

우태아 혈청이 포함된 Poly-glycolic Acid 배양관에서 인간 조골세포의 성장

최재원¹ · 김용하¹ · 문영미² · 김연정³ · 최식영³

영남대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 의료공학 연구소², 안동대학교 자연대학 응용화학과³

The Growth of Human Osteoblasts in Culture Dishes Made with Poly-glycolic Acid Containing Fetal Bovine Serum

Jae Won Choi, M.D.¹, Yong Ha Kim, M.D.¹,
Young Mi Moon², Yoeng Jung Kim³, Sik Young Choi, Ph.D.³

Department of ¹Plastic & Reconstructive Surgery, ²Tissue Engineering, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea,

³Applied Chemistry, Natural Science, Andong National University, Andong, Korea

Purpose: An ideal bony construct can be divided into two broad categories: (1) the design and fabrication of biodegradable, biomimetic scaffolds that provide correct signals to induce osteogenesis; (2) the identification of an ideal source of osteoprogenitor cells to seed onto the scaffold. We selected poly-glycolic acid as a synthetic scaffold among various scaffolds because of these properties. Meanwhile, culture medium is supplemented with fetal bovine serum(FBS): such serum contains essential elements such as proteins, hormones, growth factors and trace minerals. The composition of FBS can be ideal for various cell growth in vitro. We supposed that we could enhance bone growth at a fractured site if FBS was mixed with synthetic scaffold-PGA.

Methods: We cultured human osteoblasts in five different prepared culture dishes made with FBS and PGA mixture. The mixtures contained different ratio of FBS, that is, 0, 1.5, 3, 7, and 10%. We cultured human osteoblasts for seven days and examined the growth and attachment of the cells at the 1st, 3rd, 5th, 7th days, respectively.

Results: In the mixture of 0% FBS and PGA, the growth of the cells lasted for one day. In 1.5 and 3% FBS and PGA, the growth of the cells was examined at the 3rd day, then minimally declined at the 5th and 7th days. In 7% FBS and PGA, the growth of the cells lasted for 5 days, then declined at the 7th day. In 10% FBS and PGA, the growth of the cells lasted for 5 days, then declined at the 7th day. Staining status of the osteoblasts with alkaline phosphatase showed pale pink color in 0% FBS and PGA groups, but bright pink color in 1.5, 3, 7, 10% FBS and PGA groups, especially in 3%, 7%.

Conclusion: In consequence, the growth of human osteoblast was higher in the mixture of FBS and PGA groups than in pure PGA ones. It is assumed that the mixture of FBS and PGA affects the proliferation of human osteoblasts.

Key Words: Fetal bovine serum, Poly-glycolic acid, Human Osteoblast

I. 서 론

다양한 골 고정 재료들 중 골절의 치유기간 동안 필요한 물리학적 강도를 제공할 뿐만 아니라 이차적인 제거 수술이 불필요한 흡수성 재료들이 각광을 받고 있다. 이상적인 조직공학적 골 고정물이란 이런 특징과 더불어 생체 내에서 골세포가 증식할 수 있는 담체(scaffold)로서의 역할을 하는 것이라 할 수 있다.¹⁻⁶

한편 실험실에서 세포배양을 위해 배지(media)에 첨가되는 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 세포의 기본 영양공급원이며, 이는 단백질, 호르몬, 성장인자 및 미량의 무기질이 혼합된 형태로 세포 성장에 필수적인 조성을 지닌다고 할 수 있다.⁷

저자들은 골 고정에 사용되는 흡수성 재료가 골 고정뿐만 아니라 담체로서의 역할을 할 수 있으며 여기에 조골세포의 성장에 필수적인 우태아 혈청을 혼합한다면 골의 치유기간 동안 지속적으로 골의 성장에 필요한 인자들을 충분히 공급할 수 있다는 가정을 하였다.⁸⁻¹⁰ 이에 본 교실에서는 골 고정에 사용되는 흡수성 재료 중 Poly-glycolic acid(PGA)와 세포의 기본 영양 공급원인 우태아 혈청을 혼합하여 인간 조골세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하

Received April 27, 2006

Revised July 10, 2006

Address Correspondence: Yong Ha Kim M.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, College of Medicine, Yeungnam University Hospital, 317-1 Daemyung 5-dong, Nam-gu, Daegu 705-717, Korea. Tel: (053) 620-3483 / Fax: (053) 626-0705 / E-mail: yhkim@med.yu.ac.kr

* 본 논문은 2005년 제 59차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

* 본 논문은 2005년도 재단법인 천마의학연구재단 지원에 의하여 이루어졌음.

여 의미 있는 결과를 얻었기에 참고문헌과 함께 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

가. 배양판의 제조 과정

우태아 혈청(FBS, Gibco BRL, USA)을 동결건조(lyophilization)하여 분말(powder) 상태로 만들고 이를 유기 용매인 HFIP(hexafluoroisopropanol)에 분산(dispersion)시켰다. 우태아 혈청이 균일하게 분산된 유기 용매에 고체 상태의 PGA(Sigma-Aldrich, USA)를 넣어 상온에서 용해시켰다. 적당량의 유기 용매가 증발된 후 고점도의 혼합물을 18 × 18 mm의 얇은 유리판의 한쪽 면에 50 μm의 두께로 균일하게 코팅을 하였다. 이렇게 제작된 유리판 위의 혼합물에서 유기 용매를 완전히 제거하기 위해 유기 용매가 휘발되는 기간인 1-2일 동안 진공 상태에서 방치하였다. 이 유리판을 가스(ethylene oxide, EO) 소독을 실시한 후 인간 조골세포의 배양판으로 사용하였다. 우태아 혈청을 PGA와 혼합할 때 0%, 1.5%, 3%, 7%, 10%의 비율로 PGA에 혼합하였고, 각각 5개씩 배양 접시(culture dish)에 넣어 실험하였다(Fig. 1).

나. 실험방법

우태아 혈청의 혼합 비율을 달리한 5가지 종류의 배양판을 각각 5개씩 배양 접시에 넣고 10%의 우태아 혈청이 함유된 DMEM 배양액(Dulbecco's modified Eagle's media, Gibco BRL, USA)으로 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 한국 세포주 은행에서 분양받은 MG-63 인간 조골세포를 ml 당 1 × 10⁵의 농도로 계대배양하였다. 세포증식에 필요한 혈

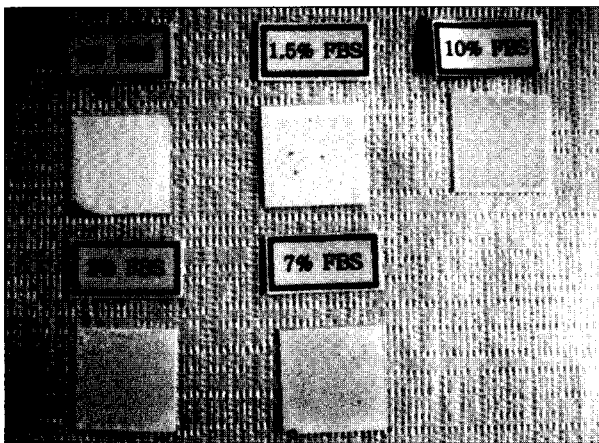


Fig. 1. Prepared culture plate for growth of the human osteoblasts. White film is the mixture of fetal bovine serum(FBS) and poly-glycolic acid(PGA), that is coated on the cover glass. Each number means the proportion of FBS in the mixture.

청이 고갈되는 시점인 배양 24시간 후부터는 무 혈청배지를 넣고 2일마다 한 번씩 무 혈청배지를 교환하였으며, 교환시 채취한 배지에서 혈청의 정량 분석을 통해 존재를 확인하였다. 순수 PGA만 코팅된 배양판을 대조군으로 하였고 나머지 일정 비율의 혼합물이 코팅된 배양판을 실험군으로 하였다.

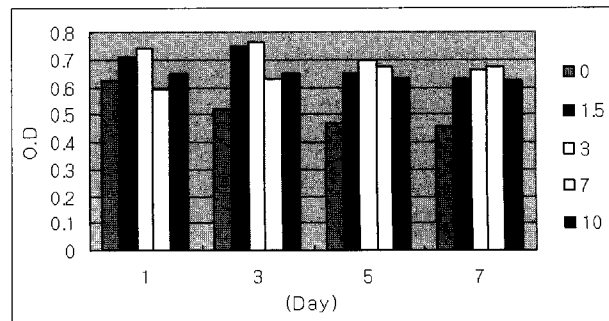
배양 1, 3, 5, 7일째 5개 군에서 각각 인간 조골세포의 증식률 및 성장 상태를 관찰하였다. 조골세포의 증식률은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA)를 이용한 흡광도 측정을 통해 세포수를 측정하였다. 조골세포의 성장 상태의 관찰은 배양 접시 내에 있는 배양판을 꺼내어 alkaline phosphatase (86R-1KT, Sigma, USA) 염색을 실시하여 세포의 유착 정도를 확인하고 Polaroid DMC Ie가 장착된 Nikon 현미경을 이용하여 사진을 촬영하였다.

III. 결 과

MTT 분석을 이용한 인간 조골세포의 증식률을 측정한 결과, 대조군으로 순수 PGA만 코팅된 배양판에서는 1일 이후부터 조골세포의 증식이 감소하였다. 1.5%, 3%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서는 배양 3일까지 세포증식이 관찰되었고 5, 7일에는 세포가 소폭으로 감소하는 것을 확인하였다. 7%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서는 배양 7일까지 세포증식이 관찰되었다. 10%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서는 배양 5일까지 세포증식이 관찰되었고 7일째 세포가 소폭으로 감소함을 확인하였다 (Table I).

Alkaline phosphatase 염색을 통한 조골세포의 유착 상태의 관찰 결과는 순수 PGA만 코팅한 대조군에서는 드물게 붉은 색을 띄었고, 1.5%, 3%, 7%, 10%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서는 전체적으로 선명한

Table I. Graph Comparing Daily MTT Assay of the Human Osteoblasts Cultured in 0% FBS + PGA, 1.5% FBS + PGA, 3% FBS + PGA, 7% FBS + PGA and 10% FBS + PGA



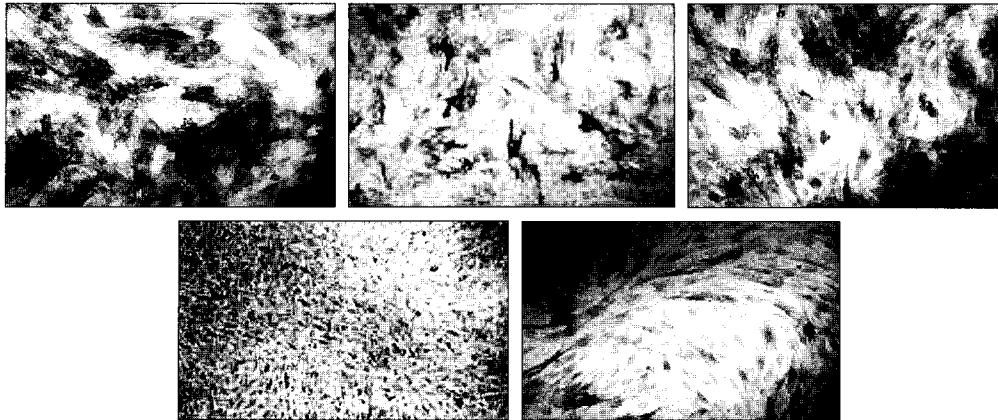


Fig. 2. (Above, left) Histologic findings of human osteoblasts cultured in 0% FBS + PGA, (Above, center) 1.5% FBS + PGA, (Above, right) 3% FBS + PGA, (Below, left) 7% FBS + PGA and (Below, right) 10% FBS + PGA. Osteoblasts were stained at 7 day for alkaline phosphatase staining. Pale pink color was shown at 0% FBS + PGA groups, but bright pink color was shown at other groups, especially in 3% and 7% FBS + PGA.

붉은 색의 염색 상태를 보였으며, 그 중 3%, 7%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서 더욱 선명하였다(Fig. 2).

IV. 고 찰

현재까지 골절부의 골 고정에 사용되는 재료들은 그 조성에 관계없이 골절의 치유기간 동안 필요한 물리학적 강도의 유지가 목적이다. 성형외과 영역에서 많이 사용하는 골 고정 목적의 재료들의 성분으로는 크게 비 흡수성 재료와 흡수성 재료로 나눌 수 있는데, 골 고정 목적만을 생각한다면 강도가 강한 비 흡수성 재료가 일차적 선택이 된다. 그러나 20세기 후반에 들어 재료 공학, 고분자 공학의 발달로 우수한 흡수성 재료들이 개발되었고, 그 사용량도 늘어나고 있는데 그 이유로는 일정시간이 경과한 후 완전히 체내에 흡수되어 이차 수술이 불필요한 장점 때문이다.

흡수성 재료 중 대표적인 것이 poly-lactic acid(PLA)와 poly-glycolic acid(PGA)이며, 이들을 이용한 다양한 조성의 제품들이 골 고정에 사용된다. 이 중 PGA는 1930년대 William Carothers에 의해 합성된 물질로 glycolic acid 단분자(monomer)로부터 만든 중합체(polymer)이며 현재 사용되는 봉합사 중 Dexon II[®] (Sherwood Davis & Geck, USA)이 PGA로 구성되어 있다.¹¹ PGA는 구조가 간단하고 기계적 강도가 큰 반면에 분자량에 따른 여러 형태의 제조가 용이하다는 점에서 사용 빈도가 늘어나고 있으며, 생체 적합성이 있고 주위의 골과 밀접하게 연계되어 뼈대 구조를 제공하게 되어 골 담체 물질로 사용 가능성이 높다.²⁶

심한 분쇄 골절의 경우 흡수성 재료로 구성된 골 고정 재료들은 충분한 강도를 제공할 수 없어 사용이 제한된다.

저자들은 강도가 약한 흡수성 재료를 분쇄 골절에 적용하기 위해서 초기 골 고정시 골의 성장에 긍정적인 영향을 미치는 여러 인자들을 같이 적용하는 방법을 생각하였다. 이런 것들의 예로서 아연, 황화 칼슘염,^{12,13} 키토산(chitosan) 등¹³이 있으며, 저자들은 모든 조직 관련 연구기관에서 세포배양에 사용하는 우태아 혈청을 선택하였다. 우태아 혈청은 세포의 성장과 기능에 관여하는 호르몬, 즉 알부민(albumin)과 글로불린(globulin)을 제공하고 세포증식 촉진 능력을 가지고 있는 폴리펩타이드, 각종 성장인자 등이 포함되어 있으며 아직까지 정확하게 밝혀지지 않은 세포 성장에 용이한 여러 인자가 포함되어 있다고 할 수 있다.⁷ 저자들은 우태아 혈청을 흡수성 재료에 혼합하는 방법을 생각하였고, 이를 심한 골절부에 적용한다면 골절 초기 골의 성장에 긍정적인 영향을 미칠 것이라 가설을 세웠다. 즉, 이 두 가지 물질을 혼합하여 골절부에 적용한다면 골 고정 효과뿐만 아니라 국소적이고 지속적인 골 성장을 유도할 수 있다는 가설이다.

MTT 분석을 이용한 인간 조골세포의 증식률을 측정한 결과, 순수 PGA만 코팅된 대조군보다 우태아 혈청과 PGA의 혼합물을 코팅한 실험군에서 배양 7일 동안 세포성장률이 높았는데 이는 배양기간 동안 혼합물에 포함된 우태아 혈청이 배양액으로 방출되어 세포 성장에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. PGA만 코팅된 배양판에서 배양 1일 이후부터 조골세포의 증식이 감소한 이유는 배양액 내의 우태아 혈청이 고갈되었기 때문일 것이다. 1.5%, 3%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서는 배양 3일까지 세포증식이 관찰되었고 5, 7일에는 세포가 소폭으로 감소하는 것을 확인하였는데 이는 혼합물에서 방출되는 우태아 혈청이 증식하는 세포가 필요로 하는 양보다 배

양 3일 이후 적게 유리되기 때문으로 생각된다. 7%의 경우 배양 7일까지 세포증식이 관찰되는 것은 배양기간 동안 지속적으로 세포증식에 적합한 농도의 혈청이 방출됨을 의미한다. 10%의 경우에는 배양 5일까지 세포증식이 관찰되었고 7일째 세포가 소폭으로 감소함을 확인하였는데 이는 세포증식에 필요한 농도의 혈청이 배양 5일째까지는 방출되나 5일 이후에 방출되는 혈청의 농도는 세포 증식을 억제한다고 할 수 있다.

Alkaline phosphatase 염색을 통한 조골세포의 유착 상태의 관찰 결과도 순수 PGA만 코팅된 대조군보다 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 실험군에서 전체적으로 선명한 붉은 색의 염색 상태를 보여 세포의 유착 상태가 양호함을 나타내었고 이는 세포 활동이 왕성함을 의미한다. 특히 3, 7%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 배양판에서 더욱 선명한 붉은 색의 염색 상태로 왕성한 조골 세포의 활동을 나타내었다.

저자들의 실험에 사용된 우태아 혈청은 인체 적용을 전제로 한다면 광우병 등의 전염성 질환을 인간에게 전파할 수 있는 잠재적 위험이 있다.⁷ 이런 위험을 방지하기 위하여 인체 적용 시에는 환자 자신의 자가 혈청을 이용함으로써 예방할 수 있을 것이다. 저자들의 실험은 시험관내에서 이루어진 것으로 비교적 용이하게 구할 수 있는 우태아 혈청을 이용하여 세포실험을 시행하여 의미 있는 결과를 얻었으나 오랜기간의 추적관찰이 이루어지지 못했으며, 향후 동물실험을 통해 생체 내에서의 골절부의 변화 양상을 통해 검증이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

MTT 분석을 이용한 인간 조골세포의 증식률을 측정 한 결과 순수 PGA만 코팅된 대조군보다 우태아 혈청과 PGA의 혼합물을 코팅한 실험군에서 배양 7일 동안 세포성장률이 높았다. Alkaline phosphatase 염색을 통한 조골세포의 부착 상태의 관찰 결과는 대조군으로 순수 PGA만 코팅된 대조군에서는 드물게 붉은 색을 띄었고, 1.5%, 3%, 7%, 10%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 유리판에서는 전체적으로 선명한 붉은 색의 염색 상태를 보였으며, 그 중 3%, 7%의 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 코팅된 유리판에서 더욱 선명하였다. 이 결과는 우태아 혈청과 PGA의 혼합물이 인간 조골세포의 성장에 긍정적인 영향을 미치는 것을 의미하며, 골절부의 고정 시 사용하는 흡수성 골 고정 재료에 적당량의 우태아 혈청을 혼합하여 적용한다

면 골절 초기 골 성장을 촉진할 수 있으리라 기대된다.

REFERENCES

1. Nacamuli RP, Wan DC, Lenton KA, Longaker MT: New developments in pediatric plastic surgery research. *Clin Plast Surg* 32: 123, 2005
2. Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, Davies JE: In vivo bone engineering in a rabbit femur. *J Craniofac Surg* 14: 324, 2003
3. Eppley BL, Reilly M: Degradation characteristics of PLLA-PGA bone fixation devices. *J Craniofac Surg* 8: 116, 1997
4. Tija JS, Moghe PV: Analysis of 3-D microstructure of porous poly (lactide-glycolide) matrices using confocal microscopy. *J Biomed Mater Res* 43: 291, 1998
5. Long CM, Conley SF, Kajdacsy-Balla A, Kerschner JE: Laryngotracheal reconstruction in canines: Fixation of autologous costochondral grafts using polylactic and polyglycolic acid miniplates. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 570, 2001
6. Nelson JF, Stanford HG, Cutright DE: Evaluation and comparisons of biodegradable substances as osteogenic agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 43: 836, 1977
7. McAlinden MG, Wilson DJ: Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. *Cell Transplant* 9: 445, 2000
8. Widmer MS, Gupta PK, Lu L, Meszlenyi RK, Evans GR, Brandt K, Savel T, Gurlek A, Patrick CW Jr, Mikos AG: Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 19: 1945, 1998
9. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Miyamoto S, Nozaki K, Takaoka K: Biodegradable poly-D, L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S92, 2001
10. Takata T, Wang HL, Miyauchi M: Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodontol Res* 36: 322, 2001
11. Huang MH, Li S, Vert M: Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of ϵ -caprolactone and DL-Lactide. *Polymer* 45: 8675, 2004
12. Al Ruhaimi KA: Effect of adding resorbable calcium sulfate to grafting materials on early bone regeneration in osseous defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15: 859, 2000
13. Kim GR, Cho BC, Yang JD, Lee DG, Chung HY, Park JW, Kim JS, Park NW, Jang KH, Jang HS, Kwon IC, Roh KH, Lee DS: Effect of injectable chitosan bead encapsulating calcium sulfate on bony consolidation in distraction osteogenesis. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 390, 2004