

세포부착을 위한 스캐폴드 개발 및 줄기세포를 적용한 스캐폴드의 조직재생능력 평가

유 훈*, 송경호*, 임현창, 이종석, 윤정호², 서영권³, 정의원¹, 이용근⁴, 오남식², 최성호¹

¹연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소, ²인하대학교 의과대학 치과학교실, ³동국대학교 생명화학공학과, ⁴(주)에스바이오골드

Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold

Hoon You^{1*}, Kyung-Ho Song^{1*}, Hyun-Chang Lim¹, Jung-Seok Lee¹, Jeong-Ho Yun², Young-Kwon Seo³, Ui-Won Jung¹, Yong-Keun Lee⁴, Nam-Sik Oh², Seong-Ho Choi¹

¹Research Institute for Periodontal Regeneration, Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

²Department of Dentistry, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

³Department of Chemical & Biochemical Engineering, Dongguk University, Seoul, Korea

⁴Yesbiogold Co., Ltd., Seoul, Korea

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to review the outcomes of a series of studies on tissue regeneration conducted in multiple institutions including the Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University.

Materials and Methods: Studies were performed divided into the following three subjects; 1) Development of three-dimensional nano-hydroxyapatite (n-HA) scaffold for facilitating drug release and cell adhesion. 2) Synergistic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSC) application simultaneously with platelet-rich plasma (PRP) on HA scaffolds. 3) The efficacy of silk scaffolds coated with n-HA. Also, all results were analyzed by subjects.

Results: Hollow hydroxyapatite spherical granules were found to be a useful tool for the drug release and avidin-biotin binding system for cell attachment. Also, BMMSC simultaneously with PRP applied in an animal bone defect model was seen to be more synergistic than in the control group. But, the efficacy of periodontal ligament cells and dental pulp cells with silk scaffolds could not be confirmed in the initial phase of bone healing.

Conclusion: The ideal combination of three elements of tissue engineering—scaffolds, cells and signaling molecules could be substantiated due to further investigations with the potentials and limitations of the suggested list of studies.

Key Words: stem cells, tissue engineering, tissue scaffolds

Reprint requests: Seong-Ho Choi
Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University,
50, Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: 82-2-2228-3189, Fax: 82-2-392-0398
E-mail: shchoi726@yuhs.ac
Received for publication: May 22, 2014
Accepted for publication: June 15, 2014

교신저자: 최성호
(120-752) 서울시 서대문구 연세로 50
연세대학교 치과대학 치주과학교실
Tel: 82-2-2228-3189, Fax: 82-2-392-0398
E-mail: shchoi726@yuhs.ac
원고접수일: 2014년 5월 22일
게재확정일: 2014년 6월 15일

*These authors contributed equally to this study.

This study was supported by a grant of the Korea Health technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A101578).

Copyright © 2014. The Korean Academy of Oral & Maxillofacial Implantology

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I 서론

현 현재까지 가장 이상적으로 여겨지는 자가골 이식은 많은 장점이 있음에도 불구하고, 이차적인 수술 부위를 필요로 하며 원하는 만큼의 충분한 채득이 어려운 경우가 많다. 또한, 동종골 혹은 이종골 이식 시에는 교차감염의 위험성²이 존재하는 등의 문제가 따르기 때문에 합성골에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다.

하지만 합성골은 골유도능과 골형성능이 없으며 골전도 효과만을 지니고 있기 때문에³ 최근의 조직공학과 관련한 연구는 합성골에 줄기세포를 함께 적용하는 방향으로 많은 노력을 기울이고 있다^{4,5}. 줄기세포는 자기-재생능력을 가지는 progenitor cell로서 여러 가지 형태의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문에, bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC), dental pulp stem cell (DPSC), periodontal ligament stem cell (PDLSC) 등을 기존 합성골과 함께 적용하여 골유도능을 얻고자 하는 연구가 다방면으로 진행되고 있다⁶⁻¹¹.

이와 더불어 platelet-rich plasma (PRP)는 platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor, epithelial growth factor 등과 같이 성장인자 (growth factor)로서 합성골 이식재에 골유도능을 부여한다¹². 게다가 PRP는 mesenchymal stem cell (MSC)과 함께 적용할 경우 MSC의 분화를 촉진시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다^{13,14}.

이러한 줄기세포 및 성장인자의 효과를 극대화하기 위해서는 스캐폴드(scaffold) 역할을 하는 합성골의 성질 또한 중요하다. 스캐폴드는 우선 생체 내 조건과 유사한 3차원적 구조를 가져야 하며, 세포의 부착 및 기능 수행을 극대화시켜야 한다. 또한, 충분한 물리적 강도가 요구된

다¹⁵. 이런 이유로 체내 경조직과 3차원적으로 가장 유사한 구조를 지니는 hydroxyapatite (HA)를 주된 합성 스캐폴드의 재료로 사용해 왔다¹⁶.

줄기세포 및 성장인자를 스캐폴드에 적용하였을 때의 효과를 극대화하기 위하여 본 연구팀에서는 그간 다음의 세 가지 주제로 나누어 연구를 진행하였다. 1) 약물방출과 세포부착을 용이하게 하기 위한 3차원 nano-hydroxyapatite (n-HA) 스캐폴드의 개발, 2) BMMSC와 PRP를 HA 스캐폴드에 동시에 적용하였을 때 시너지 효과, 3) n-HA를 코팅한 실크 스캐폴드의 효능이다. 따라서 이번 연구에서는 ‘약물방출과 세포부착을 위한 스캐폴드 개발 및 줄기세포를 적용한 스캐폴드의 조직재생능 평가’에 대해 연세대학교 치과대학 치주과학교실을 비롯한 여러 기관에서 시행한 일련의 연구들(Table 1)¹⁷⁻²¹을 기반으로 그 결과 및 효과를 보고하고자 한다.

II 연구재료 및 방법

1. 약물방출과 세포부착을 용이하게 하기 위한 3차원 n-HA 스캐폴드의 개발

1) Hollow hydroxyapatite spherical granules

최근에 HA와 같은 세라믹과 생체분자 간 결합을 시도하여 골형성능과 골유도능을 탑재하려는 시도들이 있었다²². 하지만 이러한 연구들에서 세라믹과 생체분자 간의 결합은 매우 어렵다는 사실이 밝혀지면서, 약물방출에 있어 분자 간의 결합을 이용한 방법보다 3차원적 구조를 이용한 diffusion and water penetration-controlled systems에 더 초점이 맞춰지게 되었다²³. 이를 위해 alginate beads의 승화를 통하여, 겔을 둘러싸는 HA층 내부에 radial pore channels을 생성하는 방법이 소개되었다(Fig. 1)²⁴. 본 연구에서는 이의 가능성에 대한 고찰

Table 1. Study designs of the included studies

Author	Purpose	Study group	Study model	Evaluation method	Healing period (wk)
Jang et al. ¹⁸ (2011)	To explore cell attachment of PDL on n-HA scaffold	Static Agitation ABBS	–	SEM WST-1	–
Hong et al. ¹⁷ (2012)	To discuss hollow HA spherical granules as bone grafts and drug carriers	H1 (0.50 HA ratio) H2 (0.33 HA ratio) H3 (0.25 HA ratio)	–	SEM XRD FTIR	–
Yun et al. ¹⁹ (2011)	To investigate the influence of BMMSC and PRP on bone regeneration	HS HP HSP	Rabbit calvaria	Histological and histomorphometric analysis Statistical analysis	2/4/8
Yun et al. ²⁰ (2012)	To determine the bone formation ability of BMMSC and PRP when applied separately or together to the intrabony defect	HA HS HP HSP	Canine three-wall intrabony defects	Histological and histomorphometric analysis Statistical analysis	6/12
Park et al. (2014)*	To characterize the efficacy of n-HA coated silk scaffold for bone tissue engineering and to determine the osteogenic effect of PDLC and DPC at an early stage of healing in rabbits.	Control SS PDLSS DPSS	Rabbit calvaria	SEM Histological analysis	2/4
Yang et al. ²¹ (2013)	To investigate the effect of silk scaffolds on one-wall periodontal intrabony defects	Control SS PDLSS DPSS	Canine three-wall intrabony defects	SEM Histological analysis	8

PDL: periodontal ligament, n-HA: nano-hydroxyapatite, ABBS: Avidin-biotin binding system, SEM: scanning electron microscopy, WST-1: water soluble tetrazolium salt, HA: hydroxyapatite, XRD: X-Ray diffraction, FTIR: transform infrared spectroscopy, BMMSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cell, PRP: platelet-rich plasma, HS: HA loaded with BMMSC alone group, HP: HA loaded with PRP alone group, HSP: HA loaded with BMMSC and PRP group, PDLC: periodontal ligament cells, DPC: dental pulp cells, SS: silk scaffold, PDLSS: periodontal ligament cells seeded on SS, DPSS: pulp cells seeded on SS.

*Unpublished article.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

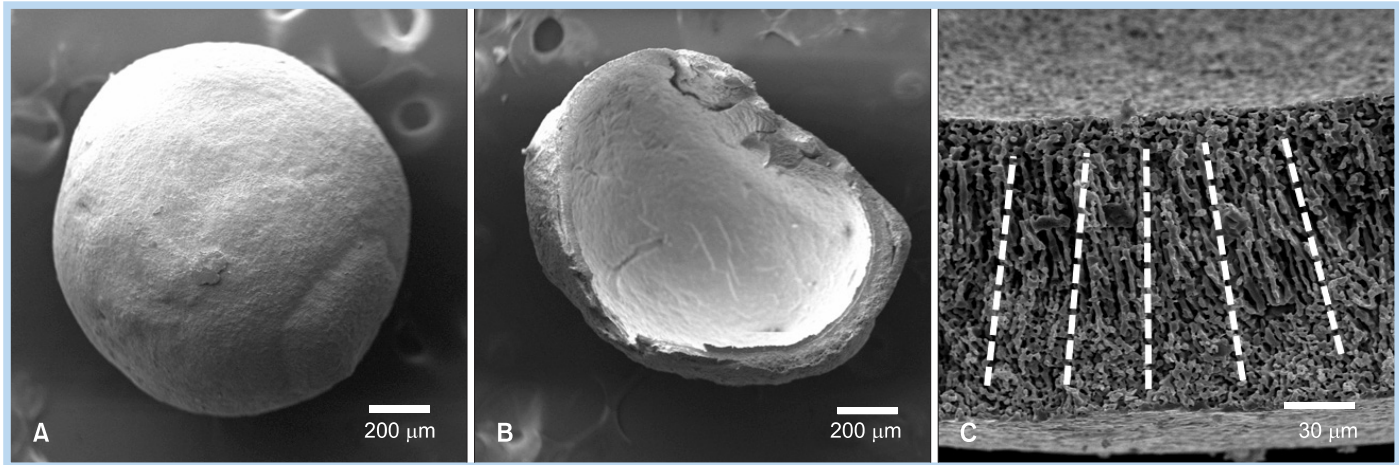


Fig. 1. Scanning electron microscopy images of hollow hydroxyapatite spherical granules before immersing in simulated body fluid. (A) Spherical shape was obtained by drop slurry into liquid nitrogen, (B) Hollow space of granule was the site of alginate bead used as a template, (C) Image shows that the radial-shaped pore channels were obtained. Reproduced from the article of Hong et al. (Micro Nano Lett, 2012; 7: 634–636)¹⁷ with permission of The Institution of Engineering and Technology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

을 하고자 하였다.

① Preparation of hollow hydroxyapatite spherical granules

2.0 wt% of alginic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액과 1.0 wt% of calcium chloride (Sigma-Aldrich)를 혼합하여 alginate beads를 제조하였다. 이를 증류수로 세정한 후 HA (OssGen, Gyeongsan, Korea) slurry를 이용해 alginate beads에 HA를 코팅하였다. HA slurry의 농도에 따라 다음과 같은 세 가지 그룹으로 분류하였다. ① H1=0.50, ② H2=0.33, ③ H3=0.25 (powder/liquid ratio, g/ml). 이를 동결건조과정을 통해 beads 안의 수분과 유기물을 승화시키며, radial pore channels를 형성하였다.

② Evaluation method

HA slurry 농도에 따른 세 가지 그룹을 각각 scanning electron microscopy (SEM, S-3000H; Hitachi, Tokyo, Japan), X-Ray diffraction (XRD, Ultima IV; Rigaku, Tokyo, Japan), fourier transform infrared spectroscopy

(FTIR, Avatar 360; Thermo Nicolet, Madison, WI, USA)의 장비를 이용하여 granule의 특성을 분석하였다. SEM을 통하여 HA spherical granule의 구조를 관찰하였으며, XRD pattern과 FTIR spectra를 이용하여 granule의 특성을 관찰하기로 하였다.

2) Avidin-biotin binding system

3차원 스캐폴드의 제작이 이루어지면서, 스캐폴드 내로 세포들을 효과적으로 seeding시키는 것은 매우 중요한 과제로 남게 되었다. 이를 위해 dynamic perfusion seeding, centrifugal seeding, agitation seeding 등의 방법이 개발되었다. 그 중 새로운 방법으로 서로 결합력이 강한 한 쌍의 분자를 세포막과 스캐폴드 표면에 각각 부착하는 방식이 소개되었다²⁵. 이는 분자 간의 결합을 이용해 세포의 효과적인 seeding을 유도하는 것으로, avidin과 biotin이 좋은 예이다.

이의 결합력을 평가하기 위하여 n-HA 스캐폴드 내에 periodontal ligament fibroblast (PDLF)를 static, agita-

tion, Avidin-biotin binding system (ABBS) 방법을 이용하여 seeding시킨 후, SEM과 water soluble tetrazolium salt (WST-1)를 통하여 스캐폴드의 표면 및 세포부착 정도를 비교 관찰하였다.

① Cell harvesting: PDLF

교정치료를 목적으로 발치를 시행한 환자의 동의를 얻어 PDLF를 채취하였다. 연구는 연세대학교 연구윤리심의위원회의 승인을 받아 진행하였다(No. 2-2008-0014). 100 U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함한 α -minimum essential medium (α -MEM; Gibco)으로 치아를 세척한 후, 치근의 중간 1/3 부위의 PDLF를 채득하였다.

② Biotinylation of PDLF

위의 과정을 통해 채득한 세포를 배양한 후, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)을 이용하여 제작자의 지시에 따라 biotinylation을 시행하였다. 세포 배양액에 담긴 PDL 세포를 50 ml tube에 담아 1,500 rpm에서 5분간 원심분리를 시행한 후, biotinylation 재제를 실온에서 30분간 적용하였다.

③ Cell culture method

각 static, agitation, ABBS seeding 방법마다 8개의 n-HA 스캐폴드를 준비하였다. Seeding을 시행하기 전에 ABBS군의 스캐폴드는 avidin (Sigma-Aldrich) 용액을 2시간 동안 적용한 후 SEM을 이용하여 표면을 관찰하였다. 그 후, static군과 ABBS군은 실온에서 6시간 동안 PDLF를 배양하였으며, agitation군은 100 rpm에서 6시간 동안 orbital shaker를 이용하여 agitation을 시행하였다. 과정이 종료된 후, phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 스캐폴드를 세정하여 스캐폴드에 부착되지 않은 세포를 제거한 뒤, WST-1을 이용하여 세포부착 정도를 측정하였다. 또한, SEM을 이용하여 스캐폴드에 부착된 PDLF를 관찰하였다.

2. BMMSC와 PRP를 HA 스캐폴드에 동시 적용하였을 때 시너지 효과

줄기세포는 특정 조건에서 복수의 세포 계통으로 분화가 가능한 클론원성(clonogenic)과 자기-재생 능력을 보유하는 세포로서 정의된다²⁶. MSC는 multipotent progenitor cell의 범주 안에 포함되며, 배양과 골형성 세포로의 분화가 용이하다. 2011년 Jones와 Yang⁴은 동물실험 모델에서 MSC의 매식을 통한 골형성능의 증대를 보고한 바 있다. 또한 서론에 언급한 것처럼 PRP의 적용도 합성골 이식재에 골유도능을 부여한다¹².

하지만 in vivo에서 HA를 스캐폴드로 사용하여 MSC와 PRP를 동시에 사용한 연구는 그 수가 적으며, MSC와 PRP의 개별적 효과 혹은 시너지 효과에 대한 분석이 필요할 것으로 생각된다²⁷.

따라서 HA 스캐폴드에 MSC와 PRP를 동시 적용하였을 때 시너지 효과에 대한 정량적 분석을 위하여 다음과 같이 토끼 두개골 결손부 모델과 성견의 삼벽성 골결손부 모델을 통해 조직학적, 조직계측학적, 통계적 분석을 시행하였다.

1) Rabbit calvaria defect model

① Preparation of human BMMSC and PRP

본 연구에 사용한 BMMSC는 인하대학교 의과대학 임상연구센터로부터 제공받았다. 그 후, Song 등²⁸이 제시한 다음의 방법에 따라 human BMMSC를 분리 및 배양하였다. 채취한 1 ml의 골수 샘플을 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco)과 1% penicillin/streptomycin (Gibco)과 혼합한 15 ml의 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco)에 희석한 후, 100 mm cell culture dish에 배양하였다. 2시간 후 상층부를 분리하여 새로운 culture dish에 배양하였으며, 다시 같은 과정을 2시간 간격으로 2회, 24시간 간격으로 2회, 48시간 간격으로 1회 반복 시행하였다. 그 후, 정제된 BMMSC를 배양한 후

0.25% trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 세포를 분리하였다.

PRP는 2회에 걸친 토끼 혈액의 원심분리를 통해 채득하였다²⁹. 5 ml의 혈액을 양측 귀의 정맥을 통해 채득한 후, 실온에서 5분간 600 rpm으로 원심분리를 시행하여 적혈구를 제거하였다. 두 번째 원심분리는 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 시행하여 PRP를 혈액에서 분리하였다. 2회에 걸친 원심분리 결과 혈액 내 평균 혈소판 농도를 $79,333 \pm 15,373$ platelets/ μ l에서 $2,000,000 \pm 157,162$ platelets/ μ l로 높일 수 있었다.

② Study design

HA 스캐폴드에 BMMSC를 2×10^5 cells/scaffold 농도로 적용한 군을 HS group (n=6)으로 정의하였으며, 100 μ l/scaffold 농도로 PRP를 적용한 군을 HP group (n=6), BMMSC와 PRP를 모두 적용한 군을 HSP group (n=6)이라 정의하였다.

두개골에 6 mm 직경의 결손부를 양측으로 2개 형성한 후, BMMSC와 PRP의 골재생에 대한 효과를 관찰하기 위

하여 2, 4, 8주 후에 조직학적, 조직계측학적, 통계적 분석을 시행하였다.

2) Canine three-wall intrabony defect model

① Preparation of human BMMSC and PRP

BMMSC의 채득과정은 앞서 시행한 Yun 등¹⁹의 연구에서와 같은 방법으로 시행되었다. PRP 역시 2회에 걸친 원심분리를 통하여 채득하였다. 성견의 족부 정맥에서 채득한 혈액에 혈액응고를 방지하기 위한 1.1 ml의 anti-coagulant citrate dextrose-A를 첨가하여 10 ml의 샘플을 준비한 후, 각 10분간 1,500 rpm과 3,000 rpm의 원심분리를 가해 적혈구를 제거한 PRP를 채득하였다. 이 실험을 위해 채득한 PRP 용액의 혈소판 농도는 약 1,000,000 platelets/ml로 측정되었다.

② Study design

총 4마리 성견의 하악 소구치 및 제1대구치를 발치한 후 3개월의 치유기간을 두었다. 그 후, 편악당 4개의 임플란트를 식립하였다. 각 임플란트의 근심부에 $4 \times 4 \times 4$

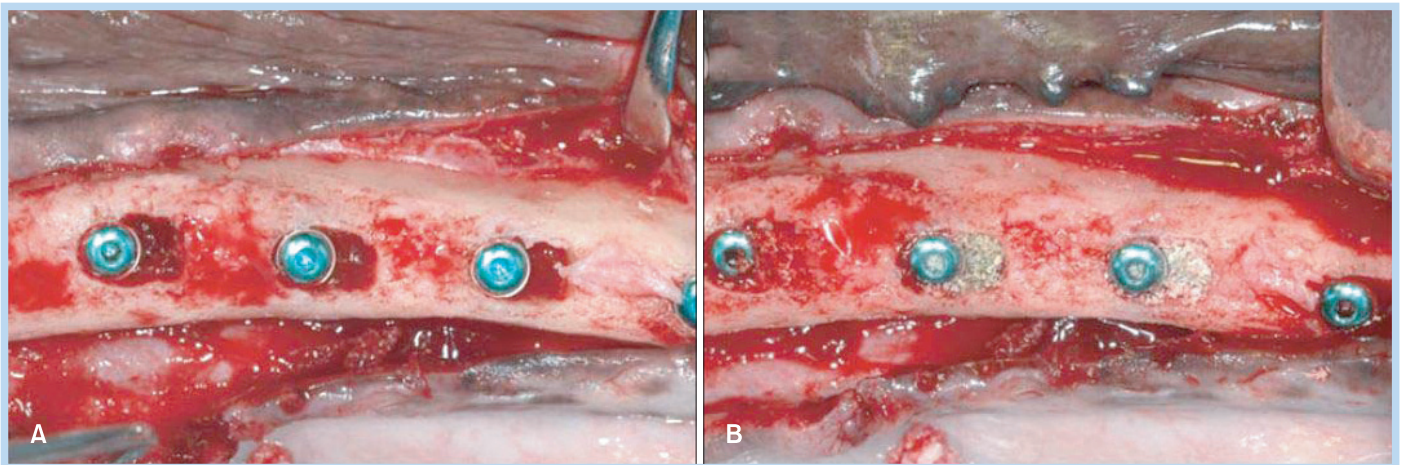


Fig. 2. Three-wall intrabony defect in a dog. (A) Twelve weeks after the extraction of the four premolars and first molars of the mandible, a three-wall intrabony defect (4x4x4 mm size) was formed at the mesial side of the drilling hole prepared for implant fixture. (B) After four dental implants were placed on each side of the mandible, graft materials were filled at the bone defect area. Reproduced from the article of Yun et al. (J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014; 102: 1021-1030)²⁰ with permission of Wiley.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

mm 크기의 삼벽성 골내 결손부를 형성한 후 실험재료를 적용하였다(Fig. 2). 그 후, 6주와 12주 후 실험동물의 희생을 시행하였으며, BMMSC와 PRP의 골재생에 대한 효과를 관찰하기 위하여 조직학적, 조직계측학적, 통계적 분석을 시행하였다.

3. n-HA를 코팅한 실크 스캐폴드의 효능

체내 경조직의 세포외 기질(extracellular matrix) 중, 무기질은 n-HA 결정체로 구성되어 있기 때문에³⁰, 경조직 재생을 위한 스캐폴드 관련 연구에서는 체내 경조직과 3차원적으로 가장 유사한 구조를 지니는 n-HA를 주로 사용하여 왔다¹⁶. 하지만, n-HA와 같은 합성 고분자 스캐폴드에서는 자연 고분자에 비해 세포부착능과 생체 친화성의 저하가 관찰되어^{31,32}, 자연 고분자로 구성되는 스캐폴드에 대한 연구도 함께 이루어지고 있다.

그 중 실크(silk)는 단백질을 기반으로 이루어진 자연 고분자로서 세포의 분화와 이주를 더 용이하게 한다³¹. 이를 이용하여 제작한 실크 스캐폴드에 n-HA를 융합하였을 경우, 칼슘 침착과 bone sialoprotein, type I collagen 등의 bone-specific marker 수치가 높아진 것으로 밝혀진 바 있다³³.

위와 같은 이론적 배경을 바탕으로 새로이 개발한 실크 스캐폴드에 periodontal ligament cell (PDL)과 dental pulp cell (DPC)을 각기 적용함으로써, 이의 재생능에 대해 알아보하고자 하였다. 본 연구 팀에서는 이를 위하여 토끼 두개골 결손부 모델과 비글견의 일벽성 골내 결손부 모델을 이용하여 조직학적 분석을 시행하였다.

1) Rabbit calvaria defect model (unpublished data)

① Preparation of silk scaffolds coated with nano-hydroxyapatite

봉합용 실크(Won Corp., Seoul, Korea)를 원료로 사용하여 실크 스캐폴드를 제조한 후, 실크섬유(silk fibroin)

에 아교성 단백질인 sericin을 0.02 M Na_2CO_3 와 0.3% ivory detergent를 용매로 사용하여 제거하였다. 스캐폴드의 n-HA 코팅을 위하여, 0.15 g의 n-HA (Sigma-Aldrich)를 10 ml의 PBS에 용해시킨 후, 0.8×1.2 cm 크기의 실크 스캐폴드 위에 1 ml를 적용하여 공기 중에 건조시켰다. 그 후, 1%의 atelocollagen 용액(Bioland, Cheonan, Korea)에 스캐폴드를 침전시킨 후, 냉동건조기(Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)에서 48시간 동안 -80°C 에서 동결건조과정을 시행하였다. 그 후의 제조과정은 Yang 등²¹이 제시한 방법과 동일하게 진행하였다.

② Primary cell culture: PDL

실험에 사용된 PDL은 정보제공 및 피험자의 동의를 얻은 후, 발치한 제3대구치로부터 채득하였다. 발치한 제3대구치는 70%의 에탄올에 소독한 후, antibiotic antimycotic solution (AA, Welgene Inc., Daegu, Korea)을 포함한 PBS 용액을 사용하여 3분간 세척하였다.

치아를 작은 조각으로 분리시켜 치근표면으로부터 치주조직을 채득한 후, 3 mg/ml 농도의 collagenase type I (Sigma-Aldrich) 용액과 4 mg/ml 농도의 protease (P 3417; Sigma-Aldrich) 용액을 사용하여 4°C 에서 12시간 동안 채득한 조직을 용해시켰다. 그 후, PDL 조직을 3 ml의 0.25% trypsin에서 15분간 배양하였으며, 10%의 FBS (BioWhittaker, Radnor, PA, USA)를 포함한 α -MEM (Sigma-Aldrich)을 이용하여 희석하였다. 5분간 800 rpm에서 원심분리 시행 및 상등액을 제거한 후, 10 ml의 α -MEM 용액을 피펫으로 계측하여 첨가하였다. 그 후, 세포현탁액을 100 mm culture dish에 배양하였다.

③ Primary cell culture: DPC

실험에 사용된 DPC는 정보제공 및 피험자의 동의를 얻은 후, 발치한 제3대구치로부터 채득하였다. 발치한 제3대구치는 70%의 에탄올에 소독한 후, antibiotic antimy-

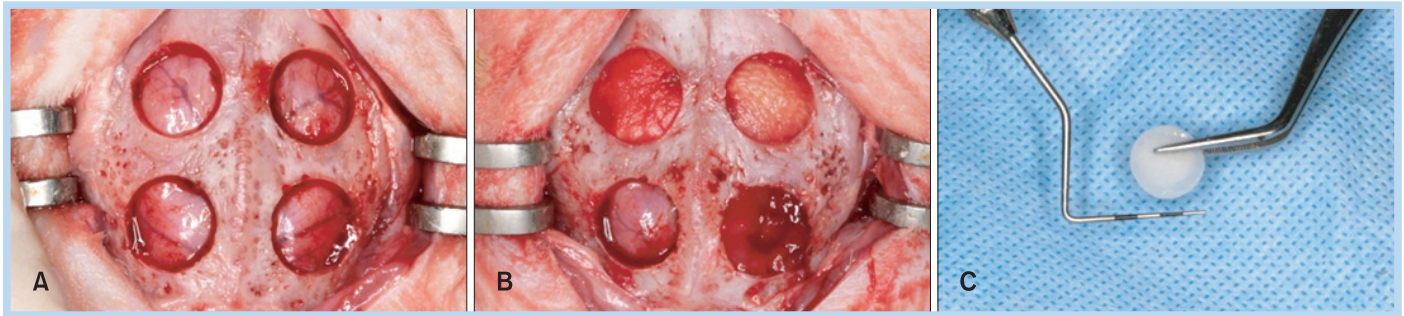


Fig. 3. The defects in each animal were assigned into four groups—empty control, silk scaffold (SS), dental pulp cells seeded on SS (DPSS), periodontal ligament cells seeded on SS (PDLSS). The silk scaffold was made at 8 mm in diameter in order to fit into the defects (unpublished data).

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

cotic solution을 포함한 PBS 용액을 사용하여 3분간 세척하였다.

치수조직을 제거한 후, 3 mg/ml 농도의 collagenase type I (Sigma-Aldrich) 용액과 4 mg/ml 농도의 dispase (Sigma-Aldrich) 용액을 사용하여 4°C에서 12시간 동안 채득한 조직을 용해시켰다. 그 후, PDL 조직을 3 ml의 0.25% trypsin에서 15분간 배양하였으며, 10%의 FBS를 포함한 α -MEM을 이용하여 희석하였다. 5분간 800 rpm에서 원심분리 시행 및 상등액을 제거한 후, 10 ml의 α -MEM 용액을 피펫으로 계측하여 첨가하였다. 그 후, 세포현탁액을 100 mm culture dish에 배양하였다.

④ Seeding of cells in silk scaffolds

효율적인 seeding을 위해, 건조된 환경에서 세포를 seeding하였다. 2.8×10^4 개의 DPC 혹은 1×10^6 PDLC를 포함하는 100 μ l의 세포현탁액과 실크 스캐폴드를 humidified 5% CO₂ incubator 안의 petri dish에 배양하였다. 3시간 후, 10 ml의 α -MEM 용액을 petri dish에 적용시켰으며, 3일마다 교체하면서 7일간 배양하였다. 그 후, PDLC와 DPC는 각기 다른 differentiation medium에서 3주간 배양하였으며, medium은 2일에 한 번 교체하였다.

⑤ Study design

총 8마리의 토끼가 연구에 사용되었다. 결손부를 그대

로 남겨둔 군을 control group으로, 실크 스캐폴드에 normal saline을 적신 군을 SS group, PDLC를 적용한 군을 PDLSS group, DPC를 적용한 군을 DPSS group이라 정의하였다. 두개골에 8 mm 직경의 결손부를 4개 형성한 후(Fig. 3), 초기치유에 미치는 영향을 확인하기 위하여 2, 4주 후에 조직학적 분석을 시행하였다.

2) Canine one-wall intrabony defect model

① Materials: n-HA coated silk scaffolds, PDLC, DPC, seeding method

위의 rabbit calvaria defect model과 같은 재료를 사용하였다.

② Study design

총 5마리 비글견의 하악 제2소구치 원심면과 제4소구치 근심면에 4×2 mm 크기의 1벽성 치주 결손부를 형성한 후, 위의 rabbit calvaria defect model과 같이 각각 control, SS, PDLSS, DPSS group으로 분류하여 양측으로 네 개의 결손부에 임의적으로 실험재료를 적용하였다(Fig. 4)²¹. 8주 후 실험동물의 희생을 시행하였으며, 이들이 치주 결손부에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조직학적 분석을 시행하였다.

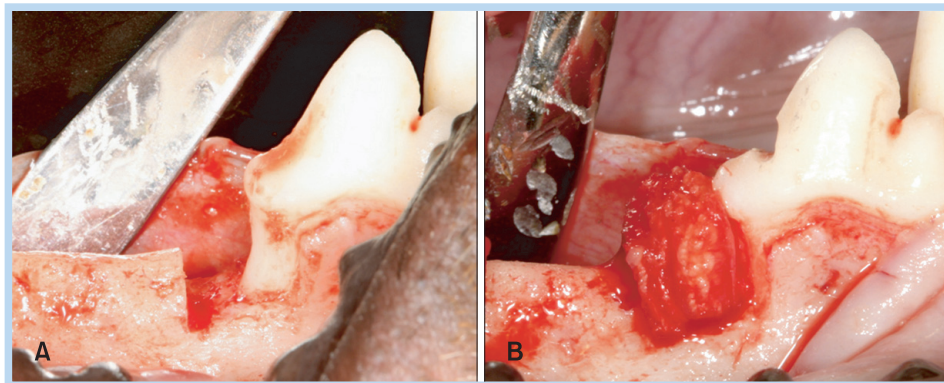


Fig. 4. One-wall intrabony defect in a dog. (A) One-wall defects were surgically created (depth×mesiodistal width, 4×2 mm size). (B) Nano-hydroxyapatite-coated scaffolds were transplanted into the bone defect. Reproduced from the article of Yang et al. (J Periodontal Implant Sci. 2012; 43: 315–322)²¹ with permission of Korean Academy of Periodontology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

III 연구결과

1. 약물방출과 세포부착을 용이하게 하기 위한 3차원 n-HA 스캐폴드의 개발

1) Hollow hydroxyapatite spherical granules

① XRD pattern and FTIR spectra

XRD pattern 그래프에서 raw HA의 peak과 H1, H2, H3의 peak이 모두 일치하였다. Alginate beads를 승화시킨 후의 실험군과 alginate beads의 FTIR spectra 그래프를 비교한 결과에서는 peak이 일치하지 않았다. 투과도를 평가하기 위하여 simulated body fluid (SBF)에 7일간 침전시킨 후에 XRD pattern에서 역시 raw HA의 peak과 H1, H2, H3의 peak에 변화가 없었다. 하지만 FTIR spectra에서는 carbonate ion에 의한 새로운 peak이 1,650–1,300 cm^{-1} 과 873 cm^{-1} 에서 생성되었다(Fig. 5)¹⁷.

② SEM observation

SBF에 HA granule을 침전시킨 후의 SEM 사진을 통하여 granule 표면을 관찰하였다. 1일간 침전시킨 후에 granule의 바깥 표면에서 H1, H2, H3 모두 apatite crys-

tal이 생성되었다. 하지만 H1, H2 granule의 안쪽 표면에 서는 apatite crystal이 생성되지 않았다. 3일 후의 SEM 사진을 관찰한 결과(Fig. 6)¹⁷ H2는 SBF가 granule의 안쪽 표면까지 관통되어 crystal을 형성하였으나, H1은 micropore가 남아 있었다.

2) Avidin-biotin binding system (ABBS)

① Cell attachment

세포부착 정도를 평가하기 위하여 WST-1값을 이용하였다(Fig. 7)¹⁸. 그 결과 static (mean±standard deviation [SD], 2.05±0.11)과 agitation seeding method (mean±SD, 2.24±0.16) 간의 통계적 유의차는 없었다. 하지만 ABBS seeding method (mean±SD, 3.16±0.19)에서는 다른 두 가지 seeding method보다 유의차 있게 높은 WST-1값을 나타내었다($p < 0.05$).

② SEM observation

Static seeding, agitation seeding, ABBS seeding method의 SEM 사진에서 PDLF의 부착 여부를 관찰한 결과, static seeding method에서는 다수 세포들이 스캐폴드로부터 탈락된 것으로 여겨지지만 agitation과 ABBS seeding method에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 8)¹⁸.

2. BMMSC와 PRP를 HA 스캐폴드에 동시 적용하였을 때 시너지 효과

1) Rabbit calvaria defect model

① Histologic evaluation

HS, HP, HSP 그룹에서 2주, 4주, 8주군으로 갈수록 신

생골의 형성과 골아세포의 활성도가 증가하였다(Fig. 9)¹⁹. 하지만, HS 그룹에서는 8주군 결손부의 중앙에 잔존한 HA를 관찰할 수 있었으며, 골재생의 정도가 다른 군들에 비해 미약하였다. HP 그룹에서는 HS 그룹에서보다 더 증진된 골재생 양상을 보였고, HSP 그룹은 신생골

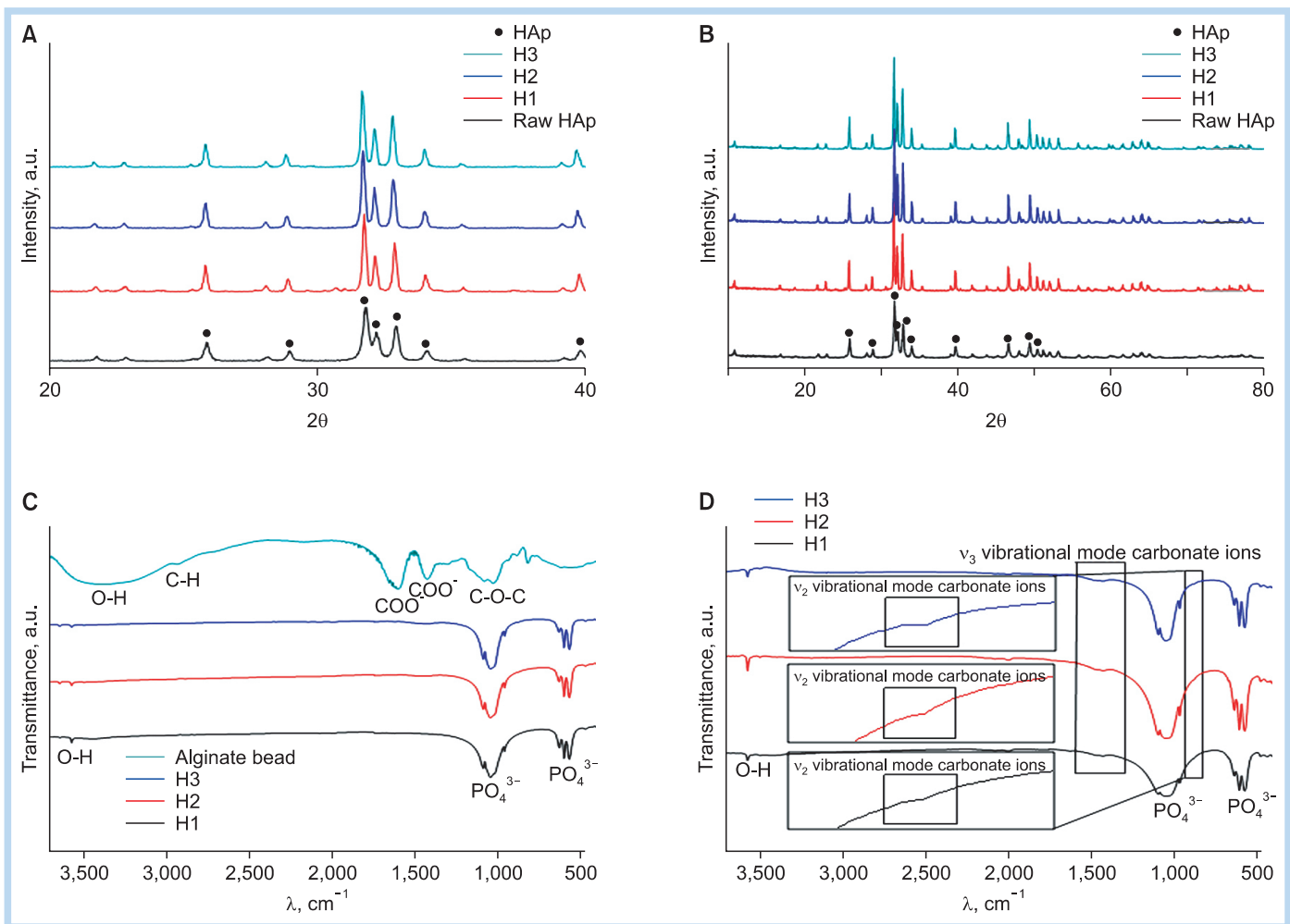


Fig. 5. Characterisation after sintering. (A) X-Ray diffraction (XRD) patterns of raw material and experimental groups. Five major peaks in the range from 20 to 40 were indicated with reference to JCPDS 74-0566, (B) XRD patterns of experimental groups after 7 days of immersion in simulated body fluid (SBF). Ten major peaks in the range from 10 to 80 were indicated with reference to JCPDS 74-0566. There were no more peaks of the newly grown crystal on XRD patterns after immersion in SBF. (C) There were no residue peaks on spectra of experimental groups after sintering in fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra, (D) FTIR spectra of raw materials and experimental groups after 7 days of immersion in SBF. There were peaks of v₃ and v₂ vibrational mode carbonate ions on spectra of all experimental groups after immersion in SBF. HAp: hydroxyapatite, H1=0.50, H2=0.33, H3=0.25 powder/liquid ratio, g/ml. Reproduced from the article of Hong et al. (Micro Nano Lett, 2012; 7: 634-636)¹⁷ with permission of The Institution of Engineering and Technology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

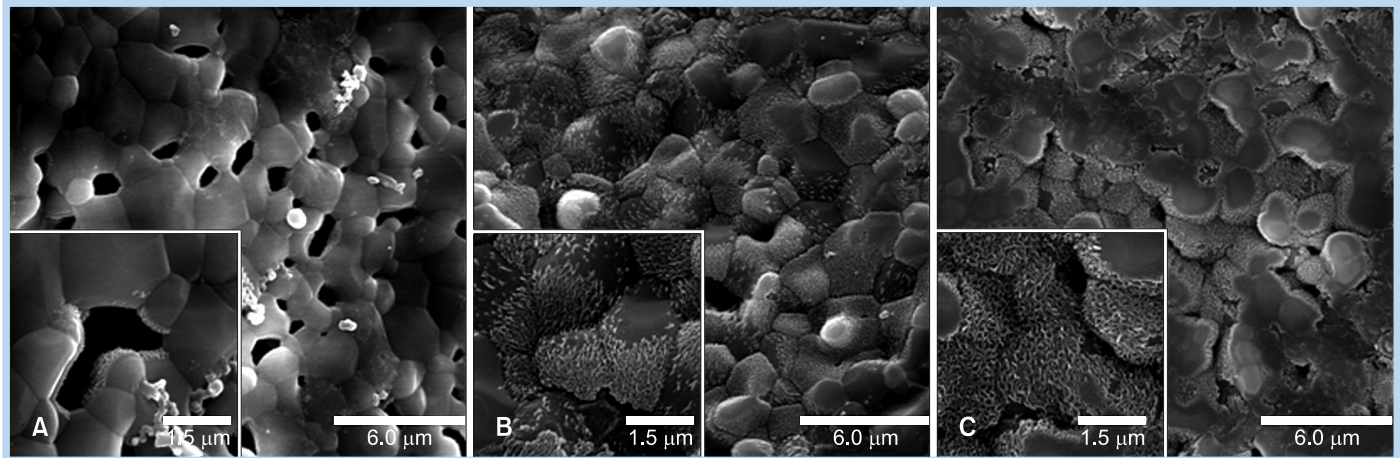


Fig. 6. Scanning electron microscopy images of inner wall of groups. (A) H1, (B) H2, (C) H3 after immersing in simulated body fluid for 3 days. Growth rate of apatite layer on the inner surface increased as decreasing powder/liquid ratio (bottom lefts are magnified images). Reproduced from the article of Hong et al. (Micro Nano Lett, 2012; 7: 634–636)¹⁷ with permission of The Institution of Engineering and Technology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

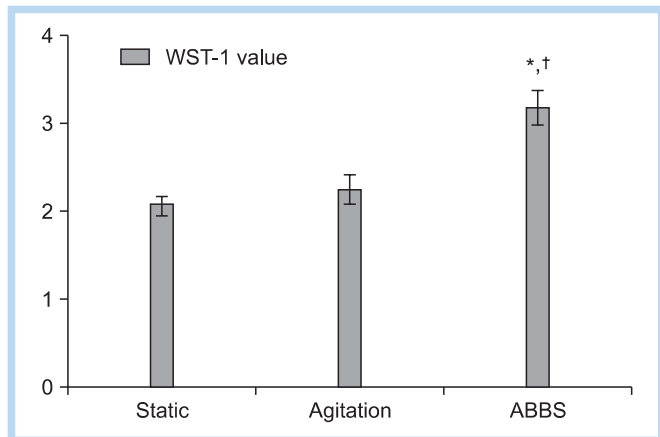


Fig. 7. Water soluble tetrazolium salt (WST-1) values. Each value reflects a ratio of attached living cells. *Significant difference between the static and avidin biotin binding system (ABBS) groups, $p < 0.05$. †Significant difference between the agitating and ABBS groups, $p < 0.05$. Reproduced from the article of Jang et al. (J Periodontal Implant Sci, 2011; 41: 73–78)¹⁸ with permission of Korean Academy of Periodontology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

의 형성과 골 성숙도 면에서 다른 군들보다 우수하였다.

② Histomorphometric analysis

조직계측학적 분석을 시행한 결과, 신생골 면적이 모든 그룹에서 2주에서 8주군으로 갈수록 증가되었다. 특히 결손부 면적에 대한 신생골 면적의 비율을 측정된 결과, HS 그룹의 2주군에 비해(25%), 4주군과 8주군에서는 각각 70.8%와 72.5%의 신생골 면적이 계측되었다(Fig. 10)¹⁹. HSP 그룹에서는 다른 그룹에 비해 높은 신생골의 면적이 관찰되었으며, 8주군에서는 98.8%의 계측값을 보여 통계적으로 유의차 있는 결과를 도출할 수 있었다.

2) Canine three-wall intrabony defect model

① Histologic evaluation

6주보다 12주군에서 골 결손부의 중심으로 골형성이 많이 진행된 양상을 보였다. 또한, HP와 HSP 그룹에서 다른 그룹보다 많은 양의 골형성이 관찰되었다. 특히, HSP 그룹의 12주군에서는 신생골과 기존골이 구별되지 않을 정도의 성숙도를 보였다(Fig. 11)²⁰.

② Histomorphometric analysis

HS 그룹의 골-임플란트 접촉률을 제외하면, 모든 그룹의 골밀도와 골-임플란트 접촉률은 6주에서 12주로 경과할수록 높은 수치를 나타내었다. 12주의 HSP 그룹에서 가장 높은 골밀도와 골-임플란트 접촉률을 보였으나 통계적 유의차는 없었다($p < 0.05$).

3. n-HA를 코팅한 실크 스캐폴드의 효능

1) Rabbit calvaria defect model

① SEM observation

n-HA를 코팅한 실크 스캐폴드의 다공성 silk fibroin 구조를 관찰하였다(Fig. 12)²¹. Cross-sectional 및 longitudinal view를 통해 본 결과, fibrous bundle들이 스캐폴드의 표면과 평행하게 주행하며 silk fibroin 사이에 pore들이 상호 연결되어 있었다. 또한 세포를 배양한 후 스캐폴드 표면에서 extracellular matrix의 형성과 세포의 부착을 확인하였다.

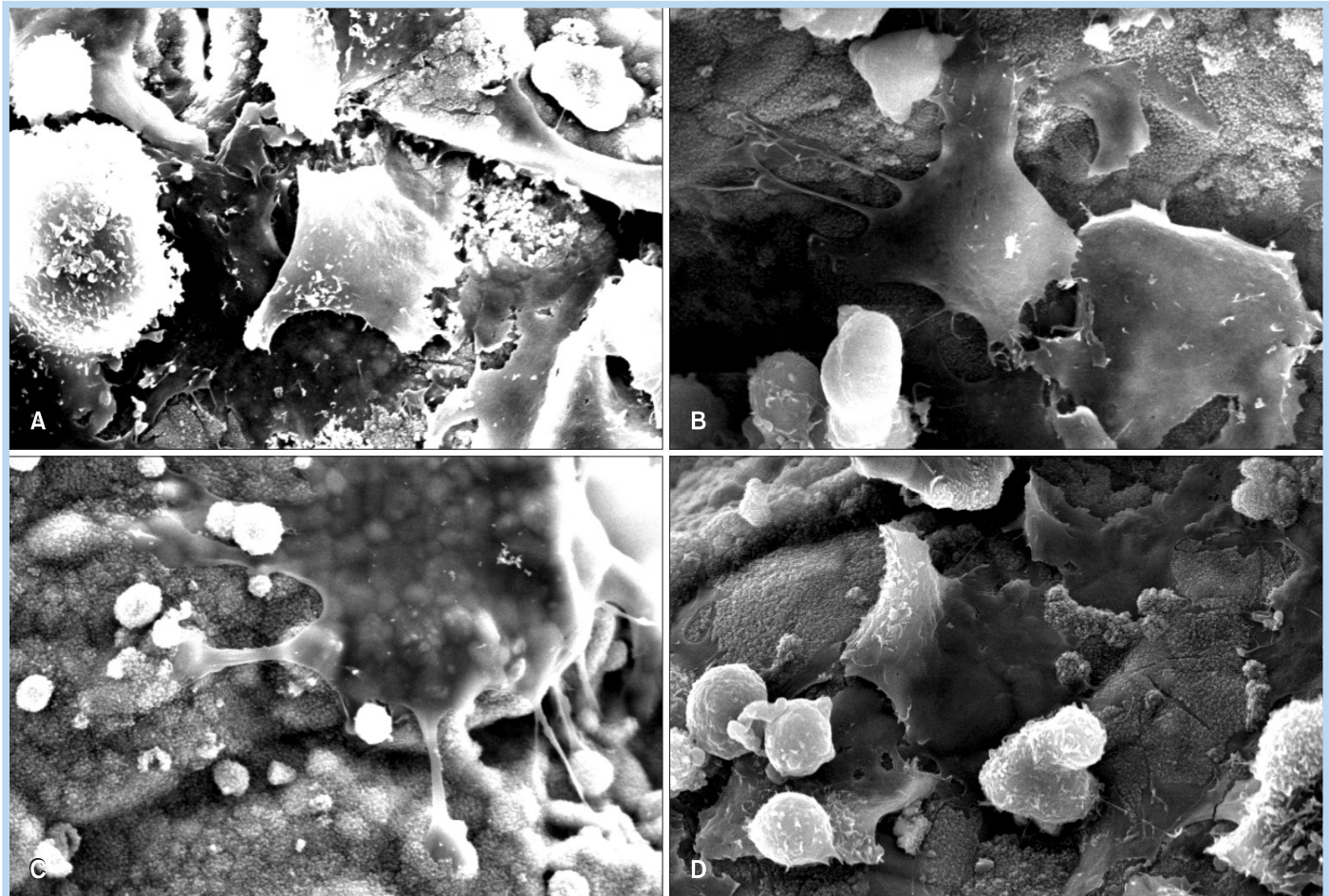


Fig. 8. Scanning electron micrographs of periodontal ligament fibroblasts attached to nano-hydroxyapatite scaffold. No meaningful difference was observed among the seeding methods. (A) Static cell seeding, (B) Agitating cell seeding, (C, D) Avidin biotin binding system cell seeding ($\times 2,000$). Reproduced from the article of Jang et al, (J Periodontal Implant Sci, 2011; 41: 73-78)¹⁸ with permission of Korean Academy of Periodontology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

② Histologic evaluation

2주군에서는 스캐폴드의 다공성 구조 내에 염증성 세포들의 침윤이 관찰되었으나, 스캐폴드 내의 가지런히 배열된 silk fiber들 사이로 신생혈관들이 네트워크 구조를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 4주군의 조직학적 관찰에서도 실크 스캐폴드가 흡수되지 않고, 그 형태를 잘 유지하여 외부로부터의 세포유입을 차단하는 모습을 보였다. 4주째에는 결손부 주변으로부터의 신생골 형성

이 관찰되었으며, 이것은 silk fibroin과 긴밀한 접촉을 이루고 있었다. 신생골의 양에 있어서는 3개의 실험군에 유의차가 없는 결과를 나타내었다.

2) Canine one-wall intrabony defect model

① Clinical findings

모든 실험부위는 염증 징후 없이 치유되었으며, 술 후 비정상적인 출혈이나, 감염 등의 징후는 발견되지 않았

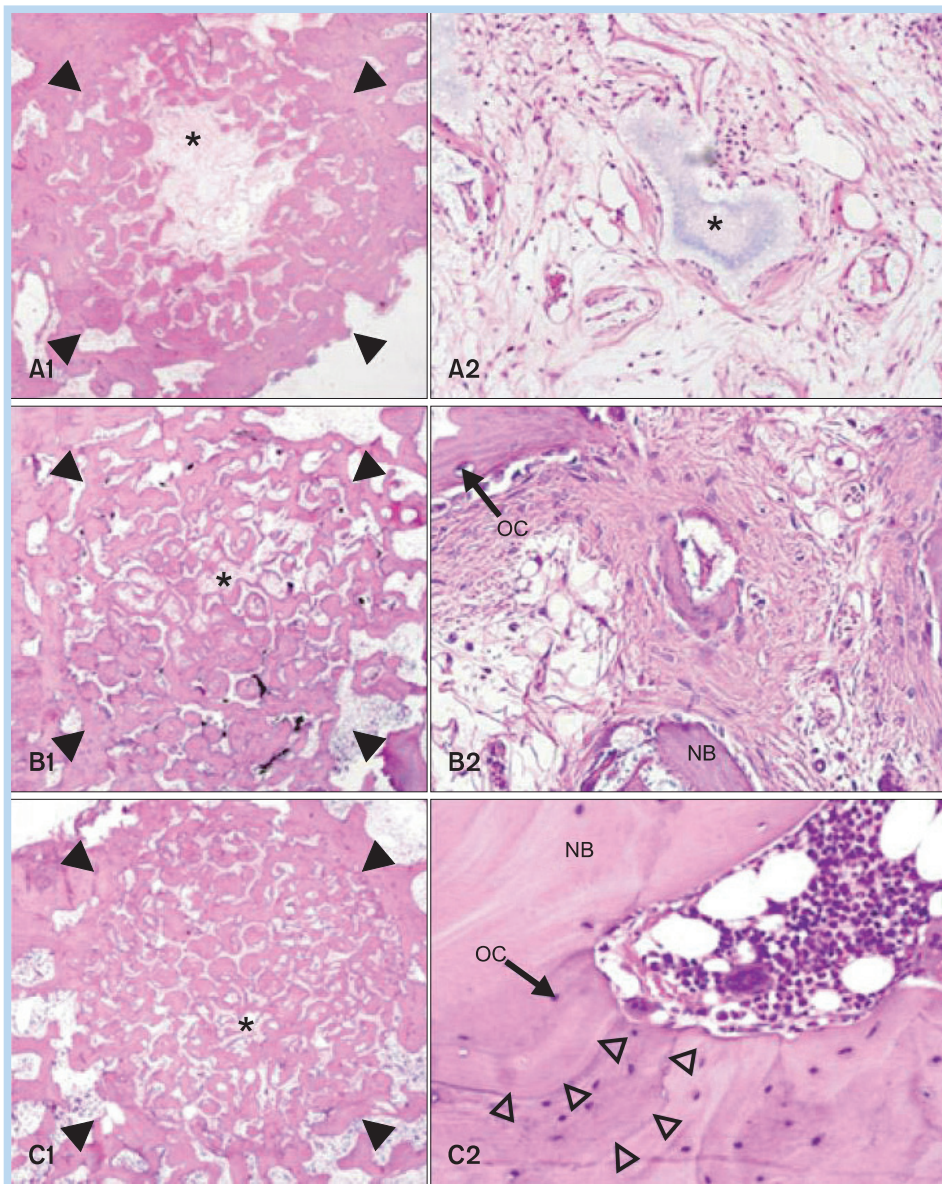


Fig. 9. Representative photomicrographs of calvarial defect sites that were treated with hydroxyapatite (HA) loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC) or platelet-rich plasma (PRP) for 8 weeks. (A) HS group: HA loaded with BMMSC alone, (B) HP group: HA loaded with PRP alone, (C) HSP group: HA loaded with BMMSC and PRP. HSP group was shown to have the highest levels of osteogenesis, lamellar bone generation, and bone maturity. In the HS group, HA was observed to remain in the center of defects. A1, B1, C1: H&E, $\times 12.5$; A2, B2, C2: H&E, $\times 400$. Asterisks: HA, NB: new bone, full arrowheads: defect margin, OC (arrow): osteocyte, hollow arrowheads: cemental line. Reproduced from the article of Yun et al. (Tissue Eng Regen Med. 2012; 9: 73–78)⁹ with permission of Wiley.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

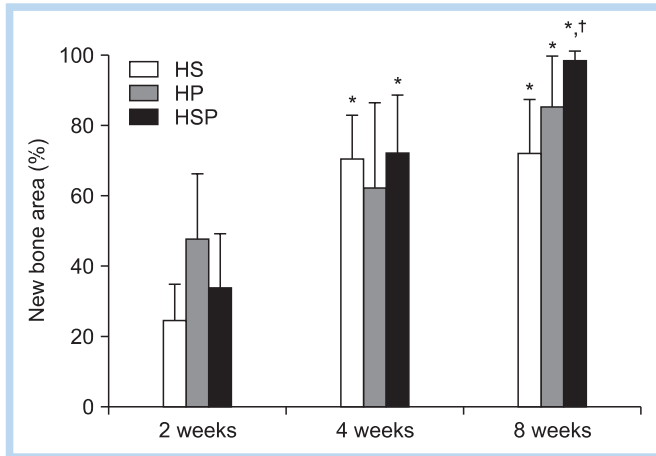


Fig. 10. Histomorphometric measurement of new bone area. Percentage of new bone area was generally increased in a time-dependent manner in all groups. HSP group showed a significant difference from the other groups at 8 weeks. HS: hydroxyapatite (HA) loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC), HP: HA loaded with platelet-rich plasma (PRP), HSP: HA loaded with BMMSC and PRP. *Statistically significant difference compared to the 2-week healing period at the same group, $p < 0.05$. †Statistically significant difference compared to the other groups at the same healing period, $p < 0.05$. Reproduced from the article of Yun et al. (Tissue Eng Regen Med. 2012; 9: 73–78)¹⁹ with permission of Wiley.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

다.

② Histologic evaluation

접합상피의 근단부 이동의 정도와 신생 백악질의 형성 정도는 대조군과 실험군에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한 실크 스캐폴드는 치주 결손부에서 공간유지 기능을 잘 수행하고 있는 것으로 관찰되었으나, 스캐폴드 주위의 조직 구성은 대부분이 결합조직으로 되어 있었다. 모든 실험군에서는 염증세포들이 산재하는 thin fibrous capsule이 관찰되었다(Fig. 13)²¹.

IV 총괄 및 고찰

본 연구팀에서는 다음 일련의 주제에 따른 연구를 진행하였다. 1) 약물방출과 세포부착을 용이하게 하기 위한 3차원 n-HA 스캐폴드의 개발, 2) BMMSC와 PRP를 HA 스캐폴드에 동시 적용하였을 때 시너지 효과, 3) n-HA를 코팅한 실크 스캐폴드의 효능이다.

1. 약물방출과 세포부착을 용이하게 하기 위한 3차원 n-HA 스캐폴드의 개발

조직치유를 촉진하기 위한 약물, 성장인자를 서서히 유리시키기 위한 hollow HA spherical granules에서는 SBF의 투과속도가 HA의 powder/liquid ratio에 의해 결정되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 HA granule표면에 새로 생성된 carbonate apatite에 의한 것으로 보인다. 또한, alginate beads를 template로 사용한 후 이를 승화시키는 과정을 통하여 방사상의 약물방출 통로를 형성할 수 있었고, 이를 SEM을 통하여 확인할 수 있었다.

스캐폴드에 대한 세포부착을 증진시키기 위한 방법으로, 서로 결합력이 강한 분자인 avidin과 biotin을 세포막과 스캐폴드 표면에 각각 부착하였다. 그 결과, 실험군에서 높은 WST-1 value를 보여 새로운 방법의 효용성을 검증하였다. Takahashi와 Tabata³⁴는 agitating cell seeding이 세포부착 정도에 있어서 static seeding보다 더 우수한 결과를 보인다고 보고하였으나, 본 연구팀에 의한 결과에서는 두 군 사이에서 통계적인 유의차를 볼 수 없었다. 이는 사용한 세포나 스캐폴드, 세포 현탁액, 회전 속도, 배양 시간 등에 의하여 결과가 달라진 것으로 보인다.

2. BMMSC와 PRP를 HA 스캐폴드에 동시 적용하였을 때 시너지 효과

조직공학의 세 가지 요소로 scaffolds, cells, signaling molecules를 꼽을 수 있다. 본 연구팀에서는 위 세 가지 요소 모두를 적용하여 토끼 두개골 결손부 모델과 성견의 삼벽성 골결손부 모델에서의 골재생 효과를 알아보았다. 그 결과 두 가지 동물실험 모델 모두 HSP 그룹에서 높은 골재생 정도를 관찰할 수 있었다. Yamada 등³⁵에 의한 연구에서는, PRP가 MSC의 증식 및 분화를 촉진하기 때문에, 이를 함께 적용할 경우 높은 골밀도를 관찰하였

다고 보고하였다. 특히 토끼 두개골 결손부 모델의 조직 계층학적 분석을 시행한 결과, HS 그룹이 초기 골재생에서 우수한 효과를 보이는 반면에 골재생 후기에서는 그 효과가 감소한 것으로 여겨진다. 하지만 2, 4, 8주군의 HSP 그룹에서는 각각 34.2%, 72.5%, 98.8%의 계층값을 보여 PRP가 BMMSC의 증식을 촉진 및 지속시켰던 것으로 생각된다. 성견의 삼벽성 골결손부 모델에서도 HSP 그룹의 골-임플란트 접촉율의 증가 및 골밀도의 향상이 관찰되어, 이를 뒷받침하고 있다.

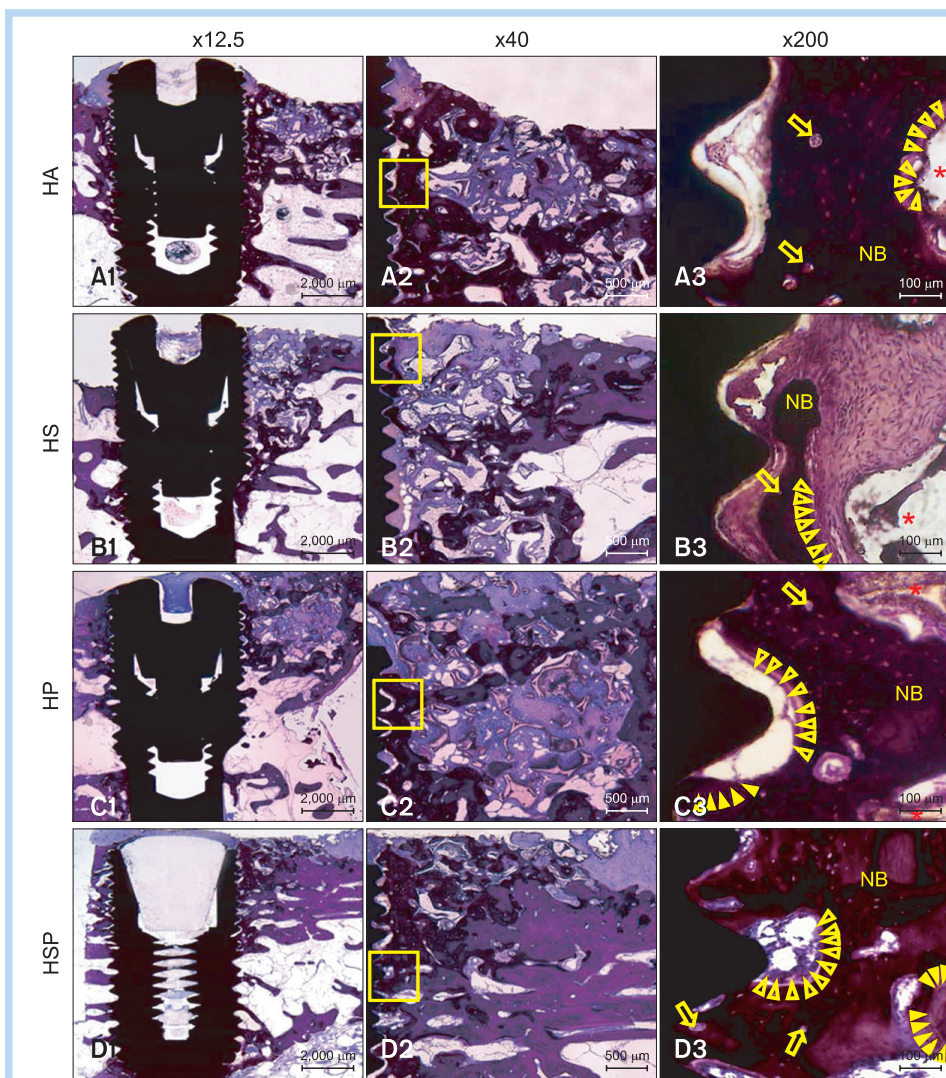


Fig. 11. Representative photomicrographs of peri-implant defect sites that were treated with porous hydroxyapatite (HA) loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC) or platelet-rich plasma (PRP) for 12 weeks. (A) HA group: HA alone, (B) HS group: HA loaded with BMMSC alone, (C) HP group: HA loaded with PRP alone, (D) HSP group: HA loaded with BMMSC and PRP. More improved osteogenesis and osseointegration was observed in HP and HSP groups than in the other groups. Asterisks: HA, NB: new bone, arrows: osteocyte, full arrowheads: osteoblastic cell lining, hollow arrowheads: reversal line. A1, B1, C1, D1: H&E, ×12.5; A2, B2, C2, D2: H&E, ×40; A3, B3, C3, D3: H&E, ×200. Reproduced from the article of Yun et al. (*J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014; 102: 1021–1030)²⁰ with permission of Wiley.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

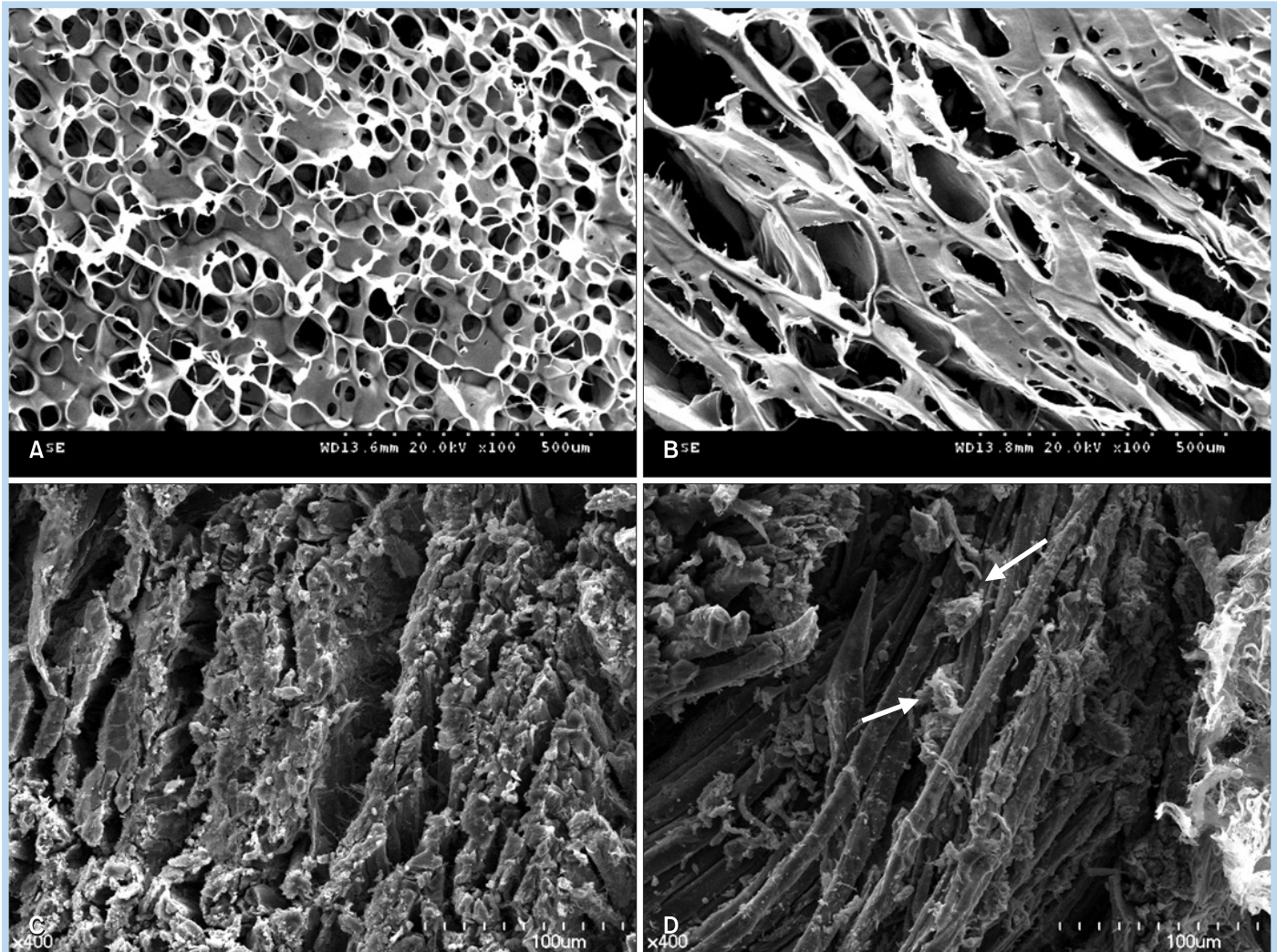


Fig. 12. Scanning electron microscopy images of silk scaffold. (A) and (B) shows the cross section and longitudinal section of the silk scaffold respectively prior to the cell culture. Porous, interconnected structure can be observed ($\times 100$), (C) and (D) show the cross section and longitudinal section of the silk scaffold respectively, following the cell culture ($\times 400$). Arrows represent spreading of the cells with secreted extracellular matrix on the silk fibroin, Reproduced from the article of Yang et al. (J Periodontal Implant Sci, 2013; 43: 315–322)²¹ with permission of Korean Academy of Periodontology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

3. n-HA를 코팅한 실크 스캐폴드의 효능

토끼 두개골 결손부 모델과 비글견의 일벽성 골내 결손부 모델을 통하여 위의 두 가지 연구에서는 실크 스캐폴드의 생체적합성을 확인하였다. 본 연구에 사용한 실크 스캐폴드는 면역원성을 가지는 glycosylated protein인 sericin을 제거함으로써 생체적합성을 높일 수 있었다³⁶.

실크 스캐폴드를 적용한 토끼 두개골 결손부 모델의 2

주군에서는 macrophages를 포함한 염증세포들이 균일하게 분포되어 있었으나, 4주군에서 염증세포들이 완전히 사라진 모습을 관찰할 수 있었으며 임상적으로 특기할 만한 합병증은 없었다. 성견 모델에서 또한 임상적으로 특기할 만한 염증소견은 관찰되지 않았다.

그러나 초기 치유단계의 골재생에 대한 치수세포와 치주인대세포의 효능은 확인할 수 없었으며, 배양한 전구

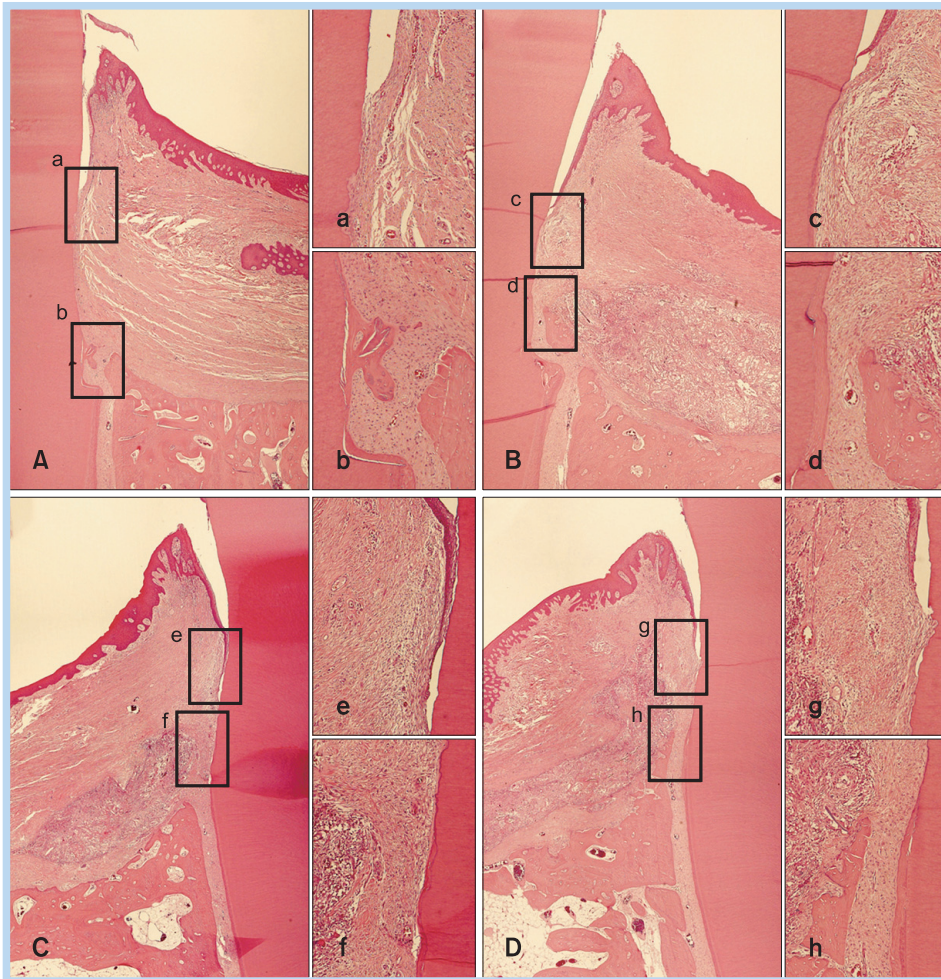


Fig. 13. Representative photomicrographs from control (A) and experimental (B~D) sites. Low-magnification views of the experimental site in the 8-week control group (A), the 8-week silk scaffold (SS) group (B), the 8-week periodontal ligament cell (PDLSS) group (C), and the 8-week dental pulp cell (DPSS) group (D) (H&E, $\times 40$). High-magnification views of the framed areas in a~h (H&E, $\times 100$). Control group (A, a, b), SS group (B, c, d), PDLSS group (C, e, f), and DPSS group (D, g, h). Reproduced from the article of Yang et al. (J Periodontal Implant Sci, 2013; 43: 315–322)²¹ with permission of Korean Academy of Periodontology.

Hoon You et al. : Development of Scaffold for Cell Attachment and Evaluation of Tissue Regeneration Using Stem Cells Seeded Scaffold. *Implantology* 2014

세포들의 osteogenic potential이 골형성을 이루기에는 충분하지 못했을 가능성을 추론해 볼 수 있었다. 또한, 동물모델에 인간유래 세포를 사용함으로써 실험동물에게 특화된 자가세포 이식의 장점을 살리지 못하였던 사실이 원인으로 생각될 수 있을 것이다.

실크 스캐폴드가 이식된 성견의 치주 결손부에서는 접합상피의 근단부 이동과 결합조직으로 채워진 골결손부를 관찰할 수 있었다. Lam 등³⁷은 proteolytic enzymes로 인해 실크가 분해된다고 하였으나, 이러한 분해과정들은 매우 천천히 일어나기 때문에 완전히 분해되는데 최소한 60일이 소요되게 된다³⁸. 분해가 지나치게 느렸기 때문에, 미세공 구조가 오랫동안 유지되어 상대적으로 이주

속도가 빠른 상피세포와 결합조직 세포가 먼저 채워진 것으로 생각된다³⁹.

V 결론

본 연구팀에서는 약물방출과 세포부착을 위한 스캐폴드 개발 및 줄기세포를 적용한 스캐폴드의 조직재생능 평가를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. Alginate beads를 통해 micropore의 형성이 가능하며, 약물방출 속도는 HA slurry의 powder/liquid ratio로

결정가능하다.

2. ABBS는 기존의 방법보다 더 효과적으로 3차원 스캐폴드에 세포를 부착할 수 있다.

3. BMMSC와 PRP를 동시 적용한 경우 골재생에 있어 시너지 효과를 가지는 것으로 생각된다.

4. 실크 스캐폴드의 높은 공간유지능과 생체적합성을 확인하였다. 그러나 초기 치유단계의 골재생에 대한 DPC와 PDL의 효능은 확인할 수 없었다.

조직공학의 세 가지 요소인 scaffolds, cells, signaling molecules를 기반으로 이들을 개별적으로, 혹은 조합하여 위에서 언급한 연구들을 시행하였다. 본 연구팀에서는 향후 위 세가지 요소를 기반으로 한 연구들을 통하여 임상에서 유용하게 사용할 수 있는 재료들을 개발해 나갈 계획이다.



References

1. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989; 3: 192-195.
2. Takamoto M, Takechi M, Ohta K, et al. Risk of bacterial contamination of bone harvesting devices used for autogenous bone graft in implant surgery. *Head Face Med*. 2013; 9: 3.
3. McAuliffe JA. Bone graft substitutes. *J Hand Ther*. 2003; 16: 180-187.
4. Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury*. 2011; 42: 562-568.
5. Arinze TL, Tran T, Mcalary J, et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005; 26: 3631-3638.
6. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng*. 2004; 10: 955-964.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920-926.
8. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, et al. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008; 4: 21-26.
9. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, et al. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J*. 2008; 34: 52-67.
10. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*. 2007; 10: 149-160.
11. Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, et al. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J Periodontol Res*. 2009; 44: 199-210.
12. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18: 93-103.
13. Vogel JP, Szalay K, Geiger F, et al. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*. 2006; 17: 462-469.
14. Mishra A, Tummala P, King A, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15: 431-435.
15. Lynch SE MR, Nevins M, Wisner-Lynch LA. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. 2nd ed. Chicago: Quintessence; 2008.
16. Wang H, Li Y, Zuo Y, et al. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2007; 28: 3338-3348.
17. Hong MH, Kim KM, Choi SH, et al. Fabrication of hollow hydroxyapatite spherical granules for hard tissue regeneration and alternative method for drug release test. *Micro Nano Lett*. 2012; 7: 634-636.
18. Jang YJ, Jung IH, Park JC, et al. Effect of seeding using an avidin-biotin binding system on the attachment of periodontal ligament fibroblasts to nanohydroxyapatite scaffolds: three-dimensional culture. *J Periodontol Implant Sci*. 2011; 41: 73-78.
19. Yun JH, Yoo JH, Choi SH, et al. Synergistic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration of calvarial defects in rabbits. *Tissue Eng Regen Med*. 2012; 9: 17-23.
20. Yun JH, Han SH, Choi SH, et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: Preliminary study in canine three-wall intrabony defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.

- 2014; 102: 1021-1030.
21. Yang C, Lee JS, Jung UW, et al. Periodontal regeneration with nano-hydroxyapatite-coated silk scaffolds in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2013; 43: 315-322.
 22. Haddad AJ, Peel SA, Clokie CM, et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg.* 2006; 17: 926-934.
 23. Bae SE, Son JS, Park K, et al. Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. *J Control Release.* 2009; 133: 37-43.
 24. Hong MH, Son JS, Kim KM, et al. Drug-loaded porous spherical hydroxyapatite granules for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22: 349-355.
 25. Tsai WB, Wang MC. Effects of an avidin-biotin binding system on chondrocyte adhesion and growth on biodegradable polymers. *Macromol Biosci.* 2005; 5: 214-221.
 26. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, et al. Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol.* 2006; 17: 74-77.
 27. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 539-546.
 28. Song SU, Kim CS, Yoon SP, et al. Variations of clonal marrow stem cell lines established from human bone marrow in surface epitopes, differentiation potential, gene expression, and cytokine secretion. *Stem Cells Dev.* 2008; 17: 451-461.
 29. Nagata MJ, Messora MR, Furlaneto FA, et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 2010; 4: 395-402.
 30. Zhao F, Yin Y, Lu WW, et al. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials.* 2002; 23: 3227-3234.
 31. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. Cambridge (MA): StemBook; 2008.
 32. Hooper KA, Macon ND, Kohn J. Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly (L-lactic acid) as a function of polymer degradation. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41: 443-454.
 33. Li C, Vepari C, Jin HJ, et al. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27: 3115-3124.
 34. Takahashi Y, Tabata Y. Homogeneous seeding of mesenchymal stem cells into nonwoven fabric for tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003; 9: 931-938.
 35. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15: 589-597.
 36. Teuschl AH, van Griensven M, Redl H. Sericin removal from raw *Bombyx mori* silk scaffolds of high hierarchical order. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014; 20: 431-439.
 37. Lam KH, Nijenhuis AJ, Bartels H, et al. Reinforced poly(L-lactic acid) fibres as suture material. *J Appl Biomater.* 1995; 6: 191-197.
 38. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials.* 2003; 24: 401-416.
 39. Heslot H. Artificial fibrous proteins: a review. *Biochimie.* 1998; 80: 19-31.