

삼인산 칼슘 혼합 하이드로젤 지지체와 중간엽줄기세포로 구성된 복합화합물의 신생골조직 형성능

이다름 • 강용구^{*✉}

가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학연구소, *정형외과

The Role of Beta-Tricalcium Phosphate-Hydrogel Scaffold and Mesenchymal Stem Cells on Neogenic Bone Formation

Da Reum Lee, B.S. and Yong Koo Kang, M.D.^{*✉}

Research Institute of Medical Science and *Department of Orthopedic Surgery, The Catholic University of Korea, St. Vincent Hospital, Suwon, Korea

Purpose: The purpose of this paper was to determine the ability of a mixture consisting of mesenchymal stem cells, beta-tricalcium phosphate β -TCP), and hydrogel, to support cells and form new tissue.

Materials and Methods: A composite was produced by adding β -TCP to hydrogel, and mesenchymal stem cells were cultivated in the composite. Then, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to measure the level of gene expression for the new bone formation in the cells. Moreover, a composite in which the mesenchymal stem cells were added was injected into the subcutaneous fat of sprague-dawley rats. After four weeks, H&E, Masson trichrome, silver nitrate staining, and osterix immunohistochemical staining were conducted by taking the tissue to evaluate whether the composite supported mesenchymal stem cells and formed new tissue.

Results: By using RT-PCR, we found that the level of gene expression became significantly higher in 3-dimensional gel culture with RUNX2 by 1.26 times, with osteopontin by 1.23 times, transforming growth factor- β by 2.12 times, osterix by 1.07 times, type I collagen by 1.3 times, and fibronectin by 1.3 times. In the animal experiment in which a composite was transplanted into the subcutaneous fat, newly formed tissue was observed. Also, it was found that the composite prevented mesenchymal stem cells from leaving and formed new tissue. Osteogenic differentiation cells in the tissue was observed through osterix immunostaining.

Conclusion: It was identified that the composite prevented mesenchymal stem cells dispersal and contributed to the formation of neogenic tissue. Therefore we conclude that the composite plays a role of a scaffold to support the implanted cells and form neogenic tissue more effectively.

Key words: osteogenesis, mesenchymal stem cells, hydrogel, tricalcium phosphate

서론

질환이나 외상으로 인한 골결손의 치료를 위해 자가골, 동종골 혹은 합성골 이식이 이용되고 있다.¹⁻⁵⁾ 그러나 현재 이루어지는 자가골 이식은 골 형성을 효과적으로 유도하지만 공급의 한계가 있고²⁾ 동종골 이식은 공급의 제한과 함께 감염의 위험성이 있어³⁾ 합성골 이식을 고려하게 된다. 그러나 합성골 이식은 골 형성 능력이 제한적이기 때문에 합성골의 골 형성 능력을 높이기 위한 조직공학적 연구가 활발히 이루어지고 있다.⁵⁾

Received May 20, 2015 Revised September 25, 2015 Accepted August 9, 2017

✉Correspondence to: Yong Koo Kang, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, St. Vincent Hospital, 93 Jungbu-daero, Paldal-gu, Suwon 16247, Korea

TEL: +82-31-249-7186 FAX: +82-31-254-7186 E-mail: ykang@cmcnu.or.kr

Da Reum Lee's Current affiliation: independent researcher.

골결손 치료를 위한 세포치료제는 중간엽줄기세포(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells)가 흔히 이용되는데,⁶⁾ 이 세포는 체내 어디에나 존재하며 골, 연골, 지방 등 다양한 세포로 분화할 수 있어 조직치료를 다양한 방법으로 사용되고 있다. 중간엽줄기세포는 주로 골수에서 채취하는데 채취 시 환자에게 통증을 유발하며 그 채취량이 골수세포의 0.001%~0.01%밖에 되지 않아 사용에 어려움이 있다.⁷⁾ 이에 쉽게 접근이 가능하고 많은 양의 채취가 가능한 지방조직을 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다.^{6,8,9)} 지방조직도 골수와 같은 중간엽조직에서 기원하며 중간엽줄기세포가 존재하는 것으로 밝혀졌다. 중간엽줄기세포는 직접적으로 골세포로의 분화가 가능하며, 다양한 사이토카인을 분비하여 다른 세포들에게도 영향을 주는 것으로 알려져 신생조직 형성을 통하여 조직재생에 많이 이용된다.¹⁰⁾ 그러나 중간엽줄기세포를 단독으로 이식할 경우 세포가 생착이 일어나기 이전에 이식 부위에서 이탈되는 단점이 지적되고 있다.

이 때문에 골결손을 치료하는 과정에서 이식부위에 중간엽줄기세포를 효과적으로 전달하는 방법에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 최근 연구되고 있는 중간엽줄기세포의 지지체로는 collagen, beta-tricalcium phosphate (β -TCP), hydroxyapatite, polylactic acid, polyglycolic acid, hydrogel 등 여러 복합화합물이 있다.^{11,12)} 그 중에서도 hydrogel을 이용한 세포 전달에 대해 연구가 활발하게 진행되고 있는데, 이는 hydrogel이 3차원(3-diminsional, 3D) 고분자 네트워크를 가지고 있어 세포 점착성이 높으며, 조직 재생을 극대화시켜 줄 수 있는 고분자 성장인자 혼합이 용이하기 때문이다. 또한 hydrogel은 침습적인 수술 과정 없이 체내에 주기적으로 주사하여 이식할 수 있다는 장점이 있다.^{8,13,14)} 그러나 hydrogel 또한 체내에서 쉽게 분해되고 기계적 강도가 약하기 때문에 형태를 유지하며 체내에서 일정기간 고정되어 있기 힘들다는 단점이 있다. 이 점을 보완하기 위해 β -TCP, collagen, fibrin, chitosan, gelatin 등을 사용하여 강도를 높여주려는 연구가 진행되고 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 그 중 β -TCP는 실제 골과 유사한 화학적인 성분으로 구성되어 있으며, 이식 후 생분해 과정을 거치며 Ca와 P를 방출하게 된다.^{19,20)} 이렇게 방출된 이온들은 중간엽줄기세포가 골세포로 성장하기 위한 미세환경 조성에 도움이 되는 것으로 알려져 있다.^{8,21)}

본 연구는 hydrogel, β -TCP, 지방조직에서 유래된 중간엽줄기세포를 섞어 주사형 복합화합물을 만들고, 이를 흰쥐(sprague-dawley rat)의 피하지방조직에 주사하여, 중간엽세포의 지지체로 역할과 신생조직을 형성하는 능력이 향상되는지를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 연구대상

근골격계가 성숙하고 몸무게가 평균 80 g (80 ± 20 g)인 4주령의 수컷 흰쥐(Koatech, Seoul, Korea) 20마리를 실험동물로 사용하여, 실험 1주일 전부터 명주기 12시간, 암주기 12시간 및 온·습도가 유지되는 조건하에서 사육하였다. 주사형 복합화합물을 이식 후에 4주간 사육하고 신생조직 형성을 확인하기 위해 흰쥐를 희생하였다. 본 연구는 동물실험윤리위원회의 사전심사를 받고 연구관리규정을 준수하였다(승인번호 가의빈 동물 IRB 14-01).

2. 지방유래 중간엽줄기세포의 분리배양 및 분화능

4주령의 수컷 흰쥐를 사용하여 피하지방조직(subcutaneous adipose tissue)을 채취하였다. 채취한 지방조직을 2% bovine serum albumin (Gibco [Thermo Fisher Scientific], Waltham, MA, USA)을 넣은 hank's balanced salt solution (Gibco)으로 세척하여 작은 조각으로 분쇄하였다. 분쇄시킨 조직을 0.075% collagenase type II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 37°C에서 30분 처리한 다음, 10% fetal bovine serum (FBS), 0.2% fungizone, 1% penicillin streptomycin (Gibco)을 함유한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco)으로 효소반응을 정지시키고, 100 μ m 나일론 여과지에 통과시켜 불필요한 조직을 제거하였다. 200 \times g에서 10분 동안 원심분리하여 상층에 부유된 지질과 지방세포층을 제거한 다음 하부에 모아진 세포를 RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)에 10분간 처리하고 여과 및 원심분리하여 stromal vascular fraction을 모았다. 분리된 세포는 10% heat inactivated FBS가 첨가된 DMEM 배양액에서 재부유하여 배양하였다. 세포 배양은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS가 함유된 DMEM으로 배양하였다. 분리 배양한 세포의 골세포 분화능 관찰을 위하여 12 well plate에 1×10^5 cell/ml를 접종하고 DMEM에 100 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerol-phosphate와 50 μ M ascorbate-2-phosphate를 첨가한 골세포 분화 유도 배양액에서 14일간 배양하였다. 14일 후 0.1% Alizarin Red S 용액(pH 4.2)으로 염색한 후 석회화 양상을 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용한 줄기세포 확인

배양된 줄기세포를 배양액에서 제거 후 phosphate buffer saline (PBS)로 2회 세척 후 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid를 사용해 세포를 떼어내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 세포는 각 약 1×10^6 씩 준비하였다. 중간엽줄기세포의 표지인자로 알려져 있는 표면항원 CD44H-fluorescein isothiocyanate (FITC; BD Bioscience, San Jose, CA, USA), CD90.1-peridinin chlorophyll protein (PerCP; BD Bioscience), CD106-phycoerythrin (PE; BD Bioscience) 및 백혈구(leukocyte)나 조혈세포(hematopoi-

etic cell)의 표면항원인 CD45-allophycocyanin-cyanine7 (APC-Cy7; BD Bioscience)의 형광물질이 부착된 항체를 처리 후 암실에서 30분간 반응시켰다. 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 PBS 500 μ l를 넣고 fluorescence activated cell sorter (FACS) tube에 옮겨 flow cytometer (Navios [Beckman Coulter], Brea, CA, USA)로 발현여부를 분석하였다.

4. 3차원 배양 중간엽줄기세포의 유전자 발현 양상

상품화되어 있는 calcium gluconate hydrogel (Alfa Aesar, Lancashire, UK)에 β -TCP (Sigma-Aldrich) 0.1%, 1×10^6 중간엽줄기세포를 첨가하여 주사형 복합화합물을 제조하였다. 12 well plate에 중간엽줄기세포를 함유한 주사형 복합화합물을 1 ml씩 분주하고 그 위에 배양액을 2 ml 첨가하여 3일간 배양하였다(n=5). 대조군은 12 well plate에 중간엽줄기세포 1×10^5 cell/ml를 접종하여 실험군과 동일한 조건하에서 배양하였다(n=5). 배양된 세포는 3일

째 모두 수확하였으며 runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin, transforming growth factor-beta (TGF- β), osterix, type I collagen, fibronectin의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하였다(Table 1). 채취한 세포는 RNA 추출 키트(QIAGEN, Limburg, Netherlands)를 이용하여 RNA를 분리한 후 RT master premix (Elpis, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 합성한 cDNA 1 μ g, 0.2 Mm의 각 primer와 pre-mixture (Promega, Madison, WI, USA)를 혼합하여 PCR system에서 시행하였다. 대조유전자로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase를 사용하였다. PCR 생성물은 2% 아가로스 겔에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 유전자 발현량을 Quantity One 프로그램(Bio Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량 분석하였다.

Table 1. List of Genes and the Primer Sequences

Gene	Amplicon (bp)	Primer sequence		Temperature ($^{\circ}$ C)
		Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
RUNX2	114	CACAAGTGCGGTGCAAACCTT	AGCACTCACTGACTCGGTTG	53
Osteopontin	332	TCCTGGCTGAATTCTGAGGG	CTCTCTGCATGGTCTCCGTC	54
TGF- β	482	AGGAGACGGAATACAGGGCT	CCACGTAGTAGACGATGGGC	54
Osterix	289	TTACCCGCTCTGACTTTGCC	AATGGGCTTCTTCTCAGCC	57
Type I Collagen	380	CCCAGCGGTGGTTATGACTT	GGGTTTGGGCTGATGTACCA	57
Fibronectin	205	TGACTCGCTTTGACTTCACC	TCTCCTTCCTCGCTCAGTTC	57
GAPDH	311	ACGGGAAACCCATCACCATC	CCCTTCCACGATGCCAAAGT	58

RUNX2, runt-related transcription factor 2; TGF- β , transforming growth factor-beta; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

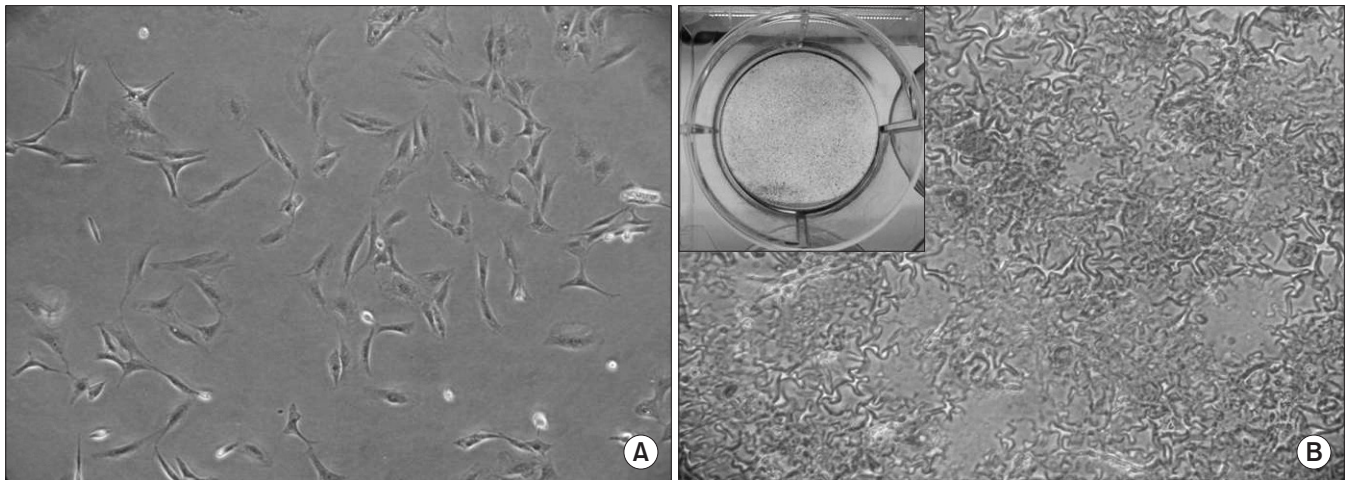


Figure 1. (A) Adipose derived stem cell (ADSC) harvested from adipose tissue after 48 hours of incubation in proliferative medium ($\times 100$). (B) ADSC cultured under osteogenic differentiation medium for 2 weeks were stained positively for Alizarin Red S staining, showing mineralization ($\times 100$).

5. 흰쥐 피하의 복합화합물 이식 후 신생조직 형성

3D 배양에서 사용한 동일한 방법으로 주사형 복합화합물을 제조하여, 실험군에는 1×10^6 cells/500 μ l/마리가 되도록 주사하였다. 대조군에는 동일한 양의 세포를 PBS에 녹여 주사하였다. 실험 흰쥐의 전신 마취는 호흡마취기에 isoflurane와 NO_2 를 혼합한 gas를 이용하여 유도하였다. 마취 후 수술부위의 제모를 시행하고 10% bethadine 용액으로 수술부위를 소독했다. 제조된 복합화합물을 18 G 주사기에 넣고 대퇴부 후방의 피하에 만들어 놓은 복합화합물을 주사하였다. 이식 4주에 실험동물을 희생하여 조직을 채취하였다. 채취한 조직을 육안으로 염증소견, 합병증 및 특이사항 유무를 관찰하였다. 복합화합물을 주사한 부위의 조직을 채취하여 고정, 침투, 파라핀 포매 처리를 한 후 표본을 5 μ m 두께로 박절하였다. 조직염색으로는 조직의 형태와 구조를 관찰하기 위한 H&E 염색, 신생조직의 세포 지지를 확인하기 위해 Masson trichrome 염색, 칼슘 침착을 확인하기 위해서는 silver nitrate stain

을 하였다. 면역조직화학염색으로는 이식한 중간엽줄기세포의 골세포 분화를 확인하기 위해 골세포 분화 maker인 osterix를 염색하였다. 염색한 조직 슬라이드는 광학현미경(Olympus IX83; Olympus Optical Co, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

6. 통계분석

본 실험에서는 유세포 분석기를 이용한 줄기세포 동정 및 3D 배양 중간엽줄기세포의 유전자 발현 양상을 통계 분석하였고, Student t-test를 사용하여 p값 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 정의하였다. IBM SPSS ver. 25 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 분석하였다.

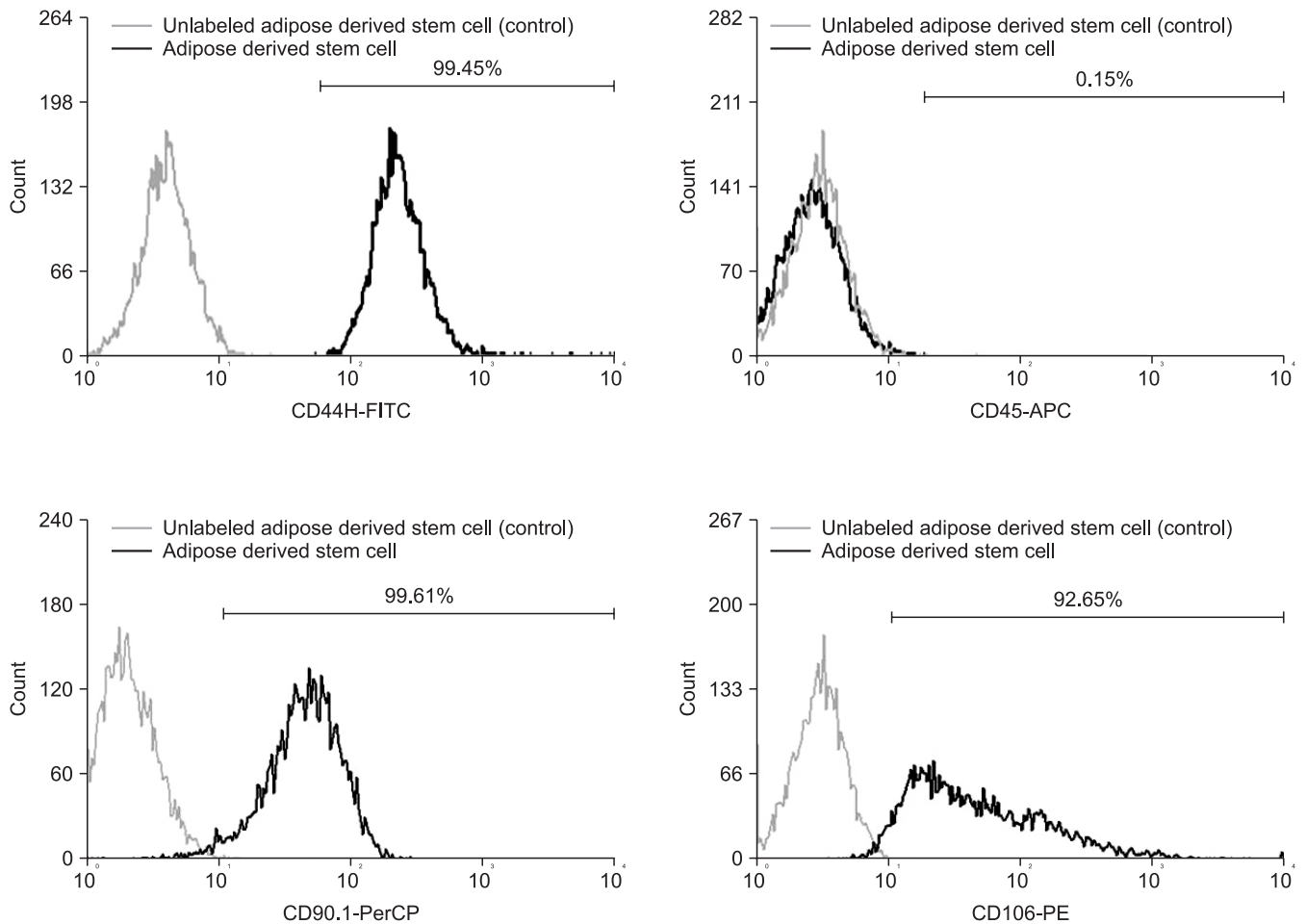


Figure 2. Surface marker expression of adipose derived stem cell (ADSC) after one passage. ADSC cells have positive expression of ADSC markers, including CD44H, CD90.1, and CD106. The cells are free of hematopoietic contamination, as shown by the lack of expression of CD45. Unlabeled cell (negative) control is included for comparison. FITC, fluorescein isothiocyanate; APC, allophycocyanin; PerCP, peridinin chlorophyll protein; PE, phycoerythrin.

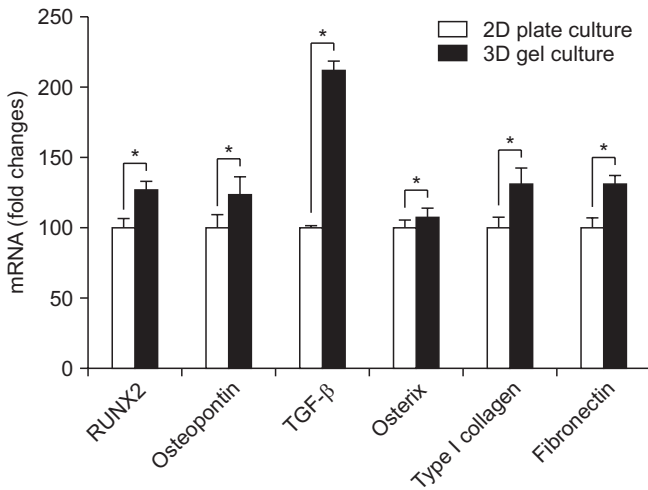


Figure 3. RNA expression relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin, transforming growth factor-beta (TGF-β), osterix, type I collagen and fibronectin in the 2-dimensional (2D) plate culture and 3D gel culture at the end of the 3 days. The data are expressed as the mean with standard deviation (n=10) (*p < 0.05).

결 과

1. 지방유래 중간엽줄기세포의 분리배양 및 분화능

지방조직에서 얻어진 중간엽줄기세포를 배양한 결과 이들 세포들은 생체 외에서 쉽게 배양되었고 전형적인 방추형의 섬유모세포와 같은 형태를 나타내었다(Fig. 1A). 배양된 중간엽줄기세포를 골세포로 분화유도 배양 후 Alizarin Red S로 염색하였다. 염색한 세포 내에서 석회화가 일어난 부위는 붉은색으로 염색되었고(Fig. 1B), 이를 통하여 배양된 중간엽줄기세포가 조골세포로 분화되었음을 확인할 수 있었다.

2. 유세포 분석기를 이용한 지방유래 중간엽줄기세포 확인

지방유래 중간엽줄기세포의 표면 항원 CD44H는 99.45%, CD90.1은 99.61%, CD106은 92.65%로 양성을 나타내었으며 CD45는 99.85%로 음성, 0.15%로 양성을 나타내는 것을 확인했다. 지방유래 중간엽줄기세포에 대한 FACS 분석 결과 CD44H, CD90.1, CD106은 양성, CD45는 음성으로 확인되어 지방유래 중간엽줄기세포의 특성을 보였다(Fig. 2).

3. 3차원 배양 중간엽줄기세포의 유전자 발현 양상

3D gel culture군과 대조군인 2D plate culture의 세포에서 골 형성 및 세포 지지와 관련된 유전자 발현 양상을 분석하였다. 2D plate에서 배양한 것보다 3D gel culture군이 RUNX2 1.26배, osteopontin 1.23배, TGF-β 2.12배, osterix 1.07배, type I collagen 1.3배, fibronectin 1.3배로 높았다. Osterix를 제외한 모든 유전자 발현도

가 통계적으로 유의하게 높았다(p < 0.05) (Fig. 3).

4. 흰쥐 피하의 복합화합물 이식 후 신생조직 형성

복합화합물을 이식한 부위의 조직을 채취하여 육안적으로 관찰하였다(Fig. 4A). 복합화합물을 이식한 실험군에서는 이식 부위에서 신생조직이 관찰되었다(Fig. 4B). 육안으로 확인된 조직을 채취하여 조직학적 관찰을 위해 조직학적 염색을 시행하였다. 그러나 PBS에 세포를 혼합하여 주사한 대조군에서는 신생조직을 관찰할 수 없었다(Fig. 4C). H&E 염색 결과 대조군에서는 지방조직이 관찰되었다(Fig. 4D-a). 실험군에서는 동물 간의 개체 차이는 있었지만 이식한 부위에 전체적으로 증식된 세포가 존재하고 있었으며 신생조직이 활발하게 형성되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 β-TCP 과립이 조직 내에서 다 생분해되지 않고 남아있음을 확인할 수 있었으며 β-TCP를 중심으로 하여 그 주변부로 세포들이 부착하여 신생조직이 형성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4D-b). Masson trichrome 염색 결과 조직 내의 아교섬유들이 많이 형성되어 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D-c). Silver nitrate 염색 결과 β-TCP가 조직 내 남아 있음을 확인하였다(Fig. 4D-d). 골세포 분화 마커인 osterix를 면역 염색한 결과 신생조직 내에 일부 세포에서 osterix가 염색된 것을 관찰할 수 있어 이식한 중간엽줄기세포가 골세포로 분화하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4D-e).

고 찰

최초의 골재생을 위한 세포치료제 이식은 1978년에 이루어졌는데 이들은 장관골 불유합 치료를 위해 이종골에 골수흡인물을 섞어 이식하여 치료하였다.²²⁾ 이를 통하여 골재생을 위한 세포치료제에 대한 관심이 높아졌다. 또한 골재생 치료에 적용할 수 있는 세포원으로 중간엽줄기세포에 대한 연구가 발표되면서 줄기세포를 이용한 골 재생 공학 연구가 가속화되었다.²³⁾ 이에 따라 중간엽줄기세포의 이식을 위한 다양한 지지체에 대한 연구가 발표되고 있다. 본 연구에서는 골재생을 위해 β-TCP 혼합 hydrogel과 중간엽줄기세포로 구성된 복합화합물의 신생조직 형성능을 관찰하고자 하였다.

배양된 지방유래 중간엽줄기세포의 특성을 확인하기 위하여 골세포 분화능 및 면역표지자를 관찰하였다. Bunnell 등²⁴⁾은 중간엽줄기세포는 특정 배양조건하에서 다형성능을 가진다고 보고하였고, Hass 등²⁵⁾은 골수, 지방, 혈액에서 분리한 줄기세포의 면역표지자를 분류하였다. 이에 따라 본 실험에서도 중간엽줄기세포의 골세포로의 분화능을 관찰하였으며, 중간엽줄기세포의 공통 면역표지자인 CD44H(+), CD90.1(+), CD45(-)와 지방유래중간엽줄기세포 표지자인 CD106(+),의 발현양상을 관찰함으로써 지방유래중간엽줄기세포의 특성을 확인하였다.

3D 세포배양은 세포-세포, 세포-기질 간의 상호교류를 원활하

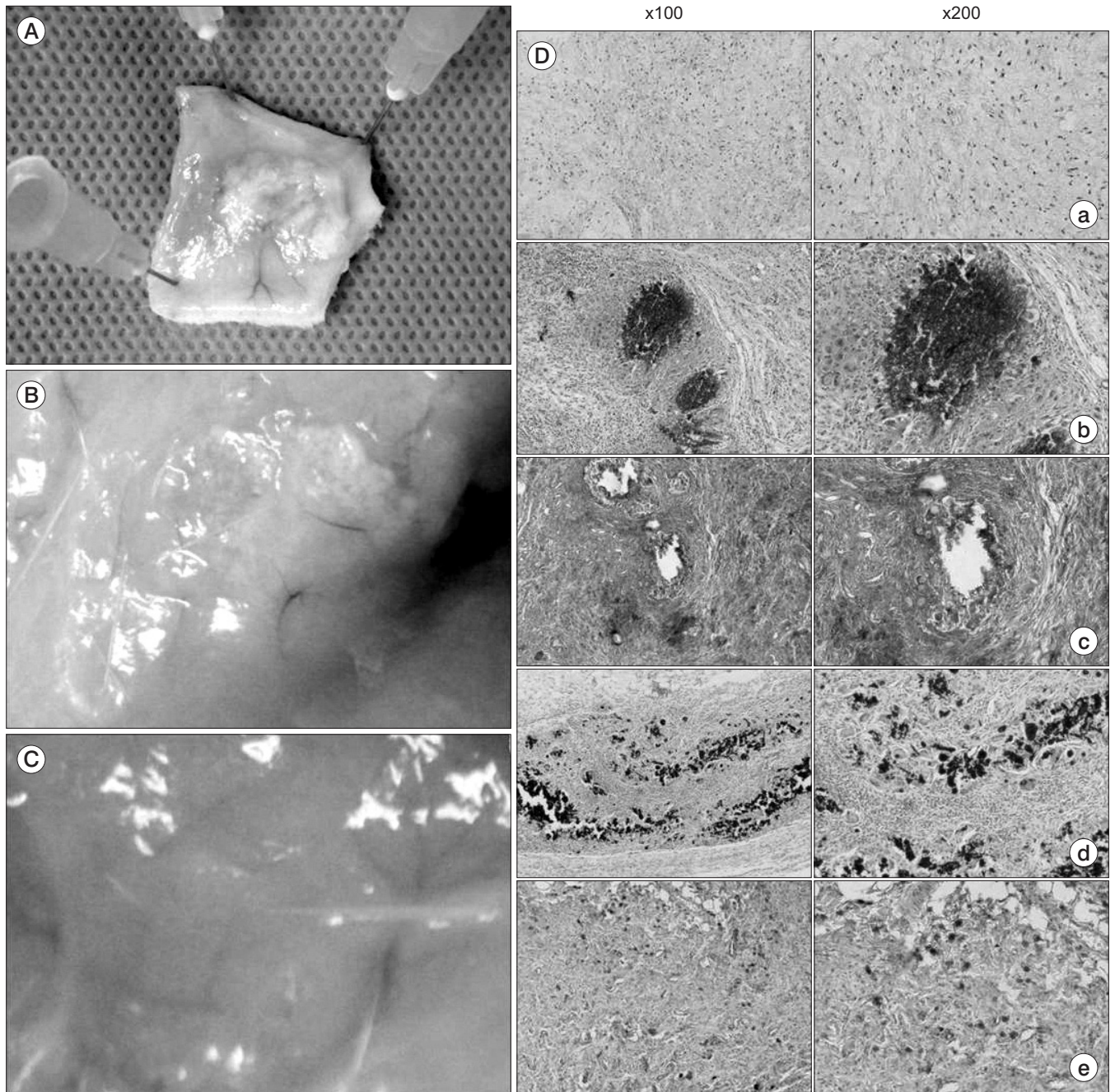


Figure 4. (A) Macroscopic view of the resected specimen. Subcutaneous injection of the composite from a rat after 4 weeks. (B) Subcutaneous injection of composite from a rat after 4 weeks. (C) Subcutaneous injection of phosphate buffer saline (PBS)+adipose derived stem cell (ADSC) from a rat after 4 weeks. (D) Histological observations: (a) H&E stain of control (PBS+ADSC), (b) H&E stain of composite, (c) Masson trichrome stain of composite and (d) Silver nitrate stain of composite, and (e) Osterix immunohistochemical staining of the composite.

게 하며 세포증식 및 유전자 발현양상까지 변화시킨다고 보고하였으며, Han 등²⁶⁾은 중간엽줄기세포의 일반 2D 배양과 3D 배양법을 비교하였을 때 중간엽줄기세포의 Stemness 유전자로 알려진 rex1, sox1, oct4, nanog와 골 형성 유전자 type I collagen, bone sialoprotein, alkaline phosphatase, osteocalcin의 발현이 3D 배양시 더 높아졌다고 보고했다. 또한 Cheng 등²⁷⁾은 2D 배양 시 β -

TCP powder를 처리하는 것만으로도 중간엽줄기세포의 골형성능이 높아진다고 보고하였다. Amosi 등²⁸⁾은 연구에서는 β -TCP, hydrogel, β -TCP+hydrogel에 각각 조골세포를 처리한 군을 비교하였고 그 결과 β -TCP를 첨가한 3D hydrogel을 이용한 군에서의 골 세포증식, alkaline phosphatase (ALP) 활성, 골조직 형성에 다른 군에 비해 높은 활성을 보여 이 둘의 조합이 세포의 골 형

성을 촉진시킨다고 보고하였다. 그러나 지지체에 따른 조골세포의 유전자 발현양상을 비교하지는 않았다. 본 연구에서는 제조한 복합화합물에 중간엽줄기세포를 배양하고 골 형성 시 발현된다고 알려진 유전자 RUNX2, osteopontin, TGF- β , osterix, type I collagen, fibronectin을 정량 분석하였으며 2D 배양과 비교했을 때 각각의 유전자 발현이 유의한 차이를 보이며 높아진 것을 관찰함으로써 복합화합물이 중간엽줄기세포의 골세포 분화를 돕는 것으로 생각한다.

복합화합물로 중간엽줄기세포가 이식 부위에서 이탈하지 않고 신생조직을 형성할 수 있는지 관찰하기 위해 흰쥐에 복합화합물 이식 4주 뒤에 대조군과 비교 관찰하였다. Rustad 등²⁹⁾은 지지체가 없는 중간엽세포만 이식한 군에서 줄기세포가 신생조직을 형성하지 못하였고 거의 모든 세포가 14일이 지나고 이식부위에서 소실되었음을 보고하였는데 이는 본 실험의 대조군에서 이식한 세포가 신생조직을 형성하지 못하고 이식부위에서 소실된 것과 같은 결과를 나타내었다. 그에 비해 복합화합물을 이식한 군에서는 분해되지 않은 β -TCP를 중심으로 신생조직이 관찰되었으며, 이 조직을 채취하여 조직학적 염색으로 관찰하였다. 그 결과 β -TCP 주위로 풍부한 양의 교원섬유가 관찰되었으며, 생성된 교원섬유는 세포 지지 및 세포 간 네트워크를 이루는 것을 도왔을 것으로 예상된다. 그러나 신생조직 내의 성숙한 골조직은 관찰할 수 없었으며, кам 염색만으로는 조직 내 β -TCP와 골 형성 시 나타나는 세포 내 칼슘 침착을 감별하기 어려워 신생조직 내의 골화를 증명하기 어렵다. 이에 골 형성 시 발현되는 osterix (osteoblast specific transcription factor)를 면역조직화학염색을 통하여 세포 내 골세포분화를 확인하였으며 이는 신생조직내 골화를 기대할 수 있는 결과이다. 이식부위에서의 석회화나 성숙한 골 형성이 이루어지지 않은 이유로는 성숙한 골 형성 시 나타나는 ALP, osteopontin, osteonectin, osteocalcin의 발현이 5-7주 급격한 증가를 나타내는 것으로 알려져 있는데,⁸⁾ 그에 비해 본 실험의 4주간의 이식 기간은 세포가 성숙한 골을 형성하기까지 충분한 시간이 되지 않은 것으로 보인다. 또한 복합화합물을 이식한 부위가 골 결손 부위가 아닌 피하지방조직에 이식한 것으로, 지속적인 골 형성 유도 성장인자의 전달이 어려워 자연적인 골 조직 형성이 어려웠을 것으로 예상된다. 비록 이식부위에서의 성숙한 골 형성을 관찰할 수 없었지만 본 연구를 통해 복합화합물이 신생조직을 형성할 수 있다는 것과 신생조직 내의 부분적인 골분화 세포를 관찰하였다. 그러나 본 연구의 목적인 복합화합물의 세포지지 및 신생조직 형성에 대한 우수성을 증명하기에는 복합화합물을 구성하는 각각의 물질들을 비교하기 위한 실험군 설정이 부족하다는 한계가 있다. In vitro 및 in vivo 실험에서 각각 β -TCP-hydrogel-중간엽줄기세포군, β -TCP-중간엽줄기세포군, hydrogel-중간엽줄기세포군 및 no scaffold-중간엽줄기세포군으로 나누어 β -TCP-hydrogel-중간엽줄기세포군이 다른 군에 비해

여 세포지지 및 신생골 형성능에 대한 결과를 비교하지 못해 절대적인 실험군의 우수성을 증명할 수 없는 약점이 있다. 또한 실험 개체수가 충분하지 않다는 점에서 통계적인 의의를 부여하는 것에 제한이 있다. 그리고 실험 기간이 4주로 성숙한 골 형성을 관찰하기 위해서는 실험기간이 부족하여 후속 연구에서는 장기적인 관찰이 필요할 것으로 판단된다. 다만 본 연구는 제조한 복합화합물이 조직 내의 골 형성을 유도할 수 있는 신생조직을 형성하는지에 대하여 분석하였다는 데 의의가 있다.

결론

β -TCP와 hydrogel로 구성된 지지체와 중간엽줄기세포를 혼합한 복합화합물은 중간엽줄기세포를 지지하고 신생조직을 형성하는데 유익한 환경을 제공하는 것으로 판단한다.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

1. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S20-7.
2. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg*. 1996;35:413-7.
3. Carter G. Harvesting and implanting allograft bone. *AORN J*. 1999;70:660-70; quiz 672-6.
4. Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:1-6.
5. La Gatta A, De Rosa A, Laurienzo P, Malinconico M, De Rosa M, Schiraldi C. A novel injectable poly(epsilon-caprolactone)/calcium sulfate system for bone regeneration: synthesis and characterization. *Macromol Biosci*. 2005;5:1108-17.
6. Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6:288-95.
7. Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;33:211-5.
8. Ye X, Zhang P, Xue S, Xu Y, Tan J, Liu G. Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model. *Cytotherapy*. 2014;16:1643-55.

9. Cheung HK, Han TT, Marecak DM, Watkins JF, Amsden BG, Flynn LE. Composite hydrogel scaffolds incorporating decellularized adipose tissue for soft tissue engineering with adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2014;35:1914-23.
10. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:204.
11. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8:277-84.
12. Ren T, Ren J, Jia X, Pan K. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74:562-9.
13. Park YS, Lee JY, Suh JS, et al. Selective osteogenesis by a synthetic mineral inducing peptide for the treatment of osteoporosis. *Biomaterials*. 2014;35:9747-54.
14. Maia FR, Barbosa M, Gomes DB, et al. Hydrogel depots for local co-delivery of osteoinductive peptides and mesenchymal stem cells. *J Control Release*. 2014;189:158-68.
15. Nagahara T, Yoshimatsu S, Shiba H, et al. Introduction of a mixture of β -tricalcium phosphate into a complex of bone marrow mesenchymal stem cells and type I collagen can augment the volume of alveolar bone without impairing cementum regeneration. *J Periodontol*. 2015;86:456-64.
16. Murphy KC, Hughbanks ML, Binder BY, Vissers CB, Leach JK. Engineered fibrin gels for parallel stimulation of mesenchymal stem cell proangiogenic and osteogenic potential. *Ann Biomed Eng*. 2015;43:2010-21.
17. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One*. 2014;9:e104061.
18. Cuadros TR, Erices AA, Aguilera JM. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;46:331-42.
19. Peter SJ, Miller ST, Zhu G, Yasko AW, Mikos AG. In vivo degradation of a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate injectable composite scaffold. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:1-7.
20. Peters F, Reif D. Functional materials for bone regeneration from beta-tricalcium phosphate. *Mater Sci Eng Technol*. 2004;35:203-7.
21. Maia FR, Fonseca KB, Rodrigues G, Granja PL, Barrias CC. Matrix-driven formation of mesenchymal stem cell-extra-cellular matrix microtissues on soft alginate hydrogels. *Acta Biomater*. 2014;10:3197-208.
22. Salama R, Weissman SL. The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Br*. 1978;60:111-5.
23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
24. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45:115-20.
25. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
26. Han S, Zhao Y, Xiao Z, et al. The three-dimensional collagen scaffold improves the stemness of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Genet Genomics*. 2012;39:633-41.
27. Cheng L, Shi Y, Ye F, Bu H. Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33:1254-60.
28. Amosi N, Zarzhitsky S, Gilsohn E, et al. Acidic peptide hydrogel scaffolds enhance calcium phosphate mineral turnover into bone tissue. *Acta Biomater*. 2012;8:2466-75.
29. Rustad KC, Wong VW, Sorkin M, et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*. 2012;33:80-90.

삼인산 칼슘 혼합 하이드로젤 지지체와 중간엽줄기세포로 구성된 복합화합물의 신생골조직 형성능

이다름 • 강용구^{*✉}

가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학연구소, *정형외과

목적: 중간엽줄기세포와 베타 3인산 칼슘염(beta-tricalcium phosphate, β -TCP), hydrogel로 구성된 복합화합물의 세포 지지 및 신생조직 형성능에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 중간엽줄기세포와 β -TCP를 hydrogel에 혼합하여 복합화합물을 제조하고, 제조한 복합화합물을 3일간 배양하여 신생골 형성을 위한 유전자 발현도를 분석하였다. 또한 복합화합물을 흰쥐의 피하에 주사하고 4주 후 형성된 신생조직을 채취해 조직학적 염색을 시행하였다.

결과: 일반 2차원 배양과 복합화합물에서 배양한 중간엽줄기세포의 유전자 발현 양상을 비교할 때 복합화합물의 세포에서 RUNX2 1.26배, osteopontin 1.23배, transforming growth factor- β 2.12배, osterix 1.07배, type I collagen 1.3배, fibronectin 1.3배로 신생조직의 골 형성과 관련된 유전자 발현도가 높아진 것을 확인하였다($p < 0.05$). 동물실험에서도 신생조직이 관찰되었으며 조직염색을 통하여 복합화합물이 중간엽줄기세포의 이탈을 막고 신생조직을 형성한 것을 확인하였으며 osterix 면역염색을 통해 조직 내 골분화세포를 관찰하였다. 대조군의 경우 이식한 중간엽줄기세포가 모두 소실되고 신생조직 형성이 없었다.

결론: β -TCP와 hydrogel로 구성된 지지체와 중간엽줄기세포를 혼합한 복합화합물은 중간엽줄기세포를 지지하고 신생조직을 형성하는 데 유익한 환경을 제공하는 것으로 판단한다.

색인단어: 골형성, 중간엽줄기세포, 하이드로젤, 3인산 칼슘염

접수일 2015년 5월 20일 수정일 2015년 9월 25일 게재확정일 2017년 8월 9일

[✉]책임저자 강용구

16247, 수원시 팔달구 중부대로 93, 성빈센트병원 정형외과

TEL 031-249-7186, FAX 031-254-7186, E-mail ykang@cmcnu.or.kr

이다름 저자 현소속: 독립 연구자(무소속)