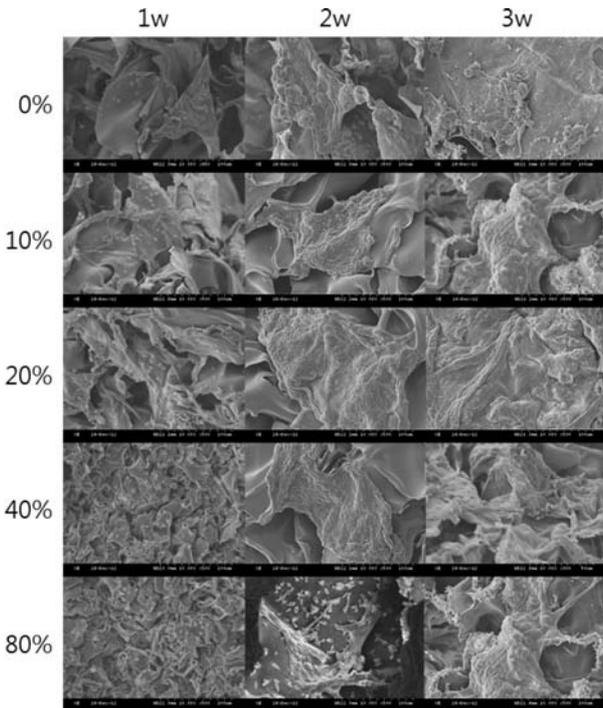


Figure 5. SEM images of chondrocyte after 1, 2 and 3 weeks of culture with DBP/alginate (0, 10, 20, 40 and 80%) sponges (magnification $\times 500$, scale bar = 100 μm).

부착되어 있었다. 2주에서는 모든 군에서 세포 부착 후 많은 ECM이 분비되어 있는 것을 확인하였다. 특히 DBP 함량이 20, 40%인 DBP/알지네이트 스펀지 군에서 더 많은 ECM이 분비되어, 분포 면적이 넓게 관찰되었다. 그리고 3주에서는 전체적으로 스펀지 다공 내부까지, 세포가 부착하고, ECM이 형성되어 있으며, 특히 20% 스펀지에서 전체적으로 고르고, 넓은 범위에서 ECM이 형성되어 있음을 확인하였다.

세포증식률 측정. DBP/알지네이트 스펀지에 파종된 연골 세포의 세포증식률을 관찰하기 위하여 MTT 분석을 시행한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 초기 1, 3, 5 및 7일째에서 증식률은 큰 차이를 보이지 않았으나, 초기 부착률은 20% 스펀지에서 유의하게 높게 관찰되었다. 10, 14일째 세포증식률은 모든 군에서 증가하였고, 앞서 나타난 결과와 같이, 20% 스펀지에서 가장 좋은 증식률을 보였다. 알지네이트에 DBP가 첨가되면 다양한 성장인자와 사이토카인의 영향으로 증식률은 증가하나, 스펀지 내의 다공 크기와 공간의 제약으로 인하여, DBP가 20%로 첨가되었을 때, 연골세포의 증식과 성장에 가장 긍정적인 영향을 미쳤다고 사료된다.

mRNA 발현도 확인. DBP을 비율별로 함유한 알지네이트 스펀지에서 발현되는 연골의 사이토카인을 mRNA 관점에서 알아보았다. 1, 2 및 3주 배양한 후 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 수행하여, 연골세포의 특이적 유전자인 제 II형 콜라겐과 퇴화된 연골에서 나타나는 유전자인 제 I형 콜라겐, 그

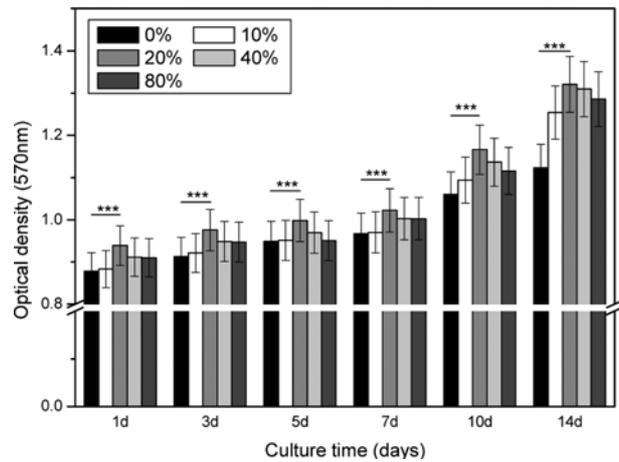


Figure 6. Chondrocyte proliferation in DBP/alginate (0, 10, 20, 40 and 80%) sponges after 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days *in vitro* (** $p < 0.001$).

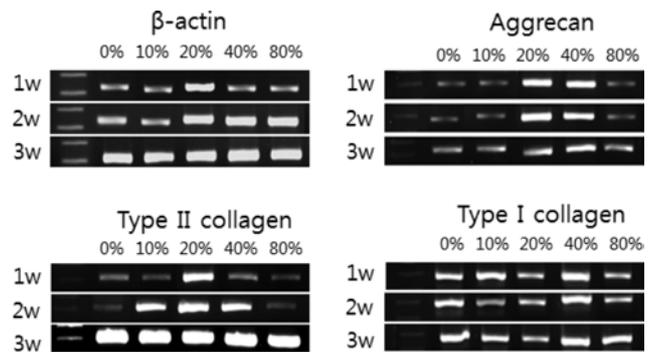


Figure 7. Effect of DBP concentration on the level of mRNA expression for β -actin, aggrecan, type I collagen and type II collagen at 1, 2 and 3 weeks *in vitro*. Agarose gel electrophoresis for the series of DBP/alginate sponges.

리고 연골의 구성 성분으로 정상적이고 건강한 연골에서 나타나는 어그리칸의 발현정도를 확인하여 Figure 7에 나타내었다. 모든 실험 군에서 내부 대조군인 β -actin이 발현되었으며, 제 I형 콜라겐의 발현정도를 보면 1주에서는 퇴화도가 확인되었으나 시간이 지날수록 낮은 퇴화도를 보였다. 연골세포의 특이 유전자인 제 II형 콜라겐의 발현 역시 시간이 지날수록 DBP/알지네이트 스펀지에서 뚜렷이 발현됨을 확인할 수 있었다. 어그리칸의 발현에 있어서는 DBP을 20% 함유한 알지네이트 스펀지에서 연골세포가 더 건강하고 정상적임을 증명시켜 주었다. 이러한 결과를 통해 20% DBP/알지네이트 스펀지에서 연골세포가 안정적으로 배양될 수 있음을 확인하였다.

조직학적 평가. 조직학적 평가를 위해 면역결핍 마우스에 이식한 DBP/알지네이트 스펀지를 1주와 4주에 적출하여, 염색을 실시하였다.

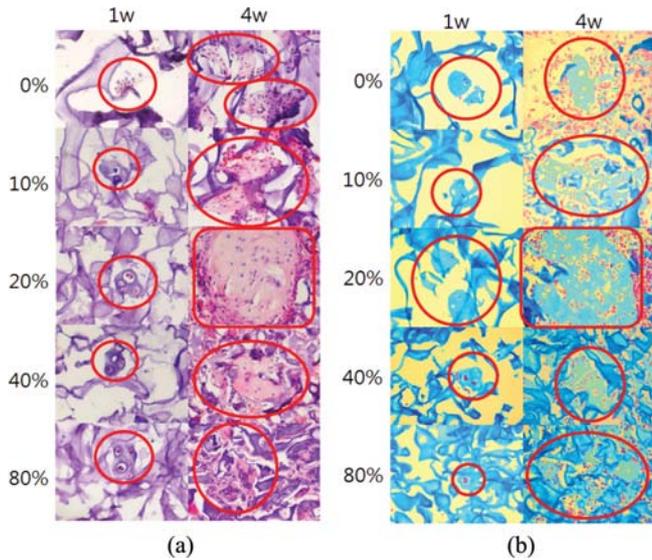


Figure 8. Histochemistry evaluation of DBP/alginate sponges with chondrocyte after 1 and 3 weeks of implantation *in vivo*: (a) H&E; (b) alcian blue (n=6).

H&E 염색을 통해 연골조직의 형성 정도를 확인하였다 (Figure 8(a)). 그 결과 초기 1주 동안은 연골세포들이 모여서 작은 군집을 이루고 있는 것을 볼 수 있었다. 또한 4주가 지나면서 전체적으로 조직화가 진행되면서 세포가 다공을 채우며 증식되어있는 것을 확인할 수 있다. 특히 20% DBP/알지네이트 스펀지군에서 촘촘히 다공을 채우고 있을 뿐만 아니라, 연골 특이적 형태인 라쿠나가 조직에 전체적으로 분포하면서 넓은 조직을 이루고 있음을 확인하였다.

Alcian blue 염색으로 연골세포에서 형성되는 산성뮤코다당류의 형성을 확인하였다(Figure 8(b)). 그 결과 초기 1주에는 DBP/알지네이트 스펀지군 중 DBP의 함유량에 상관없이 군집을 이루며 산성뮤코다당류가 세포주위에 잘 형성된 것을 확인하였다. 그리고 4주째에는 전체적으로 푸르게 염색되어 세포에서 산성뮤코다당류가 다량 분비된 것을 확인하였고, 특히 20% 스펀지에서 넓은 조직을 이루고 있는 푸른색 영역을 확인할 수 있다. 따라서 이러한 결과에 따라 DBP가 산성뮤코다당류의 분비를 촉진시키고, 연골세포의 증식에 도움을 주는 것으로 사료된다.

연골세포에서 주로 분포하고 있는 특이적 콜라겐인 제 II형 콜라겐과 뼈에서 분포하고 있는 제 I형 콜라겐의 발현도를 측정하기 위해서 면역조직화학 염색인 제 II형 콜라겐, 제 I형 콜라겐의 염색을 실시하였고 이는 Figure 10에 나타내었다. 표적 단백질은 빨간색으로 염색되었으며, 알지네이트의 수용성이라는 특성 상 대조 염색한 헤마톡실린이 보라색으로 알지네이트를 염색하였다. Figure 9(a)를 보면 제 II형 콜라겐의 발현은 1주보다 4주 째 모든 군에서 다공 안으로 단백질이 분포되어있음을 확인할 수 있다. 이외는 대조적으로 Figure

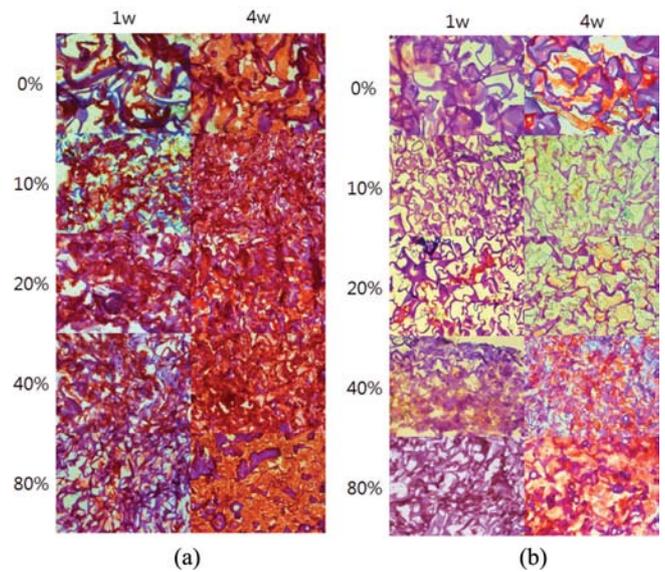


Figure 9. Immunohistochemistry evaluation of DBP/alginate sponges with chondrocyte after 1 and 3 weeks of implantation *in vivo*: (a) Type II collagen; (b) Type I collagen (n=6).

9(b)에서 제 I형 콜라겐은 제 II형 콜라겐보다는 적게 관찰되었으며, 특히 20%에서 그 발현이 가장 적게 관찰되어 20%에서 연골세포의 특성을 가장 잘 유지하고 있음을 확인하였다.

결론

본 연구에서는 천연 고분자 재료인 알지네이트에 DBP를 비율별로 첨가하여, 0, 10, 20, 40 및 80% DBP/알지네이트 스펀지 군을 제작하여 연골세포에 최적인 DBP 함량을 제안하고자 하였다. 3차원 스펀지 형태로 제조된 이들 군에 대한 물리, 화학적인 물성 평가를 위하여, FTIR, DSC, 압축강도, SEM 분석을 실시한 결과, DBP 함량이 증가할수록 압축강도가 증가하고, 다공크기가 작아지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 스펀지에 연골세포를 파종하여, *in vitro* 환경에서 SEM, MTT, mRNA을 확인한 결과, 공극의 크기는 0, 10, 20%에서 연골세포 증식에 가장 좋은 150-355 μm 다공크기³³ 범위에 들어간다는 것을 확인하였으며, 세포 증식률 역시 같은 맥락에서 20%에서 가장 높은 증식률을 보였다. 또한 mRNA 분석결과에서도 연골세포 퇴화에 관련된 제 I형 콜라겐의 발현이 20%에서 가장 낮게 나타났다. *In vivo* 환경에서 조직형성 및 산성뮤코다당류와 콜라겐같은 ECM 형성 분석을 통하여 DBP가 연골세포의 세포 증식과 표현형의 유지에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였다. 이는 본연의 DBP가 가지고 있는 콜라겐과 연골에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 사이토카인의 작용으로 인한 것이라고 사료되어진다. 이러한 결과를 종합해보면 20% DBP/알지네이트 스펀지가 연골재생에 가장 적합

하다고 판단되어지며, 연골조직공학에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(112007-05-1-SB010)과 한국연구재단 바이오의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구(2012M3A9C6050204)입니다.

참 고 문 헌

- S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).
- D. W. Huttmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
- K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Am. Chem. Soc.*, **101**, 1069 (2001).
- Z. Lin, C. Willers, J. Xu, and M. H. Zheng, *Tissue Eng.*, **12**, 1971 (2006).
- N. Isogai, H. Kusuhara, V. Ikada, H. Ohtani, R. Jacquet, J. Hillyer, E. Lowder, and W. J. Landis, *Tissue Eng.*, **12**, 691 (2006).
- S. Vijayan, W. Bartlett, G. Bentley, R. W. Carrington, J. A. Skinner, R. C. Pollock, M. Alorjani, and T. W. Briggs, *J. Bone Joint Surg Br.*, **94**, 488 (2012).
- J. M. Pestka, G. M. Salzmann, N. P. Südkamp, and P. Niemeier, *Z. Orthop. Unfall.*, **151**, 278 (2013).
- M. A. Accardi, S. D. McCullen, A. Callanan, S. Chung, P. M. Cann, M. M. Stevens, and D. Dini, *Tissue Eng. Part A*, **19**, 2300 (2013).
- P. M. van der Kraan and W. B. van den Berg, *Osteoarthritis Cartilage*, **20**, 223 (2012).
- R. A. A. Muzzarelli, F. Greco, A. Busilacchi, V. Sollazzo, and A. Gigante, *Carbohydr. Polym.*, **89**, 723 (2012).
- K. E. Benders, P. R. van Weeren, S. F. Badylak, D. B. Saris, W. J. Dhert, and J. Malda, *Trends Biotechnol.*, **31**, 169 (2013).
- E. M. Darling and K. A. Athanasiou, *J. Orthop. Res.*, **23**, 425 (2005).
- J. E. Barralet, L. Wang, M. Lawson, J. T. Triffitt, P. R. Cooper, and R. M. Shelton, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **16**, 515 (2005).
- T. Kimura, N. Yasui, S. Ohsawa, and K. Ono, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **186**, 231 (1984).
- C. Bassleer, P. Gysen, J. M. Foidart, R. Bassleer, and P. Franchimont, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **22**, 113 (1986).
- B. Beekman, N. Verzijl, R. A. Bank, K. von der Mark, and J. M. TeKoppele, *Exp. Cell Res.*, **237**, 135 (1997).
- K. A. Mehta, M. S. Kislalioglu, W. Phuanpradit, A. W. Malick, and N. H. Shah, *J. Control. Release*, **63**, 201 (2000).
- E. J. Caterson, W. J. Li, L. J. Nesti, T. Albert, K. Danielson, and R. S. Tuan, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **961**, 134 (2002).
- H. H. Tonnesen and J. Karksen, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **28**, 621 (2002).
- I. J. Kim, H. W. Kang, and C. N. Jeong, *Polymer(Korea)*, **27**, 195 (2003).
- O. Smidsrod and G. Skjak-Bræk, *Trend Biotechnol.*, **8**, 71 (1998).
- M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
- C. B. Huggins and M. R. Urist, *Science*, **167**, 896 (1970).
- S. H. Kim, K. S. Park, 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).
- Y. M. Lee, C. R. Shim, Y. J. Lee, J. E. Song, J. W. Bea, Y. L. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 13 (2012).
- C. R. Shim, Y. J. Lee, H. A. Ko, M. J. Kim, J. W. Bae, J. H. Lee, J. E. Song, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 50 (2012).
- S. J. Yoon, S. H. Kim, H. J. Ha, Y. K. Ko, J. W. So, M. S. Kim, I. Y. Yang, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Part A*, **14**, 539 (2008).
- M. Otterlei, A. Sundan, G. Skjak-Braek, L. Ryan, O. Smidsrod, and T. Espevik, *Infect Immun.*, **61**, 1917 (1993).
- H. Y. Lin and C. T. Yeh, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **21**, 1611 (2010).
- C. G. van Hoogmoed, H. J. Busscher, and P. de Vos, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **67**, 172 (2003).
- J. P. Soares, J. E. Santos, G. O. Chierice, and E. T. G. Cavaleiro, *Eclética Química*, **29**, 57 (2004).
- E. H. Jo, Y. J. Kim, H. Yu, S. C. Yoo, Y. S. Kang, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **1**, 46 (2010).
- T. G. Tienen, R. G. Heijkants, P. Buma, J. H. Groot, A. J. Pennings, and R. P. Veth, *Biomaterials*, **23**, 1731 (2002).