탈미네랄 골분이 비율별로 포접된 알지네이트 미세캡슐을 이용한 조직공학적 연골재생

김아람 · 김혜민 · 이정근 · 이지혜 · 송정은 · 윤건호* · 이동원 · 강길선†

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자소재융합연구소, 고분자나노공학과, *가톨릭대학교 의과대학 내분비내과
(2012년 6월 20일 접수, 2012년 7월 6일 수정, 2012년 7월 30일 채택)

Effect of Ratio of Demineralized Bone Powder with Alginate Microcapsules on Articular Cartilage Regeneration

A Ram Kim, Hye Min Kim, Jung Keun Lee, Ji Hye Lee, Jeong Eun Song, Kun Ho Yoon*,
Dongwon Lee, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech., Polymer Fusion Res. Center & Dept. of Polymer Nano Sci. Tech., Chonbuk National Univ.,
567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, 505 Banpodong, Seocho, Seoul 137-701, Korea

(Received June 20, 2012; Revised July 6, 2012; Accepted July 30, 2012)

초록: 해조류로부터 얻어지는 알지네이트는 캡슐화된 세포의 생존율에 긍정적인 영향을 끼치며 살아있는 세포를 신속하게 포접하여 캡슐화할 수 있어 세포이식을 위한 생체재료 분야에 널리 쓰인다. 탈미네랄화된 골분(DBP)은 천연 뼈조직으로부터 유래되어 조직과의 반응정도가 낮고 항원성 또한 낮아 임상에 적용되어 사용되어 왔다. 알지네이트에 비율별 DBP를 포함시켜 연골세포를 파종한 뒤 미세캡슐을 제조한 후 MTT 분석을 통하여 세포의 부착 및 증식률을 관찰하였고 glycosaminoglycan(sGAG)과 콜라겐 함량 측정과 연골세포의 특정유전자 표현형을 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다. 또한 연골세포가 파종된 알지네이트 미세캡슐을 누드마우스의 피하에 이식한 뒤 적출하여 면역화학적 염색을 실시하였다. 실험 결과 1%의 DBP를 함유한 알지네이트 미세캡슐에서 가장 높은 세포 증식률을 보였고 표현형 유지에도 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이번 연구 결과를 토대로 알지네이트와 DBP를 이용한 미세캡슐을 제조함으로써 DBP내의 성장인자와 알지네이트의 상호작용으로 인하여 연골세포의 성장에 긍정적인 영향을 미쳐 생체공학적 지지체로 적합할 것으로 예상된다.

Abstract: Alginate, obtained from the seaweeds, is a widely used biomaterial for cell transplantation, since its positive effect on viability of capsulized cells and its easier encapsulation capability of living cells. Demineralized bone powder (DBP), derived from the natural bone tissue, is widely applied for clinical trials for its low rate of reaction and antigenicity. A chondrocyte was seeded into an alginate with DBP of different contents, and a microcapsule was produced. The adhesion and proliferation of cells was observed through the MTT analysis, and the PCR was applied to estimate the content of the glycosaminoglycan (sGAG) and collagen, and confirm the specific genetic pattern of the chondrocytes. Also, the alginate microcapsule where the chondrocyte is seeded was extracted after transplantation under the skin of a nude mouse, and was immunochemically stained. The experimental result confirmed that the alginate microcapsule containing 1% of DBP not only showed the highest proliferation of cell but had a positive effect of chondrocytes by the interaction between the alginates and the growth factor in DBP. It can be expected that the microcapsule with application of the alginates and DBP might be an appropriate scaffold for tissue engineering.

Keywords: alginate, demineralized bone powder, microcapsule, biocompatibility.

서 론

생체조직공학은 생체에서 완전히 흡수 및 분해되고 세포와 친화력이 있는 적절한 지지체에 세포를 체외 배양하여 실제

장기와 유사한 구조와 기능을 가진 인공 조직을 형성하고 생체 조직에 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상 및 복원하는 것을 목적으로 하는 기법이다.¹⁻³

생체재료는 손상된 조직이나 상처부위를 대체하기 위하여 여러 의학 분야에 널리 이용되고 있으며,⁴ 천연이나 합성고분자로 제조된 생체재료는 상처 드레싱,⁵ 치과 이식재료, 조직

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

공학⁶ 단백질 및 생체 내 약물전달을 위한 마이크로캡슐의⁷ 용도로 사용되고 있다. 현재까지 많은 천연 및 합성고분자들이 조직공학에 사용되고 있다. 합성고분자의 경우 유기합성을 통하여 원하는 다양한 종류를 제조할 수 있으나 안전성 측면에서 사용이 제한적이고 천연고분자의 경우 자연에서 얻으므로 비교적 안정적이거나 선택이 한정적이다.⁸ 이러한 생체 지지체로 적합한 물질 중의 하나로 알긴산이 널리 쓰이고 있다.

알긴산은 선형 다당류로 만뉴론산(M)과 글루론산(G)으로 이루어진 공중합체이다.⁹⁻¹² 갈조류의 중요 구성성분으로 많은 음이온의 카르복실기를 함유하고 있어¹³ 2가 양이온(Ca^{2+} , Ba^{2+})과 결합하여 하이드로젤을 비교적 쉽게 생성한다.¹⁴⁻¹⁸ 알긴산은 생체적합성이 뛰어나고 독성이 낮아 의료용 재료로서 조직공학뿐만 아니라 다양한 분야에서 사용되어 왔다.¹⁹ 그러나 체내 이식시 알긴산 캡슐에 대한 숙주의 면역거부반응으로 인하여 캡슐화된 세포의 기능상실, 대식세포의 과증식으로 인하여 이식의 문제점을 야기시킨다.²⁰

이를 해결하기 위하여 이전의 연구에서 개선된 *Korbitt* 방법을 이용하여 정제과정을 거쳐 면역거부반응을 일으킨다고 보고된 만뉴론산의 함량을 감소시킨 정제된 고순도 알긴산을 제조하고 특성분석, 구조분석 및 면역반응을 통하여 고순도 알긴산의 효과를 확인하였다.^{21,22} 본 연구에서는 이러한 알긴산을 이용하여 생체적합성에 관하여 연구를 진행하기 위하여 생체활성재료인 탈미네랄골분(DBP)을 포접시킨 알지네이트 미세캡슐을 제조하여 연구를 진행하였다.

천연 뼈조직으로부터 유래된 생체활성재료인 DBP는 뼈형성을 초래한다고 Urist에 의하여 보고된 이후 생체활성천연 재료로서 새로운 뼈의 성장에 강력한 유도체로 작용한다. DBP는 콜라겐, 프로테오글라이칸과 같은 뼈형성단백질(BMP) 등 뼈와 연골형성에 영향을 주는 많은 사이토카인을 함유하고 있어 뼈 결손부위에 충전제로 널리 사용되고 있다.²¹⁻²⁴ 또한 염증반응을 감소시킨다고 보고되어 광범위하게 임상용으로 사용되고 최근에는 신생혈관 형성에도 영향을 끼친다고 보고되었다.^{25,26}

전 연구 결과를 바탕으로 본 연구에서는 함량별 DBP를 포접한 알지네이트 미세캡슐이 세포배양에 미치는 영향을 알아보고자 알지네이트 미세캡슐에 연골세포 배양 실험을 수행하였고 함량별 DBP와 알지네이트 미세캡슐의 화학적 변화를 알아보기 위해 적외선분광법을 실시하였으며 세포의 부착 및 증식, 분포를 MTT 분석 및 glycosaminoglycan(sGAG), 콜라겐 함량 측정, 조직학적 염색법으로 평가하였다.

실 험

시약 및 재료. 사용된 알지네이트는 평균분자량이 75000~200000 g/mole인 것을 사용하였으며, 글루론산의 함량이 ~60%인 알지네이트(Pronova UP- LVG, Novamatrix, Oslo, Norway)

를 사용하였다. 실험에 사용된 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

연골세포의 분리 및 배양. 연골세포는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼의 무릎 관절에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후 털을 제거하고, 멸균된 수술용 가위로 무릎 관절을 절개해 연골 부위만 취한 다음 인산완충용액(PBS, pH7.4, Gibco, NY, USA)으로 여러 번 세척 후 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, Indianapolis, USA)용액으로 12시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 하에서 조직을 용해시켰다. 조직이 담긴 용액을 70 μm의 나이론 메쉬로 거른 후 원심분리하여 PBS로 3회 세척한 다음 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco)과 F-12 영양배지 혼합액(Ham's F-12, Gibco), 10% 우태아혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신)와 200 mM L-글루타민(Gibco), 50 μg/mL 아스코르빈산(sigma), 15 mM HEPES buffer 1 M(Gibco)이 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었다.

DBP 제조. DBP는 Urist방법으로 제조하였다.^{27,28} 소의 대퇴부의 골막과 속막을 제거한 후 지방을 제거하기 위하여 클로로포름과 메탄올을 1:1로 혼합한 용액을 초음파세척기를 이용하여 세척을 하고 아세톤을 사용하여 수분을 제거하였다. 탈미네랄화시킨 뼈를 잘게 부쇄 PBS로 세척하여 최종 pH를 7.4로 맞추어 동결분쇄기(6700 SPEX Inc, USA)로 180 μm 이하의 분말을 얻었다.²⁹⁻³³

미세캡슐화 방법. 연골세포는 계대배양 2 회째에 트립신(Gibco)을 이용하여 수확하였으며 알지네이트를 KRH(Krebs-Ringer-HEPES) 용액에 녹여 2% 용액을 만든 후 1 mL 당 5×10^5 세포농도로 희석하여 DBP가 포접된 알지네이트 부유액을 만든 후, 공기분사형 방울제조기(Coaxial airflow bead generator, Novamatrix)에 연결된 주사기 펌프(No.55-1111, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)에 방울제조기의 공

Figure 1. Schematic diagram illustrating the fabrication process of alginate/DBP microcapsule.

Figure 2. Microscope images of alginate microcapsules with various contents of DBP (1 Day).

기주입구로 공기관을 연결해 CO_2 를 6.0 kgf/cm^2 의 압력으로 주입하였다. 주사기 펌프를 1.6 mL/hr 속도로 밀어 넣으면서 알지네이트 부유액을 10 mM Ba^{2+} 용액으로 낙하한 후, 10 분간 알지네이트 캡슐이 충분히 굳어지게 한다(Figure 1). 10 분 후, 캡슐을 HBSS(Hank's Balanced Salt solution) 용액으로 2 차례 세척한 후, 배양액에서 $37.5\% \text{ CO}_2$ 환경 하에서 배양시켰다(Figure 2).

MTT 분석. 미세캡슐화된 알지네이트에 포접된 세포의 증식률을 분석하기 위하여 MTT[3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드] 분석을 각각 1, 3, 5, 7, 10 및 14 일째 시행하여 주었다. MTT 용액(Sigma, 50 mg/mL)을 $100 \mu\text{L}$ 를 넣어준 후, 4시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)를 1 mL 첨가 후, 샘플을 각 $100 \mu\text{L}$ 씩을 채취하여 microplate reader 570 nm 의 흡광도를 이용하여 세포 증식률을 분석하여 주었다.

sGAG 및 콜라겐 함량 측정. 지지체 세포파종 후 1, 2 및 3주에 회수된 지지체를 급랭시킨 후 5 mTorr , -70°C 조건에서 동결건조하였다. 준비된 지지체에 파파인 용액($125 \mu\text{g/mL}$ 파파인, 5 mM L -시스테인, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 5 mM EDTA , $\text{pH } 6.8$)을 $300 \mu\text{L}$ 씩 넣어 60°C 온도에서 16시간 동안 반응시켰다. 지지체에서 sGAG 생산량은 1,9-다이메틸렌 블루(DMMB) 분석법을 이용하여 측정하였다. 파파인에 반응시킨 용액을 $50 \mu\text{L}$ 취해 $200 \mu\text{L}$ DMMB 용액과 혼합하여 상온에서 20분 동안 천천히 교반한 후 96웰 플레이트에 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더를 사용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 지지체에서 생산된 총 sGAG량은 황산콘드로이틴(Sigma)을 기준으로 하여 계산하였다. 콜라겐의 생산량은 반응시킨 용액에 수산화나트륨을 첨가하여 2 N 농도로 만든 후 이 용액을 $50 \mu\text{L}$ 취하여 120°C 온도에서 20분 동안 오토클레이브한다. 여기에 클로라민-T 용액을 $450 \mu\text{L}$

첨가하여 실온에서 25분 동안 천천히 교반하고 $500 \mu\text{L}$ Enrich's 알데하이드 용액을 넣어 65°C 온도에서 20분 동안 반응시킨 후 96웰 플레이트에 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더를 사용하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 지지체의 콜라겐 생산량은 하이드록시프롤린(Sigma)을 측정함으로써 계산하였다.

DBP의 비율에 따른 특정 mRNA 발현도 확인. DBP가 비율별로 포접된 알지네이트에 파종된 연골세포의 특정 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 1, 2 및 3 주째에 회수된 미세캡슐을 55 mM 의 구연산나트륨과 150 mM 의 염화나트륨 및 30 mM 의 EDTA(Sigma Aldrich; Germany) 용해용액에 1.5 mL 씩 담아 20분 동안 처리하여 알지네이트를 제거해준 후, PBS로 2차례 세척하여 세포만 수거해준다. 그 후, 1 mL 의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션한 다음 1.5 mL 의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL 의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4°C , 12000 g 에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™, $5 \times$ first strand buffer, Invitrogen™), dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor (Invitrogen™, Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립타제(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다.^{20,33-35} 역전사시킨 cDNA를 β -actin 및 Type II Collagen, Type I Collagen, Aggrecan PCR을 수행하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 $1.5\%(\text{w/v})$ 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K.)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 β -actin 및 Type II Collagen, Type I Collagen, Aggrecan mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다. 프라이머는

Table 1. PCR Primers and Protocol for Thermal Cycling

Species	Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles
Rabbit	β -actin	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; 1 min E=72 °C; 45 sec	
	Type collagen	F : 5'-gat gcg ttc cag ttc gag ta'	D=95 °C; 30 sec A=65 °C; 30 sec	25
		R : 5'-ggg ctt ccg gtg gtc ttg ta-3'	E=72 °C; 30 sec	
	Type collagen	F : 5'-gca ccc atg gac att gga ggg-3'	D=94 °C; 1 min	35
		R : 5'-atg ttt taa aaa ata cag ag-3'	A=59 °C; 1 min E=72 °C; 45 sec	
	Aggrecan	F : 5'-gag atg gag ggt gag gtc-3'	D=94 °C; 45 sec	35
		R : 5'-acg ctg cct cgg gct tc-3'	A=53 °C; 30 sec E=72 °C; 1 min	

제노텍(Korea)으로부터 구입하였으며 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

압축강도 측정 분석. DBP 함량별로 제조된 알지네이트 미세캡슐의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, Food Technology Corporation, Sterling, Virginia, USA)를 이용하였다. DBP 함량에 따른 압축강도를 측정하기 위해 만능물성측정기의 설정 값으로 측정거리는 0.5 mm, 측정스피드는 20 mm/sec, 측정 힘은 0.05 N으로 하였다.

알지네이트 캡슐의 구조적 분석. 함량별 DBP와 알지네이트의 화학적 변화를 분석하기 위하여 FTIR(GX, Perkin Elmer, 미국)을 이용하였으며 400~4000 cm^{-1} 의 파장범위에서 분석하였다.

조직학적 평가. 조직학적 평가를 위하여 정제된 DBP를 함량별로 포함한 알지네이트 미세캡슐을 면역결핍쥐의 피하에 이식한 후 4주 뒤 회수하여 10% 포르말린(Sigma) 용액에 고정하였다. 그 후 조직을 파라핀 블록으로 제작하여 6 μm 의 두께로 잘라 슬라이드에 고정하였다. 조직절편을 탈파라핀 과정을 거친 후 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색과 Safranin-O 염색, Alcian Blue 염색을 시행하였다.

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

결과 및 토론

세포 증식률. DBP의 함량에 따른 알지네이트 미세캡슐에 파종된 연골세포의 증식률을 관찰하기 위하여 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트리졸리움을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 MTT 분석을 시행하였으며, 이를 Figure 3에 나타내었다. 실험결과 시간이 지날수록 1%의 DBP를 함유한 알지네이트 미세캡슐에서 보다 높은 증식

Figure 3. Chondrocyte proliferation in various ratio of alginate microcapsules after 1, 3, 5, 7 and 14 days *in vitro* ($p^{***} < 0.001$).

률을 보임을 확인하였다. 이는 천연재료인 DBP를 알지네이트와 함께 캡슐화하여 DBP내에 있는 다양한 성장인자 또는 사이토카인이 연골세포의 증식에 긍정적 영향을 주었으리라 사료된다.^{36,37}

압축강도 분석. 조직공학적 바이오 연골재생에 응용하는 지지체로 사용되기 위해서는 배양시 또는 이식시에 지속적인 기계적, 물리적 특성을 가진 지지체이어야 한다. 그러한 의미에서 기계적 강도측정 실험은 매우 중요한 의미를 갖는다. 이에 따라 DBP의 함량에 따른 알지네이트 미세캡슐의 물성변화를 확인하기 위하여 압축강도 측정을 실시한 결과를 나타내었다(Figure 4). 그림에서 보이듯 DBP의 함량이 증가할수록 그 강도가 점차 강해짐을 확인할 수 있었다. 이는 DBP가 알지네이트 미세캡슐의 수분 흡수에 영향을 미칠뿐더러 세포

의 증식에 긍정적인 역할로 작용하여 세포외기질의 증가로 인한 것으로 보인다.

적외선 분광기 측정. 적외선 분광기 분석법을 통하여 DBP의 함량에 따른 알지네이트 마이크로캡슐의 화학적 성분을 분석하여 Figure 5에 나타내었다. 분석결과 순수 알지네이트 미세캡슐에서는 카르복실기(1638 cm^{-1})와 에스터기(1016 cm^{-1}), 하이드록실기(2356 cm^{-1})가 나타났음을 확인하였고 함량별 DBP가 포함된 알지네이트 마이크로캡슐에서는 아마이드기(1418 cm^{-1})의 피크를 확인할 수 있었다. 그림에서 보이듯이 DBP의 함량이 증가할수록 아마이드기의 피크가 점차 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 DBP의 비율별로 알지네이트 미세캡슐에 잘 포접됨을 확인하였다. 또 이전의 연구에서 DBP

를 원소분석한 결과 DBP가 질소, 탄소, 수소, 황 등으로 이루어진 유기물임을 확인할 수 있었고,³⁸ 알지네이트 미세캡슐을 구성하고 있는 재료의 화학적특성이 변하지 않고 원상태대로 유지됨을 확인할 수 있었다.¹³

GAG 및 콜라겐 함량 측정. DBP가 함량별로 포접된 알지네이트 미세캡슐에 연골세포를 파종하여 1, 2 및 3주 배양한 후 연골의 세포외기질을 이루고 배양시 분비되는 sGAG의 함량을 측정한 결과 1%의 DBP를 함유한 알지네이트 미세캡슐에서 sGAG양이 확연히 높음을 확인할 수 있었다(Figure 6). 이는 DBP의 함량이 높아질수록 연골에서 많이 발현되는 세포외기질의 수분을 함유하는 GAG의 발현에 영향을 주어 연골기질의 형성에 긍정적으로 작용하여 알지네이트와 함께 미

Figure 4. Compressive strength of various contents of DBP in alginate microcapsules ($p^{**} < 0.01$).

Figure 5. FTIR spectra of various contents of DBP in alginate microcapsules.

Figure 6. sGAG contents of various contents of DBP in alginate microcapsules at 1, 2 and 3 weeks post-cultivation ($p^* < 0.05$).

Figure 7. Collagen contents of various contents of DBP in alginate microcapsules at 1, 2 and 3 weeks post-cultivation.

세캡슐을 제조하였을 때 지지체의 역할을 수행할 것으로 예상된다.³⁶

콜라겐 함량을 측정한 결과 DBP의 함량이 높아질수록 콜라겐의 합성량이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 7). 이는 PCR의 결과와 부합하는 것으로써 DBP가 세포외기질분비를 촉진하고 세포증식을 유도하였을 것이라 사료된다. 따라서 DBP가 연골기질의 형성에 긍정적으로 작용할 뿐더러 적절한 환경을 제공하여 연골의 틀을 유지해주는 콜라겐 섬유질이 적절히 합성됨을 알 수 있었다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 알지네이트 미세캡슐에 대해 발현되는 연골의 사이토카인을 mRNA 관점에서 알아보았다. 1, 2 및 3주 배양한 후 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하여 연골세포에서 나타나는 특이적 유전자인 제 2형 콜라겐과 연골의 퇴화에서 나타나는 유전자인 제 1형 콜라겐 그리고 연골의 구성 성분으로 정상적이고 건강한 연골에서 나타나는 어그리칸의 발현정도를 확인하여 나타내었다(Figure 8). 모든 실험 군에서 house keeping gene인 β -actin이 발현되었으며 제 1형 콜라겐의 발현정도를 보면 DBP를 함유하지 않은 알지네이트 미세캡슐에서 다른 실험 군에 비하여 크게 발현된 것을 확인할 수 있었다(Figure 8(A)). 그리고 1%의 DBP를 함유한 군에서 가장 낮은 발현정도를 보아 가장 낮은 퇴화도를 보였다. 연골세포의 특이 유전자인 제 2형 콜라겐의 발현 역시 1%의 DBP가 함유된 알지네이트 미세캡슐에서 가장 크게 발현된 것을 확인할 수 있었다(Figure 8(B)). 어그리칸의 발현에 있어서는 1%의 DBP가 함유된 알지네이트 미세캡슐에서 더 높게 발현이 되었는데(Figure 8(C)), 이는 DBP가 함유되어 있는 알지네이트 미세캡슐에서 배양된 연골세포가 더 건강하고 정상적임을 증명시켜 주었다. 이러한 결과를 통해 DBP를 함유한 알지네이트 미세캡슐에서 연골세포가 안정적으로 배양될 수 있음을 확인하였다.

조직학적 평가. 조직학적 평가로 DBP가 연골 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 함량별 DBP를 포접한 알지네이트 미세캡슐에 연골세포를 파종한 뒤 4주 동안 *in vivo* 환경에서 배양하였다. 지지체를 수거하여 H&E 염색과 Safranin-O, Alcian Blue 염색을 실시하였으며 Figure 9에 나타내었다. H&E 염색 결과 DBP 함량이 높은 알지네이트 미세캡슐로 갈수록 연골세포의 핵이 더 고르게 분포되어있음을 확인하였고 세포질과 세포간 섬유조직 역시 풍부하게 형성되었음을 확인할 수 있었다. 또한 연골특유의 라쿠나 조직이 DBP 함량이 높은 알지네이트 미세캡슐로 갈수록 더 많이 형성됨을 확인할 수 있었다. 또한 세포외기질의 수분을 함유하는 GAG의 발현정도를 Safranin-O 염색으로 확인할 수 있었는데 DBP의 함량이 높아질수록 단백질과 복합된 산성 점액성 다당류인 sGAG가 붉은색을 나타내며 알지네이트 미세캡슐에서 넓은 영역에 걸쳐 형성됨을 확인할 수 있었다. 또한 라쿠나 조직이 많이 형성됨을 확인할 수 있었다. Alcian blue

Figure 8. Gene expression profiles of β -actin, Type I collagen, Type II collagen, aggrecan as analyzed by RT-PCR on week 1, 2 and 3. The results of agarose gel electrophoresis normalization of by (A) Type I collagen; (B) Type II collagen; (C) Aggrecan by β -actin ($p^{***} < 0.001$).

Figure 9. Hematoxylin & Eosin (magnification $\times 200$) (A); Safranin-O (magnification $\times 200$) (B); Alcian blue (magnification $\times 200$) (C); staining of various ratio of DBP in alginate microcapsules after 4 weeks of implantation *in vivo* (magnification $\times 200$).

염색 역시 DBP 함량이 높아질수록 푸르게 염색됨을 확인하여 sGAG가 넓게 형성됨을 확인하였고 라구나 조직 역시 월등하게 형성되었음을 확인하였다.³⁹ 이것으로 보아 DBP가 알지네이트 미세캡슐에서 연골세포의 증식과 생존에 긍정적인 영향을 줌으로써 연골세포가 그 기능을 유지하는데 필수적인 프로테오글라이칸이나 콜라겐과 같은 세포외기질 물질들이 활발하게 합성되어 연골세포가 증식하는데 도움을 준 것을 알 수 있다.

결론

본 연구에서는 천연고분자 재료인 알지네이트와 연골 및 뼈의 성장에 강력한 유도체로 작용한다고 알려져 있는 DBP를 이용하여 함량별 알지네이트 미세캡슐을 제조하였고 연골세포의 증식과 표현형유지에 긍정적인 영향을 미침을 확인하였다.

본 연구의 알지네이트와 DBP를 포접한 알지네이트 미세캡슐에 토끼 무릎 관절에서 분리한 연골세포를 파종하여 *in vitro* 환경에서 MTT 분석을 통하여 세포의 부착 및 증식을 확인하였고, sGAG와 콜라겐 함량 분석을 통하여 DBP가 연골기질의 형성에 긍정적으로 작용함을 확인하였다.

또한 연골세포에서 특이적으로 발현하는 유전자인 제 2형 콜라겐, 연골세포의 탈분화상태와 섬유성이 되었을 때 분비되는 유전자인 제 1형 콜라겐 그리고 수분을 함유하고 있어

충격흡수와 조직이 무게를 지탱하는데 도움을 주는 어그리칸의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 분석하였다.

그리고 DBP가 연골 형성에 어떠한 영향을 미치는지 조직학적으로 확인하기 위하여 누드마우스 피하에 미세캡슐을 이식하여 적출한 뒤, H&E, Safranin-O 그리고 Alcian blue 염색을 실시하여 주었다.

그 결과 높은 함량의 DBP를 포접한 알지네이트 미세캡슐일수록 연골세포가 그 기능을 유지하는데 필수적인 세포외기질물질들이 활발히 합성되어 연골세포가 증식하는데 도움을 주는 등 긍정적인 영향을 미쳐 연골재생을 위한 조직공학 적 재료로서 유용하게 쓰일 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부의 바이오 이종장기사업과(A040004), 근골격바이오장기센터(0405-BO01-0204-0006), 그리고 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029)의 연구 지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. S. R. Caliaira, M. A. Ramirezb, and B. A. C. Harley, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
2. M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. S. Langer, T. B. Sufdemorte, and A. G. Mikos, *Tissue Eng. Part A*, **1**, 41 (1995).
3. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
4. T. H. Kim, J. H. Ko, S. J. Kim, and Y. H. Park, *Int. J. Tissue*

- Regen.*, **2**, 1 (2011).
5. A. Thomas, K. G. Harding, and K. Moore, *Biomaterials*, **21**, 1797 (2000).
6. J. P. Vacanti and R. Langer, *Lancet*, **354**, 32 (1999).
7. G. Orive, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. D. Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacik, A. M. J. Shapiro, and J. L. Pedraz, *Nat. Med.*, **9**, 104 (2003).
8. H. N. Park, J. B. Lee, and I. K. Kwon, *Int. J. Tissue Regen.*, **1**, 10 (2010).
9. K. Susan, D. Julie, P. Stefania, M. Martin, H. Jean-Pierre, and Y. L'Hocine, *Biomaterials*, **27**, 1296 (2006).
10. J. Dusseault, S. K. Tam, M. Menard, S. Polizu, G. Jourdan, L. Yahia, and J. P. Halle, *J. Biomed. Mater. Res.*, **76**, 243 (2006).
11. G. Klock, H. Frank, R. Houben, T. Zekorn, A. Horcher, U. Siebers, M. Wohrle, K. Federlin, and U. Zimmermann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 638 (1994).
12. C. Wandrey and D. S. Vidal, *N. Y. Ann. Acad. Sci.*, **944**, 187 (2001).
13. C. Nadda, S. Neeracha, S. Keskanya, P. Prasit, and P. Muenduen, *Carbohydr. Polym.*, **85**, 548 (2011).
14. S. Rao, H. Mckellop, D. Chao, T. A. Schildhauer, E. Gendler, and T. M. Moore, *Clin Orthop.*, **289**, 131 (1993).
15. J. Glowacki, J. E. Murray, L. B. Kaban, J. Folkman, and J. B. Mulliken, *Lancet*, **1**, 959 (1981).
16. M. S. Kim, S. J. Park, B. K. Gu, G. Khang, and C. Kim, *Int. J. Tissue Regen.*, **2**, 125 (2011).
17. U. Zimmermann, G. Klock, K. Federlin, K. Haning, M. Kowalski, R. G. Bretzel, A. Horcher, H. Entenmann, U. Siebers, and T. Zekorn, *Electrophoresis*, **13**, 269 (1992).
18. T. Espevik, M. Otterlei, G. Skjåk-Bræk, L. Ryan, S. D. Wright, and A. Sundan, *Eur. J. Immunol.*, **23**, 255 (1993).
19. O. Y. Kim, S. J. Kim, Y. S. Song, E. H. Jo, J. H. Hwang, J. Y. Bae, I. S. Yoo, D. Lee, K. H. Yun, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.*, **2**, 13 (2011).
20. P. Goegan, G. Johnson, and R. Vincent, *Toxic in Vitro*, **9**, 257 (1995).
21. W. Huang, B. Carlsen, I. Wulur, G. Rudkina, K. Ishidaa, B. Wuc, D. T. Yamaguchia, and T. A. Miller, *Exp. Cell Res.*, **299**, 325 (2004).
22. J. Y. Bae, Y. N. Shin, J. H. Hwang, H. E. Kim, H. Yoon, D. Lee, K. H. Yoon, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.*, **2**, 103 (2011).
23. H. G. Sun, C. Wu, K. Dai, J. Chang, and T. Tang, *Biomaterials*, **27**, 5651 (2006).
24. S. H. Kim, S. J. Yoon, B. S. Choi, H. J. Ha, J. M. Rhee, M. S. Kim, Y. S. Yang, H. B. Lee, and G. Khang, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **585**, 167 (2006).
25. S. J. Yoon, S. H. Kim, H. J. Ha, Y. K. Ko, J. W. So, M. S. Kim, I. Y. Yang, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Part A*, **14**, 539 (2008).
26. M. M. L. Deckers, R. L. van Bezooijen, G. van der Horst, J. Hoogendam, C. van der Bent, S. E. Papapoulos, and C. W. G. M. Lowik, *Endocrinology*, **143**, 1545 (2002).
27. K. S. Park, E. J. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **7**, 120 (2003).
28. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
29. J. W. Jang, M. O. Baek, S. H. Kim, J. H. Choi, J. C. Yang, H. H. Hong, H. K. Hong, J. M. Rhee, B. H. Min, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **33**, 104 (2009).
30. R. G. Payne, J. S. Mc Gonigle, M. J. Yaszemski, A. W. Yasko, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **23**, 4359 (2001).
31. M. Matsuoka, B. Wispriyono, and H. Igisu, *Biochem. Pharm.*, **59**, 1573 (2000).
32. H. S. Shin, J. S. Temenoff, G. C. Bowden, K. Zyqourakis, M. C. Farach-Carson, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **26**, 3645 (2005).
33. P. Soon-Shiong, M. Otterlei, G. Skjåk-Bræk, O. Smidsrod, R. Heintz, R. P. Lanza, and T. Espevik, *Transplantation Proceedings*, **23**, 758 (1991).
34. G. M. Aaron and S. K. Gregory, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 1301 (2009).
35. M. Otterlei, A. Sundan, G. Skjak-Braek, L. Ryan, O. Smidsrod, and T. Espevik, *Infect Immun.*, **61**, 1917 (1993).
36. W. Y. Ahn, H. L. Kim, J. E. Song, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 499 (2011).
37. J. A. Cooper, H. H. Lu, F. K. Ko, J. W. Freeman, and C. T. Laurencin, *Biomaterials*, **26**, 1523 (2005).
38. 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).
39. K. Nakatsuka, K. Kurita, T. Hayakawa, K. Nakashima, K. Yamashita, T. Hoshino, and K. Miyazaki, *Int. J. Biomed. Sci.*, **6**, 103 (2010).