함량별 고분자 히알루론산과 소장점막하조직을 이용한 스폰지의 제조 및 특성 분석

신재호 · 김기훈 · 신용원 · 김휘율[†]

건국대학교 수의과대학 수의외과학 (2016년 7월 5일 접수, 2016년 9월 20일 수정, 2016년 9월 21일 채택)

Preparation and Characterization of Sponge Using Different Ratios of High Molecular Hyaluronic Acid and Small Intestine Submucosa

Jaiho Shin, Kihoon Kim, Yongwon Shin, and Hwi-Yool Kim[†]

Department of Veterinary Surgery, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea (Received July 5, 2016; Revised September 20, 2016; Accepted September 21, 2016)

초록: 본 연구에서는 소장점막하조직(SIS)에 히알루론산(HA) 함량을 달리하여 동결건조법으로 SIS-HA 스폰지를 제작하였고 그 특성을 분석함으로써 생체조직공학적 지지체로서의 응용 가능성을 확인하였다. 3% 아세트산 용액에 SIS와 SIS 함량의 1, 2, 5 및 10% HA를 첨가하여 스폰지를 제작하였고 50 mM의 가교제를 통해 가교하여 이를 전 자주사현미경, X-ray 회절분석, 적외선 분광기, 기계적 강도 및 물 흡수성 실험을 통해서 물리, 화학적 분석을 시행 하였다. 지지체 내에서 지방세포유래 중간엽줄기세포의 증식률과 침투성은 WST 분석과 H&E 염색으로 확인하였고 초기의 골분화능은 ALP 분석으로 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 세포 성장률 및 골분화능에 HA 함량이 영향 을 미치는 것으로 판단되었고 제조된 SIS-HA5% 스폰지는 골재생에 있어서 조직공학적 지지체로서의 가능성을 보여주었다.

Abstract: In this study, small intestine submucosa (SIS) - hyaluronic acid (HA) sponges were prepared by freeze-drying SIS-HA mixtures and characterized for the possible application of tissue engineered scaffold. HA of ratios of 1, 2, 5 or 10% was added to SIS dissolved in 3% (v/v) acetic acid solution. The prepared sponges were crosslinked by 50 mM of EDC solution and were lyophilized. To analyze chemical and physical properties of the scaffold, SEM, XRD, FTIR, compression test and water uptake test were used. WST assay and H&E stain was used to measure the proliferation and infiltration of adipose derived stem cell, respectively. ALP assay was used to evaluate the expression of osteo-differentiation. Our study revealed that HA ratio affected cell viability and bone differentiation. In conclusion, the composite scaffold of SIS-HA5% sponge could be considered a potential bone tissue engineering scaffold.

Keywords: small intestine submucosa, hyaluronic acid, sponge, adipose derived stem cell(ADSC), bone regeneration.

서 론

생체조직공학은 인공적으로 배양한 특이적 세포를 체외에 서 지지체 내에 배양하여 생체 내에 이식함으로써 손상된 조 직 혹은 장기를 재생시켜 정상적인 기능으로 복구하는데 그 목적이 있다. 이때 사용되는 지지체는 매우 주요한 역할을 가 지는데 세포가 성장하기 위한 이상적인 공간이 연결성을 갖 는 구조를 지녀야 하며, 생체 친화성을 가지고 체내로 이식 시에 독성 및 면역 반응을 일으키지 않고 새로운 조직을 형 성할 수 있어야 한다. 이러한 조건을 충족하는 여러 가지 형 태의 지지체 중 스폰지 형태는 이상적인 조직공학적 지지체 로 최근 연구가 지속적으로 수행되어 왔으며 소장점막하조 직, 콜라겐, 탈미네랄화된 골분, 알지네이트 등 다양한 천연 물질이 재료로¹⁻¹¹ 사용되고 있다.

소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS)은 소장을 탈세포화하여 만든 천연 생체조직으로 체내 이식을 하였을 때 면역 반응이 거의 일어나지 않는다. 구성성분 중 대부분이 콜라겐 I, II 형으로 구성되어 있고 세포외기질로 글리코스아 미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG), 피브로넥틴(fibronectin),

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hykim@konkuk.ac.kr

^{©2017} The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

콘드로이틴(chondroitin) 및 설페이트(sulfate)가 존재한다. 또 한 생체 내에서 빠르게 분해되며, SIS가 함유하고 있는 염기 성 섬유아세포 성장인자-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 혈관 내피 세포 성장인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 등과 사이토카인이 재생반응을 촉진시키며 이식된 조직의 세 포로 재생되는 역할을 하게 된다.

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 포유류의 다양한 결합 조직에서 발견되는 산성 다당류로 세포외기질의 성분인 GAG 의 일종이며 근본적으로 생체를 구성하는 물질이다. 뛰어난 점탄성으로 조직 표면을 보호하고 면역 거부반응이 없다는 장점으로 재생 의학에 널리 이용되고 있는데, 최근 마우스 모 델을 이용한 연구에서 HA가 염증관련 사이토카인의 발현을 차단해서 항염증 효과를 가져오는 것으로 밝혀졌으며¹⁵ 뿐만 아니라 뼈, 연골, 인대 등의 다양한 인체 조직재생에 도움을 준다고 보고되고 있다.¹⁶⁻¹⁸

한편, 최근 연구에 따르면 콜라겐에 HA가 함유된 스폰지 를 제작한 뒤 섬유모세포를 배양시에 20%의 HA 함유량 스 폰지에서 세포의 증식률이 뛰어남이 보고된 바 있다.¹⁰ 반면, HA 10% 이하가 함유된 농도에서는 HA가 세포의 이동과 증 식을 향상시키는 역할을 하지만 40% 이상의 고농도가 포함 된 경우 오히려 세포의 증식과 부착을 억제시키는 것으로 알 려져 있다.¹⁹ 또한 100% HA 유도체를 이용하여 제작한 스폰 지 형태의 지지체는 연골 및 피부의 결손부위에 이식되어 환 부의 재생을 증가시킨다는 보고가²⁰ 있어 세포의 증식과 분 화 및 조직의 재생과 HA 농도와의 정확한 상관관계는 아직 명확하게 밝혀진 바가 없다.

기존의 연구는 특정 농도의 HA에 대한 스폰지 제조와 세 포배양에 관한 연구에 한정되어 있으며^{35,6} HA 함량에 따른 비교 연구결과는 아직 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구에 서는 스폰지형태 지지체의 HA 함량에 따른 물리, 화학적 특 징과 세포재생 효과를 비교 분석하였다. 이를 위해 지지체의 구조를 SEM을 통하여 관찰하였고 기계적 강도와 물 흡수성 을 평가하였으며, FTIR을 이용한 유기 분석 및 XRD를 이용 한 무기 분석을 하였다. 또한 지방세포유래 중간엽줄기세포 를 지지체 내로 이식하여 WST 검사와 세포가 배양된 지지 체의 H&E 염색을 통해 세포증식과 침투성을 평가하였으며 ALP assay를 통하여 골분화 정도를 확인하였다. 이러한 실험 결과를 토대로 이상적인 HA 함량을 가지는 SIS 스폰지를 결 정하였으며, 골재생에 있어서 조직공학적 지지체로서의 이용 가능성을 확인하였다.

실 험

SIS 파우더 제조. 돼지의 빈창자를 도축한지 4시간 이내 에 획득하여 식염수로 수회 세척한 뒤, 7 cm의 길이로 자른 후 다시 세척하였다. 이 후 소장점막하조직층을 제외한 조직 을 면도날을 이용하여 기계적으로 제거하였다. 이후, SIS 내 에 존재하는 잔류세포를 제거하기 위해 SIS를 0.1% 과산화 아세트산(Sigma, USA)을 처리한 뒤, 인산염 완충용액(PBS, Gibco, USA)과 증류수를 이용하여 세척하고 0.5% 겐타마이 신(신풍제약, 한국)이 함유된 식염수로 처리하여 -70 ℃ 급저 온 냉동기에 보관하였다. 보관한 SIS는 5 mTorr, -60 ℃의 조 건에서 48시간 동안 동결 건조시킨 후, 잘게 잘라 동결분쇄 기(SPEX 6870, SPEX Inc, USA)를 이용하여 파우더 형태로 제작하였다.

SIS 스폰지 제조. 3%(v/v, in distilled water, DW) 아세트 산(acros, USA)과 0.1% 펩신(acros, USA)을 함유한 용액에 1 wt%로 SIS 파우더 첨가하여 상온에서 24시간 교반 후, 연 속하여 4 °C에서 24시간 교반하였다. 이후 용액을 몰드에 담 고 4, -20와 -70 °C에서 각각 5시간 보관 후 5 mTorr, -60 °C 의 조건에서 48시간 동안 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS 지지체를 얻었다. 제작된 SIS 스폰지는 95% 에탄올에 50 mM 의 EDC(*N*-(3-dimethylamino propyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Tokyo chemical, Japan) 용액으로 24시간 동안 경화하였다. 경화 이후에 남아있는 EDC를 제거하기 위해 37 °C의 3차 증류수로 15분간 5회 세척한 후 다시 급랭 후 동 결 건조를 실시하여 경화된 SIS 스폰지를 얻었다.²

SIS-HA 스폰지 제조. SIS-HA 스폰지는 3%(v/v, in DW) 아세트산과 0.1% 펩신에 SIS와 HA간의 폴리이온 복합체를 형성하여 서로 섞이지 않는 것을 억제하기 위해서 0.2 M의 NaCl(대정, 한국)을 첨가하였다.²¹ 용액에 1 wt%로 SIS와 SIS

Table 1. Ratio of SIS and HA in Sponges

SIS -	HA (g)				
	0	0.01	0.02	0.05	0.1
1 g	SIS	SIS -HA1%	SIS -HA2%	SIS -HA5%	SIS -HA10%



Figure 1. Manufacturing methods of SIS-HA sponges.

함량의 1, 2, 5와 10% HA(MW, ~1×10⁶ Da, Hyaluronic acid from Rooster Comb, Wako, Japan)를 넣어주었고(Table 1) 상 온과 4 ℃에서 각각 24시간 교반시킨 후, 이를 몰드에 담고 4, -20 ℃와 -70 ℃에서 각각 5시간 보관 후 5 mTorr, -60 ℃ 의 조건에서 48시간 동안 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS-HA 지지체를 얻었다. 제작된 SIS-HA 스폰지는 95% 에탄을 에 50 mM의 EDC 용액으로 24시간 동안 경화하였다. 경화 이후에 남아있는 EDC를 제거하기 위해 37 ℃의 3차 증류수 로 15분간 5회 세척한 후 다시 급랭 후 동결 건조를 실시하 여 최종적으로 경화된 SIS-HA 스폰지를 획득하였다(Figure 1).

지방세포유래 중간엽줄기세포의 분리 및 배양. 본 실험에 서 사용된 4주령 수컷 랫드의 지방세포유래 중간엽줄기세포 (Adipose derived stem cell; ADSC)는 랫드의 고환 주변 지 방조직을 채취하여 PBS에 세척 후, 콜라게나아제 타입2(Gibco, USA)로 37 °C에서 4시간 동안 세포간의 유착을 떼어준다. 다 시 PBS로 세척 후 원심분리하여 펠렛을 회수한다. 이후 100 µm 나일론 메쉬로 걸러주어 세포 잔여물을 제거하고 DMEM(Gibco, USA) 배지에 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 100 U/mL의 penicillin과 100 µg/mL의 streptomycin(Gibco, USA)을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37 °C 항온기(incubator)에서 배양시켰다. 배양액은 3일에 한 번 성장배양액으로 교체하였으며 본 실험에서는 줄기세포성 이 유지되는 계대수 3 이하의 세포를 사용하였다.

배양액. 성장배양액은 Dulbecco's modified essential media (DMEM, Gibco, USA), 10%(v/v) FBS 그리고 100 U/mL의 penicillin과 100 µg/mL의 streptomycin을 첨가해 주었다. 골분 화배양액은 DMEM에 10%(v/v) FBS, 100 U/mL의 penicillin 과 100 µg/mL의 streptomycin, 10 mM β-글리세롤포스페이트 (Sigma, USA), 10⁸ M 텍사메타손(Sigma, USA) 그리고 50 µg/ mL 아스코르빅산(Sigma, USA)이 함유된 것을 사용하였다.

세포배양 및 독성(Cytotoxicity Assay) 평가. 배양한 ADSC 는 0.05% 트립신(Trypsin-EDTA, Gibco, USA)을 이용하여 수거한 후, 5×5×2 mm³ 크기로 제조한 스폰지에 1×10⁵ cell/지 지체의 농도로 계산하여 파종하였다. 배양액은 2일에 한번 골 분화배양액으로 교체하였으며 3, 7, 14 및 21일 후, 세포의 성장률은 cell viability assay kit(WST, Ez-Cytox, Daeillab, Korea)를 이용하여 평가하였다. 분석시약(assay reagent) 20 μL 을 각 well에 분주하고 37 ℃ 항온기에서 2시간 동안 반응하 였으며 반응액 100 μL을 96웰 플레이트에 옮긴 후 ELISA reader(X fluor4, TECAN, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡 광도를 측정하였다.

Alkaline Phosphatase(ALP) 분석. SIS와 SIS-HA 스폰지 에 ADSC를 파종한 뒤에 골분화배지로 배양 후, HA의 함량 에 따른 골세포로의 분화정도를 확인하기 위해 조골세포에 특이적인 마커인 ALP 활성도를 TRACP & ALP Kit(Takara Bio Inc., Japan)을 이용하여 측정하였다.²² 각각 3, 7, 14 및 21일째 배양액을 제거하고 샘플을 생리식염수로 5분씩 3회 세척한 후 추출용액 1 mL를 혼합하여 지지체를 잘게 자르고 1시간 동안 교반하였다. 혼합액을 4 ℃, 13000 rpm에서 10분 간 원심분리한 뒤 상층액을 획득하여 기질용액과 혼합액을 1:1 비율로 혼합하여 1시간 동안 37 ℃ 인큐베이터에서 반응 시킨 뒤 0.9 N NaOH를 첨가하여 효소반응을 중지시키고 96 웰 플레이트에 반응시킨 용액을 100 µL씩 넣어 405 nm에서 홉광도를 측정하였다.

조직학적 평가. 배양한 ADSC는 0.05% 트립신을 이용하 여 수거한 다음, 직경 10 mm, 두께 3 mm의 크기로 제조한 스폰지에 2×10⁶ cell/지지체의 농도로 계산하여 파종하였다. 이 후, *In vitro* 상에서 ADSC의 골분화를 3주간 유도한 스폰 지를 10% 포름알데히드를 이용하여 고정시키고 탈수 처리하 여 물을 제거한 후, 파라핀에 고정시켰다. 그리고 스폰지를 4 µm의 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켜 조직학적 염색 시 편으로 준비하였다. 슬라이드에 4 µm 두께의 시편을 슬라이 드에 고정한 후 H&E 염색을 시행하였다. 염색한 시편은 구 배 알코올을 통해 수분을 제거하였고 자일렌으로 씻어낸 다 음 mounting medium로 마운팅하였다.⁷

전자주사현미경(SEM) 측정. SIS 스폰지와 HA 함량에 따 른 스폰지의 기공상태 및 형태학적 특성을 확인하기 위해서 SEM 측정을 실시하였다. 스폰지의 가로, 세로 절단면을 시 료홀더에 고정시킨 후, 아르곤 가스 하에서 플라즈마 스퍼터 를 이용하여 90초간 백금 코팅하였고 이를 주사전자현미경 (JSM-6701F, JEOL Ltd. USA)을 이용하여 형태학적 구조를 관찰하였다.

다공크기 및 다공도 측정. 가교된 SIS-HA 스폰지의 다공 크기를 측정하기 위하여 SEM으로 촬영한 이미지를 Image J 이미지 분석 프로그램을 이용하여 65개의 다공의 다공크기 를 측정하였다.¹⁰

제조된 스폰지의 다공도는 하버드 비중병(hubbard specific gravity bottle)을 사용하여 측정하였다.⁸ 그 계산식은 식 (1)과 같다.

Porosity(%) =
$$\frac{(W_2 - W_3 - W_s)}{(W_1 - W_3)} \times 100$$
 (1)

여기서, W_s는 측정하고자 하는 각 군의 스폰지의 무게, W₁은 에탄올을 가득 채운 후 비중병의 무게, W₂는 스폰지가 포함 된 에탄올이 가득 채워진 비중병의 무게, 그리고 W₃는 W₂로 부터 에탄올이 함유된(스폰지의 다공에 에탄올이 채워진 상 태) 스폰지를 제거한 후 비중병의 무게를 나타낸다. 각각의 무게를 측정하고 식 (1)에 대입하여 다공도를 계산하였다.

스폰지의 기계적 강도 측정. SIS와 HA의 농도를 달리한 지지체의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TA.XT plus, Texture technologies corp.)를 이용하였다. 측정하고자 하는 시료의 크기는 직경 10 mm, 높이 4 mm로 일정하게 제 작하여 20 mm 직경 실린더 프로브를 이용하여 0.1 mm/sec 의 속도로 지지체 높이의 70%까지 압력을 가하여 응력-변형 률 곡선을 통해 elastic collapse stress 값을 분석하였다.

물 흡수성 측정. 제조된 SIS와 SIS-HA 스폰지의 물 흡수 능력을 측정하기 위해서 동결건조 상태에서 무게(W_{dry})를 측 정한 후 20 mL의 PBS에 넣고 1시간 동안 방치 후 물을 흡 수한 스폰지를 용기에서 꺼내어 1분간 들어서 표면의 물기를 제거한 후 무게(W_{wet})를 측정하여 물 흡수율을 측정하였다.¹⁰

Water uptake(%) =
$$\frac{(W_{wet} - W_{dry})}{W_{dry}} \times 100$$
 (2)

X-ray 회절 분석 측정. 가교된 SIS-HA 스폰지의 결정성 및 배향성의 구조변화를 확인하기 위하여 XRD(Ultima IV, Rigaku, Japan)를 이용하여 측정하였다. 분석에 이용된 X선 은 40 kV, 40 mA의 Cu Kα선을 이용하였다.

적외선 분광기 측정. 가교된 SIS-HA 스폰지에서 콜라겐 사슬과 HA사슬의 가교결합 형성 여부를 확인하고자 FTIR (Vertex70, Bruker, USA)을 이용하였다. 500~4000 cm⁻¹의 파 장범위에서 분석하였으며 베이스라인은 제거하였다. 분석은 Kbr 펠렛법을 이용하여 각 1~2 mg의 스폰지를 알루미늄 용 기에 넣고 시편을 만들어 측정하였다.

통계학적 분석. 각 실험의 통계학적 분석은 student's *t*-test 를 시행하여 *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으 로 하였다(**p*<0.05, ***p*<0.01).

결과 및 토론

전자주사현미경 측정. SIS와 HA의 함량별로 제작된 SIS-HA 스폰지 다공체의 미세 형태는 Figure 2에 나타내었다. 스 폰지 내부는 균일한 다공을 가지며 다공도가 높게 나타냈으 며 모든 SIS-HA 스폰지에서 열린 다공의 형태를 관찰할 수 있었다.

다공크기 및 다공도 측정. HA 농도에 따른 SIS 스폰지의 다공크기는 Figure 3에 나타내었다. 분석 결과, 다공크기는 50~100 µm 범위를 가졌으며 각 군의 평균 다공크기의 사이 즈는 SIS-HA1%, SIS-HA2%, SIS-HA5% 군에서 SIS 군에 비하여 약 10 µm 크게 측정이 되었으며 SIS-HA2% 군에서 가장 큰 다공크기를 확인할 수 있었다. 이는 기존연구와¹⁰ 동 일하게 HA 함량이 다공크기의 변화를 나타내지만 유의적인 차이를 나타내지 않음을 다시 확인하였다. 또한 앞선 연구에²³ 의하면 제작된 스폰지의 다공크기가 50~200 µm 범위에서는 세포가 지지체 내로 침투하는데 있어서 유의적인 차이를 보 이지 않는다고 보고된 바 있다. 다공도의 경우 SIS의 경우 97.45±0.76%, SIS-HA1%는 97.68±0.69%, SIS-HA2%는 97.52±0.62%로 모든 군에서 97% 이상의 높은 다공도를 나



Figure 2. SEM images of SIS and SIS-HA sponges. Images were taken at $\times 150$ magnifications (white scale bars, 100 µm).

타내었다. 이러한 결과로부터 SIS-HA 스폰지가 세포의 부착 과 증식을 위하여 충분한 영양분을 공급할 수 있는 다공을 제공할 수 있음을 확인하였다.

기계적 강도 측정. HA 함량이 증가함에 따라 SIS 스폰지 에 미치는 강도의 변화를 확인하고자 기계적 강도를 측정하 였다. 기존의 연구 결과에서는¹¹ 콜라겐과 HA 분자 사이의 가교결합으로 인하여 HA 함량이 7.5% 이상일 때 평균 기계 적 강도가 상승되었다. 본 실험 결과에서는 Figure 4에서 나 타낸 것처럼 SIS-HA1%, SIS-HA2% 군에서 SIS 군에 비하 여 평균 기계적 강도의 미약한 감소를 나타내었는데 이러한 차이는 다공크기와 기계적 강도의 연구결과를²⁴ 고려하였을 때, 스폰지의 다공크기가 커지면서 상대적인 기계적 강도가 약해졌기 때문이라 사료된다. HA 함량이 5% 이상일 경우,









콜라겐과 가교결합이 다공크기가 미치는 영향보다 더 커짐으 로 인해 평균 기계적 강도가 다시 상승한 것으로 보인다. SIS-HA10% 군이 다른 군과 비교하여 평균 기계적 강도가 가장 높았으며 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

물 흡수성 측정. 수분 흡수력은 체내로 이식된 지지체가 세포를 수용할 수 있는 능력을 나타내는 주요한 요소로²⁵ Figure 5에서 확인된 바와 같이 HA의 함유량이 증가할수록 미약하게 증가된 평균 물 흡수율을 나타내었지만 군간의 유 의적인 차이는 나타나지 않았다.

X-ray 회절 분석(XRD) 측정. HA가 SIS의 콜라겐 분자구 조의 미치는 영향을 알아보기 위하여 XRD 분석을 실시하여 Figure 6에 나타내었다. XRD 회절이 20=20°에서 HA의 농 도와 큰 상관없이 완만한 피크가 관찰되었다. 20=20°에서 나타나는 완만한 피크는 콜라겐 삼차 헬릭스 구조의 특성이 며¹¹ 이러한 결과로 SIS에 첨가된 HA가 콜라겐 섬유의 배향



Figure 5. Water uptake ability of SIS and SIS-HA sponges (n=10).



Figure 6. XRD patterns of SIS and various SIS-HA sponges.

에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

적외선 분광기(FTIR) 측정. FTIR 분석을 통하여 스폰지 내의 화학적 성분을 정성적 분석을 하여 Figure 7에 나타내 었다. SIS 및 SIS-HA 스폰지의 측정결과 아미드 I(1650 cm⁻¹), 아미드 II(1540 cm⁻¹), 아미드 III(1450 cm⁻¹), N-H 진동으로 인 한 메틸기(2925 cm⁻¹)와 하이드록실기 그룹인 -OH(3300 cm⁻¹) 의 피크의 존재를 확인하였으며, 이를 통하여 EDC 가교 결 합에 의해 SIS의 주성분인 콜라겐에 존재하는 카복실기의 활 성으로 아민의 치환반응이 아미드 계열을 형성하고 카복실기 가 감소됨을 확인하였다.² HA가 함량별로 첨가된 SIS의 스 폰지의 경우 SIS 스폰지에서 존재하지 않았던 C-O 관능기가 관찰되었음을 확인하였고 이는 이전 연구와³ 동일하게 HA가 소실되지 않고 고르게 분포되어 SIS와 HA의 가교결합으로 나타난 결과로 사료된다.



Figure 7. FTIR spectra of SIS and SIS-HA sponges; C-O bond (arrow).



Figure 8. Cell proliferation assay of the SIS and SIS-HA sponge for 3, 7, 14 and 21 days (Bars correspond to the mean \pm standard deviation for n=6 measurements. *p<0.05 vs. SIS group. **p<0.01 vs. SIS group).

WST 분석. SIS 스폰지를 대조군으로 하고 HA 함량에 따 른 ADSC의 3, 7, 14 및 21일의 세포 부착도 및 성장률을 WST 검사를 통해 알아보았다. Figure 8에서 보듯이 HA 함 량이 1%와 2%인 군에서는 SIS 스폰지에 비해 유사하거나 낮은 세포 성장률을 보였으며 SIS-HA5%와 SIS-HA10% 군 에서는 높은 성장률을 보였다. 이는 HA 함량에 따라서 세포 성장률에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며 모든 측정 일에서 SIS-HA5% 군이 가장 높은 세포 성장률을 보이는 것



Figure 9. Alkaline phosphatase activity in SIS and SIS-HA sponge for 3, 7, 14 and 21 days (Bars correspond to the mean \pm standard deviation for n=6 measurements. **p*<0.05 *vs*. SIS group. ***p*<0.01 *vs*. SIS group).

을 확인할 수 있었다. SIS 군에 비하여 SIS-HA1%, SIS-HA2% 군의 세포 성장률의 저하는 골분화 지표로 사용되는 ALP 활성도의 증가를 고려할 때 1, 2%의 HA 농도가 세포 독성을 가지거나 세포 친화성을 저해하는 것이 아니라 세포 의 성장과 골분화에 따른 modulation의 결과로^{26,27} 사료된다.

ALP 활성도 측정. 조골세포가 형성하는 세포의 효소이자 골형성 마커인 ALP의 발현여부를 알아보기 위하여 제조한 SIS와 SIS-HA 스폰지에 ADSC을 파종한 후 ALP 활성도를 측정하였다. Figure 9에서 보듯이 3일에서 21일까지 모든 군 에서 꾸준히 활성이 증가하였으며 모든 측정일에서 SIS 단독 의 스폰지보다 HA를 함유한 스폰지에서 그 값이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 이전 연구에서²⁸ 보고된 바와 동일하 게 HA가 직접적으로 골분화를 일으키는데 도움을 주는 것으 로 사료된다. 특히 SIS-HA5% 스폰지에서 ALP 활성이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 지방유래 줄기세포 의 골분화 증식에 있어서 SIS-HA5% 스폰지가 가장 긍정적 인 영향을 줄 것으로 사료된다.

조직학적 평가. 스폰지 내에서 배양한 세포를 조직학적으 로 평가하기 위하여 세포의 침투 및 형태학적 변화를 관찰할 수 있는 H&E 염색을 시행하였다. H&E 염색 결과를 통하여 ADSC 세포의 형태를 관찰할 수 있으며 Figure 10에서 나타 난 바와 같이 세포가 다공구조 내부까지 침투함을 확인하였 고 SIS-HA5% 군에서 가장 치밀하게 성장한 것을 확인하였 다. 이러한 결과로 SIS-HA 스폰지가 세포가 부착하여 성장 을 할 수 있는 지지체로 응용될 수 있으며 또한 생체 적합성 도 확인할 수 있었다.

Sures (x50)
Sures (x10)

SIS
Image: Sisser (x10)
Image: Siser (x10)
Im

Figure 10. H & E staining of cell/scaffolds constructs cultured for 3 weeks *in vitro*. Images were taken at \times 50 and \times 100 magnifications (gray scale bars, 200 µm).

결 론

이전 연구를 통해서 SIS-HA 스폰지의 조직공학적 지지체 로서의 가능성을 확인하였고³이에 더 나아가 본 연구에서는 천연 생체재료인 SIS에 HA 함량을 달리하여 스폰지 형태 지 지체로 제작한 후 ADSC를 지지체 내에서 배양 및 분화하여 골재생에 적합한 HA 함량을 찾고자 하였다.

이번 실험 결과, SIS 스폰지와 1, 2, 5, 10%의 HA 함량을 가진 SIS-HA 스폰지에서 기계적 강도와 물흡수성 실험 결과 에 있어 유의적인 차이를 나타내지 않았다. FTIR을 통해서 SIS의 콜라겐 특징과 SIS와 HA의 결합이 잘 유지됨을 확인 하였다. XRD를 통해서 HA의 첨가가 콜라겐 섬유의 배향을 영향을 미치지 않고 삼차 헬릭스 구조를 유지함을 확인하였 다. SEM을 이용해서는 다공크기 및 다공도 또한 우수함을 확인하였다.

세포 성장 및 독성 여부를 확인하고자 ADSC를 이용한 WST 검사 결과에서는 SIS-HA5%, SIS-HA10% 군이 우수한 세포 성장률을 보여주고 있다. 이와 더불어 ALP 활성도 검 사에서는 SIS 군에 비해서 모든 SIS-HA 군이 높은 ALP 활 성도를 가졌으며 이는 HA가 골분화에 도움을 주는 것으로 사료된다. 특히 SIS-HA5% 군에서 가장 우수한 활성도를 나 타내었다.

결론적으로 본 연구에서는 HA가 가교된 SIS 스폰지를 이 용하여 생체적합성 실험을 시행하였으며 *in vitro* 실험을 통 해서 결과를 확인하였다. SIS-HA5% 스폰지에서 가장 우수 한 세포 성장률 및 골분화능을 나타내었고 HA 함량은 SIS-HA 스폰지 혼합 지지체에서 ADSC의 세포 성장률과 골분화 에 영향을 미치는 것으로 보인다. 향후 특이 세포로의 분화 여부를 알아보기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 미래창조과학부의 재원으로 한국연 구재단의 지원(No. 2014-A002-0012)을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문 헌

- K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, and G. Khang, *Polym. Korea*, **29**, 501 (2005).
- H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, 28, 194 (2004).
- J. Y. Lim, S. H. Kim, and G. Khang, *Polym. Korea*, **32**, 415 (2008).
- H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Chung, *Polym. Korea*, 25, 476 (2001).
- H. K. Hong, S. K. Lee, Y. Song, D. S. Kim, S. E. Hyoung, E. Kim, D. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, 34, 282 (2010).
- Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Jeong, J. S. Park, J. Y. Lim, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, **31**, 505 (2007).
- I. B. Song, M. S. Lee, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 3, 273 (2006).
- J. W. Jang, M. O. Baek, S. H. Kim, J. H. Choi, J. H. Choi, J. C. Yang, H. H. Hong, H. K. Hong, J. Rhee, B. H. Min, and G. Khang, *Polym. Korea*, **33**, 104 (2009).
- H. M. Kim, J. Y. Park, E. Y. Kim, J. E. Song, S. Y. Kwon, J. W. Chung, and G. Khang, *Polym. Korea*, 38, 278 (2013).
- S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, 24, 1631 (2005).
- N. Davidenko, J. Campbell, E. S. Thian, C. J. Watson, and R. E. Cameron, *Acta Biomaterialia*, 6, 3957 (2010).
- N. Turner, A. Yates, D. Weber, I. Qureshi, D. Stolz, T. Gilbert, and S. Badylak, *Tissue Eng.: Part A*, 26, 3309 (2010).
- J. Valentin, N. Turner, T. Gilbert, and S. Badylak, *Biomaterials*, 31, 7475 (2010).

- B. Brown, J. Valentin, A. Stewart-Akers, G. McCabe, and S. Badylak, *Biomaterials*, 30, 1482 (2009).
- S. K. Kim, H. S. Lee, K. S. Byeon, Y. J. Lee, S. M. Hong, M. R. Choi, and J. W. Park, *J. Kor. Oral Maxillofac. Surg.*, **36**, 16 (2010).
- 16. T. Sasaki and C. Watanabe, Bone, 16, 9 (1995).
- E. Sato, T. Ando, J. Ichikawa, G. Okita, N. Sato, M. Wako, T. Ohba, S. Ochiai, T. Hagino, R. Jacobson, and H. Haro, *J. Orthop. Res.*, **32**, 1619 (2014).
- M. Wigg, D. Amiel, J. Vandeberg, L. Kitabayashi, F. Harwood, and K. Arfors, *J. Orthop. Res.*, 8, 425 (1990).
- S. Tasi, J. Fang, C. Yang, J. Chen, L. Su, and S. Jan, J. Int. Med. Res., 33, 68 (2005).
- 20. A. Caplan, Tissue Eng., 6, 1 (2000).
- 21. S. Chen, Q. Zhang, N. Kawazoe, and G. Chen, RSC Adv., 5, 94405 (2015).

- J. W. So, J. W. Jang, S. H. Kim, G. A. Kim, J. H. Choi, J. Rhee, Y. S. Son, B. H. Min, and G. Khang, *Polym. Korea*, **33**, 26 (2009).
- S. Dawlee, A. Sugandhi, B. Balakrishnan, D. Labarre, and A. Jayakrishnan, *Biomacromolecules*, 6, 2040 (2005).
- Y. M. Soon, K. H. Shin, Y. H. Koh, J. H. Lee, and H. E. Kim, *Mater. Lett.*, 63, 1548 (2009).
- Y. S. Choi, S. B. Lee, S. R. Hong, Y. M. Lee, K. W. Song, and M. H. Park, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**, 67 (2001).
- H. L. Holtorf, N. Datta, J. A. Jansen, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 74, 171 (2005).
- S. Hirota, A. Kawamoto, Y. Yoshikawa, T. Ikeo, and Y. Komasa, J. Osaka Dent. Univ., 49, 27 (2015).
- Y. M. Cho, S. K. Min, S. N. Kim, and Y. O. You, J. Kor. Oral Maxillofac. Surg., 28, 216 (2002).