

## 탈미네랄화된 골분 스펀지에서 쥐지방줄기세포의 골분화 유도

김창현 · 장나금 · 김도경 · 송야성 · 송정은 · 강길선\*

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소  
(2016년 5월 24일 접수, 2016년 7월 18일 수정, 2016년 8월 22일 채택)

### Osteogenic Differentiation of Rat Adipose Stem Cells in Demineralized Bone Particles Sponges

Chang Hyun Kim, Na Keum Jang, Do Kyung Kim, Yah Seong Song,  
Jeong Eun Song, and Gilson Khang†

Dept. of BIN Convergence Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 54896, Korea

(Received May 24, 2016; Revised July 18, 2016; Accepted August 22, 2016)

**초록:** 탈미네랄화된 골분(DBP)은 콜라겐, 칼슘 그리고 프로테오글리칸을 포함한다. DBP는 조직공학 분야에서 널리 사용되는 생체재료로, 새로운 뼈나 연골 성장의 기초를 다지는데 도움을 주는 생체 활성 분자를 포함한다. 본 연구에서는 천연 생체재료인 DBP를 1, 2, 3% 비율의 스펀지형태로 제작하였다. 또한 체내 지방에서 쉽게 얻을 수 있는 쥐지방줄기세포(rASCs)를 DBP 스펀지에 파종한 후, 골분화를 확인하기 위해 다음과 같은 연구를 실시하였다. 먼저, 세포의 부착과 증식의 효과를 확인하고자 SEM과 MTT분석을 실시하였으며, 골분화의 발현 정도와 잠재력 확인을 위해 ALP 활성과 RT-PCR을 실시하였다. 조직화학적 염색은 쥐에 DBP 스펀지를 이식한 후 1주, 4주 및 8주 후에 적출하여, Alizarine Red S 염색과 Von Kossa 염색을 통해, 생체 내에서 골분화의 효과를 확인하였다. 그 결과, 1% DBP 스펀지가 rASCs의 골분화능을 증가시키는데 적합한 환경을 제공한다는 것을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** Demineralized bone particle (DBP) is a well-studied biomaterial, composed of collagen, calcium and proteoglycan. It is widely used in tissue engineering and regenerative medicine, because it contains powerful bioactive molecules that facilitate new bone or cartilage growth. Herein, we fabricated 1, 2 and 3% sponges using natural biomaterial DBP and studied its efficiency in rat adipose stem cells (rASCs) as models. After rASCs were seeded on DBP sponges, we evaluated rASCs adhesion, proliferation, cell attachment, proliferation and osteogenesis using SEM, MTT, and bone differentiation expose using ALP assay, RT-PCR *in vitro*. Histological examinations were performed at 1, 4 and 8 weeks after implantation DBP sponge to assess the effect of bone differentiation *in vivo* using Alizarin Red S, Von Kossa staining. We found that 1% DBP sponge can provide suitable environment for bone differentiation of rASCs.

**Keywords:** rat adipose stem cell, demineralized bone particle, sponge, osteogenesis, bone differentiation.

## 서 론

인체 조직재생 능력은 복잡한 조직구조를 가지며, 자체 재생 능력은 매우 한정적이다. 조직 손상 시 줄기세포를 통해 조직 복원이 일어나고 있지만, 사고, 질병, 노화 등의 이유로 인해, 재생의 한계를 벗어나는 일이 발생하면, 인공 조직을 통해 복원을 해야 하므로, 조직공학을 이용한 효과적인 대체 법이나 이식법 개발이 요구되고 있다.<sup>1-6</sup>

조직공학을 이용한 치료는 약물요법, 수술적 재건, 기계적

인공장기와는 달리 장기의 모든 기능을 완벽하게 대체할 수 있고 정상 장기처럼 손상으로부터 스스로 복구하는 기능을 가질 뿐 아니라 유아나 어린이에게 이식 시 성장도 가능하다는 장점을 가지고 있다.<sup>7-14</sup>

현대인에게 많이 발생하는 질병 중 하나인 골 손상을 조직 공학적인 방법으로 치료하기 위해서, 생체 골에 가까운 골 조직을 개발해야 한다.<sup>15-26</sup>

본 연구에서는 골 조직과 유사한 생체재료로 탈미네랄화된 골분(DBP, demineralized bone particles)을 사용하였다. DBP는 골 형성 단백질인 BMPs(bone morphogenetic proteins)를 비롯하여, 콜라겐, 성장인자, 그리고 다양한 사이토카인 등이 포함되어 있어, 새로운 뼈 형성을 유도할 수 있는 생체 재료이다.<sup>27-30</sup>

\*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

또한 골 조직을 재생시킬 수 있는 세포원으로 지방 줄기세포를 사용하여 부족한 골세포로 사용하고자 하였다. 지방 조직은 우리 몸에서 상당부분을 차지하는데 지방세포 외에 많은 미세혈관 내피세포, 내막세포, 지방전구세포, 간엽줄기세포 등이 포함되어 있어 적합한 환경과 생물학적 영향을 주면 각각 다른 연골, 골, 근육, 지방 등으로 유도된다는 사실이 알려져 있다. 이러한 이유로 최근에는 분화에 대한 많은 연구결과가 진행되고 있으며, 특히 허벅지나 복부로부터 쉽게 채취가 가능하며, 골수나 제대혈에서 채취해야 하는 기존의 성체줄기세포나 배아줄기세포보다 고통스럽지 않고 다양한 연령대에서 줄기세포를 확보할 수 있는 장점이 있다.<sup>31-34</sup>

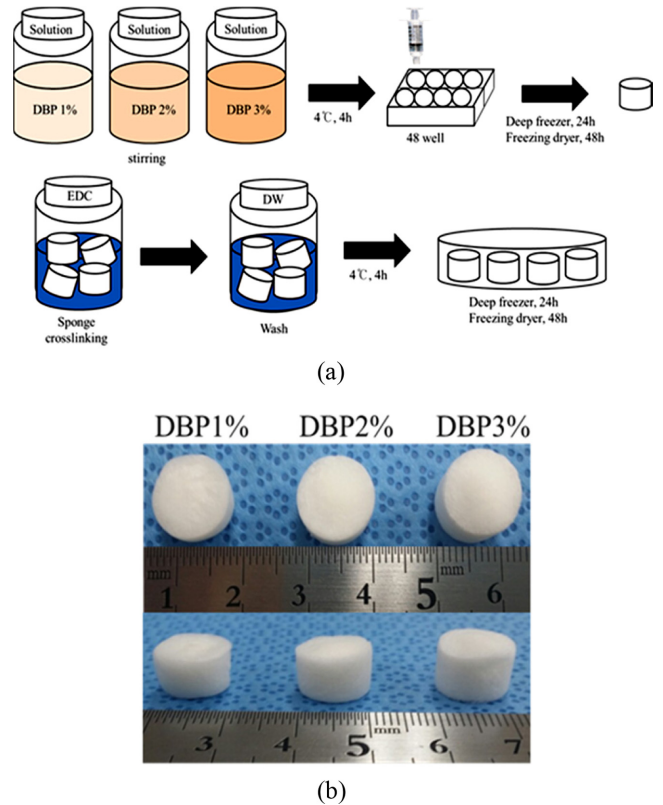
본 연구에서는 다양한 사이토카인을 함유한 3차원의 DBP 스펀지에 쥐지방줄기세포(rASCs, rat adipose stem cells)를 파종하여, 골분화 유도에 적합한 조직공학적 담체로서 가능성을 확인하고자 하였다. 세포의 증식은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)와 SEM(scanning electron microscope)을 통하여 확인하였고, ALP(alkaline phosphatase) 활성도와 osteocalcin, 제 1형 교원질의 발현을 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)을 통해 측정해 골 분화능을 확인하였다. 이를 통해 조직공학적 골 재건용 담체로서 가장 적합한 비율의 DBP 스펀지를 평가하고자 하였다.

실 험

**시약 및 재료.** DBP는 평균 크기가 180 μm 이하인 것을 사용했으며, 아세트산(acetic acid)은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였으며, 메틸렌클로라이드(methylene chloride, Tedia Co. Inc., USA) 및 이외의 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC등급을 사용하였다.

**DBP 제조.** DBP는 Urist 방법으로<sup>35</sup> 소의 대퇴부를 이용하여 제조하였다. 얇게 자른(1 cm 이내) 대퇴골을 3차 증류수로 여러 번 세척한 후 골수를 제거하고 골막과 속막을 물리적으로 제거하였다. 동결건조시켜 모래알의 크기로 분쇄한 후 분쇄된 뼈를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매(3:1)로 지방을 제거하였고 무수알콜로 헹구어 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 함량별 스펀지 제조.** 삼차증류수에 3% 아세트산(Sigma)과 0.1% 펄신(Sigma)을 함유한 용액에 DBP를 함량별로 1, 2, 3 wt%의 DBP분말을 첨가시켜 상온에서 24시간 교반 후, 4°C에서 24시간 보관하였다. 이를 직경 9 mm의 자체 제작된 원형 몰드에 담고 급랭 후 동결 건조시켜 스펀지



**Figure 1.** (a) Schematic diagram illustrating the fabrication process of DBP sponge; (b) schematics of DBP sponges at 1, 2 and 3% of DBP powder contents.

형태의 DBP를 얻었다. 제조된 스펀지는 50 mM EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, Sigma) 용액에 24시간 동안 경화시키고 95, 90, 80, 70%의 에탄올과 삼차증류수에 여러 번 세척하여 EDC를 완전히 제거하였다. 24시간 동안 급랭시킨 후 동결건조하여 경화된 DBP 스펀지를 완성하였다. 완성된 스펀지는 수분이 없는 상태로 실험 전까지 데시케이터에 보관하였다. 이 때 1 wt% DBP 스펀지는 1%로, 2 wt% DBP 스펀지는 2%로, 3 wt% DBP 스펀지는 3%로 표기하였다(Figure 1).

**지방줄기세포의 분리 및 배양.** rASCs는 4주된 암컷 쥐(spargue-dawley rat)를 사용하였다. 쥐를 희생시킨 후 몸의 털을 제거한 뒤, 수술도구를 사용하여 옆구리 쪽 지방을 채취하였다. 채취한 지방을 클린벤치에서 가위와 칼로 자른 뒤 PBS 1x에 담가놓고, 10% penicillin-streptomycin에 지방조직을 1~2분 담가놓는다. 그 후 75 μL의 콜라게나아제(Roche, Germany) 용액이 포함된 10 mL PBS에 조직을 1:1로 담고, 1시간 인큐베이션시킨 후 콜라게나아제 용액을 1500 rpm, 5분, 4°C의 원심기를 돌린다. 원심기가 끝나면 상층액을 제거하고, 10% heat inactivated FBS와 100 unit/mL의 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbeco's modified

eagle's media) LOW(Gibco) 배양액을 넣고 피펫팅 후 원심분리를 하였다. 상층액을 제거한 후 10 mL의 배양액을 따서 피펫팅한 후 cell strainer(70  $\mu$ m)를 코니컬 튜브에 올리고 배양액과 조직을 걸러준다. 걸러진 세포가 들어있는 배양액으로 세포 수를  $5 \times 10^5$  cell/mL 농도로 넣고 인큐베이터(5% CO<sub>2</sub>, humidified 37°C)에서 배양하였다. 이후 세포들이 부착된 것이 확인되면 배양액을 교환한 다음, 매 2일마다 배양액을 교환하였다.

**적외선 분광기 측정.** 가교된 DBP 스펀지에서 아마이드기의 증가를 FTIR(fourier-transform infrared spectroscopy, Bio-Rad Digilab, FTS-165, Canada)로 측정하였다. 이 분석은 KBr 펠렛법을 이용하여 시편을 만들어 측정하였다.

**압축강도 측정 분석.** DBP 스펀지의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, Food Technology Corporation, Sterling, Virginia, USA)를 이용하였다. 만능물성측정기의 설정 값으로 측정거리는 3 mm, 측정 스피드는 20 mm/sec, 측정 힘은 0.5 N으로 하였다.

**DBP 스펀지에서 지방줄기세포 배양.** rASCs( $1 \times 10^5$  세포/지지체)를 지지체(9 mm $\times$ 6 mm)의 중앙에 파종한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 1시간 동안 유지시켜 세포가 지지체 내로 스며들게 한 다음 DMEM LOW 배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 세 번 교체해 주었다. 골분화는 순수 배양액에서 지지체만으로 분화가 되도록 하였다.

**DBP 스펀지 내부 관찰과 세포부착 모폴로지.** DBP 스펀지의 다공크기와 지지체의 내부를 관찰하기 위하여 SEM 측정을 실시하였다. 지지체를 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 백금 코팅하였고 이를 SEM(Hitachi Co, Model S-2250N, Japan)을 이용하여 표면 변화를 관찰하였다.

또한 DBP 스펀지에서의 세포의 부착 및 증식 정도를 알아보기 위해 SEM 측정을 실시하였다. 제조된 지지체에 rASCs를  $1 \times 10^5$  세포/지지체의 농도로 파종하고 3, 10 및 20일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5% 글루타알데하이드(Sigma Co.)로 24시간 동안 고정하고, 알코올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90, 100%)을 이용하여 각 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 지지체를 잘라 시료 폴더에 고정시킨 후, 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope, Model SC500K, UK)를 이용하여 약 200  $\mu$ m의 두께로 백금 코팅하였고 이를 SEM(Hitachi Co., Model S-2250N, Japan)을 이용하여 DBP의 함량에 따른 스펀지에서의 rASCs의 부착 정도와 형태를 관찰하였다.

**MTT 분석.** 지지체에 파종한 rASCs의 증식률을 분석하기 위하여 MTT(3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드)분석을 각각 1, 3, 7, 10, 14, 21 및 28일째 시행하여 주었다. MTT(Sigma) 용액(5 mg/mL)을 100  $\mu$ L를 넣

어준 후, 4시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)를 1 mL 첨가하여 결정을 완전히 녹인 후, 각 100  $\mu$ L씩을 채취하여 microplate reader(Thermox, Molecular Device Co. USA)로 570 nm의 흡광도를 이용하여 세포 증식률을 분석하였다.

**ALP 분석.** 지지체에 파종한 rASCs의 알카리성인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP)를 측정하여 세포의 분화와 미분화를 모니터링하였다. ALP 분석은 파종 1, 3, 5, 7, 10 및 14일째에 시행하여 주었다. 분석은 ALP activity Kit(Takara)를 사용하였다. 지지체에서 배양액을 제거 후 DW(distilled water)로 3회 세척한 뒤 0.02% extraction solution으로 지지체에서 세포를 추출해 냈다. 이 추출액에 pNPP(paranitrophenyl phosphate) 용액을 넣은 뒤, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.9 N의 NaOH로 반응을 정지시켜 405 nm의 흡광도를 이용하여 분화 정도를 분석하였다.

**mRNA 발현도 확인.** DBP 스펀지에서 골 분화된 세포의 특정 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 파종 1, 7, 14 및 28일째에 회수된 DBP 스펀지를 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°C, 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™), 5X 완충용액(first strand buffer, Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco), RNA 분해효소 억제제(RNase inhibitor, Invitrogen™), 역전사 트랜스크립타제(Superscript™ RNase H Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 중합효소반응기(Authorized thermal cycler, TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사 하였다. 역전사 시킨 cDNA를,  $\beta$ -actin, Type I collagen, Osteocalcin 및 VEGF primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 EtBr(ethidium bromide, sigma)를 사용하여 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 밴드의 발현 정도를 확인하였다.

**동물이식 및 조직화학적 분석.** DBP 스펀지에서의 지방줄기세포의 골분화 가능성을 확인하기 위하여 면역결핍 쥐를 이용하여 실험하였다. 비울별로 제조한 DBP 스펀지(9 mm $\times$ 6 mm)에 rASCs를 스펀지 1개당  $1 \times 10^5$  농도로 파종하여 DMEM LOW(10% FBS, 1% PS) 배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 일주일 동안 인큐베이션하여 스펀지를 안정화시킨 후, 생후 4주된 balb-c 마우스 등 쪽을 2~3 cm 정도 절개하고 피하층에 이식을 하였으며, 1, 4 및 8주가 지난 후에 스펀지를 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 고정된 스펀지를 파라핀 블록으로 제작하여 4  $\mu$ m의 두께로 잘라 PLL(poly-L-lysine) 코팅 슬라이드에 고정하였다. 조직 절편

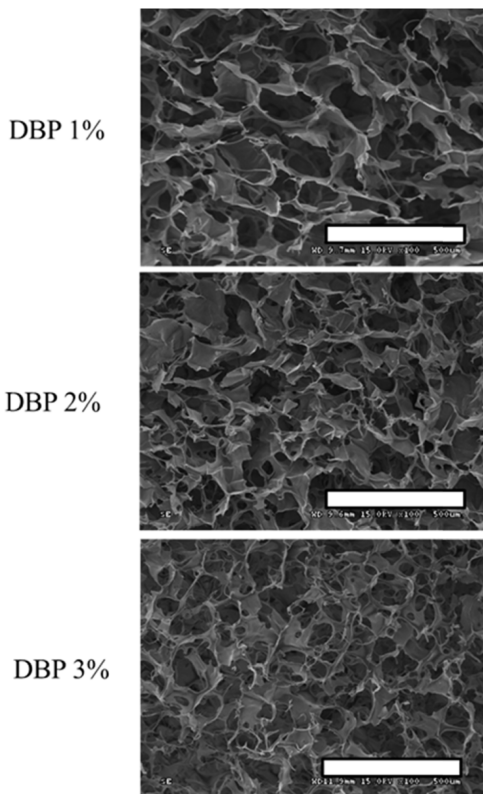
을 탈파라핀 과정을 거친 후 조직학적 평가를 위하여 Alizarin Red S와 Von Kossa 염색을 실시하였다.

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

### 결과 및 토론

**DBP 다공성 지지체 내부 관찰.** DBP 스펀지의 다공크기와 지지체의 내부를 관찰하기 위하여 SEM 측정을 실시하였다(Figure 2). DBP의 스펀지의 다공은 매트릭스에 전반적으로 잘 형성되어 있는 것을 확인하였다. 특히 1%의 DBP 스펀지가 다공의 크기가 가장 크고 균일하게 형성되었다는 것을 확인하였다. DBP의 함유량이 많아질수록 다공의 크기가 작아지며 다공의 모양이 불규칙적인 것을 확인하였다. 이는 스펀지의 다공 내에서 EDC에 의한 DBP 젤의 2차 가교의 결과로써, 스펀지 다공 내에서 DBP의 함유량이 높아질수록 밀도가 높아진 결과로 사료된다.

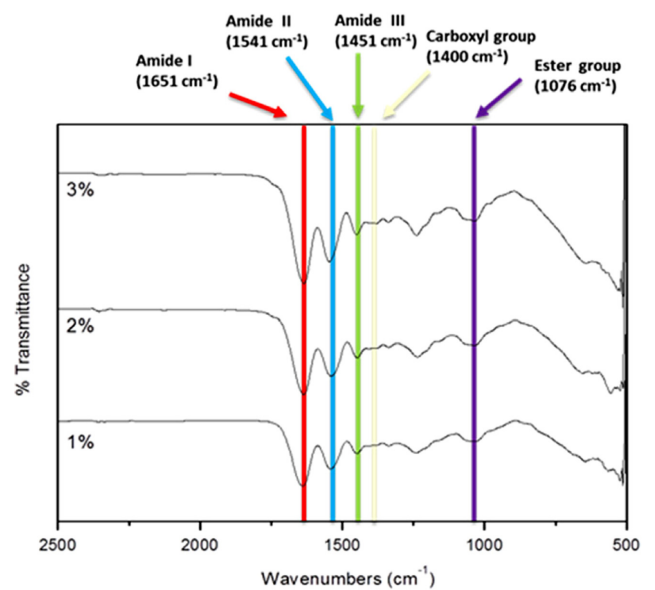
**적외선 분광기 측정.** 적외선 분광기 분석법을 통하여 DBP 스펀지의 화학적 성분을 분석하여 Figure 3에 나타내었다.



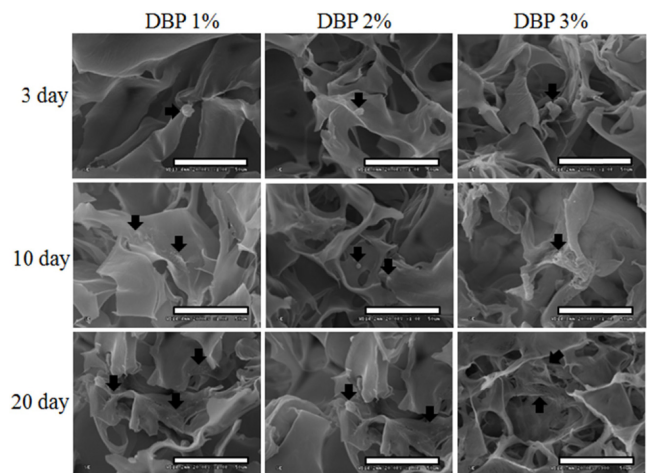
**Figure 2.** SEM microphotographs of the pore size and structure of the DBP sponges with 1, 2 and 3% of DBP powder contents (scale bar=500 μm).

DBP의 고유의 피크인 아마이드 I(1651 cm<sup>-1</sup>), 아마이드 II (1541 cm<sup>-1</sup>), 아마이드 III(1451 cm<sup>-1</sup>), 에스터(1076 cm<sup>-1</sup>) 및 카복실기(1400 cm<sup>-1</sup>)의 피크를 확인할 수 있었다. 스펀지의 DBP 농도가 증가할수록 아마이드 I, II, III 및 에스터의 피크가 증가함을 확인할 수 있었고 카복실기는 큰 차이가 없음을 확인하였다. 따라서 DBP를 스펀지로 제조하여도 그 성질을 잃지 않으며, 지지체가 함량별로 잘 제조됨을 알 수 있다.

**DBP 스펀지 세포부착 모폴로지.** DBP 스펀지에서의 rASCs의 부착 및 증식 정도를 알아보기 위해 세포를 파종한 후 3일, 10일 그리고 20일 후의 지지체를 SEM 측정을 통하여 알아보았다(Figure 4). 각 스펀지 안에서 세포가 구형의 모습



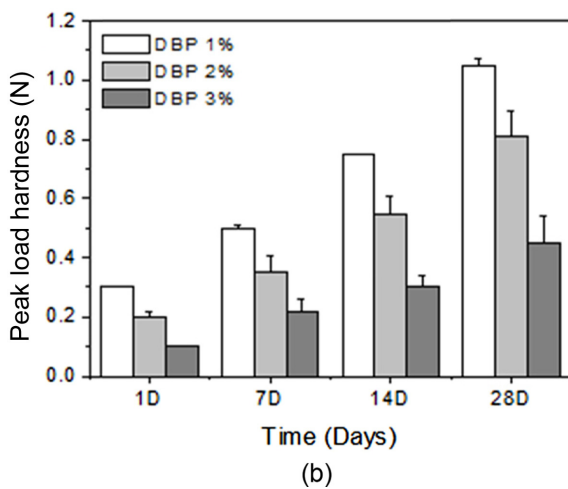
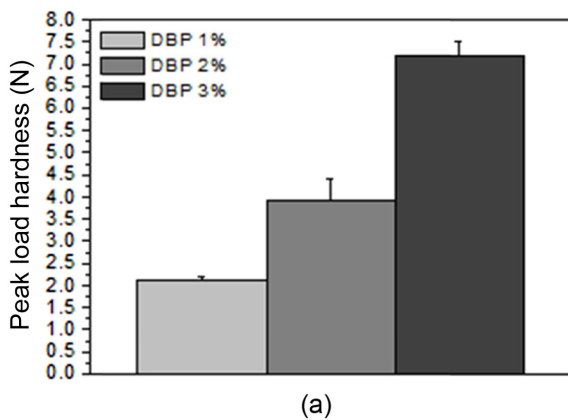
**Figure 3.** FTIR spectra of 1, 2 and 3% DBP sponges.



**Figure 4.** SEM microphotographs of rASCs morphology on DBP sponges surfaces at different cultivation times (scale bar=50 μm).

으로 유지하며 초기 부착이 잘 되어있음을 알 수 있다. 또한 세포를 파종한 후 3일 차에서부터 20일 차까지 세포의 증식 정도가 시간이 지남에 따라 모든 군에서 잘 됨을 확인하였고, 10일 차부터는 세포가 방추 형태로 뻗어있고 20일 차에서는 세포의 뻗음이 크고 길게 되어있음을 확인할 수 있다. 특히 MTT 분석과 동일하게 DBP 1%의 스펀지에서 세포의 뻗음과 증식이 가장 잘 됨을 확인하였다.

**압축강도 측정 분석.** 조직공학적 골 재생의 지지체로 사용되기 위해서는 적합한 물리적, 기계적 특성을 가진 환경이 제공되어야 한다. 이는 골 조직재생의 특성상 하중을 견뎌야 하므로 지지체는 3~5 MPa 정도의 강도를 가지고 있어야 한다는 것을 의미한다.<sup>36</sup> 그렇기 때문에 지지체에 세포를 배양하기에 앞서 지지체 자체로의 압축강도를 측정하였고, rASCs를 파종한 후 배양하면서 시간이 지남에 따라 지지체의 압축강도를 측정하였다. 이 결과는 Figure 5에 나타내었고, 세포를 파종하지 않은 지지체(Figure 5(a))에서는 DBP의 함유량이 증가할수록 압축강도가 비례적으로 증가함을 알 수 있었다. 세포를 파종한 지지체(Figure 5(b))에서는 DBP 1%의 지

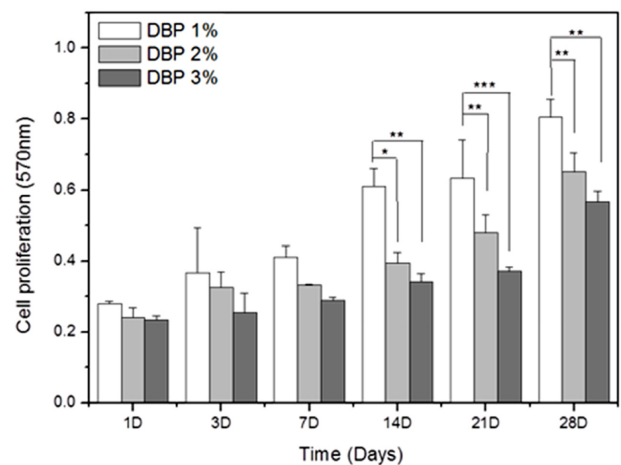


**Figure 5.** Compressive strength of 1, 2 and 3% DBP sponges (a) without cells; (b) with cells at 1, 7, 14, 28 days.

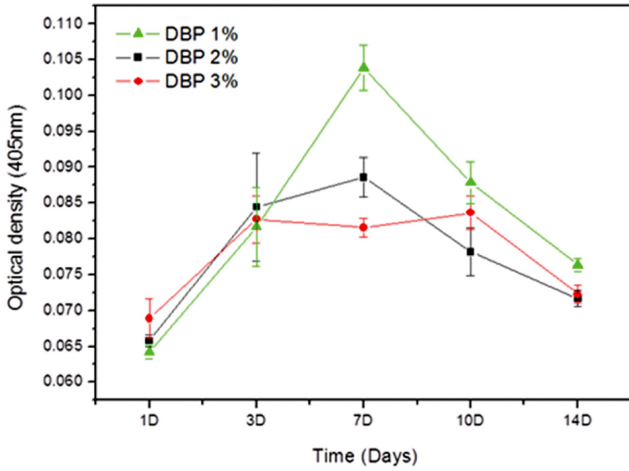
지체에서 시간이 지남에 따라 압축강도가 증가함을 알 수 있었다. 이는 DBP 스펀지가 골분화를 활성화시키면서 ECM의 분비가 증가하고 미네랄이 축적되면서 압축강도가 증가하는 것으로 보여진다. 그래서 DBP 1%의 지지체가 rASCs의 증식과 분화에 가장 적합한 환경인 것으로 사료된다.

**MTT 분석.** DBP 스펀지에 파종된 지방줄기세포의 세포증식률을 관찰하기 위하여 MTT 분석을 시행한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 초기 1, 3일째에서는 각 군에서 증식률은 큰 차이를 보이지 않았으나, 시간이 지남에 따라 모든 군에서 세포의 증식이 일어남을 알 수 있다. 특히 세포를 파종한 후 14일 이후부터는 모든 군에서 세포의 증식이 일정한 비율로 일어나며, DBP 1%의 스펀지에서 세포의 증식이 더 크게 잘 일어남을 알 수 있다. 이는 지지체 내부의 다공성 차이에 의한 것으로 사료된다. 즉, 지지체 내부 다공의 경우 세포가 부착하여 증식하는 공간이며 또한 세포가 증식하기 위한 산소와 수분, 영양분의 공급로인데 세포가 증식함에 따라 물질전달에 대한 요구가 증가하고 세포구성물의 축적으로 다공의 크기가 감소하기 때문에 적절하고 일정한 크기의 다공성을 가지는 것이 중요하다.<sup>37</sup> 결론적으로 DBP의 함유량이 증가할수록 다양한 성장인자와 사이토카인의 영향으로 증식률은 증가해야 하나, 스펀지 내의 다공 크기와 공간의 제약으로 인하여, DBP 스펀지가 1%로 제조되었을 때에 rASCs의 증식과 성장에 가장 긍정적인 영향을 미쳤다고 사료된다.

**ALP 분석.** DBP 스펀지에 파종한 지방줄기세포의 시간에 따른 골분화 정도를 확인하기 위하여 ALP 분석을 시행하였다(Figure 7). Alkaline phosphatase는 성인의 간과 소아의 골에서 주로 발견되고 특히 뼈를 생성하는 세포인 뼈 모세포에 많이 존재한다. 뼈 모세포의 활동이 증가되면 뼈 모세포의 효소인 알칼리성 인산분해효소의 활성화도 역시 증가하므로 줄기



**Figure 6.** rASCs cell viability in DBP sponges analyzed by MTT assay after 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. The symbol “\*” indicates the statistical significance (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

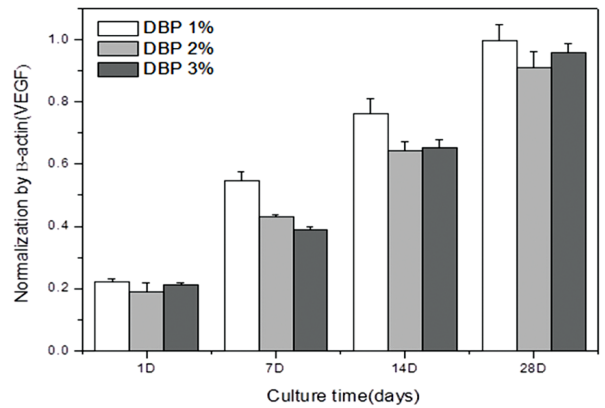
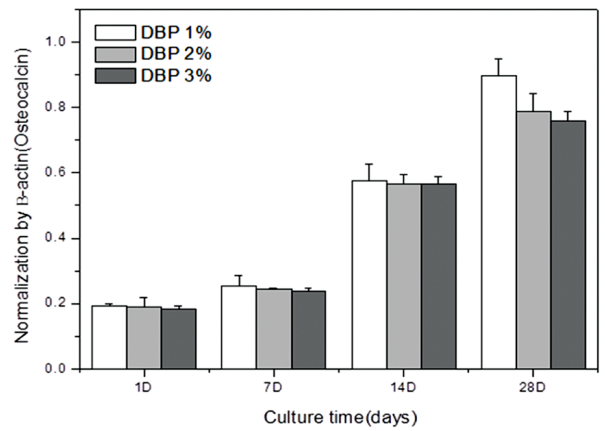
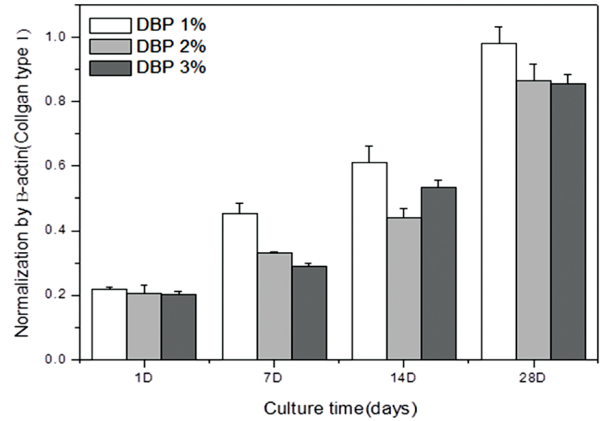


**Figure 7.** Alkaline phosphatase activity of rASCs on DBP sponges measured at 1, 3, 7, 10 and 14 days.

세포의 골분화 정도를 인산분해효소의 활성도를 측정하여 확인하였다. 문헌조사 결과 이 효소는 골분화 초기에 가장 잘 활성화된다고 한다.<sup>38</sup> 이에 따라 파종 초기 2주 동안 활성도를 측정하였다. 그 결과 모든 군에서 1일째에서 7일째를 비교해보면 모든 군에서 활성도가 증가하였다. 특히 DBP 1% 스펀지에서 활성도가 가장 크게 증가함을 알 수 있었다. 이는 rASCs의 골분화 진행에 따라 DBP 스펀지에 존재하는 여러 사이토카인이 작용하고 세포 증식이 가장 잘 이루어지는 적절한 다공성이 긍정적인 영향을 주어 미네랄이 침착되었을 것이라 사료된다.

세포를 파종한지 7일 이후부터 14일까지 활성도 전체적으로 감소함을 알 수 있다. 이러한 결과를 보았을 때, DBP 스펀지에 지방줄기세포를 파종함으로써 골분화능의 활성도를 확인하였고, 특히 1% DBP 스펀지에서 초기 활성도가 크게 증가하여 골분화가 더 잘 됨을 알 수 있었다. 이에 따라, DBP 스펀지가 골분화에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

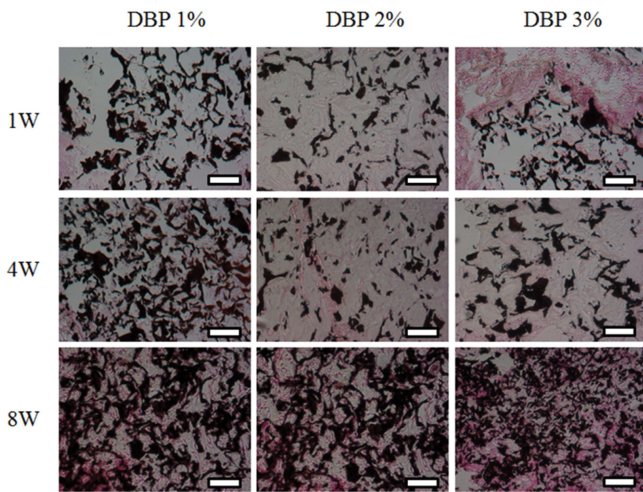
**mRNA 발현도 확인.** DBP를 비율별로 함유한 스펀지에서 지방줄기세포의 파종 후 발현되는 사이토카인을 mRNA 관점에서 알아보았다. 1, 7, 14 그리고 28일 후의 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 수행하여 발현을 나타내었다(Figure 8). RT-PCR 결과를 보면 모든 실험 군에서 House keeping gene인  $\beta$ -actin이 발현되었고, collagen type I과 osteocalcin이 시간이 지남에 따라 밴드의 발현이 진하게 됨을 확인하였다. 그리고 골 형성에 따른 신생혈관의 성장인자인 VEGF의 경우 또한 시간이 지남에 따라 모든 군에서 밴드의 발현을 확인하였다. 시간이 지남에 따라 collagen type I과 osteocalcin이 발현되는 것은 DBP 내에 존재하는 여러 성장인자와 사이토카인이 골분화를 유도했기 때문이라고 사료되며 신생혈관인자인 VEGF 또한 발현이 잘 되는 것으로 보아 DBP 스펀지가 rASCs의 골분화에 효과적인 영향을 주는 것으로 사료된다.



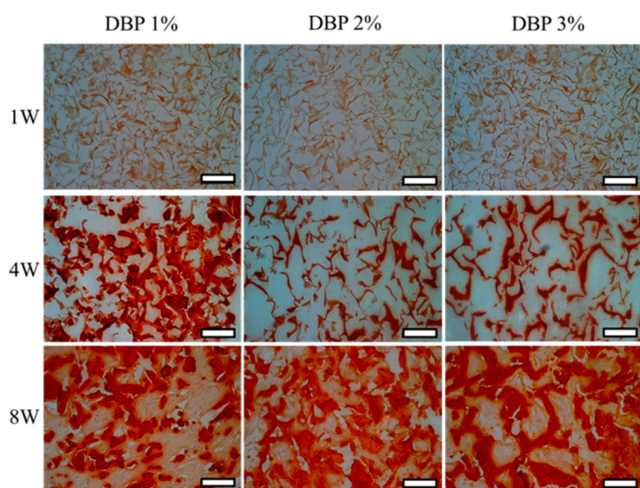
**Figure 8.** Gene expression profiles of  $\beta$ -actin, type I collagen, osteocalcin, VEGF primer on DBP sponges (no significant difference,  $p > 0.05$ ).

**동물이식 및 조직화학적 분석.** *In vivo* 환경에서의 DBP 스펀지의 rASCs의 증식과 골분화를 확인하기 위하여 누드마우스의 피하에 이식 후 1, 4, 8주 후 지지체를 적출하여 Von Kossa, Alizarin Red S 염색을 통하여 관측하였다.

칼슘과 인의 침착 정도로 뼈 조직을 구분할 수 있는 Von Kossa 염색을 하였다(Figure 9). 결과를 보면 모든 군에서 배



**Figure 9.** Von Kossa staining in DBP sponges after 1, 4 and 8 weeks of implantation *in vivo* (magnification×200, scale bar=100 μm).



**Figure 10.** Alizarin Red S staining in DBP sponges after 1, 4 and 8 weeks of implantation *in vivo* (magnification×200, scale bar=100 μm).

양 시간이 길어짐에 따라 세포질이 진한 갈색으로 점점 진해지면서 염색된 것을 확인하였고, 특히 8주째에 지지체에서 넓은 영역에 걸쳐 짙은 갈색을 띠며 뼈가 형성됨을 확인하였다. 또한 각 군을 비교하였을 때 2, 3% DBP 스펀지에 비해 1% DBP 스펀지가 뼈를 더욱 잘 형성함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 DBP가 rASCs의 골분화에 있어서 세포질 형성, 칼슘 및 미네랄의 침착 및 신생 골의 형성을 촉진해 주었음을 확인할 수 있었다.

Alizarin Red S 염색을 통해 골분화가 진행되면서 나타나는 미네랄의 침착을 확인하였다(Figure 10). 그 결과 배양 기간이 길어짐에 따라 붉고 짙게 염색되어 미네랄이 다량 침착된 것을 확인하였다. 1주째에는 전체적으로 주황색으로 염색

된 것으로 보아 조직에서 전체적으로 골분화가 진행되고 있음을 확인하였고, 4주째에는 모든 군에서 빨간색으로 염색되어 미네랄의 침착이 잘 일어나고 있음을 확인하였다. 8주째에는 신생골 영역이 특히 진한 빨간색으로 골이 형성되면서 미네랄의 침착이 잘 일어남을 관찰할 수 있다. 여기서도 Von Kossa 염색과 마찬가지로 2, 3% DBP 스펀지에 비해 1% DBP 스펀지에서의 미네랄 침착이 전반적으로 많이 일어났다는 것을 확인할 수 있었다.

## 결론

본 연구에서는 여러 사이토카인을 함유해 조직공학적 담체로서 기능이 우수한 DBP를 사용하여 1, 2 및 3%의 3차원 스펀지 형태로 제작하였고 지방줄기세포의 골분화에 최적의 DBP 함량을 찾고자 하였다. 3차원 스펀지에 대한 물리, 화학적인 물성 평가를 위하여, FTIR, 압축강도, SEM 분석을 실시한 결과, DBP 1% 스펀지에서 세포를 파종한 후 시간이 지남에 따라 압축강도가 증가하고, 다공크기가 균일하고 큰 것을 관찰할 수 있었다. 세포의 증식과 부착을 SEM과 MTT를 통해 관찰한 결과, DBP 1% 스펀지에서 시간이 지남에 따라 rASCs의 부착과 증식이 증가함을 확인하였다. 그리고 ALP 활성도와 RT-PCR을 통해 골분화능을 확인한 결과 마찬가지로 DBP 1% 스펀지에서 조직공학적으로 골분화능이 잘 형성됨을 확인하였다. 또한 *in vivo* 환경에서도 DBP 스펀지가 rASCs의 칼슘 및 미네랄 침착으로 인한 골분화에 표현이 잘 됨을 확인하였다. 이는 본연의 DBP가 가지고 있는 콜라겐과 골에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 사이토카인의 작용으로 인한 것이라고 사료된다. 이러한 결과를 종합해 보면 DBP 1% 스펀지가 골 재생에 가장 적합하다고 판단되며, 골 재건용 담체로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

**감사의 글:** 이 논문은 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원(HI15C2996)을 받아 수행된 연구입니다.

## 참고 문헌

1. M. S. Kim, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *J. Korea Vacuum Society*, **16**, 58 (2007).
2. T. G. Park and J. J. Yoo, *Polym. Sci. Tech.*, **10**, 722 (1999).
3. Y. Kobayashi, M. Hirose, Y. Sogo, K. Cheng, A. Ito, and A. Yamazaki, *Inter. J. Tissue Regen.*, **5**, 1 (2014).
4. G. Khang, J. M. Rhee, P. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
5. S. H. Kim, S. J. Yun, J. W. Jang, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Polym. Korea*, **30**, 14 (2006).
6. S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).

7. Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, and S. Ramakrishna, *Tissue Eng.*, **11**, 101 (2005).
8. H. Park, K. Y. Lee, S. J. Lee, K. E. Park, and W. H. Park, *Macromol. Res.*, **15**, 238 (2007).
9. Y. Cao, J. Vacanti, P. Ma, K. Paige, J. Upton, R. Langer, and C. Vacanti, *Mater. Res. Soc. Proceed.*, **394**, 91 (1995).
10. M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. S. Langer, T. B. Aufdemorte, and A. G. Mikos, *Tissue Eng.*, **1**, 41 (1995).
11. M. E. Schwab, *Science*, **295**, 1029 (2002).
12. P. J. Horner and F. H. Gage, *Nature*, **407**, 963 (2000).
13. T. X. Ngo, E. Nagamori, T. Shimizu, T. Okano, M. Taya, and M. K. Oka, *Inter. J. Tissue Regen.*, **5**, 2 (2014).
14. K. M. Park, Y. K. Joung, K. D. Park, S. Y. Lee, and M. C. Lee, *Macromol. Res.*, **16**, 517 (2008).
15. R. Langer and D. Tirrell, *Nature*, **428**, 487 (2004).
16. B. L. Fowler and B. E. Dall, *Am. J. Orthop.*, **24**, 895 (1995).
17. J. A. Goulet, L. E. Senunas, G. L. DeSilva, and M. L. Greenfield, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **339**, 76 (1997).
18. S. N. Parikh, *J. Postgrad. Med.*, **48**, 142 (2002).
19. H. J. Lim and H. J. Chun, *Inter. J. Tissue Regen.*, **6**, 2 (2015).
20. J. E. Fleming, C. N. Cornell, and G. F. Muschler, *Orthop. Clin. North Am.*, **31**, 357 (2000).
21. K. Partridge, X. Yang, N. M. Clarke, Y. Okubo, K. Bessho, W. Sebald, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, and R. O. Oreffo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 144 (2002).
22. S. H. Yang, C. K. Hsu, K. C. Wang, S. M. Hou, and F. H. Lin, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **74**, 468 (2005).
23. H. H. Lu, M. D. Kofron, S. F. Amin, M. A. Attawia, and C. T. Laurencin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 882 (2003).
24. M. E. Joyce, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and M. E. Bolander, *J. Cell Biol.*, **110**, 2195 (1990).
25. D. S. Steinbrech, B. J. Mehrara, N. M. Rowe, M. E. Dudziak, P. B. Saadeh, G. K. Gittes, and M. T. Longaker, *Ann. Plast. Surg.*, **42**, 481 (1999).
26. E. Canalis, T. L. McCarthy, and M. Centrella, *J. Cell Physiol.*, **140**, 530 (1989).
27. M. R. Urist, *Science*, **150**, 893 (1965).
28. B. L. Hogan, *Harvey Lect.*, **92**, 83 (1996).
29. T. Ebenbal, H. Bengtsson, and S. Soderstrom, *J. Neurosci. Res.*, **51**, 139 (1998).
30. P. Lonn, K. Zaia, C. Israelsson, S. Althini, D. Usoskin, A. Kylberg, and T. Ebendal, *Neurochem. Res.*, **30**, 753 (2005).
31. J. B. Mitchell, *Stem Cells*, **24**, 376 (2006).
32. D. Ugarte and A. Daniel, *Immunol. Lett.*, **89**, 267 (2003).
33. K. Mesimäki, B. Lindroos, J. Törnwall, J. Mauno, C. Lindqvist, R. Kontio, and R. Suuronen, *Inter. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **38**, 201 (2009).
34. S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, *Stem. Cells*, **24**, 1294 (2006).
35. S. H. Lee, H. K. Hong, S. J. Kim, Y. K. Kim, Y. S. Song, Y. Ha, D. W. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, **34**, 5 (2010).
36. B. B. Mandal, A. Grinberg, E. S. Gill, B. Panilaitis, and D. L. Kaplan, *PNAS*, **109**, 20 (2012).
37. J. W. So, J. W. Jang, S. H. Kim, J. H. Choi, J. M. Rhee, B. H. Min, and G. Khang, *Polym. Korea*, **32**, 6 (2008).
38. H. Kuk, H. M. Kim, S. M. Kim, E. Y. Kim, J. E. Song, S. Y. Kwon, D. S. Suh, C. H. Park, and G. Khang, *Polym. Korea*, **39**, 6 (2015).