

3D 바이오프린팅과 무지지체 조직공학 기술 기반 추간판 복합 조직 제작

김병국¹·박진호¹·박상혁²

¹아주대학교 분자과학기술학과, ²국립 부경대학교 의공학과

Fabrication of Tissue Engineered Intervertebral Disc Using Enable 3D bio-printing and Scaffold-Free technologies

Byeong Kook Kim¹, Jinho Park¹ and Sang-Hyug Park²

¹Departments of Molecular Science and Technology, Ajou University

²Department of Biomedical Engineering, Pukyong National University

Abstract Intervertebral disc(IVD) mainly consists of Annulus fibrosus(AF) and Nucleus pulposus(NP), playing a role of distributing a mechanical load on vertebral body. IVD tissue engineering has been developed the methods to achieve anatomic morphology and restoration of biological function. The goal of present study is to identify the possibilities for creating a substitute of IVD the morphology and biological functions are the same as undamaged complete IVD. To fabricate the AF and NP combine biphasic IVD tissue, AF tissue scaffolds have been printed by 3D bio-printing system with natural biomaterials and NP tissues have been prepared by scaffold-free culture system. We evaluated whether the combined structure of 3D printed AF scaffold and scaffold-free NP tissue construct could support the architecture and cell functions as IVD tissue. 3D printed AF scaffolds were printed with 60 degree angle stripe patterned lamella structure(the inner-diameter is 5mm, outer-diameter is 10 mm and height is 3 mm). In the cytotoxicity test, the 3D printed AF scaffold showed good cell compatibility. The results of histological and immunohistochemical staining also showed the newly synthesized collagens and glycosaminoglycans, which are specific makers of AF tissue. And scaffold-free NP tissue actively synthesized glycosaminoglycans and type 2 collagen, which are the major components of NP tissue. When we combined two engineered tissues to realize the IVD, combined biphasic tissues showed a good integration between the two tissues. In conclusion, this study describes the fabrication of Engineered biphasic IVD tissue by using enable techniques of tissue engineering. This fabricated biphasic tissue would be used as a model system for the study of the native IVD tissue. In the future, it may have the potential to replace the damaged IVD in the future.

Key words: Intervertebral disc(IVD), Annulus fibrosus(AF), Nucleus pulposus(NP), 3D Bio-printing, Scaffold free tissue

1. 서 론

추간판(Intervertebral disc)은 척추 뼈 사이에 존재하여 척추에 걸리는 압축, 비틀림, 및 굽힘 등의 기계적 부하를

전달하거나 감쇠시키는 역할을 하며, 수핵(Nucleus pulposus), 섬유륜(Annulus fibrosus), 및 종판(End-plate) 세 부분의 복합적인 배열로 구성되어 있다. 수핵은 수분을 풍부하게 함유하는 구조를 바탕으로 하중을 분산시키는 역할을 하는 조직이며, 섬유륜은 수핵을 감싸는 층판(Lamella)구조의 섬유 조직으로, 하중을 견디는 역할을 한다[1-4].

수핵은 추간판에서 가장 수분 함량이 많은 곳으로 제 2형 콜라겐, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸, 히알루론산 등의 네트워크로 구성되어 있다. 특히 히알루론산은 물을 흡

Corresponding Author : Sang-Hyug Park
Pukyong University, 45, Yongso-ro, Nam-Gu, Busan, Korea
TEL: 010-3021-7946

E-mail: sanghyugpark@gmail.com

이 연구는 부경대학교 자율창의학술연구비(2016년 C-D-2016-0459)의 지원을 받아 수행되었음.

수하여 추간판 내 압력을 일정하게 유지시키는 핵심 구성 성분이다[5]. 수핵은 이런 구조를 바탕으로 압축력이나 굽힘력 등 외부에서 가해진 부하들을 흡수하여 방사상으로 재분배한다. 섬유륜은 제 1형 콜라겐이 주요 구성 성분이며, 섬유가닥들이 종판 기준으로 60°기울어져 있는 층판 구조가 수핵을 감싸는 형태로 형성 되어있어, 수핵 또는 하중으로부터 오는 부하를 장력성 부하(tensile load)로 전환하여 비틀림에 견디는 역할을 한다. 종판은 수핵과 섬유륜을 아래 위로 덮으면서 척추체와 추간판을 연결함으로써 추간판의 형태 유지 및 영양분이 외부로 유출 되는 것을 막는 역할을 한다[6].

추간판은 노화가 진행됨에 따라 수핵의 제 2형 콜라겐, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸, 히알루론산이 제 1형 콜라겐 성분으로 대체되어 수분 함유량이 낮아지므로 최종적으로는 섬유륜 외측부와 종판으로부터의 영양 공급이 감소한다. 이로 인해 추간판 내 혐기성 대사가 증가하고 노폐물이 축적되면서 pH가 감소하는데, 이런 환경으로 인해 콜라겐의 분해를 촉진하고 단백다당의 생성을 저해하여 수핵의

외측부부터 안쪽으로 점차 섬유화가 일어나 수핵과 섬유륜의 구분이 점차 모호해지고 수핵은 퇴화하게 된다[7]. 앞서 언급했듯이 노화가 진행되면서 변성된 수핵이 하중 전달 능력을 상실하면 섬유륜은 축성하중을 직접적으로 받게 되며, 축성하중에 취약한 섬유조직으로 구성된 섬유륜은 하중에 의해 쉽게 손상되어 역학적으로 불안정한 상태가 초래되며 이로 인해 여러 추간판 관련 질병으로 연결될 가능성이 높아진다[7-8].

추간판의 손상에 따른 문제를 근본적으로 해결하기 위해서는 추간판의 생체역학적 기능을 온전히 대체하면서도 뛰어난 생체적합성을 가지는 조직공학적 대체물을 개발할 필요가 있다. 조직 기능의 회복 및 대체를 위해 조직 공학 분야에서는 다양한 바이오 소재를 이용한 3차원 지지체를 기반으로 세포를 배양하여 조직공학적 구조체를 개발하는 연구가 활발히 진행 중이다. 조직공학용 지지체의 핵심은 체내 세포외기질과 유사한 성분을 사용하여 체내환경과 유사한 환경을 제공하는 것이다. 구현하는 미세환경에 따라 세포 부착성, 생존력, 증식력, 분화성, 유전 표현형 등이 달라

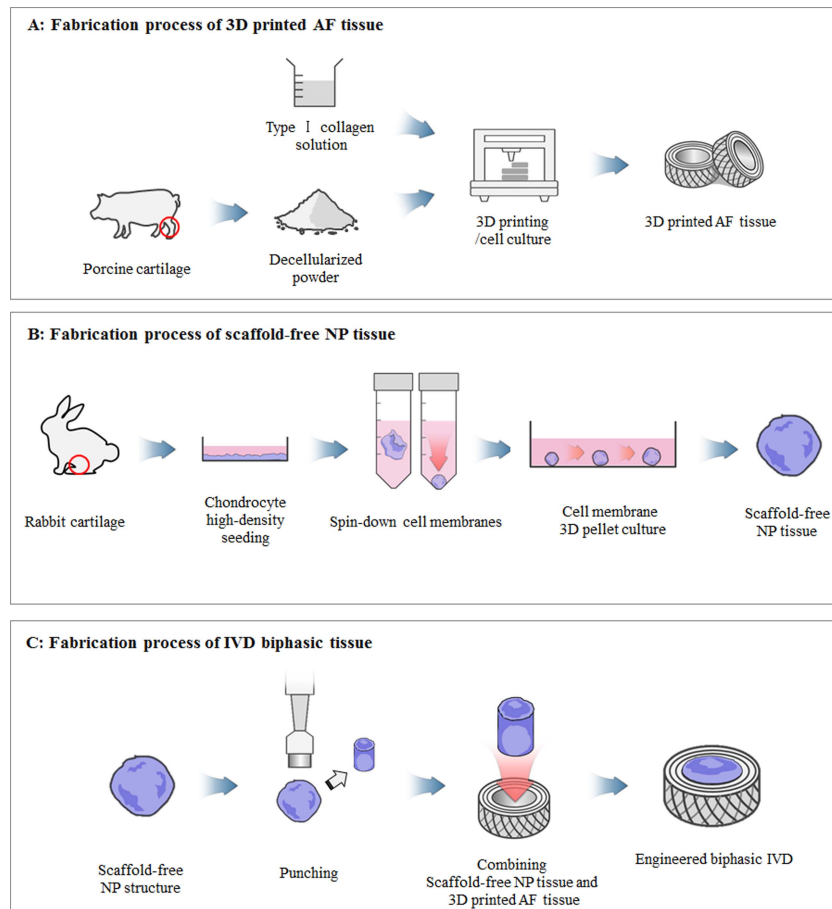


그림 1. 연구 흐름도.

Fig. 1. Schematic flow diagram of research.

지기 때문에 목표 조직의 물리적 특성, 무게변화 특성, 상호 작용을 위한 생화학적 필요성을 고려한 최적화된 지지체를 제작하는 것이 필요하다. 추간판 대체물 개발을 목적으로 콜라겐[9], 아가로스[10], 콜라겐-글리코사미노글리칸[11], 알지네이트-키토산[12], 그리고 폴리글리콜산-폴리락트산[13] 등의 재료를 사용하여 섬유류 지지체 제작을 시도한 연구들이 있었으나, 추간판 본래의 해부학적인 구조를 구현한 경우는 없었다.

따라서 본 연구에서는 콜라겐과 돼지연골 유래 세포외기질을 혼합한 바이오잉크를 제조한 뒤, 최근 조직공학 분야에서 다양하고 활발하게 응용되고 있는 3D 바이오프린팅 기술을 활용하여 섬유류의 층판 구조를 구현한 지지체를 제작하였다. 또한, 연골세포와 세포가 합성한 세포외기질로 이루어진 무지지체(Scaffold-free) 조직 구조체로 수핵을 구현하여 섬유류 모방 지지체와 결합함으로써 구조와 성분이 실제 추간판과 유사한 추간판 대체물 개발의 가능성을 확인하고자 하였다(그림 1).

II. 연구방법

1. 토끼 연골세포 분리 및 세포 배양

2주령 뉴질랜드 화이트 토끼 대퇴골에서 연골을 분리. 그 다음에 인큐베이터에서 16시간동안 0.1% Collagenase 처리 후 얻은 연골세포를 2번의 계대배양(P2)까지 세포 배양 배지(DMEM(Gibco), 10% FBS(Biotechnics research INC.), 5 ng/ml FGF(R&D systems), 100 U/ml penicillin G-100 µg/ml streptomycin(Gibco))를 이용하여 배양한다.

2. 돼지연골 유래 세포외기질 생체재료 준비

8주령 돼지 대퇴골에서 연골을 분리 한 후 블렌더를 이용하여 분쇄한다. 분쇄된 돼지연골 유래 세포외기질 파우더를 저장액에 700 ml/g 12시간, SDS 50 ml/g 2시간, Dnase 100 µm/g 하룻밤 동안 처리하여 탈세포 과정을 진행한 후에 원심분리기(10000 rpm, 20 min)를 이용하여 3차수로 세척한다. 그 후에 동결건조(-50°C, 2day)후에 동결 파쇄하여 돼지연골 유래 세포외기질을 백색 파우더 형태로 확보한다.

3. 바이오잉크 제작

3차수(pH 2.7)에 제 1형 콜라겐(다립티센)을 녹여 1% 콜라겐 수용액을 만든다. 그 후에 1% 콜라겐 수용액에 돼지연골 유래 세포외기질을 15%v/w로 혼합하여 바이오잉크를 제작한다.

4. 3D 바이오 프린팅 섬유류 모방 지지체 제작

미세압출(micro-extrusion) 방식의 3D 바이오프린터(대전 한국기계원)와 바이오잉크로 도관 지지체를 제작 (Thickness: 400 µm, Thick shift: 98%, Grid: 1 mm, Angle: 60°, -60° crossed, Inner Diameter: 5 mm, Outer Diameter: 10 mm, Length: 60 mm) 후 300 mM EDC-NHS 수용액에 하룻밤 처리하여 가교 시킨다. 그 후에 Microtomy-blade(Muto microtome blades)로 자른다 (Height: 4 mm) (그림 1, A).

5. 수핵 모방 무지지체 조직 제작

P2 토끼 연골세포를 60Φ Culture dish(TPP)에 5×10^6 세포를 분주하여 5~7일간 배양해 세포 시트를 만든다 (배지 조성: DMEM(Gibco), 10% FBS(Biotechnics research INC.), 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin(Pen-Strep; Gibco), 50 µg/ml ascorbate-2 phosphate(Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)). 1x Trypsin(Gibco)으로 세포 시트를 떼어 50 ml Tube에 넣고 원심분리기를 이용해 세포 시트를 원심분리기에(1000 g, 20분) 처리 한 뒤, 인큐베이터에서 하루 동안 배양한다. 그 다음에 6well culture dish(TPP)에 옮겨 5일 동안 배양한다(그림 1, B).

6. 추간판 모방 복합 조직 배양

E-O Gas멸균된 3차원 프린팅 섬유류 모방 지지체(Inner Diameter: 5 mm, Outer Diameter: 10 mm, Height: 3 mm)당 P2 토끼 연골세포를 8×10^6 세포 파종 후 10일 동안 배양한다. 5일 동안 배양한 무지지체 조직을 5 mm 바이옵시 펀치(kai medical)로 뚫은 다음 섬유류 모방 조직 안쪽에 넣고 5주간 추가로 배양한다(그림 1, C).

7. 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM)

세포를 파종 한 지지체에는 10일 배양 후 SEM 이미지 촬영 전, 0.4% 글루타르알데히드(Sigma-Aldrich)에 12시간 처리 한 뒤 50, 70, 90, 100% 에탄올(덕산)에 각 1시간씩 담가 탈수 시키는 전처리 과정을 진행하였고, 세포 파종이 안 된 지지체는 2일 동안 동결건조 한 뒤 탈수 후 주사전자현미경(JEOL, JSM-6700F)으로 이미지를 촬영하였다.

8. 세포 독성 분석

지지체에 P2 토끼 연골세포를 파종을 한 후 하루 뒤에 Live&Dead Kit(Thermofisher scientific, USA)를 1시간 동안 처리 후 공초점 현광 현미경(Nikon-ESC LPSE TE2000U, 아주대학교 세포치료센터) (ex: 495 nm em: Live-515 nm, Dead-635 nm)을 이용해 세포 독성을 확인하였다.

9. 조직 및 면역조직학적 염색

토끼 추간판, 섬유륜 모방 지지체, 연골세포가 파종된 섬유륜 모방 조직, 수핵 모방 무지지체 조직, 추간판 모방 복합 조직에서 H&E염색을 통해 세포 모양 및 분포를 확인하였고 Safranin-O(S-O) 염색을 통해 글리코사미노글리칸을 확인 하였다. 또한 면역조직염색을 통해 제 1형, 2형 콜라겐 발현을 확인하였다.

10. WST측정

세포 증식을 확인하기 위해 지지체에 P2 토끼 연골세포를 파종한 후 1일, 4일, 7일, 10일 차에 EZ-Cytox kit (DoGen)를 이용하여 WST 실험을 진행하였다.

11. 글리코사미노글리칸 정량 분석

글리코사미노글리칸의 양을 확인하기 위해 Blyscan sulfated Glycos-amino-glycan assay kit(Biocolour)를 이용하여 수핵 모방 무지지체 조직의 배양 1일, 5일, 5주 차에 각각 정량 분석 실험을 진행하였다.

12. 통계 분석

통계학적 비교분석은 GraphPad PRISM statistical

package(ver 7.00, Graphpad software INC, San Diego, USA)를 이용하였고, 각 실험군 간의 비교는 Unpaired t test 와 one-way analysis of ANOVA test로 진행하였다. 그림에서 각각의 수치는 평균 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 표시했으며, 양방 검정 유의도(Two-tailed p value)는 $p < 0.05$ 수준일 때를 기준으로 진행하였다.

III. 연구 결과

1. 3D 바이오프린팅 섬유륜 모방 조직

바이오잉크와 3D 바이오프린터를 이용하여 제작한 섬유륜 모방 지지체가 모델링된 수치에(Angle: 60°, -60° crossed, Inner Diameter: 5 mm, Outer Diameter: 10 mm, Height: 4mm) 부합하게 제작이 된 것을 확인 할 수 있었다(그림 2, A). 주사 전자 현미경 촬영 결과를 보면 섬유륜 모방 지지체의 가닥이 모양을 유지하며, 원형으로 다층을 이루는 층판 구조를 확인 하였다(그림 2, B, a). 또한 지지체 측면에서는 본래 섬유륜의 해부학적 구조를 모사하여 구현한 60° 각도의 가닥 패턴을 확인 할 수 있었다(그림 2, B, b). 토끼 연골세포를 파종한 뒤 10일 후에 지지체에 토끼 연골세포가 부착 증식하여 지지체 가닥 사이에 세포의

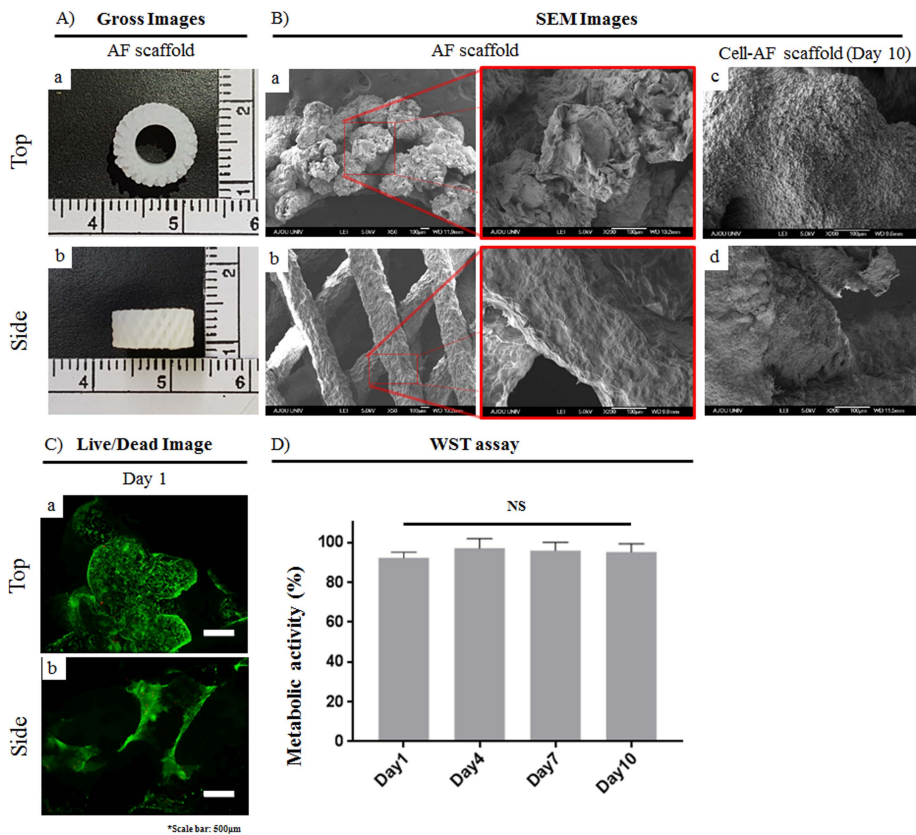


그림 2. 3D 프린팅 섬유륜 모방 조직의 SEM 이미지와 세포독성평가 결과.
Fig. 2. SEM images and cytotoxicity assay of 3D printed AF tissues.

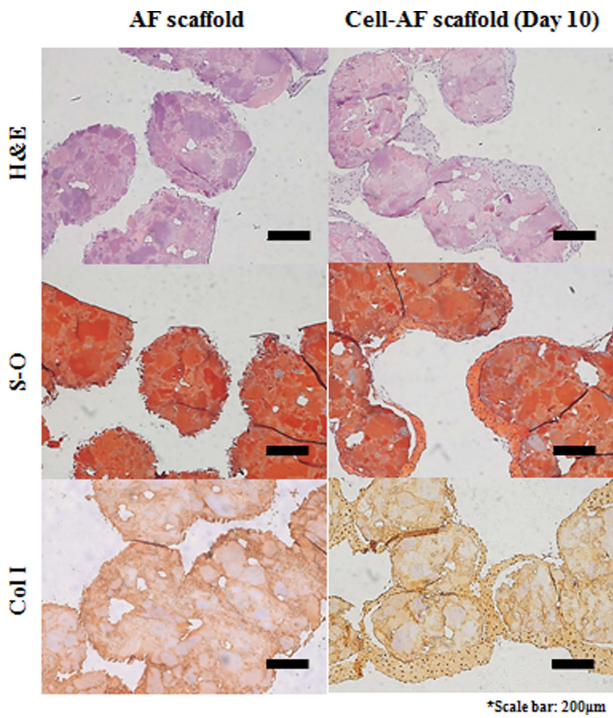


그림 3. 3D 프린팅 섬유류 모방 조직의 조직학 염색 결과.
Fig. 3. Histological staining images(H&E, S-O and Col I) of 3D printed AF tissues.

하루 뒤에 Live & Dead kit을 이용한 표지 후 공초점 현광 현미경 이미지를 확인한 결과, 대부분이 초록색 형광을 띄며 붉은색 형광이 거의 관찰되지 않았다(그림 2, C). 또한 WST 실험 결과, 1일, 4일, 7일, 10일차에서 세포 대사 기능이 일반 배양 접시에서 키웠을 때 대비 85% 이상을 유지하는 것을 확인하였다(그림 2, D). 조직학 염색 결과, H&E 염색을 통해 섬유류 모방 지지체에 토끼 연골세포가 부착되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. S-O 염색에서 제작된 지지체 구조 위에 세포가 배양 되면서 세포외기질 구성요소인 글리코사미노글리칸이 형성되었음을 확인하였다. 또한 면역조직염색 결과에서도 부착 증식된 연골세포가 제 1형 콜라겐을 합성하고 있음을 확인 하였다(그림 3).

2. 수핵 모방 무지지체 조직

무지지체 배양 시스템을 이용하여 제작한 수핵 모방 무지지체 조직은 배양 시간이 지날수록 크기가 커진 것을 확인할 수 있다(그림 4, A(Gross images, H&E)). 또한 세포외기질의 발현이 시간에 따라 증가 하는 것을 확인 하였으며, 글리코사미노글리칸 정량 실험 결과 역시 배양 시간이 경과함에 따라서 통계적으로 유의미하게 정량 값이 높아 지는 것을 확인할 수 있었다(그림 4, A(S-O), B). 제 2형 콜라겐 면역조직 염색결과에서 또한 배양 시간이 경과함에 따라, 발현이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다(그림 4, A(Col II)).

26

기질이 형성되었음을 확인 하였다(그림 2, B, c, d). 그리고 섬유류 구조 모방 지지체의 세포 독성 평가를 하기 위해서 섬유류 모방 지지체에 토끼 연골세포를 8×10^6 세포 파종 후

3. 추간판 모방 복합 조직

토끼 추간판 조직의 H&E 염색 결과, 섬유류 부분의 세

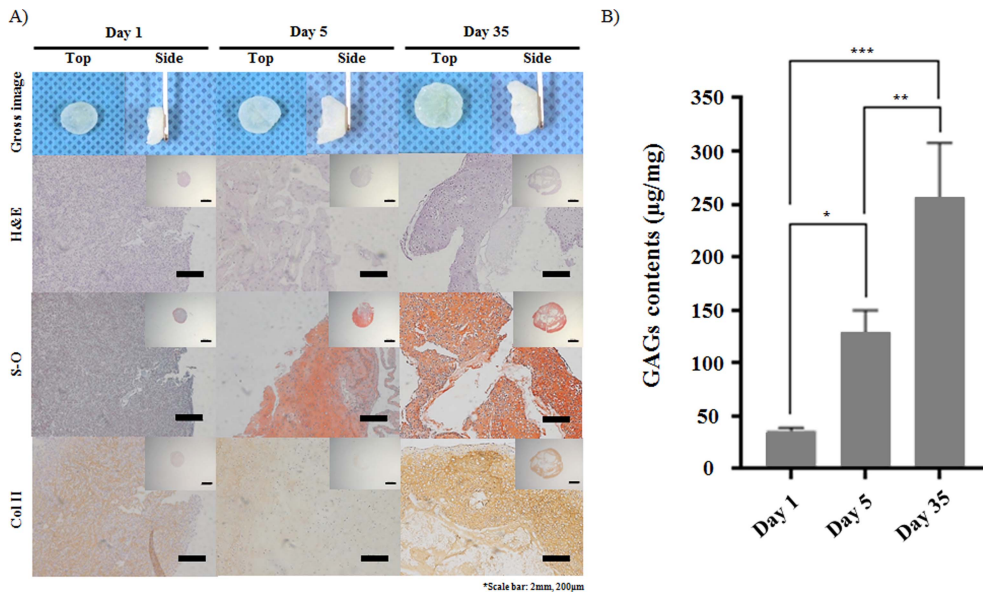


그림 4. 수핵 모방 무지지체 조직의 조직학 염색 결과와 GAG 정량실험 결과.
Fig. 4. Histological staining images(H&E, S-O and Col II) and GAG quantification assay of scaffold-free NP tissues. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

포 배열이 타원형으로 겹겹이 쌓인 층판 구조를 이루고 있는 것을 확인 하였다(그림 5, A(H&E)). S-O 염색 결과를 통해 섬유륜 부분보다 수핵 부분에 진하게 염색이 된 것을 확인 하였다(그림 5, A(S-O)). 제 1형 콜라겐은 수핵 조직 대비 섬유륜 부분에서 진하게 염색이 되었고, 제 2형 콜라겐은 섬유륜 조직 대비 수핵 부분에 진하게 염색이 된 것을 확인 하였다(그림 5, A(Col I, Col II)). 추간판 모방 복합 조직 외관 사진을 보면 가운데 수핵 부분이 존재하고 수핵 주변에 층판 형태로 감싸는 섬유륜 조직으로 구성되어 있으며 배양 기간 동안 그 형태와 크기를 유지하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 5, B(Gross images)). H&E 염색 결과로 섬유륜 모방 지지체 사이사이에 세포가 존재를 하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 5, B(H&E)). S-O 염색 결과에서 혼합한 두 조직 모두에서 세포가 만들어 내는 추간판 조직 기질인 글리코사미노글리칸이 형성되었음을 확인하였다(그림5, B(S-O)). 제 1형 콜라겐은 수핵 모방 무지지체 조직 부위보다 섬유륜 모방 지지체 및 그 주위에 있는 세포 기질에서 진하게 염색된 것을 확인 할 수 있었으며, 반대로 제 2형 콜라겐은 섬유륜 모방 지지체 및 그 주위 세포 기질 보다 수핵 모방 무지지체 조직에서 진하게 염색된 것을 확인 할 수 있었다(그림 5, B(Col I, Col II)).

IV. 토의 및 결론

추간판의 대체 및 재건을 위해 다양한 조직공학 기술을 이용한 인공 추간판 제작 연구가 진행되어 왔지만, 추간판의 해부학적 구조와 무관한 구조의 지지체를 사용하거나, 추간판의 실제 구성성분과 상이한 재료를 이용하거나, 또는 추간판 복합 조직 전체가 아닌 섬유륜 또는 수핵 일부분의 재건만을 목적으로 연구가 되는 등의 한계점이 있었다[14]. 하지만 추간판 관련 질병은 추간판 각 부위에 독립적으로 발생하는 것이 아닌 연쇄적인 결합에 의한 것이기 때문에 추

간판 기능 회복의 이상적인 형태는 추간판 전체를 복합적으로 재건하는 것이라고 할 수 있다[14-15]. 본 연구에서는 이러한 한계를 극복하기 위해, 추간판을 구성하는 두 조직인 섬유륜과 수핵 조직을 각각 본래 해부학적 구조 및 성분과 유사하게 구현하는데 목적을 두었으며, 이를 위해 3D 바이오프린팅 및 무지지체 조직 제작 관련 조직공학 기술 응용하였다.

섬유륜 모방 지지체의 구조를 섬유륜 본래 해부학적 구조와 유사하게 구현하는 데에는 미세압출(Micro-extrusion) 방식의 3D 바이오프린터와 부속 모델링 소프트웨어가 중요한 역할을 하였다[16]. 소프트웨어를 이용하여 층판 구조 및 60° 로 기울어진 섬유륜의 층판 패턴을 모델링 하였고, 프린팅을 통해 이 계산된 모델을 원하는 크기로 제작하였다. 그리고 외관사진과 SEM 촬영 결과를 통해 제작된 지지체의 전체 크기, 가닥의 두께 및 패턴 등이 사진에 모델링한 것과 유사함을 확인할 수 있었다. 또한, 섬유륜은 제 1형 콜라겐이 주를 이루고 제 2형 콜라겐 성분 또한 포함하기 때문에[17], 제 1형 콜라겐을 제 2형 콜라겐이 주성분인 돼지 연골 유래 세포외기질과 혼합한 바이오잉크를 프린팅에 사용하였다. 제 1형 콜라겐 및 돼지연골 유래 세포외기질은 모두 천연재료이기 때문에 세포 생존확인을 위한 Live&Dead 실험과 WST 실험에서 모두 세포 독성이 없음을 확인하였다. 세포 파종을 하지 않은 섬유륜 모방 지지체의 H&E 염색 결과 층판 구조를 확인 할 수 있었으며, S-O 염색과 제 1형 콜라겐 면역조직염색 또한 지지체에서 염색되어 콜라겐을 기반으로 하는 바이오 잉크의 구성 성분에 부합하는 결과를 얻었다. 세포 파종 후에도 지지체의 구성 성분의 변화는 없었으며, 배양기간 동안 세포가 안정적으로 부착된 상태가 유지되었는데 이는 돼지연골 유래 세포외기질에 풍부하게 존재하는 라미닌이 세포 멤브레인에 존재하는 인테그린과 결합하면서 세포 부착에 영향을 끼친 것으로 보인다 [18-19]. 또한 배양기간이 늘어남에 따라 S-O 및 제1형 콜

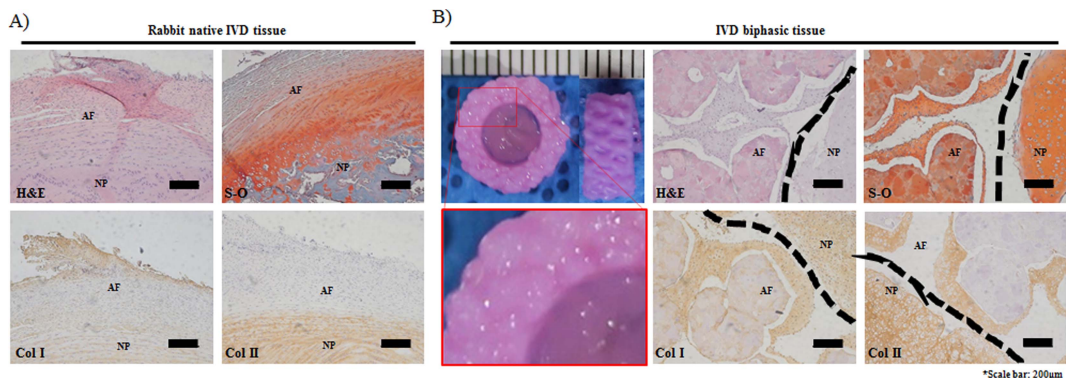


그림 5. 추간판 모방 복합 조직의 조직학 염색 결과.
Fig. 5. Histological staining images(H&E, S-O, Col I and Col II) of engineered biphasic IVD tissue.

라겐 염색의 염색이 넓고 진하게 된 것을 확인할 수 있었으며 이는 세포외기질이 새롭게 합성되었기 때문으로 사료된다. 위와 같이, 제작된 3D 바이오프린팅 섬유류 모방 지지체는 세포독성이 없고, 세포가 안정적으로 부착되며, 부착된 세포에서 섬유류를 구성하는 세포외기질이 잘 합성되었기 때문에 섬유류 모방 지지체로 사용하여 섬유류 조직을 제작할 수 있었다.

수핵은 제 2형 콜라겐이 골격을 구성하고, 음전하를 띠는 글리코사미노글리칸, 히알루론산, 어그리칸 등의 세포외기질 성분들과 네트워크를 이루어 섬유류에 비해 많은 양의 수분을 함유할 수 있다[5]. 이러한 이유로 수핵은 수분을 함유한 탄성체로써 기능하여 하중을 전방위로 분산하는데 주요한 역할을 한다. 또한 세포외기질들은 세포 부착 및 세포 표현형, 세포 사멸, 세포 이동, 세포 증식에도 관여 한다고 알려져 왔다[20-22]. 뿐만 아니라 조직의 갈습화를 막는 것에도 관여 한다고 알려져 있기 때문에[23] 수핵 모방 조직을 제작하는데 있어, 이러한 성분을 풍부하게 함유 시키는 것은 필수적이다. 본 실험에서는 이러한 수핵의 조건을 충족하기 위해서, 조직공학 분야에서 세포의 3차원 배양에 사용되는 방법 중 하나인 무지지체 배양 조직 제작 방식을 응용하여[24] 수핵 모방 무지지체 조직을 제작하였다. 본 연구에서 제작한 수핵 모방 무지지체 조직은 토끼 연골세포와 3차원 분화 유도 환경에서 연골세포가 합성하는 세포외기질의 복합물이다. 일반적으로, 연골세포가 합성하는 세포외기질은 제 2형 콜라겐 및 글리코사미노글리칸, 어그리칸 등이다. 그렇기 때문에 본 연구에서는 연골세포를 이용한 무지지체 조직이 수핵 대체물에 적합하다고 판단하였고 조직학적 염색 및 정량 결과, 수핵 모방 무지지체 조직은 예상대로 제 2형 콜라겐과 글리코사미노글리칸을 풍부하게 함유하고 있었다. 3D 프린팅된 섬유류 모방 지지체와 복합 조직을 만들기 위해서 수핵 모방 무지지체 조직을 일정기간 배양하여 골화 되지 않은 상태로 지름 10 mm 이상까지 성장시키는데 성공하였다. 수핵 모방 무지지체 조직의 크기는 배양 기간 동안 증가하였는데, 글리코사미노글리칸의 양 또한 함께 증가함을 정량 분석을 통해 확인하였다. 이처럼, 제작된 수핵 모방 무지지체 조직은 수핵 본래의 성분과 유사한 구성성분을 포함하고 있으며 배양기간에 따른 크기 조절이 가능하다. 이러한 점들은 수핵 대체물으로써 응용 가능한 잠재력을 보여주었다.

추간판 모방 복합 조직은 중앙에 수핵 부분이 존재하고 수핵 주변을 층판 형태로 감싸는 섬유류 조직으로 구성되어 있으며 배양 기간 동안 그 형태와 크기를 일정하게 유지하였고, 이로써 제작된 추간판 모방 복합 조직의 해부학적 구조가 추간판 본래의 구조와 유사성을 보인다는 점을 확인하였다. 또한, 일반적인 추간판 조직을 구성하는 성분과 유사

하게, 섬유류 부분에는 제 1형 콜라겐이 수핵 부분보다 강하게 발현하였으며, 제 2형 콜라겐은 수핵 부분이 섬유류 부분보다 강하게 발현된 것을 조직학적 염색을 통해 확인하였다. 따라서 본 연구 결과들을 통해, 그 해부학적 구조와 구성 성분이 본래 추간판과 유사한 추간판 모방 조직을 성공적으로 제작하였음을 알 수 있었다.

하지만 본 연구에는 몇 가지 한계점이 존재한다. 첫 번째로, 수핵 모방 무지지체 조직과 3D 바이오프린팅 섬유류 모방 조직을 통합된 복합 조직으로 만들기 위해, 토끼 연골세포를 섬유류 모방 지지체에 접종하여 분화 배양한 조직과 동일한 세포를 일정기간 배양한 수핵 모방 무지지체 조직을 물리적으로 복합화 하였다. 하지만 이미 섬유류와 수핵 특성을 가진 조직으로 분화된 조직이어서 물리적으로 복합화 후 5주간의 배양을 더 진행하였으나 두 조직이 완전하게 결합되지는 않았다. 두가지 조직의 복합 조직인 추간판 조직의 기능을 최대화하기 위해서는 각 조직의 분화 기간 및 조직 복합화 방법 등에 대한 연구가 필요하다. 두 번째로, 단일 세포에 할당되는 공간의 규모는 나노에서 마이크로 단위로 무척 작은 반면[25], 본 연구에서 제작된 지지체는 천연 고분자 바이오잉크의 3D 프린팅 기술의 제한으로 500 μm 이상의 상대적으로 큰 공간을 제공한다. 따라서 실제 추간판 섬유 조직과 비교할 때 세포활동과 물리적 특성 및 세포 분화에 영향을 주는 변수로 작용할 것으로 예상된다. 마지막으로, 본 연구 결과는 생체의 환경에서 단기적으로 관찰한 결과이며, 장기적 배양 또는 생체내 환경이 모방 조직에 어떤 영향을 미칠지는 아직 미지수로 남아있다. 이런 제한점들은 배양 환경 및 방법의 개선, 3D 바이오 프린팅 기술의 향상 등을 통해 추후 개선이 필요하다.

그럼에도 본 실험은 조직유래 천연재료를 사용한 바이오잉크와 3D 바이오 프린터, 그리고 무지지체 배양 시스템을 이용하여 본래 추간판의 해부학적 구조와 성분 모사를 시도하고 유의미한 결과를 보였으며, 또한 추간판의 특정 부위에 국한되지 않고 통합적인 모델을 제시함으로써 추간판 질환 치료를 위한 발전된 가능성을 제시하였다.

참고 문헌

- [1] J.P. Urban, S. Roberts, "Degeneration of the intervertebral disc," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 5, no. 3, pp. 120-130, 2003.
- [2] S. Chan, B. Gantenbein-Ritter, "Intervertebral disc regeneration or repair with biomaterials and stem cell therapy-feasible or fiction," *Swiss. Med. Wkly.*, vol. w13598, pp. 142, 2012.
- [3] D.M. O'Halloran, A.S. Pandit, "Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 8, pp. 1927-1954, 2007.
- [4] S. Li, V.C. Duance, E.J. Blain, "Zonal variations in cytoskeletal element organization, mRNA and protein expression in

- the intervertebral disc,” *J. Anat.*, vol. 213, no. 6, pp. 725-732, 2008.
- [5] D. Pereira, J. Silva, Correia, J.M. Oliveira, R. Reis, “Hydrogels in acellular and cellular strategies for intervertebral disc regeneration,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 85-98, 2013.
- [6] K.S. Ryu, C.K. Park, “Lumbar Total Disc Replacement,” *Kor. J. Spine*, vol. 6, no. 4, pp. 251-259, 2009.
- [7] D.J. Kim, “Pathophysiology of degenerative cervical spinal disease,” *J. Korean. Soc. Spine Surg.*, vol. 6, no. 2, pp. 173-180, 1999.
- [8] C.J.M. Jongeneelen, F. Baaijens, J. Huyghe, “Biomechanics in the intervertebral disc A literature review,” *BMTE.*, vol. 24, 2006.
- [9] M. Sato, T. Asazuma, M. Ishihara, T. Kikuchi, K. Masuoka, S. Ichimura, M. Kikuchi, A. Kurita, K. Fujikawa, “An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc,” *J. Biomed. Mater. Res. A.*, vol. 64, no. 2, pp. 248-256, 2003.
- [10] H.E. Gruber, G.L. Hoelscher, K. Leslie, J.A. Ingram, E.N. Hanley, “Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 3, 2006.
- [11] Y. Rong, G. Sugumaran, J.E. Silbert, M. Spector, “Proteoglycans synthesized by canine intervertebral disc cells grown in a type I collagen-glycosaminoglycan matrix,” *Tissue Eng.*, vol. 8, no. 6, pp. 1037-1047, 2002.
- [12] X. Shao, C.J. Hunter, “Developing an alginate/chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 82, no. 3, pp. 701-710, 2007.
- [13] H. Mizuno, A.K. Roy, C.A. Vacanti, K. Kojima, M. Ueda, L.J. Bonassar, “Tissue-engineered composites of anulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement,” *Spine*, vol. 29, no. 12, pp. 1290-1297, 2004.
- [14] G. Paesold, A.G. Nerlich, N. Boos, “Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings,” *Eur. Spine J.*, vol. 16, no. 4, pp. 447-468, 2007.
- [15] H.J. Wilke, F. Heuer, C. Neidlinger-Wilke, L. Claes, “Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model?,” *Eur. Spine J.*, vol. 15, no. 3, pp. 433-438, 2006.
- [16] B.R. Song, S.S. Yang, H. Jin, S.H. Lee, J.H. Lee, S.R. Park, S.H. Park, B.H. Min, “Three dimensional plotted extracellular matrix scaffolds using a rapid prototyping for tissue engineering application,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 172-180, 2015.
- [17] J.S. Ahn, J.K. Lee, D.S. Hwang, S.Y. Chung, T.S. Jeon, C.S. Lee, “Correlation among magnetic resonance images, electron microscopic findings, 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.
- [18] J.D. Humphries, A. Byron, M.J. Humphries, “Integrin ligands at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 19, pp. 3901-3903, 2006.
- [19] K.E. Brown, K.M. Yamada, “The role of integrins during vertebrate development,” *Seminars in Developmental Biology*, vol. 6, no. 2, pp. 69-78, 1995.
- [20] N.J. Goodstone, A. Cartwright, B. Ashton, “Effects of high molecular weight hyaluronan on chondrocytes cultured within a resorbable gelatin sponge,” *Tissue engineering*, vol. 10, no. 3-4, pp. 621-631, 2004.
- [21] J. Fraser, T. Laurent, U. Laurent, “Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover,” *J. Intern. Med.*, vol. 242, no. 1, pp. 27-33, 1997.
- [22] B. Shen, A. Wei, D. Bhargav, T. Kishen, A.D. Diwan, “Hyaluronan: its potential application in intervertebral disc regeneration,” *Orthop. Res. Rev.*, Vol. 2, pp. 17-26, 2010.
- [23] C.K. Kepler, G.D. Anderson, C. Tannoury, R.K. Ponnappan, “Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments,” *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 19, no. 9, pp. 543-553, 2011.
- [24] R.L. Jin, S.R. Park, B.H. Choi, B.H. Min, “IScaffold-free cartilage fabrication system using passaged porcine chondrocytes and basic fibroblast growth factor,” *Tissue Eng.*, vol. 15, no. 8, pp. 1887-1895, 2009.
- [25] K.K. Parker, D.E. Ingber, “IExtracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 362, no. 1484, pp. 1267-1279, 2007.