

## 간헐적인 압축하중이 조골세포주 성장에 미치는 영향

### The Effect of Intermittent Compressive Loading to Growth of Pre-osteoblast Cells

최성규<sup>1</sup>, 박정훈<sup>2</sup>, 이승재<sup>3</sup>, 이인환<sup>4,✉</sup>, 강상순<sup>5</sup>  
Sung Kyu Choi<sup>1</sup>, Jeong Hun Park<sup>2</sup>, Seung-Jae Lee<sup>3</sup>, In Hwan Lee<sup>4,✉</sup> and Sang Sun Kang<sup>5</sup>

1 충북대학교 정밀기계공학과 (Department of Precision Mechanical Engineering, Chungbuk National Univ.)

2 포항공과대학교 기계공학과 (Department of Mechanical Engineering, POSTECH)

3 충남대학교 BK21 메카트로닉스 사업단 (BK21 Mechatronics group, Chungnam National Univ.)

4 충북대학교 기계공학부 (School of Mechanical Engineering, Chungbuk National Univ.)

5 충북대학교 과학교육과 (School of Science Education, Chungbuk National Univ.)

✉ Corresponding author: anxanx@chungbuk.ac.kr, Tel: 043-261-3161

Manuscript received: 2009.7.22 / Revised: 2010.1.6 / Accepted: 2010.1.11

*Recently, it has been reported that mechanical stimulation takes a role in improving cell growth. Also, became generally known that skeletal system as bone or cartilage tissues take influence of compression loading. In this study, we fabricated a custom-made bioreactor and analyzed that conditions of compressive loading would influence cell growth. To compare the effect of intermittent compressive loading on cell-encapsulated agarose scaffold, we cultured pre-osteoblast cell (MC3T3-E1 cells) statically and dynamically. And dynamic culture conditions were produced by changing parameters such as the iteration time and interval delay time. Also, cell-encapsulated agarose scaffold were subjected to 10 % dynamic compressive strain at 1Hz frequency for 7 days. After cell culture, cell proliferation was assessed with PI stain assay for fluorescence images and flow cytometry (FACS).*

Key Words: Compressive Loading (압축 하중), Cell Growth (세포 성장), Pre-osteoblast Cells (조골세포주), Scaffold (인공 지지체), Tissue Engineering (조직 공학)

#### 1. 서론

세포나 조직을 재건하거나 복원하기 위해 인공 지지체 내에서 세포를 배양하여 조직을 재생하는 조직공학 기술은 근래 활발히 연구되고 있다. 최근에는 기계적 자극이 세포의 성장에 중요한 역할을 한다는 실험적 연구 결과가 보고되고 있다. 특히 뼈나 연골 조직과 같은 골격계 조직세포의 경우 압축력과 같은 기계적 자극에 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다.<sup>1-4</sup>

Bloom 등은 단순 반복 자극의 압축력을 이용하여 연골세포를 배양하여 세포의 증식 및 분화에

대한 압축의 영향을 비교, 관찰하였다.<sup>5</sup> 또한 Hunter 등은 세포가 파종된 피브리젤(fibrin gel)을 제작하고 이에 정적 압축과 사인파형 압축을 0.1Hz, 1Hz 주기로 가하여 세포의 성장을 비교 분석하였다.<sup>6</sup> 하지만 이와 같은 기존 연구들은 단순한 경험적 수준의 반복적인 자극만을 고려하였다.

이에 본 연구에서는 단순한 형태의 자극이 아닌 여러 가지 변수를 통해 제어되는 다양한 조건의 기계적 압축력이 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려 한다. 이를 위해 다양한 기계적 압축력을 발생시키는 동적 배양기를 제작하였다. 그리고 이를 이용하여 아가로스(agarose) 인

공지지체에 쥐의 조골세포주(pre-osteoblast) MC3T3-E1 세포를 배양하여 다양한 기계적 자극이 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다.

## 2. 동적 배양기의 제작

뼈와 같은 조직은 인체의 무게를 지탱하며 다양한 움직임에 의한 압축하중을 받고 있다. 따라서 동적 배양기는 이와 유사한 환경을 제공해 주기 위한 압축시스템으로 제작하였다. 압축시스템은 스텝모터(PK23-01A, Oriental motor, USA)와 볼스크류(GPR1202RC3T, Issoku, Japan)로 구성되어 압축하중을 전달하도록 제작되었으며, 제어컴퓨터의 프로그램(LabView, NI, USA)을 통하여 제어된다. 이러한 압축시스템의 장점은 테프론(teflon)으로 제작된 10 개의 압축 피스톤을 이용하여 총 10 개의 인공지지체를 동시에 배양할 수 있다. 또한 압축하중을 세포가 파종된 각각의 인공지지체에 효과적으로 전달하기 위해서 인공지지체의 미소한 높이 차이를 고려하여 압축 피스톤의 초기 위치를 개별적으로 조절할 수 있도록 설계하였다.<sup>7</sup> 한편, 세포 배양에 있어서 중요하게 고려되는 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)의 농도(5%)와 배양 온도(37°C)를 고려하여 고가의 상용화된 인큐베이터 대신에 저가의 맞춤형 인큐베이터를 구현하였다.<sup>8</sup> Fig. 1 은 본 연구에서 개발된 동적 배양기의 전체 개략도를 나타낸다.

## 3. 재료 및 방법

### 3.1 조골세포주(MC3T3-E1)의 배양

본 연구에서 사용된 MC3T3-E1 세포 (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan)는 신생쥐의 두개골에서 분리되어 계대 배양된 세포로 염기성 인산분해효소 (alkaline phosphatase, ALP)활성과 교원질 합성능이 있으며, 장기간 배양하면 골기질의 석회화뿐만 아니라 골세포로의 분화를 관찰할 수 있다.<sup>9</sup> 이를 배양하기 위하여  $\alpha$ -MEM (alpha minimum essential medium, HYCLONE, USA)을 사용하였고, 여기에 10%의 우태혈청 (fetal bovine serum, GIBCO, USA)과 1%의 항생제 (100 units/ml penicillin, GIBCO, USA)를 첨가하였다.<sup>10</sup> 배양된 세포는 3 일에 한 번씩 배지를 교체하였으며, 7 일에 한 번씩 계대 배양하였다. 계대 배양 후 세포를 수확하여  $2 \times 10^6$  cells/scaffold의 농도로 세포 캡슐형 인공지지체를 제작하여 증식을 유도하였다. 그리고 제작된 인공지지체는 제작된 동적 배양기와 상용화된 인큐베이터에서 배양하였다.

### 3.2 세포 캡슐형 인공지지체의 제작

세포에 기계적인 압축 자극을 가하기 위해 아가로스 젤 안에 세포를 파종시켜 인공지지체를 제작 하였다. 아가로스는 열가소성 특성을 갖고 있으므로 상온에서 쉽게 젤로 변화하고 열을 가하면 다시 액상으로 변하므로 젤 제작이 용이하다. 또한 세포 점착과 성장을 효과적으로 유도하고 대사산물의 전달이 용이해야 하는 생체 조직 공학적 지지체로서 장점을 지니고 있다.<sup>11</sup> 이에 본 연구에서는 Bacto™ Agar(BD, USA)를 이용하여 아가로스 젤을 제작하였다.

Fig. 2 는 세포 캡슐형 인공지지체의 제조과정을

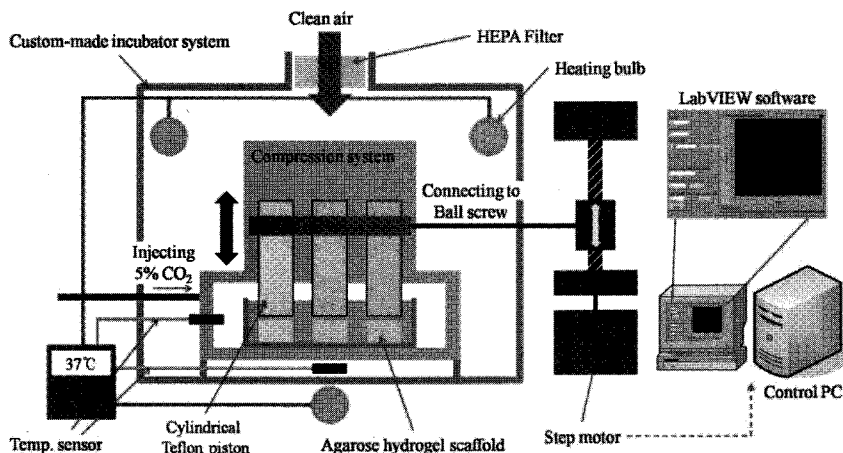


Fig. 1 Schematic drawing of bioreactor system for compressive loading

나타낸 것이다. 젤을 제작하기 위해 DW(deionized water) 100ml 에 아가로스 분말 4g 을 혼합하고 오토클레이브(autoclave)로 고온 멸균시켜 아가로스 분말을 용해시켜 4%의 아가로스 용액을 제조하였다. 이를 MC3T3-E1 세포가 부유되어 있는 배양액과 1:1 의 비율로 혼합하고 젤 제작용 몰드(Fig. 3, 지름 10mm, 높이 5mm)에 주입하여 상온에서 경화시켰다. 경화 후에 젤 제작용 몰드로부터 이형시켜 최종적으로 2%의 세포 캡슐형 인공지지체를 완성하였다.

### 3.3 기계적 압축자극 모드

다양한 압축 자극이 세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 4 개의 실험군을 설정하였고, Fig. 4 와 같이 압축 자극의 조건은 총 4 가지이다. 정적 배양군(static culture, 아무런 자극을 가하지 않음), 3 초의 간헐적인 압축하중(Int\_3sec, 3 초간 압축하중을 가하며 3 초간 휴지함), 60 초의 간헐적인 압축하중(Int\_60sec, 60 초간 압축하중을 가하며 60 초간 휴지함), 600 초의 간헐적인 압축하중(Int\_600sec, 600 초간 압축하중을 가하며 600 초간 휴지함)으로 구성되어 있다.

각각의 모드에 대한 입력 조건들은 Table 1 에 나타내었다. 또한 4 개의 실험군은 동일하게 0.5mm 의 압축 변위(세포 캡슐형 인공지지체 높이의 10%

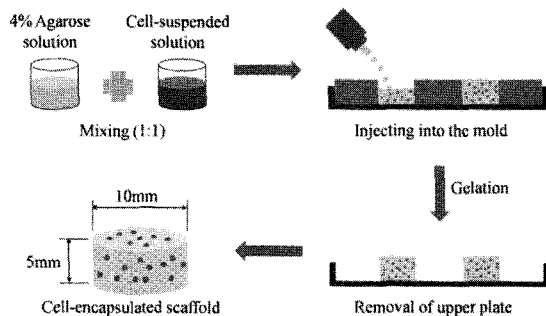


Fig. 2 Schematic diagram of the fabrication of cell-encapsulating agarose gel scaffold



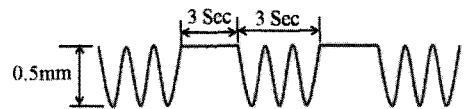
Fig. 3 Photograph of the mold for agarose scaffold

변형률)로 일일 8 시간(인체의 일일 활동량을 고려함)씩 1Hz 의 주기(인체의 심장 박동을 고려함)로 사인파형의 반복 압축을 인공지지체에 가해주며 총 7 일간 배양시켰다. Fig. 5 는 개발된 동적 배양기를 이용하여 아가로스 인공지지체에 자극을 가하여 배양하는 모습을 나타낸다.

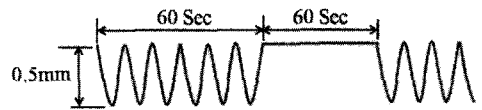
### 3.4 Flow cytometric (FACS) 분석

#### ① Static culture

#### ② Intermittent mode\_3sec



#### ③ Intermittent mode\_60sec



#### ④ Intermittent mode\_600sec

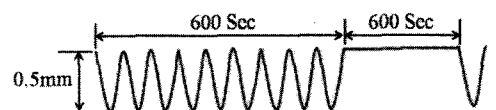


Fig. 4 One control group for static culture and three modes of intermittent compressive loading for dynamic culture

Table 1 Input parameters for the compressive loading conditions

| Parameter                                      | Int_3sec | Int_60sec | Int_600sec |
|--|----------|-----------|------------|
| Velocity (mm/sec)                              | 1.3      | 1.3       | 1.3        |
| Acceleration (mm/sec <sup>2</sup> )            | 13       | 13        | 13         |
| Displacement (mm)                              | 0.5      | 0.5       | 0.5        |
| Interval delay time at the zero position (sec) | 3        | 60        | 600        |
| Iterations                                     | 3        | 60        | 600        |
| Cyclic iterations                              | 4800     | 240       | 24         |

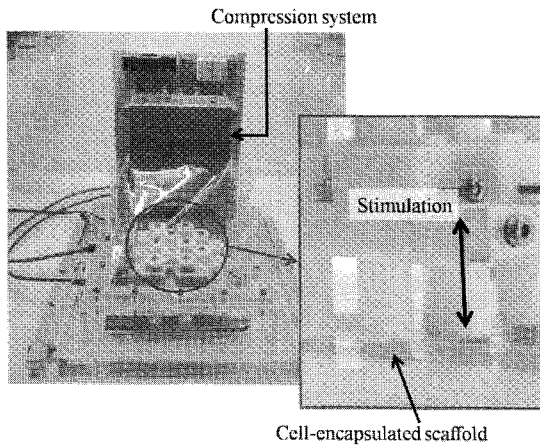


Fig. 5 Dynamic culture using bioreactor

세포 캡슐형 인공지지체의 배양 후 세포의 증식에 대한 평가를 위하여 총 7 일간의 배양 중 1, 3, 7 일째에 유세포 분류기(FACS Calibur-S system, BD, USA)를 이용하여 세포의 개수를 측정하였다 (Fig. 6). 이를 위해 15ml 원심분리용 튜브에 DW 8ml 과 세포 캡슐형 인공지지체 1 개를 넣고 85°C 에서 2 분 동안 가열하였다. 이때 세포 캡슐형 인공지지체는 DW 에 용해되고 이를 원심 분리하여 세포만을 수확하였다. 그리고 수확된 세포를 500µl 의 PBS(phosphate buffered saline)로 부유시킨다. PBS 안에 부유된 세포는 유세포 분류기의 아르곤 레이저(argon laser, 488nm)를 통해 측정된다. 이때 분당 60µl 의 PBS 가 유세포 분류기의 노즐에 흘러 들어 가며 총 3 분간 측정된다.

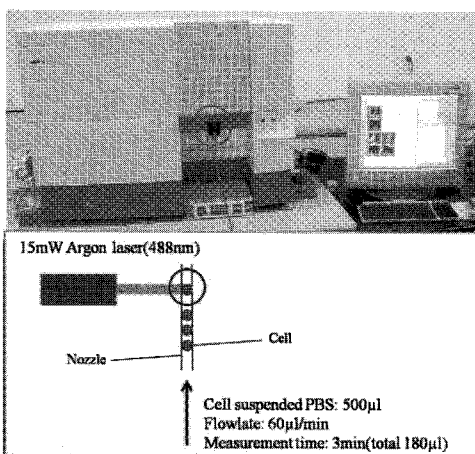


Fig. 6 Evaluated for cell count using FACS

### 3.5 형광 이미지 분석

세포 증식을 평가하기 위해 세포 캡슐형 인공 지지체 내에 있는 세포의 핵을 염색하여 형광 이미지 분석을 실시하였다. 배양 후 7 일째의 세포 캡슐형 인공지지체 내의 세포를 PI 를 이용하여 염색하기 위해 세포 캡슐형 인공지지체를 70% 에탄올(ethanol)에 10 분간 담가 세포를 고정시킨 후, PBS 로 2 회 세척하였다. 그 후에 1ml 의 PBS 를 주입하고 PI 솔루션과 RNase 솔루션을 각각 0.4ml 씩 첨가하여 세포 핵의 염색을 수행하였다. 염색이 완료된 세포 캡슐형 인공지지체는 공초점 현미경(confocal laser scanning microscope, LEICA, Germany)을 이용하여 세포 캡슐형 인공지지체의 밀면부터 20µm 두께로 총 10 개의 단면을 촬영하였다.

### 3.6 Western blot. 분석

MC3T3-E1 세포의 성장과정에서 동적 배양이 세포의 형질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 단백질 분석(western blot.)을 실시하였다. 단백질 분석은 항원-항체 반응을 이용하여 여러 단백질의 혼합물로부터 특정 단백질을 검색하는 방법이다.<sup>12</sup>

이를 위해 15ml 원심분리용 튜브에 세포 캡슐형 인공지지체 1 개를 넣고 PBS 로 1 분간 2 회 세척한다. 그 후에 DW 8ml 을 넣고 85 °C 에서 2 분 동안 가열하였다. 이때 세포 캡슐형 인공지지체는 DW 에 용해되고 이를 원심 분리하여 세포만을 수확하였다. 후에 1×Ripa buffer 를 0.33ml 첨가하여 30 분간 교반기에 배치시켰다. 그 후에 3000rpm 으로 4°C 에서 30 분간 원심 분리하여 단백질을 추출해 내었다. 추출 단백질로 SDS-PAGE 를 수행한 후, membrane 에 단백질을 이동시켰다. 1 차 항체와 2 차 항체를 차례로 반응시키고 UV 영상분석기(LAS-3000, Fujifilm, Japan)를 사용하여 분석하였다. 실험에 사용한 1 차 항체는 β-Actin(Millipore, USA), Osetopontin(Millipore, USA)이며, 2 차 항체는 anti-mouse (Millipore, USA)이다.

## 4. 결과 및 고찰

### 4.1 Flow cytometric 분석 결과

다양한 기계적 자극이 세포의 성장에서 증식에 미치는 영향을 유세포 분류기를 이용하여 측정하였다. Fig. 7 은 1, 3, 7 일째의 증식 결과를 보여준다.

증식 결과를 비교해 보았을 때, 3 일째에서 3 초와 60 초의 간헐적인 압축하중이 아무런 자극을

가하지 않은 정적 배양군과 600 초의 간헐적인 압축하중보다 많은 수의 세포를 나타내었다. 또한 7 일째에서 그 양은 크게 증가한 것을 알 수 있다. 일정 휴지시간을 갖는 동적 배양군 모두가 비교군(정적 배양군) 보다 세포의 개수가 많이 증가 되었으며, 특히 3 초의 간헐적인 압축하중(Int\_3sec)의 경우가 세포의 증식에 가장 큰 영향을 주는 것으로 관찰되었다.

**4.2 형광 이미지 분석 결과**

세포의 증식 여부를 측정하기 위하여 세포의 개수 측정과 더불어 형광 이미지 분석을 실시하였다. Fig. 8 는 7 일째의 세포 캡슐형 인공지지체를 염색하여 촬영한 형광 이미지이다. PI 염색법은 세포를 붉은색으로 염색시킨다. 그러나 본 연구에서는 이미지의 가독성을 향상시키기 위하여 붉게 염색된 세포를 녹색이 띄도록 하여 분석하였다. 이

미지를 비교하여 보았을 때, 염색된 세포의 수가 기계적 자극을 가하지 않은 정적 배양보다 동적 배양군(기계적 자극을 가한 동적 배양)에서 많이 관찰되었다. 이로 미루어 보아 기계적 자극이 세포의 성장에서 증식에 영향을 주는 것으로 판단된다.

**4.3 Western blot. 분석 결과**

세포의 배양에서 기계적 압축하중이 세포의 형질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot. 분석을 실시하였다. 실험에 사용된 1 차 항체  $\beta$ -Actin 은 대조군으로 사용되었으며, osteopontin 은 실험에 사용된 MC3T3-E1 세포의 표지인자 단백질로 알려져 있다.<sup>13</sup> Fig. 9 는 7 일째의 세포 캡슐형 인공지지체를 이용하여 western blot.을 실시한 결과이다. 결과를 분석하여 보면, 정적 배양군과 동적 배양군 모두 표지인자 단백질인 osteopontin 이 발

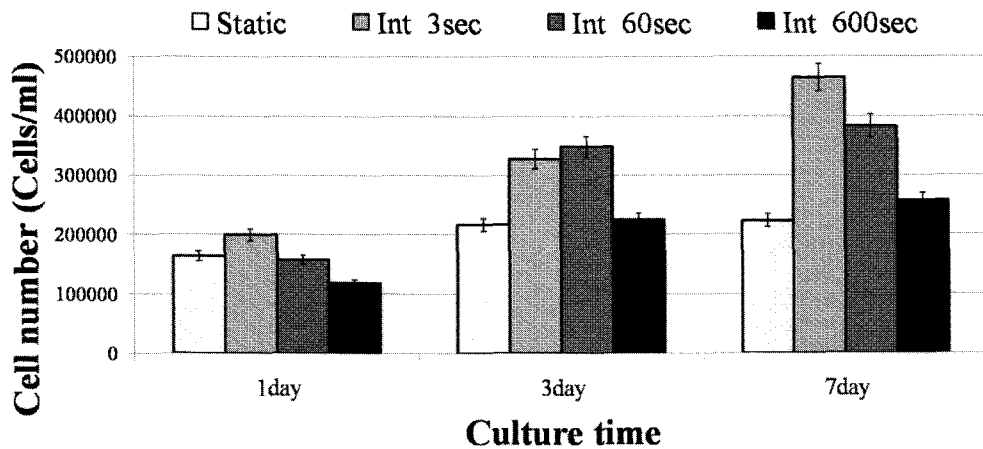


Fig. 7 Numbers of MC3T3-E1 cells in static and dynamic cultures

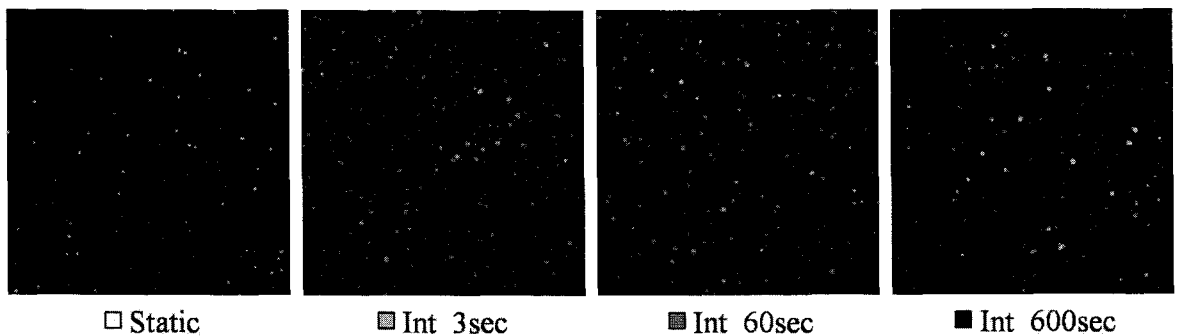


Fig. 8 Fluorescence images of cell-encapsulated agarose scaffold after 7days in static and dynamic culture (x100)

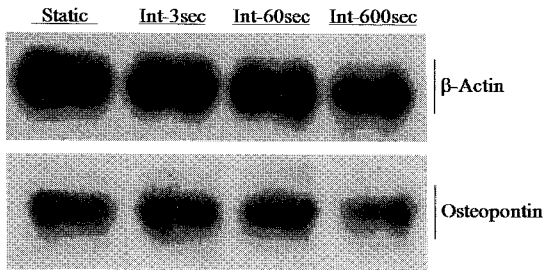


Fig. 9 The osteoblast markers which were expressed in cell culture

현되었다. 이로 미루어 보아 압축하중은 세포의 형질에는 영향을 미치지 않고 동일시간 내에 증식을 촉진시키는 것으로 판단된다.

### 5. 결론

본 연구에서는 MC3T3-E1 세포를 아가로스 젤에 파종하여 세포 캡슐형 인공지지체를 제조하였다. 또한 개발된 동적 배양기를 이용하여 다양한 휴지 시간을 갖는 간헐적인 압축하중이 세포의 성장에서 증식에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 형광 이미지 분석 결과를 살펴보면 휴지 시간을 갖는 간헐적인 압축하중을 가한 동적 배양군이 아무런 자극을 가하지 않은 정적 배양군보다 많은 세포가 관찰되었다. 또한 FACS 분석 결과를 통하여 이러한 결과를 수치적으로 판단할 수 있었다. 이는 3 초간의 간헐적인 압축하중이 아무런 자극을 가하지 않은 정적 배양군보다 세포수가 약 107%가 많은 것으로 나타났다.

또한 기계적 자극이 세포의 형질에 미치는 영향을 판단하기 위해 western blot 분석을 실시하였고 그 결과 모든 실험군에서 MC3T3-E1 세포의 표지인자 단백질인 osteopontin이 발현되었다.

이러한 실험 결과를 종합하여 보면, 기계적 자극인 압축하중은 세포의 형질에는 거의 영향을 미치지 않지만 동일한 세포 배양 기간 동안 세포의 증식을 촉진시키며, 특히 3 초간의 간헐적인 압축하중 조건은 세포의 증식에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 7 일체의 결과를 통하여 간헐적 자극 주기가 짧은 것(3 초)이 세포 자극이 활발하여 배양 효과가 좋은 것으로 판단되지만 3 일체의 증식결과에서는 60 초의 간헐적인 압축조건이 배양효과가 좋은 것으로 나타났다. 이는 세포 분화 시기에 따라 적합한 자극조건이 필요한

것으로 판단된다.

따라서 향후 세포 분화 시기에 따른 적합한 자극 조건의 정확한 분석을 위해 추가적인 반복 실험을 통하여 이를 조사할 예정이며, 또한 기계적 자극이 세포의 증식뿐만 아니라 세포의 분화에 미치는 영향을 조사하여 세포 성장에 최적화된 기계적 자극조건을 분석할 예정이다.

### 후 기

이 논문은 2008 년도 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비 지원으로 수행됨.

### 참고문헌

1. Mauck, R. L., Soltz, M. A., Wang, C. C., Wong, D. D., Chao, P. H., Valhmu, W. B., Hung, C. T. and Ateshian, G. A., "Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels," *Journal of Biochemical Engineering*, Vol. 122, No. 3, pp. 252-260, 2000.
2. Kisiday, J. D., Jin, M. S, DiMicco, M. A., Kurz, B. and Grodzinsky, A. J., "Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffold," *Journal of Biomechanics*, Vol. 37, No. 5, pp. 594-604, 2004.
3. Meyer, U., Buchter, A., Nazer, N. and Wiesmann, H. P., "Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering," *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 44, No. 2, pp. 134-140, 2006.
4. Engelmayr Jr., G. C., Hildebrand, D. K., Sutherland, F. W. H., Mayer Jr, J. E. and Sacks, M. S., "A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials," *Biomaterials*, Vol. 24, No. 14, pp. 2523-2532, 2003.
5. Preiss-Bloom, O., Mizrahi, J., Elisseeff, J. and Seliktar, D., "Real-time monitoring of force response measured in mechanically stimulated tissue-engineered cartilage," *Artificial Organs*, Vol. 33, No. 4, pp. 318-327, 2009.
6. Hunter, C. J., Mouw, J. K., Levenston, A. E., Coulter, W. H. and Woodruff, G. W., "Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness," *Osteo*

- Arthritis and Cartilage, Vol. 12, No. 2, pp. 117-130, 2004.
7. Park, J. H., Lee, S.-J., Lee, I. H., Cho, D.-W. and Rhie, J.-W., "Development of bioreactor by rapid prototyping technology," *Journal of the Korean Society for Precision Engineering*, Vol. 26, No. 3, pp. 137-143, 2009.
  8. Nugent-Derfus, G. E., Takara, T., O'neill, J. K., Cahill, S. B., Görtz, S., Pong, T., Inoue, H., Aneloski, N. M., Wang, W. W., Vega, K. I., Klein, T. J., Hsieh-Bonassera, N. D., Bae, W. C., Bugbee, J. D. and Sah, R. L., "Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4," *Osteo Arthritis and Cartilage*, Vol. 15, No. 5, pp. 556-574, 2007.
  9. Bae, S.-M., Kyung, H.-M. and Sung, J.-H., "The effects of mechanical stress on alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells," *The Korean Journal of Orthodontics*, Vol. 26, No. 3, pp. 291-299, 1996.
  10. Choi, S.-Y. and Koh, K.-J., "The effects of irradiation on the mRNA expression of type I collagen and alkaline phosphatase in the MC3T3-E1 osteoblastic cell line," *Korean Journal of Oral Maxillofac Radiol*, Vol. 33, No. 1, pp. 51-57, 2003.
  11. Awad, H. A., Wickham, Q. W., Leddy, H. A., Gimble, J. M. and Guilak, F., "Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds," *Biomaterials*, Vol. 25, No. 16, pp. 3211-3222, 2004.
  12. Wikipedia, [http://en.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot)
  13. Leboy, P. S., Beresford, J. N., Devlin, C. and Owen, M. E., "Dexamethasone induction of osteoblast mRNA in rat marrow stromal cell cultures," *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 146, No. 3, pp. 370-378, 1991.