

## P-14 Calcium PolyPhosphate의 생물학적 활성도에 관한 연구

설양조<sup>1</sup>, 임윤탁<sup>2</sup>, 김석영<sup>2</sup>, 구 영<sup>1</sup>, 이재일<sup>3</sup>,

류인철<sup>1</sup>, 한수부<sup>1</sup>, 최상묵<sup>1</sup>, 정종평<sup>1</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 치과대학 치주과학교실

<sup>2</sup>영남대학교 공과대학 재료금속공학부

<sup>3</sup>서울대학교 치과대학 구강병리학교실

### 목적

이 연구의 목적은 다공성의 CPP 내부에 쥐의 골수에서 유래된 세포를 접종하고 3차원적으로 배양하여 CPP에서 세포가 잘 부착하여 분열을 잘하는지를 연구하고, Calcium Polyphosphate(CPP)의 돌연변이 유발성을 검사하는 것이다.

### 재료 및 방법

#### 1. Calcium polyphosphate의 제조

무수  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 를 condensation하여 무결정의  $\text{Ca}(\text{PO}_3)$ 를 얻고 이를 용융하고 냉각시킨 후 분쇄하여 Calcium polyphosphate(CPP) powder를 얻었다. 다공성의 CPP는 5%  $\text{SiO}_2$ 를 첨가하여 polyurethane sponge를 이용하여 polyurethane을 소환하는 방법으로 sponge 형태의 0.2-0.3mm의 소공의 크기를 가지는 것(60ppi) 0.45-0.55mm의 소공의 크기를 가지는 것(60ppi) 2가지로 제작하였다. 각각의 CPP matrice는 5mm × 5mm × 1mm의 블록 형태로 만들었다(영남대학교 재료공학교실 기증).

#### 2. 골아세포-세포지지체 혼합체의 실험실적 배양 및 관찰

- 1) 백서 장골 골수 세포의 분리 및 배양-체중 80g 내외의 백서에서 장골(femur, tibia)을 채취하여 백서의 장골 골수 세포를 분리하여 배양하였다(Maniatopoulos 등).
- 2) 세포의 접종 및 세포-CPP 혼합체의 실험실적 배양-24well에 CPP block을 넣고 CPP block 당 105개의 배양한 세포를 접종하였다.
- 3) 세포증식률 측정-배양 1, 7, 14, 및 21 일째에 각 well에서 trypsin EDTA를 이용하여 2회 반복하여 cell을 분리하였고, 원심분리한 후 hemacytometer로 측정하였다.
- 4) 염기성 인산효소(Alkaline phosphatase)의 활성 측정: 45ppi와 60ppi, 그리고 Tissue Culture Polystyrene(control group)에 접종, 배양된 세포들의 염기성 인산효소활성도를 배양 7, 14, 및 21 일째에 각각 측정하였다.
- 5) 배양된 세포-CPP 블록 혼합체의 조직학적 관찰: 각 기간 별로 배양된 세포-CPP 혼합체내에서 세포의 부착 및 증식과 형성된 조직의 3차원 적 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경하에서의 관찰을 시행하였다.

#### 3. CPP의 돌연변이유발성 검사

CPP의 돌연변이 유발성 검사(mutagenicity test)를 위해 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl

transferase(HPRT) assay를 하였다. NIH3T3 cell line과 CHO-K1 cell line으로 각각 1000 $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$ , 10 $\mu\text{g/ml}$  그리고 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 CPP 농도에서 측정하였다.

#### 4. 통계적 분석

통계적 분석을 위해서 모든 측정은 각 군당 4개체 이상 시험하였고, 각 측정값은 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성 검정을 위해서 5% 및 1%의 유의 수준으로 Analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 분석하였고 Tukey의 방법으로 사후분석을 실시하였다.

### 결론

1. 제조된 CPP는 45ppi와 60ppi 모두에서 세포의 부착이 잘 일어났고, 세포의 분열도 잘 일어났다. 2가지의 CPP 모두에서 7, 14, 21일째의 세포수는 1일째에 비해 유의성있게 증가하였다( $P < 0.01$ ).
2. 3차원적 구조인 Calcium PolyPhosphate에서 배양한 세포는 24well dish(tissue culture polystyrene)에서 평면적으로 배양된 대조군의 세포에서 보다 염기성 인산효소(Alkaline Phosphatase)를 유의성있게 높게 나타내었다.
3. 주사전자현미경에서 CPP block에 세포들이 잘 부착되어 있었고, 시간이 지남에 따라 세포가 뭉치는 현상을 것을 관찰하였다.
4. Calcium Polyphosphate는 돌연변이 유발성을 보이지 않았다.
5. 이상의 결과로 볼 때 CPP는 골조직을 위한 조직공학의 우수한 지지체가 될 수 있을 것으로 보였다.