

## SIS 스폰지와 골수유래줄기세포를 이용한 조직공학적 골분화 유도

박기숙 · 진채문\* · 윤선중\* · 홍금덕\* · 김순희\* · 김문석\*\* · 이종문 · 강길선\*\*\*,† · 이해빙\*\*

전북대학교 고분자나노공학과, \*전북대학교 유기신물질공학과,

\*\*한국화학연구원 나노생체재료연구팀

(2005년 7월 20일 접수, 2005년 9월 9일 채택)

## Effects of SIS Sponge and Bone Marrow-Derived Stem Cells on the Osteogenic Differentiation for Tissue Engineered Bone

Ki Suk Park, Chae Moon Jin\*, Sun Jung Yun\*, Keum Duck Hong\*, Soon Hee Kim\*,  
Moon Suk Kim\*\*, John M. Rhee, Gilson Khang\*\*\*\*,†, and Hai Bang Lee\*\*

Department of Polymer · Nano Science and Technology,

Chonbuk National University, 664-14, Duckjin, Jeonju 561-756, Korea

\*Department of Advanced Organic Materials, Chonbuk National University,

664-14, Duckjin, Jeonju 561-756, Korea

\*\*Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,

P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

(Received July 20, 2005; accepted September 9, 2005)

**초록 :** 소장 점막하 조직(SIS)은 면역반응이 없어 생체재료로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 SIS를 스폰지 형태로 제조하여 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC)를 이용하여 경화시켰으며, SIS 스폰지의 구성 원소를 알아보기 위해 원소분석(EA)과 에너지 분산 X선 분광계(EDS)를 사용해 분석하였다. 또한 SIS 함량과 EDC의 농도에 따른 섬유아세포의 부착도 및 성장도를 알아보기 위해 methylthiazolotetrazolium(MTT)을 실시하였다. 이 스폰지에 골수 간엽 줄기세포(BMSCs)를 피종해 4주 동안 조직공학적 골분화를 유도하였다. 골분화 유도를 위해 골분화 배지를 사용했으며, 배지에 따른 BMSCs의 세포 성장도와 alkaline phosphatase(ALP) 활성을 측정해 보았다. 또한 역전사 중합연쇄반응을 통해 골분화 여부를 관찰하였다. SEM 관찰 결과 모든 스폰지에서 균일한 형태의 열린 다공이 형성되었음을 확인할 수 있었다. RT-PCR 결과 4주 동안 골분화 배지를 주었을 때 제 I형 교원질이 발현됨을 확인할 수 있었으며, ALP 결과에서도 골분화 배지에서 ALP 활성이 높게 나타남을 볼 수 있었다. 결론적으로 제조한 SIS 스폰지는 조직공학적 담체로서 우수한 특성을 보이고 있었으며, 또한 BMSCs의 골분화 유도에도 좋은 결과를 보임으로써 조직공학적 골 재생에 잠재적인 가능성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** Small intestinal submucosa (SIS) had been widely used as a biomaterial without immune rejection responses. SIS sponges prepared by crosslinking with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). SIS powders dissolved in 3% (v/v) acetic acid aqueous solution for 48 hrs and freeze-dried. EDC solution ( $H_2O$  : ethanol = 5 : 95) as a crosslink agent was used in concentration of 100 mM. *In vitro*, rat-BMSCs seeded in SIS sponges and induced the osteogenesis for 28 days. We have characterized the osteogenic potential of rat-BMSCs in SIS sponges by alkaline phosphatase activity (ALP), MTT assay, SEM and RT-PCR for osteogenic phenotype. In SEM, all morphology of SIS sponges was regular and showed interconnected pore structure. By RT-PCR analysis, we observed type I collagen expression. These results demonstrate osteogenic differentiation of rat-BMSCs. In conclusion, we confirmed that the morphology of surface, cross-section, and side of SIS sponges were highly porous with good interconnections between each pores, which can support the surface of cell growth, proliferation, and differentiation. This result indicates that SIS sponge is useful for osteogenesis of BMSCs.

**Keywords:** small intestinal submucosa, sponge, osteogenesis, BMSCs.

### 1. 서론

산업화가 진행됨에 따라 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 노령화로 인한 골 밀도 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골 형성 부진증 같은 질환에 의한 성장부진 등과 같은 다양한 문

제들에 대한 효과적인 재건방법이 많은 연구진에 의해 대두되고 있다.<sup>1-6</sup> 전통적인 골결손 치료방법은 자가 골이식과 동종 골이식 등이 있는데, 자가 골이식이 지금까지는 골형성 측면에서 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으나, 골채취 부위의 감염, 동통, 혈종 등과 같은 합병증이 발생할 수 있고 동종 골이식은 공여자로부터 질병의 전염, 감염, 그리고 자가 골이식에 비해 골유합 및 골형성 효과가 저조한 단점을 가지고 있다.<sup>7-9</sup>

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

이러한 단점을 해결하기 위해 조직공학적 골재생 방법이 많이 진행되고 있는데, 골조직 재생의 목적은 골이 필요한 부위에 골형성을 유도하고 실제 골조직과 유사한 조직을 개발하는 데 있다. 조직공학에 의한 골조직의 재생을 위해 골생성을 유도하는 골아전구세포, 세포가 증식 분화할 수 있는 담체, 그리고 골조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도 성장인자들이 필요하다.<sup>16</sup> 이에 전 연구로써 소장점막하 조직이 혼합된 PLGA 담체,<sup>10</sup> 항생제인 겐타마이신이 혼합된 PLGA 담체,<sup>11</sup> 신경성장인자가 혼합된 PLGA 담체<sup>12,13</sup> 및 비타민 D<sub>3</sub>가 함유된 PLGA 담체,<sup>14</sup> 이프리플라본을 함유한 담체,<sup>15</sup> 탈미네랄화 골분이 혼합된 PLGA 담체 등을<sup>16</sup> 제조하여 이들의 사이토카인류가 조직성장에 미치는 영향에 대해 고찰하였다. 또한 이전의 실험에서 SIS를 이용하여 SIS를 함유한 PLGA 담체가 생체 내에서 새로운 골형성을 유도한다는 것을 확인하였다.<sup>5,6,17-25</sup>

SIS는 세포가 존재하지 않은 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않으며 90% 이상이 피부에 있는 콜라겐 I, II 형으로 구성되어 있고, 그 외에는 소량의 콜라겐 V, VI 형 등이 다양하게 존재한다. 또한 SIS는 약 60~90일간의 생체 분해능을 가지며 수분 흡수율이 높고 SIS 자체의 기계적 물성도 비교적 양호하다. 또한 SIS는 세포외 기질(extracellular matrix; ECM)로서 글리코사미노글리칸 및 피브로넥틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린, 헤파린 설페이트, 하이아루론산과 염기성 섬유아세포 성장인자-2(FGF-2), 신경성장인자(NGF), 변환성장인자-β (TGF-β), 상피세포 성장인자(EGF), 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 및 인슐린 유사 성장인자(IGF-1) 등의 다양한 사이토카인을 다량 함유하고 있다. 이러한 SIS 내의 ECM 및 사이토카인의 존재는 세포의 부착이나 성장, 이동, 분화 등의 세포의 기능적인 면에 관여하며 조직재생이나 상처 치유에 매우 유용하게 작용할 수 있다.<sup>20,21</sup>

이러한 특성을 가지고 있는 SIS는 동맥이나<sup>26-29</sup> 정맥의<sup>30</sup> 혈관과 진피, 상피,<sup>31</sup> 뼈 등의<sup>32</sup> 이식물, 담즙관의 재생,<sup>33</sup> 요실금 환자의 방광을 조여 주는 이식물<sup>34,35</sup> 등으로 연구되고 있다. 그러므로 SIS는 여러 가지 생체 대체물로서 다양하게 응용가능하며 생체적합성 재료로 앞으로 많은 연구가 기대된다. 그러나 천연재료로서의 응용에는 한계가 있고 기계적 물성의 증가 및 여러 기하학적 형태의 가공이

화학적 처리에 의하여 물성을 증진시켜야만 한다.

이전의 실험을<sup>17-19,22-25,36</sup> 통해 본 연구팀은 SIS를 이용한 창상 드레싱으로의 응용에 대해 연구해 보았다. 그 결과, SIS가 가지는 여러 성장인자와 사이토카인의 영향에 의해 창상 드레싱으로써 우수한 특성을 가지고 있었다. 또한 SIS 스폰지는 세포 점착성이 우수하고 세포가 성장하기 좋은 조건을 가져 드레싱 이외에도 조직공학적 담체로도 많은 응용성을 가지고 있는데,<sup>5,37</sup> 본 연구에서는 SIS 스폰지를 제조한 뒤 BMSCs를 파종해 골분화를 유도해 골조직 재생용 조직공학적 담체로서의 가능성을 알아보았다.

본 연구는 SIS를 스폰지 형태로 제조하여 생체 재료용으로 널리 사용되는 경화제인 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC)를 이용해 가교시켰다.<sup>22,23</sup> 이렇게 가교된 SIS 스폰지에 BMSCs를 파종하고 골분화를 유도하였다. 이렇게 골분화를 유도시킨 SIS 스폰지는 ALP 활성도와 osteocalcin, 제 I형 교원질의 발현을 RT-PCR을 통해 측정해서 골분화 여부를 알아보려고 하였다.

## 2. 실험

### 2.1 SIS 분리

SIS를 분리하기 위하여 돼지의 공장에 있는 지방조직을 우선 제거하고, 물로 깨끗이 공장 안과 밖을 세척한 다음, 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라서 식염수에 넣고 세척하였다. 잘라낸 공장을 집게와 손을 이용하여 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 SIS 층만을 분리하였다. 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, -80 °C 극저온 냉각기에 보관하였다. -80 °C에서 보관한 SIS를 동결 건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결 분쇄기를 이용하여 대략 20 μm 크기의 고운 분말로 만들었다.

### 2.2 SIS 스폰지 제조

3% 아세트산(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)에 0.1% 펩신(Sigma Chem. Co.)을 함유한 용액에 1, 및 2 wt%의 SIS 분말을 첨가시켜 상온에서 48시간 동안 방치한 후 직경 30 mm의 차체 제작된

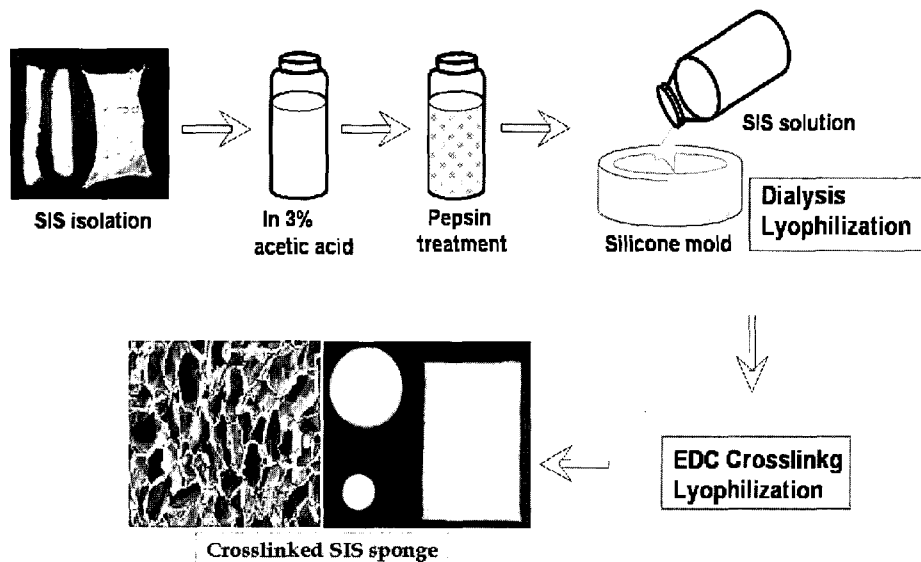


Figure 1. Schematic diagram of fabrication process of SIS sponge.

원형 볼드에 담고 이를 급랭 후 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS를 얻었다. 제조된 SIS 스폰지는 각각 95% 에탄올(ethanol : deionized water : ethanol = 5 : 95)에 EDC(Sigma Chem. Co.) 용액 1, 5, 10, 50 및 100 mM으로 24시간 동안 경화시켰다. 경화 후 40 °C의 증류수에 1시간 동안 세척하고 경화와 세척이 끝난 SIS 스폰지는 급랭 후 재동결 건조하여 최종적으로 경화된 SIS 스폰지를 얻었다(Figure 1).<sup>22,23</sup>

### 2.3 주사전자 현미경 측정

SIS 스폰지의 경화 전과 각 농도별로 경화된 후의 형태학적 특성을 주사전자 현미경(Hitachi, S-2250N, Japan)으로 관찰하였다. SIS 스폰지는 표면, 볼드 바닥면을 가로축 및 세로축으로 자른 단면을 관찰하였다. 각 샘플들은 금속판에 고정시키고, 아르곤 가스 하에서 2분 동안 플라즈마 스퍼터(Model SC 500K, Emscope, UK)를 이용하여 백금을 코팅하였다. 관찰된 이미지는 이미지 분석 프로그램인 P-SEM(Mirero, Korea)을 이용하여 분석하였다.

### 2.4 다공도 측정

SIS 각 EDC 경화제의 농도별로 경화된 후 SIS 스폰지의 다공 크기 분포, 비다공면적, 평균다공직경 및 다공도를 측정하기 위하여 수은 다공도계(Micromeritics Co., Model AutoPore V 9500, USA)를 이용하였다.

### 2.5 원소 분석

SIS 스폰지를 구성하고 있는 원소를 분석하고, 각각의 함량을 알아보기 위해 원소분석(EA)과 에너지 분산 X선 분광계(EDS)를 사용해 분석했다.

### 2.6 골수 간엽 줄기세포의 분리 및 배양

사람의 골수 간엽 줄기세포는 기부자로부터 14개이지의 비늘과 3000 U 헤파린을 포함한 수용액이 든 주사기를 사용하여 20~30 mL의 골수에서 채취하였으며 배양액으로 2배 희석한 다음 50% 퍼콜(Sigma Chem. Co.) 점진구배 용액을 이용해 세포층을 분리한 다음,  $10^3 \sim 10^4$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 배양 플라스크에 배양하였다. 세포의 성장 배지로는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco BRL, USA)에 10% 우태혈청(FBS, Gibco BRL)과 항생제(10 U/mL 페니실린 G 소디움과 10 µg/mL 암포테리신 B, Gibco BRL)를 사용하였다. 배양된 세포는 3일에 한 번씩 배양액을 교체하였으며, 9일에 한 번씩 계대배양 하였다.<sup>24</sup>

### 2.7 골수 간엽 줄기세포의 조골세포로의 분화

5~6회 계대배양 후 세포를 수확하여  $1 \times 10^5$  세포수/스폰지 농도로 에틸렌옥사이드 가스로 멸균한 SIS 스폰지에 파종하여 조골세포로의 분화를 유도하였다. 그리고 세포를 파종한 SIS 스폰지는 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 세포배양기에서 배양하였으며 배양액은 골분화 배지(DMEM + 10% FBS + 1% 항생제 + 10 mM β-글리세롤포스페이트 +  $10^{-8}$  M 덱사메타손 +  $10^{-8}$  M 비타민 D<sub>3</sub>)를 사용하였다.<sup>38</sup> 4주 동안 배양액은 2~3일에 한 번씩 교체해 주었다. RT-PCR과 ALP 활성도를 측정하여 조골세포로의 분화여부를 확인하였으며, 실험군으로는 골분화 배지, 대조군으로 성장 배지로 나누어 골분화 정도를 비교해 보았다.

### 2.8 세포 부착도 실험

SIS 함량과 EDC 농도에 따른 NIH/3T3 세포의 부착도 및 성장도를 알아보기 위해 1, 2, 4, 8, 및 14일에 MTT를 실시하였다. 또한 배지의 종류에 따른 BMSCs의 부착도와 성장도를 알아보려 3, 7, 14, 21, 및 28일에 역시 MTT를 실시하였다.

### 2.9 RT-PCR

**Table 1. The Sequence and PCR Reaction Cycles of GAPDH, Osteocalcin, and Type I Collagen Primer**

Gene	Sequence
GAPDH	Up : 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'
	Down : 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'
Osteocalcin	Up : 5'-AGGTGCAGCCTTTTGTGTCCAAG-3'
	Down : 5'-GCAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG-3'
Type I collagen	Up : 5-CCTCCTCCCAGCCACAAAGA-3'
	Down : 5'-TCTTGGTCGGTGGGTGACTCT-3'

SIS 스폰지를 넣고 배양한 용기에 배양액을 제거한 후 1 mL의 TriZol®(Invitrogen™, Life technologies Co., Groningen, Netherlands)을 넣어 5분 동안 인큐베이션하여 1.5 mL의 튜브에 넣고 클로로포름(Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 4 °C, 12000 g에서 15분 동안 원심분리한다. 분리된 상층액을 1.5 mL 튜브에 넣고 이소프로판올(Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 원심분리한 후 RNA를 침전시킨다. 분리된 RNA를 5× first strand buffer(Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Gibco BRL Co.), RNase 억제제(Invitrogen™), Superscript™ II RNase H 역전사 트랜스크립타제(Invitrogen™), 올리고 dT<sub>12-18</sub> Primer(Invitrogen™), DNase/RNase free 증류수(Gibco BRL Co.)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이렇게 역전사시킨 cDNA를 GAPDH, 제 I형 교원질, osteocalcin의 프라이머(GenoTech, Korea)를 사용하여 PCR을 하였다.<sup>39,40</sup> 각 프라이머의 염기서열과 반응조건은 Table 1과 같다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.2%(w/v) 아가로스겔(Sigma-Aldrich Co.)에 얻은 후 110 V에서 15분 동안 전기영동을 하였다. DNA를 전개시킨 젤은 자외선 투과조사기(Spectroline®, Spceronics Co., USA) 위에 위치시켜 관찰하였다.

## 3. 결과 및 토론

### 3.1 SIS 스폰지 제조

본 연구에서는 이전의 실험에서 결정된 특성 조건을 바탕으로 천연재료인 SIS를 스폰지 형태로 제조하여 골분화에 응용하고자 하였다. 제조된 SIS 스폰지는 주사전자 현미경, 다공도 측정, EA, EDS 분석 및 NIH/3T3 세포의 부착도 실험을 실시하여, 조직공학적 골분화를 위한 담체로서의 가능성과 골분화 유도 여부를 알아보았다.

### 3.2 전자주사 현미경 특성

Figure 2에서 보듯이, SIS 스폰지의 미세 형태는 표면과 내부에 균일한 다공을 가지며 다공도가 높게 나타났다. EDC의 농도의 차이에 따른 다공형태나 크기의 차이는 특별히 관찰되지 않았다. 다만, 스폰지의 표면 다공의 경우 EDC 농도가 50 mM 이상부터 규칙적인 다공이 관찰되며, 경화제의 농도가 증가할수록 다공의 형태 유지력이 증가하였으며, 경화제의 농도가 낮을수록 다공도가 감소하는 것으로 관찰되었다. 따라서 적정 경화제 농도는 50 mM 이상 되어야 할 것으로 사료된다.<sup>22,23</sup>

### 3.3 다공도 측정

다공의 크기는 전자주사 현미경 관찰 결과에서 100 µm 이상이 됨을 보였다. Table 1은 평균 다공도 측정 데이터 값들을 나타낸 것으로 1 mM에서 가장 작은 다공 크기 및 다공 분포를 나타내었고 EDC 경화제의 농도가 증가할수록 다공의 크기와 다공도 90% 이상인 것을 확인할 수 있었다. 다공 분포도는 0.1~400 µm 정도의 분포도를

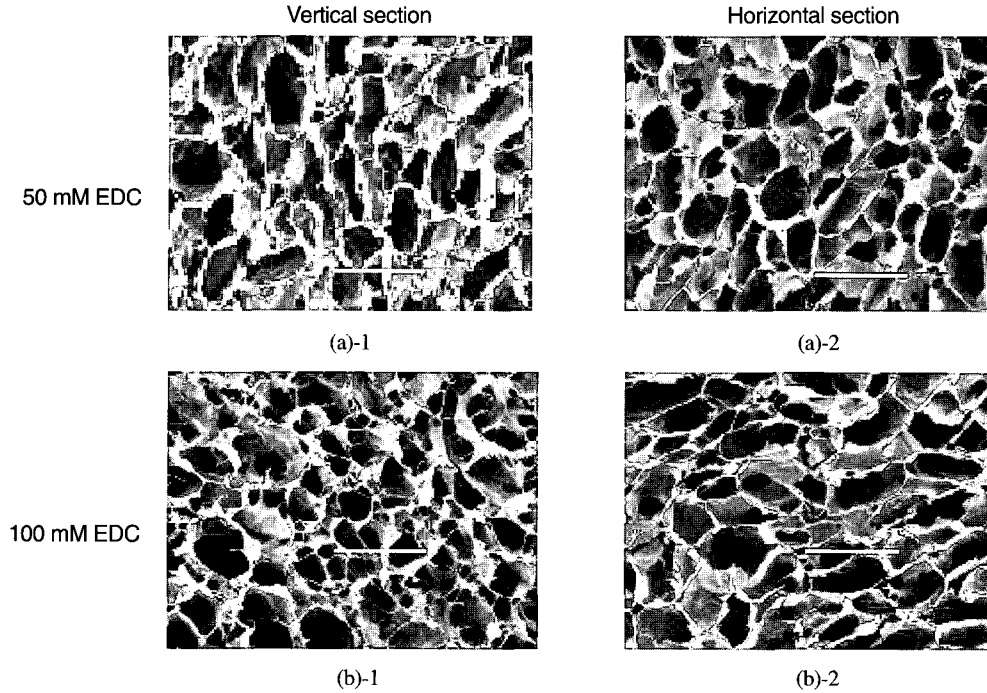


Figure 2. SEM measurements of SIS sponge(magnification×150, scale bar : 200 μm). (a) 50 mM and (b) 100 mM. 1: vertical, 2: horizontal section.

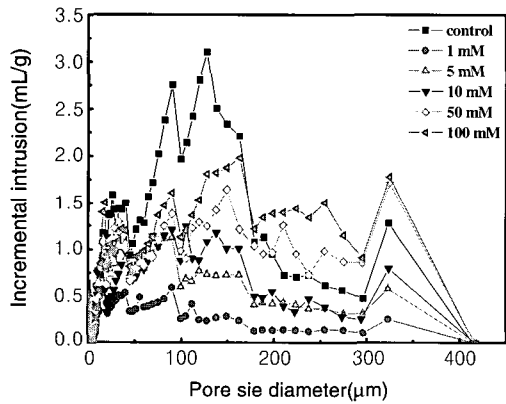


Figure 3. Porosity of SIS sponge(control(non-crosslinked, 0), 1, 5, 10, 50, and 100 mM of EDC).

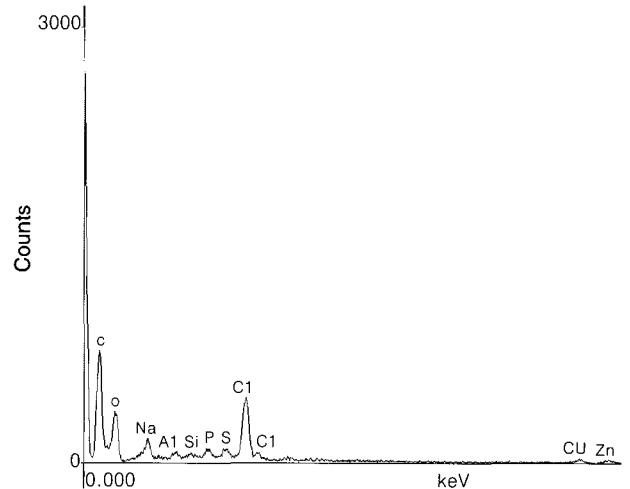


Figure 4. The component of SIS measured by EDS.

나타내었다(Figure 3).<sup>22,23</sup> 100 μm 이상의 다공 크기는 골분화 유도시 골세포의 성장과 신생혈관 형성이 가능하며, 골분화용 조직공학적 담체로의 가능성을 보여주었다.

3.4 SIS 스폰지의 원소 분석

SIS 스폰지 구성 원소를 알아보기 위해 EA와 EDS를 실시하였다. Figure 4 및 Table 2에서 보여주듯, EA와 EDS 결과 SIS 스폰지는 N, C, H, S, O 등의 원소로 이루어져 있으며, 이전 실험의 FTIR의 결과와<sup>22</sup> 함께 미루어볼 때 체내 존재하는 성분과 유사함을 확인할 수 있었다.

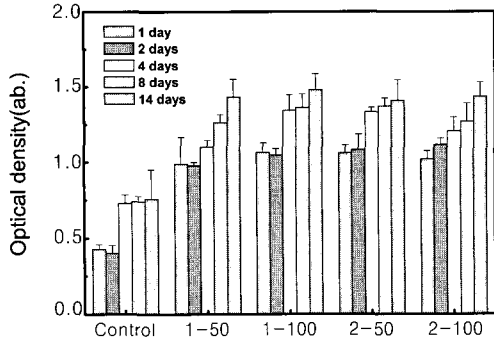
3.5 세포 부착도 및 성장도

PGA를 대조군으로 하고, SIS 함량과 EDC의 농도에 따른 NIH/3T3 세포의 1, 2, 4, 8, 14일의 세포 부착도 및 성장도를 MTT를 통해 알아 보았다. 또한 동일한 1% SIS, 100 mM EDC 농도로 제조한 스폰지에서 성장 배지와 골분화 배지에 따른 BMSCs의 성장도를 알아보고자

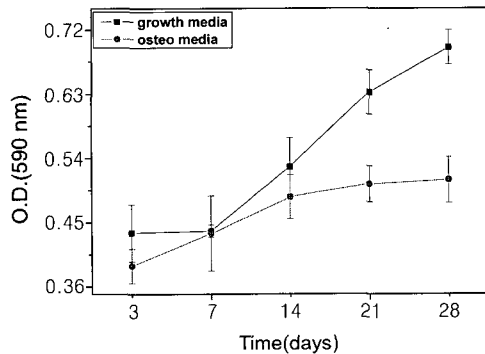
Table 2. The Component Ratio of SIS Measured by EA

Component	Ratio(%)
Nitrogen	15.5
Carbon	45.9
Hydrogen	6.4
Sulphur	0.3
Oxygen	22.4
Total	90.5
Remainder(Na, Al, P, Cl, Cu, Zn, and etc.)	9.5

역시 MTT를 실시해 보았다. Figure 5에서 보듯이 대조군인 PGA 부직포에 비해 초기 세포 부착도 및 배양기간별 성장도가 우수함을 확



**Figure 5.** NIH/3T3 cell proliferation of different content of EDC/SIS contained SIS sponge by MTT assay. 1-50: 1% SIS and 50 mM EDC, 1-100: 1% SIS and 100 mM EDC, 2-50: 2% SIS and 50 mM EDC, and 2-100: 2% SIS and 100 mM EDC.

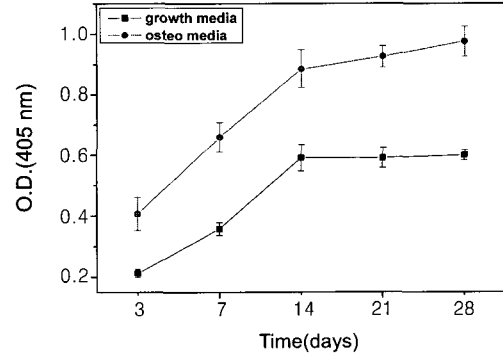


**Figure 6.** BMSC cell proliferation of different component of media by MTT assay (for 4 weeks).

할 수 있었다. 하지만 SIS 함량 및 EDC 농도에 따른 특별한 차이는 발견할 수 없었다. 이러한 결과로 미루어보아, EDC가 세포의 성장에 영향을 미치지 않는다고 사료되며, SIS 농도 1% 이상이면 좋은 세포의 부착도 및 성장도를 보임을 알 수 있었다. 배지의 종류에 따른 BMSCs의 성장도를 보면, 3일 배양 후 측정된 MTT의 결과에서 골분화 배지보다 성장 배지에서 측정값이 더 높았으며, 이를 통해 성장 배지가 골분화 배지보다 초기 세포 부착 및 성장에 우수함을 알 수 있었다(Figure 6).<sup>13,14</sup> 시간이 지남에 따라 두 배지 모두에서 세포수가 점차적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 성장 배지의 경우 3일에서 7일로 시간이 지나면서 세포 성장률이 조금 더더졌지만 7일 이후에는 성장이 거의 일정한 속도로 증가함을 알 수 있으며 골분화 배지의 경우 14일까지 꾸준한 속도의 성장도를 보이다가 14일 이후 증식도가 느려지는데, 이는 14일 이후부터 골분화가 이루어지면서 증식 속도가 더더지기 때문이라 생각되며 이 결과들로부터 배양액의 종류에 관계없이 스폰지 내에서 세포가 잘 성장하고 생존함을 확인할 수 있었다.

### 3.6 ALP 활성도

SIS 스폰지에 BMSCs를 파종한 후 배지의 종류에 따른 알칼리 인포스파타아제의 형성여부를 알아보기 위해 ALP 활성도를 측정하였다. Figure 7에서 보듯이, 3일이 경과한 후 ALP 활성을 측정했을 때 성장 배지보다 골분화 배지에서의 ALP 활성값이 더 높은 것을 확인할 수 있었고, 시간이 지남에 따라 ALP 활성이 증가함을 확인



**Figure 7.** ALP activity of different component of media (for 4 weeks).

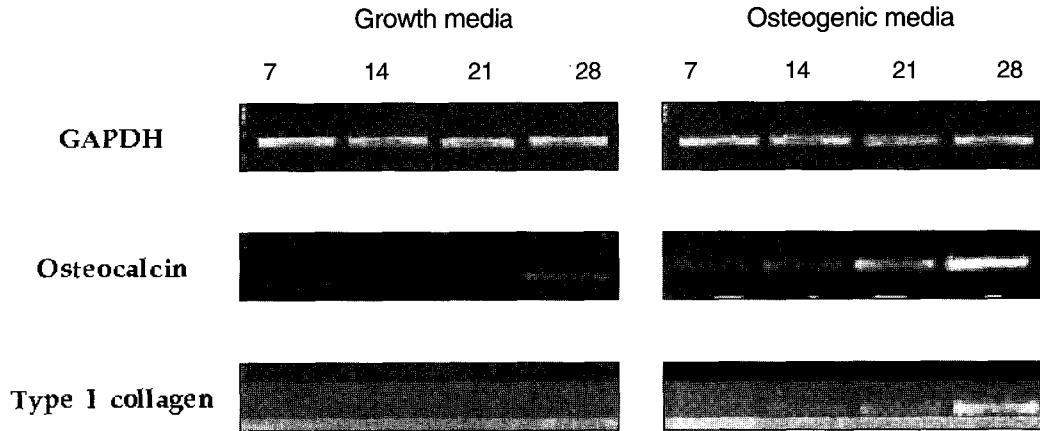
할 수 있었다. 3일에서 14일까지는 ALP 활성이 급격히 증가하였으며, 14일 이후에도 급격히는 아니지만 꾸준히 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 이로부터 SIS 스폰지에 존재하는 BMSCs의 골분화 진행에 따라 미네랄이 침착됨을 알 수 있었다. 또한 성장 배지로 배양시켰을 경우 ALP 활성이 측정되지 않아야 하나 14일까지 꾸준히 증가하는 것으로 보아 SIS 스폰지 내에 존재하는 여러 가지 성장인자 및 사이토카인 등이 작용하여 ALP 활성이 증가하였다고 사료된다. 하지만 이러한 영향은 14일 이후에는 거의 일정하게 유지됨으로 보아 골분화 유도를 오랜 기간 동안 유지시키기 위해서는 골분화 배지로 배양시키는 것이 바람직하다고 사료된다.

### 3.7 RT-PCR

조골세포에서 나타나는 특이적 유전자인 제 I형 교원질과 osteocalcin의 발현 여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 실시하였다. Figure 8은 SIS 스폰지에 BMSCs를 파종하여 성장배지와 골분화 배지로 배양한 후 7, 14, 21, 및 28일에 RT-PCR을 실시한 결과이다. RT-PCR 결과를 보면 성장 배지를 사용했을 경우 house keeping gene인 GAPDH는 시간에 관계없이 일정하게 발현됨을 확인할 수 있었으며, osteocalcin의 경우 28일이 경과한 후에 희미하게 밴드가 보임을 확인할 수 있었고 제 I형 교원질은 발현되지 않았다. 시간이 지남에 따라 osteocalcin이 발현되는 것은 SIS 내에 존재하는 여러 성장인자와 사이토카인이 조골세포로의 분화를 유도했기 때문이라 사료되며, 제 I형 교원질의 경우 발현 시기가 osteocalcin에 비해 느리므로 28일까지는 발현되지 않았다고 사료된다. 골분화 배지를 사용했을 경우 성장 배지로 배양했을 때와 마찬가지로 GAPDH는 시간에 관계없이 잘 발현이 되었으며 osteocalcin과 제 I형 교원질은 시간이 지남에 따라 점차적으로 발현됨을 확인할 수 있었다. Osteocalcin의 경우 7일째부터 발현되어 밴드가 희미하게 관찰되었으며, 제 I형 교원질의 경우 14일째부터 발현되어 밴드가 희미하게 관찰되는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 조골세포로 분화가 이루어지면서 osteocalcin이 발현되며, osteocalcin의 발현에 의해 분화가 촉진되고, 이에 따라 제 I형 교원질이 분비되는 메카니즘에 따른 것이라 사료된다.<sup>32,39</sup>

## 4. 결론

본 연구에서는 천연 생체재료인 SIS를 스폰지 형태로 제조한 뒤 EDC로 가교시킨 골조직 재생에 응용하고자 하였다. 이전의 실험을 통해 SIS 스폰지의 조직공학적 담체로서의 가능성을 확인한 본 연구팀은 BMSCs를 조골세포로의 분화를 유도하고자 SIS 스폰지를 담



**Figure 8.** Gene expression of BMSCs in SIS sponge according to different component of media (for 4 weeks). GAPDH: house keeping gene, osteocalcin and, type I collagen: osteoblast specific gene.

체로 사용하게 되었다.

이전 실험과 이번 실험의 결과에서 보여주듯이 SIS 스폰지는 면역반응이 없는 생체재료로 EDC로 가교함에 의해 다공 형성 및 유지가 향상되며, 물 흡수도 역시 증가하는 것을 확인했다. 또한 원소 분석 및 FTIR 결과 구성성분이 체내 존재 성분과 유사하며 다공 크기 및 다공도가 우수했으며 세포 독성이 있는지 알아보기 위한 NIH/3T3 세포를 이용한 MTT 결과 역시 조직공학적 담체로써 우수한 특성을 가짐을 보여주고 있었다.

또한, BMSCs를 이용한 조골세포로의 분화를 유도할 때 배지에 따른 영향을 알아본 결과 세포의 성장도는 골분화 배지에서 더 낮게 나왔지만 이는 BMSCs가 분화됨에 따른 결과로 사료되며, MTT 결과가 증가함으로 미루어보아 세포 독성은 없는 것으로 사료된다. 또한 ALP 활성도와 RT-PCR 결과 골분화 배지를 사용했을 때 더 좋은 결과가 나옴을 확인했다. 그러나 골분화 배지를 사용하지 않은 경우에도 ALP 활성도가 증가하며, osteocalcin이 발현되는 것은 SIS 내에 존재하는 여러 성장인자와 사이토카인으로 인한 것이라 사료된다.

결론적으로 SIS 스폰지가 골조직 재생에 우수한 결과를 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 현재 *in vivo/in vitro* 상에서 SIS 스폰지의 골분화 여부를 알아보기 위한 실험이 진행 중이다.

**감사의 글:** 본 연구는 보건복지부(0405-BO01-0204-0006)와 세포융용사업(SC3100)의 지원에 의하여 진행되어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- G. Khang and H. B. Lee, "Cell-synthetic surface interaction: Physicochemical surface modification", in *Methods of Tissue Engineering*, A. Atala and R. Lanza, Editors, Academic Press, Section II, pp 771 (2001).
- G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Science & Technology*, **12**, 527 (2001).
- G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Science & Technology*, **13**, 4 (2002).
- G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, and H. B. Lee, "Preparation and characterization of natural/synthetic hybrid scaffolds", in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, M. Elcin, Editor, Kluwer-Plenum Press, London, Vol. 657, pp 235 (2003).
- G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
- G. Khang, S. J. Lee, M. S. Kim, and H. B. Lee, "Scaffolds; Tissue Engineering", in *Webster's Biomedical Engineering Handbook*, S. Webster, Editor, John & Wiley Press, NY, in press, 2005.
- M. B. Habal, *Clin. Orthop.*, **188**, 239 (1984).
- J. M. Lane and H. S. Sandhu, *Orthop. Clin. North Am.*, **18**, 213 (1997).
- H. E. Jergesen, J. Chua, R. T. Kao, and L. B. Kaban, *Clin. Orthop.*, **268**, 253 (1991).
- M. K. Choi, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 318 (2001).
- E. K. Jeon, J. Y. Shim, H. J. Whang, G. Khang, I. Jo, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **5**, 23 (2001).
- E. K. Jeon, G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
- H. S. Kim, I. Lee, J. M. Lee, C. W. Han, J. H. Sung, M. Y. Park, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Korea Soc. Endocrinology*, **17**, 206 (2002).
- S. J. Lee, D. H. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 201 (2002).
- J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, I. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **27**, 226 (2003).
- G. Khang, C. S. Park, J. M. Rhee, S. J. Lee, Y. M. Lee, I. Lee, M. K. Choi, and H. B. Lee, *Korea Polym. J.*, **9**, 267 (2001).
- G. Khang, P. Shin, I. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and I. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 158 (2002).
- P. K. Shin, S. J. Lee, B. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**, 175 (2002).
- J. A. Kang, S. J. Lee, G. Khang, I. Lee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **6**, 107 (2002).
- S. F. Badylak, B. Kropp, and T. B. McPherson, *Tissue Eng.*, **4**, 379 (1998).
- E. H. Ledet, A. L. Carl, D. J. Dirisio, M. P. Tymeson, L. B. Andersen, C. E. Sheenhan, B. Kallakury, M. Slivka, and H. Serhan, *Spine J.*, **2**, 188 (2002).
- H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 194 (2004).
- S. H. Kim, H. W. Shin, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee and G. Khang,

- Biomater. Res.*, **8**, 143(2004).
24. S. J. Lee, I. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, and G. Khang, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **15**, 1003(2004).
  25. S. H. Kim, H. W. Shin, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 478 (2004).
  26. S. F. Badylak, G. C. Lantz, and A. C. Coffey, *J. Surg. Res.*, **47**, 74 (1989).
  27. C. J. Morgan, A. G. P. Coutts, M. C. McFadyen, T. P. King, and D. Kelly, *J. Nutri. Biochem.*, **7**, 339 (1996).
  28. G. C. Lantz, S. F. Badylak, and A. C. Coffey, *J. Invest. Surg.*, **3**, 217 (1990).
  29. S. F. Badylak, B. Kropp, and T. B. McPherson, *Tissue Eng.*, **4**, 379 (1998).
  30. G. E. Sandusky, S. F. Badylak, and R. J. Horff, *Ann. J. Path.*, **140**, 317 (1992).
  31. S. P. Hong, J. K. Park, S. H. Huh, and H. S. Kim, *J. Plast. Surg.*, **25**, 547 (1998).
  32. E. N. Lamme, H. J. de Vries, H. van Veen, G. Gabbiani, W. Westerhof, and E. Middelkoop, *J. Histochem. Cytochem.*, **44**, 1311 (1996).
  33. D. Prevel, B. L. Eppley, and S. F. Badylak, *Ann. Plast. Surg.*, **35**, 381 (1995).
  34. B. P. Kropp, B. L. Eppley, C. D. Prevel, M. K. Rippey, R. C. Haruff, S. F. Badylak, M. C. Adams, R. C. Rink, and M. A. Keating, *Urology*, **46**, 396 (1995).
  35. M. Rosen, J. Ponsky, R. Petras, A. Fanning, F. Brody, and F. Duperier, *Surgery*, **132**, 480 (2002).
  36. S. B. Song, G. Khang, S. K. Hong, I. Lee, S. W. Kim, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**, 13 (2000).
  37. S. R. Park, "Cellular interactions with cells and extracellular matrix", in *Tissue Engineering: Concepts and Application*, J. J. Yoo and I. Lee, Editors, Korea Medical Book Publisher Co., Seoul, p 43 (2002).
  38. J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, C. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, G. Khang and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2005).
  39. J. W. Jang, E. J. Kim, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Biomater. Res.*, **8**, 51 (2004).
  40. E. J. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28**, 218 (2004).