

연골조직공학에서 Poly(lactic-Glycolic Acid)와 Chitosan 골격의 비교

이용직¹ · 정호윤¹ · 신동필² · 김종엽¹ · 양정덕¹ · 이동걸¹ · 박재우¹ · 조병채¹ · 백봉수³

경북대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 신동필 성형외과², 울산동강병원 성형외과³

The Comparative Study between PLGA and Chitosan Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering

Yong Jik Lee, M.D.¹, Ho Yun Chung, M.D.¹,
Dong Phil Shin, M.D.², Jong Yeop Kim, M.D.¹,
Jung Duk Yang, M.D.¹, Dong Gul Lee, M.D.¹,
Jae Woo Park, M.D.¹, Byung Chae Cho, M.D.¹,
Bong Soo Baik, M.D.³

¹Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea,

²Dr. Shin's Aesthetic Plastic Surgical Clinic, Daegu, Korea,

³Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Ulsan Dongkang Hospital, Ulsan, Korea

Clinical application of the cartilage formed by tissue engineering is of no practical use due to the failure of long-term structural integrity maintenance. One of the important factors for integrity maintenance is the biomaterial for a scaffold. The purpose of this study is to evaluate the difference between poly(lactic-co-glycolic acids (PLGA) and chitosan as scaffolds.

Human auricular chondrocytes were isolated, cultured, and seeded on the scaffolds, which were implanted in the back of nude mice. Eight animals were sacrificed at 4, 8, 12, 16, and 24 weeks after implantation respectively.

In gross examination and histological findings, the volume of chondrocyte-PLGA complexes was decreased rapidly. The volume of chondrocyte-chitosan complexes was well maintained with a slow decrease rate. The expression of type II collagen protein detected by immunohistochemistry and western blots became weaker with time in the chondrocyte-PLGA complexes. However, the expression in the chondrocyte-chitosan complexes was strong for the whole period. Collagen type II gene ex-

pressions using RT-PCR showed a similar pattern.

In conclusion, these results suggest that chitosan is a superior scaffold in cartilage tissue engineering in terms of structural integrity maintenance. It is expected that chitosan scaffold may become one of the most useful scaffolds for cartilage tissue engineering.

Key Words: PLGA, Chitosan, Scaffold, Cartilage tissue engineering

1. 서 론

여러 가지 원인으로 인한 조직결손의 재건은 현대의학의 발전과 함께 개발되어 왔으나 아직도 극복해야 할 많은 문제점들을 안고 있다. 연골은 실질조직에 혈관이 없는 독특한 조직으로서 손상을 받았을 때 재생이 잘 일어나지 않는다. 현재까지 시행된 연골결손의 재건법으로 동종 혹은 자가연골이식과 합성인공기구(synthetic prosthetic device)가 있으며, 그 중 자가조직을 이식하는 방법이 가장 이상적인 것으로 알려져 있다.¹ 그러나 자가연골이식은 공여부가 제한되어 있고, 이완률도 높으며, 원래의 크기나 복잡한 모양대로 만드는 것이 어렵고, 이식하는 연골과 원래의 연골의 특성이 서로 다른 점 등의 한계성을 가지고 있다.²

이런 제한점을 극복하기 위한 노력의 하나로 1980년대 후반부터 조직공학을 이용한 연골의 생성에 많은 연구가 있어 왔다.^{2,3} 일반적으로 조직공학의 3가지 중요한 요소는 세포의 생물학적 특성, 생체적합성 골격(biocompatible scaffold)의 선택, 체내 환경(*in vivo* environment)에서의 적용으로 알려져 있다. 연골을 이용한 조직공학의 응용에서는 현재까지 흡수와 변형에 대한 문제점으로 다른 장기와는 달리 현실적인 임상 적용이 어려운데 이는 3가지 요소 중 생체 적합성 골격의 선택에 대한 문제를 그 한 가지 이유로 생각하고 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.⁴

본 연구에서는 PLGA와 키토산을 골격물질로 사용하여 조직공학의 기법에 따라 배양된 인체의 이개 연골세포를 이 골격들에 이식하여 연골조직을 생성한 후 그 형태의 변화와 흡수의 관점에서 서로 비교하여 앞으로 임상적용에서 적절한 골격을 선택하는데 도움을 주고자 하였다.

Received April 25, 2005

Revised June 12, 2005

Address Correspondence: Ho Yun Chung, M.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Kyungpook National University Hospital, 50 Samduk 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea, Tel: (053) 420-5681 / Fax: (053) 425-3879 / E-mail: hy-chung@mail.knu.ac.kr

* 본 논문은 2004년도 경북대학교 연구비에 의하여 연구되었음.

* 본 논문은 2004년도 제 7차 한일성형외과학회에서 구연 발표되었음.

II. 재료 및 방법

가. 연골세포의 분리 및 배양

20세 이하의 정상인 귀에서 탄력 연골을 취하여 Klagsbrun 방법을 통해 연골세포를 분리배양하였다.^{5,6} 채취한 연골조직을 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin, Sigma, USA), 100 unit/ml 페니실린 G(penicillin G, Sigma, USA), 20 µg/ml 미코스타틴(mycostatin, Sigma, USA)이 포함된 인산염완충용액(phosphate buffered solution, pH 7.4)으로 수 차례 씻고, 섬유모세포(fibroblast)의 오염을 방지하기 위해 연골막을 완전히 제거하였다. 연골조직을 1-2 mm³ 크기로 썰어 37°C에서 0.2% II형 아교질 분해효소(type II collagenase, Gibco/BRL, USA)를 이용하여 완전히 용해시켰다. 이 용액을 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 침전시키고, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 unit/ml 페니실린 G, 4.5 g/l 포도당이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Media, Gibco/BRL, USA)에 소의 태아혈청(fetal calf serum, HyClone, USA)이 10%가 되도록 혼합된 배양액에 세포를 부유시킨 후 150 µm 체에 걸러 잔여물을 제거하고, 100 mm³ 배양접시에 담아 37°C, 5% CO₂ 환경에서 단층배양(monolayer culture)하였다. 배양액은 2-3일마다 갈아주었으며, 0.25% 트립신(trypsin, Gibco/BRL, USA)과 0.02% EDTA(ethylene diaminetetra-acetic acid Sigma, USA)를 이용하여 2회에 걸쳐 계대배양하였다. 골격에 심어주기 전에 알시안 블루(Alcian blue) 염색을 시행하여 배양된 세포들이 연골세포임을 확인하였다.

나. 고분자 골격 제작

10% PLGA(poly-lactic-glycolic acid 35%, poly-lactic acid 65%, molecular weight: 110,000 g/mol, Beoringer, Germany)를 디클로로메탄(dichloromethane)에 용해시킨 후 75-105 µm 입자 크기의 중탄산 암모늄(ammonium bicarbonate)을 5%가 되도록 섞어주었다. 혼합 후 건조되어 겔 상태가 되면 직경 7 mm, 두께 3 mm가 되는 원반형의 골격을 제작하였다. 골격 안에 남아있는 디클로로메탄을 후드 안에서 건조시켜 완전히 제거하였으며, 70°C의 증류수에서 중탄산 암모늄이 기포가 되어 빠져 나오게 하였다. 더 이상 기포가 빠져 나오지 않게 되면 골격을 상온의 증류수에 씻고 건조 후 10분간 음파처리(sonication)하였다. 골격의 표면 및 내부 구조는 주사형 전자현미경(scanning electron microscope)으로 관찰하였다.

키토산은 그 농도에 따른 차이를 보기 위해 2.5%와 5% 두 가지 농도로 제작하였는데, 제작하는 과정은 분자량이 340.3 g/mol(M), 탈아세틸(deacetylation) 정도가 75-85% 인 키토산(poly(1→4)-β-D-glucosamine, Sigma, USA)을 1

M 초산(acetic acid)용액 100 ml에 각각 2.5 g, 5 g을 넣어 실온에서 약 20시간 교반(stirring)시킨 후 1 M 수산화나트륨(sodium hydroxide)으로 중화시켰다. 중화된 키토산 용액을 겔상태로 PLGA와 동일한 크기로 만들기 위해 내부 직경 7 mm, 두께 3 mm인 원반형의 용기에 담아 -70°C로 얼린 후 동결건조기(freeze drier, Il-shin, Korea)에서 약 12시간 동결 건조시켜 원반 모양의 키토산 골격을 제작하였다.

다. 연골세포-골격 복합체(chondrocyte-scaffold complex) 형성

1×10⁸ cells/ml의 밀도로 세포 부유액을 만들어 각 골격 당 200 µl씩 골고루 주입하여 최종 세포 수가 골격 당 2×10⁷ cells가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO₂ 환경에서 4시간 동안 세포를 골격에 유착시킨 후 세포가 떨어지지 않도록 주의해서 배양액을 넣어 주었으며, 이러한 세포-골격 복합체를 일주일 동안 체외(in vitro)에서 배양한 후 실험동물에 이식하였다.

라. 실험동물 및 연골세포-골격 복합체의 이식

실험동물로는 총 40마리의 생후 5주된 수컷 털이 없는 실험용 쥐(Balb/c-nu, SLC, Japan)를 이용하였고 쥐의 배부 피하층에 2.5%, 5% 연골세포-키토산 복합체와 2개의 연골 세포-PLGA 복합체 등 모두 4개의 연골세포-골격 복합체를 이식하였다. 수술 후 창상감염을 예방하기 위하여 5일 동안 항생제 투여와 창상처치를 하였다.

마. 실험 평가

연골세포-골격 복합체 이식 후 4, 8, 12, 16, 24주째 각각 8마리씩 실험동물을 과량의 마취제로 안락사시킨 후 삽입한 연골세포-골격 복합체를 적출하여 비교 분석하였다.

1) 육안적 평가

채취한 연골세포-골격 복합체를 육안적으로 관찰한 후 세밀한 눈금자로 직경과 두께를 측정하여 남아 있는 복합체의 부피를 계산하고 비교 분석하였다. 측정하여 계산된 값들은 시간에 따른 각 복합체 간의 상호 비교로 분산분석법(ANOVA test)과 쉐페법(Scheffe's test)을 이용해 통계 처리하였다.

2) 조직학적 분석

연골의 생성된 정도와 그 성상을 확인하기 위해 광학 현미경으로 조직학적 검사를 시행하였다. 연골세포-골격 복합체를 싸고 있는 피막(fibrous capsule)을 포함한 조직을 한 덩어리로 취하여, 10% 완충 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매시킨 후 6 µm 두께로 연속 절단하여 헤마톡실

린-에오신(hematoxylin and eosin) 염색, 마손의 트리크롬(Masson's trichrome) 염색, 알시안 블루(alcian blue) 염색을 하여 관찰하였다.

생성된 연골의 기원을 알아보기 위해 인체의 연골에 특이적으로 반응하는 단세포군 아교질 II형 항체(monoclonal collagen type II antibody, Oncogene™ Research Products, USA)를 사용하여 면역 화학 검사를 시행하였다.

3) 단백질 분석

연골의 세포외 기질 중 연골 특이 단백질인 아교질 II형 단백질에 대한 분석으로 면역학적 블로팅(immunoblotting)중 하나인 웨스턴 블로팅(western blotting)을 시행하였다.⁷ 조직을 용해 완충액(lysis buffer solution, Invitrogen, USA)에 넣고 완충액에 담긴 조직을 균질분쇄기(homogenizer)로 갈아 분쇄시킨 후 4℃에서 약 30분간 교반시켜 완전히 용해시켰다. 용해액의 단백질 농도를 측정 한 뒤 동일한 양의 단백질을 부하완충액(loading buffer)에 녹이고 12% SDS 폴리아크릴아마이드겔(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel, Invitrogen, U.S.A.)에 부하시켜 분별시킨 후 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane, Amersham, Netherlands)에 전이(transfer)시켰다. 니트로셀룰로스 막을 1:1000 희석 농도의 항아교질 II형 항원(anti-Collagen typeII antigen, Santa cruz, USA) 용액에 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 항아교질 II형 항체(anti-collagen type II antibody, Santa cruz, USA)로 세척하였다. 그 후 1:5000 희석농도의 양고추냉이페록시다제(horseradish peroxidase)를 복합시킨 항토끼 IgG 항체(anti-rabbit IgG antibody, Sigma, USA)를 이차항체로 이용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 반응이 끝난 니트로셀룰로스 막을 ECL시스템(extended chemiluminescent system, Amersham, Netherland)으로 현상

하여 단백질 발현을 보았다.

4) mRNA 분석

아교질 2형 단백질의 유전자(COL2A1)에 대한 연골세포의 mRNA 발현 양상을 분석하기 위해 역전사 중합 효소 연쇄 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하였다.⁸ RT-PCR의 적합도를 측정하기 위해 GAPDH를 이용하였고, GAPDH 유전자 증폭을 위해서는 5'-GGGCTGCTTTAACTCTGGT-3'을 전방프라이머(forward primer)로 5'-TGGCAGGTTTTTCTAG ACGG-3'을 역방프라이머(reverse primer)로 이용하였고, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초의 순서를 35회 반복하여 증폭시킨 후 마지막으로 72℃에서 7분간 안정화하였다. COL2A1 유전자 증폭은 전방프라이머로 5'-CCAGG ACCAAAGGGCAGAAAG-3' 올리고뉴클레오타이드(oligo nucleotide)를 이용했고 역방프라이머로 5'-TT CACCAG GTTACCAGGATTG-3' 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분의 순서를 35회 반복하여 증폭시켰으며 72℃에서 7분간 안정화하였다.

III. 결 과

가. 이식 전 골격의 전자현미경적 소견

PLGA 골격에서 섬유간의 거리가 100 - 200 μm이었으며 다공성(porosity)은 95%였다(Fig. 1, Left). 키토산에서 섬유간의 거리는 50 - 100 μm이었으며 다공성은 85%로 PLGA 보다는 기공이 작고 더 밀집된 양상을 보여주었다. 그리고 2.5% 키토산보다 5% 키토산에서 다공성이 더 작아 80%를 나타내고 있었다. 섬유간의 거리는 2.5%와 5%에서 별다른 차이점이 없었다(Fig. 1, Center, right).

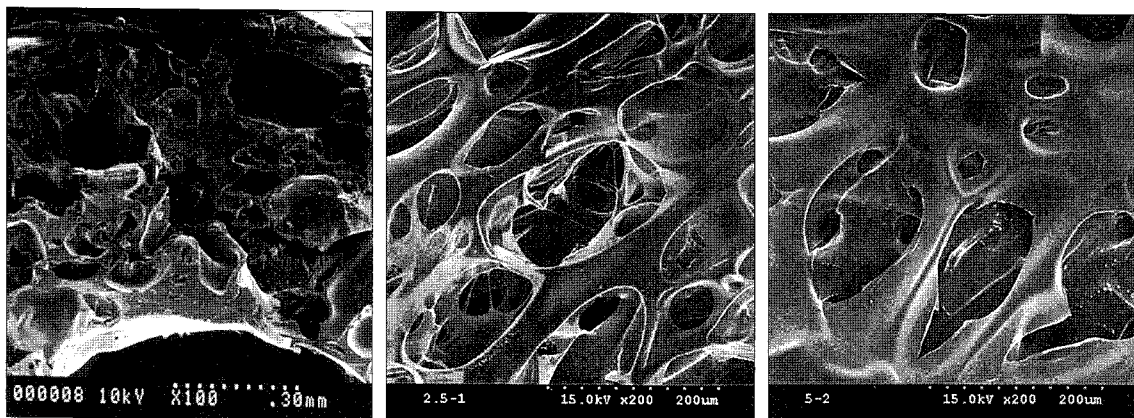


Fig. 1. Scanning electron microscopical finding of scaffolds. (Left) PLGA scaffold(× 100). (Center) 2.5% chitosan scaffold(× 200). (Right) 5% chitosan scaffold(× 200). PLGA scaffold has longer interfiber distance and higher porosity than 2.5% and 5% chitosan scaffolds.

나. 이식 후 육안적 평가

모든 실험동물들은 실험 기간 동안 감염이나 연골세포-골격 복합체의 노출 등 특별한 부작용은 없었다.

이식 후 4주에 PLGA를 골격으로 한 복합체에서 우윳빛의 연골 조직 형성이 동일 시기의 키토산을 골격으로 한 복합체보다 많았으나 복합체의 부피는 $109.3 \pm 7.1 \text{ mm}^3$ 로 5% 키토산의 $114.4 \pm 3.1 \text{ mm}^3$, 2.5% 키토산의 $111.5 \pm 2.3 \text{ mm}^3$ 와 통계학적으로 유의한 차이가 없었고 이식할 당시 부피인 115.4 mm^3 (Fig. 2, Above, left)와 비슷하였다. 이식 후 8주에 PLGA골격을 이용한 복합체에서 부피의 현저한 감소를 관찰할 수 있었는데 평균 $52.1 \pm 10.1 \text{ mm}^3$ 로 원래 원반형 부피인 115.4 mm^3 의 반 정도가 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 키토산을 골격으로 한 복합체는 이식 후 8주에 연골형성이 더 많아져 복합체에서 우윳빛 연골의 외관을 더 많이 관찰할 수 있었고 부피는 5% 키토산을 골격으로 한 복합체에서 평균 $112.7 \pm 7.1 \text{ mm}^3$, 2.5% 키토산을 골격으로 한 복합체에서 평균 $110.2 \pm 5.9 \text{ mm}^3$ 로 이식할 당시 원반형 부피인 115.4 mm^3 와 비슷하였다(Fig. 2, Above, right). 이식 후 12주에 PLGA를 골격으로 한 복합체는 부피가 약 86% 감소한 평균 $16.7 \pm 9.7 \text{ mm}^3$ 를 나타내었으나 이에 비해 5% 키토산은 골격으로 한 복합체는 평균 $107.1 \pm 5.3 \text{ mm}^3$, 2.5% 키토산을 골격으로 한 복합체는 평균 $101.7 \pm 8.1 \text{ mm}^3$ 로 원형의 부피가 비교적 잘 유지되고 있음을 보여주었다(Fig. 2, Below, left). PLGA를 골격으로 한 복합체에서 이식 후 16주에는 흡수가 일어나 거의 형태를 소실한 증례가 많았으며 이식 후 24주에는 형태가 남아 있는 복합체는 8마리 중 2마리에서만 관찰되었으며 그 부피도 아주 작아 평균 $3.1 \pm 1.3 \text{ mm}^3$ 로 거의 흡수가 다된 소견을 보였다. 이식 16주 후 2.5% 키토산을 골격으로 한 복합체의 부피는 $84.5 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ 로 5% 키토산을 골격으로 한 복합체의 $99.4 \pm 7.1 \text{ mm}^3$ 에 비해 흡수가 더 일어나는 양상을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이식 24주 후 키토산을 골격으로 한 복합체의 연골형성이 더 많이 된 것을 육안적으로 알 수는 있었으나 아직 키토산이 완전하게 생분해되지 않고 남아 있는 것을 관찰할 수 있었고 그 부피의 감소도 2.5% 키토산에서는 $60.3 \pm 10.1 \text{ mm}^3$, 5% 키토산에서는 $89.1 \pm 8.5 \text{ mm}^3$ 로 2.5% 키토산군에서 5% 키토산군보다 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 2, Below, right, Fig. 3).

다. 조직학적 평가

이식 후 4주에 PLGA를 골격으로 이용한 복합체에서 정상 연골조직과 매우 흡사한 소견을 볼 수 있었는데 점액성의 세포외 기질(myxoid extracellular matrix)에 연골세포가 산재해 있는 연골조직의 구조를 관찰할 수 있었다. 그

리고 분해되지 않는 PLGA섬유들이 있었으며 섬유들 주위로 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte)와 거대세포(giant cell)를 관찰할 수 있어 염증반응이 있음을 보여주

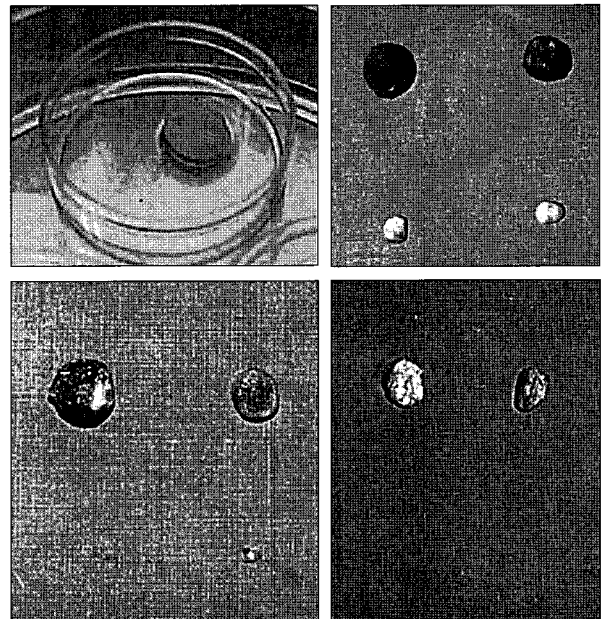


Fig. 2. Volume changes of the different chondrocyte-scaffold complexes. (Above, left) Pregraft state of the chondrocyte-scaffold complex. (Above, right) eight weeks after implantation. (Below, left) Twelve weeks after implantation. (Below, right) Twenty-four weeks after implantation. Upper left complex on the upper right and both lower pictures is a chondrocyte chitosan complex with 5% chitosan. Upper right complex is a chondrocyte-chitosan complex with 2.5% chitosan. Both lower complexes are the chondrocyte-PLGA complexes. Most of the chondrocyte-PLGA complexes on lower pictures were absorbed.

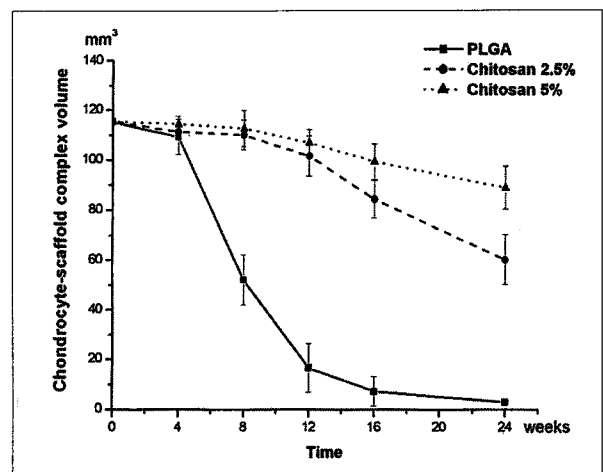


Fig. 3. Changes of chondrocyte-scaffold complex volume following the period of implantation. The volume decrease rate in chondrocyte-PLGA complexes is rapid than in chondrocyte-chitosan complexes.

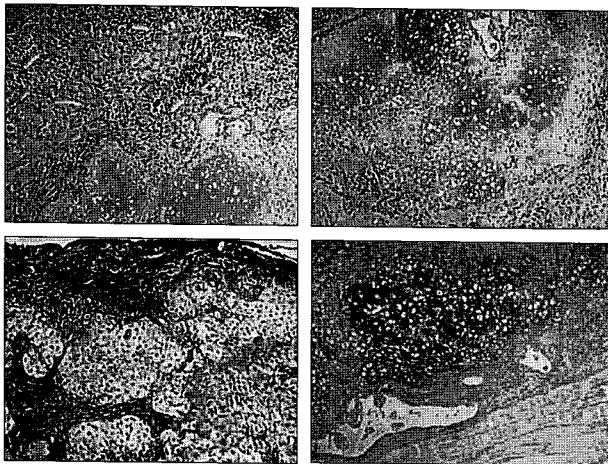


Fig. 4. Histological findings of chondrocyte-PLGA complexes. (Above, left) Four weeks after implantation (H&E, $\times 100$). (Above, right) Eight weeks after implantation (H&E, $\times 100$). (Below, left) Eight weeks after implantation (Masson's trichrome stain, $\times 100$). (Below, right) Four weeks after implantation (alcian blue stain, $\times 100$). The mature cartilage tissues with abundant extracellular matrix are found on four and eight weeks after implantation.

었다(Fig. 4, Above, left). 이식 후 8주에는 4주보다 세포간 거리가 더욱 증가되고 세포의 밀도도 감소되는 소견을 보였고 열공(lacuna)의 존재를 확인할 수 있었다(Fig. 4, Above, right). 이식 16주 이후에는 골격이 거의 흡수되고 형태 유지가 되지 않아 조직학적 관찰이 어려웠다. 트리크롬 염색상 4주와 8주에 풍부하게 생성된 아교질 섬유들이 잘 관찰되었고 점액성의 세포의 기질의 한 단백질인 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)을 염색하는데 이용하는 알시안블루 염색에서 4주와 8주에 양성 반응을 보임으로써 실험 초반기인 4주와 8주에 연골 세포가 세포의 기질의 주성분인 아교질과 글리코사미노글리칸을 합성해 내면서 연골구조를 잘 형성함을 확인시켜준다 하겠다(Fig. 4, Below, left and right). 이식 후 12주에도 8주와 비슷한 양상을 보이고 있었으나 전반적으로 연골조직의 양의 감소를 볼 수 있었으며 이식 16주 이후에는 거의 흡수되어 조직학적 관찰이 어려웠다.

키토산을 이용한 복합체에서는 이식 후 4주에 성숙된 연골조직의 형성을 조직학적으로 관찰할 수는 없었으며 원형의 연골세포가 관찰은 되었지만 아직도 세포의 기질을 만들지 못하고 있었다. 키토산의 망상 구조 주변에 여러 다형핵백혈구와 거대세포들의 침윤이 관찰되어 키토산에 의한 심한 염증반응의 소견을 나타내고 있었다. 이식 8주 후 일부에서 연골구조를 관찰할 수 있었으나 성숙된 연골구조를 보이고 있지는 않았다(Fig. 5, Above, left). 이식 12주와 16주 후에 키토산의 분해가 일어나면서 성숙된 연골

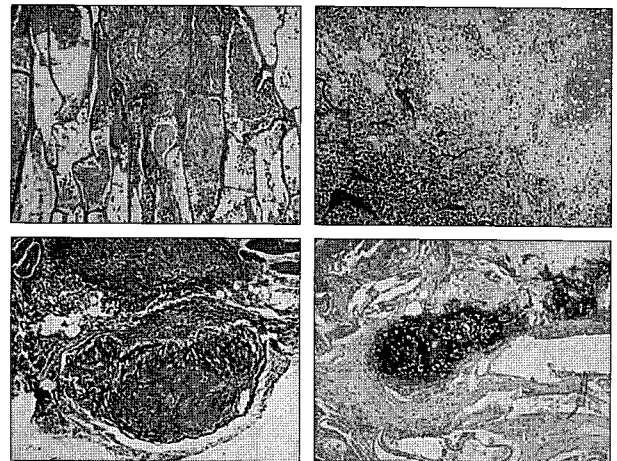


Fig. 5. Histological findings of chondrocyte-chitosan complexes. (Above, left) Eight weeks after implantation of the chondrocyte-chitosan complex using 5% chitosan (H&E, $\times 100$). The cartilage tissues can be found between chitosan fibers. (Above, right) Sixteen weeks after implantation of the chondrocyte-chitosan complex using 5% chitosan(H&E, $\times 100$). (Below, left) Sixteen weeks after implantation of the chondrocyte-chitosan complex using 2.5% chitosan(Masson's trichrome stain, $\times 40$). (Below, right) Sixteen weeks after implantation of the chondrocyte-chitosan complex using 5% chitosan (alcian blue stain, $\times 40$). Mature cartilage tissues are formed with time.

구조로 대체되는 조직소견을 볼 수 있었으며(Fig. 5, Above, right) 트리크롬 염색과 알시안블루 염색에 양성 반응이 시간이 경과하면서 점점 강하게 나타나는데 이는 시간이 경과함에 따라 연골세포들이 세포의 기질을 형성하고 연골구조를 형성하는 것을 보여준다고 하겠다(Fig. 5, Below, left and right). 그러나 24주 후에도 분해되지 않은 키토산 구조물을 관찰할 수 있었고 비록 이전보다는 감소하였지만 염증세포의 침윤이 주위에 있어 염증반응이 지속되고 있음을 관찰할 수 있었다. 조직소견상 2.5%와 5%의 농도 차이에 따라 연골구조를 형성하는데 차이는 없었다.

아교질 II형 항체를 이용한 면역조직화학적 검사에서 PLGA를 골격으로 이용한 복합체에서 이식 후 4주, 8주(Fig. 6, Left), 12주에 전반적인 강한 양성 반응으로 풍부하게 아교질 II형 단백질이 생성됨을 관찰할 수 있었다. 키토산을 골격으로 이용한 복합체에서는 4주와 8주(Fig. 6, Right)에 부분적인 양성반응이 있었고 시간이 지남에 따라 증가된 양성반응을 관찰할 수 있었다.

라. 단백질 분석

아교질 II형 단백질을 검출하기 위한 웨스턴 블롯트 검사에서 PLGA를 골격으로 이용한 연골세포-골격 복합체는 이식 후 4주부터 아교질 II형 단백질의 발현이 나타나고 8주에서 가장 강한 발현을 보인 후 차차 감소되는 현상을

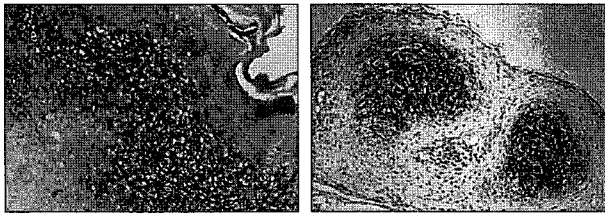


Fig. 6. Immunohistochemical findings of chondrocyte-scaffold complexes using type II collagen antibody. (Left) Chondrocyte-PLGA complex four weeks after implantation (x100). (Right) Chondrocyte-chitosan complex using 2.5% chitosan eight weeks after implantation (x40). Cells within the scaffolds have synthesized type II collagen.

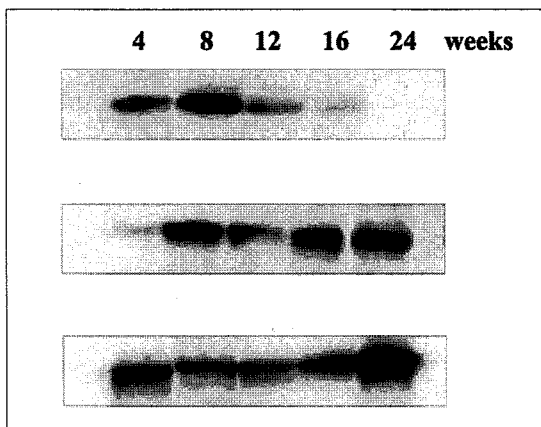


Fig. 7. The expression pattern of collagen type II protein using western blots. (Above) Chondrocyte-PLGA complexes. The expression of type II collagen becomes weaker with time. (Center) Chondrocyte-chitosan complexes using 2.5% chitosan scaffold. (Below) Chondrocyte-chitosan complexes using 5% chitosan scaffold. The expression of type II collagen is strong for whole experimental period.

보여주고 있었다(Fig. 7, Above). 2.5% 키토산을 골격으로 이용한 연골세포-골격 복합체는 이식 후 4주에는 아교질 II형 단백질의 발현을 보이기에는 하나 발현 정도가 아주 약하며 8주부터는 강하게 발현되고 그 후 12주, 16주, 24주를 지나면서 강한 발현을 유지하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7, Center). 5% 키토산을 이용한 연골세포-골격 복합체는 이식 후 4주째부터 아교질 II형 단백질의 비교적 강한 발현을 보이며 계속적으로 강한 발현 정도를 16주에 걸쳐 유지하였고 24주에 가장 강한 발현을 보였다(Fig. 7, Below).

마. mRNA 분석

아교질 II형 유전자에 대한 연골세포의 mRNA 발현양상을 관찰한 결과 PLGA를 골격으로 이용한 연골세포-골격 복합체는 이식 후 4주와 8주에 강한 발현을 보였으며

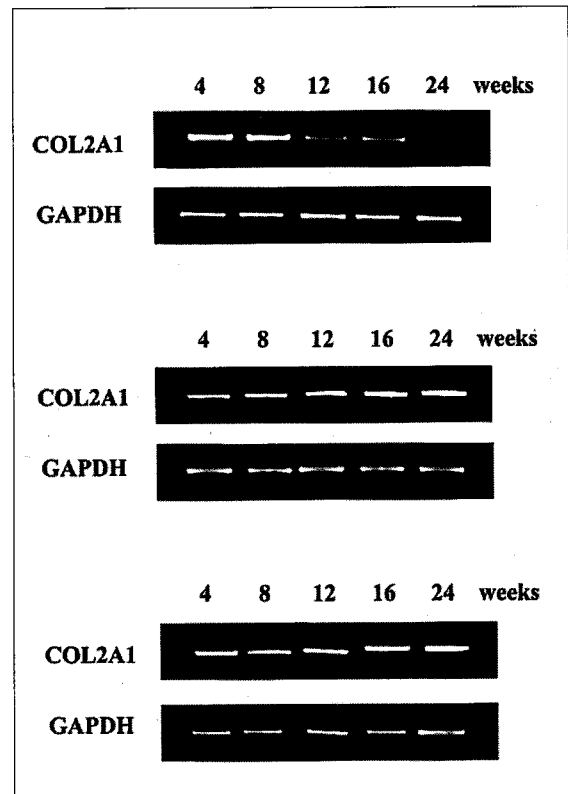


Fig. 8. The expression pattern of collagen type II gene mRNA using RT-PCR. (Above) Chondrocyte-PLGA complexes. The expression of COL2A1 becomes weaker with time. (Center) Chondrocyte-chitosan complexes using 2.5% chitosan scaffold. (Below) Chondrocyte-chitosan complexes using 5% chitosan scaffold. The expression of COL2A1 is strong for whole experimental period. COL2A1: collagen type II gene. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

시간이 감에 따라 점점 감소하는 양상을 보였다. 이에 비해 2.5%와 5% 키토산을 골격으로 이용한 연골세포-골격 복합체에서는 아교질 2형 유전자에 대한 연골세포의 mRNA 발현이 이식 후 4주부터 전 실험 기간에 걸쳐 잘 되고 있었으며, 농도 차이에 따른 두 실험군 간에 발현의 차이는 보이지 않았고 시간이 경과함에 따라 그 발현 정도가 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

IV. 고 찰

조직공학을 이용한 조직재생과 재건은 작은 양의 자가 조직으로부터 세포를 얻어 배양과정을 거쳐 생체 적합성 골격을 이용해 원하는 조직과 장기를 만들어냄으로써 그동안 공여 조직의 부족으로 자가조직을 이용하지 못하였던 많은 재건 분야에 새로운 장을 열었다. 특히 연골은 1988년 처음으로 조직공학 방법을 이용한 유리연골의 재

생이 발표되고⁹ 조직공학의 발전초기부터 많은 연구와 좋은 결과들이 보고되었다.^{3,6} 그러나 아직 실제 임상적 적용이 이루어지지 못하고 있는데 그 이유는 이식 초기에 생성된 연골구조를 계속 유지하지 못하는 것이 가장 큰 이유라고 알려지고 있다.²⁴ 임상적용에 가깝게 접근하는 방법으로 조직공학기법에 중요한 요소인 조직 재생용 생체물질에 대한 비교분석을 통해 최적의 생체물질을 확보하려는 노력들이 기울어져 왔다. 현재까지 연골재생을 위해 사용된 골격으로는 섬유 한 가닥의 지름이 15 μm 인 폴리글리콜산 중합체(polyglycolic acid polymer, PGA)가 많이 사용되었으며 연골형성을 위한 적절한 골격으로 알려져 왔다.⁵ 그 외 폴리락틱산(poly-lactic acid, PLA)이 이용되어지고 있으며, 폴리글리콜산과 폴리락틱산을 합친 PLGA가 Cao 등¹⁰에 의해 연골 형성에 골격으로 이용된 이후 많이 사용되고 있는 합성고분자물질이다.¹¹ 이러한 물질들은 천연물에서 추출된 것이 아닌 합성된 고분자 중합체로 생체 내에서 분해되는 특성을 가진 물질들이다. PGA는 PLA보다는 친수성(hydrophilicity)이 강해 분해되는 과정인 가수 분해 과정이 쉽게 일어나 4주에 약 99%가 분해될 정도로 분해 속도가 빠르다. 그러나 강한 친수성은 세포의 유착과 증식에 유리한 조건으로 인해 분해될 때까지 연골의 기질을 만들 수 있는 골격으로는 유용하다고 생각된다. 이에 비해 PLA는 소수성(hydrophobicity)이 강해 물의 침투가 느려 가수 분해 속도가 늦고 이에 따라 그 구조를 유지하는 데는 장점이 있으나 소수성으로 인한 세포의 유착의 어려움이 단점으로 지적되고 있다. PLGA는 두 가지 장단점을 보완해 주는 골격으로 실제 조직재생을 위한 조직공학에 가장 많이 이용되고 있는 합성 분해성 고분자 물질인데 보통 PGA와 PLA를 30:70에서 50:50 정도로 목적에 맞게 섞어 사용한다. 본 실험에서는 가장 널리 쓰이는 약 35:65 정도의 비율의 배합을 사용하였는데 완전 분해가 될 때까지 약 2-3개월의 시간이 걸리는 것으로 보고되고 있다.

한편, 천연물에서 추출된 여러 가지 고분자 생체물질들이 더 좋은 생체적합성과 높은 세포접착성 등의 이유로 연골조직공학의 골격으로 연구되고 있다.⁴ 이러한 천연 고분자 물질 중 키토산은 갑각류의 껍질, 곤충류, 연체동물, 곰팡이, 효모, 버섯 등 지구상에서 풍부하게 존재하는 키틴(chitin)을 탈아세틸화(deacetylation)시켜 얻어지는 물질로 여러 목적으로 사용되어져 오고 있다. 특히 Hoffmeister 등에 의해 키토산의 창상치유 효과가 알려진 후 여러 실험적, 임상적 보고가 있으며 아직 그 정확한 기전은 규명되지 않았지만 항미생물성, 생체적합성, 삼출물의 흡수성 등의 성질을 가지는 좋은 창상치유제로 현재까지 많은 연구들이 이루어졌다.¹² 키토산의 조직공학에의 응용이 아직은 활발하지는 않지만 뛰어난 생체적합성, 생체 내에서 흡수

성, 올리고당류(oligosaccharides)로 효소분해가 되는 점, 체내에서 아교질과 GAG와 같은 결합조직과 함께 비용해성 복합체를 형성할 수 있는 성질 등으로 응용의 가능성이 높은 물질이다. 특히, 기계적 강도가 키토산의 농도 등에 의해 조절이 가능하고 합성 고분자 물질만큼의 강도를 얻을 수 있는 장점이 있어 높은 이용가치가 있다.

조직공학에 있어 세포-세포외기질간의 상호작용과 세포-고분자 중합체간의 상호작용의 분야는 아직도 규명해야 할 많은 부분들을 남겨놓고 있지만 본 연구와 같은 체내 실험에서는 그 결과의 해석에 이러한 개념을 적용하는 것이 필요하다. 물론 골격으로 이용된 생체 물질의 고유한 특성이 그 결과에 많은 영향을 주지만 골격이 생체 내에서 세포와 주위 환경에 어떠한 상호작용을 하는가가 결과의 규명에 반드시 고려되어야 한다. PLGA의 경우 체내에서의 세포와의 상호작용이나 그 세포가 만들어 내는 세포외기질과의 상호작용에 대한 구체적인 연구보고는 없었으나 체외에서는 PLGA에 연골세포를 유착시켜 배양한 경우 3차원적 구조에서 둥근 모양의 연골세포가 증식하면서 그 형질을 잘 유지하고 또한 세포외기질을 잘 형성하며 그 세포외기질과 세포막의 리간드(ligand) 간의 신호전달을 통해 연골세포가 지속적인 성숙의 방향으로 분화 증식하는 보고들이 있었다.^{12,13} 그러나 본 결과는 그러한 성숙된 구조를 유지하지 못하고 있는데, 그 원인을 체내 환경의 관점에서 살펴보면 체내에서 PLGA가 이물질로 많은 염증반응을 동반하게 된다. 즉 PLGA가 가수분해 과정을 통해 분해되면서 만들어진 산물이 산성물질로서 낮은 pH환경을 만들고 이에 따른 연골세포 침윤의 저해, 세포외기질의 분해와 함께 동반되었던 염증반응이 심화되어 연골조직의 흡수가 가속화되는 것으로 생각되어지며, 체외에서 산성화가 배양액으로 인해 중화되고 염증반응이 없는 환경인 것과는 반대의 결과로 나타나는 이유로 해석되어진다. 키토산의 경우는 그 분해 과정이 라이소자임(lysozyme)에 의한 탈중합반응(depolymerization)으로 PLGA와는 다르고, 다양이온성(polycationic)이지만 다른 다양이온성 물질이 세포독성이 있는 것과는 달리 체내에서 아미노기가 해리되어 세포독성이 낮아, 연골세포의 생존, 형질과 기능의 유지, 세포외기질 형성과 연골구조 유지 등의 측면에서 PLGA보다는 좋은 결과를 보인 것으로 생각된다.

본 실험의 육안적, 조직학적 조건에서 보듯이 연골형성이 키토산을 이용한 복합체에서 PLGA를 이용한 복합체보다 이식 초기에 저하된 양상을 보이고 있는데 이는 다공성의 차이에서 오는 결과로 해석할 수 있다. 두 물질이 모두 친수성의 성질을 가지고 있으며 세포의 유착이라는 측면에서는 모두 우수한 유착과 이에 따른 증식, 분화능력이 있어 별다른 차이가 없는 것으로 보인다. 본 연구에서 이

용된 PLGA는 95% 이상의 다공성을 가짐으로 이식 초기의 연골 형성에 있어서는 키토산과 현저한 차이를 나타낸다. 다공성은 조직공학에 이용되는 생체 물질의 중요한 요소로 다공성이 확보되어야만 이를 통해 세포들의 이동과 증식이 잘 되고 충분한 세포외기질을 만들 수 있는 공간을 가질 수 있다. 일반적으로 세포의 크기를 10 μm 로 가정하면 평균적으로 섬유간 거리는 67 μm 가 되어야 세포가 잘 이동 증식할 수 있다고 보고되고 있고, 세포가 생체물질에 끌고루 퍼지고 여러 가지 혈장물질들을 잘 공급받기 위해서는 95% 이상의 다공성이 요구되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 키토산의 섬유간 거리가 50-100 μm 로 섬유간거리가 100-200 μm 인 PLGA보다 좁고 다공성도 2.5% 키토산이 85%, 5% 키토산은 80%로 95%인 PLGA보다 작아 초반기에 연골의 형성이 잘 이루어지지 않았던 원인으로 생각된다.

키토산이 생체 내에서 완전한 분해가 되는 정확한 시간에 대해서는 확실하지 않으며, Tomihata 등¹⁴은 84% 탈아세틸화된 키토산 필름을 체외에서 라이소자임 용액에 두어도 50시간 후 10%정도 밖에 분해되지 않는 것을 관찰하였고 쥐의 피하에 삽입한 후 12주 후에도 처음 무게의 80%가 유지되고 있다고 보고하였다. 본 연구에서 이식 후 12주에 2.5% 키토산을 이용한 복합체는 약 88%, 5% 키토산을 이용한 복합체는 약 93%의 부피가 유지되는 것을 볼 때 상당량의 키토산이 분해되지 않고 남아 있는 것을 알 수 있었는데, 이는 그 분해 속도가 아주 느린 것으로 구조의 유지라는 측면에서 큰 장점으로 사료된다. 이러한 장점이 있는 반면 원하는 조직의 재생이라는 관점에서는 이물질에 대한 지속적인 염증반응과 섬유화 등을 초래할 수도 있어 고려되어야 할 부분으로 생각된다.

V. 결 론

PLGA와 키토산을 골격으로 이용한 본 연구를 통해 연골 조직공학에서 연골조직의 형성과 유지, 그에 동반되는 연골세포의 형질 유지와 세포외기질의 형성 등을 비교 분석한 결과, 키토산을 이용한 연골세포-골격 복합체가 PLGA를 이용한 연골세포-골격 복합체보다 연골조직의 형성은 다소 늦었으나 연골조직의 형태유지와 세포외기질의 형성에서 보다 우수한 성적을 보여주었다. 추후 이러한 생체 재료에 대한 정확한 특성 규명과 단점을 보완하기 위한 노

력으로 임상 적용에 좋은 결과가 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Zalzal GH, Cotton RT, McAdams AJ: Cartilage grafts-present status. *Head Neck Surg* 8: 363, 1986
- Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavery RD, Vacanti CA: Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 103: 1111, 1999
- Chalain TD, Philips JH, Hinek A: Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and κ -elastin. *J Biomed Mater Res* 44: 280, 1999
- Risbud MV, Sittinger M: Tissue engineering: advances in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol* 20: 351, 2002
- Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP: Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 88: 753, 1991
- Kim WS, Vacanti JP, Cima L, Mooney D, Upton J, Puelacher WC, Vacanti CA: Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast Reconstr Surg* 94: 233, 1994
- Bahrami S, Stratmann U, Wiesmann HP, Mokrys K, Bruckner P, Szuwart T: Periosteally derived osteoblast-like cells differentiate into chondrocytes in suspension culture in agarose. *Anat Rec* 259: 124, 2000
- Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH: Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res* 64A: 273, 2003
- Vacanti JP: Beyond transplantation. *Arch Surg* 123: 545, 1988
- Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA: Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 100: 297, 1997
- Saadeh PB, Brent B, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Ting V, Gittes GK, Longaker MT: Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. *Ann Plast Surg* 42: 509, 1999
- Dessau W, Sasse J, Timpl R, Jilek F, von der Mark K: Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. *J Cell Biol* 79: 342, 1978
- Glowacki J, Trepman E, Folkman J: Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 93, 1983
- Tomihata K, Ikada Y: *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 18: 567, 1997