Polymer(Korea), Vol. 34, No. 5, pp 474-479, 2010

케라틴/PLGA 복합체 필름의 적층 원통형 지지체가 섬유륜 재생에 미치는 영향

이선경 · 홍희경 · 김수진 · 김용기 · 이동원 · 강길선†
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과
(2010년 1월 27일 접수, 2010년 4월 7일 수정, 2010년 5월 17일 채택)

Effects of Laminated Cylindrical Scaffolds of Keratin/Poly(lactic-*co*-glycolic acid) Hybrid Film on Annulus Fibrous Tissue Regeneration

Seon Kyoung Lee, Hee Kyung Hong, Su Jin Kim, Yong Ki Kim, Dongwon Lee, and Gilson Khang†
Department of BIN Fusion Technology & Department of Polymer·Nano Science & Technology, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea
(Received January 27, 2010; Revised April 7, 2010; Accepted May 17, 2010)

초록: 조직공학에 이용되는 고분자인 poly(lactic-*co*-glycolic acid)(PLGA)는 높은 생체적합성 및 생분해성의 장점을 지니지만, 생체활성물질의 결여와 소수성으로 인해 세포의 부착에 어려움을 가진다. 또한 PLGA의 가수분해 과정 중 생성되는 산 분해물이 조직주변의 pH를 감소시켜 염증을 유발하는 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하기 위한 방법으로 천연고분자인 케라틴을 첨가한 PLGA필름을 제작하였으며 조직공학적 디스크재생에 응용하기 위하여 케라틴/PLGA 복합체필름의 원통형 지지체를 제작하였다. 이 원통형 지지체의 내부는 케라틴/PLGA 필름을 말아서 사용하였으며 외부는 PLGA 다공성 지지체 링을 제작하여 사용하였다. 본 연구에서는 이 지지체에 섬유륜세포를 파종하여 PLGA 필름과 케라틴/PLGA 필름을 이용한 원통형 지지체에서의 세포의 부착 및 생존율을 비교하고 케라틴을 첨가한 지지체의 우수성을 확인하였으며 강도의 우수성 또한 확인하였다. 이 결과는 디스크재생을 위한 지지체의 연구에 유용한 정보를 제공할 것이다.

Abstract: We developed laminated cylindrical scaffolds composed of poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) and keratin, and investigated their potential for tissue engineering and disk regeneration. The scaffold was designed to have two parts, i.e. inner cylinder and outer disk, to mimic a natural disk. The outer disk was composed of PLGA and the inner cylinder was prepared using PLGA film or PLGA/keratin hybrid film. In this study, we investigated the effects of keratin on the growth and proliferation of annulus fibrous(AF) cells in the cylindrical scaffolds. Scaffolds containing PLGA/keratin films showed a significantly higher cell proliferation and expression of collagen I and II than the counterpart with PLGA films. Keratin containing scaffolds also exhibited an excellent mechanical strength, demonstrating that keratin influences the proliferation of annulus fibrous cells. The results provide valuable information on PLGA/keratin films for tissue engineered disk regeneration.

Keywords: keratin, PLGA, annulus fibrous, scaffold, film.

서 론

추간판 디스크는 구조적으로 섬유륜(annulus fibrous, AF)과 수핵(nucleus pulposus, NP)으로 구성되어 있고, 이들은 전이영역에 의해서 서로 연결되어 있으며 연골 말단판과 병합되어 있다. 추간판 디스크의 역학적 특성은 디스크를 구성하고 있는 섬유륜과 수핵의 서로 다른 세포외기질(ECM)에 의해서 유지된다. 바깥쪽 부분의 섬유륜은 대부분 콜라겐으로 구성되어 있으며 콜라겐 중심으로 집중되는 라멜라 구조를 이루고 있다.[1] 이런 라멜라 구조 내에 있는 콜라겐은 수직방향으로부터 약 65° 배향되어져 있어 인장강도를 제공해 준다.[2]

생체조직공학이란 생체에 적합하고, 생체기능성을 갖는 생체재료로 이루어진 지지체에 세포를 배양하여 체내에 이식함으로써 손상되거나 기능을 상실한 조직 및 장기를 가능한 정상적기능을 할 수 있도록 유도하는 기술이다.[3,4] 조직공학에 사용되는 생체재료 지지체는 체내이식 초기에 파종된 세포가 사멸하지 않고 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공하여야 한다. 또한 생체내에서 세포가 잘 정착할 수 있게 도와주고 세포의 고유 표현형의 유지는 물론 ECM을 분비함으로써 조직재생을 촉진시켜야 한다. 이와 더불어 체내에 이식된 후에도 일정기간이 지나면 안전하게 흡수, 분해하는 생체적합성을 가져야 한다.[5,6]

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

이와 같은 조건을 갖춘 α-하이드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA) 및 그들의 공중합체인 PLGA는 미국 FDA의 승인을 받은 합성고분자로서 조직공학적 다공성 지지체, 약물전달시스템 등의 생체재료로 널리 이용되고 있으며,[7] 높은 생체적합성, 생분해성 및 가공성을 가지고 있다. 하지만, 생체활성물질의 결여와 소수성으로 인해 세포부착에 어려움을 가지며,[8] PLGA의 가수분해 과정 중 생성되는 산분해물이 조직주변의 pH를 감소시켜 염증을 유발하는 단점을 가지고 있다.[9-11] 이의 단점을 보완하기 위한 방법으로 다양한 약물, 사이토카인 및 합성, 천연물질을 첨가하는 방법이 연구되고 있다.[12-16]

천연고분자인 케라틴은 머리카락, 양모, 손톱 및 깃털 등을 구성하는 섬유단백질의 구성요소 중 하나로서 글루탐산, 알기닌, 시스틴 등의 친수성 아미노산으로 구성되어 PLGA가 가지고 있는 소수성 표면이 케라틴 첨가됨에 따라 친수화되어 세포부착에 긍정적인 영향을 줄 뿐만 아니라[17] 케라틴 함량별 PLGA 지지체의 염증완화에 관한 연구결과 20%의 케라틴을 함유했을 때 PLGA 지지체의 염증 반응을 상당히 완화시킬 수 있음을 확인하였다.[15] 특히, 아미노산 중 많은 양을(7~20%) 차지하는 시스틴이 산화된 잔여물은 분자와 분자 사이 그리고 분자내에서 이황화 결합함으로써 3차원의 강력한 구조망을 가져 케라틴 섬유의 강하면서 유동적인 고유의 특성을 가지게 된다.[18,19] 또한 케라틴은 머리카락이 형성되는 과정에서 계속적으로 오르고 내리면서 30개의 성장 요소, 사이토카인 및 다른 신호 분자들이 최적의 효과를 올리도록 조절되어 세포행동을 조절하는 미량의 분자와 세포이동, 부착 그리고 자가집결을 조절하는 많은 양의 단백질 기질을 포함하기 때문에[20-22] 조직재생을 위한 재료로서의 가능성을 인정받았다.[23]

이에 본 연구에서는 섬유륜재생을 위한 지지체 연구의 일환으로 케라틴을 함유한 PLGA 필름에서의 증식 및 표현형 유지를 확인하고자 하였으며, 비교적 기계적인 강도가 약하여 조직공학적 디스크 재생에 응용하기 어려운 필름을 보완하기 위해 케라틴/PLGA 복합체 필름을 이용한 원통형 지지체를 제조함으로 디스크재생에 응용하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. 케라틴은 인간의 머리카락에서 유래된 것으로 미국의 Wake Forest 의대 재생의학연구소(Winston-Salem, USA)에서 제공받아 액체질소 내에서 동결분쇄(SPEX 6700, USA)하여 약 180 μm 크기 이하의 분말형태로 얻었다. PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비, 75/25, Resomer RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 또한 다공생성물질로 사용한 염화나트륨(NaCl, Orient Chem. Co., Korea)은 분자체를 사용하여 입자크기를 180~250 μm로 얻어 사용하였다. 메틸렌클로라이드(MC, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

케라틴을 함유한 PLGA 필름 제조. PLGA 및 케라틴/PLGA 필름은 용매 증발법을 이용하여 제조하였다. PLGA 1 g을 4 mL의 MC에 용해한 후 PLGA 양의 각각 0 및 20 wt%가 되도록 0 및 0.2 g의 케라틴를 첨가하였다. 상기의 용액을 직경이 30 mm인 디쉬에 부은 후 상온 건조하여 22×4 mm 크기로 잘랐다. 잔류용매인 MC를 충분히 제거하기 위하여 최소 일주일 이상 진공오븐에서 건조시킨 후 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다. 이들의 모식도를 Figure 1에 나타내었다.

케라틴을 함유한 PLGA 다공성 지지체 제조. PLGA 및 케라틴/PLGA 다공성 지지체는 용매캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다. 1 g의 PLGA를 5 mL의 MC에 용해한 후 PLGA 양의 각각 0 및 20 wt%가 되도록 0 및 0.2 g의 케라틴를 첨가하였다. 그 후 다공형성물질인 NaCl은 PLGA의 9배가 되도록 9 g을 첨가하고 직경 7 mm 및 높이 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm^{2}의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 염의 추출은 3차 증류수를 6시간마다 교체하여 48시간 동안 수행하였고 8 mTorr, −80 ℃ 조건에서 24시간 동안 동결건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위해서 최소 1주일 이상 25 ℃의 진공오븐에서 건조시킨 후 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 2에 나타내었다.

섬유륜세포의 분리 및 배양. 섬유륜세포는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼의 척추에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후 등의 털을 제거하고 멸균된 수술용 가위로 토끼의 척추부분을 절단하여 PBS로 다시 세척하고 0.25 wt%의 콜라게네이즈 A형(Roche, Indianapolis, USA)용액을 24시간 동안 처리하여 섬유륜세포를 획득하였다. 콜라게네이즈를 처리한 세포는 100 μm 메쉬(Falcon, USA)를 이용하여 거르고 75 T 플라스크에 분주하여 37 ℃, 5% CO_2 조건

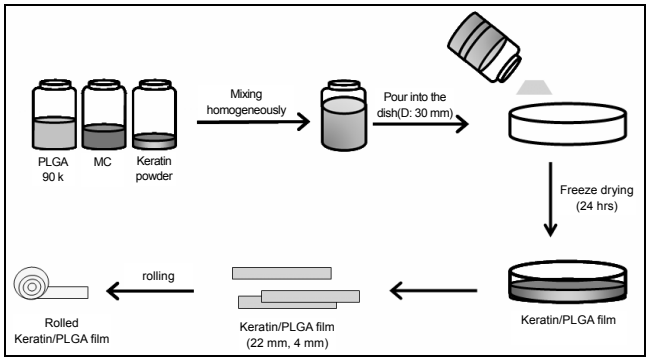

Figure 1. The schematic diagram illustrating fabrication process of keratin/PLGA hybrid films by a solvent evaporation method.

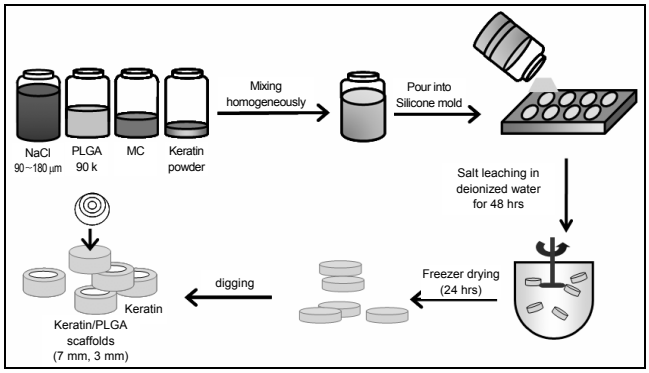

Figure 2. The schematic diagram illustrating fabrication process of keratin/PLGA scaffolds by a solvent casting/salt leaching method.

에서 배양하였다. 성장배지로는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL, USA)와 F−12 nutrient mixture (Ham's F−12, Gibco)의 비가 1대 1이 되도록 혼합하고, 여기에 10% 우태아혈청(FBS, Gibco)과 1%의 항생제(100 U/mL의 페니실린과 100 μg/mL의 스트렙토마이신)를 첨가하여 사용하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해주었으며 계대 배양 2회째까지 배양한 후 실험에 사용하였다.

PLGA/케라틴 복합체필름의 원통형 지지체 제조 및 세포파종. 용매증발법으로 제조한 PLGA 및 케라틴/PLGA 필름에 필름당 1×10^5 세포/필름농도로 섬유륜세포를 파종하였다. 세포가 필름에 잘 부착할 수 있도록 48시간 동안 37 ℃, 5% CO_2 조건에서 배양하고, 48시간이 지난 뒤 세포가 잘 부착된 필름을 말아서 용매캐스팅/염추출법을 이용하여 제조한 링형태의 PLGA 다공성 지지체 안쪽에 넣어 이를 결합함으로써 PLGA/케라틴 복합체필름의 원통형 지지체를 제작하였다(Figure 2). 제작된 지지체는 필름 조건에서 시간에 따라 배양하였으며, 배양액은 2일마다 교체해 주었다.

SEM 관찰. PLGA 및 케라틴/PLGA 필름 내에서의 세포의 부착 및 증식 정도를 확인하고자 주사현미경(SEM; S−2250 N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 지지체에 세포를 파종한 후 1, 2 및 4주 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 글루타르알데하이드(Sigma)로 24시간 상온에서 고정한 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 지지체를 완전히 건조하였다. 지지체 관찰이 용이하도록 필름을 잘라 시료폴더에 고정시킨 후 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500 K, London, UK)를 이용하여 백금코팅한 후 각각의 시료를 가속전압 5.00 KV에서 촬영하였다.

MTT 분석. PLGA 및 케라틴/PLGA 필름을 이용하여 제작한 원통형 지지체내에서의 세포의 증식률은 MTT(3−[4,5−디메틸치아졸−−2−일]−2,5−다이페닐테트라졸리움 브로마이드, Sigma)분석법을 이용하여 확인하였다. 세포가 파종된 지지체에 1, 3, 7, 그리고 14일째에 MTT 용액(50 mg/mL)을 100 μL씩 넣고 4시간 동안 37 ℃ 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 세척하고 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)용액을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파세척기로 1시간 동안 결정을 용해하였다. 그 후, 96웰 플레이트에 샘플을 100 μL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E−max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 제작한 두 종류의 원통형 지지체 내에서 섬유륜세포의 표현형 유지를 확인하고자 RT−PCR을 실시하였다. 지지체에 세포를 파종한 후 1, 2 및 4주째에 회수된 지지체에 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 ℃, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 이소프로판올(Sigma)과 폴리아크릴 Carrier™(Molecular Research Center, Inc.)로 RNA를 침전시켰다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12−18 프라이머(Invitrogen™), 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen™), Superscript™ RNaseH 역전사 트랜스크립테이즈(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 β−actin, 제 1형 및 2형 콜라겐 프라이머(Geno Tech., Korea)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 프라이머의 염기서열과 반응조건은 Table 1에 나타내었다. PCR후 증폭된 DNA를 1.5 w/v% 아가로스겔(Sigma)에 전기영동을 한 후 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™, Green Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, U.K)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 촬영하여 밴드의 발현정도를 확인하였다. 또한 Adobe 포토샵 프로그램을 이용하여 밴드의 광도를 측정하고 β−actin으로 표준화 하였다.

Table 1. PCR Primers and the Protocol for Thermal Cycling

Species	Gene	Primer sequence	Protocol	Cycles
Rabbit	β−actin	F: 5′−gcc atc ctg cgt ctg gac ctg gct−3′ R: 5′−gtg atg acc tgg ccg tca ggc agc−3′	D=94 ℃; 30 sec A=59 ℃; 1 min E=72 ℃; 49 sec	25
	Type I collagen	F: 5′ gat gcg ttc cag ttc gag ta−3′ R: 5′−ggt ctt ccg gtg gtc ttg ta−3′	D=95 ℃; 30 sec A=65 ℃; 30 sec E=72 ℃; 30 sec	35
	Type II collagen	F: 5′−gca ccc atg gca att gga ggg−3′ R: 5′−atg ttt taa aaa ata cag ag−3′	D=94 ℃; 1 min A=59 ℃; 1 min E=72 ℃; 45 sec	35

D: Denature, A: Annealing, E: Extension.

지지체의 압축강도 측정. 지지체의 바깥쪽 부분을 구성하는 PLGA 다공성 지지체 링이 제작한 원통형 지지체의 강도에 미치는 영향을 확인하기 위해서 원통형 지지체에 세포를 파종하여 1, 2, 4 및 6주를 배양한 후 만능물성측정기(FTC, Sterting, Virginia, USA)를 이용하여 강도를 측정하였다. 이때 만능물성측정기의 설정 값은 시료거리는 1.5 mm, 테스트속도는 1 mm/min, 초기 측정강도는 0.5 N으로 모두 동일시 하였다.

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

결과 및 토론

PLGA/케라틴 복합체필름의 원통형 지지체 제조 및 세포배양. PLGA 및 케라틴/PLGA 필름의 원통형 지지체를 제조하기 위해 제작한 필름과 PLGA 다공성 지지체는 각각 Figures 1과 2에 나타낸 모식도와 같은 방법으로 제작하였다. 육안관찰 결과 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었고, 케라틴을 함유한 필름이 함유하지 않은 것에 비해 필름 표면의 거침도가 큰 것을 확인하였다. 제작한 필름에 섬유륜세포를 파종한 후 세포가 잘 부착될 수 있도록 2일 동안 인큐베이션 한 후 필름을 말아 링 형태의 PLGA 다공성 지지체와 결합시켜 배양하였고, 이 지지체 역시 육안관

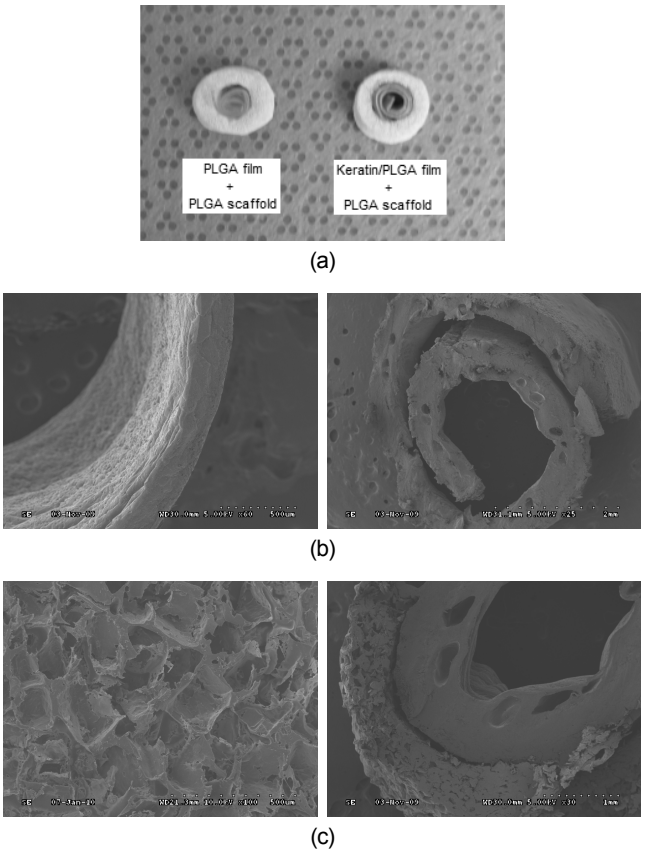

Figure 3. (a) Photographs of the cylindrical scaffolds. SEM micro-photographs of the cylindrical scaffolds; (b) inner part; (c) outer part of cylinder.

찰 결과 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 이렇게 제작된 원통형 지지체의 모습은 Figure 3에 나타내었다.

SEM 관찰. 필름에서 섬유륜세포가 부착된 형태학적인 모습과 세포증식 정도를 확인하기 위해서 PLGA 및 케라틴/PLGA 필름에 섬유륜세포를 파종하고 1, 2 및 4주의 모습을 SEM을 통해 관찰하였다. 필름에서 세포가 뻗어나가는 형태학적인 모습을 관찰한 결과 두 종류의 필름 모두 세포의 필로포디아 및 라멜리포디아 등이 뻗어 나와 본연의 형태학적 모습인 방추형태를 유지하는 것을 확인하였다. 증식정도를 확인해보면 1주에서는 케라틴을 함유한 필름에서는 필름전체에 세포가 고루 뻗어있는 것을 확인할 수 있었지만, PLGA 필름에서는 부분적으로 세포가 뻗어나가는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 2주의 케라틴필름을 확인해보면 필름의 표면을 찾아볼 수 없을 정도로 필름표면에 세포가 부착되어 있으며 4주에서는 두 종류의 필름 모두 세포가 퇴화된 것을 확인하였는데 케라틴을 함유하지 않은 필름에서 퇴화가 많이 이루어진 것을 확인하였다. 이로써 PLGA 필름보다는 케라틴을 함유한 PLGA 필름이 세포의 부착 및 증식에 있어 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었고 이 결과는 Figure 4에 나타내었다.

MTT 분석. PLGA 및 케라틴/PLGA 복합체필름의 원통형 지지체에서 섬유륜세포성장 및 증식률을 확인해보기 위해서 MTT 분석을 수행하였다. MTT 분석은 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성기질인 MTT 테트라졸리움을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT

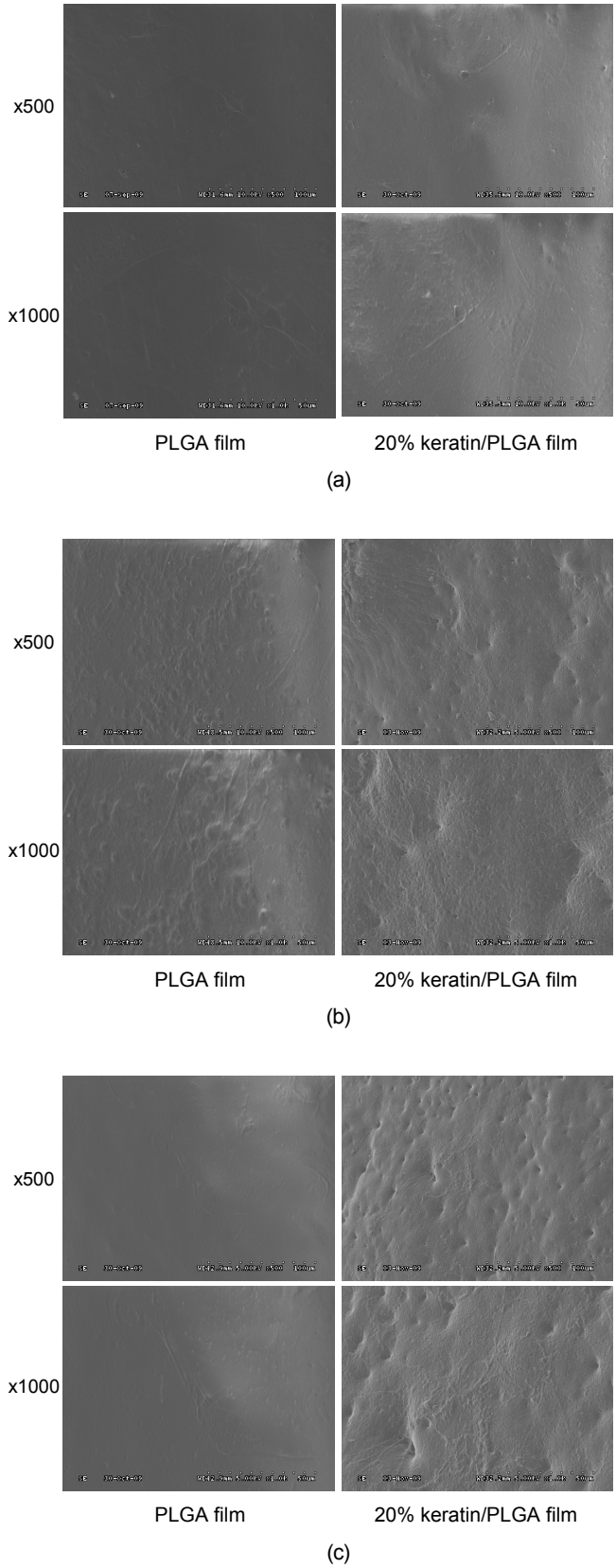

Figure 4. SEM microphotographs of annulus fibrous cells morphology on PLGA and keratin/PLGA film surfaces at (a) 1; (b) 2; (c) 4 weeks post cultivation.

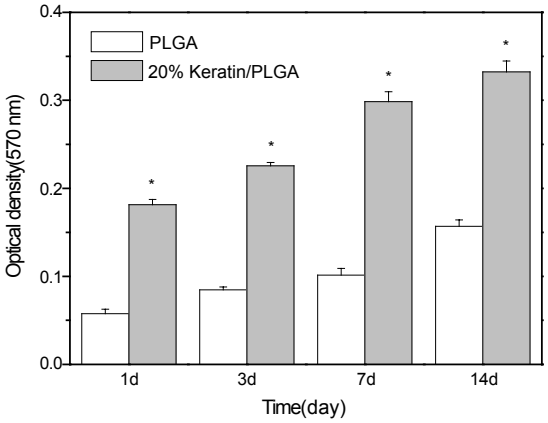

Figure 5. Measurement of cellular viability in cylindrical scaffolds of PLGA and keratin/PLGA hybrid films by MTT assay on 1, 3, 7 and 14 days.

포마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 활성도를 알아볼 수 있는 분석법으로 이를 통해 세포의 수, 증식정도 및 활성 등을 알 수 있는데 이 결과는 Figure 5에 나타내었다. 두 종류의 지지체에서 모두 시간이 지남에 따라 세포증식률이 증가함을 알 수 있었고 PLGA 필름을 이용한 원통형 지지체에 비해 케라틴필름을 이용한 원통형 지지체가 약 2.5배가량 증식률이 높음을 확인하였다. 이로써 섬유륜세포가 생존 및 증식하는데 있어서 케라틴/PLGA 복합체필름의 원통형 지지체가 좋은 환경을 제공함을 알 수 있었다.

mRNA 분리 및 RT-PCR. 제작한 원통형 지지체에서의 섬유륜세포의 표현형 유지에 미치는 영향을 mRNA 관점에서 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 섬유륜세포에서 나타나는 특이적인 유전자인 제 1형 및 2형 콜라겐 발현을 1, 2 및 4주에서 확인하여 그 결과를 Figure 6(a)에 나타내었다. 모든 실험군은 house keeping 유전자인 β-actin의 발현을 확인하였으며, β-actin에 대한 밴드의 강도를 표준화하여 Figure 6(b)에 그래프로 나타내었다. 제 1형 및 2형 콜라겐 모두 PLGA 필름을 이용한 3차원적 원통형 지지체보다 케라틴을 함유한 지지체에서 높은 발현을 나타내었으며 두 지지체 모두 4주에서 제 1형 및 2형 콜라겐발현이 감소되었는데 이는 SEM 관찰을 통해서 알 수 있었듯이 섬유륜세포의 퇴화로 인한 것이라 사료된다. 이로써 케라틴을 함유한 지지체가 섬유륜세포의 특성 유지에 도움을 주는 것을 확인하였다.

압축강도 측정. 추간판 디스크에서 바깥쪽 부분을 구성하고 있는 섬유륜은 추간판 디스크에 걸리는 하중을 견뎌야 하므로 기계적 물성을 담당하고 있다. 따라서 섬유륜재생에 응용하는 지지체로 사용하기 위해서는 기계적, 물리적특성을 가져야 한다. 앞의 분석을 통해 섬유륜세포가 부착, 증식 및 특성 유지에 있어서 케라틴/PLGA 복합체필름의 원통형 지지체가 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인하였고, 이를 토대로 케라틴/PLGA 필름을 이용한 원통형 지지체에 세포를 파종한 후 시간에 따른 강도를 측정하여 Figure 7에 나타내었다. 지지체의 바깥쪽 부분을 구성하는 PLGA 다공성 지지체 링이 제작한 원통형 지지체의 강도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 대조군으로 케라틴/PLGA 복합체필름을 말아서 사용하였고, 20% 케라틴을 함유한 PLGA 다공성 지지체로 제작한 링을 이용한 케라틴/PLGA

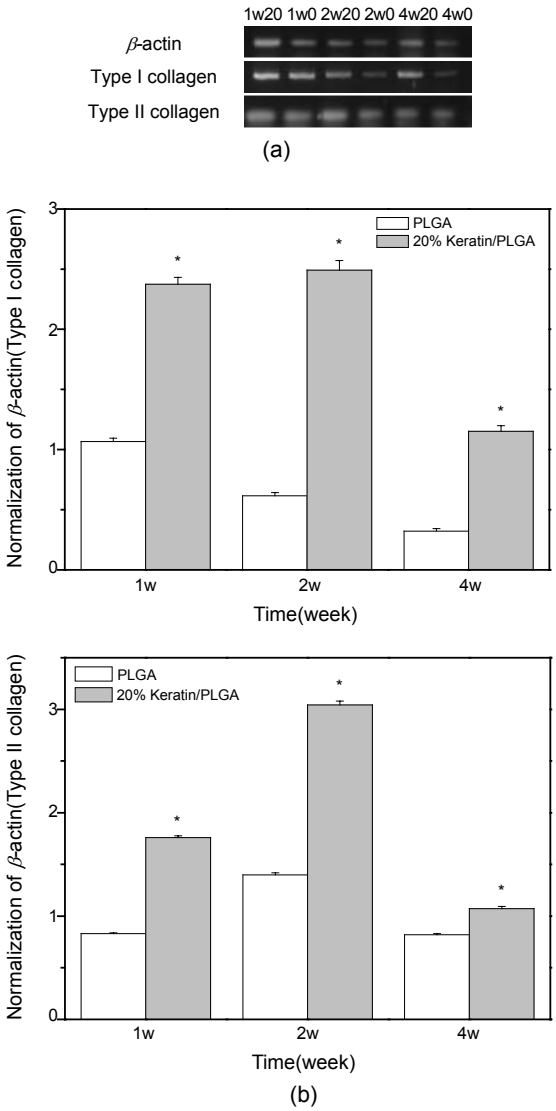

Figure 6. Gene expression profiles of β-actin, type I and type II collagen as analyzed by RT-PCR at 1, 2 and 4 weeks: (a) The results of agarose gel electrophoresis(20: cylindrical scaffolds of keratin/PLGA hybrid film, 0: cylindrical scaffolds of PLGA film); (b) Normalization of β-actin expression by type I and type II collagen.

필름+케라틴/PLGA 원통형 지지체를 제조하여 링에 따른 지지체의 강도를 측정하여 비교하였다.

시간에 따른 기계적 강도를 비교해본 결과 시간이 지남에 따라 3개군의 지지체 모두 생분해성인 PLGA의 분해로 인해 기계적인 강도가 감소함을 보였고, 이 실험에서 사용한 2종류의 원통형 지지체는 대조군으로 사용한 필름보다 기계적인 강도가 강한 것을 확인하였다. 이는 필름만 사용하였을 때보다 이를 말아 PLGA 다공성 지지체와 결합한 원통형 지지체로 제작하여 사용하였을 때 강도면에 있어 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 PLGA 다공성 지지체 링을 사용한 지지체와 케라틴/PLGA 다공성 지지체 링을 사용한 지지체의 강도를 비교한 결과 큰 차이를 보이지는 않았지만 케라틴을 함유한 다공성 지지체 링을 사용한 지지체의 강도가 강한 것을 확인하였다. 이는 케라틴

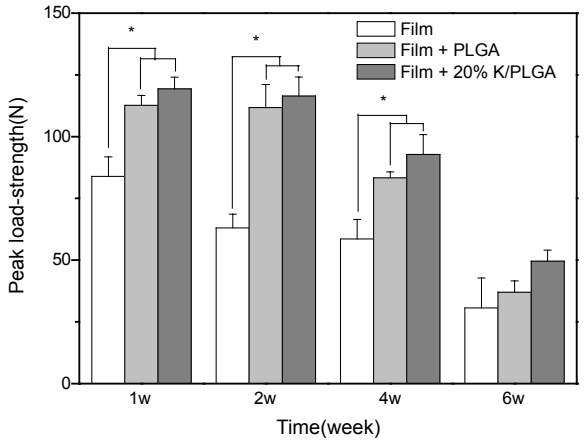

Figure 7. Compressive strength of cylindrical scaffolds of keratin/PLGA hybrid film during cell cultivation.

을 구성하는 친수성 아미노산으로 인해서 케라틴을 함유한 다공성 지지체가 압력에 대한 저항성이 높아진 것이라 사료된다. 이로써 본 연구에서 사용한 원통형 지지체가 강도면에서 우수함을 증명하였고 지지체 바깥부분의 다공성 지지체 링에 의해 원통형 지지체 강도를 조절할 수 있음을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 섬유륜재생을 위한 지지체연구의 일환으로 PLGA의 염증과 소수성의 문제점을 보완할 수 있는 천연고분자인 케라틴을 이용하여 케라틴/PLGA 필름을 제조하였다. 그러나 조직공학적 디스크재생에 응용하기 위해서는 기계적 강도의 문제점이 따르고, 이를 보완하기 위하여 케라틴/PLGA 복합체필름을 이용한 원통형 지지체를 제조하여 이 지지체가 섬유륜 재생에 적합한지를 확인하였다. 그 결과 케라틴을 함유하여 제작한 지지체가 함유하지 않은 것에 비해 섬유륜세포의 부착, 증식 및 표현형 유지에 있어 우수함을 보였다. 이는 케라틴에 포함되어 있는 세포의 이동과 부착, 자가 집결을 조작하는 많은 양의 단백질 기질과[21,22] 케라틴을 구성하는 친수성 아미노산이 복합적 원통형 지지체에 친수성을 증가시켜 섬유륜세포의 증식 및 표현형 유지에 긍정적인 영향을 준 것이라 사료된다.

이 결과에 따라 원통형 지지체의 기계적 강도를 측정하였고 필름만 말아 사용한 지지체보다 기계적인 강도가 우수한 것을 확인하였다. 또한, 이 원통형 지지체의 강도는 지지체의 바깥쪽 부분인 다공성 지지체 링의 선택에 따라 달라질 수 있음을 확인하였는데 이는 조직공학적 디스크재생에 이용되는 지지체의 설계에 있어 응용 가능성을 제시하였다. 이로써 본 연구팀에서 제작한 원통형 지지체가 섬유륜 재생에 있어 적합함을 확인하였으며 조직공학적 디스크재생에 응용 가능성을 입증하였다.

감사의 글: 본 연구는 세계수준의 연구중심대학(WCU R31-20029)과 보건복지부의 근골격계 바이오장기센터(0405-BO01-0204-0006) 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. R. Bibby, D. A. Jones, R. B. Lee, Y. Jing, and J. P. Urban, *Joint Bone Spine*, **68**, 537 (2001).
2. 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).
3. S. H. Kim, S. J. Yun, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 14 (2006).
4. 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).
5. I. K. Park, S. H. Oh, and J. H. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 164 (2004).
6. W. Y. Jang, S. H. Kim, I. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 100 (2005).
7. G. Khang, E. K. Jeon, J. M. Rhee, I. Lee, S. J. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **11**, 334 (2003).
8. G. Khang, M. S. Kim, B. H. Min, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2006).
9. O. Bostman, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **73**, 148 (1991).
10. M. S. Taylor, A. U. Daniels, K. P. Andriano, and J. Heller, *J. Appl. Biomater.*, **5**, 151 (1994).
11. J. Klompmaker, H. W. Jansen, R. P. Veth, J. H. Groot, A. J. Nijenhuis, and A. J. Pennings, *Biomaterials*, **12**, 810 (1991).
12. Y. Iwasaki, S. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **23**, 3897 (2002).
13. S. J. Yoon, S. H. Kim, H. J. Ha, Y. K. Ko, J. W. So, M. S. Kim, I. Y. Young, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Enigneering Part A,* **14**, 539 (2008).
14. 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).
15. H. H. Hong, S. J. Kim, S. H. Kim, H. L. Kim, J. H. Park, D. Lee, J. M. Rhee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **6**, 711 (2009).
16. M. S. Kim, H. H. Ahn, Y. N. Shin, M. H. Cho, G. Khang, and H. B. Lee, *Biomaterials*, **28**, 5137 (2007).
17. F. Wen, S. Chang, Y. C. Toh, S. H. Teoh, and H. Yu, *Mater. Sci. Eng.,* **27**, 285 (2007).
18. L. M. Dowling, W. G. Crewther, and DAD. Parry, *Biochem. J.*, **236**, 705 (1986).
19. T. Toshizumi, O. Naoya, T. Akira, and Y. Kiyoshi, *Biomaterials*, **23,** 817 (2002).
20. P. Sierpinskia, J. Garrettb, J. Mab, P. Apelb, D. Kloriga, T. Smithb, L. A. Komanb, A. Atala, and M. V. Dykea, *Biomaterials*, **29**, 118 (2008).
21. K. S. Stenn, S. M. Prouty, and M. Seiberg, *J. Dermatol. Sci.*, **7**, 109 (1994).
22. A. Tachibana, Y. Furuta, H. Takeshima, T. Tanabe, and K. Yamauchi, *Biotech.*, **93**, 165 (2002).
23. K. Kazunori, T. Toshizumi, and Y. Kiyoshi, *Biomaterials*, **25**, 4255 (2004).