

히알루론산이 함유된 SIS 스폰지와 섬유륜세포를 이용한 디스크재생

홍희경 · 이선경 · 송이슬 · 김대성 · 엄 신 · 김형은 · 이동원[†] · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과

(2010년 1월 20일 접수, 2010년 2월 8일 수정, 2010년 2월 10일 채택)

Biodisc Regeneration Using Annulus Fibrosus Cell with Hyaluronic Acid Impregnated Small Intestinal Submucosa Sponge

Hee Kyung Hong, Seon Kyoung Lee, Yi-Seul Song, Dae Sung Kim, Shin Eom, Hyoung Eun Kim, Dongwon Lee[†], and Gilson Khang[†]

Department of BIN Fusion Technology & Department of Polymer-Nano Science & Technology, Chonbuk National University, 664-14 Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

(Received January 20, 2010; Revised February 8, 2010; Accepted February 10, 2010)

초록: 소장점막하조직(SIS)은 면역반응이 없어 생체물질로 널리 사용되고 있다. 히알루론산(HA)은 천연 보습제라 불릴 정도로 친수성이 매우 뛰어나고 조직을 수복하기 위한 체내이식용 구조물로서 널리 사용되고 있는 천연고분자이다. 본 연구에서는 섬유륜세포를 이용한 조직공학 디스크 재생을 위해 HA를 함유한 SIS/HA 스폰지를 제조하였다. 제조된 스폰지 내부의 전자현미경 관찰 결과 열린 다공구조를 하고 있음을 확인하였고, FTIR 분석을 통해 C-O 관능기가 관찰되어 SIS/HA 스폰지 내부의 HA가 빠져나가지 않고 고르게 분포되어 있음을 확인하였다. 결론적으로 SIS/HA 스폰지는 SIS와 HA 각각의 특성을 유지하며 섬유륜세포의 성장에 유익한 환경을 제공함을 확인하였고, 이는 HA의 우수한 생체적합성 및 수분 보유능력에 기인된 것으로 사료된다.

Abstract: The porcine small intestinal submucosa (SIS) has been widely used as a biomaterial without immuno rejection responses and hyalunonic acid (HA) can be used as biocompatible materials to regenerate tissue. We developed the SIS sponge and HA loaded SIS sponges (SIS/HA) for the possibility of the application of the tissue engineering using annulus fibrosus (AF). SEM observation shows that SIS and SIS/HA sponges have interconnected and open pores. We demonstrated the presence of HA in SIS/HA sponge from C-O functional group observed by the FTIR analysis. In conclusion, we suggest that SIS/HA sponge may be useful to tissue engineering using AF cell. This may be due to the enhanced biocompatibility and higher water retention capacity of HA.

Keywords: small intestinal submucosa, hyaluronic acid, sponge, annulus fibrosus.

서 론

추간판 디스크(IVD)는 구조적으로 반유체상태의 하이드로젤로 중심부를 구성하는 수핵(NP)과 그 주변을 고리모양으로 감싸고 있는 섬유륜(AF) 및 연골 종판으로 구성된다.¹ 이러한 구조물들이 함께 작용하여 몸의 균형유지, 하중지지, 유연성을 책임지는 중요한 부위로 내부의 NP는 친수성을 지닌 젤과 유사한 조직으로 높은 수분함량을 가져 팽창압력을 제공하고 추간판 디스크에 걸리는 하중을 견디게 하며 다량의 프로테오글라이칸이 함유되어 있다. 바깥쪽의 AF는 척추에 가해지는 하중을 분산시키며 인장강도를 가지며 대부분 I형 콜라겐으로 이루어져 교원질을 중심으로 집중되는 라멜라 구조를 이루고 있다.^{2,3} 하지만, 외상, 노화, 기계적인 힘, 영양손실, 유전적 기질의 영향으로 인하여 추간

판 디스크 질환이 나타나며 특히 강한 외력이나 반복적, 지속적인 약한 외력이 가해지면 AF가 찢어지면서 이 부분을 통해 NP는 척추관 쪽으로 밀려 나와 신경을 자극하고 통증을 유발하는 추간판 탈출 증상을 일으킨다.⁴⁻⁷

생체조직공학이란 생체 내에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 지지체를 생체조직에 이식함으로써 새로운 조직을 형성하게 하는 일련의 기법이다.⁸ 현재까지 진행된 조직공학적인 연구는 조직의 편리성과 조직 재생의 유용성에 있어서 추간판 디스크 세포를 알지네이트 비드와 젤,^{9,10} 아카로오스,¹¹ 탈미네랄화된 골분(DBP),²⁵ PLGA의⁸ 재료를 이용한 3차원 형태를 가진 지지체에서 배양한 연구결과가 보고되고 있다.

본 연구에서 사용된 돼지의 소장점막하조직(porcine small intestinal submucosa, SIS)은 세포가 존재하지 않은 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않으며 90% 이상이 피부에 있는 콜라겐 I, II 형으로 구

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr, dlee@jbnu.ac.kr

성되어 있고, 그 외에는 소량의 콜라겐 V, VI형 등이 다양하게 존재한다. 또한, SIS는 약 60~90일간의 생분해능을 가지며 수분 흡수율이 높고 SIS 자체의 기계적 물성도 비교적 양호하다.¹² 또한, SIS는 세포외기질로 글리코사미노글리칸 및 피브로넥틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린, 히알루론산, 프로테오글라이칸, 상처 치유와 복원에 중요한 역할을 하는 염기성 섬유아세포 성장인자-2(FGF-2), 상피세포 성장인자(EGF), 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 등의 다양한 사이토카인을 다량 함유하고 있다. 이러한 SIS 내의 세포외기질 및 사이토카인의 존재는 세포의 부착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 관여하며 조직재생이나 상처 치유에 매우 유용하게 작용할 수 있다.^{13,14}

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 관절액, 연골, 피부 등 다양한 조직에서 발견되는 점액다당류로서 세포외기질을 구성하는 중요한 물질로서 많은 양의 물과 결합하여 젤 상태가 되어 관절의 윤활작용이나 피부의 유연성에 관여한다. 또한, HA는 근본적으로 생체를 구성하는 물질이기 때문에 생체적합성과 생분해성이 뛰어나며, 여러 가지 조직의 치유를 증진시키는 능력이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 세포외기질을 구성하는 중요한 물질로 점탄성을 가지고 조직 표면을 보호하는 윤활제 역할을 하며 면역 거부 반응이 없고 염증을 일으킬 확률이 적어 조직공학 분야에서 널리 사용되고 있는 생체재료이다.¹⁵⁻¹⁷ 이러한 탁월한 능력에도 불구하고 HA는 수용성, 빠른 체내 분해성 및 조직 내에서의 짧은 체류기간 때문에 응용이 제한되어져 왔다. 따라서, 이전 연구에서 이러한 단점을 보완하고 수용성의 특성을 갖는 HA를 포함한 SIS/HA 담체를 제조하여 생체활성물질 전달 디바이스로서의 가능성을 확인하였다.¹⁸ 이에 따라 본 연구에서는 긴 생분해능과 자체의 기계적 물성이 양호한 SIS와 세포의 점착성이 우수하여 세포가 성장하기에 좋은 조건을 가지는 HA를 이용하여 SIS/HA 스폰지를 제조하였고,

섬유류세포를 파종하여 스폰지의 물성 및 생물학적 특성을 분석하고 디스크 재생 조직공학용으로 적합한지를 평가하였다.

실 험

SIS 분리. SIS를 분리하기 위하여 돼지의 공장에 있는 지방조직을 우선 제거하고, 물로 깨끗이 공장 안과 밖을 세척한 다음, 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라서 식염수에 넣고 세척하였다. 잘라낸 공장을 집게와 손을 이용하여 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 SIS 층만을 분리하였다. 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, -80 °C 극저온 냉각기에 보관하였다. -80 °C에서 보관한 SIS를 동결 건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결 분쇄기를 이용하여 대략 180 μm 크기의 고운 분말로 만들었다.¹⁹

SIS 스폰지 제조. 3% 아세트산(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)에 0.1% 펩신(Sigma Chem.)을 함유한 용액에 1 wt%의 SIS 분말을 첨가시켜 상온에서 24시간 교반 후, 4 °C에서 24시간 보관하였다. 이를 실리콘 몰드(1×1 cm)에 분주하여 급랭후 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS를 얻었다. 제조된 스폰지는 95%의 에탄올에 EDC[1-에틸-3(3-3-디메틸 아미노프로필) 카보이미드 HCl, Sigma] 용액의 농도로 24시간 동안 경화시켰다. 경화후 3차 증류수로 세척하여 -80 °C에서 급랭후 재동결 건조하여 최종적으로 경화된 SIS 스폰지를 얻었다.¹⁹ 이를 Figure 1 (a)에 나타내었다.

SIS/HA 스폰지 제조. HA에 증류수를 넣어 녹여 상온에서 24시간 교반시킨 후, 4°C에서 24시간 보관하여 1% HA 용액을 만들었다. 48웰 플레이트에 완성된 SIS 스폰지를 넣고 SIS 스폰지 내부로 HA 용액이 충분히 흡수될 수 있도록, 200 μL씩 5번 주입하였다. 이를 4,

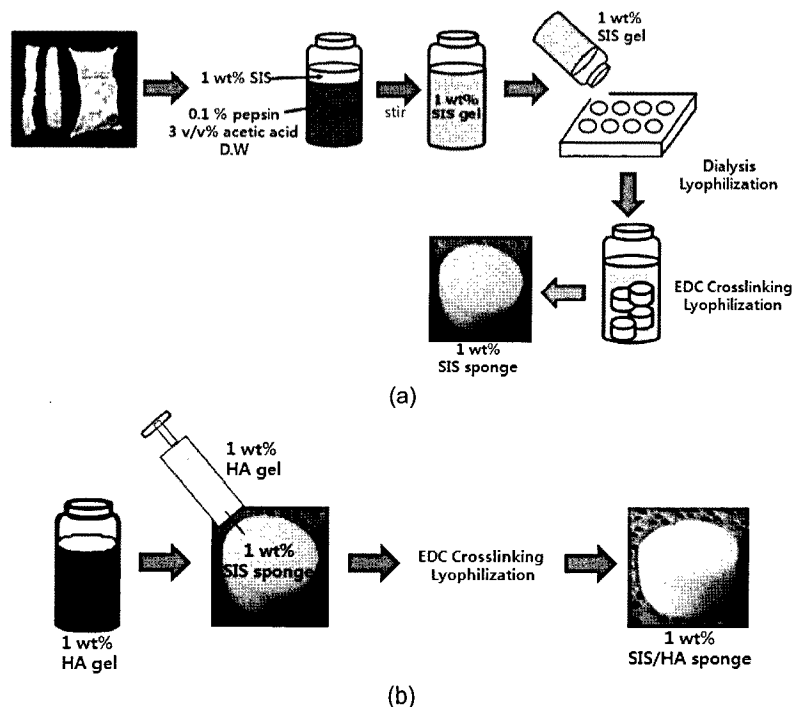


Figure 1. Schematic diagram of fabrication process of (a) SIS sponge; (b) SIS/HA sponge.

-10, -70 °C에서 각각 96시간 보관하고 동결 건조시켜 스폰지를 얻은 후 95%의 에탄올에 EDC 용액을 제조하여 24시간 동안 가교하였다. 3차 증류수로 세척하여 -80 °C에서 급랭 후 재동결 건조하여 최종적으로 SIS/HA 스폰지를 얻었다. 이를 Figure 1 (b)에 나타내었다.

섬유류세포의 분리 및 배양. 섬유류세포는 생후 4~5주된 암컷 뉴질랜드 화이트산 토끼(Damul Sci, Daejeon, Korea)의 L1~L5 척추마디로부터 분리하였다. 무균술식을 통하여 추간판으로부터 섬유류(AF) 조직을 각각 따로 분리하였다. 분리한 섬유류조직은 인산완충 식염수로 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.), 10% 우태혈청(FBS, Gibco BRL), 및 1% 항생제(AA, antibiotics~anti-mycotics)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이때, 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었으며, 섬유류세포를 계대 배양 2회째까지 실시하여 실험하였다.

전자주사현미경(SEM) 측정. 제조된 SIS와 SIS/HA 스폰지 내부의 형태학적 특성을 주사전자현미경(Hitachi, S-2250 N, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 5×5×1 mm의 크기로 절단하여 샘플들은 금속판에 고정시키고 플라즈마 스퍼터(Emitech, K575, UK)를 이용하여 200 Å 두께의 백금을 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태를 확인하였다.

다공크기 측정. 제조된 SIS, SIS/HA 스폰지의 다공크기를 측정하기 위하여 캄스코프(Camscope, Model SV-32, Sometch, Korea)를 통해서 300배의 배율에서 실시하였다.

MTT 분석. 세포의 부착도 및 증식률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma) 분석법을 이용하여 확인하였다. 배양한 섬유류세포는 0.05% 트립신(Trypsin-EDTA, Gibco)을 이용하여 수거한 후, 제조된 스폰지에 1×10⁵ cell/지지체의 농도로 계산하여 파종하였다. 세포가 파종된 지지체를 배양한지 1, 3, 5, 7 및 14일 후에 MTT 용액(50 mg/mL)을 100 µL씩 넣은 후 4시간 동안 5% CO₂하의 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 세척하고 디메틸설폭사이드용액(Sigma)을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파세척기로 1시간 30분 동안 결정을 용해하였다. 그 후, 96웰 플레이트에 샘플을 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

적외선 분광기 측정. 가교된 SIS/HA 지지체에서 HA 사슬의 가교결합 여부를 확인하고자 FTIR(Bio-Rad Digilab, FTS-165, Canada)로 측정하였다. 이 분석은 KBr 펠렛법을²⁰ 이용하여 각 2.5 mg의 스폰지를 알루미늄 용기에 넣고 시편을 만들어 측정하였다.

물 흡수성 실험. 처음 젖은 무게(W_{wet})를 측정한 뒤 동결건조시킨 후 건조 무게(W_{dry})를 측정하였다. 무게를 측정한 값들을 이용하여 다음의 식에 대입하여 수분 흡수성을 계산하였다.

$$W(\%) = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100$$

글리코사미노글리칸(sGAG) 및 콜라겐 양 측정. 스폰지에 세포 파종 후 3, 7 및 14일에 회수된 지지체를 급랭시킨 후 5 mTorr, -70 °C의 조건에서 동결 건조하였다. 준비된 지지체에 파파인 용액(125 µg/mL 파파인, 5 mM L-시스테인, 100 mM Na₂HPO₄, 5 mM EDTA, pH 6.8)을 300 µL씩 넣어 60 °C 온도에서 16시간 동안 반응시켰다. 지지체에서 sGAG 생산량은 1,9-다이메틸렌 블루(DMMB) 분석법을 이용하여 측정하였다. 파파인에 반응시킨 용액을 50 µL 취해 200 µL DMMB 용액과 혼합하여 상온에서 20분 동안 천천히 교반한 후 96웰 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트리더를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지지체에서 생산된 총 sGAG 양은 황산콘드로이틴(Sigma)을 기준으로 하여 계산하였다. 콜라겐의 생산량은 반응시킨 용액에 수산화나트륨을 첨가하여 2 N 농도로 만든 후 이 용액을 50 µL 취하여 120 °C 온도에서 20분 동안 오토클레이브 한다. 여기에 클로라민-T용액을 450 µL 첨가하여 실온에서 25분 동안 천천히 교반하고 500 µL Enrich's 알데하이드 용액을 넣어 65 °C 온도에서 20분 동안 반응시킨 후 96웰 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트리더를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지지체의 콜라겐 생산량은 히드록시프롤린(Sigma)을 측정함으로써 계산하였다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 유전자의 발현 정도를 확인하기 위해 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 실시하였다. 배양된 세포의 배양액을 제거하고 1 mL의 Trizol(Invitrogen TM, 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 RNA로 분리하였다. 상층액을 취하여 이소프로판올(Sigma)과 poly-acryl carrier(Molecular Research Center, Inc)로 RNA를 침전시킨다. 분리된 RNA를 Oligo(dT) 12-18 프라이머(Invitrogen), 5× first strand buffer(Invitrogen), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen), Superscript II RNase H 역전사 트랜스크립타이즈(Invitrogen), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP 600, Takara Bio Inc, Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다. 이렇게 역전사시킨 cDNA를 β-actin, 제 1형 콜라겐 프라이머, 제 2형 콜라겐 프라이머(Geno Tech, KOREA)를²¹⁻²³ 이용하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 염기서열 조건은 Table 1에 나타내

Table 1. The Sequence and PCR Reaction Cycles of β-Actin, and Type I, II Collagen Primer

Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles
β-actin (227 bp)	F : 5'-gcc atc ctg cgt ctg egac ctg gct-3'	d=94 °C; 30 sec	25
	R : 5'-gtg atg acc tgg ccg tca ggc agc-3'	a=59 °C; 60 sec	
		e=72 °C; 30 sec	
Type I collagen (312 bp)	F : 5'-gat gcg ttc cag ttc gag ta-3'	d=95 °C; 30 sec	35
	R : 5'-ggg ctt ccg ctg gtc ttg ta-3'	a=65 °C; 30 sec	
		e=72 °C; 30 sec	
Type II collagen (394 bp)	F : 5'-gac ccc atg gac att gga ggg-3'	d=94 °C; 45 sec	35
	R : 5'-atg ttt taa aaa ata cag ag-3'	a=59 °C; 30 sec	
		e=72 °C; 60 sec	

(d) Denaturation. (a) Annealing. (e) Extension.

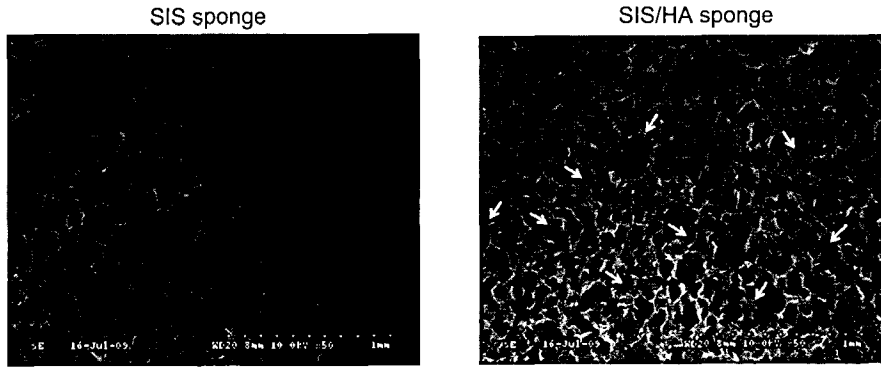


Figure 2. SEM micrographs of SIS sponge, SIS/HA sponge (magnification $\times 50$) (arrow is point out invaded HA).

었다.²⁴ PCR후 증폭된 DNA를 1.5 w/v% 아가로스젤(Sigma)에 100 V에서 25분 동안 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain Cambrex, UK)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 촬영하여 밴드의 발현정도를 확인하였다.^{25,26}

결과 및 토론

SIS, SIS/HA 스폰지 다공구조 확인. 본 연구에서는 이전의 실험에서 결정된 특성 조건을 바탕으로 천연재료인 SIS와 HA를 이용하여 SIS 스폰지에 HA를 함유한 SIS/HA 스폰지를 제조하였다.¹⁸ 제조된 스폰지를 이용하여 조직공학적 디스크 재생을 위한 지지체로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 제조한 스폰지 내부의 SEM 사진은 Figure 2에 나타내었다. 각각의 스폰지 외형적 형태는 몰드의 빈 공간과 똑같은 형태로 얻어졌으며, 수축, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 스폰지의 내부 다공 구조는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 구조를 하고 있는 것으로 나타났으며, HA를 함유한 스폰지는 다공안에 HA가 함유되어 SIS 스폰지보다 작은 다공을 확인하였다. 또한, 다공 크기를 캡스코프를 이용하여 측정된 평균값을 Table 2에 나타내었다.

적외선 분광기 측정. FTIR 분석을 통하여 SIS 스폰지에 HA를 함유하여 EDC로 경화시킨 스폰지내의 화학적 성분과 시간이 지나도 HA가 스폰지내에서 유지되고 있는지를 확인하기 위해 정성적 분석을 하여 Figure 3에 나타내었다. 이전 연구에서 SIS 스폰지 측정결과 아미드 I(1653 cm^{-1}), 아미드 II(1543 cm^{-1}) 및 아미드 III(1453 cm^{-1})의 피크 확인을 통하여 EDC 결합으로 SIS의 주성분인 콜라겐에 많이 존재하는 카르복실기의 활성으로 인한 아민의 치환반응으로 아미드를 형성하고, 카르복실기의 상대적인 감소가 일어남을 확인하였다.¹² SIS/HA 스폰지는 SIS 스폰지에서 확인한 아미드 I, II, III가 모두 관찰되었고 HA의 사슬에서만 관찰되는 C-O(1200~1300 cm^{-1})의 관능기를 확인하였다.¹⁸ 본 연구에서도 동일한 관능기를 확인하였고 또한 시간이 지나도 HA가 스폰지내에서 유지되고 있음을 확인하였다. 하지만, 이 관능기가 시간이 지나면서 조금 줄어드는 모습을 보이는데 이것은 HA가 조금씩 녹아 나왔기 때문인 것으로 사료된다.

Table 2. The Mean of Pore Size on SIS and SIS/HA Sponges

	SIS sponge	SIS/HA sponge
Pore size (μm)	97 \pm 2.12	90 \pm 2.73

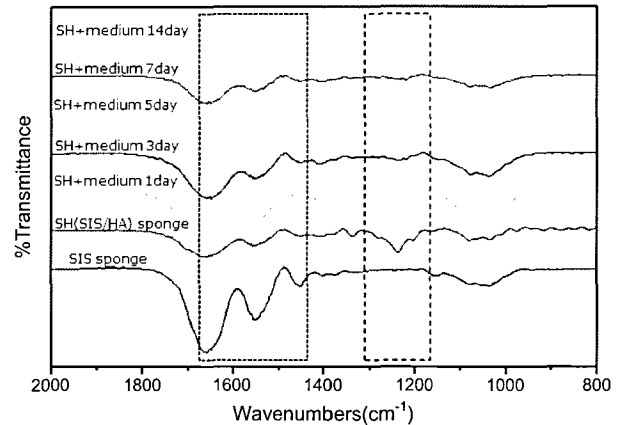


Figure 3. FTIR spectra of SIS, SIS/HA sponge and SIS/HA sponge during in medium cultivation period(square is point out C-O functional group).

MTT 분석. 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 MTT 분석법을 이용하여 스폰지에서 섬유류세포의 증식률을 비교하였고, 이를 Figure 4에 나타내었다. 1일에는 세포의 부착과 증식에 영향을 주는 SIS 스폰지에서 높은 결과를 보였지만, 3일부터는 각각의 SIS, HA 스폰지보다 HA를 함유한 SIS/HA 스폰지에서 높은 세포 증식률을 확인할 수 있었다. 또한, 시간이 경과하여도 처음과 같은 형태를 유지하며 세포의 증식률이 유지되는 것을 확인하였다. HA 스폰지는 7일부터는 세포의 증식률이 감소하였는데 이는 HA의 단점인 빠른 분해성 때문인 것으로 사료되며, SIS/HA 스폰지는 스폰지에 함유된 기계적 물성이 양호한 SIS와 HA가 높은 세포친화력과 수분흡수율을 제공하여 섬유류 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 HA가 서로 긍정적인 영향을 주며 적합한 환경을 제공한 것이라 사료된다.^{16,27}

물 흡수성 측정. HA의 함유에 따른 스폰지의 친수성 효과를 Figure 5에 나타내었다. HA를 함유한 SIS/HA 스폰지가 SIS 스폰지보다

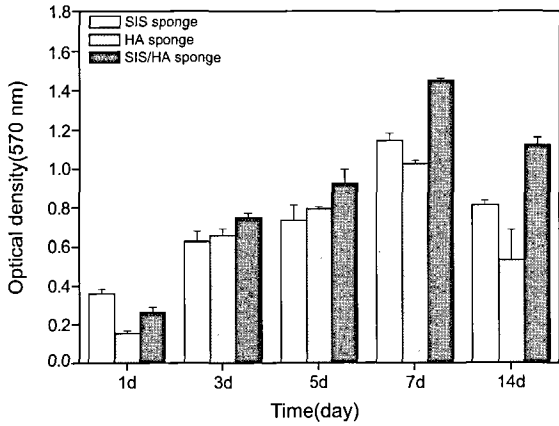


Figure 4. Cell viability of AF cells in SIS, HA and SIS/HA sponges analyzed by MTT assay after 1, 3, 5, 7 and 14 day post-seeding *in vitro* (n=5).

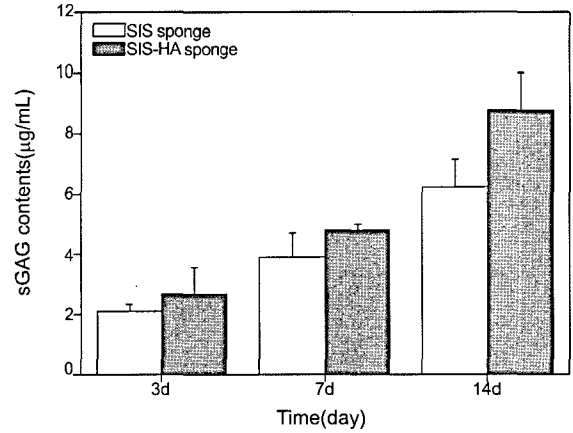


Figure 6. Sulfated glycosaminoglycan (sGAG) contents of SIS and SIS/HA sponges after 3, 7 and 14 day of cultivation (n=5).

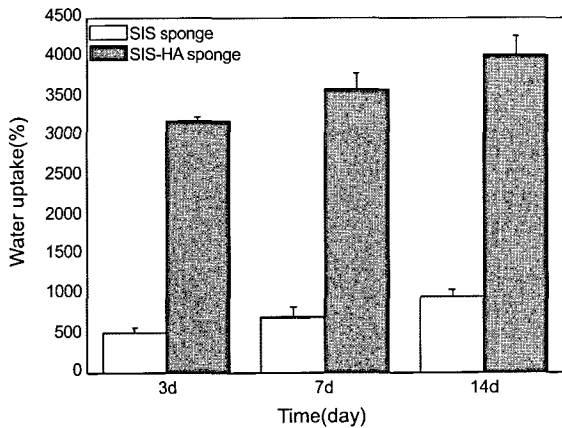


Figure 5. The water uptake ability of SIS and SIS/HA sponges prepared by freeze-drying method (n=5).

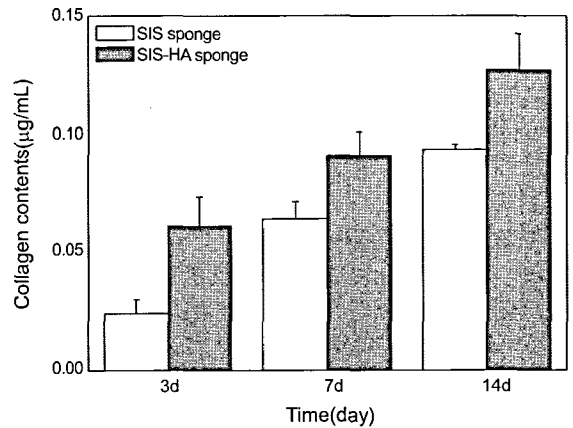


Figure 7. Collagen contents of SIS and SIS/HA sponges after 3, 7 and 14 day of cultivation (n=5).

5~6배 높은 흡수율을 나타내었다. HA는 대표적인 프로테오글리칸의 한 종류로서 코어 단백질을 중심으로 많은 수의 글루코사미노글라이칸들이 결합되어 있는 구조를 가지는데, 이러한 구조적 특징으로 인하여 친수성을 증가시켜 수분을 함유하는 능력이 우수하여 이와 같은 결과를 나타낸 것으로 사료된다.^{15,16}

글리코사미노글리칸(sGAG) 및 콜라겐 함성량 측정. 섬유류세포를 파종한 스폰지에서 섬유류의 세포외기질의 대부분을 차지하는 sGAG 함성량과 콜라겐 함량을 Figures 6 및 7에 나타내었다. SIS 스폰지보다 HA를 함유한 SIS/HA 스폰지에서 sGAG, 콜라겐 함량이 높음을 확인할 수 있었다. 이는 상기의 물 흡수율 결과와 유사한 결과로 지지체내에 파종된 섬유류세포의 sGAG 기질과 물 흡수율과의 연관성을 알 수 있게 해준다. HA를 함유한 스폰지가 섬유류의 형성에 적절한 환경을 제공해주고 지지체로서의 역할을 하는 것으로 사료된다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. HA가 섬유류세포의 mRNA 발현에 주는 영향을 확인하기 위하여 각 스폰지에 세포를 파종한 후 3, 7일 후에 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하여 Figure 8(a)에 나타내었다. 모든 실험군에서 house keeping gene인 β -actin을 일정하게 발현됨을 확인할 수 있었으며 섬유류의 주요 성분인 제 I형 콜라겐의 발현은 HA를 함유한 SIS/HA 스폰지에서 매우 높게 발현됨을 확인할 수

있었고 섬유류에 소량 성분인 제 II형 콜라겐의 발현은 낮게 나타났다가 거의 사라짐을 확인할 수 있었다. 발현 또한 β -actin에 대한 밴드의 광도를 표준화하여 Figure 8(b)에 나타내었다. 제 I형 콜라겐의 경우 전기영동 결과와 마찬가지로 SIS/HA 스폰지에서 그 값이 높았으며 시간이 흐름에 따라 발현양이 증가하고 있음을 알 수 있었다. 이는 섬유류세포가 HA를 함유한 SIS/HA 스폰지에서 그 기능을 잘 유지하는 것으로 사료된다.

SEM 측정. 스폰지에서 섬유류세포의 부착과 세포 형태를 알아보기 위하여 SEM 분석을 실시하였으며, 이를 Figure 9에 나타내었다. SEM 분석결과, SIS 스폰지내의 세포는 구형 형태의 모양으로 다공 내부에 자리잡고 있었지만 HA가 함유된 SIS/HA 스폰지내의 세포는 구형 형태와 넓게 퍼진 모양으로 다공벽을 뒤덮고 있는 섬유류세포의 형태가 관찰되었다. 이것은 세포외기질을 구성하는데 긍정적 영향을 주는 HA의 영향을 받아 섬유류기질의 형성에 적절한 환경을 제공한 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 세포의 부착과 조직형성을 위한 3차원적 지지체인

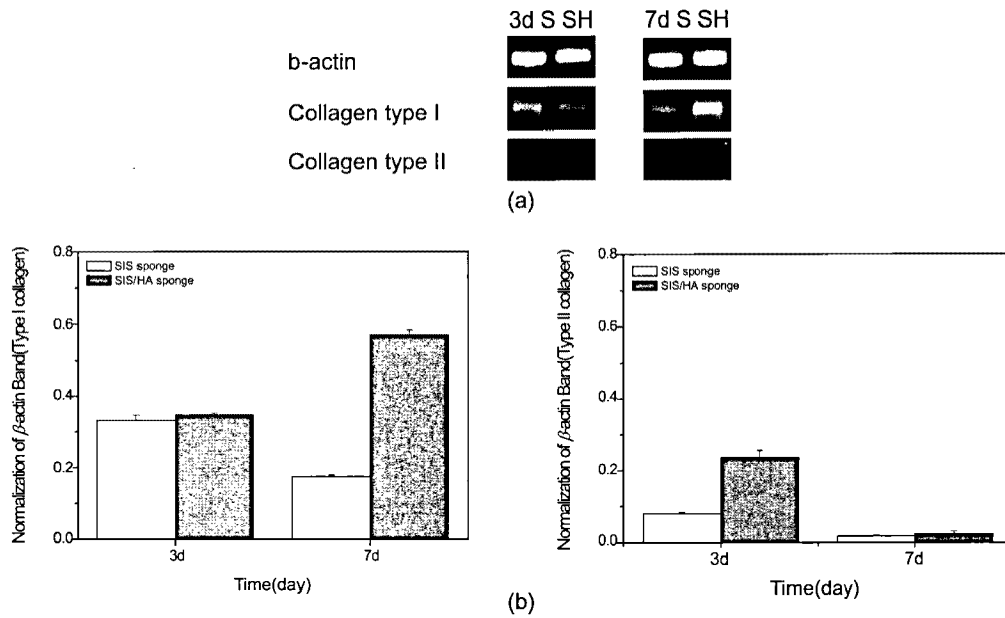


Figure 8. Gene expression profiles of β -actin, type I collagen, type II collagen as analyzed by RT-PCR after 3, 7 day. (a) The result of agarose gel electrophoresis. (b) Normalization of β -actin expression by collagen type I and collagen type II.

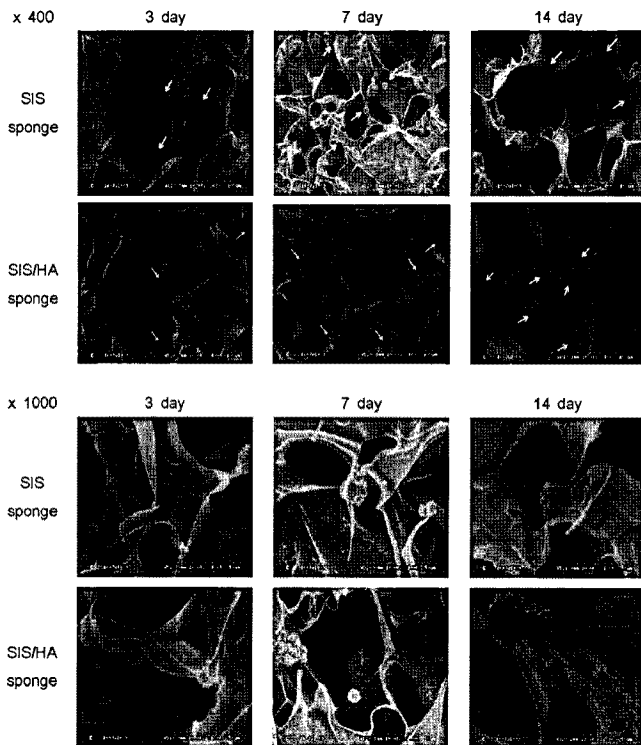


Figure 9. SEM microphotographs of AF cell morphology on SIS and SIS/HA sponges surfaces : at 3, 7 and 14 day post cultivation (magnification $\times 400$, $\times 1000$).

스폰지를 제조한 후, SEM을 통하여 제조된 스폰지 내부에 상호연결된 다공구조를 가짐을 확인하였고, SIS/HA 스폰지에 HA가 다공에 침투되어 SIS 스폰지보다는 작은 다공을 확인하였다. 또한, SIS 스폰지에 HA를 첨가하여 EDC로 경화한 결과 C-O 관능기를 확인함으

로써 SIS/HA 스폰지내에서 HA가 시간이 지나도 빠져나가지 않고 고르게 분산되어 있음을 확인하였다. MTT 분석법을 통하여 HA가 섬유류세포의 성장과 증식에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였고, sGAG 및 콜라겐 생산량도 더 높음을 확인할 수 있었다. 이것은 HA가 스폰지내에 많은 수분을 함유케 하고 윤활성을 주어 세포의 성장과 대사, 형태 등에 영향을 미치는 세포외기질의 합성에 적절한 환경을 제공하였을 것이라 사료된다. 따라서, 본 연구에서 제조한 SIS/HA 스폰지는 천연재료로서 다루기 쉽고 SIS와 HA 각각의 특성을 모두 내재하고 있어 섬유류세포의 성장에 긍정적인 영향을 미치므로 디스크 조직공학적 담체로서의 응용에 적합하다고 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지가족부의 근골격계 바이오장기센터 (0405-BO01-0204-0006) 및 WCU(R31-2009)의 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. J. A. Buckwalter, *Spine J.*, **20**, 1307 (1995).
2. S. R. Bibby, D. A. Jones, R. B. Lee, J. Yu, and J. P. Urban, *Joint Bone Spine*, **68**, 537 (2001).
3. J. Y. Lim, S. H. Kim, S. W. Park, J. W. So, M. O. Back, M. S. Kim, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 96 (2008).
4. E. Hedbom and D. Heinegard, *J Biol. Chem.*, **264**, 6898 (1989).
5. E. Hedbom and D. Heinegard, *J Biol. Chem.*, **268**, 27307 (1993).
6. E. H. Cassinelli, R. A. Hall, and J. D. Kang, *Spine J.*, **1**, 205 (2001).
7. H. E. Gruber, K. Leslie, J. Ingram, H. J. Norton, and E. N.

- Hanley, *Spine J.*, **4**, 44 (2004).
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. B. A. Maldonado and T. R. Oegema, *J. Orthop. Res.*, **10**, 677 (1992).
 10. K. Chiba, G. B. Andersson, and K. Masuda, *Spine J.*, **22**, 2885 (1997).
 11. H. E. Gruber, E. C. Fisher, J. B. Desai, A. A. Stasky, G. Hoelscher, and E. N. Hanley, *Exp. Cell Res.*, **235**, 13 (1997).
 12. H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polym. Sci. Tech.*, **2**, 194 (2004).
 13. S. F. Bdyak, B. Kropp, and T. B. McPherson, *Tissue Eng.*, **4**, 379 (1998).
 14. E. H. Ledet, A. L. Carl, D. J. Dirisio, M. P. Tymeson, L. B. Andersen, C. E. Sheenhanm, B. Kallakury, M. Slivka, and H. Serhan, *Spine J.*, **2**, 188 (2002).
 15. G. Prestwich, D. Marecak, J. Marecek, K. Vercruysse, and M. Ziebell, *J. Control. Release*, **53**, 93 (1998).
 16. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Seo, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
 17. J. G. Thalhammer, M. Vladimirova, and B. Bershadsky, *Anesthesiology*, **82**, 1013 (1995).
 18. J. Y. Lim, S. H. Kim, G. Khang, and J. M. Rhee, *Polymer (Korea)*, **32**, 415 (2008).
 19. K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 96 (2008).
 20. L. A. Forato, R. B. Filho, and A. Colnago, *Anal. Biochem.*, **15**, 136 (1998).
 21. E. K. Lee, J. S. Lee, H. S. Park, C. H. Kim, Y. J. Gin, and Y. S. Son, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 94 (2005).
 22. G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **534**, 235 (2003).
 23. K. Lee, J. G. Roper, and J. Wang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 437 (2008).
 24. H. J. Ha, S. H. Kim, S. J. Yoon, Y. K. Ko, E. K. Lee, Y. Son, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 416 (2006).
 25. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, H. J. Ha, S. J. Yoon, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 14 (2007).
 26. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yun, H. J. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. Son, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).
 27. J. Entwistle, C. L. Hall, and E. A. Turley, *J. Cell Biochem.*, **61**, 569 (1996).