

## 연골세포의 기계적 물성치 측정

이권용\*(세종대 기계공학과), Daehwan Shin(Univ. of Texas Health Science Center at San Antonio), 박상국(세종대 대학원 기계공학과), 김병수(한양대 응용화학공학부), 박종철(연세대 의용공학교실)

### Measurement of Biomechanical Property of Chondrocyte

K.-Y. Lee(Mechanical Eng. Dept., SJU), D. Shin(UTHSC), S.K. Park(Mechanical Eng. Dept., SJU), B.S. Kim(Applied Chemical Eng. Dept., HYU), J. C. Park(Biomedical Eng. Dept., YSU)

#### ABSTRACT

A cyto-indentation technique was used to obtain the biomechanical compressive compliance property of an chondrocyte cell attached to glass surface, which was tried to generate joint cartilage by tissue engineering. Piezo-transducer system and dual photo-diode system were used to conduct mechanical indentation through displacement-controlled testing and the measurement of corresponding cell reaction force. The Poisson's ratio of 0.37 was quoted from other report. The compressive compliance of chondrocyte, that was determined by elastic contact theory, was  $1.38 \pm 0.057$  kPa. This value is 30% higher than that of MG63 osteoblast-like cell. The cyto-indentation technique employed in this study is so precise that it can quantify the biomechanical property of single cell.

**Key Words** : Chondrocyte, Cartilage, Cyto-indentation, Compressive Compliance, Tissue Engineering

#### 1. 서론

인체내의 관절 부위에서 발생되어지는 질병을 치료하기 위하여 여러 종류의 인공 대체물이 개발되어 사용되고 있다. 이 가운데 대표적인 것이 인공 관절 치환술이며, 이에는 금속, 폴리머, 세라믹 등 여러 종류의 기계 재료들이 활용되고 있다. 일차적으로 이들 재료들은 생체 적합성에서 문제가 없는 경우 사용되고 있으며, 또한 생체 역학적인 특성을 충분히 만족할 수 있어야 한다.

그러나, 꾸준한 연구와 발전을 통한 인공 관절 대체물의 개선에도 불구하고, 관절 상대 미끄럼 운동에 의한 미세 마멸 입자의 발생과 이들 입자의 주변 골세포와의 생리학적 반응으로 인한 골용해(bone resorption)과 이로 인한 대체물의 무균성 해리현상(aseptic loosening)이 인공 관절의 수명을 제한하는 원인으로 판명되었다 [1-3]. 따라서 과거 20년 전 이래로 현재까지 마멸을 줄이고 생체 적합성에 문제가 없는 인공 관절 대체물의 개발과 개선을 위한 노력들이 진행되고 있다 [4,5].

최근에는 인공 대체물을 사용하는 대신에 실제 생체조직을 활용하는 방법으로서의 방향 전환이 시도되고 있다 [6, 7]. 연골조직의 인공적인 재생기술은 연골을 구성하는 기본 세포인 chondrocyte를 extra-cellular matrix (collagen)를 포함하여 생분해성 폴리머 구조체 (scaffold) 표면에 접합하고, 생체환경 아래에서 세포를 배양하고 동물이나 인체에 시술을 통하여 손상된 연골 조직에 삽입하는 것으로 구성되어 있다. 이러한 새로운 시도가 가능해진 것은 조직공학의 발달로 실험실에서 세포배양에 의한 인체의 조직 재생이 가능해 졌고, 아직은 여러 가지 기술적 제약이 많으나, 이를 통한 관절 질환의 치료를 위한 연구들이 진행되고 있다.

조직공학을 이용하여 재생된 관절 연골의 성공 여부는 인공적으로 연골이 필요한 형상으로 재생되는가? 주위 연골 또는 하부 골과의 접합은 용이한가? 인체 내로의 이식 이후 계속 조직이 성장하는가? 등의 기본적인 평가와 재생된 연골조직의 생물학적, 생리학적, 생체역학적 평가 등이 종합적으로 이루어져야 한다.

조직공학을 이용한 연골의 재생평가에 의하면 생물학적, 생리학적 결과는 매우 성공적인 것으로 나타나고 있으나, 생체역학적 평가는 정상적인 연골에 비하여 1/3 수준에 머무르고 있는 실정이다 [8-10]. 최근에는 이 문제점을 해결하기 위한 방편으로 조직재생과정에 기계적 자극을 포함하는 시도가 활발히 진행되고 있다. 특히, 재생된 연골조직의 기계적 load bearing 역할에 대한 평가뿐 아니라 접합된 cell level 에서의 평가도 매우 의미가 크다. 조직공학을 이용한 연골조직의 성공적 개발과 임상적용을 위해서는 정상적인 연골조직에서 추출된 chondrocyte 연골세포 자체의 기계적 물성치에 대한 기초 data 확립이 필요하며, 특히 cell culture 과정 (기간, matrix 의 종류, growth factor 의 영향 등)을 통한 chondrocyte 의 기계적 물성치 변화에 관한 data 도 필요하다.

Cell 자체의 biomechanical property 측정 방법에는 Duke 대학의 Dr. Guilak 이 개발한 cell 을 작은 대롱으로 부분적으로 빨아 들여서 cell 기질의 물성치를 측정하는 suction method [11]와 Texas Health Science Center at San Antonio 대학의 Dr. Shin 에 의하여 개발된 cell 을 micro indenter tip 으로 눌러서 cell 기질의 물성치를 측정하는 cyto-indentation method [12]가 있다. 본 연구에서는 cyto-indentation method 를 활용하여 chondrocyte 의 기계적 물성치를 측정하는 것을 목적으로 한다.

## 2. 실험방법

### 2.1 연골세포 sample preparation

1 개월 된 뉴질랜드 토끼 뒷다리 무릎연골로부터 연골세포를 분리하고 FBS-containing DMEM/F-12 배지를 넣어 resuspension 시킨 후 이산화탄소가 유지되는 37°C incubator 에서 배양한다. 1 주일마다 세포가 confluent 해지면 trypsin 처리하여 1 세포배양 용기로부터 3-5 용기로 passage 한다. Passage 1-5 의 연골세포를 실험을 위해 액체질소탱크에 저장해 두었다가 사용하였다.

Seeding 된 세포를 되도록 적게 하고, 또한, 같은 조건의 세포 시편을 반복적으로 확보하기 위하여 microscope glass slide 를 여러 장 포개어 필요한 크기로 Diamond saw 로 절단하고 그 절단면을 폴리싱하고 알코올로 세척하고 autoclave 에서 멸균 처리하여 four-well cull culture chamber 안에 절단면이 위로 향하도록 위치시키고, 분리 저장되었던 passage 2 연골세포를 절단면 위에 seeding 하고 5% 이산화탄소가 유지되는 37°C incubator 에서 배양한다. 배양 후 2-5 시간부터 over night 배양하는 동안 포개진 slide 조각을 하나 씩 분리하여 glass 표면에 부착된 연골

세포를 현미경으로 관찰하여 하나의 연골세포를 대상으로 indentation test 를 실시하기에 가장 적합한 세포의 부착상태 (퍼지지 않고 반구 형상의 세포가 isolation 되어 있고 주위의 다른 세포와 겹치거나 뭉쳐있지 않은)를 확인하였다 (Fig. 1).

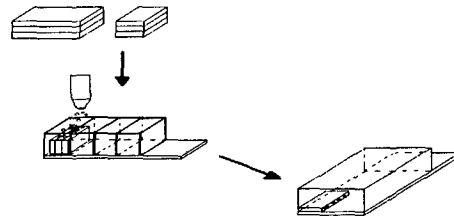


Fig. 1 Sample preparation of chondrocyte cells for the cyto-indentation tests.

### 2.2 Cyto-indentation equipment

Olympus 사의 IX70 inverted microscope 에 guide frame 을 부착하여 piezo-transducer 를 장착하고 그 위에 manipulator 를 고정한다. 1 mm dia.의 glass beam 을 lead beam 으로, 75  $\mu$ m beam 을 cantilever 로 하고, 이 cantilever beam 끝단에 수직하게 5  $\mu$ m dia. 의 glass fiber indenter tip 을 부착한다. 또한, 7  $\mu$ m diameter 의 carbon filament 를 indenter tip 에 수직하게 부착하여 test 동안에 발생하는 cantilever beam 의 deflection 에 의한 indenter tip 의 변위를 dual photo-diode system 으로 측정한다 (Fig. 2). Piezo-transducer system 의 구동을 위한 입력 전압과 dual photo-diode system 의 출력 전압을 PC-base feed-back control 하기 위하여 National Instrument 사의 multi-function AI/AO board 를 사용하였다.

Piezo-transducer 로부터 주어진 cantilever beam 고정부의 이동거리에서 photo-diode system 에 의하여 측정된 deflection 거리를 변위 거리를 실제 세포가 indentation 되면서 변형된 displacement 로 하고 Cantilever beam 의 elastic bending theory 를 적용하여 indentation force 를 결정하였다.

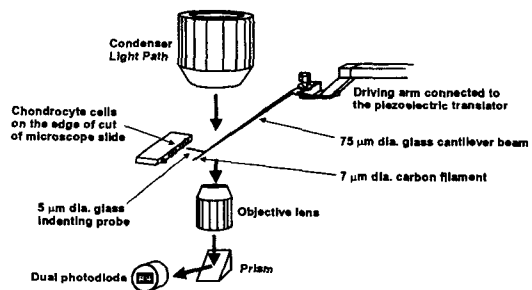


Fig. 2 Setup of the cyto-indentation test equipment system.

### 2.3 Cyto-indentation protocol

연골세포가 seeding 되고 일정시간 배양된 slide 조각을 하나 씩 분리하여 one-well cell culture chamber 의 뒤쪽 왼편 모서리 부위바닥에 세포가 부착된 면이 indentation tip 에 수직되도록 위치한다. 실험하기에 적당한 target cell 을 선정하고 indenter tip 을 target cell 에 위치하며 조도와 focus 를 맞춘다. Manipulator 를 수동으로 전후진 시켜서 Dual photo-diode 출력전압의 선형 부위를 선택하고, Target cell 을 indenter tip 으로 직접 누르지 않는 상태로 piezo-transducer 를 구동시켜 calibration 을 실시한다. 이때의 dual photo-diode signal 을 받아서 piezo-transducer displacement vs. photo-diode voltage 선도로부터 비례상수를 결정한다.

Calibration 에서 사용한 조도와 focus 를 변화시키지 않고 microscope stage knob 을 조절하여 target cell 반구의 정점을 indenter tip 끝단에 접촉시킨다. Calibration 에서 결정된 비례상수를 지정하고 piezo-transducer 이동거리를 target cell 반구 height 의 1/10 이하로 입력하여 indentation test 를 실시한다 (Fig. 3). Indentation displacement 가 1.5  $\mu\text{m}$  발생하도록 ramp time 3 초 동안 piezo-transducer 를 작동시킨 후 원위치 시키고 indentation force 와 displacement 를 저장한다.

측정된 indentation force 와 displacement 를 elastic contact theory 와 Boussinesq-Papkovich function 을 적용한 식  $E = P(1-\nu^2)/2a\delta$  (applied force P, radius of tip a, displacement  $\delta$ , Poisson's ratio  $\nu = 0.37$  [12])에 적용하여 compressive compliance (Young's Modulus, E) 를 결정하였다 [13].

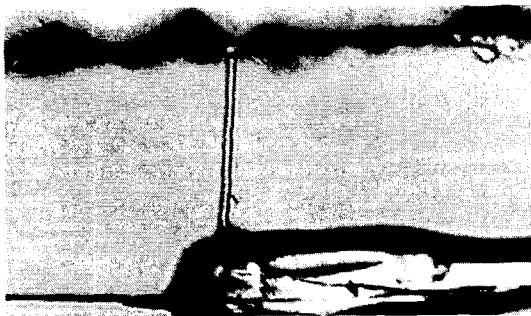


Fig. 3 Chondrocyte indented by a glass fiber tip attached to the cantilever beam including carbon filament.

### 3. 결과

토끼 무릎 관절연골로부터 분리한 연골세포 (chondrocyte)를 cyto-indentation technique 을 사용하여

force-deformation curve 를 구하고 elastic contact theory 를 적용하여 연골세포의 생체역학적 기계적 물성치인 compressive compliance (compressive Young's Modulus)를 다음과 같이 구하였다.

Fig. 4 는 indentation force-deformation curve 로 거의 직선에 가까우며 curve fitting 결과 regression 값이 모든 경우 (n=4)에  $R^2=0.99$  를 보인다. 실험결과로 얻은 chondrocyte 의 compressive compliance 값이 Table 1 에 정리되었다.

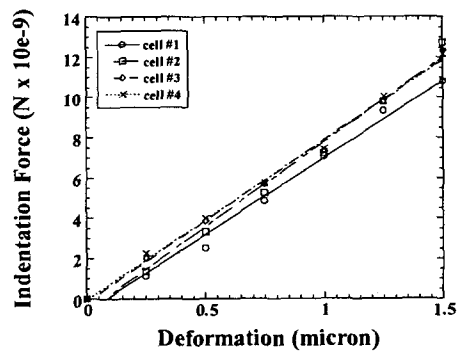


Fig. 4 Indentation force-deformation curve of chondrocyte.

Chondrocyte Cell Samples	Compressive Compliance (kPa)
#1	1.318
#2	1.455
#3	1.384
#4	1.367
average	1.381 ± 0.057

Table 1 Results of measured compressive compliance of chondrocyte isolated from rabbit knee cartilage.

### 4. 토론

본 연구에서 측정된 연골세포의 생체역학적 기계적 물성치 결과는 다른 연구 [12]에서 osteoblast-like cell 을 대상으로 측정한 실험결과와 비교할 때 약 30% 크다. 이는 대상 cell 의 종류가 다른 것이 원인일 수 있으며, Poisson's ratio 값의 가정이 실제와 차이가 날 수도 있다. 또한, glass fiber indenter tip 의 길이의 영향과 indenter tip 의 방향이 정확하게 target cell 표면에 수직으로 놓이지 않은 것에 의한 오차 등으로 해석될 수도 있다. 그러나, 본 실험 장비로 nano-newton level 의 force 를 반복성 있게 측

정할 수 있었으며, indentation force-deformation 선도의 regression 값이 모든 경우에  $R^2=0.99$  이고, 측정된 compressive compliance 의 standard deviation 이 매우 작은 것으로 보아서 실험은 성공적인 것으로 평가할 수 있다. 보다 신빙성이 있는 결과를 얻기 위해서 더 많은 실험을 반복하여 실시할 필요가 있다.

또한, 본 실험의 결과에서 보듯이 연골세포를 대상으로 한 force-deformation 선도가 거의 선형으로 관찰된 것으로 보아 연골세포를 elastic deformation 하는 물질로 가정하여 elastic contact theory 를 적용하고 기계적 물성치를 결정하는 것도 큰 무리가 없는 것으로 판단된다. 이 방법은 natural cartilage 에도 적용되어 그 결과가 많은 논문에서 발표되었다. 그러나, 생체 세포를 탄성체로 가정하는 것에는 상식적으로 무리가 따른다. 이 문제의 해결을 위하여 natural cartilage 을 대상으로 solid phase 와 fluid phase 를 동시에 고려한 linear bi-phasic theory [14]를 적용하여 본 연구의 세포를 대상으로 한 실험에서 얻은 결과를 다시 계산하여 생체역학적 물성치를 결정할 필요성이 있다.

본 실험의 결과는 앞으로 chondrocyte 자체의 기계적 물성치뿐 아니라 chondrocyte 로부터 조직공학을 이용하여 재생될 engineered cartilage 에 대한 기계적 물성치의 평가 및 그 중간 과정에서의 tissue 의 기계적 물성치 평가에도 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사려된다.

## 후 기

본 연구는 2001 년 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (01-PJ1-PG3-31400-0059)의 연구비 지원으로 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Harris, W.H., "The problem is osteolysis," Clin. Orthop., Vol. 311, pp. 46 – 53, 1995.
- Amstutz, H.C., Campbell, P., Kossovsky, N., Clarke, I.C., "Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis," Clin. Orthop., Vol. 276, pp. 7 – 18, 1992.
- Goldring, S.R., Clark, C.R., Wright, T.M., "The problem in total-joint arthroplasty: Aseptic loosening [Editorial]," J. Bone Joint Surg., Vol. 75A, pp. 799 – 801, 1993.
- McKellop, H., Shen, F.-W., Lu, B., Campbell, P., Salovey, R., "Development of an extremely wear-resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacement," J. Orthop Res, Vol. 17, pp. 157 – 167, 1999.
- Kurtz, S.M., Muratoglu, O.K., Evans, M., Edidin, A.A., "Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty," Biomaterials, Vol. 20, pp. 1659 – 1688, 1999.
- Brown, A.N., Kim, B.S., Alsberg, E., Mooney, D.J., "Combining chondrocytes and smooth muscle cells to engineered hybrid soft tissue constructs," Tissue Engineering, Vol. 6, pp. 297 – 305, 2000.
- Mauck, R.L., Soltz, M.A., Wang, C.C.B., Wong, D.D., Chao, P.G., Valhmu, W.B., Hung, C.T., Ateshian, G.A., "Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels," J. Biomechanical Eng., Vol. 122, pp. 252 – 260, 2000.
- Sah, R.L., Trippel, S.B., Grodzinsky, A.J., "Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture," J. Orthop. Res., Vol. 14, pp. 44 – 52, 1996.
- Ma, P.X., Schloo, B., Mooney, D., Langer, R., "Development of biomechanical properties and morphogenesis of in vitro tissue engineered cartilage," J. Biomed. Mat. Res., Vol. 29, pp. 1587 – 1595, 1995.
- Vunjak-Novakovic, G., Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E., "Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage," J. Orthop. Res., Vol. 17, pp. 130 – 138, 1999.
- Guilak, F., "Compression-induced changes in the shape and volume of chondrocyte nucleus," J. Biomechanics, Vol. 28, 1529 – 1541, 1995.
- Shin, D., Athanasiou, K., "Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties," J. Orthop. Res., Vol. 17, pp. 880 – 890, 1999.
- Hayes, W.C., Keer, L.M., Herrmann, G., Mockros, L.F., "A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage," J. Biomechanics, Vol. 5, pp. 541 – 551, 1972.
- Mak, A.F., Lai, W.M., Mow, V.C., "Biphasic indentation of articular cartilage-I. Theoretical analysis," J. Biomechanics, Vol. 20, pp. 703 – 714, 1987.