

# 기관배양을 통한 추간판 재생용 나노파이버 및 온도 감응성 지지체에 대한 검증

이용재<sup>1</sup>, 신지원<sup>1</sup>, 신호준<sup>2</sup>, 김찬환<sup>3</sup>, 박기동<sup>4</sup>, 배진우<sup>4</sup>, 서형연<sup>5</sup>, 김영직<sup>6</sup>, 신정욱<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 의용공학과, <sup>2</sup>일본 자이스트 재료과학과, <sup>3</sup>인제대학교 병리학과 병리학교실, <sup>4</sup>아주대학교 분자과학기술학과, <sup>5</sup>전남대학교 의과대학 정형외과, <sup>6</sup>부산가톨릭대학교 치기공과, <sup>7</sup>인제대학교 FIRST 연구그룹, 의생명공학원

(Received February 13, 2007. Accepted June 11, 2007)

## Investigation of Nanofiber and Thermosensitive Scaffold for Intervertebral Disc through Organ Culture

Yong Jae Lee<sup>1</sup>, Ji Won Shin<sup>1</sup>, Ho Jun Shin<sup>2</sup>, Chan Hwan Kim<sup>3</sup>, Ki Dong Park<sup>4</sup>, Jin Woo Bae<sup>4</sup>, Hyoung-Yeon Seo<sup>5</sup>, Young Jick Kim<sup>6</sup>, Jung-Woog Shin<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Inje University, Gimhae, Korea.,

<sup>2</sup>School of Material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Japan,

<sup>3</sup>Department of Pathology, Inje University, Gimhae, Korea,

<sup>4</sup>Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon, Korea,

<sup>5</sup>Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Chunnam National University,

<sup>6</sup>Department of Dental Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan, Korea,

<sup>7</sup>FIRST Research Group, Institute of Biomedical Engineering, Inje University

### Abstract

The purpose of this study is to investigate the potential of a novel tissue engineering approach to regenerate intervertebral disc. In this study, thermosensitive scaffold (chitosan-Pluronic hydrogel) and nanofiber were used to replace the nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus of a degenerated intervertebral disc, leading to an eventual regeneration of the disc using the minimally invasive surgical procedure and organ culture. In preliminary study, disc cells were seeded into the scaffolds and cellular responses were assessed by MTT assay and scanning electron microscopy (SEM). Based on these results, we could know that tissue engineered scaffolds might provide favorable environments for the regeneration of tissues. Organ culture was performed in fresh porcine spinal motion segments with endplates on both sides. These spinal motion segments were classified into three groups: control (Intact), injured NP (Defect), and inserting tissue engineered scaffolds (Insert). The specimens were cultivated for 7 days, subsequently structural stability, cell proliferation and morphological changes were evaluated by the relaxation time, quantity of DNA, GAG and histological examination. In these results, inserting group showed higher relaxation time, reduced decrement of DNA contents, and accumulated GAG amount. Consequently, the tissue engineered scaffolds used in this study seen to be a promising base scaffolds for regenerative intervertebral disc due to its capacity to absorb external dynamic loading and the possible ideal environment provided for disc cell growing.

**Key words :** intervertebral disc, regeneration, chitosan-Pluronic hydrogel, nanofiber, organ culture

### 1. 서론



통은 요추부분의 피하조직, 배근막, 인대, 척추골, 척추관 절, 추간판, 척수 등의 이상에 의해 생기는 통증으로 전체

인구의 80%가 경험하고 있다. 치료는 원인에 따라 다르며 대부분의 경우 역학적 요인에 기인되어 야기되므로 역학적 장애를 교정하는 방향으로 수행되고 있다. 이들 중 추간판 퇴행은 우리나라 전체 등통의 약 40% 정도를 차지하고 우리나라 내 40 대의 약 1/3 정도가 추간판 퇴행을 겪고 있는 것으로 알려져 있다. 추간판 퇴행은 또한 추간판 탈출증, 척추관 협착증, 척추 신경 병변과 같은 질병을 유발하기도 한다[1, 2].

추간판은 척추에서 하중전달에 중요한 역할을 담당하는 연골조

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2004-000-10164-0)에 의해 지원되었음.

Corresponding Author : 신정욱  
(612-749) 김해시 여방동 607 인제대학교 의용공학과  
Tel : 055-320-3317 / Fax : 055-327-3292  
E-mail : sjw@bme.inje.ac.kr

직으로 중심부에 다량의 수분을 함유한 젤 형태의 수핵과 섬유성 조직의 섬유류로 구성되어 있다. 일상생활에서 신체가 하중을 받을 때 수핵은 움직임에 따라 유동적으로 변형되어 섬유류와 종판 사이의 압력의 균형을 유지하고 주변조직으로 하중을 분산·전달하는 중요한 역할을 수행한다[1, 3]. 나이가 들면서 수핵은 내부의 수분 감소와 섬유성 조직으로의 변형으로 인해 본래의 성질을 상실하고 내부의 압력 감소를 초래하여 효과적인 하중 전달이 어렵게 된다. 이로 인해 수핵 주변의 섬유류에 과도한 하중이 가해지게 되는데 이는 추간판의 퇴행을 유발하는 주요한 원인 중의 하나이다[1, 3, 4].

현재 추간판 퇴행의 치료법으로 스테로이드 주사나 물리치료부터 척추 유합술과 인공 추간판을 이용한 추간판 전치환술 등의 수술적 기법에 이르기까지 많은 치료법들이 행해지고 있으나 이와 같은 치료법들은 퇴행을 예방하거나 억제하고 본래의 조직으로 회복시키는 근본적 치료는 되지 않는다.

최근에는 추간판의 퇴행 정도에 따라 단계를 나누고 각각의 단계에 따라 다른 치료 및 재생 방법들을 시도해야 한다는 주장이 제기되고 있다. 이들 중 조직 공학적 방법은 세포가 증식 및 분화할 수 있는 이상적인 환경을 지지체와 물리적·화학적 인자를 이용해 구현하여 추간판의 재생을 유도하는 방법으로 초기 퇴행 단계에 적합한 치료 방법으로 보고되고 있다[5]. 실제로 많은 연구기관에서 동물이나 사람의 추간판에서 세포들을 각각 분리·배양하고 지지체 및 물리적·화학적 성장인자 등의 배양 환경을 달리하여 변화에 따른 세포의 증식 및 분화 정도를 평가하는 생체 외 실험, 인위적으로 퇴행을 유도한 동물의 추간판에 지지체와 각종 인자들을 적용한 후 추간판의 재생 정도를 관찰하는 동물실험 등이 시행되고 있다[6-8]. 그러나 생체 외 실험의 경우, 실험에 필요로 하는 많은 수의 세포를 얻기 위해 단층 배양할 때 반복되는 계대배양으로 세포의 탈분화 현상이 일어날 가능성이 있다[9]. 이러한 현상은 3 차원 배양을 통해 세포의 표현형을 유지하면서 탈분화를 막을 수 있지만 생체 내의 복잡하고 다양한 환경을 생체 외에서 구현하는 데는 한계가 있다. 또한 동물실험은 전임상과정에서 재생 정도를 측정할 수 있는 이상적인 실험 방법이지만 고가이고 윤리 문제 등 실험준비 및 절차에 많은 시일이 소요된다.

이와 같은 실험의 단점들을 절충할 수 있는 방법으로 기관 배양법을 들 수 있다. 기관 배양은 수핵과 주변 다른 조직(섬유류와 종판)의 통합성을 유지하고 조직의 성장에 필수적인 세포와 세포, 조직과 조직 간의 상호작용을 유지하여 추간판 본래의 표현형과 기능을 보존할 수 있는 장점을 가진 배양 방법이다. 최근 여러 연구에서 동물의 추간판을 이용한 기관 배양이 조직 공학적 접근 방법으로 효용성과 가능성을 가지고 있다고 보고되어지고 있다[10, 11].

본 연구에서는 인위적으로 손상을 가한 추간판에 조직 공학적 방법을 이용하여 추간판의 기능 회복 및 재생을 유도하고자 하였다. 최소 침습적 기술이 가능하고 수핵과 유사한 형태를 가진 온도 감응성 지지체를 수핵 부위에 삽입하고 손상된 섬유류 부위에 생분해성 고분자인 PLGA로 만들어진 나노 섬유 지지체를 삽입해

수핵과 추간판 세포의 증식을 통한 추간판의 재생 가능성을 검증하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. 추간판 세포 분리

추간판 세포는 생후 6 개월 된 돼지 요추의 추간판을 적출하여 분리하였다. 적출된 추간판에서 채취된 조직을 수핵과 섬유류로 각각 나누고 효소분리법을 이용하여 분리하였다. 분리된 조직을 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)으로 세척하고 섬유류의 경우 2% pronase (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 37°C에서 1 시간, 0.2% type II collagenase (Gibco BRL®, USA)로 37°C에서 5 시간, 수핵의 경우 0.2% collagenase로 37°C에서 5 시간 동안 녹였다[12]. 분리된 세포들은(수핵 세포: 약  $2.0 \times 10^6$  개, 섬유류 세포: 약  $3.0 \times 10^6$  개) 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), 50  $\mu\text{g/ml}$  L-ascorbic acid, 항생제 (penicillin G, 100 U/ml; streptomycin sulfate, 100  $\mu\text{g/ml}$ )가 첨가된 DMEM-F12 (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA)배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태의 인큐베이터에서 배양되었다.

### B. 온도 감응성 지지체 제작 및 적합성 평가

온도 감응성 지지체는 아주대학교 분자과학기술학과에서 제조한 공중합체를 사용하였다. Pluronic F127 (MW 12,600, BASF, Korea)과 Chitosan (High molecular weight, 75-85 deacetylated, Sigma-Aldrich, USA)을 couple agent인 EDS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide)와 NHS (N-hydroxysuccinimide)를 사용하여 chitosan-Pluronic 공중합체 (Pluronic)를 제조하였다. 합성된 온도 감응성 지지체는 실온에서 sol 상태를 유지하며 임계하한농도 (LCST, lower critical solution temperature)인 32°C에서 gel 상태로 변화하였다[13]. 제작된 온도 감응성 지지체의 세포 적합성 평가를 위해 2 회 계대배양된 수핵 세포를 24 well의 바닥에 미리 도포해놓은 온도 감응성 지지체 위에 50,000 cells/well의 농도로 파종하여 단층 배양하였다. 대조군으로 일반적인 주입형 지지체로 이용되는 알지네이트 (Alginate)를 사용하였다. 배양 후 1, 3, 7 일차에 MTT Assay kit (Cell Proliferation Kit I, Boehringer-Mannheim Biochemical, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포 적합성 평가를 시행하였다.

### C. 나노 섬유 지지체 제작 및 적합성 평가

전기방사 시스템을 이용하여 나노 섬유 지지체를 제작하였다. 75:25 PLGA (Poly(D,L-lactide-co-glycolic acid)를 N,N-dimethylformamide (DMF, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)와 tetrahydrofuran (THF, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 1:1로 혼합한 용매에 녹여 전기방사를 시행하였다. 분사구와 집속부 사이에는 0.56 kV/cm의 고압 직류 전압을 부

과하였다. 방사시 용매의 증발을 위해 챔버 내부의 온도를 40℃로 유지하였다. 제작된 지지체는 잔류용매의 제거를 위해 진공건조기를 이용하여 5일간 상온에서 진공 건조하였다.

제작된 PLGA 나노 섬유 지지체의 세포 적합성 평가를 위해 3회 계대배양된 섬유를 세포를 1×1×0.1cm<sup>3</sup> 크기의 나노 섬유 지지체에 25,000 cells/cm<sup>2</sup>의 농도로 파종하였고 배양 3일차에 나노 섬유 지지체에 부착된 세포의 형상 관찰 및 적합성 평가를 위해 scanning electron microscopy (SEM, JSM-6700; JEOL, Japan) 을 이용하여 관찰하였다.

#### D. 기관 배양

6 마리의 생후 6 개월 전후 100kg 내외의 암컷 돼지에서 요추의 운동분절 24 개를 획득하였다. 돼지의 요추는 도살 후 2 시간 이내에 분리하였고 요추의 중판 윗부분을 횡단면으로 절단하여 제 1-2, 2-3, 3-4, 4-5 요추간 운동분절을 적출하였으며 이때 추간판 양쪽으로 중판과 약간의 척추체는 보존하였고 주변의 근육과 인대는 모두 제거하였다. 적출된 시편은 항생제 (penicillin G, 1000 U/ml; streptomycin sulfate, 1000 µg/ml)가 첨가된 HBSS에 1 시간 동안 담가 멸균한 후 HBSS로 2~3 회 세척하였다. 실험군은 정상군 (Intact), 추간판 퇴행 유도 후 지지체 삽입 군 (Insert), 추간판 퇴행군 (Defect)으로 구분되었다 (실험 군당 n=8). 추간판 퇴행을 구현하기 위해 18 게이지의 주사기를 이용하여 섬유를 부위에 천공 후 약 200 µl의 수핵을 흡입하였다[14]. Insert 군에는 제거된 수핵 부분에 온도 감응성 지지체, 손상된 섬유를 부위에 나노 섬유 지지체를 삽입하였다. 배지에 의해 시편이 팽윤되는 것을 막기 위해 손상된 섬유를 입구 부위를 의료용 접착제 (CA40H, Scotch-Weld™, 3M, St. Paul, MN, USA)로 밀봉하였다. 시편은 20%(v/v) FBS, 50 µg/ml L-ascorbic acid, 항생제 (penicillin G, 100 U/ml; streptomycin sulfate, 100 µg/ml), ITS supplement (10 µg/ml insulin, 5.5 µg/ml transferrin, 0.5 ng/ml sodium selenite)가 첨가된 DMEM-F12를 이용하여 인큐베이터에서 배양되었다. 그리고 배지에 NaCl을 첨가하여 360~410 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O 삼투압을 유지시켰다[15, 16]. 배지는 2 일마다 교체해 주었으며 7 일간 배양하였다. 본 실험에서는 조직 공학적 지지체를 적합성을 검증하기 위해 동종의 수핵 세포나 중간엽 줄기세포를 사용하지 않고 지지체를 손상부위에 삽입하였다.

#### E. 생체 역학적 특성 평가

점탄성 물질로 이루어진 추간판의 점탄성 물성치 중 하나인 응력 이완시간 (stress relaxation time)을 확인하기 위해 기관 배양 전 실험군 내 시편을 임의로 하나씩 선택하여 응력-이완 실험을 시행하였다[17]. 실온에서 시편들의 수분 건조를 최소화하기 위하여 식염수에 젖은 거즈를 이용하여 시편을 감싸 보관하였고 실험 직전에 거즈를 제거한 후 실험하였다. 실험 전 버니어 캘리퍼스를 이용하여 시편 전방부의 추간판 높이를 측정하고 Image J(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 이용하여 단면적을 측정하였다. 5%의 압

축 변형율을 만능시험기 (MTS 850.20, MTS system, Eden Prairie, MN, USA)를 이용하여 부과하였다. 변형율을 부과한 후 출력값의 변화가 없을 때까지 출력값을 저장하였다. 출력값으로 완화시간을 계산하기 위하여 다음과 같은 식을 이용하였다[18].

$$\sigma(t) = A \cdot e^{-(t/\tau)} + B$$

A+B: 최대 응력 (t=0)

τ: 응력 완화시간

B: 최대 완화 후 응력

각 계수는 응력-시간 곡선상의 데이터들 중 최대 응력 후의 데이터에 비선형 회귀분석을 적용하여 결정하였다. 회귀분석은 SPSS (Ver.10.0, SPSS Inc., USA)를 사용하였다.

#### F. DNA 분석

세포의 증식 정도는 DNA 정량 키트 (PicoGreen dsDNA Quantitation kit, Molecular Probes, Eugene, USA)를 이용하여 측정하였다. 7 일간 배양 후 시편에서 수핵 부분을 적출하여 -60℃에서 2 일간 동결 건조 하였다. 동결 건조 후 획득한 시편에 파파인 용액 (papain 125 µg/ml, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM L-Cystelue hydrochloride, 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA)을 500 µl 첨가한 후 드라이오븐에서 24 시간 동안 녹였다. 녹인 용액 중 50 µl를 96 well plate에 옮긴 후 50 µl의 TE buffer와 100 µl의 reagent를 첨가하였다. 빛을 차단시킨 상태에서 5 분간 실온에서 반응시킨 후 Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA)를 이용하여 480~520 nm의 파장에서 형광도를 측정하였다. 모든 결과들은 건조 중량 (Dry weight)으로 표준화 하였다.

#### G. GAG 분석

세포의 세포 외 기질 형성 정도를 측정하기 위해 GAG 정량 키트 (Blycan Glycosaminoglycan Assay, Biocolor Ltd., N. Ireland)를 이용하였다. 동결 건조 후 획득한 시편을 파파인 용액에 녹인 후 50 µl의 용액에 200 µl의 Blyscan dye reagent를 첨가한 후 30 분간 교반하였다. 원심분리를 실시한 후 상층액을 제거하고 200 µl의 dissociation reagent를 첨가한 후 Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader를 이용하여 656 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 결과들은 건조 중량으로 표준화 하였다.

#### H. 조직학적 분석

실험군 내 시편을 임의로 2 개씩 선택하여 조직학적 검사를 시행하였다. 4% 중성 포르말린 용액에 24 시간 고정 후 요추의 추간판 윗부분을 횡단면으로 절단하여 파파인 블록을 제작하였다. 4 µm 두께의 박편으로 잘라 슬라이드를 제작한 후 조직학적 염색을 실시하였다. 염색은 hematoxylin-eosin (H&E) 염색과 alcian blue 염색을 시행하였으며 광학현미경 (CK40, Olympus Optical Co. LTD., Japan)에서 관찰한 후 디지털 카메라 (C-5050 ZOOM, Olympus Optical Co. LTD., Japan)로 촬영하였다.

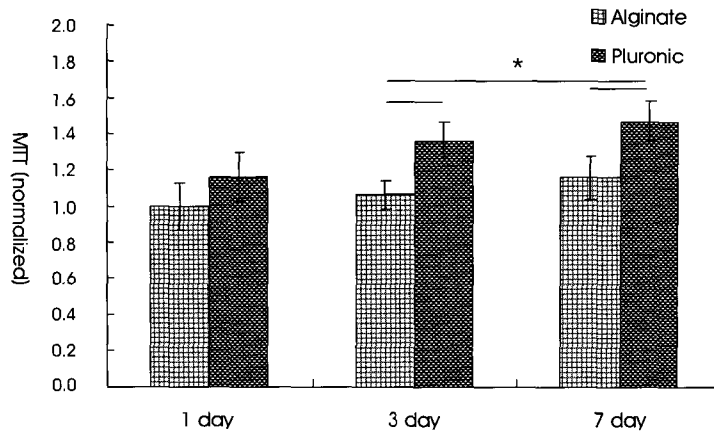


그림 1. 수핵 재생용 지지체 제작에 이용된 재료들에서 단층 배양된 수핵 세포의 증식 (\*:  $p < 0.05$ ).

Fig. 1. Cell proliferation on the different materials used for making the structural scaffolds of the nucleus pulposus by monolayer culture (\*:  $p < 0.05$ ).

### I. 통계적 분석

데이터의 통계적 신뢰성 확보를 위해 범용 통계 프로그램인 SPSS를 이용하여 일원 분산 분석을 실시하였고 다중 분산 비교는 least significant difference 방법을 이용하였다.

## III. 결과

### A. 온도 감응성 지지체 제작 및 적합성 평가

MTT Assay kit 를 이용한 세포 적합성 평가에서 모든 실험군에서 7 일차까지 통계적으로 유의하지는 않지만 증가하는 경향을 보였다. 실험군 간의 비교에서 온도 감응성 지지체 (Pluronic)군이 배

양 후 3 일, 7 일차에 대조군 (Alginate)보다 통계적으로 유의한 차이를 보이며 높게 나타났다[그림 1]  $p < 0.05$ ).

### B. 나노 섬유 지지체 제작 및 적합성 평가

나노 섬유 지지체는 수백 nm의 직경을 지닌 섬유들로 구성되어 있고 다공구조를 가지고 있음을 SEM 사진을 통해 알 수 있었다. 또한 배양 후 3 일차 지지체의 상부에 고르게 세포 부착이 일어난 것을 확인할 수 있었다[그림 2].

### C. 생체 역학적 특성

응력 완화시간은 Intact 군 180.344 sec, Insert 군 158.126 sec,

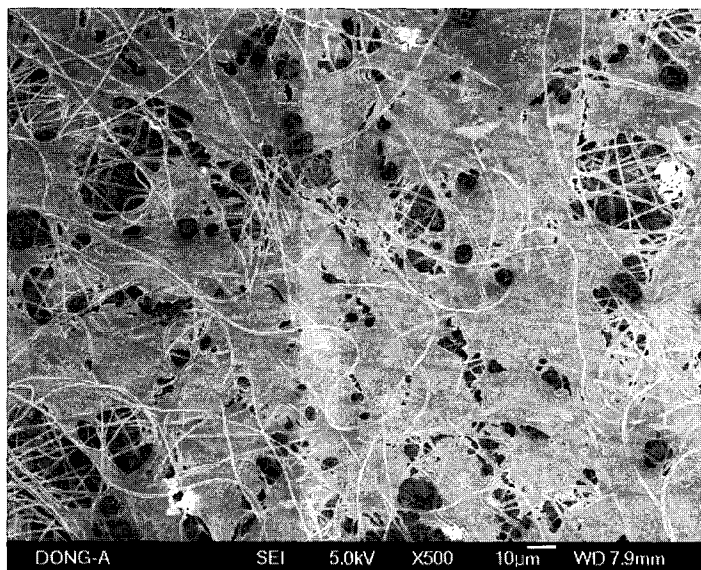


그림 2. 섬유류 세포가 부착된 PLGA 나노 섬유 지지체.

Fig. 2. Scanning electron microscopy images of the electrospun PLGA nanofiber scaffold and cell growth.

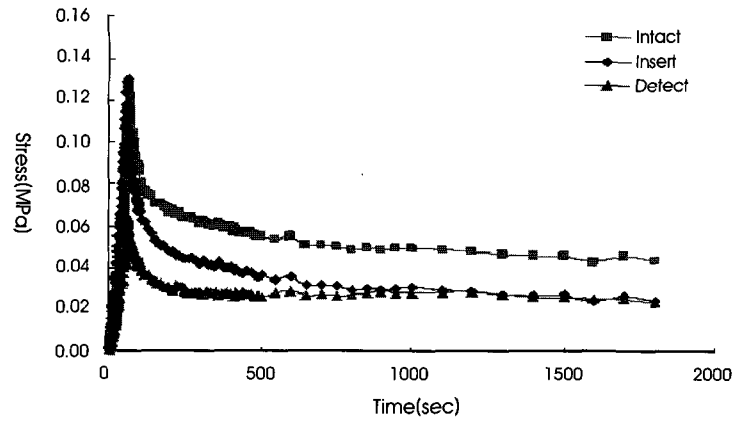


그림 3. 응력-이완 곡선.  
Fig. 3. Stress relaxation curves.

Defect 군 62.134 sec 으로 Insert 군의 완화시간이 Defect 군에 비해 Intact 군의 응력완화 시간에 근사한 것을 확인하였다[그림 3].

하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 배양 7 일차 Defect 군의 DNA 양은 1 일차의 DNA 양에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하였다. 배양 1 일차 Intact 군과 Defect 군은 유의한 차이를 보이지 않았으나 7 일차 실험군 간의 유의한 차이를 보이며 Defect 군이 낮은 DNA 양을 나타냈다[그림 4. A].

**D. DNA 분석**

7 일간의 배양기간 동안 Intact 군과 Insert 군의 DNA 양은 감소

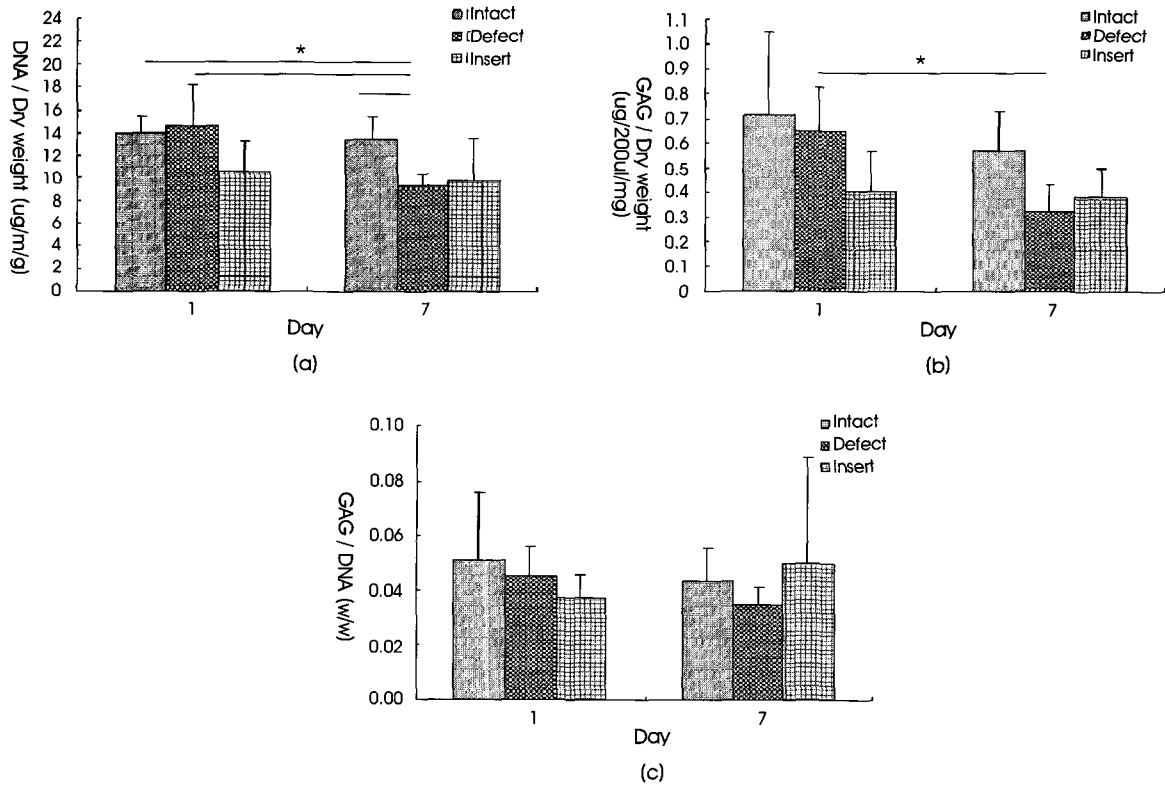


그림 4. 실험군에 따른 DNA 및 GAG 양. (a) DNA 양, (b) GAG 양, (c) GAG/DNA 비 (\*: p < 0.05).

Fig. 4. DNA and GAG contents in experimental groups. (a) DNA contents, (b) GAG contents. Both results were normalized to dry weight. (c) GAG/DNA ratio (\*: p < 0.05).

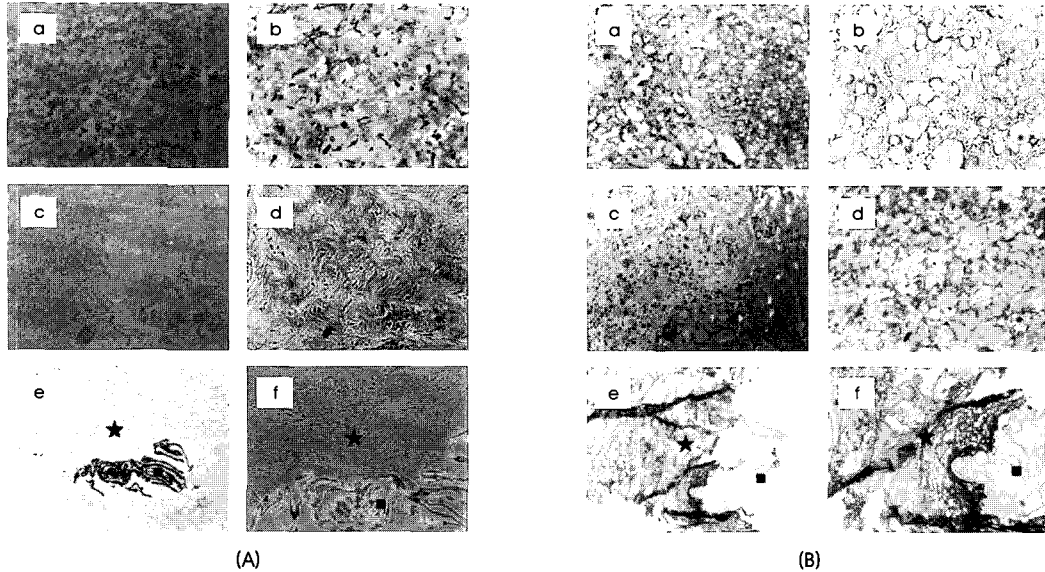


그림 5. 실험군 내 수핵부위의 조직학적 관찰 (A) H&E 염색, (B) Alcian blue 염색, (a), (b) 정상군, (c), (d) 손상을 가한 군, (e), (f) 지지체를 삽입한 군, (a), (c), (e) × 40. (b), (d), (f) × 100. 지지체를 삽입한 군의 경우 ★: 수핵, ■: 온도 감응성 지지체.

Fig. 5. Histological observations [(A) H&E, (B) Alcian blue] of the stained nucleus pulposus (NP) in the experimental groups (a), (b): Intact group, (c), (d): Defect group, (e), (f): Insert group relatively. (a), (c), (e) Magnification × 40. (b), (d), (f) Magnification × 100. In image of Insert group, ★: nucleus pulposus, ■: thermosensitive scaffold.

### E. GAG 분석

7 일간의 배양기간 동안 GAG 양은 DNA 양과 유사한 경향을 보였다. Intact 군과 Insert 군의 GAG 양은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 배양 7 일차 Defect 군의 GAG 양은 1 일차의 GAG 양에 비해 유의한 차이를 보이며 감소하였다[그림 4. B].

### F. 조직학적 분석

조직학적 분석을 통해 Intact 군에서 높은 세포 밀도, 세포 주변으로 형성된 세포 외 기질, 액포를 띤 수핵 조직 등을 관찰할 수 있었다. 그러나 Defect 군의 경우 일부 수핵에서 섬유화 및 액포의 감소 등이 나타났고 다수의 도상 배열형태로 분리된 수핵 세포를 확인할 수 있었다. Insert 군의 경우 삽입된 지지체와 기존의 수핵조직 경계 간에 세포의 군집, 다량의 기질 분포를 H&E 염색을 통해 확인하였고, Alcian blue 염색을 통해 푸른색으로 염색된 당단백질을 확인할 수 있었다[그림 5].

## IV. 고 찰

외부에서 다양한 세포들로 구성된 복수의 조직을 배양하는 기관 배양은 동물실험보다 실험 환경의 제어가 용이하고 조직과 조직 간의 복합적인 반응을 기대할 수 있기 때문에 많은 연구에서 이용되어지고 있다. 그러나 최근까지의 추간판을 이용한 기관 배양은 쥐의 미추 혹은 토끼의 요추 등과 같은 소동물의 추간판으로 시행되어 왔다[10, 19]. Risbud 등[11]은 쥐의 요추 추간판을 3 주 동

안 배양하며 추간판의 기관 배양 가능성에 관한 연구 결과를 보고한 바 있다. 배양 1 주차의 추간판에서는 세포의 활성화, 당단백질의 분비, 수핵 세포의 단백질 발현 등이 유지되었지만 3 주차에는 세포 기능의 손실이 나타났다고 보고하고 있다. 그러나 소동물의 추간판은 대동물과 비교하였을 때 해부학적인 차이를 비롯하여 높은 세포 밀도와 대사 이동, 성숙한 수핵 내 존재하는 notochordal 세포의 유무 등의 생물학적 차이가 있다. 그러므로 소동물의 실험결과를 인간에 적용하기에는 한계가 있고 돼지나 소 등과 같은 대동물의 추간판을 이용한 실험의 필요성이 제기되고 있다[20]. 본 실험에서는 돼지의 추간판을 이용하여 기관 배양을 시도하였고 배양 후 7 일차에 DNA, GAG, 조직학적 검사를 시행하여 추간판의 수핵 내 세포의 존재 및 당단백질 잔존을 확인하였다. 이것은 본 연구의 결과가 Risbud 등의 결과와 유사함을 나타내고 돼지의 추간판을 이용한 기관 배양이 최소 1 주 동안 유지될 수 있음을 보여준다. 따라서 대동물의 기관 배양은 앞으로 세포를 이용한 생체 외 실험과 동물 실험 혹은 임상 실험의 매개체 역할로서 매우 유용할 것으로 사료된다.

동물의 경우 자연적인 추간판 퇴행성 모델을 구하기 어려워 약물을 주입하거나 간단한 시술을 부가하여 퇴행성 모델을 유도한다[21, 22]. 퇴행 유도 방법에 따라 퇴행의 진행 속도가 달리 나타나는데 본 연구에서는 전체 배양 기간을 고려하여 짧은 기간에 추간판 퇴행을 유도하고자 섬유륜 일부에 주사기로 손상을 주고 수핵의 일부를 흡입하는 방법을 사용하였다. 박 등[23]과 김 등[24]은 섬유륜의 손상으로 도 추간판의 퇴행이 일어날 수 있다고 보고하고

있다. 그러므로 본 실험에서는 섬유류의 손상을 최소화하면서 수핵 부위에 주입이 가능하고 수핵의 재생을 유도할 수 있는 온도 감응성 지지체를 사용하였고, 손상된 섬유류 부위에 유사한 섬유성 구조를 지닌 나노 섬유 지지체를 삽입하여 수핵과 섬유류의 동시 재생을 통한 손상된 혹은 퇴행성 추간판의 기능 회복 및 재생을 이루고자 하였다. 지지체를 이용한 세포 적합성 실험 결과, 온도 감응성 지지체에서 기존의 주입형 지지체로 사용되고 있는 알지네이트에 비해 높은 세포 활성이 나타남을 알 수 있었다. 또한 나노 섬유의 상층부를 덮고 있는 섬유류 세포의 SEM 영상을 통해 조직 공학용 지지체로서의 가능성을 확인하였다.

점탄성 물질의 대표적인 물성치 중 하나인 응력 이완시간은 일정 시간 혹은 반복적인 하중 부가 후 본래의 형태 및 기능을 회복하는 능력을 나타낸다. 응력-이완 실험을 통해 응력 완화시간을 확인하였는데 Intact 시편이 가장 높은 응력 완화시간을 나타냈고 Insert 시편이 Intact 시편에 근사한 응력 완화시간을 나타냈다. 회복된 응력 완화시간은 손상을 유도한 시편이 지지체의 삽입으로 외부 하중이나 과도한 동적 하중을 흡수하는 능력이 향상된 것으로 추정된다. 따라서 손상을 유도한 추간판 내부에 삽입된 지지체가 추간판의 생체 역학적 능력을 회복하는 데 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다. 7일간 배양 후 시행한 정량 분석 결과 배양 1일차 각 실험군 간의 DNA 양은 돼지의 개체에 따라 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 기관 배양기간 동안 모든 실험군에서 DNA 전체 양의 감소가 나타남을 알 수 있었다. Intact 군의 경우 DNA, GAG의 양이 배양기간 동안 소량 감소하였으나 차이는 1 일차에 비해 통계적으로 유의하지 않았다. 인위적인 손상을 가한 Defect 군의 경우 7 일차의 DNA의 양이 1 일차의 DNA의 양에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하는 것을 알 수 있었다. GAG의 양에서도 Defect 군은 7 일차에 유의한 차이를 보여 감소함을 확인하였다. 온도 감응성 지지체를 삽입한 Insert 군의 경우 조직에 삽입되어진 후 온도 변화에 따라 상변이를 일으켜 형태를 유지하고 구체적인 기전을 밝히지는 못했지만 삽입된 지지체가 본래의 수핵 조직에 영향을 끼쳐 내부의 수핵 세포가 배양기간 동안 조직 내 세포의 존재, 세포 외 기질의 분비를 유도함을 확인할 수 있었다. 또한 조직학적 염색 결과에서도 Intact 군과 같은 정상적인 수핵 조직에서 관찰되는 많은 수핵 세포 및 세포-지지체 간의 축적된 풍부한 당단백질 등이 Insert 군의 지지체 삽입 부위 주위로 관찰되어 삽입된 지지체가 세포의 생장에 영향을 끼쳤을 것으로 사료된다. 그러나 수핵의 재생과 함께 유도한 섬유류의 재생은 지지체가 삽입된 부위에서 구체적인 재생의 근거를 확인할 수 없었다. 차후 실험에서는 지지체의 삽입으로 조직과 지지체 간에 유발된 구체적인 기전을 밝히고 유전자나 효소의 발현 등을 측정하여 섬유류의 재생을 확인하고자 한다. 또한 일상생활에서 사람의 추간판이 받는 역학적인 환경을 고려하여 기계적인 하중을 가하고 이와 같은 환경이 추간판의 재생에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

## V. 결론

본 연구를 통해 다음과 같은 결론을 유도 할 수 있었다. 인위적인 손상을 유도한 추간판에 조직 공학적 방법인 온도 감응성 지지체를 삽입하는 최소 침습적인 수술 방법을 시행하여 추간판의 기능 회복, 수핵 세포의 증식 및 세포 외 기질의 형성을 유도할 수 있었다. 이는 추간판 퇴행의 속도를 늦출 수 있으므로 재생을 위한 유용한 재료 및 방법으로 이용할 수 있을 것이다. 또한 동종 세포 및 줄기세포를 이용한 세포치료나 약물전달체제를 부가하여 더욱 효율적인 추간판의 재생을 유도할 수 있을 것으로 사료된다. 이와 같은 연구 결과를 임상에 적용하기에는 한계가 있으므로 지지체의 성능 및 접근, 치료 방법 개선을 이루고 전임상실험으로 토끼 및 돼지를 이용한 동물실험 등이 선행하여 할 것이다.

차후 실험에서는 MRI 나 유전자 분석 등과 같은 다양한 분석방법을 통해 추간판의 재생 여부 및 기능 회복의 가능성을 평가해보자 한다.

## 참고문헌

- [1] J. S. Ahn, J. K. Lee, T. S. Jeon, S. Y. Kwon and S. K. Kwak, "Correlation among magnetic resonance images, electron microscopic finding, light microscopic findings and clinical symptom of the degeneration of lumbar intervertebral disc," *J. Korean Soc. Spine Surg.*, vol. 8, no. 2, pp. 121-129, 2001.
- [2] B. Shen, J. Melrose, P. Ghosh and F. Tayler, "Induction of matrix metalloproteinase-2 and -3 activity in ovine nucleus pulposus cells grown in three-dimensional agarose gel culture by interleukin-1 $\beta$ : a potential pathway of disc degeneration," *Eur. Spine J.*, vol. 12, pp. 66-75, 2003.
- [3] J. A. Buckwalter, T. A. Einhorn and S. R. Simon, "Orthopaedic basic science 2nd. American academy of orthopaedic surgeons," *Illinois*, pp. 443, 2000.
- [4] J. C. Gan, P. Ducheyne, E. J. Vresilovic, W. Swaim and I. M. Shapiro, "Intervertebral disc tissue engineering I: Characterization of the nucleus pulposus," *Clinical Orthop Related Res*, vol. 411, pp. 305-314, 2003.
- [5] H. S. An, E. J. Thonar and K. Masuda, "Biological repair of intervertebral disc," *Spine*, vol. 28, no. 15S, pp. S86-S92, 2003.
- [6] H. E. Gruber, G. L. Hoeslscher, K. Leslie, J. A. Ingram and E. N. Hanley, "Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 371-376, 2006.
- [7] R. Q. Brown, A. Mount and K. J. L. Burg, "Evaluation of polymer scaffolds to be used in a composite injectable system for intervertebral disc tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 74, no. 1, pp. 32-39, 2005.
- [8] T. Chujo, H. S. An, K. Akeda, K. Miyamoto, C. Muehleman, M. Attawia, G. Andersson and K. Masuda, "Effects of growth differentiation of factor-5 on the intervertebral disc - In vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study," *Spine*, vol. 31, no. 25, pp. 2909-2917, 2006.

- [9] S. J. Chacko, J. Abbott S. and Holtzer, "The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte," *J. Exp. Med.*, vol. 130, pp. 417-442, 1969.
- [10] M. V. Risbud, M. W. Izzo, C. S. Adams and et al. "An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells," *Spine*, vol. 28, no. 24, pp. 2652-2659, 2003.
- [11] C. R. Lee, J. C. Latridis, L. Poveda and M. Alini, "In vitro organ culture of the bovine intervertebral disc - Effects of vertebral endplate and potential for mechanobiology studies," *Spine*, vol. 31, no. 5, pp. 515-522, 2006.
- [12] S. Stern, K. Lindenhayn, O. Schultz and C. Perka, "Cultivation of porcine cells from the nucleus pulposus in a fibrin/hyaluronic acid matrix," *Acta Orthop Scand*, vol. 71, no. 5, pp. 496-502, 2000.
- [13] J. W. Lee, M. C. Jung, H. D. Park, K. D. Park and G. H. Ryu, "Synthesis and characterization of thermosensitive chitosan copolymer as a novel biomaterial," *J. Biomater Sci. Polym. Ed.*, vol. 15, no. 8, pp. 1065 - 1079, 2004.
- [14] M. Okuma, J. Mochida, K. Nishimura, K. Sakabe and K. Seiki, "Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study," *J. Orthop. Res.*, vol. 18, pp. 988 - 997, 2000.
- [15] G. D. Palmer, Ph P. H. Chao, F. Raia, R. L. Mauck, W. B. Valhmu and C. T. Hung, "Time-dependent aggrecan gene expression of articular chondrocytes in reponse to hyperosmotic loading," *Osteoarthritis cartilage*, vol. 9, no. 8, pp. 761-770, 2001.
- [16] H. Ishihara, K. Warensjo, S. Roberts and J. P. Urban, "Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolaity," *Am. J. Physiol.*, vol. 272, pp. 1499-1506, 1997.
- [17] W. Johannessen, E. J. Vresilovic, A. C. Wright, D. M. Elliott, "Intervertebral disc mechanics are restored following cyclic loading and unloaded recover," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 32, no. 1, pp. 70-76, 2004.
- [18] C. Park, Y. J. Kim, C. S. Lee, K. An, H. J. Shin, C. H. Lee, C. H. Kim and J. W. Shin, "An in vitro animal study of the biomechanical responses of anulus fibrosus with aging," *Spine*, vol. 30, no. 10, pp. E259-265, 2005.
- [19] D. Haschtmann, J. V. Stoyanov, L. Ettinger, L. P. Nolte and S. J. Ferguson, "Establishment of a novel intervertebral disc/endplate culture model: Analysis of an ex vivo in vitro whole-organ rabbit culture system," *Spine*, vol. 31, no. 25, pp. 2918-2925, 2006.
- [20] J. C. Lotz, "Animal models of intervertebral disc degeneration: Lessons learned," *Spine*, vol. 24, no. 23, pp. 2742-2750, 2004.
- [21] K. Takegami, H. S. An, F. Kumano, K. Chiba, E. J. Thonar, K. Singh and K. Masuda, "Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis," *Spine J*, vol. 5, no. 3, pp. 231-238, 2005.
- [22] S. Sobajima, J. F. Kompel, J. S. Kim, C. J. Wallach, D. D. Robertson, M. T. Vogt, J. D. Kang and L. G. Gilbertson, "A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology," *Spine*, vol. 30, no. 1, pp. 15-24, 2005.
- [23] Y. S. Park, J. L. Cho and J. P. Kostuik, "Experimental annulotomy-induced degeneration in rabbit intervertebral discs -Comparative study between incomplete and complete annulotomy," *J. of Korean Orthop Accoc*, vol. 38, pp. 619-623, 2003.
- [24] Y. T. Kim, J. J. Kim, J. H. Hwang, M. J. Shin, E. S. Yu and Y. K. Shin, "Annulus tears in the intervertebral disc degeneration -An experimental study using an animal model," *J. of Korean Spine Surg*, vol. 1, pp. 259-272, 1994.