

생분해성 고분자 지지체의 조성과 초기 세포접종 밀도에 따른 사람 간엽 줄기세포의 골 형성 유도

김현우 · 주소연 · 강호정 · 한수봉 · 한창동

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

목적 : 사람의 골수 간엽 줄기세포를 고분자 지지체내에서 배양시켜 골 조직으로의 분화 및 석회화를 유도하는데 가장 적절한 지지체의 조성과 초기 세포접종 밀도를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 간엽 줄기세포를 서로 다른 세 종류의 다공성 고분자 지지체(65/35 PLGA, 85/15 PLGA, PLLA)내에서 6주간 삼차원 배양을 시도하였으며 조직학적, 면역조직학적 검사 및 투과/주사 전자현미경으로 골 조직으로의 분화과정을 관찰하였다.

결과 : 세포의 기질의 침착 정도는 각각 전체 부피의 23% (65/35 PLGA), 21% (85/15 PLGA), 13% (PLLA)였으며, 주사 전자 현미경상 지지체 표면에 간엽 줄기 세포 부착과 세포의 기질 형성을 관찰하였고 투과 전자 현미경에서 2주째 골세포로의 분화를 확인하였다. 칼슘 침착은 4주째 급격히 증가하였으며, 세포접종 밀도에 따른 세포의 기질 형성 정도는 유사하였다. 석회화 물질의 침착은 2주째 높은 세포 밀도에서 더욱 뚜렷하였으나 6주째에는 세포 밀도에 따른 차이가 없었다.

결론 : 다양한 조성의 고분자 지지체에서 모두 골조직으로 분화하는 것을 확인하였으며, 지지체의 조성에 따라 세포의 기질의 침착 정도에 차이가 있고 높은 세포 접종 밀도는 초기 석회화에 보다 적합한 조건임을 관찰하였다.

색인 단어 : 사람 간엽 줄기세포, 골 형성 유도, 생분해성 고분자 지지체

Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Effects of the compositions of biodegradable polymers and the initial cell-seeding density

Hyun-Woo Kim, M.D., So-Yeon Joo, M.S., Ho-Jung Kang, M.D., Soo-Bong Hahn, M.D., and Chang-Dong Han, M.D.
Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : To investigate the effects of initial cell-seeding density and the compositions of biodegradable polymer scaffolds on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.

Materials and Methods : Human mesenchymal stem cells (hBMSCs) were cultured three-dimensionally onto biodegradable polymers with three different compositions (65/35 PLGA, 85/15 PLGA, PLLA), and osteogenic differentiation was studied by; histology, immunohistochemistry, and transmission/scanning electron microscopy.

Results : In terms of the amount of extracellular matrix (ECM) produced, the 65/35 PLGA (23% of the whole volume) was found to produce more ECM than 85/15 PLGA (21%) and PLLA (13%). Osteoblastic differentiation of hBMSCs was induced in all scaffolds examined and the deposition of ECM with calcifications started after 2 weeks of culture. The amount of calcium deposited on the 65/35 PLGA dramatically increased at 4 weeks. On comparing low cell-seeding density with the high cell-seeding density on 65/35 PLGA, calcium deposits reached similar levels at 6 weeks.

Conclusion : Three-dimensional culture of hBMSCs on biodegradable polymer scaffolds induced bone formation, which was dependent on the compositions of the scaffolds and the initial cell-seeding density.

Key Words : Human mesenchymal stem cells, Osteogenic differentiation, Biodegradable polymers

인체 골격의 결손을 초래하는 원인은 매우 다양하며 이러한

골 결손부를 회복시키고 부족한 골 조직을 공급하기 위한 고식

통신저자 : 한 창 동
서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 세브란스병원 정형외과학교실
TEL: 02-361-5640 · FAX: 02-363-1139
E-mail: cdhan@yumc.yonsei.ac.kr

Address reprint requests to
Chang-Dong Han, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Severance Hospital
Yonsei University College of Medicine
134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82.2-361-5640, Fax: +82.2-363-1139
E-mail: cdhan@yumc.yonsei.ac.kr

*본 논문의 요지는 2001년도 대한정형외과학회 추계학술대회 및 2002년도 Engineering Tissue Growth 2nd International Conference and Exposition, Pittsburgh, USA에서 구연되었음.

*본 논문은 2001년도 연세대학교 학술연구비 및 보건복지부(HMP-99-E-05-0001)의 지원을 받아 이루어졌음.

적인 자가이식골(autografts) 이외에도 탈회 동결건조 동종골(demineralized freeze-dried bone allograft), 수산화인회석(hydroxy-apatite), 인산삼칼슘입자(tricalcium phosphate), 순수 비 유기질골(purified inorganic bone) 등 많은 골 대체 재료들이 개발되어 왔다³⁾. 그러나 이들은 순수하게 골 형성 자체를 유도하지는 못하며 대부분 분말형태로만 제조가 가능함에 따라 골 손상 범위가 클 때에는 사용할 수 없다는 한계를 가진다. 현재는 세포 배양 이식술이 기존의 치료법을 보완, 대체할 방법으로 적극적인 연구가 진행되고 있으며, 이중 골수에서 기원하는 골수 간엽 줄기세포(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)는 실험실 수준에서 여러 근·골격계 세포로 분화될 수 있는 능력이 증명된 바 있어¹⁰⁾ 다양한 임상적 요구에 적합할 뿐만 아니라 배아 줄기 세포(embryonic stem cells)의 이용과 같은 윤리적 문제가 없다는 점에서 유용한 연구대상이다. BMSCs는 적절한 배양조건에 의해 시험관내 수준에서 골세포로의 분화가 가능하며⁷⁾ 이와 같은 방법은 줄기세포 생물학(stem cell biology)과 골 조직 형성에 대한 많은 연구에 응용될 수 있으나 이를 보다 적극적으로 임상에 이용하기 위해서는 임상적용이 가능한 입체적인 형태 내에서의 배양과 분화 유도가 필수적이다⁵⁾. 이를 위해 근래에는 다양한 삼차원적인 지지체와의 결합이 시도되고 있으나 아직까지 이들 내에서의 분화과정에 대한 연구는 미흡한 실정으로 특히 사람의 골수 간엽 줄기세포(human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, hBMSCs)에 대한 연구는 ceramic내에서의 배양 연구 이외에 거의 없는 실정이다¹¹⁾. 본 연구에서는 사람의 골수 간엽 줄기세포를 발포성 염을 이용하여 제작된 고분자 지지체내에서 배양시켜, 골세포로의 분화와 석회화를 유도하는데 가장 적절한 지지체의 조성 및 초기 세포집중 밀도를 알아보려 하였다. 이를 위해 서로 다른 조성을 가진 세 종류의 지지체에서 hBMSCs를 배양하였으며, 또한 각각의 지지체에서 낮은 세포 밀도(1×10^6 cells/236 mm³)와 높은 세포 밀도(2.5×10^6 cells/236 mm³)로 접종하였을 때의 골조직으로의 분화도 및 석회화 차이를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. hBMSCs의 일차 배양

고관절 질환으로 인하여 무명골(innominate bone) 절골술을 시행 받는 환아들(연령, 4-10세)로부터 동의서(consent form)를 얻은 후, 절골술시 자연히 삼출되는 골수를 포도당 1 g/L가 들어 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG, Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)에 부유시켰다. 부유물을 원심 분리기에 1,500 rpm으로 10분간 두어 상층액을 버린 후, Phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, KH₂PO₄, pH 7.3)으로 3회 세척하고, 10% 우태혈청(fetal bovine serum), penicillin (100 U/mL, Gibco BRL)과 streptomycin (100 µg/mL, Gibco BRL)이 포함된 DMEM-LG 배양액이 들어있는 75 cm² 조직

배양 용기에 5×10^7 개의 세포수의 농도로 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 시작하였다. 4일 후 부유하는 세포는 배양액을 교환하며 버리고, 이후 3일 간격으로 2주간 배양액을 교환하여 간엽 줄기세포의 분리 및 일차 배양을 시도하였다. 이후 역시 3일 간격으로 배양액을 교환하여 배양 용기 바닥이 가득차면 0.25% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 37°C에서 5분간 처리하여 세포를 분리하여 계대 배양하였다¹⁰⁾. 분리 배양된 hBM-SCs의 골모세포로의 분화능을 확인하기 위해 Von Kossa 염색과 Alkaline phosphatase (ALPase)의 활성도를 측정하였으며 대조군으로는 사람의 치은 섬유아세포가 이용되었다. 6-Well plates에 세포(3×10^4 cells/well)를 분주하여 골 형성 유도 물질(100 nM dexamethasone, 0.05 mM L-ascorbic acid-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate)이 첨가된 골 형성 배지로 21일간 배양한 후, 10% formalin으로 세포층을 고정시키고 10분 간 어두운 곳에서 2% silver nitrate solution (w/v)과 반응시켰다. 이어 증류수로 행구어 내고 직사광선을 비추어 석회화된 기질을 가시화 하였다. ALPase의 활성도 측정을 위해 역시 골 형성 배지로 7일, 14일, 21일간 배양하고 Triton X-100으로 처리된 세포 용해물을 p-nitrophenyl phosphate와 반응시켜 분광측정계(spectrophotometer, 405 nm)로 효소에 의해 생성된 p-nitrophenol의 흡광도를 측정하였다.

2. 사용된 고분자 화합물과 hBMSCs의 삼차원적 배양

삼차원 배양에 사용된 고분자 화합물은 상온 산성 수용액에 의한 발포성 염 제조법에 의해 제작되었으며¹⁴⁾, glycolide와 lactide의 비율에 따른 영향을 알아보려 함으로써 65/35 (glycolide와 lactide의 몰분율) poly-DL-glycolic-co-lactic acid (PLGA), 85/15 PLGA (평균분자량, Mw=100,000-120,000) 및 poly-L-lactic acid (PLLA)를 chloroform에 녹여 10% (w/v) 용액으로 만든 후 과량의 에탄올이 첨가된 고분자 용액을 이용하여 회수한 젤 상의 고분자 침전물에 300-500 µm 크기의 ammonium bicarbonate 입자를 첨가하였다. 이를 디스크 형태의 테프론틀에서 주형한 뒤 상온의 citric acid 과포화용액에 주형물을 담가 고분자 내의 염 입자를 발포시키고 일주일간 동결 건조하여 잔류 용매를 제거하였다. 고분자는 직경 10 µm, 두께 3 mm의 디스크 형태로서 평균 기공크기는 300-500 µm이고 90%의 다공성을 가졌다(Fig. 1). 삼차원적 세포배양을 위해 4°C에서 100%, 90%, 70%, 10% 알코올로 지지체를 전처리하고 phosphate buffered saline (PBS)과 배양배지로 씻어준 후 건조된 고분자 화합물에 각각 서로 다른 세포밀도(1×10^6 , 2.5×10^6 cells)의 세포현탁액 100 µL를 분주한 후 지름 60 mm 크기의 배양접시에서 배양을 시작하였다. 2시간 후 4 mL 배지를 첨가하고 orbital shaker (30 rpm)를 이용하여 배양기내에서 배양하였으며 세포 분주 2일 후, 3일 간격으로 골 형성 배지를 공급하였다. 새로운 골 형성 관찰 위해 배양 15일째에 tetracyclin 2 mg/mL을 48시간동안 처리하였다.

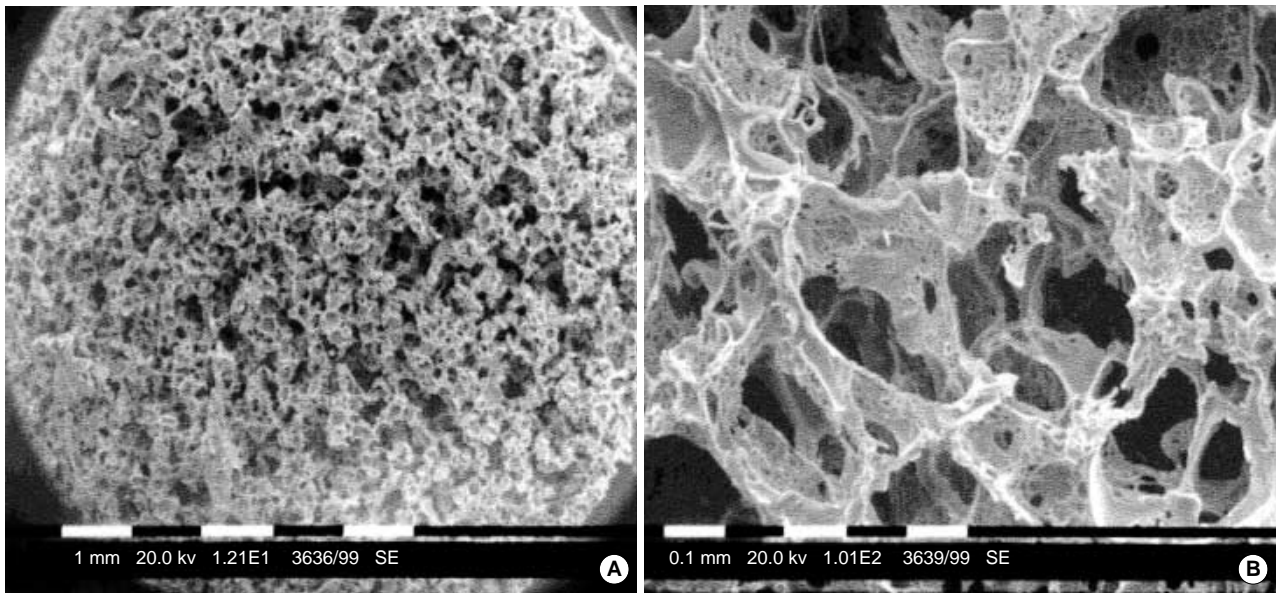


Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph of the PLGA used.

3. 골 형성 관찰방법

각 배양 시기별로 배양된 세포-지지체 복합체(hBMSCs-scaffolds complex)를 10% 중성 포르말린에 8시간 이상 고정하여 파라핀 포매 후 5 μm 두께의 연속 절편을 제작하였다. H/E 염색을 시행하여 지지체 내에서의 세포 분포와 석회화 물질의 침착, 세포의 기질침착, 골세포의 분화를 관찰하였다. 지지체의 조성에 따른 세포의 증식 및 세포의 기질의 침착량을 분석하기 위하여 H/E 염색 절편을 Image-pro plus[®] (Media cybernetics, MD, USA)로 관찰하여 지지체의 부피 당 세포 및 세포의 기질이 차지하는 비율을 측정하였다.

지지체 내에서 hBMSCs의 증식과 골 형성 배지의 영향을 평가하기 위하여 65/35 PLGA에 1×10^6 cells/100 μL 의 세포를 접종하여 배양하였다. 3일, 5일, 7일간 DMEM으로 배양하였으며 3일, 5일, 7일, 10일간 골 형성배지로 추가 배양하여 10% 중성 포르말린 용액으로 고정하였다. 전술한 방법에 따라 H/E 염색과 Feulgen 염색을 시행한 후 400배 광학 현미경하에서 각 절편 당 임의의 부위를 선정하여 0.0625 mm^2 면적 당 세포 수를 측정하였으며 이를 5회씩 반복 측정하였다.

Osteocalcin에 대한 면역조직 화학적 염색을 위해 5 μm 두께의 파라핀 연속절편을 xylene 처리 후 알코올로 단계적으로 흡수 시켰으며 0.5% 과산화수소용액에서 내인성 과산화효소를 제거하고 정상 goat serum으로 30분간 처리하였다. Osteocalcin에 대한 일차항체(Takara, Japan)를 3% bovine serum albumin이 포함된 PBS로 희석하고 8시간 동안 상온에서 반응시킨 후 PBS로 5분간 3회 세척하고 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ horseradish peroxidase streptavidin (BD Biosciences, USA)에 30분간 반응시켰다. 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ horseradish peroxidase streptavidin IgG (BD Biosciences, USA)에서 30분간 반응시키고 DAB와

hydrogen peroxide를 이용하여 발색 한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 osteocalcin의 발현을 광학 현미경으로 관찰하였다.

지지체내 접종 후 세포의 부착 정도와 골모세포의 분화도 및 세포의 기질 형성을 관찰하기 위하여 주사 전자 현미경(scanning electron microscopy, HITACHI S-800, Japan)과 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy, Philips CM-10, Germany)을 시행하였다. 투과 전자 현미경을 위해 적출된 시료를 0.1 M PBS (PH 7.4)으로 완충된 2% glutaraldehyde와 paraformaldehyde로 전 고정 및 1.33% OsO_4 로 후 고정을 시행하였다. 알코올로 탈수 후 propylene oxide로 치환하고 Epon 혼합액에 포매한 후 초박 절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 투과전자현미경으로 관찰하였다. 주사 전자 현미경의 경우, 탈수 후 isoamylactate로 치환시켜 약 6시간 후에 임계점 건조(critical point dry)한 다음 ion coater (Eiko IB-3형)를 이용하여 300 \AA 두께로 금피복(gold coating)한 후 주사 전자 현미경으로 관찰하였다. 형성되는 칼슘의 관찰을 위해 파라핀 절편을 2% silver nitrate solution (W/V)과 반응시키고 증류수로 행구어 낸 후 Von Kossa 염색을 시행하였다. 또한 tetracyclin과 결합한 칼슘 침착을 형광 현미경으로 확인하였다. 생성된 칼슘의 정량적 분석을 위해 세포-지지체 복합체를 0.5N HCl로 처리한 후 원심 분리하였으며 상층액을 cresolphthalein complexone (Sigma, MD, USA)과 반응시켜 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3번씩 시행되었으며 그 값은 평균과 표준편차로 나타내었고, ALPase 활성도 측정 및 세포-지지체 복합체의 조직학적 관찰 결과, 세포 증식을 측정, 칼슘 침착 정량 분석 시에 통계적 유의성을 파악하고자 Kruskal-Wallis test를 시행하였다.

결 과

1. hBMSCs의 일차 배양과 골모세포로의 분화능 확인

골수 조직으로부터 분리된 간엽 줄기세포를 일차 배양하였을 때, 3일 후 단일 세포로 분리되어 배양 접시의 바닥에 붙어있는 것이 관찰되며 7일 후 이들 세포로부터 증식된 많은 세포들이 관찰되었다. 이들을 골 형성 배지로 21일 동안 분화 유도한 후 Von Kossa 염색을 시행하였을 때 골 형성 배지를 처리한 경우에만 명확한 석회화 물질을 관찰할 수 있어 골세포로의 분화가 확인되었다. 그러나 대조군인 섬유아세포는 골 형성 배지를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두 석회화가 관찰되지 않았다. ALPase의 활성도 측정 시, 간엽 줄기세포에 골 형성 배지 처리 1주일 후, ALPase 활성도가 4779.4 unit/g로 골 형성 배지를 처리하지 않은 경우의 37.5 unit/g보다 약 130배 증가하였

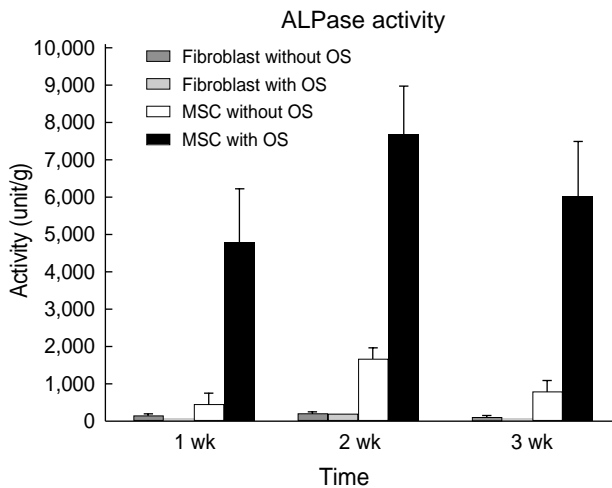


Fig. 2. On the 14th day of culture, highest alkaline phosphatase activity was observed at 7512.8 unit/g. The experiment with fibroblasts showed low ALPase activity both with and without the addition of an osteogenic supplement (OS).

고, 배양 2주 제 7512.8 unit/g의 가장 높은 활성도를 나타내었다. 섬유아세포의 경우 배양 3주까지 골 형성 배지를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두 간엽 줄기 세포에 비하여 매우 낮은 활성도를 보였다($p=0.0188$) (Fig. 2).

2. 지지체의 구성에 따른 hBMSCs의 골 형성 유도

지지체의 구성에 따른 세포 및 세포의 기질의 침착량을 비교하기 위하여 H/E 염색 절편을 Image-pro plus로 관찰, 분석한 결과 통계학적 유의성이 있었으며($p=0.0066$) 간엽 줄기 세포를 6주간 배양하였을 때 65/35 PLGA에서 가장 많은 세포 및 세포의 기질이 침착되었다(전체 부피의 약 23%). PLGA 65/35, 85/15 (약 21%) 두 종류 모두 조직학적 소견에서 PLLA (약13%)에 비하여 많은 세포의 기질이 형성되었다. 초기 2주간 배양 후, 사용된 모든 지지체내에서 H/E 염색 상 대부분의 세포는 방추형 모양을 유지하고 있었고 약간의 세포의 기질 침착을 관찰할 수 있었지만 골모세포로의 분화는 확실하지 않았다(Fig. 3A). 배양 4주 후 이용된 모든 지지체내에서 세포들은 작고 분명한 핵과 함께 풍부한 양염성의 세포질을 가지고 있으며 골모세포와 유사한 양상을 보였다(Fig. 3B). 63/35 PLGA와 85/15 PLGA에서 무정형의 호산성 유골(osteoid)이 침착 되어 있었고 세포의 기질부위에 3 μm 이하 크기의 석회화 물질이 산재되어 있었다. 6주간 배양하였을 때 다소 세포수는 감소하였지만 세포 형태는 4주 때와 유사하였고 보다 많은 양의 세포의 기질과 광범위한 석회화 물질이 관찰되었다(Fig. 3C). 간엽 줄기 세포를 6주간 배양 후 Von Kossa 염색시에도 65/35 PLGA (전체 부피의 11%)와 85/15 PLGA (9%)에 비하여 PLLA (6%)에서 가장 적은 양의 석회화 물질이 나타나 PLLA에서 골 형성이 느리게 유도됨을 관찰하였다.

3. 65/35 PLGA에서 hBMSCs의 골 형성 유도

Feulgen 염색 상, 집중된 세포는 지지체 내에서 계속 증식하

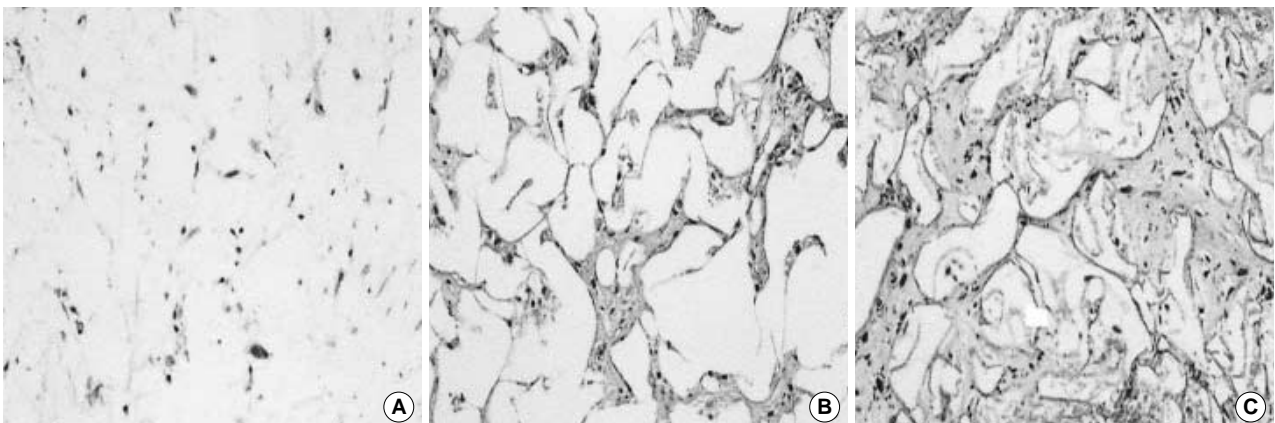


Fig. 3. Histologic findings of the cell-PLGA (65/35) complex (H-E staining, $\times 200$). (A) Most of the cells maintained their spindle shape during the first 2 weeks of culture. (B) Cells were observed to contain abundant amounts of amphophilic cytoplasm and a small but definite nucleus. Amorphous osteoid, acidic in nature, was deposited and these calcific materials were dispersed throughout the ECM. (C) After 6 weeks of culture, a large amounts of ECM and calcium deposit were observed.

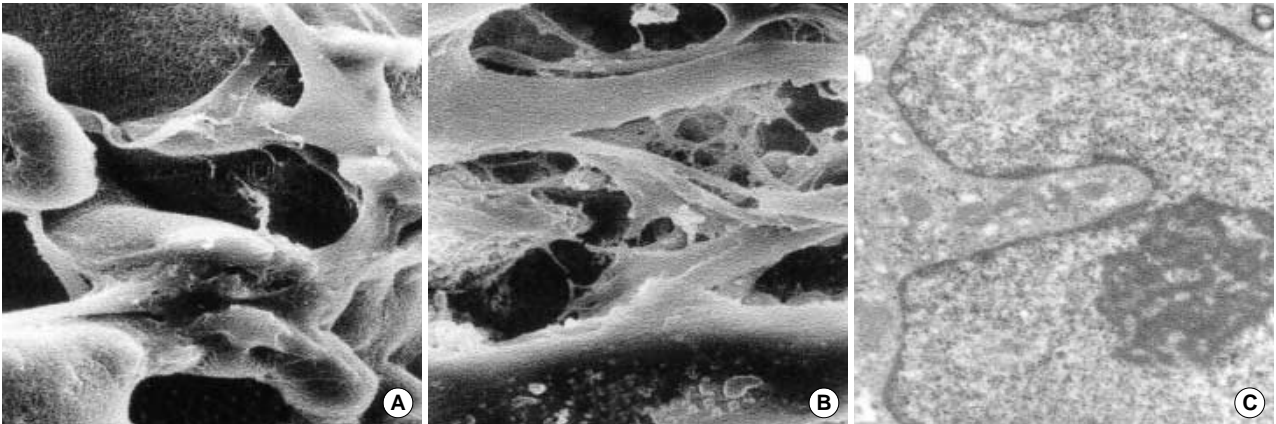


Fig. 6. Electron microscopic findings of culture. (A) Spindle shaped cells that were attached to the surface of the scaffold and long cytoplasmic process that extended toward an adjacent pore were observed after two days of culture. (B) After 2 weeks of culture, abundant ECM had been secreted and deposited on the surface of the scaffold. Some regions of the ECM had in a reticular form with numerous deposits of calcified material that were spherical in shape and under 1 micrometer in size, on its surface. (C) After 2 weeks of culture, copious amounts of ECM was observed, ribosomes and golgi bodies were well developed, and numerous secretory granules were present within the cells. From the extracellular point of view, irregular shapes of ECM and collagen bundles were found.

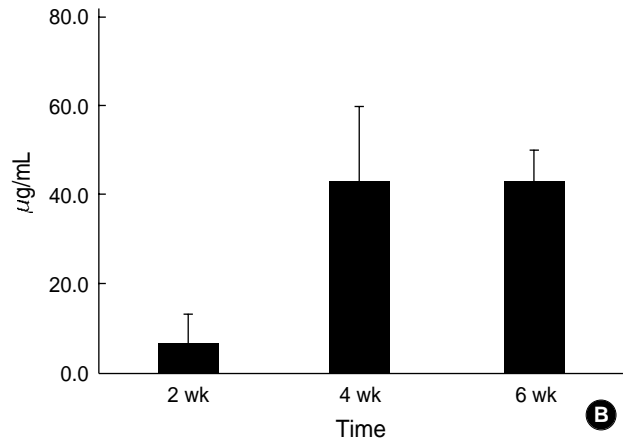
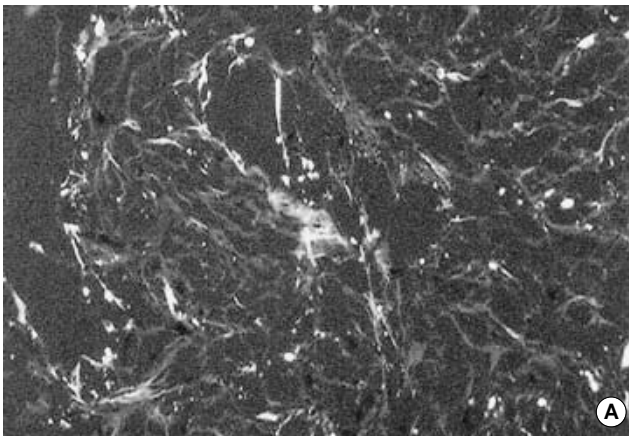


Fig. 7. (A) The tetracycline labeling study confirmed calcific deposits after 15 days of culture. (B) These were apparent after 4th weeks of culture.

정량적인 분석을 통하여 4주 후 석회화 물질의 침착이 급격히 증가함을 보여주었다($p=0.0166$) (Fig. 7B).

4. 65/35 PLGA에서 세포 밀도에 따른 골 형성 유도

초기 세포접종 밀도에 따른 골 형성을 관찰하기 위하여 65/35 PLGA에 1×10^6 cells/100 μ L, 2.5×10^6 cells/100 μ L의 세포를 6주간 배양하여 H/E 염색 절편을 Image-pro plus로 분석한 결과, 세포 및 세포의 기질 형성 정도는 유사하였다. 초기 세포접종 밀도에 따른 석회화의 차이를 비교하기 위하여 Von Kossa 염색하였을 때, 저 농도(1×10^6)의 세포접종 시 2주 후에는 석회화 물질 침착이 뚜렷하게 관찰되지 않았으나(Fig. 8A) 고농도(2.5×10^6)의 세포접종을 한 경우 다양한 크기의 석회화 물질이 침착되었다(Fig. 8B). 6주 후에는 저농도 및 고농도 세포접종 시 유사한 양의 석회화 침착을 보였다(Fig. 8C, 8D).

고찰

골수에서 분리 가능한 간엽 줄기 세포는 골 조직의 손상과 소실을 치료할 수 있는 이상적인 방법이 될 수 있으며 특히 최근에는 말초 혈액에서도 간엽 줄기 세포의 존재가 보고되어 임상 적용 가능성을 한층 높여 주었다⁸⁾. 본 연구는 생분해성 고분자 지지체내에서 사람 간엽 줄기세포의 골세포 분화 및 석회화에 관한 연구로서 지지체를 이용한 삼차원 배양을 하기에 앞서, 골세포의 분화능을 단층배양으로 확인하였고 골 조직 형성 중 석회화 과정을 Von Kossa 염색으로 관찰하였다. 또한 신생되는 골 조직에서 높은 활성도를 나타내는 ALPase의 활성이 골 형성 배지 처리 7일 만에 매우 높게 유도되어 골세포 분화과정 이 골 형성 배지만으로 매우 빠르게 유도되는 것을 알 수 있었으며 이는 14일 후에 활성도가 가장 높아지다가 점차 감소하는 것으로 보아 ALPase가 석회화 물질의 형성에 앞서 작용함을

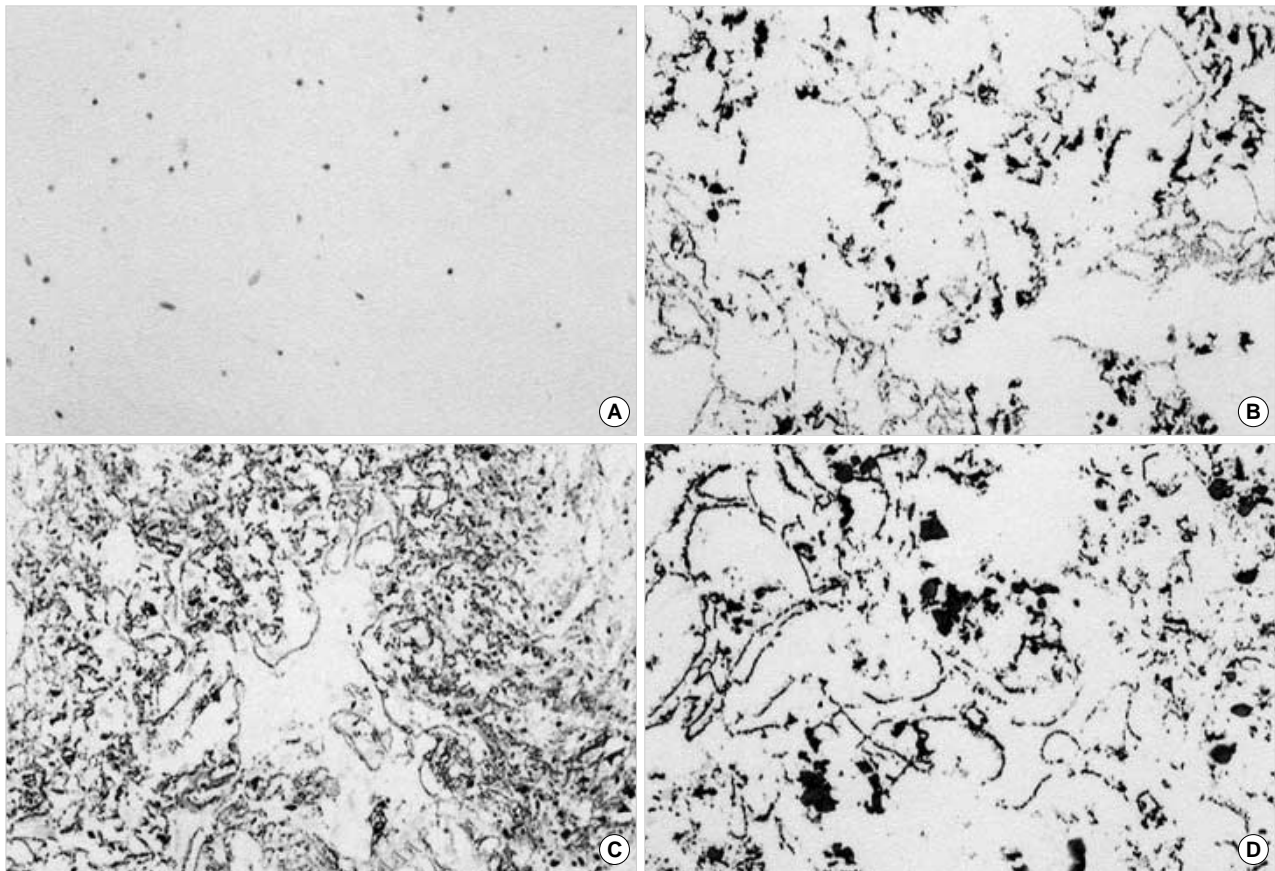


Fig. 8. Von Kossa staining to compare the effects of different cell-seeding densities on a 65/35 PLGA scaffold (low cell-seeding density: A-2 weeks, C-6 weeks versus high cell-seeding density: B-2 weeks, D-6 weeks). Although a high cell-seeding density was found to be effective for initial calcification, the calcium deposits reached the same level at both cell-seeding densities after 6 weeks of culture.

관찰하였다.

생분해성 고분자 화합물은 다양한 형태로 가공이 가능하고 여러 성장유도인자와 혼합가공이 가능한 장점으로 인하여 특히 연골의 재생을 위한 지지체로서 주목을 받아왔다^{3,9,12)}. 이러한 고분자 화합물은 생체 적합성이 뛰어나고 삼차원 구조로의 가공이 용이하며 생체 내에서 분해된다는 특징을 가지지만 친유성(hydrophobic)의 특성으로 인해 세포 배양이 어렵고 제조방법에 따라 다양한 표면특성을 가질 수 있으며, 최근에는 고분자 화합물의 표면을 변화시켜 지지체내의 세포부착과 증식, 분화를 유도하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다¹³⁾. 본 연구에서 사용된 발포성 염 제조법(gas-forming/salt-leaching method)에 의하여 제작된 PLGA 지지체의 경우, 세포 분주 이틀 후 주사 전자 현미경상 방추형모양의 세포들이 지지체표면에 잘 부착되어 있었고 시간이 지남에 따라 세포의 수가 증가함을 보여 이 지지체가 간엽 줄기세포의 초기 부착과 증식에 적합한 지지체임을 확인할 수 있었다. 또한 PLGA 지지체내에서 골 형성 배지만으로도 골세포로의 분화와 석회화 물질 침착이 이루어짐을 관찰하였으며 H/E 염색상 세포의 기질의 분비와 침착을 보였고 투과 전자 현미경에서 섬유상의 세포의 기질과 교원질 다발을

확인하므로써 사람의 간엽 줄기세포는 PLGA 지지체내에서 풍부한 세포의 기질을 생성함을 확인하였다. Osteocalcin은 골 조직의 비 교원질성 단백질 중 가장 풍부한 물질 중 하나로서 조건에 따라 osteocalcin이 골 형성의 방해 인자로 작용할 수도 있지만 발육 골 조직에서 골세포에 의해 특이적으로 발현된다⁴⁾. 즉 osteocalcin은 골 조직의 석회화 시기와 관련되어 있으며 간엽 줄기세포의 골세포 분화 표지자로서 이용된다. 최근 사람의 간엽 줄기 세포를 다공성의 고분자 지지체에 RGD 펩타이드로 표면 처리하여 배양하였을 때 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우에만 osteocalcin의 발현이 관찰된다고 보고된 바 있으나¹³⁾ 본 연구에서와 같이 VitD3의 전 처리 없이도 dexamethasone이 포함된 골 형성 배지만으로 PLGA 지지체내에서 osteocalcin이 발현됨을 관찰하였다. 또한 osteocalcin은 낮은 밀도로 분주하였을 때에도 배양 2주 후부터 석회화 물질의 침착 없이 발현하여 골 형성 물질의 공급이 사람 간엽 줄기세포를 골세포로 분화시킴을 알 수 있었다. 한편 고분자의 조성에 따른 세포의 기질의 침착은 다양하였으며, 간엽 줄기세포를 6주간 배양하여 H/E 염색으로 관찰시 PLGA 65/35 및 85/15에 비하여 PLLA가 가장 적은 양의 침착이 이루어짐을 관찰하였다.

Holy 등⁶⁾의 연구에 의하면 쥐의 골모세포(osteoblasts)를 PLGA 지지체내에서 골 조직으로의 분화를 유도하였을 때 저농도 세포밀도와 고농도 세포 밀도에서 큰 차이를 보이지 않았다. 지지체내에서 골수 간엽 세포를 이용 시, 골 조직으로의 유도와 석회화 물질의 형성은 다양한 인자에 의해 조절될 수 있을 것이며 이중 초기 배양시 세포 밀도는 골 형성의 가장 중요한 요소 중 하나로 작용할 수 있다. 본 연구에서 1×10^6 cells/100 μ L를 분주하였을 때 모든 지지체내에서 석회화 물질의 침착이 2주 후에는 뚜렷하게 관찰되지 않았으나 4주 후부터는 지지체 표면을 따라 침착되는 미세한 석회화 물질이 H/E 염색과 Von Kossa 염색을 통해 관찰되었다. 또한 세포 접종 농도를 증가시켰을 때 2주 후 Von Kossa 염색에서 보다 명확한 석회화가 관찰되었고 6주 후에는 2 μ m 이상의 석회화 결정이 관찰되었지만 전체 석회화의 양에는 차이가 없었다. 이러한 석회화 물질은 주사 전자 현미경상에서 비교적 균일한 1 μ m 이하 크기의 구형으로 지지체 표면에 고루 분포되어 있었다. 석회화 물질의 침착은 시간이 지남에 따라 증가하여 6주 후에는 세포내 및 세포외 영역에서 석회화 결정의 크기가 증가함을 관찰하였다. 투과 전자 현미경상, 세포질 내에 풍부한 소포체와 분비과립이 관찰되어 골모세포의 특징을 보이고 있었지만 형성된 석회화 물질의 형태학적 특징은 생체내 골 형성 과정의 조직학적 양상과는 차이가 있었으며 이러한 차이가 세포 배양조건의 한계성에 기인하는 것인지 혹은 석회화를 위한 다른 유도인자가 필요한 것인지에 관해서는 추후 연구가 필요하리라 사료되었다.

결론

사람의 간엽 줄기 세포를 생분해성 고분자 지지체내에서 배양하고 골 형성을 유도한 결과, 다양한 조성의 고분자 지지체내에서 모두 골모세포로 분화하는 것을 확인할 수 있었으며 지지체의 조성에 따라 세포의 기질의 침착 정도가 차이나는 것을 관찰하였다. 또한 높은 초기 세포 접종밀도가 초기 석회화에 적합한 조건임을 확인하였으며, 발포성 염으로 제조된 다공성 고분자 지지체내에서의 간엽 줄기세포의 배양은 골 조직 개발을 위한 좋은 생체의 모델로서 전임상 시험을 통한 유용성에 대한 검토가 뒤따라야 할 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumta PN, Dimilla PA and Weiss LE: Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces. *J Biomed Mater Res*, 52: 279-284, 2000.
2. Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ and Amiel D: Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): A tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res*, 29: 1147-1154, 1995.
3. Cornell CN and Lane JM: Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Ortho Rel Res*, 355S: 267-273, 1998.
4. George W: Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev*, 54: 332-333, 1996.
5. Hasirci V, Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL and Trantolo DJ: Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. *J Biotech*, 86: 135-150, 2001.
6. Holy CE, Shoichet MS and Davies JE: Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds; initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res*, 51: 376-382, 2000.
7. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64: 295-312, 1997.
8. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S and Satomura K: Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 153: 1133-1139, 2001.
9. Murphy WL, Kohn DH and Mooney DJ: Growth of continuous bone-like mineral within porous poly (lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res*, 50: 50-58, 2000.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells, *Science*, 284: 143-147, 1999.
11. Toquet J, Rohanisadeh R, Guicheux J, Couillaud S and Passuti N: Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J Biomed Mater Res*, 44: 98-108, 1999.
12. Whang K, Goldstick TK and Healy KE: A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors. *Biomaterials*, 21: 2545-2551, 2000.
13. Yang XB, Roach HI, Clarke NMP, et al: Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone*, 29: 523-531, 2001.
14. Yoon JJ and Park TG: Degradable behavior of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas forming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res*, 55: 401-408, 2001.

1. Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumta PN, Dimilla PA and Weiss LE: Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow