

SIS/PLGA 담체와 근육유래 줄기세포를 이용한 생체조직공학 골재생

김순희 · 윤선중 · 장지옥* · 김문석* · 강길선[†] · 이해방*

전북대학교 유기신물질공학과, *한국화학연구원 나노생체재료연구팀

**가톨릭 의과대학 정형외과

(2005년 6월 28일 접수, 2006년 1월 4일 채택)

Effects of SIS/PLGA Porous Scaffolds and Muscle-Derived Stem Cell on the Formation of Tissue Engineered Bone

Soon Hee Kim, Sun Jung Yun, Ji Wook Jang*,
Moon Suk Kim*, Gilson Khang[†], and Hai Bang Lee*

Department of Advanced Organic Material Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin Dong 1Ga, Dukjin Ku, Jeonju 561-756, Korea

*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,

P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

(Received June 28, 2005; accepted January 4, 2006)

초록 : 조직공학 기술은 *in vitro*와 *in vivo*에서 초기 세포 부착과 차후의 조직형성을 위해 3차원적인 지지체로서 다공성의 생분해성 담체의 사용이 필수적이다. 소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS)은 고유의 인장력과 생체적 합성 때문에 생체물질로서 사용될 잠재력을 가지고 있는 콜라겐 조직이다. 근육유래 줄기세포는 배양조건에 따라 골세포, 연골세포, 및 근육세포 등으로 분화가 가능하다고 알려져 있다. 본 연구에서는 SIS를 함유한 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA) 다공성 지지체를 용매캐스팅/염추출법으로 제조하였고, 전자주사현미경 및 수은다공측정계를 이용하여 특성을 결정하였다. 세포의 생존율과 성장률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) 분석 방법을 이용하였고 골로 분화된 세포를 알칼라인 포스파테이즈(ALP) 활성을 측정하여 확인하였다. SIS가 함유된 지지체와 SIS가 함유되지 않은 지지체를 면역결핍 쥐의 피하에 삽입하여 이들의 골형성 정도를 비교하여 보았다. 조직을 파라핀으로 고정시켜 슬라이드를 제조한 후 hematoxylin과 eosin, 트라이크롬 및 분쿠사 염색을 실시하였다. 천연/합성 하이브리드 담체로서의 SIS/PLGA 담체가 PLGA 단독으로 사용하였을 때와 비교하여 볼 때 골형성이 우수하였는데 이는 SIS 내에 함유하고 있는 여러 생체활성분자에 기인한 것으로 추측되었다.

Abstract : Tissue engineering techniques require the use of a porous biodegradable/bioresorbable scaffold, which serves as a three-dimensional template for initial cell attachment and subsequent tissue formation in both *in vitro* and *in vivo*. Small intestinal submucosa (SIS) has been investigated as a source of collagenous tissue with the potential to be used as biomaterials because of its inherent strength and biocompatibility. SIS-loaded poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds were prepared by solvent casting/particle leaching. Characterizations of SIS/PLGA scaffold were carried out by SEM, mercury porosimeter, and so on. Muscle-derived stem cells can be differentiated in culture into osteoblasts, chondrocytes, and even myoblasts by the controlling the culture environment. Cellular viability and proliferation were assayed by 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) test. Osteogenic differential cells were analyzed by alkaline phosphatase (ALP) activity. SIS/PLGA scaffolds were implanted into the back of athymic nude mouse to observe the effect of SIS on the osteoinduction compared with controlled PLGA scaffolds. Thin sections were cut from paraffin embedded tissues and histological sections were conducted hematoxylin and eosin (H&E), Trichrome, and von Kossa. We observed that bone formation of SIS/PLGA hybrid scaffold as natural/synthetic scaffold was better than that of only PLGA scaffold. It can be explained that SIS contains various kinds of bioactive molecules for osteoinduction.

Keywords : small intestinal submucosa, PLGA, scaffold, muscle-derived stem cells, osteoinduction.

서 론

생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 담체를 생

체조직에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 형성하게 하는 일련의 기법을 생체조직공학이라고 한다.¹ 생체조직공학은 세포 배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합이며, 이러한 조직공학 기법을 이용하여 연골세포와 골세포로 연골조직과 골조직을 얻을 수 있고 담체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 구조할 수가 있다. 생체

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

조직공학에 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 심어 주게 되는데 이때 사용되는 고분자의 구조는 화학적 형상이나, 미세 구조학적 성상이 세포와 친화력이 있어야 한다.^{2,5}

최근 α -하이드록시산 계열인 폴리글리콜라이드(PGA), 폴리락타이드(PLA), 및 그들의 공중합체인 PLGA는 미국 FDA의 승인을 받은 합성고분자로서 조직공학적 다공성 지지체, 약물전달 시스템 등의 생체재료로 널리 이용되고 있다.⁶ PLGA는 높은 생체적합성, 생분해성, 가공성을 가지고 있으며, 단량체량을 조절함으로써 분해기간을 조절할 수 있다.^{7,9} 현대 산업사회에서 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 나이에 따라 골밀도의 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골 형성 부진증 같은 질환에 의한 성장부진 등과 같은 다양한 문제들에 대한 효과적인 재건방법이 대두되고 있다.¹⁰ 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.¹¹⁻¹³

조직공학적인 골형성이 이런 단점을 해결하고 골결손을 치료할 수 있도록 많은 연구가 진행되고 있는데, 골조직공학의 목적은 골이 필요한 부위에 골형성을 유도하고 실제 골조직을 개발하는데 있다. 조직공학에 의한 골조직의 형성을 위해 골생성을 유도하는 골아전구 세포, 이런 세포들이 적당한 위치에서 증식 분화할 수 있는 담체, 그리고 골조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도 성장인자들이 필요하다.¹⁴ 이에 전 연구에서는 항생제인 황산겐타마이신이 혼합된 PLGA 담체,¹⁵ 신경성장인자가 혼합된 PLGA 담체,^{16,17} 비타민 D₃가 함유된 PLGA 담체^{18,19} 및 이프리플라본을 함유한 담체²⁰ 등을 제조하여 이들의 생체활성분자가 조직성장에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다. 또한 이전 실험에서 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particle, DBP)을 이용하여 DBP 및 DBP를 함유한 PLGA 담체가 생체 내에서 새로운 골형성을 유도한다는 것을 확인하였다.^{14,21-23}

이러한 일련의 연구를 바탕으로 본 연구에서는 PLGA 담체의 생체활성력이 결여되어 있는 단점을 개선하고자 그리고 골형성에 도움을 주는 성장인자를 가지고 있는 소장점막하조직(small intestinal

submucosa, SIS)을 응용함으로써 골형성 촉진을 꾀하려 하였다.^{2,24-31} SIS는 세포의 성장, 분화 및 이동에 유리한 작용을 하는 생리활성물질인 섬유아세포 성장인자, 전환성장인자, 혈관 내피세포 성장인자, 신경성장인자 등을 다량 함유하고 있고 수분을 90% 이상 흡수할 수 있어서 재료에 친수성을 부여해줄 뿐만 아니라 생분해성을 가지고 있어 미국의 Cook사(Cook Group Inc., Bloomington, USA)에서 Oasis[®]와 Surgisis[®] 등으로 상품화되어 있다.^{2,14,24,31} 본 연구에서는 지지체 내에 함유된 SIS가 근육유래 줄기세포(muscle-derived stem cells, MDSCs)의 골형성에 미치는 영향을 확인하였다.³²⁻³⁴

실 험

시약 및 재료. 평균분자량이 90000(90 K) g/mole인 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 75/25, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd., Germany)와 평균분자량이 110000(110 K) g/mol인 PLGA(락타이드/글라이콜라이드 몰비 50/50, Resomer[®] RG 756, Boehringer Ingelheim Chem. Co. Ltd.)인 것을 사용하였다. 또한 염화나트륨(Orient Chem. Co., Korea)은 다공 생성물질로 사용하였는데 본 실험에서 요구되는 크기로 선별하기 위하여 각 크기별 분자체를 사용하였다. 메틸렌클로라이드(Tedia Co. Inc., USA) 등의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다. SIS는 동결건조 후 동결 분쇄하여 약 20 μ m 크기의 분말 형태로 얻었다 (Figure 1 (C)).

용매 캐스팅/염 추출법을 이용한 다공성 지지체의 제조. SIS와 PLGA를 용매 캐스팅/염 추출법을 이용하여 다공성 지지체를 제조하였다.^{22,35} 이 때, PLGA 1 g의 0, 10, 20, 40 및 80 wt%인 0, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 g에 해당하는 SIS를 첨가하였으며 다공형성물질로 이용된 염화나트륨은 250~355 μ m로 선별하여 혼합하였다. 실리콘 몰드는 직경 15 mm 및 두께 5 mm 크기의 것을 이용하였다. 이들의 제조 모식도를 Figure 2에 나타내었다.

SIS를 함유한 다공성 지지체의 표면 특성. 상기의 방법들을 사용하여 제조한 다공성 PLGA 지지체의 표면, 옆면 및 내부의 다공형태를 SEM(S-2250N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 면도칼로 5×5×1 mm의 크기로 절단하고 양면테이프를 이용하여 샘플 폴더에 고정시키고 플라즈마 스퍼터(Ermitex, K575, UK)를 이용하여 200 Å 두께의 백금을 코팅하여 촬영한 사진으로 다공의 형태 및 크기를 확인하였다.

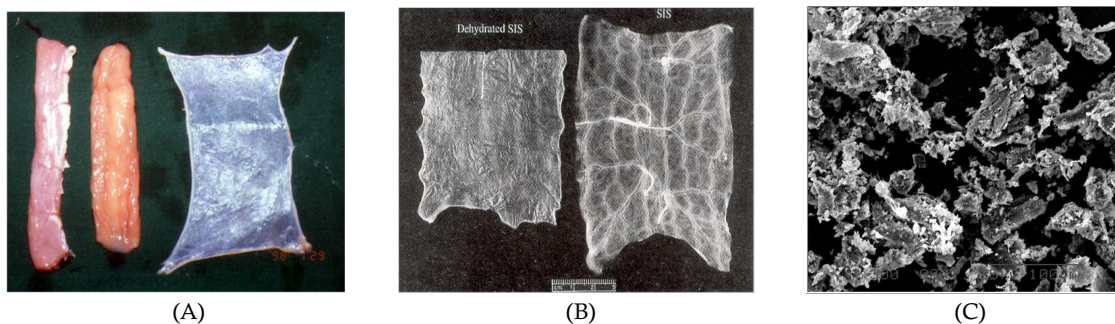


Figure 1. The preparation processing of SIS: (A) Section of porcine jejunum, (B) SIS, and (C) SEM microphotographs after freezer-milled SIS powder ($\times 100$).

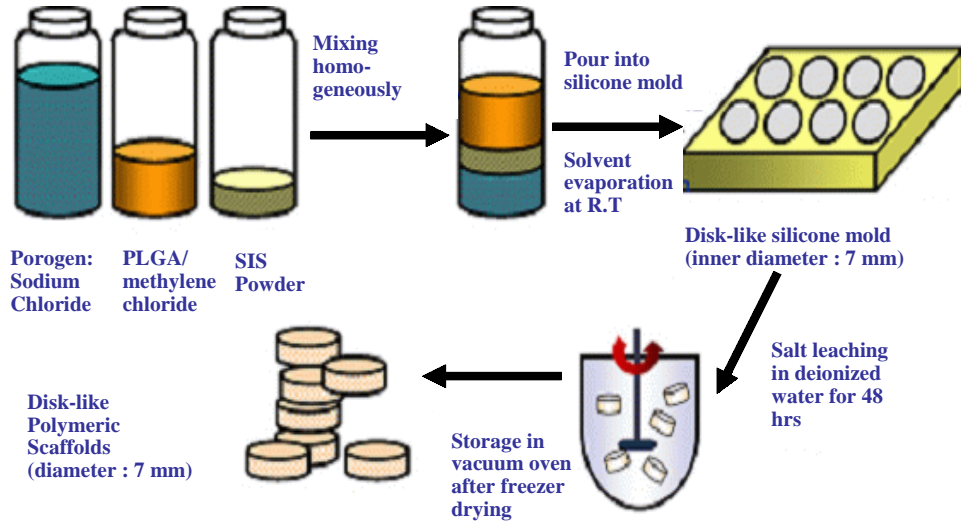


Figure 2. Schematic representation of the solvent casting/salt leaching method to fabricate SIS/PLGA scaffolds.

수는 다공도계 분석. 상기의 여러 방법들을 사용하여 제조한 다공성 지지체의 다공크기 분포, 비다공면적, 평균 다공직경 및 다공도를 측정하기 위하여 수는 다공도계(Micromeritics Co., Model Auto Pore II 9220, USA)를 이용하였다.^{22,36} 사용된 PLGA 지지체의 질량, 측정수은체적, 수은압력 및 최대압력은 각각 0.1 g, 6.7~7.3 mL, 3.4 KPa 및 414 MPa 이었다. 수은표면장력으로 485 dyne/cm를 사용하였으며 수은과 PLGA 표면의 접촉각인테 접촉각 측정기(Model 100-0, Rame-Hart Inc., USA)를³⁷ 이용하여 실측한 결과 160° 이었다. 다공도 ϵ 는 다음의 식

$$\epsilon = \frac{V_i}{V_i + \frac{1}{\rho}}$$

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

친수성 실험. SIS 함량에 따른 다공성 지지체의 친수성 효과를 살펴 보기 위하여 지지체 위에 트리판블루 염료를 떨어뜨리고 시간에 따른 흡수 정도를 관찰하여 보았다. 트리판블루 염료를 떨어뜨리고 1, 10 및 60분 후의 염료 침투 효과를 사진을 찍어 관찰하였다.

In vitro 분해도 실험. SIS 함량에 따른 PLGA 지지체의 분해도를 알아보기 위하여 0.2% 콜라게네이즈 I 형(Sigma Co., USA)을 이용하여 분해 실험을 실시하였다. 1 g의 SIS/PLGA 90 K 지지체와 PLGA 110 K 지지체를 콜라게네이즈 용액에 침지시켜 37 °C에서 흔들어주었다. 용액은 매일 교환해 주었으며, 실험이 끝난 후 증류수로 씻은 뒤 동결 건조하여 질량을 측정하였다.

근육유래 줄기세포의 분리. 근육유래 줄기세포는 5주된 암컷 Jackson 마우스의 뒷다리 대퇴부 근육에서 분리하여 사용하였다. 마우스를 케타민(Yuhan Co., Korea)과 럼폰(Yuhan Co.) 혼합액으로 마취시킨 후 뒷다리의 털을 제거하였다. 멸균된 수술용 가위로 뒷다리를 절단하여 근육만 분리하였다. 분리한 근육을 인산완충용액(PBS, pH 7.2; Gibco, USA)으로 헹군 뒤 블레이드로 잘게 자르고 0.2%의 콜라게네이즈 XI형(Worthington, Freehold, USA) 용액에서 1시간 동안 처리하고 원심분리 후 상층액을 제거하고 0.1%의 디스파아제(Boehringer

Mannheim, Mannheim, Germany)를 첨가하여 1시간 동안 처리한 후 마지막으로 0.1%의 트립신(Trypsin-EDTA, Gibco) 용액으로 30분간 처리하였다. 처리된 조직을 18, 20 및 22 게이지 니들로 피펫팅하여 물리적으로 세포를 분리한 후 T-25 플라스크에 플레이트 하였다. 플레이트시 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco)에 10% 우태혈청(FBS, Gibco), 10% 말혈청(HS, Gibco), 및 2% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 µg/mL 스트렙토마이신, Gibco)를 첨가한 성장배지에 세포를 부유시킨 후 플레이트 하였다. 순수한 근육 유래줄기세포를 분리하기 위해 플레이트(PP#1)하고 1시간 후 상층액을 걷어 다른 플라스크에 플레이트(PP#2)하였다. 24시간 후 상층액을 걷어 다른 플라스크에 플레이트(PP#3)하였다. 이런 방법으로 하루에 한 번씩 플레이트 하여 PP#6까지 진행시켰다. 이 방법을 프리플레이트 방법이라 하며 프리플레이트 후 성장배지를 이용하여 세포를 배양하였다.^{32,34} 본 실험에 4대 계대배양 후 5대 째의 계대배양 세포를 이용하였다.

MTT 분석. 세포성장률은 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. 제조된 지지체에 근육유래 줄기세포를 1×10^5 개로 계산하여 파종 후, 1, 3, 7, 14, 및 21일째 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co.) 용액(50 µg/mL)을 100 µL 씩 넣고 4시간 동안 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 헹구고 디메틸설폭사이드(Sigma Co.) 용액을 1 mL 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 교반하였다. 96 well 플라스크에 샘플을 100 µL씩 분주하고 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁵

ALP활성 측정. 근육유래 줄기세포가 지지체내에서 골세포로 분화하였는지 확인하여 보기 위하여 조골세포에 특이적으로 발현하는 ALP 활성을 측정하였다. 3주 동안 배양한 샘플을 1, 3, 7, 14, 및 21일째 배지를 제거하고 PBS로 3번 헹군 후 0.02%의 Nonidet P-40(Fluka Co., Japan) 용액을 1 mL 넣어 세포의 세포막을 용해시켰다. ALP 리간트(Sigma Co.)에 3차 증류수 20 mL를 넣어 가볍게 흔들어 용해시킨 후 세포를 녹인 용액 50 µL에 ALP 리간트 150 µL를 넣고 37 °C 인큐베이터에서 1시간 동안 배양시켰다. 2 N의 NaOH 용액을 넣

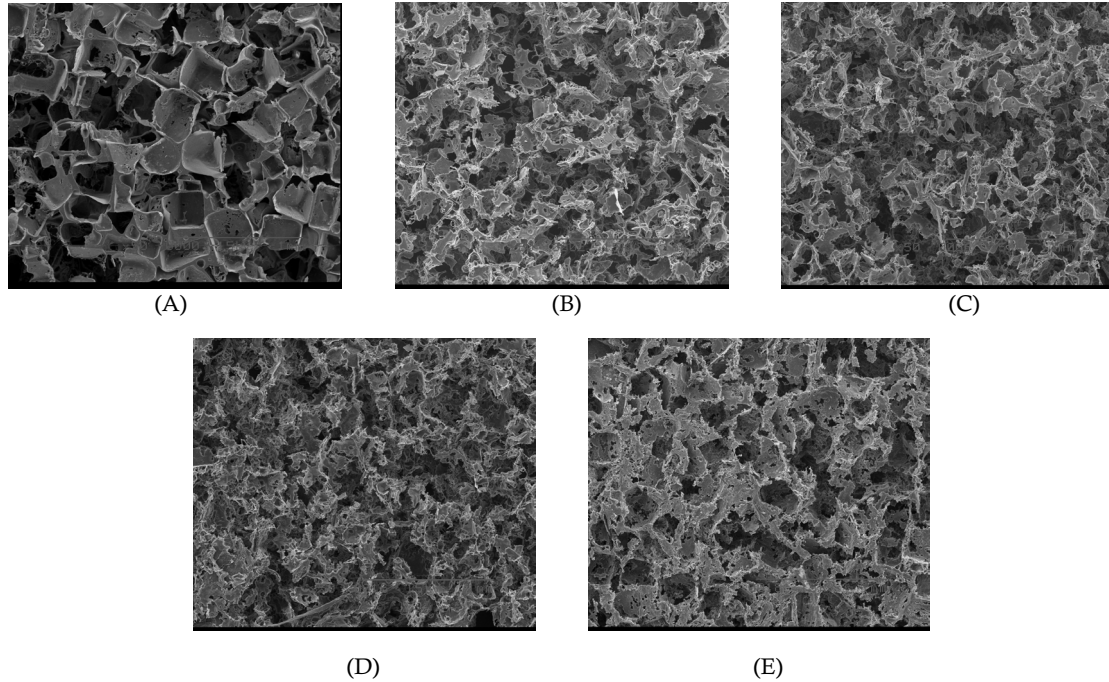


Figure 3. SEM micrographs of SIS/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching: (A) PLGA, (B) PLGA/SIS (10 wt%), (C) PLGA/SIS (20 wt%), (D) PLGA/SIS (40 wt%), and (E) PLGA/SIS (80 wt%) ($\times 100$).

어 반응을 중지시키고 96 well 플레이트에 100 μ L씩 반응시킨 용액을 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

In vivo 환경에서의 SIS를 함유한 지지체에서의 골형성. *In vivo* 환경에서의 조직공학용 골형성을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 비율별 SIS가 함유된 PLGA 지지체에 1×10^6 cells/scaffold의 근육유래 줄기세포를 파종시켜 생후 4주된 쥐의 등 쪽 부분을 2~3 cm 정도 절개하고 이식을 하였으며, 4주가 지난 후에 지지체를 적출하여 10% 포르말린에 고정하였다. 고정된 지지체를 파라핀 블록으로 제작한 후에 3 μ m로 자른 후 슬라이드에 고정하고 조직학적 평가를 하기 위하여 H&E, 트라이크롬, 그리고 본쿠사 염색을 실시하였다.

결과 및 토론

SIS를 함유한 다공성 지지체의 제조 용매 캐스팅/염 추출법으로 SIS를 함유한 다공성 지지체를 제조하였다. SIS를 혼합하여 다공성 지지체를 제조하여도 물성의 변화가 크지 않고 일정한 크기의 다공성 지지체를 제조할 수 있었다.^{25,26,30}

SIS를 함유한 다공성 지지체의 특성. 용매 캐스팅/염 추출법으로 제조한 다공성 PLGA 지지체의 SEM 사진은 Figure 3에 나타내었다. 외형적 형태는 실리콘 몰드의 빈 공간과 똑같은 디스크 형태로 얻어졌으며, 수축, 부풀림, 불규칙한 크기의 구멍 및 여타 결함이 없는 것으로 관찰되었다. 몰드 직경에 따라 지지체의 직경도 조절이 가능했고, 두께 역시 조절이 가능함을 알 수 있었다.

염의 크기와 양을 조절함으로써 지지체의 다공크기와 다공도를 조절할 수 있다. 지지체의 내부, 옆면의 다공 구조는 다공과 다공 사이의 연결이 양호하고 대부분이 열린 셀 구조를 하고 있는 것으로 나타났다.^{25,30}

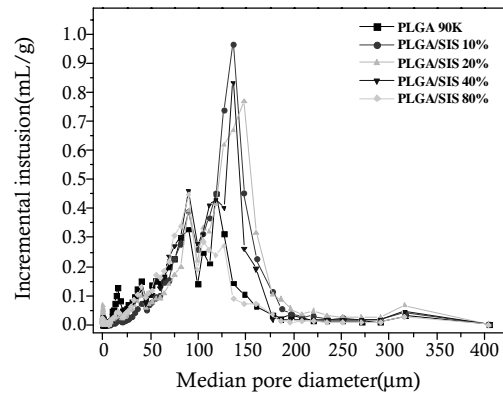


Figure 4. Pore size distribution of SIS/PLGA scaffolds by means of the solvent casting/salt leaching.

하지만, 지지체 표면의 다공 구조는 거의 모든 샘플에서 대부분 닫힌 셀 구조를 나타내었다. 이는 지지체의 내부 및 옆면과는 달리 몰드에서 받는 압력이 직접적으로 표면에 작용하여 이로 인해 다공이 약간 눌린 듯한 모양을 가졌을 것이라 사료된다. Figure 3을 보면 알 수 있듯이 SIS의 함량이 증가하여도 다공 구조는 변화하지 않았다.

수은 다공도계 분석. 수은 다공도계로 다공도 및 다공크기를 분석한 결과(Figure 4), 다공도는 SIS의 함량이 증가할수록 감소하는 경향이 나타났고, 다공크기는 증가한 것으로 나타났다. 하지만 SIS 함량이 지지체의 다공크기와 다공도의 증감에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 사료되었다.

친수성 실험. SIS 함량에 따른 친수성 효과를 Figure 5에 나타내었다. PLGA 지지체에서는 60분 후에도 염료가 지지체 내로 침투하지 못하였지만, SIS 10% 지지체를 제외하고 다른 지지체는 모두

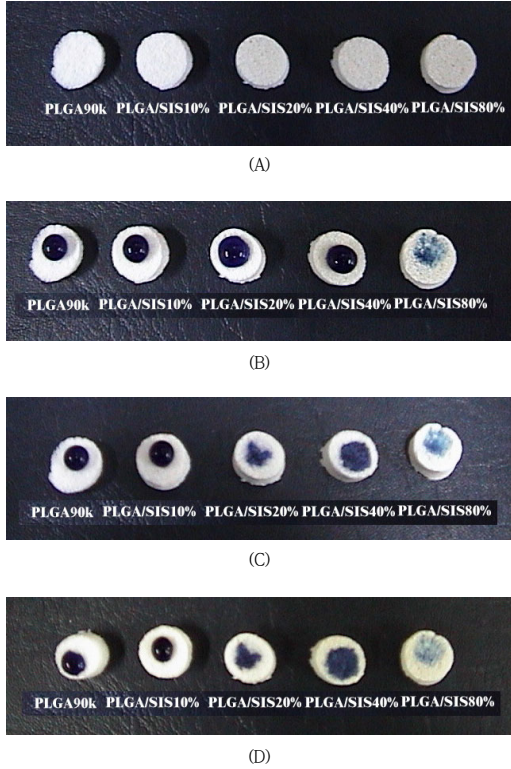


Figure 5. Photographs of wetting property of SIS/PLGA scaffolds (A) after 0 min, (B) after 1 min, (C) after 10 min, and (D) after 60 min.

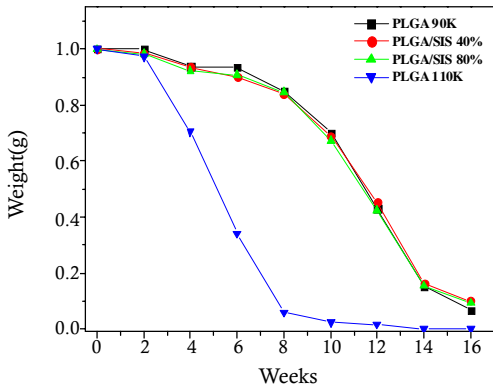


Figure 6. *In vitro* degradation in PBS collagenase solution of PLGA 90K, SIS-loaded PLGA 90K, and PLGA 110K scaffold.

염료가 침투하였다. 또한 SIS의 함량이 증가할수록 침투 속도도 빨랐는데, SIS가 80% 함유된 지지체에서는 1분 후 염료가 지지체 내로 완전히 침투하였다.¹⁴ 이는 SIS 자체가 콜라겐으로 형성되어 있고 또한 여러 가지 단백질을 함유하고 있어 친수성을 띠기 때문이라 사료된다.

In vitro 분해도 실험. PLGA 110 K 지지체는 8주 안에 완전히 분해된 반면 PLGA 90 K 지지체는 16주가 경과되어도 완전 분해가 되지 않았다(Figure 6). SIS가 40 및 80% 함유된 PLGA 90 K는 PLGA 90 K 지지체와 유사한 분해거동을 보였다. 이로써 PLGA 90 K을 이용한 지지체가 16주 이상 생체 내에서 지지체의 역할을 할 수 있으며 SIS가 함유되어도 분해도가 변하지 않음을 알 수 있다.

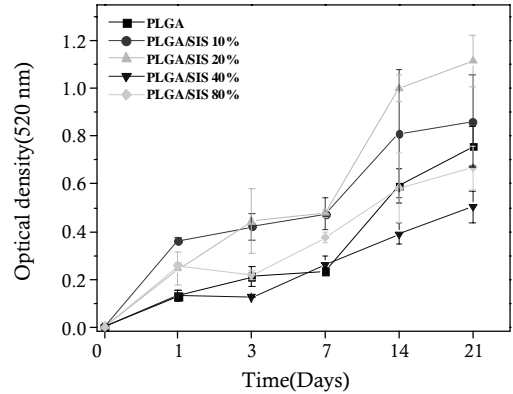


Figure 7. Measurement of cellular viability in PLGA and SIS-loaded PLGA scaffolds by MTT assay (n=3).

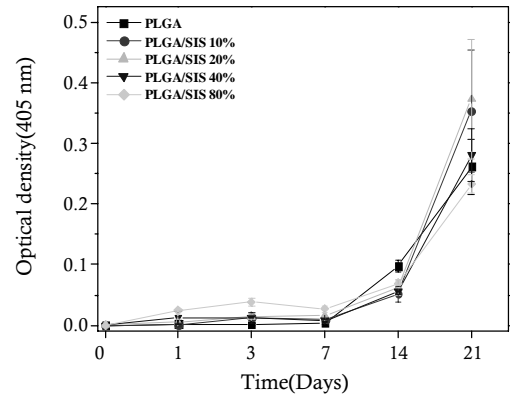


Figure 8. Alkaline phosphatase assay of PLGA and SIS-loaded PLGA scaffolds for osteogenesis confirmation (n=3).

따라서 본 연구에서는 뼈의 성장에 필요한 기간을 고려하여 분해기간이 장시간인 PLGA 90 K 및 SIS가 함유된 PLGA 90K 지지체를 동물실험에 사용하였다.

MTT 분석. 근육유래세포의 성장은 외부성장 환경에 영향을 받는데, SIS의 함량이 다른 지지체 내에서의 세포 성장을 MTT 분석법을 통하여 비교하여 보았다. Figure 7에 나타난 것처럼 세포의 성장은 21일 동안 정상적으로 이루어졌다. 7일 동안은 세포의 수가 급격하게 증가하였으며, 그 이후로는 서서히 세포가 증식하였음을 확인할 수 있었다. 특히 SIS가 10 및 20% 함유한 지지체에서는 세포의 성장률이 40 및 80% 함유 지지체보다 우월함을 확인하여 향후 SIS/ PLGA 지지체 설계에 있어서 중요한 인자로서 작용할 것으로 사료된다.

ALP활성 측정. 근육유래세포가 골세포로 분화하였는지 확인하기 위하여 ALP 활성을 측정하였다. Figure 8에 나타난 것처럼 ALP 활성은 SIS 10%에서 가장 높게 나타났다. 이는 SIS에 함유된 골분화에 도움을 주는 성장 인자의 영향이라 사료된다. 하지만, SIS 40, 80% 그룹에서는 ALP 활성이 낮았는데 이는 MTT 분석과 유사하게 세포의 성장률이 낮는데 기인한다고 사료된다.²⁶

SIS를 함유한 지지체 내에서의 골형성에 관한 조직학적 평가. SIS가 함유된 PLGA 고분자 지지체가 조직공학적 골형성에 도움을 주는지를 관찰하기 위해 지지체를 이식한지 4주가 지난 후 면역결핍

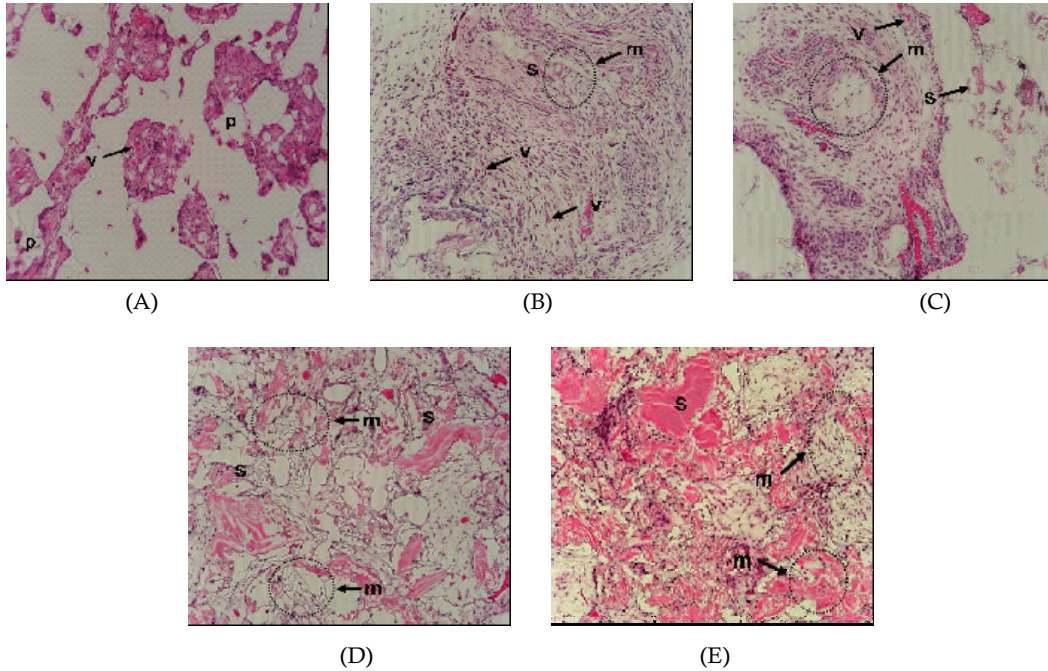


Figure 9. Photographs of histochemical staining for H&E (after 4 weeks): (A) PLGA, (B) PLGA/SIS (10 wt%), (C) PLGA/SIS (20 wt%), (D) PLGA/SIS (40 wt%), and (E) PLGA/SIS (80 wt%) ($\times 100$). m: differentiated MDSCs into osteocyte, s: SIS powder, v: vessel and p: PLGA.

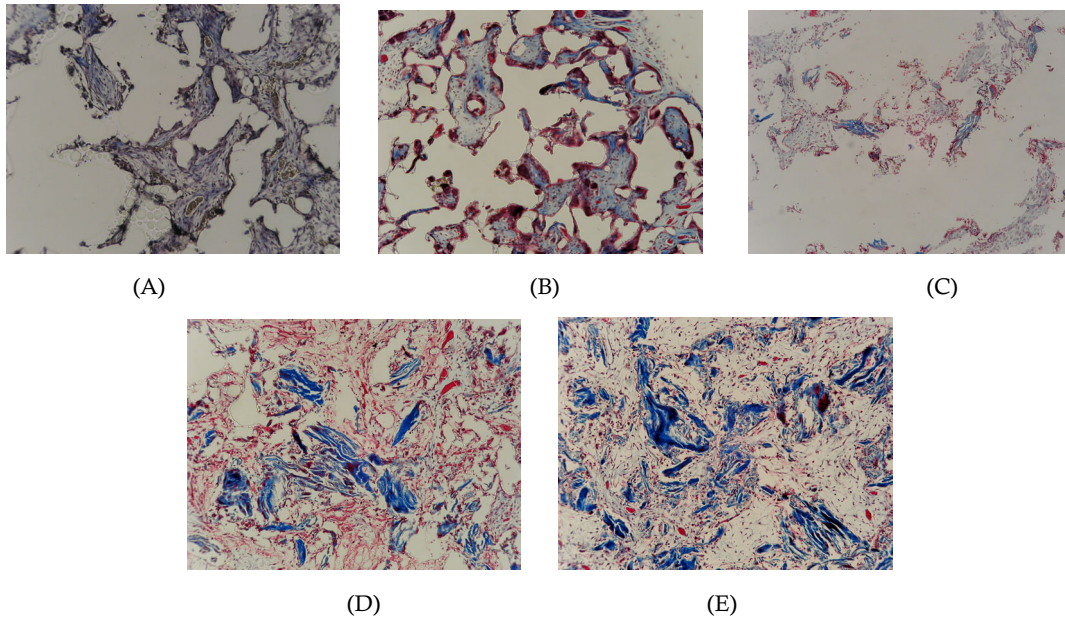


Figure 10. Photographs of histochemical staining for Trichrome to confirm collagen (after 4 weeks): (A) PLGA, (B) PLGA/SIS (10 wt%), (C) PLGA/SIS (20 wt%), (D) PLGA/SIS (40 wt%), and (E) PLGA/SIS (80 wt%) ($\times 100$).

취의 피하를 절개하여 지지체를 분리하고, 분리된 담체를 10% 포르말린 수용액으로 고정한 후 $3\ \mu\text{m}$ 로 절단하여 슬라이드에 고정시키고 H&E, 트라이크롬 및 본쿠사 염색을 하였다. 먼저 골형성을 확인하기 위하여 H&E 염색을 하였다. Figure 9의 사진을 보면 뼈세포들이 콜라겐 막을 중심으로 그 주위를 일정한 방향으로 배열하고 있음을 관찰할 수 있다. SIS가 10% 함유된 것과 80% 함유된 것

의 H&E 염색 사진을 비교해 보면 세포질이 SIS가 80% 함유된 것에서 더 많이 나타나며 뼈세포를 또한 더 많이 배열함을 알 수 있다. 또한 미분화된 PLGA 주위에서 SIS 영역을 확인할 수 있었고, 신생혈관이 생성됨을 확인하였다. 즉, SIS의 함량이 높은 지지체에서 더 많은 뼈세포가 유도되어 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었으며 이로써 SIS가 함유된 지지체의 경우 뼈 형성을 유도하는 가능성을 가짐

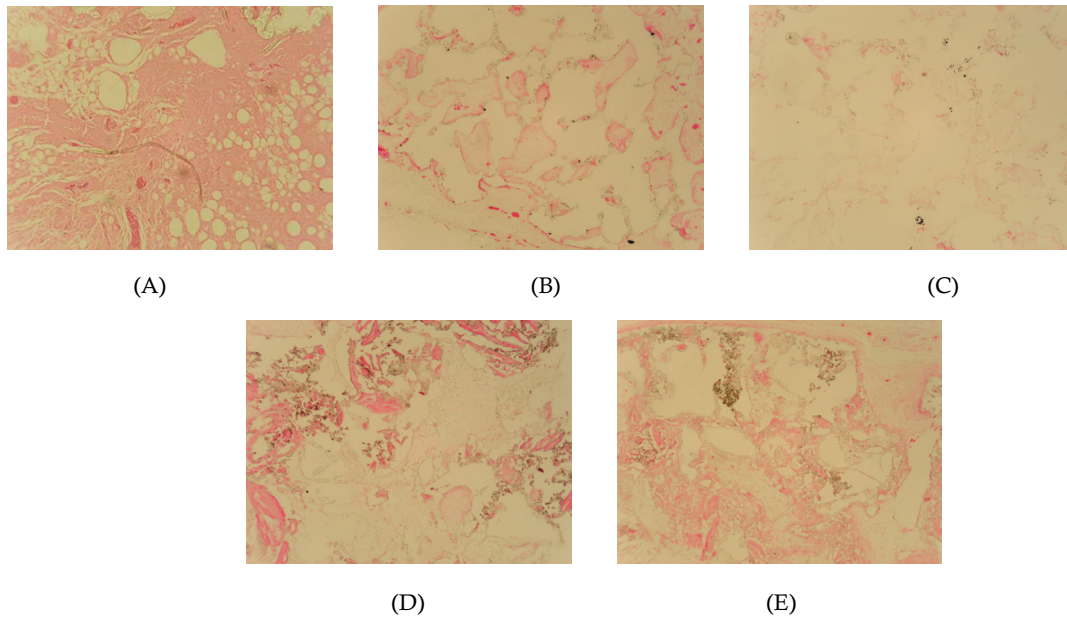


Figure 11. Photographs of histochemical staining for von Kossa to confirm calcium area (after 4 weeks) : (A) PLGA, (B) PLGA/SIS (10 wt%), (C) PLGA/SIS (20 wt%), (D) PLGA/SIS (40 wt%), and (E) PLGA/SIS (80 wt%) ($\times 100$).

을 알 수 있다.^{2,25}

조직의 콜라겐 형성을 알아보기 위하여 트라이크롬 염색을 실시한 결과(Figure 10), 모든 샘플에서 콜라겐 형성 영역을 확인하였고, SIS의 함량이 증가할수록 더 광범위한 콜라겐 형성 영역을 확인할 수 있었다.

조직에서 칼슘 형성을 본쿠사 염색을 통하여 알아보았다(Figure 11). 본쿠사 염색은 조골세포가 가지는 인산염이나 탄산염 형태로 존재하는 칼슘을 실버나이트레이트로 처리하면 칼슘과 은이 은염으로 치환되고 이것은 강한 빛에 의해 흑색의 금속 은으로 치환되는 것이다. PLGA 지지체에서는 칼슘형성 영역을 확인할 수 없었지만 SIS가 함유된 지지체에서는 SIS의 함량이 증가할수록 칼슘침착 영역이 증가하는 경향을 보였다. 이는 SIS가 골형성에 영향을 주는 여러 가지 성장인자를 함유하고 있기 때문이라 사료된다.^{2,30}

결 론

조직공학 기술은 초기 세포 부착과 차후의 조직형성을 위해 3차원적인 지지체로서 다공성 생분해성 담체가 필수적이다. SIS는 생체 물질로서 골형성을 유도할 수 있는 성장인자를 가지고 있다. 이러한 SIS를 함유한 PLGA 다공성 지지체를 용매 캐스팅/염추출법으로 제조하여 특성결정을 하였다. SEM 사진을 통해 다공성 지지체 내의 SIS 함량이 증가하여도 다공 구조는 변하지 않음을 확인하였고, 수는 다공도계 분석을 통해 SIS의 함량이 증가할수록 다공도가 감소하는 경향을 보였다. 근육유래세포가 골세포로 분화하면서 세포성장과 골세포 분화도를 MTT와 ALP 활성 분석을 통해 알아보았다. SIS가 10, 20% 함유한 지지체에서는 세포성장률이 높는데 이는 SIS 내의 여러 성장인자의 영향이라 사료된다. 반면 H&E, 트라이크롬, 및 본쿠사 염색 사진을 통해 SIS 함량이 높은 지지체에서 더

많은 뼈 세포가 유도되어 밀집되어 있음을 관찰하였다. 이는 SIS 함유된 지지체가 뼈 형성을 유도하는 가능성을 가지고 있음을 보여준다. 콜라겐의 형성 영역을 알아본 트라이크롬 염색 사진을 통해서 SIS 함량이 증가할수록 광범위한 콜라겐 형성 영역을 확인할 수 있었다. 본쿠사 염색에서는 PLGA 지지체에서는 칼슘 형성을 확인할 수 없었지만 SIS 함유 지지체에서는 SIS 함량이 증가할수록 칼슘침착 영역이 다소 증가함을 보였다.

결론적으로 SIS가 함유된 지지체가 골형성에 도움을 주는 성장인자를 가지고 있으며 지지체에 성체줄기세포인 근육유래 줄기세포를 함유시켰을 때 골세포로의 분화를 도울 것이라고 추측한다. 현재 SIS 함량에 따른 골, 연골 및 신경재생의 효과 및 근육유래 줄기세포의 추적시스템을 통한 분화 메커니즘 추적을 통하여 SIS/PLGA 담체의 새로운 천연/합성 하이브리드 담체로서의 실용화에 대하여 연구 중이다.

감사의 글 : 본 연구는 세포융용사업단(SC3100)과 보건복지부(0405-BO01-0204-0006)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. G. Khang, S. J. Lee, and H. B. Lee, "Polymer-cell interaction"; in *Tissue Engineering: Concepts and Application*, J. J. Yoo, and I. Lee, Editors, 2nd Eds., Korea Med. Pub. Co., Seoul, p. 297 (2002).
2. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 1, 9 (2004).
3. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, 12, 527 (2001).
4. G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, 13, 4 (2002).
5. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, 13,

- 226 (2002).
6. 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*, Marcel Dekker, 2nd Eds., New York, p. 1055 (1995).
 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. G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, "Preparation and characterization of natural/synthetic hybrid scaffolds", in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Chap. 17, M. Elcin, Editor, Kluwer-Plenum Press, London, Vol. 657, p. 235 (2003).
 15. M. K. Choi, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, 25, 318 (2001).
 16. 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).
 17. E. K. Jeon, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, 25, 893 (2001).
 18. 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).
 19. S. J. Lee, D. H. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, 15, 201 (2002).
 20. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, I. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, 27, 226 (2003).
 21. 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).
 22. J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, 28, 382 (2004).
 23. J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, C. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2, 34 (2005).
 24. S. B. Song, G. Khang, S. K. Hong, I. Lee, S. W. Kim, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, 4, 13 (2000).
 25. G. Khang, P. K. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, 10, 158 (2002).
 26. P. K. Shin, S. J. Lee, B. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Macromol. Chem. Symp.*, 15, 175 (2002).
 27. J. A. Kang, S. J. Lee, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, 6, 107 (2002).
 28. H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, 28, 194 (2004).
 29. S. H. Kim, H. W. Shin, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Biomater. Res.*, 8, 143 (2004).
 30. S. J. Lee, I. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 15, 1003 (2004).
 31. M. A. Cobb, S. F. Badylak, W. Janas, and F. A. Boop, *Surg. Neurol.*, 46, 389 (1996).
 32. J. W. Jang, E. J. Kim, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Biomater. Res.*, 8, 51 (2004).
 33. E. J. Kim, J. H. Song, M. S. Kim, J. M. Rhee, C. H. Han, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 1, 41 (2004).
 34. J. W. Jang, S. H. Kim, C. H. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, I. Lee, and G. Khang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 1, 59 (2004).
 35. L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, 11, 27 (1993).
 36. H. L. Ritter and L. C. Drake, *Ind. Eng. Chem.*, 17, 782 (1945).
 37. D. M. Smith, D. W. Hua, and W. L. Earl, *MRS Bull.*, 19, 44 (1994).