

조직공학적 골재생을 위한 탈미네랄화된 골분을 함유한 다공성 지지체의 제조 및 그 특성

장지욱, 이봉, 한창환*, 김문석**, 조선행**, 이해방**, 강길선***,†

부경대학교 고분자공학과, *가톨릭 의과대학 정형외과,

한국화학연구원 나노생체재료연구팀, *전북대학교 고분자·나노공학과

(2004년 1월 20일 접수, 2004년 9월 2일 채택)

Preparation and Characterization of Demineralized Bone Particle-loaded PLGA Scaffold for Tissue Engineered Bone

Ji Wook Jang, Bong Lee, Chang Whan Han*, Mun Suk Kim**,
Sun Hang Cho**, Hai Bang Lee**, and Gilson Khang***,†

Department of Polymer Engineering, Pukyong National University, San 100, Nam Ku, Busan 608-739, Korea

*Department of Orthopedic Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea,
520-2, Daeheung 2 Dong, Jung Ku, Daejeon 301-723, Korea

**Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

***Department of Polymer · Nano Science and Technology, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin Dong 1Ga, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

†e-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr

(Received January 20, 2004; accepted September 2, 2004)

초록 : 생체적합성 천연재료 중 하나인 탈미네랄화된 골분 (demineralized bone particle, DBP)은 골형성단백질 (BMP)을 함유하고 있어 골수간엽줄기세포 (BMSCs)의 분화를 유도한다. 본 연구에서는 DBP를 함유한 폴리락타이드 (PLA)와 락타이드-글리콜라이드 공중합체 (PLGA) 다공성 지지체를 용매 캐스팅/염추출법으로 제조하였고, 수은다공측정계 및 전자주사현미경을 이용하여 특성결정 하였다. BMSCs는 골분화 배지를 이용하여 조골세포로 분화시켜 Wright-Giemsa, Alizarin red, von Kossa 및 ALP 염색으로 확인하였다. DBP가 함유된 지지체와 DBP가 함유되지 않은 지지체에 BMSCs를 파종한 후 면역결핍 누드마우스의 피하에 삽입하여 이들의 골형성 정도를 비교하여 보았다. 제조한 지지체의 다공도는 90.2% 이상이었으며 평균 다공크기도 69.1 μm 이상이었다. BMSCs는 Wright-Giemsa, Alizarin red, von Kossa 및 ALP 염색결과 조골세포로 분화가 가능했으며, 동물실험을 수행한 결과 DBP가 함유된 지지체에서 칼슘침착 영역을 확인할 수 있었지만 DBP가 함유되지 않은 지지체에서는 칼슘침착 영역을 확인하지 못하였다. 결론적으로 DBP를 함유한 지지체에서 DBP와 BMSCs가 골형성에 중요한 요인으로 작용한다고 사료된다.

ABSTRACT : One of the significant natural bioactive materials is demineralized bone particle (DBP) whose has a powerful inducer of new bone growth. In this study, we developed the DBP loaded poly-lactide (PLA) and poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for the possibility of the application of the tissue engineered bone. PLA/DBP and PLGA/DBP scaffolds were prepared by solvent casting/salt leaching method and were characterized by porosimeter, scanning electron microscopy. BMSCs were stimulated by osteogenic medium and characterized by histological stained Wright-Giemsa, Alizarin red, von Kossa, and alkaline phosphate activity (ALP). DBP impregnated scaffolds with BMSCs were implanted into the back of athymic nude mouse to observe the effect of DBP on the osteoinduction compared with control scaffolds. It can be observed that the porosity was above 90.2% and the pore size was above 69.1 μm . BMSCs could be differentiated into osteoprogenitor cells as result of wright-giemsa, alizarin red, von Kossa and ALP staining. In *in vivo* study, we could observed calcification region in PLA/DBP and PLGA/DBP groups, but calcification did not occur almost in control scaffolds. From these results, it seems that DBP as well as BMSCs play an important role for bone induction in PLA/DBP and PLGA/DBP scaffolds.

Keywords : scaffold, DBP, BMSCs, osteogenesis, tissue engineered bone.

1. 서론

생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 담체를 생체조직에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 형성하게 하는 일련의 기법을 생체조직공학이라고 한다.¹ 생체조직공학은 세포 배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합이며, 이러한 조직공학 기법을 이용하여 연골세포와 골막세포로 연골조직과 골조직을 얻을 수 있고 담체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 주조할 수가 있다. 생체조직공학에 사용되는 고분자담체의 역할은 분리된 세포를 집적화하여 생체내에서 세포가 왕성하게 활성화하여 새로운 기질을 분비하게 함으로써 분화된 조직을 만들어 주는 것이다. 분리된 세포를 인체에 해를 미치지 않으면서, 인체에서 완전히 분해되는 고분자에 심어주게 되는데 이때 사용되는 고분자의 구조는 화학적 형상이나, 미세구조학적 성상이 세포와 친화력이 있어야 한다.^{2,3}

최근 α -하이드록시산 계열인 폴리글리콜라이드 (PGA), 폴리락타이드 (PLA), 및 그들의 공중합체인 폴리(L-lactide-co-glycolide) (PLGA)는 미국 FDA의 승인을 받은 합성고분자로서 조직공학적 다공성 지지체, 약물전달 시스템 등의 생체재료로 널리 이용되고 있다.^{4,6} PLA와 PLGA는 높은 생체적합성, 생분해성, 가공성을 가지고 있으며, 특히 PLGA는 단량체량을 조절함으로써 분해기간을 조절할 수 있다.^{7,9} 생체활성 천연재료인 탈미네랄화된 골분 (demineralized bone particle, DBP)은 새로운 골형성에 강한 영향을 가진다고 알려져 있다. Urist 등은 DBP가 가진 골형성 단백질이 간엽줄기세포의 분화에 자극을 가진다고 보고하였다.^{10,11} DBP는 골결손 부위의 충전제로 이용되며 임상적용시 국소 부위에는 이용될 수 있으나 광범위한 부위의 충전제로는 이용될 수 없다고 알려져 있다.¹²⁻¹⁸ 현대 산업사회에서 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 나이에 따라 골 밀도의 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골 형성 부전증 같은 질환에 의한 성장부전 등과 같은 다양한 문제들에 대한 효과적인 재건방법으로 대두되고 있다.¹⁹ 전통적인 골결손 처리방법으로는 자가 골이식과 동종 골이식 등이 있다. 자가 골이식이 지금까지는 골형성 측면에서 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으나, 골채취 부위의 감염, 동통, 혈종 등과 같은 합병증이 발생할 수 있고 동종 골이식은 공여자로부터 질병의 전염, 감염, 그리고 자가 골이식에 비해 골유합 및 골형성 효과가 저조한 단점을 가지고 있다.²⁰⁻²²

조직공학적인 골형성이 이런 단점을 해결하고 골결손을 치료할 수 있도록 많은 연구가 진행되고 있는데, 골

조직공학의 목적은 골이 필요한 부위에 골형성을 유도하고 실제 골조직을 개발하는데 있다. 조직공학에 의한 골조직의 형성을 위해 골 생성을 유도하는 골아전구세포, 이런 세포들이 적당한 위치에서 증식 분화할 수 있는 담체, 그리고 골조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도성장인자들이 필요하다.²³ 이에 본 연구팀은 소장점막하조직이 혼합된 PLGA 담체,²⁴ 항생제인 겐타마이신이 혼합된 PLGA 담체,²⁵ 신경성장인자가 혼합된 PLGA 담체,^{26,27} 및 비타민 D₃가 함유된 PLGA 담체,^{28,29} 이프리플라분을 함유한 담체 등을³⁰ 제조하여 이들의 싸이토카인류가 조직성장에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다. 또한 이전 실험에서 DBP를 이용하여 DBP 및 DBP를 함유한 PLGA 담체가 생체 내에서 새로운 골형성을 유도한다는 것을 확인하였다.³¹

이러한 일련의 연구를 바탕으로 본 연구에서는 PLA 및 PLGA 담체의 생체활성력이 결여되어 있는 단점을 개선하고자, 그리고 골형성 자극을 가지는 DBP를 응용함으로써 골형성 촉진을 꾀하려 하였다. 또한 골수간엽줄기세포 (bone-marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)가 골형성에 미치는 영향을 확인하려 하였다. DBP와 PLGA를 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 다공성 지지체를 제조하였고³² 특성결정 방법으로 주사전자현미경 (scanning electron microscopy, SEM)으로 다공형태 및 크기를 관찰하였다. BMSCs는 사람으로부터 분리하여 배양하였으며, 골분화 배지를 사용하여 조골세포로 분화시켰다. 조골세포 분화는 Wright-Giemsa, Alizalin red, von Kossa 염색으로 확인하였으며, *in vivo* 환경에서 조직공학적 골형성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐로 실험하여 조직학적 염색을 실시하였다.

2. 실험

시약 및 재료. PLA는 (Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)에서 구입하였고, PLGA (lactide/glycolide 몰비, 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)는 평균분자량이 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 염화나트륨 (Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성물질로 사용하였는데 본 실험에서 요구되는 크기로 선별하기 위하여 각 크기별 분자체를 사용하였다. DBP는 (Osteotech, Inc., Shrewsbury, NJ, USA)으로부터 구입하였고, 메틸렌클로라이드 (MC, Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. PLA와 PLGA의 화학 구조식은 Figure 1에 나타내었고 DBP의 형태는 Figure 2에 나타내었다.

용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조.

PLA, PLA/DBP (50%), PLGA, 및 PLGA/DBP (50%) 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다. 먼저 PLA 및 PLGA를 MC에 일정 농도로 용해한 후 각각 DBP를 일정량 첨가하고 여기에 다공생성 물질인 염화나트륨을 분자체로 선별된 (180~250 μm , 250~355 μm) 염화나트륨을 일정 비율로 혼합하였다 (Table 1). 용해된 PLA, PLA/DBP, PLGA, 및 PLGA/DBP와 염의 혼합물을 직경 10 mm 및 두께 5 mm 크기의 실리콘 몰

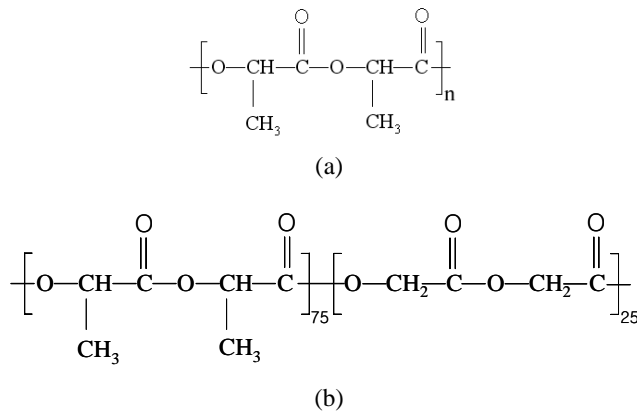
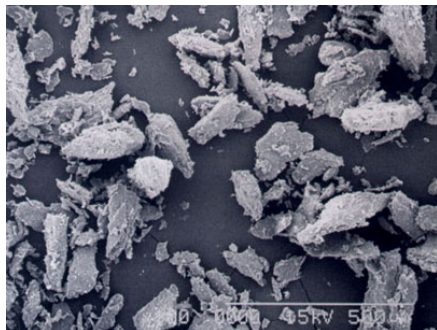


Figure 1. Chemical structures of (a) PLA and (b) PLGA.



(a)



(b)

Figure 2. SEM microphotographs of (a) DBP and (b) DBP powder.

드에 넣은 후 프레스 (MH-50Y, CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 60 kgf/cm²의 압력으로 24시간 동안 가압하였다. 다공형성 물질인 염의 추출은 3차 증류수에서 48시간 동안 시행한 후, 8 mTorr, -55 °C 조건에서 48시간 동안 동결 건조하였다. 잔류용매인 MC를 제거하기 위하여 최소 1주일 동안 25 °C 진공오븐에서 건조시킨 후, 진공 상태에서 보관하여 실험에 사용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 3에 나타내었다.

수은 다공도계 분석. 상기의 여러 방법들을 사용하여 제조한 다공성 지지체의 다공 크기 분포, 비다공면적, 평균 다공직경 및 다공도를 측정하기 위하여 수은 다공도계 (Micromeritics Co., Model AutoPore II 9220, USA)를 이용하였다. 사용된 PLA, PLGA 지지체의 질량, 측정수은 체적, 수은압력 및 최대압력은 각각 0.1 g, 6.7 ~ 7.3 mL, 3.4 KPa 및 414 MPa 이었다. 수은압력 P 와 구멍 반지름 r 의 관계는 다음의 Washburn 식³³

$$r = -2\gamma \cos \theta \cdot p \quad (2)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 γ 은 수은표면장력으로 485

Table 1. Properties of Fabricated Porous DBP/PLGA Scaffolds by means of Solvent Casting/Salt Leaching

polymer	DBP content (%)	size of NaCl (μm)	volume of PLGA to NaCl (w/w %)	porosity (%)	median pore diameter (μm)
PLA	0	180~250	90	94.1	92.1
PLA	0	250~355	90	92.5	109.3
PLA	50	180~250	90	92.9	69.1
PLA	50	250~355	90	90.2	80.4
PLGA	0	180~250	90	97.3	120.8
PLGA	0	250~355	90	96.5	133.7
PLGA	50	180~250	90	96.6	96.5
PLGA	50	250~355	90	94.8	111.9

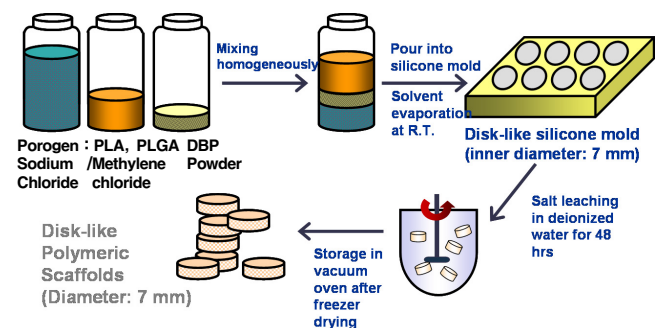


Figure 3. Schematic representation of the solvent casting/salt leaching method to fabricate PLA/DBP and PLGA/DBP scaffolds.

dyne/cm를 사용하였으며 θ 는 수은과 PLA와 PLGA 표면의 접촉각인데 접촉각 측정기 (Model 100-0, Rame-Hart Inc., USA)를 이용하여 실측한 결과 160° 이었다.^{34,35}

다공도 ε 는 다음의 식

$$\varepsilon = \frac{V_i}{V_i + \frac{1}{\rho}} \quad (3)$$

에 의해서 정의된다. 여기서 V_i 는 전체 침투 체적이며 ρ 는 밀도를 나타낸다.

골수간엽줄기세포의 분리 및 배양. 사람의 골수 간엽 줄기세포는 기부자로부터 14 게이지의 바늘과 3000 U 헤파린을 포함한 수용액이 든 주사기를 사용하여 20~30 mL의 골수에서 채취하였으며 배양액으로 2배 희석하였다. 이 골수는 50% 퍼콜 (Percoll, Sigma, Chem. Co., USA) 점진구배용액에 천천히 낙하시켜 퍼콜 층과 섞이지 않도록 하였다. 이를 원심분리기로 500 g에서 25분간 원심분리하여 적혈구 층, 퍼콜 층, 세포 층과 혈장 층으로 구분하였으며 마이크로 피펫을 이용하여 세포 층만을 분리하여 배양액으로 다시 희석하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 세포를 $10^3 \sim 10^4$ 세포/cm²의 농도로 배양 플라스크에 배양하였다. 세포의 성장배지로는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL, USA)에 10% 우태혈청 (FBS, Gibco BRL)과 항생제 (10 U/mL, 페니실린 G 소듐과 10 µg/mL 암프테리신 B, Gibco BRL)를 사용하였다. 배양된 세포는 3일에 한번씩 배양액을 교체하였으며 9일에 한번씩 계대 배양하였다.

골수간엽줄기세포의 조골세포로의 분화. 골수간엽줄기 세포의 조골세포로의 분화는 골분화 배지 (DMEM+10% FBS+1% 항생제+10 mM β -글리세롤포스페이트+ 10^{-8} M 덱사메타손+ 10^{-8} M 비타민 D₃)를 이용하였다. 4주 후 Wright-Giemsa, Alizarin red, von Kossa 염색을 통하여 조골세포로의 분화를 확인하였다. 골분화 배지는 4가지 그룹으로 나누어 β -글리세롤포스페이트, 덱사메타손, 비타민 D₃의 인자가 조골세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보았다 (Table 2). 그룹 I은 성장배지 (DMEM)에 β -글리세롤포스페이트를 첨가한 것이고, 그룹 II는 성장배지에 β -글리세롤포스페이트와 비타민 D₃를 첨가한 것, 그룹 III는 성장배지에 β -글리세롤포스페이트와 덱사메타손을 첨가한 것이고 마지막 그룹 IV는 성장배지에 β -글리세롤포스페이트, 비타민 D₃, 및 덱사메타손을 첨가한 것이다. 이들의 조골세포분화 정도는 ALP 염색과 ALP 활성

Table 2. The Condition of Medium for Osteogenesis of BMSCs

groups	condition of medium
Group I	DMEM +FBS +antibody + β -glycerophosphate
Group II	DMEM +FBS +antibody + β -glycerophosphate +vitamin D ₃
Group III	DMEM +FBS +antibody +Dexametasone + β -glycerophosphate
Group IV	DMEM +FBS +antibody +dexametasone + β -glycerophosphate +vitamin D ₃

을 측정하여 확인하였다.

In vivo 환경에서의 골형성 효과. In vivo 환경에서의 조직공학적 골형성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 생후 4주된 쥐의 등쪽 부분을 2~3 cm 정도 절개하고 PLA, PLA/DBP, PLGA 및 PLGA/DBP 지지체와 여기에 BMSCs를 1×10^5 개/cell을 파종시킨 PLA/BMSCs, PLA/DBP/BMSCs, PLGA/BMSCs, 및 PLGA/DBP/BMSCs를 이식하고, 4주가 지난 후에 지지체를 10% 포르말린에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록을 제작한 후에 3 µm로 자른 후 슬라이드에 고정하고 조직학적 평가를 하기 위하여 H&E 염색과 von Kossa 염색을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조. PLA, PLA/DBP (50%), PLGA, 및 PLGA/DBP (50%) 다공성 지지체는 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 제조하였다. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조한 다공성 지지체의 SEM 사진은 Figure 4에 나타내었다. 외형적 형태는 실리콘 몰드의 빈 공간과 똑같은 디스크 형태로 얻어졌으며, 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 몰드의 형태에 여러 형태의 지지체의 제조가 가능하였으며, 몰드 직경에 따라 지지체의 직경도 조절이 가능했고, 두께 역시 조절이 가능함을 알 수 있었다. 염의 크기 (180~250 µm, 250~355 µm)에 따라 지지체에서도 염과 유사한 크기의 다공이 나타났다. 이는 염의 크기와 양을 조절함으로써 지지체의 다공크기와 다공도를 조절할 수 있다는 것이다. 지지체의 내부, 옆면의 다공 구조는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다. DBP가 함유된 지지체와 DBP가 함유되지 않는 지지체의 다공형태는 형태학적으로 큰 차이가 관찰되지 않았으며 이러한 결과는 DBP가 다공형태에 큰 영향을 주지 않는다고 사료된다.

수은 다공도계 분석. Table 1에서 수은다공도계 분석 결과를 나타내었다. 평균다공 크기는 염의 크기가 180~250

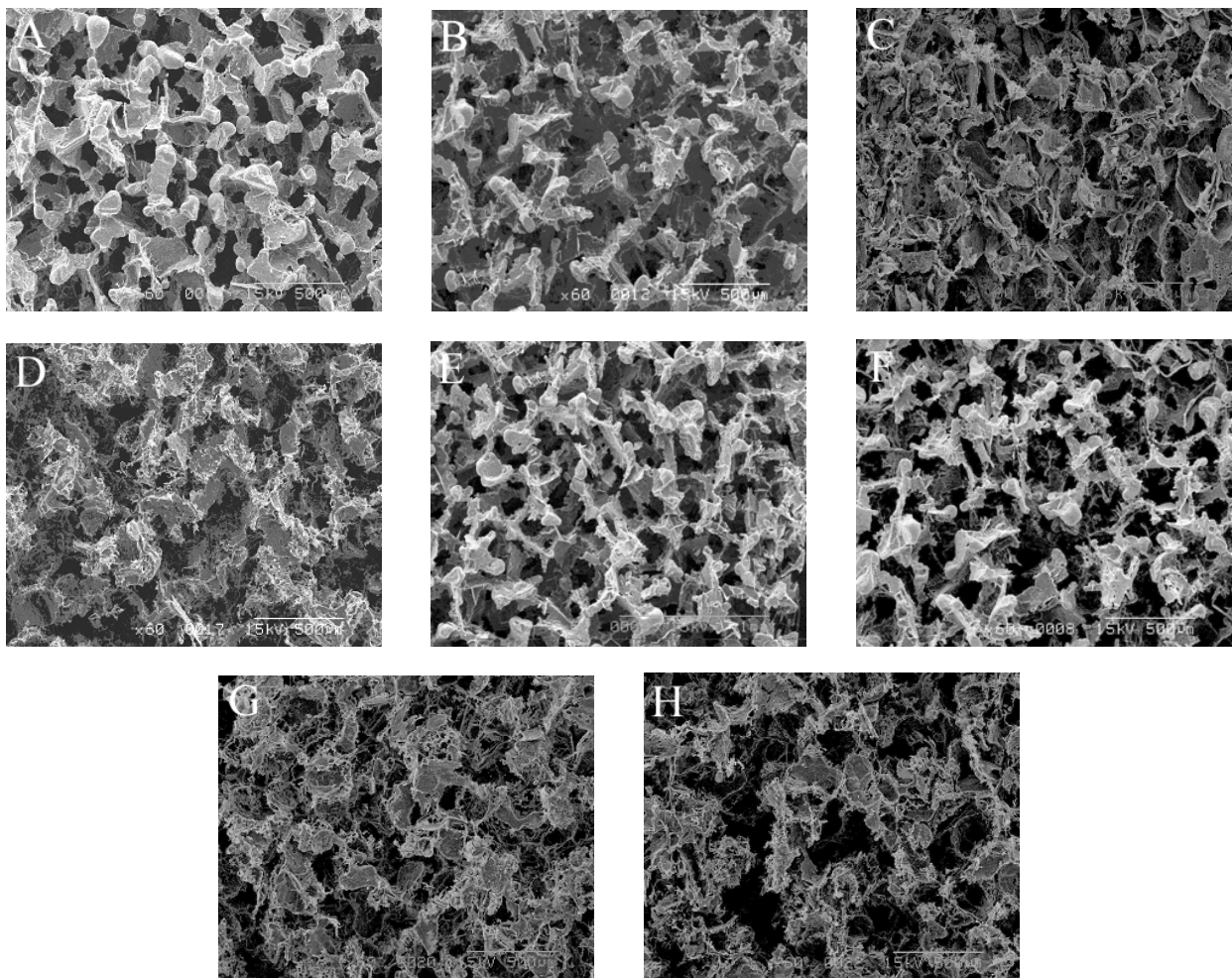


Figure 4. SEM micrographs of DBP/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching. (A) PLA (180~250 μm), (B) PLA (250~355 μm), (C) PLA/DBP (180~250 μm), (D) PLA/DBP (250~355 μm), (E) PLGA (180~250 μm), (F) PLGA (250~355 μm), (G) PLGA/DBP (180~250 μm), and (H) PLGA/DBP (250~355 μm).

μm 보다 250~355 μm 의 지지체에서 큰 것을 확인하였고, 다공도는 모든 샘플에서 90%이상의 높은 다공도를 나타내었다. 모든 샘플은 상호다공연결성이 우수하다고 사료되며, DBP의 함량에 크게 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. Figure 5에 다공 분포를 나타내었는데, DBP의 함량이 50%정도 되어도 다공크기 및 다공도에 큰 영향을 주지 않아 일정한 형태의 다공성 지지체의 제조가 가능한 것으로 사료된다.

골수간엽줄기세포의 분리 및 배양. 골수간엽줄기세포는 기부자로부터 분리하여 배양하였으며, 4번 정도 계대 배양 후 세포를 관찰한 결과, 전형적인 골수간엽줄기세포의 형태를 관찰할 수 있었다. 4주 정도 배양하여 실험에 필요한 정도의 세포를 얻을 수 있었다.

골수간엽줄기세포의 조골세포로의 분화. 골수간엽줄기

세포가 조골세포로 분화되는지 확인하기 위하여 골분화 배지를 처리하고 4주 후 Wright-Giemsa, Alizarin red, 및 von Kossa 염색을 실시하였다. 염색 결과는 Figure 6에 나타내었고, von Kossa 염색 결과에서 조골세포에서 발견되는 칼슘형성을 확인할 수 있었다. 또한 골분화 배지에서 골분화 인자들의 영향을 확인하기 위하여 4가지 그룹으로 배지를 조성하여 골분화 실험을 하였고 4주 후 ALP 염색과 ALP 활성으로 분석한 결과를 Figure 7과 Table 3에 나타내었다. ALP 염색결과 그룹 I, III, II, 및 IV의 순으로 염색이 강하게 되었으며, 그룹 II와 III을 비교하여 보았을 때 덱사메타손 보다 비타민 D₃가 더 강한 골분화 효과를 가진다고 사료되며, β -글리세롤포스페이트, 덱사메타손, 비타민 D₃가 함유된 배지에서 비교적 강한 골분화 효과를 가진다. 또한 ALP 활성을 측정된 결과는 그룹 I에서 13.7

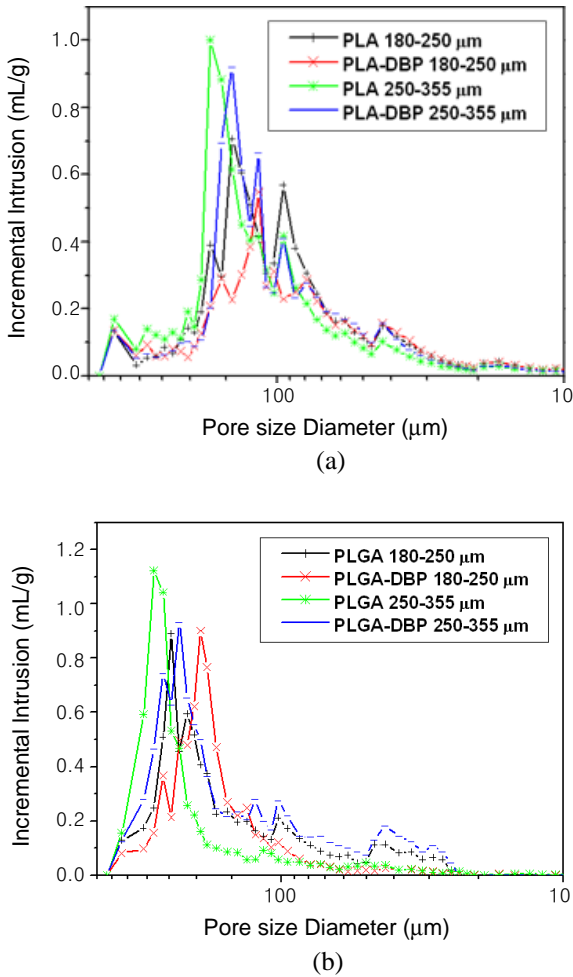
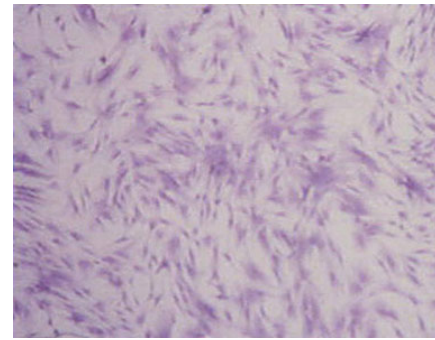


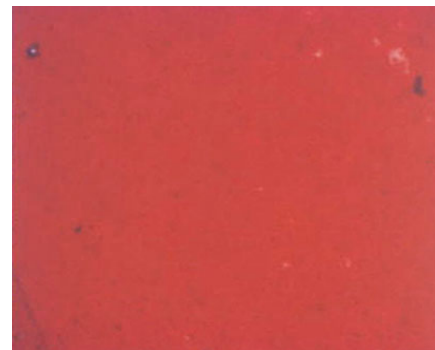
Figure 5. Pore size distribution of (a) PLA/DBP and (b) PLGA/DBP scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching.

± 4.63 , 그룹 II에서 30.3 ± 19.53 , 그룹 III에서 18.88 ± 7.47 , 그룹 IV에서 40.24 ± 24.2 로 나타났다. 그룹 III에서 보다 그룹 II에서 높은 ALP 활성을 가졌으며, 그룹 IV에서 가장 강한 ALP 활성을 가졌다.

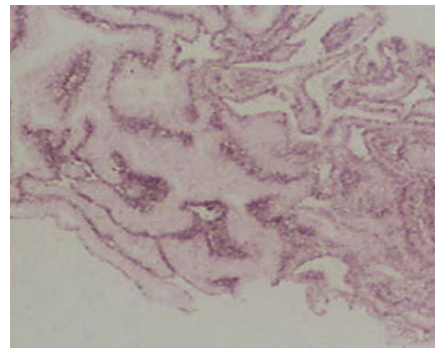
In vivo 환경에서의 골 형성 효과. PLA와 PLGA에 DBP를 함유시킨 지지체를 제조하고 여기에 골수간엽줄기세포를 파종시켜 골분화 정도를 확인하고자 하였다. 면역 결핍 누드마우스의 피하에 지지체를 삽입하고 4주 후 꺼내어 조직을 10% 포르말린 수용액으로 고정한 후 3 μm 로 절단하여 슬라이드에 고정시키고 H&E, von Kossa 염색을 하였다. 먼저 골세포의 형태를 확인하기 위하여 H&E 염색을 하였다. Figure 8을 보면 미분해된 PLA와 PLGA를 관찰할 수 있고, 신생혈관과 새로운 조직의 형성을 확인할 수 있다. PLA/DBP와 PLGA/DBP 지지체를 관찰하면 DBP 영역에 세포들이 콜라겐 막을 중심으로 그 주위를 일정한 방향으로 배열하고 있음을 관찰할 수 있



(a)



(b)



(c)

Figure 6. Photographs of histochemical staining for (a) Wright-Giemsa, (b) Alizarin reds, and (c) von Kossa.

다. 또한 DBP 주위에 매크로파지로 사료되는 대식세포의 형성을 확인할 수 있고, 이는 DBP가 어느 정도의 감염반응을 일으키기 때문이라 사료된다. DBP가 골형성에 영향을 주는지 더 정확히 확인하기 위하여 칼슘형성을 확인할 수 있는 von Kossa 염색을 실시하였다. von Kossa 염색결과 PLA와 PLGA 지지체에서는 칼슘형성을 확인하지 못하였다. 하지만 PLA/DBP와 PLGA/DBP 지지체에서는 광범위한 칼슘형성 영역을 확인하였다. 마찬가지로 PLA와 PLGA에 BMSCs를 파종시킨 지지체에서는 칼슘형성을 확인하지 못하였지만, PLA/DBP와 PLGA/DBP에

BMSCs를 파종시킨 지지체에서는 칼슘형성 영역을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 PLA나 PLGA와 같은 고분

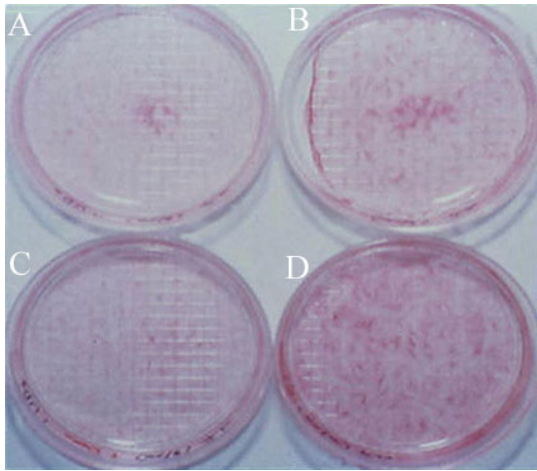


Figure 7. Photographs of histochemical staining for ALP (A) group I medium, (B) group II medium, (C) group III medium, and (D) group IV medium.

Table 3. ALP Activity of BMSCs

groups	2 weeks (n = 12)
Group I	13.7 ± 4.63
Group II	30.3 ± 19.53
Group III	18.88 ± 7.47
Group IV	40.24 ± 24.2
ρ -Value	0.68

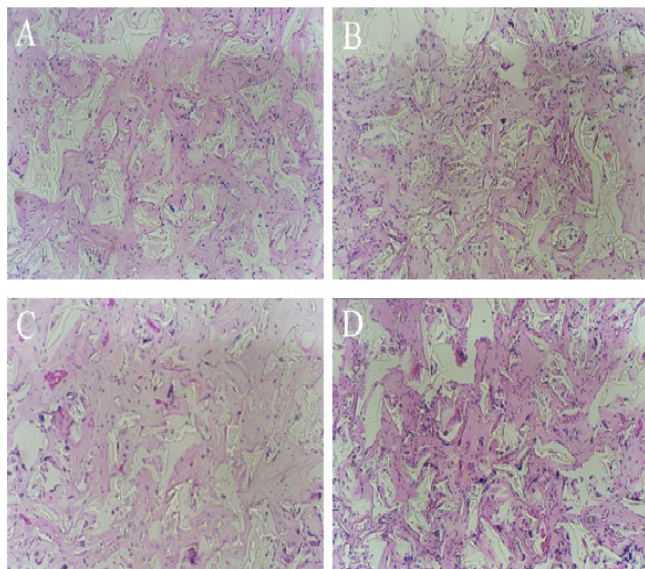


Figure 8. Photographs of histochemical staining for H&E (After 4 weeks): (A) PLA ($\times 100$), (B) PLA/DBP ($\times 100$), (C) PLGA ($\times 100$), and (D) PLGA/DBP ($\times 100$).

자 자체가 골형성에 어떠한 영향도 가지고 있지 않으며, 또한 골분화 인자가 없이 미분화된 BMSCs의 이용도 골형성에 영향을 주지 않는다고 사료된다. 반면 골분화 성장인자인 BMP를 함유하고 있는 DBP를 넣은 지지체에서는 지지체 자체만으로도 피하 층에 분포되어 있던 미분화된 줄기세포를 자극하여 골세포로 분화시켰고, 또한 BMSCs를 파종한 지지체에서는 BMSCs가 골세포로 분화되었을 뿐만 아니라 피하 층의 미분화 줄기세포도 골세포로 분화하였으리라 사료된다. BMSCs가 파종된 지지체에서는 줄기세포의 영향으로 더 많은 조직이 형성되었고, 칼슘형성 영역도 광범위하게 나타났다고 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 생체적합성 고분자인 PLA와 PLGA에 골형성 자극을 가지는 DBP를 함유시켜 다공성 지지체를 제조하여 골조직 공학에 응용하고자 하였다.

첫 번째로 다공성 지지체의 제조는 용매 캐스팅/염 추출법을 사용하여 제조하였고 제조한 지지체의 다공도는 90% 이상, 100 μm 내외의 다공크기를 가졌다.

두 번째로 골수간엽줄기세포의 골세포 분화는 골분화 배지를 사용하였다. 조골세포로의 분화를 확인하기 위하여 Wright-Giemsa, Alizarin red, 및 von Kossa 염색을 실시하여 조골세포에서 발현되는 칼슘형성을 알아보았다. 위의 염색을 통해 골수간엽줄기세포를 골분화 배지로 분화가 가능하였음을 확인하였고, β -글리세롤포스페이트, 비타민 D_3 , 및 덱사메타손이 골분화에 중요한 인자이며, 덱사메타손보다 비타민 D_3 가 더 중요한 작용을 한다고 사료된다.

세 번째로 DBP와 BMSCs가 새로운 골조직 형성에 주는 영향을 확인을 하였다. H&E 염색의 결과에서 4주 후 새로운 조직의 형성을 확인할 수 있었으며, DBP가 함유된 지지체에서는 DBP 주위로 조골세포로 사료되는 세포가 배열하고 있으며 또한 매크로파지로 사료되는 세포가 형성되었음을 확인하였다. 또한 von Kossa 염색에서 DBP 자체와 그 주위에 광범위한 칼슘형성 영역을 확인할 수 있었다. 이는 DBP가 가진 BMP 등의 골세포에 자극을 주는 인자가 피하 층에 존재하는 미분화된 줄기세포를 골세포로 분화시켰거나, 미리 파종시킨 BMSCs가 골세포로 파종된 결과라고 사료된다.

결론적으로 PLA 및 PLGA에 DBP를 50% 함유시킨 지지체의 제조가 가능하였으며 DBP가 함유된 지지체는 생체 내에서 새로운 골조직을 형성한다는 것을 H&E와 von Kossa 염색을 통하여 확인하였다. 이는 DBP가 새로운 골조직의 형성에 매우 우수한 효과를 나타내는 것

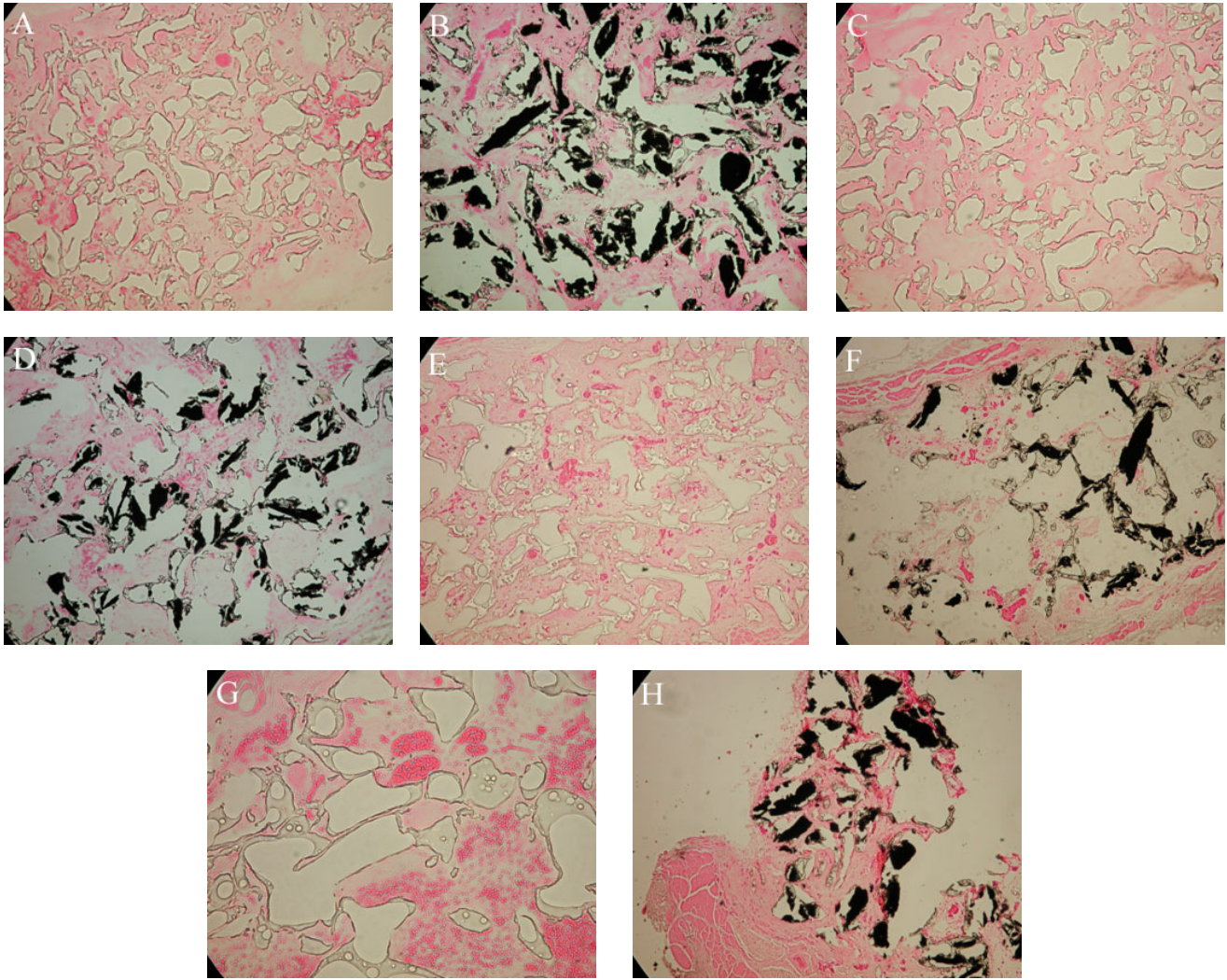


Figure 9. Photographs of histochemical staining for von Kossa (After 4 weeks): (A) PLA, (B) PLA/DBP, (C) PLA/BMSCs, (D) PLA/DBP/BMSCs, (E) PLGA, (F) PLGA/DBP, (G) PLGA/ BMSCs, and (H) PLGA/DBP/BMSCs.

으로 확인되었다. 현재 DBP의 함량에 따른 지지체의 제조, DBP 함유량의 최적조건 설정, 시간에 따른 골형성의 메커니즘, BMSCs와의 상호작용 메커니즘 및 세포 성장과 분화에 대한 영향을 실험 중에 있다.

감사의 글 : 본 연구는 보건복지부 (01-PJ11-PG9-01NT00-0011, 0405-BO01-0204-0006)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

1. 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).
2. E. Wintermantel, J. Mayer, J. Blum, K. L. Eckert, P. Luscher, and M. Mathey, *Biomaterials*, **17**, 83 (1996).
3. S. P. Baldwin and W. M. Saltzman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **33**, 71 (1998).
4. C. M. Agrawal, G. G. Niederauer, D. M. Micallef, and K. A. Athanasiou, "The use of PLA-PGA Polymers in Orthopedics", in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, 2nd Eds., Marcel Dekker, New York, p 1055 (1995).
5. J. O. Hollinger and J. P. Schmitz, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **45**, 594 (1987).
6. O. Bostman, *J. Bone Joint Surg.*, **73**, 148 (1991).
7. K. A. Athanasiou, A. R. Singhal, C. M. Agrawal, and B. D. Boyan, *Clin Orthop.*, **315**, 272 (1995).
8. L. G. Cima, J. P. Vacanti, C. Vacanti, D. Ingber, D. Mooney,

- and R. Langer, *J. Biomech. Eng.*, **113**, 143 (1991).
9. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **14**, 323 (1993).
 10. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
 11. C. B. Huggins and M. R. Urist, *Science*, **167**, 896 (1971).
 12. J. Wang and M. J. Glimcher, *Calcif. Tissue Int.*, **65**, 156 (1999).
 13. J. Wang and M. J. Glimcher, *Calcif. Tissue Int.*, **65**, 486 (1999).
 14. J. Wang, R. Yang, L. C. Gerstenfeld, and M. J. Glimcher, *Calcif. Tissue Int.*, **67**, 314 (2000).
 15. H. D. Adkinsson, J. Strauss-Schoerenberger, M. Gillis, R. Wilkins, M. Jackson, and K. A. Hruska, *J. Orthop. Res.*, **18**, 503 (2000).
 16. S. Mizuno and J. Glowacki, *Exp. Cell. Res.*, **227**, 89 (1996).
 17. C. Lasa, J. Hollinger, W. Drohan, and M. MacPhee, *Plast. Reconst. Surg.*, **96**, 1409 (1995).
 18. S. Mizuno and J. Glowacki, *Biomaterials*, **17**, 1819 (1996).
 19. K. Whang, C. H. Thomas, and K. E. Healy, *Polymer*, **36**, 837 (1995).
 20. M. B. Habal, *Clin. Orthop.*, **188**, 239 (1984).
 21. J. M. Lane and H. S. Sandhu, *Orthop. Clin. North Am.*, **18**, 213 (1997).
 22. H. E. Jergesen, J. Chua, R. T. Kao, and L. B. Kaban, *Clin. Orthop.*, **268**, 253 (1991).
 23. N. C. Rath and A. H. Reddi, *Nature*, **278**, 855 (1979).
 24. G. Khang, P. Shin, I. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
 25. M. K. Choi, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 318 (2001).
 26. E. K. Jeon, J. Y. Shim, H. J. Whang, G. Khang, I. Jo, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **5**, 23 (2001).
 27. E. K. Jeon, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
 28. H. S. Kim, I. Lee, J. M. Lee, C. W. Han, J. H. Sung, M. Y. Park, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Korea Soc. Endocrinology*, **17**, 206 (2002).
 29. S. J. Lee, D. H. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 201 (2002).
 30. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, I. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **27**, 226 (2003).
 31. G. Khang, C. S. Park, J. M. Rhee, S. J. Lee, Y. M. Lee, I. Lee, M. K. Choi, and H. B. Lee, *Korea Polym. J.*, **9**, 267 (2001).
 32. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 27 (1993).
 33. H. L. Ritter and L. C. Drake, *Ind. Eng. Chem.*, **17**, 782 (1945).
 34. D. M. Smith, D. W. Hua, and W. L. Earl, *MRS Bull.*, **19**, 44 (1994).
 35. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, **14**, 323 (1993).