

이프리플라본을 함유한 생분해성 PLGA 미립구의 제조 및 조직공학적 골재생을 위한 영향평가

소정원 · 장지욱 · 김순희 · 김근아 · 최진희 · 이종문 · 손영숙* · 민병현** · 강길선†

전북대학교 고분자 BIN소계 융합연구센터, *경희대학교 근골격계 바이오 장기센터, **아주대학교 세포치료센터
(2008년 7월 21일 접수, 2008년 7월 31일 수정, 2008년 8월 14일 채택)

Preparation and Release Behavior of Ipriflavone-Loaded PLGA Microsphere for Tissue Engineered Bone

Jung Won So, Ji Wook Jang, Soon Hee Kim, Geun Ah Kim, Jin Hee Choi,
John M. Rhee, Young Suk Son*, Byoung-Hyun Min**, and Gilson Khang†

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

*Musculoskeletal Bioorgan Center, Kyunghee University, Global campus,
Seocheon Dong, Giheung gu, Yongin 446-701, Korea

**Cell Therapy Center, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-721, Korea
(Received July 21, 2008; Revised July 31, 2008; Accepted August 14, 2008)

초록: 골 결손 치료를 위해 생분해성 고분자인 PLGA에 골다공증 치료제인 이프리플라본(IP)을 함유한 미립구를 O/W 유화 용매 증발법으로 제조하였으며, 생체의 방출실험에서 IP 방출량은 HPLC로 분석하였다. SEM을 이용하여 미립구에 부착된 세포의 거동을 확인하였으며, IP가 세포에 미치는 독성평가는 CCK-8 분석방법을 이용하여 측정하였다. 골 형성 지표인 ALP 활성도를 측정하였으며, 배양된 BMSCs의 골세포로의 표현형을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 방출결과에서 IP 방출은 거의 40일 이상으로 지속적이었으며, IP를 함유한 미립구에서의 세포의 부착, 성장 등이 잘 이루어짐을 확인하였고, ALP 활성도 및 RT-PCR 분석결과에서도 단독의 PLGA 미립구보다 IP를 함유한 미립구에서의 값이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 본 실험결과를 바탕으로 향후 서방성 제제화에 있어서 IP/PLGA 미립구를 응용하게 되면 국소지향성 골분화 주사용 지지체로서 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

Abstract: The aim of this research was to prepare microparticulate systems based on poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) for the local release of ipriflavone in order to reduce bone loss. We developed the IP loaded PLGA microspheres using relatively simple oil-in-water (O/W) solvent evaporation method. HPLC was used to perform the *in vitro* release test of IP and morphology of cell attached on the microspheres was investigated using SEM. Cytotoxicity was assayed by cell counting kit-8 (CCK-8) test. Osteogenic differential cells were analyzed by ALP activity. Through RT-PCR analysis, we observed osteocalcin, ALP, and Type I collagen mRNA expression. The release of IP *in vitro* was more prolonged over 42 days and IP/PLGA microspheres showed the improvement on the cell proliferation, ALP activity and RT-PCR comparing with control (only PLGA). This initial research will be used to direct future work involved in developing this composite injectable bone tissue engineering system.

Keywords: ipriflavone, PLGA, microsphere, osteogenesis, BMSCs.

서 론

골다공증은 가장 흔한 대사성 골질환의 하나로 골격대사 이상에 의해서 골의 절대량이 감소됨에 따라 골 형성세포 활성에 비해 골 용해세포 활성의 비정상적인 증가로 인하여 경미한 외상에도 불구하고 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 골격계 질환이다.¹⁻³ 인구의 고령화로 인한 연령의 증가와 관련이 있는 골다공증에 의한 골절은 환자 및 의사

모두가 관심을 가져야 할 질환이며 이미 서구에서는 의료비 등 여러 면에서 사회적 문제로 대두되고 있는 실정으로써 골다공증 골절과 연관된 골 결손의 치료를 위한 적절한 재건 방법이 요구되고 있는 상황이다.⁴ 골 결손부에 대한 재건 기법으로는 골 시멘트로 충전하는 방법, 주문 제작된 특수 삽입물을 사용하는 방법, metal wire mesh로 보강한 후 골 이식을 하는 방법 등이 있으나 이 모두 임상적으로는 만족스러운 결과를 보여주지는 못하고 있으며, 또한 자가골이나 동종골을 이식하는 방법이 있으나 각각 그 양에 제한이 있고 골 조직 채취 부위에 손상이 생기며 채취 방법이 불편하다는 단점과 가격이 비싸고

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

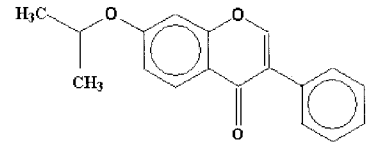
면역학적 거부 반응을 일으킬 수 있으며 여러 감염 질환에 이환될 수 있다는 위험이 있다.⁵⁻⁸ 따라서, 이러한 단점을 극복하기 위한 골 조직 대체물에 대한 개발과 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 환자 자신으로부터 얻은 줄기세포를 이용하여 적절한 생체재료와 함께 이식하는 생체 조직공학적 치료 또는 재생 방법이 새로운 골결손의 치료 방법으로 시도되고 있다.^{5,9-12}

이프리플라본(ipriflavone, 3-phenyl-7-isopropoxy-4H-1-benzopyrane-4-one, IP)은 이소플라본의 파생물로서 골의 재흡수를 방지하며 에스트로겐의 칼시토닌 분비 촉진작용 증가에 의해 조골세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이 약물은 경구 투여를 통해서 노년층이나 폐경기 여성들에서 빈발하는 골다공증의 치료 및 예방제로 널리 쓰이고 있으나, 극히 난용성이어서 경구 투여시 일부만 소장 상부에서 흡수될 뿐 거의 흡수되지 않는 것으로 알려져 있으며 우울증, 심박급속증 및 특히 합성 식물성 에스트로겐으로써 가장 흔한 부작용인 위장관장애 같은 합병증이 뒤따른다.^{13,14} 따라서, 이러한 약물의 흡수를 개선 및 국부지향성을 위한 생분해성 고분자를 이용하여 장기간 약물을 지속적으로 방출할 수 있는 조직공학적으로 주사가능한 지지체 시스템의 중요성이 부각되고 있다.^{15,16} 더욱이 이런 주사가능한 지지체들은 일반적인 기능뿐만 아니라 조직의 편리성과 조직 재생의 관점에 있어서 크게 주목 받고 있고 알지네이트,¹⁷ 아가로스,¹⁸ 피브린 비드와¹⁹ 같은 재료를 이용한 조직공학적 주사 전달체 등의 연구결과 또한 보고되고 있다. 또한, 생분해성 고분자를 이용한 미립구는 3D 세포배양, 약물 또는 성장인자에 대한 적재력에서 독특한 특성을 가지고 있기 때문에 조직공학적 조직재생을 위한 주사가능한 지지체로서 응용이 증가하고 있다.²⁰ 주로 이용되는 생분해성 고분자로는 폴리에스테르 계열의 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA)로서 생체 내에서 젖산과 글리콜산으로 분해되고 최종적으로 이산화탄소와 물로 배출되는 생분해성과 생체적합성의 특징으로 인하여 약물 전달체로서 다양한 분야에 이용되고 있으며 미국 식품의약품안전청(FDA)에서 허가를 받은 물질이기도 하다.^{9,21,22}

본 연구에서는 골다공증 환자를 위한 약물의 서방성 제제화 및 조직공학적으로 골 형성을 위해 골다공증 치료제인 이프리플라본의 함유량을 달리하여 생분해성 고분자인 PLGA로 일반적인 O/W 유화용매 증발법을 이용한 IP/PLGA 미립구를 제조하였고 국소지향성 및 장기간 지속적인 약물을 방출하는 조직공학적으로 주사가능한 미립구 시스템의 골분화 가능성을 평가하고자 골수 중간엽 줄기 세포를 파종하였다.

실 험

시약 및 재료. PLGA(락타이드/글라이콜라이드 볼비, 75/25, Resomer® RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mol인 것을 사용하였다. Ipriflavone(순도 99.2%, Dongbang Future Technique & Life Co. Ltd., Korea)은 상온에서 보관하여 사용하였으며, 미립구를 제조하는데 에멀전을 형성하도록 사용하는 유화제는 폴리(비닐 알코올)(PVA)로서 분자량이 1500 g/mol로 Showa Chem. Co. Ltd.(Tokyo, Japan) 제품을 구입하여 사용하였다. 메틸렌클로라이드(methylene chloride, MC Tebia Co. In., USA)와 그 외의 기타 시약들은 HPLC



7-isopropoxy-3-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
C₁₈H₁₆O₃ : M.W.280.33

Figure 1. The chemical structure of ipriflavone.

등급을 사용하였다. IP의 화학 구조식은 Figure 1에 나타내었다.

O/W 용매 증발법을 이용한 IP/PLGA 미립구 제조. 본 연구에서 사용한 미립구의 제조는 약물의 초기 함량을 각각 변수로 주어 일반적인 O/W 용매 증발 방법을 이용하여 제조하였다. 먼저 PLGA와 IP를 MC에 용해시켜 유기용액 층을 제조한 후, 유화제가 함유된 수용액 층에 주사기를 이용하여 한 방울씩 떨어뜨리면서 교반시킨다. 이때 교반속도는 500 rpm이며 7시간 동안 교반시키면서 용매를 증발시켰다. 본 실험에서 사용한 물리적 교반기는 RZR 2102(Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany)를 사용하였으며 교반 후 용액을 증류수로 희석시켜 원심분리기에서 2000 rpm으로 2분 동안 원심분리하여 상등액을 버린 후 증류수로 미립구를 5회 세척하여 얻었다. 제조된 미립구는 동결건조기를 사용하여 건조시켰다(8 mTorr, -78 °C, 24시간). 미립구는 사용 전까지 데시케이터에 보관하였다.

미립구내에 존재하는 약물 함량 결정. 미립구 내에 포집시킨 이프리플라본의 포집률을 분석하기 위하여 함유량에 따른 각각의 미립구 20 mg을 2 mL의 MC에 넣어 PLGA와 약물을 녹이고, 18 mL의 메탄올을 첨가하여 PLGA를 침전시키고 상등액 1 mL를 취하여 HPLC 분석하였다. HPLC 분석은 UV 검출기(UV-1000, Thermo Separation Products, Fermont, CA, USA), 펌프(P-2000, Thermo Separation Products), 자동시료주입기(AS-3000, Thermo Separation Products)로 구성된 HPLC를 사용하였다. 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈(3.9×300 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고 이동상은 증류수와 아세트니트릴의 혼합액(70 : 30, v/v)을 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 컬럼온도는 상온을 유지하였고 검출파장은 250 nm를 선택하였으며 시료주입량은 20 μ L로 하였다. 데이터는 다음의 포집률 공식을 이용하여 구하였다.

$$E \cdot E = \frac{\text{Amount of drug in microsphere}}{\text{Total amount of polymer}} \times 100\%$$

Encapsulation efficiency ($E \cdot E$)는 약물의 포집 효율을 나타낸다.²¹

생체의 방출분석. 제조한 미립구로부터 난용성 약물인 IP의 생체외 방출거동을 조사하기 위해 소디움도데실설페이트(SDS, Sigma Chem. Co., USA)를 1% w/v 첨가한 완충용액으로 제조된 실험액에 미립구를 분산시켜 생체 외에서 이프리플라본의 방출을 관찰하였다. 일정 농도의 계면활성제를 포함하는 10 mL의 PBS 용액에서 미립구(20 mg/10 mL PBS)를 넣어 현탁하고 인큐베이터 안에서 37 °C와 일정한 교반속도(70 rpm)를 유지하면서 일정 기간별로 시료를 취하였고, 동일한 양의 용출액을 보충해 주었다. 분석시료는 HPLC 분석을 이용하여 정량하였다.

BMSC의 배양. BMSC는 4주된 암컷 Fischer 쥐(Japan SLC Inc.,

Japan)의 대퇴부를 절단하여 근육을 제거하고 무균상태에서 18개월의 바늘과 PBS 수용액이 든 주사기를 사용하여 2~3 mL의 골수를 채취한 다음 배양액으로 2배 희석하여, 원심분리기로 2500 rpm에서 25분간 원심분리 하여 마이크로피펫을 이용하여 세포층만을 분리하여 배양액으로 다시 희석하고 1200 rpm에서 10분간 원심분리한 후 배양액으로 2~3번 세척하였다. 분리한 세포는 10% 우태혈청(FBS, Gibco BRL Grand Island, NY, USA)과 1% 항생제(100 unit/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신, Gibco)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37 °C, 5%, CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포는 3일에 한번 씩 배양액을 교체하였으며 7~9일에 한 번씩 세 번 계대 배양하였다.²³⁻²⁵

SEM 관찰. BMSC가 파종된 IP/PLGA 미립구의 표면 형태를 관찰하기 위하여 SEM(model S-2250N, Hitach Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 플라즈마 스퍼터(Emiteck, K575, UK)를 이용하여 아르곤 가스 하에서 백금코팅을 실시한 후 교류전압(ACC voltage) 5 kV에서 각각 100 및 800 배율로 관찰하였다.

CCK-8 분석. 이프리플라본을 함유한 미립구에서의 세포독성을 평가하기 위해 CCK-8 분석을 수행하였다. 배양된 세포를 지지체에 파종한 후 1, 3, 7 및 14일째 CCK-8(Cell Counting Kit-8, Dojindo Lab., Japan) 용액을 첨가하고, 2시간 동안 5%, CO₂하에 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 주황색 결정이 생성되면 SDS(Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Bockland, ME USA) 용액을 500 µL씩 넣어 1시간 동안 교반하였다. 96 웰 플레이트에 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Alkaline Phosphate(ALP) 분석. IP/PLGA 미립구에 BMSC를 파종한 후 IP의 함량에 따른 골세포의 분화를 확인하기 위하여 조골세포에 특이적으로 발현하는 ALP 활성도를 TRACP & ALP Kit (Takara Bio Inc., Japan)를 이용하여 측정하였다. 배양한 샘플을 각각 1, 3, 7 및 14일째 배양액을 제거하고 생리식염수로 3회 세척한 후 추출용액 500 µL를 혼합하여 1시간 동안 교반한다. 혼합액을 13000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 취하여 기질용액과 혼합액을 1 : 1 비율로 혼합하여 1시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 반응시킨 뒤 0.9 N NaOH를 첨가하여 효소반응을 중지시키고 96 웰 플레이트에 100 µL씩 반응시킨 용액을 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR). 골세포에서 나타나는 특정 유전자를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. IP/PLGA 미립구에 세포를 파종하여 배양한 배양액을 제거하고 1 mL의 Trizol(Invitrogen™, 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 RNA를 분리하였다. 상층액을 취하여 이소프로판올(Sigma)과 폴리리크릴 carrier (Molecular Research Center, Inc.)로 RNA를 침전시켰다. RNA 양은 UV분석기(Smartspec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD)를 이용하여 3 µg/mL로 정량화한 후 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 트랜스크립타제(Invitrogen), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP 600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사 하였다. 이렇게 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, 오스테오칼신, ALP, I형 콜라겐 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각 프라이머의 염기서열과 반응조건은 Table 1에 나타내었다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.5 w/v% 아가로스겔(Sigma)에 100 V에서 25분 동안 전기영동을 하였다. DNA를 전개시킨 젤은 자외선 투과조사기(Spectroline, UV Transilluminator, USA)로 촬영하여 오스테오칼신, ALP, I형 콜라겐의 발현 정도를 확인하였으며 housekeeping 유전자인 GAPDH로 표준화하였다.^{26,27}

결과 및 토론

미립구의 제조 및 약물의 포접률. 국소지향성 및 지속적인 약물 방

Table 1. The Sequence and PCR Reaction Cycles of GAPDH, ALP, Osteocalcin and Type I Collagen Primer

Species	Gene	Sequence	Product size
Rat	GAPDH	Up : 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'	218 bp
		Down : 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	
	Osteocalcin	Up : 5'-AGGTGCAGCCTTTTGTCCAAG-3'	440 bp
		Down : 5'-GCAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG-3'	
	ALP	Up : 5'-AGGCAGGATTGACCACGG-3'	279 bp
		Down : 5'-TGTAAGTCTGCTCATGGA-3'	
	Type I collagen	Up : 5'-CCTCCTCCCCAGCCACAAGA-3'	150 bp
		Down : 5'-TCTTGGTCGGTGGGTGACTCT-3'	

Table 2. The Preparation Condition of IP-Loaded PLGA Microspheres

Batch no.	Initial drug loading (%)	PLGA Mw	Polymer conc. (wt/w%)	Encapsulation efficiency (%)
1	5	90 K	10	69.8
2	10	90 K	10	76.6
3	20	90 K	10	82.2
4	30	90 K	10	81.4

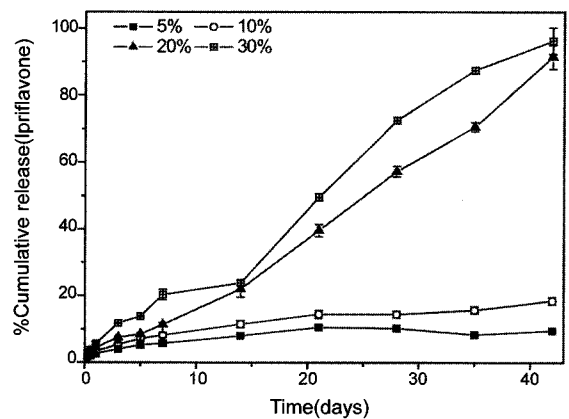


Figure 2. Release profile of ipriflavone from the microspheres according to initial IP loading ratio (n=3).

출을 할 수 있는 주사가능한 생분해성 지지체를 제조하고자 O/W 용매 증발법을 이용하여 골다공증 치료제인 IP를 함유한 PLGA 미립구를 제조하였으며 미립구 내에 포집된 IP의 포집률을 측정하였다(Table 2). 미립구 내에 포집된 약물의 포집 효율은 비교적 높

은 평균 78%로 초기 함량이 증가할수록 포집률도 증가하는 경향을 보였다. 이는 난용성 약물인 IP의 용해도가 매우 낮기 때문에 미립구 제조 과정 중에 약물의 수상으로 이동이 적고 대부분의 약물이 소수성인 PLGA 고분자 담체 내부에 쉽게 분산되었음을 보이고 있다.²⁸

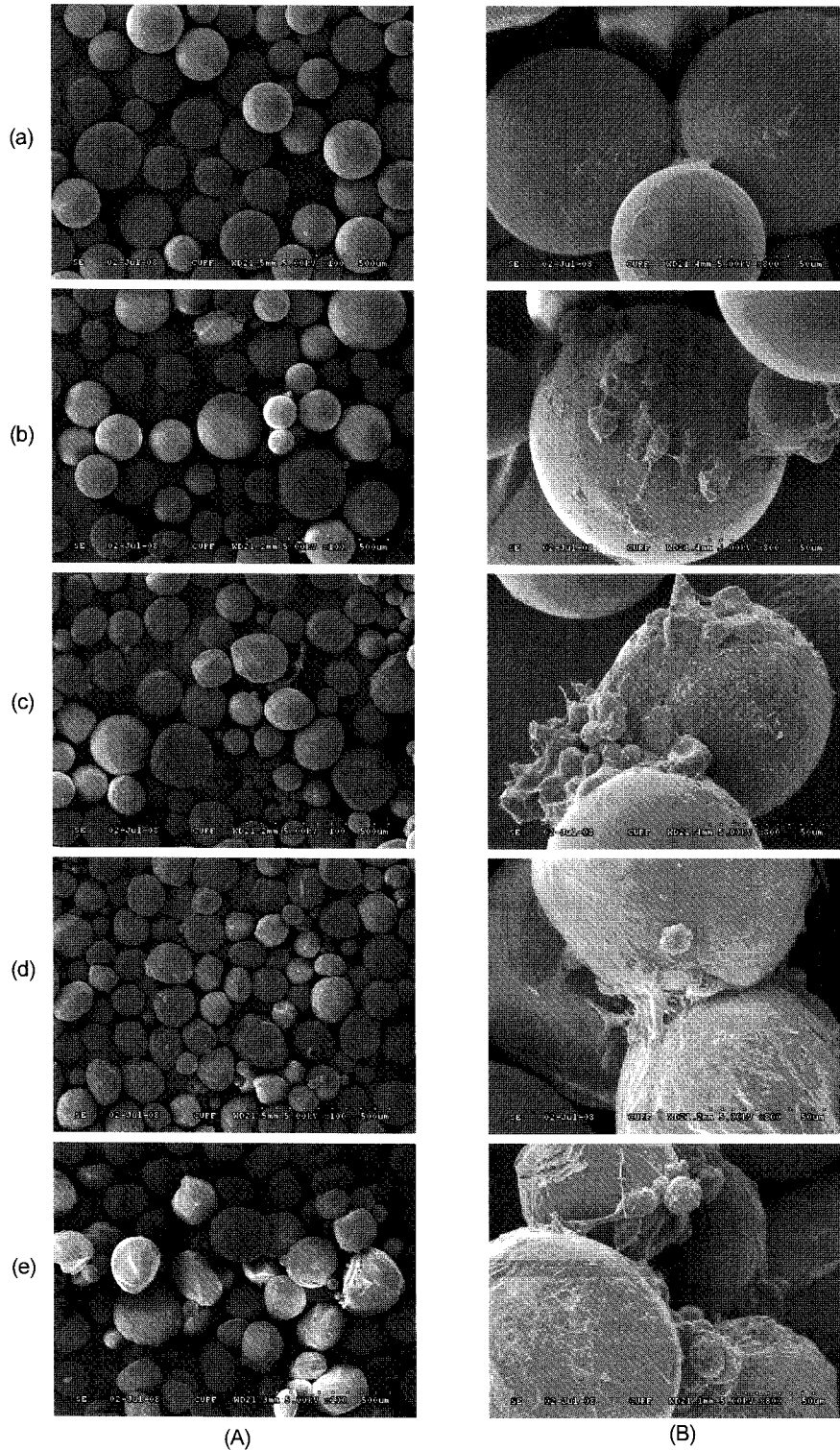


Figure 3. The morphology of IP/PLGA microspheres: (a) only PLGA; (b) PLGA/IP 5%; (c) PLGA/IP 10%; (d) PLGA/IP 20%; (e) PLGA/IP 30%((A) surface morphology($\times 100$) and (B) morphology of BMSC attachment to microspheres($\times 800$)).

생체의 방출거동. 장기간의 *in vitro* 용출시험은 실제 생체내에서 약물의 용출양상을 판단할 수 있는 중요한 기준이 된다.²⁹ 본 연구에서는 제조된 미립구를 이용하여 6주 동안 *in vitro* 실험으로 약물의 방출거동을 알아보았다. Figure 2는 초기 약물 함유량에 따른 IP를 함유한 미립구의 방출거동을 나타낸 것으로 초기 약물 함유량이 증가할수록 약물 방출이 빠르게 진행되어 특히 IP 20%와 IP 30%를 함유한 미립구에서 40일 동안 IP의 방출이 지속됨을 확인할 수 있었다. 이는 일반적인 약물 방출거동과 유사한 결과로써 초기 약물 함량에 의해 약물전달속도를 제어할 수 있음을 의미한다. 반면, IP 5%와 10%는 약물의 방출이 더디었는데 이는 초기함량이 적은 농도일 경우 미립구내에 포집된 약물에 비해 상대적으로 많이 분포된 고분자가 그 골격을 유지하여 약물의 방출을 지연시킨 것으로 판단된다.

BMSCs가 파종된 미립구의 SEM 관찰. 본 연구에서는 약물의 초기 함유량을 다르게 하여 IP를 함유한 생분해성 미립구를 제조하였고, 그 형태를 관찰하기 위하여 SEM을 이용하여 분석하였다. Figure 3(A)-(b), (c)에 나타난 바와 같이 완성된 미립구의 형태는 약물의 초기 함유량이 5% 및 10%인 경우에는 전체적으로 구형을 가지는 표면이 매끄러운 미립구를 형성하고 있지만, 약물의 초기 함유량이 20%로 증가할수록 미립구의 전체적인 형태가 일그러지고 미립구 표면의 깨짐현상이 관찰되었다(Figure 3A-(d)). 이러한 현상은 약물 초기 함유량이 30%인 경우에 더욱 뚜렷하게 나타났는데(Figure 3A-(e)) 이는 약물의 초기 함유량이 증가할수록 약물의 고분자내에 차지하는 비율이 높아져 결정성이 매우 큰 약물과 무정형인 고분자 매트릭스가 서로 잘 결합하지 못하여 생기는 현상으로 보인다. Figure 3(B)는 계대 배양한 BMSCs를 IP를 함유한 미립구에 파종한 후 5일 동안 배양한 뒤 세포부착 특성을 나타내었다. 그림에 나타난 바와 같이 단독의 PLGA 미립구 보다 IP를 함유한 PLGA 미립구에서의 세포의 부착, 성장, 이동 등이 잘 이루어져 왕성한 BMSCs의 거동을 관찰할 수 있었다. 이는 결정성 약물인 IP가 PLGA 미립구내에 포집되면서 미립구표면의 거침성이 증가하여 세포가 부착하기 알맞은 환경을 제공해 줌으로써 BMSCs의 부착이 증진된 것으로 보인다.

CCK-8을 이용한 독성 분석. IP/PLGA 미립구에 파종한 BMSCs의 반응성 및 독성평가를 하기 위하여 CCK-8 분석법을 이용한 1, 3, 7 및 14일째의 세포독성 분석을 Figure 4에 나타내었다. Figure 4에 나타난 것처럼 단독의 PLGA 미립구보다 IP를 함유한 PLGA 미립구에서 비교적 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 1일에서 7일까지 PLGA로만 구성된 미립구에서 보다 IP를 함유한 미립구에서 세포 성장이 잘 이루어졌으며 7일째는 특히 IP의 함유량이 5 및 10 wt%를 함유한 미립구에서의 값이 높게 측정되었다. 따라서, 분석 결과를 바탕으로 단독의 PLGA 미립구보다 IP를 함유한 PLGA 미립구에서 흡광도가 높게 측정됨에 따라 이프리플라본이 세포에 미치는 독성이 거의 없다고 보인다.

ALP 활성도 측정. 조골세포가 만들어내는 세포의 효소이며 골 형성 지표인 ALP의 형성여부를 알아보기 위하여 제조한 IP/PLGA 미립구에 BMSCs를 파종한 후 ALP 활성도를 측정하였다. Figure 5에서 보듯이, 골분화 초기마커인 ALP가 1일째에는 IP 30%를 함유한 미립구에서 그 값이 높은 것을 확인할 수 있었고, 시간이 3일째로 지남에 따라 ALP 활성이 모든 미립구에서 급격히 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 단독의 PLGA 미립구보다 IP를 함유한 미립구에서의 값

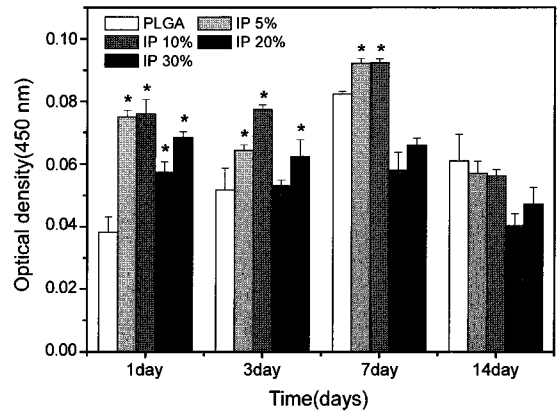


Figure 4. Measurement of cytotoxicity on PLGA and IP/PLGA microspheres by CCK-8 assay. *The asterisks denote significant difference compared with control (only PLGA) of each microspheres ($p < 0.05$).

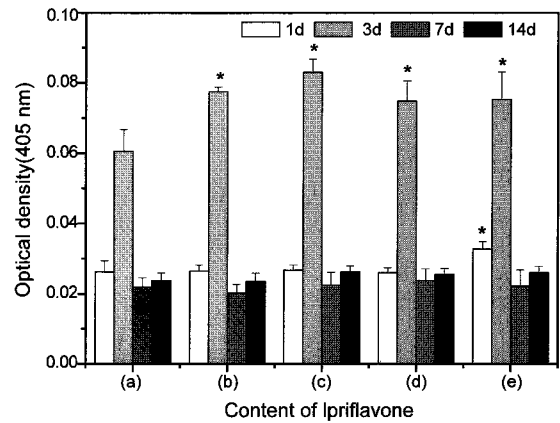


Figure 5. Alkaline phosphatase activity of PLGA microspheres by IP loading ratio: (a) PLGA only; (b) PLGA/IP 5%; (c) PLGA/IP 10%; (d) PLGA/IP 20%; (e) PLGA/IP 30% ($p < 0.05$).

이 더 높은 것을 확인할 수 있었는데, 이는 IP가 함유된 미립구의 경우 골세포로의 분화에 활성을 가짐으로써 ALP 활성을 증가시켜 조골세포로의 분화를 증가시키는 것으로 판단된다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. IP/PLGA 미립구에 배양된 세포들의 골세포로의 표현형을 확인하기 위하여 골세포의 표지로 사용되고 있는 오스테오칼신, ALP 및 I형 콜라겐의 mRNA 발현정도를 측정하기 위하여 IP 함량에 따른 IP/PLGA 미립구에 각각 BMSCs를 파종한 후, 7 및 14일째에 RNA 분리 및 RT-PCR을 수행하여 각각의 골분화 마커를 GAPDH로 표준화하여 나타내었다. 오스테오칼신 mRNA를 7 및 14일째에 확인한 결과 단독의 PLGA 미립구보다 IP 5 wt% 및 IP 10 wt%를 함유한 PLGA 미립구에서 높은 발현정도를 나타내었다(Figure 6). ALP에서는 7일째에서 IP를 함유한 모든 미립구에서의 상대적 광도가 단독의 PLGA 미립구보다 높음을 확인할 수 있었고 시간이 갈수록 특히 IP 5%에서의 밴드 광도 값이 매우 높음을 확인할 수 있었다. I형 콜라겐의 발현정도를 Figure 8에 나타난 것과 같이 모든 실험군에서 밴드의 발현정도가 높게 측정되었으며, 특히 IP 5%에서 좀 더 높은 발현을 나타내었다($p < 0.05$). 따라서, 이는

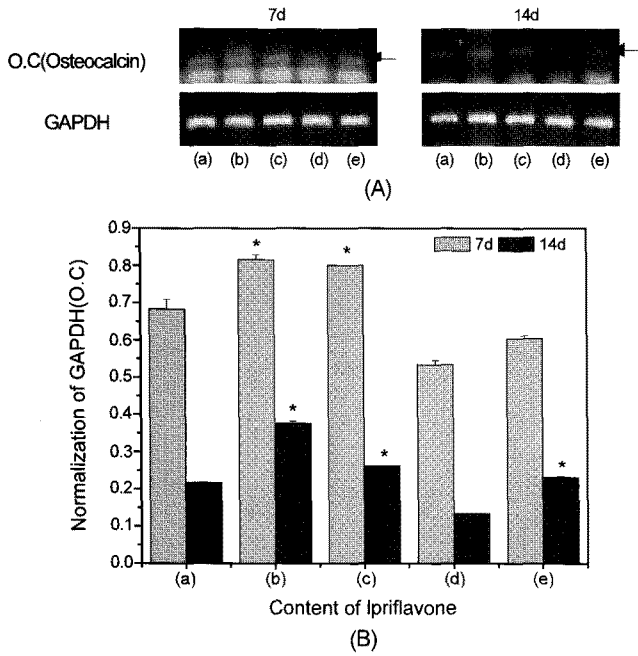


Figure 6. Gene expression of osteocalcin(O.C) as analyzed by RT-PCR(7 and 14 day). (A) agarose gel electrophoresis. ((a) PLGA only; (b) PLGA/IP 5%; (c) PLGA/IP 10%; (d) PLGA/IP 20%; (e) PLGA/IP 30%). (B) Normalization of osteocalcin expression by GAPDH($p < 0.05$).

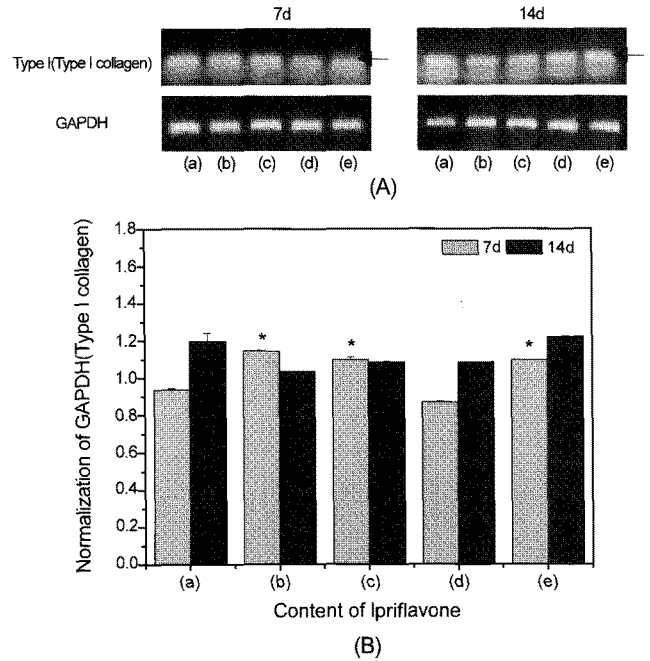


Figure 8. Gene expression of Type I collagen(Type I) as analyzed by RT-PCR(7 and 14 day). (A) agarose gel electrophoresis. ((a) PLGA only; (b) PLGA/IP 5%; (c) PLGA/IP 10%; (d) PLGA/IP 20%; (e) PLGA/IP 30%). (B) Normalization of Type I collagen expression by GAPDH($p < 0.05$).

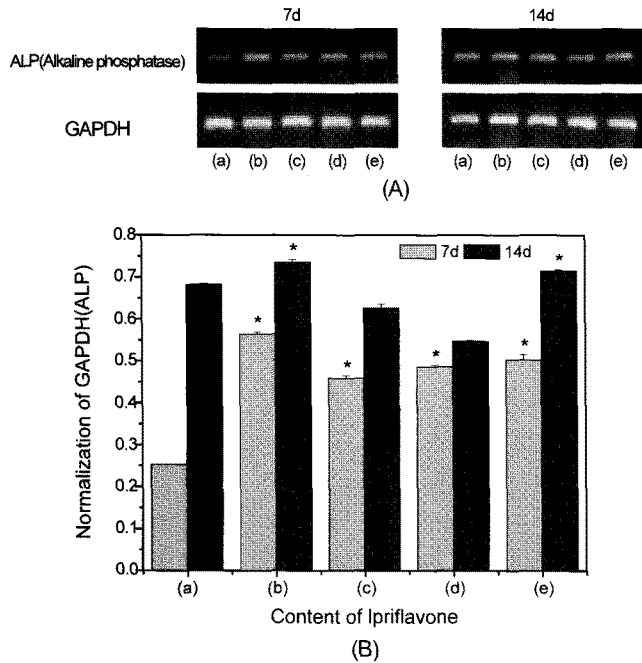


Figure 7. Gene expression of alkaline phosphatase(ALP) as analyzed by RT-PCR(7 and 14 day). (A) agarose gel electrophoresis. ((a) PLGA only; (b) PLGA/IP 5%; (c) PLGA/IP 10%; (d) PLGA/IP 20%; (e) PLGA/IP 30%). (B) Normalization of alkaline phosphatase expression by GAPDH($p < 0.05$).

합성 식물성 에스트로겐인 이프리플라본이 강한 골세포 자극을 가져 IP/PLGA 미립구의 경우에 골 생성 작용에 있어 우수한 효과가 나타

나는 것으로 확인되었다.

결론

본 연구에서는 조직공학을 이용한 새로운 골 재생에 있어 생분해성 고분자인 PLGA를 매트릭스로 이용하고 골다공증 치료제인 IP를 서방화한 미립구를 O/W 용매 증발법으로 제조하였다. 미립구 내에 약물의 포접 효율은 평균 78%로 높게 측정되었고, 생체의 방출 실험 결과 40일 동안 IP의 방출이 가능함을 확인할 수 있었다. SEM 관찰 결과로부터 초기 약물 함유량에 따라 미립구의 표면 및 전체적인 형태가 다르게 나타남을 볼 수 있었다. 또한, CCK-8 분석결과 IP가 세포에 미치는 독성은 없는 것으로 확인할 수 있었으며 BMSCs가 조골세포로 분화하였는지 확인하기 위해 ALP 활성을 측정된 결과 단독의 PLGA 미립구보다 IP를 함유한 미립구에서의 값이 더 높은 것을 확인할 수 있었는데 이는 IP가 골세포로의 분화에 활성을 가짐으로써 ALP 활성을 증가시키는 것으로 판단된다. 또한, RT-PCR 결과 골마커 mRNA가 지속적으로 존재하고 있음을 확인할 수 있었으며 본 실험결과를 바탕으로 향후 조직공학적 골 결손 치료법으로서 방사성 제제화에 있어서 응용하게 되면 국소지향성 골분화 주사용 지지체로서 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

감사의 글: 본 연구는 세포융용사업단(SC4110)과 보건복지부(0405-BO01-0204-0006)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. P. D. Ross, *Arch. Intern. Med.*, **156**, 1399 (1996).
2. L. M. Boyden, J. Mao, J. Belsky, L. Mitzner, A. Farhi, M. A. Mitnick, D. Wu, K. Insogna, and R. P. Lifton, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1513 (2002).
3. K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **29**, 501 (2005).
4. A. V. Schwartz, J. L. Kelsey, S. Maggi, M. Tuttleman, S. C. Ho, P. V. Jonsson, G. Poor, J. A. Sisson de castro, L. Xu, C. C. Matkin, L. M. Nelson, and S. P. Heyse, *Osteoporosis Int.*, **9**, 242 (1999).
5. P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey, *Stem Cells*, **19**, 180 (2001).
6. P. Bianco and P. G. Robey, *J. Clin. Invest.*, **105**, 1663 (2000).
7. E. K. Park, S. Y. Lee, T. H. Kim, P. H. Hoon, G. Khang, Y. S. Son, S. Y. Kim, and S. Y. Kim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 55 (2005).
8. L. Cui, B. Liu, G. Liu, W. Zhang, L. Cen, J. Sun, S. Yin, W. Liu, and Y. Cao, *Biomaterial*, **28**, 5477 (2007).
9. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
10. T. L. Arinzeh, S. J. Peter, M. P. Archambault, Chistian van den Bos, S. Gordon, K. Kraus, A. Smith, and S. Kadiyala, *J. Bone. Joint. Sug.*, **85**, 1927 (2003).
11. Q. Shang, Z. Wang, W. Liu, Y. Shi, L. Cui, and Y. Cao, *J. Craniofac. Surg.*, **12**, 586 (2001).
12. J. W. So, S. H. Kim, M. O. Baek, J. Y. Lim, H. W. Roh, N. R. Lee, G. H. Ryu, Y. H. Cho, S. J. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 84 (2008).
13. P. Perugini, I. Genta, B. Conti, T. Modena, D. Cocchi, D. Zaffe, and F. Pavanetto, *Int. J. Pharm.*, **256**, 153 (2003).
14. J. S. Lee, J. H. Shin, J. K. Jeong, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **27**, 9 (2003).
15. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, I. W. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **27**, 226 (2003).
16. 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).
17. J. Y. Wang, A. E. Baer, V. B. Kraus, and L. A. Setton, *Spine*, **26**, 1747 (2001).
18. R. Q. Brown, A. Mount, and K. J. L. Burg, *J. Biomed. Mater. Res.*, **4**, 32 (2005).
19. C. Perka, U. Arnold, R. Spitzer, and K. Lindenhayn, *Tissue Eng.*, **7**, 359 (2001).
20. Y. Hong, C. Gao, Y. Xie, Y. Gong, and J. Shen, *Biomaterials*, **26**, 6305 (2005).
21. J. S. Park, J. C. Yang, S. H. Yuk, H. S. Shin, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 189 (2007).
22. J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 728 (2000).
23. S. H. Kim, M. O. Baek, 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**, 595 (2007).
24. S. K. Kim, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, G. Khang, I. W. Lee, C. W. Han, H. K. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 130 (2005).
25. H. Shin, J. S. Temenoff, G. C. Browden, K. Zygourakis, M. C. Farach-carson, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **26**, 3645 (2005).
26. R. G. Payne, J. S. McGonigle, M. J. Yaszemski, A. W. Yasko, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **23**, 4359 (2001).
27. E. J. Kim, C. S. Park, M. S. Kim, S. H. Cho, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 218 (2004).
28. S. Michalet, P. Favreau, and R. Stocklin, *Cli. Chem. Lab. Med.*, **41**, 1589 (2003).
29. Y. Choi, S. Y. Kim, S. H. Kim, K. S. Lee, C. Kim, and Y. Byun, *Int. J. Pharm.*, **215**, 67 (2001).