

전기방사법으로 제조된 실리카/폴리카프로락톤 적층형 부직포에 배양한 골아 세포의 증식, 분화에 관한 연구

안민국¹, 김경화^{1,2}, 김태일¹, 이용무¹, 이상운³, 구 영¹,
류인철¹, 정종평¹, 한수부¹, 설양조^{1*}

1. 서울대학교 치의학대학원 치주과학교실
2. 서울대학교 BK21 치의학생명과학사업단
3. 서울대학교 치의학대학원 치과생체재료학교실

I. 서론

골 이식재는 자가골, 동종골, 이종골 및 합성골로 분류되며 현재까지의 임상실험 결과에서 골 전도도는 자가골이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 동종골 이식은 다른 개체에 의해 기부되거나 사체로부터 얻어진 골 조직을 이용하고, 이종골 이식은 다른 종으로부터 얻어진 골 조직을 이용한다. 동종골과 이종골이 널리 사용되기 어려운 점은 조직적 합성이나 감염 질환의 전이와 같은 단점이 있기 때문이다. 자가골 이식은 80-90%의 높은 성공률을 보이며, 면역 거부나 감염, 질병의 전이를 얻을 위험이 최소한이고 대부분 환자의 장골이나 상 하악골로부터 얻어진다. 자가골은 골의 치유나 재생을 위해 임상적으로 가장 선호되는 골 이식재이다. 그러나 자가골은 공여부의 morbidity나 해부학적인 부적합성 등으로 인해 제한적으로 사용할 수 있다¹⁾.

오늘날 생분해적인 중합체나 유리 그리고, 유리-세라믹들에 기초한 다양한 물질이 골 조직 이식재, 골조직공학 이식재로 연구 되고 있고 다양한 제품들

이 개발되고 있다²⁾. 그중에서 실리카를 주성분으로 하는 유리와 수산화 인회석은 생활성을 가지고 있다. 즉, 즉 생물학적 환경과 친화성이 있고 생체 내에서 골조직과 함께 화학적으로 결합할 수 있기 때문에 골조직 치유에 적합한 성질을 가지고 있다. 또, 생활성 유리는 골 전도성이 뛰어나고 세포를 유도할 수 있는 능력이 있고 생분해성을 조절할 수 있다. 이러한 장점이 생활성 유리를 골이식재 혹은 골조직공학을 위한 비계로서의 가능성을 많이 부여하며 여러 연구자에 의해 다양하게 연구되어지고 있다³⁾.

생분해될 수 있는 물질은 결국 호스트의 조직에 의해 대체될 수 있다는 면에서 매력적이다. 동시에 큰 골 결손 부가 있는 경우의 재생에 있어 필요한 초기의 구조적 강도와 유지를 제공 한다⁴⁾. 이상적인 골이식재를 위한 요건은 세포 전달 능력, 골 전도성, 생체적합성, 기계적 물성, 불규칙한 모양 제조 능력, 상용화 가능성, 다공성 구조 등이 있다.

생분해성 고분자물질 중 효소 분해성 고분자(생체 고분자)는 콜라겐, 젤라틴 및 고분자량의 폴리아미노산, 폴리아스파틱산 등과 같은 폴리펩타이드, 키틴

* 교신저자 : 설양조, 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치의학대학원 치주과학교실, 110-749 (전자우편 : yjseol@snu.ac.kr)

* 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2005-000-10375-0)지원으로 수행되었음.

이나 키토산, dextran, cellulose 등과 같은 다당체 및 박테리아에 의해 생성 되는 폴리베타 하이드록실 알카노에이트 등과 같은 폴리에스테르류 그리고 DNA 와 같은 핵산 등이 존재한다⁵⁾. 생체고분자는 생체친 화성이 높은 장점이 있으나 면역반응을 유발할 수 있고 비효소 분해성 고분자에 비해 생분해 속도 및 기계적 물성을 임의적으로 조절하기가 어렵다. 효소에 의해서 분해 되지 않고 물의 수화작용에 의해 분해 되는 합성고분자는 폴리글리코릭산(PGA), 폴리락틱산(PLA), 폴리락티코글리코릭산(PLGA), 폴리말레익산(PMA)등과 같은 폴리에스테르류, 폴리디옥사논 및 폴리락틱산과 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리프로필렌글리콜을 공중합 시킨 고분자류 그리고, 폴리카프로락톤 및 폴리 베타하이드록시부틸레이트 등과 같은 폴리하이드록실산 등이 있다. 이들은 체내에서 면역반응이 적고 기계적 물성의 제어가 용이하며 용도에 따라 구조의 변경이 비교적 간편하다. 폴리카프로락톤은 합성고분자의 일종으로 에스테르기를 포함하여 이것이 수용액속에 침적되었을 때 수화의 발생에 에스테르 결합이 끊기면서 생분해된다. 폴리카프로락톤과 생활성 유리, 수산화인회석, tricalcium phosphate(TCP) 등과 폴리락틱산이나 다당성 산, 그들의 공중합체들, 콤포짓계 들은 어느 정도 수준의 유연성을 갖고 있고 적당한 기계적 물성 뿐 아니라 한층 향상된 생물학적 물성이나 골 전도성을 지닌다⁶⁾.

전기 방사법은 최근에 개발된 나노 섬유 제조 방법으로 전기자기장을 이용하여 나노 섬유를 방사하여 직물형태가 아닌 불규칙한 배열의 부직포를 제조하는 방법이다. 기존의 마이크로미터 단위의 섬유와 비교하여 더 가는 나노 섬유는 단위 무게 당 표면적이 매우 커서 생체와 반응할 수 있는 면적이 높고 또한 3차원적으로 다공성이 높다고 알려져 있다. 이러한 성질은 세포와 조직을 배양하는 데 유용하여 나노 섬유로 제작한 물질은 조직공학을 위한 우수한 재료로 여겨지고 있다⁷⁾.

이 연구의 목적은 실리카와 폴리카프로락톤을 전기 방사시켜 적층으로 부직포를 형성하여 만든 실리카/고분자 복합체에 배양된 골아세포의 증식, 분화

를 관찰함으로써 새로이 개발한 물질의 향후 골이식 재료로서의 개발 가능성을 알아보는 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 부직포의 제조

실리카부직포의 제조를 위하여 tetraethyl ortho-silicate (TEOS)를 물, 에탄올, 염산과 1:4:1:0.02의 비로 혼합하여 60°C에서 3시간 동안 반응시켜 수화 응축시켰다. 이 용액을 2 kV/cm 의 전기장 하에서 방사한 후 방사된 실리카부직포를 24시간 동안 쾌적한 상태로 건조시킨다. 건조 후 2°C/min 의 속도로 온도를 올리면서 3시간 동안 300°C에서 열처리를 한다⁸⁾. 폴리카프로락톤 (polycaprolactone, PCL) 부직포의 제조를 위하여 폴리카프로락톤을 dimethylformamide (DMF)에 용해시킨 후 실리카부직포에서와 같은 방법으로 2 kV/cm의 전장 하에서 방사하였다. PCL-silica-PCL(PSP)부직포와 silica-PCL-silica (SPS) 부직포의 제조를 위하여 TEOS에 물, 에탄올을 첨가한 후 염산을 촉매로 하여 겔화 반응을 유도하였다. 이때 TEOS에 0.1배의 염화칼슘을 첨가하였고 적정량의 점도가 얻어지면, 이를 spinneret으로 옮긴 후 2 kV/cm 의 전장 하에서 방사를 하였다. 그 후 PCL을 DMF에 용해시킨 후 역시 2 kV/cm의 전장 하에서 방사된 실리카 부직포위에 방사를 하였다. 그 후, 다시 실리카 상을 방사하여 silica/PCL/Silica 다층복합체를 제조하였다. 반면, PCL/silica/PCL의 다층복합체를 제조하기 위해서는 방사의 순서만을 바꾸어서 위와 같은 방법으로 방사하였다. 방사된 두 가지의 다층형 부직포는 하루 동안 건조시킨 후, 이를 지름 12 mm의 원형으로 자른 후 UV lamp하에서 30분간 자외선 살균하였다.

2. 세포배양

골아세포인 MC3T3-E1 세포는 ATCC (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

10% fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotic-antimycotic solution이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 세포를 배양하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 배양 시 습도는 100%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다.

3. 세포부착 및 형태 관찰

세포의 초기 부착형태를 관찰하기 위하여 MC3T3-E1 세포를 각각의 부직포에 접종하였다. 4시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양한 후 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 씻고 10% NBF에서 10분간 고정하였다. Rhodamine-labeled phalloidin (Molecular Probes, Sunnyvale, CA, USA)으로 filamentous actin (F-actin)을 염색하고 stress fiber의 형성을 confocal laser scanning microscope (CLSM, Zeiss, Göttingen, Germany)를 통하여 관찰하였다. 세포 접종 후 3일, 7일 후의 세포의 형태는 field emission scanning electron microscope (FESEM, Hitachi, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였다. 골아세포를 각각의 부직포에 접종한 후 3일, 7일 후에 세포가 접종된 각각의 부직포를 PBS용액으로 두 번 헹구었다. 2.5%(v/v) glutaraldehyde (Showa, Kyoda, Saitama, Japan)과 1% OsO₄ (Ted Pella, Redding, CA, USA)용액에서 각각 고정하였다. 4°C에서 10분씩 에탄올의 농도를 점차 증가시키면서 탈수시키고 최종적으로 hexamethyldisilazane (Acros, Geel, Belgium)으로 탈수시켰다. 고정된 재료들은 금으로 sputter-coating한 후 FESEM을 이용하여 관찰하였다.

4. 세포성장도 관찰

각각의 부직포를 48well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 넣은 후 ethylene oxide(EO) gas로 소독을 시행하였다. 부직포를 넣은 각각의 well 및 부

직포가 없는 well에 MC3T3-E1 세포를 1×10⁵/well의 수로 접종하였다. 접종 후 1일, 7일, 14일에 배지를 제거하고 alamar blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액이 10% 첨가된 배지를 첨가한 후 2시간 30분 동안 37°C에서 배양하였다. 2시간 30분 후에 570 nm와 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Optical density는 Microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 통하여 측정하였다.

5. Osteocalcin 및 osteopontin 측정

각각의 부직포를 48well plate에 넣은 후 EO gas로 소독을 시행하였다. 부직포를 넣은 각각의 well 및 부직포가 없는 well에 MC3T3-E1 세포를 1×10⁵/well로 접종을 하였다. 접종 후 1일, 3일, 7일, 14일에 배지를 모아서 사용 시까지 -70°C에 보관하였다. Osteocalcin 및 osteopontin 양은 immunoassay 방법을 이용하여 측정하였다. Osteocalcin의 측정은 Mouse osteocalcin ELISA kit (BTI, Stoughton, MA, USA)를 이용하였으며, osteopontin의 측정은 Mouse osteopontin EIA kit (Assay designs, Ann Arbor, Michigan, USA)를 이용하였다.

6. 통계분석

모든 실험은 3회 실시하였으며 실험에서 얻어진 수치는 Kruskal-Walis test로 분석하였다. 통계학적 유의성은 p=0.05 수준에서 검정하였다.

III. 결과

1. 세포부착 및 형태 관찰

세포 접종 4시간 후 CLSM으로 관찰한 결과, 실리카 부직포의 경우 세포들이 많이 보이지 않으며 이는 재료 관찰을 위한 준비과정에서 배지위로 빠져나간 것으로 추정되고, 또 실리카의 대사산물에 의

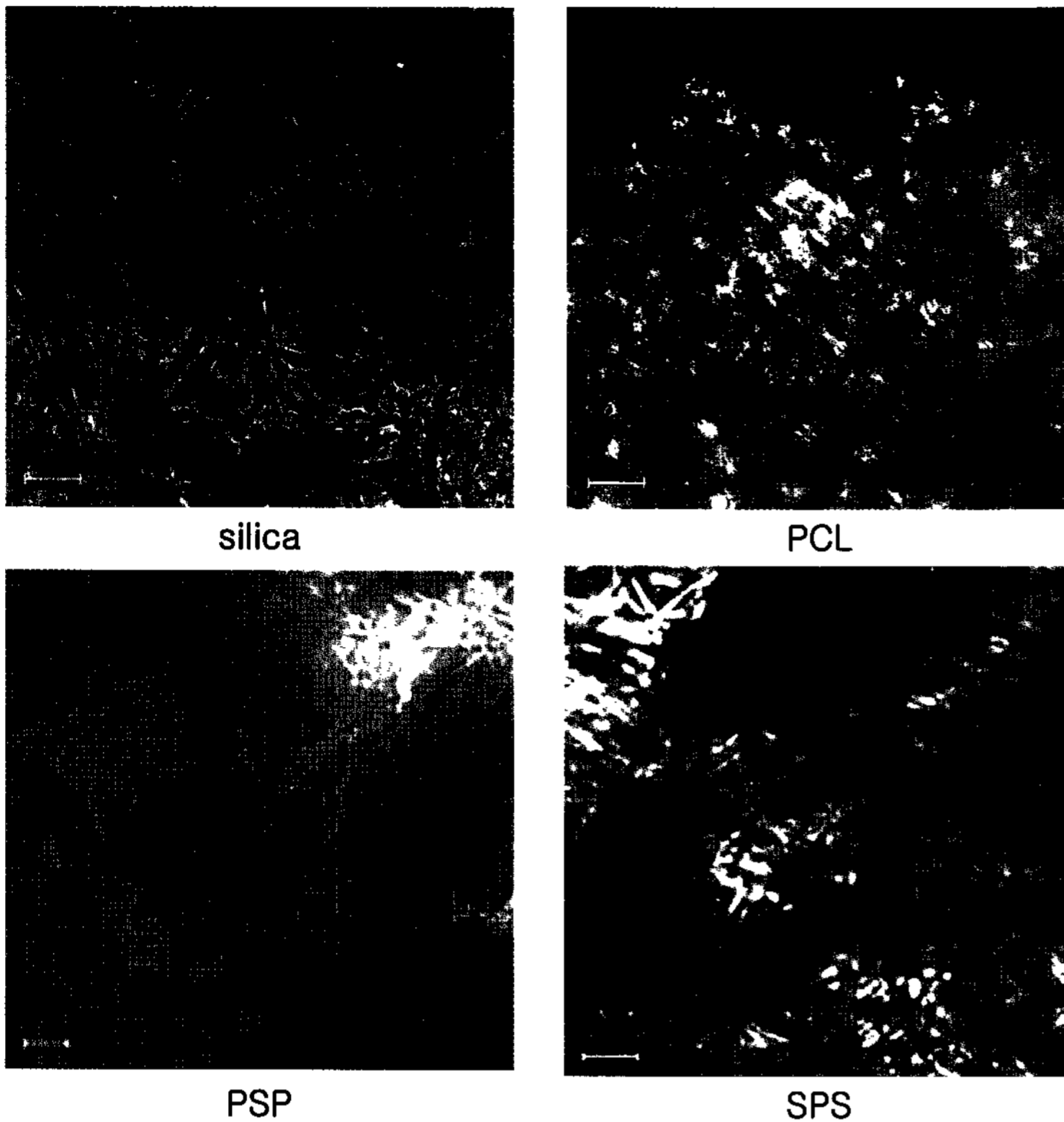


Figure 1. 세포접종 후 4시간 동안 배양한 후 부직포에 부착된 세포의 부착형태 관찰. 세포 접종 4시간 후 CLSM으로 관찰한 결과 silica, PCL, PSP, SPS 등 모든 군에서 세포들이 actin stress fiber를 뿜으며 잘 부착되어 있으며, 특히 PSP의 경우 다른 군들에 비해 좀 더 발달된 부착양상을 보이고 있다.

한 영향과 실리카 자체의 물성에 기인한 것으로 추정된다. 폴리카프로락톤 부직포의 경우 세포들이 다수 존재하고 있었으며, 이는 고분자구조이고 생체친화적이기 때문에 세포들이 어느 정도 잘 자라는 것으로 보인다. Figure 1은 원래의 모양보다는 약간 위축된 모습을 보인다. PSP부직포의 경우에는 세포들이 적절하게 보이고 원래의 세포 모양으로 방추형으로 잘 자라고 있음을 보여 생체친화적임을 알 수 있다. SPS부직포의 경우 세포의 모양이 위축되어 잘 자라지 못함을 보여준다.

부직포에서 세포를 3일, 7일 동안 배양한 후 주사전자현미경으로 세포형태를 관찰한 결과 실리카 부직포에서 배양된 세포들은 3일과 7일 모두에서 동그란 형태로 부직포에 부착되어 있으며 증식은 활발하게 이루어지지 않았다(Figure 2). 폴리카프로락톤 부직포에서 배양된 세포들은 3일, 7일 모두에서 방추형의 형태를 보이면서 부직포에 잘 부착된 형태를 보여주고 있으며 증식이 활발하게 진행되고 있음을 보여준다. PSP부직포에서 배양된 세포들은 접종 후

3일 째에는 동그란 형태로 부직포에 부착되어 있으나 7일 째에는 방추형의 형태를 보이면서 부착되어 있으며 증식이 활발하게 이루어지고 있다. SPS부직포에서 배양된 세포들은 3일, 7일 모두에서 방추형의 형태를 보이면서 부직포에 잘 부착된 형태를 보여주고 있다.

Table 1에서는 세포 증식을 비교한 결과를 보여주고 있는데, 실리카의 경우 대조군을 제외하고 가장 높은 값을 보여 세포의 증식이 잘 되고 있음을 보여주고 있다. 전체적으로 7일째 가장 높은 값을 보이고 14일째로 갈수록 감소함을 보였다. 이는 세포 증식이 이루어지다가 포화상태에 이르러 분화가 진행되면서 세포 분열의 속도가 느려지는 것으로 해석된다. 시기에 따라 군별로 유의한 차이는 없었다.

2. 세포 분화

Table 2에서는 osteopontin의 분비량을 비교한 결과를 보여주고 있다. 3일째 silica, PSP, SPS에서

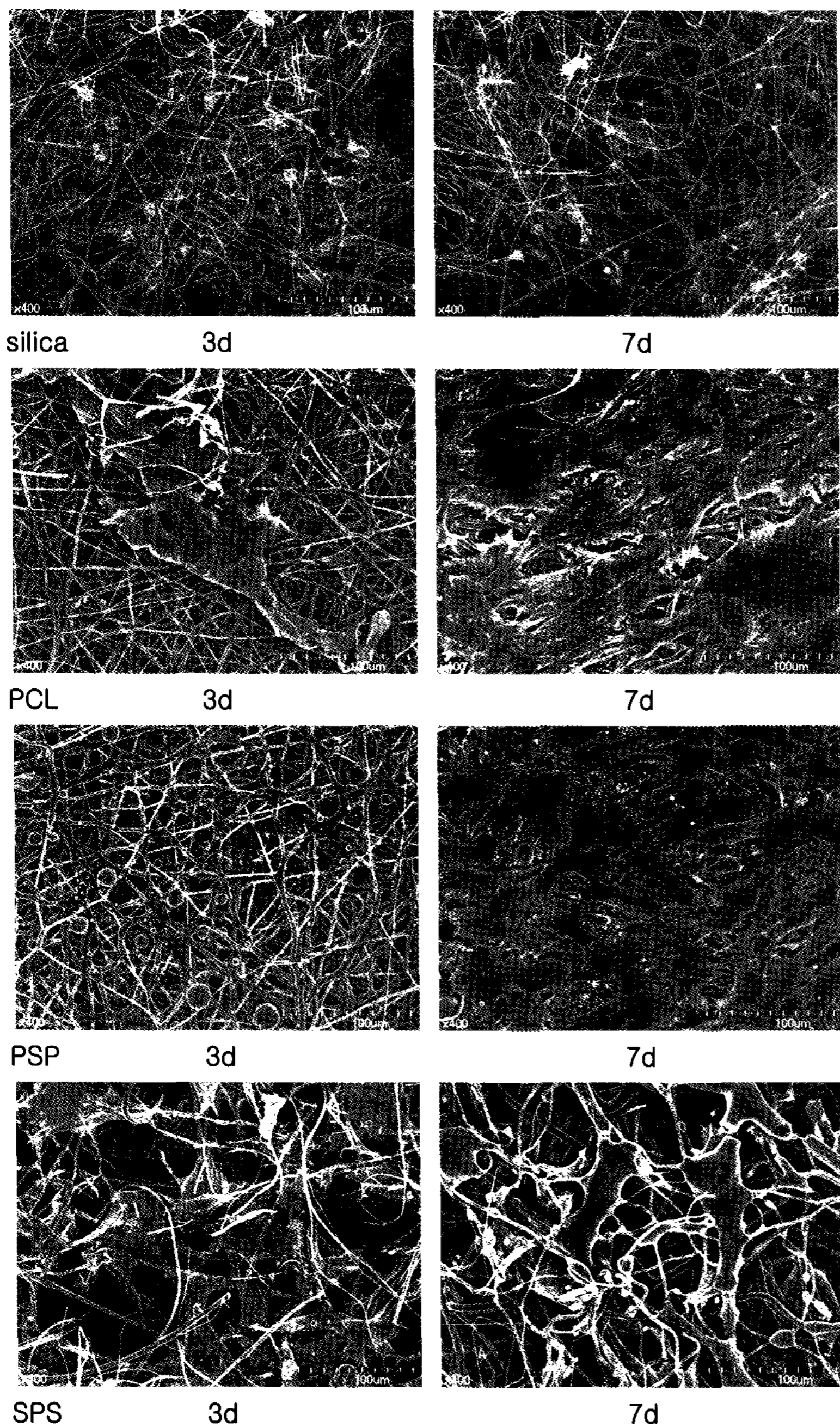


Figure 2. 부직포에서 세포를 배양한 후 3일, 7일 후의 부직포에 부착된 세포의 형태 관찰. silica에서 배양된 세포들은 동그란 형태를 띠고 있으며, 세포는 증식이 활발하게 이루어지지 않음. PCL에서 배양된 세포들은 증식이 활발히 이루어짐. PSP에서 배양된 세포들이 증식이 활발히 이루어짐. SPS: 세포들의 증식이 PSP 경우보다 활발하지 않음.

높은 값(29.8, 34.5, 33.2 ug/ml)을 보이고 PSP와 SPS는 14일째까지 감소(2.4, 1.6 ug/ml)하였으며, silica는 7일째까지 감소(5.6 ug/ml)하다 14일째 증가(10.0 ug/ml)하는 모습을 보였다. PCL부직포에서는 1, 3, 7일까지는 서서히 증가하다가 14일째 큰 폭의 증가를 보였다.

Table 3에서는 후기 분화표지인자인 osteocalcin의 분비량을 보여주고 있다. 모두에서 14일째로 갈수록 점차 증가함을 보여주고 있다. 실리카부직포군(0.685 ng/ml)을 제외하고 PSP부직포군(0.573 ng/ml)에서 가장 높은 값을 보였으며($P < 0.05$), PCL 부직포군(0.491 ng/ml)이 가장 낮았다.

Table 1. Cell proliferation(%). 세포 증식 실험 결과 1일째에는 실리카에서 가장 높은 값을 보였고 SPS, PSP, PCL 순으로 나타남. 7일째까지 증가하다가 14일 이후로 감소하는 모습을 보임. 7일째 PSP가 SPS보다 높다가 14일째 SPS가 높게 나타났음.

	control	silica	PSP	SPS	PCL
1d	0.658	0.797	0.611	0.646	0.688
7d	0.937	0.968	0.803	0.728	0.793
14d	0.882	0.839	0.615	0.653	0.549

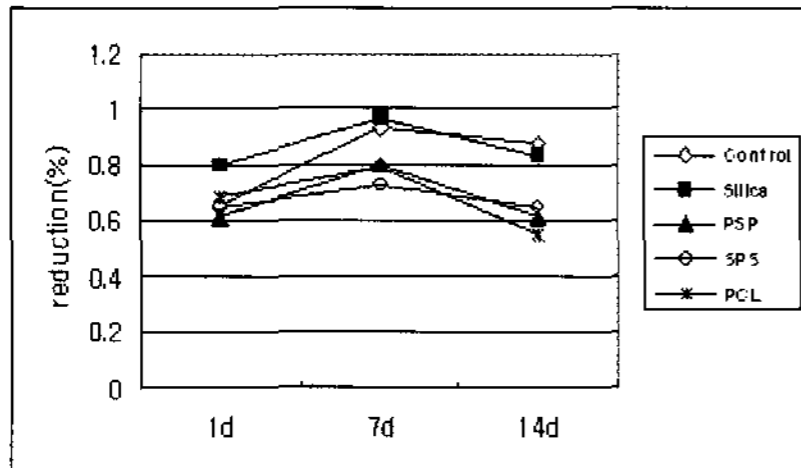


Figure 3. Cell proliferation(%). 1, 7, 14일 후의 세포 증식을 비교한 그래프.

Table 2. Osteopontin(ug/ml). 3일째 silica, PSP, SPS에서 높은 값을 보이고 PSP와 SPS는 14일째 까지 감소함을 보이고, silica는 7일째까지 감소하다 14일째 증가하는 모습을 보임. PCL에서는 점차 증가하는 모습을 보임.

	control	silica	PSP	SPS	PCL
1d	4.5	10.0	11.9	10.4	7.9
3d	4.2	29.8	34.5	33.2	8.6
7d	2.8	5.6	10.9	24.1	9.8
14d	3.2	10.0	2.4	1.6	21.5

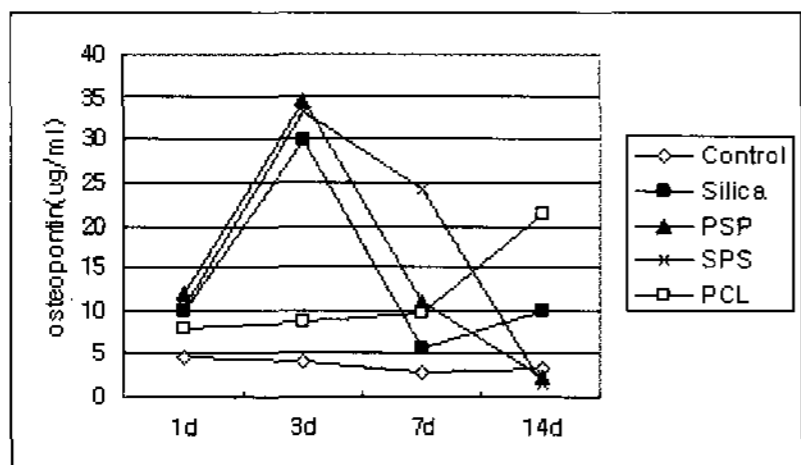


Figure 4. 배양 1, 3, 7, 14일 후의 osteopontin 값을 비교한 그래프

Table 3. Osteocalcin(ng/ml). silica, PSP, SPS, PCL에서 모두 7일에서 14일로 갈수록 점차 증가함을 보임. silica의 값이 가장 높았고 PSP, control, SPS, PCL순이었다.

	control	silica	PSP	SPS	PCL
1d	0.283	0.304	0.322	0.300	0.247
3d	0.313	0.346	0.313	0.296	0.322
7d	0.439	0.346	0.300	0.380	0.422
14d	0.515	0.685	0.573	0.503	0.491

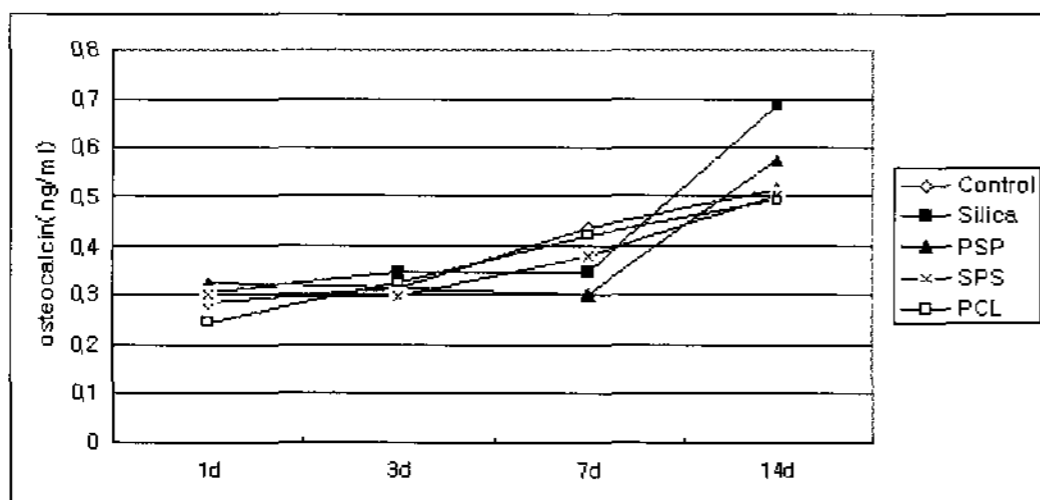


Figure 5. 배양 1, 3, 7, 14일 후의 osteocalcin 값(ng/ml)을 비교한 그래프.

IV. 고안

현재 많이 사용되고 있는 합성골은 bioactive glass, hydroxyapatite(HA), β -tricalcium phosphate (β -TCP), coralline calcium carbonate 등이며, 그 장점으로 사용하기 쉽고 재료 공급이 무한하며, 이식재의 조기 흡수 및 높은 골 형성을 들 수 있다. 그 중 bioactive glass는 골과 강한 결합력을 가지고 반응이 자발적으로 이루어지며 결합에 소요되는 시간도 단기에 이루어진다. 그러나 낮은 파괴인성과 강도로 인해 제한적으로 사용되며, 탄성률이 골에 비해 매우 높기 때문에 골 흡수 현상을 유발한다⁹⁾. 골과 비슷한 아파타이트 층을 표면에 지닌 합성 중합체는 그 표면의 아파타이트가 자연골의 주된 무기물 성분인 반면 골전도성과 생체적합성이 우수하기 때문에 골 조직 재생을 위한 물질로서 유용하다¹⁰⁾. 이식재는 조절되는 방식으로 신체에서 대사되거나 일반 생리적인 방식을 통해 배설되어 독성이 없는 물질로 분해되어야 한다. 이 물질은 생체 반응과 조절되어 적절한 속도로 흡수되어야 하며, 특히 치과 임플란트를 식립하면서 골이식재로 사용되었을 때는 더욱 그러해야 한다. 인공골이식재로 많이 사용되고 있는 하이드록시아파타이트의 흡수는 인체 내에 이식한 경우 느리게 진행되므로 좀 더 빠른 속도로 분해되는 골대체재를 생산할 수 있는 상당한 노력들이 진행 중이다. 그리고 이러한 재료들은 경계면에서 높은 생분해 속도를 지니고 골 형성을 증가시키게 하는 좋은 골 결합성을 보인다¹¹⁾.

폴리카프로락톤은 중합체로서 생체 내에서 분해가 되며 생체적합성을 가지고 있다. 또한 기계적인 강도를 지니고 있고 낮은 녹는점으로 인해 형태를 쉽게 변형시킬 수 있으며, 폴리카프로락톤의 분해속도를 형식이나 합성조건을 변화함으로써 쉽게 조절할 수 있다. 폴리카프로락톤과 그의 중합체들은 생의학적으로 다양하게 적용할 수 있는 뛰어난 기계적 화학적 물성을 갖고 있다. 최근의 연구에서는 폴리카프로락톤의 아파타이트 형성을 위한 유도기간이 단순한 표면 변경을 통해서 놀라울 정도로 감소하였다

¹²⁾. 폴리카프로락톤은 폴리락티드(PLA), 폴리글리콜리드(PGA)와 비교하여 생분해 속도가 느리기 때문에 실제적인 사용이 제한되어져 왔다. 이러한 단점들을 극복하고 일시적인 조직재생물질로 적용하기 위하여 친수성의 폴리에틸렌 산화체로 폴리카프로락톤의 구조를 변경하거나 폴리락티드(PLA)나 폴리글리콜리드(PGA)와 공중합체를 형성함으로써 폴리카프로락톤의 생분해 속도를 조절하는 시도들이 시행되었다¹³⁾. 폴리카프로락톤은 수화과정을 통해 생분해되기 때문에 친수성의 성분을 도입하는 것은 생분해 속도를 향상시키는데 효과적이며, 그중 친수성 세라믹의 첨가는 폴리카프로락톤의 소수성을 향상하고 분해속도를 증가시키는 대안 중의 하나가 될 것이다¹⁴⁾. Oyane 등¹⁵⁾은 최근에 생활성 폴리카프로락톤 비계들을 만드는 좀 더 쉬운 방법을 개발하였다. 그들은 폴리카프로락톤의 표면에 산소를 포함하는 기능기를 형성하는 방법으로 플라즈마 처리를 사용하였다. 이어 칼슘이온과 인산이온 용액에 교대로 침적시켰다. 이러한 비계는 골과 유사한 아파타이트 층으로 코팅되었고, 의사체액 내에서 칼슘인의 핵화와 성장을 가속시키고 유도할 수 있다. 또한 폴리카프로락톤 기질을 삼입함으로써 공중합된 생활성 무기 상에서 칼슘 인의 침착을 가능하게 해주기 때문에 기계적인 강도를 증가시킬 수 있다¹⁶⁾.

본 연구에서 PSP와 PCL 부직포에서 배양된 세포들은 방추형의 형태를 유지하면서 잘 부착되어 있었으며 세포증식이 활발하게 이루어 졌다. silica에서 배양된 세포들은 동그란 형태의 모양을 보이고 있으나 증식은 활발하게 이루어 졌다 (Figure 1, 2). 이 결과들은 이 두 부직포가 이 연구에서 사용된 다른 재료들 보다 생체적합성이 우수하다는 것을 보여 준다고 할 수 있으며, 이는 경사 기능형 계면 층을 도입하여 전기 방사한 관계로 표면에 PCL뿐만 아니라 실리카가 혼재되어 있어서 더욱 골아세포의 반응이 좋았던 것으로 추정된다. PCL이 소수성이고 실리카가 친수성인 관계로 순차적인 방사에 의한 재료 제작 시 두 면 사이의 박리현상을 극복하기 위해 두 재료를 처음부터 점차적으로 방사하여 혼재시킴으로

써 재료의 물성도 증가시키고 표면에 실리카 성분이 위치함으로 골전도성도 증가한 것으로 생각된다.

모든 군의 세포 증식 실험에서는 7일째까지 증가하다가 14일째로 가면서 감소하는 모습을 보였는데, 이는 세포의 대사산물과 재료와의 화학적 반응의 영향으로 세포의 대사능력이 떨어졌거나 감소했을 가능성과 세포 주기에 따라 분화가 진행되면서부터 세포의 증식이 감소되는 것과 연관이 있을 것으로 추정된다. 여기서도 실리카의 값이 가장 높은 것으로 보아 실리카의 골 전도성이 높은 것을 알 수 있다.

골아세포 분화의 단계들은 각각의 특징적인 골 기질 단백질의 발현으로 확인할 수 있다. 골아 세포의 초기에 type I collagen이 최대 발현되고 기질성 숙단계에서 염기성 인산분해효소가 최대 발현된다¹⁷⁾. 후기분화단계로 진행되면서 osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein 등이 발현된다. 본 연구에서는 골분화표지인자인 osteopontin과 osteocalcin으로 분화정도를 평가하였으며, 또 다른 대표적인 골분화표지인자 중 하나인 염기성 인산분해효소의 활성도 측정은 재료가 3차원적 구조로 인하여 측정의 정확성이 떨어지기 때문에 관찰하지 않았다. Osteopontin은 PSP와 SPS에서 배양된 세포들에서 3일째 최대치를 보인 후 14일째까지 급격히 감소함을 보여주고 있다(Table 2). 골분화과정 중 분화의 2 단계에서 관찰되는 osteopontin은 세포의 초기증식기에는 증가하다가 증식이 되면서 감소되며, 분화가 시작되어 성숙기를 지나 광화가 시작되면서 다시 증가하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 본 연구에서는 silica, PSP, SPS 부직포에서 배양된 세포의 초기 증식기에 이와 비슷한 양상을 보여주었으나, 분화가 진행되는 과정에서는 silica에서 배양된 세포들만이 다시 증가되는 경향을 보여주었다. 이는 silica에서 분화가 가장 먼저 촉진된다는 것을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 그러나 다른 군들에서는 이 양상을 관찰하지 못했으며, 이는 기간이 짧아서 관찰하지 못했을 가능성이 있다고 보여 이에 대한 추가적인 연구를 현재 진행 중에 있다. Table 3과 Figure 5를 통해서 측정된 osteocalcin의 양은 모두에서 14일째까지 증

가하는 것을 보여주고 있는데, 이는 골아 세포들이 분화가 잘 이루어지고 있음을 보여주며 PSP 부직포에서 silica를 제외한 나머지 보다 유의하게 높은 값을 보였다($P < 0.05$). 또, 이것은 기질 광화기에 증가하는 osteocalcin의 발현과 일치하는 것을 알 수 있다¹⁹⁾.

본 연구에서 세포 증식, 세포의 형태 관찰, 세포 분화관찰을 통해 PSP 부직포는 silica와 PCL의 특성을 겸하며 생체적합성이 우수하다고 보인다. 이러한 결과들은 PSP 부직포의 골이식재로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있으며 *in vivo*를 통한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

V. 결론 및 요약

이번 실험을 통해 골아 세포는 4가지 부직포 상에서 모두 잘 자라는 것으로 나타났다. CLSM 과 주사전자현미경 사진에서 뿐만 아니라, 골아 세포의 분화 관찰을 한 결과 PSP 부직포에서 골아세포의 분화를 촉진함을 보였다. silica와 PCL을 전기 방사하여 제조한 부직포(PSP)는 골이식재로서의 가능성을 보였다.

VI. 참고문헌

1. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW et al. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76:827-838.
2. Laurencin CT, ElAmin SF, Ibim SE et al. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1996;30:133-138.
3. Qizhi Z, Chen, Ian D. Thompson, Aldo R. Boccaccini 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering.

- Biomaterials 2006 ;27:2414-2425.
4. Lu HH, EL-Amin SF, Scott KD, Laurencin CT. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:465-474.
 5. Chen J, Ma A, Lai Y, Chen Y, Cui M. The mechanism of degradation for the absorbable biomaterials poly(epsilon-caprolactone) in vitro and in vivo. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 1997;14:334-337.
 6. Kim HW, Lee EJ, Kim HE, Salih V, Knowles JC. Effect of fluoridation of hydroxyapatite in hydroxy-apatite polycaprolactone composites on osteoblast activity. *Biomaterials* 2005;26:4395-4404.
 7. 신승윤, 박호남, 김경화 et al. 키토산 나노 차폐막의 골조직 재생유도 능력에 관한 조직학적 연구. *대한치주과학회지* 2004;34:543-548.
 8. Rhee SH. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(epsilon-caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(epsilon-caprolactone) content. *Biomaterials* 2004;25:1167-1175.
 9. 김병옥. 골이식을 위한 치주치료의 최신지견. *대한치과의사협회지* 2005;43:762-773.
 10. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in diaphyseal defect. A histological study. *J Orthop Res* 1987;5:114-121.
 11. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AC. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 1996;17:175-185.
 12. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000 2000;24:99-126.
 13. Huang MH, Li S, Huttmacher DW et al. Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res* 2004;69:417-427.
 14. Kim HW, Lee EJ, Jun IK, Kim HE, Knowles JC. Degradation and drug release of phosphate glass/poly caprolactone biological composite sites for hard-tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B* 2005;75:34-41.
 15. Oyane A, Uchida M, Yokoyama Y et al. Simple surface medication of poly(epsilon-caprolactone) to induce its apatite-forming ability. *J Biomed Mater Res* 2005;75:138-145.
 16. Seregin VV, Coffey JL. Biomineralization of calcium disilicide in porous polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:4745-4754.
 17. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143: 420-430.
 18. Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 2001;155:157-167.
 19. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Osteocalcin Gene Promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem (suppl)* 1998;30:62-72.

A study on the differentiation of MC3T3-E1 incubated on the layer-built silica/polycaprolactone non-woven fabric produced by electrospinning

Min Kuk AN¹, Kyoung-Hwa Kim^{1,2}, Tae-II Kim¹, Yong-Moo Lee¹, Sang-Hoon Rhee³, Young Ku¹, In-Chul Rhyu¹, Chong-Pyoung Chung¹, Soo-Boo Han¹, Yang-Jo Seol¹

1. Department of Periodontology,
2. BK21 Craniomaxillofacial Life Science,
3. Department of Dental Biomaterials Science, School of Dentistry, Seoul National University

Silica is known as a promising osteoconductive material, and polycaprolactone is a bioactive and degradable material. The purpose of this study was to monitor the differentiation of MC3T3-E1 cells cultured on the layer-built silica/poly caprolactone non-woven fabric produced by electrospinning.

Non-woven fabric (silica, polycaprolactone, PSP, SPS) was made by electrospinning and they were inserted in the 48 well cell culture plate. MC3T3-E1 cells were prepared by subculture. Cells were seeded to each well 1×10^5 concentration per well. Dulbecco's modified eagle medium with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution was used. Confocal laser scanning microscope was taken 4 hours after incubation (95% air, 5% CO₂, 37°C). Cell proliferation was monitored by spectrophotometer on 1, 7, 14 days, and the morphology of the growing cells was observed by field emission scanning electron microscope. To monitor the differentiation of osteoblasts on the materials, MC3T3-E1 cells were incubated in 48 well culture plate after seeding with the density of 1×10^5 concentration. Then ELISA kit & EIA kit were used on to assess osteocalcin and osteopontin expression respectively. The other conditions were the same as above.

MC3T3-E1 cells were proliferated well on all of the materials. There were no statistical differences among them. The osteopontin expression of silica, PSP, SPS was significantly higher than other groups on day 3 ($p < 0.05$), but after that time, there were no statistically significant differences. The osteocalcin expression was significantly higher in silica and PSP than other groups on day 14.

These findings show that PSP was as good as silica on the effect of osteoblast differentiation. The PSP non-woven fabric may have the possibility as bone graft materials.