

## Polydioxanone/pluronic F127 담체에 유입된 골막기원세포의 조골활성

이진호 · 오세행 · 박봉욱\* · 하영술\*\* · 김덕룡\*\*\* · 김옥규\*\*\*\* · 김종렬\*\*\*\* · 변준호\*

한남대학교 생명나노과학대학 신소재공학과,

\*경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),

\*\*경상대학교병원 임상의학연구소,

\*\*\*경상대학교 의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),

\*\*\*\*부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### OSTEOGENIC ACTIVITY OF CULTURED HUMAN PERIOSTEAL-DERIVED CELLS IN A THREE DIMENSIONAL POLYDIOXANONE/PLURONIC F127 SCAFFOLD

Jin-Ho Lee, Se-Heang Oh, Bong-Wook Park\*, Young-Sool Hah\*\*, Deok Ryong Kim\*\*\*,

Uk-Kyu Kim\*\*\*\*, Jong-Ryoul Kim\*\*\*\*, June-Ho Byun\*

*Department of Advanced Materials, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University,*

*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical center (BK21), \*\*Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital,*

*\*\*\*Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical center (BK21), \*\*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University*

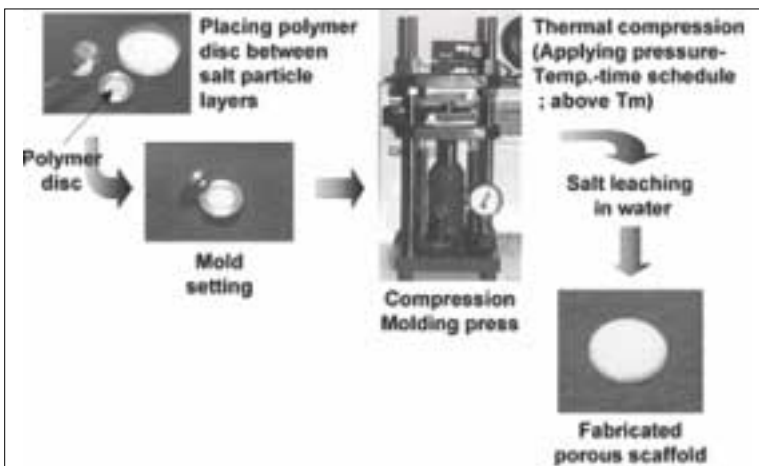
Three-dimensional porous scaffolds play an important role in tissue engineering strategies. They provide a void volume in which vascularization, new tissue formation, and remodeling can occur. Like any grafted materials, the ideal scaffold for bone tissue engineering should be biocompatible without causing an inflammatory response. It should also possess biodegradability, which provides a suitable three-dimensional environment for the cell function together with the capacity for gradual resorption and replacement by host bone tissue. Various scaffolds have already been developed for bone tissue engineering applications, including naturally derived materials, bioceramics, and synthetic polymers. The advantages of biodegradable synthetic polymers include the ability to tailor specific functions. The purpose of this study was to examine the osteogenic activity of periosteal-derived cells in a polydioxanone/pluronic F127 scaffold. Periosteal-derived cells were successfully differentiated into osteoblasts in the polydioxanone/pluronic F127 scaffold. ALP activity showed its peak level at 2 weeks of culture, followed by decreased activity during the culture period. Similar to biochemical data, the level of ALP mRNA in the periosteal-derived cells was also largely elevated at 2 weeks of culture. The level of osteocalcin mRNA was gradually increased during entire culture period. Calcium content was detectable at 1 week and increased in a time-dependent manner up to the entire duration of culture. Our results suggest that polydioxanone/pluronic F127 could be a suitable scaffold of periosteal-derived cells for bone tissue engineering.

**Key words:** Periosteal-derived cells, Polydioxanone/pluronic F127 scaffold

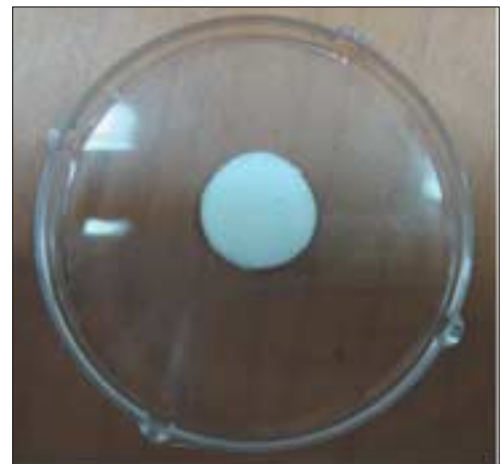
## I. 서 론

다양한 원인에 의한 골부족시 자가골 이식의 대안으로 골 조직공학을 응용하는 것은 이제 어느덧 중요한 재건학의 한 축이 되고 있다. 이에 본 교실에서도 골막에서 골막기원세포를 추출하고 성숙한 조골세포로 분화시키는 과정은 이전의 연구에서 보고한 바 있다<sup>1,2)</sup>. 조직공학적 골형성의 궁극적인 목표는 정상적인 골조직과 유사한 조직을 형성하는 것이므로 이를 위해서는 골 전구세포의 조골세포로의 분화 뿐만 아니라 다공성 체계의 삼차원적 구조를 가지는 적절한 담체로의 적용 및 광화가 이루어져야 할 것이다. 현재까지 콜라겐 등의 천연고분자, 수산화인회석 (hydroxyapatite) 및 인산칼슘 (calcium phosphate)와 같은 바이오세라믹스 (bioceramics), 그리고 다양한 합성 고분자들이 이용되고 있다. 일반적으로 콜라겐은 여러 가지 세포들을 위한 기질 역할을 하며 세포의 이동, 부착 및 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 골 조직에 존재하는 콜라겐 제1형 콜라겐 (type 1 collagen)은 정상적인 골 기질에서 유기질 성분의 약 95%를 담당하고 있으며 조골세포 표현형의 발현 및 골기질 형성에 긍정적인 역할을 한다. 현재 조직공학적 피부형성, 혈관이식, 연골형성 및 골형성 등에 콜라겐이 많이 이용되고 있는 실정이다<sup>3-6)</sup>. 본 연구에서는 합성 고분자의 하나인 다공성 polydioxanone/pluronic F127 담체를 이용하고자 한다. Polydioxanone은 생체적합성과 서서히 생체내 분해되는 생분해성으로 이미 여러 의학관련 분야에서 이용되고 있고 있다. 콜라겐 등의 천연고분자가 강도면에서 상당한 단점을 가지는 것과 달리, polydioxanone은 적절한 강도를 가지고 있어 생체내에서 분해되는

동안 결손부위의 무너짐을 최대한 방지할 수 있는 장점이 있으므로 골 조직공학 분야에서 그 역할이 기대되는 담체이다. 그러나 polydioxanone을 녹일 수 있는 용매가 극히 제한적이고 독성이 매우 강하며 값이 비싸기 때문에 다공성 지지체로 쉽게 제조되지 못하고 있는 실정이다. 또한 일반적으로 대부분의 합성고분자들은 제작시 사용된 용매의 잔존으로 소수성을 나타내므로 담체로 제작시, 담체의 다공성 내로 배양된 세포를 적용하려 하여도 그 세포의 접착 (attachment)에 적지 않은 어려운 점이 있으며 일단 접착된 세포들도 소수성 다공성 표면에서 증식하기가 쉽지 않기 때문이다. 유입된 세포없이 이러한 담체 자체를 임상의학 각 분야에서 생체내의 결손부위에 바로 적용하는 것도 이러한 이유 때문이다. 이러한 단점에 대한 해결방안으로 에틸알코올과 물의 혼합액을 사용하여 세포 배양액이 담체 다공질 사이로 잘 스며들도록 전적침 방법이 사용되고 있으나, 잔여 에틸알코올의 독성과 고분자 지지체 다공질 자체를 근본적으로 친수성으로 바꾸어 줄 수 없다는 점이 단점으로 나타나고 있다<sup>7-12)</sup>. 그리하여 본 연구에서는 담체의 친수성 처리를 위하여 부가제로 pluronic F127을 사용한다. Pluronic F127은 polyethylene glycol과 polypropylene glycol에 대한 수용성의 혼성중합체로 생체적합성이 뛰어나고 부착되는 세포들에 대하여 특이적인 독성을 잘 나타내지 않는 것으로 알려져 있다. 이러한 pluronic F127의 담체로의 부착은 최근 새로운 표면처리 기술의 하나인 미세분말 열압착법 (melt-molding particulate-leaching method)을 통하여 이루며 이를 통하여 다공성의 친수성 polydioxanone/pluronic F127을 제작하여 본 연구에 이용하고자 한다 (Fig. 1)<sup>11)</sup>.



**Fig. 1.** Photographs of scaffold fabrication process by a melt-molding particulate-leaching method (by Oh SH, Kang SG, Kim ES et al : Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials* 24 : 4011, 2003).



**Fig. 2.** Photograph of porous hydrophilized polydioxanone/pluronic F127 scaffold.

골 조직공학과 관련하여 가장 적합한 다공의 크기는 정해진 것이 없으며 관련된 골 전구세포, 담체의 종류등이 이에 관여하나 일반적으로 100 - 200  $\mu\text{m}$  정도의 다공 크기가 성공적인 골 조직공학을 위하여 사용되고 있는 실정이다<sup>13-15)</sup>. 본 연구의 목적은 골막에서 추출한 골막기원세포를 다공의 크기가 100 - 200  $\mu\text{m}$ 이고 15 mm의 직경을 가지며 높이는 2 - 3 mm 정도가 되는 친수성 polydioxanone/pluronic F127 담체에 적용한 후, 조골활성 정도를 관찰하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 골막기원세포의 추출, 증식 및 조골세포로의 분화

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다<sup>12)</sup>. 경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 몇조각으로 다시 자른다. 이를 100-mm culture dish에 넣은 후 넣은 후 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통하여 배양하였다. 약 90%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 0.02% 트립신과 0.02% EDTA로 5분간 트립신 처리시키고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시하였다. Passage 3을 거친 후, 골막기원세포를 3 × 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 친수성 polydioxanone/pluronic F127 담체에 주입한 후, 10% fetal calf serum, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 nM dexamethasone, 그리고 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate이 포함된 DMEM로 구성된 골형성 유도 배지에서 3주동안 배양하였으며 골형성 유도 배지는 매 3일마다 교체해주었다.

### 2. 다공성 polydioxanone/pluronic F127 담체의 제작

다공성 담체를 제작하기 위한 전단계로, polydioxanone (molecular weight 200,000, Samyang, Korea)와 pluronic F127 (molecular weight 12,500, BASF, USA)이 일정비율로 혼합되어 있는 polydioxanone/pluronic F127 입자를 냉동 분쇄기를 이용하여 균일한 미세 혼합분말로 제조한 다음, 80°C로 예열된 열압착기를 이용하여 polydioxanone/pluronic F127 필름을 제조한다. 이러한 고분자 필름을 최근에 개발한 표면처리 기술인 미세 분말 열압착법을 통하여 배양된 세포들이 잘 유입될 수 있도록 친수성과 유연성을 가지는 담체를 제작한다. 미세분말 열압착법에 대하여 간단히 언급하면, 먼저 고분자 필름을

편치를 이용하여 디스크형태로 만든다. 다공성을 위하여 NaCl 입자를 막자사발을 이용하여 분쇄한 후, 황동 재질로 제작된 몰드에 NaCl 입자를 균일하게 분포시킨 후, 몰드에 맞게 디스크형 polydioxanone/pluronic F127 필름 시료를 위치시키고 다시 NaCl 입자를 균일하게 덮어준다. 이러한 몰드를 180°C로 미리 예열시킨 압축성형기에 위치시키고, 황동재질의 몰드 내부의 필름까지 열이 전달되도록 적절한 압력으로 압착한 후, 연화된 필름의 표면 및 내부에 NaCl 결정이 잘 침투되도록 다시 압력을 가해 압착시킨다. 그런 다음 황동재질의 몰드를 압축성형기에서 분리하고 몰드의 상, 하판을 분리하여 NaCl 결정이 함유된 디스크형 시편을 얻는다. 이 시편을 차가운 물에서 4시간 동안 세척하여 NaCl 결정을 완전히 제거한 후, 24시간 상온에서 진공 건조하여 다공성, 친수성 및 유연성을 가지는 다공성 고분자 담체를 제조한다. 골 조직공학에서는 주로 100 - 200  $\mu\text{m}$  정도의 다공 크기가 유리하다는 의견이 많음을 고려하여 본 연구에 이용하고자 하는 친수성 polydioxanone/pluronic F127 담체는 다공의 크기가 100 - 200  $\mu\text{m}$ 이고 15 mm의 직경을 가지며 높이는 2 - 3 mm 정도가 되도록 제작한다.

### 3. 주사 전자현미경 관찰 (Scanning electron microscopy)

골막기원세포를 함유하며 3주 배양된 한 polydioxanone/pluronic F127 담체를 주사 전자현미경 관찰을 시행하였다. 2% 글루테랄알데하이드/인산염완충식염수 (gluteraldehyde/Phosphate-buffered saline)에 고정하고 탈수시 표면형성 변화를 방지하기 위하여 일련의 에탄올 농도로 탈수시키며 탈수가 끝난 시료는 건조시킨 후, 금으로 스퍼터링 코팅 (sputtered coating)을 시행하였다. 영상은 주사 전자현미경 (Philips XL30 S FEG, Philips Co, Eindhoven, Netherlands)을 사용하여 촬영하였다.

### 4. 알칼리성 인산분해효소 활성도의 측정 및 DNA content (Biochemical measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity and DNA content)

알칼리성 인산분해효소는 조골세포에서 형성되는 외효소 (ectoenzyme)로, 무기성 피로인산염 (inorganic pyrophosphate)의 분해에 관여하여 무기질 침착을 위한 인산염 혹은 무기성 피로인산염의 국소적 증가를 이루게 하는 역할을 한다. 일반적으로 알칼리성 인산분해효소는 조골세포의 분화 초기에 그 활성이 뚜렷하여 초기 조골세포의 특이 표지자로 알려져 있다. 알칼리성 인산분해효소 활성도는 배양 1, 2, 그리고 3주째에 pH 10.4의 Glycine-NaOH

완충액에서 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 기질로 이용하여 골막기원세포에서 유리되는 pNPP를 흡광도 410 nm에서 측정하였다. 각 주에서 동일한 수로 존재하는 polydioxanone/pluronic F127 담체내의 골막기원세포에서 알칼리성 인산분해효소의 활성도를 측정하기 위하여 관련 세포를 PicoGreen dsDNA quantitation kit (Molecular Probes, OR, USA)를 사용하여 정량화 하였으며  $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  DNA로 표기하였다.

### 5. 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin에 대한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

골형성 유도 배지에서 1, 2, 그리고 3주의 배양기간동안 polydioxanone/pluronic F127 담체에서 배양되는 골막기원세포의 조골세포로의 분화정도를 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin에 대한 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 배양 1, 2, 그리고 3주째에 분석하였다. 총 RNA를 각 주의 세포층에서 TRIzol reagent를 처리하여 추출하였고 oligo (dT) 시발체 (primer)와 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)을 이용한 역전사반응으로 cDNA를 합성하였다. 적절한 시발체를 이용하여 합성된 cDNA로부터 알칼리성 인산분해효소, osteocalcin 및 GAPDH에 대한 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 위하여 사용체 시발체는 다음과 같다 (sense / antisense) :

5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3', 5'-GTAGCC-ATATTCATTGTCAT-3', 515 bp, GAPDH; 5'-CCTC-GGAAGACACTCTG-3', 5'-AGACTGCGCCTGGTA-GTTGT-3', 238 bp, ALP; 5'-CCCTCACACTCC-TC-GCCCTAT-3', 5'-TCAGCCAACCTCGTCACAGTCC-3' 246 bp, osteocalcin. RT-PCR 산물은 1.5% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 확인하였다. 그리고 이러한 유전자들의 mRNA 발현은 음영계측 (Densitometry, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 통하여 상대적으로 평가하였다.

### 6. Von kossa 염색 및 칼슘량의 측정 (Quantification of calcium content)

무기질이 침착된 기질을 갈색으로 표현되게 하는 Von kossa 염색을 통하여 골기질 형성정도를 평가하였다. 골막기원세포가 유입되어 3주동안 배양된 골막기원세포-polydioxanone/pluronic F127 담체를 인산염 식염수로 세척하고 4% 포름알데히드로 10분간 고정하였다. 통상의 방법

으로 5- $\mu\text{m}$  파라핀 블록을 제작하였다.

골형성 유도 배지에서 1, 2, 그리고 3주의 배양기간동안 polydioxanone/pluronic F127 담체에서 배양되는 골막기원세포에서 산생하는 칼슘량에 대한 측정은, 24시간동안 관련 세포를 0.6 N HCl로 탈회시키고 o-cresolphthalein 방법 (o-cresolphthalein method, calcium C-test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)을 이용하여 골막기원세포에 의하여 형성된 칼슘에 대한 정량적 평가를 실시하였다. 칼슘량은 배지당 산생되는 칼슘의 microgram으로 측정 ( $\mu\text{g}/\text{well}$ ) 하였다.

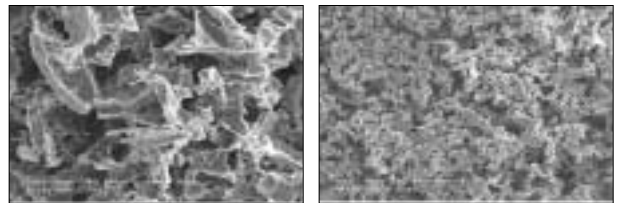
## III. 연구결과

### 1. 주사 전자현미경 관찰

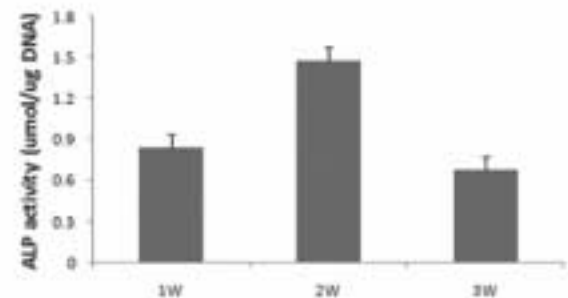
골막기원세포는 배양 3주동안 polydioxanone/pluronic F127 담체에 잘 유입되었으며 그들의 증식양상 또한 원활하게 이루어지고 있음을 관찰하였다 (Fig. 3).

### 2. 알칼리성 인산분해효소 활성도

배양 2주까지 알칼리성 인산분해효소의 활성도가 증가하였으며 배양 3주째에 이의 활성도가 감소하였다 (Fig. 4).



**Fig. 3.** Scanning electron micrograph of the polydioxanone/pluronic F127 scaffold with periosteal-derived cells after 14 days of culture. Periosteal-derived cells seeded on the polydioxanone/pluronic F127 scaffold successfully grew into the scaffold.



**Fig. 4.** ALP activity of periosteal-derived cells seeded onto polydioxanone/pluronic F127 scaffold. ALP activity showed its peak level at 2W (2 week) in culture, followed by decreased activity during the culture period.

### 3. RT-PCR 분석

알칼리성 인산분해효소 mRNA 발현은 배양 7일째부터 나타났고 배양 14일에 증가되었으며 이후 이의 발현은 감소하는 경향을 나타내었다. Osteocalcin mRNA 발현은 배양 7일째에 처음 나타났으며 이후 배양기간동안 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다 (Figs. 5A and B).

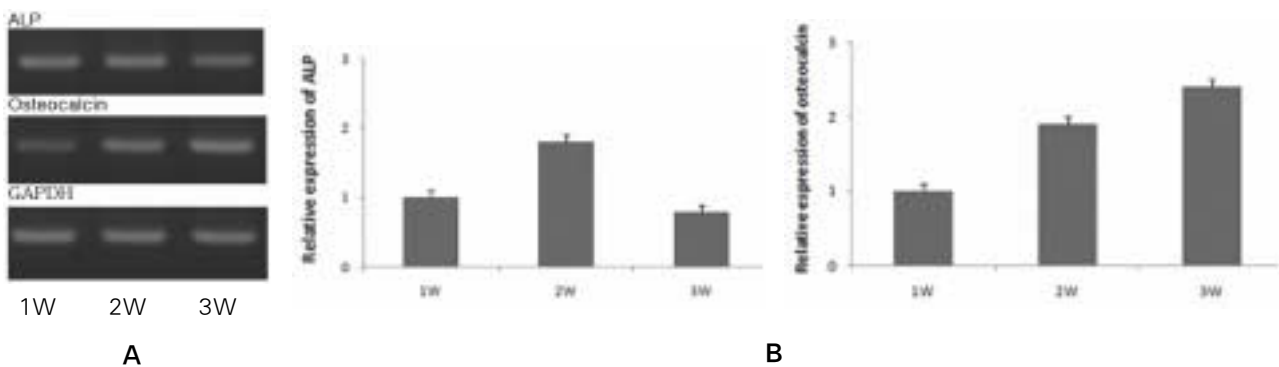
### 4. Von kossa 염색 및 칼슘량의 측정

골막기원세포가 유입되어 3주동안 배양된 골막기원세포-polydioxanone/pluronic F127 담체는 von kossa 염색에 강한 양성을 나타내었다. Polydioxanone/pluronic F127 담체에 유입되어 배양된 골막기원세포에서 생성되는 칼슘량은 배양 7일째에 처음 인지되었으며 이후 배양기간동안 증가하는 경향을 나타내었다 (Figs. 6A and B).

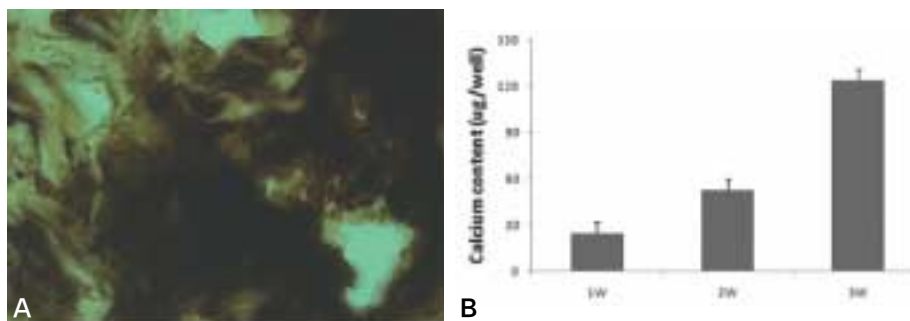
### IV. 총괄 및 고찰

골조직공학의 궁극적인 목표는 정상적인 골조직과 유사한 조직을 형성하는 것이므로 이를 위해서는 적절한 담체가 필요하다. 이상적인 담체는 적용된 후, 주위조직과의 생물학적 반응동안 생체적합성 (biocompatibility)과 서서히 체내에서 분해되며 자가조직으로 치환되는 생분해성 (biodegradability)을 가지고 있는 것이라 할 수 있으며 이에 덧붙여 조직공학적으로는 배양된 세포와의 상호작용을 통하여 관련 세포의 표현형 (phenotype)의 발현에 긍정적인 효과를 제공하여야 한다. 또한 배양된 세포가 담체로 유입되어 활성을 나타내기 위하여 적절한 다공성 구조 및 적절한 다공 크기를 가지고 있어야 한다.

현재 임상의학에서는 여러 가지 담체가 이용되고 있다. 천연고분자, 세라믹 제재, 합성 고분자 및 이들을 조합한 것들까지 광범위한 범위의 담체가 존재한다<sup>3-6)</sup>. 대부분의 담체는



**Fig. 5.** (A) Expression of ALP and osteocalcin mRNA during the osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells seeded onto polydioxanone/pluronic F127 scaffold. (B) Quantifications of these genes are expressed as relative mRNA levels by densitometry. Bands with the intensity of 1 week were regarded as 1.



**Fig. 6.** (A) Von kossa positive staining and calcium content in the periosteal-derived cells seeded onto polydioxanone/pluronic F127 scaffold. Von kossa-positive mineralization is noted by dark brown deposits. Von Kossa-positive mineralization was strongly observed in the polydioxanone/pluronic F127 scaffold with 3-week cultured periosteal-derived cells. Bar = 200 µm. (B) Quantification of the calcium content in the periosteal-derived cells seeded onto polydioxanone/pluronic F127 scaffold at 1 week (1W), 2 weeks (2W), and 3 weeks (3W). Calcium content was detectable at 1 week and increased in a time-dependent manner up to the entire duration of culture.

관련된 세포에 대하여 독성을 나타내지 않는다면 이차원적 세포배양 접시에서보다 삼차원적 배양환경에서 배양된 세포가 더 큰 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 이는 세포 표현형의 활성은 인접한 세포기질에 크게 영향을 받기 때문이다. Tabata<sup>16)</sup>는 배양된 세포가 바람직한 환경을 가진 담체에 적용된다면 그 세포들은 우수한 세포의 기질을 형성하고 이에 기반하여 세포의 증식과 분화가 더 촉진된다고 하였다. 그러므로 일단 담체는 유입된 세포들의 증식, 분화를 증진시키기 위하여 세포가 잘 접촉할 수 있는 환경체계를 가지는 것이 중요하다. 이러한 점만 고려한다면 합성고분자보다 콜라겐등의 천연고분자가 조직공학을 위한 담체로 더 유익할 수 있다<sup>17-19)</sup>.

본 연구에서는 합성고분자의 하나로 다공 크기가 100-200  $\mu\text{m}$ 인 친수성 polydioxanone/pluronic F127 담체를 이용하고자 한다. Polydioxanone은 생체적합성과 함께 유연한 생분해성으로 이미 여러 의학관련 분야에서 이용되고 있고 있으며 적절한 강도를 가지고 있어 생체내에서 분해되는 동안 결손부위의 무너짐을 최대한 방지할 수 있는 장점이 있으므로 골 조직공학 분야에서 그 역할이 기대되는 담체이다. 그러나 생체외에서 배양된 세포와 함께 적용되는 경우에 대해서는 그리 많이 알려진 것이 없으며 특히 골 전구세포와의 융합에 대해서는 거의 알려진 것이 없다. 이는 생체외에서 배양된 세포를 적용하기 위하여 polydioxanone 담체를 다공성으로 제작하여야 하는데, polydioxanone을 녹일 수 있는 용매가 극히 제한되어 있고 독성이 강하며 가격이 비싸 다공성 담체로서의 제작이 어렵기 때문이다. 이러한 단점은 polydioxanone에 국한된 문제점이 아니라 여러 가지 생분해성 합성 고분자 대부분에서 나타나고 있는 문제점이다.

일반적으로 사용되고 있는 생분해성 고분자들이 소수성이므로 이들로부터 담체 제조 시, 담체의 다공질 내로 세포 및 배양액 등이 제대로 침투하지 못하며 일단 유입된 세포들도 소수성 다공질 표면으로의 접촉 및 증식에 상당한 문제점이 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 합성고분자를 배양된 세포와 함께 적용하여 생체적합성 세포-담체 형성물 (cell-scaffold construct)을 제작하기 위해서는 담체의 표면에 친수성 처리를 시행하여 관련된 세포가 잘 접촉하고 증식할 수 있도록 하여야 한다. 본 연구에 사용된 담체는 친수성 처리를 위한 부가제로 pluronic F127을 사용하였다. Pluronic F127은 polyethylene glycol과 polypropylene glycol에 대한 수용성의 혼성중합체로 생체적합성이 뛰어나고 부착되는 세포들에 대하여 특이적인 독성을 잘 나타내지 않는 것으로 알려져 있다. 이러한 pluronic F127의 담체로의 부착은 최근에 개발한 표면처리 기술인 미세분말 열압착법 (melt-molding particulate-leaching method)을 통하여 이루어졌으며 이를 통하여 다공성의 친수성 polydiox-

anone/pluronic F127을 제작하여 본 연구에 이용하였다. 기존의 조직공학용 소수성 고분자 담체들의 경우, 물의 흡수가 일어나지 않아 세포 배양시 배양액의 침투가 어렵고, 세포를 균일하게 분산 주입시키는데 어려움이 있어, 에틸알코올등을 사용한 전적심 단계를 거쳐야 하지만, polydioxanone/pluronic F127 담체는 친수성을 나타내므로 특별한 전처리 과정 없이 곧바로 배양된 세포를 적용할 수 있다<sup>7-12)</sup>.

담체에서 다공의 크기는 적용되는 배양된 세포의 접촉, 증식 및 표현형의 발현에 중요한 영향을 미친다. 골 조직공학에 있어서 가장 적합한 다공의 크기는 정해져 있지 않으며 관련된 세포의 종류, 담체의 물성등과 같은 여러 요소에 의하여 결정되나 일반적으로는 100에서 150  $\mu\text{m}$ 가 세포의 증식에 적합하다고 알려져 있다<sup>13-15)</sup>. 하지만 이보다 작은 다공의 크기에서도 새롭게 골이 잘 형성된다는 보고도 있다. Itälä 등<sup>20)</sup>은 가토 동물모델을 이용하고 타이타늄 금속판을 이용한 실험에서 다공의 크기가 50에서 125  $\mu\text{m}$ 인 경우라도 신생골이 잘 형성된다고 보고하였다. Polydioxanone/pluronic F127 담체에 적용되는 골 전구세포들의 활성과 다공의 크기와 관련하여서는 부가적인 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다. 동물실험등을 포함하여 향후, 여러 가지 부가적인 연구가 동반되어야 할 것이지만 본 연구를 통하여 합성고분자의 하나인 polydioxanone/pluronic F127 담체는 골 조직공학적 측면에서 충분히 이용가능한 담체라고 할 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서  $5 \times 20$  mm의 골막을 채취하여 일차배양 및 계대배양을 실시하고 passage 3을 거친 골막기원세포를 polydioxanone/pluronic F127 담체에 주입한 후, 골형성 유도 배지에서 3주동안 배양하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 골막기원세포는 polydioxanone/pluronic F127 담체에 유입된 후, 배양 14일까지 알칼리성 인산분해효소 활성의 증가를 나타냈으며 이후 감소하는 경향을 나타내었다.
2. 골막기원세포는 polydioxanone/pluronic F127 담체에 유입된 후, 알칼리성 인산분해효소 mRNA 발현은 배양 7일째부터 나타났고 배양 14일에 증가되었으며 이후 감소하였다. Osteocalcin mRNA 발현은 배양 7일째에 처음 나타났으며 이후 배양기간동안 지속적으로 증가하였다.
3. 골막기원세포가 유입되어 3주동안 배양된 골막기원세포-polydioxanone/pluronic F127 담체는 von kossa 염색에 강한 양성을 나타내었으며, polydioxanone/

pluronic F127 담체에 유입된 후, 골막기원세포에 의하여 생성되는 칼슘량은 배양 7일째에 처음으로 인지 되었으며 이후 배양기간동안 증가하였다.

### References

1. Park BW, Byun JH, Lee SG *et al* : Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 28 : 511, 2006.
2. Park BW, Byun JH, Ryu YM *et al* : Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 29 : 197, 2007.
3. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA : Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 23 : 449, 2002.
4. Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C *et al* : Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 61 : 1455, 2003.
5. Koh CJ, Atala A : Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Opportunities for Regenerative Medicine. *J Am Soc Nephrol* 15 : 1113, 2004.
6. Rumpler M, Woesz A, Varga F *et al* : Three-dimensional growth behavior of osteoblasts on biomimetic hydroxylapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 81 : 40, 2007.
7. Schugens C, Maquet V, Grandfils C *et al* : Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation. *J Biomed Mater Res* 30 : 449, 1996.
8. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ : Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J Biomed Mater Res* 42 : 396, 1998.
9. Nam YS, Park TG : Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *J Biomed Mater Res* 47 : 8, 1999.
10. Nam YS, Yoon JJ, Park TG : A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. *J Biomed Mater Res* 53 : 1, 2000.
11. Oh SH, Kang SG, Kim ES *et al* : Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials* 24 : 4011, 2003.
12. Jeong WK, Oh SH, Lee JH *et al* : Repair of osteochondral defects with a construct of mesenchymal stem cells and a polydioxanone/poly(vinyl alcohol) scaffold. *Biotechnol Appl Biochem* 49 : 155, 2008.
13. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA *et al* : Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng* 7 : 557, 2001.
14. Kneser U, Voogd A, Ohnolz J *et al* : Fibrin gel-immobilized primary osteoblasts in calcium phosphate bone cement: in vivo evaluation with regard to application as injectable biological bone substitute. *Cells Tissues Organs* 179 : 158, 2005.
15. Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P *et al* : Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36 : 328, 2007.
16. Tabata Y : Recent progress in tissue engineering. *Durg Discov Today* 6 : 483, 2001.
17. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG : Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86-A : 1541, 2004.
18. Yang XB, Bhatnagar RS, Li S *et al* : Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tissue Eng* 10 : 1148, 2004.
19. Rosso F, Marino G, Giordano A *et al* : Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol* 203 : 465, 2005.
20. Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C *et al* : Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 58 : 679, 2001.

### 저자 연락처

우편번호 660-702  
경상남도 진주시 칠암동 90번지  
경상대학교 의과대학/의학전문대학원 구강악안면외과학교실  
변준호

원고 접수일 2009년 6월 5일  
게재 확정일 2009년 11월 2일

### Reprint Requests

**June-Ho Byun**  
Dept. of OMFS, Gyeongsang National University School of Medicine. Institute of Health Sciences.  
90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea  
Tel: 82-55-750-8258 Fax: 82-55-761-7024  
E-mail : surbyun@gsnu.ac.kr

Paper received 5 June 2009  
Paper accepted 2 November 2009