

## 백서의 두개골 결손 모델에 있어 지방유래 줄기세포가 탈회골의 골유도에 미치는 영향

허찬영<sup>1</sup> · 이은혜<sup>1</sup> · 서석진<sup>2</sup> · 은석찬<sup>1</sup> · 장 학<sup>1</sup> · 백룡민<sup>1</sup> · 민경원<sup>1</sup>

서울대학교 의과대학 성형외과학교실·재생의학 연구소<sup>1</sup>, 한스바이오메드<sup>2</sup>

### Effect of Murine Adipose Derived Stem Cell(ADSC) on Bone Induction of Demineralized Bone Matrix(DBM) in a Rat Calvarian Defect Model

Chan Yeong Heo, M.D.<sup>1</sup>, Eun Hye Lee, B.S.<sup>1</sup>,  
Seog Jin Seo, Ph.D.<sup>2</sup>, Seok Chan Eun, M.D.<sup>1</sup>,  
Hak Chang, M.D.<sup>1</sup>, Rong Min Baek, M.D.<sup>1</sup>,  
Kyeong Won Minn, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plastic Surgery Research Institute, Department of Plastic Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University, <sup>2</sup>Hans Biomed Daeduk Institute Seoul, Korea

**Purpose:** Adipose tissue-derived stem cells(ADSC) has an osteoconductive potential and demineralized bone matrix(DBM) is an osteoinductive material. A combination of DBM and ADSC would probably create osteoinductive properties. The purpose of this study is to determine the effect of the combination of DBM and ADSC mixture on healing of rat calvarial defect.

**Methods:** Thirty adult male Sprague-Dawley rats were randomized into 3 groups(n=10) as 1) Control, 2) DBM alone, 3) DBM with ADSC mixture. DBM with ADSC mixture group has had a 3-day preculture of ADSC from groin fat pad. An 6 mm critical size circular calvarial defect was made in each rat. Defect was

implanted with DBM alone or DBM with ADSC mixture. Control defect was left unfilled. 6 and 12 weeks after the implantation, the rats were sacrificed and the defects were evaluated by histomorphometric and radiographical studies.

**Results:** Histomorphometric analysis revealed that DBM with ADSC mixture group showed significantly higher bone formation than DBM alone group( $p<0.05$ ). Although radiographs from DBM alone group and DBM with ADSC group revealed similar diffuse radiopaque spots dispersed throughout the defect. Densitometric analysis of calvarial defect revealed DBM with ADSC mixture group significantly higher bone formation than DBM alone( $p<0.05$ ). There was correlation of densitometry with new bone formation(Spearman's correlation of coefficient=0.804, 6 weeks, 0.802, 12 weeks).

**Conclusion:** The DBM with ADSC mixture group showed the best healing response and the osteoinductive properties of DBM were accelerated with ADSC mixture. It will be clinically applicable that DBM and ADSC mixture in plastic and reconstructive surgery, such as alveolar cleft and congenital facial deformities that bone graft should be required.

**Key Word:** Adipose tissue-derived stem cells(ADSC), Demineralized bone matrix(DBM), Bone induction

Received July 11, 2008  
Revised July 28, 2008  
Accepted September 8, 2008

**Address Correspondence:** Chan Yeong Heo, M.D., Ph.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University Bundang Hospital, 300 Gumi-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-707, Korea. Tel: 031) 787-7222 / Fax: 031) 787-4055 / E-mail: lionheo@snu.ac.kr

\* 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수 연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(R11-2005-065).

\* This work was supported by the SRC/ERC Program of MOST/KOSEF (R11-2005-065) through the Intelligent Textile System Research Center (iTRC) at Seoul National University.

\* 본 논문은 2007년 한국생체재료학회 학술대회에서 구연 발표되었음.

\* 본 논문은 2007년 Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting (TERMIS-AP)에서 구연 발표되었음.

### I. 서론

간엽줄기세포와 같이 지방유래줄기세포(adipose tissue-derived stem cells) 또한 골, 연골, 근육, 신경 등으로의 분화가 가능하며 줄기세포의 획득 과정에 있어 성형외과 의사에게 익숙하다는 점과, 덜 침습적이며 실험 및 임상적용에 있어 충분한 양의 줄기세포를 얻을 수 있는 장점이 있다. 지방유래줄기세포의 조골모세포로의 분화를 이용한 재생의학적 방법 등이 속속 보고되고 있다. 효율 면에 있어 자가골이식 이상의 결과를 보여 줄 수 있는 골 대체물질은 없으나 공여부 합병증을 고려할 경우 골 대체물질의 필요성은 늘 있어 왔다. 이중 탈회골(demineralized bone matrix)과 같은 이종골의 이용은 미국기준으로 약 45만 건의 골이식이 이루어지고 있다. 저자들은 탈회골의 골유도 및 골유도 능력을 향상시키

기 위한 방법으로 백서의 두개골 결손 모델에서 DBM과 지방유래줄기세포를 혼합하여 이식한 후 관찰함으로써 지방유래줄기세포가 탈회골의 골유도 과정에서 어떠한 영향을 미치는 지에 대하여 알아보려고 하였다.<sup>1,2</sup>

## II. 재료 및 방법

### 가. 지방유래줄기세포의 분리 및 배양

생후 8주, 체중 250 - 350 g의 수컷 Sprague-Dawley 백서 30마리를 사용하였다. 먼저 임의로 백서 10마리에 대하여 각각이 서혜부 지방층(inguinal fat pad)을 2 cm 가량의 서혜부 절개선을 통하여 얻는다. 얻은 1 g 가량의 지방층을 phosphate-buffered saline(Mediatech)를 이용하여 3회 씻은 후 0.075% collagenase type I (Worthington, USA)를 소화효소로 이용하여 37°C에서 50분간 흔들여 준다. 이후 같은 분량의 10% fetal bovine serum(Welgene)이 첨가된 Dulbecco modified Eagle medium(Welgene)을 첨가하여 collagenase를 비활성화시킨다. 1200 xg에서 10분간 원심분리 한다. 원심분리 후 pellet은 남겨두고 상층 액은 조심스럽게 버린다. RBC lysis buffer(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣고 잘 섞어준 후 10분 동안 상온에 놓아둔다. 새로운 50 mL tube에 세포 여과기를 올려놓고 여과한다. 1200 xg에서 10분간 원심분리 한 후 상층 액을 버린다. 10% fetal bovine serum이 첨가된 Dulbecco modified Eagle medium에 세포를 재부유시킨다. Trypan blue exclusion을 이용하여 세포수와 세포 생존율을 확인한다. 서혜부에서 획득한 지방 1g당 10<sup>6</sup>개의 지방유래줄기세포가 확인된다.<sup>3</sup>

### 나. 탈회골의 제조

백서 탈회골은 인증된 조직은행에서 제조되었다. 무균적 조작을 통하여 백서 경골의 연부조직을 제거한 후 1 - 2 cm 크기로 자른 후 95% 에탄올에서 2시간 정도 탈수한다. 그 후 diethylether에서 다시 2시간 정도 탈지과정을 거친 후 0.3 - 1 mm의 크기로 분쇄한다. 그 후 0.5 N hydrochloric acid를 이용 상온에서 3시간 탈회(demineralization)시킨 후 멸균 증류수를 이용하여 중성 pH phosphate buffer를 이용하여 세척한 후 다시 멸균 증류수에 재차 세척 후 lyophilization한 후 적정한 용기에 담아 포장 후 15내지 20 Kilo Gray 방사선에 조사 후 실험하기 전까지 냉장보관하였다.

### 다. 두개골 결손을 위한 기술

30마리의 백서 모두 두개골 상부의 정중선을 따라 절개선을 가한 후 피관거상 후 피하건막을 분리한 후 골막

피관을 좌우측으로 거상하여 젖힌 후에 전동 천공기를 이용하여 6 mm의 원형 골 결손을 만들었다. 이중 먼저 서혜부 지방층에서 분리 배양한 지방유래줄기세포가 있는 10마리의 백서에서 백서 탈회골과 지방유래줄기세포를 혼합하여 골결손 부위에 이식 후 피관을 봉합하여 지방유래줄기세포가 혼합된 백서 탈회골을 이식한 실험군을 만들고, 남은 20마리 중 10마리를 임의로 선택하여 백서 탈회골을 이식한 후 피관을 봉합한 탈회골만 이식된 실험군을 만들었다. 마지막으로 남은 임의의 10마리는 골 결손에 대한 처치 없이 그대로 피관을 봉합한 후 대조군으로 나누어 실험에 임하였다. 6주와 12주 후 각각 백서 10마리 중 5마리를 안락사 시킨 후 결손 부위를 포함한 두개골과 경막을 en bloc형태의 골편을 채취한 후 24시간 10% 포르말린에 고정하였다.

### 라. 영상의학적 분석

각각 6주와 12주에 채취한 두개골 샘플을 표준화된 조건하에서 x-선 촬영 후 디지털 방식으로 전환된 이미지를 얻었다. 영상의학적 골밀도 측정은 범용 소프트웨어인 NIH images 1.62(<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>)를 이용하여 이었다.

### 마. 조직형태학적 분석

영상의학적 골밀도 측정을 마친 각각의 샘플을 HNO<sub>3</sub>을 이용하여 탈석회화(decalcification)과정을 거친 후 파라핀 블록을 만들었다. 대표적인 관상 절편(coronal section)을 10 μm 두께로 얻어 H&E 염색을 시행하였다. 광학현미경상에서 각 그룹간의 조직형태학적 차이를 평가하였다. 모든 샘플에 대하여 저배율 상에서 신생골의 정량적 분석을 시행하였으며 모든 이미지 분석은 Autocad<sup>®</sup>를 이용하였다.

### 바. 통계적 분석

각 그룹간의 유의성 판단은 Kruskal-Wallis 검정을 이용하였고( $p < 0.05$ ) 골밀도와 신생골 형성간의 상관관계는 Spearman 상관계수를 이용하였다. 모든 통계처리는 SPSS(Ver 14.0 SPSS inc, USA)를 이용하였다.

## III. 결 과

### 가. 조직형태학적 분석

술후 6주 및 12주에서 조직소견은 대조군에서 가교형태의 섬유성 결체조직이 결손 부위를 가로질러 있으며 뚜렷한 신생골형성이 확인되지 않았으나 백서 탈회골 및 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한

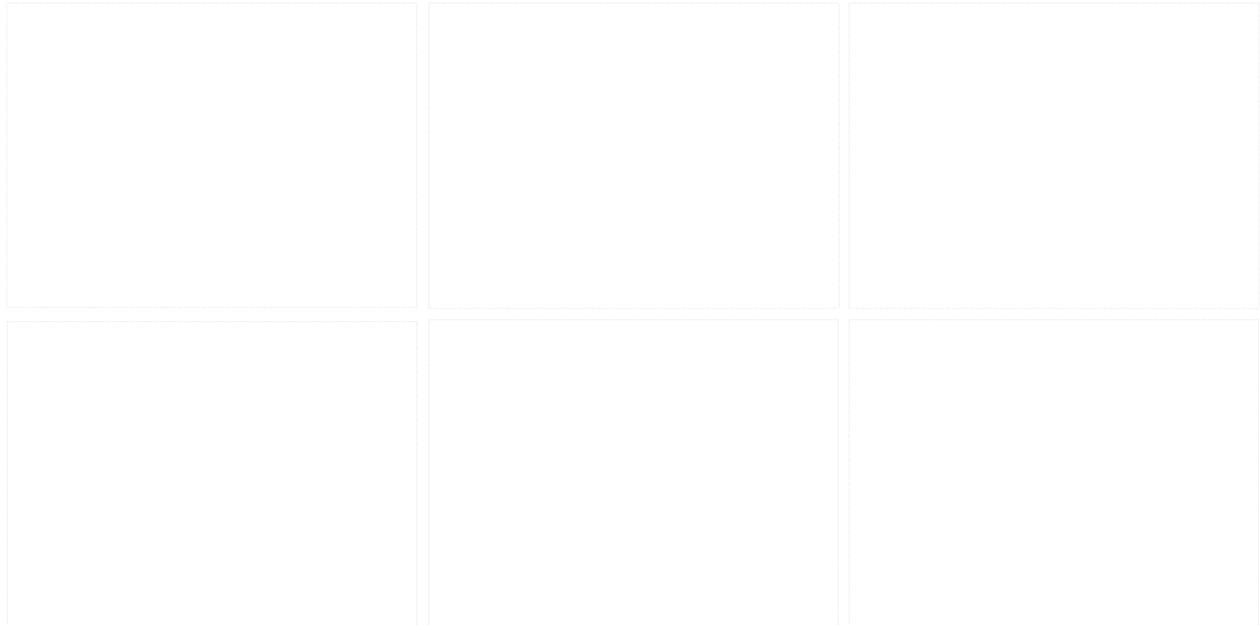


Fig. 1. Representative section of critical size defects 6 weeks after the operation(Hematoxylin and eosin stain, × 40). Only fibrous connective tissue bridge is observed in control group but the osteoblast in lacunae and osteoblast lining which is related with bone induction capacity is more abundant in demineralized bone matrix(DBM) without adipose tissue-derived stem cells(ADSC) and DBM with ADSC group. (Above, left) Control group in 6 weeks. (Above, center) DBM alone group in 6 weeks. (Above, right) DBM with ADSC group in 6 weeks. (Below, left) Control group at 12 weeks. (Below, center) DBM alone group in 12 weeks. (Below, right) DBM with ADSC group in 12 weeks.

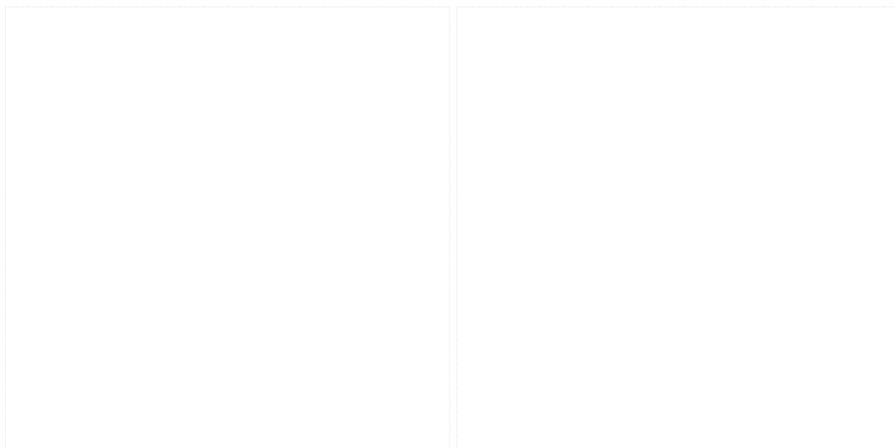


Fig. 2. The histomorphometric analysis of calvarium defect at 6 and 12 weeks postoperatively. Demineralized bone matrix with adipose tissue-derived stem cells(ADSC) showed significantly higher bone formation than DBM alone( $p < 0.05$ ). The data represent means  $\pm$  standard deviations. (Left) 6 weeks postoperatively. (Right) 12 weeks postoperatively.

실험군에 있어 골유도에 의한 뚜렷한 신생골형성을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

신생골의 정량적 분석을 통하여 술후 6주 대조군(n=5)은 평균  $0.23 \pm 0.10\%$ 의 신생골 형성률을 보였으며 탈회골을 이식한 실험군(n=5)은 평균  $3.31 \pm 0.99\%$ 이었고 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한 실험군(n=5)은 평균  $9.25 \pm 50.5\%$ 이었다. 술후 8주에 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한 실험군

중 1마리가 폐사하였고 12주에 채취한 및 대조군(n=5)의 신생골형성은 평균  $0.56 \pm 0.42\%$ 였고 백서 탈회골을 이식한 실험군(n=5)은  $8.76 \pm 4.08$ 이었고 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한 실험군(n=4)은 평균  $26.8 \pm 5.08$ 이었다. Kruskal-Wallis 검정에서 각 집단 간의 신생골 형성은 95% 유의 수준에서 6주 및 12주 모두 각 군 간의 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

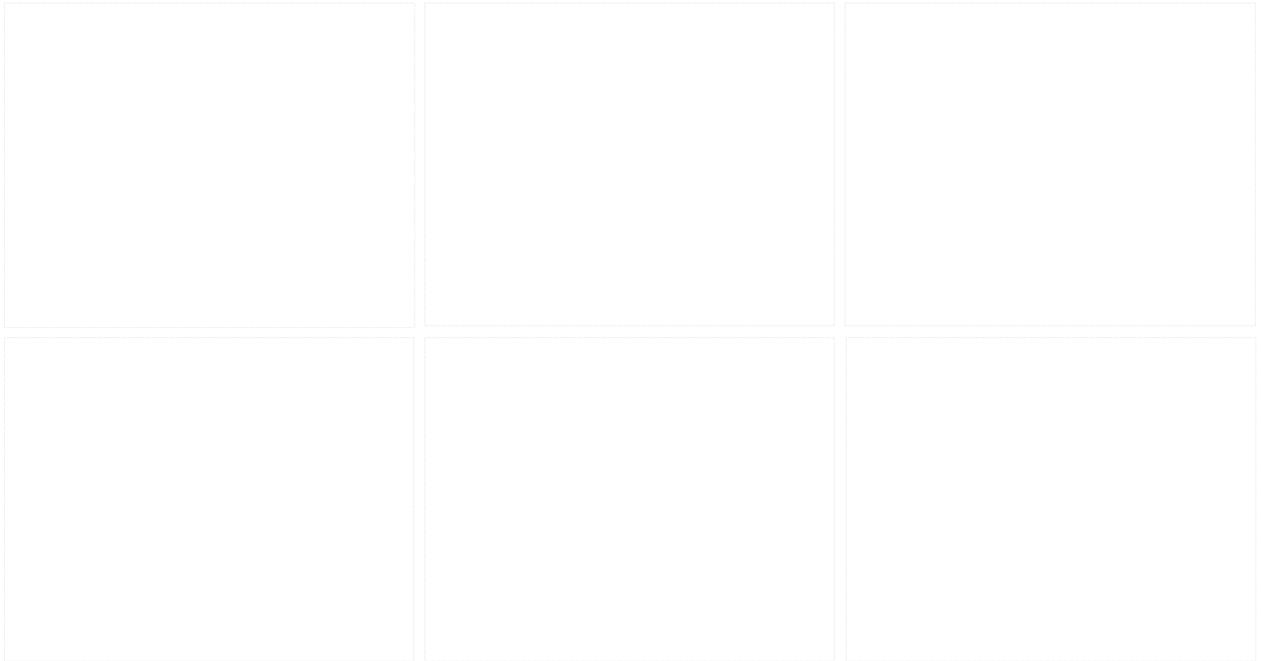


Fig. 3. Radiographic images of calvarium 6 week after the operation. The images show dynamics for bone formation in demineralized bone matrix(DBM) with adipose derived stem cells(ADSC) and lack of radiopacity in the defect control group. Although radiographs from DBM alone group and DBM with ADSC group revealed similar diffuse radiopaque spots dispersed throughout the defect. But the densitometry itself showed significantly higher bone formation. (Above, left) DBM with ADSC group at 6 weeks. (Above, center) DBM alone group in 6 weeks. (Above, right) Control group in 6 weeks. (Below, left) DBM with ADSC group in 12 weeks. (Below, center) DBM alone group in 12 weeks. (Below, right) Control group in 12 weeks.

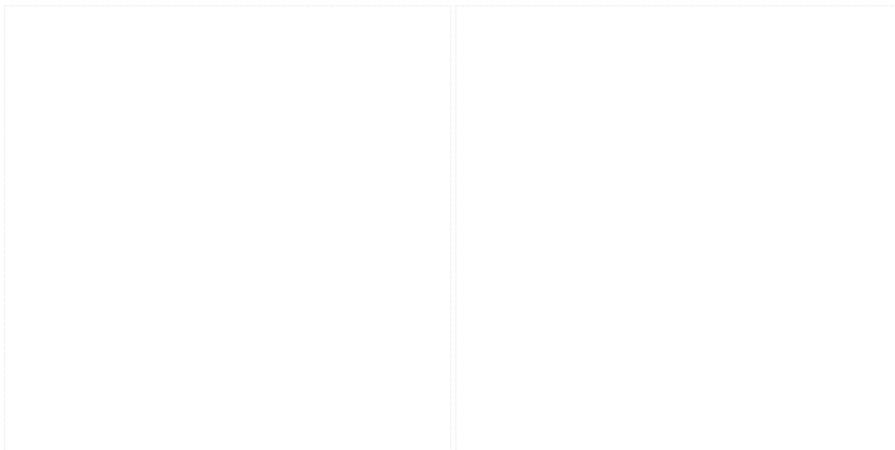


Fig. 4. The densitometric analysis of calvarial defect at 6 and 12 weeks postoperatively. Demineralized bone matrix(DBM) with adipose tissue-derived stem cells (ADSC) showed significantly higher bone formation than DBM alone ( $p < 0.05$ ). The data represent means  $\pm$  standard deviations. (Left) 6 weeks postoperatively. (Right) 12 weeks postoperatively.

#### 나. 영상의학적 분석

술후 6주 대조군(n=5)의 골밀도는 평균  $38.22 \pm 8.95$  (gray level)이었으며 백서 탈회골을 이식한 실험군(n=5)은 평균  $92.89 \pm 8.23$  이었고 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한 실험군(n=5)은 평균  $102.13 \pm 12.79$ 이었다. 술후 8주에 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한 실험군중 1마리가 폐사하였고 12주에 채취한 및 대조군(n=5)의 골밀도는 평균  $42.95$ 였고

백서 탈회골을 이식한 실험군(n=5)은  $1.08 \pm 21.3$ 이었고 지방유래줄기세포와 백서 탈회골을 혼합하여 이식한 실험군(n=4)은 평균  $107.92 \pm 19.93$  이었다. Kruskal-Wallis 검정에서 각 집단간의 신생골 형성은 95% 유의 수준에서 6주 및 12주 모두 각 군 간의 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

골밀도와 신생골 형성간의 관계는 6주에서 상관계수( $\rho$ )= $0.804$ , 유의확률  $p < 0.001$ , 12주에서 상관계수( $\rho$ )

=0.802, 유의확률  $p=0.001$ 로 상관관계에 있음을 알 수 있었다.

#### IV. 고 찰

지방유래줄기세포는 지방조직, 골조직, 근육조직으로 분화가 가능하며 전도유망한 조직공학의 원재료로서 각광을 받고 있다. 특히 골재생 능력은 지방세포의 공여자의 나이와 연관이 없고 지지체 없이 삼차원적 신생골 형성이 가능한 것으로 보이며 이를 이용한 다양한 방법으로서의 적용이 가능할 것으로 보인다.<sup>2,4,6</sup> 실험적으로 콜라겐을 주성분으로 한 마이크로 비드를 지지체로 한 지방유래줄기세포의 실험적 골 분화에 성공함으로써 주사제로서의 골 대체물질로서의 가능성이 열려 있으며,<sup>7</sup> 흡인 지방 속의 줄기세포를 분리하여 세포치료제로서 활용 가능한 단계에 있다. 백서 두개골 결손 모델에 있어 흡수성 지지체와 골분화로 유도된 지방유래줄기세포를 통한 두개골 결손에 대한 치료 효과가 있음이 밝혀져 있으며<sup>8</sup> 두개골 결손 모델에 있어서도 배양 증식되어 이식된 지방유래줄기세포가 골신생 능력에 있어 앞선 결과를<sup>9</sup> 볼 때 향후 지방유래줄기세포에 대한 보관 방법에 대한 방법론이 정립된다면 필요한 시기에 지방흡입을 한 후 보관하여 조직은행처럼 향후 필요시 사용할 수 있는 체계가 정립되리라 본다. 하지만 피하지방보다 복부지방에서 지방유래줄기세포의 골 분화 능력이 높은 것을<sup>10</sup> 감안하여 보면 내부 장기의 수술시 얻을 수 있는 복부지방에 대한 관심과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

백서간엽줄기세포의 골 분화에 있어 BMP-7이 농도의존적으로 골형성을 증가시키는 것이 밝혀져 있고 BMP-2 gene에 의해 변이된 지방유래줄기세포의 신생골 형성능력이 의미 있는 증가를 보여 주고 있으며<sup>11</sup> BMP-2는 골 분화에 영향을 미치고 BMP-7은 연골로의 분화에 일정 영향을 미친다.<sup>12</sup> 저산소 상황에서의 지방유래줄기세포의 골 형성 능력이 감소된다는 보고가 있으며<sup>13</sup> 이에 본 실험에서는 효율을 극대화하기 위하여 두개골 결손 부위에 탈회골을 채워 넣은 후 지방유래줄기세포의 현탁액을 붓는 형태로 실험을 진행하였으나 이에 대한 실험적 개선이 필요할 것으로 생각되어진다.

골 결손시의 골 재건은 자가골이식이 가장 효과적인 방법이다. 하지만 결손 부위가 클 경우 공여부의 제한이 있다. 골 대체물질로 탈회골은 생물학적 적합성을 가지고 있으며 골유도 및 골전도의 특성을 가지고 있으며 이는 탈회골 내의 남아 있는 콜라겐, 비콜라겐 단백질, BMP의 작용에 의한 것이며 상대적으로 체내에서 흡수가 덜 되는 장점이 있어 다양한 제형으로 상품화 되어

있다. 하지만 무게가 가는 부위에의 적용하기에는 구조를 유지하는 능력이 떨어져 주로 두개골 결손 및 골낭종 및 골 공동화된 골 결손 부위에 사용된다.<sup>1</sup>

현재 탈회골의 골전도 능력을 향상시키기 위한 많은 노력들이 있어 왔고<sup>14</sup> 현재 유도조직 재생법을 이용한 탈회골의 신생골 생성능력을 높이는 기술 등이 개발되어 있다. 골분화로 유도된 골수간질세포가 탈회골 지지체의 골유도능력을 향상시키며 본 실험에서와 같이 지방유래줄기세포 또한 탈회골 지지체의 신생골 형성 및 골유도능력에 대한 유의한 결과를 볼 때 향후 지방유래 줄기세포를 선골 분화시켜 지지체에 혼합하는 등의 연구가 필요하리라 생각된다.

PDGF는 탈회골 지지체의 골유도능력을 저해하는 것이 밝혀져 있으며<sup>15</sup> 설치류의 지방유래 줄기에서의 골 및 연골로의 분화는 24주 이상 지속되나 근육 및 골수로의 분화는 제한적이다.<sup>6</sup> 이는 본 실험에서의 의미 있는 결과와 비교하여 볼 때 향후 백서의 지방유래 줄기세포에 대한 연구 시 참고하여야 하겠다.

#### V. 결 론

백서 두개골 결손 모델에 있어 지방유래줄기세포가 탈회골의 골유도에 의한 신생골형성에 있어 유의한 증가를 확인할 수 있었으며 향후 골 결손재건에 있어 탈회골을 사용할 경우 지방유래줄기세포를 혼합하여 사용함으로써 향후 골 결손 수복에 있어 보다 나은 골 생성률과 생착률을 보일 것으로 사료된다.

#### REFERENCES

1. Leupold JA, Barfield WR, An YH, Hartsock LA: A comparison of ProOsteon, DBX, and collagraft in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 79: 292, 2006
2. Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B: Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Cranio-maxillofac Surg* 34: 466, 2006
3. 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
4. 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
5. 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
6. Zheng B, Cao B, Li G, Huard J: Mouse adipose-

- derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation *in vivo*. *Tissue Eng* 12: 1891, 2006
7. Rubin JP, Bennett JM, Doctor JS, Tebbets BM, Marra KG: Collagenous microbeads as a scaffold for tissue engineering with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 120: 414, 2007
  8. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, Breitbart AS: Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 117: 857, 2006
  9. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR: *In vivo* osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 2007 13: 619, 2007
  10. Peptan IA, Hong L, Mao JJ: Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg* 117: 1462, 2006
  11. Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J: Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 836, 2007
  12. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, Klein-Nulend J: Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 902, 2006
  13. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT: Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1139, 2006
  14. Han B, Tang B, Nimni ME: Combined effects of phosphatidylcholine and demineralized bone matrix on bone induction. *Connect Tissue Res* 44: 160, 2003
  15. Ranly DM, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD: Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am* 87: 2052, 2005