

오리발 유래 콜라겐/락타이드 글리콜라이드 공중합체 지지체에서의 골분화능 효과

국 현[#] · 김혜민[#] · 김수민 · 김은영 · 송정은 · 권순용* · 서동삼** · 박찬흠*** · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소

*가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과, **세원셀론텍

***한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과

(2015년 2월 23일 접수, 2015년 3월 23일 수정, 2015년 4월 10일 채택)

Osteogenic Effect of Hybrid Scaffolds Composed of Duck Feet Collagen and PLGA

Hyeon Kuk[#], Hye Min Kim[#], Soo Min Kim, Eun Young Kim, Jeong Eun Song, Soon Yong Kwon*,
Dong Sam Suh**, Chan Hum Park***, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Fusion Tech., Polymer Fusion Res. Center & Dept. of PolymerNano Sci. Tech.,
Chonbuk National University, 567 Baekje Daero, 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

**Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongsu, 2ga 3-dong, Seongdong gu, Seoul 133-831, 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

(Received February 23, 2015; Revised March 23, 2015; Accepted April 10, 2015)

초록: 오리발 콜라겐은 최근에 조직공학에서 안정하고 안전한 재료로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 PLGA 용액에 오리발에서 추출한 콜라겐을 비율별로 첨가하여 지지체를 준비하였다. DC/PLGA 지지체에 골수유래줄기세포를 배양하고 골분화능 및 골형성능을 체계적으로 비교하였다. 세포파괴 후 초기 7day에서의 골분화는 DC함량에 비례하여 80%의 비율까지 넣은 PLGA 지지체에서 상당한 증가를 보여주었다. 하지만, DC/PLGA 지지체에서 ALP 활성도는 첫 주 이후, 점차적으로 감소하였고 14일 째에 기저수준에 도달하였다. 이 결과는 DC/PLGA 공중합체 지지체가 초기 뼈 형성과 분화에 도움을 주고 긍정적인 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

Abstract: Duck feet collagen (DC) has recently been used as a stable and safe source for tissue engineering. In this study, we have prepared a series of collagen scaffolds by mixing PLGA solutions with different percentages of collagen extracted from duck feet. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) were cultured on the prepared DC/PLGA scaffolds, and their osteogenic effect and bone formation were compared systemically. At 7 days after seeding, osteogenesis was significantly increased on PLGA scaffolds containing upto 80% of DC. However, the alkaline phosphatase activity of DC/PLGA scaffolds decreased gradually after the first week and reached to the basal line after 14 days. This result indicates that DC/PLGA hybrid scaffolds are helpful for initial bone formation and differentiation, and have a positive effect on them.

Keywords: PLGA scaffold, collagen, ducks collagen, BMSC, bone regeneration, bone reconstruction.

서 론

콜라겐은 인간의 몸을 구성하는 단백질 중 약 30% 정도 차지하고 있으며 세포외기질(extracellular matrix; ECM)의 주요 성분 중 하나로, 생체적합성, 생분해성, 낮은 항원성 등을

나타내기에 삼차원 지지체, 패치, 섬유 등으로 가공하여 연골, 뼈, 피부 재생에 주로 사용된다.¹⁻⁵ 조직공학에 이용되는 콜라겐은 주로 소나 돼지의 피부나 뼈와 같은 동물의 조직에서 추출된 동물유래 콜라겐을 이용하며 낮은 항원성, 지혈효과, 세포부착 능력이 우수하다고 알려져 있다.^{6,7}

그러나 이러한 동물유래 콜라겐은 생체에서 유래한 복잡한 분자구조를 가진 물질로 최종제품에 대한 물리화학적 분석만으로는 제품의 효능을 평가하기 어려울 뿐 아니라 원료 자체에 감염성병원 인자가 오염될 가능성이 크기 때문에 안전성

[#]These authors contributed equally to the work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

에 관한 논란이 오래 전부터 있어왔으며⁸ 여러 나라에서 소에게서 광우병 및 돼지에게서 구제역 등 인수공통 감염병이 전 세계에서 발병한 이후 불안감이 더욱 심해졌다.^{8,9} 따라서 유래 동물의 상태, 콜라겐의 추출방법 등을 포함한 제조공정 및 동물유래 바이러스 관련 안전성에 관한 사항 등이 특별하게 고려되고 있으며, 더 나아가 동물유래 콜라겐을 대체할 수 있는 다른 공급원에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.¹⁰

이러한 이유로 소나 돼지 이외의 사람으로부터 진화적으로 멀리 떨어져 있으며 사람과 공통되는 감염질환이 비교적 발견되어 있지 않아 소나 돼지의 콜라겐에 비하여 안전성이 높은 고등어, 황다랑어 등과 같은 어류의 껍질이나 비늘 및 뼈 등의 부산물에서 추출하거나¹¹⁻¹³ 오징어, 해파리, 불가사리와 같은 해양수산물,¹⁴⁻¹⁶ 녹용, 닭발 등과 같은 기타 축산물에서¹⁷ 유래하는 콜라겐이 주목을 받아 화장품이나 의약품 등의 원료로서 이용하고자 연구가 진행 중에 있지만 고가라는 단점이 있기도 하다.¹⁸

이에 따라 본 실험에서는 축산 부산물인 오리발에서 콜라겐(collagen extracted from feet of ducks; DC)을 추출하여 이용하였다. 우리나라에서는 해마다 오리 소비량이 증가하지만, 오리 부산물의 폐기량도 늘어나고 있다.¹⁹ 오리 부산물은 대부분 자원낭비는 물론 환경오염을 야기하는 축산부산물이다. 이에 본 연구팀에서는 전량 폐기되는 오리발에서 고부가가치를 창출할 수 있는 콜라겐을 추출하여 식용, 미용 및 의료용으로 적용하고자 하였다. 앞선 연구에¹⁹ 의하면 오리발에서 추출된 콜라겐은 소에서 얻은 탈미네랄화 골분(demineralized bone powder; DBP)이나 돼지에서 얻은 소장 점막하 조직(small intestinal submucosa; SIS)과 비교하여 그 기능이나 순도가 뒤지지 않았다. 또한 DC와 DBP, SIS를 이용하여 진행한 비교 실험에서는 DC가 DBP나 SIS보다 높은 세포증식과 성장을 나타내 조직공학에 이용 가능한 재료로서의 가능성을 보였다.

본 실험에서는 골의 세포외기질(extracellular matrix; ECM)에 있어 90%를 이루며, 뼈의 탄성과 유연성을 유지하는 역할을 하는 제 I형 콜라겐을 많이 함유하고 있는 DC를 이용하여 손상된 골의 재건 및 재생을 도와주는 의료용 재료로 사용하고자 하였고,²⁰ 미국 FDA의 승인을 받아 널리 사용되고 있으며 생체적합성이 뛰어난 뿐만 아니라 생분해도를 조절할 수 있는²¹ 폴리락타이드글리콜라이드 공중합체(poly(lactide-co-glycolide); PLGA)와 혼합하여 삼차원 DC/PLGA 지지체를 제조한 뒤, 골수유래줄기세포(bone marrow mesenchymal stem cells; BMSC)를 지지체에 파종하여 지지체만으로 골분화를 유도함으로써 골재생용 지지체로서의 활용 가능성을 평가하였다.

실 험

시약 및 재료. 콜라겐은 전북 전주시의 농장에서 폐기된

오리발에서 채취하였으며, PLGA는 락타이드/글리콜라이드의 비율이 75/25이고 분자량이 90000 g/mol인 것을 Boehringer Ingelheim Chem. Co.(Germany)에서 구입하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

콜라겐 추출방법. 폐기된 오리발을 수거하여 -80 °C에서 급속 냉각시켜 사용하였다. 냉각시켜 둔 오리발을 증류수에 하루 동안 담가 핏물을 제거한 후 증류수로 세척하였다. 오리발을 30 mm 크기로 절단하여 절단 조직의 10배(w/v)의 10% 에틸렌디아민시아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 용액을 첨가 후 40분에서 1시간 교반 및 4시간 초음파 처리하여 탈회하였다. 탈회가 완료되면 조직을 증류수를 이용하여 세척한 뒤 지방제거를 위하여 0.5 M의 수산화나트륨에 24시간 동안 처리하면서 250 rpm으로 교반하였으며 지방제거 후 조직을 회수하여 증류수로 세척하였다.

지방이 제거된 조직은 알코올과 아세톤을 이용하여 추가적으로 세척한 뒤, 5%의 시트르산을 8배수(w/v) 첨가하여 48시간 4 °C에서 250 rpm으로 교반하여 조직에서 콜라겐이 산성용액으로 녹아나오게 하였다. 콜라겐이 추출된 용액을 180~250 μm 체에 걸러 녹지 않은 조직은 수거하여 다시 산성 용액을 가하여 교반하였다. 콜라겐이 녹아 나온 산성용액을 원심분리(12000 rpm, 20분, 4 °C)하여 불순물을 침전시켰다. 상등액을 수거한 뒤, 용액에 1 M의 염화나트륨을 첨가하여 12~24시간 동안 침전시킨 뒤, 셀룰로오스 한외여과막(3500 MWCO)에 충전시켜 24시간 이상 증류수를 투석외액으로 투석하여 염을 제거하여 콜라겐을 얻었다. 증류수는 1일 5회 이상 교환해주었으며 48시간 투석한 뒤, 투석이 완료된 콜라겐 용액은 수거하여 원심분리(12000 rpm, 20분, 4 °C)한 뒤, 70% 알코올로 2회 세척하고 증류수에 재현탁시켜 동결 건조하여 파우더의 형태로 얻은 뒤 사용 전까지 냉장보관하였다.

SDS-PAGE. 7.5%의 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 젤을 평판 젤용 유리판에 충전하고 그 위에 메탄올을 부은 뒤 상온에서 30분간 고분자를 중합시켰다. 30분 후 증류수를 제거하고 3% stacking gel을 사용해 젤의 상부에 충전하고 상온에서 20분 동안 고분자를 중합시켰다. 2% SDS, 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 8.0), 2% 메르캅토에탄올에 농도가 5 mg/mL 이 되도록 DC를 제조한 후 100 °C에서 5분간 반응시켰다. 그 후, stacking gel에 반응시킨 샘플을 주입하고 30 mA의 전류로 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Coomassie Brilliant Blue R250 이용하여 전기영동 밴드를 확인하였다. 콜라겐의 분자량은 collagen from rat tail(Sigma, USA)을 사용하여 비교하였다.

지지체 제조. 지지체는 대조군인 PLGA 지지체 및 DC를 비율별로 함유한 PLGA 지지체를 제조하였다. 지지체는 염 추출법을 이용하였으며 방법은 다음과 같다. 우선 PLGA 1 g을 MC 4 mL에 완전히 녹여낸 뒤, 상기의 PLGA가 굳기 전

오리발에서 추출한 콜라겐 분말을 PLGA 중량의 0, 10, 20, 40, 60, 80%의 무게비로 넣고 볼텍스 믹서로 10분간 섞어 PLGA에 포함되도록 하였다. 그 후, 오리발 콜라겐이 포함된 PLGA가 완전히 굳기 전에 250~355 μm 크기의 NaCl 9 g과 섞고, 직경 7 mm, 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 충전시킨 후 24시간 동안 60 kgf/cm²의 압력을 가하였다. 24시간 후 NaCl을 제거하기 위하여 제조한 지지체를 48시간 동안 증류수에 담가 놓으며 증류수는 6시간마다 교체하였다. NaCl을 제거한 지지체는 냉각시킨 후 24시간 동안 동결건조시켜 사용하였다.

세포분리. 골수유래줄기세포(BMSC)는 4 주령 암컷 흰색 뉴질랜드 토끼의 골수에서 분리하여 사용하였다. 토끼 다리 부분의 뼈를 채취한 후 절단하여 18 게이지 실린지를 사용해 골수를 채취하였다. 채취한 골수는 층분리 배양법을 사용하여 배양용기에 4×10⁵ cell/mL의 농도로 5% CO₂, 37 °C의 인큐베이터에서 배양하였으며 20% 우태아혈청(FBS, fetal bovine serum, Gibco, USA) 및 100 unit/mL의 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 포함된 이글의 최소필요배지(α -MEM, alpha modification of eagle's minimum essential media, Lonza, USA)를 배양액으로 이용하였다. 세포들이 배양용기에 부착되면 배양액을 교환한 후, 2일 마다 배양액을 교환하였으며, 80~90% 정도 배양용기의 바닥을 채우면 0.25% 트립신-EDTA(Gibco)를 이용하여 세포를 채취한 후 사용하였다.

압축강도 측정. 지지체의 압축강도를 확인하기 위하여 Texture analyzer(TMS-Pro, USA)를 이용하였다. 세포는 1×10⁵의 BMSC를 지지체에 파종하였으며, 세포 파종 후 14 일 후에 지지체의 압축강도를 측정하였다. Texture analyzer의 설정 값은 표적거리 1.5 mm, 시험속도 1 mm/min, 압축력 1 N으로 모두 동일하게 적용하였다.

세포 증식률 측정. DC를 함유한 지지체의 세포 독성과 지지체에 파종된 BMSC의 증식능력을 확인하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 분석법을 실시하였다. 1×10⁵의 BMSC를 지지체에 파종하고 상기의 배양액으로 배양하였다. 배양 후 1, 3, 7, 14, 28일째에 MTT 용액(5 mg/mL)을 100 μL 씩 넣고 4시간 동안 5% CO₂와 37 °C의 환경에서 배양하였다. 그 후 보라색 결정이 생성되면 지지체를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)용액을 1 mL씩 넣어 생성된 보라색 결정을 완전히 용해시킨 후 96웰 플레이트에 시료를 각각 100 μL 씩 분주하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 분화정도 측정. 알칼리성 인산 분해 효소(alkaline phosphatase; ALP)를 측정하여 지지체에 파종한 BMSC 세포의 골분화능을 모니터링 하였으며 분석에는 ALP activity Kit (Takara, Japan)를 사용하였다. ALP 활성도 분석은 세포 파종 1, 7, 10, 및 14일 째에 실시하였다. 지지체에서 배양액 제거

후 DW로 3회 세척한 뒤, 0.02% 추출액으로 지지체에 배양된 세포에서 효소를 추출해 냈다. 이 추출액에 4-니트로페닐 포스페이트(nNPP, ρ -nitrophenyl phosphate) 용액을 넣은 뒤, 37 °C 인큐베이터에서 1시간 반응시킨 후 0.9 M NaOH로 반응을 정지시킨 다음 405 nm의 흡광도로 측정하고, 송아지 소장 알칼리성 인산분해 효소(calf intestinal alkaline phosphatase; Takara)를 사용하여 위와 동일한 방법으로 ALP 활성도를 측정하여 추세를 그린 뒤, 지지체 내에서 세포의 분화정도를 분석하였다.

조직학적 평가. 지지체에 존재하는 콜라겐을 확인하기 위하여 세포를 파종하지 않은 DC/PLGA 지지체를 이용하여 제 I형 콜라겐(Calbiochem® MD Bio Sciences Inc., La Jolla 1:90)을 AEC 방법으로 확인하였다. 또한 *in vivo* 상에서 골형성 정도를 확인하기 위하여 DC를 비율별로 함유한 DC/PLGA 지지체에 1×10⁵의 BMSC를 파종하여, 일주일동안 배양한 뒤, 누드마우스 피하에 이식하였다. 이식 후 1, 2, 3 및 4주 뒤에 지지체를 적출하여 포르말린(Sigma) 용액에 고정하였다. 고정된 지지체는 파라핀 블록으로 제작하여 4 μm 의 두께로 박절하여 폴리 L-라이신(poly-L-lysine; PLL) 코팅 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편은 탈 파라핀 과정을 거친 후 조직학적 평가를 위하여 H&E 및 von Kossa 염색을 실시하였다.

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

결과 및 토론

DC의 콜라겐 구성. SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide)는 콜라겐의 단백질 질량의 차이로 DC의 콜라겐 구성을 알아보고자 하였으며 결과를 Figure 1에 나타내었다. SDS-PAGE 결

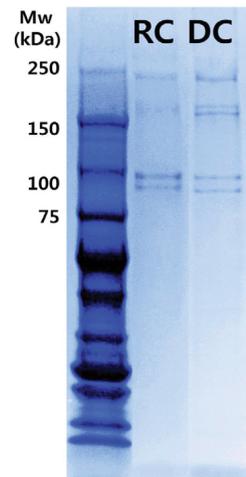


Figure 1. SDS-PAGE of DC: RC is collagen from rat tail and DC is duck feet collagen.

과 대조군으로 이용한 제 I형 콜라겐에서 하나의 β 밴드와 삼중나선의 풀림 폴리펩타이드 사슬을 나타내는 두 개의 α 밴드가 나타났다. DC 역시 그림에서 보는 바와 같이 샘플과 거의 동일한 β 밴드 및 α_1, α_2 밴드가 나타난 것을 확인할 수 있었다. 그 같은 결과는 DC가 골 ECM의 주성분인 제 I형 콜라겐으로 구성되어^{3,19} 있음을 알 수 있다. 이로써 본 연구팀이 오리발에서 추출한 콜라겐 골 ECM의 90%를 이루는 콜라겐 제 I형으로 이루어져 있어 생체재료로 적용 시 골의 탄성과 유연성을 유지해 줄 수 있을 뿐만 아니라 효과적으로 골을 재건, 재생에 긍정적인 영향을²⁰ 줄 수 있는 적합한 재료라고 판단된다.

세포 증식 및 부착도. 세포는 외부성장 환경의 영향으로 인해 부착도와 증식률에 변화가 생기는데 DC의 포함 정도에 따른 세포성장을 확인하기 위해 MTT 분석법을 실시하였다 (Figure 2). 그 결과 초기부착도가 세포를 파종한 후 1일 뒤, DC를 80 wt% 함유한 지지체에서의 세포 생존율이 매우 높았다.

전체 실험 기간 동안에 모든 지지체에서 세포증식이 활발하게 일어났으며 증식거동은 파종 1일째와 비슷하게 나타났는데, 이는 DC와 BMSC의 초기부착에 있어 긍정적인 작용을 한 것으로 판단된다.

DC는 세포의 성장에는 유의한 영향을 미치지 않으나 초기의 부착에 영향을 줌으로써 세포의 생존에 긍정적인 역할을^{19,22} 한 것으로 사료된다.

골분화 활성도 분석. 지지체 내에서 세포의 초기 및 중기의 골분화 정도를 확인하기 위하여 ALP 활성도를 측정하였다(Figure 3). ALP는 골분화 초기에 가장 잘 활성되기에 세포 파종 후 2주 동안 활동도를 측정하였다. 파종 후 1일째와 7일째를 비교해보면 모든 지지체에서 활성도가 증가하였

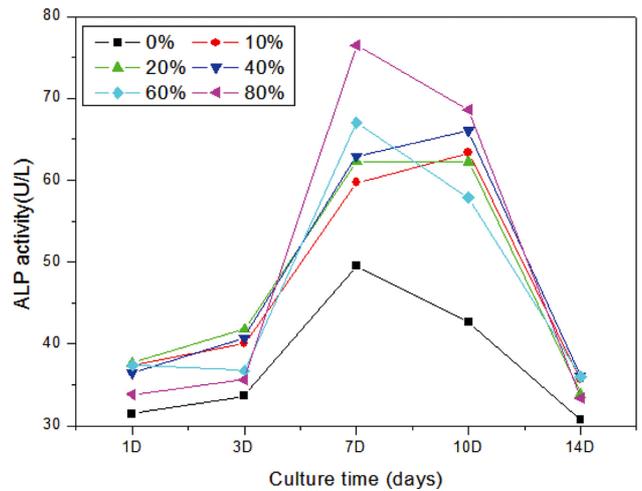


Figure 3. Alkaline phosphatase activity of BMSC on DC/PLGA scaffolds measured at various contents of collagen at 1, 3, 7, 10, and 14 days.

다. 특히 DC를 80 wt% 함유한 지지체를 보면 파종 후 7일 후에 활성도가 급격히 증가하였으며 DC를 함유하지 않은 지지체와 비교해 보았을 때, 그 값이 2배 이상 차이가 날 수 있다. 다른 지지체들 역시 DC의 농도가 증가할수록 세포 활성도가 높은 경향을 나타냈다. 이렇게 증가한 활성도는 7일을 기점으로 하여 점점 감소했다. ALP가 골분화 초기 발현하여 초기 석회화 과정에 관여하며 석회화가 진행되면서 줄어들었을 것으로 생각되며²³ 이러한 결과로 보았을 때, 다른 골분화 관련 성장인자를 사용하지 않고 DC를 첨가하여 제작한 지지체를 사용함으로써 효율적으로 골분화를 촉진시킬 수 있음으로 사료된다.

골분화에 따른 압축강도의 변화. DC 첨가에 따른 PLGA 지지체의 물성변화를 확인하기 위하여 압축강도 분석을 실시하였다. 세포를 파종하기 전에는 DC의 함유량이 높을수록 압축강도가 감소하는 것을 보였다(Figure 4). 이는 PLGA 보다 상대적으로 물성이 약한 DC가 지지체에 다량 첨가되면서 도출된 결과이다. 반면에, BMSC를 파종하여 골분화시킨 지지체에서의 압축강도를 측정된 결과, DC의 함유량이 증가할수록 압축강도가 증가함을 보였다(Figure 4). 이는 지지체에 파종한 세포의 증식 및 골분화로 인한 ECM 형성 및 미네랄 침착으로 압축강도가 증가한 것으로 사료된다. 따라서 DC가 골분화를 유도, 촉진함과 동시에 미네랄을 침착시켜 압축강도를 증가시켜^{5,13,20} 준 것을 알 수 있다. 특히, 80% DC/PLGA 지지체는 골분화 전에 2.86 MPa로 골 대체재료 적용하기에 그 물리적 강도가 다소 약하다는 한계가 있었으나,^{15,24} 골분화를 거침으로 5.57 MPa 정도의 충분한 강도를 가졌다.^{22,24} 이러한 거동으로 보아 DC/PLGA 지지체에 BMSC를 파종한다면 골 대체재료로 사용 시 더욱 안정적으로 작용할 수 있을 것이라고 판단된다.

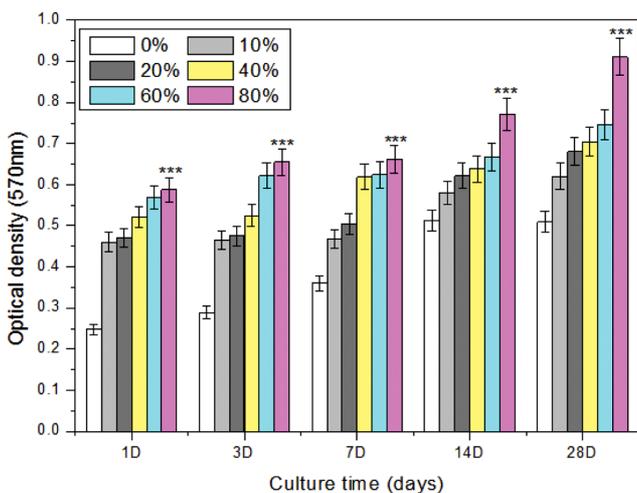


Figure 2. Cell viability of BMSC on DC/PLGA scaffolds with various contents of collagen for 1, 3, 5, 7, 14 and 28 days (***) $P < 0.01$.

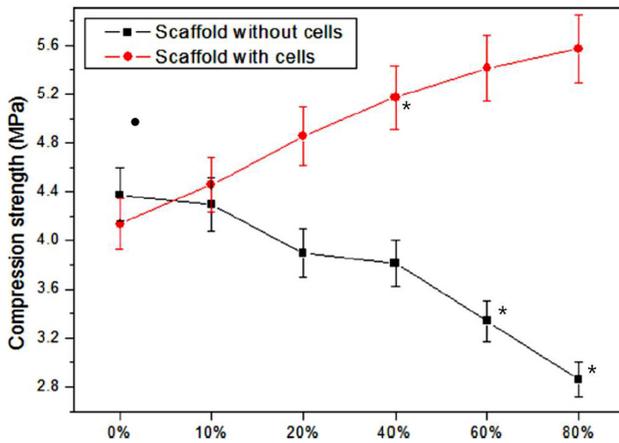


Figure 4. Compressive strength of DC/PLGA scaffolds on various contents of collagen with/without cells (n=30, *P<0.05).

조직화학적 염색. *In vivo* 환경에서의 세포질 형성 및 골형성을 평가하기 위하여, 함량별 DC/PLGA 지지체 및 비교를 위한 PLGA 지지체를 누드마우스 피하에 이식 후 1주 및 4주 후 지지체를 적출하여 조직화학적 염색을 실시하였다.

H&E 염색 결과, DC의 함유량에 따라 세포 활성도가 증가하여 세포 증식이 활발히 일어나 이식된 지지체의 다공이 조직으로 채워진 것을 볼 수 있다. 또한 골이 형성된 부분은 무기질 침착으로 인하여 다른 부위보다 짙게 염색이 되는데, 관찰 시간이 증가함에 따라 그리고 DC의 함유량이 증가함에 따라서 무기질이 침착된 부분이 넓게 분포했으며, 이는 골분화에 따른 미네랄의 형성이 활발히 일어난 결과로 사료된다 (Figure 5).

Von Kossa 염색은 골화를 확인하는 방법 중 마지막 단계에 실시하는 염색법으로 알려져 있다. Von Kossa 염색은 석회화된 세포외 기질 부분에서 은의 침착으로 인해 검정색으로 염색되는데, 이식 후 1주째에는 염색된 부분이 전혀 발견되지 않았으나(결과를 첨부하지 않음.), 4주째에는 염색된 부분이 나타났으며 DC의 함량이 증가함에 따라 염색된 부분에 부분이 점차 넓어졌을 뿐 아니라 진한 염색상을 보였다 (Figure 5).

이와 같이 *in vivo* 조직화학적 염색의 분석에서도 DC의 함량이 증가함에 따라서 세포의 증식이 잘 일어나고 골분화가 활발히 일어난 앞의 *in vitro* 분석과 비슷한 양상으로 결과가 도출되었다. 이러한 결과로 보아, DC/PLGA 지지체를 생체 내에 적용 시, DC가 골분화에 있어 긍정적인 요인으로 작용할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 전량 폐기되는 축산 부산물인 오리발에서 천연 고분자인 콜라겐(DC)을 추출하여 조직 공학적인 골 재

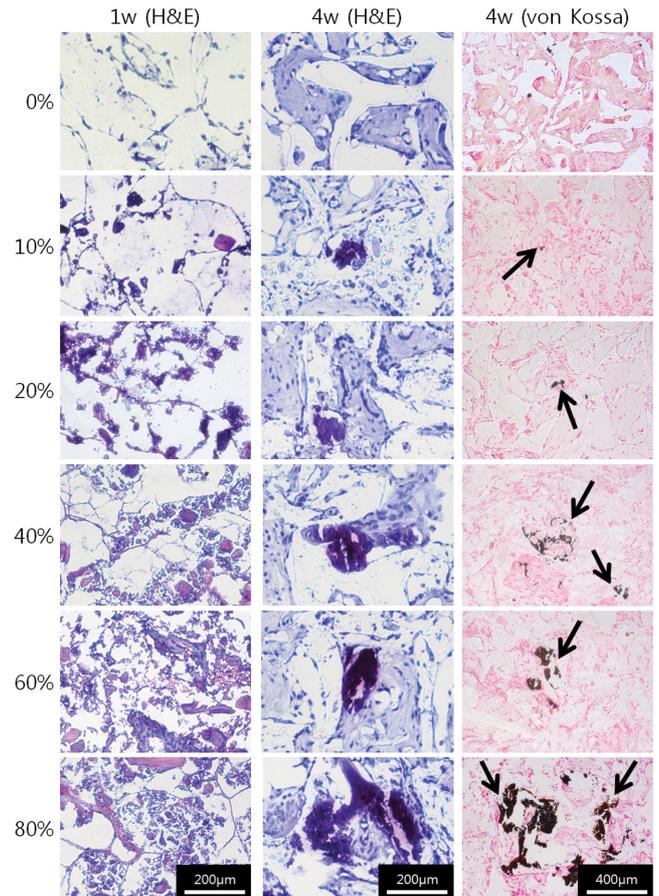


Figure 5. Histochemistry evaluation in DC/PLGA scaffolds. H&E staining after 1 and 4 weeks of implantation and von Kossa staining after 4 weeks of implantation (black arrow: New bone) at various contents of collagen with BMSC in *in vivo*.

생에 적용할 수 있는 가능성을 알아보려고 하였다.

일련의 과정을 통해 얻어진 DC는 하나의 β 밴드와 두 개의 α 밴드로 구성되어 있는데, 이는 골 ECM의 90%를 차지하는 제 1형 콜라겐에 유사하였다. 그러나 DC를 조직공학으로 골 재생에 적용하기에는 물리적 특성이 약하여 생체적합성이 떨어질 뿐만 아니라 생분해도를 조절할 수 있으며 기본적인 물리적 강도를 지닌 폴리락타이드글리콜라이드 공중합체(poly(lactide-co-glycolide); PLGA)와 혼합하여 삼차원 다공성 DC/PLGA 지지체를 제조하였다.

본 연구에서 제작된 DC/PLGA 지지체에 BMSC를 파종한 뒤, *in vitro* 환경에서 MTT와 ALP 활성도를 측정한 결과, 세포의 생존율 및 골분화 활성도가 DC의 함량이 증가함에 따라 BMSC의 초기 부착과 증식 그리고 골분화가 활발함을 확인하였다.

이러한 골분화의 결과로 BMSC를 배양한 뒤의 압축강도가 배양 전보다 배양 후에 모든 군에서 전체적으로 증가하였다. 그러나 DC의 함량이 높을수록 압축강도가 낮게 측정된 배양

전과는 다르게 BMSC 배양 후에 DC의 함량이 높을수록 압축강도가 높게 측정되었는데, 이는 배양 후 압축강도를 증가시키는 기본적인 요인인 세포의 증식 및 ECM의 형성보다는 BMSC의 골분화에 의한 미네랄 침착에서 기인한 것으로 사료된다.

또한 *in vivo* 조직화학적 염색의 분석에서도 앞의 *in vitro* 결과와 유사하게 DC의 함량이 증가함에 따라 세포질 형성이 활발히 일어났으며 무기질 침착 및 석회화된 부분이 넓은 영역에 걸쳐서 분포하고 있음을 알 수 있었다. 이로써 DC/PLGA 지지체를 생체 내 적용 시, DC가 골분화에 있어 긍정적인 영향을 미쳤음을 확인하였다.

감사의 글: 이 논문은 한국연구재단 BK21플러스사업, 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020), 생명산업기술개발사업(112007-05-3-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. P. Lee, R. Lin, J. Moon, and L. P. Lee, *Biomed. Microdevices*, **8**, 35 (2006).
2. J. Brinckmann, *Top. Curr. Chem.*, **247**, 1 (2005).
3. A. Aszodi, K. R. Legate, I. Nakchbandi, and R. Fassler, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 591 (2006).
4. Y. Miyagi, L. L. Y. Chiu, M. Cimini, R. D. Weisel, M. Radisic, R. D. Weisel, M. Radisic, and R. K. Li, *Biomaterials*, **32**, 1280 (2011).
5. F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P. H. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. J. Hilbers, and G. N. A. J. M. Sommerdijk, *Nat. Mater.*, **9**, 1004 (2010).
6. K. A. Faraj, T. H. van Kuppevelt, and W. F. Daamen, *Tissue Eng.*, **13**, 2387 (2007).
7. A. Rudnick, *J. Wound Care*, **15**, 402 (2006).
8. P. D. Parkman, *Dev. Biol. Stand.*, **88**, 5 (1996).
9. F. Haraud, *Dev. Biol. Stand.*, **75**, 3 (1991).
10. P. Celis and G. Silvester, *Dev. Biol. Stand.*, **118**, 3 (2004).
11. S. Chen, N. Hirota, M. Okuda, M. Takeguchi, H. Kobayashi, N. Hanagataa, and T. Ikom, *Acta Biomater.*, **7**, 644 (2011).
12. R. Duan, J. Zhang, X. Du, X. Yao, and K. Konno, *Food Chem.*, **112**, 702 (2009).
13. J. W. Woo, S. J. Yu, S. M. Cho, Y. B. Lee, and S. B. Kim, *Food Hydrocolloid*, **22**, 879 (2008).
14. J. L. Arias-Moscoco, H. Soto-Valdez, M. Plascencia-Jatomea, Reyna-Luz Vidal-Quintanar, O. Rouzaud-Sndez, and J. M. Ezquerro-Brauer, *Polym. Int.*, **60**, 924 (2011).
15. S. Nishimoto, Y. Goto, H. Morishige, R. Shiraishi, M. Doi, K. Akiyama, and T. Sugahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2806 (2008).
16. K. Lee, H. Y. Park, Y. K. Kim, J. I. Park, and H. D. Yoon, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **52**, 221 (2009).
17. A. Saiga, K. Iwai, T. Hayakawa, Y. Takahata, S. Kitamura, T. Nishimura, and F. Morimatsu, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 9586 (2008).
18. F. Pati, B. Adhikari, and S. Dhara, *Bioresource Technol.*, **101**, 3737 (2010).
19. H. A. Ko, H. M. Kim, H. J. Ha, A. R. Kim, J. E. Jang, K. H. Kim, J. H. Lee, J. E. Song, H. Yoon, O. J. Lee, D. Lee, C. H. Park, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 103 (2012).
20. H. M. Kim, J. Y. Park, E. Y. Kim, J. E. Song, S. Y. Kwon, J. W. Chung, and G. Khang, *Polym. Korea*, **38**, 278 (2014).
21. H. Kim, H. M. Kim, J. E. Jang, C. M. Kim, E. Y. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Int J. Stem Cells*, **6**, 67 (2013).
22. K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, and C. Petibois, *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 829 (2009).
23. D. H. Han, H. J. Kang, J. J. An, H. K. Jo, H. R. Yoo, I. C. Seol, and Y. S. Kim, *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.*, **22**, 142 (2008).
24. S. Chen, N. Hirota, M. Okuda, M. Takeguchi, H. Kobayashi, N. Hanagataa, and T. Ikom, *Acta Biomater.*, **7**, 644 (2011).