

<학술논문>

DOI:10.3795/KSME-A.2010.34.6.675

## 바이오리액터 개발과 기계적 자극에 의한 중간엽 줄기세포의 영향에 관한 연구

주민진\* · 전흥재\*\*† · 정형진\* · 이창근\*\* · 허동녕\*\*\* · 권일근\*\*\* · 문성환\*\*

\* 연세대학교 기계공학부, \*\* 연세대학교 의과대학 의과학과, \*\*\* 경희대학교 치의학대학원 구강생물학과

### Development of Bioreactor for Regenerative Medicine and Effect of Mechanical Stimuli on Mesenchymal Stem Cells in Polyurethane Scaffolds

Min Jin Joo\*, Heung-Jae Chun†, Hyung Jin Jung\*, Chang Gun Lee\*\*,  
Dong Nyoung Heo\*\*\*, Il Keun Kwon\*\*\* and Seong Hwan Moon\*\*

\* School of Mechanical Engineering, Yonsei Univ., \*\* College of Medical Science, Yonsei Univ.,  
\*\*\* College of Dental Science, Kyunghee Univ.

(Received February 10, 2009 ; Revised January 14, 2010 ; Accepted March 23, 2010)

**Key Words :** Bioreactor(바이오리액터), Mechanical Stimulation(기계적 자극), Mesenchymal Stem Cell(중간엽줄기세포), Polyurethane Scaffold(PU지지체)

**초록 :** 중간엽 줄기세포(MSCs)는 미분화 상태의 세포로써, 섬유아세포, 연골아세포, 골아세포 등으로 분화하여 인체의 근골격계를 구성하며, 기계적 자극은 중간엽 줄기세포 분화를 결정하는 중요한 인자로 알려져 있다. 본 연구에서는, 세포가 생존하기 위한 환경을 제공하고, 세포가 기계적 자극조건에 따라 분화할 수 있도록 하는 바이오리액터를 제안하였다. 또한, 중간엽 줄기세포를 배양하기 위한 세포 지지체로써 PU(polyurethane)로 제작된 지지체를 제안하였다. 세포 분화를 확인하기 위하여, 중간엽 줄기세포를 PU 지지체에 seeding한 후, 바이오리액터를 이용하여 기계적 자극에 의한 세포의 분화를 확인하였다.

**Abstract:** It is well known that mesenchymal stem cell(MSCs) can be differentiated into fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts and that they develop into fibrous tissue, cartilage, or bone, as a result of mechanical stimulation. In this study, we developed a bioreactor system, which is composed of a reactor vessel that provides the required cell culture environment, an environment controlling chamber to control the media, a gas mixer, and a reactor motion control subsystem to apply mechanical stimuli to the cells. For the MSC culture, We used a poly-urethane (PU) scaffold, with a collagen coating to ensure improved cohesion ratio. Then, we transferred the cultivated MSCs in the PU scaffold, cultured the cells in the bioreactor system, and confirmed the proliferation, differentiation, and ossification processes, resulting from mechanical stimuli.

### 1. 서 론

최근 재생의학(Regenerative Medicine)의 발전과 더불어 줄기세포를 이용한 치유방법 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 배아 줄기세포(Embryonic stem cell)가 가지고 있는 면역학적 부조화, 변이 암종의 형성, 윤리적 문제를 극복할 수 있는 성체 줄기세포(Adult stem cell)를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 자가 이식이 가능한 성체 줄기세포는 면역의 문제가 적고, 골수나 뇌세포 등

이미 성장한 신체 조직에서 추출한 세포를 이용하기 때문에 윤리적 논쟁이 적은 장점을 지니고 있다.<sup>(1,2)</sup>

재생의학에 있어서, 성체 줄기세포는 지방(Fat) 조직, 근-골격 질환, 소화기계 및 비뇨기 질환 등 다양한 분야로 응용될 수 있으며 이와 관련된 조직 분화 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>(3)</sup> 성체 줄기세포 중 특히 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell, MSC)는 다양한 자극(성장인자, 호르몬, 물리적 자극 등)에 의해 연골(Cartilage), 골(Bone), 근육(Muscle) 등의 근골격계 조직으로 분화가 가능하다.<sup>(4,5)</sup> 중간엽 줄기세포를 이용한 인공 근골격계 조직재생에

† Corresponding Author, hjchun@yonsei.ac.kr

있어서 물리적 자극은 중요한 요소 중 하나이며, 화학적 자극보다 물리적 자극이 줄기세포의 배양속도 및 분화방향의 제어에 더욱 효과적이라는 결과들이 나오고 있다.<sup>(6,7)</sup>

줄기세포를 이용해 조직공학을 시행하기 위해서는 조직의 구조를 유지하고 형성하기 위한 최적화된 지지체(scaffold)와 특정 조직으로 분화하기 위한 외부적 자극들이 필요하다. 현재 근골격계 조직재생을 위해 이용되고 있는 지지체의 대부분은 silk(ref)나 collagen 등의 천연물 소재나 PLGA, PLA 등의 합성 중합체등을 이용한 예가 많았으며,<sup>(8)</sup> 지지체 자체의 구조를 최적화하여 연구되기 보다는 소재의 변이에 따른 연구가 주를 이루고 있는 실정이다. 본 연구에서는 Pellethane Thermoplastic Polyurethane Elastomer를 이용한 다공성 구조 지지체를 제작하였다. Pellethane은 열가소성 탄성소재로 마모에 강하며, 높은 인장강도, 화학적 안정성, 가격 등의 여러 장점이 있는 소재이다. 이러한 Polyurethane(PU) 소재들은 현재 상업 또는 실험용으로 널리 사용되고 있으며 특히, 높은 혈액적합성과 탄성, 인장 등의 물리적 특성의 장점 때문에 의료진단기나 치료기 또는 실험용으로 혈액 또는 조직과 접촉하는 부분에서의 소재로 사용되고 있다. 바이오 리액터(Bioreactor) 내 세포와의 융합거동과 다양한 조건(인장, 압축, 비틀림)의 기계적 자극을 제공하기 위해 Polyurethane Elastomer Base의 Pellethane은 적합한 소재이다.<sup>(9)</sup>

세포 분화에 필요한 외부적 자극을 전달하는 바이오 리액터는 정확한 변위제어를 하는 것이 목표이다. Vunjak 등은 대류를 통해 세포가 지지체에 전달되는 Spinner flask 바이오 리액터를 제작하였고,<sup>(10)</sup> 유속에 의해 세포가 전달되는 방식으로 Unsworth 등이 Rotating-wavessels을 Jasmund 등은 Hollow-fiber 바이오 리액터를 Wendt 등은 Direct perfusion 바이오 리액터를 각각 제작하였다.<sup>(11-13)</sup> 대류나 유속에 의한 간접적인 자극을 가하는 바이오 리액터는 정확한 변위제어를 할 수 없다는 한계가 있다. 세포에 정확한 변위를 가하기 위해 langelier 등은 피스톤을 이용하여 모터를 구동하였고,<sup>(14)</sup> Gregory 등은 스텝모터를 사용하여 다양한 기계적 자극에 의한 중간엽 줄기세포의 분화 경향을 살펴보았다.<sup>(15)</sup> 앞선 연구들은 여전히 미세한 변위제어에 문제가 있으며 다양한 기계적 자극을 주는 데에도 한계가 있다. 또한 줄기 세포 배양에 따른 무균 환경 조성 또한 제공되고 있지 않아 두 가지를 모두 충족시켜주는 바이오 리액터의 개발이 시급한 실정이다. 따라서

본 연구에서는 최적화된 배양환경을 제공하고, 다양하고 정량적인 기계적 자극이 세포의 분화, 증식에 다른 조직 재생에 미치는 영향을 분석할 수 있는 바이오 리액터를 제작하였다. 또한, PU 지지체를 제작하고 지지체에 기계적 자극을 통한 중간엽 줄기세포에 가해진 영향을 살펴보았다.

## 2. 바이오 리액터 시스템

### 2.1 바이오 리액터 설계 및 제작

인공 근골격계 조직 재생에 있어서 기계적 자극의 수치적 정량화는 매우 중요한 연구 분야라 할 수 있다. 이를 위하여 중간엽 줄기세포에 다양한 기계적 자극을 주기 위한 바이오 리액터 시스템을 개발하였다. 바이오 리액터 시스템은 중간엽 줄기세포에 구현할 다양한 기계적 자극을 생성하는 구동부, 세포 성장에 필요한 환경조건을 제공하는 컨트롤러, 적합한 환경조건에서 세포가 기계적 자극을 받아 분화하는 Chamber로 구성된다. Fig. 1은 본 연구에서 사용된 바이오 리액터 시스템의 구성도 이다.

바이오 리액터 시스템의 기계적 자극을 구현하는 구동부에서는 인장, 압축 그리고 비틀림의 3가지의 자극을 지지체에 작용하게 된다. 최대 1000N의 하중을 가할 수 있는 서보 모터(Servo motor)와 볼스크류(Ball screw)를 이용하여 직선운동으로 바꾸어 인장 및 압축의 자극을 제공하게 된다. 이러한 직선운동에 대한 변위를 제어하기 위해 Linear Motion Guide와 Linear Motion guide actuator를 이용하여 실시간 움직이는 변위를 지속적으로 측정하며 Feedback을 통해 보다 정밀한 운동을 할 수 있게 된다. 또한 비틀림 자극은 서보 모터와 감속기(Harmonic drive)를 이용하여 각도제어를 하게 되는데 이때 사용되는 서보 모터의 용량은 최대 42N. m 이다. 두 모터를 제어할 수 있는 프로그램을 통해 세포 분화 실험에 필요한 다양한 변위 및 각도를 제공하며, 이를 통해 다양한 실험을 수행할 수 있게 된다.

줄기세포를 분화시키기 위해 환경조건 또한 매우 중요한 요소 중 하나이다. 이를 위해 영양분(Media)을 줄기세포에 제공하게 되는데 이를 일정한 유량과 유속으로 Vessel에 보내기 위해 Peristaltic pump를 이용하게 된다. Media의 경우 O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>를 포함하게 되는데 이를 위해 3종의 Gas를 하나의 Gas로 혼합하여 Media에 용해시킨다. 또한 Vessel 내의 온도를 인간 체온과 같은 온도인 37°C로

일정하게 유지하기 위해 Vessel을 이중벽으로 구성하였고, 내부벽과 외부벽 사이에 Water bath를 이용하여 37°C로 데워진 물을 순환시켜 Vessel 내부의 온도를 유지시킨다. Vessel 내부의 기밀을 유지하기 위해 Top anchor mount와 Bottom anchor mount를 구성하여 폴리우레탄 재질의 O-ring과 접촉면의 마찰력을 줄임으로써 회전운동 시에 사용이 용이한 Mechanical Seal을 이용하여 외부의 오염을 차단하였다.

Vessel 내부에서 줄기세포의 환경 조건을 측정하여 사용자가 환경 조건을 실시간으로 확인하게 된다. 이때 측정이 가능한 조건은 O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 함유량과 영양분의 pH농도, 온도 그리고 압력 등 다양한 환경적 조건을 측정하게 됨으로써 사용자가 실시간으로 피드백 할 수 있게 된다. 환경조건을 유지 및 측정하기 위해 Wheaton사의 Automatic Cell Optimizer System을 사용하였다. Fig. 2는 본 연구에서 사용된 바이오 리액터 모습이다.

### 3. 세포 지지체 개발

#### 3.1 PU 지지체 제작

실험을 위하여 제작된 지지체는 폴리우레탄

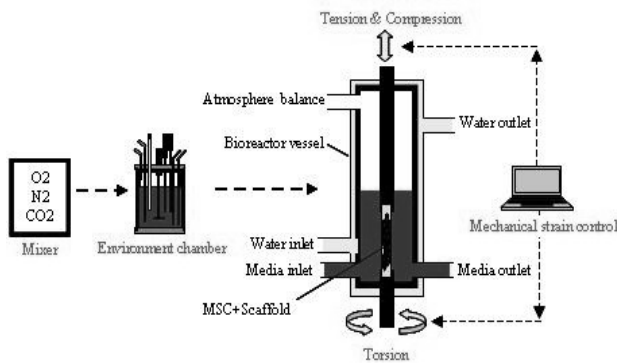


Fig. 1 Schematic drawing of Operating Bioreactor System



Fig. 2 Environmental system

(PU, DOW Chemical com., USA) 필름에 용매를 휘발시키는 방법을 사용하였다. 폴리우레탄을 Tetrahydrofuran (THF, JUNSEI Chemical Ind., Ltd., Japan)에 넣은 후 24시간 동안 막대자석으로 회전시켜 녹인다. 준비된 PU 용액(6% wt/vol)은 유리배양접시에 부은 후 뚜껑을 덮고 3-4일 동안 상온에서 서서히 유기용매를 휘발시켜 날리게 된다. 휘발이 완료되면 유리배양접시로부터 주조가 완료된 필름을 분리하여 잔류하는 유기용매 제거를 위해 45°C에서 24시간 동안 진공상태로 둔다. 그 후 균일한 크기와 형태를 갖는 PU 필름 지지체를 만들기 위해 Fig. 3(b)의 특수 제작된 장치를 이용하여 적당한 사이즈로 절단하였다. 지지체에 일정한 stress를 가하기 위해서 균일한 두께로 제작하였으며 morphology를 분석하기 위해서 투명하게 제작하였다.

#### 3.2 PU 지지체 제1형 교원질 입힘

세포 흡착성을 높이기 위해 PU 지지체를 3차 증류수로 씻어주고, Ethylene oxide(EO) 가스멸균 후, 200ml의 제1형 교원질 용액(Nitta gelatin, cell matrix type I-A collagen)을 PU 지지체 위에 입혔다. 무균 작업대에서 자외선으로 3시간 동안 건조시키면서 교원질 용액의 중합체 가교를 유도한 후, crystal violet(Sigma, St.Louis, MO, USA)으로 MSC의 흡착효과를 확인하였다. 확인결과, 교원질 용액을 입힌 지지체에서 세포의 높은 흡착효과를 보이며 세포외기질이 더 활동적으로 뻗어나가는 것을 광학현미경 (Optical microscope, OM)을 통해 보았다. (Fig. 4)

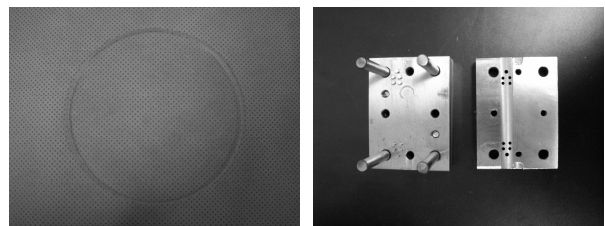


Fig. 3 (a) PU film, (b)PU film Device

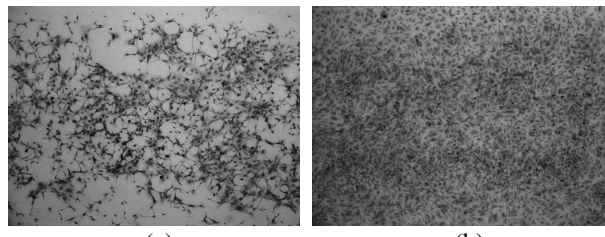


Fig. 4 OM ;(a) Non-coated PU, (b)Collagen coated PU

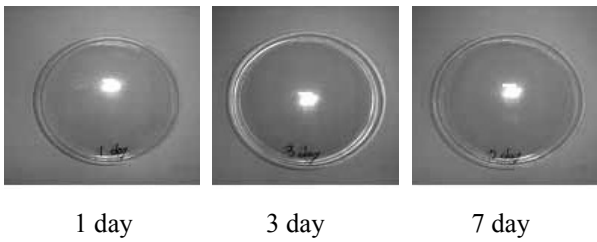


Fig. 5 Contamination test

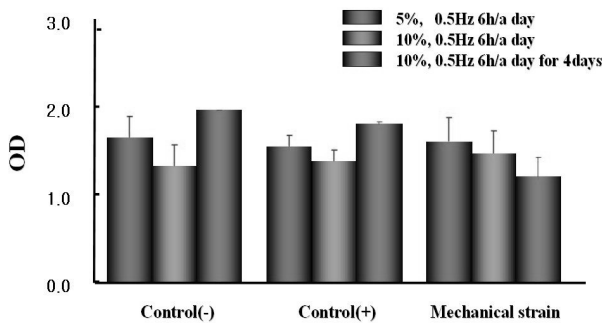


Fig. 6 MTT assay

4. 세포 배양

4.1 실험에 사용한 세포

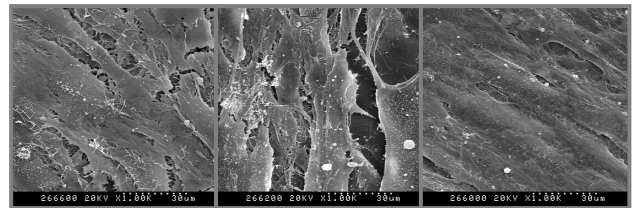
본 실험은 척추관 협착증으로 외과적 수술을 시행할 환자의 동의 하에 추출한 골수를 Ficoll을 사용하여 MSC를 분리하였다. 분리된 MSC는 DMEM-LG, 1% Antibiotic-antimythotic(AA, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 10% Fetal bovine serum(FBS Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 3일에 한번씩 배양액을 바꿔주고 배양용기에 세포가 1x10<sup>6</sup>이 되면 Trypsin/Ethylene-diamine tetra acid(EDTA)효소처리법으로 passage를 시행하였다. Passage 3에서 배양을 멈추고 DMEM-LG에 50% FBS와 10% Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% AA 를 섞어 -70°C에 보관하였다.

4.2 오염 검사

바이오 리액터 부품들을 세척제로 씻어낸 후, 조립하여 EO가스멸균 후, 무균작업대에서 배양액을 주입했다. 1일, 3일, 7일간 배양하여 각각의 배양액을 lure-lock주사기를 이용하여 각각 1ml씩 수집하여 Luria-Bertani(LB, Difco, Le PONT de Claix, France)를 배지에 묻혀 scraper로 펼친 후, 박테리아 배양기에 24시간 넣고 박테리아 군집의 형성 유무를 살펴본 결과, 용기내부가 무균상태임을 확인하였다. (Fig. 5)

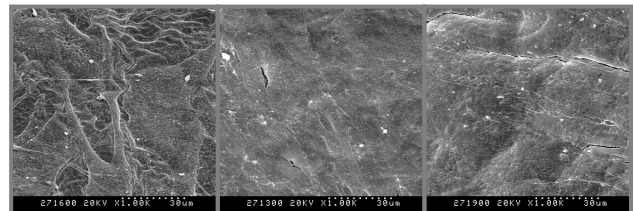
4.3 기계적 자극 조건

Cell seeding 6시간이 지난 후에 바이오 리액터



Control(-) Control(+) Mechanical strain

Fig. 7(a) SEM; 0.5Hz, 5% tension, 6h/day



Control(-) Control(+) Mechanical strain

Fig. 7(b) SEM; 0.5Hz, 10% tension, 6h/day

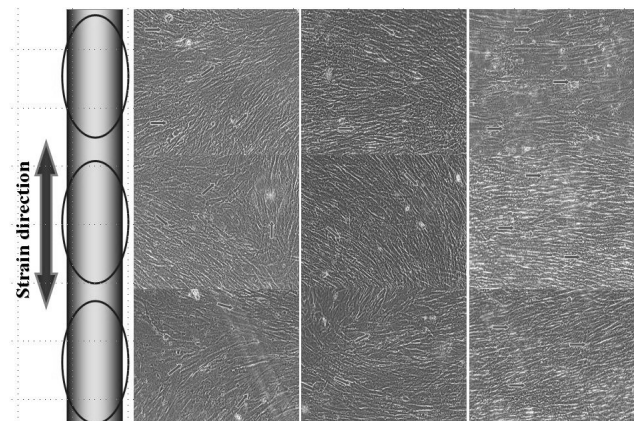


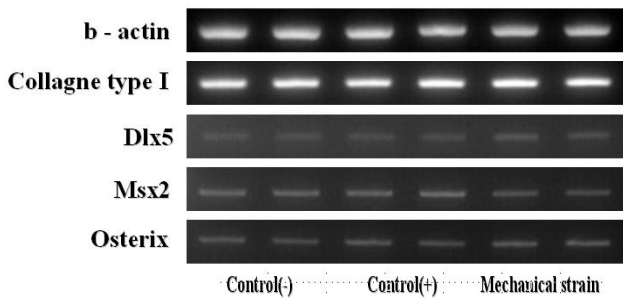
Fig. 7(c) OEM; 0.5Hz, 10% tension, 6h/day for 4days

vessel안에 장착한다. Frequency는 0.5Hz로(10800회/6시간) 설정하였고 strain을 5%(2mm), 10%(4mm)씩 6시간 동안과, 4일 기준 하루 6시간씩 10%(4mm) 자극을 가해 주었다. PU지지체에 코팅된 세포의 헤리를 방지하면서 자극의 효과를 보기 위하여 안정적 범위인 10% 인장자극과 0.5Hz frequency를 설정하였다.<sup>(16-18)</sup> 대조군은 기계적 자극을 가하지 않은 군(1. 단순히 vessel에서 기계적 자극을 주지 않고 배양한 군. 2. 세포배양기에서 배양한 군)으로 설정하였다.

4.4 세포 관찰

4.4.1 세포 독성 관찰

세포독성 및 증식 검사를 수행하기 위해 PU 지지체에 적정 수의 세포(1.0 x 10<sup>5</sup>/scaffold)를 흡착시켰다. PBS로 MTT stock 용액 (5mg MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)/ml)을 (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 미리 만들



**Fig. 10** RT-PCR; 0.5Hz, 10% tension, 6h/day for 4days  
 \* Control (-): Non-mechanical strain in incubator  
 Control (+): Non-mechanical strain in bioreactor  
 Mechanical strain: Mechanical strain in bioreactor

어 놓고 working 용액은 1:5 (MTT stock 용액: 배양액)로 하여 사용하였다. 세포가 흡착된 PU 지지체는 2시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에 넣고 반응을 시켰다. Media를 제거하고 DMSO 1:4 (working 용액에 사용된 MTT: DMSO)을 처리하여 MTT를 10분간 녹여 낸 후, 570nm의 파장에서 ELISA를 시행하였다. 확인결과, 모든 조건에서 세포독성은 관찰되지 않았다. (Fig. 6)

4.4.2 세포 형태 관찰

배양을 마친 후, 각각의 군들을 수집하여, D-PBS로 충분히 배양액을 씻어낸 뒤, 고정액에 24시간 고정 후 주사전자현미경(Scanning Electronic microscope, SEM)으로 세포형태학적으로 세포를 관찰하였다. 기계적 자극을 받은 군은 그렇지 않은 군에 비해 세포외기질의 뻗어나감이 기계적 자극을 받지 않은 군에 비해 굵으며, 지지체의 간격이 보이지 않을 정도로 세포들이 뻗뻗이 채워져 있었다. 또한 4일 기준 하루에 6시간씩 자극을 준 군에서는 하루 6시간만 자극을 가해준 군과는 달리 세포들의 방향성을 볼 수 있었다. (Fig. 7)

4.4.3 RT-PCR

RNeasy mini kit(QIAGEN, GmbH, Hiden, Germany)를 이용하여 총 RNA를 분리하고 총 RNA 1µg에 Oligo d(T)<sub>16</sub> primer 2.5µM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 70°C에서 5분간 annealing 시킨 후, RT-permix(Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR permix(Bioneer, 대전, 한국)을 이용하여 뼈 형성 초기 인자들인 제 1형 교원질, dlx5, osterix 유전자 발현확인 결과 기계적 자극에 의한 유전자 발현효과 차이를 알 수 없었다. (Fig. 8)

5. 결론

중간엽 줄기세포를 이용한 인공 근골격계

조직재생에 있어서 물리적 자극과 환경 조건은 중요한 요소로 작용하며, 이를 위해서 중간엽 줄기세포에 정량화된 다양한 기계적 자극을 주며 환경조건을 유지하는 바이오리액터 시스템을 개발하였다. 또한, 생체 친화성을 가지며 기계적 자극에 의한 탄성을 가지는 PU지지체를 개발하고 중간엽 줄기세포를 PU 지지체에 0.5Hz frequency에 6시간동안 5%, 10%인장자극과, 4일 기준 1일6시간 10%의 인장자극을 가해 기계적 자극에 의한 중간엽 줄기세포의 영향을 살펴보았다. 실험에 앞서 오염검사를 통해 바이오 리액터가 무균 상태를 확인하였다. 세포 독성 실험을 통해 기계적 자극으로 인한 세포 사멸이 일어나지 않음을 확인할 수 있었으며, 세포 형태 관찰에서 기계적 자극이 가해진 세포에서 ECM의 분비가 기계적 자극이 가해지지 않은 세포보다 더 활발하게 뻗어나가고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 4일 기준, 하루에 6시간 기계적 인장자극을 가해준 그룹에서는 세포의 방향성까지 확인 할 수 있는데 더 오랜 자극으로 인해 성체줄기세포가 세포 분열 후 증식을 위해 일정 방향성을 갖는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 의미 있는 골 형성 표현형의 발현이 관찰되지 않았는데 이는 세포의 생물학적 반응을 야기할만한 기계적 자극의 범위의 탐색이 용이한 작업이 아님을 알 수 있다. 그러나 본 실험의 인장 자극 및 frequency범위에서 세포 독성이 없음을 안 것은 큰 수확이며 이에 근거하여 세포가 생존하며, 좀 더 넓은 범위의 인장자극 및 frequency를 세포에 가할 수 있는 계기를 마련할 수 있다. 향후 연구에서는 기계적 자극에 예민하게 반응할 수 있는 섬유세포를 선택하여 교원질 생성 반응을 알아본다면 유의한 결과를 도출할 것으로 사료된다. 세포의 골 형성 반응 또한, 없었는데 이에 대한 이유는 첫 번째, 불충분한 인장 자극 및 frequency, 짧은 자극 시간 등을 들 수 있다. 두 번째는, 유전자 발현, 표현 형질 발현에 많은 시간을 필요로 하는 골 형성 반응을 짧은 실험 기간을 고려할 때 부적절 하였던 것으로 사료된다. 그러나 본 실험으로 세포 독성이 없는 인장 자극 및 frequency자료를 습득하였으므로 향후 실험 시간 연장, 기계적 자극의 다양한 적용이 가능 할 것이다. 골 형성 반응은 수일부터 시작하여 수주 일에 걸쳐 진행해야 하기 때문에, 본 실험의 수일간의 기계적 자극으로는 반응이 없었다. 기계적 자극에 대한 생물학적 반응을 얻기 위해서는 21일 간 자극을 준 보고도 있음으로 향후 연구에서는 오염 없이 2-3주

정도 장기간 기계적 자극을 주고 생물학적 반응을 알아보아야 할 것이다.<sup>(18)</sup> 또한, 자극의 시간을 늘려 골 분화와 섬유화의 분화를 유도하여 각각의 표지인자를 통해 확인, 분석 할 것이며 기계적 자극 또한 다양하게 가해줄 것이다. Isobe 등은 뼈조직 성장인자 단백질중의 하나인 Bone morphogenetic protein(BMP)을 지지체 내부에 함께 가해주어 osteoblasts 세포의 원활한 성장과 빠른 조직재생을 하였는데,<sup>(19)</sup> 본 연구에서도 생물학적 자극들인 BMP, Transforming growth factor(TGF)- $\beta$ , Fibroblast Growth factor(FGF) 등의 유도물질들을 기계적 자극과 함께 가해주어 그 효율성을 증대시킬 예정이다. 이와 더불어 기계적 자극의 크기와 빈도에 대한 중간엽 줄기세포의 세포분화율을 확인하고, 이를 이용하여 중간엽 줄기세포의 분화 알고리즘을 수립한 후, CAE와 세포분화 알고리즘을 이용하여 기계적 자극의 크기와 빈도에 따른 중간엽 줄기세포의 분화 알고리즘을 해석, 정립할 것이다. 기계적 자극과 중간엽 줄기세포의 근골격계 분화 및 성장 관계를 정립하여 알고리즘 해석 및 검증을 통해 조직공학적인 모의실험계를 정립함으로써 앞으로의 조직 재생 연구에 있어 크게 기여 할 수 있을 것이라 생각한다.

## 후 기

본 논문은 한국과학재단 특정기초사업 “기계적 자극에 의한 성체줄기세포의 분화 모델 및 생체역학적 BIOREACTOR를 이용한 근골격계 COMPUTER AIDED TISSUE ENGINEERING”의 지원과 (R01-2006-000-10933-0) 연세대학교 의과학과 및 기계공학과 Brain Korea 21 Project의 지원을 받아 작성되었음.

## 참고문헌

- (1) James, J. Yoo. and Lee, Il. Woo., 2002, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Koonja Publishing.
- (2) Robert, P. Lanza, Robert Langer. and Joseph Vacanti., 2000, *Principles of Tissue Engineering*, Academic press.
- (3) Pittenger, M. F. Mackay, A. M. Beck, S.C. Jaiswal, R. K. Douglas, R. and Mosca, J. D., 1999, “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cell,” *Science*, Vol. 284, pp. 143~147.
- (4) Bruder, S. P. Fink, D. J. and Caplan, A. I., 1994, “Mesenchymal Stem Cells in Bonedevelopment, Bone Repair, and Skeletal Regeneration Therapy,” *J Cell Biochem*, Vol. 56, pp. 283~294.
- (5) Nugent-Derfus, G. E. Takara, J. K. O'Neill, S. B. Cahill, S. Görtz, T. Pong, Inoue H. Aneloski, N. M. Wang, W. W. Vega, K. I. Klein, T. J. Hsieh-Bonassera, N. D. Bae, W. C. Burke, J. D. Bugbee, W. D. and Sah R. L., 2007, “Continous Passive Motion Allpied to Whole Joints Stimulates Chondrocyte Biosynthesis of PRG4,” *Osteoarthritis and Cartilage*. Vol.15, pp. 566~574.
- (6) Freshney, R. I., 1992, *Animal Cell Culture-a Practical Approach*, 2nd edi, IRL press, New york, pp. 68~72
- (7) Vunjak-Novakovic, G. Meinel, L. Altman, G. and Kaplan, D., 2005, “Bioreactor Cultivation of Osteochondral Grafts,” *Orthodontics and Craniofacial Research*, Vol. 8, No. 3, pp. 209~218.
- (8) Kadilaya, S. Lo, H. and Leong, K. W., 1994, “Biodegradable Polymers and Synthetic Bone Graft in Bone Formation and Repair,” *American Academy orthopaedic Surgeons Symposium*, pp. 317~324.
- (9) Gultekin, G. Atalay-Oral, C. Erkal, S. Sahin, F. Karastova, D. Tanteekin-Ersolmaz, S. B. and Guner, F. S., 2008, “Fatty Acid-Based Polyurethane Films for Wound Dressing Applications,” *J Mater Sci Mater Med*, Vol. 20, No. 1, pp. 421~431.
- (10) Vunjaknovakovic, G. Freed, L. E. Biron, R. J. and Langer, R., 1996, “Effects of Mixing on the Composition and Morphology of Tissue-Engineered Cartilage,” *AICHE J*, Vol. 42, pp. 850~860.
- (11) Unsworth, B. R. and Lelkes, P. I., 1998, “Growing Tissues in Microgravity.Nat,” *Med*, Vol. 4, pp. 901~907.
- (12) Jasmund, I. and Bader, A., 2002, “Bioreactor Developments for Tissue Engineering Applications by the Example of the Bioartificial Liver,” *Adv Biochem Eng*, Vol. 74, pp. 99~109.
- (13) Wendt, D. Marsano, A. Jakob, M. Heberer, M. and Martin, I., 2003, “Oscillating Perfusion of Cell Suspensions Through Three-Dimensional Scaffolds Enhances Cell Seeding Efficiency and Uniformity,” *Biotechnol*, Vol. 84, pp. 205~214.
- (14) Langelier, E. Rancourt, D. Bouchard, S. Lord, C. Stevens, P. P. Germain, L. and Auger, F. A., 1999, “Cyclic Traction Machine for Long-Term Culture of Fibroblast-Populated Collagen Gels,” *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 27, No. 1, pp. 67~72
- (15) Gregory, H. A. Helen, H. Lu, R. L. Horan, Tara Calabro. Daniel Ryder. David, L. Kaplan. Peter Stark. Ivan Martin. John, C. R. and Grodana Vunfak-Novakovic., 2002, “Advanced Bioreactor with Controlled Application of Multi-Dimensional Strain for Tissue Engineering,” *Transaction of the ASME*, Vol. 124, pp. 742~749
- (16) Milan, J.L., Planell, J.A. and Lacroix, D., 2009,

- "Computational Modelling of the Mechanical Environment of Osteogenesis Within a Polylactic Acid-Calcium Phosphate Glass Scaffold," *Biomaterials*, Vol. 30, No. 25, pp.4219~4226.
- (17) Ignatius, A., Blessing, H., Liedert, A., Schmidt, C., Neidlinger-Wilke, C., Kaspar, D., Friemert, B. and Claes, L., 2005, "Tissue Engineering of Bone: Effects of Mechanical Strain on Osteoblastic Cells in Type I Collagen Matrices," *Biomaterials*, Vol. 26, No. 3, pp. 311~318.
- (18) Altman, G.H., Horan, R.L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P.R., Volloch, V., Richmond, J.C., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D.L., 2002, "Cell Differentiation by Mechanical Stress" *FASEB J*, Vol. 16, No. 2, pp. 270~272.
- (19) Isobe, M. Yamazaki, Y. Oida, S. I. Ishihara, K. Nakabayashi, N. and Amagasa, T., "Bone Morphogenetic Protein Encapsulated with a Biodegradable and Biocompatible Polymer," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 32, No. 3, pp. 433~438.