발생과 생식 제 15권 제 2호, 87~98 (2011)
Dev. Reprod. Vol. 15, No. 2, 87~98 (2011)

Bioceramic-Poly D,L-Lactic-co-Glycolic Acid(PLGA) Scaffold에 접종한 인간지방조직-유래 중간엽 줄기세포의 골 형성

강유미[1] · 홍순갑[1] · 도병록[2] · 김해권[3] · 이준영[1,†]

[1]충북대학교 생물학과, [2]휴림바이오셀 생명공학연구소, [3]서울여자대학교 생명공학과

Osteogenesis of Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells (ATMSCs) Seeded in Bioceramic-Poly D,L-Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) Scaffold

Yu Mi Kang[1], Soon Gab Hong[1], Byung-Rok Do[2], Haekwon Kim[3] and Joon Yeong Lee[1,†]

[1]Dept. of Biology, Chungbuk National University, Choengju 361-763, Korea
[2]Bioengineering Institute, Hurim Biocell Inc., Seoul 153-023, Korea
[3]Dept. of Biotechnology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT : The present experiment was performed to evaluate the osteogenic differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ATMSCs) seeded in bioceramic-poly D,L-latic-co-glycolic acid (PLGA) scaffold. Osteogenic differentiation of ATMSCs were induced using the osteogenic induction (OI) medium. ATMSCs were cultured with OI medium during 28 days in well plate. The proliferation of ATMSCs in OI medium group was significantly increased for 14 days of plate culture but slowed after 21 days. On the other hand, proliferation in the control group showed constant increase for 28 days of culturing. The alkaline phosphatase (ALP) activity of ATMSCs in OI medium group increased during the 21 days of culture but decreased on 28 days. However, in control group ALP activity of ATMSCs was continuously decreased as time goes. Nodule was observed at 21 days of culture in OI medium group and confirmed accumulation of calcium in cell by alizarin red staining. ATMSCs were seeded in PLGA scaffold or in Bioceramic-PLGA scaffold, and cultured with OI medium. ALP activity of ATMSCs by osteoblast differentiation in each scaffold increased on 21 days of culture and decreased rapidly on 28 days. ALP activity of ATMSCs was increased highly in Bioceramic-PLGA scaffold compared to PLGA scaffold on 21 days of culturing. SEM-EDS analysis demonstrated that calcium and phosphate content and Ca/P ratio in Bioceramic-PLGA scaffold increased higher than in PLGA scaffold. Biodegradability of scaffold at 56 days after implantation showed that Bioceramic-PLGA scaffold was more biodegradable than PLGA scaffold. The results demonstrated that the differentiation of ATMSCs to osteoblast were more effective in scaffold culture than well plate culture. Bioceramic increased cell adhesion rate on scaffold and ALP activity by osteoblast differentiation. Also, bioceramic was considered to increase the calcium and phosphate in scaffold when ATMSCs was mineralized by osteogenic differentiation. Bioceramic-PLGA scaffold enhanced the osteogenesis of seeded ATMSCs compared to PLGA scaffold.

Key words : Osteogenesis, ATMSC, Bioceramic, PLGA scaffold.

요 약 : 본 실험은 bioceramic을 첨가하여 만든 다공성 poly D,L-lactic-co-glycolic acid(PLGA)-scaffold가 인간 지방조직에서 유래된 중간엽 줄기세포(human adipose tissue derived mesenchymal stem cells, ATMSCs)의 골 형성과정에 효과적인지를 알아보고자 수행하였다. ATMSCs를 well plate에 접종하여 골형성 유도(osteogenic induction, OI) 배양액으로 28일 동안 배양하였다. OI배양액군의 증식률은 세포접종 후 14일까지는 세포증식이 활발하게 진행됐지만, 21일 이후 세포의 증식이 둔화되는 양상을 보였다. 반면, 기본배양액군은 꾸준한 세포 증식을 보이며 21일 이후에는 OI배양액군보다 더 높은 증식을 나타냈다. OI배양액군의 alkaline phosphatase(ALP) 활성은 세포배양 21일까지는 증가했지만,

† 교신저자: 충북 청주시 흥덕구 개신동 산48 충북대학교 자연과학대학 생물학과. (우) 361-763, (전) 043-261-2294, E-mail: leejy@chungbuk.ac.kr

28일에는 감소한 반면에 기본배양액군은 계속 감소하는 양상을 띠었다. OI배양액군의 세포는 배양 21일에는 뚜렷한 nodule의 형성을 관찰할 수 있었고, nodule에 칼슘의 축적이 일어남을 확인하였다. ATMSCs를 scaffold에 접종하여 OI배양액으로 배양하였다. Scaffold 내 골아세포 분화에 따른 ALP 활성은 PLGA scaffold와 Bioceramic-PLGA scaffold 모두에서 세포 배양 21일에 급격히 증가하였고, Bioceramic-PLGA scaffold의 ALP 활성이 PLGA scaffold보다 크게 증가하였다. 칼슘과 인의 함량 역시 Bioceramic-PLGA scaffold에서 높게 나타났으며, Bioceramic-PLGA scaffold의 Ca/P ratio가 PLGA scaffold보다 높게 나타났다. 생체내에 이식된 scaffold의 생분해성과 광물화는 bioceramic-PLGA scaffold에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 본 실험의 결과들을 종합해 볼 때 ATMSCs의 골형성능은 well plate보다 scaffold가 더 효과적이며, bioceramic이 scaffold의 세포 부착률과 ALP 활성을 증가시켜 골형성능에 효과적으로 작용하는 것으로 생각된다. 또한 bioceramic이 ATMSCs의 골형성 분화에 따른 광물화단계의 scaffold 내 칼슘과 인의 함량을 증가시키는 것으로 사료된다. 생체 내 scaffold의 생분해성은 PLGA scaffold보다 Bioceramic-PLGA scaffold가 빠른 분해를 나타내며, 광물화에 따른 칼슘 침착이 더 활발한 것은 scaffold에 포함된 bioceramic이 생체 내 세포의 부착, 증식, 분화를 증가시켜 골형성을 촉진시키는 물질로 작용한 것으로 사료된다.

서 론

배아줄기세포는 전능성으로 조직공학적으로 이상적인 세포이지만 실제적인 사용은 윤리적 관점과 정부의 규제로 제한된다(Dresser, 2001). 성체 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 높은 clonogenic cell로 자가 재생능력을 가지며, 골, 연골, 지방, 근육세포 등으로 분화할 수 있다고 알려져 최근 연구에 많이 이용되고 있다(Barry et al., 2001). 골수는 가장 보편적인 중간엽 줄기세포의 원천으로 알려져 있지만, 골막, 근육, 활액낭막과 지방조직 같은 조직에서도 MSCs를 분리할 수 있다고 알려져 있다(Zuk et al., 2002; Winter et al., 2003).

또한, 지방조직은 채취하기 쉽고 풍부해서 최근에 더욱 각광받고 있다(Nathan et al., 2003). Zuk et al.(2002)은 지방흡입으로부터 분리한 adipose tissue-derived mesenchymal stem cells(ATMSCs)은 다능성으로 지방세포, 근육세포, 골아세포로 분화할 수 있다고 보고했다. ATMSCs는 osteogenic differentiation 환경에서 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)에 광물화를 일으키며, 이때 osteocalcin, alkaline phosphatase(ALP)의 발현이 증가된다고 보고되고 있다(Halvorsen et al., 2001).

MSCs로부터 골이 형성되기 위해서는 세포증식과 분화를 촉진시키는 3D-scaffold가 효과적이다(Yang et al., 2001; Otto & Rao, 2004). 조직공학에서 다공성 scaffold에 세포를 배양하면 세포가 scaffold에 부착하여 증식하고 자신의 세포외 기질을 분비하며, 생분해성 scaffold를 대체한다. 또한 3D-scaffold는 세포의 부착을 돕고 세포의 성장을 촉진시키며 분화된 세포의 기능을 유지하도록 한다. 생분해성 scaffold는 생물학적 안전성을 가져야 하며, 부피를 최대로 하는 다공성 표면으로서 기계적으로 강해서 원하는 모양을 만들기가 수월해야 한다. 이러한 다공성 scaffold의 biomaterial로 사용되는 물질은 poly glycolic acid(PGA), poly D,L-lactic-co-glycolic acid(PLGA)나, 콜라겐과 무기질 hydroxyapatite(HA)와 같이 천연적으로 얻은 polymer가 있다(Peter et al., 1998).

PLGA는 생분해성 그리고 생안정성 scaffold 물질로 넓게 사용되어 왔다(Huang et al., 2004). HA는 인회석(calcium phosphate)으로 좋은 bio-affinity를 가지며, 골 형성 과정을 촉진시키고 이식 후에 host bone으로 천천히 대체된다(Radin & Duchenyne, 1994; Redey et al., 1994). HA는 세포의 배양환경에서 부착과 증식을 증가시키고(Webster et al., 2000), scaffold 표면을 거칠게 만들어 부착된 세포의 안정성을 제공하고 세포의 분화와 단백질 합성을 촉진시킨다고 알려져 있다(Boyan et al., 2002). 그러나, PLGA 단독으로는 MSCs의 골 조직 형성 시 골유도 환경을 제공하지 못한다고 보고되었다(Cowan et al., 2005).

이에 본 실험에서는 Bioceramic-PLGA scaffold가 인간 ATMSCs의 골 조직 형성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 또한, ATMSCs를 dexamethasone, ascorbic acid와 β-glycerophosphate가 들어있는 골 형성 유도 배양액으로 배양하여 ATMSCs의 골 형성 분화능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. ATMSCs의 배양

인간 지방조직에서 유래된 중간엽 줄기세포(human adipose

tissue derived mesenchymal stem cells, ATMSCs)는 휴림바이오셀(주)에서 제공받아 사용하였다.

세포배양은 T-75 flask(SPL)에 ATMSCs을 2×10^5의 세포수로 접종하여 37℃, 5% CO_2가 공급되는 습윤한 배양기에서 배양하였다. 기본 배양액으로는 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO), 100 ㎕/㎖ penicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose (DMEM-L, GIBCO)를 기본 배양액으로 사용하였으며, 2~3일에 한 번씩 배양액을 교환해 주었다. 세포가 배양용기에 80~90%까지 증식하였을 때 배양용기 내 배양액을 제거한 후 2 ㎖의 TrepLE(GIBCO)을 첨가하여 배양기에 3~5분간 방치한 후 배양용기로부터 약 90% 이상 단일세포로 분리된 것을 현미경을 통해 확인한 후 10 ㎖의 DMEM-L를 첨가하여 15 ㎖ conical tube(SPL)에 옮겨 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 제거 후 1 ㎖의 DMEM-L를 첨가하여 현탁한 후 T-75 flask에 2×10^5의 세포수가 되도록 접종하여 계대배양을 실시하였다. ATMSCs의 골형성 분화는 DMEM-L 배양액에 100nM dexamethasone(Sigma), 10mM β-glycerol-phosphate(Sigma), 0.05mM 2-phosphate-ascorbic acid(Sigma)를 첨가한 osteogenic induction(OI)배양액을 만들어 2~3일에 한 번씩 배양액을 교체하며 배양하였다.

2. ATMSCs의 증식률 측정

4th-passage ATMSCs를 24 well plate(SPL)에 2,000 cells/well이 되도록 접종하여 OI배양액과 기본배양액으로 2~3일에 한번씩 배양액을 교체하며 배양하였다. 각 well plate에서 세포의 증식률은 MTT assay(Mosmann, 1983)를 이용하여 측정하였다. 세포배양 0, 7, 14, 21, 28일째 되는 날에 plate의 상층액을 제거하고 0.5 ㎎/㎖의 3-(4,5-demethylthizol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma)가 포함된 DMEM-L를 넣어준 후 배양시켰다. 배양 8시간 후 각 plate의 상층액을 제거한 후 DMSO 1 ㎖를 넣고 10분 동안 배양시킨 뒤 microplate reader(Bio-Tek, ELx-800)를 이용하여 550 ㎚의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3. ATMSCs의 Osteoblast로의 분화: Alkaline Phosphatase 활성 측정

4th-passage ATMSCs를 24well plate에 2,000 cells/well이 되도록 접종하여 OI배양액과 기본배양액으로 처리하여 2~3일에 한번씩 배양액을 교체하며 배양하였다. Osteoblast로의 분화를 보기 위하여 각 well plate에서 marker enzyme인 ALP의 활성을 p-nitrophenol method(Shukunami et al., 1998)를 이용하여 파장 410 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 배양 0, 7, 14, 21, 28일째 되는 날에 ALP 활성을 측정하였다.

4. Scaffold 제작

PLGA scaffold는 salt leaching method를 이용하여 제작하였다. Acetone 8 ㎖에 poly D,L-lactic-co-glycolic acid(PLGA, Sigma) 8 g을 넣고 완전히 녹인 용액에 NaCl(particle size, 212~425 ㎛) 8 g을 넣고 충분히 섞어 두께가 1.6 ㎜가 되도록 cast에 부어 두께가 일정해지도록 하여 바람이 잘 통하는 그늘진 곳에 놓아두었다.

Bioceramic-PLGA scaffold는 acetone 8 ㎖에 PLGA 8 g과 bioceramic(SiO_2-68.13%, Al_2O_3-18.70%, Na_2O_3-6.80%, K_2O-4.60%, CaO-1.50%, Fe_2O_3-0.07%, AL-S-30, OK Co. Japan)을 50 ㎎ 첨가하여 넣고 완전히 용해한 후 NaCl(particle size, 212~425 ㎛) 8 g을 넣고 충분히 섞어 두께가 1.6 ㎜가 되도록 cast에 부어 두께가 일정해지도록 하여 바람이 잘 통하는 그늘진 곳에 놓아두었다. 단단히 굳어진 각각의 scaffold가 든 cast를 증류수에 넣고 scaffold와 cast가 분리될 때까지 3시간마다 한번 씩 증류수를 교환하였다. 분리된 각각의 scaffold에 수분을 완전히 제거하고 직경 12.0 ㎜의 일정한 크기로 잘라 실험하기 전까지 진공상태로 −20℃ 냉동 보관하였다. 각 scaffold는 살균 후 수세하여 10% penicillin이 포함된 FBS에 2시간 동안 처리한 후 사용하였다.

5. Scaffold에 따른 세포의 부착률 측정

4th-passage ATMSCs를 2×10^5 cells/㎖로 DMEM-L에 부유시켜서 2×10^4 cells/scaffold가 되도록 접종하여 37℃에 30분간 방치하였다. 세포가 scaffold에 충분히 부착된 것을 확인한 후 세포가 접종된 scaffold를 새 24-well plate로 옮기고, 200 ㎕ TrepLE를 이용하여 scaffold에 부착되지 않고 배양용기에 남아있는 세포를 채취하였다. 채취된 세포는 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 새 배양액으로 재 부유시키고 hemocytometer로 세포수를 측정한 다음 처음 접종한 세포수와 비교하여 부착률을 계산하였다.

6. Scaffold의 구조와 골 형성시의 광물화 측정

ATMSCs가 접종된 scaffold를 OI배양액에서 배양하여 14, 28, 42, 56일에 well plate로부터 꺼내어 4% formaldehyde로 1시간 고정하였다. Scaffold는 수세 후 탈수하여 동결건조기(Micro Modulyo-115, Thermo Savant)로 12시간 동안 동결 건조시켰다. 동결 건조된 scaffold는 gold coating한 뒤 FE-SEM (LEO1530, German)을 이용하여 10 keV로 scaffold 표면을 관찰하였고, SEM-EDS(KEVEX, USA)을 이용하여 20 keV로 scaffold 내의 인과 칼슘의 함량(광자량, photon count)을 측정하였다.

7. Scaffold의 생분해성 측정

ATMSCs가 접종된 PLGA scaffold와 Bioceramic-PLGA scaffold를 OI배양액으로 배양하여 2주간 분화를 유도한 뒤 생후 7주된 ICR-Strain 생쥐 수컷의 등쪽 피하에 이식하고, 이 생쥐를 56일간 사육하였다. 이식 후 56일째에 scaffold를 회수하였다. 회수한 scaffold와 ATMSCs를 접종하지 않은 초기 제작상태의 scaffold 크기를 각각 측정한 후 이식했던 scaffold를 4% formaldehyde로 고정하였다.

8. 골 형성시의 광물화 확인: 조직학적 염색(H/E Staining, Alizarin Red Staining)

기본배양액 또는 OI배양액으로 배양한 ATMSCs에 의한 광물화를 관찰하기 위해 배양 7, 14, 21, 28일에 alizarin red 염색으로 기질의 광물화를 확인하였다. 배양용기 내 세포의 광물화를 관찰하기 위해 배양용기의 배양액을 제거하고 4% formaldehyde로 10분간 고정한 후 수세하여 5분 동안 염색을 실시하였다.

Scaffold에서의 광물화를 관찰하기 위해 체내 이식하였던 scaffold는 4% formaldehyde에서 1시간 동안 고정한 후 paraffin section method로 5~7 ㎛로 절단하여 hematoxylin-eosin(H/E) 염색과 alizarin red 염색을 실시하였다.

9. 통계처리

실험은 3회 이상 반복하였으며, 대조군과 실험군의 통계적 유의성은 origin pro 7.5(OriginLab, USA)를 이용하여 Student *t*-test로 검정하였다.

결 과

1. ATMSCs의 분화

1) ATMSCs의 증식률 및 Osteoblast로의 분화

인간 지방조직에서 유래된 중간엽 줄기세포(human adipose tissue derived mesenchymal stem cells, ATMSCs)를 well-plate에 접종하여 osteogenic induction(OI)배양액과 기본배양액으로 28일 동안 배양하여 MTT assay로 증식률을 비교하고, osteoblast로의 분화는 alkaline phosphatase(ALP) 활성을 측정하였다.

ATMSCs의 증식률은 OI배양액군에서 배양 7일과 배양 14일에서 optical density(O.D)가 각각 0.31±0.02, 0.81±0.03로 기본배양액군 0.27±0.01, 0.56±0.06에 비해 다소 높게 나타났다(p<0.01). 그러나 배양 21일과 28일에서 증식률은 OI배양액군(1.05±0.05, 1.13±0.05)보다 기본배양액군(1.16±0.01, 1.46±0.07)에서 증식이 더 활발한 것으로 나타났다(p<0.01). 또한 OI배양액군의 증식률은 세포배양 후 14일까지는 세포증식이 활발하게 진행됐지만, 21일 이후에는 세포의 증식이 둔화되는 양상을 보였다. 반면, 기본배양액군은 꾸준한 세포증식을 보이며 21일 이후에는 OI배양액군보다 더 높은 증식을 나타냈다(Fig. 1).

배양에 따른 세포의 ALP 활성은 OI배양액군은 배양 7, 14, 21, 28일에서 각각 1.72±0.02, 1.85±0.01, 1.95±0.01, 1,72±0.01로 세포배양 21일까지는 ALP 활성이 증가했지만 28일(1.72±0.01)에는 감소하였다. 반면에 기본배양액군은 1.70±0.02, 1.62±

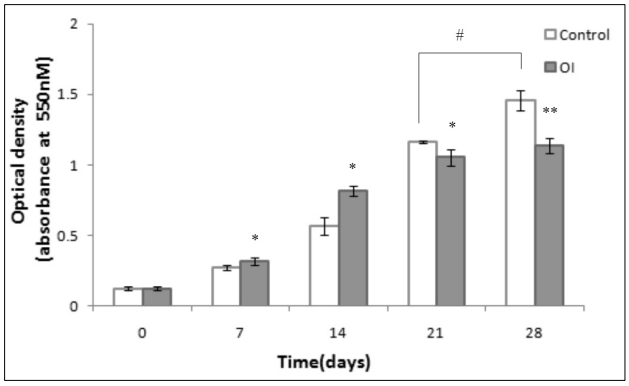

Fig. 1. The proliferation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells cultured in the basic or the osteogenic induction medium during 28 days. Optical density is arbitrary unit. Data are presented as the mean±S.D. and three replications were done. Abbreviations: Control, basic medium (blank bar); OI, osteogenic induction medium (dark bar). *,**Significantly different from the control group, *p<0.01, **p<0.001. # Significantly different from the 21 days, #p<0.001.

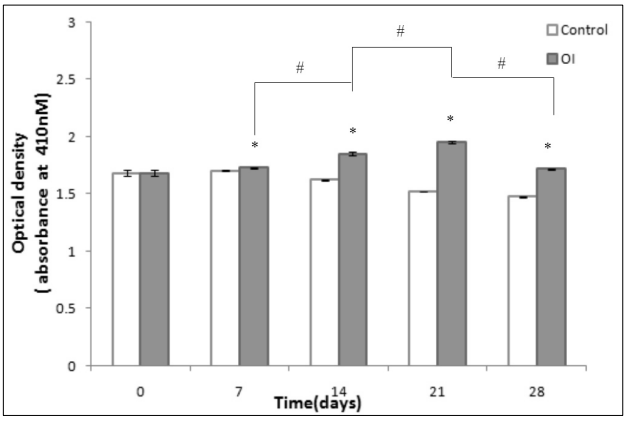

Fig. 2. Alkaline phosphatase activity of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells cultured in the basic or the osteogenic induction medium during 28 days. Optical density is arbitrary unit. Data are presented as the mean ±SD and three replications were done. Abbreviations: Control, basic medium (blank bar); OI, osteogenic induction medium (dark bar). *Significantly different from the control group, *p<0.001, #Significantly different from the each OI group, #p<0.001.

0.04, 1.53±0.01, 1.46±0.01로 세포배양 시간이 증가함에 따라 계속 감소하는 양상을 띠었다(Fig. 2).

2) ATMSCs의 형태적 변화와 골 형성시의 광물화

ATMSCs를 well plate에 접종하고 OI배양액으로 28일 동안 배양하였다. ATMSCs의 골형성 과정은 세포의 형태적 변화와 alizarin red 염색을 하여 광물화를 관찰하였다.

OI배양액군은 14일에 세포가 모여 군집을 이루며 둥글게 nodule를 형성하기 시작했다. 반면, 기본배양액군에서는 뚜렷한 형태의 군집을 이루지 않고 일반적인 세포증식에 따른 세포의 형태를 띠고 있음을 관찰하였다(Fig. 3).

세포를 배양하면서 7, 14, 21, 28일에 alizarin red 염색 결과를 비교했을 때, 기본배양액군은 변화가 뚜렷하게 나타나지 않았다(Fig. 4). 반면, OI배양액군은 14일 이후 염색에 의한 변화가 뚜렷하게 나타났으며, 시간이 지날수록 더욱 뚜렷한 색 변화를 볼 수 있었다(Fig. 4). OI배양액군의 염색부분은 세포가 모여 둥글게 형성된 nodule 부분에서 더 활발히 일어난 것을 볼 수 있었다(Fig. 4).

2. Scaffold에서 ATMSCs의 골 형성

1) Scaffold의 미세구조와 세포부착

Scaffold의 표면을 관찰해 보면, PLGA scaffold는 NaCl

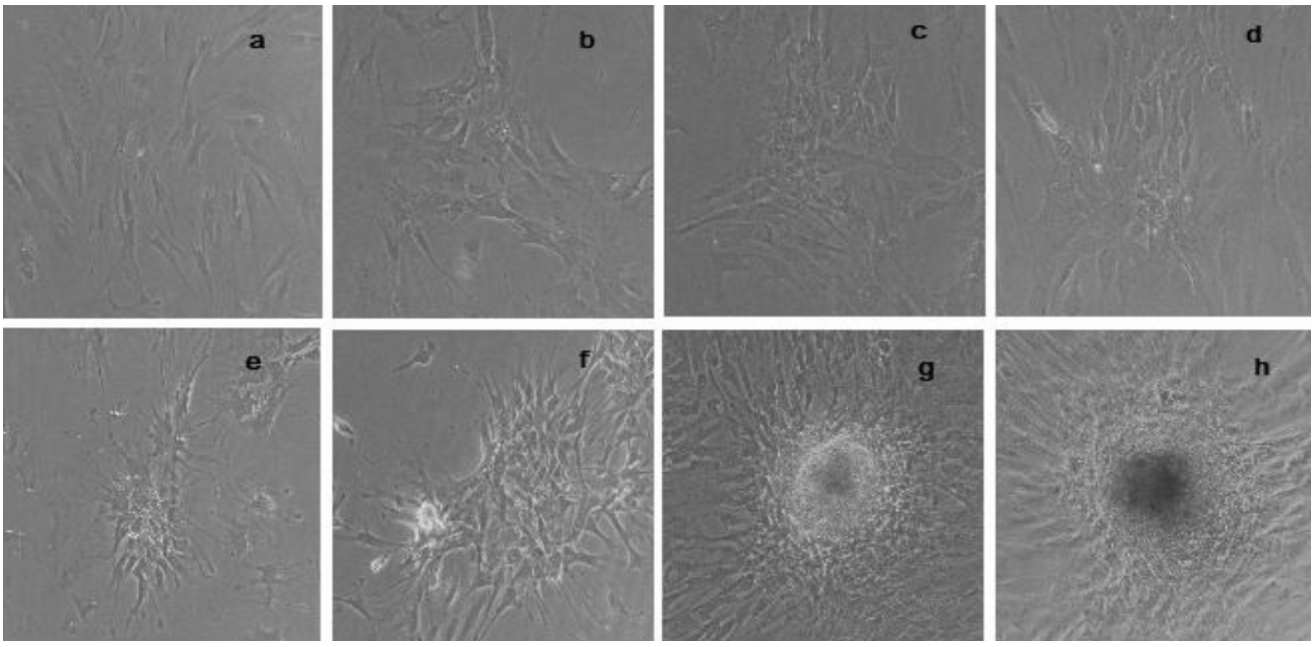

Fig. 3. The formation of nodular aggregate. The human adipose tissue derived mesenchymal stem cells cultured in the basic (a~d) or osteogenic induction (OI) medium (e~h) and examined at 7 (a and e), 14 (b and f), 21 (c and g) and 28 days (d and h). Magnification: ×100. The nodular aggregates were formed in OI medium at 21 and 28 days.

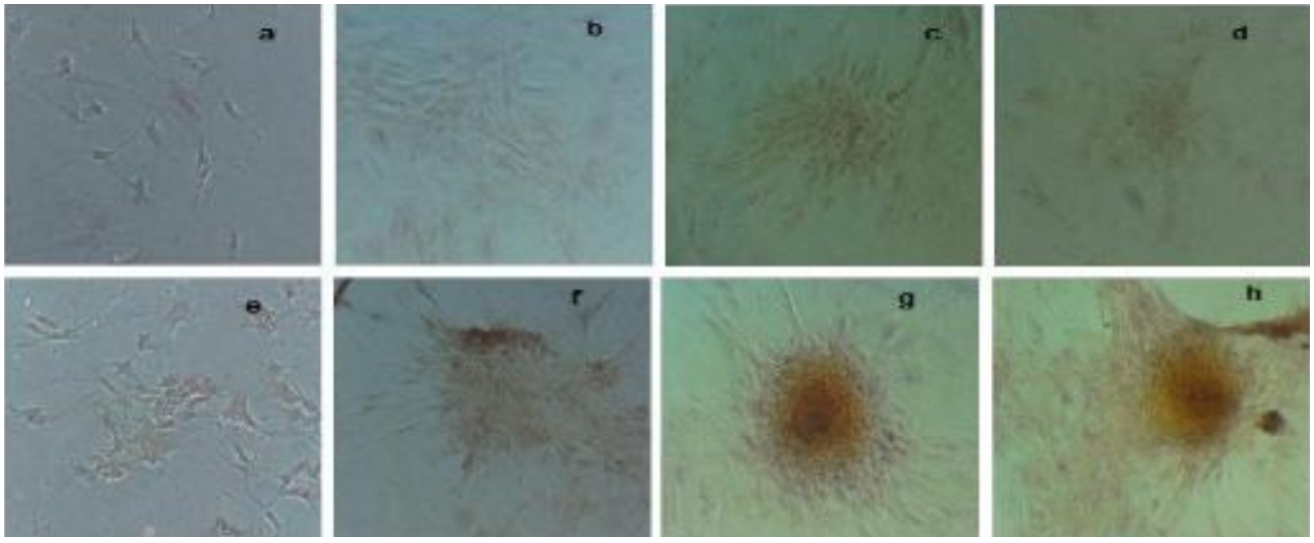

Fig. 4. The human adipose tissue derived mesenchymal stem cells stained with the alizarin red. Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells were cultured in the basic (a~d) or in the osteogenic induction medium (e~h) and stained with the alizarin red at 7 (a and e), 14 (b and f), 21 (c and g) or 28 days (d and h). Magnification: ×100. Nodular aggregates were stained positively in OI medium at 21 and 28 days.

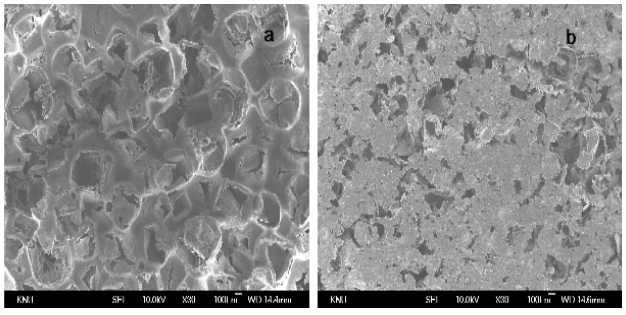

Fig. 5. The scanning electron microscopic examination of each scaffold. Poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold (a) and Bioceramic-poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold (b). Magnification: ×30.

의 결정에 의해 큰 pore를 형성했다. 그러나 Bioceramic-PLGA scaffold는 NaCl 결정에 의해 생긴 큰 pore 사이에 bioceramic이 첨가되어 pore size를 작게 만든 것이 관찰되었다(Fig. 5a, b).

OI배양액에서 배양된 각각의 scaffold에 부착된 ATMSCs는 형태적 차이는 나타나지 않았다. 배양 14일에 ATMSCs는 세포의 경계가 불명확한 단일층으로 나타났다. 배양 28일 이후 부터는 세포가 길쭉하게 경계가 분리되고 납작하며, 세포질 돌기물이 다양하게 뻗어나온 다각형 구조를 나타내었고, 다층으로 증식된 형태를 나타냈다. 또한 광물화에 따른 calcified

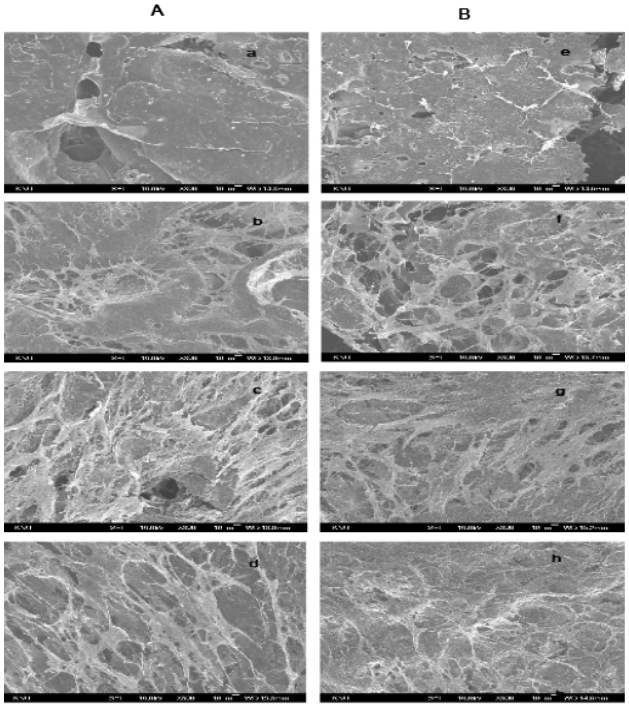

Fig. 6. The scanning electron micrograph of scaffolds. The human adipose tissue derived mesenchymal stem cells seeded in poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold (A) or Bioceramic-poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold (B) cultured in the osteogenic induction medium for 14 (a and e), 28 (b and f), 42 (c and g), 56 days (d and h). Magnification: ×300.

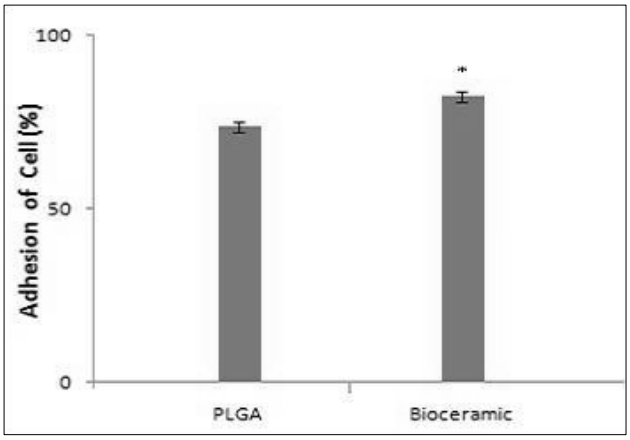

Fig. 7. The adhesion rate of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells in each scaffold surface. Data are presented as the mean±SD of three replications. Abbreviations: PLGA, poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold; Bioceramic, Bioceramic-poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold. *Significantly different from the PLGA, *p<0.01.

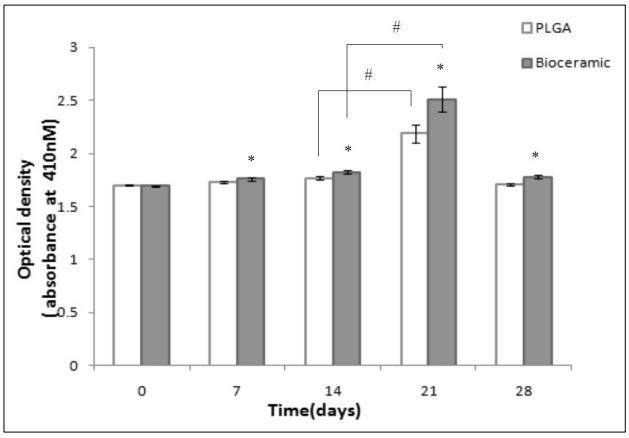

Fig. 8. The alkaline phosphatase activity of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells seeded in PLGA or Bioceramic-PLGA scaffold cultured in the osteogenic induction medium for 28 days. Optical density is arbitrary unit. Data are presented as the mean±SD and three replications were done. Abbreviations: PLGA, poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold (blank bar); Bioceramic, Bioceramic-poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold (dark bar). *Significantly different from the PLGA scaffold, *p<0.001, # Significantly different from 14 days each scaffold, #p<0.001.

globular nodule은 배양동안에 부분적으로 관찰되며, nodular aggregate는 56일 배양된 Bioceramic-PLGA scaffold에서 관찰되었다(Fig. 6).

각각의 scaffold에서 ATMSCs의 부착률은 PLGA scaffold에서 73.52±1.80%로 나타났으며, Bioceramic-PLGA scaffold에서는 82.31±1.52%로 나타났다(Fig. 7).

2) Scaffold에 접종된 ATMSCs의 분화

Scaffold에 접종된 ATMSCs의 분화유도에 따른 ALP 활성은 배양 0, 7, 14, 21, 28일에 각각 측정하였다. PLGA scaffold에서 ALP 활성은 각각 1.67±0.02, 1.73±0.01, 1.76±0.01, 2.18±0.09, 1.70±0.01로 나타났고, Bioceramic-PLGA scaffold는 각각 1.68±0.02, 1.75±0.01, 1.82±0.01, 2.50±0.11, 1.77±0.01로 PLGA scaffold와 비슷하게 나타났다. PLGA scaffold와 Bioceramic-PLGA scaffold 모두 세포 배양 14일까지는 뚜렷하게 증가하지 않다가 21일에 급격히 증가하였고, 28일에 급격한 감소를 나타냈다. 특히 21일에 PLGA scaffold와 Bioceramic-PLGA scaffold 모두 높은 ALP 활성 증가가 나타났고, PLGA scaffold에 비해 Bioceramic-PLGA scaffold의 ALP 활성이 크게 증가하였다(Fig. 8).

3) Scaffold의 생분해성과 골 형성시의 광물화

Scaffold에 ATMSCs를 접종하여 OI배양액에서 14일간 분화를 유도한 뒤에, 이 scaffold를 생쥐의 등쪽 피하에 이식하여 56일 경과된 scaffold와 세포를 접종하여 배양하기 전의 scaffold의 직경을 비교해 보았을 때, PLGA scaffold는 12 ㎜에서 9 ㎜로 세포를 접종하여 배양하기 전보다 크기가 25% 감

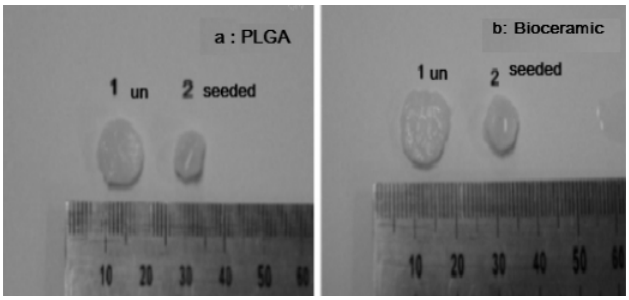

Fig. 9. The comparison between unseeded scaffold and seeded scaffold after implantation for 56 days *in vivo*. The human adipose tissue derived mesenchymal stem cells seeded in scaffolds were cultured in the osteogenic induction medium for 14 days and implanted in mouse. Abbreviations: PLGA, poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold; Bioceramic, Bioceramic-poly D,L-lactic-co-glycolic acid scaffold; 1 un, human adipose tissue derived mesenchymal stem cells unseeded scaffold at 0 day; 2 seeded, human adipose tissue derived mesenchymal stem cells seeded scaffold at 56 days.

소하였다. Bioceramic-PLGA scaffold는 12 ㎜에서 8.3 ㎜로 크기가 31% 감소하였다(Fig. 9). 또한 ATMSCs가 접종된 scaffold의 생체내 mineralization은 hematoxylin-eosin 염색과 alizarin red 염색을 통해 확인했는데, Bioceramic-PLGA scaffold의 세포들이 더 큰 군집을 이룬 것을 볼 수 있었다. 또한 Bioceramic-PLGA scaffold에서 PLGA scaffold보다 더 뚜렷한 alizarin red 염색을 나타냈다(Fig. 10).

PLGA scaffold와 Bioceramic-PLGA scaffold에 ATMSCs를 접종하여 8주 동안 배양하며, 14, 28, 42, 56일에 scaffold 단위 면적당 칼슘과 인의 함량을 측정하였다. PLGA scaffold는 인의 방출선량(emitted beam intensity)은 세포를 접종하기 전에는 18 광자량(photon count)에서 접종 후 각각 34, 44, 52, 72 광자량으로 배양시간이 증가함에 따라 인의 함량 증가가 나타났다. 또한 칼슘의 방출선량도 세포를 접종하기 전에는 8 광자량에서 접종 후 각각 12, 20, 28, 42 광자량으로 배양시간이 지나며 칼슘의 함량도 증가하였다(Fig. 11). Bioceramic-PLGA scaffold는 인의 방출선량이 세포를 접종하기 전 38 광자량에서 접종 후 각각 48, 50, 64, 98 광자량으로 배양시간이 증가함에 따라 인의 함량 정도가 증가함을 알 수 있었는데, 14일에서 28일 사이의 증가폭보다 28일 이후의 증가폭이 현저히 크게 나타남을 알 수 있었다. 또한 칼슘의 방출선량은 세포를 접종하기 전 13 광자량에서 접종 후 각각 18, 32, 40, 82 광자량으로 배양시간에 따라 지속적인 증가가 일어났다(Fig. 11). Bioceramic-PLGA scaffold 자체에 초기 인과 칼슘의 함량 정도가 더 높게 나타났으며, Bioceramic-PLGA scaffold의 칼슘의 함량은 56일에는 PLGA scaffold와 비교했을 때 거의 2배 이상 높았다.

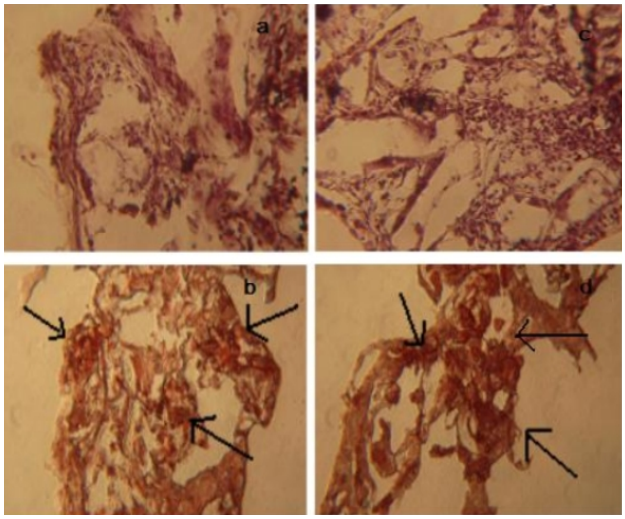

Fig. 10. The histological staining of scaffolds implanted for 56 days. Hematoxylin-eosin staining of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells seeded in PLGA (a) or Bioceramic scaffold (c) and alizarin red staining of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells seeded in PLGA (b) or Bioceramic scaffold (d). Accumulation of calcium in nodular aggregate by mineralization is indicated by arrows. Magnification; ×200. Abbreviation: PLGA, poly D,L-lactic-co-glycolic acid; Bioceramic, bioceramic-poly D,L-lactic-co-glycolic acid.

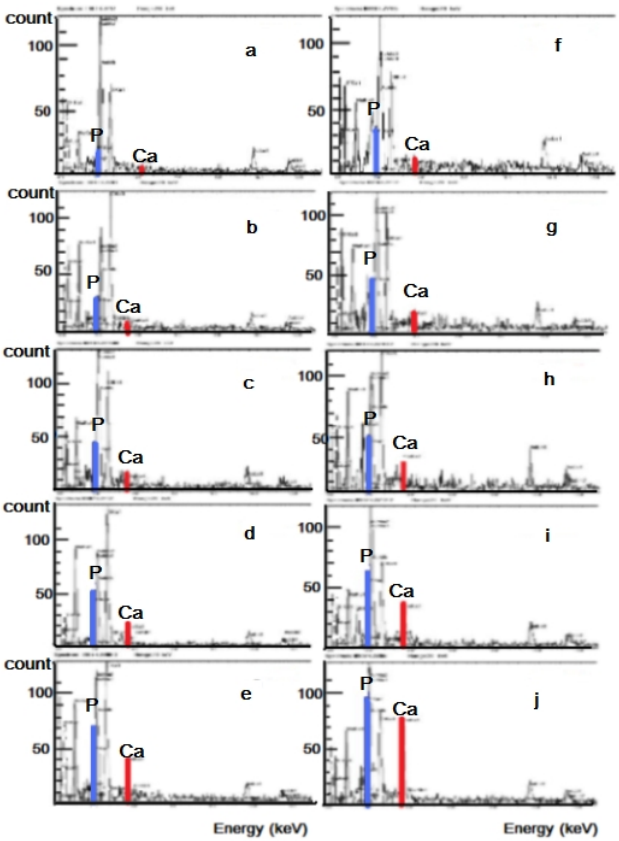

Fig. 11. The scanning electron microscopy (SEM)-energy dispersive X-ray spectrometry (EDX) analysis of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ATMSCs) seeded in scaffolds sections. ATMSCs seeded in poly D,L-lactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffolds (a~e) or Bioceramic-PLGA scaffolds (f~j) and analyzed with SEM-EDX at 0 (a and f), 14 (b and g), 28(c and h), 42 (d and i) and 56 days (e and j) after osteogenic induction. a and f were unseeded scaffold as the negative control. Calcium and phosphorous emitted beam intensity are arbitrary unit of photon count.

고 찰

Jaiswal et al.(1997)은 골형성 분화 유도 물질을 처리하여 세포를 배양하면 세포의 증식이 일어나는 동안 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 증가하며, ALP 활성이 최고점에 이른 뒤에 control level로 감소하고, ALP 활성의 증가와 활성 최고점에서 뒤따르는 ALP 활성 감소는 matrix mineralization과 osteogenesis가 시작되는 것이라고 보고했다. 세포의 증식이 활발히 일어난 뒤에 세포의 분화가 일어나며, 분화에 따른 특정 marker enzyme이 활성화 된다. 골형성 분화에는 ALP가 marker enzyme으로 작용하며 ALP 활성의 증가는 인간지방 조직에서 유래된 중간엽 줄기세포(human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ATMSCs)의 골형성 분화의 광물화 단계에 필수적이라고 보고되었다(Aubin et al., 1995; Sugawara et al., 2002).

본 실험에서 ATMSCs를 plate에 배양하며 세포의 증식과 ALP 활성 측정 결과를 보면 osteogenic induction(OI)배양액군의 초기 증식률이 기본배양액군보다 높게 나타났고, 배양 21일에는 OI배양액군보다 기본배양액군의 증식률이 높게 나타났다. 또한 배양 21일 후 OI배양액군의 증식률은 다소 둔화되는 양상을 보여주었다(Fig. 1). ALP 활성은 OI배양액군이 21일까지 계속적인 증가 후 28일에 control level로 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 ATMSCs가 OI배양액군에서 초기 증식이 활발하게 진행되어 증식이 둔화되는 시점에 ALP 활성이 증가하여 최대가 되어 초기 분화가 진행됨을 확인할 수 있었다. 반면, 기본배양액군은 골 형성 유도 물질이 존재하지 않아 ALP 활성이 증가 하지 않음을 확인할 수 있었다.

골수 유래 중간엽 줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)는 골 형성 분화가 진행되면 세포의 형태가 둥글거나 납작하게 변하며 둥글게 모여서 결절을 형성하고, 비결정 물질을 nodular aggregates에 침착하게 되는데, nodular aggregates에 침착된 물질은 alizarin red 염색을 통해 칼슘임이 확인되었다(Donzelli et al., 2007). 본 실험에서도 plate에 ATMSCs를 접종하여 배양하여 nodular aggregates가 형성됨을 배양 21일에 확인하였고, 침착된 물질은 alizarin red 염색을 통해 칼슘임을 확인하였다(Fig. 3, 4).

Scaffold에 접종된 MSCs의 골아세포 형태 분화가 활발히 진행될 때 ALP 활성이 더 높게 나타난다고 보고되었다(Wang et al., 2007). 본 실험에서도 ATMSCs를 접종한 scaffold를 OI배양액으로 배양한 후 ALP 활성을 측정하여 비교한 결과, ALP 활성 최대점이 배양 21일에 PLGA scaffold는 2.18, Bioceramic-PLGA scaffold는 2.50로 나타났다(Fig. 8). 이러한 결과로 볼 때 bioceramic이 PLGA scaffold에 첨가되면 PLGA scaffold 자체보다 osteoblast로의 분화에 효과적으로 작용한다고 사료된다.

Calcium phosphate(CaP)가 함유된 ceramics는 골 조직의 성장과 광물화와 관련된 단백질인 bone sialoprotein, osteocalcin, ALP, type Ⅰ collagen과 osteonectin 단백질 생성에 영향을 미친다고 알려져 있으며(Ayers et al., 2006), biomaterials 중 CaP가 함유된 물질은 osteoblast 분화를 촉진시킨다고 보고되었다(Wang et al., 2005). CaP 또는 CaP가 풍부한 물질은 골 형성시에 MSCs의 osteoblast로의 분화를 조절하는데 중요한 요인으로 작용하고(Takahashi et al., 2005), 체외 배양 시 칼슘과 인의 농도를 증가시키면 광물화를 촉진시킬 수 있다고 알려져 있다(Chang et al., 2000). 세포가 접종된 scaffold의 광물화가 진행될수록 칼슘과 인의 함량이 증가한다고 보고되고 있다(Donzelli et al., 2007).

본 실험에서도 배양 기간이 길어질수록 PLGA scaffold와 Bioceramic-PLGA scaffold내 칼슘과 인의 함량이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 배양 시작시에 Bioceramic-PLGA scaffold의 칼슘과 인의 함량이 PLGA scaffold의 약 2배로 나타났고, 배양시간이 증가함에 따라 칼슘과 인의 함량도 지속적으로 증가함을 확인하였다. 또한 56일 배양 후 칼슘의 함량은 Bioceramic-PLGA scaffold가 PLGA scaffold보다 2배 높게 나타났는데, 이는 bioceramic이 PLGA scaffold에 첨가되어 CaP가 함유된 ceramics처럼 작용을 하여 ATMSCs의 골형성 분화능을 촉진시켜 광물화에 따른 칼슘과 인의 함량이 증가된 것으로 사료된다. EDS 분석결과의 Ca/P ratio는 배양시간에 따라 PLGA scaffold에서 0.44, 0.40, 0.45, 0.54, 0.58배로 증가하고, Bioceramic-PLGA scaffold에서는 0.34, 0.38, 0.64, 0.63, 0.84배로 배양시간이 길어짐에 따라 scaffold 내의 골 형성이 증가되었다. 동물 뼈의 Ca/P ratio는 대략 1.67배 이하의 값을 갖는다고 알려져 있는데(Das, 2005), Bioceramic-PLGA scaffold의 Ca/P ratio값이 PLGA scaffold보다 높은 결과를 볼 때 Bioceramic-PLGA scaffold가 골 형성에 더 효과적이라 사료된다.

Nano-sized hydroxyapatite(HA) particles를 이용해 만든

PLGA/HA scaffolds는 micro-sized HA particles보다 표면적이 큰 scaffold를 만들 수 있으며, 골 손상 부위에 이식되어 생리활성과 골의 재생을 개선할 수 있고, 또한 단백질 흡착과 세포 부착을 촉진한다고 보고되고 있다(Kim et al, 2006). 본 실험의 결과에서도 Bioceramic-PLGA scaffold 표면은 PLGA scaffold의 pore와 달리 pore 표면을 bioceramic이 뒤덮어 pore 사이를 채워주고 있는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이로 인해서 세포부착 표면적을 넓혀 scaffold에 세포 접종 시 부착률을 증가시키는 것도 확인할 수 있었다(Fig. 7).

세포를 접종한 scaffold의 체내 생분해는 접종 세포의 분화 과정에서 발생하며, 광물화단계의 칼슘 침착이 분해된 scaffold를 대체한다고 보고되고 있다(Kanczler et al., 2008). Scaffold의 분해성은 scaffold 구성 물질의 영향을 받으며, 세포가 접종되어 분화되면서 scaffold 분해를 촉진시킨다고 보고되었다(Hee et al., 2006). 세포가 접종된 scaffold의 크기는 골의 형성이 증가됨에 따라 scaffold의 크기는 감소되고, scaffold의 두께가 감소되는 반면에 뼈의 두께는 증가한다고 보고되었다. 세포가 접종되지 않은 scaffold는 체외 배양 동안에 scaffold의 분해는 일어나지 않으며, 체내 이식을 하여도 분해가 뚜렷이 나타나지 않는다고 보고되었다(Mastrogiacomo et al., 2007).

본 실험에서도 세포를 접종한 Bioceramic-PLGA scaffold와 PLGA scaffold를 분화 유도하여 생체 내 이식하여 56일 동안 배양한 scaffold와 세포가 접종되지 않은 초기 scaffold의 크기를 비교해 보았을 때, 생체 내 이식한 두 scaffold 모두 크기가 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 9). 또한 생체 내 배양에 따른 광물화도 alizarin red 염색으로 확인할 수 있었다(Fig. 10). Bioceramic-PLGA scaffold의 크기는 31%가 감소하고, PLGA scaffold의 크기는 25%가 감소하여, Bioceramic-PLGA scaffold의 크기가 더 작게 나타났다(Fig. 9). 또한 alizarin red 염색으로 확인한 광물화도 Bioceramic-PLGA scaffold에서 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 10). 이러한 결과는 scaffold에 함유된 bioceramic으로 인해서 세포 분화가 촉진되고 골 형성 과정이 촉진되어 칼슘의 침착이 증가된 것으로 사료된다.

본 실험의 결과들을 종합해 볼 때 ATMSCs의 골형성능은 plate보다 scaffold가 더 효과적이며, bioceramic이 scaffold의 세포 부착률을 증가시키고 골 형성 분화에 효과적으로 작용하여 ALP 활성을 높이는 것으로 생각되며, scaffold 제작 시 생성되는 pore size를 감소시켜 scaffold에 세포가 부착, 증식하여 분화하기 더 좋은 환경을 제공한다고 사료된다. 또한 bioceramic이 ATMSCs의 골 형성 분화에 따른 광물화단계의 scaffold내 칼슘과 인의 함량을 증가시키는 것으로 사료된다. 생체 내 scaffold의 생분해성은 PLGA scaffold보다 Bioceramic-PLGA scaffold가 빠른 분해를 나타내며, 광물화에 따른 칼슘 침착이 더 활발한 것은 scaffold에 포함된 bioceramic이 생체 내 세포의 부착, 증식, 분화를 증가시켜 골형성을 촉진시키는 물질로 작용한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 충북대학교 학술연구지원사업(2009년)의 연구비 지원에 의해 연구되었음.

인용문헌

Aubin JE, Liu F, Malval L, Gupta AK (1995) Osteoblast and chondroblast differentiation. Bone 17(suppl):s77-s83.

Ayers R, Sheila NP, Virginia F, Guglielmo G, Moore JJ, Kleebe HJ (2006) Osteoblast-like cell mineralization induced by multiphasic calcium phosphate ceramic. Materials Sci and Eng C 26:1333-1337.

Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res 268:189-200.

Boyan BD, Bonewlsd LF, Paschlis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochra DL, Dean DD, Schwartz Z, Boskey AL (2002) Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopology. Calcif Tissue Int 71:519-529.

Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS (2000) Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. Biomaterials 21:1291-1298.

Cowan CM, Soo C, Wu B (2005) Evolving concepts in bone tissue engineering. Curr Top Dev Biol 66:239-285.

Das P, Ozan A, Aza AM (2005) Optimization of the mineral

content in polymeric gels: The effect of calcium to phosphate molar ratio. J Crystal Growth 280:587-593.

Donzelli E, Salvade A, Mimo P, Vigano M, Morrone M, Papagna R, Carini F, Zaopo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G (2007) Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: *In vitro* osteogenic differentiation. Arch Oral Biol 52:64-73.

Dresser R (2001) Ethical issues in embryonic stem cell research. JAMA 285:1439-1440.

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. Tissue Eng 7:729-741.

Hee CK, Joinkas MA, Nicoll SB (2006) Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. Biomaterials 27:875-884.

Huang W, Carlsen B, Wulur I, Rudkin G, Ishida K, Wu B (2004) BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and required for *in vitro* bone formation in a PLGA scaffold. Exp Cell Res 229:325-334.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cell *in vitro*. J Cell Biochem 64:295-312.

Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJA, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo ROC (2008) The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. Biomaterials 29:1892-1900.

Kim SS, Park MS, Jeon O, Choi CY, Kim BS (2006) Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 27:1399-1409.

Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, Alini M, Giannini P, Guagliardi A, Cancedda R (2007) Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: Evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. Biomaterals 28:1379-1384.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55-63.

Nathan S, De Das S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH (2003) Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. Tissue Eng 9: 733-744.

Otto WR, Rao J (2004) Tomorrow's skelecton staff: mesenchymal stem cells repair of bone and cartilage. Cell Prolif 37:97-110.

Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG (1998) Polymer concepts in tissue engineering. J Biomed Mater Res 43:422-427.

Radin SR, Ducheyne P (1994) Effect of bioactive ceramic composition and structure on *in vitro* behavior: Ⅲ Porous versus dense ceramics. J Biomed Mater Res 28: 1303-1309.

Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M (1994) Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. J Biomed Mater Res 45:140-147.

Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y (1998) Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. Exp Cell Res 241:1-11.

Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J (2002) Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. Jpn J Pharmacol 88:262-269.

Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y (2005) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β-tricalcium phosphate. Biomaterials 26:3587-3596.

Wang YW, Wu Q, Chen JC, Chen GQ (2005) Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydro-

xyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexnoate) for bone reconstruction. Biomaterials 26:899-904.

Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L (2007) Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nanohydroxyapatite/polyamid composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 28:3338-3348.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R (2000) Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. J Biomed Mater Res 51:475-483.

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids. Arthritis Rheum 48:418-429.

Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part Ⅰ. Traditional factors. Tissue Eng 7:679-689.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13:4279-4295.

(Received 7 April 2011, Received in revised form 30 May 2011, Accepted 10 June 2011)