Polymer(Korea), Vol. 41, No. 5, pp. 867-873 (2017)
https://doi.org/10.7317/pk.2017.41.5.867

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

여러 가지 천연고분자를 함유한 PLGA 하이브리드 지지체에서 토끼 골수줄기세포의 골분화 능력 평가

전하얀 · 김수민 · 전유신 · 국연지 · 송정은 · 강길선†
전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소
(2017년 4월 4일 접수, 2017년 5월 12일 수정, 2017년 5월 26일 채택)

Osteogenic Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Several Natural Source Biomaterials/PLGA Hybrid Scaffolds

Ha Yan Jeon, Soo Min Kim, Yoo Shin Jeon, Yeon Ji Kook, Jeong Eun Song, and Gilson Khang†
Department of BIN Convergence Tech, Polymer BIN Fusion Res Center & Department of Polymer·Nano Sci Tech, Chonbuk National University, 567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 54898, Korea
(Received April 4, 2017; Revised May 12, 2017; Accepted May 26, 2017)

초록: 합성고분자인 poly(lactic-*co*-glycolic acid)(PLGA)는 우수한 생분해능을 가진 생체재료로서 널리 이용되고 있으며, 천연유래 고분자인 실크와 소장 점막하 조직, 탈 미네랄화 골분 그리고 오리발 유래의 콜라겐은 생체 적합한 특성을 가지고 있다. 본 논문에서는 여러 가지 천연유래 고분자를 함유한 PLGA를 제작한 후, 지지체의 물성 및 표면을 확인하였으며 토끼 골수유래줄기세포를 이용하여 지지체에 파종 후, 세포의 생존율과 세포분화 정도를 측정하였고 *in vivo* 실험에서 면역조직학적 염색인 H&E와 Von Kossa을 실시하여 골분화 정도를 확인하였다. 결과적으로 오리발 유래 콜라겐과 소장 점막하 조직을 함유한 지지체에서 빠른 골 분화의 모습을 확인할 수 있었다.

Abstract: Poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) has been most widely used owing to its advantages such as good bio-degradability and biocompatibility. Scaffolds made of natural source bio-materials like small intestinal submucosa (SIS), demineralized bone particles (DBP), silk fibroin (SF), and collagen-derived duck's feet collagen (DC) have been proved to be biocompatible. We manufactured composite scaffolds of all these natural biomaterials/PLGA. After making hybrid scaffolds, we measured mechanical strength of scaffolds and observed a porosity and surface morphology of the scaffolds by scanning electronic microscopy. Rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) were cultured, expanded and seeded on scaffolds. Inflammatory responses were checked at 1, 4 and 8 weeks using H&E & Von Kossa staining. DC and SIS group were found to be faster in bone regeneration than other groups. Finally, we have observed that scaffolds using biomaterials are effective in cell attachment, stem cell differentiation, and mineralized tissue formation.

Keywords: collagen, silk, PLGA, scaffold, bone marrow mesenchymal stem cells.

서 론

외상이나 다양한 질환으로 인한 조직 및 장기의 기능 상실이나 손상이 증가하면서, 그에 따른 적절한 치료법 연구가 활발히 진행되고 있다.[1] 임상에서는 자가이식, 동종이식술 등을 사용하는데 공급의 한계 때문에 이를 해결하기 위한 대체물이 필요하게 되었다. 이러한 문제를 해결하기 위해 외과적 이식의 한계 없이 뼈의 결함이나 손상된 부분의 뼈를 재생시키는 골 조직공학이 주목을 받고 있으며, 생체 적합한 재료의 개발이 진행되고 있다.[2,3]

생체조직공학에 사용되는 세포는 특정 장기 또는 조직에서 얻은 일차세포나 특정한 세포로 분화할 수 있는 잠재성의 특성을 갖는 줄기세포로 분류된다.[4-6]

최근 줄기세포의 도입을 통해 조직공학에서 세포의 중요성 및 응용 가능성이 더욱 커진 상태인데, 줄기세포는 완전한 성체세포로 분화하기 전 단계인 미분화세포로서 증식을 거듭하면서 다양한 세포로 분화할 수 있어 조직공학에서 세포 적용의 제한점을 극복할 수 있는 방법으로써 논의되고 있다.[6,7] 현재 골수유래줄기세포(bone marrow derived adult stem cells)는 뼈 재생이나 심근재생 등에 적용시키기 위해 뼈세포나

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr
©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

심근세포로 분화되어 조직 재생을 위한 시도가 진행되고 있다.[4,6] 이러한 골수유래줄기세포를 이식하기 위해 다공성 지지체를 제작하는데, 이는 다공에 세포가 부착되고 증식하며 분화되어 결국 특정 조직이 되도록 유도하는 역할을 한다. 또한 이식 후 분해되고, 일정 수준의 기계적 강도를 가져야 한다. 따라서 다공성 지지체는 조직공학의 필수 요소이기 때문에 재생의학 산업기술로의 개발에 상당한 잠재력을 가지고 있다.[8,9]

생체재료는 크게 분류하면 생분해성 합성고분자와 천연 분자로 나뉜다.[10] 조직공학에서 생분해성 합성고분자는 특정 세포의 부착, 증식 및 분화를 위해 다공성 지지체로써 널리 이용되고 있다. 합성고분자 중 poly(lactic-*co*-glycolic acid)(PLGA)는 poly(lactic acid)(PLA)와 poly(glycolic acid)(PGA)의 공중합체로, 물리적, 화학적, 생분해성 특징이 많은 생물학적 부분에서 이미 증명되었다.[8,11] 특히, 공중합체의 비율을 다양하게 함으로써 생체적합성과 분해 속도, 기계적 특징이 쉽게 조절 가능하므로 가장 널리 사용되는 생분해성 고분자 중 하나이다.[12] 반면, 천연 생체재료들은 합성물질보다 생체조직 환경과 유사하여, 줄기 세포가 부착되고 증식하고 분화하는데 더 많은 기능성 리간드를 제공할 수 있다.[6,13] 그러나 다양한 응용에 필수적인 물리적, 화학적 성질은 합성물질보다 조절하기 어렵고 분해 능력이 떨어진다.[13-15]

따라서 본 연구에서는 합성고분자인 PLGA에 천연고분자인 실크(silk), 동물의 소장점막하 조직(small intestinal submucosa, SIS), 탈 미네랄화 골분(dimineralized bone particle, DBP) 및 오리발 유래 콜라겐(collagen-derived duck's feet collagen, DC)을 첨가하여 지지체를 제작하고자 하였다.

실크는 피브로인과 세리신으로 이루어진 천연 고분자로, 글리신, 알라닌, 세린과 같은 작은 분자량을 가진 아미노산이 전체 아미노산의 약 80~85%의 높은 농도로 피브로인을 구성하고 있다.[16-21]

이는 높은 인장 강도, 다양한 공정, 조절 가능한 생분해성, 쉬운 화학적 변형, 낮은 항원성과 비염증성을 가지고 있기 때문에 생체재료로서 다양하게 적용되고 있다.[16,22-24]

SIS는 세포가 존재하지 않는 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않으며, 구성 성분의 90% 이상이 피부에 있는 제 I형 및 제 III형 콜라겐으로 구성되어 있고, 그 외에는 소량의 제 IV, V 및 VI형 콜라겐으로 구성된다.[25-28] 이는 천연소재로서 높은 생체적합성을 가지며 다양한 사이토카인을 다량 함유하고 있어 세포의 점착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 도움을 줌으로써 조직 재생 이외에도 많은 분야에 응용될 수 있다.[17-19]

DBP는 골 형성 단백질과 성장인자를 포함하는 골 유도성 인자들로 구성하고 있어, 신생골 형성을 촉진시키기 위한 골 유도성 생체재료로 조직공학 분야에서 널리 사용되고 있다.[29]

콜라겐은 동물 내에 다양한 결합 조직의 주요 구조 단백질이다. 이는 세포 부착과 증식에 영향을 주며 좋은 생분해성, 생체적합성을 가지고, 다루기 쉬울 뿐만 아니라 높은 활용도 때문에 조직공학 분야에서 지난 수십 년간 폭넓게 발전해왔다.[24] 이러한 장점을 가진 콜라겐은 다양한 동물에서 추출하여, 사용되는데 본 연구에서는 활용도가 낮은 오리발에서 콜라겐을 추출하여 사용하였다.[30]

본 연구에서는 천연 재료의 장점과 합성고분자를 혼합하여 세포의 기능을 최적화시키고 골 재생에 더 적합한 천연고분자를 알아보고자, 기능과 물성이 우수한 PLGA에 여러 가지 천연고분자를 첨가하여 하이브리드 다공성 지지체를 제조하고 지지체의 물리적 특징과 세포와의 상호작용 및 골 재생촉진 여부를 확인하고자 하였다.

실 험

시약 및 재료. PLGA는 락타이드/글리콜라이드의 비율이 75/25이고 분자량이 90000 g/mol인 것을 Boehringer Ingelheim Chem. Co.(Germany)에서 구입하였다. 실크 고치는 울진농원에서 구입하였고, 콜라겐 추출에 쓰인 오리발은 전통시장에서 구입하였다. 수산화나트륨(NaCl, Sigma, USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

실크 파우더 제조. 실크고치는 1 cm×1 cm 크기로 잘게 자른 후, 0.02 M Na_2CO_3 수용액에 넣고 30분가량 끓여 실크고치 안의 세리신을 제거하였다. 증류수에 3회 세척하여 녹아나온 세리신을 제거한 후, 실크 피브로인을 오븐에서 3일간 완전 건조하였다. 완전 건조된 실크 피브로인을 9.3 M LiBr 수용액에 넣은 후, 60 ºC 오븐에서 4시간 방치하여 실크 수용액을 만들었다. 이 용액을 셀룰로오스 투석막(3500 Mw)을 사용하여 투석한 뒤, 동결 건조(SFDSF12, Samwon Freezing Engineering Co., Ltd., Seoul)하여 실크 피브로인 파우더를 얻었다.

SIS 파우더 제조. SIS를 분리하기 위하여 돼지의 공장에 있는 지방조직을 제거한 후, 물로 깨끗하게 공장 안과 밖을 여러 번 세척한다. 세척된 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라 아세트산에 담가 붙어있는 세포를 모두 괴사시킨 후, 다시 식염수에 넣고 pH 7이 되도록 세척하였다. 잘라낸 공장을 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막근육층을 제거하여 SIS층만을 분리하였다. 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, -80 ºC에서 보관한 SIS를 동결건조한 뒤, 믹서로 분쇄한 SIS를 동결분쇄기(SPEX 6700, USA)를 이용하여 약 180 μm 이하의 고운 분말을 얻었다.

DBP 파우더 제조. DBP는 소의 대퇴부를 사용하여 Urist 방법으로 제조하였다. 대퇴부의 골막과 속막을 제거한 후, 에탄올로 세척하여 잘게 파쇄 하였다. 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올을 3:1로 혼합한 혼합용매로 지방을 제거한 후, 아

세톤으로 건조시켰다. 0.5 N HCl 용액으로 탈 미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, PH 7.3-7.4; Sigma, USA)으로 pH 7.4로 조절하여 동결 건조시켰다. DBP는 액체질소 내에서 동결분쇄하여 약 180 μm 크기 이하의 분말형태로 얻었다.

오리발 유래 콜라겐 파우더 제조. 오리발은 증류수로 세척하고, 3 cm×3 cm 크기로 절단하여 증류수로 세척한 후 -20 ºC 냉동고에서 24시간 보관하였다. 냉동 보관된 시료들을 취하여 1 M의 NaOH를 첨가하고 지방제거 후 증류수로 세척한다. 5% 시트르산을 넣고 24시간 동안 4 ºC 냉장실에서 보관하였다. 이후 산 처리한 용액을 blender를 이용하여 갈아준 뒤, 뼈 잔여물을 걸러주기 위하여 10000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액만 수거하였다. 여기에 알코올을 첨가하고 하루 동안 냉장 보관하여 콜라겐을 가라앉게 하였다. 여기서 상층액을 제거하고 침전물을 -70 ºC에서 냉동하여 -80 ºC, 20 mmHg에서 동결건조(SFDSF12, Samwon Freezing Engineering Co., Ltd., Seoul)하였다. 이를 동결 분쇄하여 최종적으로 180 μm 이하의 콜라겐 분말을 획득하였다.

지지체 제조. 지지체는 염 추출법을 이용하여 제조하였다. PLGA 1 g에 각각의 천연고분자(silk, SIS, DBP, DC)를 0.8 g씩 첨가시켜준 뒤, 염화메틸렌(metylene cloride; MC)을 첨가하여 용해시켰다. 이에 다공형성물질인 180~250 μm 크기의 NaCl을 PLGA의 중량의 9배를 첨가하여 충분히 섞어준 뒤, 직경 7 mm, 두께 3 mm의 실리콘 몰드에 넣고 프레스(MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm^{2}의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 그 후 다공의 형성을 위하여 3차 증류수에 세척하면서 NaCl을 용출시켜 주었고, -80 ºC의 냉동에서 24시간 동결시킨 뒤, 5 mTorr, -50 ºC 조건에서 48시간 동안 동결건조 하였다. 실험에 사용되는 모든 지지체는 잔류용매를 충분히 제거하기 위하여 7일간 25 ºC 진공오븐에서 건조진공오븐에서 건조시킨 후, 세포실험 전 70% 알코올에 30분간 멸균하고, PBS에 세척하여 실험에 사용하였다. 대조군으로는 PLGA 지지체를 사용하였다. 제조한 silk/PLGA, SIS/PLGA, DBP/PLGA, DC/PLGA 지지체는 각 Figure에서 각각 silk, SIS, DBP, DC로 표기하였다.

SEM 관찰. 천연고분자(silk, SIS, DBP 및 DC)/PLGA 지지체의 다공 크기 및 지지체의 표면을 관찰하기 위하여 SEM 측정을 실시하였다. 지지체 관찰이 용이하도록 지지체를 잘라 시료홀더에 고정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 지지체를 백금 코팅하고 각각의 시료를 주사전자 현미경(Hitachi Co., Model S-2250N, Japan)을 이용하여 표면을 관찰하였다.

압축강도. 직경 7 mm, 두께 3 mm의 천연고분자/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.

세포 분리 및 배양. 골수 유래 줄기세포는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼의 무릎 관절에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후 다리의 털을 제거하고 수술도구를 사용하여 다리부분의 뼈를 채취하였다. 채취한 뼈를 클린벤치에서 가위로 자른 뒤, 18-게이지 실린지를 사용하여 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 층분리 배양법을 사용하여 20% FBS(Lonza, USA)와 100 unit/mL의 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA)가 포함된 α-MEM(Lonza) 배양액에 4×10^5 cell/mL 농도로 incubator(5% CO_2, 37 ºC)에서 배양하였다. 이후 세포들의 부착이 확인되면 매 2일 마다 배양액을 교환하였다. 약 2주 후 세포가 80~90% 정도 배양용기 바닥에 자라게 되면 0.25% trypsin/1 mM EDTA로 처리하여 세포를 분리한 다음, 5×10^4 cell/mL 농도로 다른 배양용기에 옮겨 층분리 배양법을 사용하여 계대 배양하였다.

세포 생존율 분석. 세포 생존율을 분석하기 위하여 골수유래 줄기세포를 지지체에 배양시킨 뒤, MTT(3-[4,5-디메틸치아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석을 각각 1, 3, 7, 10, 14 및 28일째 시행하였다. 세포를 배양한 지지체에 배양액 부피의 10% 만큼 MTT(Sigma, USA) 용액(1 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 37 ºC 인큐베이터에서 반응시켰다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸 설폭사이트(DMSO, Sigma, USA)를 사용하여 보라색 결정을 충분히 용해시킨 뒤, 마이크로 플레이트 리더(Thermolex, Molecular Device Co., USA)를 사용하여 570 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 분석하였다.

세포 분화 정도. 지지체에 파종한 골수유래 줄기세포의 alkaline phosphatase(ALP)를 측정하여 세포의 골분화 정도를 관찰하였다. ALP는 뼈를 생성하는 세포인 골모세포에 많이 존재한다. 골모세포의 활동이 증가되면 골모세포의 효소인 알카리성 인산분해효소의 활성도 역시 증가하므로 줄기세포의 골분화 정도를 인산분해효소의 활성도를 측정하여 확인하였다.[31]

분석은 TRACP & ALP Assay kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였다. 지지체에서 배양액을 제거한 후 증류수로 3회 세척하고 0.02% extraction solution으로 세포막을 용해시켰다. 이 용해시킨 추출액에 ALP buffer(pH 9.2)에 녹인 nNPP를 넣고, 37 ºC에서 1시간 반응시켜 405 nm의 흡광도를 측정하여 분화정도를 분석하였다.

mRNA 발현도 확인. 여러 가지 PLGA 지지체에서 골 분화된 세포의 특정 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 파종 1, 28일 째에 회수된 여러 가지 PLGA 지지체를 PBS로 두 번 세척한 후, 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션 한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4 ºC, 12000 rpm에서 15분간 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 TOPscript™ One-step RT PCR DryMIX(+Dye) Kit를 사용하

여 β-actin, RUNX-2, Type I collagen(COL1) 및 osteocalcin의 프라이머에 대한 발현량을 확인하였다. 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 EtBr(Sigma, USA)를 사용하여 시각화하였으며 385 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 밴드의 발현정도를 확인하고, Image J 소프트웨어를 사용하여 측정 명도값으로 정규화하여 상대적인 값을 비교하였다.

***In vivo* 지지체 이식.** 각각의 지지체에 5×10^4개의 rBMSCs를 지지체에 파종한 뒤 3일간 incubator에서 안정화시키고 4주령의 면역결핍 마우스의 등 쪽 피하에 이식하였다(n=2). 이식하기 전 ethyl ether에서 흡입마취시킨 뒤 알팍산과 도미토를 9:1로 섞고, 60 μL씩 근육 주사하여 마취시켰다.

***In vivo* 지지체 적출.** 이식 1, 4 및 8주 후에 ethyl ether 하에서 흡입 마취하여 누드마우스를 희생시킨 뒤 등을 절제하여 이식했던 지지체를 적출한 다음 4% 포르말린에 넣어 2일 동안 고정시켰다.

조직학적 평가. 조직 내에서 염증반응 정도를 조직학적 평가를 통해 분석하기 위하여 천연고분자/PLGA 지지체를 면역기관인 림프절이 주로 모여 있는 wister rat의 겨드랑이 피하에 이식하였다(n=10). 1, 4 및 8주 후 이식 부위만을 적출하였고 동물은 안락사하여 희생시켰다. 적출한 부위를 4% 포르말린(Sigma) 용액에 고정하고 조직처리를 거친 뒤, 파라핀 블록으로 제작하여 5 μm의 두께로 잘라 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편을 탈 파라핀 과정을 거친 후, 조직학적 평가를 위하여 H&E, Von Kossa 염색을 실시하였다.

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

결과 및 토론

지지체 관찰. 천연고분자를 함유한 지지체의 다공 크기 및 표면을 확인하기 위하여 SEM 촬영을 실시하였으며, 대조군으로는 PLGA만을 이용하여 만든 지지체를 이용하였다(Figure 1).

모든 지지체에서 다공이 잘 형성되었고, 천연고분자를 함유하지 않은 PLGA 지지체의 경우 표면이 비교적 매끈한 모습을 보이는 반면, 천연고분자를 함유한 지지체의 경우 표면이 거침을 확인하였다. 특히, SIS/PLGA와 DBP/PLGA 지지체의 표면이 더 거친 것으로 관찰되었다.

압축강도. 여러 가지 지지체의 조직 공학적 적용을 위하여 압축강도를 측정하였다(Figure 2).

그 결과, 큰 차이 없이 대부분 비슷한 압축강도를 보였다. DC/PLGA 지지체의 압축강도는 PLGA 지지체와 비슷하였으며, SIS/PLGA 지지체의 경우 다른 군에 비하여 압축강도가 낮음을 확인하였다.

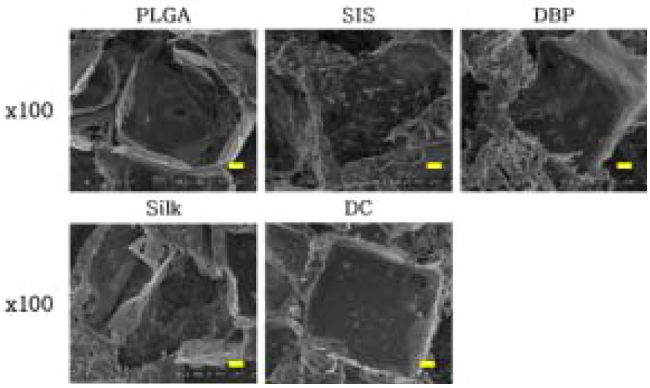

Figure 1. SEM images of natural polymer/PLGA scaffolds (magnification with ×100, scale bar=100 μm).

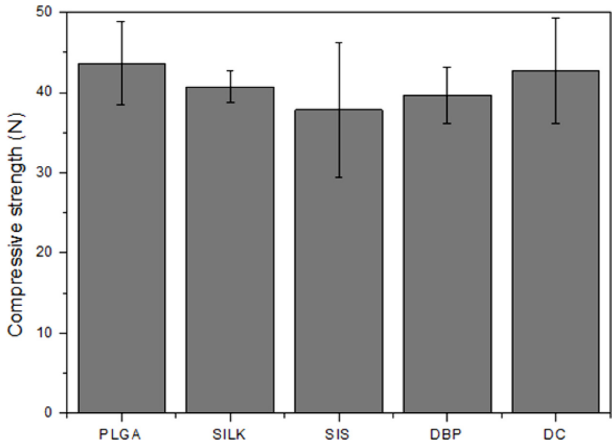

Figure 2. Compressive strength of natural polymers/PLGA scaffolds.

세포 증식률 측정. 각 지지체에 따른 세포의 부착 및 성장률을 확인하기 위해 MTT 분석법을 통해 비교하였다(Figure 3).

천연고분자/PLGA 지지체에 rBMSCs를 파종한 뒤, 배양 1, 3, 7, 10, 14 및 28일에 측정하였으며, 이에 대한 결과를 Figure 3에 나타내었다. MTT 결과, 시간이 지남에 따라 모든 군에서 증식을 보였으나, silk/PLGA 지지체에서는 증식에 거의 변화를 보이지 않다가 감소하는 양상을 보였다. DBP/PLGA 지지체에서는 10일 이후에 감소하였고 DBP/PLGA 지지체를 제외한 다른 지지체들에서는 14일 이후에 감소하였다.

세포 분화 정도. 지지체에 파종한 골수유래 줄기세포의 시간에 따른 골분화 정도를 확인하기 위하여 ALP activity 분석을 시행하였다(Figure 4).

그 결과, DC/PLGA 지지체는 10일까지 증가하면서 가장 높은 값을 보였고, silk/PLGA 지지체나 PLGA 지지체는 증가의 폭이 크지 않았다. 이러한 결과로 보아, PLGA 지지체에 DBP가 첨가되면 다른 천연고분자들보다 짧은 시간에 골

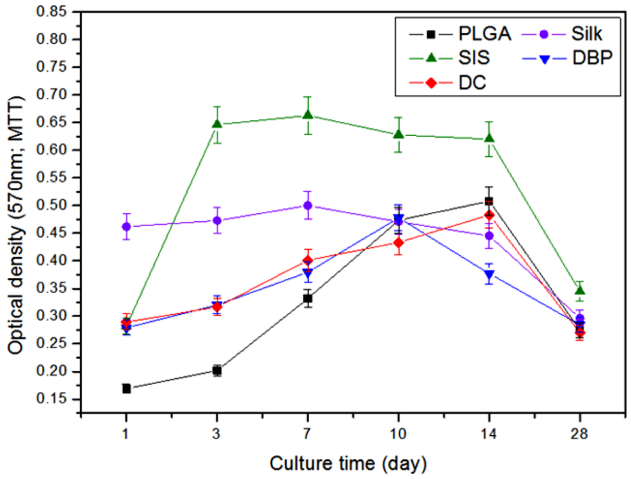

Figure 3. Cell adhesion and proliferation assay of cultured rBMSCs on natural polymer/PLGA scaffolds via MTT assay.

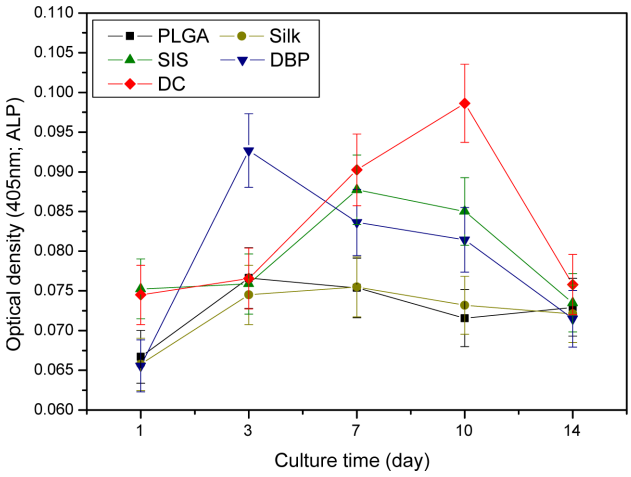

Figure 4. ALP results of cultured rBMSCs on natural polymer/PLGA scaffolds.

분화가 진행되는 반면, DC가 첨가되었을 때는 DBP/PLGA 지지체보다 긴 시간 골분화가 진행되지만, 결과적으로 ALP 값은 DBP/PLGA 지지체보다 큰 것을 확인하였다. 이로써 PLGA에 DBP와 DC가 첨가되었을 때 다른 천연고분자들보다 더 골분화를 촉진시킬 것으로 사료된다.

mRNA 발현도 확인. RT-PCR을 통하여 mRNA 발현도를 확인한 결과, 1일차에 발현되지 않은 β-actin, RUNX-2, COL1 및 osteocalcin이 28일차에서 모두 발현되었다.

각 날짜별로 앞에서부터 순서대로 PLGA, silk/PLGA, SIS/PLGA, DBP/PLGA 그리고 DC/PLGA 순이다(Figure 5).

조직학적 평가. *In vivo* 환경에서의 PLGA, silk/PLGA, SIS/PLGA, DBP/PLGA, DC/PLGA 지지체에서의 골 분화를

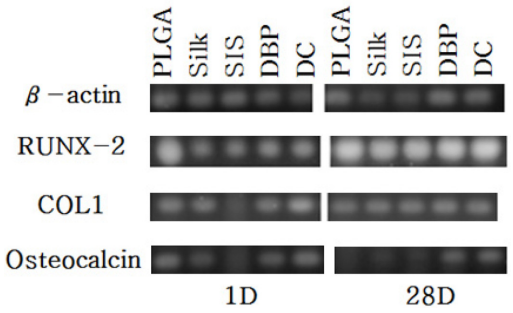

Figure 5. mRNA expression results of cultured rBMSCs on natural polymer/PLGA scaffolds.

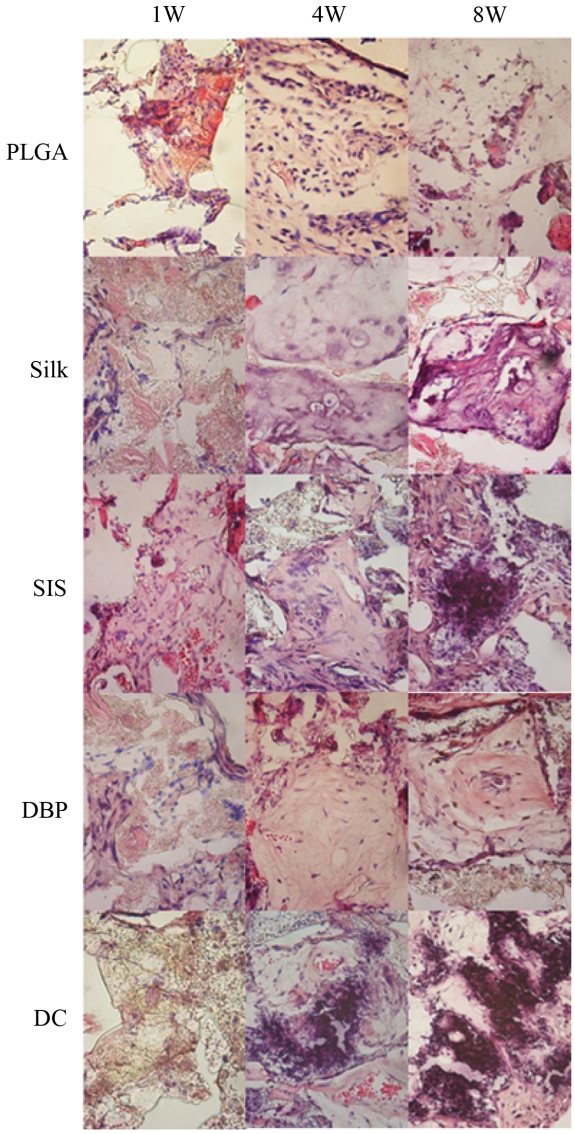

Figure 6. H&E stained histological section of tissue at scaffolds after 1, 4 and 8 weeks of implantation (magnification with ×400).

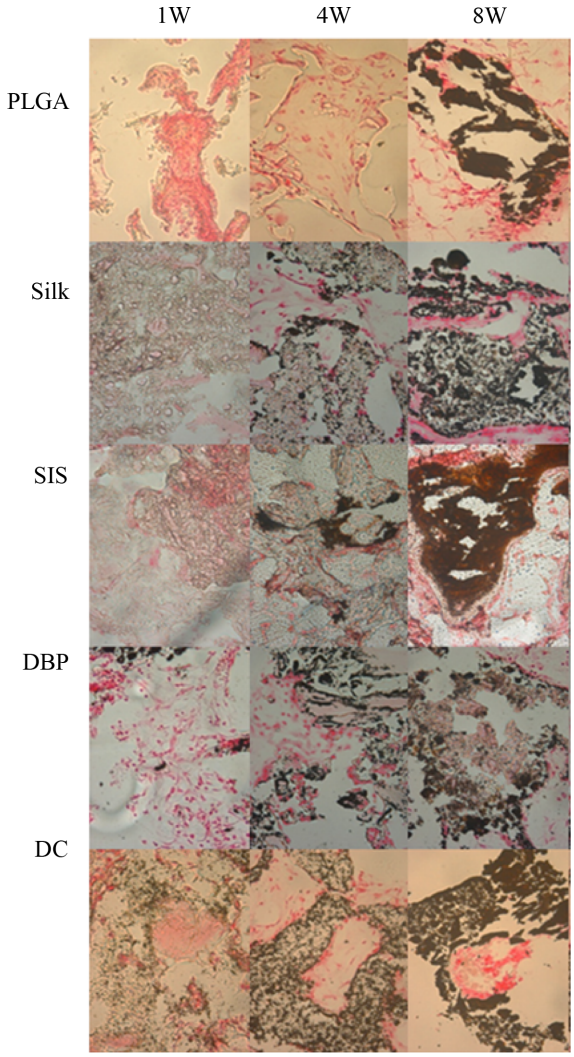

Figure 7. Von Kossa stained histological section of tissue at scaffolds after 1, 4 and 8 weeks of implantation (magnification with ×400).

비교하기 위하여 지지체를 누드마우스의 피하에 이식하고 1주, 4주 그리고 8주 후 지지체를 적출하고 H&E(Hematoxylin & Eosin) 염색을 통하여 관찰하였다(Figure 6).

1주에는 큰 차이 없이 세포가 다공 안에 차는 것을 확인하였고, 4주부터 DC/PLGA군의 경우, 골 형성이 진행됨을 알 수 있다. 그리고 8주 후 PLGA군을 제외한 모든 군에서 뼈가 형성되었으며 특히, silk/PLGA, SIS/PLGA, DC/PLGA군에서 뼈가 잘 형성됨을 보였다. 또한 Von Kossa 염색을 통하여 골 미네랄화 정도를 확인하였다(Figure 7). 또한 Von Kossa 염색사진에서 흑갈색으로 염색된 골미네랄화 조직을 image J로 정량하여 Figure 8에 나타내었다. 그 결과, 1주에는 SIS와 DC를 제외한 군에서 골미네랄화된 값은 큰 차이를 보이지 않았다. 4주에서 DC/PLGA군의 골 미네랄화가 가장 잘 된 것을

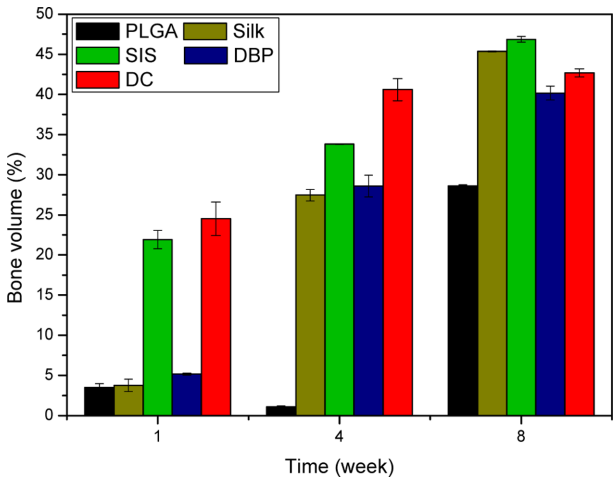

Figure 8. Quantification of mineralized bone using Von Kossa staining after 1, 4 and 8 weeks of implantation.

확인하였고, 8주에는 모든 군에서 골 미네랄화가 높게 관찰되었으며, 특히 silk와 SIS에서 가장 높은 값을 갖는 것을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 천연고분자인 silk, SIS, DBP, DC를 첨가하여 지지체를 제조함으로써, 조직 공학적으로 사용될 수 있는 지지체를 제안하였다. 3차원 다공성 지지체로 제조된 이들 군에 대하여 압축강도, SEM, MTT 및 ALP 분석을 실시하여 세포 파종 시 압축강도가 증가하고, 초기 부착 및 증식이 뛰어남을 확인하였다. *In vivo* 환경에서 조직과의 상호작용과 염증 반응을 알아보고자, H&E 염색과 Von Kossa 염색을 실시한 결과, PLGA 지지체에 비교하여 SIS와 DC가 첨가될수록 지지체에서 rBMSCs의 골분화가 더 빠르게 진행되는 것을 확인하였다. 이로써 PLGA에 천연고분자를 첨가하여 지지체를 제조할 경우 세포의 부착과 증식에 긍정적인 영향을 줄 뿐만 아니라, 골분화의 진행에 있어 도움을 받을 수 있을 것이라 사료되어 조직공학에 있어 유용한 지지체가 될 것이라 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업(2012M3A9C6050204)과 농림수산식품부 기술사업화지원사업(814005-03-3-HD020)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. S. Levenberg and R. Langer, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **61**, 113 (2004).

2. H. Shin, S. Jo, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **24**, 4353 (2003).
3. C. R. M. Black, V. Goriainov, D. Gibbs, J. Kanczler, R. S. Tare, and R. O. C. Oreffo, *Curr. Mol. Bio. Rep.*, **1**, 132 (2015).
4. M. Santin, A. Motta, G. Freddi, and M. Cannas, *J. Biomed. Mater. Res.,* **46**, 382 (1999).
5. H. A. Ko, H. M. Kim, H. J. Ha, A. R. Kim, J. E. Song, K. H. Lee, J. E. Sang, H. Yoon, O. J. Lee, D. Lee, C. H. Park, and G. Khang, *Int. J. Tissue Regen.,* **3**, 103 (2012).
6. H. J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, and D. L. Kaplan, *Biomaterials,* **25**, 1039 (2004).
7. L. Meinel, V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, B. Snyder, C. Li, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakov, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res. A,* **71**, 25 (2004).
8. X. Miao, D. M. Tan, J. Li, Y. Xiao, and R. Crawford, *Acta Biomater.*, **4**, 638 (2008).
9. H. K. Makadia and S. J. Siegel, *Polymers*, **3**, 1377 (2011).
10. L. S. Nair and C. T. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.,* **32**, 762 (2007).
11. L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **21**, 1837 (2000).
12. S. H. Oh, S. G. Kang, E. S. Kim, S. H. Cho, and J. H. Lee, *Biomaterials*, **24**, 4011 (2003).
13. C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, *Chem. Eng. Res. Des.*, **85**, 1051 (2007).
14. I. Caputo, M. Lepretti, C. Scarabino, C. Esposito, and A. Proto, *Anal. Biochem.*, **421**, 92 (2012).
15. A. Awidi, N. Ababneh, H. Alkilani, B. Salah, S. Nazzal, M. Zoghool, and M. Shomaf, *Mater. Med.*, **26**, 239 (2015).
16. C. Vepari and D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 991 (2007).
17. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
18. H. Yoshimoto, Y. M. Shin, and H. Terai, *Biomaterials*, **24**, 2077 (2003).
19. H. Fan, Y. Hu, C. Zhang, X. Li, R. Lu, L. Qin, and R. Zhn, *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. Candielio, 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. K. Long, Y. Liu, W. Li, L. Wang, S. Liu, Y. Wang, and Z. Wang, *J. Biomed. Mater. Res. Part A,* **103**, 1159 (2015).
23. O. J. Lee, J. M. Lee, J. H. Kim, J. Kim, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo, and C. H. Park, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **100**, 2018 (2012).
24. S. H. Kim, H. S. Park, O. J. Lee, J. R. Chao, H. J. Park, J. M. Lee, H. W. Ju, B. M. Moon, Y. R. Park, J. E. Song, G. Khang, and C. H. Park, *Int. J. Biol. Macromol.*, **85**, 442 (2016).
25. K. S. Kim, J. Y. Lee, Y. M. Kang, E. S. Kim, G. H. Kim, S. D. Rhee, H. G. Cheon, J. H. Kim, B. H. Min, H. B. Lee, and M. S. Kim, *Biomaterials*, **31**, 1104 (2010).
26. S. L. Voytik-Harbin, A. O. Brightman, M. R. Kraine, B. Waisner, and S. F. Badylak, *J. Cell Biochem.,* **67**, 478 (1997).
27. J. P. Hodde, S. F. Badylak, A. O. Brightman, and S. L. Voytik-harbin, *Tissue Eng.*, **2**, 209 (1996).
28. T. B. McPherson and S. F. Badylak, *Tissue Eng.*, **4**, 75 (1998).
29. T. Thitiset, S. Damrongsakkul, T. Bunaprasert, W. Leeanansaksiri, and S. Honsawek, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 2056 (2013).
30. K. S. Silvipriya, K. K. Kumar, A. R. Bhat, B. D. Kumar, and J. Anish, *J. Appl. Pharmaceuti. Sci.*, **5**, 123 (2015).
31. L. Zhang, J. Zhao, M. Duan, H. Zhang, J. Jiang, and R. Yu, *Anal. Chem.*, **85**, 3797 (2013).