

탈미네랄화된 골분을 이용한 스폰지의 제조 및 특성 분석

장지옥 · 백미옥 · 김순희 · 최진희 · 양재찬 · 홍현해 · 홍희경 · 이종문 · 민병현* · 강길선†

전북대학교 고분자 융합소재연구센터, *아주대학교 의과대학 세포치료센터
(2008년 7월 25일 접수, 2008년 8월 21일 수정, 2008년 8월 21일 채택)

Preparation and Characterization of Sponge Using Demineralized Bone Particle

Ji Wook Jang, Mi Ock Baek, Soon Hee Kim, Jin Hee Choi, Jae Chan Yang,
Hyun Hye Hong, Hee Kyung Hong, John M. Rhee, Byoung Hyun Min*, and Gilson Khang†

*Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University,
664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea*

**Cell Therapy Center, School of Medicine, Ajou University,
San 5 Wonchun-Dong, Yeongtong-Gu, Suwon 442-721, Korea*

(Received July 25, 2008; Revised August 21, 2008; Accepted August 21, 2008)

초록: 탈미네랄화된 골분(DBP)은 생체활성 천연재료로서 골을 형성시키는 유도인자로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 DBP 스폰지를 펩신의 농도와 가교제의 농도에 따라 그 특성을 분석함으로써 조직공학적 지지체로의 응용 가능성을 확인하였다. DBP를 3% 아세트산 용액에 48시간동안 용해시킨 후 0.1, 0.2 및 0.3% 펩신을 첨가하였고, 가교제 1, 5, 10, 50 및 100 mM의 EDC를 적용하였다. 이를 전자주사현미경, 시차주사열량계, 적외선 분광기, 다공도 및 흡수성 실험을 통해 특성분석하였으며 세포의 증식률은 MTT 분석으로 확인하였다. 이러한 결과를 통해 펩신의 농도로는 0.2~0.3%가, 가교제의 농도는 50~100 mM에서 물리화학적 특성이 우수한 것으로 판단되었고, 이러한 조건으로 제조된 DBP 스폰지는 조직 공학적 지지체로 유용하게 응용될 수 있을 것이다.

Abstract: Demineralized boneparticle (DBP) has been widely used as and a powerful promoter of new bone growth. In this study, DBP sponges were chemically crosslinked and characterized for the potential application of tissue engineered scaffolds. The DBP sponges prepared by crosslinking with EDC. 0.1, 0.2 or 0.3% pepsin was applied to DBP dissolved in 3% (v/v) acetic acid aqueous solution for 48 hrs. The prepared sponges were crosslinked by 1, 5, 10, 50 or 100 mM of EDC solution concentration and then were lyophilized. The DBP sponges were characterized by SEM, FT-IR and DSC and analyzed in terms of their porosity and water absorption ability. The cellular viability and proliferation were assayed by MTT assay. Our investigation revealed that 0.2~0.3% of pepsin and 50~100 mM of EDC produced DBP sponges with good physical characteristics. In conclusion, DBP sponge prepared under these conditions is potentially useful for the applications of tissue construction.

Keywords: demineralized bone particle, sponge, EDC, pepsin, BMSCs.

서 론

생체조직공학이란 생체 적합하고 생체기능성을 갖는 생체재료로 이루어진 지지체에 세포를 배양하여 체내에 이식함으로써 손상되고 기능을 상실한 조직 및 장기를 복원, 재생 또는 대체하여 정상적인 기능을 유도함으로써 조직의 수복과 재생을 추구하는 통합 과학기술이다.^{1,2} 조직공학에 사용되는 생체재료 지지체는 체내 이식 초기에 파종된 조직 세포들이 신체 내에서 사멸하지 않고 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공하도록 한다. 이들은 생체 내에서 세포가

잘 정착하여 배양될 수 있도록 도와주고 이식세포 고유의 표현형을 유지함은 물론 세포외기질을 분비함으로써 조직의 재생을 촉진시켜야 한다. 이와 더불어 체내 이식된 후에도 일정기간이 지나면 안전하게 흡수, 분해하는 생체적합성을 가져야한다.^{3,4} 생체재료 지지체에는 천연 및 합성고분자가 사용되고 있는데 천연고분자로는 콜라겐, 아미노산 키토산(키틴), 피브린, 알부민, 셀룰로오스, 전분, 스켈로루칸 등이다. 비교적 우수한 생체적합성, 상업적 유용성, 쉬운 공정 및 식품의약품안전청에 승인을 비교적 쉽게 얻을 수 있는 장점을 갖는 천연고분자는 조직공학분야에서 활발히 응용되고 있다.⁵⁻⁷

콜라겐은 피부나 뼈, 이, 연골, 건 등을 구성하는 당단백질이며 당지질로서 구조적으로 세포 등의 부착이 가능하며, 산소전달 및 세

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

포 이동에 관여하는 섬유성으로 신축성을 가지는 물성을 지니고 있다. 이러한 특성을 가진 콜라겐은 3차원적 지지체로 제조하여 인체 내에서 적절한 지지체로서의 역할을 수행할 수 있다. 따라서, 콜라겐은 세포 부착 및 성장, 이동, 분화까지 관여함으로써 콜라겐의 중요성이 점차 고조되고 있고 그 응용이 활발히 진행되고 있다. 형태에 따라 스폰지, 필름, 시트의 막 형태, 펠트, 섬유 등의 다공성 형태, 겔, 용액, 섬유, 관 모양으로 제조되며 세포 존재유무에 따라 조직 치유, 패치, 뼈와 연골치료, 신경재생, 혈관과 피부 치료에 적용하기 위한 복합체 등 여러 형태로 응용되고 있다. 그 밖에도 콜라겐은 세포와의 친화력이 매우 우수하고, 생체내 거부반응이 적어 화장품 원료뿐만 아니라 상처치유제, 약물전달체 및 조직공학용 지지체 등에 널리 응용되고 있다.⁷⁻¹²

천연 골조직으로부터 유래된 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particle, DBP)은 Urist에 의하여 처음 제기되었다. DBP의 성분은 콜라겐, 잔류칼슘과 프로테오글리칸 등의 유기물질의 분해 성분 및 BMP로 분류되는데, DBP의 이 네가지 성분에 의하여 골형성이 촉진된다.¹³⁻¹⁵ 따라서, DBP는 골 손실부의 치환, 관절 고정 강화에도 사용되고, 정형외과나 치과분야에서 골재생이 느리거나 불가능한 부위에 충전제로 사용되고 있다. 그러나, 임상 적용 시 국소 부위에는 이용될 수 있으나 광범위한 부위의 충전제로는 이용될 수 없다고 알려져 있다.¹⁶⁻²¹

본 연구팀에서는 이전 실험에서 DBP를 이용하여 DBP 및 PLGA를 함유한 PLGA 지지체가 생체내에서 새로운 골형성과 신생혈관 재생을 촉진시킴을 확인하였다. 이러한 선행 연구를 바탕으로 이번 연구에서는 DBP만을 이용하여 스폰지 형태로 제조하고자 하였고 펩신과 가교제를 이용하여 물성을 증가시켜 골조직 재생용 조직공학용 지지체로서의 응용가능성을 확인하였다.

실 험

DBP 제조. DBP는 Urist 방법으로 소의 대퇴부를 이용하여 제조하였다. 얇게 자른(1 cm 이내) 대퇴골을 3차 증류수로 여러번 세척한 후 골수를 제거하고 골막과 속막을 물리적으로 제거하였다. 동결 건조시켜 모래알의 크기로 분쇄한 후 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매(3 : 1)로 지방을 제거하였고 무수알콜로 행구어 낸 다음 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, pH 7.3-7.4; Sigma chem. Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 pH 7.4로 조절하였고 동결건조시켰다. DBP는 액체질소 내에서 동결분쇄(SPEX 6700, USA)하여 약 180 μm 크기 이하의 분말형태를 얻었다.

DBP 스폰지 제조. 3% (v/v) (in distilled water) 아세트산(Sigma Chem. Co.)에 0.1, 0.2 및 0.3 % (w/v) 펩신(Sigma Chem. Co.)을 함유한 용액에 1 wt%의 DBP 분말을 첨가시켜 상온에서 48시간 동안 교반시켰다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 저장하여 충분히 수화시킨 후 48 웰 플레이트에 1 mL씩 분주하였다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 와 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 5시간 동안 보관하고 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 급랭시킨 후 동결 건조하여 DBP 스폰지를 얻었다. 그 후 1, 5, 10, 50 및 100 mM의 1-ethyl-(3,3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma Chem. Co.) 용액을 제조하여 DBP 스폰지를 상온에서

24시간 동안 가교시켰고, 3차 증류수로 여러 번 세척하여 EDC 용액을 완전히 제거하였다. -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 급랭시킨 후 동결 건조하여 EDC 농도에 따라 가교된 DBP 스폰지(직경 8 mm, 높이 8 mm)를 완성하였다.

스폰지의 기계적 강도 측정. 펩신의 농도 및 콜라겐 가용화 시간에 따라 압축강도를 측정하였다. 만능 물성측정기(FTC Food Technology Co., Virginia, USA)를 이용하여 타겟거리 5 mm, 테스트 속도 1 mm/sec, 제동 힘 0.5 N의 조건하에서 스폰지를 압축하였다. 강도 측정은 3회를 실시하여 그 값을 평균 내어 이용하였다.

전자주사 현미경 측정. 펩신의 농도에 따라, 그리고 가교농도에 따라 가교 전과 가교 후의 형태학적 특성을 전자주사 현미경(Hitachi, S-2250N, Japan)으로 관찰하였다. DBP 스폰지는 바닥면, 가로축 및 세로축으로 잘라 그 단면을 관찰하였다. 각 샘플들은 카본테이프를 이용하여 금속판에 고정시키고 아르곤 하에서 2분 동안 프라즈마 스퍼터(Model SC 500K, Emscope, UK)로 200 \AA 두께의 백금을 코팅하였다. 관찰된 이미지는 이미지 분석 프로그램인 P-SEM (Mirero, Korea)를 이용하여 분석하였다.

다공도 측정. 제조된 스폰지의 다공도는 Archimedes 원리에 기초한 비중병(Hubbard specific gravity bottle, Hanil, Korea)을 사용하여 측정하였다. 그 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Porosity} (\epsilon) = (W_2 - W_3 - W_5) / (W_1 - W_3) \quad (1)$$

여기서 W_5 는 측정하고자 하는 스폰지의 무게, W_1 은 에탄올을 가득 채운 비중병의 무게, W_2 는 스폰지와 에탄올이 가득 채워진 비중병의 무게, 그리고 W_3 는 W_2 로부터 에탄올이 함유된(스폰지의 다공에 에탄올이 채워진 상태) 스폰지를 꺼낸 후 비중병의 무게를 나타낸다. 각각의 무게를 측정하고 위의 계산식에 대입하여 다공도를 계산하였다.¹⁰

물 흡수성 측정. 제조된 스폰지의 물 흡수성을 측정하였다. 일정한 용기에 20 mL의 물을 넣고 용기 무게 및 용기를 뺀 물의 무게를 측정하고 DBP 스폰지를 물에 넣어 2분간 방치 후 스폰지를 용기에서 꺼낸 후 용기에 있는 물의 무게를 측정하였다. 측정된 값들을 식 (1)에 대입하여 물 흡수도를 계산하였다.²²

$$W(\%) = \frac{A - B}{C} \times 100 \quad (2)$$

여기서 W 는 물 흡수도, A 는 처음 용기에 담긴 물의 무게, B 는 스폰지를 2분 담근 후 뺀 용기에 담긴 물의 무게이며 C 는 스폰지의 무게이다.

시차주사 열량계 측정. DBP 스폰지가 가교제의 농도에 따라서는 열적 특성을 관찰하기 위해 시차주사 열량계(TA Instrument, DSC 2910, USA)를 이용하였다. 시차주사 열량계를 이용하여 상온에서부터 250 $^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서 DBP 스폰지의 열적 성질 변화를 측정하였다. 분석 조건으로 승온 속도는 분당 10 $^{\circ}\text{C}$ 로 하였으며 질소기류 하에서 측정하였다.

적외선 분광기 측정. 가교된 DBP 스폰지에서 아마이드기의 증가를 FT-IR (Bio-Rad Digilab, FTS-165, Canada)로 측정하였다. 이

분석은 KBr 펠렛법을 이용하여 시편을 만들어 측정하였다.^{23,24}

MTT 분석. 세포성장률은 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. 골수유래간엽줄기세포 (bone marrow stromal cell, BMSC)는 F344 rat (Female, 4 wks, Japan SLC Inc.) 암컷 4주령 대퇴부를 절단하여 PBS 수용액이 든 주사기로 밀어내어 채취하였다. 배양액으로 2배 희석된 50% 퍼콜(Percoll, Sigma) 점진구배용액에 낙하시킨 후 2500 rpm에서 25분간 원심분리하여 세포층만 획득하여 배양액으로 희석시킨 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리한 세포는 10% FBS, 1% penicillin streptomycin을 함유한 DMEM 배양액으로 배양하였다. 3일에 한번 배양액을 교체하고 7일에 한 번 계대배양하여 3회 계대배양 후 실험에 이용하였다. BMSC를 지지체에 1×10^5 cells/scaffold의 농도로 파종한 후 1, 3, 7 및 14일 째에 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide, Sigma Chem. Co.) 용액을 100 μ L씩 첨가하였고, 4시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 지지체를 취하여 새로운 웰에 옮긴 후, 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma Chem. Co.) 용액을 1 mL씩 넣고 2시간 동안 교반하여 결정을 완전히 녹였다. 생성물을 96 웰 플레이트에 100 μ L씩 분주한 후 DMSO를 기준으로 ELISA 플레이트 리더(E-max, Molecular Device, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포성장률 분석은 3회를 실시하여 그 값을 평균 내어 이용하였다.

결과 및 토론

펩신 및 가교농도에 따른 지지체 강도 및 모폴로지. 펩신을 첨가함으로써 콜라겐 사슬 가장자리의 텔로펩타이드 가교 영역이 깨어질 수 있기 때문에 산에서 콜라겐의 용해도가 높아질 수 있다.²⁵ 이처럼 펩신으로 인하여 DBP에 함유된 불용성 콜라겐을 효소 가용화 콜라겐으로 제조할 수 있을뿐 아니라 파종될 세포와의 면역반응 또한 제거가 될 수 있는데 펩신이 콜라겐의 삼중나선의 구조는 파괴시키지 않기 때문에 사슬 내에 존재하는 BMP 등의 단백질에는 손상을 주지 않을 것으로 사료되었다. 그러나, 저분자의 $\alpha 1$ 이나 $\alpha 2$ 가 줄어드는 등 미미한 구조적 변화가 존재한다는 보고도 있기 때문에²⁶ 펩신에 의한 열적성질 등 물리적 성질에 변화가 있을 것으로 파악되었다. Figure 1

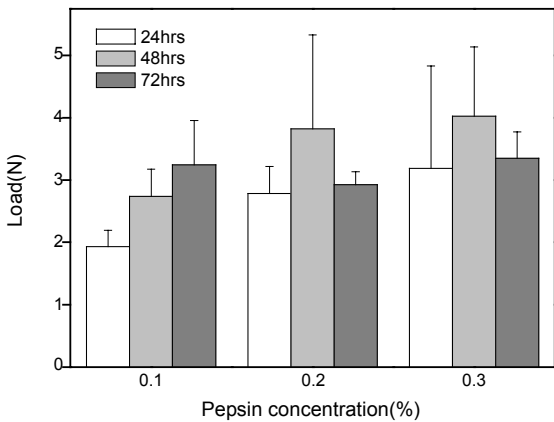


Figure 1. DBP sponge compression strength depending on pepsin concentration and stirring time.

은 펩신의 농도를 0.1, 0.2 및 0.3%로 변화를 주고 콜라겐을 가용화시키는 시간을 24, 48 및 72시간으로 변화를 주어 제조된 스폰지의 압축강도를 측정한 결과이다. 이때 가교농도는 50 mM로 고정을 시켰다. 0.2% 및 0.3%의 펩신에서 비교적 강한 강도가 확인되었고 특히 48시간 반응시에 높은 결과를 나타냈다. 다음으로 펩신의 농도에 따라 최종 스폰지의 모폴로지 변화에 주는 영향을 확인하고자 48시간 교반된 균을 선정하여 SEM을 통하여 스폰지의 바닥면, 가로 및 세로절단면을 측정하였으며 Figure 2에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 0.2% 및 0.3%의 펩신을 이용한 경우 다공의 형태가 균일하고 열린 다공을 형성하는 것을 알 수 있었다. 이외는 대조적으로 0.1% 농도를 적용한 경우 다공의 형태가 뚜렷하지 못하고 막힌 다공이 눈에 띄게 형성되었다. 이는 0.1% 펩신의 경우 불용성콜라겐에 대한 작용성이 약하여 콜라겐의 용해성이 향상되지 못하고, 산에 용해된 다른 콜라겐 가닥과 서로 엉겨 붙음에 따라 동결건조시 얼음결정이 빠져나올 수 있는 구조를 제대로 제공하지 못했기 때문으로 사료된다. 이에 따라 DBP 스폰지의 적절한 구조를 제공함에 있어 펩신

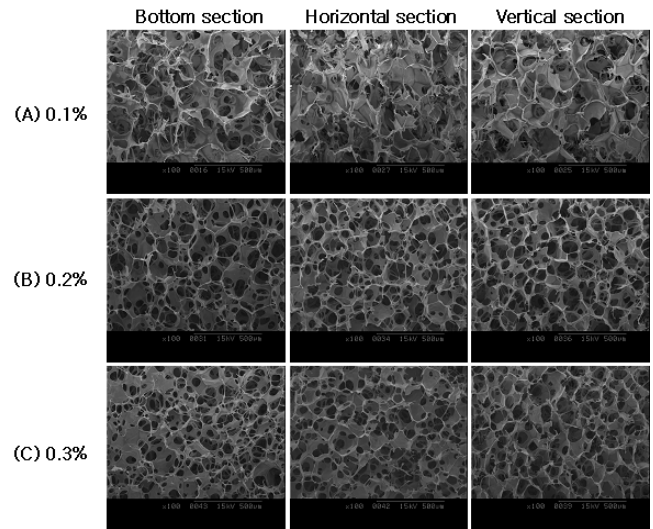


Figure 2. Sponge morphology depending on the concentration of pepsin (A) 0.1%; (B) 0.2%; (C) 0.3% of pepsin concentration (magnification $\times 100$).

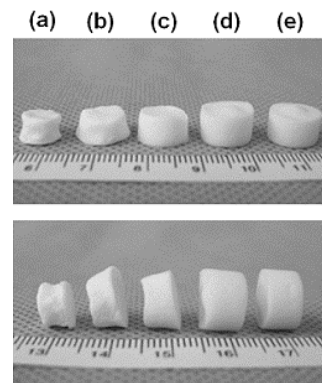


Figure 3. Gross picture of DBP sponge according to concentration of EDC (a) 1 mM; (b) 5 mM; (c) 10 mM; (d) 50 mM; (e) 100 mM of EDC concentration.

의 농도가 영향을 끼치는 것으로 보인다.

가교농도에 따른 DBP 스폰지. 상기의 결과에 따라 펄신을 0.2% 첨가하여 스폰지를 제조하였고 물성을 개량하기 위하여 가교제로서 EDC를 사용하여 가교조건에 따른 외관특성을 분석하였다. 1, 5, 10, 50 및 100 mM의 EDC로 가교한 후 완성된 스폰지를 육안으로 관찰한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 가교제의 농도가 증가함에 따라 외관이 수축되지 않았으며 몰드의 형태와 같은 크기의 스폰지를 제조할 수 있었다. 이는 가교제의 첨가에 따라 가교 메카니즘이 강하게 적용되어 콜라겐 사슬이 서로 교차하여 지나가려는 성질을 억제하

고 구조적으로 안정을 시켜주기 때문으로 사료된다.

EDC로 가교시키기 전과 농도를 다르게 하여 가교시킨 DBP 스폰지의 바닥면, 가로 및 세로 절단면을 SEM으로 분석하여 형태적 변화를 확인하였고, 이를 Figure 4에 나타내었다. 가교제의 각 농도별로 DBP 스폰지의 바닥면과 내부 절단면의 형태가 비슷하였으며 가교 전보다 가교 후에 다공의 벽이 단단하게 유지되고 있음을 알 수 있었다. 이로써 DBP 스폰지 전체를 통하여 가교가 이루어진 것으로 파악되었다. 또한, 가교제를 처리하였을 때 처리하지 않았을 때보다 상대적으로 열린 다공을 가지며 다공도 또한 높아진다는 것을 알 수 있었다. 가교

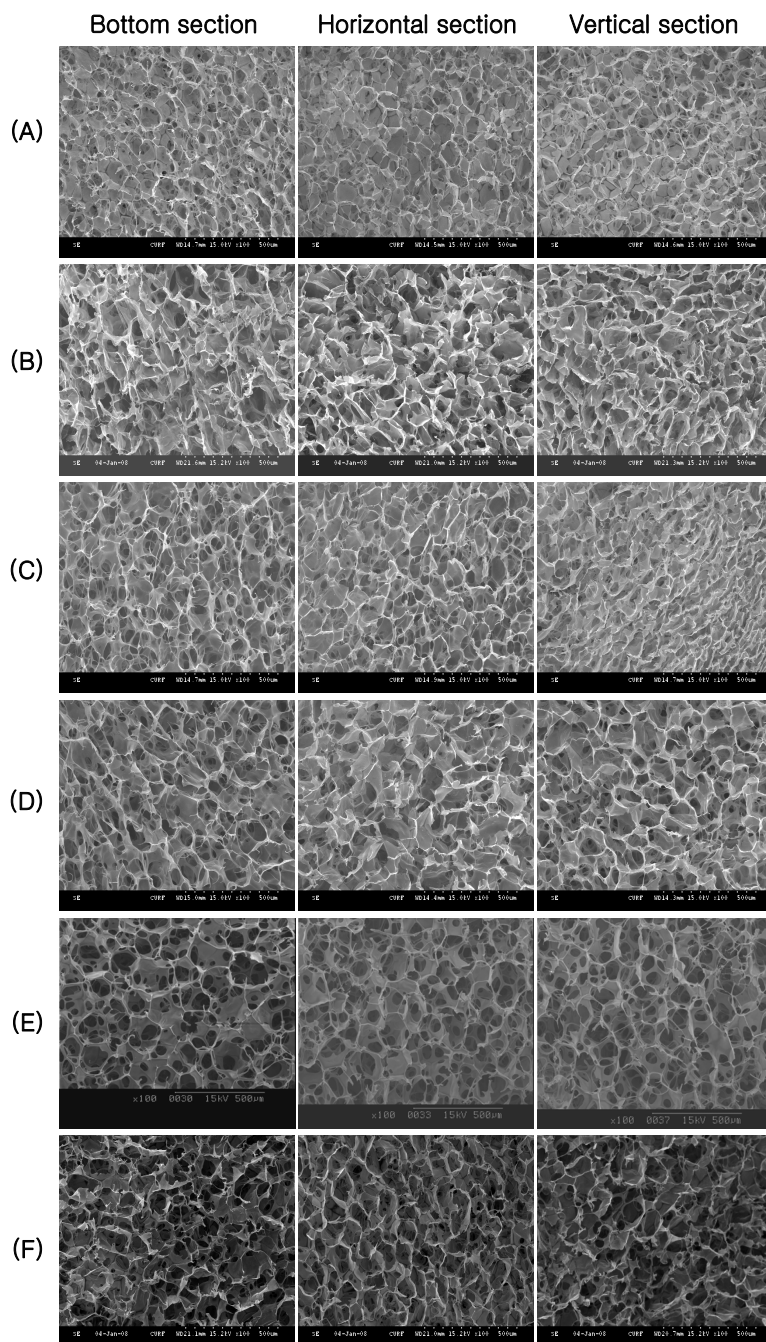


Figure 4. SEM measurements of DBP sponge depending on the EDC concentration. (A) Control(non-crosslinked); (B) 1 mM, (C) 5 mM; (D) 10 mM; (E) 50 mM; (F) 100 mM (magnification $\times 100$).

제의 농도에 따라서는 EDC의 농도가 10 mM 이상부터 균일하고 좁 좁한 다공이 형성됨을 관찰할 수 있었으며 10 mM 이하로 가교한 DBP 스폰지에서는 다공이 이그러지고 막힌 것을 알 수 있었다. 콜라겐 사슬당 적용되는 가교제 농도가 낮게 되면 콜라겐 사슬간의 가교가 완전하게 이루어지 않아 동결건조시에 적용되는 힘을 지탱하기가 힘들고 이에 따라 다공을 단하게 하는 현상이 생기는 것으로 파악된다. 한편, 타겟 거리를 2 mm로 설정하여 다공이 이그러지지 않은 가교 조건인 10, 50, 100 mM으로 제조된 스폰지의 압축강도를 측정 한 결과 각각 2.302, 2.757, 2.114 N으로 비슷한 값을 나타내었다.

다공도 측정. EDC 가교제의 농도에 따른 DBP 스폰지의 다공도를 Figure 5에 나타내었다. 분석 결과 가교제의 농도가 증가할수록 다공도가 높아짐을 확인하였고 다공도는 모두 90% 이상인 것으로 나타났으며 특히 가교제의 농도가 높아질수록 거의 100%에 가까운 다공도를 보였다. 이는 가교제가 구조적 안정성을 제공해준다는 점에서 상기의 지지체 외관관찰 및 내부 구조 관찰 결과와 상응한다고 볼 수 있다. 이러한 결과로부터 가교된 DBP 스폰지가 세포의 부착과 증식을 위하여 충분한 영양분을 공급할 수 있는 다공을 제공할 수 있음을 확인하였다.

물 흡수성 측정. EDC 가교제의 농도에 따른 DBP 스폰지의 물 흡수성을 Figure 6에 나타내었다. EDC의 농도가 증가할수록 다공도와 물성이 증가하는 것과 같이 물 흡수율도 증가함을 확인하였는

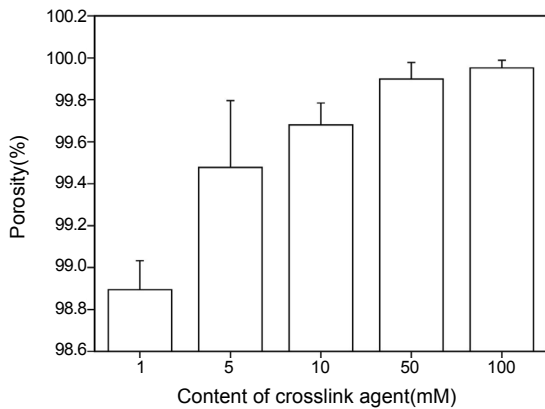


Figure 5. Porosity of DBP sponge depending on the EDC concentration.

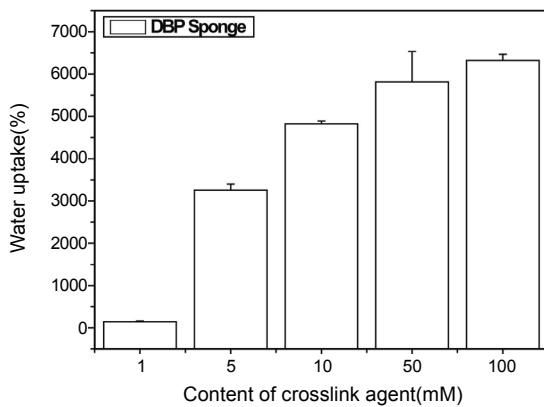


Figure 6. Water uptake experiments using DBP sponge depending on the EDC concentration.

데 이는 약간의 잔존된 EDC 자체의 친수성질뿐만 아니라 가교를 통하여 DBP 스폰지의 다공의 골격이 강하게 유지됨으로써 물을 포함하고 저장하는 능력을 향상시켰기 때문으로 파악된다. 또한, 가교제의 농도가 증가할수록 표면과 내부의 열린 다공이 형성되어 다공간의 채널이 흡수를 향상시킨 것으로 보인다. 반면에 가교되지 않거나 충분히 가교되지 않은 1 mM 군의 경우 물 흡수율을 측정하는 과정에서 물에 의해 풀어지는 현상이 나타나 물 흡수율의 측정이 불가능하였는데 이를 통하여 가교제가 물 흡수성에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

시차주사 열량계(DSC) 측정. 가교제의 농도가 증가할수록 DBP 스폰지에 미치는 열적 성질을 확인하고자 DSC 분석을 수행하여 Figure 7에 나타내었다. 초반(120 °C)에 나타나는 흡열 피크는 탈수온도를 나타내는데 이는 DBP의 콜라겐 가닥이 EDC에 의하여 가교될 시 결합된 물 때문에 생기는 것으로 보이며 50, 100 mM에서 이 흡열피크가 나타나는 것으로 보아 콜라겐 가닥의 상호작용이 더 큰 것으로 보인다. 또한, 탈수온도가 가교제 농도에 따라 줄어드는 것을 알 수 있는데 가교제가 콜라겐 간의 상호작용을 촉진시킨 것으로 보인다.²⁷ DBP 스폰지는 EDC 가교제의 농도가 증가할수록 160 °C 부근에 약간의 흡열피크가 발견되었다. 가교제의 농도가 50, 100 mM로 증가할수록 피크의 넓이(ΔH)가 증가하는 것으로 보아 가교도가 열을 흡수하는데 에너지를 요구하게 만들고 따라서 가교제로 스폰지의 물성을 향상시킬 수 있는 것으로 확인되었다.

적외선 분광기(FT-IR) 측정. 적외선 분광기 분석법을 통하여 DBP 스폰지의 화학적 성분을 분석하여 Figure 8에 나타내었다. 분석결과 가교하기 전의 DBP 스폰지에서 아마이드 I(1651 cm^{-1}), 아마이드 II(1541 cm^{-1}), 아마이드 III(1451 cm^{-1}), 에스터(1076 cm^{-1}) 및 카복실기(1400 cm^{-1})의 피크를 확인할 수 있었다. DBP 스폰지는 가교제의 농도가 증가할수록 아마이드 I, II, III 및 에스터의 피크가 증가함을 확인할 수 있었고 카복실기는 감소함을 확인하였다. 이는 DBP 스폰지의 주성분인 콜라겐에 존재하는 카복실기와 EDC가 결합하여 카복실기 활성화로 인한 아민의 치환반응으로 아마이드를 형성시키는 과정에서 카복실기가 감소하였기 때문이다.⁸

MTT 분석. DBP 스폰지에서의 세포 성장률과 증식률을 확인하기 위하여 MTT 분석을 수행하였다. 상기의 분석결과 50과 100 mM로 가교시킨 DBP 스폰지의 가교조건이 가장 우수함을 확인하였고

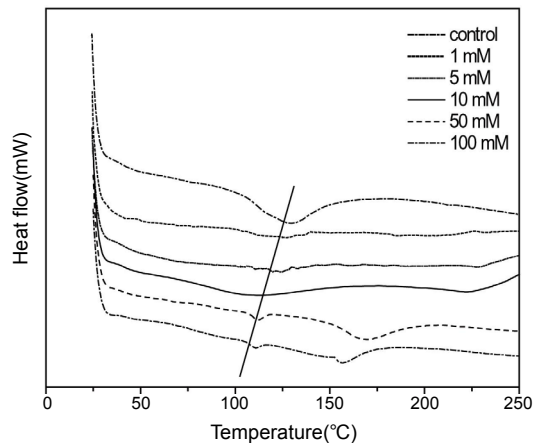


Figure 7. DSC thermogram of DBP sponge depending on the EDC concentration (line: dehydration peak).

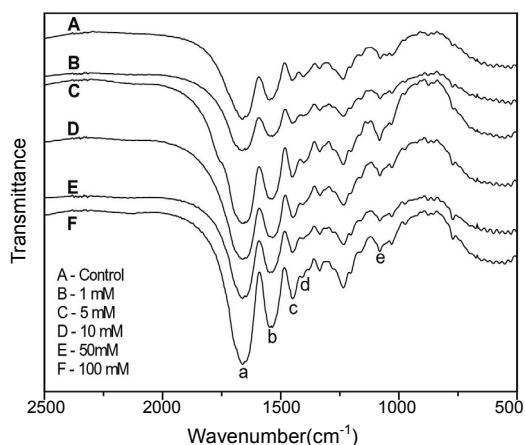


Figure 8. FT-IR spectroscopy of DBP sponge depending on the EDC concentration: (a) amide I; (b) amide II; (c) amide III; (d) carboxylate salts; (e) ester.

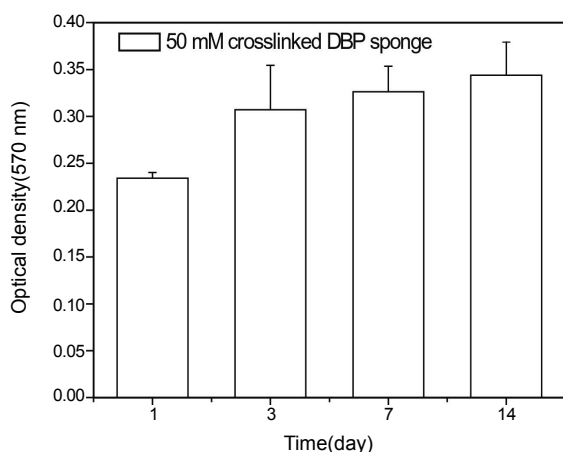


Figure 9. Cell viability of BMSCs in DBP sponge crosslinked by 50 mM EDC solution.

그 중 EDC가 갖는 세포독성을 고려하여 농도가 낮은 50 mM로 제조한 DBP 스폰지를 선택하여 rBMSC를 파종하였으며 이를 Figure 9에 나타내었다. DBP 스폰지에 파종하지 않고 단층상에 1일째 배양했을 때와 비교하였을 때 약 84.09%의 높은 초기 부착률을 보였다. 또한, 50 mM DBP 스폰지에서 배양을 시키고 14일 동안 관찰한 결과, 시간이 지날수록 꾸준한 속도의 성장률과 증식률을 보임을 확인할 수 있었다.

결론

조직공학 기술에서는 초기의 세포 부착과 차후의 조직형성을 위한 다공성의 3차원적인 지지체로서 생체적합성 지지체의 사용이 필수적이다. 본 연구에서는 천연생체재료인 DBP를 이용하여 스폰지 형태의 지지체를 제조하였고 조직공학적 지지체로서의 응용가능성을 확인하고자 하였다. DBP 스폰지는 DBP를 농도가 다른 펩신과 아세트산을 이용하여 콜라겐 가닥을 형성시키고 동결건조과정을 거쳐 EDC 가교제의 농도를 다르게 처리하여 제조하였다. 가교농도

가 일정할 때 펩신의 농도가 0.2~0.3%에서 그 다공성질이 우수하였다. 또한, 펩신의 농도를 일정히 했을 때 가교제인 EDC의 농도를 증가시킬수록 다공특성이 향상되며 물을 흡수하고 저장할 수 있는 능력 또한 향상됨을 나타내었다. 이러한 여러 분석결과 50과 100 mM로 가교한 DBP 스폰지가 조직공학적 지지체로 사용하기에 우수한 가교조건을 가짐을 확인하였다. 그 중 가교제의 농도가 50 mM인 DBP 스폰지를 이용하여 BMSC의 성장률을 측정하였는데 14일 동안 BMSC의 꾸준한 성장패턴을 확인할 수 있었다. 펩신을 이용하여 항원이 제거되고 다양한 성장인자를 포함하고 있는 DBP 스폰지는 비록 기계적 강도가 약한 천연재료이지만 EDC 가교제로 충분히 물성이 증진되어 조직공학 지지체로 응용하기에 적절한 조건이 형성될 가능성을 본 연구에서 확인하였다. 현재 DBP 스폰지에서 BMSC의 골분화를 확인 중에 있다.

감사의 글: 본 연구는 산업자원부 및 세포융용사업단(SC4110)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. G. Khang, M. S. Kim, B. Y. Min, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 376 (2006).
2. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, J. S. Park, J. Y. Lim, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 505 (2007).
3. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
4. Y. K. Ko, S. H. Hee, H. J. Ha, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, Y. S. Son, H. B. Lee, and G. Kang, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 67 (2007).
5. G. Khang, S. J. Lee, and H. B. Lee, "Polymer-cell interaction", in *Tissue Engineering: Concepts and Application*, 2nd Eds., J. J. Yoon, and I. Lee, Editors, Korea Med. Pub. Co., Seoul, p. 297 (2002).
6. S. H. Kim, S. H. Kim, and Y. H. Kim, *Polym. Sci. Tech.*, **16**, 468 (2005).
7. M. O. Baek, S. J. Won, S. H. Kim, H. W. Roh, N. R. Lee, M. S. Kim, G. H. Ryu, Y. H. Cho, S. J. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 600 (2007).
8. 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).
9. S. H. Kim, S. J. Yoon, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **30**, 14 (2006).
10. I. K. Park, S. H. Oh, and J. H. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 164 (2004).
11. 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).
12. S. J. Yoon, K. S. Park, B. S. Choi, G. Khang, M. S. Kim, J. M. Lee, and H. B. Lee, *Key Eng. Materials*, **342-343**, 161 (2007).
13. B. S. Choi, S. H. Kim, S. J. Yun, H. H. Ha, M. S. Kim, Y. I. Yang, Y. S. Son, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**, 295 (2006).

14. W. Huang, C. Brian, W. Isabella, R. George, I. Jenji, W. Benjamin, Y. Dean, and M. Timothy, *Experimental Cell Res.*, **299**, 325 (2004).
15. E. J. Kim, C. S. Park, C. S. Park, M. S. Kim, S. H. Cho, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 218 (2004).
16. K. S. Kim, M. H. Cho, H. H. Ahn, S. B. Song, S. J. Seo, M. S. Kim, B. Lee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 168 (2007).
17. S. K. Kim, K. D. Hong, S. H. Ko, M. S. Kim, G. Khang, I. W. Lee, C. W. Han, H. K. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 130 (2005).
18. J. F. Sugiura, H. Kitoh, and N. Ishiguro, *BBRC*, **316**, 233 (2004).
19. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
20. J. R. Mauney, C. Jaquierey, V. Volloch, M. Hebererb, I. Martinb, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **26**, 3173 (2005).
21. Y. Chang, C. C. Tsail, H. C. Lian, and H. W. Sung, *Biomaterials*, **23**, 2447 (2002).
22. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
23. V. Charulatha and A. Rajaram, *Biomaterials*, **24**, 759 (2003).
24. M. Matsuoka, B. Wispriyono, and H. Igisu, *Biochem. Pharm.*, **59**, 1573 (2000).
25. Y. Zhang, W. Liu, G. Li, B. Shi, Y. Miao, and X. Wub, *Food Chem.*, **103**, 906 (2007).
26. S. Nalinanon, S. Benjakul, W. Visessanguan, and H. Kishimura, *Food Chem.*, **104**, 593 (2007).
27. Z. Chen, X. Mo, C. He, and H. Wang, *Carbohydrate Polym.*, **72**, 410 (2008).