하이드록시아파타이트가 비율별로 첨가된 실크 피브로인 지지체에서 토끼 골수 유래 줄기세포의 골분화

심보라 · 김혜민 · 김수민 · 김도경 · 송정은 · 박찬흠* · 강길선[†]

전북대학교 BIN 융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자 BIN융합 연구소 *한릮대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과 (2016년 5월 23일 접수, 2016년 6월 23일 수정, 2016년 7월 22일 채택)

Osteogenesis Differentiation of Rabbit Bone Marrow-mesenchymal Stem Cells in Silk Scaffold Loaded with Various Ratios of Hydroxyapatite

Bo Ra Sim, Hye Min Kim, Soo Min Kim, Do Kyung Kim, Jeong Eun Song, Chan-Hum Park*, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Fusion Tech, Polymer BIN Fusion Res Center & Dept of Polymer Nano Sci Tech, Chonbuk National Univ., 567 Deokjin, Jeonju, Chonbuk 54896, Korea

*Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 24252, Korea (Received May 23, 2016; Revised June 23, 2016; Accepted July 22, 2016)

초록: 실크 피브로인은 좋은 기계적인 특성과 세포 호환성 때문에 인공 골 재료로써 널리 사용되어왔다. 최근 실크 피브로인이 가진 취약성 때문에 실크 피브로인은 다양한 재료들이 첨가되어 실크 복합 지지체로서 연구되고 있다. 본 연구에서는 실크 피브로인의 단점을 보완하기 위해 하이드록시아파타이트/실크 복합 지지체를 제작하였다. 하이 드록시아파타이트/실크 복합 지지체는 기계적/생물학적 특징을 확인하기 위해 SEM, EDS, 물 침투성, 다공도, 압축 강도, MTT assay, ALP 활성도, mRNA 발현을 통해 연구되었다. 실험 결과, 하이드록시아파타이트/실크 복합 지지 체는 골 조직 공학을 위한 지지체로서 뛰어난 특성을 가지며, 토끼 골수 유래 줄기세포로부터 골 형성을 유도하는 잠재성을 확인하였다.

Abstract: Silk fibroin (SF) has been widely used as an artificial bone material due to the good mechanical properties and cell compatibility. Recently it have been studied as hybrid silk scaffold with the addition of various materials because it has vulnerability. In this study, we manufactured hydroxyapatite (HAp)/SF hybrid scaffolds to complement the disadvantage of the SF. HAp/SF hybrid scaffolds were measured to study the mechanical/biological characteristics through SEM, EDS, measurement of water uptake, porosity, compressive strength, MTT assay, ALP activity and mRNAs expression. These results showed HAp/SF hybrid scaffold has excellent properties as a scaffold for bone tissue engineering and potential for inducing osteogenesis from rabbit bone marrow-mesenchymal stem cells (rBMSCs).

Keywords: silk fibroin, hydroxyapatite, rabbit bone marrow-mesenchymal stem cells, osteogenesis.

서 론

선천적인 골 관련 질병, 사고 또는 암에 의한 골 결손 등에 의해 손상된 조직 또는 장기를 회복시키는 의료기술은 많은 발전을 해왔으며, 그 중 자가이식과 이형이식 등의 기술은 널 리 이용되고 있다. 그러나 이식에 있어서 공급의 한계로 인

하여, 뼈 이식재로써 다양한 인공재료들이 골 대체재로 개발 및 연구되어 사용되고 있다.12 인공 대체물을 만들어 적용하 는 조직공학은 생체재료과학, 세포 생물학, 세포와 재료간의 상호작용 그리고 표면 특성 등 여러 분야에 걸쳐 빠르게 확 대되고 있다. 조직공학은 사고나 질병으로 인하여 잃거나 손 상된 기관이나 조직을 대체하는 기술로, 많은 연구자들과 의 사들이 환자를 치료할 때 외과적이면서 고통을 최대한 줄이 는 방법을 사용하고 있다. 일반적인 방법은 환자로부터 조직 의 특정 세포를 분리하여 이전 배양 조건하에 3차원 지지체 에서 증식시켜 적합한 부위에 이식하는 것으로, 인체의 조직

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

^{©2016} The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

이 분해 가능한 지지체와 융합되도록 한다.34

세포 기반의 조직공학에 있어서 골수유래줄기세포는 가장 기대되는 세포원이다. 이는 골수에서 쉽게 얻을 수 있고, 여 러 번의 계대배양이 가능하며 노령의 모델에서 채취한 세포 도 증식력이 우수하여 성체세포보다 많은 장점을 가지고 있 다. 또한 조골세포, 연골세포, 지방세포, 인대세포 및 신경세 포 등과 같이 여러 세포로 분화할 수 있는 잠재력을 가지고 있어 최근 다양한 동물 모델에서 분리, 배양되고 있다. 골수 유래줄기세포는 많은 연구를 통해 골절치유, 골 결손의 치유, 신연골 형성술 등에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 골 재형성 과정의 혈관 형성에 있어서도 많은 역할을 하여 그 역할에 대한 관심이 모아지고 있다.⁵⁸ 이러한 세포 기반의 조 직 공학적 치료 기술로는 골 이식술이 있으며 이 골 이식술 에 사용되는 이식 재료는 자가골, 동종골, 이종골 등이 있다. 최근에는 다양한 인공물들이 골 대체재로 개발, 연구되어 사 용되고 있다.⁹

인공 골 대체물은 우선 다루기 쉬워야 하고 생체 내에서 견딜 수 있는 기계적 강도를 가져야 한다. 이식부위에 배양 된 세포가 잘 전달되고 그 주변 조직과 융합되어 세포의 유 도와 전도가 잘 일어날 수 있도록 적당한 표면 거칠기와 다 공을 가지면서 조직에 흡수될 수 있는 우수한 흡수성을 가져 야 하며, 이 흡수성 또한 제어할 수 있어야 한다. 또한 영양 분의 순환이나 세포의 분화, 부착 및 증식이 활발히 일어날 수 있는 열린 다공성 구조여야 하며 독성이 없고 체내에서 염증을 일으키지 않으면서 분해로 인한 부산물이 생체에 영 향을 주지 않아야 한다.¹⁰⁻¹³

인공 골 대체물에 적합한 재료 중 하나인 실크 피브로인은 누에(Boombyx mori, Linne 종)에서 뽑아낸 것으로 세리신 (sericin)을 제거하는 공정을 거치면 콜라겐과 같이 체내에서 면역반응이 매우 약하게 일어나며, 체내에서 6개월 정도 지 나면 분해되기 시작하여 1년 후에는 인장강도를 상실하며 2 년 이내에 완전히 분해된다.1418 따라서 기계적 성질이 우수 하고 생분해도를 제어할 수 있을 뿐만 아니라 우수한 세포 적합성을 갖는다. 이로 인하여 실크 피브로인은 섬유, 필름, 미립구 및 다공성 지지체의 형태로 조직공학에 응용되어 생 체재료로써 널리 연구되고 있다. 19-21 또한 3차원의 다공성 실 크 피브로인 지지체는 훌륭한 물리, 화학적 성질을 가져 골 조직 공학적 재료로써 가치가 크다는 기대를 보였다.22 그러 나 실크 지지체의 기계적 성질은 원래의 뼈보다 상당히 약하 여 실크 그 자체로서는 골 형성체가 될 수 없을 뿐만 아니라, 실크 피브로인 자체가 골 전도성이나 골유도성을 갖지 않기 때문에 골 조직 공학적 재료로써 실크 피브로인에 여러 가지 재료가 첨가된 복합 실크 지지체가 연구되고 있다. 23-26 이에 본 연구팀에서는 기존의 세포 기반의 조직공학용 인공 골 대 체물을 대신할 수 있는 골 이식재를 연구하던 중, 실크 피브 로인의 단점을 보완할 수 있는 재료를 첨가하여 복합 실크 지지체를 만들게 되었다.

골 재생에 있어서 주요 생체재료는 하이드록시아파타이트 (hydroxyapatite, HAp; Ca10(PO4)6(OH)2)와 제 3인산칼슘(tricalcium phosphate, TCP) 등과 같은 세라믹이다. 이는 인공 골 재료에 있어서 가장 기대되는 재료로 널리 연구되고 있다.27 가장 보편적으로 사용되는 인산칼슘계 화합물인 하이드록시 아파타이트는 인산칼슘의 가장 안정적인 형태 중 하나이다. 이는 건조 뼈 중량의 70%를 차지하며, 인체 뼈의 무기질 부 분과 매우 비슷한 성분과 구조를 가지고 있어 여러 형태로 의료분야에 사용되고 있다. 또한 하이드록시아파타이트는 생 체적합성과 생체친화성이 우수하고, 이식 후 점차 본래의 뼈 에 의해 대체되는 골 전도성과 골 유도성을 가지기 때문에 정 형외과, 치과 등을 포함하여 여러분야에서 다양하게 사용하 고 있다. 따라서 하이드록시아파타이트의 이러한 특성으로 인 하여 골 조직공학에서 이상적인 인공 골 재료로써 인정받고 있으며, 실험 및 임상에서 연구가 활발히 진행되고 있다. 2.27,28 본 연구에서는 조직 공학적인 지지체로서 하이드록시아파 타이트/실크 복합 지지체의 적용 가능성을 확인하기 위해 하 이드록시아파타이트 마이크로입자가 다양한 함량으로 첨가된 실크피브로인 지지체에 토끼 골수유래 줄기세포를 배양하여 지지체에서의 골분화 정도를 여러 가지 특성분석을 통해 확 인하였다.

실 험

시약 및 재료. 사용된 실크(B. mori silkworm)는 대한민국 경상북도 울진 농원에서 구입하였으며, HFIP(hexafluoroisopropanol, Sigma, USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기 용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

실크 피브로인 수용액 제조. 누에고치를 1 cm×1 cm 크기 로 잘게 자른 후, 0.02 M Na₂CO₃ 수용액에 넣고 30분간 가 열하여 실크에서 세리신이 녹아나오게 하였다. 녹아나온 세 리신을 제거하기 위해 증류수에 3회 세척 후, 실크 피브로인 을 상온 후드에서 하루 동안 건조하였다. 이 실크 피브로인 을 CaCl₂, 에탄올 및 증류수를 1 : 2 : 8의 비율로 만든 용액 에 넣어 실크 피브로인 수용액이 되게 하였다. 실크 피브로 인 수용액을 미라클로스(Miracloth, Calbiochem, USA)를 사 용하여 걸러낸 뒤, 셀룰로오스 한외 여과막(3500 M_w, Thermo, USA)을 사용하여 증류수를 투석외액으로 투석하여 농도가 8 wt%인 수용액을 얻었다. 이 용액은 사용 전까지 4 ℃에서 보관하였다.

실크 피브로인 지지체 제조. 8% 실크 피브로인 수용액에 20 nm 크기의 하이드록시아파타이트(CG bio co., Korea)를 0, 10, 30, 50% 비율별로 첨가하고, 300~400 µm 크기의 NaCl (Showa, Japan)를 가한 뒤, 8 cm×8 cm 사각 프레임에 부어 건조시켰다. 건조 후, 증류수에 담가 소금을 제거한 뒤, 수분

이 충분히 적셔져 있을 때 6 mm 지름의 펀치로 잘라내었다. 잘라낸 실크 피브로인 지지체는 상온에서 말려 감마선 멸균 한 뒤, 수분 없이 보관하였다.

골수 유래 줄기세포의 분리 및 배양. 골수 유래 줄기세포 는 4주된 암컷 뉴질랜드 화이트 토끼의 다리에서 분리하여 사용하였다. 토끼를 희생시킨 후, 등의 털을 제거하고 수술도 구를 사용하여 다리부분의 뼈를 채취하였다. 채취한 뼈에서 18-게이지 실린지를 사용하여 골수를 채취하였다. 채취한 골 수를 각각 ficoll-hypaque centrifugation을 이용하여 단핵구를 분리한 다음, 10% FBS(Lonza, USA)와 100 unit/mL의 1% penicillin-streptomycin(Gibco, USA)의 포함된 α-MEM(Gibco) 배양액을 공급하여 CO₂ incubator(5% CO₂, humidified, 37 °C) 에서 배양하였다. 이후 세포들이 부착된 것이 확인되면 배양 액을 교환한 다음, 매 2일마다 배양액을 교환하였다. 세포가 80~90% 정도 배양용기 바닥에 자라게 되면 0.25% trypsin/1 mM EDTA(Gibco)로 처리하여 세포를 분리하고 다른 배양용 기에 계대 배양하여 Passage 2의 세포를 지지체에 1×10⁵ cell/ mL로 파종하였다.

SEM, FE-SEM 및 EDS 관찰. 하이드록시아파타이트/실 크 지지체의 다공 크기와 지지체의 표면을 관찰하기 위하여 SEM 측정을 실시하였다. 지지체를 아르곤가스 하에서 플라 즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 백 금 코팅하였고 주사전자 현미경(Hitachi Co, Model S-2250N, Japan)을 이용하여 표면을 관찰하였다. 또한 전계방사형 주사 전자현미경(field emission scanning electron microscope, FESEM; SN-SUPRA 40VP, Carl Zeiss, Germany)과 분산 X 선 분광분석기(energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS; JSM-5900)를 이용하여 지지체 표면 및 구성원소의 조성을 확 인하였다.

물 침투성. 제조된 지지체의 물 침투 능력을 측정하기 위 하여 지지체의 초기 무게(*W*_{dry})를 측정하고 10 mL의 3차 증 류수에 넣어 37 ℃의 인큐베이터에서 4일간 교반하고, 물을 흡수한 지지체 표면의 물을 제거한 후, 무게(*W*_{wet})를 측정하 였다.

Water uptake(%) =
$$\frac{(W_{wet} - W_{dry})}{W_{dry}} \times 100$$
 (1)

실험은 동일한 조건에서 여섯 번씩 수행하여 분석하였다. 다공도 측정. 지지체의 다공도는 액체 치환 방법을 통해 측 정하였다. 초기 물의 부피(V₁)와 물을 함유한 지지체의 부피 (V₂)를 측정하였으며, 물을 함유한 지지체를 제거하고 남은 물 의 부피(V₃)를 기록하였다. 그 후, 다음과 같은 식을 통해 다 공도를 계산하였다.

Porosity =
$$\frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100$$
 (2)

실험은 동일한 조건에서 세 번씩 수행하여 분석하였다.

압축강도 측정. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체 의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, food technology corporation, sterling, Virginia, USA)를 이용하였 다. 지름 6 mm, 높이 3 mm의 지지체를 사용하였으며, 만능 물성측정기의 설정값으로 측정거리는 2 mm, 측정 속도는 20 mm/sec, 측정 힘은 1 N으로 하였다.

하이드록시아파타이트/실크 지지체에서 골수유래 줄기세 포 배양. 10 μL의 골수유래 줄기세포(5×10⁴ cells)를 지지체 의 중앙에 파종한 뒤, 37 °C, 5% CO₂의 조건에서 1시간 동 안 유지시켜 세포가 지지체 내로 스며들게 한 다음, 20% 우 태아혈청(FBS, fetal bovine serum, Gibco, USA) 및 100 unit/ mL의 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco)이 포함된 α-MEM(alpha modification of eagle's minimum essential media, Lonza, USA)을 배양액으로 넣고 37 °C, 5% CO₂ 조 건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었다. 골분회는 순수 배양액에서 지지체만으로 분화가 되도록 하였다.

MTT 분석. 지지체에 파종한 골수유래 줄기세포의 생존율 을 분석하기 위하여 MTT(3-[4,5-디메틸치아졸-2-일]-2,5-디페 닐테트라졸리움 브로마이드)분석을 각각 1, 3, 7, 14 및 28일 째 시행하였다. MTT(Sigma, USA) 용액(50 mg/mL) 100 µL 을 넣어준 후, 4시간 동안 37 ℃ 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸설폭사이트(DMSO, Sigma)를 1 mL 첨가하여 결정을 완전히 녹인 후, 각 100 µL씩 채취하 여 microplate reader(Thermolex, Molecular Device Co. USA)로 570 nm의 흡광도에서 측정하였다.

ALP 활성도 분석. 지지체에 파종한 골수유래 줄기세포의 alkaline phosphatase(ALP)를 측정하여 세포의 분화와 미분화 를 확인하였다. ALP 분석은 파종 1, 5, 7, 10 및 14일 째에 시행하였다. 분석은 TRACP & ALP Assay kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였다. 지지체에서 배양액을 제거 후, PBS로 3회 세척하고 0.02% extraction solution으로 세포막을 용해시켰다. 이 용해시킨 추출액에 ALP buffer(pH 9.2)에 녹인 nNPP를 넣고, 37 ℃에서 1시간 반응시켜 0.9 N의 NaOH로 반응을 정지시킨 뒤, 405 nm의 흡광도에서 측정하여 분화정 도를 분석하였다.

mRNA 발현도 확인. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체에서 골분화된 세포의 특정 mRNA 발현여부를 알아 보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 파종 1, 7, 14 및 28일째에 회수된 하이드록시아파타이트/실크 지지체를 PBS로 두 번 세 척한 후, 1 mL의 trizol(Invitrogen[™] Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션한 다음, 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름을 첨 가하고 4 °C, 12000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 mRNA 를 분리하였다. 분리된 RNA를 TOPscript[™] One-step RT-PCR DryMIX(+Dye) (Enzynomix, Korea)를 사용하여, βactin, Runx2, osteocalcin 및 collagen type I에 대해 RT-PCR 을 수행하였다. 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전 기영동을 한 후, 상대적 발현을 EtBr(Sigma, USA)을 사용하 여 시각화하였으며, 365 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하 여 밴드의 발현정도를 확인하고, Image J 소프트웨어를 사용 하여 측정된 명도값으로 정규화하여 상대적인 값을 비교하였다.

조직학적 평가. 골수유래간엽줄기세포를 파종한 지지체를 면역결핍 쥐의 피하에 이식한 후, 1, 4주 뒤 회수하여 10% 포르말린(Sigma) 용액에 고정하였다. 그 후 조직을 탈수시킨 뒤, 파라핀 블록으로 제작하여 4 µm의 두께로 잘라 슬라이드 글라스에 고정하였다. 조직학적 평가를 위하여 H&E, Alizarin red S 및 Von Kossa 염색을 실시하였다.

H&E 염색은 슬라이드 글라스에 자일렌을 처리하고 함수 과정을 거친 후, 헤마토실린 처리 및 세척하였다. 그 후, 에 오신 처리 및 세척하고 탈수과정을 거친 후, 자일렌을 처리 하고 지용성 마운팅을 떨어뜨리고 조직절편을 관찰하였다.

Alizarin Red S 염색, 역시 H&E 염색과 동일하게 함수과 정으로 처리한 후, Alizarin Red 용액을 처리하고 아세톤으로 탈수과정을 거쳤다. 그 후, 아세톤과 자일렌을 1:1 비율로 섞 어 처리하고 자일렌을 처리하였다. 마지막으로 마운팅을 하 고 조직절편을 관찰하였다.

Von Kossa 염색은 자일렌, 에탄올 등의 함수과정을 거친 후, 5% 질산은 처리 및 증류수로 세척을 하였다. 또한 5% 싸 이오황산 나트륨 처리 및 증류수 세척을 하였다. 그 후, nuclear fast red로 염색 및 증류수 세척을 하고 수용성 마운팅으로 봉 입하여 관찰하였다.

통계. 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하 여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

육안 관찰. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체를 제 작한 뒤, 현미경으로 지지체의 표면을 관찰하여 디지털카메 라(Nicone, SMZ645, Japan)로 촬영하여 표면을 관찰하였다 (Figure 1).

4개의 지지체 군에서, 다공이 잘 형성된 것을 확인할 수 있 었으며, 첨가하였던 소금으로 형성된 다공을 제외하고도 미 세한 다공이 많이 생성되어 있음을 확인하였다.

미세구조 관찰. 비율별로 하이드록시아파타이트가 첨가되 었을 때, 표면과 다공성 미세구조의 변화를 확인하고자 SEM 을 통하여 표면을 관찰하였다(Figure 2). 모든 지지체에서 다 공이 잘 형성되었을 뿐만 아니라 다공 사이의 벽에도 미세 구멍이 형성되었다. 0% 지지체는 미세 구멍이 널리 퍼져있 지만 매끈한 표면을 형성된 것을 확인할 수 있었으나, 하이 드록시아파타이트가 첨가될수록 지지체 표면이 점점 거칠어 지는 것을 관찰하였다. 또한 하이드록시아파타이트가 첨가될 0% 10%

Figure 1. Microscope images showing porosity of silk fibroin scaffold loaded with various ratios of hydroxyapatite, scale bar indicates 300 µm.

30%

50%



Figure 2. SEM images of surfaces of silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of hydroxyapatite.

수록 미세구멍이 훨씬 많음을 확인하였다. 이로써 실크 지지 체에 하이드록시아파타이트가 첨가될 시, 적당한 거칠기를 제 공하고 미세 구멍을 형성시킴으로써, 세포에 적당한 부착점 을 제공할 뿐만 아니라 다공간의 활발한 상호작용을 가능하 게 할 것이라고 사료된다.

EDS 성분 분석. FE-SEM을 통해 각 지지체에 분포하는 원소의 함량을 측정하였다(Figure 3). 실크 피브로인은 유기 물질로써 C, O, 및 N을 포함하는 물질이다. 그리고 하이드록 시아파타이트는 생체활성 세라믹으로써 주로 Ca, P 및 O의 원소로 이루어져 있다(분자구조식: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). 이를 바 당으로 원소를 측정해본 결과, 0% 지지체에서는 오직 C, O, 그리고 N만이 측정되었고, 하이드록시아파타이트가 첨가되 면서 Ca와 P 원소를 발견할 수 있었다. 특히 하이드록시아파 타이트가 첨가된 비율이 증가함에 따라서 P와 Ca 원소의 함 량이 점점 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과로 볼 때, 본 실 험에서 사용된 실크 지지체에 하이드록시아파타이트가 비율 에 따라 잘 첨가된 것을 알 수 있으며, 원소 함량의 변화가 골분화에 직접적인 영향을 미친 것으로 예상할 수 있다.



Figure 3. EDS of silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of hydroxyapatite.

물 침투성. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체의 물

침투성을 측정하여 지지체의 특성을 알아보았다(Figure 4). 0% 지지체에서 87.61%, 10% 지지체에서 87.85%, 30% 지 지체에서 85.46% 그리고 50% 지지체에서 82.61%로 각각 측 정되었다. 하이트록시아파타이트가 10% 첨가되었을 때, 첨가 되지 않았을 때보다 물 침투성이 0.24% 더 높았지만 큰 차 이를 보이지 않았다. 그러나 하이드록시아파타이트가 30% 이 상으로 첨가될수록 물 침투성이 현저하게 줄었다. 이는 세라 믹 형태의 소수성인 하이드록시아파타이트의 비율이 증가하 고 친수성인 실크의 비율이 감소하기 때문에, 지지체의 전체 적인 비율이 하이드록시아파타이트를 적게 넣었을 때보다 소 수성이 증가하여 지지체의 물 침투성이 감소한 것으로 사료 된다.²⁹

다공도. 하이드록시아파타이트가 비율별로 첨가된 실크 지 지체의 다공도를 측정하여 조직 공학적 지지체로써의 가능성 을 가늠해 보았다(Figure 5).

다공도는 0% 지지체에서 67.5, 10% 지지체에서 76.8, 30%



Figure 4. Water uptake of the silk fibroin scaffold loaded with various ratios of hydroxyapatite (*p<0.05, **<0.01).



Figure 5. Porosity of silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of hydroxyapatite.

지지체에서 78.4% 그리고 50% 지지체는 77.6%로 측정되었 다. 실크 지지체보다 하이드록시아파타이트가 첨가된 지지체 의 다공도는 증가하였다. 이는 하이드록시아파타이트가 첨가 되면서 지지체 밀도가 증가하여 다공들이 서로 연결되고, 다 공이 밀집되면서 다공 벽이 두꺼워지고, 30% 이상이 되면 밀 도가 더 증가되므로, 다공수가 감소하였기 때문이라고 사료 된다.³⁰

압축강도. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체의 조 직 공학적 적용을 위하여 압축강도 분석을 실시하였다(Figure 6).

비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체를 배지에 넣어 충분히 배지를 흡수시킨 뒤, 파종 전과 토끼 골수유래줄기세 포를 파종 14일 후에 압축강도를 측정하였다. 파종 전의 0% 지지체는 18 N, 10% 지지체는 22.5 N, 30% 지지체는 27.5 N 그리고 50% 지지체는 33 N으로 측정되었다. 또한 세포를 파 종하여 증식시킨 뒤 측정한 압축강도는 0% 지지체에서 26 N, 10% 지지체에서 39 N. 30% 지지체에서 42 N 그리고 50% 지지체에서 46 N으로 측정되었다. 파종 전과 후의 압축강도 를 분석해 볼 때, 하이드록시아파타이트가 첨가됨에 따라 압 축강도가 좋음을 알 수 있었다. 그러나 파종 전과 후의 압축 강도 증가율을 비교해 볼 때, 0% 지지체는 1.44배, 10% 지 지체는 1.73배, 30% 지지체는 1.53배 그리고 50% 지지체는 1.39배 증가한 것으로 확인되었다. 모든 지지체에서 세포를 배양함에 따라 압축강도가 증가하였지만 10% 지지체에서 그 증가율이 특히 좋은 것을 알 수 있었다. 이는 세포가 증식하 면서 지지체와 상호작용으로 더욱 강도를 높아지게 한 것으 로, 이러한 결과로 미루어 볼 때, 10% 지지체에 세포를 파종 하여 in vivo에 적용 시 가장 우수한 효과를 낼 것으로 예상 된다.

세포 부착 및 증식. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지



Figure 6. Compression strength of silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of hydroxyapatite cultured rBMSCs (p < 0.05).



Figure 7. Cell proliferation and adhesion of silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of hydroxyapatite via MTT assay (***p <0.001).

지체에서 토끼에서 분리한 골수유래줄기세포의 부착 및 증식 을 알아보고자 지지체에 세포를 파종한 뒤 1, 3, 7, 14 및 28 일 째에 MTT 분석을 실시하였다(Figure 7).

그래프의 거동을 보면, 시간의 흐름에 따라서 모든 실험군 에서 같은 패턴을 그리며 증식함을 확인하였다. 특히 10% 지 지체에서 가장 부착과 증식이 좋음을 확인하였다. 그리고 0, 30, 및 50% 순으로 결과가 측정되었다. 10% 지지체에서 가 장 MTT 결과가 높게 나타난 것은 친수성이 큰 실크에 10% 의 하이드록시아파타이트가 적당한 거칠기를 제공하여 세포 의 부착점을 형성하여 주었고, 완전한 친수성으로 수막을 형 성하여 세포의 부착을 방해하는 실크 지지체보다도 훨씬 좋 은 부착도와 증식을 보인 것으로 사료된다. 그러나 30% 이 상의 하이드록시아파타이트가 첨가되었을 때, 거칠기는 훨씬 증가하였지만 실크 지지체 내에서 소수성이 더욱 크게 작용 하여 세포가 부착하고 증식하는데 부정적인 영향을 미쳤음을 확인할 수 있다. 이로써 실크에 하이드록시아파타이트가 10% 첨가되었을 때, 적당한 거칠기로 부착점을 제공하여 세포의 부착과 증식에 긍정적인 영향을 미침을 알 수 있었다.

ALP 활성도. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체에 파종한 골수유래 줄기세포의 알칼라인 포스페이트를 측정하 여 세포의 분화 정도를 분석하였다. ALP는 골분화 시 골모 세포의 활동도를 확인할 수 있는 대표적 초기 표지자로 알려 져 있다. 그러나 그 활동 양상은 기간이 정확하지 않고, 대부 분 분화 일주일 전후에 그 활성도가 최댓값을 나타낸다.²⁹ 그 러므로 본 연구팀에서는 세포 파종 후, 14일 간 ALP 활성도 를 측정하여 세포의 분화 정도를 알아보았다(Figure 8).

파종 1일 째에는 구분이 되지 않을 정도로 모든 실험 군에 서 비슷한 수치를 보였다. 그러나 시간이 지남에 따라 일정 한 패턴으로 증가했으며 파종 10일 째에 그 수치가 최댓값을



Figure 8. ALP assay of silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of hydroxyapatite.

나타냄을 확인하였다. 그리고 파종 10일이 지난 후, 활동도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 하이드록시아파타이 트가 10% 첨가된 실크 지지체에서 그 활동도가 가장 활발하 고 큰 값을 나타냈고, 5일, 7일 그리고 10일 째에 가장 큰 활 동도가 측정됨을 확인하였다. 그리고 30, 50 및 0% 순으로 활동도가 측정되었는데 0% 지지체의 활동도는 패턴을 따라 증가하는 양상을 보이기는 하지만 큰 변화율을 보이지 않음 을 확인하였다. 그리고 0% 지지체를 제외한 다른 실험군에 서 파종 후 초기에 ALP 활동도가 증가하는 결과는 실크 지 지체에 첨가된 하이드록시아파타이트의 영향으로써 나타난 것으로, 골분화에 영향을 주는 하이드록시아파타이트가 실크 지지체 내에서 줄기세포에 영향을 끼친 것으로 보인다. 골분 화에 영향을 주는 인자인 하이드록시아파타이트가 다량 첨가 되었음에도 불구하고 30% 이상의 지지체에서는 오히려 더욱 ALP 활동도가 좋지 않은데, 이러한 결과는 세라믹 성분의 하 이드록시아파타이트가 세포의 증식과 부착을 방해할 뿐만 아 니라 분화에도 또한 부정적인 영향을 주었음으로 사료된다. 우리 몸을 이루는 뼈는 60%가 인회질의 아파타이트 성분이 지만 골분화 시에는 일정량 이상의 아파타이트는 세포의 성 장과 골모세포로의 분화를 가로 막는 요인으로 작용함을 확 인하였다.^{21,29} 따라서 MTT 결과와 함께 10% 지지체는 세포 의 부착과 증식뿐만 아니라 골분화에서도 또한 긍정적인 영 향을 미침을 확인하였고, 이를 조직공학적으로 생체에 적용 시 안정적인 지지체로써의 역할을 수행할 수 있을 것이라 사 료된다.

mRNA 발현도 측정. 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체에서 토끼의 골수유래 줄기세포를 배양하였을 때 나타 나는 mRNA를 확인하고자 하였다. 골수유래 줄기세포를 *in vitro*에서 1일, 7일, 14일 및 28일 배양한 뒤 순수하게 지지체 의 영향만으로 골분화를 유도하여 RNA 분리 및 RT-PCR을



Figure 9. Gene expression profiles of Runx2, osteocalcin and collagen type I as analyzed by RT-PCR on day 1, 7, 14 and 28. The results of agarose gel electrophoresis normalization of by (a) Runx2; (b) Osteocalcin; (c) Collagen type I by β -actin ($p^{**}<0.01$, ***<0.001).

수행하였다. 골모세포로의 분화 시 분화 초기에 발현되는 싸 이토카인인 Runx2와 건강하고 안정적인 골모세포에서 확인 되는 osteocalcin 및 뼈의 대부분을 이루는 제 1형 collagen type I의 발현도 확인하였다. 모든 실험군에서 내부 대조군인 β-actin이 발현되었으며 Runx2, osteocalcin 그리고 collagen

921

type I에 대한 발현도를 β-actin으로 정규화하여 나타내었다 (Figure 9). Runx2는 골분화 시 필수적인 분화 초기 전사인자 이며, 골모세포에 직접적으로 관련된 osteocalcin 및 collagen type I 등의 유전자는 직접적으로 전사를 촉진한다고 알려져 있다. 또한 최근의 많은 연구를 통하여 Runx2가 여러 골 관 런 세포에서 골모세포로의 분화하는 과정에 영향을 끼친다고 알려져 있다. 그러므로 본 연구팀은 Runx2의 발현을 통해 분 화의 정도를 확인함과 동시에 골수유래줄기세포가 골모세포 로 분화하기 위한 최적의 하이드록시아파타이트/실크 지지체 의 비율을 찾고자 하였다. 그 결과 배양 1일째에는 4개의 실 험군 모두에서 발현이 되지 않았으며, 배양 7일째와 14일째 에 발현이 되었다. 그러나 10% 지지체를 제외한 다른 실험 군에서는 그 발현이 매우 적었으며 ALP의 결과와 부합하여 10, 30, 50 및 0% 순으로 그 발현이 나타났다. 또한 0% 지 지체에서는 그 발현이 확인되지 않았는데, 이러한 결과는 실 크 지지체 자체만으로는 골분화가 어렵다는 것을 확인시켜 주었으며, 10% 하이드록시아파타이트/실크 지지체에서 골분 화가 가장 크게 촉진되고 있었음을 확인하였다. Osteocalcin 은 뼈 조직의 주요 비아교단백질성분으로, 본 연구팀에서는 골수유래 줄기세포의 골분화를 확인하는 마커로 사용하였다. Osteocalcin은 위의 Runx2가 전사 조절인자로 작용하여 나타 나는 골분화 중기 및 후기 표지자로 본 실험에서는 7일에 미 량 발현되었다가 14일부터 다량 발현되었으며, 28일까지도 그 양을 유지하며 조금은 증가된 발현도를 유지하였다. Osteocalcin에 발현에 있어서 0% 지지체에서는 발현이 전혀 없는 것은 아니었으나 상대적인 발현이 매우 적었으며, 10% 지지체에서 상대적으로 높은 발현도가 나타났고 30, 50 그리 고 0% 순으로 발현도가 감소하는 것을 확인하였다. 특히 10% 지지체에서 7일과 14일의 발현을 비교하였을 때, 14일에 약 3배 증가된 발현도를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 하이드록 시아파타이트/실크 지지체에서 골수유래 줄기세포가 14일 이 상이 되면 골모세포로 안정적으로 분화한 상태라고 예상된 다. 또한 10% 지지체에서 가장 안정적이며 건강한 상태로 존 재하고 있음으로 사료된다. Collagen type I은 유기바탕질의 성분으로 뼈에 다량 함유되어 있어 osteocalcin과 함께 골분 화의 중기 및 후기 표지자로 사용된다. Collagen type I은 osteocalcin과 비슷하게 Runx2가 전사 조절인자로 작용하여 발현되는 싸이토카인이다. Collagen type I 역시 10% 지지체 에서 그 발현도가 가장 우수하였으며 다른 실험군에서도 모 두 발현이 되었다. 0% 실크 지지체에서도 또한 증가되는 발 현도를 보였다. 파종 1일째와 28일째의 발현도를 비교하여 볼 때, 0% 지지체는 약 2.86배, 30% 지지체는 약 4.49배, 50% 지지체는 3.53배 그리고 10% 지지체에서는 약 5.6배 증 가된 발현도를 확인하였다. 이로써 10% 하이드록시아파타이 트/실크 지지체에서 골수유래 줄기세포가 가장 골분화가 잘 촉진되었으며, 가장 안정적으로 골모세포의 특징을 띠고 있 음을 확인하였다.

조직학적 평가. In vivo 환경에서의 증식과 골분화 반응을 확인하기 위하여, 비율별 하이드록시아파타이트을 첨가한 하 이드록시아파타이트/실크피브로인 지지체를 누드마우스의 피 하에 이식 1, 4주 후, 지지체를 적출하여 H&E, Alizarin red S 그리고 Von Kossa 염색을 실시하였다(Figure 10). Figure



Figure 10. Histochemistry staining in aqueous-derived silk fibroin scaffolds loaded with various ratios of HAp with rBMSCs after 1 and 4 weeks of implantation *in vivo*: (a) H&E; (b) Alizarin red S; (c) Von Kossa (magnification with $\times 200$, scale bar = 200 µm) (red arrows: osteo-cyte in lacuna, black arrows: mineral).

10(a)는 H&E 염색을 나타낸 것으로, 1주째에는 모든 군에서 전체적으로 다공을 조직이 잘 채우고 있음을 알 수 있으며, 특히 10% 및 30% 지지체에서는 혈관의 생성도 잘 일어났음 을 확인할 수 있다. 그리고 4주째에는 10% 제외한 모든 군 에서 다공을 채운 조직의 가장 자리부터 무기질화가 시작되 면서 신생 골을 형성하려하고 조골세포의 특이적 라쿠나와 동그란 모양의 오스테오싸이트가 관찰되었다. 특히, 10% 지 지체에서는 넓은 영역에 걸쳐 새로운 뼈가 형성된 것을 확인 할 수 있으며, 지지체 전체 영역에서 신생골화가 일어나고 있 음을 확인하였다. 이는 앞선 연구들과 비교하여 신생 골의 형 성이 훨씬 빠르게 일어나고 있음을 알 수 있다. 그리고 지지 체 벽에는 1주째부터 미세다공이 많이 분포하고 있으며, 4주 째로 갈수록 미세다공의 크기가 커지면서 분해가 시작되고. 그 미세다공으로 골세포의 이주가 일어나 지지체 벽 자체에 서도 골의 형성이 관찰되고 있다. 미네랄의 침착을 관찰하기 위해 Alizarin red S 염색을 수행하였으며, 1주째에는 하이드 록시아파타이트가 첨가된 군에서 미네랄의 침착이 일어나고 있음을 알 수 있다(Figure 10(b)). 그리고 4주째에는 다공을 채운 골 가장자리에서 미네랄의 침착이 일어나고 있으며, 특 히 10% 지지체에서는 미네랄의 침착 영역이 다른 군들보다 훨씬 넓고 붉음을 알 수 있다. 또한 골 형성을 확인하기 위 해 Von Kossa 염색을 실시하였으며(Figure 10(c)), 1주차보다 는 4주차에 모든 군에서 신생골 형성을 관찰할 수 있었다. 특 히 10% 지지체에서 신생골이 넓고, 고르게 형성되어있는 것 을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 천연재료인 실크를 피브로인 상태로 추출하 여 뼈의 구성 성분이자 골분화를 유도한다고 알려진 하이드 록시아파타이트를 첨가해 비율별 하이드록시아파타이트/실크 지지체를 제조하여 표면분석, 구성 원소분석, 지지체의 물 침 투성, 다공도 및 압축 강도 등 물리적 평가를 통해 조직 공 학적인 강도와 조성 등의 알맞은 조건을 가진 지지체로써 뼈 재생에 사용될 수 있는지에 대한 여부를 확인하였다. 또한 토 끼 골수에서 채취한 줄기세포를 파종하여 in vitro 상에서 MTT 분석을 실시하여 세포의 부착 및 증식에 대한 효과를 확인하였고, 골분화 초기에 나타나는 ALP의 활성도를 측정 하였으며, Runx2, osteocalcin과 collagen type I 마커를 통해 mRNA 발현도 분석을 실시하였다. 그 결과 실크 지지체에 하 이드록시아파타이트가 10%로 첨가되었을 때, 뼈의 조성 및 강도 등 여러 특성이 흡사했으며. 세포의 부착과 증식에 가 장 긍정적으로 작용하였고 골수유래 줄기세포가 골분화에 있 어서 알맞은 부착점을 제공하고 증식을 도울 뿐만 아니라, 골 분화도 촉진시켜 안정적이고 건강한 골 조직으로 분화되는 데에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다. 또한 in vivo를 통해

확인한 조직학적 평가에서는 10% 하이드록시아파타이트/실 크 지지체에서 신생골화가 가장 잘 일어나는 것을 확인하였 다. 따라서 10% 하이드록시아파타이트/실크 지지체는 뼈 재 생을 위한 조직공학적 재료로써 유용하게 쓰일 것으로 사료 된다.

감사의 글: 본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사 업(112007-05-4-SB010)의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1. H. Shin, S. Jo, and A. G. Mikos, Biomaterials, 24, 4353 (2003).
- 2. J. Venkatesan and S. Kim, Mar. Drugs, 8, 2252 (2010).
- I. M. El-Sherbiny and M. H. Yacoub, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, 38, 316 (2013).
- 4. L. G. Griffith and G. Naughton, Science, 295, 1009 (2002).
- 5. P. Hairong and H. Johnny, Curr. Opin. Pharmacol., 3, 329 (2003).
- S. K. Kim, K. D. Hong, and J. W. Jang, S. J. Lee, M. S. Kim, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2, 130 (2005).
- G. Khang, J. M. Rhee, P. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res*, 6, 45 (2002).
- D. Woodbury, E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black, J. Neurosci. Res., 61, 364 (2000).
- 9. A. J. W. Johnson and B. A. Herschler, *Acta Biomater.*, 7, 16 (2011).
- Y. Wang, H. J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, Biomaterials, 27, 6064 (2006).
- Y. Khan, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, and C. T. Laurencin, J Bone Joint Surg Am., 1, 36 (2008).
- H. Yoon, H. J. Ha, E. Y. Kim, J. E. Song, C. H. Park, C. K. Joo, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, 3, 91 (2012).
- O. J. Lee, J. M. Lee, H. J. Jin, and C. H. Park, *Inter. J. Tissue Regen.*, 1, 68 (2010).
- D. N. Rockwood, E. S. Gil, S. H. Park, J. A. Kluge, W. Grayson, S. Bhumiratana, R. Rajkhowa, X. Wang, S. J. Kim, G Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *Acta Biomater*, 7, 144 (2011).
- A. Augst, D. Marolt, L. E. Freed, C. Vepari, L. Meinel, M. Farley, R. Fajardo, N. Patel, M. Gray, D. L. Kaplan, and G. Vunjak-Novakovic, J. R. Soc. Interface, 5, 929 (2008).
- L. Meinel, V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, B. Snyder, C. Li, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **71**, 25 (2004).
- R. Nazarov, H. J. Jin, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 5, 718 (2004).
- H. J. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebe, and D. L. Kaplan, Biomacromolecules, 5, 711 (2004).
- R. Nazarov, H. J. Jin, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 5, 718 (2004).
- B. B. Mandal, and S. C. Kundu, *Macromol. Biosci.*, 8, 807 (2008).

- 21. H. J. Park, O. J. Lee, M. C. Lee, B. M. Moon, H. W. Ju, J. M. Lee, J. H. Kim, D. W. Kim, and C. H. Park, *Inter. J. Biol. Macromol.*, **78**, 215 (2015).
- D. Marolt, A. Augst, L. E. Freed, C. Vepari, R. Fajardo, N. Patel, M. Gray, M. Farley, D. L. Kaplan, and G. Vunjak-Novakovic, *Biomaterials*, 27, 6138 (2006).
- 23. H. J. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebe, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 5, 711 (2004).
- X. Wang, E.Wenk, A. Matsumoto, L. Meinel, C. Li, and D. L. Kaplan, J. Control. Release, 117, 360 (2007).
- 25. L. Meinel, S. Hofmann, O. Betz, R. Fajardo, H. P. Merkle, R.

Langer, C. H. Evans, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **27**, 4993 (2006).

- P. D. Damoulis, D. E. Drakos, E. Gagari, and D. L. Kaplan, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1117**, 367 (2007).
- 27. G. Wei and P. X. Ma, Biomaterials, 25, 4749 (2004).
- B. Leukers, H. Gulkan, S. H. Irsen, S. Milz, C. Tille, M. Schieker, and H. Seitz, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 16, 1121 (2005).
- H. Kim, D. K. Kim, O. J. Lee, H. W. Ju, J. M. Lee, B. M. Moon, H. J. Park, D. W. Kim, J. M. Lee, and C. H. Park, *Inter. J. Biol. Macromol.*, 82, 160 (2016).
- 30. H. R. Ramay and M. Zhang, Biomaterials, 24, 3293 (2003).