

생체 흡수성 지지체와 연골화  
골수 간질 세포 복합체를 이용한  
관절 연골의 재생 및 평가

연세대학교 대학원

의 학 과

한 승 환

생체 흡수성 지지체와 연골화  
골수 간질 세포 복합체를 이용한  
관절 연골의 재생 및 평가

지도교수 한 수 봉

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2007년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

한 승 환

<인준서>

## 한승환의 박사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2007년 6월 일

## 감사의 글

한명의 환자를 치료하는 의사의 정성도 중요하지만 보다 더 많은 환자를 치료할 수 있는 의학의 원리를 깨우치는 것이 더욱 중요하다는 은사님의 가르침이 항상 머리에 맴돕니다. 은사님의 말씀은 제가 임상적이기 이전에 평생을 공부해야 하는 기초의학도임을 잊지 않고 연구활동을 게을리하지 않게 이끌어 주신 원동력이 되었으며, 이제 그 첫매듭을 짓게 되어 어렵고 힘든 순간에 저와 함께 해주셨던 많은 분들께 감사와 영광을 돌리고자 합니다.

임상과 기초 의학 모두에 매진하고자 많은 시간을 병원과 연구실에서 보내야 했기에 좋은 가정의 모습을 보여주지 못했음에도 불구하고, 저의 평생의 든든한 지지자로서 함께 의학을 공부한 조언자로서 항상 이해와 배려를 아끼지 않으며 끊임없는 지원을 보내준 소중한 제 아내와 사랑스러운 두 딸에게 가장 먼저 감사를 드리고 싶습니다. 또한, 학업을 잘 마칠 수 있도록 물심양면으로 지원해주신 양가 부모님께도 깊은 감사를 드립니다. 연구를 진행함에 있어 많은 가르침을 주신 지도 교수님이신 한수봉 교수님,

바쁘신 중에도 연구의 시작부터 끝까지 너무나 많은 조언과 지도를 해주신 이진우 교수님께 깊은 감사드립니다. 보다 알찬 논문이 될 수 있도록 도와주신 조재림 교수님, 김현옥 교수님, 박종철 교수님께도 감사드립니다. 실험에 서툴러 고민할 때 자신의 일처럼 옆에서 가르쳐주고 도와주었던 김윤희 박사, 정호선, 박민성 연구원에게도 감사의 말씀을 드리며 이 분들의 앞으로의 연구에도 많은 발전이 있기를 기원합니다. 동물 실험을 할 수 있도록 지원해 주신 식약청 유규하 박사님, 지지체 제작을 지원해 주신 아주대학교 박기동 교수님 및 생역학 실험을 지원해 주신 인제대 신정욱 교수님께도 감사드립니다. 이제 갓 진정한 ‘의학자’로서 연구활동을 시작하는 세계 많은 지지와 격려를 보내주신 저와 함께한 모든 분들께도 이 글로서 감사의 말씀을 전합니다.

저는 이제 기초의학이라는 무한한 우주에 이 연구를 발판으로 첫걸음을 내디딤으로써 기대와 희망으로 응비하고자 합니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. Poly-(L)-lactic-co-glycolic acid (PLGA) 지지체 제작 .....	6
2. 골수 간질세포 일차배양 .....	6
3. PLGA 지지체를 이용한 3차원 배양 및 연골세포 분화 .....	7
4. 반정량 역전사 중합 효소 반응을 이용한 연골세포 표현형 검사 .....	8
5. 세포 생존 능력 검사 .....	9
6. 교원질 및 점액다당류 분비량 측정.....	10
7. 주사 전자 현미경 .....	11
8. 가토 슬관절에 골수 간질세포/지지체 복합체 이식.....	11
9. 연골 외형 평가 .....	12
10. 함입 검사에 의한 재생 연골 생역학적 특성 측정.....	13
11. 조직 염색 및 점수화 .....	14
12. 통계 분석.....	15
III. 결과 .....	16
1. 연골화 기간 동안 지지체내 세포 생존률 .....	16
2. 연골화 세포 분화 확인.....	17
3. 연골 세포 유전자 발현 .....	19

4. 주사 현미경 .....	20
5. 재생된 연골의 외형 지수 .....	20
6. 합입 검사 .....	22
7. 조직 소견 및 조직화학 염색 소견 .....	24
가. H & E 염색 .....	24
나. Safranin-O 염색 .....	25
다. 제 2형 교원질 면역조직화학 염색 .....	25
라. 재생 조직 점수화 .....	26
IV. 고찰 .....	28
V. 결론 .....	34
VI. 참고문헌 .....	36
영문요약 .....	43

## 그림 차례

그림 1.	세포 생존률 MTT 시험 결과 .....	16
그림 2.	실험실 배양 기간 중 분비되는 전체 교원질 및 점액 다당류 양 측정 결과 .....	18
그림 3.	연골 세포 표현형에 대한 역전사 중합 효소 반응 .....	19
그림 4.	PLGA 지지체 및 골수 간질세포/지지체 복합체 주사 현미경 사진 .....	20
그림 5.	이식 12주 적출한 대퇴골 원위부 슬관절 외형 사진 .....	22
그림 6.	합입 검사에 의해 계산된 재생연골의 Young 계수 .....	24
그림 7.	TGF- $\beta$ 처리 골수 간질세포/지지체 복합체 가토 이식 후 12주째 조직 소견 .....	27
그림 8.	TGF- $\beta$ 비 처리 골수 간질세포/지지체 복합체 가토 이식 후 12주째 조직 소견 .....	27

## 표 차례

표 1.	역전사 중합효소 반응에 사용된 연골세포 표현형 유전자 primer .....	9
표 2.	이식편 종류에 따른 실험개체 분류 .....	12



## 국문요약

### 생체 흡수성 지지체와 연골화 골수 간질 세포 복합체를 이용한 관절 연골의 재생 및 평가

관절연골의 손상은 외상에 의한 이차적 발생이나 박리성 골 연골염과 같은 특발성 원인에 의하여 발생하나, 관절연골의 자생력 결여로 인하여 현재까지도 연골 재생 치료에 많은 어려움이 있다. 최근 손상된 관절연골의 재생을 위해 다양한 방법들이 연구되고 있으며, 최근에는 배양 세포 및 지지체를 이용하여 연골 재생을 유도하는 방법들이 고안되고 있다. 이러한 맥락에서 본 연구는 관절연골의 재생을 위해 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 골수 간질세포 및 poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) 지지체를 사용하여 손상된 관절 연골을 재생하고자 하였으며, 다양한 방법을 이용하여 재생된 연골의 특성을 평가하고자 하였다.

본 연구에서 고안된 방법에 의해 재생된 관절 연골의 생체 적합성 및 연골 재생 정도의 평가를 위해 가토 슬관절에 인위적 연골 결손 부위를 만든 후 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 골수 간질세포/PLGA 지지체 복합체를 이식하였다. 연골 재생 여부를 확인하기 위해 이식 후 12주에 슬관절을 분리하였고, 대조군으로 설정한 TGF- $\beta_3$ 로 처리하지 않은 골수 간질세포/PLGA 지지체 복합체를 이식하여 관절 연골을 재생한 가토군과 비교하여 외형적, 조직학적 그리고 생역학적 특성을 비교하였다.

실험은 가토의 장골에서 골수를 흡인 한 후 골수 간질 세포를 분리하여 충분히 증식 시킨 후 PLGA 지지체에서 3차원 배양을 시행하였으며, 이식 전 3주간 TGF- $\beta_3$ 로 전처리하였다. 이식 전

골수 간질세포/지지체 복합체에 대하여 관절 연골의 특징적인 유전자 및 단백질 발현 측정하여 연골화 여부를 확인하였고, 이후 연골화된 골수 간질세포/지지체 복합체를 가토의 슬관절 결손 부위에 이식하였다. 이식 12주에 6마리의 가토 중 5마리에서 관절연골의 재생이 관찰되었으며, 관절연골의 평가를 위해 생존한 가토의 슬관절을 안락사 후 분리하였다. TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 군에서는 외형적으로 주변 연골과 색, 투명도, 연결성 등에서 정상연골과 유사한 소견을 보였으며, 생역학적 특성에서 측정된 Young 계수는 정상연골의 약 80%의 소견을 보이는 것으로 나타났다. 조직학적 소견에서는 초자 연골 소견을 보였으며, 제 2형 교원질 조직화학염색에서 세포외기질의 발현도가 높았다. 특히, 조직소견을 점수화 하여 정상 연골과 비교 시 통계학적으로 차이가 없는 것으로 나타나 정상연골에 가까운 소견을 보였다. 이러한 소견들은 TGF- $\beta_3$  비처리군과 비교 시 조직학적, 생역학적으로 향상된 소견을 나타내었다.

따라서, 본 연구에서는 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 골수 간질세포 및 지지체 복합체를 이용한 연골 재생법으로 초자 연골과 유사한 연골을 재생할 수 있었으며, 이러한 치료방법을 관절 연골 재생의 새로운 가능성을 제시하였다.

---

핵심되는 말: 골수 간질세포, PLGA 지지체, 연골, 조직 공학

# 생체 흡수성 지지체와 연골화 골수 간질 세포 복합체를 이용한 관절 연골의 재생 및 평가

<지도교수 한수봉>

연세대학교 대학원 의학과

한 승 환

## I. 서 론

관절연골의 결손은 외상이나 박리성 골연골염과 같은 특발성 원인에 의하여 발생한다. 관절연골 손상은 외상 혹은 퇴행성 변화 후 매우 제한된 재생 능력을 보이며, 재생된 관절연골은 조직학적, 생화학적, 그리고 생역학적으로 불완전한 성질을 나타낸다. 치료되지 않고 재생된 관절 조직은 초자 연골 (hyaline cartilage)이 아닌 섬유화 연골 (fibrous cartilage) 혹은 섬유 조직 (fibrous tissue)으로 대체되는 결과를 보여 퇴행성 관절염의 발생 확률이 높아 지게 된다. 손상된 관절 연골의 치료로 자가 연골 세포 이식 (autologous chondrocyte transplantation) 방법이 개발되어 최근 임상적 사용이 늘어나고 있으나<sup>1</sup>, 이식부위의 불균등한 세포 분포, 이식 세포의 소실, 그리고 이식된 세포의 탈분화 등의 문제점이 나타나, 부분적인 연골 형성이 결손 부위에 생성이 되지만 안정적인 연골의 재생과

주변의 숙주조직과 융합되지 못하는 단점 등이 지적되고 있다<sup>2</sup>. 이러한 문제점을 보완하고자 최근에는 생체흡수성 지지체 (bio-absorbable scaffold)와 세포이식 기술이 접목되어 관절 연골 재생을 위해 다양한 연구들이 시행되고 있는 실정이다<sup>2-4</sup>.

기존의 자가 연골 세포 이식법은 정상 연골의 채취 과정 및 배양 후 세포 이식 과정과 같은 두 번 이상의 수술 그리고 연골 채취 공여부의 위험성 등과 같은 단점을 가지고 있으며, 특히, 조직공학적 연골 재생의 중요한 요소인 이식 세포의 충분한 확보라는 관점에서 연골 세포 자체는 탈분화 (dedifferentiation)라는 위험성을 내포하고 있어 이식에 충분한 세포 수를 확보하기 위한 계대 배양의 횟수가 제한을 받는다<sup>5-7</sup>. 따라서, 많은 연구자들은 이러한 문제를 극복하기 위해 골수 간질세포, 제대혈 간질세포, 배아 줄기 세포 등을 이용하여 안정적이고 충분한 수의 확보를 위한 세포 배양법을 연구하고 있으며, 특히 이들 세포는 계대 배양 과정에서의 세포 표현형에 대한 안정성과 함께 일정한 조건에서 연골 세포로의 분화 유도가 가능하므로 새로운 조직공학적 연골 치료 방법으로 이들 세포들을 치료에 적용하기 시작하였다<sup>8-11</sup>.

연골 세포 분화는 TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 군에 속해 있는 다양한 성장 인자에 의해 매개 되며, 이는 발생기에 중간엽 조직이 응축되거나 연골분화가 일어나는 시기에 다량으로 생성되는 성장 인자로 알려져 있다<sup>12,13</sup>. TGF- $\beta$ 는  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  및  $\beta_3$ 의 아형으로 분류되며  $\beta_1$ 보다는  $\beta_2$  또는  $\beta_3$  형이 연골 분화 능력이 더 우수한 것으로 알려져 있으며, 특히, TGF- $\beta_3$ 를 골수 간질 세포에 처리 하는 경우 연골 기질의 성분인 aggrecan, link protein, fibromodulin, cartilage oligomatrix protein, decorin, 제 2형 교원 단백질 등을 생성하는 것으로 알려져 있어, 골수 간질 세포 및

TGF- $\beta$ 를 이용하는 많은 연구가 현재 진행되고 있다<sup>13</sup>. 생체 고분자를 이용한 연골의 재생에 대한 연구는 많은 연구자에 의하여 진행되고 있으나 임상에 응용할 수 있을 정도의 향상된 결과를 보이는 경우는 아직 없어 현재 다양한 성분과 물성을 보유한 지지체들이 개발 중에 있다. 특히, 조직 공학에 적용되는 이상적인 지지체의 조건으로 이식주변 조직과 물리적 유사성, 적절한 기간의 생체 흡수성, 그리고 세포 분화 기간 중 세포 표현형의 유지와 안정성을 제공할 수 있는 특성 등이 거론되고 있으나 현재 임상에 응용할 수 있을 정도로 연골 재생의 좋은 결과를 보이는 지지체는 개발된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 연골 세포의 대체 세포로 골수 간질 세포를 이용하여 연골 분화 능력과 이의 임상적 응용의 가능성을 알아보며, 특히, 3차원 배양에서 지지체와 골수 간질 세포 복합체를 TGF- $\beta_3$ 를 이용하여 연골 분화를 유도시킨 후 동물 이식 실험을 통하여 지지체의 생체 적합성을 판별하고 골수 간질 세포가 관절 연골 결손의 치료제로서의 역할을 분석하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Poly-(L)-lactic-co-glycolic acid (PLGA) 지지체 제작

PLGA 복합체는 기존의 방법을 참고하여 제작 하였다<sup>14</sup>. PLGA 지지체의 lactide와 glycolide peak 비는 <sup>1</sup>H-NMR (MERCURY plus 400 MHz, Varian Inc., Palo Aloto, CA, USA)를 이용하여 (75:25)가 되도록 하였다. PLGA 복합체의 분자량은 515 HPLC pump, 717 plus auto sampler 및 419 differential refractometer (Waters CO. Milford, MA, USA)로 구성된 gas permeation chromatography system을 이용하여 측정하였으며, 측정된 분자량은 약 120,000이었고, polydispersity index (PDI) 값이 1.33이었다. PLGA 지지체는 polymer와 salt의 비가 1:15가 되도록 혼합하여 염침전 (salt leaching) 방법을 이용하여 제작하였다. 5 wt% PLGA 용액을 chloroform에 용해 시킨 후 염화 나트륨 (300-500  $\mu$ m)과 혼합하였다. 지름 6 mm, 높이 3 mm인 teflon 주형에 polymer/salt 반죽을 채워 넣었다. 이후 반죽을 주형으로부터 제거한 후 증류수에 2일간 보관하여 염을 녹였고, 최종적으로 2-3일 동안 동결 건조시켜 제작하였다. 다공성 및 다공의 크기는 mercury porosimeter를 사용하여 측정하였다.

### 2. 골수 간질세포 일차배양

골수 간질 세포는 3개월 된 New Zealand white rabbit의 장골 에서 골수를 흡인하여 기존에 알려진 방법으로 골수 간질 세포를 분리 배양 하였다<sup>15</sup>. 3000 U의 헤파린 (heparin)이 함유된 주사기를 이용하여 가토의 후 장골능 (posterior iliac crest)에서 골수를 2-4 ml 흡인하였다. Dulbecco's Modified Eagle's medium-low glucose

(DMEM-LG, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)를 골수와 같은 부피로 첨가하여 500 xg에서 5분간 원심 분리 하였고, 골수 내 세포를 침전시켜 pellet을 만들었다. 상층액을 제거 한 후 DMEM-LG에 우태 혈청 (FBS, fetal bovine serum, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) 10% (v/v), 100 units/ml penicillin G 및 0.1 mg/ml streptomycin이 첨가된 기본 배양액 10 ml로 두 번 세척 한 후 T-75 cm<sup>2</sup> 세포 배양 플라스크에 분주 시켰으며, 4일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양하여 골수 간질 세포 분리를 유도하였다. 이후, 플라스크 바닥에 부착되지 않은 세포들은 제거 하였고, 바닥에 부착된 골수 간질 세포는 3일 간격으로 배양액을 교환하여 플라스크에 90% 이상이 차게 되면 계대 배양을 시행하였다. 분리된 골수 간질 세포는 2계대 배양까지 세포를 증식시켰으며, 모든 실험은 2계대 배양 세포로 진행하였다.

### 3. PLGA 지지체를 이용한 3차원 배양 및 연골세포 분화

냉동 보관된 PLGA 지지체는 배양 24시간 전 70% alcohol에 교반하여 진공상태에서 3시간 동안 멸균하였고, phosphate buffered saline (PBS)로 3차례 세척하였다. 이후 10% FBS DMEM-LG 용액에 교반하여 냉동보관 하였으며 세포 이식 전 30분 이상 37°C에서 bathing 시작하였다. 플라스크에 충분히 증식된 골수 간질세포는 trypsin-EDTA (0.5 mg/ml)을 이용하여 플라스크에서 탈부착시킨 후, 500 x g 5분간 원심분리 하여 세포 현탁액을 만들었다. 준비된 PLGA 지지체에 2x10<sup>6</sup> cells/scaffold로 준비된 원통형 PLGA 지지체에 정적 주입 (static seeding)하였고, 세포가 지지체에 부착 및 적응하도록 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 4시간 동안 24 well flask 에서 배양시켰다. 이후 연골화 세포 분화 유도를 위해 10 ng/ml TGF-β<sub>3</sub>

(R & D system Inc, Minneapolis, MN, USA) 및 30  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid가 첨가된 DMEM-LG 배양액을 첨가하였고, 원활한 분화를 위해 100 RPM 교반기에서 배양을 유지하였다. 가토 슬관절에 다시 이식하기 위한 골수 간질 세포/지지체 복합체는 21일간 in vitro 에서 연골 분화를 유도하였고, TGF- $\beta_3$ 를 처리 하지 않은 골수 간질 세포/지지체 복합체와 비교하여 연골 분화 상태를 검사하였다.

#### 4. 반정량 역전사 중합 효소 반응 (Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)을 이용한 연골세포 표현형 검사

골수 간질 세포의 연골 분화를 검사하기 위하여, 연골 세포의 특징적 유전자 발현은 역전사 중합 효소 반응법을 이용하여 확인하였다. 21일간의 연골 분화 기간 동안 일정 시점에서 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액을 이용하여 추출하였고, 분광 광도계를 사용하여 추출액 내의 total RNA를 정량하였다. 추출된 total RNA는 Omniscript kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 37°C 에서 90분 반응시킨 후 95°C 에서 5분간 반응시켜 cDNA (clonal DNA)를 제작하였으며, 이에 의해 만들어진 cDNA 2 ul aliquot에 10 pM의 sense primer와 10 pM의 antisense primer를 첨가하고, PCR buffer, 0.2M dinucleoside triphosphate mixture, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M primer 및 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen) 복합 용액을 더하여 50 ul 용액을 만든 후 25-40 cycle로 증폭시켰다. Primer는 관절연골세포 특이 표지자인 제 2형 교원질, aggrecan은 gene bank에 근거한 염기서열을 찾아 제작하고 각각의 반응 조건을 정하였다 (표 1)<sup>16,17</sup>. 증폭된 유전자는 1.5% agarose gel에서 ethidium bromide로 염색 하여 image



analyzer로 분석하였으며, 각 세포 군마다 GAPDH 발현 정도를 표준화시켜 개별 유전자 발현양을 간접적으로 비교하였다.

표 1. 역전사 중합효소 반응에 사용된 연골세포 표현형 유전자 primer

Gene	Size (bp)		Primer Sequence	Access No.
Collagen Type II	366	sense	5'-GCACCCATGGACATTGGAGGG-3'	S83370
		antisense	5'-GACACGGAGTAGCACCATCG -3'	
Aggrecan	313	sense	5'-GAGGAGATGGAGGGTGAGGTCTTT-3'	L38480
		antisense	5'-CTTCGCCTGTGTAGCAGCTG-3'	
GAPDH	444	sense	5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'	L23961
		antisense	5'-ATGAG TCCACCACCCTGTT-3'	

(bp: base pair)

#### 5. 세포 생존 능력 검사 (Viability test)

연골화 분화 배양 기간 동안 지지체내 골수 간질 세포 생존 능력 검사를 위하여, methylthiozole tetrazolium (MTT) 분석법을 사용하였다. 지지체를 일정 크기로 (지름: 6 mm, 두께 2 mm, 원통형)로 자르고 96 well flask에 넣은 후,  $5 \times 10^5$  cells/scaffold 용량으로 가토 골수 간질 세포를 지지체에 고르게 접종하였고, 4시간 동안 세포 부착을 위해 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 배양하였다. 연골화 분화 배지 (150  $\mu$ l/well)에 3주간 복합체를 배양하였으며, 매주 세포 양의 변화를 측정하였다. TGF- $\beta_3$ 가 제외된 배양액을 대조군으로 사용하여, TGF- $\beta_3$ 에 의한 세포 생존 능력 변화를 비교하였다. 배양액에 있는 복합체에서 배지를 제거 한 후 새로운 배양액 150  $\mu$ l을 첨가 하고 추가로 MTT 용액 (0.5 mg/ml) 100  $\mu$ l를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 후 배양액을 조심스럽게 제거 하고 세포 내 formazan을 녹이기 위해 200  $\mu$ l dimethyl sulfoxide

(DMSO, Sigma) 용액을 각 well에 첨가하였다. 세포 내 formazan을 최대한 용해시킨 후 570 nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다. 실험의 재현을 위해 반복실험을 세 번 수행하였다<sup>18</sup>.

#### 6. 교원질 (collagen) 및 점액다당류 (glycosaminoglycan) 분비량 측정

골수 간질세포/지지체 복합체의 연골 분화 배양 기간 동안, 배양액으로 분비되는 전체 교원질 양과 점액다당류 양을 기간 별로 측정하여 분비 변화량을 측정하였다. 전체 교원질의 측정은 dye-binding 법을 이용한 Sircol<sup>TM</sup> collagen assay kit (Biocolor, Northern Ireland, UK) 을 사용하였다<sup>19</sup>. 연골 분화 중인 배양액 100  $\mu$ l을 수집하여 1 ml Sircol<sup>TM</sup> dye reagent과 혼합하고 30분간 반응 시켜 교원질과 염색 시약의 결합을 유도하였다. 이후, 10,000 xg 조건으로 10분간 원심분리 시킨 후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 염색시약이 결합된 교원질을 kit에 포함된 염기 용액 1 ml에 용해시켰다. 이후 용해된 염색 시약의 농도는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 그 양을 측정하였으며, 표준 교원질 용액인 rat tail collagen (Biocolor)의 흡광도와 비교하여 교원질 양을 산출하였다.

점액 다당류의 경우 1,9-dimethylmethlene blue 염색 시약의 결합 방법을 응용한 Blyscan<sup>TM</sup> assay kit (Biocolor)을 이용하여 분비량을 측정하였다<sup>20</sup>. 연골 분화 중인 배양액 100  $\mu$ l을 수집하여 1 ml Blyscan<sup>TM</sup> dye reagent와 혼합하고 30분간 반응시켜 점액다당류와 염색 시약의 결합을 유도하였다. 이후 10,000 x g 조건으로 10 분간 원심분리 한 후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 염색 시약이 결합된 점액다당류를 kit에 포함된 해리 용액을 1 ml을 사용하여 용해시켰다. 이후 용해된 염색 시약의 농도는 656 nm에서 흡광도를 측

정하였으며, 표준 용액인 chondroitin 4-sulfate (Biocolor) 용액의 흡광도와 비교하여 점액 다당류의 양을 산출하였다. 실험의 재현을 위해 반복실험을 세 번 수행하였다.

#### 7. 주사 전자 현미경

지지체의 미세 구조 및 세포 부착 여부는 주사 현미경 방법을 이용하여 검사 하였다. 골수 간질세포/지지체 복합체를 3주간 연골 분화 시킨 후 PBS 용액으로 세 번 가볍게 세척하였다. 이후 복합체 조직을 3% glutaraldehyde이 함유된 PBS 용액에 넣어 4℃에서 24 시간 보관하여 복합체를 고정하였다. PBS 용액으로 고정 용액을 완전히 세척 시킨 후 50%, 70%, 95% 및 100% ethanol 용액에 순차적으로 5분간 처리하여 탈수하였다. 고정된 복합체 조직은 동결 건조 및 gold sputter-coating을 시행하여 주사 현미경 (scanning electron microscope, SEM, s-800, HITACHI, Tokyo, Japan)으로 조직 소견을 촬영하였다.

#### 8. 가토 슬관절에 골수 간질세포/지지체 복합체 이식

6마리 12월령 New Zealand white rabbit ( $3\pm 0.5$  kg body weight)의 슬관절에 골수 간질세포/지지체 복합체를 이식하였다. 마취는 30 mg/kg b.w. 용량의 ketamine과 5 mg/kg b.w. 용량의 xylazine을 근주하였으며, 수술 중 마취의 연장은 초기 용량의 절반 용량을 근주하여 유지하였다. 슬개골 내측부위를 따라 피부를 절개한 후, 슬개골을 외측으로 탈구시켜 대퇴골의 슬개골 고랑 (patellofemoral groove)을 노출시켰다. 슬개골 고랑에 지름 6 mm, 깊이 3 mm의 원형 연골-골 결손을 만든 후 미리 준비된 연골화 골수 간질세포/지지체 복합체를 press fitting 법 및 fibrin glue (Tissel<sup>®</sup> kit, Baxter,

Vienna, Austria)를 이용하여 골-연골 결손 부위에 이식하였다. 최종적으로 이식편 고정의 안전성을 확인한 후, 절개된 창상을 봉합하였다. 수술 후 12시간에 항생제 투여를 1회 시행하였으며, 수술 부위의 고정은 시행하지 않고 사육장안에서 가토가 자유롭게 움직이도록 하였다. 대조군으로 미분화 골수 간질세포/지지체 복합체를 같은 방법으로 이식하였고 (6마리), 복합체를 이식하지 않고 결손만 만든 결손 대조군 (6마리)과 피부절개 및 관절 면 노출만 시킨 후 다시 봉합한 sham operation 대조군 (6마리)도 설정하였다 (표 2).

표 2. 이식편 종류에 따른 실험 개체 분류

Group	Description	Total cases
I	TGF- $\beta_3$ pretreated bMSCs/Scaffold composite	6 cases
II	bMSCs/Scaffold composite only	6 cases
III	Sham operation	6 cases
IV	Defect only	6 cases

(TGF: Transforming growth factor, bMSCs: bone marrow stromal cells)

### 9. 연골 외형 평가

수술 후 12주에 가토를 CO<sub>2</sub> chamber에서 안락사 시켰으며, 양쪽 슬관절 부위를 적출하여 이식 부위를 관찰하였다. Brun 및 Moran의 연골 외적 형태 평가 점수표를 이용하여 재생된 연골의 edge integration, surface roughness, defect fill 및 재생 연골의 색깔을 점수화하여 비교하였다<sup>21,22</sup>. 개별 항목에 대한 점수의 합은 8점이다.

## 10. 함입 검사 (Indentation test)에 의한 재생 연골 생역학적 특성 측정

재생된 연골의 생역학적 평가 (biomechanical evaluation)을 위하여 함입 검사 (indentation test)를 시행하였다. 함입 검사는 기존에 알려진 방법에 따라 비파괴 (nondestructive in situ) 방법으로 측정하였다<sup>23,24</sup>. 안락사 시킨 가토로부터 대퇴골 원위부를 적출하여 10% protease inhibitor (Sigma)가 첨가된 PBS 용액에 넣고 함입 검사 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 실험은 자체 제작한 Micro Indentation System (인제대학교)를 사용하였다. 검사는 일정 변형 조정법 (displacement control mode)를 사용하여 일정한 변형을 주기 위해 가해지는 load (gf) 및 stress (MPa)를 측정하여 연골의 Young 계수를 계산하였다. 요약하면, 준비된 대퇴골 원위부를 연골 부위가 위로 향하도록 틀에 고정한 후 실험 시간 동안 재생 연골의 용해 또는 흡수를 방지하기 위하여 protease inhibitor (10%)가 함유된 PBS용액으로 실험 기간 동안 담가두었다. 0.5 mm 원뿔 형 함입기를 고정 장치에 부착시키고, 1 step 30  $\mu\text{m}$ , loading time 0.1 mm/min 및 각 측정간 이완 시기 (relaxation time) 90초 mode로 150  $\mu\text{m}$  깊이까지 모두 5번의 연속적인 측정을 통해 매번 가해지는 stress (MPa)를 측정하였다. 측정값은 각 step 당 모두 200초 동안 걸리는 load의 변화 량 중 마지막 60초 동안 이완되었을 때의 값을 기록하였다. 각 단계에서 이완률 변화가 100 Pa 이하로 측정되는 경우를 이완으로 정의하였다. 최종적으로 각 단계마다 계산된 stress (MPa)를 이용하여 탄성도 ( $E$ )를 구하고, 다음과 같이 Hayes 등에 의해 제안된 공식에 의하여 다양한 변수로 환산하여 연골의 특성에 맞는 최종적인 Young 계수 ( $E_s$ )를 산출하였다<sup>24</sup>.

$$E_s = \frac{(1 - V_s^2) \pi a}{2kh} E$$

수식에서  $E$  는 가해진 stress (MPa)에 의해 계산된 탄성도,  $V_s$ 는 포아송 비 (Poisson's ratio),  $a$ 는 함입기의 지름,  $k$ 는 이론적 비례 상수이다<sup>25</sup>. 특히, 본 연구에서는 포아송 비를 직접 측정할 만큼의 충분한 조직이 부족하였던 관계로, 기존의 참고문헌을 통하여 연골의 포아송 비를 0.20으로 정하여 계산하였다<sup>26</sup>. 또한, 비례상수인  $k$  값 또한 기존의 참고문헌을 이용하여 값을 산출하였다<sup>27</sup>.

#### 11. 조직 염색 및 점수화

생역학적 분석이 끝난 후 대퇴골 원위부는 10% 포르말린 (formalin, Sigma) 용액에 넣어 고정시키고 탈 석회화 (decalcification) 과정을 진행하였다. 적절한 탈 석회화 과정 이후 모든 조직들은 순차적 alcohol 및 xylene 탈수화 과정 이후 파라핀으로 조직 slide를 제작하였다.

5-6  $\mu$ m 두께로 순차적으로 잘라 제작된 slide는 Heamtoxylin and Eosin (Sigma) 염색법을 통해 세포 형태, 세포 외 기질 등의 조직학적 소견을 분석하였고, 재생된 연골 조직내의 당단백을 염색하기 위해 Safranin-O (Sigma) 염색법을 시행하였다. 또한, 다양한 조직학적 소견은 O'Dricoll에 의해 제안된 점수표를 사용하여 점수로 환산하였다<sup>28</sup>. 이는 모두 9개의 항목으로 구성되어 있으며 만점은 24 점이다. 점수화는 100 배 현미경 소견으로 분석하였다.

재생된 연골의 기질내에 제 2 형 교원질의 발현과 분포를 분석하기 위해, 면역 조직화학 염색을 시행하였다. Mouse anti-collagen type

II 항체 (ICN Biomedial Inc., Costa Mesa, CA, USA)를 1:500 으로 희석하여 일차 항체로 사용하여 12 시간 동안 반응 시키고 2 차 항체로 2 분 반응시킨 후 세척시킨 후 삼차 반응 시약으로 20 분간 처리하였다. 다시 PBS 로 10 분간 세 차례 세척한 후, chromogen (AEC)을 투여하여 10 분간 반응시킨 후, 3 차 증류수로 세척 하였으며 덮개 유리를 덮어 현미경으로 관찰하였다<sup>29</sup>. 사용한 항체의 특이도 및 양성 대조군은 정상 연골을 이용하여 확인하였으며, 음성 대조군은 일차 항체를 제외하고 염색한 조직 소견과 비교하였다.

## 12. 통계 분석

모든 data는 평균±표준편차로 기록하였으며, 각 실험 군을 비교하였고, 실험 개체수가 적은 관계로 통계 처리는 비모수법으로 시행하였다. 생존능력 검사, 교원질 및 점액다당류 분비량은 repeated measures analysis of variance 법으로 통계처리 하였다. 연골 외형, 조직학적 소견 및 Young 계수는 one way analysis of variance로 통계처리 하였으며, p 값이 0.05이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 연골화 기간 동안 지지체내 세포 생존률

PLGA 지지체내 있는 생존 세포는 전체 3주간의 실험실 배양 기간 동안 매주 측정하였다. 처음 지지체에 세포를 접종 시킨 후 12시간 이후에 지지체에 생착된 세포 수를 초기 지지체내 생존 세포수로 간주하여 100%로 기준을 잡았다. 3주간의 배양 기간 동안 세포 생존율은 90-100%를 유지하였으며, 각 주마다 비교 시 생존율은 변화가 없는 것으로 나타났다 ( $p=0.8160$ ). 결과적으로 초기에 접종하였던 세포들 대부분이 이식 전 실험실 배양 기간 동안 대부분 생존함을 알 수 있었다. 그러나, 연골화 배양 기간 동안 삼차원 배양에서 세포의 수는 증가하지 않았으며, 특히, TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교했을 경우에도 세포 생존율에는 차이를 보이지 않았고 90-100% 정도의 생존율을 보였다 (그림 1).

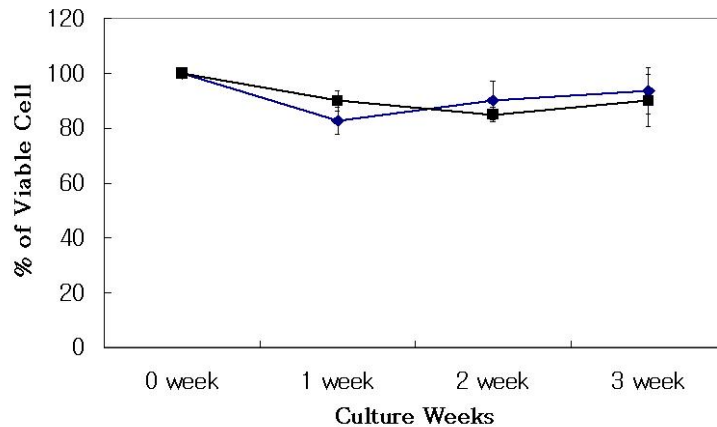


그림 1. 세포 생존률 MTT 시험 결과. TGF- $\beta_3$  처리한 골수 간질세포/지지체 복합체내 세포 생존률 변화는 초기 이식한 세포 수와 비교하여 3주째까지 초기 양의 90-100%의 양을 유지 하고 있음. 비 처리 군에서도 90-100%의 세포 생존률을 보이고 있음. (◆:(+) TGF- $\beta$ , ■:(-) TGF-  $\beta$ )



## 2. 연골화 세포 분화 확인

골수 간질 세포/지지체 복합체를 연골화 배양액에서 분화시키는 동안 배양액으로 분비되는 교원질 및 점액 다당류 양을 측정하였다. 배양액 1 ml에 함유된 양을 배양 기간 동안 변화량을 측정하였다. 전체 교원질의 경우 연골화 분화 배양 9일째부터 측정되기 시작하여, 21일째까지 증가하기 시작하였으며 이후 분비량 정점을 유지하였다 (그림 2-A). 점액 다당류의 경우 배양 18일째부터 측정되기 시작하여 24일째 이후부터 분비량이 정점을 유지하였다. 전체적으로 대략 연골화 배양 21일째 교원질 및 점액 다당류의 분비량이 급속하게 증가함을 관찰할 수 있었다 (그림 2-B). 반면, TGF- $\beta_3$ 를 사용하지 않고 일반 배양에서 배양한 복합체의 경우 교원질과 점액 다당류의 양은 측정 불가능한 수준으로 분비되었다. 따라서, 유전자 및 단백질 분비 결과에 따라 본 연구에서 사용한 TGF- $\beta_3$ 에 의한 연골화 분화는 배양 후 3주째 그 활성이 증가됨으로 보아, 최종적으로 3주 연골 분화 후 생체 내 이식을 시키는 것이 적합한 것으로 결정할 수 있었다.

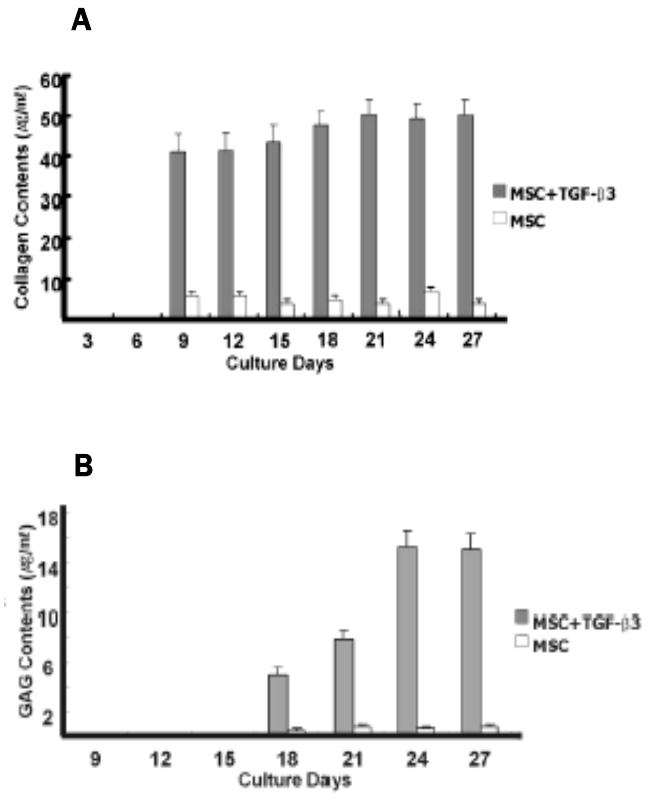


그림 2. 실험실 배양 기간 중 분비 되는 전체 교원질 및 점액 다당류 양 측정 결과.

전체 교원질의 경우 TGF-β<sub>3</sub>를 처리한 경우 배양 9일째부터 분비량이 증가하기 시작하여 21일째 최고점을 나타내는 반면, 비처리 군에서는 의미있는 단백질량의 증가가 관찰되지 않고 있음 (A). 점액 다당류의 경우 배양 18일째부터 측정되기 시작하여 그 분비량이 24일째까지 증가하며 이후 최고점을 나타내는 반면, 비처리 군에서는 점액 다당류가 3주간의 배양기간 동안 측정되지 않음 (B). 전체적으로 배양 약 21일째 연골 세포외기질 관련 단백질의 분비가 증가함을 관찰할 수 있음.

### 3. 연골 세포 유전자 발현

반정량 역전사 중합 효소방법을 사용하여 TGF- $\beta_3$ 에 의한 연골화 분화기간 동안 연골 세포의 표현형 유전자인 제 2형 교원질 및 aggrecan 유전자 발현을 측정하였다. 연골화 분화 배양기간 21일 동안 5, 7, 11, 14, 21일 간격으로 유전자 발현을 측정하였다. 실험 결과 분화 후 5일째부터 제 2형 교원질 유전자 발현이 관찰되었으며, 21일째 분화 기간 동안 계속해서 측정됨을 관찰할 수 있었다. Aggrecan의 경우에도 5일째부터 유전자발현이 제 2형 교원질과 함께 측정되었으며, 제 2형 교원질의 경우 aggrecan 유전자보다는 배양기간이 증가할수록 발현량이 증가함을 관찰할 수 있었다. 대조군으로 측정한 일반 배양액에서 배양된 복합체의 경우 제 2형 교원질 및 aggrecan 유전자의 발현이 관찰되지 않아, 연골화 분화가 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다 (그림 3).

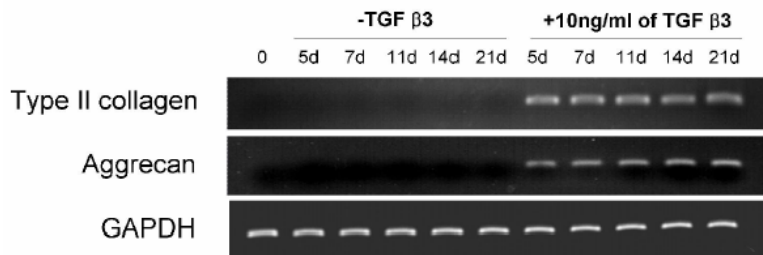


그림 3. 연골 세포 표현형에 대한 역전사 중합 효소 반응. 골수 간질 세포의 삼차원적 배양기간 동안 역전사 중합 효소 반응법을 사용하여 연골세포 표현형 유전자에 대한 발현을 측정한 결과, 제 2 교원질 및 aggrecan 유전자 발현이 배양 5일째부터 발현되기 시작하여 배양 21일째까지 점차적으로 증가함을 관찰할 수 있었음.

#### 4. 주사 현미경

주사 현미경 상 측정된 pore의 크기는 대략 300-500  $\mu\text{m}$  이었으며, porosity는 약 98%였다. 골수 간질세포/지지체 복합체를 가토 슬관절에 이식하기 전에 주사 현미경 사진으로 세포의 부착 및 세포외기질의 존재를 관찰하였으며, 배양 3주째 주사현미경 사진에서 골수간질 세포가 지지체 내에 고르게 분포되고 있음을 관찰할 수 있었다. 또한, 세포 주변으로 세포외기질 성분이 분비되는 소견 등을 관찰 할 수 있었다 (그림 4).

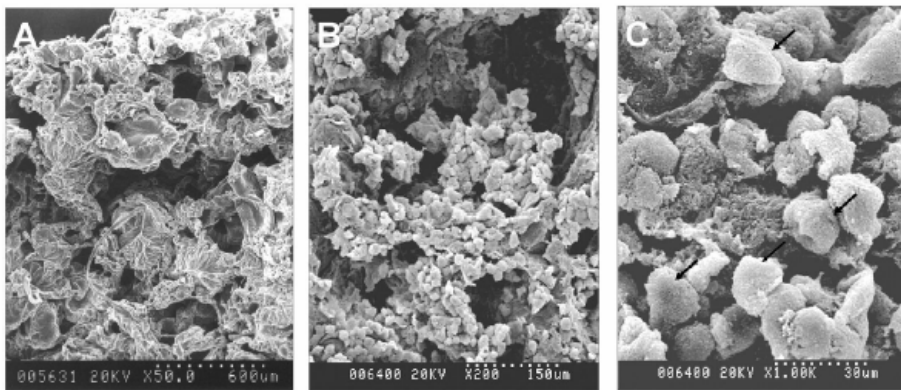


그림 4. PLGA 지지체 및 골수 간질세포/지지체 복합체 주사 현미경 사진. 실험에 사용된 75:25 PLGA 지지체 사진. 다공의 크기는 약 300-500  $\mu\text{m}$ 로 측정되었으며, 다공의 연속성을 관찰할 수 있음 (A). 골수간질 세포가 지지체내에 정착하여 있는 사진으로 고배율 사진에서 정착된 세포와 주변에 세포의 기질이 분비됨 (화살표)을 관찰할 수 있음(B, C). (배율 - A: x50, B:x200, C: x1000)

#### 5. 재생된 연골의 외형 지수

수술 후 12주 연골분화가 유도된 세포를 이식한 가토 6마리 모두 생존하였고, 연골분화가 유도되지 않은 골수 간질 세포/지지체 복합체를 이식한 가토 6마리 중 1마리는 수술 후 6주에 사망하여 연구

에서 제외시켰다. 생존한 모든 가토는 이산화탄소 사실에서 안락사시켰으며, 대퇴 원위부 약 4 cm 위치에서 절단하여 슬관절 조직과 함께 보관하였다. 결손 부위에 조직이 형성된 가토를 대상으로 재생된 연골 조직에 대한 평가를 시행하였으며, 최종적으로 TGF- $\beta_3$  전처리 복합체군 5마리, TGF- $\beta_3$  비처리 복합체군 4마리에서 연골 재생에 성공하여 전체 75%의 연골 생성 성공률을 나타내었다.

연골 분화 복합체에 의해 재생된 연골의 외형 지수는 평균 TGF- $\beta_3$  처리 군에서  $7.3 \pm 0.6$ 점 이었고, TGF- $\beta_3$  비처리 군에서  $5.5 \pm 1.7$ 점 이었으며, 정상 연골의 경우  $8.0 \pm 0$  점 이었으며 연골화 분화 복합체에 의해 재생된 연골과 정상 조직간에는 통계적으로 차이를 보이지 않았으나 ( $p=0.1835$ ), 미분화 복합체에 의해 재생된 연골은 다른 두 군보다 평균 점수에서 비교적 점수가 낮았으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 ( $p=0.1274$ ). 결손 대조군의 경우  $1.6 \pm 0.6$ 점의 평가를 보여 재생 실험군들과는 현저한 차이를 나타내었다 ( $p < 0.0001$ ). TGF- $\beta_3$  전처리된 골수 간질 세포/지지체 복합체 이식 후 12주에 재생된 연골의 경우 표면이 부드럽고 윤기가 나는 유리 연골 양상으로 나타났다. 주변 조직과의 연결성도 대부분의 조직에서 좋았다. 결손 대조군의 경우 관절염 소견과 함께 주변 조직과의 연결성이 좋지 않았고 일부 결손 부위는 이식 후 3주째에도 결손 되었거나 섬유조직으로 덮여 있음을 확인할 수 있었다 (그림 5).

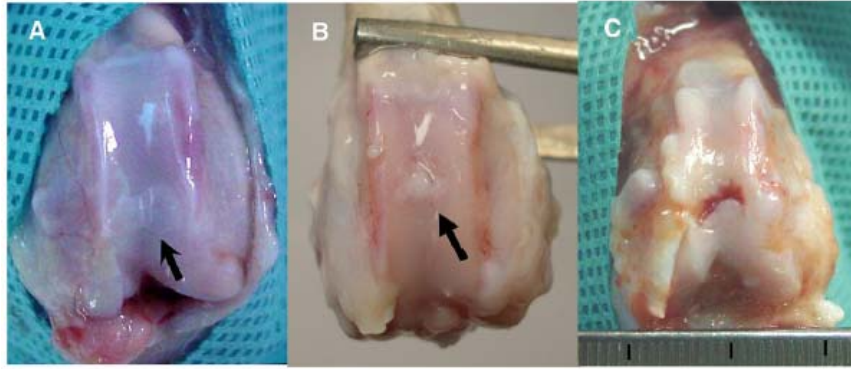


그림 5. 이식 12주 적출한 대퇴골 원위부 슬관절 외형 사진. TGF- $\beta_3$  전처리한 군에서 생성된 연골로 주변 조직과의 색상, 균일성 및 주변조직 연속성에서 우수한 연골 재생을 관찰 할 수 있음 (A). TGF- $\beta_3$  비처리군에서 적출한 재생연골로, 초기 결손 부위로 만든 부분에 주변조직과 비슷한 외형의 조직으로 채워져 있는 것을 관찰할 수 있으나, 색은 다소 섬유화된 것으로 관찰됨 (B). 결손 부위만 만들고 12주 후 적출한 대퇴원위부 사진으로 결손 부위가 계속 관찰되고 있으며, 주변 조직으로 관절염 소견이 관찰되고 있음 (C).

## 6. 함입 검사

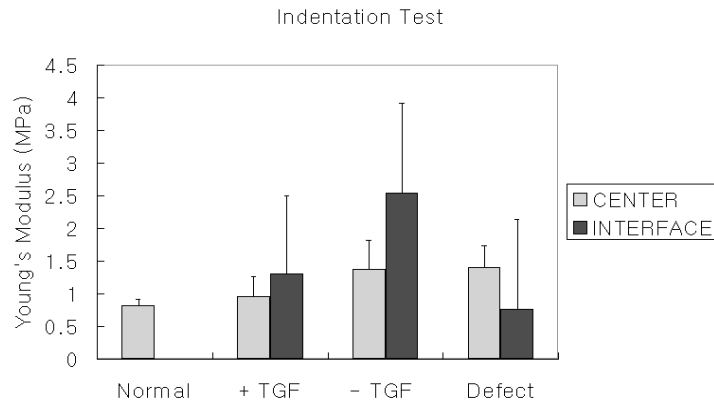
최대 strain 깊이를 결정하기 위하여 대퇴 슬개골 고랑의 연골 두께를 측정된 결과 정상 연골의 경우  $0.44 \pm 0.01$  mm 정도의 깊이를 나타내었다. 따라서, 최종적으로 연골 하 골의 영향을 최대한 줄이기 위해 전체 연골 두께의 약 25%인  $100 \mu\text{m}$  깊이를 최대 함입 깊이로 정하여 정상 연골의 탄성 계수를 측정하였다. 재생 연골의 경우 사전 실험에서 재생 12주째 약 0.7 mm 정도의 연골 두께를 나타내어, 재생연골의 경우는  $150 \mu\text{m}$  깊이를 최대 함입 깊이로 정하여 재생 연골의 탄성 계수를 측정하였다. 최종적으로 계산된 Young 계수는 TGF- $\beta_3$ 를 처리한 복합체에 의해 재생된 연골 조직의 경우 중심부에서  $0.95 \pm 0.30$  MPa, 변연부는  $1.30 \pm 1.21$  MPa로 측정이 되

었다. 또한 TGF- $\beta_3$ 를 처리하지 않은 복합체에 의해 재생된 연골 조직의 경우 중심부에서  $1.37 \pm 0.45$  MPa, 변연부는  $2.54 \pm 1.37$  MPa로 측정되었다. 수술 시 결손 부위만 만들어 연골 유사 조직으로 재생된 경우 중심부에서  $1.42 \pm 0.30$  MPa로 측정되었고, 변연부는  $2.15 \pm 0.76$  MPa로 측정되었다. 정상 연골의 Young 계수는  $0.82 \pm 0.09$ 로 측정되었다. 중심부의 경우 TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군과 정상 군의 값을 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 나지 않았으나 ( $p=0.4077$ ), TGF- $\beta_3$ 를 처리하지 않은 군과 정상 군의 값을 비교 시, 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ( $p<0.05$ ). 그러나, TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 ( $p=0.1410$ ). 또한, 결손 군과 비교 시 TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 ( $p<0.05$ ), TGF- $\beta_3$ 를 처리하지 않은 군에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아 ( $p=0.907$ ), TGF- $\beta_3$ 를 처리 군의 Young 계수 값이 다소 정상에 가깝게 나타남을 알 수 있었다.

변연부의 경우 TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군과 정상 군의 값을 비교 시, 통계적으로 차이가 나지 않았으나 ( $p=0.4078$ ), TGF- $\beta_3$ 를 처리하지 않은 군과 정상 군의 값을 비교 시, 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ( $p<0.05$ ). 그러나, TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교하였을 때, 두 값에는 차이가 없는 것으로 나타났다 ( $p=0.1690$ ). 또한, 결손 군과 비교 시, TGF- $\beta_3$ 를 처리한 군 및 처리하지 않은 군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아 (각각,  $p=0.3106$ ,  $p=0.6780$ ), 변연부 재생 조직의 경우 모든 군에서 Young 계수가 정상 조직과 비교하여 다소 떨어짐을 알 수 있었다.

재생연골의 중심부와 변연부의 Young 계수 평균은 통계적으로 유의한 수준으로 차이가 나지 않았으며 ( $p=0.2485$ ), 정상 연골의 탄

성계수와 비교 시에는 통계적으로 유의하게 차이가 났으며 ( $p < 0.05$ ), 정상 연골에 비해 약 80% 정도의 생역학적 특성을 나타냈다 (그림 6).



**그림 6. 함입 검사에 의해 계산된 재생연골의 Young 계수.** 재생 연골 중간 부위의 경우 정상과 비교 시 TGF- $\beta_3$  전처리 군과는 Young 계수가 차이가 없이 비슷하게 측정되었으나, TGF- $\beta_3$  비처리 군에서는 정상연골 보다 Young 계수가 높은 것으로 측정되어 정상 연골보다 다소 물성이 강함을 알 수 있었음. 반면, 재생 연골 변연부에서는 정상 연골과 비교 시 TGF- $\beta_3$  전처리 군 및 비처리군 모두 연골 세포보다 물성이 떨어지나 높은 것으로 나타났으며, 특히 표준편차가 크게 측정되는 것으로 나타나 재생된 연골의 비균등성을 유추 할 수 있었음.

## 7. 조직 소견 및 면역조직화학 염색 소견

### 가. H & E 염색

TGF- $\beta_3$  전처리군 및 비처리군 복합체에 의해 재생된 연골에서 연골세포의 lacunae의 형성 및 종단 정렬 (longitudinal arrangement) 양상을 보였으며 염증 소견은 대부분의 슬관절에서 미비하였다. 변연부에도 정상 연골과의 연결성을 유지하면서 재생이 비교적 연속



적으로 되어 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나, 재생된 연골 사이에 결손 부위가 발견되는 경우도 있었으며 특히, 연골 하 골과의 접촉 부위에서 연결성이 좋지 못한 경우도 관찰되었다. 또한, 세포의 clustering 현상도 관찰되는 경우도 있었다 (그림 7. A, B, C). 결손군의 경우 부분적인 연골 조직 형성 소견 및 섬유화 소견이 혼합된 양상으로 보였으며, 연골 하 골 및 주변 정상 연골과의 연속성이 관찰되지 않았다.

#### 나. Safranin-O 염색

Safranin-O 연골 특수 염색에서 TGF- $\beta_3$  전처리군 및 비처리군 복합체에 의해 재생된 연골에서 모두 염색이 되었으나, 특히 TGF- $\beta_3$  전처리군에서 재생된 연골 조직에 염색 시약이 대부분의 조직에서 균일하게 염색이 되어 점액 다당질 (glycosaminoglycan)의 형성을 간접적으로 관찰할 수 있었다. 그러나, TGF- $\beta_3$  비처리군 및 결손군에서는 재생된 조직에 부분적으로 염색된 것으로 보아 재생된 조직 일부에서만 연골 조직으로 재생됨을 알 수 있었고, H&E 소견과 비교하여 섬유화 조직으로 관찰되었던 부분은 염색이 잘 되지 않았기 때문에 연골 조직으로 재생이 되지 않음을 확인할 수 있었다.

#### 다. 제 2형 교원질 면역조직화학 염색

제 2형 교원질에 특이적인 면역조직화학 염색에서는 TGF- $\beta_3$ 를 전처리한 복합체에 의해 재생된 조직이 이식부위 주변의 정상연골과 비슷한 양상으로 재생된 대부분의 조직에 제 2형 교원질에 대한 면역 화학 염색이 잘 됨을 관찰할 수 있어, 재생된 조직 내에 제 2형 교원질의 형성을 간접적으로 확인할 수 있었고, 재생된 조직이

유리 연골과 비슷한 조직임을 확인할 수 있었다 (그림 7-D). 제 2형 교원질 항체의 특이도는 대조군으로 사용한 정상 연골의 염색 유무로 검증하였다.

대조군으로 사용한 TGF- $\beta_3$  비처리군 및 결손군의 경우 재생된 조직 대부분에서 제 2형 교원질 염색이 되지 않아 제 2형 교원질 형성이 저조함을 확인할 수 있었다. 특히, safranin-O 염색 소견과 비교 시 비록 점액 다당류의 형성으로 safranin-O의 염색은 되었지만, 관절 연골의 주요 세포외기질의 성분인 제 2형 교원질 염색이 관찰되지 않는 것으로 보아 재생된 연골이 유리 연골과는 다른 조직으로 형성되었음을 간접적으로 확인할 수 있었다 (그림 8).

#### 라. 재생 조직 점수화

TGF- $\beta_3$  전처리 군에서 재생된 연골의 조직소견을 점수로 환산 시  $21.7 \pm 1.4$ 로 계산되었으며, TGF- $\beta_3$  비처리군에서는  $20.5 \pm 1.6$ 으로 환산되었다. 두 군 모두 정상 연골과 비교 시 ( $24.0 \pm 0$ ) 낮은 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 그러나, TGF- $\beta_3$  전처리 및 비처리 두 군간의 비교에서는 비슷한 점수 양상을 나타내었다 ( $p = 0.3070$ ). 그러나, 결손 대조군의 경우  $14.0 \pm 5.2$ 로 계산되어, 재생연골과 비교 시 통계적으로 점수가 저하됨을 관찰할 수 있었다 ( $p < 0.001$ ).

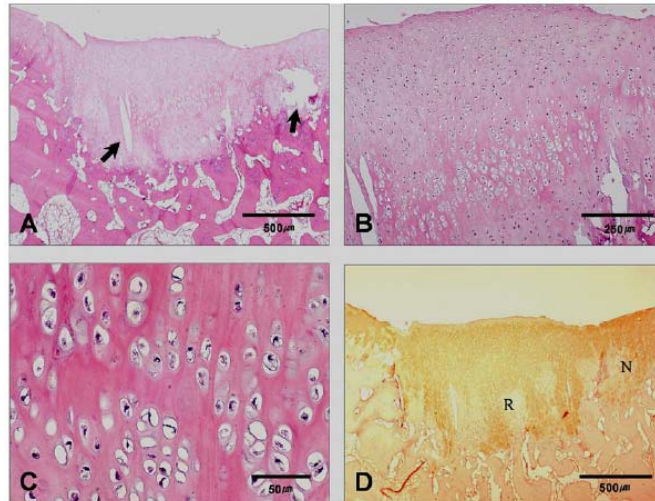


그림 7. TGF- $\beta_3$  전처리 골수 간질세포/지지체 복합체 가토 이식 후 12주째 조직 소견. 조직학 소견에서 유리 연골에서 보이는 연골 세포 관찰되고 있음. 저배율(A, B)에서 재생된 연골 일부에서 연골 결손이 관찰됨 (화살표). 고배율(C)에서 lacunae를 형성한 연골 세포가 관찰되며, 제 2형 교원질 조직 화학 염색(D)에서 대부분의 세포외기질에 양성 염색 소견을 나타냄. (배율: A: x40, B: x 100, C: x 400 D: x 40)

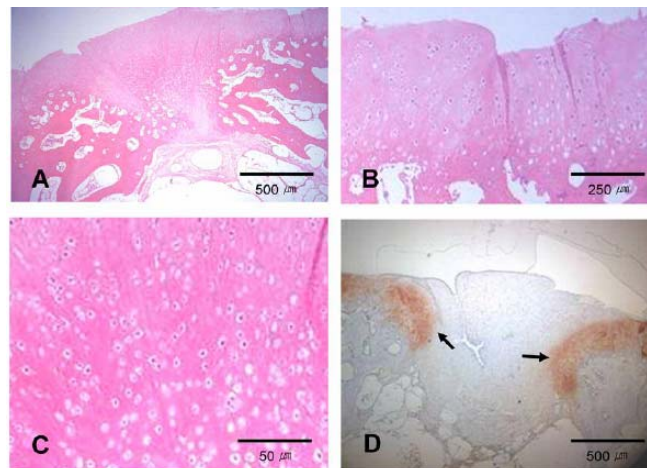


그림 8. TGF- $\beta_3$  비처리 골수 간질세포/지지체 복합체 가토 이식 후 12주째 조직 소견. 조직학 소견(A,B,C)에서 유리 연골 모양의 유리 연골에서 보이는 연골 세포 관찰되고 있으나, 고배율(C)에서 군집 (cluster)을 형성한 연골 세포가 관찰되지 않으며, 제 2형 교원질 조직 화학 염색(D)에서 부분적인 세포 외 기질에 양성 염색 소견을 나타냄(화살표). (배율: A: x40, B: x 100, C: x 400, D: x 40)

#### IV. 고찰

연골 재생에 관한 연구는 다각도로 진행되고 있다. 특히 자가 연골 세포 이식 법은 고비용 및 세포 공급원의 제한이라는 단점을 내포하고 있어도 연골 재생을 세포 치료적 개념에서 시작한 의학적 진보로 평가된다. 현재의 조직 공학은 병리학적으로 그 구조가 변형되었거나 기능이 소실된 조직에 기능 세포를 최대한 이식시킴으로써 조직을 재생을 극대화 시키는데 주력하고 있다. 특히, 조직 공학적으로 성공적인 조직 재생을 위해서는 적절한 기능 세포와 이들 세포의 항상성을 유지시킬 수 있는 지지체 및 세포의 분화 및 조직의 재생을 촉진시키는 생활성 (bioactive) 인자 등 세가지 중요한 요소가 필요하다<sup>30,31</sup>. 이러한 개념에 기초하여 골수 간질 세포 연구, 고분자 지지체 및 TGF- $\beta$ 와 같은 성장 인자에 대해 많은 실험실적 (*in vitro*) 연구가 진행 중이나, 이러한 방법에 의해 생체 내에서 재생된 연골의 특성에 대해서는 연구가 미비하다. 따라서, 본 연구에서는 생체 내 환경에서 다양한 조건으로 재생된 연골의 성질을 비교, 분석하여 골수 간질세포/지지체 복합체의 연골 재생 가능성을 평가하고자 하였다.

충분한 세포와 함께 사용한 지지체는 그 사용 유무에 따라 이식된 세포의 표현형 및 재생된 연골의 질 (quality)에 중요한 영향을 준다. 세포원으로써 배양된 연골 세포는 조직 내 이용 가능 세포 수의 부족, 충분한 세포 배양의 제한 및 공여부의 이환 등의 문제점을 내포하고 있다. 특히, 충분한 세포 수를 확보하기 위해 이차원 배양에서 계대 배양 횟수를 증가시키는 경우 연골세포의 표현형은 불완전해지고 주요 표현형 발현의 소실 속도가 빠르게 진행된다. 더욱이, 이러한 표현형의 유지와 충분한 세포수의 확보는 현재까지도 해결

되지 못하고 있는 연골 조직 공학의 문제점으로 알려져 있다<sup>32</sup>. 그러나, 골수 간질 세포의 경우 충분한 이식 세포 수를 얻기 위한 배양 기간 동안 그 표현형을 적절히 유지시킬 수가 있으며, 특정한 조건하에서는 다양한 기능적 세포로 분화 유도를 시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한, 다양한 부위에서 골수의 획득이 가능하므로 이식 세포의 확보 및 표현형의 유지라는 점에서 기존의 연골 세포 이식법과 비교하여 장점으로 해석될 수 있는 부분이다<sup>33</sup>.

골수 간질 세포만을 이식하여 연골을 재생하려는 이전의 여러 연구에서는 초자 연골 (hyaline cartilage)의 재생에 많은 실패를 거듭해 왔다<sup>34-36</sup>. 이들 연구의 연구 가설로 이식된 간질 세포들이 생체 내 환경에서 적절한 세포로 분화될 수 있는 조건을 제공받을 수 있을 것으로 기대하였으나, 여러 추가적인 연구에 의해 성인 생체 내에서는 연골 세포로 분화를 충분히 유도할 수 있는 환경이 더 이상 존재하지 않는 것으로 알려져 있어, 기대 이상의 연골 재생 결과를 보이지 못했다. 따라서, 성공적인 연골 재생을 위해서는 TGF- $\beta$ 와 같은 성장 인자나 이와 비슷한 생물학적 (bioactive) 자극들이 지속적으로 가해져 골수 간질세포를 연골 세포로의 분화를 유도할 수 있는 세포 내 신호전달 체계의 자극이 필요하다고 할 수 있으며, 이러한 점에서 골수 간질세포는 실험실적 환경에서 다양한 방법에 의해 연골 세포로 유도가 가능한 장점이 있어 조직공학 분야에 그 적용 영역이 넓어지고 있다. 또한, 다양한 세포로 분화할 수 있는 골수 간질세포만을 연골-골 결손 부위에 이식하는 경우 골수로부터의 다양한 자극으로 인해 골아세포나 지방 세포로 분화가 가능하며, 이는 최종적으로 연골 재생에 필요한 연골화 세포의 수를 상대적으로 감소시킬 수 있어 연골 재생능력에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 본 연구자는 이식 전에 골수 간질세포에 TGF- $\beta_3$ 로 전처리 함으로써

이러한 문제점들을 극복하고자 하였으며, 이러한 일련의 과정들은 골수 간질 세포를 전 연골화 세포 (pre-chondrogenic cell)나 연골 세포로 단속 (commit) 시킬 수 있을 것으로 가정하였으며, 최종적으로 이식부위에 연골화 세포의 수를 늘릴 수 있을 것으로 예상하였다. 본 연구의 결과에서와 같이 비록 생역학적 특성이나 조직학적 소견에서 TGF- $\beta_3$ 를 사용하여 재생된 연골이 단순히 골수 간질 세포/지지체만 이식한 군보다 현저한 차이를 보이지는 않았지만, 생역학적 특성은 정상 연골 조직과 비슷한 소견을 보였으며, 특히 조직 소견에서 제 2형 교원질의 염색이 비처리군과 비교하여 특징적으로 현저히 염색됨을 보아 기존에 시행한 방법 보다는 정상 조직에 가까운 초자 연골의 형성이라는 측면에서 TGF- $\beta_3$ 의 전처리 방법이 좀 더 진보된 연골 재생의 방법으로 사료된다. 또한, 현재 사용되고 있는 연골조직 소견의 점수화 내용에 연골기질 성분 염색 여부가 자세히 반영되지 않기 때문에, 본 연구에서와 같이 재생 연골의 조직학적 소견은 현저한 차이가 보이나 조직 평가 점수에 있어서는 두 군간의 차이를 명확히 보이지 못하는 결과가 초래된 것으로 판단되며, 이는 새로운 연골 조직 점수화 기준이 제시되어야 할 필요성이 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

현재 많은 연구에서 골수 간질 세포에 연골화 자극을 전달하는 다양한 방법들이 연구되고 있으며, 유전자 이식, 성장 인자 관절강내 주사, 전처리 법 등이 대표적인 방법들이다<sup>37-39</sup>. 본 연구에서는 실험실적 환경에서 TGF- $\beta_3$ 를 전처리 시키는 방법을 선택하였고, 이식 전에 연골화 세포로의 분화를 유도하였다. 반 정량적 역전사 중합 효소 연쇄 반응법을 이용하여 관절 연골 세포의 대표적인 표현형 유전자인 제 2형 교원질 및 aggrecan 유전자의 발현을 확인하였고, 배양액 내에 분비된 점액 다당류의 양적 증가를 측정함으로써

연골세포 분화 유도를 증명하였다. 이러한 성장인자의 사용은 안전성의 측면에서 아직 임상적인 적용까지는 여러 단계의 추가적인 검증이 더 필요하나, 본 연구에서는 세포 성장인자를 생체 내 투여 전에 생체 밖에서 전처리 함으로써, 이러한 안전성의 문제를 어느 정도 극복하고자 하였다.

본 연구에서 초자 연골을 생체 내에서 생성할 수 있었던 중요한 인자는 적절한 지지체의 선택이라고 사료된다. 지지체는 삼차원 공간에서 세포를 유지시킬 수 있으며, 이차원적 배양 환경보다는 표현형을 유지시키기에 용이한 것으로 알려져 있다<sup>40</sup>. 많은 양의 연골 세포가 이식되고 골막으로 봉합하여 연골 세포의 누출을 막을 수 있다고 하더라도, 지지체 없이 이식된 자가 연골 이식법에서는 중력 및 관절의 움직임, 불균등한 주입 등의 영향으로 인하여 이식된 연골세포가 불균등하게 분포될 수 있는 단점이 있다<sup>2</sup>. 그러나, 본 연구에서는 주사 현미경 사진 및 지지체내 염색에 의한 세포 분포를 검사한 결과, 지지체의 중심부와 주변부에 고른 세포의 분포를 확인할 수 있었고, 이러한 점이 연골 결손 부위에 고르게 연골 조직을 재생시키는데 중요한 역할을 한 것으로 판단된다. 외형적인 면에서도 본 연구에서 재생된 연골은 경우에 따라 색, 투명도 및 평탄함에서 주변 정상 연골과 거의 흡사한 소견을 보였고, 조직학적 소견에서도 만족할 만한 경계부 재생이 정상 연골 및 재생 연골에서 관찰되었다.

Alginate, hyaluronic acid, collagen 및 chitosan 등의 다양한 생체 고분자 물질이 현재 연골 재생 지지체의 성분으로 사용되고 있다. 그러나, 이들 고분자 물질의 생역학적 특성은 아직까지는 근골격계 조직 공학에 적용할 만큼 내구적이지 못한 것으로 알려져 있다<sup>41,42</sup>. 연골 조직 공학에서 말하는 이상적인 지지체는 지지체내 이식된 세

포들이 충분히 성장하고 분화하는 기간 동안 연골과 같은 생역학적 특성을 내포하여 초기 연골 재생단계에서 정상 연골과 같은 생역학적 물리적 특성을 보유하고 있어야 하며, 연골 조직이 재생되면서 이들 지지체는 흡수되어 적절한 기간 동안 지지체와 재생연골이 교차될 수 있는 환경을 제공하여야 한다<sup>43</sup>. 이러한 점에서 PLGA 지지체는 근골격계 조직공학에서 초기 생역학적 안정성의 제공이 가능한 고분자 생흡수성 지지체로 알려져 있다<sup>44</sup>. 그러나, 연골 재생을 위한 이상적인 지지체의 제조에 대해서는 아직도 많은 연구가 이루어지고 있으며, 본 연구에서는 연골 재생한 적합하다고 판단되는 성분과 물성을 가진 한가지 지지체를 선택하여 실험하였지만, 보다 정상 연골에 가까운 연골 기질을 생성하기 위해서는 다양한 지지체에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상적인 지지체의 조건으로 안정적인 고정, 지지체와 연골 결손간의 구조적 조화 (congruence), 그리고 적절한 생체 흡수성 (absorbability) 및 생체 적합성 (biocompatibility)가 있다. 본 연구에서 지지체의 안정성을 위해 압착 고정법 (press-fit) 및 생체 섬유 아교 (fibrin glue)를 사용하여 고정력을 높이려고 하였다. 일부 재생 연골의 경우 외형에서 우수한 생착을 보였지만, 조직학적 소견에서 연골하 골 (subchondral bone)과의 분리 (detachment), 연골 결손, 세포 군집성 (cell clustering) 및 연골 표면의 불규칙성 등이 관찰 되었다. 이는 지지체와 연골 결손간의 불일치 (incongruency), 부적절한 흡수성 및 주변 조직과의 부적합성 (incompatibility) 등에 기인한 것으로 판단된다.

생역학적 특성의 분석방법으로 본 연구에서는 함입 검사법을 사용하였다. 본 연구에서 시행한 비 제한적 (unconfined) 함입 검사에서는 연골의 깊이가 중요한 요소로 작용하며, 이는  $k$  상수 값을 결정



짓는 중요한 요소이다. 정확한 계산을 위해서는 함입 검사가 시행되는 연골에서 연골 하 골까지의 정확한 깊이가 고려되어 진행 되어야 하나, 본 연구에서는 함입 검사 전에 연골 검사를 직접적으로 측정할 수가 없었다. 예비 실험 결과에서 이식 후 12주째 재생 연골의 깊이는 0.7 mm 이었기 때문에 150  $\mu\text{m}$  즉, 재생 연골 두께의 약 20%에 해당되는 깊이로 함입 검사가 시행되었다. 또한 이러한 수치는 다른 연구와 비슷하게 측정되는 값이었다<sup>23, 24</sup>.

Hidaka 등은 지지체의 사용 없이 연골 분화 유전자 이식 (gene transfer)을 통해 연골을 재생하였으나, Young 계수는 정상연골의 1/10에서 1/2정도를 보인다고 하였다<sup>23</sup>. 이러한 결과는 연골재생의 중요한 인자인 지지체를 사용하지 않은 것에 기인된 것으로 사료된다. 그러나, 지지체 및 세포 복합체를 사용한 Schaefer 등의 연구와 본 연구에 의하면 재생된 연골의 Young 계수가 약 80%-100% 수준에서 나타나고 있어 지지체 사용의 중요성을 보여주고 있어, 본 연구에서 사용한 연골 재생의 방법이 이전의 방법보다 더 진전된 방법으로 그 가치가 있다고 판단된다<sup>24</sup>.

## V. 결 론

골수 간질세포/PLGA 지지체 복합체를 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 결과, 관절 연골 세포의 표현형인 제 2형 교원질과 aggrecan의 유전자 및 단백질 발현이 배양 시간이 지날수록 증가함을 측정 할 수 있어 연골화 분화가 가능함을 확인하였다. 특히, 이러한 현상은 배양 3주째 급속히 증가하는 양상을 보였다. 지지체 내에서 골수 간질세포의 생존률은 배양 3주째까지 초기에 접종된 세포 수를 유지하고 있었으며, 이는 주사 현미경 소견에서도 확인할 수 있었다. 위의 실험결과로 미루어 골수 간질세포의 연골 분화 활성 및 세포 생존 측면에서 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 후 3주째가 적절한 이식 시기임을 알 수 있었다.

3주간 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 골수 간질세포/지지체 복합체를 가토 슬관절 연골 결손 부위에 이식하여 이식 12주에 재생된 연골 조직을 외형적, 조직학적 및 생역학적 분석을 시행한 결과, 외형적으로 관절연골과 비슷한 양상을 나타내었으며, 이를 점수화 하였을 때 정상연골과 통계적인 차이를 보이지 않았다. 조직학적 소견에 있어서도 정상연골에서 보이는 세포 외형과 주변 세포의 기질의 소견은 정상 연골 소견과 흡사하여 점수화 하였을 때도 통계적으로 차이가 없었으며, 특히 제 2형 교원질에 대한 면역조직화학염색법에서도 단백질 새로 생성된 연골의 세포외 기질에서 발현이 뚜렷하여 본 연구에서 사용한 복합체로부터 유리 연골 형성이 가능했음을 알 수 있었다. 생역학적 특성 분석에서도 측정된 재생 연골의 Young 계수는 정상 연골과 비교하여 약 80% 정도의 물성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 기존에 알려진 방법인 TGF- $\beta_3$ 로 처리하지 않은 복합체를 사용하여 연골을 재생한

대조군과 비교하였을 때, 보다 정상 관절 연골과 비슷한 조직학적, 생역학적 특성을 보이는 유리 연골 생성을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었으므로, 본 연구에서 사용된 TGF- $\beta_3$ 로 전처리한 골수 간질세포/지지체 복합체 이식법은 관절 연골 재생을 위한 새로운 가능성을 제시하였다.

## VI. 참고 문헌

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defect in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95.
2. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg* 2002;84-B:571-8.
3. Katsube K, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Matsusaki M, Tobita M, Iwasa J. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel; Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120:121-7.
4. Peretti GM, Randolph MA, Zaporozhan V, Bonassar JL, Xu JW, Fellers JC, Yaremchuk MJ. A biomechanical analysis of an engineered cell-scaffold implant for cartilage repair. *Ann Plast Surg* 2001;46:533-7.
5. Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, Ju JW, Song WK, Yoo YJ, Huh TL, Chun JS. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal regulated protein kinase. *J Biol Chem* 2002;277:8412-20.
6. Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Hg, KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular

- chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994;212:97-104.
7. Panossian A, Ashiku S, Kirchohoff H, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Effect of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:392-402.
  8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
  9. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-35.
  10. Hegert C, Krammer J, Hargus G, Muller J, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2002;115:4617-28.
  11. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro : Activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000;92:193-205.
  12. Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HYP,

- Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB. Role of transforming growth factor- $\beta$  in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987;105:2861-76.
13. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix component. *Exp Cell Res* 2001;268:189-200.
  14. Jamshidi K, Hyon SH, Ikada Y. Thermal characterization of polylactides. *Polymer* 1988;29:2229-34.
  15. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-72.
  16. Graverand MH, Reno C, Hart DA. Influence of pregnancy on gene expression in rabbit articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:341-50.
  17. Park KS, Kim EJ, Han CW, Lee I, Lee HB, Khang G. Chondrogenic differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells in polymeric scaffolds. *Biomaterials Research* 2003;7:120-7.
  18. Wan Y, Chen W, Yang J, Bei J, Wang S. Biodegradable poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol) multiblock copolymer: synthesis and evaluation of cell affinity. *Biomaterials* 2003;24:2195-203.
  19. Templeton DM. The basis and applicability of the dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans. *Connect Tissue Res* 1988;17:23-32.

20. Ioannidis N, Kurz B, Hansen U. Influence of fulvic acid on the collagen secretion of bovine chondrocytes in vitro. *Cell Tissue Res* 1999;297:141-7.
21. Bruns J, Kersten P, Lierse W, Silbermann M. Autologous rib perichondrial grafts in experimentally induced osteochondral lesions in the sheep-knee joint: morphological results. *Virchows Arch A Patol Anat* 1992;421:1-8.
22. Moran ME, Kim HKW, Salter RB. Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1992;74-A:659-67.
23. Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expression bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2003;21:573-83.
24. Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A, Bergin I, Vunjak-Novakovic G, Free LE. Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum* 2002;46:2524-34.
25. Swadener JG, George EP, Pharr GM. The correlation of the indentation size effect measured with indenters of various shapes. *J Mech Phys Solids* 2002;50:681-94.
26. Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 1991;9:330-40.
27. Zhang M, Zheng YP, Mak AFT. Estimating the effective

- young's modulus of soft tissues from indentation tests–non linear finite element analysis of effects of friction and large deformation. Med Eng Phys 1997;19:512–7.
28. O'dricoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autologous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. J Bone Joint Surg 1988;70-A:595–606.
  29. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am J Clin Pathol 1981;75:816–21.
  30. Risbud M. Tissue engineering: implication in the treatment of organ and tissue defects. Biogerontology 2001;2:117–25.
  31. Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. Biomaterials 1996;17:237–42.
  32. Risbud MV, Sittinger M. Tissue engineering: Advances in *in vitro* cartilage generation. Trends Biotechol 2002;20:351–6.
  33. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:568–84.
  34. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg



- 1994;76-A:579-92.
35. Butnarui-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocyts derived from bone marrow. Clin Orthop 1996;330:234-43.
  36. Yoo JU, Mandel I, Angele P, Johnstone B. Chondrogenitor cells and gene therapy. Clin Orthop 2000;379S:S164-70.
  37. Nochi H, Sung JH, Lou J, Adkisson HD, Maloney WJ, Hruska KA. Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. J Bone Miner Res 2004;19:111-22.
  38. Giannoni P, Hunziker EB. Release kinetics of transforming growth factor-beta1 from fibrin clots. Biotechnol Bioeng 2003;83:121-3.
  39. Miura Y, Parvizi J, Fitzsimmons JS, O'dricoll SW. Brief exposure to high-dose transforming growth factor-beta 1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro. J Bone Joint Surg 2002;84-A:793-9.
  40. Roche S, Ronzière MC,Herbage D, Freyria AM. Native and DPPA cross-linked collagen sponges seeded with fetal bovine epiphyseal chondrocytes used for cartilage tissue engineering. Biomaterials 2001;22:9-18.
  41. Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocytes-alginate suspension. J Urol 1994;152:641-3.
  42. Risbud M, Ringe J, Bhonde R, Sittinger M. *In vitro* expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a

biocompatible hydrogel: implication for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant* 2001;10:755-63.

43. Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:1111-9.
44. Ma PX, Schloo B, Mooney D, Langer R. Development of biomechanical properties and morphogenesis of *in vitro* tissue engineered cartilage. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1587-95.

## Abstract

### Evaluation of articular cartilage regeneration using chondrogenic bone marrow stromal cells with a bioabsorbable scaffold *in vivo*

Seung Hwan Han

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Soo Bong Hahn)

Focal Cartilage defects frequently occur in secondary to trauma or to the idiopathic condition such as osteochondritis dissecans. Cartilage has a limited capacity to heal and the treatment of cartilage defects remains a challenge. Recently the newly developed treatment modality using various cell and scaffold has shown the great progress to regenerate the hyaline cartilage. In this aspect, we designed new cartilage regeneration method using bone marrow stromal cells (bMSCs) and poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffold composites pretreated of TGF- $\beta_3$  and the properties of regenerated cartilage by this method were investigated comparing with the non TGF- $\beta_3$  treated bMSCs/PLGA composites in rabbit model.

We prepared bMSCs/PLGA scaffold composites and pre-treated this with TGF- $\beta_3$  for 3 weeks prior to transplantation. Then, composites were transplanted to the osteochondral defect in rabbit knee. After 12 weeks post-transplantation, 5 of the 6 rabbits in which TGF-  $\beta_3$  pretreated bMSCs/PLGA scaffold composites were transplanted have shown cartilaginous regeneration. In gross morphology, regenerated cartilage showed smooth, flush, transparent features. In indentation test, this had ca. 80% of Young's modulus of normal articular cartilage. Histological examination demonstrated hyaline like cartilage structures with glycosaminoglycan and type II collagen expression. Histological scores were not statistically different to the normal articular cartilage. These results showed improvement of cartilage regeneration comparing with the non pretreated bMSCs/PLGA scaffold composite transplanted group.

Thus, we have successfully regenerated improved hyaline-like cartilage and determined the feasibility of treating damaged articular cartilage using bMSCs/PLGA scaffold composite pretreated of TGF- $\beta_3$ . Also, we suggest this treatment modality as another concept of cartilage tissue engineering.

-----  
Key Words: bone marrow stromal cell, poly lactic-co-glycolic acid, cartilage, tissue engineering