

조직공학용 사람 치조골세포의 인공증식

최병호 · 박진형 · 허진영* · 유재하

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 아산재단강릉병원 치과*

Abstract

ISOLATION OF HUMAN ALVEOLAR BONE-DERIVED CELLS AND IN VITRO AMPLIFICATION FOR TISSUE ENGINEERING

Byung-Ho Choi, Jin-Hyoung Park, Jin-Young Huh*, Jae-Ha Yoo

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Yonsei University

Department of Dentistry*, Asan Kangnung Hospital, Kangnung

Background: Autogenous alveolar bone cell transplantation may be suitable for tissue engineering for alveolar bone reconstruction. This study aimed to isolate human alveolar bone-derived cells (HABDCs) and to evaluate the ability of collagen gels to support HABDC proliferation and differentiation for human alveolar bone tissue engineering applications.

Method: Cultures of primary HABDCs were established from alveolar bone chips obtained from 10 persons undergoing tooth extraction. These cells were expanded in vitro until passage 3 and used for the in vitro characterization of HABDCs and the in vitro analysis of collagen gels for alveolar bone tissue engineering.

Results: Of the 10 attempts made to obtain HABDC cultures, eight were successful. HABDCs expressed the osteoblastic phenotype characterized by alkaline phosphatase activity, osteocalcin expression and the mineralization of the extracellular matrix in vitro. When seeded on collagen gels, HABDCs penetrated into the collagen gel matrices and proliferated inside the gels. Significantly, when HABDCs were embedded into the gels, collagen fibers and mineralization were produced within the gels.

Conclusion: This study demonstrates the feasibility of using cultured HABDCs and collagen gels for human alveolar bone tissue engineering applications.

Key words : Alveolar bone, Tissue engineering, Bone regeneration

I. 서 론

골재건을 위한 방법으로 조직공학이 지난 수년간 큰 주목을 받아 왔는데, 조직공학을 이용한 골형성방법은 골세포를 삼차원적인 지지체(scaffold)에 배양하여 이것을 골결손부위에 이식하여 골조직을 생성시키는 방법이다¹⁾. 지금까지 조직공학을 이용한 골형성에 대한 연구는 소의 골막세포 또는 쥐의 골세포를 이용하여 무흉선 누드 마우스의 피하조직내에서 골형성을 이룬 것이 보고되었다²⁻⁴⁾. 그러나 소나 쥐에서 얻어진 골세포는 사람의 골세포와 대체될 수 없으며, 사람의 골세포라 하더라도 부위에 따라 표현형(phenotype)에 차이가 있기 때문에⁵⁾ 사람 치조골 재건을 위해서는 자가 치조골세포가 가장 적절한 세포가 될 수 있다.

지지체로는 PGA(polyglycolic acid)나 PLA(polylactic acid) 같은 생분해성 합성중합체가 이용되어 왔다. 그러나 이들 중합체들은 내부 깊숙이 세포들을 파종하는데 한계가 있어 삼차원적인 지지체 내에 균일하게 세포를 다량 파종시킬 수 없는 단점이 있다⁶⁾. 최근에 젤성 지지체를 이용하여 지지체내에 다량의 세포들을 파종시킬 수 있음이 보고되었다⁷⁻¹⁰⁾. 특히 콜라겐 젤은 세포독성이 없고, 생체적합성이 우수하고, 생분해성이고, 형태형성이 쉬워 지지체로 자주 사용되었다. 그리하여 본 연구에서는 콜라겐 젤과 사람 치조골세포를 이용하여 조직공학으로 치조골을 형성하기 위한 전단계로 생체외에서 콜라겐 젤이 사람 치조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 치조골의 채취 및 치조골세포의 배양

실험에 사용한 치조골편은 10명의 환자에서 매복치 발치시 채취하여 사용하였다. 채취한 치조골편은 100u/ml 페니실린과

최병호

220-956, 강원도 원주시 일산동 162번지
연세대학교 원주의과대학 구강악안면외과

Byung-Ho Choi

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Wonju Christian Hospital, Yonsei Univ.

162 Ilsan-dong, Wonju, Kangwon-do, 220-956, Korea

Tel: 82-33-741-1430 Fax: 82-33-748-2025

E-mail:choibh@wonju.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-1-20500-011-3)지원으로 수행되었음.

100g/ml 스트렙토마이신 (Gibco)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 넣어 보관하거나, 채취 즉시 세포배양을 진행시켰다. 치조골세포의 배양방법은 문헌에 기술된 방법을¹¹⁾ 따랐다. 치조골편은 1mm³ 크기로 분쇄한 후 혈액과 지방을 제거하기 위해 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척하였다. 세척후 골조각들은 25cm² 배양용기 바닥에 위치시키고 성장용 배지를 1ml 넣었다. 성장용 배지는 DMEM을 기본배지로 하여 여기에 20% 우태혈청(FCS, Gibco), 10ml/L nonessential amino acid, 10ml/L sodium pyruvate, 10ml/L vitamin, 10ml/L antibiotic (Gibco)를 첨가한 것을 사용하였다. 14일 후부터 배지를 2~3일 간격으로 교환 공급하였다. 골편에서 증식되어 나온 세포들이 바닥을 덮으면 이를 트립신 처리하여 계대배양을 하였으며, 3차에 걸친 계대배양후 세포들을 생체의 실험에 사용하였다.

2. 치조골세포의 생체의 특성분석

치조골세포의 특성분석을 위하여 1×10⁶cells/ml 세포수를 24 wells에 접종한 후 성장용 배지로 배양하여 세포들이 바닥을 덮으면 분화용 배지로 배양하였다. 분화용 배지는 성장용 배지에 10mM -glycerophosphate(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 50g/ml ascorbic acid(Sigma), 10nM dexamethasone(Sigma)를 첨가하였다. 1주간 배양후 배지에서 osteocalcin량을 측정하였으며 측정은 상품으로 나온 immunoassay kit(Novocalcin, Metra Biosystems, Inc)을 사용하였다. 2주간 배양후 배양된 세포에서 alkaline phosphatase activity를 86-C kit(Sigma)을 사용하여 측정하였으며, 또한 무기질 형성을 Von Kossa 염색방법을¹²⁾ 사용하여 평가하였다. 4주간 배양후 유기질과 무기질형성을 전자현미경(transmission electron microscopy)으로 관찰하였다.

3. 콜라겐 겔이 사람 치조골세포에 미치는 영향

제 I형 콜라겐 (Nitta Co, Japan) 용액을 사용하여 다음과 같은 과정으로 콜라겐 겔을 형성하였다: 콜라겐 용액을 0.2N NaOH와 혼합하여 pH7.4로 맞추는 후 37°C로 유지되는 배양용기에 하루동안 두어 겔로 굳어지게 하였다. 사람 치조골세포가 콜라겐 겔 내부로 증식할 수 있는지 관찰하기 위하여 콜라겐 겔 표면에 1×10⁶cells/ml 치조골세포를 파종한 후 1주, 2주, 3주, 4주후 세포의 모습을 전자현미경으로 관찰하였다. 또한 콜라겐 겔내부에서 치조골세포의 분화를 관찰하기 위하여 1×10⁶cells/ml 치조골세포를 콜라겐 용액과 혼합한 후 37°C 배양용기에 하루동안 두어 굳어지게 하여 겔속에 세포를 파종한 다음 분화용 배지로 4주동안 배양하고 겔내에 형성된 유기질과 무기질을 전자현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. 치조골세포의 배양

치조골세포를 채취한 10명 환자의 치조골편 중 8명에서 배양후 약 2주후 세포의 성장이 관찰되었다. 그러나 2명에서는 5주후까지 세포의 성장이 관찰되지 않았다. 채취 즉시 세포배양을 진행시킨 경우는 5명중 5명 모두에서 세포의 성장이 관찰되었으나, 하루동안 보관후 세포배양을 진행시킨 경우는 5명중 3명에서 세포성장이 관찰되었다. 세포의 성장과 증식은 치조골편의 가장자리에서부터 관찰되었으며, 세포는 전형적인 섬유아세포 형태를 가졌고, 약 7주후에는 증식된 세포들이 배양용기 바닥을 덮었으며 이때 결절 같은 구조가 골편주변에서 관찰되었다.

2. 치조골세포의 생체의 특성

치조골편에서 증식된 세포들에서 6.5ng/ml에서 10.2ng/ml까지의 범위의 osteocalcin량이 분비되었으며, alkaline phosphatase activity 검사에서 배양용기바닥 전체중 39.9%에서 61.2%에 해당하는 부위가 양성반응을 보였다. 또한 무기질 형성을 평가한 Von Kossa 염색에서 국소적으로 무기질이 침착된 부위를 보이거나 또는 광범위하게 무기질이 침착된 양상으로 다양한 정도의 석회화를 보였다(Fig. 1). 전자현미경조건에서 콜라겐 섬유가 이에 무기질 침착이 관찰되었으며 무기질에 바늘모양의 결정체가 침착되어 있었다 (Fig. 2).

3. 치조골세포에 대한 콜라겐 겔의 영향

Fig. 3은 치조골세포를 콜라겐 겔 표면에 파종하여 배양한 후 촬영한 전자현미경사진으로 겔기질내로 세포들이 침투하여 증식한 모습을 보여준다. 겔내로 침투해 들어간 깊이는 시간이 경

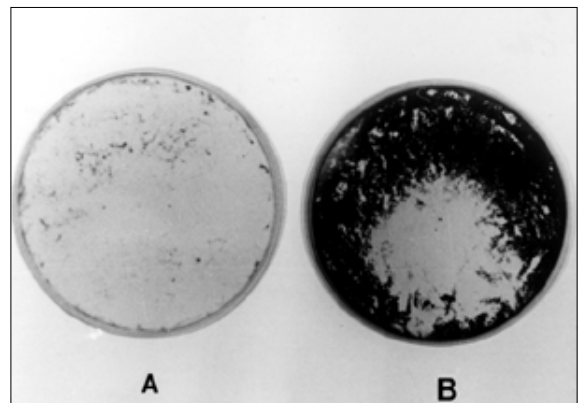


Fig. 1. Von Kossa 염색결과 모습. (A) 국소적으로 무기질이 침착된 육안적 모습. (B) 광범위하게 무기질이 침착된 육안적 모습.

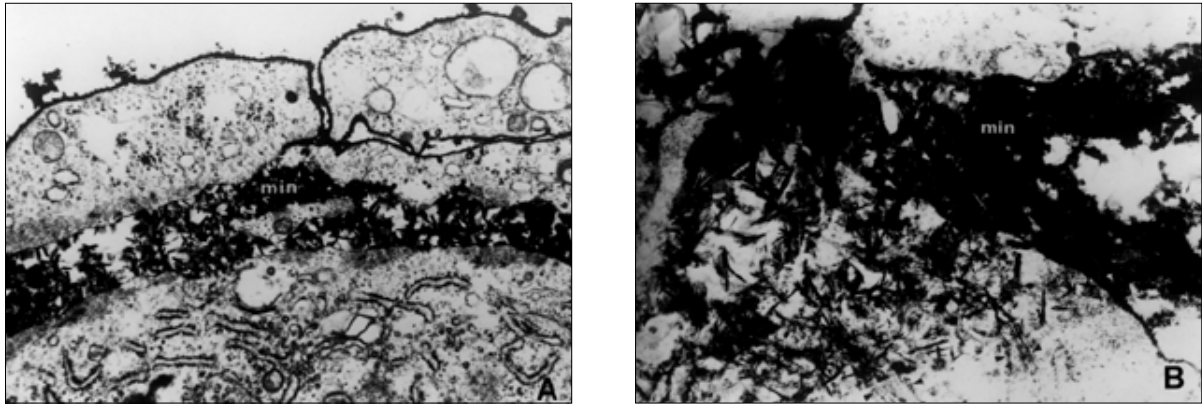


Fig. 2. 배양용기에 배양된 치조골세포의 전자현미경 모습. (A) 저배율 모습 (x12,000) (B) 고배율 모습으로 바늘모양의 결정체가 침착된 무기질과 콜라겐 섬유를 보여주는 사진 (x30,000). (min = mineralization; arrow heads: collagen fibers).

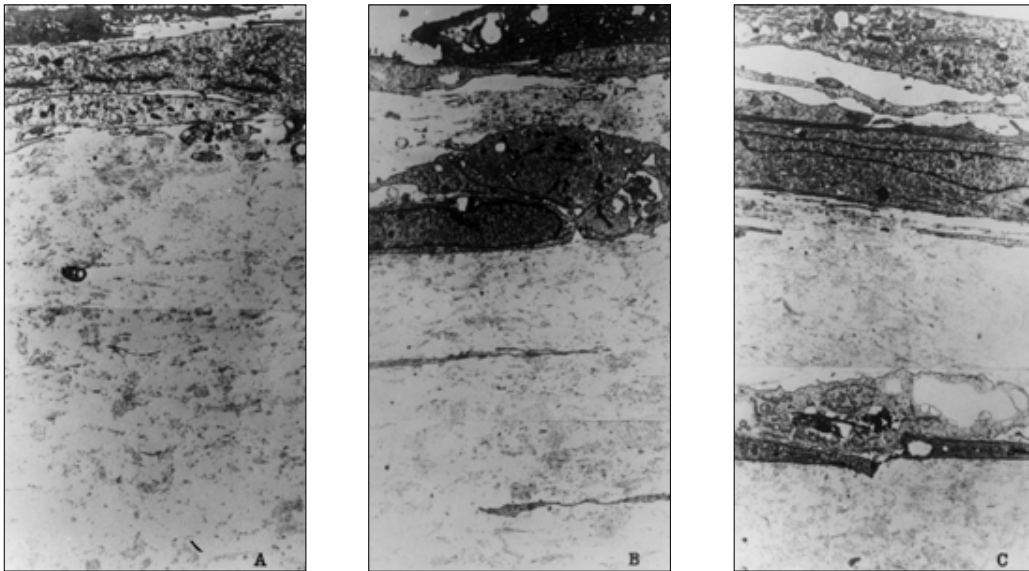


Fig. 3. 콜라겐 겔 표면에 치조골세포를 파종한 후 시간경과에 따른 세포증식을 보여주는 사진. (A) 2주후, (B) 3주후, (C) 4주후.

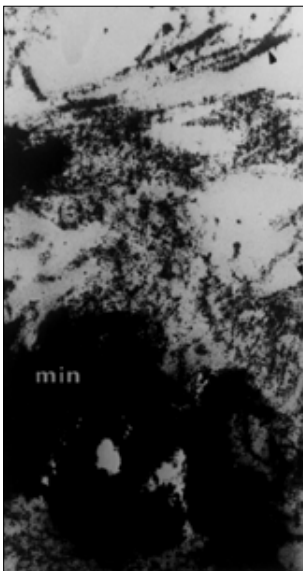


Fig. 4. 콜라겐 겔 속에 치조골세포를 파종한 후 4주후 모습 (x20,000). (min = mineralization; arrow heads: collagen fibers).

과하면서 증가하였다. 침투해 들어간 깊이 (겔표면에서 세포가 발견된 부위까지 거리)는 1주후에는 238 μ m, 2주후에는 410 μ m, 3주후에는 723 μ m, 4주후에는 1051 μ m였다. Fig. 4는 치조골세포를 콜라겐 겔 속에 파종하여 배양한 후 촬영한 전자현미경사진으로 세포외기질이 겔표면 가까이 뿐 아니라 심부에서도 발견되었다. 세포주변에 무형의 무기질과 함께 콜라겐 섬유들이 특정한 방향 없이 배열되어 있었다.

IV. 고 찰

본 실험에서 5~61세된 환자의 치조골편을 이용하여 간단한 과정으로 치조골편에서 치조골세포를 배양할 수 있었으며, 특히 61세된 환자의 치조골편에서 치조골세포를 배양할 수 있었다는 것은 재건분야에서 중요하다. 왜냐하면 재건이 요하는 대부분의 환자들이 40세이상의 연령층이기 때문이다. 나이가 많을수록 세포 증식속도가 느려 실험에 필요한 충분한 량의 세포를 얻기위

해 시행한 3차에 걸친 계대배양까지 시간이 더 많이 소요되었다. 치조골편에서 세포를 얻을 수 있는 확률은 10명중 8명(80%)으로 상당히 높아 구강내 치조골재건을 위한 조직공학용으로 세포를 얻는 근원으로 치조골을 사용할 수 있겠다.

본 연구에서 사람 치조골세포가 alkaline phosphatase activity를 나타내고, osteocalcin을 생산하고, Von Kossa 검사에서 양성으로 염색되고, 콜라겐 섬유와 무기질을 형성함이 관찰되었다. 이전 연구에서는¹³⁾ alkaline phosphatase가 분비되고, 콜라겐이 형성되고, osteocalcin이 생성되면 골세포의 표현형(phenotype)을 가진다고 판단하였는데, 이들 기준에 근거하면 사람 치조골편에서 얻은 세포들도 이들 골세포의 기준을 충족한다고 볼 수 있다. 골세포를 형태에 근거하여 구별할 수 없음은 이미 오래전부터 알려진 사실이며¹⁴⁾, 본 연구에서도 치조골세포의 형태는 전형적인 섬유아세포의 형태를 가지고 있어 섬유아세포와 형태적으로 구별이 되지 않았다.

조직공학을 이용한 골형성을 위한 전제조건은 지지체내에서 골세포가 골성분을 생성할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 생체 외에서 사람 치조골세포를 제 I형 콜라겐 겔내에 파종하여 횡무늬가 있는 콜라겐 섬유와 무기질이 생성되었다. 콜라겐 겔 없이 배양용기에서 배양시 관찰되는 유기질 기질과 비교할 때 콜라겐 겔 내에서 관찰되는 유기질은 양은 더 많고 콜라겐 섬유가 더 굵은 것이 특징적이었다. 세포없이 콜라겐 겔 자체만 배양할 때는 횡무늬가 있는 콜라겐 섬유가 관찰되지 않아 콜라겐 겔 내부에서 관찰된 횡무늬를 가진 콜라겐 섬유는 사람 치조골세포에 의하여 생성된 것임을 알 수 있었다.

적절한 세포수를 3차원적인 지지체에 파종하는 기술은 조직공학을 이용한 골형성에서 매우 중요한데, 이는 지지체가 세포부착, 증식, 분화 및 조직형성을 위한 주형(template)으로 작용하기 때문이다. Mara 등은¹⁴⁾ 합성 고분자 지지체내로 세포가 100~500 μ m까지 침투해 들어감을 보고하였고, 또 다른 연구자들에 의하면 합성 고분자 지지체내로 100~300 μ m까지 세포침투가 있었다고 보고하였다^{15,16)}. 본 연구에서 4주배양동안 겔 표면에 있던 세포들이 1051 μ m 깊이까지 침투해 들어가서 콜라겐 겔은 세포침투에 있어서 우수한 지지체임을 알 수 있었다. 그러므로 콜라겐 겔을 지지체로 이용할 경우 보다 많은 수의 세포들을 파종할 수 있다고 생각한다. 콜라겐 겔은 생체 적합성이 우수하고 형태형성이 용이하여 세포반응 지지체로 사용하기 위한 연구가 있어 왔으며, 이들 연구에 의하면 콜라겐 겔은 위해작용이 없을 뿐 아니라 세포가 새로운 기질을 형성할 수 있는 비계 (framework)로 역할도 수행함이 증명되었다^{17,18)}. 그러나 콜라겐 겔은 수축이 크다는 단점이 있으므로 이 단점을 극복하기 위하여 콜라겐 겔을 고형의 중합체와 함께 사용하는 것도 바람직하리라 생각되며, 앞으로 이들 복합 지지체가 생체내에서 치조골을 형성하는지에 관한 연구가 필요하겠다.

결론적으로 사람 치조골세포를 성공적으로 배양할 수 있었으며 이들 세포들은 골세포의 특성을 나타내었다. 또한 콜라겐 겔은 세포성장, 유기질 형성, 그리고 무기질 생성에 좋은 환경을 치

조골세포에 제공하였다. 앞으로 치조골세포와 콜라겐 겔을 생체내에 이식하여 골형성을 유도할 수 있는 연구가 필요하겠다.

참고문헌

- Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 101:567-574, 1998.
- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mat Res* 36:17-28, 1997.
- Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA. Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25:223-228, 1996.
- Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res* 32:481-492, 1996.
- Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2511-2517, 1995.
- Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac surg* 23:49-53, 1994.
- Meinhart J, Fussenegger M, Hoebbling W. Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. *Ann Plast Surg* 42:673-678, 1999.
- Perka C, Schultz O, Lindenhayn K, et al. Joint cartilage repair with transplantation of embryonic chondrocytes embedded in collagen-fibrin matrices. *Clin Exp Rheumatol* 18:13-22, 2000.
- Silverman R, Passaretti D, Huang W, et al. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 103:1809-1818, 1999.
- Ting V, Sims CD, Brecht LE, et al. In vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes. *Ann Plast Surg* 40:413-421, 1998.
- Nefussi JR, Casamajor P, Serfaty R, Bolle M, Hugly C, Forest N. Activated adult human alveolar bone cells: a new model of matrix mineralization. *Eur J Oral Sci* 106 (suppl 1):424-428, 1998.
- Thompson SW, Hunt RD. Histochemical procedure: von Kossa technique for calcium. In: Thomas C (ed.) *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. Springfield, IL, U.S.A., 1996, P.581-584.
- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype on cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 143:213-221, 1990.
- Mara KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. In vitro analysis of biodegradable polymer bend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mat Res* 47:324-335, 1999.
- DeLeu J, Trueta J. Vascularization of bone grafts in the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 47B:319-329, 1965.
- Heslop BF, Zeiss IM, Nisbet NW. Studies on transference of bone. I. Comparison of autologous and homologous implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis, and host reaction. *Br J Exp Pathol* 41:269-287, 1960.
- Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop* 186:231-239, 1984.
- Toung JS, Ogle RC, Morgan RF, Lindsey WH. Repair of a rodent nasal critical-size osseous defect with osteoblast augmented collagen gel. *Laryngoscope* 109:1580-1584, 1999.