

## 오리발 유래 콜라겐/락타이드 글리콜라이드 하이브리드 지지체의 특성 및 염증 완화 효과

김수민 · 김혜민 · 국 현 · 김은영 · 송정은 · 서동삼\* · 박찬흠\*\* · 강길선†  
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소, \*세원셀론텍  
\*\*한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과  
(2015년 2월 13일 접수, 2015년 4월 8일 수정, 2015년 4월 28일 채택)

### Characterization and Effect of Inflammatory Reaction of Duck-Foot Derived Collagen/PLGA(Poly lactic-co-glycolide) Hybrid Scaffold

Soo Min Kim, Hye Min Kim, Hyeon Kuk, Eun Young Kim, Jeong Eun Song,  
Dong Sam Suh\*, Chan Hum Park\*\*, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Fusion Tech, Polymer BIN Fusion Res Center & Dept. of PolymerNano Sci Tech, Chonbuk National Univ.,  
567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea

\*Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongsu 2ga 3-dong, Seongdong gu, Seoul 133-831, Korea

\*\*Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine,  
Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

(Received February 13, 2015; Revised April 8, 2015; Accepted April 28, 2015)

**초록:** 본 연구에서는 오리발에서 추출한 콜라겐(extracted from feet of ducks)을 함유한 poly(lactic-co-glycolide) (PLGA) 복합 지지체를 제조하여 조직 공학적으로 적용될 수 있도록 지지체의 기본 특성과 염증 반응을 알아보고자 하였다. 그 특성을 알아보기 위하여 압축강도, SEM, MTT를 측정하였으며, RT-PCR, ROS 그리고 조직화학적 염색을 통해 염증반응을 확인하였다. 그 결과 DC/PLGA 지지체는 기계적 성질 및 증식이 우수하고 염증반응 또한 완화시켜 줄 수 있음을 알 수 있었다. 이로써, DC가 첨가된 PLGA 지지체가 조직공학적인 지지체로 적용될 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, hybrid scaffold composed of duck's feet extract (DC)/poly(lactic-co-glycolide) (PLGA) were fabricated to apply in tissue engineering. Characterizations such as compressive strength, SEM analysis and MTT were performed for the analysis of basic properties. RT-PCR, ROS and H&E staining were carried out for anti-inflammatory effect. DC/PLGA scaffolds have shown excellent mechanical properties and proliferation and can reduce inflammatory response. This study suggested that DC/PLGA scaffolds may serve as a potential cell delivery vehicle and a structural basis for tissue engineering.

**Keywords:** collagen, feet of duck, inflammatory reaction, scaffold, tissue engineering.

## 1. 서 론

콜라겐은 몸속에서 결합조직을 이루는 주요한 단백질로, 신체구성 단백질 중 25~35%의 매우 많은 부분을 차지한다.<sup>1-3</sup> 인체 부분별 콜라겐 구성비를 보면, 이의 상아질 18%, 피부 표피 아래 진피의 70%, 관절 연골의 50%, 뼈의 유기물 중 80%, 뼈와 근육을 이어주는 힘줄의 80% 그리고, 눈의 각막

과 결막에서 주성분으로 구성되어 있다.<sup>2,3</sup>

콜라겐은 나이가 들수록 체내에서 합성하는 능력을 잃게 되는데, 18세 정도가 되면 콜라겐 생성 속도는 급속히 떨어지기 시작하여 40세에는 18세에 비해 절반 이하가 된다.<sup>3,5</sup> 또한 신진대사가 둔해져, 오래된 콜라겐이 분해되지 않고 계속 축적되면 콜라겐을 합성하는 능력 또한 부족해짐으로써 노화가 촉진된다.<sup>5,6</sup>

이러한 이유로 콜라겐 개발과 이에 대한 화장품, 식용 및 생체 소재에 대하여 지속적으로 연구되고 있다.<sup>7,9</sup> 지금까지는 소나 돼지, 어류 및 기타 가축에서 유래하는 콜라겐이 생체재료나 화장품, 건강식품의 원료로 이용이 검토되고 있다.<sup>4,8-10</sup>

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr  
©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

그러나 광우병과 구제역 발발 이후에 사람과 공통되는 감염증이 비교적 적고, 안정성이 높다는 이유로 사람으로부터 진화적으로 멀리 떨어져 있는 하등척추동물에 초점이 맞춰지고 있다.<sup>9,11-13</sup>

대부분의 동물에서 발견되는 콜라겐은 제 1형 콜라겐으로, 300 kDa의 단량체로 이루어져 있으며, 특정부위에 공유결합하고 있어 생체 내 이식 시 낮은 용해성을 갖는다.<sup>11,12</sup> 또한 변성이 쉽고 추출 수율이 낮은 단점을 가진 콜라겐은 생체재료 소재로써 적용 시, 그 가격이 매우 비싸다.<sup>10,14-16</sup>

이에 본 연구에서는 혈값으로 국외로 수출되거나, 사용되지 못해 폐기되는 축산폐기물인 오리부산물로부터<sup>2,3</sup> 일련의 가공법을 거쳐 콜라겐을 획득함과 동시에 이를 생분해성 합성 고분자인 PLGA와 혼합하여 생체 소재로 적용하려 하였다.

생분해성 합성 고분자인 poly(lactic-co-glycolide)(PLGA)는  $\alpha$ -하이드록시산 계열 고분자인 PGA와 PLA의 공중합체로 FDA 승인을 받아 약물전달시스템이나 조직 공학적 생체 재료로 적용되고 있다.<sup>17,18</sup> PLGA는 FDA 승인을 받을 만큼의 여러 장점에도 불구하고 체내에서 분해될 때, 분해 산물로 얻어지는 산과 독성물 때문에 세포의 증식률이 감소될 뿐만 아니라 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다.<sup>17,19</sup> 이러한 문제로 인해 다년간 PLGA의 화학적, 물리적 특성을 변화, 조절하여 독성반응과 생체 적합성 등의 기능적인 강화를 시도하는 연구가 지속되고 있다.<sup>17-20</sup>

최근 다양한 생체 재료가 널리 사용되고 있지만 생체 재료를 이식하였을 경우 체내에서 주변 조직과 어떠한 작용이 일어나는지 알아야 하며 체내 이식하는 재료로서의 적용 가능성을 판단하는 것이 중요하다.<sup>18,19</sup> 생체 재료로서의 적용 가능성을 결정하는 몇 가지 요인 중 하나는 염증반응이다. 염증반응은 체내의 방어기전으로, 외부 침입에 의한 변화, 즉 손상을 구조적, 기능적으로 자가 회복시키는 것이다.<sup>21,22</sup> 그러나 염증반응은 체내의 조직 손상을 야기하여, 이러한 손상을 예방하거나 치료하려는 노력이 계속해서 시도되고 있다. 특히, 이러한 염증반응을 예방, 치료하려는 노력은 염증반응을 야기하는 요인이 되는 재료를 최대한 줄이고 생체적합성이 뛰어난 재료로 대체하는 것에 초점이 맞춰지고 있는 상태이다.<sup>23,24</sup>

이에 본 연구에서는 기능과 물성이 우수한 PLGA에 오리발에서 얻어진 콜라겐(DC)을 첨가한 DC/PLGA 지지체 제조하여 지지체의 물리, 화학적 특성 및 제조된 DC/PLGA 지지체의 염증 반응을 알아보았다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 콜라겐 추출을 위한 오리발은 대한민국 전라북도 전주시의 오리농가에서 오리발을 공급받았으며, poly(lactic-co-glycolide)(PLGA)는 락타이드/글리콜라이드의

비율이 75/25이고 분자량이 90000 g/mol인 것을 Beringer Ingelheim Chem. Co.(Germany)에서 구입하였다. 수산화나트륨(NaOH, Sigma, USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

**콜라겐 추출.** 오리를 희생시킨 뒤 -80 °C로 급속 냉각시켜 냉동 보관하였다. 콜라겐 추출은 사용 하루 전 4 °C의 냉장고에서 24시간 동안 해동시킨 오리발을 사용하였다. 오리발을 정제수로 세척한 뒤, 3 cm 크기로 절단하여 24시간 동안 정제수에 담가 핏물을 제거하였다. 그 후 1 M의 수산화나트륨을 첨가하여 조직의 지방을 제거한 뒤 증류수로 세척하였다. 지방이 제거된 조직에 5%의 농도로 제조된 구연산(citric acid monohydrate, Showa, Japan)을 넣고 48시간 동안 4 °C 냉장실에서 150 rpm으로 교반하였다. 이후 산 처리한 용액을 블렌더를 이용하여 갈아 준 뒤, 부피의 8배 정도의 구연산을 추가적으로 첨가하여 조직에서 콜라겐이 충분히 추출될 수 있도록 하였다. 구연산에 녹아있는 콜라겐을 수거하기 위하여 4 °C, 10000 rpm에서 10분간 원심분리해 상층액만을 수거하였다. 여기에 1.5 M의 농도의 염화나트륨(NaCl, Showa, Japan)과 에탄올(ethyl alcohol, Merck Millipore, Germany)을 첨가하여 하루 동안 냉장 보관하면서 콜라겐을 침전시켰다. 침전된 콜라겐을 수거하여 2~3회 증류수로 세척하고 -70 °C에서 냉동, -50 °C, 20 mmHg으로 동결건조(SFDSF12, Samwon Freezing Engineering Co., Ltd.)하여 콜라겐 분말을 획득하였다.

**지지체 제조.** 오리발 콜라겐이 첨가된 PLGA 다공성 지지체는 염 추출법을 이용하여 제조하였다. PLGA 1 g 당 4 mL의 디클로로메탄(dichloromethane, Sigma)을 첨가하여 용해시켜준 뒤, 180  $\mu$ m 이하 크기의 오리발 콜라겐 분말을 PLGA 중량% 별로 첨가하였다. 이에 다공형성물질인 180~250  $\mu$ m 크기의 염화나트륨을 PLGA의 중량 대비 900% 첨가하여 충분히 섞어 직경 7 mm, 두께 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm<sup>2</sup>의 압력으로 24시간 동안 가압해주었다. 그 후 다공의 형성을 위하여 3차 증류수에 세척하면서 염화나트륨을 용출시켜 주었고, -80 °C의 냉동에서 24시간 동결시킨 뒤, 5 mTorr, -50 °C 조건에서 48시간 동안 동결건조하였다. 잔류용매를 충분히 제거하기 위하여 7일간 25 °C 진공오븐에서 건조시킨 후 사용 전 70% 알코올에 멸균하여 실험에 사용하였다.

**SEM 관찰.** 제조된 지지체의 다공 및 지지체의 표면을 관찰하기 위하여 주사전자현미경(SEM) 관찰을 실시하였다. 지지체 관찰이 용이하도록 지지체를 잘라 시료폴더에 고정시킨 후 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 지지체를 백금 코팅한 후 각각의 시료를 주사전자현미경(Hitachi Co., Model S-2250N, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

**면역조직화학적 염색.** DC/PLGA-80 지지체로 파라핀 블록을 제조하여 5  $\mu\text{m}$ 의 두께로 박절한 후 유리 슬라이드에 부착시켰다. 준비된 슬라이드를 65  $^{\circ}\text{C}$  오븐에 24시간 이상 건조한 뒤, 100% 자일렌(Junsei, Japan)으로 5분간 2회 처리하여 파라핀을 제거한 후 100, 95, 90, 80, 75% 알코올로 처리하고 증류수로 합수시켰다. 항원을 노출시키기 위해 0.03% 펩신(돼지 위 점막 추출 효소, Sigma)으로 처리하였고, 내인성 과산화효소의 작용을 억제시키기 위해 3% 과산화수소(Showa)를 차례로 처리하였다. 배경의 비특이적인 결합을 막기 위해 정상 면양 혈청을 가하여 반응시킨 후, 제 I형 콜라겐(Calbiochem MD Bio Sciences Inc., La Jolla) 항체를 1:90의 비율로 희석하여 하룻밤 반응시켰다. 그 다음 바이오틴이 결합된 이차항체 항마우스 IgG 항체(Santa Cruz, USA)를 반응시키고 스트렙타비딘 퍼옥시다아제(Abcam, USA)를 처리하였다. 마지막으로 3-아미노-9-에틸 카르바졸(AEC, Dako, Japan)로 발색하고 마이어 헤마톡실린(Dako)으로 대조 염색하여 봉입시켰다.

**FTIR 분석.** 푸리에 변환 적외선 분광 분석(FTIR)은 FTIR 분광 광도계(JASCO Co., Japan)를 이용하여 해상도 4  $\text{cm}^{-1}$ 로 500~4000  $\text{cm}^{-1}$ 의 범위에서 측정하였다. 최적의 신호 대 잡음비를 얻기 위해 1000회 스캔하여 보정하였고 측정된 모든 스펙트럼은 Jasco Spectra Manager(Jasco)를 사용하여 대기 중의 물과 이산화탄소의 간섭효과에 대하여 정량적으로 보정하였다.

**세포 배양.** 쥐 배아섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658)와 쥐 단핵대식세포(Mouse leukaemic monocyte macrophages cell line; Raw 264.7, KCLB40071)는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 제공받았다. NIH/3T3는 RPMI1640(Gibco, USA), Raw 264.7은 고농도 글루코오스 DMEM(Gibco) 배양액에 각각 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco), 1% 항생제(antibiotics/antimycotics, Gibco)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포는 세포배양 접시에 분주하여 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 배양하였으며, 배양액은 3일에 한 번씩 교체해주었고 접시 면적의 80% 가량 세포가 성장하면 계대해주었다.

**압축강도.** 직경 7 mm, 두께 3 mm의 DC/PLGA 지지체를 준비하여 만능물성측정기(FTC, Sterling, USA)를 이용하여 각 군마다 100개씩 압축강도를 측정, 분석하였다. 만능물성측정기의 설정 값은 표적거리 1.5 mm, 시험 속도 1 mm/min, 압축력 1 N으로 모두 동일하게 적용하였다.

**세포의 부착 거동 분석.** DC/PLGA 지지체에 NIH/3T3 세포를  $2 \times 10^5$ 개씩 파종하여 지지체의 표면 및 세포를 파종하였을 때의 세포의 부착 거동을 주사전자현미경(SEM)을 사용하여 관찰하였다. 지지체에 세포를 파종한 뒤, 1일과 3일간 배양시킨 뒤 배양액을 제거하고 인산완충용액으로 세척하였다. 이를 2.5% 글루타알데하이드 용액(Sigma)으로 24시간 동안

고정하고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분간 탈수 과정을 진행하였다. 탈수가 완료된 지지체는 관찰 전까지 수분 없이 데시케이터에 보관하였다. 지지체를 관찰하기 위하여 스테이지에 고정시킨 뒤, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 백금 코팅하였고 이를 주사전자현미경(Hitachi Co., S-2250N, Japan)을 이용하여 관찰, 분석하였다.

**세포 생존율 분석.** 제조된 DC/PLGA 지지체에서의 세포 생존율을 분석하여 위하여 NIH/3T3 세포를 지지체에서 배양시킨 뒤 MTT(3-[4,5-디메틸치아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석을 각각 1일, 2일 및 3일째 시행하여 주었다. 세포를 배양한 지지체에 배양액 부피의 10%만큼 MTT용액(1 mg/mL, Sigma)을 첨가하여 4시간 동안 37  $^{\circ}\text{C}$  인큐베이터에서 반응시켰다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸 설피록사이드(Sigma)를 사용하여 보라색 결정을 충분히 용해시킨 뒤, 마이크로 플레이트 리더(Thermo, Molecular Device Co., USA)를 사용하여 570 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 분석하였다.

**염증관련 mRNA 발현도 확인.** DC/PLGA 지지체에 파종된 Raw 264.7 세포에서의 염증 관련 mRNA 발현도의 발현 여부를 알아보기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다. 파종 1일과 3일째에 회수된 지지체를 인산완충용액으로 세척한 뒤, 트리졸(Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies Co., Netherlands)에 넣어 약 10분간 충분히 반응시키고 클로로포름(Sigma)을 트리졸의 20% 만큼 넣어 섞어준다. 그 후, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12000 rpm으로 15분 동안 원심분리해 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 TOPscript<sup>TM</sup> One-step RT-PCR DryMix (+Dye)(Enzymomics, Korea)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR후 증폭된 DNA를 1%(w/v) 아가로스 겔을 사용하여 전기영동한 뒤, 브로민화 에티듬(Sigma)으로 시각화하였으며 300 nm의 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 항존 유전자인 GAPDH와 TNF- $\alpha$  밴드의 발현정도를 확인하였다. 그 후 각각의 발현도를 사진 분석 소프트웨어(Image J; National Institutes of Health, USA)를 사용하여 그 값을 표준화하여 분석하였다.

**활성산소 생성도 분석.** 활성산소(ROS; reactive oxygen species)의 생성도를 통해 염증정도를 분석하기 위하여 형광 물질인 dichlorofluorescein(DCF)를 이용하여 측정하였다. 지지체에 Raw 264.7을  $1 \times 10^6$  세포/지지체의 농도로 파종하여 3일간 배양하였다(n=10). 양성 대조군으로는 지지체에 파종한 세포의 배양액에 염증 유발 물질인 내독소(LPS; lipopolysaccharide, Sigma)를 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하여 배양하였고 음성 대조군은 Raw 264.7을 세포배양접시에 배양시켰다. 그 후 배양액에 20  $\mu\text{M}$ 의 DCF-DA(dichlorofluorescein diacetate, Sigma)를 첨가하여 반응시킨 뒤, 형광 활성화 세포 분류기(fluorescence activated cell sorter, Benton-Dickson,

USA)를 사용하여 측정하였다.

**조직학적 평가.** 조직 내에서 염증반응 정도를 조직학적 평가를 통해 분석하기 위하여 DC/PLGA 지지체를 면역기관인 림프절이 주로 모여 있는 위스터 랫(4주령, 암컷)의 겨드랑이 피하에 이식하였다(n=10). 1주 및 4주 후 이식 부위만을 적출하였고 동물은 안락사시켰다. 적출한 부위를 4% 포르말린 (Sigma) 용액에 고정시킨 뒤, 파라핀 블록을 제조하여 5 µm의 두께로 박절하여 유리 슬라이드에 부착시켰다. 이렇게 준비된 슬라이드를 65 °C 오븐에 24시간 이상 건조한 뒤, 탈파라핀 과정을 거친 후 함수시켰다. 그 후 헤마톡실린 용액 (Sigma)과 에오신 Y 용액(Sigma)으로 차례로 처리한 후 봉입하였다. H&E 염색법으로 염색된 조직의 세포 및 세포외 기질, 혈관형성 등을 광학현미경(Nikon Eclipse TE2000-U-Inverted, Japan)으로 관찰하여 염증정도를 조직학적으로 비교 분석하였다.

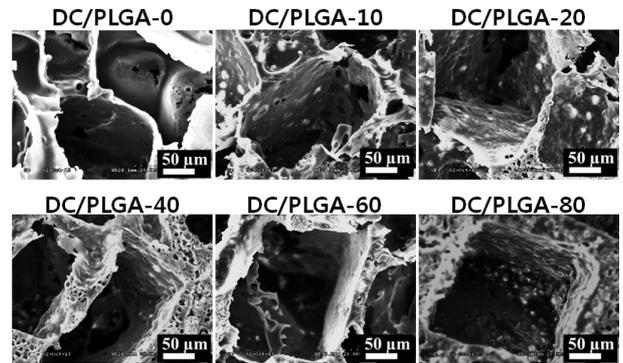
**통계.** 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

**결과 및 토론**

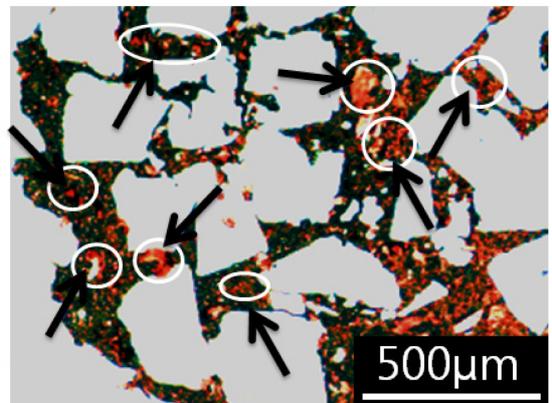
**지지체 관찰.** 본 연구에서 일련의 과정을 거쳐 Table 1과 같이 제조한 DC/PLGA 지지체의 다공 및 표면을 확인하기 위하여 주사 전자 현미경 촬영을 실시하였다(Figure 1(a)). DC가 전혀 첨가되지 않은 DC/PLGA-0은 지지체에 다공이 다른 군에 비교적 균일하게 형성되어 있었으며 다공 내부의 표면이 매끄러운 것을 볼 수 있다. 그러나 지지체 제조 시 DC가 첨가된 DC/PLGA 지지체는 첨가한 DC 입자가 PLGA 다공 벽에 무질서하게 퍼져 있었고 DC의 첨가량이 증가할수록 지지체의 표면이 점점 거칠어짐을 확인하였다.

또한 지지체 다공 벽에 퍼져 있는 콜라겐을 확인하기 위하여 DC/PLGA-80 지지체에 제 I형 콜라겐의 면역조직화학염색을 실시한 것이다(Figure 1(b)). 제 I형 콜라겐은 AEC에 의해 붉은색으로 발현되는데 지지체의 벽 사이사이에 붉은색 입자가 박혀있는 것을 볼 수 있다. 이로써 지지체의 벽에 퍼져있는 균일하게 퍼져있는 입자들이 콜라겐임을 확인하였다.

FTIR. 제작한 지지체를 푸리에 변환 적외선 분광기를 사용



(a)



(b)

**Figure 1.** Collagen incorporated into PLGA scaffolds: (a) SEM micrographs of DC/PLGA scaffolds; (b) Micrograph of collagen I immunohistochemical staining of DC/PLGA-80 scaffolds, AEC was used as a chromogen (black arrow: type I collagen).

하여 분석해 본 결과, DC가 첨가되지 않은 DC/PLGA-0을 제외한 다른 지지체에서 보통의 콜라겐에서 발견되어지는 amide 피크가 1650~1655 cm<sup>-1</sup>에, amide II 피크가 1567 cm<sup>-1</sup>, amide III 피크가 1250 cm<sup>-1</sup>에서 나타났으며(Figure 2(a)),<sup>25</sup> 지지체가 함유하는 DC의 양이 증가함에 따라서 흡수도가 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한 3000~3600 cm<sup>-1</sup> 영역의 OH기 피크 스펙트럼을 분석해 본 결과 지지체가 함유하는 DC의 양이 증가함에 따라서 흡수도가 증가하는 것을 볼 수 있다(Figure 2(b)).

**압축강도.** 제조된 DC/PLGA 지지체를 세포 파종 전과 후의 압축강도를 측정하여 Figure 3에 나타내었다. 세포를 파종하지 않은 DC/PLGA 지지체는 배양액 하에서 3일 동안 담가둔 후에 측정하였고 세포를 파종한 후의 DC/PLGA 지지체는 NIH/3T3 세포를 파종한 뒤 배양액 하에서 3일 동안 배양한 뒤 압축강도를 측정하였다. 세포를 파종하지 않은 DC/PLGA 지지체는 DC가 첨가되는 양이 증가함에 따라서 압축강도가 감소하였다. 이는 DC/PLGA 지지체 내에 DC가 첨가됨에 따라 물리적 특성이 비교적 우수한 PLGA의 밀도가 감

**Table 1. Ratio of PLGA and Ducks Collage in Scaffold**

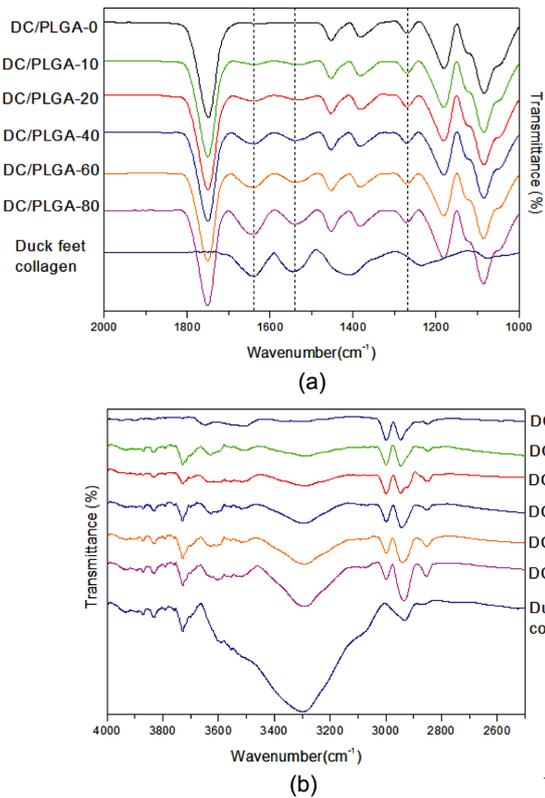
	PLGA(g)	DC(g)
DC/PLGA-0	1	0
DC/PLGA-10	1	0.1
DC/PLGA-20	1	0.2
DC/PLGA-40	1	0.4
DC/PLGA-60	1	0.6
DC/PLGA-80	1	0.8

소함으로써 압축강도가 감소한 것이라 사료된다. 또한 상대적으로 소수성을 띠는 PLGA와 상대적으로 친수성을 띠는 DC의 상호작용으로 친수성 기질과 소수성 기질이 혼합될 때 낮은 계면결합으로 인해 물성이 저하된 결과라고 판단된다.<sup>26</sup>

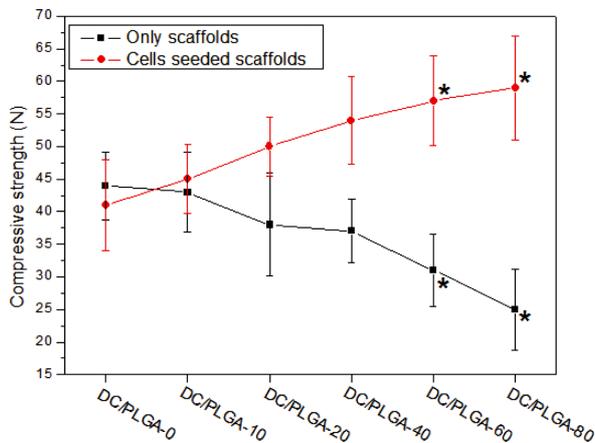
그러나 이러한 결과와는 다르게 DC/PLGA 지지체에 NIH/

3T3 세포를 파종하여 3일 동안 배양한 뒤 측정하였을 때는 지지체에 첨가되는 DC의 함량이 증가할수록 압축강도가 높게 측정되었고, 특히 DC/PLGA-80은 60N으로 DC/PLGA보다 20N 가량 높은 강도로 측정되었다. 이는 DC/PLGA 지지체의 다공에서 콜라겐이 NIH/3T3 세포에 화학 주성으로 작용하여 세포의 이동을 촉진시키고 세포의 결합, 세포와 세포 사이의 결합 그리고 세포외기질의 분비를 촉진시킴으로써<sup>27</sup> 기계적 강도가 증가된 결과로 사료된다.

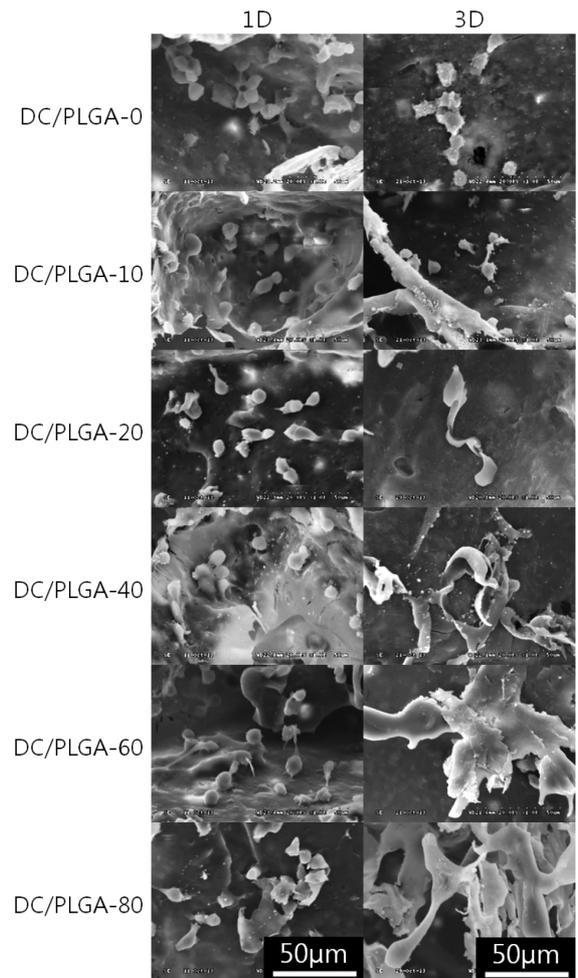
**지지체에서의 세포 부착 양상.** DC/PLGA 지지체에서의 초기 세포의 부착 정도와 부착 형태를 육안으로 관찰하기 위해 주사 전자 현미경 촬영을 통해 분석하였다. NIH/3T3 세포를 각각 DC/PLGA 지지체에서 배양한 세포의 부착 정도와 부착 형태를 Figure 4에 나타내었다. NIH/3T3 세포는 보통 초기에 단층의 둥근 형태로 부착되었다가 증식하면서 표면 바닥에 넓게 뻗은 방추형으로 부착된다.



**Figure 2.** FTIR spectra of DC/PLGA scaffolds compared with duck feet collagen: (a) 1000~2000 cm<sup>-1</sup>; (b) 2600~4000 cm<sup>-1</sup>.



**Figure 3.** Compressive strength of DC/PLGA scaffolds before and after cultured NIH/3T3 for 3 days (\*Statistically significant changes compared with the control(DC/PLGA-0) group  $p < 0.05$ ).



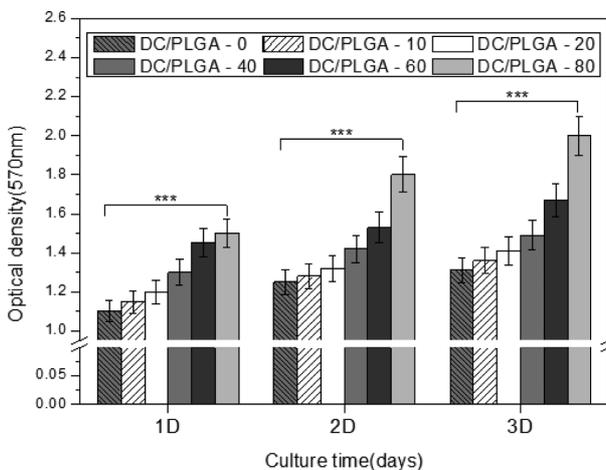
**Figure 4.** Cross-section SEM micrographs of NIH/3T3 cells seeded on DC/PLGA scaffolds at day 1 and 3 of culture in proliferation medium.

배양 1일 쯤에는 DC/PLGA-80을 제외한 나머지 DC/PLGA 지지체 군의 표면에서 세포가 둥근 형태였으며 부착 정도는 DC의 첨가 및 첨가량과는 관계없이 비슷한 양상을 보였다. 그러나 배양 1일 쯤에도 불구하고 DC/PLGA-80의 표면에서 둥근 형태의 세포와 동시에 바닥에 넓게 뻗은 방추형의 세포도 함께 관찰되었다.

배양 3일 쯤에는 DC/PLGA-0, 10의 표면에 부착된 세포는 여전히 길게 뻗어 넓적하게 바닥에 붙지 못하고 둥근 형태를 유지하고 있다. DC/PLGA-20,40의 표면에 세포는 바닥에 방추형으로 뻗어있다. DC/PLGA-60, 80의 표면에 세포는 바닥에 방추형으로 길게 뻗음과 동시에 넓적하게 바닥에 부착되어 있으며, 특히 DC/PLGA-80에서는 활발한 세포의 증식으로 지지체의 표면이 덮여 있었다.

이는 친수성 결가지를 가진 DC가 첨가됨에 따라 콜라겐에 비하여 상대성으로 소수성인 PLGA에 친수성을 부여하고,<sup>2</sup> 거칠기를 부여함으로써<sup>28</sup> 세포가 부착, 증식하는데 있어 알맞은 환경이 형성되었을<sup>29,30</sup> 뿐만 아니라, 콜라겐 그 자체로 세포에게 바람직한 부착 표면이 되어 세포의 부착, 증식 그리고 뻗음에 긍정적인 영향을<sup>27,31</sup> 미친 결과에 의한 것으로 사료된다.

**세포 증식을 측정.** DC/PLGA 지지체에서의 세포의 증식을 MTT를 사용하여 분석하였다. 일련의 과정을 거쳐 제조된 각각의 DC/PLGA 지지체에 NIH/3T3 세포를 파종한 뒤, 배양 1일, 2일 및 3일에 그 값을 측정하였으며, 이에 대한 결과를 Figure 5에 나타내었다. 모든 지지체에서 배양기간이 길어짐에 따라 증식률이 증가하였다. 전체 배양기간에 걸쳐 DC/PLGA-0에서는 세포의 증식률이 다른 군에 비하여 상대적으로 적었으며 DC가 첨가되는 양이 증가함에 따라서 세포의 증식률이 증가함을 알 수 있다. 이는 앞의 SEM을 통한 부착 양상 분석과도 부합하는 결과로써 DC가 PLGA에 첨가됨으

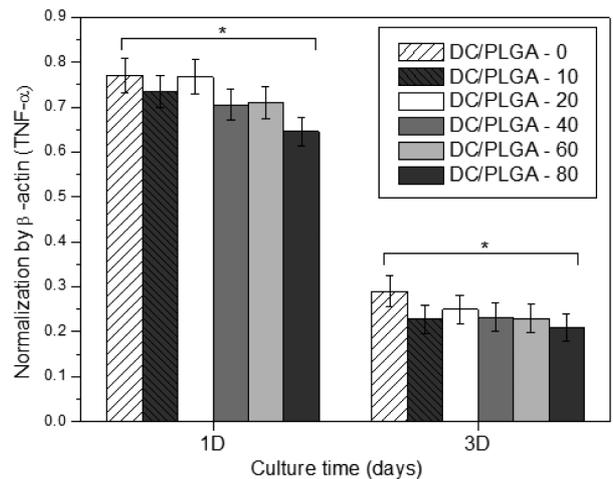


**Figure 5.** Cell adhesion and proliferation assay of NIH/3T3 cell seeded on DC/PLGA scaffolds via MTT (\*\*\*) $p < 0.001$ .

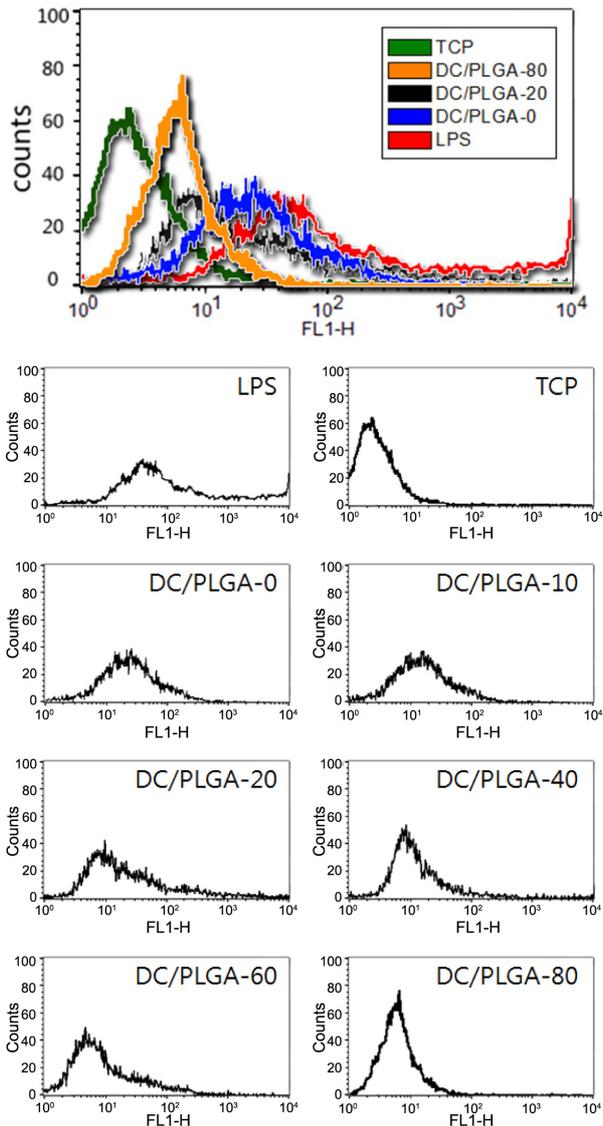
로써 지지체 자체의 친수성과 수분 함유력<sup>2</sup> 그리고 거칠기를<sup>28</sup> 부여해 주어 세포의 이동을 촉진함으로써<sup>15,27</sup> 세포의 증식과 조직의 형성을 돕고,<sup>5,6,16,24</sup> DC 내에 함유된 여러 사이토카인이 세포의 증식에 긍정적인 영향을<sup>29-31</sup> 끼친 결과라고 사료된다.

**종양괴사인자 TNF- $\alpha$  발현도.** 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ 는 면역 반응과 염증 반응의 중요한 매개 물질로 작용하면서 보통 대식세포에 의해 분해되고 체내에서 발열을 유발하며 종양생성을 억제하고 바이러스 복제를 억제한다. DC/PLGA 지지체에 대식세포인 Raw 264.7 세포를 파종한 뒤 1 및 3일 후에 염증 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 mRNA 관점에서 알아보았으며, 이에 대한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 모든 실험 군에서 항존 유전자인 GAPDH가 발현되었으며 이를 통해 각 지지체에서의 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현도를 표준화하였다. 1일과 3일의 TNF- $\alpha$  발현도를 비교해보면, 1일 쯤에 발현되었다가 3일 쯤에 그 발현도가 줄어드는 거동을 보이고 있으며, 특히 DC/PLGA-0이 가장 강하게, DC/PLGA-80이 가장 약하게 발현되었다. 이러한 결과로 보아 DC가 첨가되어진 DC/PLGA 지지체는 시간이 지남에 따라서 전염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ 의 발현량이 감소하는 것으로 보아 DC가 첨가된 DC/PLGA 지지체를 생체 재료로 적용될 가능성이 있음으로 사료된다.

**활성산소(ROS) 측정 분석.** DCF-DA(dichlorofluorescein diacetate)가 세포내로 들어가게 되면 가수분해반응에 의해 2',7'-dihydrodichlorofluorescein(DCF-H)로 전환이 되고, 이 물질은 ROS가 발생하는 곳에서 형광 빛을 발하는 DCF로 산화반응이 일어난다. DC가 첨가된 DC/PLGA 지지체에서 생성된 ROS를 측정하기 위하여 DCFH-DA를 이용하여 검출하였다. ROS는 높은 반응성으로 체내에서 산화적 손상을 일으킴으로써 염증을 일으킨다.<sup>26,27</sup> 본 연구에서는 DC/PLGA 지

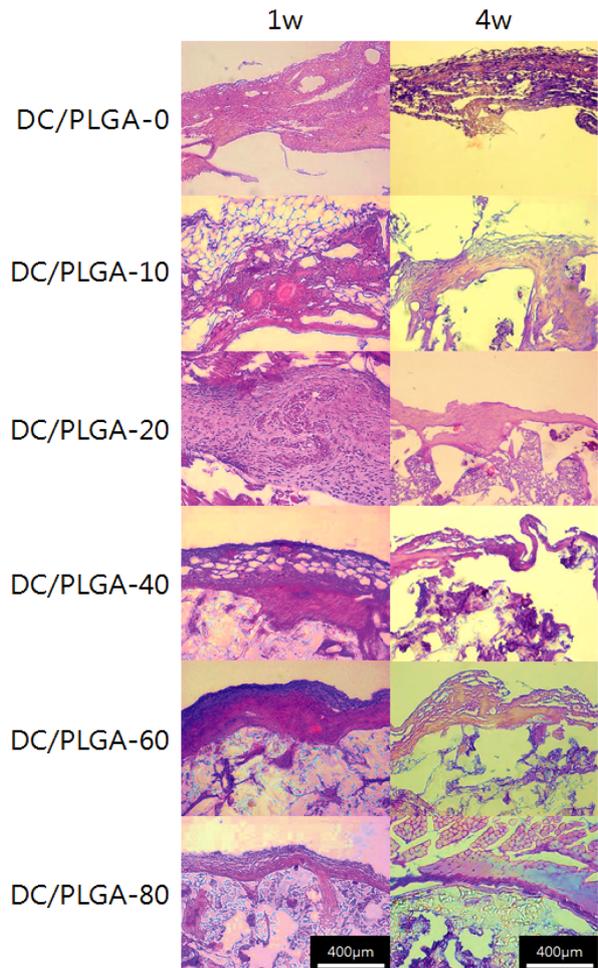


**Figure 6.** Gene expression profiles of TNF- $\alpha$  in DC/PLGA scaffolds (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 7.** Antioxidant activity of DC/PLGA scaffolds. The flow cytometry analysis shows the effects of DC/PLGA on the generation of ROS.

지지체에 대식세포인 Raw 264.7 세포를 배양한 뒤 ROS를 측정하여 염증 정도를 평가하여 Figure 7에 나타내었다. 형광 활성화 세포 분류기(FACS)를 통한 ROS 분석은 배양액에 264.7 세포만 배양한 음성대조군인 TCP(tissue culture plate)와 내독소인 LPS를 처리하여 배양액에 264.7 세포를 배양한 양성대조군과 함께 비교하였다.<sup>32</sup> 모든 실험군은 음성대조군과 양성대조군 형광 세기 사이에서 그 세기가 측정되었으며, 음성대조군인 TCP에서는 형광의 세기가 가장 약하게 측정되었고 LPS 자극으로 인해 양성대조군은 가장 강한 형광 세기가 측정되었다. DC/PLGA-0은 LPS와 비슷한 형광 세기를 보였고 이를 통해 DC/PLGA-0에서 많은 양의 ROS가 생성된



**Figure 8.** H&E stained histochemical section of tissue at DC/PLGA scaffolds after 1 and 4 weeks of implantation (magnification with  $\times 200$ ).

것을 알 수 있었다. 이렇게 많은 양의 ROS가 생체 내에서 지속해서 생성되면 염증이 발생하여 만성 질환이 일어나게 된다.<sup>21,22,30</sup> DC가 첨가된 지지체 중에서 DC/PLGA-80이 음성대조군인 TCP에 가장 근접한, 그리고 DC/PLGA 지지체 중에서 형광 세기가 가장 약하게 측정되었다. 이로써 DC/PLGA-80 지지체는 생체에 적용 시 ROS 생성량이 가장 적을 것이고 산화적 손상에 의한 염증반응을 줄여줄 수 있을 것으로 예상된다.

**조직화학적 평가.** 생체 내에 지지체 적용 시 주변조직과 지지체 사이에 어떠한 작용이 일어나는지 알아보기 위하여 지지체를 위스터 랫 겨드랑이 부위의 피하에 이식하여 1 및 4 주 뒤에 적출하여 관찰하였다.

Figure 8은 H&E 염색 결과로, 이식 1주 후에 모든 DC/PLGA 지지체의 표면에 염증반응으로 인한 대식세포와 거대세포 축적에 따른 벽이 형성되었다. 특히 DC/PLGA-0과 DC/PLGA-10, 20의 표면은 육아중성 침윤과 섬유화가 진행되어

두꺼운 벽을 형성함으로써 나머지 지지체군보다 염증 반응이 활발히 진행되어 있었다.<sup>27,28,30</sup> DC를 다른 군에 비하여 상대적으로 많이 첨가하여 제조한 DC/PLGA-80은 형성된 조직 반응에 의한 벽의 두께가 가장 얇음을 알 수 있다. 이식 4주 후에 DC/PLGA-80을 제외한 지지체의 염색 결과를 보면, 표면에 형성되었던 벽의 두께가 감소한 것을 볼 수 있으나 지지체 표면에는 염증 세포가 여전히 존재하고 육아종성 반응으로 인하여 섬유화된 조직이 관찰된다. 이식 초기에도 벽이 가장 얇았던 DC/PLGA-80은 이식 4주 후에도 다른 DC/PLGA 지지체보다 육아종성 반응, 대식세포 및 거대세포 등이 현저하게 적게 관찰되었으며 염증 세포의 침윤도 적어 표면에 형성된 벽의 두께가 가장 얇았다.

이는 앞의 *in vitro* 상에서의 TNF- $\alpha$  발현도와 ROS 생성도 분석과 부합하는 결과이다. 따라서 DC/PLGA 지지체를 생체 재료로 적용한다면 DC/PLGA-80이 이물 반응에 의한 염증을 가장 효과적으로 줄여줄 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 오리발에서 추출한 콜라겐(DC)을 생분해성 고분자 PLGA에 첨가하여 DC/PLGA 지지체를 제조함으로써, 조직 공학적으로 사용될 수 있는 지지체를 제안하였다. 3차원 다공성 지지체로 제조된 DC/PLGA 지지체는 DC가 첨가됨으로써 다공 표면이 거칠어짐을 SEM으로 확인하였고, FTIR, 제 I형 콜라겐 면역염색을 통해 DC와 PLGA가 서로의 성질을 잃지 않고 혼합되어 지지체로 제조되었음을 알 수 있었다. 또한 DC/PLGA 지지체에서의 세포 파종 전, 후의 압축강도, 세포의 부착형태, 부착정도 및 세포의 증식을 통하여 DC/PLGA 지지체가 세포의 증식, 부착 및 세포외기질 형성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 TNF- $\alpha$  mRNA 발현, ROS 생성 및 *in vivo* 상에서의 조직화학평가를 분석을 통해 제조된 지지체 중에서 DC/PLGA-80이 전염증선 사이토카인 TNF- $\alpha$ 의 발현량과 산화적 손상에 의한 염증 반응을 가장 잘 감소시켰으며 염증 세포와 섬유 피막의 축적이 가장 적었다. 이는 DC가 친수성과 거칠기를 제공하였고 DC 내에 함유된 여러 사이토카인이 세포의 부착과 이동을 도움으로써 세포 증식 및 조직 형성이 촉진된 것으로 사료된다. 그리고 DC를 PLGA에 첨가함으로써 합성고분자인 PLGA의 밀도를 줄이고 상대적으로 생체적합성이 우수한 콜라겐의 밀도를 증가함으로써 염증 반응을 감소시키는 결과를 가져왔다. 이는 DC/PLGA 지지체가 세포에 긍정적이고 유익한 환경을 제공하였고 조직공학적인 지지체로 적용될 가능성을 확인하였다.

**감사의 글:** 이 논문은 한국연구재단 BK21플러스사업, 농림수산식품부 기술사업화 지원사업(814005-03-1-HD020), 생

명산업기술개발사업(112007-05-3-SB010)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

## 참 고 문 헌

1. Z. Deyl and M. Adam, *J. Chromatography*, **488**, 161 (1989).
2. H. A. Ko, H. M. Kim, H. J. Ha, A. R. Kim, J. E. Jang, K. H. Kim, J. H. Lee, J. E. Song, H. Yoon, O. J. Lee, D. Lee, C. H. Park, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.*, **3**, 102 (2012).
3. Z. Deyl, Mikšik and A. Eckhardt, *J. Chromatogr. B*, **790**, 245 (2003).
4. C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, *Chem. Eng. Res. Des.*, **85**, 1051 (2007).
5. J. M. Pachence, *J. Biomed. Mater. Res., Part B: Appl. Biomater.*, **33**, 35 (1996).
6. M. H. Santos, R. M. Silva, V. C. Dumont, J. S. Neves, H. S. Mansur, and L. G. D. Heneine, *Mat. Sci. Eng. C*, **33**, 790 (2013).
7. I. Caputo, M. Lepretti, C. Scarabino, C. Esposito, and A. Proto, *Anal. Biochem.*, **421**, 92 (2012).
8. D. I. Zeugolis, R. G. Paul, and G. Attenburrow, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **86**, 892 (2008).
9. V. Deo, S. Gupta, S. Ansari, P. Kumar, and R. Yadav, *Quintessence Int.*, **45**, 15 (2014).
10. F. Maspero, S. Sala, M. E. Fedi, M. Martini, and A. Papagni, *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 2019 (2011).
11. W. Feng, T. Zhao, Y. Zhou, F. Li, Y. Zou, S. Bai, W. Wang, L. Yang, and X. Wu, *Pharmacogn. Mag.*, **9**, 32 (2013).
12. P. Fagerholm, N. S. Lagali, J. A. Ong, K. Merrett, W. B. Jackson, J. W. Polarek, E. J. Suuronen, Y. Liu, I. Brunette, and M. Griffith, *Biomaterials*, **35**, 2420 (2014).
13. Z. L. Shen, H. Kahn, R. Ballarini, and S. J. Eppell, *Biophys. J.*, **100**, 3008 (2011).
14. C. E. Ghezzi, B. Marelli, N. Muja, and S. N. Nazhat, *Acta Biomater.*, **8**, 1813 (2012).
15. A. El-Fiqi, J. H. Lee, E. J. Lee, and H. W. Kim, *Acta Biomater.*, **9**, 9508 (2013).
16. R. Sopakayang, R. De Vita, A. Kwansa, and J. W. Freeman, *J. Theor. Biol.*, **293**, 197 (2012).
17. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 34 (2004).
18. H. Yoshimoto, Y. M. Shin, and H. Terai, *Biomaterials*, **24**, 2077 (2003).
19. H. Fan, Y. Hu, C. Zhang, X. Li, R. Lv, L. Qin, and R. Zhua, *Biomaterials*, **27**, 4573 (2006).
20. Y. C. Wu, S. Y. Shaw, H. R. Lin, T. M. Lee, and C. Y. Yang, *Biomaterials*, **27**, 896 (2006).
21. S. K. Goh, S. Bertera, P. Olsen, J. E. Candiello, W. Halfter, G. Uechi, M. Balasubramani, S. A. Johnson, B. M. Sicari, E. Kollar, S. F. Badylak, and I. Banerjee, *Biomaterials*, **34**, 6760 (2013).
22. H. Lu, T. Hoshiba, N. Kawazoe, I. Koda, M. Song, and G. Chen, *Biomaterials*, **32**, 9658 (2011).
23. S. Eom, J. H. Park, S. C. Yoo, S. J. Kim, and G. Khang, *Int. J.*

- Tissue. Regen.*, **1**, 28 (2010).
24. J. M. Curran, S. Fawcett, L. Hamilton, N. P. Rhodes, C. V. Rahman, M. Alexander, K. Shakesheff, and J. A. Hunt, *Biomaterials*, **34**, 9352 (2013).
25. S. J. Lee, *Int. J. Tissue Regen.*, **4**, 89 (2013).
26. T. J. Chung, B. H. Lee, H. J. Lee, H. J. Kwon, W. B. Jang, H. J. Kim, and Y. G. Eom, *Elastomer*, **46**, 195 (2011).
27. H. E. Kim, H. N. Kim, H. Yoo, J. E. Song, S. Y. Jeong, Y. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Macromol. Res.*, **20**, 1044 (2012).
28. M. Ngiam, S. Liao, A. J. Patil, Z. Cheng, C. K. Chan, and S. Ramakrishna, *Bone*, **45**, 4 (2009).
29. B. L. Farrugia, J. M. Whitelock, M. Jung, B. McGrath, R. L. O'Grady, S. J. McCarthy, and M. S. Lord, *Biomaterials*, **35**, 1462 (2014).
30. R. A. Ashley, B. W. Palmer, A. D. Schultz, B. W. Woodson, C. C. Roth, J. C. Routh, K. M. Fung, D. Frimberger, H. K. Lin, and B. P. Kropp, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 3241 (2009).
31. S. L. B. Bucktrout, M. M. Lordella, X. Zhou, B. Anthony, W. Rosenthal, H. Luche, H. J. Fehling, and J. A. Bluestone, *Immunity*, **39**, 949 (2013).
32. K. Abouzid and S. A. Bekhit, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 5547 (2008).