

## 조직공학적 섬유륜재생을 위한 PLGA 지지체 제조시 다공크기의 영향에 관한 연구

소정원 · 장지욱 · 김순희 · 최진희 · 이종문 · 민병현\* · 강길선†

전북대학교 고분자 소재융합연구센터, \*아주대학교 세포치료센터  
(2008년 3월 29일 접수, 2008년 5월 7일 수정, 2008년 5월 7일 채택)

### The Effect of Pore Sizes on Poly(L-lactide-co-glycolide) Scaffolds for Annulus Fibrosus Tissue Regeneration

Jeong Won So, Ji Wook Jang, Soon Hee Kim, Jin Hee Choi, John M. Rhee, Byung Hyun Min\*, and Gilson Khang†

BK-21 Polymer BIN Fusion Research Center, Chonbuk National University,  
664-14, Dukjin Dong 1Ga, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

\*Cell therapy Center, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-721, Korea

(Received March 29, 2008; Revised May 7, 2008; Accepted May 7, 2008)

**초록:** 생분해성 고분자인 poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA)를 이용한 조직공학용 다공성 지지체에서의 공극률, 공극의 크기, 공극의 모양 등은 주입된 세포들이 안착하여 증식하는데 있어서 중요한 요인 중 하나이다. 본 연구에서는 섬유륜 세포와 다공크기와의 관계를 파악하고자 다공형성물질인 염화나트륨을 다섯 개의 범위로 분류하여 용매캐스팅/염추출법을 이용한 다양한 다공크기를 갖는 다공성 지지체를 제조하였다. (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) (MMT) 분석방법을 이용하여 제조된 지지체에 파종된 섬유륜 세포의 생존율과 증식률을 확인하였으며, *in vitro* 환경에서의 콜라겐 양과 DNA량을 측정하였다. *In vivo* 환경에의 세포간의 발생하는 여러 상호작용을 확인하기 위하여 면역결핍 쥐의 피하에 섬유륜 세포가 파종된 지지체를 이식하여 sulfated glycosaminoglycan (sGAG)의 함성정도와 조직학적인 평가를 수행하였다. 결론적으로 180~250 μm 다공크기를 갖는 지지체에서 높은 세포 생존율과 체내에서의 원활한 세포외기질의 형성을 보임으로써 여타의 지지체보다 섬유륜 조직 재생에 적절할 것으로 사료된다.

**Abstract:** Biodegradable polymers have been used extensively as scaffolding materials to regenerate new tissues and the ingrowth of tissue have been reported to be dependent directly of the porosity, pore diameter, pore shape, and porous structure of the scaffold. In this study, porous poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds with five different pore sizes were fabricated to investigate the effect of pore sizes for AF tissue regeneration. Cellular viability and proliferation were assayed by MTT test. Hydroxyproline/DNA content of AF cells on each scaffold was measured. sGAG analyses were performed at each time point of 2 and 6 weeks. Scaffold seeded AF cells were implanted into the back of athymic nude mouse to observe the difference of formation of disc-like tissue depending on pore size *in vivo*. We confirmed that scaffold with 180~250 μm pores displayed high cell viability *in vitro* and produced higher ECM than scaffold with other pore sizes *in vivo*.

**Keywords:** tissue engineering, annulus fibrosus cell, PLGA, scaffold, pore size.

## 서 론

퇴행성 디스크 질환은 나이가 들면서 발생하는 일반적인 현상으로 잦은 고통을 수반하며 신경계를 압박하여 척수장애까지 일으키는 현대인들이 지니고 있는 의학적이고 사회적인 문제이다.<sup>1,2</sup> 특히 추간판 (IVD) 탈출증에 의한 추간판의 형태와 부피의 변형은 척추의 중요한 기계적 기능을 방해하고 요통을 일으키는 원인이 된다.<sup>3-5</sup> 요통에 대

한 치료법은 진통제, 물리치료 등의 보존적인 요법과 추간판 절제술, 척추 융합술, 추간판 치환술 및 관절고정술과 같은 외과적 치료법이 시술되고 있다.<sup>5,6</sup> 그러나 이런 치료적 접근은 일시적으로 고통을 줄여주거나 척추의 운동성을 감소시키고 장기적 합병증을 발생시키며 재수술 등의 부작용을 불러 일으킬 수 있기 때문에<sup>6</sup> 이들의 한계점을 극복하기 위하여 생체 조직공학적 치료 또는 재생 기법이 추간판의 재기능을 재생하기 위한 우수한 해결책으로 응용되고 있다.<sup>7</sup>

생체조직공학은 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자지지체를 생체조직에 이식함으로써 새로운 실질조직을 형성하

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

게 하는 일련의 기법으로<sup>8</sup> 세포배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다 학제간 조합이며, 이러한 조직공학기법을 이용하여 원하는 조직을 얻을 수 있고 지지체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 주조할 수가 있다.<sup>9</sup> 분리된 세포를 인체에 해를 미치지 않으면서, 인체에서 완전히 분해되는 고분자에 심어주게 되는데 이때 사용되는 고분자구조는 화학적 형상이나, 미세구조학적 성상이 세포와 친화력이 있어야 한다. 생체조직공학에 사용되는 고분자 지지체의 역할은 분리된 세포를 집적화하여 생체내에서 세포가 왕성하게 활성화하여 새로운 기질을 분비하게 함으로써 분화된 조직을 만들어 주는 것이다.<sup>10-13</sup>

현재 가장 많이 사용되고 있는 생분해성 고분자 중의 하나인 하이드록시산 계열의 폴리글리콜라이드(PGA)와 폴리락타이드(PLA), 및 이들의 공중합체인 PLGA는 미국 식품의약품안전청에 의해 임상용으로 승인을 받은 유일한 합성고분자로서 높은 생체적합성, 생분해성, 가공성을 가지고 있으며, 단량체량을 조절함으로써 분해기간을 조절할 수 있는 장점이 있기 때문에<sup>14-17</sup> 조직공학적 다공성지지체, 약물전달시스템 등의 생체재료로 널리 이용되고 있다.<sup>8</sup>

효과적인 조직 재생을 위한 이상적인 지지체에는 체내 하중을 견뎌내야 할 충분한 기계적 강도, 세포들의 정착 및 성장이 가능한 표면 화학적 성질, 기공의 마이크로와 매크로적인 구조, 크기 및 형태 등이 필수조건으로서 요구된다.<sup>14,18</sup> 특히 세포의 정착과 분화가 원활히 이루어질 수 있는 최대의 공극률과 상호연결성이 우수한 공극구조를 지닌 다공성의 3차원 고분자 지지체의 공극률, 공극의 크기, 공극의 모양 등은 지지체가 갖추어야 할 중요한 매개변수이다.<sup>19,20</sup> 따라서, 다공성 네트워크는 주입된 세포들이 안착하여 생존하고 증식을 하기 위한 산소와 영양분의 공급에 주요한 영향을 미치기 때문에 지지체의 설계 조건 중에서 가장 고려하여야 할 요소로서<sup>21-23</sup> 섬유아세포가 가장 잘 자라는 기공의 크기는 20 µm 내외, 피부세포 및 물렁뼈세포 등은 20~125 µm 및 뼈세포는 50~250 µm인 것으로 보고되고 있다.<sup>18</sup>

본 연구에서는 손상된 디스크를 대신할 조직공학적 바이오디스크 제조에 있어 디스크 세포와 다공크기와의 관계를 파악하고자 생분해성 고분자인 PLGA를 사용하여 용매캐스팅/염 추출법 이용한 다양한 다공크기를 갖는 다공성 지지체를 제조하였으며, 섬유류 세포를 지지체에 파종하여 섬유류조직 재생가능성을 위한 최적의 다공크기를 파악하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** PLGA(락타이드/글리콜라이드 몰비, 75/25, Resomer RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mol인 것을 사용하였다. 또한 다공형성물질로 이용된 염화나트륨(Orient Chem. Co., Korea)은 분자체로 입자의 크기를 90~180, 180~250, 250~355, 355~425, 및 425~600 µm로 선별하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA)와 이외의 모든 화학 약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

**용매캐스팅/염추출법을 이용한 다공크기별 지지체 제조.** 본 연구에서는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 다공크기별 PLGA 지지체를 제조하였다. 먼저 1 g의 PLGA를 5 mL의 MC에 용해한 후, 다공형성물질로 이용될 염화나트륨을 크기별 분자체로 선별하여 PLGA

무게의 10배가 되게 첨가하여 이들을 혼합하였다. 용해된 혼합물을 직경 5 mm 및 높이 5 mm의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm<sup>2</sup>의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 염의 추출은 600 mL의 3차 증류수를 6시간마다 교체하여 48시간 동안 수행하였고, 8 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25 °C 진공오븐에서 건조시켰다.

**섬유류 세포의 분리 및 배양.** 섬유류 세포는 4~5주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼의 L1~L5 척추마디로부터 분리하였다. 무균술식을 통하여 추간판으로부터 수핵(NP) 조직과 섬유류(AF) 조직을 따로 분리하였다. 분리한 섬유류조직은 인산완충식염수로 수회 세척하였고, 이를 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A(Roche, Indianapolis, USA)로 6시간 인큐베이션 하였다. 콜라게네이즈를 처리한 조직은 100 µm 메쉬(Falcon, USA)를 이용하여 거르고, Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco BRL, USA)와 F-12 nutrient mixture(Ham's F-12, Gibco BRL), 10% 우태혈청(FBS, Gibco BRL), 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 이때 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었으며, 섬유류 세포를 계대 배양 3회째까지 실시하여 충분한 세포수를 확보하였다.

**지지체의 표면 모폴로지 관찰.** 다공크기별로 제조된 PLGA 지지체의 표면형태를 관찰하기 위하여 SEM(Model S-2250 N, Hitachi Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 플라즈마 스퍼터(Emiteck, K575, UK)를 이용하여 아르곤 가스하에서 백금코팅을 실시한 후 15 kV에서 각각 60배율로 관찰하였다.

**MTT 분석.** 세포성장률은 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. 배양된 세포를 지지체당 1×10<sup>5</sup> 세포/지지체의 농도로 파종한 후, 1, 3, 7, 및 14일 째에 5 mg/mL의 농도의 MTT(브롬화 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움, Sigma Co.) 용액을 첨가하고, 4시간동안 5% CO<sub>2</sub> 하에 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 지지체를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma Co.) 용액을 2 mL씩 넣어 2시간 동안 교반하였다. 결정이 용해된 용액을 96 웰 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**콜라겐 양 측정.** *In vitro*에서 섬유류 세포가 파종된 다공크기별 지지체의 히드록시프롤린의 농도와 DNA의 양을 측정하기 위해서 섬유류 세포를 1×10<sup>5</sup> 세포/지지체의 농도로 분주하였고 이들에 한 번씩 새로운 배양액으로 교체하였다. 히드록시프롤린의 농도를 측정하기 위하여 2주 후에 지지체를 획득하여 4 N HCl을 400 µL를 넣고 120 °C로 가열하여 수화시킨 후 최종농도가 4 N이 되도록 동량의 수산화나트륨을 넣고 120 °C로 반응시켰다. Chloramint T Reagent(Sigma Co.) 400 µL를 첨가하고 25분 동안 방치시킨 후 Enrich's 시약(Sigma Co.)을 500 µL씩 튜브에 넣고 65 °C 오븐에서 20분 동안 반응시켰다. 그 후, 96 웰 플레이트에 반응액을 100 µL씩 넣고, 마이크로플레이트리더(Emax precision microplatereader, Molecular Devices Corp., USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포를 파종한 뒤 2주째에 지지체를 채취해 DNA의 양을 측정하기 위하

여 Axyprep™ multisource genomic DNA miniprep kit (Axygen Scientific, Inc. Union, USA)로 DNA를 분리하였고 spectrophotometer (Biorad, USA)로 정량하였다.

**sGAG 농도 분석.** *In vivo*에서 세포외기질내에 존재하는 글라이코사미노글라이칸의 합성정도를 확인하기 위하여 PLGA 지지체에 섬유류 세포를  $2 \times 10^5$  세포/지지체의 농도로 파종한 후 생체의 조건에서 5일 동안 배양한 뒤 면역결핍 쥐에 이식하여 2주와 6주 후에 각각의 지지체를 적출하여 동결건조한 후 파파인용액 (papain 125 µg/mL (Sigma Co.), L-cystein 5 mM (Sigma Co.),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM (Fisher scientific Ltd), EDTA 5 mM (Duksan pharmaceutical Co., Ltd))을 300 µL씩 넣고 60 °C에서 16시간 동안 반응시킨 후 DMMB (1,9-다이메틸메틸렌 블루) 분석을 이용하여 sGAG 농도를 분석하였다. 파파인용액에서 반응시킨 각각의 샘플 50 µL에 DMMB 용액 200 µL을 혼합하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 sGAG 농도는 동결건조시킨 각각 샘플의 무게로 정량화하였다.

***In vivo* 환경에서의 조직학적 분석.** *In vivo*에서 다공크기에 따른 PLGA 지지체에서의 조직공학적인 바이오 디스크로서의 가능성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. PLGA 지지체에 섬유류 세포를  $2 \times 10^5$  세포/지지체의 농도로 파종한 후 생후 4주된 쥐의 등쪽 부분을 2~3 cm 절개하여 이식하였고 2주 및 6주 후에 각각의 지지체를 적출하여 10%의 포르말린에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록을 제작한 후에 4 µm로 자른 후 슬라이드에 고정

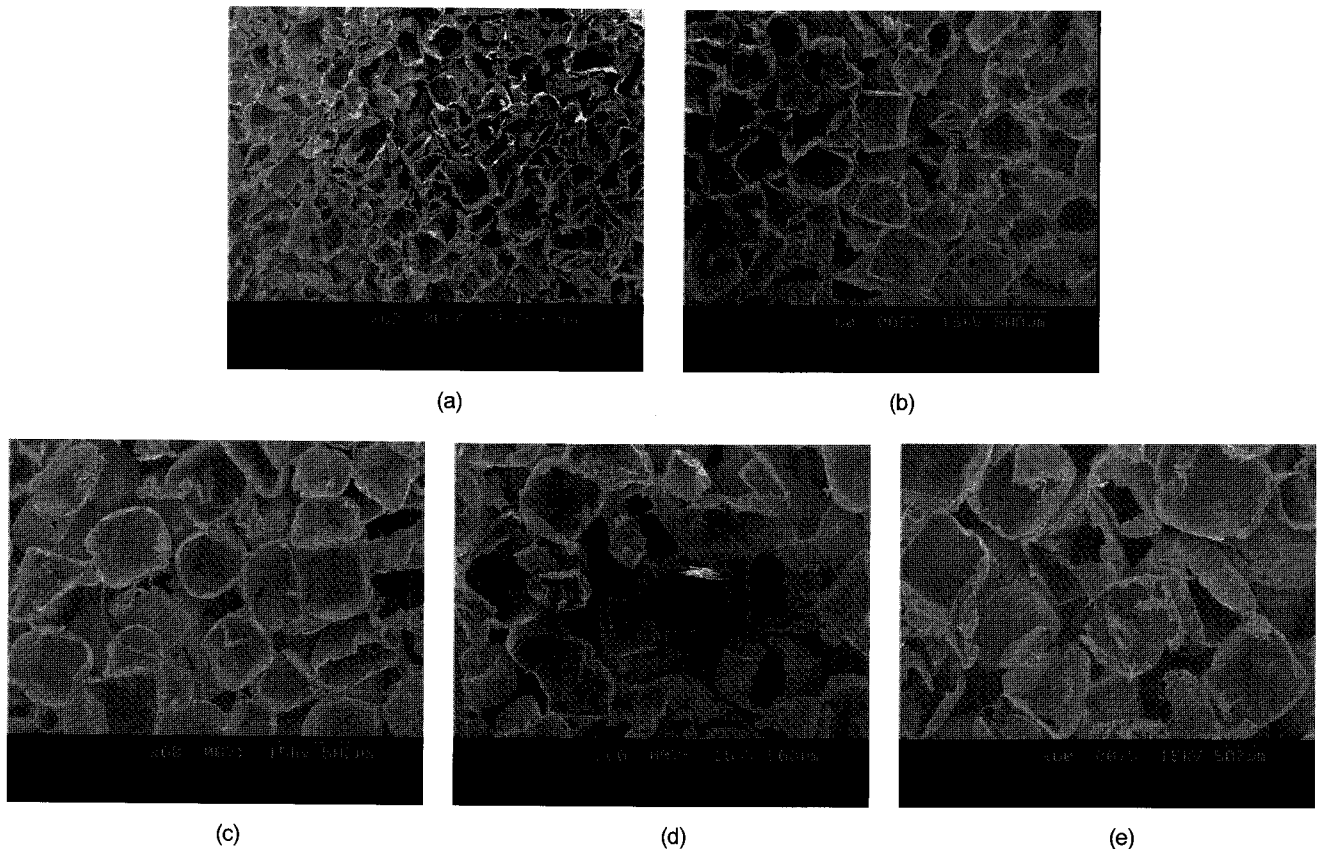
하고 조직학적 평가를 하기 위하여 H&E, Safranin-O, 면역조직학적(제 I형 교원질 (Monoclonal Anti-Collagen, Type I, antibody produced in mouse, Sigma Co.)) 염색을 시행하였다. 현미경 사진 (Nikon TE-2000, Japan)은 200배에서 촬영하였다.<sup>24</sup>

**통계적 분석.** 각 실험군 들의 평균값과 표준편차를 확인하였으며, 통계학적인 분석은 Student's *t*-test를 수행하였다. 결과 값이  $p < 0.05$ 일 때 충분한 유의성을 갖는 것을 기준으로 하였다.

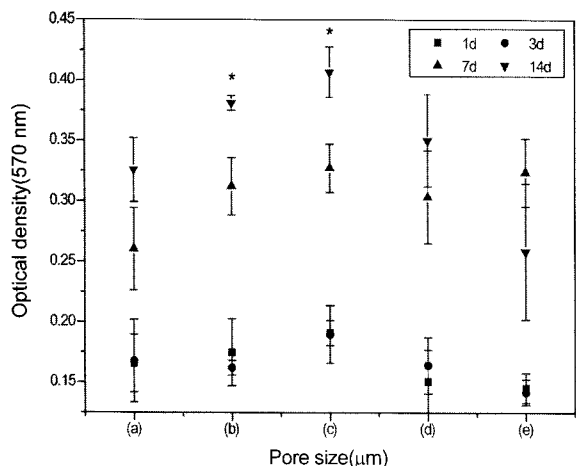
## 결과 및 토론

**다공성 지지체 제조 및 표면형태.** 본 연구에서는 조직공학적인 바이오 디스크 재생에 응용하고자 제조방법에 따라 다공의 크기 및 다공도와 같은 다공의 특성 조절이 용이한 물성을 가진 생분해성 고분자인 PLGA를 이용하여 다공형성 물질인 염화나트륨을 다섯개의 범위로 분류하여 용매캐스팅/염추출법으로 다양한 다공크기를 갖는 다공성 지지체를 제조하였다. 완성된 지지체의 다공 표면 형태에 대한 SEM 분석 결과 Figure 1에서 볼 수 있듯이 염화나트륨의 크기가 증가함에 따라 지지체 내부의 다공크기가 증가함을 알 수 있었고 모든 지지체에서 다공과 다공사이의 상호연결이 우수함을 확인할 수 있었다.

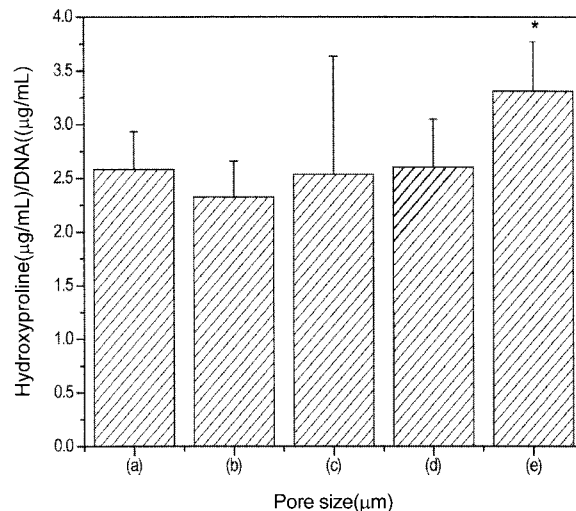
**MTT 분석.** 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움, 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 MTT 분석법을 이용하



**Figure 1.** SEM micrographs of porous PLGA scaffolds with (a) 90–180 µm, (b) 180–250 µm, (c) 250–355 µm, (d) 355–425 µm, and (e) 425–600 µm (x 60).



**Figure 2.** Cell proliferation of annulus fibrosus cells in PLGA scaffolds of various pore sizes by MTT assay (for 14 days). \* denotes significant difference compared with (a) of each scaffolds ( $p < 0.05$ ). (a) 90–180  $\mu\text{m}$ , (b) 180–250  $\mu\text{m}$ , (c) 250–355  $\mu\text{m}$ , (d) 355–425  $\mu\text{m}$ , and (e) 425–600  $\mu\text{m}$ .

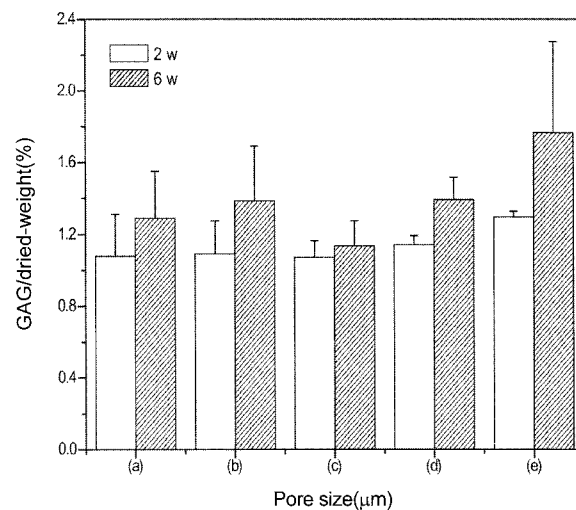


**Figure 3.** Total content of collagen per DNA by various pore sizes of scaffolds (after 2 weeks *in vitro*). (a) 90–180  $\mu\text{m}$ , (b) 180–250  $\mu\text{m}$ , (c) 250–355  $\mu\text{m}$ , (d) 355–425  $\mu\text{m}$ , and (e) 425–600  $\mu\text{m}$ . \* denotes significant difference compared with (a) of each scaffolds ( $p < 0.05$ ).

여 다공크기에 따른 섬유원 세포의 성장률을 비교해 보았다.<sup>25</sup> 1, 3, 7 및 14일째의 세포성장률을 Figure 2에 나타내었다. 425~600  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체를 제외한 나머지 지지체에서 시간이 갈수록 지속적인 세포 성장이 일어남을 확인할 수 있었으며 다공크기에 따른 지지체 사이의 세포증식률은 7일째까지는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 14일째에서 180~355  $\mu\text{m}$  다공크기의 범위를 갖는 지지체에서 비교적 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 이는 지지체 내부의 다공은 세포가 부착하여 증식하는 공간임과 동시에 세포가 생존하기 위한 산소나 영양분의 공급로이기도 하므로 세포 성장이 증가함에 따라 물질전달에 대한 요구가 증가하고 세포구성물의 축적으로 다공의 크기가 감소하기 때문에 90~180  $\mu\text{m}$ 와 같은 작은 다공크기보다는 일정 크기 이상의 다공이 유지되어야 할 것으로 사료된다. 따라서 180~355  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체에서 세포 생존율이 유리하게 작용한 것으로 예상된다. 반면, 지지체내의 넓은 표면적은 높은 밀도의 세포점착을 가능하게 하여 세포를 고밀도로 배양할 수 있는 역할을 수행하는데, 다공크기가 증가함에 따라 지지체의 단위 부피당 표면적은 감소하게 되어 425~600  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체의 경우는 세포의 부착과 증식이 더디게 진행되어 전체적인 세포의 성장률이 낮아진 것으로 사료된다.<sup>26,27</sup>

**콜라겐 양 측정.** 다공크기에 따른 지지체에 섬유원 세포를 파종하고 *in vitro*에서 2주간 배양 후 콜라겐 합성 시에 생성되는 히드록시프롤린의 농도와 각각 다공크기별 지지체의 DNA 양을 측정하여 1개의 DNA에서 합성되는 콜라겐의 합성량을 나타내었다(Figure 3). 나타난 바와 같이 425~600  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체에서 콜라겐의 합성정도가 가장 높게 측정되었는데 이는 큰 다공의 경우 다공 각각의 넓은 내벽이 세포의 유착과 세포퍼짐도면에서 충분한 공간을 제공하여 한 세포와 다른 세포간의 세포-세포 결합과 세포-세포외기질 결합을 자극하여 콜라겐 합성이 촉진된 것으로 사료된다.

**sGAG 측정.** AF 세포를 다공크기에 따른 PLGA 다공성 지지체에 파종시켜 생체외에서 5일 동안 배양한 뒤 누드마우스의 피하에



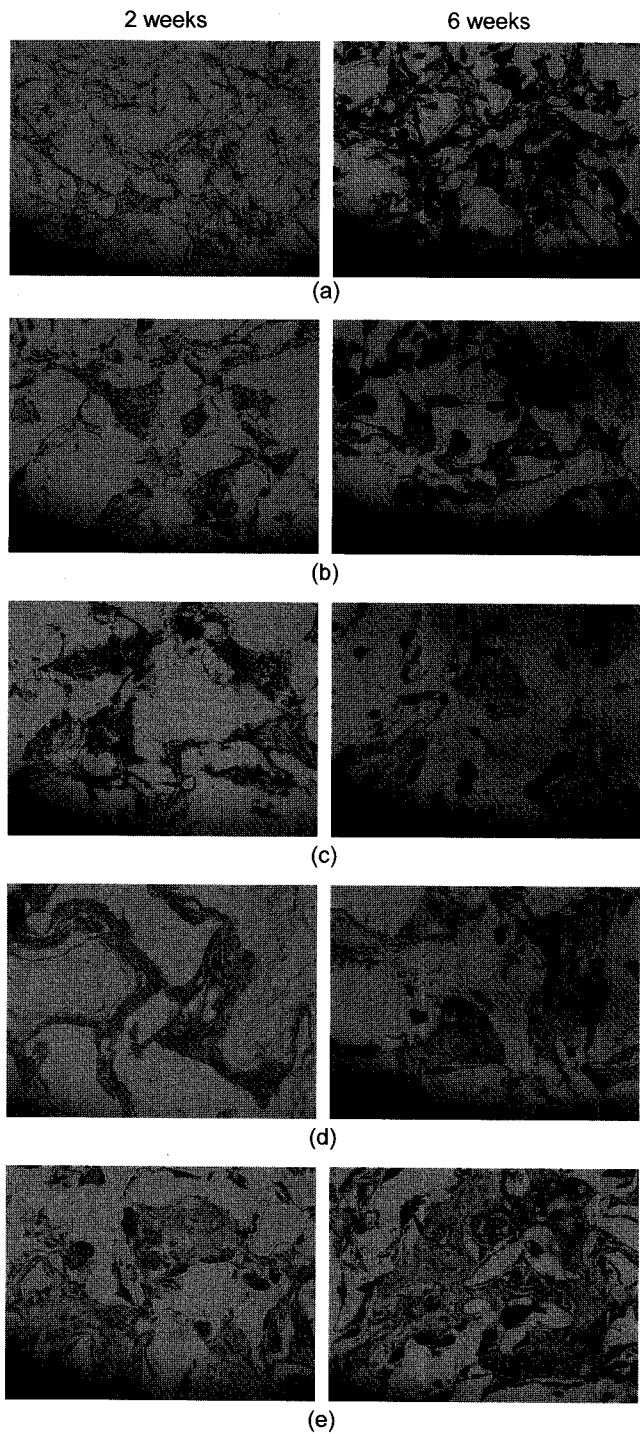
**Figure 4.** Glycosaminoglycan content by dimethyl methylene blue assay (after 2 and 6 weeks *in vivo*). (a) 90–180  $\mu\text{m}$ , (b) 180–250  $\mu\text{m}$ , (c) 250–355  $\mu\text{m}$ , (d) 355–425  $\mu\text{m}$ , and (e) 425–600  $\mu\text{m}$ .

이식한지 2주 및 6주 후에 적출하여 DMMB를 이용한 sGAG 분석을 수행하였다. Figure 4에 나타난 것과 같이 모든 실험군에서 sGAG의 농도가 전 기간에 걸쳐 높게 관찰되었으며, 다공크기에 따른 지지체에 대한 sGAG의 형성정도에는 차이를 보이지 않았다 ( $p < 0.05$ ).

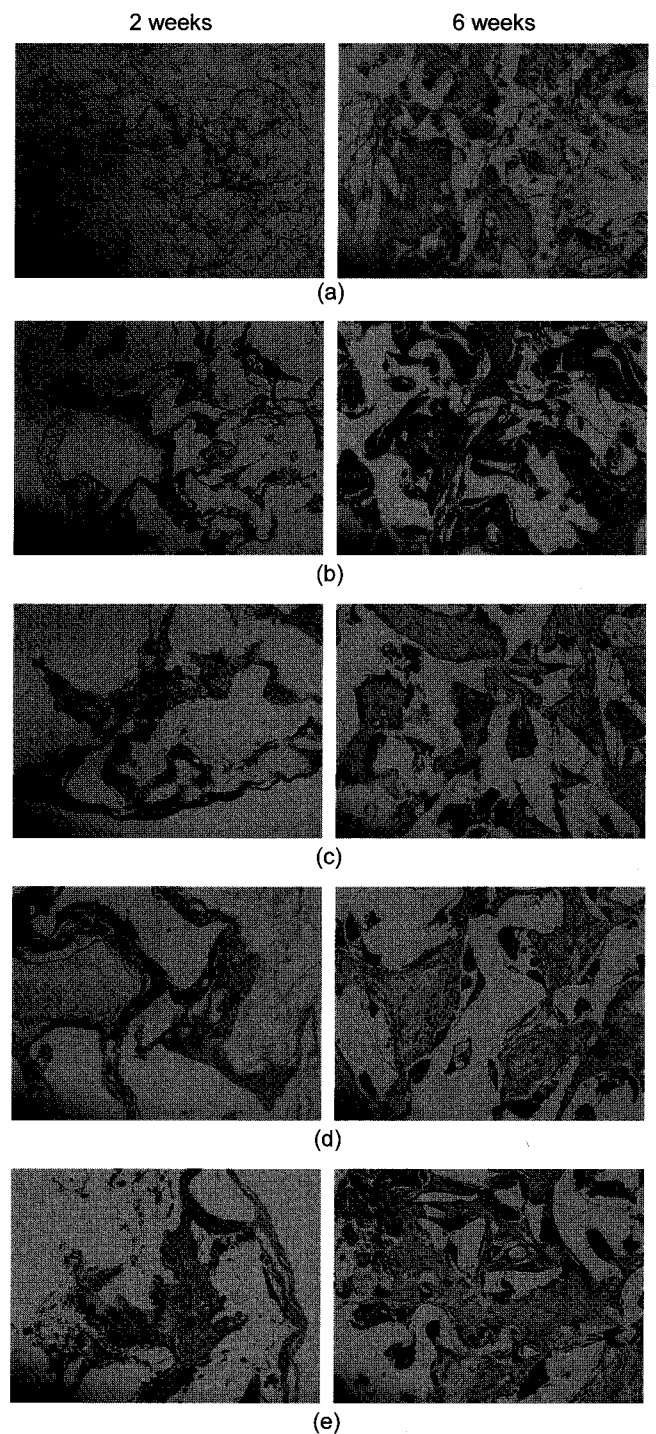
***In vivo* 환경에서의 조직학적 분석.** *In vivo* 환경에서 섬유원 조직 재생 가능성을 평가하고자 AF 세포가 파종된 지지체를 2주 및 6주 후에 적출하였다. H&E를 통하여 매트릭스 내부에 존재하는 세포의 분포 양상과 세포의 모폴로지를 확인한 결과 AF 세포가 다공속으로 들어가 지지체-세포 복합체에서 세포외기질을 생성함을 확인하였고,

특히 하나 하나의 다공내부로 핵과 세포질이 가득 차는 형태를 보임으로써 세포 배열 및 세포외기질의 형성 면적이 다공크기에 따른 면적과 비례함을 관찰할 수 있었다(Figure 5). 또한, 세포외기질의 수분을 함유하는 프로테오글라이칸의 발현정도를 확인하기 위하여 Safranin-O 염색을 실시하였다. Figure 6에서 나타낸 것과 같

이 2주째에서는 GAG의 합성영역이 거의 발견되지 않았지만, 시간이 6주째로 경과됨에 따라 Safranin-O에 의해 붉은색으로 염색된 부분이 상당부분을 차지하였고, 특히 180~250  $\mu\text{m}$ 의 다공크기를 갖는 지지체에서 비교적 높게 발색됨을 관찰할 수 있었다. 또한, 특정 세포에만 존재하는 특이적인 단백질을 항원-항체 반응에 의하여 염



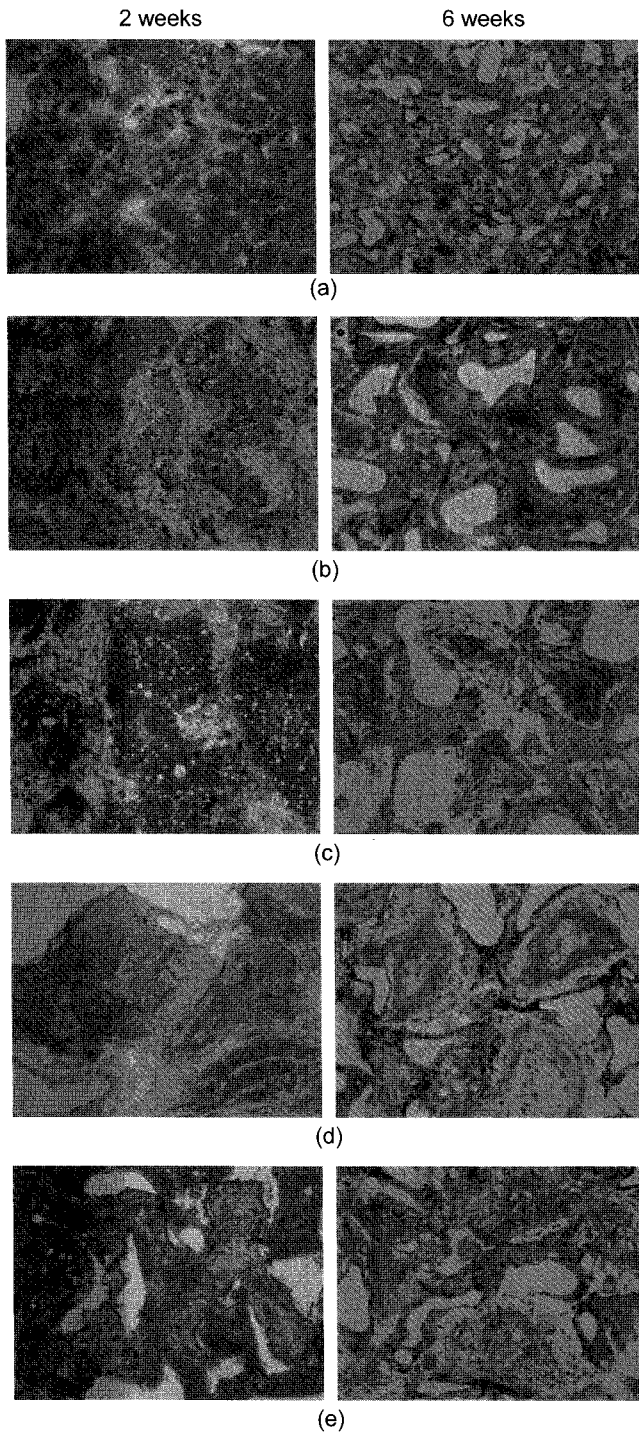
**Figure 5.** Photographs of histological staining for H&E(after 2 and 6 weeks *in vivo*). (a) 90-180  $\mu\text{m}$ , (b) 180-250  $\mu\text{m}$ , (c) 250-355  $\mu\text{m}$ , (d) 355-425  $\mu\text{m}$ , and (e) 425-600  $\mu\text{m}$ (magnification, x 200).



**Figure 6.** Photographs of histological staining for Safranin-O(after 2 and 6 weeks *in vivo*). (a) 90-180  $\mu\text{m}$ , (b) 180-250  $\mu\text{m}$ , (c) 250-355  $\mu\text{m}$ , (d) 355-425  $\mu\text{m}$ , and (e) 425-600  $\mu\text{m}$  (magnification, x 200).

색함으로써 특정 세포를 증명하는 면역화학적 염색을 실시하였다. Figure 7은 제 I형 교원질의 단백질 발현 여부를 확인한 결과로서 Safranin-O 염색과 유사하게 시간이 6주째로 경과됨에 따라 교원질의 발현강도가 증가하는 경향을 보였고, 이 역시 180~250  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체에서 비교적 높게 발현됨을 확인할 수 있었

다. 이는 시간이 지남에 따라서 지지체 내에 재생된 세포외기질이 주변의 조직과 잘 융합되어 원활한 증식을 보인 것으로 예상되며, 세포외기질이 충분히 생성될 만큼 지속적인 세포 성장률을 제공해 주는 크기인 180~250  $\mu\text{m}$ 의 다공크기에서 보다 유리하게 작용한 것으로 사료된다.



**Figure 7.** Photographs of immunohistochemistry for collagen type-I(after 2 and 6 weeks *in vivo*). (a) 90~180  $\mu\text{m}$ , (b) 180~250  $\mu\text{m}$ , (c) 250~355  $\mu\text{m}$ , (d) 355~425  $\mu\text{m}$ , and (e) 425~600  $\mu\text{m}$  (magnification,  $\times 200$ ).

## 결 론

본 연구에서는 PLGA를 이용하여 다공형성물질인 염화나트륨의 크기를 달리하여 용매캐스팅/염추출법을 이용한 다양한 다공크기를 갖는 다공성 지지체를 제조하여 섬유류 재생에 영향을 미치는 최적의 다공크기를 평가하고자 하였다. 섬유류 재생 위한 조직공학적 바이오 디스크로서 지지체 내부의 다공은 세포가 정착하여 증식하는 공간임과 동시에 세포의 성장과 분화에 필요한 산소와 영양분의 공급로이기도 하므로 세포가 증식함에 따라 발생하는 세포구성물의 축적으로 다공크기의 감소현상에 영향을 받는 90~180  $\mu\text{m}$ 와 같은 작은 다공크기를 갖는 지지체는 섬유류 재생에 불리하게 작용할 것으로 예상되며, 또한 425~600  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체에서는 체내에서의 세포외기질 형성과 체외에서의 세포간의 발생하는 여러 상호작용이 서로 다른 경향을 보임으로써 향후 상호보완을 통한 다양한 시도가 필요할 것으로 예상된다. 따라서, 본 연구에서는 높은 세포 생존률과 체내에서 원활한 세포외기질의 형성을 보인 180~250  $\mu\text{m}$  다공크기를 갖는 지지체가 여타의 지지체보다 섬유류 조직 형성에 적절할 것으로 사료되며 이는 향후 조직공학적 바이오 디스크 설계에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

**감사의 글:** 본 연구는 세포응용사업단(SC4110)과 보건복지부(0405-B001-0204-0006)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. W. Helen and E. G. Julie, *Biomaterials*, **27**, 5220 (2006).
2. K. Nishida, J. D. Kang, L. G. Gilbertson, S. H. Moon, J. K. Suh, M. T. Vogt, P. D. Robbins, and C. H. Evans, *Spine*, **24**, 2419 (1999).
3. E. H. Cassinelli, R. A. Hall, and J. D. Kang, *Spine J.*, **1**, 205 (2001).
4. H. E. Gruber, K. Leslie, J. Ingram, H. J. Norton, and E. N. Hanley, *Spine J.*, **4**, 44 (2004).
5. M. Alini, P. Markovic, M. Aebi, R. C. Spiro, and P. J. Roughley, *Spine*, **28**, 446 (2003).
6. C. A. Seguin, M. D. Grynepas, R. M. Pilliar, S. D. Waldman, and R. A. Kandel, *Spine*, **29**, 1299 (2004).
7. H. J. Ha, S. H. Kim, S. J. Yoon, S. W. Park, J. W. So, J. M. Rhee, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **32**, 26 (2008).
8. Y. K. Ko, S. H. Kim, H. J. Ha, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, Y. S. Son, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 67 (2007).

9. G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim, and H. B. Lee, *Bio-materials: Tissue-Engineering*, in "Webster's Biomedical Engineering Handbook", S. Webster, Editor, John & Wiley press, NY, pp 366-383 (2006).
10. S. K. Kim, S. H. Kim, H. R. Lee, M. H. Cho, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 388 (2005).
11. S. H. Kim, Y. K. Ko, H. J. Ha, S. J. Yoon, Y. S. Yang, M. S. Kim, G. Khang, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 331 (2007).
12. M. Honda, T. Yada, M. Ueda, and K. Kimata, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **58**, 767 (2000).
13. J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, C. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2005).
14. J. W. So, S. H. Kim, M. O. Baek, J. Y. Lim, B. H. Min, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 577 (2007).
15. J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 728 (2000).
16. E. K. Jeon, H. J. Whang, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
17. S. K. Kim, K. D. Hong, J. W. Jang, S. J. Lee, M. S. Kim, C. W. Han, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 149 (2004).
18. G. Khang, J. H. Jeon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **23**, 3 (1999).
19. P. X. Ma and J. W. Choi, *Tissue Eng.*, **7**, 23 (2001).
20. G. Khang, S. K. Kim, K. D. Hong, W. Y. Sang, C. W. Han, I. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 136 (2004).
21. Y. Hu, D. W. Grainger, S. R. Winn, and J. O. Hollinger, *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 563 (2002).
22. C. J. Liao, C. F. Chen, J. H. Chen, S. F. Chiang, Y. J. Lin, and K. Y. Chang, *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 676 (2002).
23. L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **21**, 1837 (2000).
24. H. J. Ha, S. H. Kim, S. J. Yoon, Y. K. Ko, E. K. Lee, Y. S. Son, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 416 (2006).
25. M. O. Baek, S. H. Kim, J. W. So, H. W. Roh, N. R. Lee, M. S. Kim, G. H. Ryu, Y. H. Cho, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 571 (2007).
26. T. G. Park and J. J. Yoon, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 722 (1999).
27. S. H. Kim, S. H. Kim, and Y. H. Kim, *Polymer Sci. Tech.*, **16**, 468 (2005).