

오리발 유래 콜라겐과 탈미네랄화된 골분 스펀지에서 골 분화능력평가

차재근 · 차세롬 · 이대훈 · 신재훈 · 송정은 · 서동삼* · 박찬흠** · 강길선[†]

전북대학교, BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소,

*세원셀론텍, **한림대학교 의과대학 춘천성심병원 이비인후과

(2016년 4월 4일 접수, 2016년 6월 13일 수정, 2016년 7월 26일 채택)

Evaluation of Osteogenesis on Duck's Feet Derived Collagen and Demineralized Bone Particles Sponges

Jae Geun Cha, Se Rom Cha, Dae Hoon Lee, Jae Hun Shin, Jeong Eun Song, Dong Sam Suh*,
Chan Hum Park**, and Gilson Khang[†]

Dept. of BIN Fusion Tech & Dept. of PolymerNanoSci Tech, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 54896, Korea

*Sewon Cellontech, 801, Wooyoung techno center, 273-15 Seongsu 2ga 3-dong, Seongdong gu, Seoul 04783, Korea

**Dept. of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Chuncheon Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, 1-1 Okcheon, Chuncheon, Gangwon 24252, Korea

(Received April 4, 2016; Revised June 13, 2016; Accepted July 26, 2016)

초록: 본 연구에서는 오리발 콜라겐(duck's feet derived collagen, DC)과 탈미네랄화된 골분(demineralized bone particles, DBP)을 3:1, 1:1, 1:3 비율로 혼합하여 스펀지를 제조하였다. 제조한 스펀지의 특성분석을 위해 압축강도, 다공성, SEM 등을 측정하였으며, 골수 유래 줄기세포(BMSC)를 비율별 DC/DBP 스펀지에 파종하여, 세포 부착, 증식 및 골 분화를 확인하고자, SEM, MTT, ALP, RT-PCR 및 조직학적 염색을 통한 분석을 실시하였다. 그 결과, 1:1 DC/DBP 스펀지에서 골 분화 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 이를 골 재생을 위한 생체재료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, duck's feet derived collagen (DC) and demineralized bone particles (DBP) sponges were prepared by mixing both the components on the ratio of 3:1, 1:1, and 1:3. The physio-chemical properties of the sponges were examined by measuring compressive strength, porosity, SEM, etc. *In vitro* biological characterizations such as cell attachment, proliferation and osteogenic differentiation of the as-prepared sponges were studied by inoculating the bone marrow-derived stem cells (BMSC) in ratio-specific DC/DBP sponges followed by SEM, MTT, ALP, RT-PCR & histological analysis by staining. We found that the 1:1 DC/DBP sponges displayed superior osteogenesis, thus can be envisioned as a potential, biomaterial for regeneration of bone.

Keywords: duck's feet derived collagen (DC), demineralized bone particle (DBP), bone marrow stem cells (BMSc) osteogenesis.

서 론

조직공학은 생물학적인 기능을 하는 세포와 세포 주변 환경을 조절할 수 있는 공학적인 기술을 이용해 세포의 기능을 조절하고 손상된 조직에 이식해 원하는 기능을 구현할 수 있는 포괄적인 의미로 최근에 재생의학으로 통칭된다.^{1,3}

골 결손을 치료하기 위해 골 형성을 유도하고 실제 골 조

직을 개발하는 조직공학적인 골 형성 연구가 진행되고 있다. 골 조직공학에 필요한 요소로 첫째, 세포들이 살아가면서 골을 형성하기 위해서는 천연물로부터 얻거나 인공적으로 합성한 기질과 같은 골 전도 물질이 필요하다. 골 전도 물질은 골의 무기화 단계와 유사하고 생체 적합성이 있어야 하며 주위의 뼈와 밀접하게 연계되는 표면 활성도와 뼈대 구조를 제공하게 된다. 이러한 골 전도 물질로는 세라믹, 콜라겐, 생분해성 고분자 등이 다양하게 연구되고 있다.⁴ 둘째, 골 조직의 재생 시에도 충분한 수의 조골세포들이 필요하다. 조골세포로는 골아 세포, 골세포, 골 전구세포 등이 있다. 셋째, 골 조직으로의 분화를 유도하는 BMP-2,⁵ BMP-4⁶ 및 BMP-7⁷ 형

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

질전환성장인자(TGFβ),⁸ 인슐린유사성장인자(IGF),⁹ 혈소판 유래 성장인자(PDGF)가¹⁰ 있다.

골 조직공학의 가장 궁극적인 목표는 골 형성과 회복 촉진을 위한 인체의 재생 메커니즘을 증가시키고, 생체 골에 가까운 골 조직을 개발하는 것이다.

천연재료 중 하나인 콜라겐은 세포와의 친화력이 매우 우수하고 생체 내 거부반응이 적기 때문에 생체의료용 재료로 주목받고 있으며, 지방 성분이 함유되어 있지 않고 수용성 단백질로 이루어져 흡수가 잘 이루어지는 장점이 있다.¹¹⁻¹³ 또한, 피부, 뼈, 연골 등을 구성하는 당 단백질, 당 지질로 구조적으로 세포 부착이 가능하며, 산소전달 및 신축성을 가져 화장품의 원료뿐만 아니라 약물전달, 상처치유, 화상치유 지지체로 필름, 3D 등의 형태로 널리 응용되고 있다.¹⁴⁻¹⁷

조직공학에서 사용되는 동물유래 콜라겐은 주로 소, 돼지 등에서 추출하여 사용되며, 이는 낮은 항원성, 지혈효과, 세포부착능력이 우수하다고 알려져 있다.^{18,19}

이에 따라 본 실험에서는 안정성이 우수하고 추출공정이 짧고, 공급가격이 낮으며 제 1형 콜라겐이 풍부하다고 알려진 축산부산물인 오리발 콜라겐(duck's feet collagen, DC)과 오리발 콜라겐의 물리적, 기계적 특성을 강화하기 위하여 소에서 추출한 탈미네랄화된 골분(demineralized bone powder, DBP)을 사용하여, 스펀지를 제작하여 골분화 능력을 평가하였다.²⁰⁻²²

실 험

시약 및 재료. 모든 화학약품과 유기용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

오리발 콜라겐 분리. 오리발을 수돗물에 담가 24시간 동안 핏물을 제거해준다. 핏물을 제거한 오리발은 지방 제거를 위해 1 M NaOH에 넣고 24시간 교반한다. 그 다음 메탄올 : 클로로포름(3:1)용액, 아세톤, 알코올 및 deionized water(DW) 순서로 세척해준 후 오리발을 분쇄한다. 분쇄한 오리발은 콜라겐 추출을 위해, 5% 구연산에 넣고, 48시간 동안 교반한다. 불순물을 거르기로 걸러낸 후, 원심분리(10000 rpm, 15분) 시킨 후, 다시 한 번 불순물을 거른다. 거른 용액 부피의 3배인 알코올을 넣고 원심분리(1500 rpm, 5분)한 후, 상층액은 버리고 침전된 콜라겐들을 모아서 DW에 넣고 풀어준 후, 동결 건조한다.

DBP 분리. DBP는 소의 대퇴골의 원위골단부, 근위골단부, 골막과 골수 및 연조직을 깨끗이 제거한 후 잘게 분쇄하여 클로로포름과 메탄올의 혼합 용매에 지방을 제거한 후 아세톤으로 건조시켰다. 0.5 N의 HCl 용액으로 탈미네랄화 과정을 거친 후 인산완충용액(PBS, pH 7.4, Sigma Chem Co, St Louis, MO, USA)으로 pH 7.4로 조절하여 동결건조하였다. DBP는 액체질소 내에서 동결분쇄(SPEX 6770, USA)하여 약

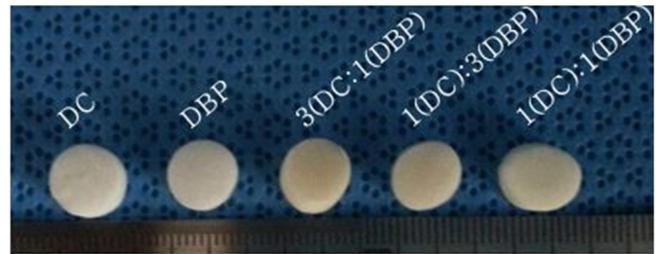


Figure 1. Fabricated DC/DBP sponges.

180 μm 크기 이하의 분말형태로 얻었다.

스펀지 제조. 3차 증류수에 3% 아세트산(Sigma)과 0.1% 펩신(Sigma)을 함유한 용액에 DBP/DC 파우더를 1:1, 3:1, 1:3 비율로 2 wt%로 상온에서 24시간 교반 후 4°C에서 24시간 보관하였다. 이를 48웰플레이트에 담고 냉장 4시간, 냉동 4시간 후 동결 건조시켜 스펀지 형태의 지지체를 얻었다. 제조된 스펀지는 0.25% 글루타알데하이드(Sigma)에 넣어 4시간 동안 경화시킨 뒤 알데하이드 그룹의 작용을 막기 위해 0.1 M의 글리신에 24시간 담가두었으며 모든 스펀지는 DW로 세척 후 동결건조하였다(Figure 1). 동결건조한 스펀지는 사용 전 여러 번의 세척을 통하여 독성을 제거하였다.

압축강도 측정 분석. DC/DBP 스펀지의 강도를 측정하기 위하여 만능물성측정기(TMS-Pro, food technology corporation, sterling, USA)를 이용하였다. 만능물성측정기의 설정 값으로 측정거리는 3 mm, 측정 속도는 20 mm/sec, 측정 힘은 0.1 MPa으로 하였다.

공극률 측정 분석. 제조된 스펀지 내에 공극으로 있는 부분이 전체 부피에서 차지하고 있는 비율을 확인하기 위해, Archimedes의 유체 변의 측정기법을²³ 통하여 측정하였다.

$$\text{Porosity}(\%) = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100 \quad (1)$$

처음 증류수의 부피(V_1)와 스펀지 추가 후 증가한 증류수의 부피(V_2) 그리고 스펀지를 뺀 후 줄어든 증류수의 부피(V_3)를 이용하여 백분율로 나타냈다.

세포배양. 골수 줄기 세포(bone marrow stem cell, BMSC)는 토끼 다리에서 분리, 배양하였다. BMSC는 MEM-α (alpha modification of eagle's minimum essential medium, Lonza, USA)에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco, USA), 1% 항생제(100 units/mL 페니실린과 100 μg/mL 스트렙토마이신)가 함유된 배양액으로 현탁액을 만든 후 세포배양 플라스크에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. BMSC 세포는 2대 계대 배양 후 사용하였다. 배양액은 3일에 한 번씩 교체해주었다.

세포 부착 양상 분석. DC/DBP 스펀지에서 BMSC의 부착 양상 및 변화된 모폴로지를 확인하고자 주사전자현미경 (SEM; S-2250N, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다(각 스펀지

당 $n=2$). 각 스펀지를 24웰플레이트에 넣은 후, 1×10^5 세포/스펀지 농도로 BMSC를 파종하고, 28일 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 이를 2.5%의 글루타알데하이드(Sigma)로 24시간 동안 상온에서 고정한 후 에탄올 구배용액(50, 60, 70, 80, 90 및 100%)을 이용하여 각각 30분씩 탈수한 후 건조하였다. 시료관찰이 용이하도록 시편을 잘라 시료폴더에 고정시킨 후, 아르곤가스 하에서 플라즈마 스퍼터(Emscope SC500K, London, UK)를 이용하여 백금코팅한 후 각각의 시료를 500배로 촬영하였다.

세포 증식률 측정. 세포 증식능력을 분석하기 위해 MTT (디메틸티아졸-2-일-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드) 분석법을 시행하였다. 각 스펀지에, 1×10^5 세포/스펀지의 농도로 BMSC를 파종하고, 상기의 배양액으로 정적 배양하였다 (각 스펀지당 $n=6$). 배양 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28일째에 MTT 용액(5 mg/mL stock in PBS, Sigma)을 100 μ L씩 넣고 4시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 보라색 결정이 생성되면 스펀지를 시험관에 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma)용액을 1 mL씩 넣어 결정이 완전히 녹을 때까지 초음파 세척기로 1시간 동안 용해한 후 96웰플레이트에 시료를 각각 100 μ L씩 분주하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

골 분화정도 측정. 알칼리성 인산 분해 효소(alkaline phosphatase; ALP)를 통하여 스펀지에 파종한 BMSC의 골 분화정도를 확인하였으며 ALP activity kit(Takara, Japan)를 사용하여 분석하였다. 골 분화정도는 스펀지에 세포를 파종한 후 1, 3, 7, 14 및 28일째에 실시하였다. 스펀지에 있는 배양액을 모두 제거해주고 DW로 세척한 뒤, 0.02%의 extraction solution으로 스펀지에 붙어있는 세포에서 효소를 추출하였다. 추출액에 4-니트로페닐 포스페이트(4-nitrophenyl phosphate; nNPP) 용액을 넣은 후, 37°C 인큐베이터에 1시간 동안 방치시키며 반응을 일으킨 다음, 0.9 N 수산화나트륨(Showa, Japan)로 반응을 멈추어 주었다. 마이크로플레이트(SynergyMx™, BioTek, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 송아지 소장 알칼리성 인산분해 효소(calf intestinal alkaline phosphatase; Takara)를 사용하여 기재된 같은 방법으로 알칼리성 인산분해 효소 활성도를 측정하여 추세선을 그린 후, 스펀지 내부에 배양되어 있는 세포의 분화정도를 분석하였다.

mRNA 발현도 확인. DC/DBP 스펀지에 대한 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 세포 파종 후 1, 14, 28일째에 회수된 스펀지에 1 mL의 Trizol(Invitrogen™ Life Technologies Co., Groningen, Netherlands)을 첨가하여 5분 동안 인큐베이션 한 다음 1.5 mL의 EP 튜브에 넣어 0.2 mL의 클로로포름(Sigma)을 첨가하고 4°C, 12000 g에서 15분 동안 원심분리하여 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Oligo(dT)12-18 프라이머(Invitrogen™, 5×first strand buffer(Invitrogen™), dNTP(dGTP, dATP, dTTP,

dCTP, Gibco), RNase inhibitor(Invitrogen™), Superscript™ RNase H 역전사트랜스크립타제(Invitrogen™), DNase/RNase free water(Gibco)를 첨가하여 Authorized thermal cycler(TP600, Takara Bio Inc., Japan)를 통하여 cDNA로 역전사하였다.²⁰⁻²⁵ 역전사시킨 cDNA를 β -actin, Col I, Runx-2, Osteocalcin PCR을 수행하였다. PCR 후 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스겔에 전기영동을 한 후, 상대적 발현을 SYBR 녹색형광(SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain, Cambrex, UK)에 의해 시각화하였으며 300 nm 자외선 조사기로 사진촬영을 하여 β -actin, Col I, Runx-2, 및 Osteocalcin mRNA 밴드의 발현정도를 확인하였다.

조직학적 평가. 조직학적 평가로 DBP/DC 각 스펀지에, 1×10^5 세포/스펀지의 농도로 BMSC를 파종하고 4주령의 면역결핍 누드마우스(한일 실험동물센터, Korea)의 면역기관인 겨드랑이 피하에 이식하였다($n=4$). 1, 4, 8주 후 이식부위만을 잘라내어 스펀지를 적출한 후 안락사하였다. 적출한 스펀지는 10% 포르말린(Sigma) 용액에 고정시킨 후 파라핀 블록을 제조하였다. 이렇게 만들어진 파라핀 블록은 조직학적 염색이 가능하도록 박절기로 7 μ m의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켜서 헤마톡실린-에오신(H&E) 염색을 실시한 후 조직학적 분석을 통해 비교 분석하였다.

통계학적 분석. 각 실험의 통계학적 분석은 student's t-test를 시행하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였으며, ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) 모든 실험은 3번 이상에 걸쳐 진행하였다($n=3$).

결과 및 토론

압축강도 측정. 스펀지의 물리적 특성을 평가하기 위하여 압축강도를 실시하였다. 이에 대한 결과는 Figure 2에 나타내었다.

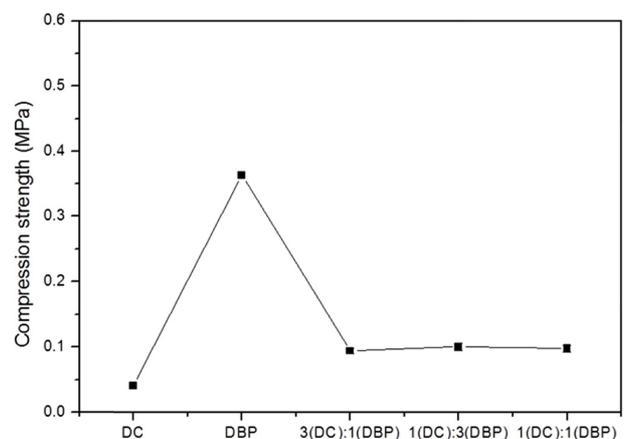


Figure 2. Compressive strength of DC/DBP sponges.

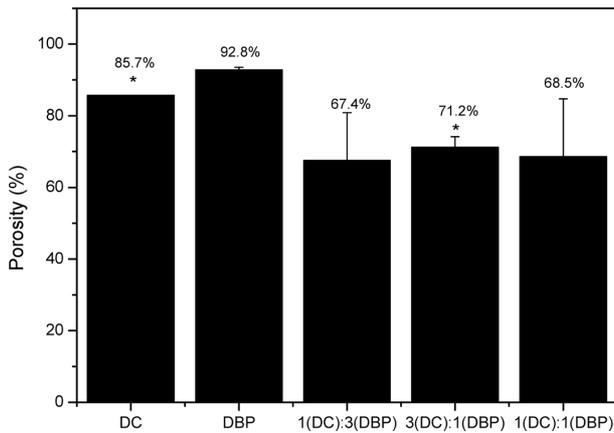


Figure 3. Porosity of DC/DBP sponges (* $p < 0.05$).

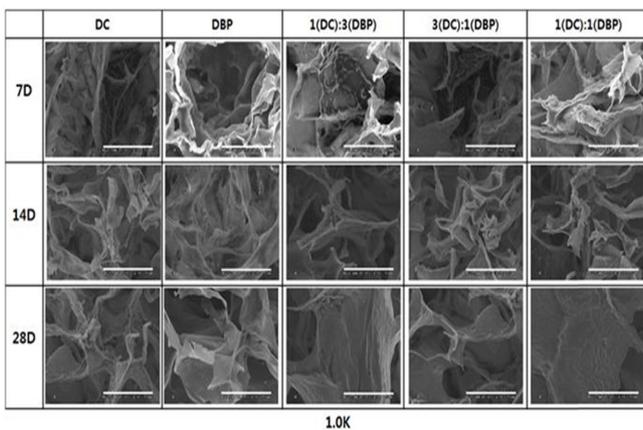


Figure 4. SEM photomicrographs of bone marrow stem cell morphology in sponge surfaces at 7, 14 and 28 days (magnification with $\times 1.0$ K, scale bars=50 μ m).

Figure 2에서 보여지는 것과 같이 일반적으로 DC는 강도가 0.04 MPa로 가장 낮은 값을, DBP는 0.3 MPa로 가장 높은 값을 나타내었다. 이는 DBP 스펀지의 다공벽이 칼슘과 인산으로 이루어져 강도가 오리발 콜라겐보다 증가되었기 때문에, 압축강도가 높아진 것으로 사료된다. 따라서 혼합한 스펀지에서도 역시, DBP가 가장 많이 함유된 1(DC): 3(DBP) 스펀지의 값이 가장 높은 값인 0.1 MPa으로 보였으며, 그 뒤로는 1(DC):1(DBP)이 0.097 MPa, DC함량이 높은 3(DC): 1(DBP)는 0.093 MPa로 가장 낮은 값을 보여주었다.

공극률 측정. 세포의 이동과 증식을 위해 공극률을 측정하였고, 결과는 Figure 3에 나타내었다.

Figure 3과 같이 공극률 측정에서는 DBP의 공극률이 92.8%로 가장 높았으며, 그 뒤로는 DC, 3(DC):1(DBP), 1(DC):1(DBP), 1(DC):3(DBP) 스펀지 순으로 각각 85.7%, 71.2%, 68.5%, 67.4%의 공극률을 보였다. 단일 물질로 이루어진 DBP, DC 스펀지의 공극률이 높았으며, DBP와 DC의 혼합 스펀지

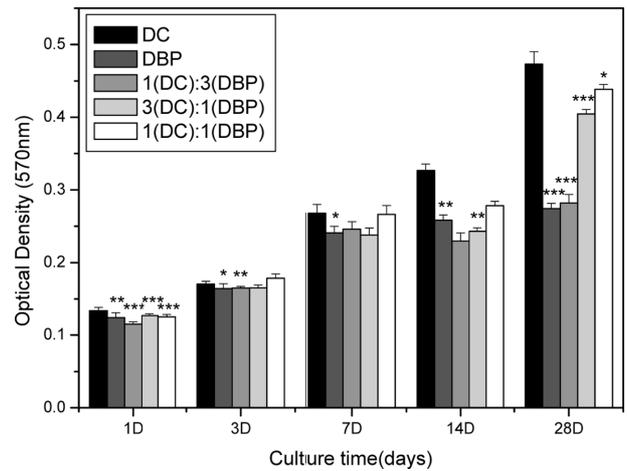


Figure 5. *In vitro* viability of bone marrow stem cell in sponges analyzed by MTT assay at 1, 3, 7, 14 and 28 days (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

는 입자간 차이로 인해 비슷한 공극률을 보이는것으로 사료된다.

세포 부착 양상 평가. 스펀지에 세포 부착 능력과 그 모폴로지 평가를 위하여 SEM을 사용하여 7, 14, 28일째 관찰하였다(Figure 4).

Figure 4 SEM 사진에서 보여지듯이 7, 14, 28일로 시간이 지남에 따라 모든 군에서 세포의 증식이 활발하게 이루어진 것을 확인할 수 있었으나, 각 군들사이의 세포 증식률 차이는 육안으로 뚜렷히 확인되지 않았다.

세포 증식률 평가. 스펀지에서의 세포 증식률 평가를 위하여 rBMSC 세포를 파종하여 MTT assay를 실시하였다(Figure 5).

1일차에 DC는 0.133 ± 0.004 , DBP는 0.124 ± 0.006 , 혼합 스펀지에서 1(DC):3(DBP), 3(DC):1(DBP), 1(DC):1(DBP)는 각각 0.115 ± 0.002 , 0.126 ± 0.002 , 0.125 ± 0.003 의 세포 증식률을 보였다. 초기 값은 DC 스펀지군이 가장 세포 증식률이 좋았으며, 이는 시간이 증가함에 따라 같은 결과를 얻었다. 특히, 28일에 DC 스펀지의 값 0.473 ± 0.0173 이 DBP 스펀지의 값 0.274 ± 0.007 보다 높음을 알 수 있었고, 또한 혼합 스펀지에서는 1(DC):3(DBP), 3(DC):1(DBP), 1(DC):1(DBP)이 각각 0.282 ± 0.012 , 0.405 ± 0.006 , 0.438 ± 0.006 의 세포증식률을 보였다. 이 그래프로 보아 1(DC):1(DBP) 스펀지가 혼합 스펀지 중에 가장 세포 증식률이 높았다. 이는 DC의 친수성과 수분 함유력이 세포의 이동과 조직의 형성에 도움을 주었고, DBP 내의 여러 사이토카인이 세포증식에 긍정적인 영향을²⁵⁻²⁷ 끼쳤기 때문으로 사료된다.

골 분화 평가. Figure 6에 나타난 골 분화 평가 결과 14일부터 골분화가 빠르게 시작됨을 확인할 수 있었다. DC와 DBP 스펀지는 각각 0.123 ± 0.003 , 0.187 ± 0.002 값을 가져, DBP가

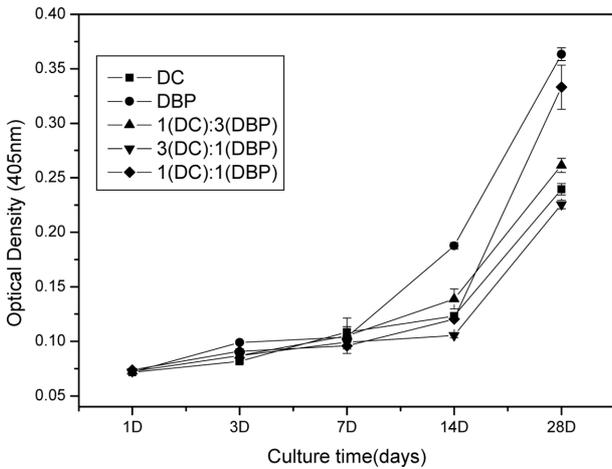


Figure 6. Alkaline phosphatase activity of sponges for 1, 3, 7, 14 and 28 days.

DC 스펀지보다 골 분화가 뛰어남을 보여주었다. 혼합 스펀지인 1(DC):3(DBP), 3(DC):1(DBP) 및 1(DC):1(DBP)는 각각 0.138 ± 0.009 , 0.105 ± 0.002 , 0.120 ± 0.001 값을 나타냈으며, 이 중 DBP가 많이 혼합된 스펀지에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 28일에서도 이와 비슷한 값을 보여주고 있다. 28일에 DC, DBP, 1(DC):3(DBP), 3(DC):1(DBP) 및 1(DC):1(DBP)는 각각 0.363 ± 0.005 , 0.239 ± 0.005 , 0.261 ± 0.006 , 0.225 ± 0.003 및 0.333 ± 0.02 값을 가져, DBP 스펀지의 골 분화 능력이 가장 높았으며, 그 다음으로는 1:1비율로 혼합된 스펀지인 1(DC):1(DBP)가 두번째로 높았다. 이는 골성분으로 이루어진 DBP가 골 분화에 영향을 준 것으로 사료되며, 1(DC):1(DBP) 혼합 스펀지는 DBP에 있는 골 성분과 DC의 콜라겐 타입 I이 골 분화에 영향을 주었기 때문으로 사료된다.

mRNA 발현도 확인. DC/DBP 스펀지에 대한 염증 사이토카인의 mRNA 발현여부를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. β -actin을 기준으로 하여 Col I, Runx-2, Osteocalcin을 평가하여 Figure 7에 그래프로 결과를 나타내었다.

Figure 7에서 보여지듯이, 모든 스펀지에서 Runx-2, 제 1형 콜라겐, 오스테오칼신의 mRNA 발현을 보였다. Figure 7(a)에서 오스테오칼신은 7일째에는 모든 군에서 비슷하게 발현되다가, 14일에 1(DC):3(DBP) 군에서 강하게 발현되었으나, 28일에서는 DBP와 1(DC):1(DBP) 스펀지 순으로 높았다. 또한 Figure 7(b)에서 제 1형 콜라겐은 모든 군에서 시간이 증가할수록 발현이 증가하였으며, 오스테오칼신과 마찬가지로 28일에 DBP와 1(DC):1(DBP) 스펀지 순으로 높았다. 마지막으로 Runx-2는 모든 군에서 7일에서 14일로 갈수록 발현량이 증가하다 28일째 감소함을 확인하였다(Figure 7(c)). 이는 앞서 언급한 ALP와 일치하는 결과로써, DBP 다음으로 1(DC):1(DBP) 스펀지의 골 분화가 활발히 진행되었음을 확인할 수 있었다.

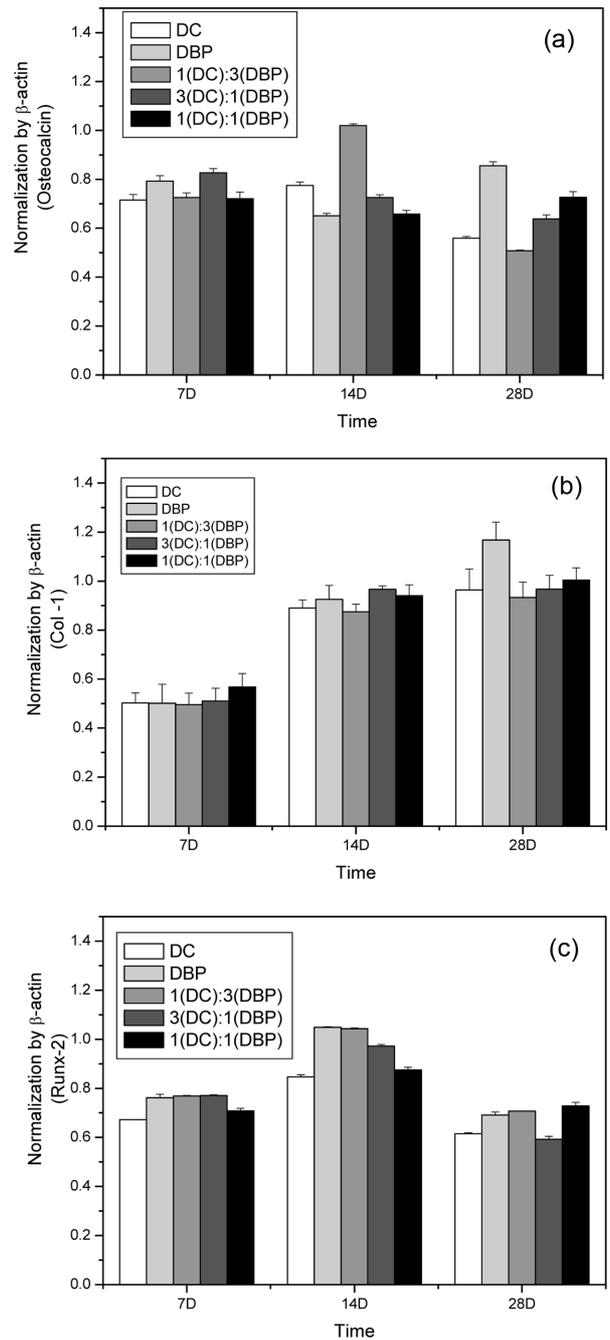


Figure 7. Gene expression results of (a) Osteocalcin; (b) Col I; (c) Runx-2 by normalization of β -actin gene expression.

조직학적 평가. *In vivo* 에서 세포질의 형성을 알아보고 골 형성을 평가하기 위해 스펀지를 누드마우스 피하에 이식한 후 2주, 5주, 8주 후 스펀지를 적출하여 조직화학적 염색을 실시하였다.

H&E 염색 결과, 2주에 모든 스펀지군에의 다공벽부분에 헤마톡실린으로 염색된 세포의 핵이 보여, 다공벽을 중심으로

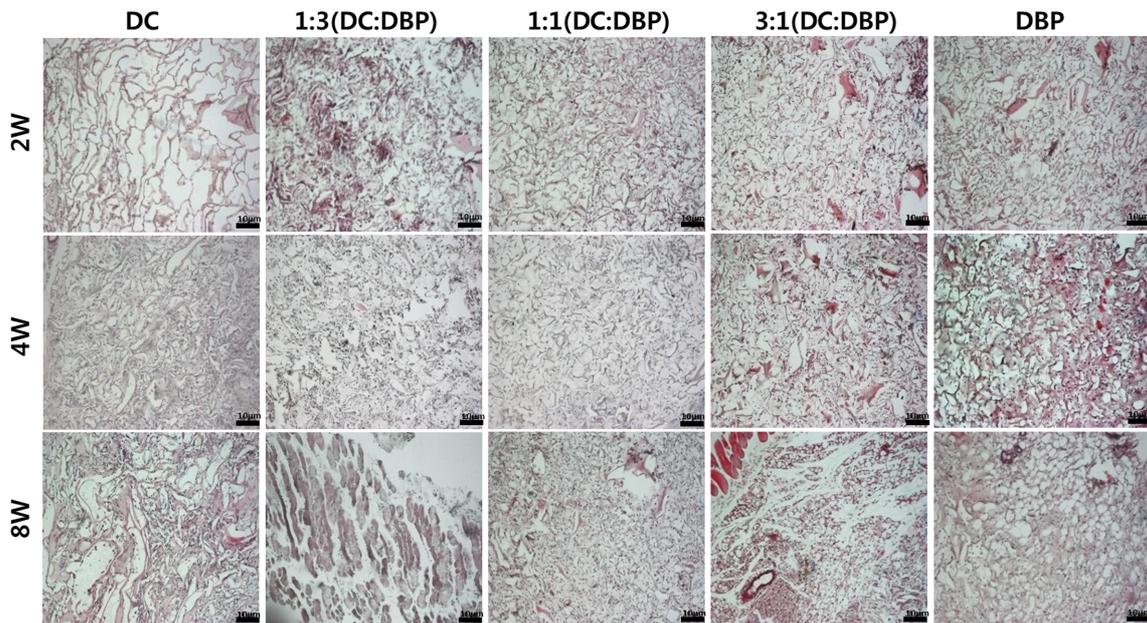


Figure 8. H&E staining in DC sponge and blending DC sponge (1:3, 1:1, 3:1), DBP sponge after 2, 4, 8 weeks of implantation *in vivo* (magnification \times 100, scale bar=10 μ m).

로 세포가 증식한 것을 확인할 수 있었으며, 시간이 지날수록 8주차에는 다공 안에 세포질이 넓게 채워진 것을 확인할 수 있었다. 특히 1(DC):1(DBP) 스펀지군이 다른 군에 비해 조밀하게 세포질이 차 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 8).

결론

본 연구에서는 오리발에서 추출한 콜라겐(DC)을 골 분화와 기계적/물리적 특성을 높은 탈미네랄화 골분(DBP)을 혼합하여 DC/DBP 스펀지를 제조함으로써, 조직공학적으로 사용될 수 있는 스펀지를 제안하였다. 3차원 다공성 스펀지로 제조된 DC/DBP 스펀지는 DBP가 첨가되어 다공 표면이 거칠어짐을 SEM으로 확인하였고, 압축강도와 공극률 측정을 통하여 기본적으로 DC를 사용한 스펀지 보다 DBP를 혼합한 스펀지가 여러 방면에서 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 DC/DBP 스펀지에서의 세포 파종 전, 후의 세포의 부착정도, 증식을 통하여 DC/DBP 스펀지가 세포외기질 형성과 증식, 부착에 긍정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 mRNA 발현분석결과로 *in vivo* 상에서의 조직화학적 평가 분석을 통해 제조된 스펀지 중에서 1(DC):1(DBP) 스펀지가 가장 세포가 많이 증식됨을 확인할 수 있었다. 이는 DC 내에 함유된 여러 사이토카인이 세포의 부착과 이동을 도움으로써 세포 증식 및 조직 형성이 촉진된 것으로 사료된다. 그리고 DC를 DBP와 혼합함으로써 DBP의 우수한 기계적/물리적 강도와 세포가 골 분화로 이끌어 주는 결과를 가져왔다. 이와

같이 DC/DBP 스펀지가 세포에 긍정적이고 유익한 환경을 제공하였고, 조직공학적인 스펀지로 적용될 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글: 본 연구는 농림수산식품부 기술사업화지원사업(814005-03-2-HD020)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참고 문헌

1. S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).
2. D. W. Humacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
3. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Am. Chem. Soc.*, **101**, 1069 (2001).
4. J. E. Fleming, C. N. Cornell, and G. F. Muschler, *Ortop. Clin. N. Am.*, **31**, 357 (2000).
5. K. Partridge, X. Yang, N. M. Clarke, Y. Okubo, K. Bessho, W. Sebald, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, and R. O. Oreffo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 144 (2002).
6. S. H. Yang, C. K. Hsu, K. C. Wang, S. M. Hou, and F. H. Lin, *J. Biomed. Mater. Res. B, Appl. Biomater.*, **74**, 468 (2005).
7. H. H. Lu, M. D. Kofron, S. F. El-Amin, M. A. Attawia, and C. T. Laurencin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 882 (2003).
8. M. E. Joyce, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and M. Bolander, *J. Cell. Biol.*, **110**, 2195 (1990).
9. D. S. Steinbrech, B. J. Mehrara, N. M. Rowe, M. E. Dudziak, P. B. Saadeh, G. K. Gittes, and M. T. Longaker, *Ann. Plast. Surg.*, **42**, 481 (1999).

10. E. Canalis, T. L. McCarthy, and M. Centrella, *J. Cell Physiol.*, **140**, 530 (1989).
11. Q. Ye, K. Ohsaki, K. Li, D. J. Li, C. S. Zhu, T. Ogawa, S. Tenshin, and T. Takano-Yamanoto, *Auris Nasus Larynx*, **28**, 131 (2001).
12. C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, *Chem. Eng. Res. Des.*, **85**, 1051 (2007).
13. A. J. Singer and R. A. Clark, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 738 (1999).
14. S. R. Caliarì, M. A. Ramirez, and B. A. C. Harely, *Biomaterials*, **32**, 8990 (2011).
15. R. M. Capito and M. Spector, *Gene Therapy*, **14**, 721 (2007).
16. J. C. Murray, G. Stingl, H. K. Kleinman, G. R. Martin, and S. I. Katz, *J. Cell Biol.*, **80**, 197 (1979).
17. E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, *Acta Biomater.*, **3**, 321 (2007).
18. R. F. Oliver, H. Barker, A. Cooke, and R. A. Grant, *Biomaterials*, **3**, 38 (1982).
19. S. R. Lynch, R. B. Colvin, and H. N. Antoniades, *J. Clin. Invest.*, **84**, 640 (1989).
20. B. P. Kropp, B. L. Eppley, C. D. Prevel, M. K. Rippy, R. C. Harruff, S. F. Badylak, M. C. Adams, R. C. Rink, and M. A. Keating, *Urology*, **46**, 396 (1995).
21. S. Mizuno and J. Glowacki, *Biomaterials*, **17**, 1819 (1996).
22. S. R. Cha, H. K. Jeong, S. Y. Kim, E. Y. Kim, J. E. Song, C. H. Park, S. Y. Kwon, and G. Khang, *Polym. Korea*, **39**, 493 (2015).
23. W. K. Lee, T. Ichi, T. Ooya, T. Yamamoto, M. Katoh, and N. Yui, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **67A**, 1087 (2003).
24. H. A. Ko, H. M. Kim, H. J. Ha, R. Kim, J. E. Jang, K. H. Kim, J. H. Lee, J. S. Song, H. Yoon, O. J. Lee, D. Lee, C. H. Park, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 103 (2012).
25. B. L. Farrugia, J. M. Whitelock, M. Jung, B. McGrath, R. L. O'Grady, S. J. McCarthy, and M. S. Lord, *Biomaterials*, **35**, 1462 (2014).
26. R. A. Asheley, B. W. Palmer, A. D. Schultz, B. W. Woodson, C. C. Roth, J. C. Routh, K. M. Fung, D. Frimberger, H. K. Lin, and B. P. Kropp, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 3241 (2009).
27. S. L. B. Bucktrout, M. M. Liordella, X. Zhou, B. Anthony, W. Rosenthal, H. Luche, H. J. Fehling, and J. A. Bluestone, *Immunity*, **39**, 949 (2013).