<학술논문>

DOI:10.3795/KSME-A.2009.33.7.629

세포 인장 자극기의 개발과 세포 인장 자극을 통한 성체 줄기세포의 골분화 유도

신현준^{*}·이우택^{*}·박석훈^{*}·이선화^{**}·박정호^{**}·윤용산^{*}·신현정[†] (2008 년 7월 3일 접수, 2009 년 6월 11일 수정, 2009 년 6월 18일 심사완료)

Development of a Tensile Cell Stimulator to Study the Effects of Uniaxial Tensile Stress on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Hyun Jun Shin, Woo Teak Lee, Suk Hoon Park, Sun Hwa Lee Jung Ho Park, Yong San Yoon and Jennifer H. Shin

Key Words : Osteogenic Differentiation(골분화), Mesenchymal Stem Cell(골수유래성체 줄기세포), Strain Ratio(변형률), Cell Tensile Stimulation(세포 인장 자극), 2D Elastic Membrane(세 포 부착 멤브레인), Quantitative Analysis(정량분석), Osteogenic Marker(골분화 지표)

Abstract

Mechanical stimulation is known to play a vital role on the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to pre-osteoblasts. In this research, we developed a tensile cell stimulator, composed of a DC motordriven actuator and LVDT sensor for measuring linear displacement, to study the effects of tensile stress on osteogenic differentiation of MSCs. First, we demonstrated the reliability of this device by showing the uniform strain field in the silicon substrate. Secondly, we investigated the effects of tensile stretching on osteogenic differentiation. We imposed a pre-set cyclic strain at a fixed frequency on cell monolayer cultured on a flexible silicon substrate while varying its amplitude and duration. 60 min of resting period was allowed between 30 min of cyclic stretching and this cycle is repeated up to 7 days. Under the combined stimulation with osteogenic media and mechanical stretching, the osteogenic markers such as alkaline phosphatase (ALP), osterix, and osteopontin began to get expressed as early as 4 days of stimulation, which is much shorter than what is typically required for osteogenic media induced differentiation. Moreover, different markers were induced at different magnitudes of the applied strains. Lastly, for the case of ALP, we observed the antagonistic effects of osteogenic media when combined with mechanical stretching.

1. 서 론

최근 조직공학(Tissue engineering)의 발전과 함께

↑ 책임저자, 회원, 한국과학기술원 기계공학과				
E-mail : j_shin@kaist.ac.kr				
TEL: (042)869-3232 FAX: (042)869-3210				
* 한국과학기술원 기계공학과				
** 고려대학교 의과대학 정형외과				

대체 장기에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁽¹⁻³⁾ 이 중 생체 내에서의 재생이 한정되어 있는 뼈와 연골의 재생에 대한 연구가 가장 활발히 진행 중 이다.⁽⁴⁻⁶⁾ 생체내의 골조직은 뼈를 생성하는 조골세 포(osteoblast)와 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast) 의 균형에 의해서 유지가 되고 있다. 조골세포의 모세포는 생체내의 골수(bone marrow)에 위치하고 있는 성체 줄기세포이며, 생체 내에서 뼈의 충분 한 재생을 위해서는 성체 줄기세포의 골분화를 효 율적으로 유도하는 것이 무엇보다도 중요하다.

조직 공학 최근의 골 관련 연구로는 in vitro 상황에서 체외 배양된 성체 줄기세포를 효율적으로 분화시키려는 다양한 시도가 많이 진행되고 있다.^(2~6) 현재 체외 배양된 성체 줄기 세포의 골분화를 유도하는 가장 강력한 유도 물질은 bone morphogenic protein (BMP)-family, transforming growth factor (TGF)- β , Dexamethasone 등의 생화학적 요소로 알려져 있다.^(7,8) 이와 더불어 기계적이나 전기적인 자극 등의 물리적 자극 (physical stimulation)이 골분화를 유도하거나 그 효율성을 증대 시킬 수 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 세포에 인장 자극을 줄 수 있는 장비를 제작하고 다양한 세기의 인장자극이 성체 줄기 세포의 골분화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 연구했다.(9~13) 세포 인장 자극기는 체외 배양된 세포에 정확한 주기로 균일한 변형률 (strain)을 가하는 것이 목표이다. 이와 같은 목표를 달성하기 위해 Leung, Matsumoto 등은 피스톤, 크랭크 시스템을 제작해 이를 모터로 구동을 했고, Ives 등은 풀리 케이블 방식을 사용해서 세포에 변형률을 가했다.(14~16) 또한 스텝모터와 선형 가이드 등을 Berry 등은 멤브레인에 세포 부착 이용해서 변형률을 유도했다.⁽¹⁷⁾ 구동원으로 모터를 사용한 위 연구자들의 방식은 세포가 부착되어 있는 탄성의 멤브레인의 한쪽을 고정시키고 반대 쪽을 잡아당기는 방식이다. 이 경우 탄성 멤브레인의 푸아송비 때문에 멖브레인의 형상을 적합하게 변화시키지 않고서는 사용영역에 균일한 변형률을 유도할 수 없다. 또한 멤브레인을 잡고 있는 고정부(holder part)의 설계에 따라 변형률의 값이 달라지게 되고 구동부의 입력 변형률 값과 실제 멤브레인의 표면에 유도되는 출력 변형률 값이 멤브레인의 형상이나 재질에 따라 달라지게 되므로 이에 대한 보정이 필요하다. 이전의 연구에서는 이에 대한 철저한 검증을 거치지 않고 사용했고, 입력 변형률 값과 출력 변형률 값에 수행하지 않았다. 대한 보정 또한 이러하 문제점을 해결하고자 Clark 등은 스텝모터를 사용한 장치를 개발하고 이에 대한 검증을 수행했으나 한꺼번에 여러 그룹에 대한 실험을 한계가 있어 실험의 수행하는데 효율성이 떨어지는 단점이 있다.(18) 현재 상용제품으로써 많은 연구자들이 사용하고 있는 Flexercell® (Flexercell international, CA, USA)의 경우는 진공 압축력으로 탄성 멤브레인을 잡아당기는 장비이다.⁽¹⁹⁾ 그러나 상용제품의 경우 진공을 가하는 과정에서 멤브레인의 고정 방식에 따라 그 결과가 크게 달라질 수 있고 멤브레인이 바닥면에 붙었다 떨어지는 과정에서 생기는 점착현상이 큰 문제로

대두되고 있다. 본 연구에서는 보다 직관적이고 정밀도를 높일 수 있는 모터 구동 방식 액추에이터를 선정했고 한꺼번에 여러 개의 멖브레인을 끼워 동시에 여러 실험을 수행할 수 있는 장비를 개발하는 것을 일차적 목표로 했다. 나아가 개발된 장비의 검증을 위해 개발된 세포 인장기를 이용한 성체줄기세포의 분화에 대한 연구를 목표로 삼았다. 이와 유사한 세포 인장 자극 장비를 이용하여 성체 줄기세포의 골분화 실험을 수행한 예는 많다. Lee 등은 Flexercell® 장비를 이용해 생물학적 자극 없이 기계적 인장 자극만으로는 골분화가 유도되지 않는다는 결과를 발표한 바 있으나⁽¹⁰⁾ Altman, Mauney 등은 기계적 자극만으로 다양한 세포로의 분화가 가능함을 보였다. 이와 같이 기계적 자극만으로 성체 줄기세포의 분화가 가능한지에 대한 연구는 아직 모호한 것이 사실이다.^(4,13) Jagodzinski 등은 성체 줄기세포에 Dexamethasone 등의 생화학적 자극과 2%. 8%의 기계적 인장 자극을 동시에 가해 성체 줄기세포의 골분화 경향에 대한 실험을 수행했다. 그는 생화학적 자극과 기계적 인장 자극을 동시에 가하는 것이 골분화에 효과적이라는 사실을 증명했으나 자극의 크기에 따른 골분화 경향에 대해서는 밝혀내지 못했다.(9) 기계적 자극만으로 골분화 유도가 가능한지에 대한 부분과 기계적 인장 자극과 생화학적 자극을 동시에 가해서 얻어지는 결과에 대해서는 최근까지도 모호한 것이 사실이다. 본 연구에서는 세포인장 자극 장비를 이용해 성체 줄기세포의 골분화를 유도했으며 기계적 자극만 가한 경우와 기계적 자극과 생물학적 자극을 동시에 가했을 때 골분화 경향의 차이에 대해서 정량적으로 평가했다.

2. Method

2.1 세포인장 자극기의 개발

세포 인장 자극기(cell tensile stimulator)의 설계 목표는 살아있는 세포에 정확한 주기와 변형률로 인장 자극을 가하는 것이다. Fig. 1 처럼 PDMS 멤 브레인을 고정시킬 수 있는 멤브레인 홀더 (membrane holder) 부분과 인장 자극을 주기 위한 구동 부분(Maxon motor RE13 Gear set, Swiss, NSK ball screw, Japan, NSK linear guide, Japan), 정확한 인 장 길이를 측정할 수 있는 LVDT 센서(Schaevitz, America)로 구성이 되어 있다. LVDT 센서는 선형 가이드의 방향과 일치하게 정렬이 되어 있으며 선 형 가이드의 직선 변위를 정확히 측정하여 AD board (COMIZOA, Korea)에 전달하고 이 값을 PC 로 받아들여 정확한 주기와 변형률의 인장을 줄



Fig. 1 Schematic diagram of uniaxial tensile stimulator

수 있도록 Visual C++을 이용해 소프트웨어를 제 작했다. 시스템은 기어비가 다른 모터를 인장 속 도에 따라 바꿔 장착할 수 있게 했고 LVDT 센서 를 이용한 정밀한 속도 제어를 통해서 0.05Hz 에 서 20Hz 까지 주기를 제어하는 것이 가능하고 변 형률은 0.3%에서 17%까지 제어할 수 있다. 구동 부와 LVDT 센서를 제외한 모든 파트를 오토클레 이브(autoclave)가 가능하도록 설계했고, 상용 디쉬 (Square dish, SPL, Korea)를 사용하여 오염을 최대한 예방했다. 또한 장비가 인큐베이터 안에서 작동이 될 수 있도록 설계하여 ex-vivo 상태에서 실험이 가능하도록 설계했으며 최대한 오염을 방지하려 노력했다. 개발된 세포인장 자극기는 1 개의 시스 템에 최대 8 개의 멤브레인을 장착해서 실험을 할 수 있고 동시에 3 대의 장비를 동작시킬 수 있으 므로 다양한 실험군을 동시에 실험하는데 유리하 다.

2.2 세포부착 멤브레인의 개발

2.2.1 세포 부착 멤브레인의 재료

본 시스템은 세포가 붙어 있는 멤브레인을 잡아 당겨 세포에 인장을 가하는 간접인장 방식이다. 따라서 멤브레인은 세포가 안정적으로 부착이 될 수 있도록 만들어져야 하고, 세포의 형태 등을 이 미징을 통해 관찰이 가능 하도록 투명해야 한다. 인장 자극을 줄 수 있어야 하므로 어느 정도의 탄 성력을 가져야 하며 자극 중 소성변형이 일어나지 않는 재료로 만들어져야 한다. 또한 표면에 균일 한 변형률을 유도해야 하므로 두께가 균일하게 제 작 되어야 한다. 본 실험에서는 PDMS (DOW CORNING SYLGARD® 184 Silicone Elastomer, U.S.A)를 사용했으며 원액과 경화제를 15:1 로 혼 합해서 사용했다. 제작된 PDMS 멤브레인은 소성 변형이 거의 없는 탄성 물질(high elastic material)이 며 세포에 무해한 물질이며 매우 투명하나 그 자 체에 세포가 부착되지는 않는다.(20) 세포 부착 멤 브레인의 표면에 세포를 부착시키기 위해서 산소



Fig. 2 (a) Contact angle on glass before plasma treatment (b) Contact angle on glass after plasma treatment

플라즈마 처리를 각 30 초씩 수행해 멤브레인의 표면을 소수성에서 친수성으로 변화시킨 후 세포 외 기질 (Extracellular Matrix) 단백질의 하나인 Fibronectin (SIGMA, USA)을 10 uM 의 농도로 코팅 처리했다. Fig. 2(a)의 처리 전 표면에 비해 Fig. 2(b) 는 플라즈마 처리에 의해서 표면이 친수성으로 바뀐 것을 보여준다

2.2.2 세포 부착 멤브레인의 제작 및 두께 조절 세포 부착 멤브레인은 표면이 매끄럽고 균일한 두께를 가져야 한다. 표면이 매끄럽지 않으면 현 미경 등을 통해서 세포의 형태를 파악하기 힘들고 균일한 두께를 갖지 못할 경우 표면에 균일한 변 형률을 유도할 수 없다. 멤브레인을 만드는 형틀 로는 매끄러운 표면을 가지는 유리를 사용했고 균 일한 두께를 유도하기 위해서 형틀 유리 사이에 330µm 의 cover slip 을 끼워 넣었다. PDMS 의 합성 은 제조사의 프로토콜에 따라 100°C 에서 1 시간 중합 조건을 따랐다. 세포 부착 멤브레인의 두께 의 측정은 제작된 PDMS 멤브레인을 얇게 절편을 낸 후 현미경을 이용해 각 부분에 대해서 두께를 측정하여 평균 328.23µm, 표준편차 2.047µm 의 값 을 얻었다 (n=15).

2.2.3 유한요소법(FEM)을 통한 초기 형상 결정 오염을 최소화하기 위해 본 장비에서는 상용되 는 사각의 배양디쉬 (118.7 x 118.7 x 16.5mm)를 사 용했다. 따라서 선택된 상용 디쉬의 크기에 따라 고정파트를 제외한 세포 부착 멤브레인의 길이는 62mm 로 결정했다. 멤브레인의 형상 설계 시에 KS 규격의 폴리머 재질 인장시편의 규격을 최대 한 반영했으나 이미 멤브레인의 길이가 정해져 있 었기 때문에 정확히 그 규격으로 맞출 수는 없었 다. 따라서 주어진 조건에서 원하는 영역에 가장 균일한 변형률을 유도하는 세포 부착 멤브레인의 유한요소법을 통하여 결정했다. 우선 형상을 PDMS 재료의 물성치 데이터를 얻기 위해서 dma2980 (TA instrument)를 이용하여 인장실험을 수 행한 결과 PDMS 의 탄성계수 (Youn's modulus)는 1.2642±0.21(MPa)로 측정되었다. 또한 푸아송비(v) 는 일반적인 고무의 값인 0.5 를 사용하였다. 유한 요소법 해석은 ABAQUS 6.5 를 이용했으며 모델링 은 IDEAS 11.0 으로 수행했다. 유한요소법 분석시 PDMS 멤브레인은 linear, elastic, isotropic 한 물질로 가정하고 외부조건으로는 정해진 변형을 가하는 방식으로 수행했다. 세포 부착 멤브레인의 전체 영역을 사용하면 변형률값의 표준편차가 본 연구 에서 지정한 tolerance 수준인 0.3%보다 커지므로 표준편차가 가장 균일하게 유도되는 유효 영역 (uniform strain region: USR)을 선정하고 폭(width)와 길이(length) 값을 변화시켜 유한요소법을 이용한 분석을 수행했다. Fig. 3 과 같이 width 가 작아질수 록 일반적인 인장시편의 모양에 가까워져 사용영 역에 보다 균일한 strain 이 유도되는 것을 알 수 있으나 RNA 나 단백질의 추출 시에 최대한 많은 양의 샘플확보를 위하여 멤브레인의 치수를 각각 length=30mm, width =17mm 로 결정했다.

2.3 Cell culture

2.3.1 Mesenchymal stem cell culture

실험에 사용된 성체 줄기세포는 고려대 안산 병 워에서 환자의 동의를 얻어서 획득했다. 적출된 bone marrow 를 냉동 보관 후 각각 5ml 씩 나누어 담아 histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA)를 첨가한 후 400g/30min centrifugation 을 수행했다. Histopaque usage manual 에 따라서 MSC(Mesenchymal stem cell)층만 분리하여 튜브에 담은 후에 PBS 로 washing 을 3 회 시행했다. 분리된 MSC 는 culture medium (10% FBS, 1% antibiotics, Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium)에 넣어서 2-3 일 배양 후에 Liquid Nitrogen tank 에 냉동 보관 했다. 냉동 보관 시 FBS(Lonza Premium Fetal Bovine serum, 20%), MEBM(Lonza, stem cell essential culture medium, 70%), DMSO(SigmaAldrich, 10%) 섞은 배지에 적출된 MSC 를 섞어 -70°C에서 12



Fig. 3 (a) PDMS membrane model (b) The standard deviation of strain as a function of width

시간 얼린 후 골분화 실험에 사용되기 전까지 Liquid Nitrogen 탱크에 보관했다. 골분화 유도 배 양액 (Ostoegenic medium)의 성분 및 양은 DMEM with 10% FBS, 1% penicillin streptomycin, 1% Amphotericin B, Dexamethasone 100nM, Ascorbic acid 50uM, β-Glycerol phosphatase 10mM 로 만들었다.

2.3.2 RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real time PCR

기계적 인장 자극을 각각 4 일과 7 일간 진행 후 멤브레인의 사용 영역(USR) 만을 잘라낸 후 TRIZOL reagent (Invitrogen, USA)를 이용해 RNA 를 추출했다. RNA 추출 방법은 Trizol 매뉴얼을 따랐 고 추출된 RNA 는 nanodrop 을 통해서 정량측정 한 후에 Reverse transcription kit (Promega, A3500, USA)을 이용해서 cDNA 로 합성했다. 매뉴얼에 따 라 RNA template 을 72°에서 10 분간 denature 시킨 후에 추가 시약을 매뉴얼대로 넣어 전체 20ul 의 template 을 만든 후에 PCR 장비를 이용해 42°C 에서 45분, 95°C에서 5분, 4°C에서 10분간 합 성해 cDNA 를 제작했다. 골분화 마커(Osteogenic marker)로는 골분화 연구에 가장 많이 사용되고 있는 ALP(Alkaline phosphatase), Osterix(Transcription factor for osteoblast differentiation), Osteopontin(SPP1) 을 선정했다. 이중 ALP 는 Real time PCR 을 통해 서 정량비교를 수행했으며, Osterix, Osteopontin 은 PCR(Takara Extaq, Japan)을 통해서 골분화가 정상 적으로 수행이 되었는지 확인하는 marker 로 사용 했다. 각각의 primer sequence 는 table. 1 과 같다. Real time PCR 은 Lightcycler Tagman system (Roche molecular system, Swiss)을 사용했으며 ALP에 적합 한 universal probe(#21)와 primer 를 Roche 사의 probe 제작 프로그램을 이용해 선정했다. Reference gene 으로는 GAPDH 를 선정했으며 역시 GAPDH 에 적합한 universal probe(#60)와 primer 를 제작해 서 사용했다. 실험 프로토콜은 매뉴얼을 따랐으며 95°C, 10 분 1 회, amplification 45 회(95°C 10 초, 60°C 30 초), cooling 과정 40°C 30 초 1 회의 과 정으로 marker gene 을 증폭했다.

Table 1 PCR Primer Sequence

ALP	S: GGG CCT GAG ACC TTC CTG	
(Real time	AS. CAT GOT TGT CTA CAC TGT ATG TCT TG	
PCR primer)	AS. CAI GET IGT CIACAC IGT AIG ICT IG	
GADDH	S: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	
UAFDH	AS: GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	
Osteopontin	S: CCA AGT AAG TCC AAC GAA A	
(SPP1)	AS: GGT GAT GTC CTC GTC TGT	
Osterix	S: CAT TGC TTT CCA TTC TCC AGA AC	
	AS: ATT ACA AGA GAA ACC CTA TCA AC	

632

2.3.3 기계적 자극 조건

세포 부착 membrane 에 붙어 있는 cell 이 70-80% confluency 로 자란 후에 세포 부착 membrane 을 세포 인장 자극기의 멤브레인 고정부에 장착했 다. 멤브레인 고정부에 물리는 과정에서 세포 부 착 멤브레인에 생기는 구부러짐 현상을 방지하기 위해서 초기 변형률을 0.8%로 주었으며 세포가 초기 변형률에 적응할 수 있도록 4 시간 후부터 인장자극실험을 수행했다. 본 연구에서는 인장기 세 대를 동시에 구동해서 변형률의 변화에 따른 세포실험을 수행했다. 미리 수행된 실험을 통해서 30 분 자극 1 시간 휴식 조건에서 가장 골분화가 가장 활발한 것으로 나타나 일주일간 이 조건을 유지하며 실험을 수행했다. 변형률을 가하는 주기 는 1Hz 로 설정했고 각 시스템에 2%, 4%, 6%의 변 형률을 주어 실험을 수행했다. Cell harvest 는 4 일 과 7일에 수행했으며 4일에 fresh medium 으로 바 꿔주었다. Table. 2 에 정리 된 바와 같이 실험 그룹 은 control medium 에 기계적 인장 자극 (2, 4, 6%) 을 가한 군(MS-Group)과 osteogenic medium 에 기 계적 인장 자극(2, 4, 6%)을 가한 군(MSOM-Group) 으로 나뉘었으며 control 로 기계적 인장 자극 없 이 각각 osteogenic medium 과 control medium 만 가 한 군(OM, CON Group)을 설정했다.

3. Result

3.1 세포인장 자극기의 검증

세포 인장 자극기의 설계 목표는 세포 부착 멤 브레인의 유효 영역(USR)에 정확한 주기로 균일 한 변형률을 유도하는 것이다. 설계 조건을 만족 하기 위해 유한요소법을 통해 멤브레인의 형상을 결정했고, 세포 부착 멤브레인의 두께를 균일하게 할 수 있는 제작 시스템을 구축했다. 실제로 유효 영역에 균일한 변형률이 유도되는지를 확인하기 위해서 세포부착 멤브레인에 Fig. 4(a)과 같은 격자 점을 형성했다. 그리드는 세포 부착 멤브레인에 플라즈마 처리 후 잉크로 2x2(mm)단위의 격자점 을 찍었다. 격자점 형성은 따로 제작한 격자에 잉

Fable 2 Experim	nent group
-----------------	------------

Group name	Mechanical	Osteogenic
Group name	stretch condition	medium
2MS	2%, 1Hz	Х
2MSOM	2%, 1Hz	0
4MS	4%, 1Hz	Х
4MSOM	4%, 1Hz	0
6MS	6%, 1Hz	Х
6MSOM	6%, 1Hz	0
CON	Х	Х
OM	Х	0

크를 묻혀서 PDMS 멤브레인 위에 찍는 방식으로 수행했다. 이와 같은 그리드를 5 장의 멤브레인위 에 형성한 후 흑백 카메라 (plea2, pointgrey, 15fps, UK)를 이용해 실시간으로 인장 전 후 격자의 이 미지를 얻어 격자 중심점의 좌표를 계산했다. 변 형률을 가하기 전후의 격자 중심점들 간의 거리 변화를 비교함으로써 멤브레인의 변형률 값을 분 석한 후 5 장에 대해서 평균값을 구해서 사용했다.



Fig. 4 (a) Displacement field of the PDMS substrate under 5% strain condition. The different lengths of the field diagram indicate the different amount of accumulative displacement applied on the substrate. (b, c) Measured average strain and standard deviation on PDMS membrane at 3 and 10% strain

633

3.1.1 Uniform strain 유도

Fig. 4(a)는 USR(uniform strain region)의 표면에 유도 되는 displacement field 를 표시한 것이다. PDMS 멤브 레인의 대칭성을 고려하여 변형률의 검증은 사분면 만을 고려했다. 장비가 PDMS 멤브레인의 왼쪽을 고 정시키고 오른쪽 방향으로 잡아당기는 방식이기 때 문에 전체영역에서 인장 방향(x 축)의 누적변위가 발 생하게 되고 x 값이 클수록 변위량이 많아지게 된다. 또한 푸아송비에 따라서 외곽영역에서는 수직방향(v 축)의 압축 변형이 발생함을 알 수 있고 이는 중심 축 영역에서는 거의 발생하지 않는다는 것을 알 수 있다. 장비 검증을 위해서 3, 10%일 때 각각 멤브레 인위의 인장방향의 변형률을 측정했다 Fig. 4(b)는 y 축을 따라 2.4.6 mm line 에서 측정된 변형률의 평균 값과 인장 방향의 표준편차를 나타냈다. 사용영역의 표준편차의 값은 대부분 0.3% 내외의 값을 가졌고 이는 상용제품인 Flexercell® 의 0.25~0.3% 값과 비교 해볼 때 비슷하거나 더욱 좋은 변형률 분포를 보인 다. 따라서 본 연구에서 제작된 세포 인장기가 실제 세포 인장 실험에 사용되어도 충분한 정도의 균일한 변형률 값을 갖는 것을 확인 할 수 있다.

3.1.2 Input – Output Correlation

구동부에서 가하는 입력 변형률이 실제 세포 부 착 멤브레인의 표면에 정확하게 유도되는지 알아 보기 위해 각 인풋 변형률 값에 따른 아웃풋 변형 률을 Fig. 5 와 같이 측정했다. 시편의 형상 때문에 실제 시편에 유도되는 변형률 값은 입력한 값과는 차이가 있을 수밖에 없으며 이는 실험값으로 보정 을 해주어야 한다. 실제 세포 인장 자극기의 구동 시에는 실험값으로 구동부의 변형률 값을 보정해 줌으로써 목표하는 변형률 이 세포부착 멤브레인 에 유도되도록 했다.

3.2 골분화 정도의 상대적 정량화

본 실험에서는 변형률에 따른 골분화 정도를 알 아보기 위해서 총 3 회의 실험을 반복 수행했다. 우선 골분화가 제대로 진행되었는지 확인하기 위 해서 Osterix 와 Osteopontin 에 대해서 RT-PCR 을

Output strain(%) 14 12 10 8 ------6 al and -Motor drive strain real strain1 (by CCD) 4 real strain2 (by CCD) real strain3 (by CCD) 2 real strain4 (by CCD) W 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Input strain(%)

Fig. 5 Input-output strain calibration

수행했다. 일반적으로 골분화 유도 물질을 이용한 실험에서는 Osterix 나 Osteopontin 과 같은 물질들이 10 일 이상의 후반부에 발현되는 것으로 보고 된 반 면 Fig. 6(a)와 6(b)에 보이는 바와 같이 자극 7 일 만 에 기계적 자극이 골분화를 활발히 유도하고 있음을 알 수 있다.^(22,23) 각 실험마다 4 일과 7 일에 RNA 를 추출해 Real time PCR 을 수행했으며 osteogenic marker 인 ALP 의 발현량을 비교했다. 오차를 줄이기 위해 각 실험군마다 2 번씩 Real time PCR 분석을 수행해 평균값을 사용했다. Fig. 6(c, d)는 기계적 자극 없이 control medium 만 넣은 control group 의 값을 1로 해 서 다른 실험군들의 값을 각각 상대적인 배수로 표 현한 것이다. 우선 Fig. 6(c)와 같이 osteogenic medium 을 첨가하지 않을 경우 2%보다는 4,6%가 골분화가 촉진되는 경향을 보이나 유의미한 차이를 보이지는 않았다. 또한 Fig. 6(d)와 같이 osteogenic medium 을 첨가했을 경우에는 7 일째에 2%의 strain 이 4, 6% 보 다는 ALP 의 발현량이 유의미하게 높은 것을 확인 했다. 이는 osteogenic medium 를 첨가하는 경우 작은 변형률 쪽에서 골분화가 효율적으로 이루어진다는 것을 의미한다. 또한 OM group 이 밴드를 보이지 않 는 것은 Osteogenic medium 만으로는 7일 안에 골분 화가 일어나지 않음을 시사하며 기계적인 자극이 생 화학적 자극 보다 더 효율적으로 분화를 유도 할 수 있음을 보여준다.





634

4. Conclusion and Discussion

세포에 인장 자극을 가하는 장비의 개발 사례는 많이 찾아 볼 수 있으나 세포 인장 장비의 성능에 대한 검증 작업은 상대적으로 소홀 하여 실험 데 이터의 유효성을 판단하는데 어려움이 있었다. 본 연구에서는 세포 인장 장비를 통해 원하는 영역에 최대한 균일한 변형률을 갖게 하기 위해서 우선 균일한 두께를 갖는 PDMS 멖브레인 제작했고 세 포 부착 멤브레인의 형상을 유한요소법 분석을 통 해서 결정했다. 구동부에서 가해진 변형률이세포 부착 멤브레인의 표면에 똑같이 유도되는지를 확 인하기 위해 CCD camera 를 통해서 이미지를 획득 하고 이미지 프로세싱을 통해 실제 멤브레인의 표 면에 유도되는 변형률을 측정했다. 또한 측정된 데이터를 curve-fitting 해 가해진 변형률 만큼 멤브 레인의 표면에 정확한 변형이 유도될 수 있도록 소프트웨어를 개발했다. 이와 같은 보정을 통해서 표준편차 0.3% strain 이내의 균일한 변형률을 유도 할 수 있는 세포인장 자극장치를 개발했고 이는 고가의 상용장비보다 더욱 정밀한 변형률을 세포 에 유도할 수 있다. 또한 PDMS 멤브레인에 세포 를 부착시키기 위해서 플라즈마 처리를 수행한 후 fibronectin 코팅을 수행했다. 개발된 세포 인장 자 극 장치가 제대로 구동하는지를 확인하기 위해 성 체 줄기세포의 골분화를 유도하는 실험을 수행했 다. 기계적 인장자극의 변형률의 크기가 골분화에 어떠한 영향을 미치는 지를 시험하고 이를 통해서 osteogenic medium 만으로 분화를 유도 했을 때보 다 기계적인 자극으로 실험 했을 때 훨씬 빠른 시 기에 골분화가 유도 됨을 밝혔다. 또한 분화 마커 에 따라 각각 최대 효과를 내는 변형률의 크기가 다름을 알게 되었다. 또한 인장 자극과 osteogenic medium 를 동시에 가했을 때 높은 인장 자극 보다 는 낮은 인장 변형률에서 골분화가 효율적으로 일 어남을 실험적으로 밝혔는데 이는 실제 뼈에 걸리 는 변형률이 0.3% 이하로 낮은 수치이므로 생리 적으로 이와 같은 실험결과가 타당하다고 생각된 다.⁽²¹⁾ 조골세포를 대상으로 실험한 Koike 의 경우 에도 저강도의 자극이 골형성에 효율적이라는 사 실이 보고 된 바 있다.⁽¹¹⁾ 또한 Fig. 6 (a, b) 에서 상대적으로 MS 샘플들이 MSOM 샘플들 보다 더 강한 발현을 보이는 것은 두 가지로 해석 될 수 있는데, 첫째 Lee et al. 이 보고했던 바와 달리 기 계적 자극만으로 골분화가 일어난다는 점과 마커 의 종류에 따라 각각 발현이 가장 효율적으로 일 어나는 변형률이 다르다는 점이다. (10) 둘째는 이렇 기계적 자극으로 유도 되었던 게 분화가 osteogenic medium 의 첨가로 인해 antagonistic 현상 을 보이는 것이다. 이는 기계적인 자극을 수용하 고 전달하는 신호체계와 생화학적 자극을 수용하

고 전달하는 신호체계가 down stream 에서 상충 효 과를 일으키거나 혹은 생화학적 자극에 사용된 물 질들 중 일부 혹은 전부가 기계적 자극 수용체의 활성화를 저지 시킨다는 것을 암시한다. 따라서 이에 대한 체계적인 분석이 시도되어야 하며 이 결과는 성체줄기세포의 골분화 메커니즘 이해에 중요한 기여를 할 것으로 기대 된다.

생체 외에서 기계적 자극만으로 분화를 유도하 는 경우에는 본 실험에서 4%의 기계적 자극이 가 장 좋은 결과를 보였다. 이런 실험 결과는 골분화 에 가장 효과적인 최적의 기계적 자극값이 존재할 것이라는 것을 예측할 수 있게 한다. 그러나 기계 적 자극 조건은 성체 줄기세포의 상태나 실험 조 건, 장비에 따라서 세포에 전달되는 자극의 크기 가 달라질 것이기 때문에 어떠한 값이 최적의 값 이라고 단정적으로 말하기는 어렵다. 이 과정에서 는 장비에서 PDMS 멤브레인으로, 멤브레인에서 세포외벽으로 힘이 전달되고 세포 내부의 세포내 골격구조 (cytoskeleron)을 거쳐 핵까지 전달되는 힘들의 전달과정을 모델링하는 과정이 필요하다. 또한 이 과정에 관련하는 여러 신호전달체계의 과 정에 대한 이해 또한 필요할 것으로 생각이 된다. 추후에 이러한 모든 과정을 고려한 최적의 기계적 자극에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

후 기

이 논문은 2009 년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연 구임(No. R01-2007-000-20959-0, "물리적 생화학적 환경변화에 따른 골세포와 조직의 정량적 변화 연 구 및 뼈 재형성 모델의 개발").

참고문헌

- (1) Arnold, I. C., 2005, "Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics," *Tissue Eng.*, Vol.11, No. 7/8, pp. 1198~1211.
- (2) Ignatius, A., Blessing, H., Liedert, A., Schmidt, C., Neidlinger-Wilke, C., Kaspar, D., Friemert B. and Claes, L., 2005, "Tissue Engineering of Bone: Effects of Mechanical Strain on Osteoblastic Cells in Type I Collagen Matrices," *Biomaterials*, Vol. 26, No. 3, pp.311~318.
- (3) Xiao, L., Marie, O., Wei, H. and Morris, K., 2005, "Neural Cell Differentiation In Vitro from Adult Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells Dev*, Vol. 14, No. 1, pp.65~69.
- (4) Mauney, J. R., Sjostorm, S., Blumberg, J., Horan, R., O'Leary, J. P., Vunjak-Novakovic. G., Volloch, V. and Kaplan, D. L., 2004, "Mechanical Stimulation Promotes Osteogenic Differentiation of Human Bone

Marrow Stromal Cells on 3-D Partially Demineralized Bone Scaffolds In Vitro," *Calcif Tissue Int*, Vol.74, No. 5, pp.458~468.

- (5) Michelle, R., Kreke, M.E. and Aaron, S. G, 2004, "Hydrodynamic Shear Stimulates Osteocalcin Expression But Not Proliferation of Bone Marrow Stromal Cells," *Tissue Eng*, Vol. 10, No. 5/6, pp. 780~788.
- (6) Heng, B. C., Cao, T. and Lee, E. H., 2004, "Directing Stem Cell Differentiation into the Chondrogenic Lineage In Vitro," *Stem Cells*, Vol. 22, pp. 1152~1167.
- (7) Byers, R.J., Brown, J., Brandwood, C., Wood, P., Staley, W., Hainey, L., Freemont, A.J. and Hoyland, J.A., 1999, "Osteoblastic Differentiation and mRNA Analysis of STRO-1-Positive Human Bone Marrow Stromal Cells Using Primary in Vitro Culture and Poly (A) PCR.," *J Pathol, Vol.* 187, No. 3, pp. 374~381.
- (8) Gruber, R., Graninger, W., Bobacz, K., Watzek, G., Erlacher, L, 2003, "BMP-6-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Cell Lines is not Modulated by Sex Steroids and Resveratrol," *Cytokine*, Vol. 23, No. 4, pp. 133~137.
- (9) Jagodzinski, M., Drescher, M., Zeichen, J., Hankemeier, S., Krettek, C., Bosch, U. and Griensven, M., 2004, "Effects Of Cyclic Longitudinal Mechanical Strain and Dexamethason on Osteogenic Differentiation of Human Bone," *Eur Cell Mater*, Vol. 7, pp. 35~41.
- (10) Lee, E. K., Lee, J. S., Park, H. S., Kim, C. H, Gin, Y. J. and Son Y. S., 2005, "Cyclic Stretch Stimulates Cell Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells but Do Not Induce Their Apoptosis and Differentiation," *Tissue Eng Reg* Med, Vol. 2, No. 1, pp. 29~33.
- (11) Koike, M., Shimokawa, H., Keiichi K., Ohya, Z. K. and Kunimichi S., 2005, "Effects of Mechanical Strain on Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Stromal Cell Line ST2," *J Bone Miner Metab*, Vol. 23, N0. 3, pp. 219~225.
- (12) Robling, A. G., Castillo A. B., and Turner C. H., 2006, "Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling," *Annu Rev Biomed Eng*, Vol.8, pp.455~498.
- (13) Altman, G., Horan, R., Martin, I., Farhadi, J., Srark, P., Volloch, V., Vunjak-novakovic, G., Richmond, J., Kaplan, D., L., 2002, "Cell Differentiation by Mechanical Stress," *FASEB*, Vol. 16, pp. 270~272.
- (14) Leung, D.Y., Glagov, S. and Mathews, M.B., 1977,

"A New in vitro System for Studying Cell Response to Mechanical Stimulation. Different Effects of Cyclic Stretching and Agitation on Smooth Muscle Cell Biosynthesis," *Exp Cell Res,* Vol. 109, No. 2, pp. 285~298.

- (15) Matsumoto, T., Delafontaine, P., Schnetzer, K.J., Tong, B.C., Nerem, R.M., 1996, "Effect of Uniaxial, Cyclic Stretch on the Morphology of Monocytes/ Macrophages in Culture." *J Biomech Eng*, Vol. 118, No. 3, pp.420~422.
- (16) Ives, C. L., Skin, S. G. and McIntire, L. V., 1986, "Mechanical Effects on Endothelial Cell Morphology: in vitro Assessment." *In Vitro Cell Dev Biol*, Vol. 22, No. 9, pp. 500~507.
- (17) Berry, C. C, Shelton, J. C., Bader, D.L. and Lee, D.A., 2003, "Influence of External Uniaxial Cyclic Strain on Oriented Fibroblast-Seeded Collagen Gels.," *Tissue Eng*, Vol. 9, No. 4, pp. 613~624.
- (18) Clark, C. B., Burkholder, T. J. and Frangos, J. A., 2001, "Uniaxial Strain System to Investigate Strain Rate Regulation in Vitro.," *Rev Sci Instr*, Vol. ;72, No. 5, pp. 2415~2422.
- (19) Matheson, L. A., Fairbank N. J., Maksym, G. N., J. Paul, Santerre and Labow R. S., 2006, "Characterization of the FlexcellTM UniflexTM Cyclic Strain Culture System with U937 Macrophage-like Cells," *Biomatrial*, Vol. 27, No. 2, pp. 226~233.
- (20) Armbruster, C., Schneider, M., Gamerdinger, K., Schumann, S., Cuevas, M., Koch, E., Guttmann, J., 2008, "Fabrication of thin and Flexible PDMS Membranes for Biomechanical Test Applications," *IFMBE Proceedings*, Vol. 22, pp. 2007~2010.
- (21) Burr, D.B., Milgrom, C., Fyhrie, D., Forwood, M., Nyska, M., Finestone, A., Hoshaw, S., Saiag, E., Simkin, A., 1996, "In Vivo Measurement of Human Tibial Strains During Vigorous Activity," *Bone*, Vol. 18, No. 5, pp.405~410.
- (22) Frank, O., Heim, M., Jakob, M., Barbero, A., Schafer, D., Bendik, I., Dick W., Heberer, M, Martin, I., 2002, "Real-Time Quantitative RT-PCR Analysis of Human Bone Marrow Stromal Cells During Osteogenic Differentiation *in Vitro*," *J Cell Biochem.*, Vol. 85, pp. 737~746.
- (23) Bruder, S. P., Horowitz, M. C., Mosca, J. D., Hayneworth, S. E., 1997, "Monoclonal Antibodies Reactive with Human Osteogenic Cell Surface Antigens," *Bone*, Vol. 21, No. 3, pp.225~235.