

DBP/PLGA 하이브리드 담체를 이용한 조직공학적 바이오 디스크 개발

고연경 · 김순희 · 정재수 · 하현정 · 윤선중 · 이종문 · 김문석* · 이해방* · 강길선†

전북대학교 BK-21 고분자 BIN융합연구팀, *한국화학연구원 나노생체재료연구팀

(2006년 8월 7일 접수, 2007년 1월 10일 채택)

Biodisc Tissue-Engineered Using PLGA/DBP Hybrid Scaffold

Youn Kyung Ko, Soon Hee Kim, Jae Soo Jeong, Hyun Jung Ha, Sun Jung Yoon,
John M. Rhee, Moon Suk Kim*, Hai Bang Lee*, and Gilson Khang†

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

*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

(Received August 7, 2006; accepted January 10, 2007)

초록 : 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particle, DBP)은 골/연골 형성의 강력한 유도인자로 사용된다. 본 연구에서는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용해 함량별 DBP와 PLGA가 하이브리드화된 다공성 지지체를 실제 디스크 형태와 유사하게 제조하였다. 제조된 지지체의 특성을 분석하기 위하여 다공도, 표면 젖음성 및 물 흡수성을 측정하였다. 디스크 세포인 섬유륜 및 수핵 세포는 토끼로부터 분리하여 제조된 지지체에 각각 파종한 후, 지지체를 재조합하여 배양하였다. 지지체에 파종된 디스크 세포의 생존율과 증식률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) 분석 방법을 이용하였고, 면역결핍 쥐의 피하에 삽입하여 이들의 디스크 조직 형성 정도를 확인하였다. 피하에 이식된 지지체를 적출하여 육안으로 관찰하고 모폴로지의 변화를 확인한 후, 조직을 파라핀으로 고정시켜 슬라이드를 제조하여 hematoxylin과 eosin 염색을 수행하였다. 천연/합성 하이브리드 담체로서의 DBP/PLGA 담체가 PLGA 단독으로 사용하였을 때와 비교하여 볼 때 디스크 조직의 형성이 우수하였으며, 특히 20, 40%의 DBP가 함유된 지지체가 세포의 성장과, 디스크 조직화에 유리함을 확인하였다.

Abstract : Demineralized bone particle (DBP) has been used as one of the powerful inducers of bone and cartilage tissue specialization. In this study, we fabricated DBP/PLGA scaffold for tissue engineered disc regeneration. We manufactured dual-structured scaffold to compose inner cylinder and outer doughnut similar to nature disc tissue. The DBP/PLGA scaffold was characterized by porosity, wettability, and water uptake ability. We isolated and cultured nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF) cells from rabbit intervertebral disc. We seeded NP cells into the inner core of the hybrid scaffold and AF cells into the outer portion of it. Cellular viability and proliferation were assayed by 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) test. PLGA and PLGA/DBP scaffolds were implanted in subcutaneous of athymic nude mouse to observe the formation of disc-like tissue *in vivo*. And then we observed change of morphology and hematoxylin and eosin (H&E). Formation of disc-like tissue was better DBP/PLGA hybrid scaffold than control. Specially, we confirmed that scaffold impregnated 20 and 40% DBP affected to proliferation of disc cell and formation of disc-like tissue.

Keywords : biodisc, demineralized bone particle, scaffold, annulus fibrosus, nucleus pulposus.

서 론

요통은 오늘날 전세계적으로 성인들이 가지고 있는 일반적인 의학적이고 사회적인 문제이다.¹⁻³ 요통의 가장 큰 원인은 추간판 디스크(intervertebral disc, IVD)의 퇴화이며, 디스크의 퇴화에는 다양한 요소들이 영향을 주는데 유전적 요인, 환경적 요인, 그리고 노

화현상이 그 예이다.^{1,2} 디스크의 퇴화로 유발되는 고통을 치료하기 위하여 골융합술, 경피수핵절단술, 화학적수핵용해술, 및 레이저감압술 등 여러 방법이 수행되고 있는데,³⁻⁵ 이러한 방법은 일시적으로 고통을 감소시킨다 하더라도 융합된 부분의 활동성이 감소하고 인접한 부분의 퇴화를 가속화시키는 단점이 있다.^{5,6} 최근에 이러한 외과적인 치료법의 한계를 극복하기 위하여 조직공학기술에 의한 연구가 시작되었다.^{7,8}

구조적으로, 추간판 디스크는 섬유륜(annulus fibrosus, AF)과

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

수핵(nucleus pulposus, NP)으로 구성되어 있고, 이들은 전이 영역에 의해서 서로 연결되어 있으며 연골 말단판과 병합되어 있다. 추간관 디스크의 역학적 특성은 디스크를 구성하고 있는 섬유륜과 수핵의 서로 다른 세포외 기질에 의해서 유지된다. 바깥쪽의 섬유륜 부분은 대부분 제 1형 교원질로 이루어져 있으며, 이러한 교원질이 중심으로 집중되는 라멜라 구조를 이루고 있다.⁹ 이런 라멜라 구조 내에 있는 교원질 섬유는 수직방향으로부터 약 65° 배향되어 있어 인장강도를 제공해준다.¹⁰ 추간관 디스크의 중심에는 수핵이 존재하는데, 이는 친수성을 지닌 젤과 유사한 조직으로 교원질 골격에 다량의 프로테오글라이칸이 함유되어 있다.¹¹ 수핵의 구성물질인 프로테오글라이칸은 조직의 높은 수분 함량을 유발하여 팽창 압력을 제공하기 때문에 추간관 디스크에 걸리는 하중을 견디게 한다.⁹

생체조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 지지체와 세포를 체내에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 형성하게 하는 일련의 기법이다.¹² 추간관 디스크의 조직공학에는 제공자의 IVD 조직에서 채취된 디스크 세포와 적절한 지지체가 요구된다.¹³⁻¹⁵ IVD 지지체의 재료로서 인공고관절, 인공슬관절에서 사용이 되었던 생체적합성 합금인 스테인레스 강, 티타늄합금 및 Co-Cr 합금 등의 금속재료와,¹⁶⁻¹⁸ 고무 탄성체로, 카본섬유로 보강된 플라스틱, 에폭시수지, 칼슘나이트라이드, 티타늄, 스테인레스 강, 폴리에틸렌/히드록시아파타이트 복합체 등의 비금속 재료로 계속 확대 응용되었다.¹⁹ 또한, 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA) 그리고 이들의 공중합체인 PLGA와 같은 폴리- α -히드록실산류가 쓰이는데 이들은 FDA에서 임상에 이용되도록 승인된 합성고분자이며,^{7,16,17} 생분해성 칼슘 폴리포스페이트와 같은 무기 물질도 IVD 지지체의 재료로서 테스트 되었다.^{7,8,14} 그러나 대부분의 재료가 세포적합성 및 조직적합성이 떨어지므로 이들을 개선할 방법이 요구되고 있는 시점이다.

본 연구팀은 이전 연구에서 천연재료의 함유와 제조방법에 따라 다양한 지지체를 제조하여 디스크 세포의 성장에 유리한 조건을 파악하였으며, 천연재료가 함유된 지지체가 디스크 세포 성장에 긍정적인 영향을 주는 것을 확인하였다.²⁰ 본 연구에서는 추간관 디스크의 구조적 특징을 모색하여 수핵조직과 섬유륜조직의 형상과 유사하게 지지체를 제조하였으며, 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particle, DBP)이라는 천연재료를 첨가하여 함유량에 따라

디스크 조직화에 미치는 영향을 확인하였다.

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. 메틸렌클로라이드(MC, Tebia Co. Inc., USA)와 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. 다공형성물질로 사용된 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co., Korea)은 분자체로 입자의 크기를 180~250 μm 로 맞추었다. DBP는 동결건조 후 동결 분쇄하여 180 μm 이하의 크기의 분말 형태로 얻었다.

용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조 및 분석. 용매 캐스팅/염 추출법으로 DBP를 함유한 PLGA 다공성 지지체를 제조하였다. 먼저 PLGA를 MC에 용해한 후 DBP를 PLGA의 0, 10, 20, 40 및 80 wt% 농도로 첨가하였다. 여기에 다공형성물질인 염화나트륨을 PLGA 무게의 10배가 되게 첨가하여 이들을 균일하게 혼합하였다. 용해된 혼합물을 직경 8 mm 및 두께 3 mm 크기와 직경 2.5 mm, 두께 3 mm의 실리콘 몰드에 넣은 후 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공형성물질인 염의 추출은 3차 증류수를 교체하며 48시간 동안 수행하였고, 8 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25 °C 진공오븐에서 건조시켰다. 이들의 제조모식도를 Figure 1에 나타내었다.

제조된 다공성 지지체의 다공 크기 분포, 평균 다공직경, 비다공면적 및 다공도를 측정하기 위하여 수는 다공도계(Micromeritics Co., Model AutoPore II 9220, USA)를 이용하였다.^{21,22}

친수성 실험. DBP 함유량에 따른 다공성 지지체의 친수성 효과를 살펴보기 위하여 지지체 위에 트리판블루 염료를 떨어뜨리고 시간에 따른 흡수 정도를 관찰하였다. 트리판블루 염료를 떨어뜨리고 30 초, 5, 10, 90분 후의 염료 침투 효과를 사진을 찍어 관찰하였다.

물 흡수율 측정. 제조된 지지체의 물 흡수성을 측정하였다. 먼저 지지체의 초기 무게(W_{dry})를 측정하고 10 mL의 물에서 24 시간 동안 상온에서 방치하였다. 물을 흡수한 지지체의 표면의 수분을

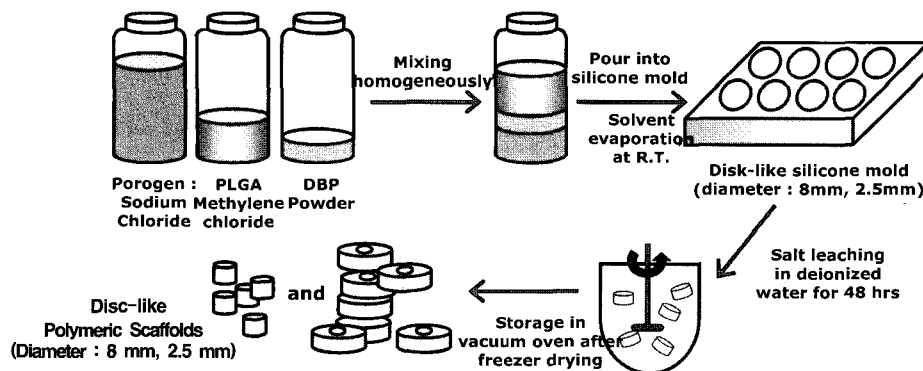


Figure 1. Schematic diagram illustrating of the fabrication process of DBP/PLGA hybrid scaffolds by solvent casting/salt leaching method.

제거한 후 무게(W_{wet})를 측정하여 아래식에 대입함으로써 물 흡수율을 측정하였다.²³

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

모든 실험은 동일 조건에서 세 번씩 수행하였다.

디스크 세포의 분리 및 배양: 디스크 세포는 4~5주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼의 척추에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후 등의 털을 제거하고, 멸균된 수술용 가위로 토끼의 척추부분을 절단하여 인산완충용액(PBS, pH 7.2; Gibco, USA)으로 세 번 정도 세척한 후 근육을 제거하였다. 블레이드로 섬유륜 조직과 수핵 조직을 각각 분리한 후 인산완충용액으로 다시 세척하고, 0.25%의 콜라게네이즈 A형(Roche, USA) 용액으로 섬유륜 조직은 6시간, 수핵 조직은 4시간 동안 처리하였다. 조직이 담긴 용액을 원심분리하고 100 μm 의 나일론 메쉬로 거른 후, 세포 수를 세어 25 cm^2 플라스크에 플레이팅 하였다. 플레이팅 시 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco)와 F-12 nutrient mixture(Ham's F-12, Gibco) 배양액에 10% 우태혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(10 U/mL, 페니실린 G 소디움과 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 암프테라신 B, Gibco)를 첨가한 성장배지에 세포를 부유시킨 후 플레이팅 하였다. 섬유륜 세포와 수핵세포를 각각 분리하여 배양한 후 3대 계대배양 후 4대 계대배양재의 세포를 트립신(Trypsin-EDTA, Gibco)을 이용하여 세포를 수거한 후, 제조된 지지체의 바깥 부분에는 섬유륜 세포를 1×10^5 cell/지지체의 농도로 파종하고, 안쪽 지지체에는 수핵 세포를 5×10^4 cell/지지체로 계산하여 각각 파종하였다.

MTT 분석. 세포성장률은 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. 세포를 지지체에 파종한 후, 1, 2 및 4주째 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co.) 용액(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 150 μL 씩 넣고 4시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 행구고 디메틸설폭사이드(Sigma Co.) 용액을 1.5 mL 넣어 2시간 동안 교반하였다. 96 well 플라스크에 샘플을 100 μL 씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁴

In vivo 내에서의 디스크 조직형성에 대한 조직학적 평가. In vivo 환경에서 DBP를 함유한 지지체의 조직공학적인 바이오 디스크의 적용 가능성을 확인하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 함량별로 DBP가 함유된 PLGA 지지체에 수핵세포는 5×10^4 , 섬유륜세포는 1×10^5 cell/지지체의 농도로 파종한 후 생후 6주된 쥐의 등 쪽 부분을 2~3 cm 절개한 절개하고 이식하였으며, 1 및 2주가 지난 후에 지지체를 적출하여 모폴로지의 변화를 관찰한 후, 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록으로 제작한 후에 3 μm 의 두께로 자른 후 슬라이드에 고정시키고 조직학적 평가를 확인하기 위하여 H&E 염색을 실시하였다.

결과 및 토론

DBP를 함유한 다공성 지지체의 제조 및 분석. 조직공학적인 바

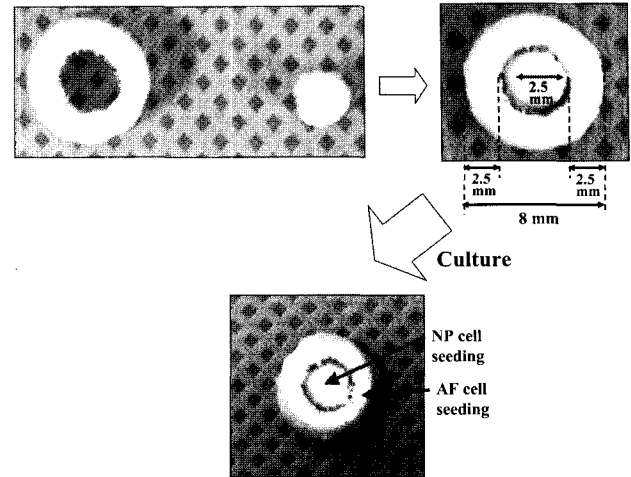


Figure 2. Gross picture of DBP/PLGA scaffold.

Table 1. Pore Size Distribution of DBP/PLGA Scaffolds by means of the Solvent Casting/Salt Leaching

DBP content (%)	Size of NaCl (μm)	Volume of PLGA to NaCl (w/w)	Porosity (%)	Median pore diameter (μm)
0	180~250	10	93.5	56.9
10	180~250	10	88.5	68.5
20	180~250	10	65.6	58.1
40	180~250	10	68.7	58.2
80	180~250	10	68.7	63.6

이오 디스크를 제조하고자 용매 캐스팅/염 추출법으로 DBP를 함유한 다공성 지지체를 제조하였다. 완성된 지지체의 모습은 Figure 2에 나타내었다. 제조된 담체의 형태는 직경 8 mm, 두께 3 mm로 내부 공간의 직경이 3 mm의 도우넛 모양의 지지체와, 직경 2.5 mm, 두께 3 mm의 원기둥 형태의 다공성 지지체를 얻을 수 있었다. DBP를 혼합하여 지지체를 제조하여도 물성의 변화가 크지 않고 원하는 형태의 다공성 지지체를 제조할 수 있었다.²⁵

수은다공도계로 다공도 및 다공 크기를 분석해 본 결과(Table 1), DBP의 함량에 따라 현저한 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 이로써 DBP가 첨가되더라도 일정한 크기의 다공을 가진 지지체를 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

친수성 실험. DBP의 함량에 따른 친수성 효과를 Figure 3에 나타내었다. PLGA 지지체에서는 90분 후에도 염료가 지지체 내로 완벽하게 침투하지 못하였지만, DBP를 함유하고 있는 지지체는 대부분 염료가 침투하였다. 또한 DBP의 함량이 증가할수록 침투 속도도 빨랐는데, 이는 DBP 자체가 콜라겐으로 형성되어 있고 또한 여러 가지 단백질을 함유하고 있어 친수성을 증가시킨 것이라 사료된다.²⁶

물 흡수율 측정. DBP의 함량에 따른 물 흡수율을 Figure 4에 나타내었다. DBP의 함량이 20%인 지지체에서 처음 값의 약 500%로 가장 높은 흡수율을 나타내었다. 이는 친수성 실험과는 다른 값을 보이고 있는데, DBP의 양이 증가할수록 일시적인 적심성은 증가한 반면, 장시간 물에 담가두게 되면 과량의 DBP에 의해 물 함유율이 오히려 줄어들게 된다. 즉, 장시간 물에 적시게 되면 PLGA가 팽창

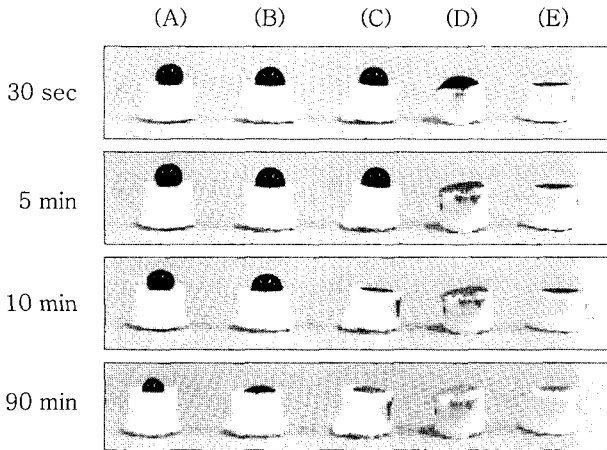


Figure 3. Photographs of wetting property of DBP/PLGA scaffolds. (A) PLGA, (B) PLGA/DBP(10 wt%), (C) PLGA/DBP(20 wt%), (D) PLGA/DBP(40 wt%), and (E) PLGA/DBP(80 wt%).

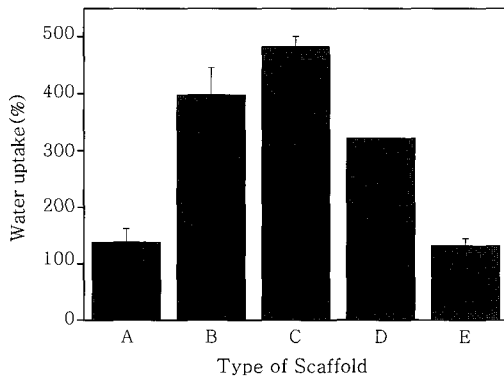


Figure 4. Water-uptake ability of scaffold by DBP concentration. (A) PLGA, (B) PLGA/DBP(10 wt%), (C) PLGA/DBP(20 wt%), (D) PLGA/DBP(40 wt%), and (E) PLGA/DBP(80 wt%).

되어 물을 머금을 수 있는 시간이 제공되나, 과량의 DBP가 함유될수록 PLGA와 직접적으로 닿을 수 있는 면적이 줄어들고 DBP와 닿는 면적이 증가하게 되므로 PLGA가 팽창으로까지의 영향을 받을 수 없게 되어 40% 이상의 함량에서 적은 수치를 보이게 된다. 반면 DBP가 함유되지 않은 경우 다공안으로 적십을 유도해 줄만한 인자가 없기 때문에 매우 낮은 수치를 보이며, 10~20%의 경우 친수성 제공은 물론 PLGA의 팽창이 이루어지기까지 알맞은 환경을 제공해 주는 것으로 사료된다.

MTT 분석. 디스크 세포의 성장은 외부 성장 환경에 영향을 받는데, DBP의 함량에 따른 지지체 내에서의 세포 성장을 MTT 분석법을 통하여 비교해 보았다. DBP의 함량에 따른 1, 2 및 4주의 세포성장을 Figure 5(A)에 나타내었다. 나타낸 것처럼 1주째에는 PLGA 지지체와 DBP를 함유한 지지체 사이에서 초기 부착률의 차이를 보이지 않았다. 또한 2주째에서는 모든 지지체에서 1주째보다 높은 세포생존율을 확인할 수 있었고, 특히 PLGA 지지체에서 가장 높은 세포생존율이 나타났다. 하지만, 4주째에서는 DBP를 함유한 지지체에서는 세포가 모두 증식하였고, PLGA 지지체는 세포생존율이 감소됨

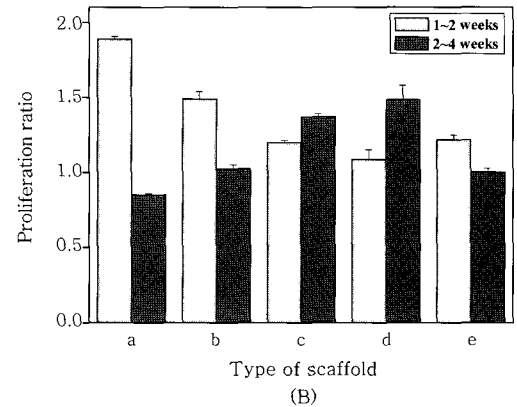
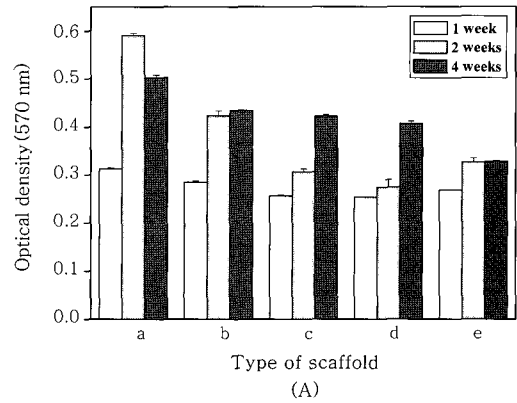


Figure 5. (A) Intensity of viable NP and AF cells analyzed by MTT assay after 1, 2 and 4 weeks *in vitro*. (B) Proliferation ratio of NP and AF cells analyzed by MTT assay during 1~2 weeks and 2~4 weeks *in vitro*. (a) PLGA only, (b) PLGA/DBP(10 wt%), (c) PLGA/DBP(20 wt%), (d) PLGA/DBP(40 wt%), and (e) PLGA/DBP(80 wt%).

을 확인할 수 있었다. Figure 5(B)에서는 1주대비 2주의 증식률, 2주 대비 4주의 증식률을 나타내었다. 1주대비 2주의 증식률에서는 PLGA와 10%의 DBP를 함유하고 있는 지지체에서 높은 세포증식률을 확인할 수 있었지만, 2주대비 4주의 세포증식률은 DBP를 함유한 지지체 전체에서 그 값이 높음을 확인할 수 있었다. 특히 DBP의 함량이 20, 40%인 지지체의 경우에 계속적으로 디스크 세포가 증식함을 확인하였다.

DBP를 함유한 지지체 내에서의 디스크 조직형성에 대한 조직학적 평가. 상기의 방법으로 제조된 DBP를 함유한 PLGA 지지체가 조직공학적 디스크 조직 형성에 도움을 주는지를 관찰하기 위해, 지지체를 이식한지 1 및 2주가 지난 후 면역결핍 쥐의 피하를 절개하여 지지체를 적출하여 지지체를 육안관찰과 염색을 실시하였다. 이식 후 1 및 2주가 지난 지지체의 육안관찰 결과는 Figure 6에 나타내었다. 육안관찰 결과 이식 후 1주가 지난 후에는 이식 초기의 지지체의 형태와 차이를 볼 수 없었고, 수핵 부분과 섬유륜 부분 지지체 사이에 공간이 있음을 확인할 수 있었다. 하지만, 시간이 지남에 따라서 지지체가 주변의 조직과 잘 융합됨을 확인할 수 있었으며 이식 초기에 관찰할 수 있었던 수핵과 섬유륜 지지체 사이의 간격도 줄어들음을 확인할 수 있었다. 육안관찰이 완료된 지지체를 염색을 하

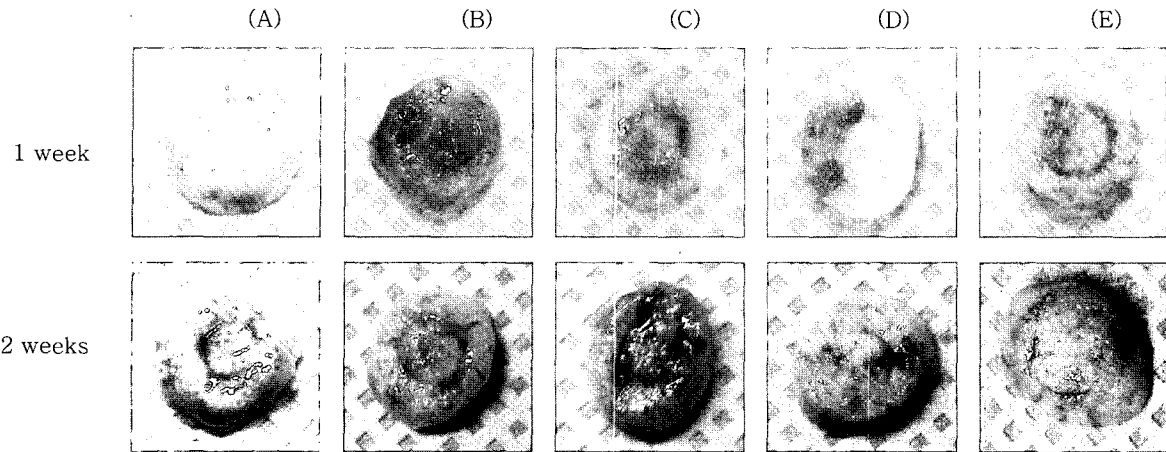


Figure 6. The gross pictures of disc cell seeded various types of scaffolds implanted on the back of nude mice after 1 and 2 weeks. (A) PLGA only, (B) PLGA/DBP(10 wt%), (C) PLGA/DBP(20 wt%), (D) PLGA/DBP(40 wt%), and (E) PLGA/DBP(80 wt%).

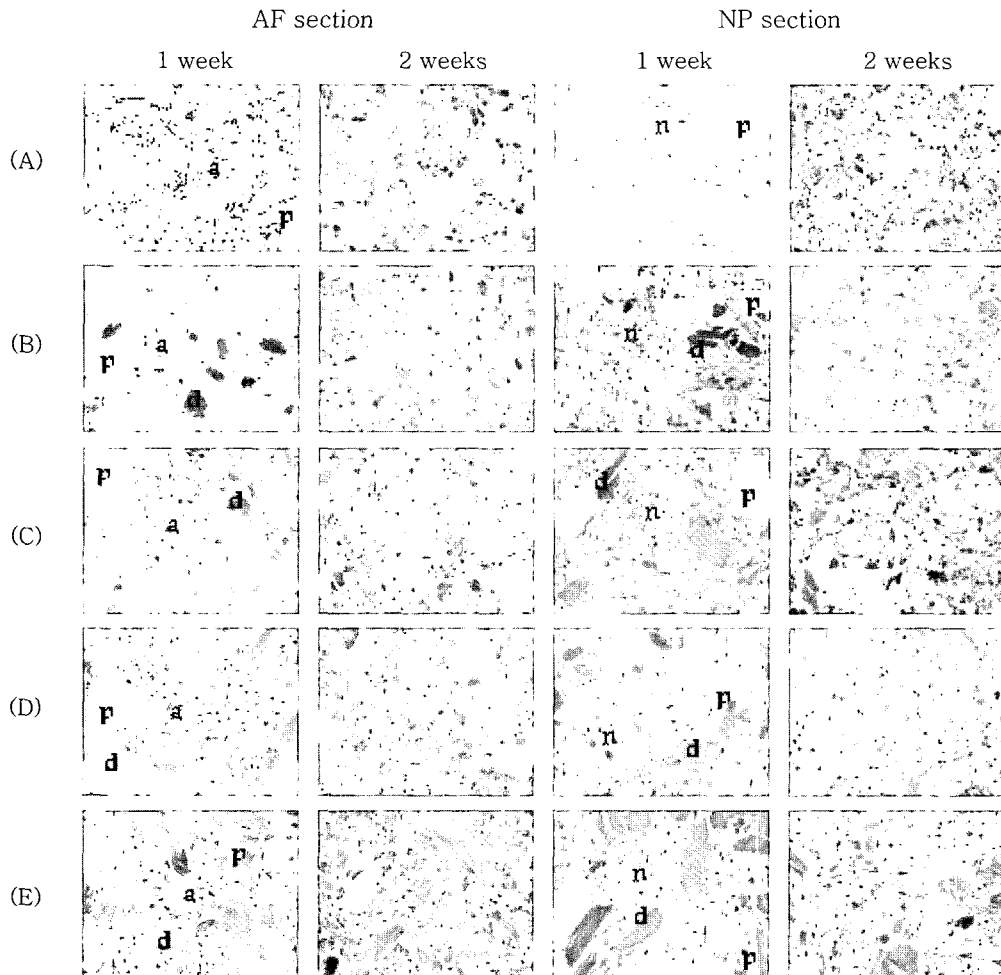


Figure 7. Photomicrographs from H&E histological section of AF/NP area implanted on the back of nude mice after 1 and 2 weeks. (A) PLGA only, (B) PLGA/DBP(10 wt%), (C) PLGA/DBP(20 wt%), (D) PLGA/DBP(40 wt%), and (E) PLGA/DBP(80 wt%) ($\times 200$). P : PLGA, d : DBP, a : AF cell, n : NP cell.

기 위하여 10% 포르말린 수용액으로 고정한 후 $3\ \mu\text{m}$ 로 절단하여 슬라이드에 고정시키고, 디스크 세포의 형태를 확인하기 위하여 H&E

염색을 실시하였다. 섬유륜 부분과 수핵 부분의 H&E 염색결과는 Figure 7에 나타내었다. 그림에서 보는 것과 같이 디스크 세포들은

지지체의 다공속으로 들어가 세포의 기질을 생성함을 확인할 수 있었고, 특히 시간이 지남에 따라 붉게 염색된 DBP의 주변에서 세포외 기질이 더 많이 생성됨을 확인할 수 있었다. 이는 DBP의 골 및 연골의 성장에 유용한 BMP와 같은 인자들이 연골의 한 종류인 디스크의 성장과 증식에 긍정적으로 작용했기 때문이고 DBP가 많이 함유될수록 뾰뾰한 조직형성이 열은 분홍색으로 염색됨을 알 수 있는데, 비록 DBP가 조직형성에 도움이 되나, 혈관형성이 많이 일어난 것을 볼 때 무혈관조직인 NP에 알맞지 않을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLGA와 연골/골 유도인자인 DBP를 사용하여 디스크 형태와 유사하게 다공성 지지체를 제조하고, 이를 조직공학적 바이오 디스크에 응용하고자 하였다.

용매 캐스팅/염 추출법으로 제조된 PLGA, DBP/PLGA 다공성 지지체는 일정한 크기의 다공과 높은 다공도를 가졌으며, 이러한 높은 다공도는 디스크 세포의 성장과 증식에 유리할 것으로 사료된다. 또한, DBP의 함량이 변화하여도 다공도와 다공 크기에는 큰 차이는 없었음을 확인하였다. 지지체에 함유된 DBP는 지지체의 표면에 낮은 계면에너지를 제공하여 높은 표면적심성과 물 흡수율을 제공한다고 사료된다. DBP의 함량이 디스크 세포의 성장과 증식에 미치는 영향을 MTT 분석을 통해 관찰한 결과, 시간이 지남에 따라 DBP는 디스크 세포에 높은 세포증식률을 제공함을 확인하였으며, 특히 DBP의 함량이 20, 40%인 경우에 지속적인 세포증식률을 확인하였다. 이는 향후 DBP/PLGA 지지체 설계에 있어서 중요한 인자로서 작용할 것으로 사료된다. *In vivo* 환경에의 지지체를 육안으로 살펴본 결과, 시간이 지남에 따라 섬유류 지지체와 수핵 지지체가 융합됨을 관찰할 수 있었고, DBP의 함량이 증가할수록 주변 조직과의 융합이 더 잘 일어나는 것을 확인할 수 있었다. H&E 염색 사진을 통해 열린 다공 구조내로 세포가 고르게 잘 퍼져있음을 확인할 수 있었으며, DBP의 함량이 높은 지지체에서 더 많은 세포외기질이 생산됨을 확인할 수 있었다. 이는 DBP/PLGA 지지체가 디스크 세포의 성장과 증식에 긍정적인 영향을 주는 여러 성장인자를 함유하기 때문이라 사료된다.

결론적으로, DBP가 함유된 지지체에서는 디스크 조직의 형성에 도움을 주는 여러 성장인자를 가지고 있으며, 분리배양된 디스크세포의 증식과 세포외 기질의 형성을 도울 것이라고 추측된다. 또한 본 연구에서 사용된 다공성 지지체는 디스크 조직과 유사한 형태를 갖고 있어, 특성이 다른 수핵 및 섬유류 조직 형성에 알맞을 것으로 사료된다. 현재, 쥐의 피하에 DBP/PLGA 하이브리드 지지체를 장기간 이식하여 여러 분석 방법으로 디스크화를 평가하고 있으며, 명확한 DBP 함유량의 최적조건 설정에 대한 연구가 진행 중이다.

감사의 글 : 본 연구는 세포융용사업단(SC3100)과 보건복지부(0405-B001-0204-0006)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. Kraemer, *Spine*, **20**, 635 (1995).
2. J. A. Buckwalter, *Spine*, **20**, 1307 (1995).

3. 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).
4. J. Mochida, K. Nishimura, T. Nomura, E. Toh, and M. Chiba, *Spine*, **21**, 1556 (1996).
5. C. K. Lee, *Spine*, **12**, 357 (1988).
6. J. D. Schlegel, J. A. Smith, and R. L. Schleusener, *Spine*, **21**, 970 (1996).
7. H. Mizuno, A. K. Roy, C. A. Vacanti, K. Kojima, M. Ueda, and L. J. Bonassar, *Spine*, **29**, 1299 (2004).
8. C. A. Seguin, M. D. Grynepas, R. M. Pillar, S. D. Walden, and R. A. Kandal, *Spine*, **29**, 1299 (2004).
9. S. R. Bibby, D. A. Jones, R. B. Lee, Y. Jing, and J. P. Urban, *Joint Bone Spine*, **68**, 537 (2001).
10. N. Bogduk, "The inter-body joints and the intervertebral disc", in *Clinical Anatomy of the Lumbar Spine and Sacrum*, N. Bogduk, Editor, New York, Churchill Livingstone, p. 13 (1997).
11. M. Rudert and B. Tillmann, *Spine*, **20**, 1307 (1995).
12. G. Khang, S. J. Lee, and H. B. Lee, "Polymer-cell interaction"; in *Tissue Engineering: Concepts and Application*, 2nd Eds., J. J. Yoo, and I. Lee, Editors, Korea Med. Pub. Co., Seoul, p. 297 (2002).
13. G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Adv. Exper. Med. Biology*, **657**, 235 (2003).
14. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Reg. Med.*, **1**, 9 (2004).
15. G. Khang, S. K. Kim, K. D. Hong, W. Y. Jang, C. W. Han, I. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Reg. Med.*, **1**, 136 (2004).
16. G. Khang, E. J. Kim, S. H. Kim, K. S. Park, C. W. Han, Y. S. Yang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Reg. Med.*, **2**, 20 (2005).
17. D. E. Perrin and P. E. English, "Polyglycolide and Polylactide". in *Handbook of Biodegradable Polymer*, A. J. Domb, J. Kost, and D. M. Wiseman, Editors, Harwood Academic Publishers, Netherland, Chap. 1, p. 3 (1997).
18. W. G. Hellier, T. P. Hedman, and J. P. Kostuik, *Spine*, **17**, S86 (1992).
19. J. Dove, P. H. Hardcastle, and J. K. Davis, US Patent 4,904,261 (1990).
20. S. H. Kim, K. S. Park, B. C. Choi, H. J. Ha, J. M. Rhee, M. S. Kim, Y. S. Yang, H. B. Lee, and G. Khang, *Adv. Exper. Med. Biology*, **585**, 209 (2006).
21. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **14**, 323 (1993).
22. D. M. Smith, D. W. Hua, and W. L. Earl, *MRS Bull.*, **19**, 44 (1994).
23. M. S. Lee, J. C. Yang, S. H. Kim, I. B. Song, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 259 (2006).
24. S. K. Kim, S. H. Kim, H. R. Lee, M. H. Cho, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Reg. Med.*, **2**, 388 (2005).
25. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 382 (2004).
26. G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim, and H. B. Lee, "Scaffolds; Tissue Engineering", in *Webster's Biomedical Engineering Handbook*, S. Webster, Editor, John & Wiley Press, NY, pp 366-383 (2006).