

백서 두개골 결손모델에서 골형성단백질이 함유된 헤파린 결합 박테리아 셀룰로오스 지지체가 골재생에 미치는 영향

정성린[#] · 안성준[#] · 김세은^{*} · 이소현^{**} · 박종석 · 권희정 · 강성수^{*} · 허중보^{**} · 임윤묵[†]

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부, *전남대학교 수의대학, **부산대학교 치과대학
(2016년 12월 8일 접수, 2016년 12월 23일 수정, 2016년 12월 30일 채택)

Efficacy of rhBMP-2 on Heparin Immobilized Bacterial Cellulose Scaffolds for Bone Tissue Engineering in Rat Calvarial Defect Model

Sung In Jeong[#], Sung-Jun An[#], Se Eun Kim^{*}, So-Hyoun Lee^{**}, Jong-Seok Park, Hui-Jeong Gwon,
Seong Soo Kang^{*}, Jung-Bo Huh^{**}, and Youn-Mook Lim[†]

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
1266 Sinjeong-dong Jeongeup-si Jeollabuk-do 56212, Korea

^{*}Department of Veterinary Surgery, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

^{**}Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Pusan National University, Dental Research Institute,
Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan, Gyeongnam 50612, Korea

(Received December 8, 2016; Revised December 23, 2016; Accepted December 30, 2016)

초록: 조직공학용 나노섬유 지지체의 3차원 고공극 구조는 세포의 부착과 성장에 적합하고, 지지체 내에 영양분과 불순물이 통과되어야 한다. 최근에 우리 연구실에서는 감마선과 EDC/NHS 화학반응을 이용하여 조직공학용 bacterial cellulose(BC) 지지체에 heparin과 2-aminoethyl methacrylate(AEMA)을 표면 개질하였다. 본 연구에서는 백서 두개골 결손 모델을 이용하여 recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) 함유 유무에 따른 헤파린 결합 박테리아 셀룰로오스 지지체가 신생골 형성에 미치는 영향을 평가하려고 한다. 지지체의 골형성 효과를 평가하기 위해서 지지체를 백서 두개골에 식립 8주 후에 방사선학적 및 조직학적 평가를 통해 지지체에 대한 임상학적인 측면에서 골결손부 크기, 신생골 재생속도, 염증반응 등을 평가하였다. 골형성 단백질이 함유된 헤파린이 결합 박테리아 셀룰로오스는 두개골 결손 모델에서 골형성을 촉진하였다. 이는 조직공학적으로나 임상학적으로 우수한 특성을 가지고 있다고 사료된다.

Abstract: Nanofibrous scaffolds for tissue regeneration need to be three-dimensional and highly porous to support uniform cell attachment and proliferation, and need to have an interconnected and permeable pore network to promote nutrient and waste exchange. Our laboratory recently developed heparin and 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) immobilized bacterial cellulose (BC) scaffolds for tissue engineering using gamma-irradiation and EDC/NHS chemistry. Here, we examined *in vivo* efficiency of a heparin immobilized AEMA-BC nanofibrous scaffolds under the condition of with or without recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for a therapeutic substrate in bone healing. To evaluate the bone healing effect of the scaffolds, they were evaluated at 8 weeks post-operatively according to the following criteria: size of residual defect area, speed of new bone formation, inflammation, and clinical applicability of the material. This heparin immobilized AEMA-BC scaffolds and rhBMP-2 independently facilitated a bone healing of the calvarial defect for its good biocompatibility. It holds a great potential for a clinical application and tissue engineering.

Keywords: bacterial cellulose, gamma-irradiation, 2-aminoethyl methacrylate, heparin, bone tissue engineering.

[#]These two authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ymlim71@kaeri.re.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

서 론

재조합 골형성 단백질[Human Recombinant Bone Morphogenic Proteins-2(rhBMP-2)]은 TGF- β super family로 골재생 과정에서 줄기세포를 조골세포로 분화시켜 신생골 형성을 한다는 것이 알려져 있다.¹⁻⁵ 활성도의 반감기가 짧은 rhBMP-2의 골형성 및 골유도능을 효과적으로 전달하기 위해서 주위 조직에 유해하지 않으면서도 신생골 형성과 더불어 rhBMP-2의 서방출이 가능한 지지체의 연구가 많이 시도되고 있는데, 이러한 전달체로는 heparin-alginate hydrogels, rhBMP-2 loaded heparin-conjugated PLLA fibrous particles, rhBMP-2-heparin-conjugated PLGA scaffold, electrospun heparin-alginate nanofibres 등이 있다.⁶⁻¹⁰ 특히, heparin이 도입된 조직공학용 지지체를 이용하여 골형성 인자와 같은 성장인자들의 방출을 조절할 수 있는 연구들이 많이 보고되었다.

그러나 기존의 heparin을 생체재료 표면에 도입시키기 위해서는 가교제나 개시제와 같은 화학물질을 사용할 경우 미 반응 또는 미 제거된 화학물질의 독성으로 인해 생체적합성이 낮아지는 경우가 많다.^{11,12} 최근에 이를 극복하기 위해서 본 연구팀에서는 방사선의 이온화에너지를 이용하여 동시에 의료용 고분자와 아크릴계 단량체인 acrylic acid, 2-aminoethyl methacrylate 등을 도입하고 EDC/NHS 반응을 통해 헤파린을 도입하는 연구를 수행하였으며, 이를 통해 성장인자를 고정하거나 서방출이 가능한 조직공학용 지지체로서의 가능성을 확인하였다.^{13,14} 특히, 미생물을 발효시켜 생산하는 박테리아 셀룰로오스(bacterial cellulose, BC)는 리그닌과 헤미셀룰로오스를 함유한 식물성 셀룰로오스에 비해 순수한 β -1,4 glucan 만으로 형성된 셀룰로오스 나노섬유가 복잡하게 얽힌 3차원 망상구조를 가지고 있다.¹⁵ 나노섬유 구조를 갖는 박테리아 셀룰로오스는 인체 내 세포 외 기질과 유사한 구조로 인해 조직공학용 지지체 연구가 많이 진행되고 있다.^{16,17}

따라서 본 연구에서는 방사선을 이용하여 rhBMP-2의 서방출을 위한 헤파린이 도입된 골재생용 박테리아 셀룰로오스 지지체를 제조하였으며, 백서 두개골 critical size defect(CSD)

모델을 통해 골 결손 부위에서 rhBMP-2 단백질 서방출을 위한 헤파린이 도입된 박테리아 셀룰로오스 지지체가 효과적인 골형성을 유도능에 대한 가능성을 평가해 보고자 한다.

실 험

재료 및 시약. 박테리아 셀룰로오스(bacterial cellulose, BC)는 (주)자담에서 감귤 껍질을 발효하여 *gluconacetobacter hansenii* TL-2C 균의 대사산물로 제조하여 사용하였다. 메탄올은 Duksan reagent(Ansan, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며, 2-aminoethyl methacrylate(AEMA), *N*-(3-dimethylamionipropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), *N*-hydroxysuccinimide(NHS), 4-morpholinoethanesulfonic acid (MES), 헤파린은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 그리고 rhBMP-2는 Peptrotech(Rocky Hill, NJ, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 다른 정제 과정 없이 사용하였다.

헤파린 Immobilized AEMA-BC 지지체 제조. 5 wt% AEMA 수용액은 AEMA를 메탄올에 넣고 상온에서 30분 동안 교반하여 만들었고 BC 지지체를 수용액에 6시간 동안 담침한 후에 ⁶⁰Co 선원의 감마선(ACEL type C-1882, Korea Atomic Energy Institute)을 선량률 10 kGy/hr로 25 kGy를 조사하였다. 미 반응된 AEMA의 단량체와 고분자를 제거하기 위해서 3차 증류수를 이용하여 4일 동안 세척하였다. AEMA가 표면 처리된 박테리아 셀룰로오스에 헤파린을 도입하기 위해서 0.1 M MES buffer solution(pH 5.07, 5 mg/mL)에 AEMA-BC를 1시간 동안 담근 후 꺼내어 0.1 M MES buffer solution(pH 5.07, 5 mg/mL)에 EDC, NHS 그리고 헤파린을 녹인 용액에 넣고 12시간 동안 교반한 후, 미 반응된 헤파린을 제거하기 위해서 MES와 PBS로 24시간 동안 세척하고 -80 °C의 저온냉동고에서 2일 동안 얼린 후에 동결건조기를 이용하여 3일 동안 동결건조하였다.¹⁶ 70% 에탄올에 담지한 후 UV 멸균된 헤파린 도입 박테리아셀룰로오스에 rhBMP-2를 결합하였으며 전체적인 모식도를 나타내었다(Figure 1). 또

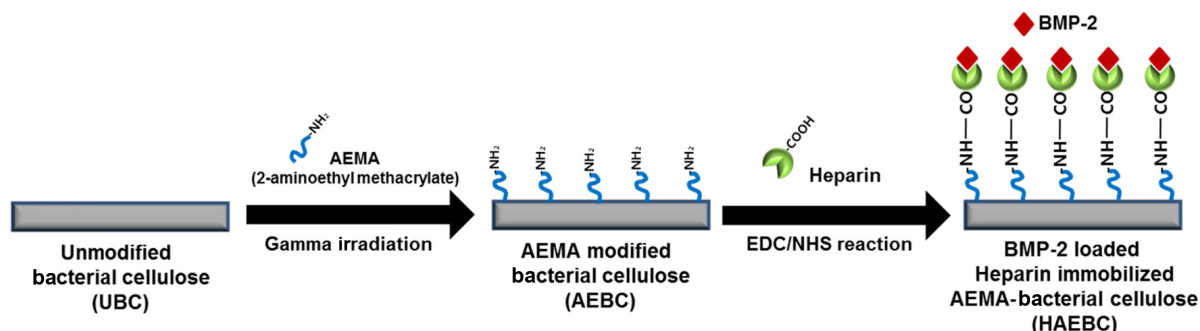


Figure 1. Schematic diagram of heparin immobilized AEBC nanofibrous scaffolds using gamma-irradiation and EDC/NHS reaction methods.

한 아무 처리 하지 않은 BC를 unmodified BC(UBC), AEMA가 도입된 BC를 AEMA grafted BC(AEBC), 헤파린이 추가로 도입된 AEBC를 heparin immobilized AEMA-BC(HAEBC)로 명명하였다.

주사전자 현미경(SEM) 분석. UBC, AEBC, HAEBC의 표면과 단면의 형태학적 구조를 확인하기 위해 주사전자현미경(S-4500, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였다. 고해상도의 이미지를 얻기 위해서 sputter coater를 이용하여 90 초 동안 백금코팅을 하였으며, 전자빔 15 kV, 5.3-5.4 mm의 거리의 조건에서 배율($\times 5000$, $\times 10000$, $\times 20000$, $\times 50000$)로 측정하였다.

감식 전반사 적외선 분광(ATR-FTIR) 분석. UBC, AEBC, HAEBC 지지체의 화학적 특성을 ATR-FTIR spectrophotometer (Bruker TENSOR 37, Bruker AXS. Inc., Germany)로 사용하였으며, spectra는 $750-1850\text{ cm}^{-1}$ 의 범위를 측정하였으며, ATR 모드와 주사회수는 64회, 4 cm^{-1} 분해능의 조건으로 측정하여 확인하였다.

동물실험군 및 수술. 본 연구는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 연구윤리위원회의 승인을 얻은 후, 위원회의 감독을 받으며 수행하였다(KAERI-IACUC-2013-004).¹⁷ 9주령 Sprague-Dawley 백서(체중 250-300 g, Oriental Bio Co, Charles River Korea, Korea) 18마리를 사용하였으며, 이식재(UBC, n=6; UBC loaded BMP-2, n=6; HAEBC loaded BMP-2, n=6; diameter: 8 mm)에 따라 3개 군으로 분류하여 실험하였다. 동물을 xylazine(Rompun, Bayer Korea Ltd, Korea)과 tiletamin-zolazepam(Zoletil, Vibac Laboratories, Carros, France)의 혼합액을 사용하여 마취하였다. Sprague-Dawley 백서 전두부의 털을 삭모하고 포비돈 솜으로 소독한 후, 2% lidocaine HCL(Yu-Han Co., Gunpo, Korea)으로 부분 마취 후에 비골에서 후두골 사이의 두개골 시상봉합을 따라 약 5 cm 가량 절개를 가한 다음 골막을 포함하는 피판을 거상하여 두정골까지 노출시켰다. 백서 두정부에 8 mm trephine bur(3i Implant Innovation, Palm Beach Garden, FL, USA)을 소형 카바이드 라운드 버에 고정된 후에 저속 드릴 키트를 사용하여 직경 8 mm의 원형 결손부를 형성하였다. 골결손부에는 rhBMP-2(25 μg)+UBC, rhBMP-2(25 μg)+HAEBC, 그리고 rhBMP-2를 추가하지 않은 UBC를 각 군의 동물에 이식하였으며, 피부는 4-0 흡수성봉합사(Vicryl, Ethicon, Somerville, NJ, USA)를 사용하여 봉합하였다(Figure 2).

방사선학적 분석. 수술 후 8주에 백서를 희생시킨 후 채취한 표본은 채취된 조직을 먼저 캐비닛형 soft X-ray(distance of 10 cm(60 kVp, 300 mA), Rotanode, Toshiba, Japan)로 방사선사진을 채득하였다. 다음에는 micro-CT(SkyScan Desktop micro-CT 1172, SkyScan, Belgium)는 스캐너 내부에 있는 turntable에 표본을 고정된 후 수평 및 수직으로 움직여 위치를 조정하고 0.05 mm 두께의 절편으로 단층촬영을 시행하였

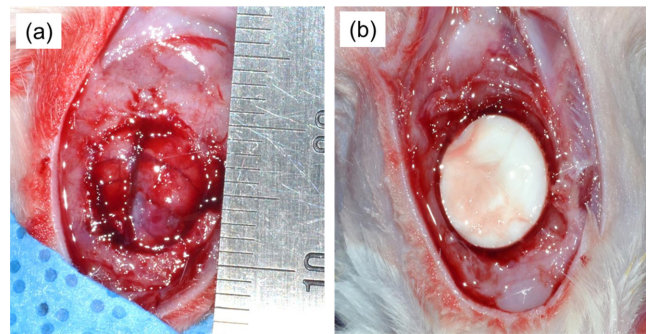


Figure 2. *In vivo* operation procedure of full-thickness rat calvarial defects: (a) The 8 mm-diameter defect of cranium was created with a trephine bur; (b) The defect site enclosed with BC scaffolds.

다. 촬영된 이미지는 MicroView software(NRecon, SkyScan)를 이용하여 삼차원으로 재구성되었다.

조직학적 분석. 각 조직표본들을 조직학적 분석을 위해 10% 중성 포르말린에 고정하였으며, 10% formic acid로 탈회한 후 ethyl alcohol 및 xylene를 이용하여 탈수시킨 조직을 파라핀에 포매하였다. 파라핀 블록을 4 μm 두께로 절단한 후 박절편을 만들어 Hematoxylin and Eosin(H&E)과 Masson-Trichrome(M-T) 염색을 시행하였다. H&E와 M-T 염색을 시행한 조직표본은 ArtiScan 4000TF(Microtek, USA)로 영상주사한 후, SPOT(version 4.6, Diagnostic Instrument, Inc, USA)로 화상화하였다.

결과 및 토론

주사전자 현미경(SEM) 분석. 방사선을 이용하여 헤파린과 AEMA가 도입된 박테리아 셀룰로오스 표면과 단면의 형태학적 변화를 확인하기 위해 SEM을 측정하였다(Figure 3, 4). 박테리아에서 생산된 박테리아 셀룰로오스는 3차원 다공성의 나노섬유로 인체조직의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 같은 나노섬유로 이루어졌다.^{18,19} 이러한 나노섬유 구조는 인체 조직 ECM 구조와 유사한 형태에 따른 세포의 신호전달을 통해 세포 접착, 증식, 분화가 촉진되고 정상적인 단백질 발현을 통해 조직재생에 중요한 역할을 한다.²⁰ Figure 3에서 보는 바와 같이 AEMA를 감마선 조사하여 표면 개질된 AEBC와 헤파린을 EDC/NHS 반응에 의해 도입된 HAEBC의 표면 구조는 표면처리되지 않은 UBC 표면의 나노섬유보다 공극이 감소하면서 섬유와 섬유가 붙어 있거나 개질된 나노섬유의 두께가 증가되는 것을 확인하였다. 이런 현상은 방사선에 의해 이온화된 UBC의 나노섬유 표면과 AEMA의 비닐기가 이온화되어 그래프트 중합(graft polymerization)에 의해 균일하게 poly(AEMA)가 합성되면서 되는 현상으로 사료된다. 만약, 방사선 조사 시 AEMA 단량체가 단일중합체로 인해 하이드로젤이 형성되었다고 하면 나노

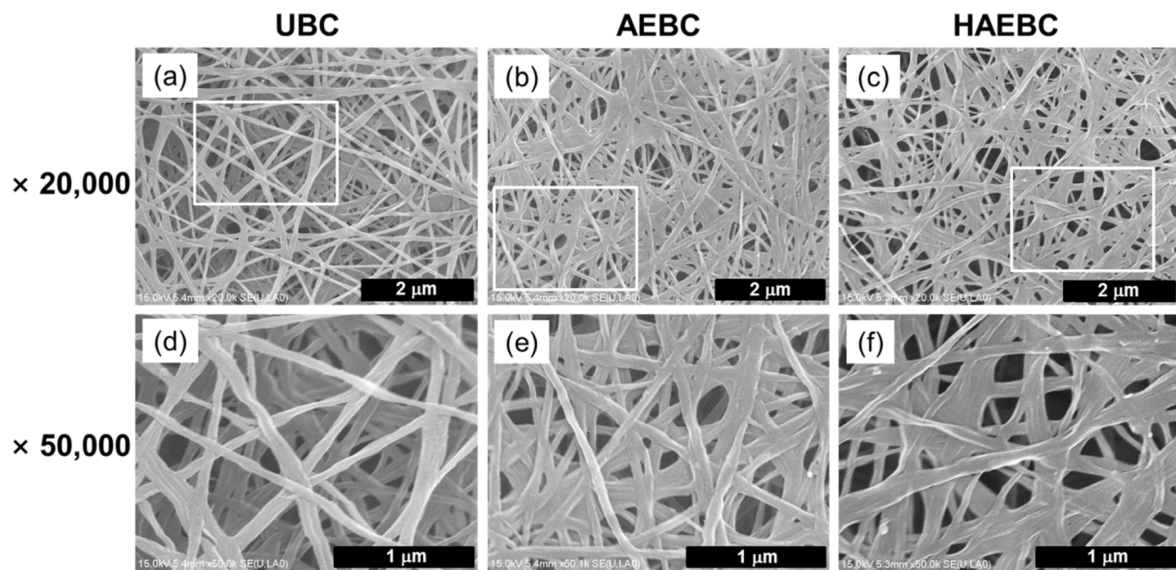


Figure 3. Scanning electron micrographs (SEM) of top surface of (a, d) unmodified bacterial cellulose (UBC); (b, e) AEMA-modified bacterial cellulose (AEBC) at 25 kGy; (c, f) heparin-AEMA-modified bacterial cellulose (HAEBC) nanofibrous scaffolds.

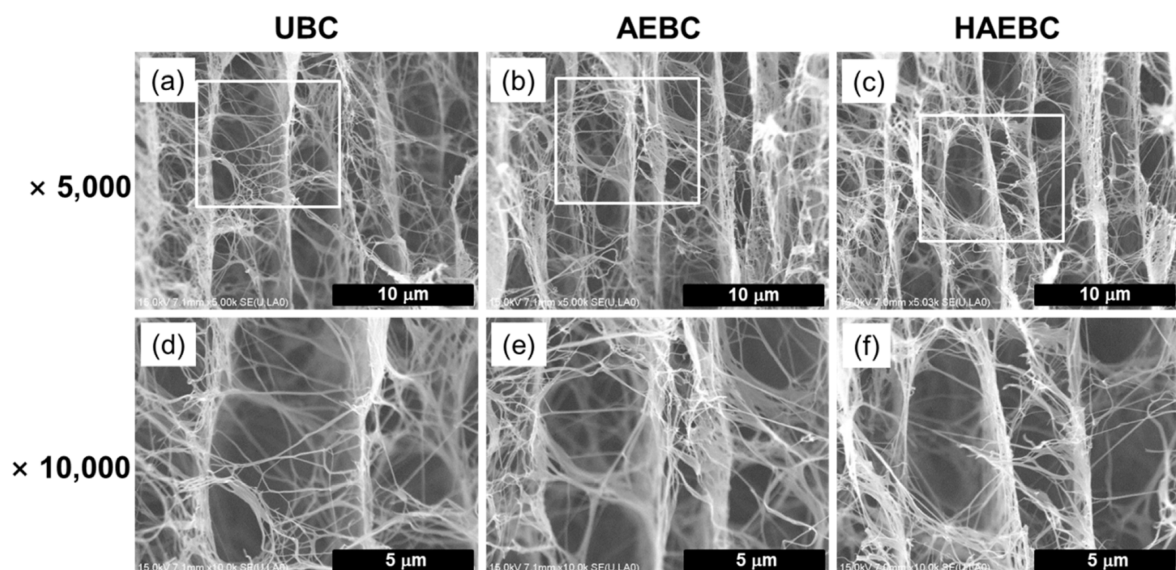


Figure 4. Scanning electron micrographs (SEM) of cross-section of (a, d) unmodified bacterial cellulose (UBC); (b, e) AEMA-modified bacterial cellulose (AEBC) at 25 kGy; (c, f) heparin-AEMA-modified bacterial cellulose (HAEBC) nanofibrous scaffolds.

섬유의 공극 사이로 poly(AEMA) 생성으로 공극이 막히는 현상이 일어난다. 하지만, 본 실험 조건인 메탄올에 녹인 5 wt% AEMA와 감마선 선량 25 kGy의 조건에서는 poly(AEMA) 하이드로젤은 생성되지 않았고 BC 표면에 균일하게 AEMA가 개질된 것으로 사료된다. 또한 AEBC와 HAEBC의 형태에는 영향이 없는 것으로 보아, EDC/NHS 반응을 통해 헤파린 도입에 따른 형태의 변화는 영향이 없음을 확인할 수 있었다.

Figure 4에서 보는 바와 같이 표면처리되지 않은 UBC와

AEMA를 감마선 조사하여 표면 개질된 AEBC와 헤파린을 EDC/NHS 반응에 의해 도입된 HAEBC의 단면 구조는 유사한 형태학적 구조로 관찰되었다. 이는 표면 처리된 AEMA와 헤파린이 나노섬유에 아주 얇은 층으로 개질되었기 때문이라고 사료된다. 또한 모든 지지체의 단면에서 벌집 구조로 형성된 이유는 동결 건조시 BC에 함유된 물이 동결에 의해 얼은 물의 결정이 승화되면서 공간이 생성되는 것으로 일반적인 천연고분자인 젤라틴, 알긴산, 키토산 등을 증류수에 동결

건조법으로 제조된 지지체의 형태학적 구조와 유사하다는 것을 알 수 있었다. 이런 구조는 세포의 침투로 인한 빠른 조직성장과 원활한 기체 및 액체가 교환할 수 있는 구조를 갖는 조직공학용 지지체로서의 장점을 가지고 있다.

감식 전반사 적외선 분광(ATR-FTIR) 분석. ATR-FTIR을 이용하여 UBC, AEBC, HAEBEC와 rhBMP-2를 함유된 HAEBEC의 화학적 특성 분석을 실시하였다(Figure 5). 방사선 조사 전의 UBC와 rhBMP-2, AEMA, 헤파린 등이 도입된 박테리아 셀룰로오스의 경우 1659 cm^{-1} 에서 카보닐 그룹이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 감마선 선량 25 kGy 에서 AEMA가 도입된 AEBC에서 AEMA의 카보닐 그룹이 1724 cm^{-1} 에서 강하게 흡수되는 것으로 보아 감마선 조사로 AEMA의 아크릴기의 이중결합이 이온화되어 수용액 상에서 개질 중합을 통해 UBC 표면에서 AEMA가 도입되었다는 것을 확인하였다.²¹ 또한 EDC/NHS 반응을 통해 AEBC의 아민기와 헤파린의 카복실 그룹이 결합됨에 따라 1724 cm^{-1} 에서 AEMA의 카보닐 그룹이 사라지며 1543 cm^{-1} 에서 아마이드 그룹이 확인되었다.^{22,23} 이를 통해 감마선 조사와 EDC/NHS 반응을 통해

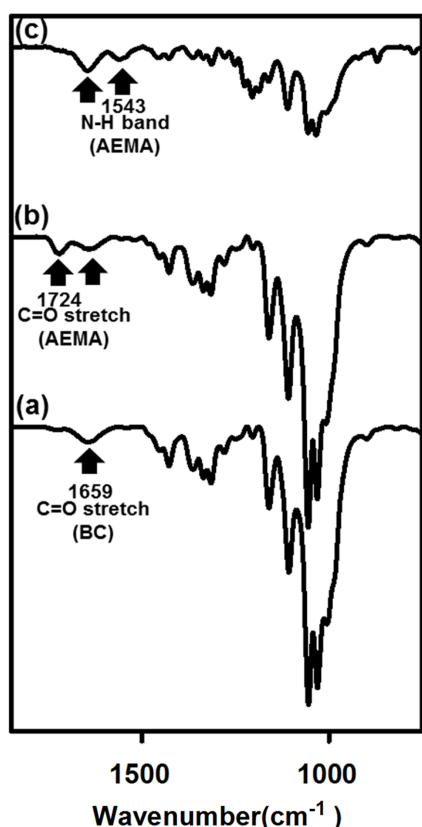


Figure 5. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) spectrum of (a) unmodified bacterial cellulose (UBC); (b) AEMA-modified bacterial cellulose (AEBC) at 25 kGy ; (c) heparin-AEMA-modified bacterial cellulose (HAEBEC) nanofibrous scaffolds.

카복실, 아마이드, 아민 그룹을 확인하여 박테리아 셀룰로오스에 헤파린과 AEMA가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

방사선학적 분석. 각 군의 soft X-ray와 micro-CT 영상 분석을 이용하여 백서 두개골에 UBA와 rhBMP-2가 함유된 UBC, HAEBEC 군에 대한 골형성을 관찰하였다(Figure 6). Soft X-ray 영상 분석 방법은 광농도에 의해 분석할 수 있고 Micro-CT 영상 분석 방법은 삼차원적으로 시편 평면을 재구성할 수 있다. 각 군의 rhBMP-2가 함유된 HAEBEC 군에서만 골형성이 관찰되었고, rhBMP-2가 함유된 UBC와 함유되지 않은 UBC 군에서는 골형성이 관찰되지 않았다. 또한 골재생 부에서 임의로 선정된 6점에서의 방사선밀도는 광밀도에 있어서 rhBMP-2가 함유된 HAEBEC가 UBC 군에 비해서는 현저히 높았다. rhBMP-2가 함유된 UBC와 함유되지 않은 UBC 군에서는 유의할 만한 차이를 보이지 않았다. Soft X-ray와 micro-CT 영상 분석을 통해 8주 차 rhBMP-2가 함유된 HAEBEC 표본에서는 방사선 사진 상에 중심부에서 보이는 방사선 불투과성 물질은 신생골조직 일부와 거의 분해되지 않고 남은 HAEBEC 지지체가 혼재한 양상이며 rhBMP-2가 함유된 UBC 표본과 rhBMP-2가 함유되지 않은 UBC 표본의 신생골 형성은 거의 없는 것으로 관찰하였다. 우수하고 빠른 신생골 형성을 위해서는 적절한 양과 농도, 시간 동안 BMP-2를 전달할 수 있어야 한다. 본 결과를 통해 HAEBEC가 UBC보다 골형성이 우수한 이유는 HAEBEC에 결합된 헤파린이 rhBMP-2와 결합하여 지속적인 서방출을 통해 조골세포 증식에 영향을 주어 신생골이 형성에 도움을 주었을 거라 생각되지만, rhBMP-2가 함유된 UBC 표본과 rhBMP-2가 함유되지 않은 UBC에서는 rhBMP-2가 빠른 시일 안에 방출되어 조골

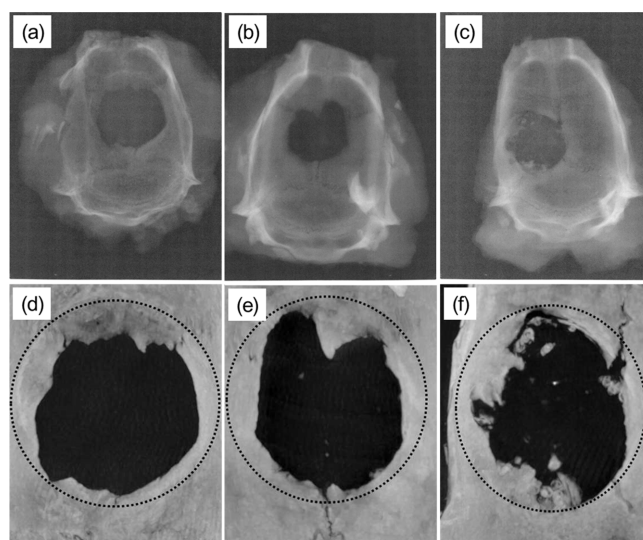


Figure 6. Soft X-ray and micro-CT images of rat skulls treated by (a, d) UBC; (b, e) UBC loaded rhBMP-2; (c, f) HAEBEC loaded rhBMP-2 scaffolds at 8 weeks.

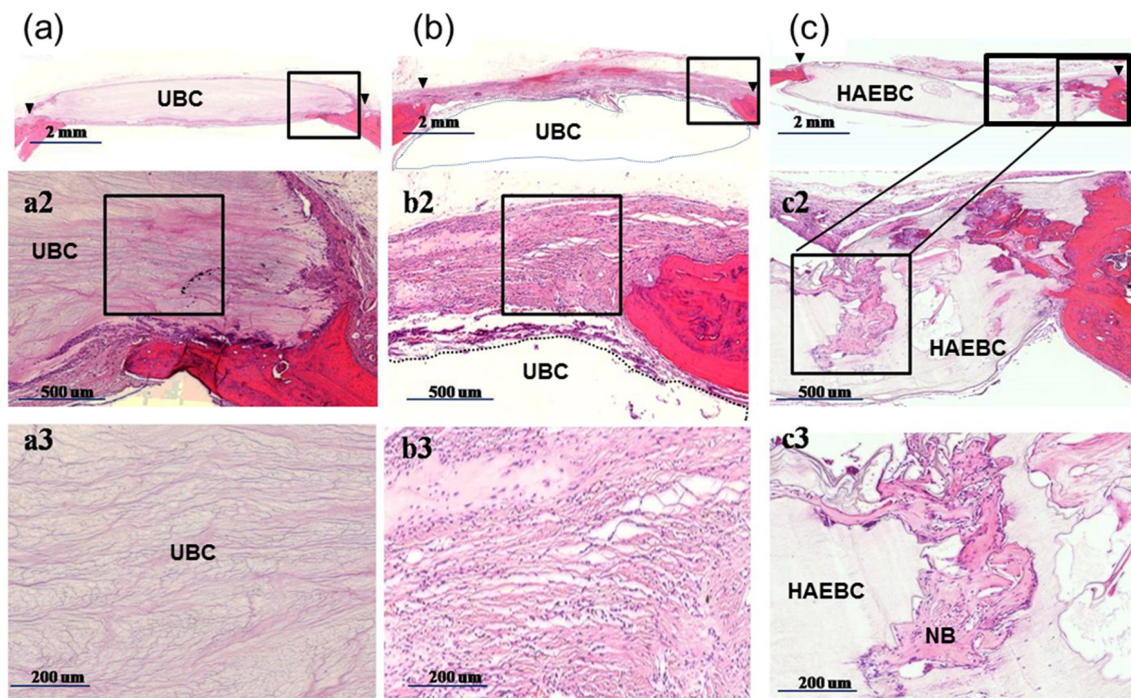


Figure 7. H&E staining of histological sections of rat skulls treated by (a) UBC; (b) UBC loaded rhBMP-2; (c) HAECB loaded rhBMP-2 scaffolds at 8 weeks.

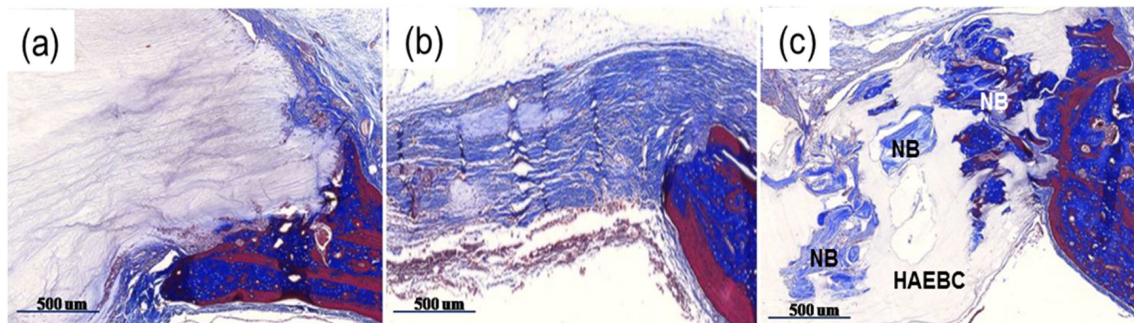


Figure 8. M-T staining of histological sections of rat skulls treated by (a) UBC; (b) UBC loaded rhBMP-2; (c) HAECB loaded rhBMP-2 scaffolds at 8 weeks.

세포 증식에 영향이 없을 거라 사료된다.²⁴

조직학적 분석. 조직 절편은 H&E와 M-T 염색을 통해 현미경으로 관찰하였다(Figure 7, 8). 골결손부의 경계부위를 관찰한 결과 rhBMP-2가 함유된 HAECB 군에서만 골형성이 관찰되었고, rhBMP-2가 함유된 UBC와 rhBMP-2가 함유되지 않은 UBC군에서는 거의 골형성이 관찰되지 않았다. 모든 실험군에서 분해되지 않고 남은 BC 지지체가 관찰되었다. 이에 대한 원인을 생각해 보면 UBC와 HAECB 지지체가 생분해 기간이 길어 8주까지도 분해되지 않아 신생골이나 혈관이 자라 들어올 공간이 부족해서 골형성을 방해하였을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 추후 연구에서는 UBC 또는 HAECB 지

지체의 생분해성을 조절할 수 있는 연구가 필요하다고 생각한다. rhBMP-2가 함유된 UBC와 rhBMP-2가 함유되지 않은 UBC군의 결손부는 얇고 성긴 불규칙한 섬유성 결합조직으로 채워져 있으며, 출혈 및 육아조직이 관찰된다. 신생골은 주로 결손부 변연과 하방 경막 주위에 국한되어 있었으며, 조골세포에 의해 둘러싸여 있고 주위로 염증세포가 관찰되었다. 하지만, rhBMP-2가 함유된 HAECB 지지체 주변의 섬유아세포들이 이주하여 그 공간을 차지하고 있으며, 미량의 신생골이 결손 변연부에서 관찰되며 결손부의 주변에서는 신생골형성에 의한 혈관증식과 조골세포들이 관찰되었다. 이번 연구 결과, rhBMP-2가 함유된 HAECB 군에서는 rhBMP-2가

함유된 UBC 군보다 신생골형성이 두드러지게 나타났다. 하지만, BC의 생분해 기간이 골형성되는 시간에 비해 늦게 생분해되기 때문에 8주 안에는 BC 지지체 안으로 신생골 형성이 많지 않았다. 따라서 BC를 조직공학용 지지체로 사용하기 위해서는 산·염기를 이용한 가수분해 또는 방사선의 높은 에너지를 이용한 BC 분자 사슬을 분해시킴으로써 생분해성이 증가되는 연구가 꼭 필요하다고 사료된다.²⁵ 이유는 본 실험에서 BC 표면에 AEMA를 개질하기 위해서 사용한 감마선 선량이 25 kGy인 것으로 보아, rhBMP-2가 함유된 UBC 지지체보다 HAECBC 지지체에서 골형성이 더 되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 HAECBC가 해파린에 결합한 rhBMP-2 때문인지 아니면 감마선에 의해 BC가 분해되었는지에 대한 연구가 선행되어야 한다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 백서 두개골 결손 모델의 골재생 실험에서 rhBMP-2가 함유된 해파린이 도입된 박테리아 셀룰로오스 지지체가 신생골 형성에 미치는 결과는 rhBMP-2를 첨가한 HAECBC 지지체를 이식한 경우 rhBMP-2를 첨가한 UBC 또는 UBC 단독으로 사용한 지지체들 보다 뚜렷한 골형성이 관찰되었다. 또한 동일한 HAECBC를 좀더 장기적인 기간의 동물 실험을 통해 HAECBC의 생분해가 진행되는 과정 동안 골재생 효과를 관찰해 보는 것이 필요하며, HAECBC의 생분해가 좀더 빠르게 진행될 수 있게 방사선 조사를 통한 생분해 조절 연구가 더 연구되어야 할 것이다. 결론적으로, 방사선을 이용하여 해파린이 도입된 박테리아 셀룰로오스는 골재생에 위한 조직공학용 지지체로 사용될 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 미래창조과학부에서 주관하는 원자력연구개발사업(2012M2A2A6013196)의 지원에 의해 이루어진 것으로, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. W. F. McKay, S. M. Peckham, and J. M. Badura, *Int. Orthop.*, **31**, 729 (2007).
2. A. Nohe, S. Hassel, M. Ehrlich, F. Neubauer, W. Sebald, Y. I. Henis, and P. Knaus, *J. Biol. Chem.*, **277**, 5330 (2002).
3. H. M. Ryoo, M. H. Lee, and Y. J. Kim, *Gene*, **366**, 51 (2006).
4. S. E. Kim, S. H. Song, Y. P. Yun, B. J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H. J. Moon, and Y. D. Kwon, *Biomaterials*, **32**, 366 (2011).
5. O. Jeon, S. J. Song, S. W. Kang, A. J. Putnam, and B. S. Kim, *Biomaterials*, **28**, 2763 (2007).
6. C. Li, C. Vepari, H. J. Jin, H. J. Kim, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **27**, 3115 (2006).
7. O. Jeon, C. Powell, L. D. Solorio, M. D. Krebs, and E. Alsberg, *J. Control. Release.*, **154**, 258 (2011).
8. O. Jeon, S. J. Song, S. W. Kang, A. J. Putnam, and B. S. Kim, *Biomaterials*, **28**, 2763 (2007).
9. S. I. Jeong, O. Jeon, M. D. Krebs, M. C. Hill, and E. Alsberg, *Eur. Cell. Mater.*, **24**, 331 (2012).
10. T. Gao, W. Cui, Z. Wang, Y. Wang, Y. Liu, P. S. Malliappan, Y. Ito, and P. Zhang, *RSC Advances*, **6**, 20202 (2016).
11. Y. M. Shin, K. S. Kim, Y. M. Lim, Y. C. Nho, and H. Shin, *Biomacromolecules*, **9**, 1772 (2008).
12. E. N. Bolbasov, M. Rybachuk, A. S. Golovkin, L. V. Antonova, E. V. Shesterikov, A. I. Malchikhina, V. A. Novikov, Y. G. Anissimov, and S. I. Tverdokhlebov, *Mater. Lett.*, **132**, 281 (2014).
13. Y. M. Shin, W. G. La, M. S. Lee, H. S. Yang, and Y. M. Lim, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 8375 (2015).
14. Y. M. Shin, J. Y. Lim, J. S. Park, H. J. Gwon, S. I. Jeong, S. J. Ahn, H. Shin, and Y. M. Lim, *RSC Advances*, **5**, 55948 (2015).
15. M. E. Embuscado, J. S. Marks, and J. N. BeMiller, *Food Hydrocoll.*, **8**, 419 (1994).
16. S. I. Jeong, J. O. Jeong, J. B. Choi, Y. M. Shin, J. S. Park, H. J. Gwon, Y. C. Nho, S. J. Ahn, M. Y. Park, and Y. M. Lim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **11**, 56 (2014).
17. S. H. Lee, Y. M. Lim, S. I. Jeong, S. J. Ahn, S. S. Kang, C. M. Jeong, and J. B. Huh, *J. Adv. Prosthodont*, **7**, 484 (2015).
18. W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown, *Biomacromolecules*, **8**, 1 (2007).
19. F. A. Muller, L. Muller, I. Hofmann, P. Greil, M. M. Wenzel, and R. Staudenmaier, *Biomaterials*, **27**, 3955 (2006).
20. C. Zhou, Q. Shi, W. Guo, L. Terrell, A. T. Qureshi, D. J. Hayes, and Q. Wu, *ACS Appl. Mater. Inter.*, **5**, 3847 (2013).
21. J. Kadokawa, S. Saitou, and S. Shoda, *Carbohydr. Polym.*, **60**, 253 (2005).
22. A. R. P. Figueiredo, A. G. P. R. Figueiredo, N. H. C. S. Silva, A. Barros-Timmons, A. Almeida, A. J. D. Silvestre, and C. S. R. Freire, *Carbohydr. Polym.*, **123**, 443 (2015).
23. O. Töpfer and G. Schmidt-Naake, *Macromol. Symposia*, **248**, 239 (2007).
24. S. E. Kim, S.-H. Song, Y. P. Yun, B.-J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H.-J. Moon, and Y.-D. Kwon, *Biomaterials*, **32**, 366 (2011).
25. D. Darwis, T. Khusniya, L. Hardiningsih, F. Nurlidar, and H. Winarno, *Atom Indonesia*, **38**, 78 (2012).