

## 민어부레가 첨가된 젤란검 조성 골 재생 차폐막의 개발

김진 · 장진운 · 이창문\*·† · 이기영\*\*·†

전남대학교 신화학소재공학과, \*전남대학교 의공학과, \*\*전남대학교 화학공학부 & (주)바이오코스모스  
(2016년 11월 12일 접수, 2016년 12월 29일 수정, 2017년 1월 31일 채택)

### Development of Bone Generation Scaffolds Composed of Croaker Swim Bladder and Gellan Gum

Jin Kim, Jin Woon Jang, Chang Moon Lee\*·†, and Ki-Young Lee\*\*·†

Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

\*Department of Biomedical Engineering, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

\*\*School of Chemical Engineering and Biocosmos Co., Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received November 12, 2016; Revised December 29, 2016; Accepted January 31, 2017)

**초록:** 본 연구는 골 재생 막으로 사용하기 위해 젤란검(GEL)/민어부레추출물(CSB)을 막으로 제조하고 평가하였다. GEL과 CSB 용액을 캐스팅하고 건조시킨 후 D-PBS(Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>)을 첨가하여 GEL/CSB 조성 막을 제조하였다. GEL/CSB 막의 물리-화학적 특성을 분석하기 위해 FTIR, XRD, 팽윤도, 효소 분해도, 세포 생존율을 평가하였다. 또한 조골세포 MC3T3-E1에 GEL/CSB 조성 막을 다양한 농도로 처리하여 alkaline phosphatase(ALP) 활성을 측정하였다. GEL/CSB 농도가 증가함에 따라 ALP가 증가하였다. 막을 처리한 rat의 골 재생물을 수술 4주 후, 마이크로 CT를 이용하여 관찰하였다. GEL/CSB 막이 새로운 신생골 형성에 상당한 효과가 있는 것을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, we present preparation of the gellan gum (GEL)-croaker swim bladder (CSB) membrane and evaluation of its use as a bone regeneration membrane. GEL/CSB membranes were obtained by casting and drying the GEL/CSB solution and adding D-PBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>). The effects of composition and crosslinking on the physico-chemical properties of GEL/CSB membranes were evaluated by FTIR analysis, XRD, swelling ratio, enzymatic degradability and cell viability test. Also, MC3T3-E1, pre-osteoblast cell line, were treated with GEL/CSB of various concentrations (2.5-100 µg/mL). And then, the effect of GEL/CSB on osteoblast differentiation was examined by alkaline phosphatase (ALP) activity. ALP activity increased as the applied GEL/CSB concentrations increased in a dose-dependent manner. The bone regeneration was evaluated by micro-computed tomography (micro-CT) analysis at 4 weeks post-operatively in rat. The GEL/CSB membrane has significant effect on the new bone formation and has the potential to be applied for guided bone regeneration.

**Keywords:** gellan gum, croaker swim bladder, guided bone regeneration, membrane.

## 서 론

이상적인 차폐막의 특성으로 양호한 생체 적합성, 공간 유지력, 효과적인 세포 폐쇄능, 조작의 용이성 그리고 흡수성을 들 수 있다.<sup>1</sup> 생분해성 고분자를 이용한 흡수성 차폐막은 비흡수성 차폐막의 제거 수술 과정을 줄이기 위해 개발되었다. 흡수성 차폐막에는 polyester(polyglycolic acid(PGA), polylactic acid(PLA), poly(ε-caprolactone)(PCL)) 계열 혹은 젤라틴, 콜

라겐, 피브린, 엘라스틴 등의 단백질 계열과 알긴산, 하이알루론산 등의 다당류 계열 고분자가 많이 사용되고 있다.<sup>2</sup> 시중에 판매되고 있는 polyester 계열 차폐막(Resolut<sup>®</sup> LT와 Biofix<sup>®</sup>)의 형태학적, 기계학적 성질을 조사해 보았는데, polyester 계열 차폐막은 처음에는 높은 강도를 가지다가, 배양액에서 4주간 배양한 후에는 강도를 완전히 상실했으며 배양 14일 후에 강도가 유의미하게 줄었다. 콜라겐 기반 차폐막은 세포 친화력과 생체 적합성이 매우 우수하다.<sup>3</sup> 조직 기원 콜라겐 기반 차폐막은 사람 피부 기원(Alloderm<sup>®</sup>), 소의 아킬레스건 기원(Cytoplast<sup>®</sup>), 돼지 피부 기원(Bio-gide<sup>®</sup>) 등 다양한 원천의 콜라겐으로 제작할 수 있다. 하지만, *in vivo*에서 흡수성과 기계적 물성의 조절이 어렵고, 고비용과 종교적

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: cmlee@jnu.ac.kr; kilee@chonnam.ac.kr  
©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

문제, 그리고 사람이나 동물로부터 질병이 매개될 수 있다는 단점이 있다.

돼지 콜라겐을 사용한 Bio-gide가 잘 팔리고 있지만 분해속도가 3개월 이내이므로 종종 치주조직이 생성되기 전에 흡수되어서 제 역할을 못하는 문제점이 있다.<sup>4</sup> 일반적으로 골(경조직)의 성장속도가 치주조직(연조직)의 성장속도보다 느리기 때문에 골이식재를 식립한 후에 차폐막을 덮어줌으로써 골이 안정적으로 성장하는 동안(4-6개월) 주변의 연조직이 골 이식재 부위로 침투하는 것을 방지하기 위해 차폐막이 필요하다.<sup>5</sup>

최근 흡수성 차폐막의 자외선 조사, genipin(GP), glutaraldehyde, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC) 등을 이용해 물리/화학적 가교를 형성하여 차폐막의 기계적 강도를 증가시키는 방법들이 개발되고 있다.<sup>6</sup>

최근 다당류 계열 소재 중 젤란검(GEL) 소재가 골아세포의 성장에 혁신적인 소재임이 입증되면서 골 재생 공학에 활용되고 있다.<sup>7</sup> 12시간 배양된 섬유아세포를 well 중앙의 빈 공간으로 이주시키면 48시간 후에 그 공간을 가득 채운다. Well의 중앙에 콜라겐(1 mg/mL)으로 피복하여도 섬유아세포는 12시간 후 중앙의 빈 공간으로 이주한다. 그러나 well의 중앙부분에 GEL(1 mg/mL)을 피복하면 섬유아세포의 이주는 현저히 저해된다. 이는 GEL의 음전하에 기인한 것으로 판단된다.<sup>8</sup>

또한 의료용 해양바이오 소재가 활발하게 연구되고 있으며 홍합, 미더덕 껍질, 어유의 뼈, 껍질 등을 추출하여 얻어지는 다양한 콜라겐과 아미노산을 이용한 조직재생이 보고되고 있다.<sup>9</sup> 민어부레 또한 다량의 단백질, 미량원소, 비타민성분이 함유되어 있다. 특히, 콜라겐이 많아 골 재생에 효과적이며 감염, 혈전형성을 방지한다는 보고가 있다.<sup>10</sup> 이전 연구에서 GEL 조성의 유착방지제를 개발했던 연구를 바탕으로 본 연구에서는 생체 내 적용 가능한 차폐막을 개발하였다. 미국식품의약안전청(FDA)의 허가를 받은 미생물 유래 다당인 GEL은 임상에서 직접 응용되고 있으며 유동학적, 구조적 특성이 밝혀지면서 여러 가지 분야에 활용되고 있다. 특히, 이전 연구에서는 GEL의 물성을 조절하기 위해 D-PBS를 처리하여 GEL의 음전하를 띠는 COOH 그룹과 D-PBS의 2가 양이온(divalent cations)의 가교결합으로 하이드로젤을 제조하여 유착방지 효능을 관찰하였다.<sup>11</sup>

본 연구에서는 GEL과 민어부레추출물(CSB)을 혼합하여 물리적 강도가 높은 막을 제조하였다. 제조한 막의 골재생 유도 기능을 관찰하였다. 또한 CSB의 첨가에 따른 지지체의 인장강도 및 생분해성을 관찰하여 차폐막으로 활용 가능성을 확인하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 민어 부레(croaker swim bladder, CSB)는 남광주시장 남부수산에서 구입하였고, 젤란검(gellan gum, GEL)

은 글루콘산, 람노오스, 포도당이 1:1:2로 구성된 음이온 다당류로, 정제한 후 건조 및 분쇄 과정을 거친 GEL(Gelzan<sup>CM</sup>, Mw=1000 kg/mol)은 Sigma Aldrich 사에서 구입하였다. D-PBS(calcium chloride, magnesium chloride, pH 7.4)는 Gibco 사에서 구입하였고, 이외의 모든 시약은 정제과정 없이 사용하였으며, 물은 3차 증류수를 사용하였다. 양성 대조군으로 돼지 유래의 collagen 조성인 Bio-gide(Osteohealth Co., USA)를 사용하였다.

**민어 부레 추출방법.** 시장에서 구입한 민어에서 부레를 채취하여, 열풍건조기에서 10일 건조시켰다. 건조된 민어 부레를 하루 정도 물에 담귀 불순물을 제거하였다. 이후, 팽윤된 민어 부레에 4배의 증류수를 첨가하여 70-80 °C에서 4시간 끓인 후 상온에서 24시간 방치 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

**GC-MS 성분 분석.** CSB의 성분 분석을 위하여 gas chromatography/mass spectroscopy(GC-2010, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) 기기를 통해 관찰하였다. CSB를 에탄올에 용해시킨 후, 원심분리기를 이용하여 부유물을 제거하고 미세 필터(0.45 μm)로 여과하여 준비하였다. 성분 분석은 다음과 같은 조건으로 진행하였다. 컬럼은 BD-5(60 mm×0.25 mm×0.25 mm), carrier gas로는 He(1 mL/min), injection 온도는 250 °C, oven 온도는 50~300 °C, 3 °C/분 승온, injection volume 은 1 μL, injection mode는 split ratio 10:1 조건에서 성분 분석을 하였으며, MSD(mass selective detector)에서 mass range 28~550, acquisition mode는 scan mode 조건으로 정량하였다.

**총 아미노산 분석.** CSB의 총 아미노산 분석은 동결 건조한 시료 50 mg을 glass tube에 넣고 6 N HCl을 5 mL 첨가한 후 110 °C에서 22시간 동안 가수분해하였다. 이 분해물을 감압 건조한 후 0.02 N HCl로 용해한 다음 Whatman membrane filter(0.2 μm)로 여과하여 아미노산 자동분석기(S433-H, SYKAM, Eresing, Germany)로 시료를 정량 분석하였다.

**IR 및 XRD 분석.** 가교시킨 막의 화학구조에 미치는 영향을 분석하기 위하여 적외선 분광분석기(Spectrum GX, USA)를 사용하였으며, 그 파수 범위는 4000~600 cm<sup>-1</sup>이며, ATR 법에 의해 정하였다. X-ray 회절 측정은 가교시킨 막의 결정 구조를 확인하기 위하여 X-선 diffractometer(D/Max Ultima III, Rigaku Co., Japan)를 사용하였으며, 시료는 필름 형태로 CuKα radiation에서 40 kV, 40 mA에서 scan range는 20 5~80 °C에서, scan speed는 4 °C/min로 설정하여 결정구조를 분석하였다.

**차폐막 제조.** 실험군으로 다양한 조성의 GEL/CSB(1:0, 0.9:0.1, 0.7:0.3, 0.5:0.5, 0.3:0.7) 차단 막을 제조하였다. 일정 비율의 GEL과 CSB를 100 °C에서 완전히 용해시키고 6-well plate에 casting한 후 60 °C의 열 건조기에서 건조시켰다. 건조된 필름막 형태에 D-PBS를 첨가하여 가교된 얇은 막을 만들었다.

**인장강도 측정.** 차폐막의 인장강도를 확인하기 위하여 인장시험편(20×70×0.03 mm)을 제작한 뒤, universal test machine (UTM, TO-102, Testone Co., Korea)을 이용하였다. Crosshead 속도는 5 mm/min이다. 이때 사용된 시험편은 24시간 동안 초순수에 담겨 충분히 팽윤시킨 상태에서 각각 측정하였다.

**효소저항성 평가.** 가로 10 mm, 세로 10 mm, 두께 0.03 mm의 시료를 0.25% 돼지 트립신(porcine trypsin) 용액 10 mL에 담가 37°C, 50 rpm 환경에서 일주일 동안 진탕한 후, 시료를 꺼내 37°C에서 24시간 동안 건조시켰다. 트립신 처리 후 시료의 무게 변화(%)를 계산하여 트립신 저항성을 구하였다.

**세포독성 평가.** L929 mouse fibroblast cells(L929)는 10% FBS와 1% penicillin이 함유된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. GEL/CSB 막을 125, 250, 500, 1000 ppm 농도로 96-well cell culture plate에 첨가하여 24시간 동안 배양 후 사용하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 MTT(3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT assay reagent) 용액을 처리하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 15분 반응시킨 후, ELISA reader(Biotex, USA)를 이용하여 570 nm 조건에서 흡광도를 측정된 뒤 세포생존율을 계산하였다. 각 실험은 모두 세 번씩 수행하였다.

**염기성 인산분해효소 측정.** MC3T3-E1 세포를 6-well plate에 각 well당 1×10<sup>5</sup>개씩 분주한 후 10% FBS, 1% 항생제, 50 µg/mL, ascorbic acid, 10 mM sodium β-glycerophosphate가 첨가된 α-MEM으로 2일간 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 미리 용해시켜 놓은 GEL/CSB 막을 2.5, 5, 10, 100 ppm 농도로 배지와 함께 첨가하고, 음성 대조군에는 증류수를 첨가한 후 각각 2일 동안 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고 trypsin/EDTA로 세포를 분리시키고 1500 rpm에서 6분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 다시 10초 동안 1500 rpm으로 원심 분리하였다. 완전히 상층액을 제거하고 0.5 mL의 멸균된 증류수를 첨가하여 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 mL에 0.1 M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2 mL, 15 mM pNPP(p-nitrophenyl phosphate) 0.1 mL, 0.1% Triton X-100/saline 0.1 mL와 멸균된 증류수 0.1 mL를 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 0.1 N NaOH를 0.6 mL 첨가하여 이들의 반응을 중지시켰다. 96-well plate에 200 µL씩 넣고 ELISA reader로 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

**동물실험.** 13마리의 수컷 Sprague-Dawley rat(체중 250~300 g, 10 주령)을 1주일간의 순응 기간을 거친 뒤 수술과정을 진행하였다. GEL/CSB(0.9:0.1, 0.7:0.3)조성 막을 각각 5마리에 처치하고 어떠한 치료도 하지 않은 대조군으로 세마리를 설정하였다. 모든 실험은 전남대학교의 동물실험 윤리위원회의 사전 승인 이후, 전남대학교 수의대학의 특정 항원

제어(specific pathogen free, SPF) 실험동물실과 준 SPF 환경의 설치류 사육실에서 전남대학교의 표준작업지침을 준수하며 진행하였다(승인번호: CNU IACUC-YB-2016-40). 본 연구에서 모든 전신마취제는 zoletil(50 mg/kg)과 rumpun(10 mg/kg)을 혼합하여 근육 주사하였다. 마취제 주입 후, rat의 두부에 시야확보와 무균적 수술환경을 위하여 전기면도기 및 1회용 면도기를 이용하여 절개 부위의 털을 제모하고 povidon-iodine 용액과 70% ethyl alcohol으로 살균하고 수술부위를 격리하였다. 2% lidocaine으로 국소 마취한 후 No.15 blade를 이용하여 rat의 두개골의 시상 봉합선을 따라 정중부에 절개를 가하고 골막기자를 이용하여 골막을 거상하고 박리하여 GEL/CSB막을 처치할 수 있도록 두개골을 충분히 노출시켰다. Trepine bur(내경 5mm)를 이용하여 두개골 시상 봉합선에 각 1개의 원형의 홈을 파서 막을 고정시켜 육안적 관찰과 micro-CT(Perkin Elmer)를 촬영하여 골 재생을 확인하였다.

**조직학적 평가.** 실험 후 4주에 각 군의 실험동물을 희생하고 두개골을 절제하였다. 절제해낸 조직을 10% 포르말린에 고정하고 5% nitric acid에 넣어 탈회시킨 후 파라핀 포매하였다. 이 블록을 3 µm 두께로 결손부의 중앙부에서 관찰면으로 절단하여 블록당 3장의 슬라이드를 제작하였다. 이를 Hematoxylin-Eosin(H-E) 염색법으로 염색하고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 토론

**민어부레의 아미노산 함량.** Glycine, proline, glutamic acid, arginine의 경우 골형성에 중요한 역할을 한다.<sup>10</sup> 민어부레를 GC-MS로 분석한 결과, 천연 L-아미노산인 glycyl-L-proline (C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 성분이 측정된 성분 중의 87% 이상 함유된 것을 확인하였다(Figure 1). 또한 구성 아미노산의 정량 분석결과 glycine 86.35 mg/g, proline 46 mg/g, glutamic acid 37.8 mg/g, arginine 23.92 mg/g 순으로 함량이 확인되었다(Table 1; 전체 아미노산 함량 328 mg/g).

**차폐막 형태.** Figure 2(a)은 돼지에서 추출한 콜라겐 조성 차폐막인 Bio-gide의 동결 건조된 형태로서 bilayer 구조를 가지고 있다. 동결 건조하여 얻은 막의 대부분은 물성이 낮고 빠른 분해율 및 흡수율을 가지고 있다.<sup>12</sup> GEL/CSB(0.7:0.3) 조성 막의 형태는 Figure 2(b)와 같다. GEL/CSB 막의 경우 중성 pH 값을 가지며 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>가 첨가된 D-PBS 용액 처리는 막의 가교에 영향을 주는 것을 관찰하였다. 열 건조 후 D-PBS로 처리하여 얻은 막의 형태는 얇은 투명한 필름형태로 확인되었다.

**IR 분석.** GEL/CSB의 조성비를 달리하여 막을 제조하였다. GEL과 CSB의 고유의 피크들이 확인되었다(Figure 3). CSB의 농도가 증가할수록 젤라틴의 펩타이드 밴드(C-N-H)에 해당하는 1543 cm<sup>-1</sup> 피크의 세기가 증가됨을 확인할 수 있었다.<sup>13</sup>

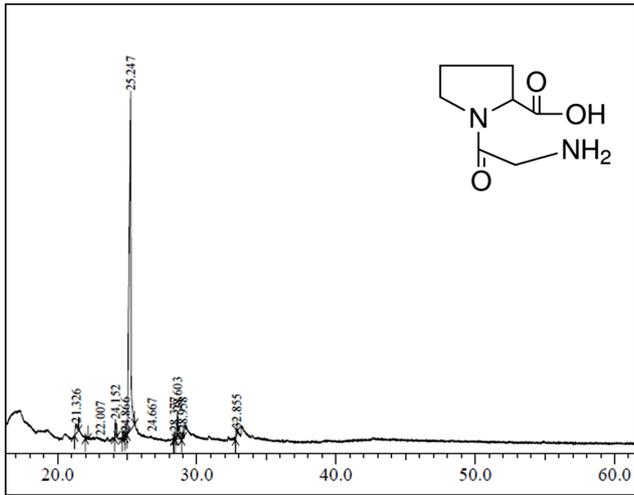


Figure 1. GC-MASS chromatogram of CSB extract.

Table 1. The Amounts of Total Amino Acids in the Dried CSB Extract

Amino acid	CSB (mg/g)
Aspartic acid	21.79
Threonine	10.96
Serine	9.87
Glutamic acid	37.87
Proline	46.00
Glycine	86.35
Alanine	40.39
Cystine	0.88
Valine	7.91
Methionine	7.05
Isoleucine	2.98
Leucine	8.28
Tyrosine	1.84
Phenylalanine	6.65
Histidine	2.818
Lysine	12.75
Arginine	23.92
Total	328.33

**XRD 분석.** D-PBS를 처리하지 않은 GEL 및 CSB 막과 D-PBS를 처리한 GEL/CSB 막의 결정성을 확인하였다(Figure 4). GEL과 CSB에서는 결정성이 크지 않았지만, D-PBS를 처리한 막에서 높은 강도의 고결정성 피크가 확인되었다. 특히, GEL의 농도가 증가할수록 결정 피크가 더 생기는 것을 관찰하였고 잘 결합되어 있음을 알 수 있었다.<sup>14</sup> 이는 D-PBS 내

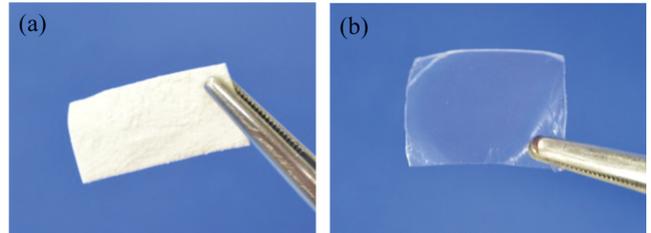


Figure 2. Photoimage of (a) Bio-gide membrane; (b) GEL/CSB (0.7:0.3) membrane.

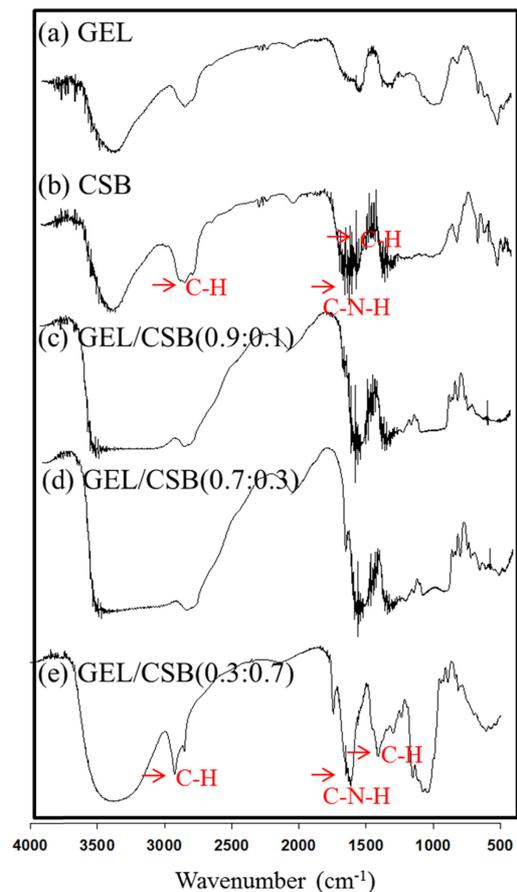
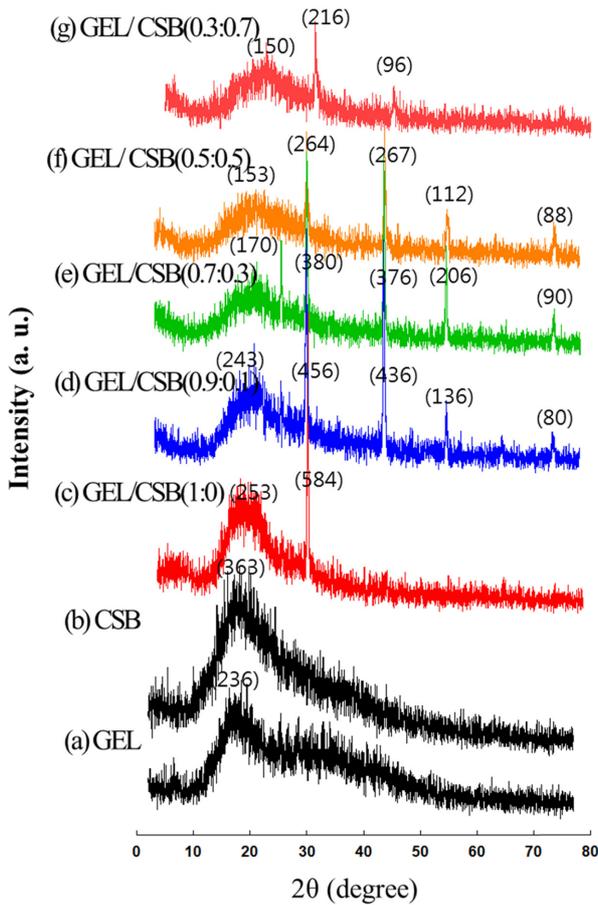


Figure 3. FTIR spectra of (a) pure GEL; (b) CSB; (c), (d), (e) GEL/CSB membrane with different ratio content.

의 양이온이 CSB보다는 음이온 다당인 GEL과 가교 결합하여 결정성 물질을 형성하는 것을 나타낸다.

**인장강도 측정.** GEL/CSB의 각 비율대로 제조한 막을 열 건조 후 인장강도를 측정된 결과 대조군으로 선정한 Bio-gide 막은  $6.4 \pm 0.12$  MPa이었고, 조성비율에 따라 GEL/CSB막의 인장강도 값의 변화를 관찰하였다. GEL 1% 농도에 D-PBS를 처리한 막에서는  $9.48 \pm 0.51$  MPa 값을 나타냈으며 GEL/CSB(0.9:0.1) 막은  $11.89 \pm 0.24$  MPa로 가장 높은 인장강도 값을 나타냈다. 이는 다당과 단백질의 결합력에 기인한 것으로

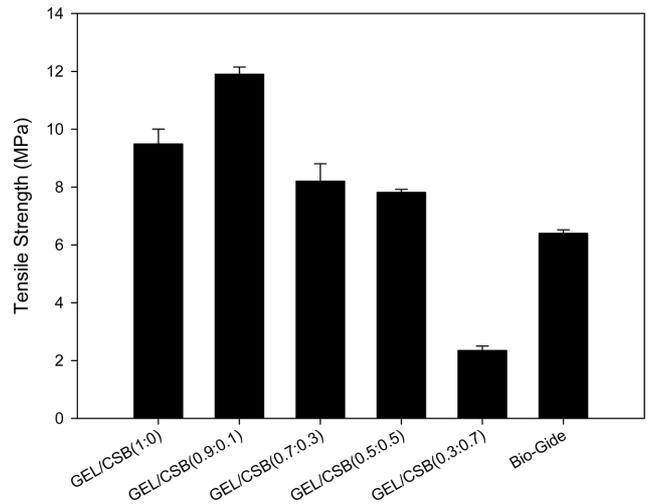


**Figure 4.** X-ray diffraction patterns of (a) GEL; (b) CBS; (d), (e), (f), (g) GEL/CBS mixture using cross-linking D-PBS solution.

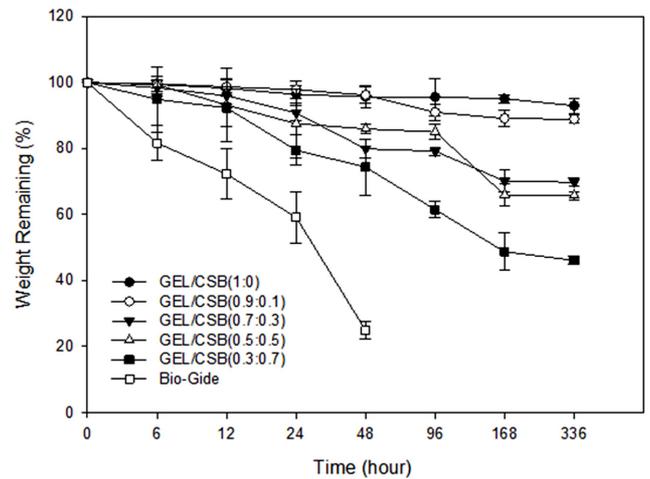
판단된다. GEL/CBS(0.5:0.5) 막과 GEL/CBS(0.3:0.7) 막에서는 CSB의 비율이 증가됨에 따라 인장강도 값이 낮아지는 것을 관찰하였다(Figure 5). 또한 CSB의 비율이 높을수록 막이 찢어지는 것을 관찰하였다. 고분자의 인장강도는 가교밀도와 밀접한 상관관계가 있다.<sup>15</sup> GEL 고분자에 반응하는 D-PBS의 처리로 가교밀도가 증가하면 인장강도가 증가되는데 반대로 CSB의 농도가 늘어남에 따라 가교밀도가 낮아져 인장강도가 낮아지는 것으로 사료된다.

Silk fibroin nanofibrous로 제조한 흡수성 차폐막의 인장강도 값은 9.4 MPa로 Bio-gide 막보다 20% 정도 높았다.<sup>16</sup> 본 연구의 실험막이 Bio-gide 막과 silk fibroin 막에 뒤지지 않는 인장강도 값을 보였으며 사용되는 목적과 범위에 따라 비율을 달리하여 다양하게 활용 가능할 것으로 판단된다.

**막의 효소저항성 평가.** 의료기기에 사용되는 콜라겐의 평가 방법을 적용시켜 실험에 적용하였다. GEL의 비율이 높을수록 막의 형태를 그대로 유지하고 있는 것을 확인하였다. 그러나 CSB의 농도가 높아질수록 분해율이 높아지는 것은 CSB의 주요성분이 트립신에 의해 분해되기 때문이다. CSB의 농



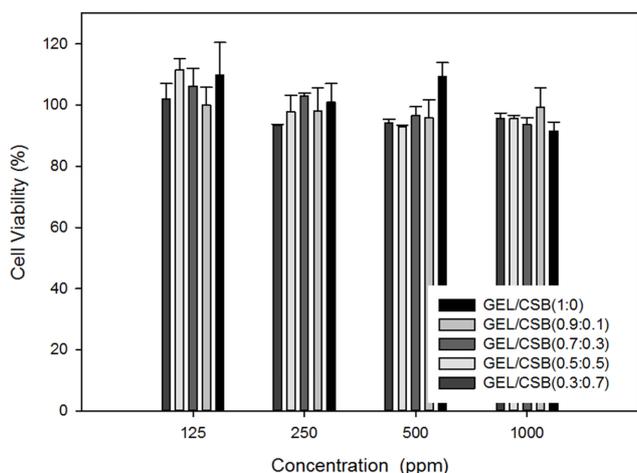
**Figure 5.** Tensile strength of GEL/CSB membrane with different ratio content and Bio-gide.



**Figure 6.** Weight remaining of GEL/CSB membrane with different ratio content (●, ○, ▼, △, ■) and Bio-gide (□).

도가 높은 GEL/CSB(0.3:0.7) 조성 막의 경우 7일이 지나면서 막의 50%가 분해되는 것을 관찰하였고, 대조군으로 관찰한 돼지 콜라겐 조성의 Bio-gide의 경우 48시간이 지나면서 분해되어 막의 형태가 사라져 더 이상 분해도 측정을 할 수가 없었다(Figure 6). Bio-gide 같은 콜라겐 막은 뛰어난 세포 친화성과 생체 적합성을 가지고 있지만, 대식세포와 다형핵 백혈구 작용에 의한 빠른 biodegradation은 흡수성 차단 막에서 중요한 문제점으로 인식되고 있다.<sup>17,18</sup> Bio-gide의 경우 기능을 연장시키기 위해 자외선조사, glutaraldehyde 처리 등 다양한 가교방법이 개발되었고 세포증식 및 골모세포의 부착과 증식 억제 및 혈관화와 조직 부착의 저해 문제가 보고되었다.<sup>19</sup>

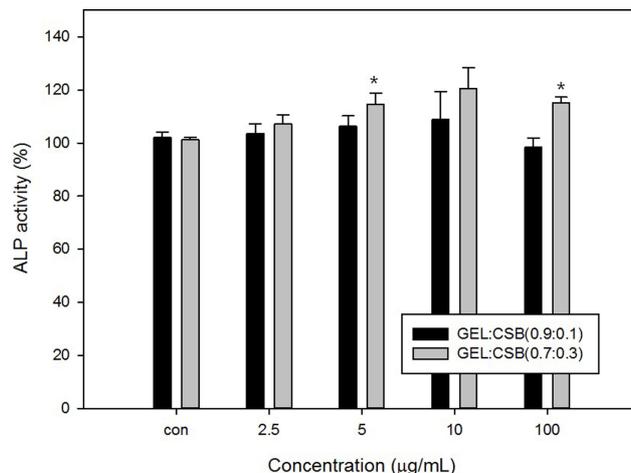
**세포독성 평가.** 생체 내에 사용되는 소재의 세포독성은 ISO10993법에 따라 L929세포로 평가하였다. GEL/CSB 조성



**Figure 7.** Cell viability of GEL/CSB membrane with different ratio content.

막의 세포독성을 분석하기 위하여 세포의 생존율을 비교하였다. 각 조성에 따른 막의 용출액은 모든 농도에서 80% 이상으로 독성이 거의 없었다(Figure 7). 본 실험에 이용된 막은 세포에 독성이 없는 생체 소재로 체내 삽입이 가능하며, 생체재료로서 다양한 응용도 가능할 것으로 사료된다.

**염기성 인산분해효소 측정.** 조골세포는 세포막에 염기성 인산분해효소를 가지고 있고, 이 효소는 세포의 외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산은 운반, 세포 분열, 분화의 조절자 역할을 하며 조골세포

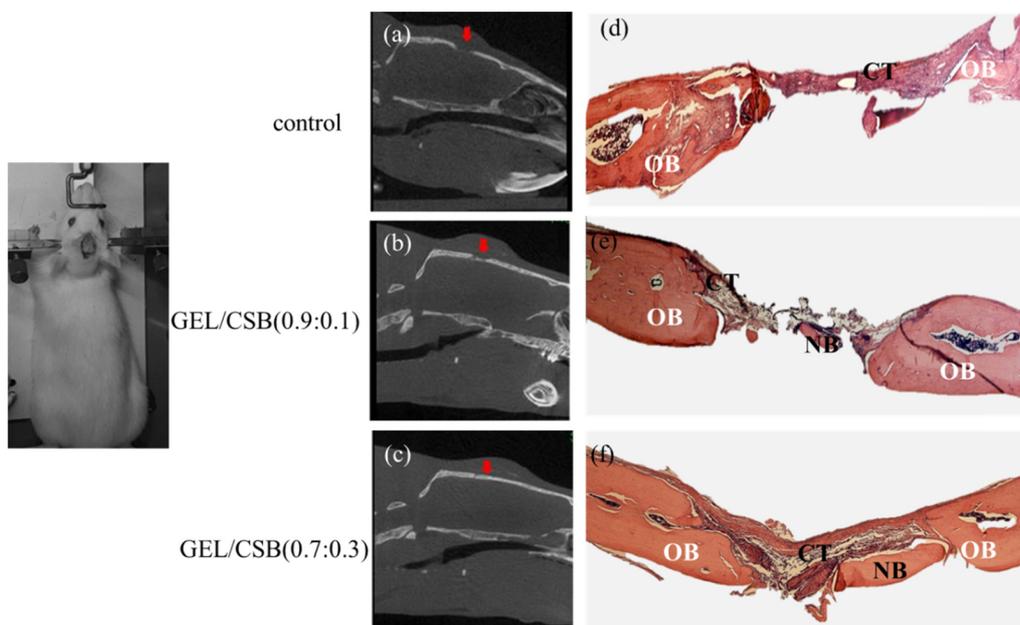


**Figure 8.** ALP activity in MC3T3-E1 cells treated with 2.5, 5, 10 and 100 µg/mL concentrations of GEL/CSB is compared with untreated control cells (\* $p < 0.05$ ).

활성의 표지인자로 널리 알려져 있다.<sup>20</sup> 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 조골세포 활성화의 지표효소로 널리 알려진 alkaline phosphatase를 측정하였다.

GEL/CSB(0.9:0.1) 조성 막과 (0.7:0.3) 조성 막은 10 µg/mL의 농도에서 각각 108.82±10.44%, 120.47±8.03%의 ALP 효소 활성을 보였으며 100 µg/mL의 농도에서 ALP 효소 활성이 다소 억제되는 것을 관찰하였다(Figure 8).

**Micro-CT 평가.** GEL 조성 차폐막의 역할에 대한 가능성



**Figure 9.** Three-dimensional reconstructed and sagittal surface images of bone defects covered without membrane (control) (a) and with GEL/CSB(0.9:0.1)(b), 0.7:0.3(c) membrane, at 4 week. Histological sections of bone defects and surrounding tissue, covered with GEL/CSB membrane (e), (f) (magnification ×10) and without membrane (d)(magnification ×10). OB(original bone); CT(connective tissue).

을 평가하고자 동물실험을 진행하였다. 골 이식재를 따로 첨가하지 않고 골 결손부에 GEL/CSB 조성 막의 인장강도 값이 가장 높은 막을 선택하여 처치한 후 단순결절 봉합 후 4주 후에 호흡 마취시킨 rat의 micro-CT를 촬영하였다.

GEL/CSB 조성 막을 처치한 그룹에서 신생골 형성에 도움을 주는 것을 관찰하였다(Figure 9). 아무것도 처치하지 않은 그룹에서는 4주 후 자연스럽게 치유되면서 형성되는 미약한 결합조직(connective tissue)의 생성을 볼 수 있었다. Micro-CT로 체적 표현(volume rendering)한 결과 새로 형성된 체적은 0.36 mm<sup>3</sup>이었다. GEL/CSB(0.9:0.1, 0.7:0.3) 조성 막을 처치한 경우 CSB 함량이 더 많은 GEL/CSB(0.7:0.3) 조성 막에서 신생골 형성능을 위한 조직결합 및 골모세포를 관찰하였고 체적 표현 결과 0.49, 1.47 mm<sup>3</sup>이 산출되었다(Figure 9(b), (c)). 조직학적 평가에서도 CSB의 함량이 높은 차폐막을 처치한 그룹에서 신생골 형성에 도움이 되는 성장인자들이 함께 증식되는 것을 확인하였다(Figure 9(d), (e), (f)). 동물의 조직에서 추출된 동물유래 콜라겐의 경우 뼈 형성과 분화에 영향을 주는 연구결과가 보고되고 있다.<sup>21</sup> GEL을 이용한 치과용 차폐막의 연구에서는 GEL이 가지고 있는 음전하 성질 때문에 섬유아세포 이주를 저해하는 것을 확인할 수 있었고, CSB에 아미노산의 성분은 골재생에 도움을 주는 것을 확인하였다.

## 결 론

GEL/CSB 조성 막은 0.9:0.1, 0.7:0.3, 0.5:0.5, 0.3:0.7 조성 비로 막을 제조하고 물리적 특성을 관찰하였다. GEL/CSB 조성 막의 인장강도는 기존의 돼지 콜라겐 조성 Bio-gide 차폐막보다 높았으며 다량의 아미노산이 함유된 CSB은 골 재생에 영향을 주는 것을 확인하였다. 하지만, CSB의 농도가 증가될수록 인장강도, 분해도가 낮아지는 것을 관찰하였다. GEL/CSB(0.9:0.1, 0.7:0.3) 조성 막을 조골세포 MC3T3-E1에 처리하여 alkaline phosphatase(ALP)를 측정 한 결과 GEL/CSB(0.7:0.3) 막에서 증가된 값을 관찰하였고 micro-CT를 이용한 동물실험에서도 수술 4주 후 GEL/CSB 막으로 처리한 그룹에서 신생골 형성에 도움이 되는 결합조직 세포와 뼈 조직 세포를 관찰하였다. 이 결과 GEL/CSB 조성 막은 골재생 막으로 활용 가능성이 높은 것을 확인하였다.

**감사의 글:** 이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2015H1C1A1035894), 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2016R1A6A3A11935439).

## 참 고 문 헌

1. Y. Zubery, A. Goldlust, A. Alves, and E. Nir, *J. Periodontol.*, **78**, 112 (2007).
2. A. H. Zisch, S. M. Zeisberger, M. Ehrbar, V. Djonov, C. C. Weber, A. Ziemiecki, E. B. Pasquale, and J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **25**, 3245 (2004).
3. Z. Cheng and S. H. Teoh, *Biomaterials*, **25**, 1991 (2004).
4. K. W. Owens and R. A. Yukna, *Implant Dent.*, **10**, 49 (2001).
5. C. Dahlin, A. Linde, J. Gottlow, and S. Nyman, *Plast. Reconstr. Surg.*, **81**, 672 (1988).
6. H. L. Kim, M. S. Hong, S. J. Kim, H. S. Jo, I. S. Yoo, D. W. Lee, and G. S. Khang, *Polym. Korea*, **35**, 378 (2011).
7. D. R. Pereira, R. F. Canadas, J. S. Correia A. P. Marques, R. L. Reis, and J. M. Oliveira, *Key Eng. Mater.*, **587**, 255 (2014).
8. S. J. Chang, S. M. Kuo, W. T. Liu, C. C. G. Niu, M. W. Lee, and C. S. Wu, *J. Med. Biol. Eng.*, **30**, 99 (2010).
9. Y. J. Jung, S. E. Jung, Y. K. Lee, J. H. Kim, J. E. Kim, E. P. Lee, H. W. Choi, H. S. Kim, J. H. Lee, B. C. Kang, J. S. Wan, and D. Y. Hwang, *Biomater. Res.*, **13**, 87 (2009).
10. S. Viquet-Carrin, P. Gamero, and P. D. Delmas, *Osteoporos. Int.*, **17**, 319 (2006).
11. J. Kim, D. I. Shin, and K. Y. Lee, *Polym. Korea*, **40**, 397 (2016).
12. Z. Li, H. R. Ramay, K. D. Hauch, D. Xiao, and M. Zhang, *Biomaterials*, **26**, 3919 (2005).
13. R. N. Hafidz, C. M. Yaakob, I. Amin, and A. Noorfaizan, *Int. Food Res. J.*, **18**, 813 (2011).
14. H. P. Klug and L. E. Alexander, *X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials*, 2nd, New York, Wiley-Interscience, 1974.
15. V. Vijayabaskar, V. K. Tikku, and A. K. Bhowmick, *Radiat. Phys. Chem.*, **75**, 779 (2006).
16. S. Lu, P. Wang, F. Zhang, X. Zhou, B. Zuo, X. You, Y. Gao, H. C. Liu, and H. Tang, *Am J. Transl. Res.*, **7**, 2244 (2015).
17. T. J. Oh, S. J. Meraw, E. J. Lee, W. V. Giannobile, and H. L. Wang, *Clin. Oral. Implants. Res.*, **14**, 80 (2003).
18. K. W. Owens and R. A. Yukna, *Implant Dent.*, **10**, 49 (2001).
19. S. I. Baek, H. W. Roh, G. B. Kim, C. M. Shin, J. Y. Yi, J. Y. Bang, M. A. Kim, W. S. Yang, E. J. Cho, H. J. Oh, H. J. Oh, G. H. Ryu, and Y. H. Cho, *Biomater. Res.*, **14**, 10 (2010).
20. S. J. Chang, S. M. Kuo, W. T. Liu, C. C. G. Niu, M. W. Lee, and C. S. Wu, *J. Med. Biol. Eng.*, **30**, 99 (2010).
21. H. Kuk, H. M. Kim, S. M. Kim, E. Y. Kim, J. E. Song, S. Y. Kwon, D. S. Suh, C. H. Park, and G. S. Khang, *Polym. Korea*, **39**, 846 (2015).