

무균돼지뼈를 이용한 복합 세라믹 골지지체의 제조와 세포독성 평가

Preparation and Cytotoxicity Test of Composite Ceramic Bone Scaffold using Gnotobiotic Pig Bone

정종훈*	임애리*	임기택*	정필훈**	홍지향**
정희원	학생희원	정희원	1	정희원
J.H. Chung	A.L. Im	K.T. Lim	P.H. Choung	J.H.Hong

1. 서론

일반적으로 골 결손 부 발생 시 그 부분의 재건은 매우 어려우며, 자가골(autogenous)을 이식하는 것이 가장 좋은 방법이나 그 양이 한정되어 있고, 다른 이차적인 골손 부를 만들기 때문에 완전한 방법이라고 볼 수 없다. 그리고 동종골(allogenic) 이식은 면역학적인 문제를 야기한다. 또, 인공합성 물질은 감염의 우려가 높고 아직까지 장기간의 결과들이 보고되지 않고 있다.(유와 이,1998) 이런 문제점의 대안으로 제기되고 있는, 고분자-세포 구조물에 의한 재건법은 매우 희망적으로 볼 수 있다(Crane et al., 1995, Vacanti et al., 1994). 고분자-세포 구조물을 이용하기 위해서는 세포가 자라고 조직화되기 위한 지지체(scaffold)가 필요한데, 가장 널리 사용되고 있는 것이 합성고분자를 사용한 지지체(scaffold)이다. 현재 가장 많이 사용되는 합성 고분자는 폴리글리콜산(polyglycolide-acid, PGA)과 폴리락트산(poly-lactide acid, PLA) 그리고 이들의 공중합체인 폴리락트-글리콜산(poly-lactide-co-glycolide acid, PLGA)이다. 그러나 PGA와 PLGA는 너무 빨리 분해되고, 다수의 분해산물을 만들기 때문에 염증반응 및 낭종을 일으키며, 분해기간 동안 주변 조직을 산성화시키는 등 골 조직의 재생에 불리한 영향을 미치는 문제점이 있다(유와 이,1998). 또한, 소수성이므로 세포의 배양이 어렵다는 단점이 있다(김과 정, 2004). 이에 친수성이며 불활성인 세라믹 재료의 장점을 지니면서 합성 고분자의 장점인 생체흡수 특성을 동시에 가지는 세라믹 복합체의 개발이 요구되었다.

또한, 현재 돼지 뼈는 요리재료, 천연 유기비료재료, 가축 사료재료 등으로 사용되고 있는 물질로서, 실제 돈육에서 차지하는 생산비 비중에 비해 저급한 용도로 사용되고 있으며, 해당 사용처에서 사용된 후의 폐기물은 1,2차 환경오염을 유발하는 문제점이 있다. 이와 같이 저급 용도로 사용되거나 폐기되는 돼지 뼈를 인체 골 결손 부 재건에 사용할 수 있는, 고 부가가치의 골 구조물 재료와 골 지지체로 가공하는 방법에 대한 연구가 필요하다.

현재, 복합 세라믹 골 지지체의 개발은 연구가 진행되고 있고, 치아인회석(toothapatite, TA)을 이용한 복합 세라믹 골 지지체의 개발이 연구된 바 있다(김과 정, 2004). 또한, 소뼈나 참치 뼈, 대구 뼈 등의 동물 뼈를 이용한 생체 재료 개발을 위한 연구도 보고되고 있다(이 등, 1997). 본 연구에서는 또 다른 골 대체재로서 유용한 재료인 무균 돼지 뼈를 이용하여 골 지지체를 제작하고, 이의 조직적합성 평가를 위한 세포독성 실험을 하고자 한다.

* 서울대학교 바이오시스템·소재학부

** 서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

2. 재료 및 방법

가. Bone Powder의 제조

무균돼지 뼈를 채집하여 과산화수소 용액에 24시간 동안 침지시켜 유기물을 제거하였다. 무균돼지 뼈의 유기물 제거를 위해 1200℃ 소결로에서 2시간 동안 소결한다. 이 때, 전기로 내의 소결 온도변화는 Fig.1과 같다. 소결한 돼지 뼈를 분쇄기(IKA-WERKE A10)에서 분쇄한 후 잔여 유기물질을 제거하기 위해 1시간동안 한 번 더 소결하였다. 소결한 돼지 뼈 가루는 체(Sieve/Shaker, 대한과학 20-500 μm)를 이용하여 입자 크기 별로 선별하였다. 본 연구에서는 150-200 μm 입자크기의 bone powder(B.P)만 사용하였다.

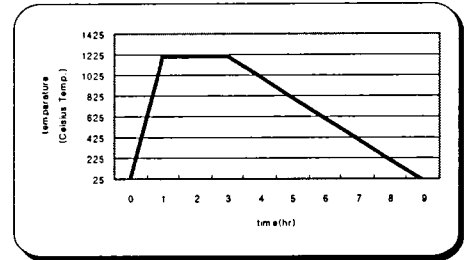


Fig.1 Sintering temperature variation during furnacing. gnotobiotic pig bones

나. 복합 세라믹 골 지지체의 제조

Fig.2은 복합 세라믹 골 지지체의 제조과정을 개략적으로 나타낸 것이다. P(D,L)LA(poly(D,L)lac-tic acid) 0.3g을 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 2ml에 넣고, 12시간동안 밀봉한 채 교반시켜 15 wt%용액을 만들었다. P(D,L)LA와 B.P.의 중량 비율은 1:1로 하였고, NaCl(300-400 μm)은 90wt% 첨가하였다. 형태 형성을 위해 알루미늄 틀을 사용하였으며, -20-40℃ 초저온 냉동고에서 24시간동안 보관하였다. 24시간 후, 이를 37℃, 멸균한 3차 증류수에서 3일간 leaching시켰다. leaching과정은 형태를 형성한 지지체를 물에 담가서 불순물을 제거하는 과정으로, 인체에 해로운 용매인 DMSO와 세포 배양에 나쁜 영향을 끼치는 NaCl을, 용해를 통해 제거하기 위해 필요하다. 이 때, 물갈이는 처음 2번은 1시간간격, 다음 2번은 4시간간격, 그 다음은 6시간 간격으로 하였다. leaching이 끝난 지지체는 데시케이터에서 10시간동안 건조시켰으며, 소독은 70% Ethyl alcohol에 10분동안 넣어 둔 후, PBS(Phosphate buffer saline)로 10분씩 3번 세척하여 잔여 alcohol을 완전히 씻어 낸 다음, 자외선에 24시간동안 노출시켰다.

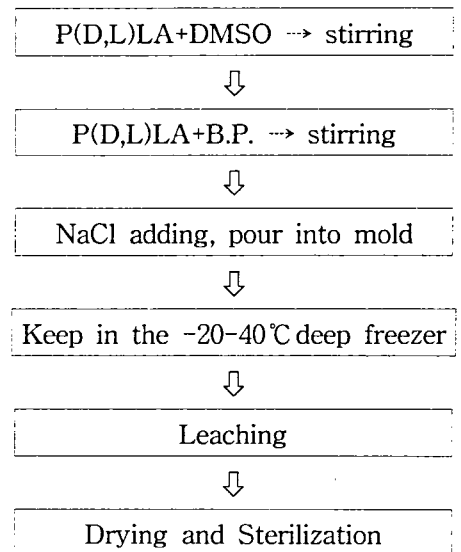


Fig.3 Procedure of P(D,L)LA-Bone Powder scaffold preparation

다. 복합 세라믹 골 지지체의 세포 독성 평가.

본 실험에서 제조한 지지체는 체내에 삽입되는 물질로서, 삽입 후 독성물질이 체액이나 세포의 기질(extracellular matrix)등에 용출(extraction)되어 주변 세포에 나쁜 영향을 줄 수 있다. 따라서 체내 실험 이전 단계로서, 체외에서 먼저 지지체의 용출물(extract)에 의한 독성을 세포 독성 평가를 통해 알아봄으로써 지지체의 조직적합성을 평가해 보았다. 먼저, 신체 내에 0.013g 용량의 지지체가 주입 되었을 때, 주위의 체액 2ml에 용출 되는 독성 물질의 양을 100% 라고 가정하였다. 실험군은 다음과 같다. 대조군은 P(D,L)LA만 첨가된 지지체로 두고, 실험군은 P(D,L)LA와 B.P.의 복합 지지체로 설정하였다. 각각의 군에서 용출물의 농도는 0, 20, 40, 60, 80, 100%로 하고, 각 실험군 당 10번씩 동일한 실험을 시행하여 그 평균값을 해당 결과 값으로 사용하였다. 용출액은, 최종 용액에서 용출물 50%, 배양

액 50%를 넣어서 희석될 것이므로 2배로 농도(0, 40, 80, 120, 160, 200%)로 만들며, 2ml의 배양액에 용출시키는 지지체의 질량은 0, 0.0052, 0.0104, 0.0156, 0.0208, 0.0260g으로 하였다. 용출액은 배양조건과 같은 조건(37℃, 5% CO₂, 95% 습도)에서 용출시킨다.

독성실험은 MTT test로 진행하였으며, 사용한 시약은 MTT(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-(-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide))(M-5655, SIGMA, USA), DMSO(K31902850, MERCK, Germany)이다. MTT test는 살아 있는 세포의 효소 활성에 의해 환원된 Tetrazolium salt의 Formazan을 DMSO같은 유기 용매에 녹여 흡광도(O.D.)를 측정하고, 측정된 흡광도를 비교함으로써 독성정도를 평가하는 실험이다. 실험한 세포는 Dental Pulp Stem Cell(DPSC)이며, 분주 세포 수는 1 well당 15,000개씩 사용하였다. 1 well당 실험 용량은 배양액 100μl와 해당 농도의 용출물 100μl로, 총 200μl로 하였다. 결과 관찰을 위한 흡광도 측정파장은 540nm로 하였다. MTT test의 개략적인 과정인 Fig.3과 같다. MTT 시약은 동일한 배양 조건에서 4시간동안 처리하였다. MTT의 환원작용으로 생긴 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해시켜서 ELISA reader 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig.4는 MTT test실험을 한 모습이다.

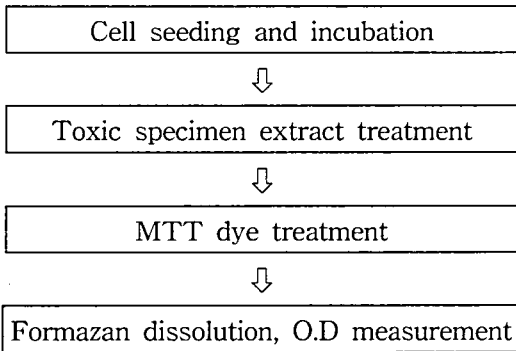


Fig.3 MTT cytotoxicity test procedure of P(D,L)LA-Bone Powder scaffold

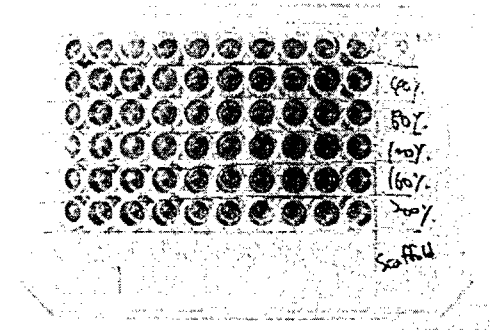


Fig.4 The picture of MTT test plate (experiment at 96well plate)

측정한 흡광도값은 IC₅₀값으로 산출하여 독성평가에 사용하였다. IC₅₀의 정의는 실험의 재료와 목적에 따라 달리 정해질 수 있지만, 본 실험에서는 1 well의 세포가 모두 살아있을 때 보다 생존수가 50% 감소했을 때의 용출농도(%) (50% Concentration Inhibition)를 IC₅₀이라 정의하였다. 생존수가 50%가 되는 시점은 사용한 MTT 시약과 세포 생존수와 관계가 통해 알 수 있다. MTT test 결과 측정되는 흡광도 값은 살아 있는 세포수와 정비례한다. 따라서 생존수가 50%되는 시점은, 분주한 세포가 모두 살았을 때의 흡광도의 절반의 값을 나타내는 지점이라 가정할 수 있다. 따라서 50% Concentration Inhibition을 나타내는 IC₅₀값은, 독성물질을 처리하지 않은 0%에서의 흡광도 값의 0.5배에 해당하는 흡광도 값에서의 용출농도(%)라 정의 하였다. 정의한 내용을 식으로 정리하면 다음과 같다.

$$\begin{aligned}
 \circ \text{ IC}_{50} &= \text{OD for 50\% Concentration Inhibition} , & \circ \text{ OD for IC}_{50} &= \frac{\text{OD for 0\% Extract}}{2}
 \end{aligned}$$

3. 결과 및 고찰

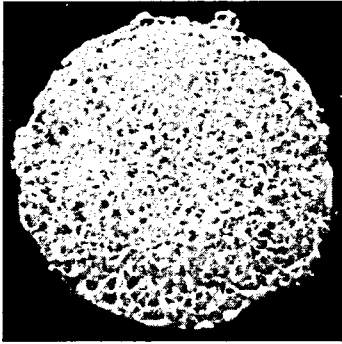


Fig.5 Product of P(D,L)LA-Bone Powder scaffold preparation

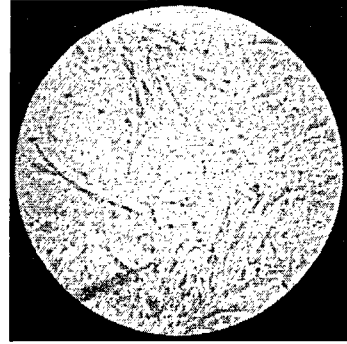


Fig.6 The image of Dental Pulp Stem Cell culture

Fig.5는 완성된 복합 세라믹 골지지체의 모습을 나타낸 것이고, fig.6은 Dental Pulp Stem Cell(DP-SC)를 배양한 모습이다. 완성된 지지체는 육안으로 보기에 큰 공극과 공극률을 가지고 있었으며, 따라서 세포가 자라기 충분한 조건이라고 볼 수 있으므로, 이후 실험을 진행하였다.

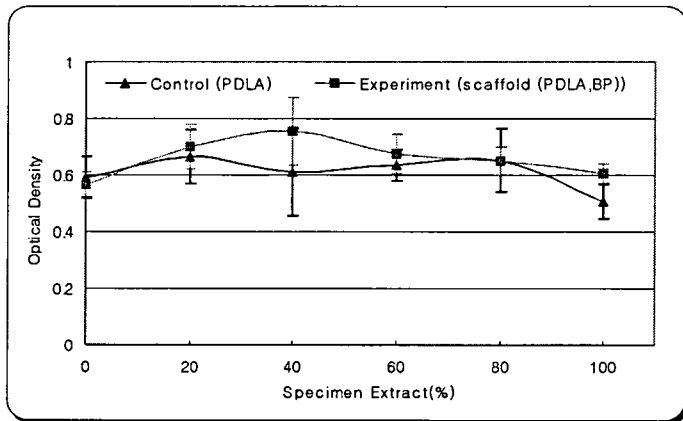


Fig.7 MTT cytotoxicity test result

Fig.7은 독성실험(MTT cytotoxicity test) 결과를 나타낸다. 위의 그래프는 대조군인 P(D,L)LA와 실험군인 지지체 각각의 용출물을 이용하여 독성실험을 실시한 결과이다. 이 결과를 통해 지지체 0.013g을 체내에 삽입하였을 때 2ml 체액에 영향을 줄 수 있는 독성의 정도를 상대적으로 평가할 수 있었다. 결과에 따라, 대조군과 실험군의 0% 용출농도에서의 결과 값이 각각 0.562608, 0.592341이므로 이 두 값의 평균인 0.577475를 0% 용출농도에서의 흡광도라고 정의하고, 이 값의 0.5배에 해당하는 O.D.값에서의 용출농도(%)값을 그래프를 통해 읽어 보면, 100% 용출물을 처리해도 흡광도가 0.288737에 못 미친다는 것을 확인 할 수 있다. 따라서 독성이 비교적 없다고 판단 할 수 있다. 또, 대조군인 P(D,L)LA에 비하여 소폭차이 이긴 하지만 전체적으로 더 큰 값의 흡광도를 나타내고 있는 것을 확인 할 수 있으므로, P(D,L)LA만으로 만든 지지체보다 복합 세라믹 골 지지체가 독성 용출물에 의한 독성은 조금 더 약하다고 판단 할 수 있다.

단, 이 실험의 단점으로는, MTT test의 특성상 절대적인 수치로 독성의 정도를 확인 할 수는 없고 상대적으로 비교하여 비교적 독성이 없다고 판단 할 수밖에 없다는 점을 들 수 있다.

4. 요약 및 결론

○ 현재 가장 많이 사용되는 합성 고분자 중 하나인, P(D,L)LA만 사용한 지지체는 분해 기간 상의 문제와 세포 적합성 등의 문제를 갖고 있기 때문에, 이에 대한 대안으로서 생분해성 복합 세라믹 지지체를 제조하였다. 또, 이에 사용한 세라믹 재료로는 생산 단가에 비해 저렴한 용도로 사용되어, 효율적인 활용방안이 요구 되고 있는 돼지 뼈를 사용하였다.

○ 체외 실험이나 실제 임상적용의 전 단계로서, 생분해성 복합 세라믹 골 지지체의 조직적합성 평가를 위해 세포 독성 평가를 실시하였다. 0.013g용량의 지지체가 체내에 들어갔을 때 체액 2ml에 주는 영향에 대해 상대적인 독성 평가를 시행한 결과, 전혀 독성이 나타나지 않는 것으로 나타났다.

○ 단, 실험의 단점으로는 실험 특성상 상대적인 수치만을 확인 할 수 있으므로, 실제 인체에 주는 독성의 정도를 절대적 수치로 나타낼 수 없다는 단점이 있다.

○ 본 연구는, 체외 실험이나 임상실험의 전 단계 연구로서, 본 연구에서 제조한 지지체의 생체 적합성을 간접적으로 평가해 보는 의미가 있다. 따라서 후속 연구로서, 체외 세포 접착 평가, 임상실험 등이 요구된다.

5. 참고문헌

1. 정중훈, 이원, 정필훈, J. E. Davies. 2004. 골 조직 공학을 위한 치아인회석, 키토산, 시아노 아크릴레이트를 이용한 새로운 생체 흡수성 골 시멘트. 바이오시스템공학. 29(4): 347-456
2. 김은석, 정중훈. 2004. 골 생체 조직 공학을 위한 복합 세라믹 골 지지체의 제조와 생체 역학적 특성. 바이오시스템공학. 29(5): 457-466
3. 유지, 이일우. 1998. 생체 조직 공학, 개념과 응용. 고려의학.
4. 김상현, 김수현, 김영하. 2005. 조직공학용 다공성 스케폴드. polymer science and technology. 16 (4)
5. 박태관, 윤준진. 1999. 생분해성 고분자를 사용한 다공성 구조 지지체. polymer science and technology. 10(6)
6. 서수원, 신지연, 김신훈, 김진국, 길광현. 2004. particulate leaching 기법을 사용한 polymer scaffold 상의 세포증식에 있어서 젤라틴 입자의 효과. 의공학회지. 25(1)
7. 오주선, 김학용, 이세철, 이덕래, 최경은. 2001. poly(p-dioanone) scaffold의 in-vitro특성에 관한 연구. 한국 섬유공학 학회지. 38(7)
8. 이찬우, 배기서. 2002. poly(DL-Lactic acid)/poly(ethylene oxide)을 포함한 블록 공중 합체의 합성 및 특성. polymer. 26(5): 582-588
9. Zhuo Xiong, Yongian Yan, Renji Zhang, Lei Sun. 2001. fabrication of porous poly(L-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. Scripta Meterialia. 45(2001): 773-779
10. Lee, C. K. and Choi, J. S., The Properties of Natural Hydroxyapatite Isolated from Tuna Bone. J. Korean Fish. Soc, 1997, 30(4), 652-659.