Journal of Radiation Industry 6 (2) : 165~169 (2012)

Poly-gamma-glutamic acid의 방사선 조사에 의한 인대 조직 손상 보호 효과

김정수 · 성낙윤 · 박종흠 · 김재경 · 송범석 · 이주운
이광원[1] · 권중기[2] · 김태운[3] · 김재훈*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소, [1]을지의과대학교 정형외과
[2]전북대학교 수의과대학, [3]리온 테크놀로지

Prevention Effect of Poly-gamma-glutamic Acid on Porcine Ligament Tissue Damage Induced by Gamma Irradiation

Jeongsoo Kim, Nak-Yun Sung, Jong-Heum Park, Jaekyung Kim, Beom-Seok Song, Ju-Woon Lee, Kwang-Won Lee[1], Jung-Kee Kwon[2], Tae-Woon Kim[3] and Jae-Hun Kim*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]*Department of Orthopaedic Surgery, Eulji University Hospital, Daejeon 302-799, Korea*
[2]*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*
[3]*Rion Technology, R&D Center, Jeonbuk Technopark, Wanju 565-902, Korea*

Abstract - This study was conducted to determine the prevention effect of poly-gamma-glutamic acid (γ-PGA) on tissue damage induced by gamma irradiation for development of xenograft. Porcine tendons were treated at various doses of γ-PGA (0.1, 0.5, 1 and 5%) and then gamma-irradiated (30 kGy). Prevention effects on tissue damage were measured as the result of tensile strength, hydroxyproline contents and viscosity of γ-PGA. Tensile strength was remarkably decrease in gamma-irradiated porcine ligament, but increased by γ-PGA treated one. Among the γ-PGA treatment doses, 1% treated group showed the highest values of tensile strength compared to non-treated group. Hydroxyproline contents was significantly increased by gamma irradiation, but decreased by the γ-PGA treatment. Particularly, 1 and 5% γ-PGA treated group were exhibited lower values of hydroxyproline contents than other group. In the result of viscosity, gamma-irradiated γ-PGA (1%) was remarkably increased. Base on the results, it demonstrated that gamma irradiation induces severe alteration of mechanical property and collagen contents on porcine ligament, but γ-PGA can effectively prevent these tissue damage.

Key words : Gamma irradiation, Xenografts, Porcine ligament, Poly-gamma-glutamic acid (γ-PGA)

* Corresponding author: Jae-Hun Kim, Tel. +82-63-570-3205,
Fax. +82-63-570-3207, E-mail. jaehun@kaeri.re.kr

서 론

이식은 서로 같은 종의 이식체를 교환하는 동종이식과 서로 다른 종의 이식체를 교환하는 이종이식으로 구분되며, 동종이식은 면역거부 반응을 수반하지 않아 이식부위에 이식체가 빠르게 적응 할 수 있는 장점을 가지고 있는(Burchardt 1987; Hubble 2001) 반면 이식 대기자 대비 이식건수는 10%에 불과하여 국내외적으로 급격히 증가하는 이식대기 환자에 비해 절대적으로 부족한 공여 이식체의 수급문제를 발생시킨다(Park *et al.* 2009). 또한 이러한 수급의 불균형은 불법 장기 매매를 비롯한 여러 가지 사회적, 경제적 문제를 야기시킨다. 이러한 장기부족현상을 해결하기 위해 이종장기, 인공장기, 줄기세포 분화, 생체조직공학을 이용한 조직 재생법 등의 연구가 전임상 및 임상단계에서 진행되고 있다(Park *et al.* 2009). 이식수술은 외상, 감염, 선천적 질환, 노화 등으로 인해 손상된 장기, 뼈, 근육의 복구와 치료에 널리 이용되는 방법으로써, 현재 정형외과학, 신경외과학, 치의학 등의 영역에서 주로 적용되며(Song and Lee 2007), 성공률을 높이고 부작용을 줄이기 위한 많은 연구들이 진행되고 있는 추세이다(Finkemeier 2002; Giannoudis *et al.* 2005).

이중 바이오 이종장기이식은 부족한 장기를 무한정 공급할 수 있을 뿐 아니라 유전공학적 기법을 이용한 환자 맞춤형 형질전환장기의 생산이 가능하다는 점에서 타 분야에 비해 현실적으로 장기 부족문제를 가장 빠르게 해결할 수 있는 방법이라 사료된다. 이종 조직을 생산 할 수 있는 계통 안에서 영장류는 면역학적 특성을 비롯한 여러 가지 성질이 사람과 유사하여 이종이식에 있어서 가장 이상적인 동물로 판단되지만, 윤리적인 측면이나 비용적 측면에서 다양한 문제점을 수반한다(Barrack 2005). 반면, 돼지는 사육을 통해서 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있고, 또 식용으로도 사용되기 때문에 윤리적으로 문제가 적을뿐더러, 이미 신장, 췌장 섬 세포, 심장 혹은 판막조직에 대한 이종장기 적합성에 관한 연구가 여러 의학 분야에서 광범위하게 진행되고 있으므로 이종 장기 이식체로서 가장 적합할 것으로 사료된다(Tseng *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005).

국제 원자력기구(IAEA)에서는 이식체를 통한 감염을 막기 위하여 25 kGy 이상의 선량으로 방사선을 조사하는 것을 허가하고 있다(IAEA 1973). 이식체에 방사선 조사를 할 경우 이식체 자체의 물리적 특성이 감소되는 현상이 일어나고 있으며, 이렇게 변화된 물리적 특성의 감소를 증진시키기 위해 가교제를 이용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 보다 안전한 조직이식재 개발을 위하여 돼지로부터 적출한 돼지인대의 감마선 조사에 따른 인대의 인장강도 감소를 측정하였고, 천연가교제인 γ-PGA를 이용하여 감소한 인장강도를 증진시키기 위한 최적 농도를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비 및 처리

본 연구에서 사용한 돼지 인대는 리온테크놀로지(Jeonju, Republic of Korea)로부터 구입하였다. 구입한 인대는 PBS (Phosphate buffered saline pH 7.4)로 세척한 후 PBS에 적신 거즈에 싸서 실험 전까지 −70˚C에 보관하였다.

2. De-cellularization 과정과 α-Gal (Galactose-α-(1,3)-galactose)의 제거

De-cellularization 과정은 두 (De-epidermization, De-cellularization)부분으로 나누어 진행하였다. De-epidermization은 1 M NaCl에 0.5% Triton X-100를 첨가하여 24시간 반응 시킨 후 PBS로 30분씩 세 번 세척하였다. De-cellularization 과정에서는 10 mM HEPEs buffer (pH 8.0)에 Sodium deoxycholate를 2% 첨가한 용액을 제조하여 24시간 동안 정치시킨 후 PBS로 30분씩 세 번 세척하였다(Xu *et al.* 2007). De-cellularization 후 돼지의 Galactose-α-(1,3)-galactose (α-gal)를 제거하기 위하여 10 unit ml^{-1}의 a-galactosidase를 2시간 동안 처리한 후 PBS로 10분씩 3번 세척하였다(Kevin *et al.* 2007).

3. 감마선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소(Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, Co^{60} 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, ON, Canada)을 이용하였다. γ-PGA를 증류수에 녹인 후 농도 별(0.1, 0.5, 1, 5 %)로 인대를 침지하여, −70˚C에서 냉동 하였고, 드라이아이스를 이용하여 냉동된 상태의 샘플을 30 kGy 선량으로 감마선 조사를 실시하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter (5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화 한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

4. 감마선 조사된 돼지 인대의 인장강도 측정

감마선 조사된 돼지 인대의 인장 강도를 측정하기 위하여 길이 10 cm 직경 8 mm의 돼지 인대를 30 kGy의 조사선량으로 조사한 후, 인장력 측정기 Instron® (Instron, Model No.5569, Mass, USA)를 사용하여 돼지 인대의 인장강도를 측정하였으며, 이때 비조사군을 대조구로 사용하여, 방사선 조사에 따른 인장강도의 변화를 비교하였다. 인장강도 측정을 위한 인장력 측정기의 세부조건으로 30 kN 용량의 load cell을 사용하였고, 인장 속도는 분당 50 mm를 유지하면서 X-Y 기록계에 표시하여 최대 인장력을 측정하였다.

5. Hydroxyproline 측정

감마선 조사된 돼지 인대를 동결건조 한 후 건조 중량이 15 mg이 되도록 조직을 잘라 1 mg ml^{-1}의 collagenase 용액을 첨가 하고 37°C에서 60시간 반응시켰다. 반응시킨 용액은 13,000 rpm 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 모아진 상층액에서 Porcine hydroxyproline을 ELISA kit (USCN LIFE, Wuhan EIAab Science Co., Ltd. China)를 사용하여 측정하였다.

6. γ-PGA의 조사선량에 따른 점도 측정

γ-PGA를 농도 별 (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1%)로 준비하여 5, 10, 15, 20, 25, 30 kGy로 감마선으로 조사 하고 점도 측정을 위하여 실온에서 준비된 γ-PGA 용액을 viscometer (DV-II+Pro, Brook-field Engineering Laboratories, Middleboro, MA, USA)를 사용하여 spindle no. 6, 7을 장착하고 20 rpm의 속도로 실온에서 점도를 측정하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 3 번 이상 반복 하여 평균값과 오차를 결과로 나타내었고, 이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0)를 이용하여 One Way ANOVA test 방법으로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 논의

1. γ-PGA 처리농도별 돼지 인대의 물리적 강도 비교

최근의 연구에서는 Glucose, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), Glutaraldehyde 등의 단백질 cross-linker들을 사용하여 단백질간의 결합을 강화하는 연구들이 수행되고 있으며 (Cheung and Nimni 1982; Reddy 2003; Powell and Boyce 2006), 본 연구에 앞서서도 물리적 강도를 증가시키기 위해 인공 가교제로 알려진 GA (Glutaraldehyde), EDC와 천연 가교제인 Vitamon C, Glucose와 γ-PGA를 사용하여 물리적 강도의 감소를 보정하는 연구를 시행한 결과 γ-PGA 처리에 따른 효과가 가장 탁월한 것으로 나타났었다. 그래서 본 연구에서는 γ-PGA 처리 조건을 달리 하여 돼지 인대의 물리적 강도 변화를 비교하여 보았다 (Fig. 1).

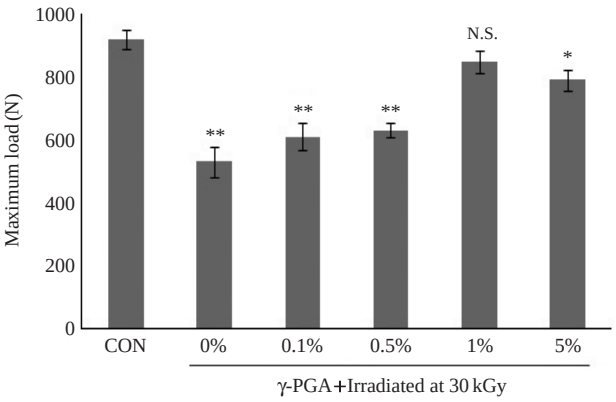

Fig. 1. Tensile strength of gamma irradiated (30 kGy) porcine tendon treated at various concentration (0.1, 0.5, 1, 5%) of PGA (n=5). Values are mean±SEM from 3 independent experiments. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ vs. control.

먼저 무처리군의 돼지 인대의 물리적 특성을 보면 Maximum load (최대 하중)의 값은 918.25±30.32 N을 나타내었다. 30 kGy 감마선 조사만 처리한 경우에는 최대하중이 530.59±50.38 N으로 약 42.2% 감소하였으며, 감마선 조사에 의해 돼지 인대의 물리적 특성이 감소함을 확인하였다. γ-PGA 처리군에서는 각각의 처리농도를 0.1, 0.5, 1, 5%로 하여 30 kGy의 감마선으로 조사를 실시하여 비교 관찰하여 보았다.

그 결과는 최대 하중 값은 각각이 601.97±42.41 N, 629.88±23.02 N, 848.44±35.99 N, 789.68±32.20 N의 측정값을 나타냈으며 이는 0% (30 kGy 조사군)의 530.59±50.38 N보다 증가하는 것으로 나타났다. γ-PGA 처리군에서의 측정값들을 비교해보면 1%의 γ-PGA 처리군이 무처리군과 비슷한 결과를 나타내며, 가장 높게 나타남을 알 수 있었다.

물리적 강도 측정을 실시한 연구에서는 1%의 γ-PGA 처리군에서 측정값이 안정되게 나타났으며 1% 이상인 5%에서는 측정값이 오히려 낮아지는 것을 볼 수 있었

다. 이상의 결과로 볼 때 1% γ-PGA 처리가 감마선 조사에 의해 약해지는 돼지 인대의 물리적 강도를 유지 및 증진시키는 데 효과적이라고 사료되었으며, 물리적 강도의 증진에 따른 인대를 구성하는 콜라겐의 구조의 변화를 알아보기 위해 hydroxyproline 측정을 실시하여 보았다.

2. γ-PGA 처리농도별 돼지 인대의 hydroxyproline 측정 및 비교

가교제 첨가 후 콜라겐 분해효소에 대한 저항성을 평가함으로써 인대를 구성하는 콜라겐의 구조적 안정성을 확인하였다. 불용성 콜라겐은 콜라겐 분해효소에 의해 분해되면서 가용성 형태의 hydroxyproline이 형성되는데, 이 hydroxyproline의 양은 곧 콜라겐 분해능을 나타낸다. 즉 hydroxyproline의 양이 적을수록 콜라겐의 구조적 안정성이 크다는 것을 의미한다(Madhan *et al.* 2007).

Fig. 2에서와 같이 측정한 결과 30 kGy 감마선 조사에 의해 콜라겐이 분해됨으로써 콜라겐 분해효소에 대한 영향을 더 많이 받았음을 의미하며 이는 곧 콜라겐구조가 감마선 조사에 의해 불안정 하여 hydroxyproline의 생성이 많아짐을 의미함을 알 수 있었다. 그러나 γ-PGA의 처리군에서는 γ-PGA에 의해 콜라겐구조의 변화가 적게 일어나 콜라겐 분해효소에 적게 반응하여 측정값이 낮게 나타남을 알 수 있었다. 또한 γ-PGA의 처리 농도 의존적으로 값이 감소함을 보였다. 1% 이후에는 대조군과의 차이가 거의 없게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 1% γ-PGA의 처리는 감마선 조사에 의해 일어나는 인대 조직의 손상을 보호 해주는 역할을 하는 것으로 생각되며, 물리적 강도 및 구조적 안전성을 위해서도 1% γ-PGA의 처리가 최적의 조건으로 사료되어 진다.

3. 조사선량에 따른 γ-PGA의 점도 측정

γ-PGA를 처리한 돼지 인대 조직의 인장강도를 측정하여 무처리군과 비교해 보았을 때, 무처리군과 비슷한 강도를 갖는 것을 확인할 수 있었고, γ-PGA의 처리와 함께 감마선 조사 후 인장강도를 측정해 보았을 때, γ-PGA의 무처리군은 비조사군과 비교했을 때 강도가 훨씬 낮아졌지만, γ-PGA 처리군은 감마선 조사에도 불구하고 비조사군과 거의 비슷하거나 높은 강도를 나타냄으로써 감마선 조사에 대해 안정적인 것을 보여주었다. 이는 점성이 강한 γ-PGA가 조직을 구성하는 단백질들 사이에 껴들어감으로써 free radicals에 대한 경쟁적인 반응을 통해 조직성분을 보호한 것으로 사료된다. 실제로 물에 녹인 γ-PGA는 낮은 농도의 γ-PGA에서는 낮은 점성을 가지고 있고 감마선 조사에 의해 점성이 없어졌으며 1%에서 선량에 따른 감마선 조사에서도 그 점성

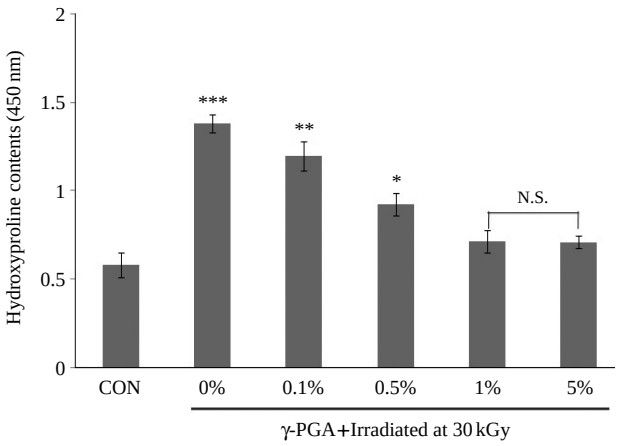

Fig. 2. Hydroxyproline contents of gamma irradiated (30 kGy) porcine tendon treated at various concentration (0.1, 0.5, 1, 5%) of PGA (n=5). Values are mean±SEM from 3 independent experiments. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ vs. control.

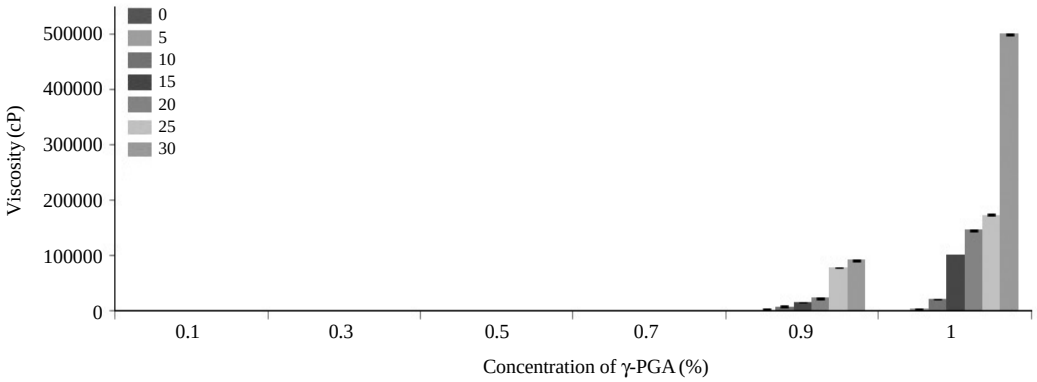

Fig. 3. Viscosity (cP) of gamma-irradiated γ-PGA. γ-PGA was irradiated at the various concentration (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1%) under various irradiation doses (0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 kGy).

이 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3). 이는 앞에서 보인 결과인 낮은 농도의 γ-PGA 처리 후 감마선 조사한 돼지 인대에서는 물리적 강도가 떨어지는 것(Fig. 1)과 동일한 결과를 보이고 있다.

결 론

본 연구에서는 안전한 조직이식재 개발을 위한 목적으로 이종조직인 돼지인대를 감마선 조사하였고, 감마선 조사에 의한 물리적 강도 및 조직학적인 손상을 막기 위하여 천연가교제인 γ-PGA를 첨가하여 감마선 조사에 의한 조직 손상을 γ-PGA가 억제하는지에 관하여 관찰하였다. 조직의 멸균 선량인 30 kGy로 감마선을 조사하였을 때, 돼지 인대의 인장강도는 감소하였으며, hydroxyproline contents 또한 증가하였다. 이는 감마선 조사에 의한 조직학적인 손상을 나타내며, 여기에 천연가교제인 γ-PGA를 농도별로 첨가하였을 때 돼지 인대의 인장강도가 증가하였으며, hydroxyproline contents 또한 감소하였다. γ-PGA 농도별 효과를 확인한 결과 1% γ-PGA처리구에서 그 효과가 가장 두드러지게 나타남을 확인하였다. 이러한 γ-PGA의 감마선 조사에 의한 조직손상의 억제 효과는 감마선 조사에 따른 γ-PGA의 점도 증가와 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. 따라서 감마선 조사에 의한 멸균 공정에서 γ-PGA의 사용은 동종 및 이종이식제의 구조적 안전성과 함께 천연 첨가제로서 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 원자력연구개발사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Barrack RL. 2005. Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins. *J. Arthroplasty* **20**:94-97.

Burchardt H. 1987. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am.* **18**:187-196.

Cheung DT and Nimni ME. 1982. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect Tissue Res.* **10**(2):201-216.

Finkemeier CG. 2002. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone Joint Surg Am.* **84**(A):454-464.

Giannoudis PV, Dinopoulos H and Tsiridis E. 2005. Bone substitutes: an update. *Injury* **36**(S3):S20-27.

Hubble MJW. 2001. Bone transplantation. *Curr. Orthop.* **15**: 199-205.

IAEA. 1973. Manual on radiation sterilization of medical and biological materials. IAEA, Vienna.

Kevin R, Stone MD, Ann W, Walgenbach RNNP, Thomas J, Turek BS, Damon L, Somers MBA, Winston W and Uri G. 2007. Anterior cruciate ligament reconstruction with a porcine xenograft: a serologic, histologic and biomechanical study in primates. *Arthroscopy* **23**(4):411-419.

Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR and Nair BU. 2006. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int. J. Bio. Macromol.* **41**: 16-22.

Park CG, Kim JS, Shin JS, Kim YH and Kim SJ. 2009. Current status and future perspectives of xenotransplantation. *J. Korean Soc. Transplant* **23**:203-213.

Powell HM and Boyce ST. 2006. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials* **27**(34): 5821-5827.

Reddy GK. 2003. Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of the soft tissues but not hard tissues. *J Orthop Res* **21**(4):738-743.

Song HN and Lee JI. 2007. Comparison of efficacy of new bone formation according to implant treatment in xenograft transplanted for experimental bone defects of rabbits. *J. Vet. Clin.* **24**(3):350-357.

Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJMF, Shimizu A, Houser SL, Hisashi Y, Yamada K, Robson Y, Awwad M, Schuurman HJ, Sacha DH and Cooper DKC. 2005. Alpha1,3-Galac tosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* **80**:1493-1500.

Wang DZ, Skinner S, Elliot R, Escobar L, Salto-Tellez M, Garkavenko O, Khoo A, Lee KO, Calne R and Isaac JR. 2005. Xenotransplantation of neonatal porcine islets and Sertoli cells into nonimmunosuppressed streptozotocin-induced diabetic rats. *Transplant Proc.* **37**:470-471.

Xu H, Wan H, Zuo W, Sun W, Owens RT, Harper JR, Ayares DL and McQuillan DJ. 2009. A porcine-derived acellular dermal scaffold that supports soft tissue regeneration: removal of terminal galactose-a-(1,3)-galactose and retention of matrix structure. *Tissue Eng.* **15**(7):1807-1819

Manuscript Received: April 5, 2012
Revised: April 19, 2012
Revision Accepted: May 21, 2012