

I형 콜라겐지지체의 다양한 가교처리 방법이 연골막성 연골재생에 미치는 영향

손대구¹ · 임중재² · 손경희¹ · 양은경³

계명대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 듀오 성형외과², 바이오랜드³

The Effect of Various Methods of Cross-linking in Type I Collagen Scaffold on Cartilage Regeneration

Dae Gu Son, M.D.¹, Joong Jae Lim, M.D.²,
Kyounghee Sohn, M.D.¹, Eun Kyung Yang, Ph.D.³

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University, Dongsan Medical Center, Daegu, Korea,

²Duo Plastic Surgery Clinic, Daegu, Korea, ³Bioland, Chonan, Korea

Purpose: Collagen is the principal structural biomolecule in cartilage extracellular matrix, which makes it a logical target for cartilage engineering. In this study, porous type I collagen scaffolds were cross-linked using dehydrothermal(DHT) treatment and/or 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide(EDC), in the presence and absence of chondroitin-6-sulfate(CS) for cartilage regeneration.

Methods: Cartilage defects were created in the proximal part of the ear of New Zealand rabbits. Four types of scaffolds(n=4) were inserted. The types included DHT cross-linked(Group 1), DHT and EDC cross-linked(Group 2), CS added DHT cross-linked(Group 3), and CS added DHT and EDC cross-linked(Group 4). Histomorphometric analysis and cartilage-specific gene expression of the reconstructed tissues were evaluated respectively 4, 8, and 12 weeks after implantation.

Results: The largest quantity of regenerated cartilage was found in DHT cross-linked groups 1 and 3 in the 8th week and then decreased in the 12th week, while calcification increased. Calcification was observed from the 8th week and the area increased in the 12th week. Group 4 was treated with EDC cross-linking and CS, and the matrix did not degrade in the 12th week. Cartilage-specific type II collagen mRNA expression increased with time in all groups.

Received April 27, 2006

Revised June 29, 2006

Address Correspondence: Dae Gu Son, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University, Dongsan Medical Center, 194 Dongsan-dong, Daegu 700-712, Korea. Tel: 053) 250-7636 / Fax: 053) 255-0632 / E-mail: handson@dsmc.or.kr

* 본 연구는 2003년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

Conclusion: CS did not increase chondrogenesis in all groups. EDC cross-linking may prevent chondrocyte infiltration from the perichondrium into the collagen scaffold.

Key Words: Collagen type I, Ear cartilages, Chondroitin sulfates

I. 서 론

연골은 연골세포(chondrocyte)와 이들을 둘러싸고 있는 바탕질(matrix)로 구성되어 있다. 바탕질은 80%의 물과 13%의 콜라겐 원섬유그물(collagen fibrillar network), 그리고 7%의 단백질로 구성되어있는데, 단백질은 하이알루론산염(hyaluronic acid)에 콘드로이틴황산염(chondroitin sulfate)과 케라틴황산염(keratan sulfate)과 같은 glycosaminoglycan(GAG)이 결합단백(link protein)에 의해 결합되어 있는 구조이다.¹ 성인의 연골은 성장하지 않고 타고난 재생능력도 떨어져 있어서 손상을 받으면 미분화된 섬유조직으로 대체되어 버리기 때문에, 결과적으로 연골의 독특한 형태와 기능을 잃어버리게 된다. 이러한 이유로 연골결손이 발생하거나 연골이 마모되었을 때, 연골을 다시 재생시키고자 하는 노력이 계속되고 있다.

연골조직공학에 이용되는 지지체는 천연과 합성고분자 물질로 나눌 수 있다. 합성고분자 물질로는 PLA, PGA,² PLGA³이 연골을 재생하는 지지체로 사용되었는데, 분해 속도를 조절할 수 있다는 장점이 있는 반면에, 세포의 부착이 어려워 많은 양의 세포가 필요하다는 결정적인 단점을 가지고 있다.⁴ 반면 천연고분자 지지체로 이용되는 콜라겐은 항원성이 적고 생분해되며, 세포와의 친화력이 뛰어나고 연골의 세포외기질의 대부분을 구성하고 있는 구조 물질이기 때문에, 연골조직재생을 위한 지지체로 가장 적절하다고 할 수 있다.⁵ 콜라겐지지체는 동물의 피부나 견에서 추출한 type I collagen으로 만드는데 화학적인 방법으로 콜라겐을 가교(crosslinking)처리하거나, 콜라겐에 GAG를 부착하여 지지체를 더욱 안정화시킴으로써 연골 세포의 부착과 표현형(phenotype)을 유지하고자 하는 노력들이 있어왔다.⁶

이혁구 등⁷의 동물실험에서 콜라겐지지체를 직경 3, 6, 9

mm의 토끼 귀 연골결손부에 이식하였을 때, 4주부터 연골이 변연부에서만 생성되었고, 3 mm의 결손에서도 연골로 완전히 채워지지 않았다. 본 연구의 목적은 이혁구 등⁷이 사용한 동일한 atelo-collagen을 원료로 제작한 다공성의 콜라겐지지체에 chondroitin-sulfate(CS)를 부착하고 이를 토끼 귀의 근위부 즉, 연골이 비교적 두꺼운 곳에 연골막이 남아있는 연골결손부에 이식하고, 12주까지 관찰기간을 연장하여 CS 부착 유무와 물리적(dehydrothermal) 혹은 화학적(chemical) 가교(crosslinking) 처리방법이 연골재생에 어떠한 영향을 미치는지를 조직학적 관찰 및 분자생물학적 방법으로 비교 분석하는 것이다.

II. 재료 및 방법

가. I형 콜라겐지지체의 제작

1) Chondroitin-6-sulphate와 결합한 콜라겐지지체의 제조

이혁구 등⁷이 기술한 방법으로 atelo-collagen 용액을 추출하고 정제하였다. 정제된 0.5% atelo-collagen을 원료로 하여 여기에 콜라겐 건조중량의 10%에 해당하는 양의 1% chondroitin-6-sulphate를 첨가한 다음, 4°C에서 5분간 1500 rpm으로 교반하여 사각접시에 붓고 -80°C의 저온냉동고에서 12시간 이상 동결시킨 후에 동결건조기를 이용해 48시간 이상 건조시켰다.

2) 콜라겐지지체의 물리적 및 화학적가교

동결 건조된 콜라겐지지체를 병에 넣어서 진공오븐에서 0.3 mmHg 이하의 진공으로 110°C에서 72시간 동안 dehydrothermal(DHT) 처리하여 물리적 가교공정을 실시하였다. 화학적 가교를 추가하는 경우에는 DHT 처리가 끝난 절편을 실온에서 pH 5.5인 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC) 용액에 4시간동안 넣어 가교 처리를 한 다음, pH 9.1인 0.1 M Na₂HPO₄용액으로 1시간동안 충분히 씻은 후 정제수로 습윤시켰다. 이후에 다시 한번 -80°C의 저온냉동고에서 12시간 이상 동결시킨 후에 동결건조기를 이용해 48시간 이상 건조시켰다. 제조된 콜라겐지지체를 직경 6 mm의 크기로 잘라 밀봉 포장을 한 다음, 멸균을 위해 ethylene oxide(EO) gas로 살균하였다.

나. 동물실험

실험동물로는 체중이 2000 - 3500 g 사이의 백색 미성숙 가토(young female New Zealand white rabbit) 9마리를 대상으로 하였다. 실험 일주일 전에 사육장에서 실험실로 옮겨서 이동에 따른 스트레스를 줄였으며, 표준화된 토끼

사료(해표사료, 한국)를 먹였고, 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 사육 환경은 1기압, 20 - 23°C, 65%의 습도를 유지하였다. 토끼의 복강내에 ketamine HCl(Ketalar[®]; 유한양행, 한국) 2 mg/kg을 주사하여 마취하였다. Glucuronic acid chlorhexidine(Microshield[®]; Johnson & Johnson, USA)액을 적신 거즈로 양측 귀를 닦고 면도용 칼로 털을 제거한 후 povidone-iodine으로 소독하였다. 연골 결손을 만들 곳은 귀의 근위부에 연골이 비교적 두꺼운 곳을 선택하였다. 결손을 만들 곳의 약간 외측 피부에 15번 칼로 연골에는 손상을 가하지 않도록 조심하면서 전면의 연골막까지 절개하고 연골막직상부로 골막기자를 이용하여 피부 연골막하로 일으켜 연골을 노출시켰다. 직경 6 mm의 천공기(punch)로 후면의 연골막이 손상되지 않도록 연골에만 천공한 후, 골막기자로 연골막을 분리하여 연골결손을 만들었다.

직경 6 mm의 4개의 연골결손부에 바로 준비한 직경 6 mm, 두께 2 mm의 콜라겐지지체 군을 삽입하여 이식하였다. 지지체와 연골을 융합하지는 않았고, 지지체 양측으로 연골막이 잘 접촉하도록 한 후에 연골막을 포함한 피부를 5-0 chromic cat gut으로 봉합하였다. 수술부위에 특별한 드레싱은 하지 않았다(Fig. 1).

4군으로 나누어 4곳에, 1군은 물리적 가교 처리한 type I collagen scaffold(Collagen-DHT), 2군은 물리적 가교에 화학적 가교 처리를 추가한 type I collagen scaffold(Collagen-DHT-EDC), 3군은 chondroitin sulfate를 결합시킨, 물리적 가교 처리한 type I collagen scaffold(CS-Collagen-DHT), 그리고 4군은 chondroitin sulfate를 결합시킨, 물리적 가교에 화학적 가교 처리를 추가한 type I collagen scaffold(CS-Collagen-DHT-EDC)를 결손부위에 이식하였다(Table I). 창상감염을 방지하기 위해 수술



Fig. 1. Type I atelo-collagen scaffold implantation into the cartilage defect of the proximal part of rabbit ear.

당일, 술후 5일 간격으로 항생제(ceftazol sodium) 15 mg/kg을 둔부에 주사하였다. 실험동물들은 각각 이식 4주, 8주, 12주에 안락사 시킨 다음, 조직을 생검하여 관찰하였다.

다. 연골세포의 type I 및 type II collagen의 mRNA의 발현 정도 측정

1) RNA 분리와 역전사 반응(transcriptase reaction)

지지체내로 자라 들어온 연골세포의 type I과 type II collagen의 생성정도를 분석하기 위해 술후 4, 8, 12주에 조직을 채취하였다. 이 때 생검할 부위 양측의 피부를 완전히 제거하고 동일한 6 mm의 천공기로 동일한 부위에서 이식된 지지체만을 연골막과 함께 천공하여 채취하였다. 채취

한 조직을 TRI Reagent(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)에서 homogenizer로 분쇄한 후 총 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 UV spectrophotometer(BECKMAN DU^R 650, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, U.S.A.)를 이용하여 순도 및 농도를 측정 후 First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, V. Graiciuno, Lithuania)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

2) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)

중합효소 연쇄반응에 사용된 collagen type I, II 그리고, 내부 대조군 유전자인 glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 sense primer와 antisense primer에 대한 primer sequences는 정지락 등⁸에 의한 primer sequences를 이용하여, BIONICS(바이오닉스, Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였다(Table II). PCR은 1 µl의 cDNA, 0.25 µl Taq polymerase(SolGent Co., Ltd., Daejeon, Korea), 1 µl 10 mM dNTP, 5 µl 10 × buffer, 각각의 primer(10 pmol/µl) 2 µl을 넣어 총 50 µl PCR 반응용액으로 thermal cycler(MJ Research PTC 100, Global MEDICAL instrumentation, Inc., Ramsey, Minnesota, U.S.A.)로 시행하였다. PCR의 조건은 annealing temperature를 collagen type I은 58°C, collagen type II는 53°C, 그리고, GAPDH는 64°C로 하였으며, collagen type I, II는 35 cycles, GAPDH는 30 cycles로 시행하였다(Table III). 이후, 각각 10 µl의 PCR

Table I. Summary of Comparative Groups

Group	Cross-linking & CS
1	Collagen-DHT
2	Collagen-DHT-EDC
3	CS-Collagen-DHT
4	CS-Collagen-DHT-EDC

DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

Table II. Primer Sequences Used for Polymerase Chain Reaction Analysis

Primer		Sense 5' → 3'	Size(bp)
Collagen I	sense	GATGGCCTGAAGCTCAA	418
	antisense	GGTTTGTTGAAGAGGCTG	
Collagen II	sense	ATGACAATCTGGCTCCCAAC	369
	antisense	GACCGGCCCTATGTCCACAC	
GAPDH	sense	TCACCATCTTCCAGGAGCGA	293
	antisense	CACAATGCCCGAAGTGGTCGT	

SolGent

10 × buffer	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
sense	2 µl
antisense	2 µl
dH ₂ O	38.75 µl
cDNA	1 µl
enzyme(Tag)	0.25 µl
total	50 µl

Table III. Reaction Condition of Polymerase Chain Reaction

Collagen I		Collagen II		GAPDH	
35 cycle		35 cycle		30 cycle	
95℃	5 min	95℃	5 min	95℃	5 min
95℃	1 min	95℃	1 min	95℃	1 min
58℃	45 sec	53℃	45 sec	64℃	45 sec
72℃	1 min	72℃	1 min	72℃	1 min
72℃	5 min	2℃	5 min	72℃	5 min

product를 100 bp ladder(JBI Wel GENE Inc., Daegu, Korea)와 함께 ethidium bromide로 염색된 2.5% agarose gel에 전기영동을 시행한 다음, 자외선 하에서 형광띠를 확인하였으며, 내부대조유전자인 GAPDH의 PCR product를 기준으로 하여, collagen type I, II의 생성정도를 상대적으로 비교, 분석하였다.

라. 동물실험의 육안적 관찰

술후 4주, 8주, 12주일에 vecuronium bromide(Vecaron[®]; 이연제약, 서울, 한국) 2 mg을 귀의 정맥으로 주사하여 안락사 시켰다. 수술한 귀 주위의 털을 깎은 후 이식한 지지체의 양측 피부를 제거하고, 연골막이 붙어 있는 채로 지지체와 주변의 상태를 육안적으로 감염유무와 지지체의 견고성, 주변조직과의 구별 정도 등을 관찰하였다.

마. 동물실험의 조직학적 관찰

술후 4주, 8주, 12주일에 위의 방법으로 육안적 관찰한 후 조직학적 관찰을 위하여서는, 지지체 주변의 정상연골을 약 5 mm 가량 포함하여 생검하였고, RNA를 분리하기 위해서는, 위에서 설명한 6 mm의 천공기로 이식한 지지체만을 생검하였다. 조직학적 관찰을 위한 생검 조직은 10% 중성 완충포름알데하이드액에 넣어 고정하였다. 생검조직은 헤마톡실린-에오신염색(hematoxylin and eosin stain) 및 알시안 블루염색(alcian blue stain)을 한 다음, Axiovert 200 Microscope(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)으로 연골 생성 정도를 관찰하였다.

각 주당 실험군마다 4개씩의 조직을 얻어 2개는 조직학적 관찰(n=2)을 위하여, 2개는 RNA(n=2)를 분석하기 위하여 사용하였다.

바. 생성된 연골의 정량분석(Quantitative histomorphometric analysis)

생검 조직 1개당 3개의 횡절편(longitudinal section)을 선택하여 연골이 생성된 면적을 Zeiss Axiovert 200

Microscope과 연결된 AxioVision Rel. 4.3 image software로 측정하여 분석하였다. 통계처리는 Mann-Whitney U test로, 통계적 유의수준은 *p*값이 0.05 미만으로 하였다. 자료처리는 통계처리전문프로그램인 SPSS(statistical package for the social science) WIN 12.0을 사용하였다.

III. 결 과

가. 동물실험의 육안적 관찰조건

술후 4주에 관찰하였을 때, 전체적으로 감염된 예는 없었으며, 수술한 곳에 이미 털이 모두 자라나 남아있는 봉합사와 술후 직전 사진을 근거로 수술한 위치를 유추하여 찾아낼 수 있었다. 양쪽의 피부를 완전히 제거하고 관찰하였을 때, 지지체를 이식한 부위가 약간 낮아 결손부위를 인식할 수 있었다. 각 군 간에 육안적인 차이는 없었다. 술후 8주에는 4주에 비하여 훨씬 견고하였고, RNA를 얻기 위한 생검을 칼로 잘게 썰 때 연골을 자를 때의 느낌과 유사하였다. 술후 12주에는 술후 8주 때와 큰 차이는 없었으나, 조직에 따라 칼로 썰 때 더욱 딱딱하고 사이사이에 뼈가 섞인 듯한 느낌이였다.

나. 동물실험의 조직학적 관찰조건

술후 4주에 모든 군에서 가장자리에서부터 연골이 조금씩 재생되기 시작하였는데, 1군(Collagen-DHT)과 3군(CS-Collagen-DHT)에서 조금 우수하였다. 1군과 3군 즉, 지지체를 물리적 가교 처리한 한 군에서는 지지체를 관찰할 수 없었고, 2군(Collagen-DHT-EDC)과 4군(CS-Collagen-DHT-EDC) 즉, 물리적 가교에 화학적 가교 처리를 추가한 군에서는 지지체가 많이 남아 있었다(Fig. 2). 술후 8주에 1군과 3군에서 연골재생이 중앙부위까지 도달하였고, 골화(calcification)가 2, 3, 4군에서 관찰되었는데, 2군에서 가장 많았다. 4군에는 아직까지 지지체가 많이 남아있었다(Fig. 3). 12주에 3군에서 연골생성이 가장 많았고, 4군에서 골화가 더 많이 진행되었다. 2군과 4군에서는 아직도 지지체가

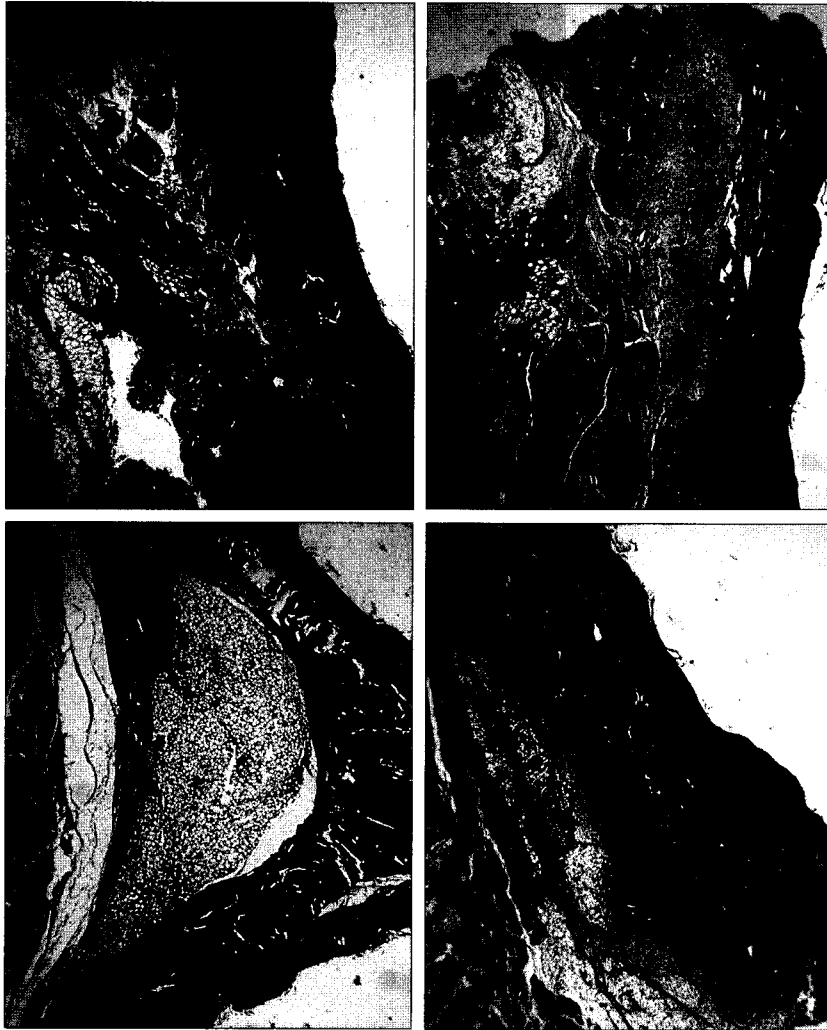
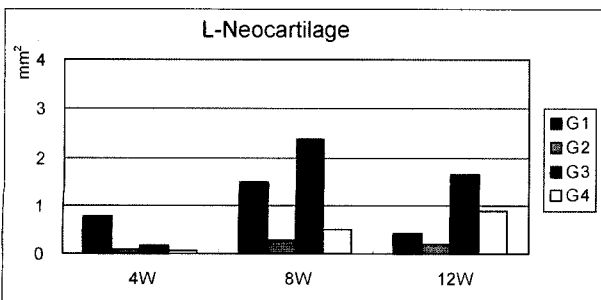


Fig. 2. Histological sagittal sections from the center of implant at 4 weeks (Hematoxylin and eosin stain, $\times 12.5$). Note that in the Collagen-DHT group (Above, left) and CS-Collagen-DHT group (Above, right) more cartilaginous tissue has been formed in the peripheral area of the scaffold. Collagen-DHT-EDC group (Below, left) and CS-Collagen-DHT-EDC group (Below, right) showed un-degraded collagen scaffolds. DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

Table IV. Histomorphometric Results of Regenerated Cartilage(μm^2)

Group	4주	8주	12주
1	775221	1498816	411213
2	87885	286539	204518
3	154586	2368138	1647285
4	43107	500135	887264



남아 있었는데, 4군에서 가장 잘 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

다. 재생된 연골의 정량분석 결과

술후 4주에 1군에서 2군($p=0.004$), 3군($p=0.004$), 4군($p=0.004$)에 비하여 연골재생이 많았고, 8주에는 3군이 2군($p=0.004$), 4군($p=0.004$)에 비해서 연골생성이 많았다. 12주에는 연골생성 면적이 8주에 비하여 4군을 제외하고는 모두 감소하였는데, 3군이 1($p=0.037$), 2군($p=0.024$)에 비해 상대적으로 연골생성면적이 크게 나타났다(Table IV).

라. 연골세포의 type I 및 type II collagen의 mRNA 발현 정도

1, 2, 3, 4군에서 4, 8, 12주 후 내부 대조유전자인 GAPDH를 기준으로 한 type I collagen의 mRNA 발현은 시간이 경과함에 따라 전체적으로 감소하였다. 그러나 type II collagen의 mRNA 발현은 시간이 지날수록 증가하였는데,



Fig. 3. Histological coronal(Above, left and Below, right & left) and sagittal (Above, right) sections from the center of the implant at 8 weeks(Hematoxylin and eosin stain, $\times 12.5$). Collagen-DHT group (Above, left) and CS-Collagen-DHT group (Below, left) showed cartilage regeneration in the whole area of the scaffold. In the Collagen-DHT-EDC group(Above, right) and CS-Collagen-DHT-EDC group(Below, right) scattered undegraded collagen scaffold and calcification could be seen. DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

3군(CS-Collagen-DHT)과 4군(CS-Collagen-DHT-EDC) 즉, chondroitin-sulfate를 결합한 지지체에서는 8주에 가장 많이 증가하였다가 12주에 다소 감소하였다(Fig. 5).

IV. 고 찰

연골막은 연골을 덮고 있는 교원성 결합조직으로, 섬유층인 외층과 세포수가 적은 중간층, 그리고 세포수가 많은 내층으로 구성되어 있다. 태생기 동안 연골에 연골세포와 기질을 공급하지만, 성장 후 기능이 정지되어 있다가 질병이나 외상 등으로 연골에 결손이 발생하면 연골막은 그 기능을 재개하여 가장 안쪽에 있는 내측연골막에서 연골막 세포(perichondrial cell)가 성숙한 연골세포(chondrocyte)로 분화하고 이 세포가 기질을 만들어 치유를 촉진시키는 중

요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁹ 그러나 연골은 재생능력이 다른 조직에 비해 떨어져 있기 때문에 한 번 손상을 받으면 결국 같은 연골로 재생되지 못하고 반흔을 남김으로써 영구적인 변형을 남기게 된다. 이러한 경우 기능과 형태를 회복시켜주기 위한 방법은 같은 종류의 연골을 신체의 다른 부위에서 채취하여 이식하여 주거나 연골의 기질과 같은 역할을 하는 지지체를 삽입하여 연골막에서 연골 재생이 최대한 이루어지도록 유도하는 것이다. 이러한 물질로 탈광물우형골기질(demineralized bovine bone matrix),¹⁰ PGA,¹¹ coral,¹² collagen⁷이 이용되었지만 충분히 원하는 양과 모양을 얻지는 못하였다.

천연 지지체 중에 콜라겐 스펀지가 연골 재생의 지지체로 주목되는 이유는 다공성의 구조로 되어있고 물리, 화학적으로도 안전하며, 생체적합성이 뛰어나고 생체 내에서

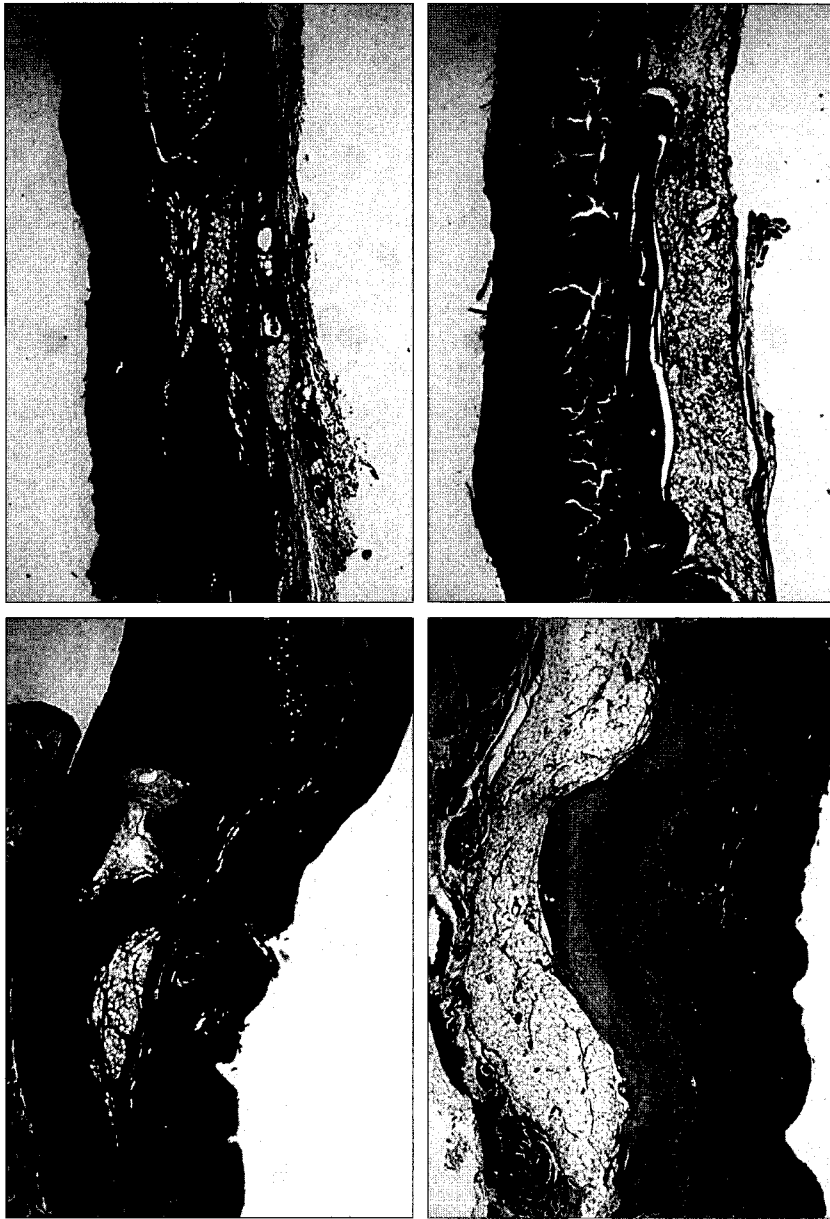


Fig. 4. Histological sagittal sections from the center of the implant at 12 weeks (Hematoxylin and eosin stain, $\times 12.5$). CS-Collagen-DHT group(Below, left) and CS-Collagen-DHT-EDC group(Below, right) showed more cartilage regeneration than other groups. Collagen-DHT group(Above, left) and Collagen-DHT-EDC group(Above, right) showed calcification in the scaffolds. DHT, dehydrothermal; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide; CS, chondroitin-6-sulfate.

흡수되는 장점을 가지고 있기 때문이다. Type I collagen은 type II collagen에 비해 glycosidic group의 숫자가 적을 뿐 아니라 tryptophan과 tyrosine이 적기 때문에 면역반응이 적어서 선호되고 있다. 이번 연구에 이용된 type I collagen은 송아지의 피부에서 추출하였으며 tyrosine의 함량을 HPLC chromatography column(Waters 510, Korea Basic Science Institutes, Daejeon, Korea)으로 분석하였을 때 0.046%로 항원성이 아주 낮았다.¹³

이번 실험에서 연골이 비교적 잘 재생된 것은, 실험에 사용된 type I atelo-collagen지지체가 연골막의 미성숙 전구세포로부터 연골세포로의 분화를 촉진시키고 이 세포가 지지체 내로 잘 자라 들어오게 하며, 세포외기질을 잘 형

성하게 한 것으로 추측할 수 있다.

콜라겐지지체에 GAG를 부착하거나 가교처리를 하는 것이 세포와 조직의 재형성에 많은 영향을 주는데, 물리적 가교 처리는 유리아민군(free amine group)과 물결함력(water-binding capacity)을 감소시켜 장력을 증가시키지만 콜라겐의 안정화에 결정적인 역할을 하지는 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 콜라겐을 물리적 가교 처리한 후에 화학적 가교 처리로 CS를 추가한 경우에는 지지체의 표면은 다소 찌부러지지만(collapse) 장력이 증가하고 단백질 분해효소에 의한 붕괴가 감소한다고 한다.¹⁴ 이번 연구에서 화학적 가교가 추가된 2군과 CS와 화학적 가교가 추가된 4군에서 12주에서도 지지체가 남아 있고 재생된

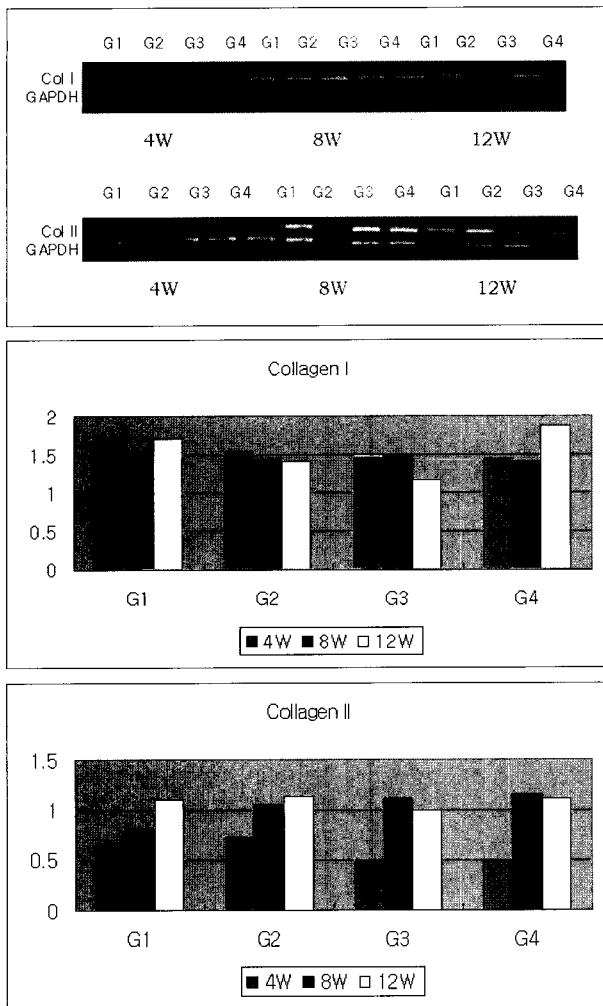


Fig. 5. RT-PCR profile of mRNA for GAPDH and type II collagen showed increasing over time in all groups, whereas in type I collagen, decreasing.

연골이 다른 군에 비해 적은 것은 화학적 가교로 지지체의 표면이 찌부러져 있었기 때문에 연골세포가 안으로 자라 들어가지 못한 것이 원인일 것으로 판단하였다. 반면에 1군과 3군 즉, 물리적 가교 처리만 한 군에서 연골재생이 많이 된 것은 지지체가 개방되어 연골세포가 잘 자라 들어와 8주에 거의 대부분 연골이 만들어진 것으로 생각된다. 그러나 이 때부터 골화가 부분적으로 진행되어 12주에는 오히려 연골의 재생면적이 저하되었다. 또한 GAG인 CS는 물결합력을 증가시켜 장력을 떨어뜨려 지지체의 구조가 개방되도록 하여 조직의 재생에 도움을 줄 것으로 생각하지만 지지체의 형태와 붕괴에는 관계가 없다고 한다.¹⁴ 이 연구에서도 CS의 유무와 연골재생의 정도와는 관계가 없는 것으로 나타났다.

Type X collagen은 연골내골화(endochondral ossification)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 골절 후

골치유 단계에서 만들어진 가골(callus)도 비만연골세포나 퇴행연골세포(degenerative chondrocyte)로 구성되어있고, type X collagen합성이 이루어지는 것으로 보아 type X collagen은 새로운 골형성의 중요한 표식자로 인식되고 있다.¹⁶ 이 연구에서 8주에 연골형성이 최고로 되었고, 이때부터 연골의 일부에서 골화가 시작되었다. 그리고 12주에는 골화가 더 진행되었다. 즉, 내측연골막의 연골막세포에서 분화된 성숙한 연골세포가 8주에 세포외기질을 왕성하게 만들어 내고 동시에 일부의 세포가 연골세포의 최종 분화 세포인 비만 혹은 퇴행연골세포로 변환하여 가는 것으로 추측된다. 연골을 만들어 내는 것도 중요하지만 만들어진 연골이 골화되지 않도록 연골세포가 증식기 또는 휴지기에 머물도록 하는 것이 연골의 형태를 유지하는데 중요할 것으로 생각되며, 이 과정에 관여할 것으로 추측되는 type X collagen과 성장인자에 대해서 앞으로 더 연구되어야 하겠다.

V. 결론

송아지의 진피에서 추출한 atelo-collagen 지지체를 물리적 혹은 화학적 가교 처리하고 CS를 결합시켜 연골막이 남아있는 연골결손부에 이식하였을 때 CS의 추가는 연골 생성에 큰 영향을 미치지 않았으며, 물리적 가교처리만 한 군에서 더 많은 연골이 생성되었다. 화학적 가교 처리는 지지체의 흡수를 지연시키고, 연골막에서 분화된 연골세포가 지지체 내로 자라들어 오게 하는데 오히려 불리하게 작용하였다.

REFERENCES

1. JS Kang: *Plastic surgery*. 3rd ed, Seoul, Koonja, 2004, p 290
2. 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
3. Rhie JW, Ahn TJ, Park JG, Sohn JY, Cho HS, Lim P: Culture of chondrocytes on scaffolds with different pore network of PLGA and PLLA. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 30: 237, 2003
4. Randolph MA, Anseth K, Yaremchuk MJ: Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg* 30: 519, 2003
5. Pachence JM: Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res* 33: 35, 1996
6. van Susante JL, Pieper J, Buma P, van Kuppevelt TH, van Beuningen H, van Der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RPH: Linkage of chondroitin-Sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes *in vitro*. *Biomaterials* 22: 2359, 2001

7. Lee HG, Son DG, Han KH, Kim JH, Lee SY: Chondrogenic effect of transplanted type I collagen scaffold within subperichondrial cartilage defect. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 521, 2005
8. Jeong JL, Shim HG, Park JG, Ju YM, Han DK, Rhie JW, Ahn ST: The effect of plasma treatment of Poly(lactic-co-glycolic)(PLGA) scaffold on adhesion and bioactivity of cultured chondrocytes. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 30: 491, 2003
9. Sohn SA, Ohlsen L: Growth of cartilage from a free perichondrial graft placed across a defect in a rabbit's trachea. *Plast Reconstr Surg* 53: 55, 1974
10. Bean JK, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CD: Reconstruction of the anterior laryngeal wall with a composite graft of demineralized bovine bone matrix and autogenous perichondrium; an experimental study in adult rabbits. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 56: 224, 1994
11. Ruuskanen MM, Virtanen MK, Tuominen H, Törmälä P, Waris T: Generation of cartilage from auricular and rib free perichondrial grafts around a self-reinforced polyglycolic acid mould in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 28: 81, 1994
12. Kim JS, Son DG, Han KH, Choi DW, Park KK: Histologic study of coral template wrapped with perichondrial flap. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 26: 392, 1999
13. Yang EK, Park JK, Ahn J II, Lee HG, Seo SJ, Son DG, Kim JC, Song KY: Tissue-engineered skin substitutes using collagen scaffold with amniotic membrane component. *Key Engineering Materials* 12: 277, 2005
14. Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH: Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 20: 847, 1999
15. Shen G: The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 8: 11, 2005
16. Grant WT, Wang GJ, Balian G: Type X collagen synthesis during endochondral ossification in fracture repair. *J Biol Chem* 262: 9844, 1987