

## 누드 마우스에서 Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) 지지체 내 인체 지방줄기세포의 골성분화

유 결<sup>1</sup> · 조성돈<sup>2</sup> · 변준희<sup>1</sup> · 이종원<sup>1</sup>

가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 예담 성형외과<sup>2</sup>

### Osteogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells within PLGA(Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)) Scaffold in the Nude Mouse

Gyeol Yoo, M.D.<sup>1</sup>, Sung Don Cho, M.D.<sup>2</sup>,  
Jun Hee Byeon, M.D.<sup>1</sup>, Jong Won Rhie, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, <sup>2</sup>Yedam Plastic Clinic

**Purpose:** The object of this study was to evaluate the development of continuous osteogenic differentiation and bone formation after the subcutaneous implantation of the tissue-engineered bone, *in vitro*.

**Methods:** Human adipose-derived stem cells were obtained by proteolytic digestion of liposuction aspirates. Adipose-derived stem cells were seeded in PLGA scaffolds after being labeled with PKH26 and cultured in osteogenic differentiation media for 1 month. The PLGA scaffolds with osteogenic stimulated adipose-derived stem cells were implanted in subcutaneous layer of four nude mice. Osteogenesis was assessed by RT-PCR for mRNA of osteopontin and bone sialoprotein(BSP), and immunohistochemistry for osteocalcin, and von Kossa staining for calcification of extracellular matrix at 1 and 2 months.

**Results:** Implanted PLGA scaffold with adipose-derived stem cells were well vascularized, and PLGA scaffolds degraded and were substituted by host tissues. The mRNA of osteopontin and BSP was detected by RT-PCR in both osteogenic stimulation group and also osteocalcin was detected by immunohistochemistry at osteogenic stimulation 1 and 2 months, but no calcified extracellular deposit in von Kossa stain was found in all

groups.

**Conclusion:** *In vivo*, it could also maintain the characteristics of osteogenic differentiation that adipose-derived stem cells within PLGA scaffold after stimulation of osteogenic differentiation *in vitro*, but there were not normal bone formation in subcutaneous area. Another important factor to consider is *in vivo*, heterologous environment would have negative effect on bone formation as.[p1]

**Key Words:** Adipose-derived stem cell, PLGA scaffold, Osteogenesis

## I. 서 론

지방줄기세포(adipose-derived stem cells)는 골수, 태아 조직이나, 제대혈 등에서 분리한 간엽줄기세포와 같이 골, 연골, 근육, 신경 및 지방 등 다양한 조직으로 분화가 가능하다. 이들은 지방흡입술때 얻은 흡입물에서도 분리가 가능하므로, 줄기세포의 수집 과정이 기존의 골수 내의 간엽 줄기세포를 얻는 과정에 비해 간단하고, 덜 침습적이며, 줄기세포의 양 자체도 많다고 알려져 있어, 기존의 줄기세포 공여부가 가지는 단점을 극복할 수 있는 또 다른 줄기세포로 제시되고 있다.<sup>1-5</sup>

최근 PLGA 지지체를 이용한 골모세포의 삼차원적 배양으로 골형성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며,<sup>6,9</sup> Cowan 등이 쥐의 지방간질조직의 줄기세포를 PLGA 지지체에 분주하여 두개골 결손부위에서 성공적으로 골성분화시킬 수 있었다고 보고하였다.<sup>10</sup>

저자는 인체 지방줄기세포를 PLGA 지지체 내 부착시켜 시험관 내에서 우선 골성분화 유도시킨 후 누드 마우스의 피하에 이식하여 피하조직에서도 지속적인 골성분화 및 골형성이 이루어지는지 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 재료

1) PLGA 지지체

실험에는 85 : 15 PLGA 중합체(MW: 120000 - 140000,

Received July 20, 2006

Revised November 2, 2006

**Address Correspondence:** Jun Hee Byeon, M.D., Department of Plastic Surgery, St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 62 Youido-dong, Youngdeungpo-gu, Seoul 150-713, Korea. Tel: 02) 3779-2047 / Fax: 02) 780-9167 / E-mail: byeon@catholic.ac.kr

\* 본 논문은 2005년 제 59차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 포스터 발표되었음.

\* 본 논문은 가톨릭대학교 성모병원 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

Alkermes, Cincinnati, OH)를 사용하였다. 스폰지 구멍 크기를 조절하기 위하여 Methyl chloroform에 PLGA를 녹인 용액에 200 - 300  $\mu\text{m}$  크기의 sodium bicarbonate 입자를 섞어 실리콘 틀에 굳히고, 동결건조 시킨 후, 50% 알코올에서 발포시켜 구멍 크기가 200 - 300  $\mu\text{m}$ 이고, 직경 10 mm, 높이 2 mm의 원반 형태로 지지체를 제작하였다. 수분 흡수율을 높이고 지지체를 소독하기 위해 30분간 ethanol에 담근 뒤, phosphate buffered saline(PBS)용액을 1시간 동안 3번 갈아주고, 다시 그 이후 3시간 동안 2번 PBS solution을 갈아주어 지지체내의 ethanol을 제거하였다.

## 2) 배양액 및 골성분화 유도 배양액

a. 일반 세포배양액(complete media)은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco/BRL, Grand Island, NY)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum (FBS; Gibco/BRL))과 항생제와 항진균제 용액(antibiotic/antimycotic solution, 1X)을 넣어 만들었다.

b. 골성분화 유도 배양액(osteogenic differentiation media)는 일반 세포배양액에 0.1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 50  $\mu\text{M}$  ascorbate-2-phosphate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate을 넣어 만들었다.

## 3) 실험동물

동물은 생후 6주된 체중 약 17g의 누드 마우스(Biogm Co., Seoul, Korea)의 수컷을 4마리 사용하였다.

## 나. 연구방법

### 1) 실험군

a. 대조군(일반 세포배양액 군): 시험관 내(*in vitro*)에서 1개월간 일반 세포배양액(complete media)으로 배양한 PLGA 지지체에 부착시킨 지방줄기세포를 누드 마우스에 이식하여 1개월 및 2개월 동안 사육한 군.

b. 분화유도군: 시험관 내에서 1개월간 골성분화 배양액(osteogenic differentiation media)으로 배양한 PLGA 지지체에 부착시킨 지방줄기세포를 누드 마우스에 이식하여 1개월 및 2개월 동안 사육한 군.

### 2) 실험방법

#### a. 지방줄기세포의 분리 및 증식

지방 흡입을 통해 얻은 흡입된 지방조직에 0.05% type I collagenase(Sigma)넣고 배양기(37°C/5% CO<sub>2</sub>)에서 진탕하였다. DMEM과 10% fetal bovine serum을 섞어 효소반응을 중화시킨 다음, 50 ml의 튜브에 넣고 원심분리(1,000 rpm, 5 min)를 시행하여 줄기세포를 수집하였다. 100  $\mu\text{m}$  구경의 나일론 그물망으로 거른 다음 이를 일반 세포배양

액이 담긴 배양 용기에 분주하고 37°C/5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 세포가 단일층을 완전히 이루면 trypsin-EDTA(Gibco/BRL)로 처리하여 날개의 세포로 분리시킨 후, 세 차례의 계대배양(subculture)하여 충분한 양의 세포를 얻었다.

#### b. 지방줄기세포의 표지(labeling)

지방줄기세포의 표지를 위해서 PKH26 fluorescent cell linker kit(Sigma)<sup>11</sup>을 이용하였다. 먼저 trypsin-EDTA로 처리하여 날개의 세포로 분리시킨 후, 혈청없는 배양액으로 세척하고 원심분리(1,000 rpm, 5 min)하여 침전된 세포를 수집하였다. 수집된 세포를 Diluent C 1 ml에 부유시키고, 키트 내의 PKH26 염색 용액 1 ml를 첨가하여 실온에서 5분간 방치 후, 2 ml의 우태아 혈청(fetal bovine serum)을 추가하고 1분간 방치한 다음 배양액 4 ml를 첨가하였다. 그 후, 세포를 원심분리하고 혈청없는 배양액으로 3회 세척하였다.

#### c. PLGA 지지체 내 세포 부착 및 골성분화 유도

지방줄기세포 4 × 10<sup>5</sup>개/ml 농도의 세포 부유 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 지지체 위에 떨어뜨린 후 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 2시간 동안 유지시켜 세포가 지지체 내로 들어가서 부착되게 한 다음 일반 세포배양액을 넣고 1일간 배양 후, 대조군의 경우는 일반 세포배양액으로, 실험군의 경우는 골성분화 유도 배양액으로 1개월간 배양하였다. 배양액은 3일마다 교체하였다.

#### d. 생체 이식 및 표본 채취

누드 마우스를 ketamin(125 mg/Kg)으로 복강 내 주사하여 마취한 후 복와위로 고정하고 배부를 알코올로 소독한 후 배부에 4군대를 적절한 크기로 절개하였다. 피부밑 근육층(panniculus carnosus) 하방에 스폰지가 들어갈 수 있을 공간을 박리한 후 일반 세포배양액으로 배양한 지방줄기세포를 가진 PLGA 지지체와 골성분화 유도 배양액으로 배양한 지방줄기세포를 가진 PLGA 지지체를 각각 2개씩 총 4개를 이식하고 창상을 봉합하였다. 실험 1개월, 2개월째에 각각 2마리의 마우스를 안락사시켜 표본을 채취하였다.

### 3) 검사 방법

#### a. 공초점 현미경 관찰

채취한 표본을 조직 틀에 넣고, 동결 고정액(Sakura, Torrance, CA)에 표본이 잠길 정도로 넣은 다음 1시간 동안 방치하고, -20°C에서 얼려서, 5  $\mu\text{m}$  두께의 절편을 slide에 부착하였다. 증류수를 이용하여 동결 고정액을 제거하

고 봉입한 후, 공초점 현미경(confocal microscope, MRC 1024, Bio-Rad Laboratories Inc., Hertfordshire, U.K.)을 이용하여 PKH26으로 표지된 세포를 관찰하였다.

b. 병리조직학적 검사

채취한 표본을 10% neutral-buffered formalin에 고정하고, 파라핀에 포매한 후, 5µm 조직절편을 얻었다. 세포들의 양상과 조직 형성을 보기 위하여 Hematoxylin and eosin염색을 실시하였고, 골분화의 최종 단계인 세포외 기질의 석회화를 확인하기 위해서 von Kossa 염색을 실시하였다. von Kossa염색 방법은 탈파라핀 후 수세하고, 5% silver nitrate수용액에 30분간 반응시킨 후 증류수로 3회 수세하고 증류수 내에서 직사광선에 20분간 노출시키고 나서 증류수로 수세한다. 5% sodium thiosulfate용액서 10분간 정착시키고, nuclear fast red용액에 5분간 대조염색을 실시하고 증류수로 수세하고 알코올로 탈수한 다음 봉입하였다. 완성된 슬라이드는 광학 현미경을 사용하여 관찰하였다.

c. 면역조직화학적 검사

5µm의 파라핀 절편을 slide에 붙여서 xylene에서 탈파라핀 과정과 알코올에서 함수 과정을 거친 후 수세하였다. 조직 내 혈구에 존재하는 내인성 peroxidase활성을 줄이기 위해 3% hydrogen peroxide에서 15분간 반응시켰다. 비특이적인 결합은 10% horse serum으로 차단하였다. Osteocalcin의 일차 항체인 rabbit anti-osteocalcin(Chemicon International, Inc., Temecula, CA)을 가진 10% horse serum 내에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 3분간 2회 세척한 다음 biotin으로 표지된 이차 항체 biotinilated goat anti-rabbit Ig G(Biosource International, Inc., Camarillo, CA)를 실온에서 30분간 반응시켰다. 이차 항체 반응액을 세척 후 peroxidase와 avidin혼합제 용액(ExtrAvidin-peroxidase (Sigma))으로 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS로 세척 후 3,3-diaminobenzidine tetra hydrochloride(DAB peroxidase substrate, Sigma)로 염색하였고, Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 완성된 슬라이드는 광학현미경을

사용하여 관찰하였다.

d. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

골성분화를 나타내는 지표인 bone sialoprotein(BSP)과 osteopontin의 발현 유무를 확인하기 위해 RT-PCR을 시행하였다.

표본을 분쇄 후 TriZol용액(InvitrogenTM, Carlsbad, CA)을 이용하여 RNA를 수집한 뒤, MMLV-역전사효소(Invitrogen™)를 사용하여 oligo dT primed cDNA를 수집하였다. 중합 효소 연쇄 반응은 OLIGO Primer Analysis Software를 사용하여 적절한 온도를 계산하여 시행하였으며, 실험에 사용된 유전자 특이 시발체는 Table I과 같다.

III. 결 과

가. Confocal microscope 소견

모든 군에서 붉은 형광색으로 발현되는 세포가 PLGA 지지체 내에서 관찰되었으며 이식된 지방줄기세포가 생체 이식 1개월, 2개월 후에도 생존해 있었다(Fig. 1).

나. 병리조직학적 소견

1) H&E 염색

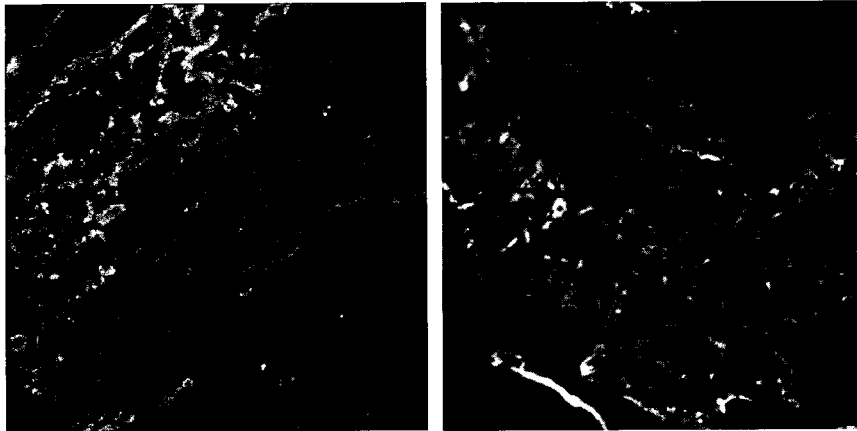
모든 군에서 PLGA 지지체 안쪽으로 자라 들어간 신생 혈관이 관찰되어 이식체가 생착된 소견을 보였으며, 대조군 및 분화유도군 모두 1개월군보다 2개월군에서 단위 현미경 영역(visual field) 내 PLGA가 차지하는 부분이 감소하여 PLGA가 흡수되는 양상을 보였다. 그러나 각 군 간에는 지지체의 흡수 차이 이외의 다른 차이는 보이지 않았다(Fig. 2).

2) von Kossa 염색

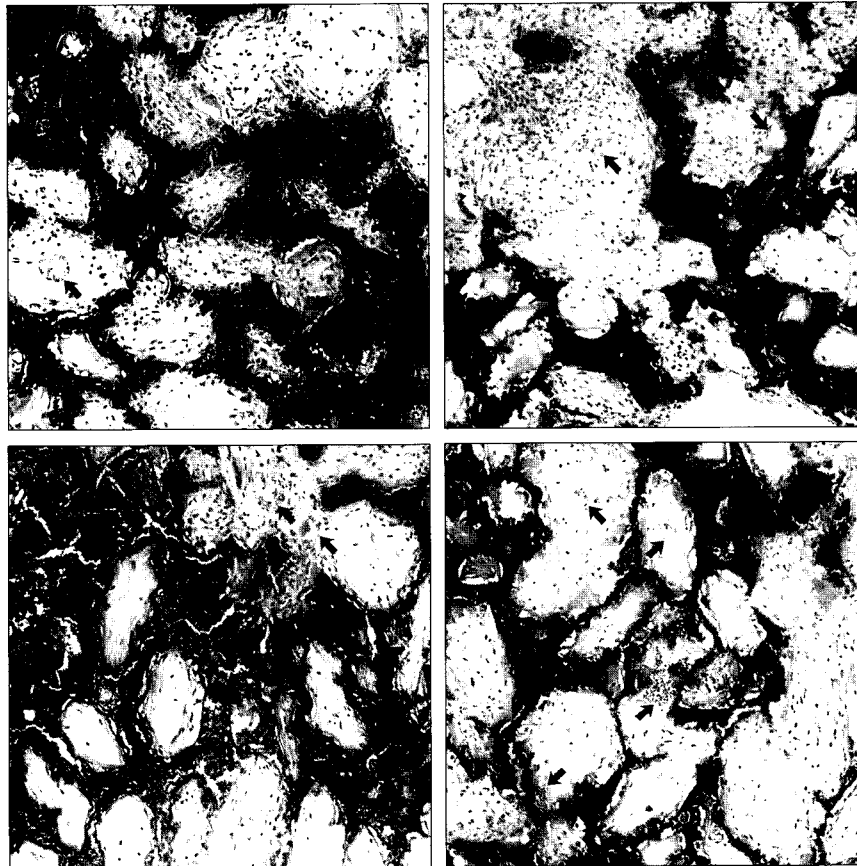
대조군과 분화유도군의 1개월 및 2개월의 표본에서 실험기간 동안 검은색의 결절이 관찰되지 않아, 모든 군에서 세포외 기질의 석회화 침착은 발견되지 않았다(Fig. 3).

Table I. Name and Nucleotid Sequence of the Primers

Primer	Sequence	Base pairs
BSP sense	TCAGCATTTTGGGAATGGCC	657
BSP antisense	GAGGTTGTTGTCTTCGAGGT	
Osteopontin sense	CCAAGTAAGTCCAACGAAAG	400
Osteopontin antisense	GGTGATGTCCTCGTCTGTA	
β-actin sense	GCCCCTCCATCGTCCACCGC	493
β-actin antisense	GGGCACGAAGGCTCATCATT	



**Fig. 1.** Confocal microscopic findings of PLGA scaffold with adipose-derived stem cells which were implanted in the nude mouse for (Left) 1 month and (Right) 2 month. Implanted adipose-derived stem cells in PLGA scaffold which were stained with PKH 26 were observed as red fluorescent color.

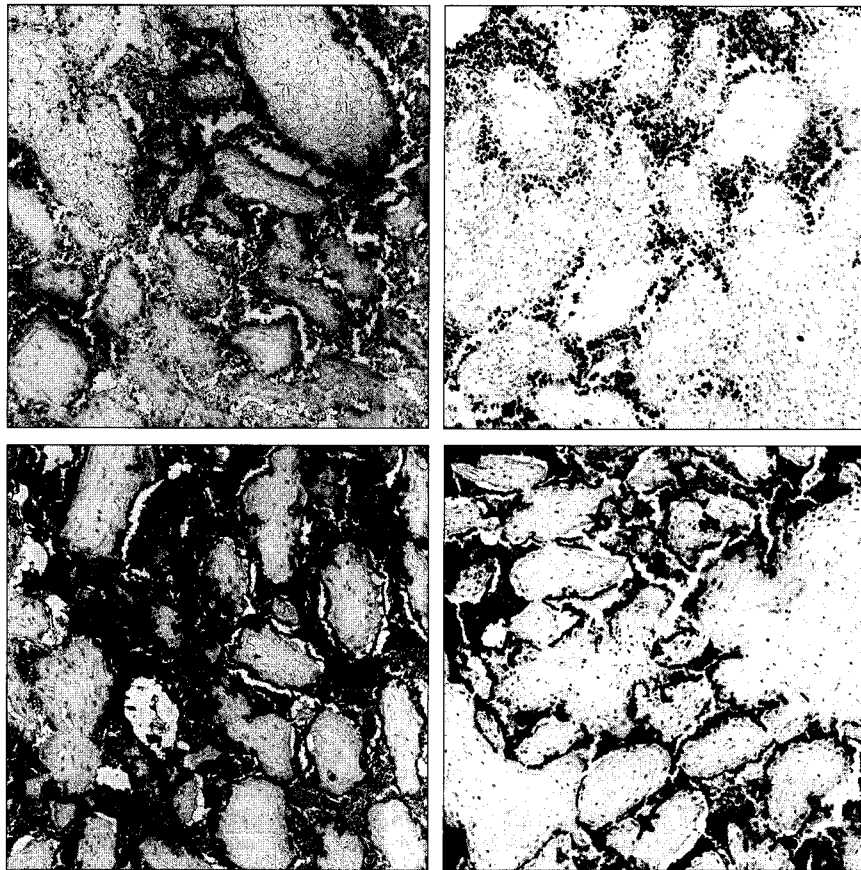


**Fig. 2.** Histologic findings of PLGA scaffold with adipose-derived stem cells which were implanted in the nude mouse(H & S,  $\times 200$ ). Blood vessels (arrows) were seen in PLGA scaffold of control group((Above, left) 1 month group and(Above, right) 2 month group) and osteogenic stimulation group ((Below, left) 1 month group and (Below, right) 2 month group). No difference among groups was seen except finding of more absorption of PLGA in (Right) 2 month groups than that of (Left) 1 month groups.

#### 다. 면역조직화학 소견

골성분화의 표식자인 osteoclastin을 가진 세포가 갈색으

로 발견되도록 면역조직화학법을 이용하여 염색한 결과 대조군에서는 갈색으로 발견되는 세포는 발견되지 않았



**Fig. 3.** Histologic findings of PLGA scaffold with adipose-derived stem cells which were implanted in the nude mouse (von Kossa stain,  $\times 200$ ). There was no evidence of osteocalcification in control group of (Above, left) 1 month, (Above, right) 2 month and osteogenic stimulation group of (Below, left) 1 month and of (Below, right) 2 month.

다. 그러나 분화유도군에서는 1개월째 일부에서 세포질이 매우 미약한 갈색으로 염색되는 세포를 볼 수 있었고, 2개월째에서는 세포질이 갈색으로 염색되는 세포들이 다발적으로 존재하였다(Fig. 4).

#### 라. BSP와 osteopontin의 발현

대조군에서는 1개월, 2개월 공히 전기영동에서 BSP(657 bp)와 osteopontin(347 bp)의 밴드가 보이지 않은 반면, 분화유도군에서는 BSP(657 bp)와 osteopontin(347 bp)의 밴드가 1개월 및 2개월 표본에서 모두 발현되었다(Fig. 5).

### IV. 고 찰

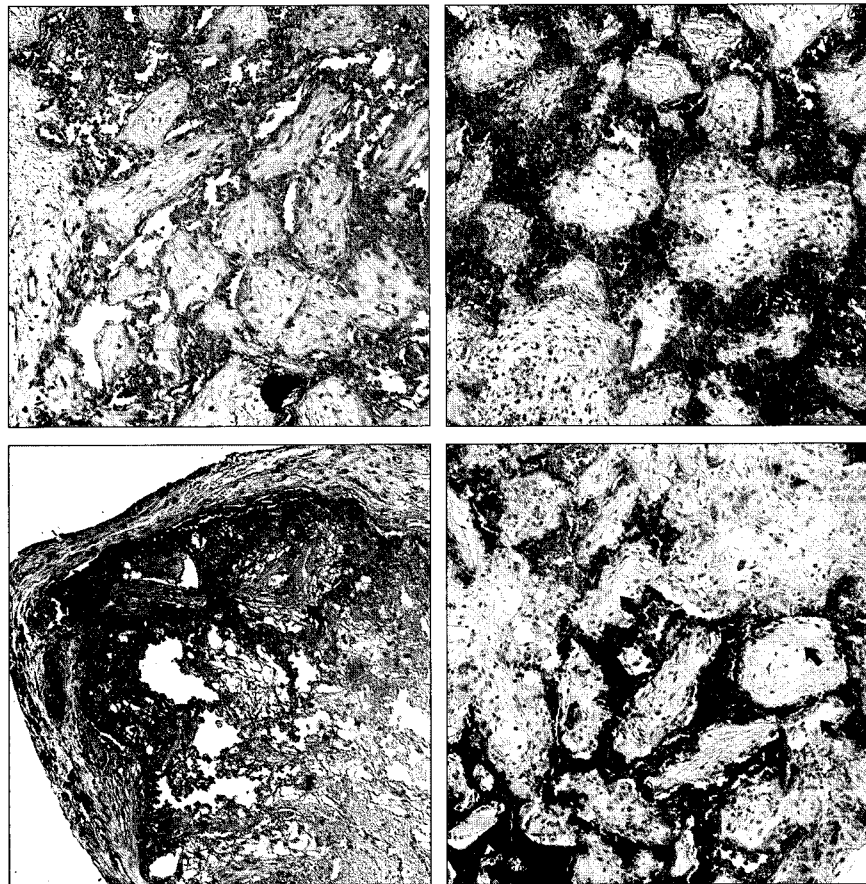
최근들어 Zuk 등과 Huang 등에 의해 지방조직에도 골, 연골, 근육, 지방 등으로 분화가 가능한 줄기세포가 있다는 것이 알려졌는데,<sup>1,24</sup> 지방줄기세포는 기존의 골수 내의 간엽 줄기세포에 비해 그 수집 과정이 간단하고, 공여부 이환을 적게 남기며, 골수에 비해 더 많은 줄기세포를 가

지고 있고,<sup>3</sup> 지방층은 몸 전체에 분포하고 있기 때문에 반복적으로 많은 양의 채취가 가능하며, 배아 줄기세포가 가지고 있는 윤리적인 문제가 없다는 장점이 있다.

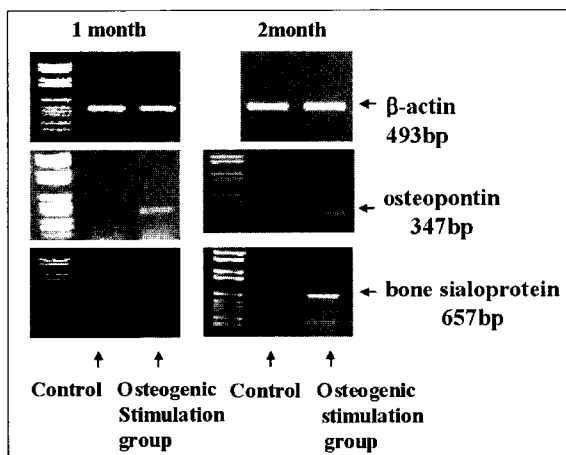
지방줄기세포를 이용하여 골조직으로 분화시키는 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 주로 시험관 내에서의 2차원적인 배양을 중심으로 이루어져 왔다.<sup>1-5,12</sup> 그러나 임상에서의 골결손은 3차원 형태로 나타나기 때문에, 지방간질조직에서 추출한 줄기세포로부터 분화시킨 골조직을 임상에서 적용하기 위해서는 골결손의 모양으로 주조가 가능한 3차원적 지지체에서 골조직으로의 분화 여부를 밝혀내는 것이 필요하다.

3차원적 지지체로는 poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)를 비롯하여, polylactic acid(PLA), polyglycolic acid(PGA), chitosan 등이 있는데, 이들 지지체는 다공성 구조로 제작 가능하여 혈관이 내증식(ingrowth) 할 수 있고, 생체 적합성이 좋으며, 결손 부위의 모양에 맞게 주조가 가능하고, 생체 분해성이 좋다는 장점이 있다.

이들 중 어느 지지체가 지방간질조직에서 유래한 줄기



**Fig. 4.** Immunohistochemistic findings for osteoclastin of PLGA scaffold with adipose- derived stem cells which were implanted in the nude mouse ( $\times 200$ ). There were no stained cells in PLGA scaffold of control group ((Above, left) 1 month and (Above, right) 2 month). A little cells were slightly stained (arrows) in osteogenic stimulation group of (Below, left) 1 month, whereas many cells were stained (arrows) in osteogenic stimulation group of (Below, right) 2 month.



**Fig. 5.** Results of RT-PCR analysis for mRNA of BSP and osteopontin of adipose-derived stem cells with PLGA scaffold which were implanted in the nude mouse for 1 month and 2 month. Expression of mRNA of BSP and osteopontin were noted in osteogenic stimulation groups of 1 month and 2 month, but expression were not in control groups.

세포의 골성 유도에 더 우수하다는 연구는 아직 발표된 바가 없으나, Ishaug 등과 Yang 등은 각각 3차원적 PLGA 지지체에 쥐와 인간의 골모세포를 분주한 뒤 골성분화시켰을 때 PLGA 지지체가 골모세포의 분화 및 기질의 무기질화에 안정적으로 작용하였다고 했으며,<sup>6,8</sup> Kim 등은 dexamethasone과 ascorbate-2-phosphate를 함유한 PLGA 지지체가 골수 간엽세포의 골성분화를 촉진하였다고 하였다.<sup>9</sup>

또한 Lee 등은 쥐의 부고환 지방조직에서 추출한 줄기세포를 PGA 섬유로 만든 3차원적인 지지체내에 이식하여 생체 내에서 골성분화가 이루어짐을 보고하였고,<sup>13</sup> 최근에는 Cowan 등이 쥐의 서혜부 지방조직에서 수집한 줄기세포를 3차원적인 PLGA 지지체에 분주한 뒤, 두개관 결손 (calvarial defect) 부위에 이식하여 막성내 골화(intra-membranous ossification)가 이루어진다고 보고하였으나,<sup>10</sup> 인체 지방 간질 조직에서 추출한 줄기세포를 시험관 내 또는 생체 내에서 3차원적 지지체에 배양하여 골조직

으로 분화시킨 연구는 아직까지 발표된 것이 없다. 저자는 인체 지방간질조직에서 추출한 줄기세포를 시험관 내에서 2차원적 배양 뿐 아니라 3차원적 지지체에 배양한 예비실험에서 PLGA 지지체내 지방유래 줄기세포가 안정적으로 증식, 골아세포로 분화함으로써, 시험관 내에서 골성분화가 이루어짐을 확인하였다. 골성분화는 2주째부터 나타났으며, 4주째에는 충분한 골성분화가 일어났다. 이에 인체 지방 간질조직에서 추출한 줄기세포를 3차원적 지지체에서 실험관 내에서 충분히 골성분화를 유도한 후 누드 마우스의 생체 내에 이식하여 골형성을 유도하고자 하였다. 생체 내 이식 후 줄기세포의 골성분화를 알아보기 위해 골성분화의 조기 표식자인 osteopontin과 후기 표식자인 bone sialoprotein의 m-RNA를 RT-PCR을 통해 측정하였는데, 생체 실험 1, 2개월째 표본의 RT-PCR 결과 분화유도를 하지 않았던 대조군에서는 발현되지 않은 반면, 시험관 내에서 1개월간 골성분화 유도를 실시한 군에서는 조기 표식자인 osteopontin과 후기 표식자인 bone sialoprotein이 생체 내 1개월 및 2개월의 표본에서 공히 발견되었는데 이는 골성분화가 지속되고 있음을 의미하며, 골성분화를 시작하는 세포와 골성분화를 완성해 가는 세포들이 뒤섞여 있음을 생각할 수 있으나, 이는 정량분석이 아닌 정성분석인 RT-PCR의 결과이므로, 이에 대한 보다 정확한 판단을 위해서는 정량분석의 연구가 추가로 필요할 것으로 생각된다.

Osteocalcin은 골성분화가 이루어져 대사가 왕성해진 골아세포에서만 분비되는 후기 골형성 지표로, bone sialoprotein과 함께 골성분화에 특이적인 표지자인데,<sup>2</sup> Lee 등은 지방줄기세포를 PGA에 이식하여 골성유도 후 쥐의 두개골에 근접하여 이식하여 면역조직화학 검사를 실시한 결과 4주에는 음성이었으나, 8주에서는 골성유도 군에서 osteocalcin에 양성으로 발현되었다고 하였다.<sup>13</sup> 본 연구에서도 분화유도를 하지 않은 대조군에서는 전혀 발현이 되지 않은 반면, 분화유도를 실시한 군에서는 1개월의 표본에서는 약한 정도의 발현을 보였고, 2개월의 표본에서는 뚜렷한 발현을 보인 것으로 보아 시간이 갈수록 확실히 더 많은 세포가 골세포로 분화가 일어났음을 시사하였다. 또한 이식 전 지방줄기세포를 PKH26으로 표지하여 이식한 세포가 누드 마우스 내에서 계속 생존하는지를 확인하였고, 숙주로부터 이동한 세포가 아님을 확인하였다. 그러나 골성분화의 최후기에 나타나는 세포의 기질의 무기질화(mineralization)를 확인하기 위해 세포의 기질의 칼슘 침착을 알아보는 von Kossa 염색에서 검은색 결정로 나타나는 세포의 기질의 석회화는 모든 군에서 관찰할 수 없었다.

이상의 결과로 PLGA를 지지체로 한 생체공학 구조물

속의 골성분화 유도된 인체 지방줄기세포는 생체 내에서도 골성분화의 분자 생물학적 특성은 지속됨을 확인할 수 있었다. 그러나 세포의 기질의 석회화는 이루어지지 않아 완전한 골형성은 되지 않았는데, 이는 피하조직에 이식함으로써 주위 환경이 지속적인 골유도 자극을 주지 못하는 것이 원인으로 생각된다.

앞으로 생체 내 필요한 어느 곳에서나 골형성을 유도하기 위해서는 지속적으로 골유도를 할 수 있는 이식한 구조물 주위 환경에 대한 연구와 생체 내 골유도(osteoinduction) 및 골전도(osteoconduction) 양상에 대한 연구 등 보다 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

지방줄기세포를 시험관 내 PLGA삼차원지지체 내에서 골분화를 유도한 후 생체 이식하여 특이 골유도 물질이 없이 골성분화와 그 골 특성이 지속되는지 알아보았다. 그 결과, 생체 내 1개월, 2개월 군 모두에서 BSP와 osteopontin mRNA의 발현 및 면역조직화학 검사에서 osteocalcin의 발현이 있었지만, von Kossa 염색에서 석회화 침착은 없었다. 골성분화 유도된 인체 지방줄기세포를 가진 PLGA 지지체는, 지지체 내 세포가 생체 내에서도 분화된 특성은 유지하지만, 골조직으로 발전하지 못했다. 이는 피하에 이식함으로써 생체 내 이종 환경이 세포들의 기능 발휘에 영향을 미친 것으로 생각된다.

결론적으로 시험관내에서 유도된 조직공학적 골형성 조직은 생체내의 골분화유도물질의 지속적인 자극이 없이는 골형성이 지속되지 못한다는 사실을 의미하며 분자 생물학적 특성은 생체 내에서도 지속적으로 유지됨을 알 수 있었다.

## REFERENCES

1. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211, 2001
2. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279, 2002
3. Drago J, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P: Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21: 622, 2003
4. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, Benhaim P: Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 109: 1033, 2002

5. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T: Chondrogenic and osteogenic differentiation by adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nippon Med Sch* 71: 240, 2004
6. 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 Mater Res* 36: 17, 1997
7. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG: Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 19: 1405, 1998
8. Yang XB, Roach HI, Clarke NM, Howdle SM, Quirk R, Shakesheff KM, Oreffo RO: Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone* 29: 523, 2001
9. Kim H, Kim HW, Suh H: Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 24: 4671, 2003
10. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT: Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 22: 560, 2004
11. Horan PK, Slezak SE: Stable cell membrane labeling. *Nature* 340: 167, 1989
12. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM: Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7: 729, 2001
13. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Nanda D, Grant RT, Breitbart AS: Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50: 610, 2003