

MC3T3-E1 세포에 대한 복합 기계적 자극의 영향

강경신[†] · 이승재^{*} · 조동우^{**}

Effect of complex mechanical stimuli for MC3T3-E1 cells

Kyung Shin Kang, Seung-Jae Lee and Dong-Woo Cho

Key Words : Bioreactor(바이오리액터), Cell(세포), Stimulation(자극)

Abstract

The purpose of this study was to examine the effects of various mechanical stimuli for MC3T3-E1 cells. Among the several mechanical stimulations, we focused on compressive stain and ultrasound. In this study, we developed a bioreactor capable of applying controlled stimuli to scaffolds. PLLA/PCL scaffold was fabricated by using salt-leaching method. We performed dynamic cell culture using pre-osteoblasts MC3T3-E1 cells with 1MHz, 30mW/cm² ultrasound and 10% of compressive strain. Result of CCK-8 analysis at 1, 4, 7, 10 days showed that mechanical stimuli had no significant effect for cell proliferation. However, those stimuli influenced ALP(Alkaline phopatase) activity, which is one of differentiation marker.

1. 서 론

인공지지체 내에서 세포를 배양하여 조직을 재생하는 기술은 근래에 각광받고 있다. 또한 실제 임상 또는 동물 실험에 앞서 인공적으로 생체와 비슷한 환경을 만들어 주어 그에 대한 영향을 연구하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 그러나 지금의 연구는 대부분 생체내의 화학적인 자극에 관한 연구가 주도적으로 이루어 졌다. 하지만 생체 내 자극은 생체신호와 같은 화학적인 자극뿐만 아니라 기계적 자극도 고려해야 할 필요가 있다. 예를 들어 연골의 경우 연골 조직의 기질과 생물학적, 생리학적 관계로 인해 기계적인 자극에 노출되어 있어, 관절의 움직임에 의해 압축력이 작용하기도 하고, 대류에 의한 영양분 이동 등으로 인해 전단력도 받고 있다. 이러한 내, 외부적인 환경을 인위적으로 만들어 줄 수 있다면 일반적인 조직 배양환경 보다는 훨씬 효과적일 수 있다는 사실이 점점 알려지고 있다[1,2].

생체 모방형 기계적 자극에 대한 연구는 활발

히 진행되고 있지만, 아직도 단순 자극에 대한 연구가 대부분이다. 하지만 생체 내에는 다양한 자극이 복합적으로 작용되고 있기 때문에 이에 대한 영향을 밝혀내기에는 부족한 면이 있다. 따라서 본 연구에서는 한 가지 자극이 아닌 두 가지 자극의 복합적인 효과가 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지 알아보려고 한다. 이를 위해 복합적인 기계적 자극을 발생시킬 수 있는 바이오리액터를 제작하였으며, 이를 이용하여 기계적인 자극이 3 차원 MC3T3-E1 세포 배양에서 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미치는지 살펴 보았다.

2. 바이오리액터의 제작

복합 기계적 자극 조건으로는 뼈와 연골조직이 많이 받고 있는 압축력과 의료용 진단 및 치료 기기로 널리 쓰이고 있는 저강도 초음파를 선택하였다. 압축력은 뼈와 연골과 같은 근골격계 생체 조직에서 가장 쉽게 유추해 낼 수 있는 자극이다. 무릎이나 뼈는 몸무게를 지탱하고, 다양한 움직임을 통해 압축력을 받고 있다. 이와 비슷한 환경을 인위적으로 만들어 주기 위해 세포의 3 차원 배양 상태에서 압축력을 가해줄 수 있는 시스템을 제작하였다. 단축 스테이지(AM1-0602-3S, MMT)를 사

† 회원, 포항공과대학교 기계공학과
E-mail : kkscc@postech.ac.kr
TEL : (054)279-5889 FAX : (054)279-2863
* 충남대학교 BK21 메카트로닉스 사업단
** 포항공과대학교 기계공학과

용하여 수 μm 의 구동을 제어할 수 있게 하였고, 각각의 압축 바(bar)는 테플론으로 제작하였다.

또 다른 자극인 저장도 초음파는 의료용 치료 기기로 널리 쓰이고 있고, 생체 내의 세포를 기계적으로 자극할 수 있는 수단으로 알려져 있다. 저장도 초음파는 뼈의 성장, 골절, 근육 조직의 치유 등 손상된 조직의 수복에 효과적임이 입증되어 있고, 특히 골절의 회복 능력에 있어서 세포의 증식을 활발하게 하여 뼈의 유합을 촉진한다는 사실이 보고되고 있다[3,4]. 이를 위해 뼈의 치유에 좋다고 알려진 주파수(1.0~1.5MHz)를 고려하여 디스크 형태의 압전을 제작하였고(Fuji Ceramics Corp, Japan, $\text{\O}20\text{mm}$), Fig. 1 과 같이 수조 아래에 위치시켰다. 따라서 초음파는 압전에서 발생하여 수조의 물을 통해 plate 에 있는 세포에 전달되도록 설계되었다.

디스크 형태로 제작된 압전을 통해 발생하는 저장도 초음파의 강도의 파형을 측정하기 위하여 hydrophone 을 사용하였으며, Fig. 2 는 초음파 압전에서 발생하는 초음파의 intensity 를 측정한 결과이다. 압전에서 나온 초음파는 무질서하게 섞여 있다가 일정한 거리를 지나게 되면 가장 높은 intensity 를 나타내고 그 이후에는 선형적으로 intensity 가 감소한다. 그러므로 최고점 이전에는 wave 가 섞여있어 정확한 intensity 를 얻기 힘들다. 따라서 바이오리액터에서 인공지지체의 위치를 압전으로부터 최고점(45mm) 이후에 고정시키고 실험을 진행하였다.

3. 재료 및 방법

3.1 인공지지체 제조

인공지지체는 Poly(L-lactic acid) (PLLA, Mw 236kDa)와 Poly(caprolactone) (PCL, Mw 65kDa)을 사

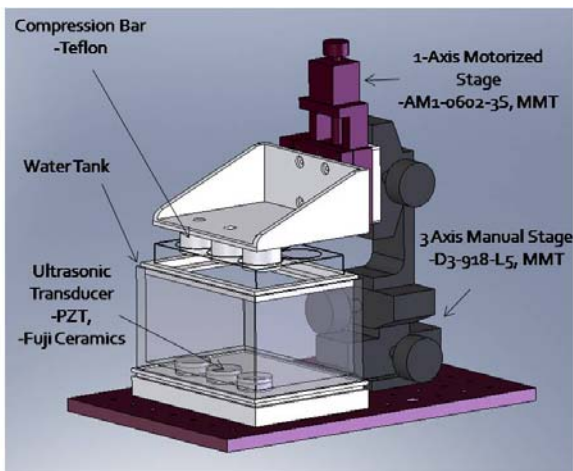


Fig. 1 CAD model of the bioreactor.

용하여 염침출법으로 제작하였다. 먼저 PLLA 와 PCL 을 일정한 비율로 섞고 교반기를 이용하여 클로로포름(Chloroform)에 녹였다. 그리고 다공성 지지체로 제작하기 위해 체(공극 지름 200~300 μm)로 걸러진 NaCl (Samjun Chem. Co., Korea)을 무게 비 10:1 (NaCl : Polymer) 비율로 균일하게 혼합하였다. 혼합물을 적당히 섞은 후 미리 제작된 테플론 몰드에 넣고 24 시간 보관 후, 몰드로부터 이형시켜 물에 넣고 3 일 동안 NaCl 을 제거하였다. 완전히 NaCl 이 제거되면 잔류 용매를 제거하기 위하여, 동결건조기에서 2~3 일 정도 보관하면서 수분을 제거하고, 냉장 보관한다. 이렇게 제작된 PLLA/PCL 인공지지체의 크기는 $\text{\O} 30\text{mm}$, 두께 3mm 이다 (Fig. 3).

3.2 MC3T3-E1 세포의 배양 및 조골세포로의 분화

Pre-osteoblast 인 MC3T3-E1 은 RIKEN Cell Bank(Tsukuba, Japan)에서 구입하였다. 세포 배양을 위해 α -MEM(alpha minimum essential medium, GIBCO, USA)를 사용하였고, 여기에 10% 우태혈청

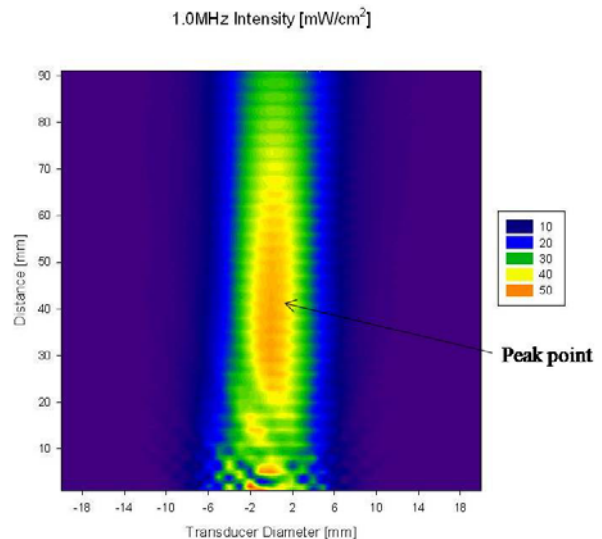


Fig. 2 2D scan image of ultrasound intensity.

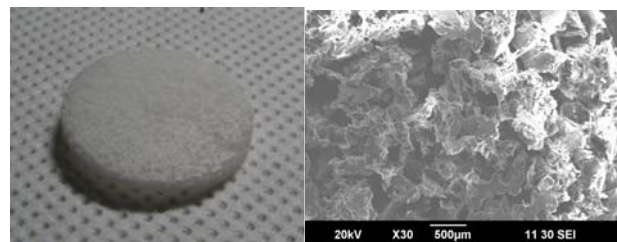


Fig. 3 Photograph of fabricated a PLLA/PCL scaffold (left) and SEM image of a scaffold (right).

(FBS, GIBCO, USA)과 1% 항생제(100 units/ml penicillin 및 100ug/ml streptomycin, GIBCO, USA)를 첨가하였다. 배양된 세포는 3 일에 한번씩 계대 배양하였고, 1~2 회 계대 배양 후 세포를 수확하여 1×10^6 개/지지체의 농도로 인공지지체에 파종하여 증식과 분화를 유도하였다. 그리고 세포가 파종된 지지체는 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 세포의 골분화 유도를 위해 배양액은 배지(α -MEM + 10% FBS + 1% 항생제)에 10nM Dexamethasone(Sigma, USA), 50ug/ml Ascorbic acid, 10mM β -gp 를 첨가한 골분화배지를 사용하였다.

3.3 복합 기계적 자극 구성

압축력과 저항도 초음파 각각에 대한 영향과 둘의 복합적인 영향을 조사하기 위하여 다음과 같이 실험을 하였다. Table 1 에서 볼 수 있는 것처럼 자극의 조건은 총 4 가지 이며, 초음파 자극만을 준 경우 (Condition 1), 초음파와 압축력을 동시에 준 경우 (Condition 2), 압축력만 준 경우 (Condition 3), 아무런 자극을 주지 않은 그룹은 비교군으로 (Condition 4)로 구성되어 있다.

Table 2 에 정리된 것처럼, 압축력 자극은 1Hz, 10%, 20 min/day 의 조건으로 수행하였고, 초음파는 20 min/day, 1 MHz, 30 mW/cm² 으로 실험하였다. 실험 외의 시간에는 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 보관되었다.

3.4 CCK-8 분석

세포 증식률은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Lab., Japan) 을 이용하여 분석하였다. 세포가 파종된 1, 4, 7, 10 일째에 인공지지체를 새로운

plate 에 옮긴 후에, CCK-8 solution 을 넣고 3 시간 동안 세포 배양기에서 배양한다. 배양 후 96 well plate 에 배지 120 μ l 씩 분주한 후, microplate reader 를 이용하여 450nm 에서 흡광도를 측정하였다.

3.5 ALP(Alkaline phosphatase) 활성 측정

MC3T3-E1 세포가 조골세포로 분화하였는지 확인하기 위하여 조골세포에 특이적으로 발현하는 ALP 활성을 측정하였다. ALP 는 조골 세포가 만들어내는 세포외 효소로서, 골분화 마커로 사용되어 골분화 정도를 알 수 있다[5]. 세포 파종 후 7, 10, 14 일째에 배양액을 제거하고 PBS 1 \times 로 세 번 washing 해 준 후 Lysis buffer (0,02% triton X-100, 0,9% NaCl) 용액을 넣어 세포막을 용해시키고, 4°C 에서 30 분간 반응시킨 후 13000 rpm 에서 10 분간 원심분리 한 후 상층액을 분리했다. 분리한 상층액 300 μ l 와 1M TRIS-HCL 500ul, 5nM MgCl₂, 5nM Sodium paranitrophenyl-2-phosphate 100 μ l 와 섞어 37°C에서 30 분 간 반응시키고, 1N NaOH 250 μ l 로 반응을 중단시킨다. 이 용액을 120 μ l 씩 96 well plate 에 분주한 후, 405nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 단백질 정량은 BCA 정량법을 이용하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 CCK-8 분석 결과

각 조건에 따른 세포 자극이 세포 증식에 어떻게 영향을 미치는 지 CCK-8 분석을 통해 관찰하였다. Fig. 4 는 1, 4, 7, 10 일 째의 증식 결과를 보여주고 있다. 증식 결과를 비교해 보았을 때, 초음파와 압축력이 세포 증식에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

Table 1 Set of experiments.

	Stimulation type
Condition 1	Ultrasound
Condition 2	Ultrasound & Compressive strain
Condition 3	Compressive strain
Condition 4	Control

Table 2 Conditions of experiments.

	Compressive strain	Ultrasound
Frequency	1Hz	1MHz
Duration	20min/day	20min/day
Intensity	-	30mW/cm ²
Strain	10%	-

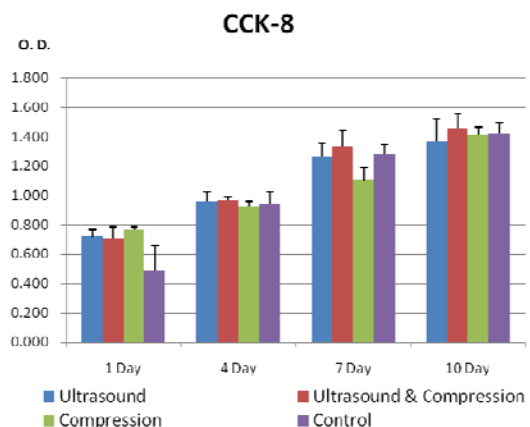


Fig. 4 Proliferation results at 1, 4, 7, 10 day (CCK-8).

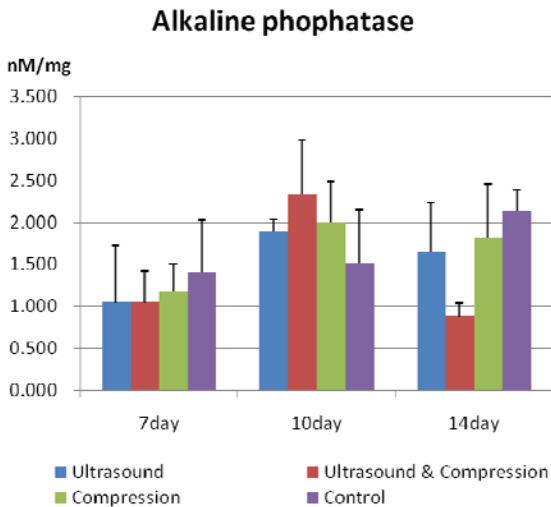


Fig. 5 ALP activities (nM/mg) of MC3T3-E1 cells with incubation time.

4.2 ALP activity

기계적 자극이 인공지지체 내에서 MC3T3-E1 세포의 골분화 유도에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 ALP activity 를 측정하였다. 측정 결과 아무런 자극을 주지 않은 비교군은 서서히 분화가 진행되는 것에 비해, 기계적 자극을 준 모든 그룹에서는 ALP 활성이 10 일째에 활발히 일어나고 있는 것을 알 수 있었다. ALP 가 초기 분화에 활발히 발현되기 때문에 기계적 자극을 준 경우에 분화가 활발하다는 것을 알 수 있었다. 특히 두 자극을 동시에 준 경우, 10 일째의 수치가 가장 높아 세포 분화가 활발히 진행되는 것을 확인할 수 있었다.

5. 결론

본 연구에서는 염침출법으로 제조한 PLLA/PCL 인공지지체에 MC3T3-E1 세포를 파종하고, 제작한 바이옱어क्टर를 이용하여 기계적인 압축력과 저장도의 초음파 자극을 주었을 때 세포의 증식과 분화에 대한 영향을 분석하였다. CCK-8 분석결과에서는 이러한 복합 자극은 세포 증식에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 하지만 ALP 활성도를 통한 세포 분화에 대한 영향은 기계적 자극만을 준 경우에도 ALP 발현이 증가되었으며, 두 자극을 동시에 준 경우에 가장 활발하게 발현되는 것을 확인하였다. 아직까지는 단편적인 조건에 대한 실험과 분석을 수행하였지만 향후 다양한 자극조건에 대한 세포의 배양특성을 다양하게 분

석할 필요가 있다고 사료되고 이를 통해 최적화된 기계적 자극 방법을 찾아낼 수 있을 것으로 기대된다

후 기

이 논문은 2008 년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행한 연구임 (No. R0A-2005-000-10042-0 & No. M10646020003-08N4602-00310).

참고문헌

- (1) 박정훈, 이인환, 이승재, 조동우, 2008, "기계적 자극을 고려한 bioreactor 개발," 대한기계학회 바이오공학부문 춘계학술대회 논문집, pp. 98~99
- (2) Z. Chunqiu, Z. Xizheng, W. Han, H. Daqing, and G Jing, 2006, "Direct compression as an appropriately mechanical environment in bone tissue reconstruction in vitro," Medical Hypotheses, Vol. 67, pp. 1414~1418.
- (3) C. Rubin, M. Bolander, J. P. Ryaby and M. Hadjilargyrou, 2001, "The Use of Low-Intensity Ultrasound to Accelerate the Healing of Fractures," the J. of Bone & Joint Surgery, Vol. 83, No. 2, pp. 259~270.
- (4) H. J. Lee, B. H. Choi, B.-H. Min and S. R. Park, "Effects of Low Intensity Ultrasound Pretreatment on the Chondrogenesis of Rabbit Mesenchymal Stem Cells," Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol 2, No. 1, pp. 50~54.
- (5) Y. K. Lee, J. Song, S. B. Lee, K. M. Kim S. H. Choi, C. K. Kim, R. Z. LeGeros, K. N. Kim, "Proliferation, differentiation, and calcification of preosteoblast-like MC3T3-E1 cells cultured onto noncrystalline calcium phosphate glass," J. of Biomedical Materials, Vol 69A, No. 1, pp. 188~195.