

PLGA 종류와 담체의 형성 방법에 따른 인간의 조직공학적 연골형성

김유미 · 임정옥* · 정호윤** · 박태인# · 백운이**

경북대학교 의공학과, 의학연구소*, 성형외과학교실**, 해부병리학교실#, 마취과학교실**

(2001년 9월 25일 접수, 2002년 4월 20일 채택)

Tissue Engineered Cartilage Formation on Various PLGA Scaffolds

Yu Mi Kim, Jeong Ok Lim*, Ho Yun Chung**, Tae In Park#, Woon Yi Baek**

Dept. of Biomedical Engineering, Medical Research Institute*, Dept. of Plastic & Reconstruction Surgery**,

Dept. of Pathology#, Dept. of Anesthesiology**, Kyungpook National University

(Received September 25, 2001. Accepted April 20, 2002)

요약 : 본 연구에서는 관상의 Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 담체에 대한 인간의 초자연골과 탄성연골의 형성정도를 살펴보았다. 담체는 PLGA의 분자량에 따라서는 110,000 g/mol과 220,000 g/mol을 비교하였고 내경 유지를 위하여 내경측에는 220,000 g/mol, 외경측에는 110,000 g/mol의 복합체를 만들거나, 비분해성 고분자 폴리에틸렌 튜브와 110,000 g/mol PLGA의 담체와의 결합도 시도하였다. PLGA 담체들은 주사전자현미경으로 단면 구조를 관찰하였다. 각각의 담체에 20세 미만의 환자들의 비중격에서 채취된 초자연골과 귀에서 채취된 탄성연골에서 분리한 연골세포를 심었다. 분리된 연골세포는 두 번의 계대배양을 거쳐 각각의 PLGA 담체에 심었고 일주일동안 생체 외 환경에서 배양하였다. 각각의 세포와 담체의 복합체를 nude mouse의 배부 좌,우로 피하조직에 이식하고 8주 뒤 H&E 염색으로 조직 검사를 시행하였다. 110,000 g/mol의 PLGA담체의 연골조직은 잘 형성되어 있었지만 그 내경은 유지되지 못하였다. 반면 220,000 g/mol의 PLGA담체의 연골조직은 내경은 유지하였으나 연골조직이 부분적으로 형성되어 있고 성숙한 연골조직의 양이 많지 않았다. 초자연골 세포에 비교하여 탄성연골 세포가 같은 조건하에서 연골조직을 더 많이 형성한 것으로 나타났다. 관상의 유지를 위하여 220,000 g/mol PLGA 담체를 내경측에 110,000 g/mol PLGA 담체를 외경측으로 한 담체에서는 연골조직 형성이 잘 되지 않았으나 내경측에 폴리에틸렌 튜브를 끼운 110,000 g/mol PLGA 담체에서는 조직 형성과 내경유지가 잘 되었고 원래의 담체와 거의 유사한 형태로 유지되었다. 분화된 연골세포도 조직 소견으로 확인할 수 있었다. 이 1mm 내경의 관상 연골조직은 인공 기관지나 식도 등을 위한 동물 실험과 인공 합성 튜브의 대체 등 앞으로 많은 응용분야가 기대된다.

Abstract : The purpose of this study was to evaluate the effect of different types of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffolds on the formation of human auricular and septal cartilages. All of the scaffolds were formed in a tubular shape for potential application for artificial trachea or esophagus with either 110,000 g/mol PLGA, 220,000 g/mol PLGA, or a combination of both. In order to maintain the tubular shape in vivo, two methods were used. One method was inserting polyethylene tube at the center of scaffolds made of 110,000 g/mol PLGA. The other method involved combination of the two different molecular weight PLGA's. The inner surface of tubular shaped scaffold made with 110,000 g/mol PLGA was coated with 220,000 g/mol PLGA to give more mechanical rigidity. Elastic cartilage was taken from the ear of a patient aged under 20 years old and hyaline cartilage was taken from the nasal septum.

The chondrocytes were then isolated. After second passage, the chondrocytes were seeded on the PLGA scaffolds followed by *in vitro* culture for one week. The cells-PLGA scaffold complex were implanted subcutaneously on the back of nude mice for 8 weeks. The tissue engineered cartilages were separated from nude mice and examined histologically after staining with the

서 론

* 이 연구는 2000년도 경북대학교 의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

통신저자 : 백운이, (700-721) 대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지

경북대학교 의과대학 마취과학교실

Tel. (053)420-5863, Fax. (053)426-2760

E-mail. webaik@knu.ac.kr

연골은 혈관이 없고 치밀 결합 조직으로 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM)을 풍부하게 함유하는데, 기질 안에 분포하는 섬유유 종류에 따라 초자연골, 탄성연골, 섬유연골의 세 종류로 나누며 이들 중 초자연골이 가장 광범위하게 분포

Hematoxylin Eosin. The morphology of the scaffolds were examined by scanning electron microscopy. The pores were well formed and uniformly distributed in the various PLGA scaffolds. After 8 weeks *in vivo* culture, cartilage was well formed with 110,000 g/mol PLGA, however lumen had collapsed. In contrast, a minimal amount of neocartilage was formed with 220,000 g/mol PLGA, while the architecture of scaffold and lumen were well preserved. Elastic cartilage formed more neocartilage than hyaline. Hyaline and elastic neocartilage were well formed on 110,000 g/mol PLGA with the polyethylene tube, exhibiting mature chondrocytes and preservation of the tubular shape. It was found that 110,000 g/mol PLGA was more appropriate for cartilage formation but higher molecular weight polymer was necessary to maintain the three dimensional shape of the scaffold.

Key words : Poly(lactic-co-glycolic acid). Two different molecular weight, Elastic cartilage, Hyaline cartilage, Polyethylene tube

되어 있다. 초자연골은 세포에 비해 세포의 기질이 풍부하여 구조적 기능을 수행하며 늑골, 기관지, 관절등에 존재한다. 탄성연골은 탄성을 부여하는 탄성 섬유가 세포의 기질에 다량 분포해 있으며 귀와 외이도 등에서 존재하여 형태적 기능을 수행한다. 섬유연골은 추간판이나 관절반월의 일부에서 볼 수 있다.

이러한 연골은 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 연골세포와 세포의 기질인 2형 교원질섬유, (type II collagen), proteoglycan, glycosaminoglycan (GAG) 로만 이루어진 비교적 단순한 구조적 지지체이다. 또한 혈관이나 신경조직이 없어 한번 손상되면 재생이 힘들어 조직공학을 이용한 연골의 형성에 관한 연구가 많이 이루어져왔다.[4]

조직공학을 이용한 연골형성에 있어 중요한 것이 다공성의 생분해성 담체를 만드는 것이다. 우선 생체적합성과 세포와의 유착율이 고려되어야 하고 세포가 적절히 생존할 수 있는 기공이 균일하게 분포되어 있어야 한다. 또한 담체는 연골세포가 연골조직을 만드는 속도에 맞추어 분해되면서도 적절한 기계적 강도를 유지하여 원하는 형태의 연골조직을 형성할 수 있도록 지지체의 역할을 하는 것이 요구된다. 생분해성 고분자인 PLGA는 적절한 기계적 강도와 생체적합성을 가지고 있고 생분해 속도를 분자량이나 중합도에 따라 조절하여 유용하게 이용할 수 있는 조직공학 담체용 고분자이다.[6,7]

따라서 본 연구에서는 여러 가지 용도를 위해서 내경 1 mm 정도의 관상의 구조물 형성을 시도하였고, 이 구조를 이용하여 인간의 탄성 연골과 초자연골 세포의 연골 형성에 대한 특성을 상호 비교하였다. 또한 가장 적절한 담체의 조건을 찾기 위해서 PLGA의 분자량에 따른 연골형성 차이와 1 mm의 내경 유지를 위하여 비분해성 고분자를 삽입하거나 내경측에는 분자량이 높은 PLGA 고분자, 외경 측에는 분자량이 낮은 PLGA 고분자로 복합체를 만드는 등 여러 가지 적절한 관상 구조물 형성을 시도하였고, 그 구조물에 의한 연골 형성 차이에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

조직 채취 및 분리

20세 이하의 환자를 대상으로 귀에서 탄성 연골을 비중격에서 초자연골을 취하여 Klausburn 방법을 통해 연골세포를 분리하였다. 채취한 조직을 100 µg/ml streptomycin (Sigma, USA), 100 unit/ml penicillin G (Sigma, USA), 20 µg/ml

mycostatin (Sigma, USA)이 포함된 완충 식염수 (PBS, pH 7.4)로 수 차례 씻고, 섬유아 세포의 오염을 방지하기 위해 연골막을 완전하게 제거하였다. 조직을 1-2 mm³ 크기로 썰어 37°C에서 주기적으로 흔들어주면서 0.2% type II collagenase (Gibco BRL, USA)를 이용하여 완전히 용해시켰다. 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 침전시키고, 100 µg/ml streptomycin, 100 unit/ml penicillin G, 4.5 g/l glucose가 포함된 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, USA)에 fetal calf serum(HyClone, USA)이 10%가 되도록 혼합된 배양액에 세포를 부유시킨 후 150µm체에 걸러 잔여물을 제거하고, 100 mm 배양접시에 담아 37°C, 5% CO₂ 환경에서 정적 배양하였다. 배양액은 2-3일마다 갈아주었으며, 0.25% Trypsin (Gibco BRL, USA)과 0.02% EDTA(Sigma, USA) 이용하여 2번에 걸쳐 계대 배양하였다. 담체에 심어주기 전에 Alcian blue 염색을 시행하여 배양된 세포들이 연골 세포임을 확인하였다.

고분자 담체 형성

10% PLGA(molecular weight : 110,000 g/mol, 220,000 g/mol ; Beoringer, Germany)를 dichloromethane에 용해시킨 후 75-105µm 입자크기의 ammonium bicarbonate를 5%가 되도록 섞어주었다. 혼합 후 겔상태가 되면 두께 1 mm, 내경 1mm, 길이 10 mm되는 원통형의 담체를 제작하였다. 그 중 일부는 내경의 지지체의 역할을 위해 직경 1 mm의 polyethylene tube를 삽입하였으며 또 다른 일부는 내경에서 500 µm는 220,000 g/mol의 PLGA로 그 바깥쪽은 110,000 g/mol의 PLGA로 복합체를 만들었다. 담체에 남아있는 dichloromethane을 후드 안에서 건조시켜 완전히 제거하였으며, 70°C의 증류수에서 ammonium bicarbonate가 기포가 되어 빠져 나오게 하였다. 더 이상 기포가 빠져 나오지 않게 되면 담체를 상온의 증류수에 씻고 건조 후, 남은 ammonium bicarbonate를 완전히 제거하기 위해서 10분간 초음파처리 (sonication)하였다. 담체의 표면 및 내부 구조는 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였고 기공의 크기와 기공도는 poroximeter (PORESIZER 9320 v2.05)로 측정하였다. 사용하기 전에 감마 방사선으로 소독하였다.

연골세포-담체 복합체 배양 및 이식

1×10⁸ cells/ml 의 농도로 세포 부유액을 만들어 각 담체당 50 µl씩 넣어 골고루 심어주었다. 37°C, 5% CO₂ 환경에서 4시간 동안 세포를 담체에 유착시킨 후 세포가 떨어지지 않도록

록 주의해서 배양액을 넣어 주었으며, 비교군은 세포를 이식하지 않은 담체를 이용하였다. 분자량 110,000 g/mol과 220,000 g/mol PLGA담체에 초자 또는 탄성 연골 세포를 심은 복합체들을 nude mouse (Balb/c-nu, male, 5 weeks, Japan SLC) 배부의 좌, 우측에 1cm길이의 횡절개를 피하까지 가한 뒤 세포담체 복합체가 긴장없이 들어갈 수 있도록 피하층과 근막층 사이로 광범위하게 박리하여 복합체를 넣고 피부를 봉합하였다.

조직 검사

이식후 8주째 육안으로 원통형의 구조가 잘 유지되었는지 관찰한 후, 연골의 생성된 정도와 그 성상을 확인하기 위해 조직학적 검사를 시행하였다. 연골-세포 복합체를 싸고 있는 피막(fibro capsule)을 포함한 조직을 en bloc으로 취하여, 완충 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매시킨 후 연속 절단하여 hematoxylin and eosin 염색을 시행하였다.

결 과

가. 분자량에 따른 담체의 구조

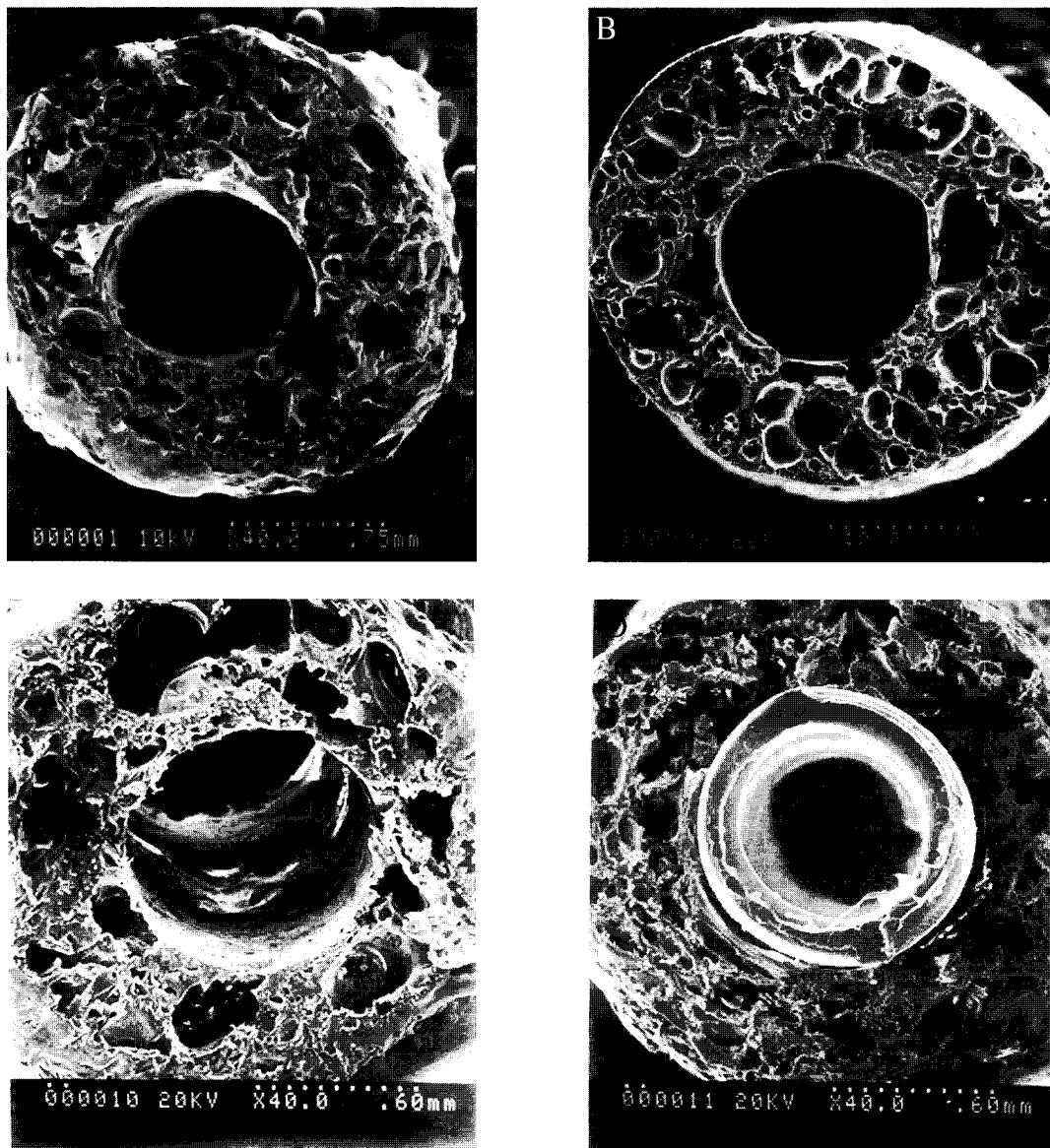


그림 1. 횡단면으로 자른 담체의 주사전자현미경 관찰

A. 110,000 g/mol PLGA, B. 220,000 g/mol PLGA, C. 내경측 220,000 g/mol PLGA, 외경측 110,000 g/mol PLGA, D. polyethylene tube를 삽입한 110,000 g/mol PLGA. 배율은 40배로 하였다

Fig. 1. The cross-sectional view of scaffolds examined by scanning electron microscope

A. 110,000 g/mol PLGA, B. 220,000 g/mol PLGA, C. side inner 220,000 g/mol PLGA, outer side 110,000 g/mol, D. 110,000 g/mol inserted polyethylene tube. The original magnification was $\times 40$

주사전자현미경으로 관찰한 결과 분자량에 관계없이 전반적으로 기공이 잘 형성되어 있었다. 110,000 g/mol PLGA, 220,000 g/mol PLGA의 복합체에서는 그 경계면에서 큰 기공들이 분포되어 있었으며 polyethylene tube를 삽입한 110,000 g/mol PLGA는 기공이 없고 분해되지 않는 tube가 내경에 존재하고 있다는 것을 제외하고는 110,000 g/mol PLGA와 같은 단면구조를 가졌다. 110,000 g/mol PLGA의 평균 기공의 크기는 250 μ m, 기공도는 30%였으며 220,000 g/mol PLGA의 경우는 평균 기공의 크기는 200 μ m, 기공도는 10%였다.(Fig. 1)

나. 조직 소견

분자량 110,000 g/mol PLGA에 초자 연골 세포를 심어서 배양한 결과 8개의 복합체 중 6개에서 담체의 전층에 걸쳐서 연골이 형성되었으며, 내강은 모든 레에서 압박되어 소실되어 있었다. 나머지 2개에서는 원래 내강이 있던 부위와 담체의 외측에 부분적으로 연골이 형성되어 있었다. 대부분의 담체는 분해되어 보이지 않았다. 성숙한 연골조직이 부분적으로 내부 중공에 매몰되어 있어 전체적으로 연골조직이 혼재된 상태로 관찰되었다.(Fig. 2A)

분자량 110,000 g/mol PLGA에 탄성 연골을 심어서 배양한

결과 8개의 복합체 전례에서 담체의 전층에 걸쳐서 균일하게 연골이 형성되어 있었으며 내강은 전례에서 압박되어 소실되어 있었다. 대부분의 담체는 분해되어 보이지 않았다. 생성된 연골의 분화도는 초자연골과 거의 유사하였다.(Fig. 2B)

분자량 220,000 g/mol PLGA 담체에 초자 연골세포와 탄성 연골세포를 심어서 배양한 결과 각각 8레에서 담체의 외측 경계에서만 연골이 약간 형성되었으며, 내강에 연골이 생긴 경우가 2레에서 보였다. 담체는 흡수되지 않고 남아 있었으며, 일부 흡수된 담체 내로 섬유조직과, 섬유아 세포의 침윤을 관찰할 수 있었으며, 내강은 잘 유지되어서 그 크기는 0.9mm 정도로 처음 제작한 담체와 거의 비슷하게 유지되었다. 세포를 심지 않고 담체만 이식한 경우에는 주변부에 연골이 형성되지 않았고 8주후에 구조를 잘 유지하고 있었다.(Fig. 2C, 2D)

분자량 110,000 g/mol PLGA와 220,000 g/mol PLGA의 복합체에서는 초자연골과 탄성 연골을 심어서 배양한 결과 각각 8 레에서 분자량 110,000 g/mol PLGA로 이루어진 담체의 외측경계에서 약간의 분화된 연골 형성이 보였으나 220,000 g/mol PLGA로 이루어진 내측 부분에서는 연골 형성이 잘 되지 않았으며 분해되지 않은 담체도 내측 부분에 남아 있는 것이 보였다. 특히 탄성 연골에서는 섬유아세포가 상당히 많이 관찰되었

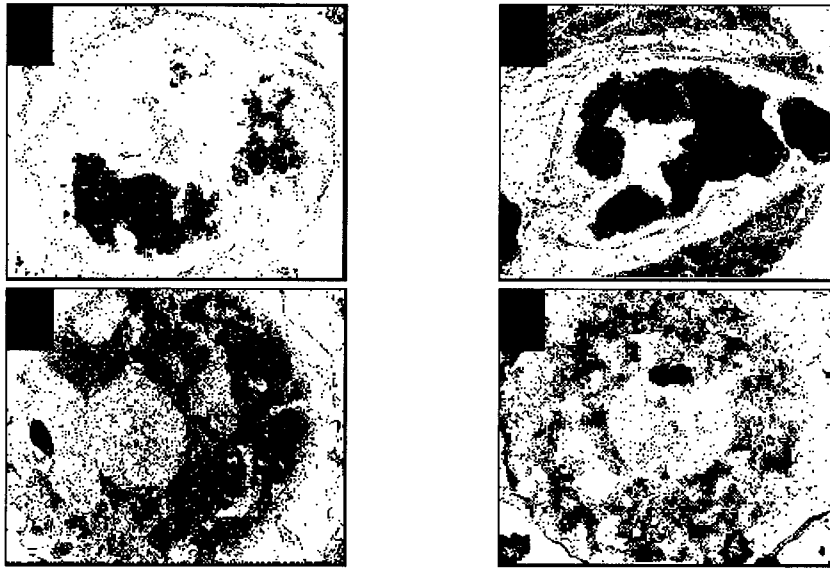


그림 2. nude 마우스에 이식된 지 8 주후 형성된 연골의 H&E 염색

A. 110,000 g/mol PLGA 와 초자연골세포(hyaline chondrocytes) B. 110,000 g/mol PLGA와 탄성연골세포(elastic chondrocytes)
연골조직은 잘 형성되었으나 내강이 유지되지 못하였다. 분화된 연골세포와 미분화된 연골 세포가 혼재하여 있었다

C. 220,000 g/mol PLGA 와 초자연골세포 D. 220,000 g/mol PLGA와 탄성연골세포
연골조직은 내강과 그 주위에 약간 형성되었으나 내강은 유지되었다. 배율은 $\times 40$ 으로 하였다

Fig. 2. The H & E staining of tissue engineered cartilage after 8 weeks implantation in nude mouse

A. 110,000 g/mol PLGA and hyaline chondrocytes B. 110,000 g/mol PLGA and elastic chondrocytes

The neocartilage was well formed while lumen was collapsed from scaffolds of 110,000 g/mol. The mature cartilage and immature cartilage which was embedded in a basophilic matrix portion were mixed in a neocartilage

C. 220,000 g/mol PLGA and hyaline chondrocytes, D. 220,000 g/mol PLGA and elastic chondrocytes

The neocartilage was formed to a minimum extent at periphery and luminal area while the shape of lumen was well maintained. The original magnification was $\times 40$

으며 초자연골과 탄성 연골 모두 내강은 압박되어 소실되어 있었다.(Fig. 3A, 3B)

분자량 110,000g/mol PLGA에 비분해성 고분자인 polyethylene tube를 삽입한 담체에서는, 초자연골은 내강이 완벽하게 유지되었고 성숙된 연골세포가 관찰되었다. Polyethylene tube로 인한 염증반응도 거의 관찰되지 않았다. 탄성연골은 초자연골보다도 더 완벽한 관상의 연골조직이 형성되어 있었고, 연골조직 주위에 혈관과 말초 신경다발이 관찰되었다. 비분해성 튜브로 인한 염증 반응이나 섬유아 세포도 거의 관찰되지 않았으며 내경과 외경이 모두 원래의 담체형태와 유사한 관상의 연골조직을 형성하였다. (Fig 3C, 3D)

고 찰

조직 공학적 기법이 발전함에 따라 초기에는 소나 가토의 초자연골, 이개 연골을 이용하여 연골 형성을 시도하였으나 현재는 실제 임상에서의 사용을 목적으로 인간의 자가 연골 세

포를 이용하는 방향으로 발전되고 있다. 인간의 초자 연골세포의 연골 형성에 대한 특징은 많은 보고가 되고 있으나, 탄성 연골 세포에 대해서는 그다지 많지 않은 실정이다.[3] 최근까지 단층 배양에서는 탄성 연골이 그 특성을 잃어버리고, 초자연골로 변화한다고 알려져 있었지만 이미 Rodriguez 등은 인간의 탄성 연골 세포를 심은 경우에 탄성 연골이 형성되었다고 보고했으며 본 실험실의 선행 연구에서 탄성연골 세포를 채취하여 PLGA에 심어 형성된 연골조직을 탄성 섬유(elastin)에만 특이하게 염색되는 Verhoff 염색을 시행한 결과 세포 주위로 탄성 섬유망을 관찰하여 확인한 바 있다.[1, 11] 따라서 본 연구에서는 인간의 두 가지 종류의 연골 세포의 연골 형성에 대한 특성을 nude mouse를 이용한 평가결과, 자연골보다 탄성연골이 오히려 조직형성능력이 뛰어난 것을 알 수 있었는데 이는 물리적 자극을 많이 받는 위치에 존재하는 초자연골보다 오히려 물리적 자극이 덜 미치는 곳에 위치하는 탄성 연골세포가 쥐의 배부와 같은 물리적 자극이 거의 없는 환경에서 더

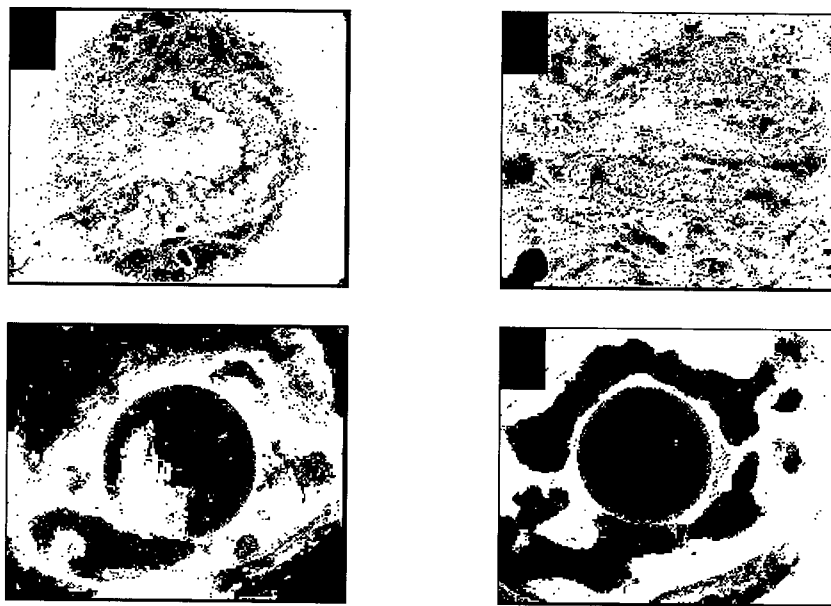


그림 3. nude 마우스에 이식된 지 8 주후 형성된 연골의 H&E 염색.

E. 내경측에는 220,000 g/mol PLGA, 외경측에는 110,000 g/mol PLGA의 담체와 초자연골세포

F. 내경측에는 220,000 g/mol PLGA, 외경측에는 110,000 g/mol PLGA의 담체와 탄성연골세포 관상의 형태를 찾아볼 수 없었고 분화된 연골 세포의 모습이 약간 보였다.

G. Polyethylene tube를 삽입한 110,000 g/mol PLGA의 담체와 초자연골세포

H. Polyethylene tube를 삽입한 110,000 g/mol PLGA의 담체와 탄성연골세포

성숙한 연골 조직이 보였고 내강이 잘 유지되었다. 관상모양과 가장 흡사한 연골 형성을 보였다. 배율은 ×40으로 하였다.

Fig. 3. The H & E staining of tissue engineered cartilage after 8 weeks implantation in nude mouse.

E. Inner side 220,000 g/mol PLGA, outer side 110,000 g/mol PLGA and hyaline chondrocytes

F. Inner side 220,000 g/mol PLGA, outer side 110,000 g/mol PLGA and elastic chondrocytes

The neocartilage was formed to a minimum extent at periphery and luminal area and the shape of lumen was not maintained.

G. 110,000 g/mol PLGA inserted with polyethylene tube and hyaline chondrocytes,

H. 110,000 g/mol PLGA inserted with polyethylene tube and elastic chondrocytes,

The neocartilage was well formed and lumen was not collapsed from scaffolds of 110,000 g/mol. The original magnification was ×40.

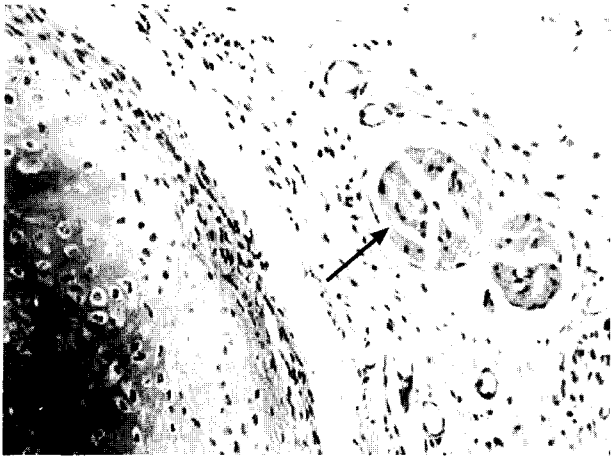


그림 4. Polyethylene tube를 삽입한 110,000 g/mol PLGA 담체의 탄성연골 조직. 배율은 200배로 하였다
연골조직 주변부에 말초 신경 다발이 형성됨을 보여준다
Fig. 4. Tissue engineered elastic cartilage from 110,000 g/mol PLGA scaffold inserted with polyethylene tube. The original magnification was $\times 200$
The formation of peripheral nerves was observed in this figure

조직형성능력이 뛰어난 것으로 사료된다.[10,8]

조직 재생용 고분자 재료는 고분자 표면의 세포 유착과 더불어 세포의 원활한 성장에 필요한 영양원의 공급과 생분해에 따른 이들 부산물들의 제거 등을 위해 적절한 다공성의 구조를 가져야 한다. 현재까지 조직 재생을 위해 사용된 담체로서는 천연 고분자로는 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 하이아론산 등이 있고 합성 고분자로는 poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)와 그 유사 공중합체 등과 poly(ϵ -caprolactone), polyanhydrides, polyorthoesters 등이 있다. [9] 이들 중 PLGA족 고분자는 지방족 폴리에스테르로서 lactic acid와 glycolic acid가 에스테르 결합으로 서로 연결되어 있고, 체내에서 lactic acid와 glycolic acid로 분해되어 생체내의 대사산물로 전환되어 결국 이산화탄소와 물로서 체외 배설되는 완전 생분해성이고 우수한 생체적합성을 지니고 있다. 따라서 체내 흡수성 수술용 봉합사로서 오래전부터 사용되어 왔고 근래에는 지속성 약물 전달용 담체로서 널리 사용되고 있으며 미국 식품보건 안전원 (FDA)의 승인 하에 장기간 걸쳐 의료용 재료로 사용된 체내 이식용 고분자로 알려져 있다.[5] 따라서 본 연구에서는 내경 1mm의 작은 관상의 구조물을 만들기 위해 PLGA를 사용하여 조직공학적 연골 형성을 시도하였다. 본 실험에서 사용한 110,000 g/mol PLGA는 충분한 양의 기질 단백질이 형성되어 어느 정도의 강도를 가지기 전에 흡수되어 원통형의 담체 모양을 유지하지 못하였으나, 연골 조직은 담체의 전층에 걸쳐서 골고루 형성되었다. 반면 220,000 g/mol PLGA의 경우, 연골은 거의 생성되지 않았으나, 생체내에서 8주간 배양되는 동안 거의 흡수되지 않고 형태를 그대로 유지하였으며 이는 세포를 넣어서 배양한 경우와 담체만

심은 경우에서 거의 차이가 없었다. 생분해 속도에는 이식된 부분에서의 혈액공급량, 고분자의 결정화도 및 이들의 형태, lactic acid와 glycolic acid의 조성비, 가공의 형태 등 여러 가지가 고려되어야 하는데, PLGA족과 같은 합성 고분자들은 단량체의 조성을 변화시켜 생분해 속도를 조절할 수 있다.[2] 220,000 g/mol PLGA는 PLA [poly(lactic acid)]와 PGA [poly(glycolic acid)]의 비율이 85 : 15로서 50 : 50의 비율을 가지는 110,000 g/mol PLGA보다는 PLA의 비율이 높다. PLA는 PGA보다 결정화도가 높고 생분해 속도가 더 느리며 더 높은 기계적 강도를 가지므로 높은 비율의 PLA로 중합된 220,000 g/mol PLGA가 기계적 강도는 높아 8주 동안 그 형태를 유지 하긴 하였으나 분해도가 느려 세포의 성장속도와 조직 형성에 따른 적절한 분해와 그로 인한 세포의 영양원 공급과 대사 산물의 교환등이 원활히 이루어지지 못한 것으로 사료된다. 그 결과, 연골 조직 형성이 잘되는 110,000 g/mol PLGA의 담체에 내경을 유지하는 방법이 적절할 것으로 생각되어 내경측에는 220,000 g/mol PLGA나 비분해성 고분자인 polyethylene tube를 삽입하는 방법으로 연골 형성을 유도하였다. 220,000 g/mol PLGA를 내경측에 삽입한 경우 초자연골과 탄성연골 각각 조직 형성이 110,000 g/mol PLGA측의 일부에서만 이루어졌고 약간의 분화된 세포도 보였으나 전체적으로는 관상의 모양과 내경이 유지되지 못하였다. 110,000 g/mol PLGA와 220,000 g/mol PLGA사이의 경계면에서 큰 기공들이 형성되어 기계적 강도를 유지하지 못하였고 세포가 균일하게 관상 내부에 심어지지 못하였기 때문이라고 사료된다. 그러나 polyethylene tube를 삽입한 110,000 g/mol PLGA의 담체에서는 초자연골과 탄성연골 모두 내경이 유지되고 조직형성이 잘 되었다. 특히 탄성연골은 원래 담체의 모양과 거의 흡사한 관상의 연골 조직을 형성하였고 성숙된 연골세포의 모습이 보였다. 염증반응이나 이물질 반응은 거의 관찰되지 않았고 모세혈관과 신경세포가 자라 들어옴을 조직 검사로 알 수 있었다.

이러한 결과들을 볼 때, 2-3 번의 단층계대 배양에 있어서 20세 이하 인간의 탄성 연골세포는 적절한 물리적 환경을 받지 않을 때에는 초자연골 세포에 비해 연골 형성이 좋은 것으로 사료된다. 또한 조직공학적 담체를 만들때 polyethylene tube를 삽입하여 비분해성 고분자와 분해성 고분자를 결합시켜 원하는 형태의 조직 형성을 유도하여 원래의 담체와 거의 유사한 형태의 연골이 형성되었고 그 연골에는 염증반응이나 이물질 반응 등이 없었으며 그 연골의 분화된 모습과 혈관과 신경세포가 자라 들어옴을 보았을 때 상당히 고무적인 결과라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 연골의 대표적인 종류인 탄성연골과 초자연골의 PLGA 담체에 따른 연골 형성 능력을 비교하였다. *In vivo*에서 8주간 배양한 후 시행한 조직 검사에서 탄성 연골 세포에서 연골 형성이 더 좋은 것으로 나타났다. 110,000

g/mol PLGA에서는 연골 형성은 잘 되었으나 내강이 유지되지 않았고 220,000 g/mol PLGA에서는 내강은 잘 유지되었으나 연골 조직형성이 적었다. 220,000 g/mol PLGA를 삽입한 경우 기공 형성이 불균일하여 조직 형성이 잘 되지 않았고 내강 유지도 기대에 미치지 못하였으나 polyethylene tube를 삽입한 경우 내강 유지도 잘 되었을 뿐만 아니라 원래 담체의 모양과 거의 흡사한 관상형의 연골조직을 얻을 수 있었다. 이러한 내경 1mm의 관상 모양의 연골 형성은 앞으로 인공 기관지나 식도등의 재건에 인공 합성 튜브를 이용한 대체가능성을 시사해 준다.

참 고 문 헌

1. A. Rodriguez, Y.L. Cao, C. Ibarra, S. Pap, M. Vacanti, R.D. Eavery, and C.A. Vacanti "Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage." *Plast Reconstr Surg* Vol. 333, pp. 1111-1119, 1999
2. C.M. Agrawal, P.E. Gabriele, G. Niederauer, and K.A. Athanasiou "Fabrication and characterization of PLA-PGA orthopedic implants." *Tissue engineering* Vol. 1, pp. 241-252, 1995
3. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber C, Mooney D, Langer R "Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates." *J biomech Eng* No. 113, pp. 143, 1991
4. L.C, Camarenal, R.B. Gomez, A.T. Guerrero, M. Solis, and J. Guerrerrosantos "Cartilaginous behavior in nasal surgery: a comparative observational study" *Ann Plast Surg*, No. 40, pp. 34-38, 1998
5. R.P. Ranza, R. Langer, and W.L. Chick, *Principles of Tissue Engineering*, Academic press, pp. 225, 1997
6. S.L. Ishaug-Riley, G.M. Crane, A. Gurlek, M.J. Miller, A.W. Yasko, M. Yaszemski, and A.G. Mikos "Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using PLGA foams implanted into the rat mesentry" *J Biomed Mater Res* Vol. 36, pp 1-18, 1997a
7. S.L. Ishaug, G.M. Crane, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, and A.G. Mikos "Bone formation by 3-D stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds." *J Biomed Mater Res* Vol. 36, pp. 17-28, 1997b
8. S. Roberts, B. Weightman, J.P.G. Urban, and Chappell D "Mechanical and biochemical properties of human articular specimens" *J Bone Joint Surg* No. 68, pp. 278, 1986
9. T.G. Park "Degradation of poly(lactide-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition" *Biomaterials*, Vol. 16, pp. 1123, 1995
10. Y.J. Kim, RLY Sah, A.J. Grodzinsky, AHK. Plaas, and J.D. Sandy "Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli" *Arch Biochem Biophys* No. 331, pp. 1, 1994
11. D. Shin, E. Han, J. Park, S. Kim, D. Kim, J. Lim, W. Beak, and B.ho "Tissue Engineered cartilage formation using human hyaline chondrocytes and elastic chondrocytes." *J Kor Soc Plast Reconstr Surg* Vol. 28, No. 3. pp. 233-240, 2001