

## 세포 함유 젤라틴 파이버 응용을 통한 골 재생 유도용 인산칼슘 생체재료 세포 탑재 연구

김선화<sup>1</sup> · 황창모<sup>2</sup> · 박상혁<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 4차산업융합바이오닉스공학과, <sup>2</sup>울산대학교 의과대학 융합의학과,  
<sup>3</sup>부경대학교 의공학과

## Cell-laden Gelatin Fiber Contained Calcium Phosphate Biomaterials as a Stem Cell Delivery Vehicle for Bone Repair

Seon-Hwa Kim<sup>1</sup>, Changmo Hwang<sup>2</sup> and Sang-Hyug Park<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program of Biomedical Mechanical & Electrical Engineering,  
Pukyong National University, Busan, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Convergence Medicine, University of Ulsan College of Medicine & Asan Institute for Life Sciences,  
Asan Medical Center, Seoul, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Pukyong National University, Busan, Republic of Korea  
(Manuscript received 10 February 2022 ; revised 15 February 2022 ; accepted 18 February 2022)

**Abstract:** Natural and synthetic forms of calcium phosphate cement (CPC) have been widely used in bone repair and augmentation. The major challenge of injectable CPC is to deliver the cells without cell death in order to regenerate new bone. The study objective was to investigate for the potential of stem cell-laden gelatin fibers containing injectable, nanocrystalline CPC to function as a delivery system. Gelatin noddle fiber method was developed to delivered cells into nCPC. Experimental groups were prepared by mixing cells with nCPC, mixing cell-laden gelatin fibers with nCPC and mixing cell-laden gelatin fibers containing BMP-2 with nCPC. Media diffusion test was conducted after dissolving the gelatin fibers. SEM examined the generated channels and delivered cell morphology. Fibers mixed with nCPC showed physical setting and hardening within 20 min after injection and showed good shape maintenances. The gelatin fibers mixed nCPC group had several vacant channels generated from the dissolved gelatin. Particularly, proliferation and attachment of the cells were observed inside of the channels. While live cells were not observed in the cell mixed nCPC group, cells delivered with the gelatin fibers into the nCPC showed good viability and increased DNA content with culture. Cell-laden gelatin fiber was a novel method for cell delivery into nCPC without cell damages. Results also indicated the osteogenic differentiation of gelatin fiber delivered cells. We suggest that the cell-laden gelatin fibers mixed with nCPC can be used as an injectable cell delivery vehicle and the addition of BMP-2 to enhances osteogenesis.

**Key words:** Nanocrystalline calcium phosphate cement, Gelatin fiber, Cell delivery, Human adipose derived stem cell, Osteogenesis

### I. 서 론

\*Corresponding Author : Sang-Hyug Park  
Department of Biomedical Engineering, Pukyong National  
University, 45, Yongso-ro, Nam-gu, Busan, Republic of Korea  
Tel: +82-51-629-5777

E-mail: shpark1@pknu.ac.kr

본 연구는 부경대학교 자율창의기술연구비(2019년CD20201462)에 의하여 수행되었음.

근 골격계의 주요 조직인 골은 칼슘 및 인산염 축적에 의한 높은 기계적 강도를 통해 인체를 지지하고 연골, 근육, 힘줄, 및 인대와 같은 주변 조직과의 상호작용을 통해 움직임을 조절한다. 이외에도 외부로부터 발생하는 충격에 대한 내부 장기 보호, 인체의 면역 조절 및 조직 재생에 기여하는 줄

기세포와 혈액 유래 세포의 보존과 같은 생리적 기능을 수행한다[1,2].

골 조직은 신체의 나이가 증가함에 따른 무기질의 소실, 사고, 염증성 질환 및 면역성 질환으로 인해 손상되며 이로 인하여 부분 골 결손 치료 혹은 골 이식이 수행되고 있다. 현대 사회의 기대 수명이 증가함에 따라 골 치료에 대한 수요는 꾸준히 증가되고 있으며, 이로 인해 골 이식 방법에 대한 기대와 관심 또한 증진되고 있다. 결손 부위에 대한 골 이식을 위해 환자 자신의 골을 채취하여 결손 부위에 이식하는 자가 골 이식 법이 주로 행해진다. 자가 골 이식은 이종 혹은 동종 조직 이식 시 발생 가능한 면역 거부 반응과 공여 조직에 내재한 질병에 대한 감염 우려가 없는 장점이 존재하며, 골 조직이 지니는 골 전도성(osteoconduction), 골 형성 능력, 및 골 재생 유도성(osteoiduction)으로 인해 널리 이용되어왔다. 그러나, 환자에게서 조직을 채취하는 과정에서 발생 가능한 채취 부위의 만성 통증, 혈종, 감염, 제한적 활용 가능성 및 채취된 조직의 질이 일정하지 않다는 부분과 여러 횃수의 외과적 수술이 행해질 수 있는 점으로 인하여 대체 법이 요구되었다[3,4]. 이에 골 조직의 생리적 기능을 수행할 수 있는 골 전도성 재료와 주위 환경과의 상호작용을 통해 재생을 촉진시킬 수 있는 줄기세포를 복합적으로 이용한 조직공학적인 접근은 큰 주목을 받았으며, 이에 대한 연구 결과 또한 활발하게 보고되었다[5,6].

골 재생 향상 목적으로 이용되는 인산칼슘(calcium phosphate)은 뛰어난 생체적합성 및 생체 활성으로 골 대체 재료로서 사용된다. 인산칼슘은 유래 여부에 따라 합성 혹은 생체 재료로 크게 분류되며, 재료 내 포함된 화학적 성분에 의해 수산화 인회석(hydroxyapatite), 베타-제3인산칼슘(beta-tricalcium phosphate), 제2인산칼슘(biphasic calcium phosphate), 비정형 인산칼슘(amorphous calcium phosphate), 탄산인회석(carbonate apatite) 및 칼슘 미포함 인회석(calcium deficient apatite forms)으로 구분된다[7,8]. 이들의 화학적 조성, 기계적 특성(mechanical property), 생체적합성(biocompatibility), 세포 매개 흡수 과정(cell-mediated mode of resorption) 및 골 전도성에 따른 골 결손 치료용 전달체로서 많은 검증들이 수행되었지만, 많은 문헌 상에서 공통적으로 언급하는 재료가 지니는 낮은 기계적 강도로 인한 한계가 존재한다[9-11]. 이에 많은 연구진은 기계적 강도를 향상시키고자 인산칼슘 시멘트(calcium phosphate cement)와 같이 이용하는 연구를 수행하였으며, 해당 재료는 스스로 경화를 통해 형상을 유지할 수 있어 골 이식 치료에 적용되었다[12-14]. 인산칼슘 파우더를 용액과 혼합하여 골 결손 부위에 주입하게 되면 결손 맞춤형으로 경화되어 넓은 면적의 결손부 및 결손이 일정치 못한 부분 외에도 깊은 결손 부위에도 이식 가능하다. 이에 다수의 연구진은 골 결손 이식재로서 다양한 종류의 인

산칼슘 시멘트를 골 결손 모델에 적용하였으며[15-17], 인산칼슘과 인간 재조합 골 형태 형성 단백질(rh-BMP-2)을 혼합한 조건에서 골 결손 치유를 가속화한다는 연구 결과가 보고된 바 있다[18,19].

이외에도, 높은 골 유도성과 기계적 강도를 지니는 인산칼슘 시멘트와 세포를 혼합하여 골 조직 재생을 촉진하려는 연구가 수행되었다. 기존 재료가 지니는 낮은 흡수성으로 인한 지지체 내부로의 제한적 세포 침투 및 이로 인해 발생하는 세포 생존 저하를 극복하고자 하였다[20-23]. 이에 본 연구진은 온도에 따라 형상 변형이 용이한 젤라틴(gelatin)과 인간 지방유래 줄기세포(human adipose-derived stem cell)를 혼합하여 누들 구조의 섬유 젤을 제작한 후, 이를 인산칼슘과 배합하여 골 이식용 세포 전달체(cell delivery vehicle) 개발 연구를 수행하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 인간 지방유래 줄기세포 분리 및 배양

본 연구 수행에 이용된 인간 지방유래 줄기세포(hASC) 및 전용 배양 배지는 세포바이오 (Seoul, Korea)사로 부터 구매하였다. 세포 수 측정에 따른 생존율 확인을 위하여 Trypan blue 염색법을 이용하였으며, 현탁 된 hASC는  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>의 농도로 세포 배양 접시에 접종 후 5% CO<sub>2</sub>/37°C 인큐베이터 내에서 배양하였다. 배양 중인 세포는 2일 주기로 새로운 배양액으로 교체되었으며, 증식된 세포가 면적의 80%를 이룰 때 0.25% Trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양을 수행하였다. 세포 분리 및 배양에 이용된 시약은 Gibco(MA, USA)사로 부터 구입하였다.

### 2. hASC 탑재 Gelatin fiber 제작

젤라틴(gelatin) 파우더는 Sigma-Aldrich(MO, USA)사를 통해 구매하였으며, 이를 완충액에 혼합하여 최종 농도 2% Gelatin 용액을 제작한 후, 이를 hASC(P<sub>3</sub>)와 혼합하였다. 미세 채널 가공 및 세포 전달 목적의 형태 제작을 위해 세포가 포함된 2% 젤라틴 용액을 얼음 상에 두어 젤화 시킨 뒤, 이를 나일론 필터 여과 멤브레인을 통과시켜 누들 구조의 젤라틴 섬유(noodle Gelatin fiber)를 제작하였다.

### 3. hASC 탑재 Gelatin fiber/nCPC 제작

세포 포함 골 충전재 제작을 위해 5cc의 나노크리스탈린 인산칼슘 시멘트(nanocrystalline calcium phosphate cement; nCPC,  $\beta$ -bsm)를 ZIMMER BIOMET(MA, USA)사로부터 친절히 제공 받았으며, 제공된 0.9% NaCl 용액 3 ml에 혼합하여 주입 가능한 골 충전재로 제조하였다. 이에 hASC 탑재 Gelatin fiber를 0, 10, 25, 50% 포함하도록 배합하였

으며, 혼합 비율에 따라 CPC100, CPC90, CPC75, CPC50으로 표기하였다. 세포 탑재 Gelatin fiber/nCPC 혼합물을 원형 디스크 형태의 몰드에 0.3cc 씩 주입한 뒤 5% CO<sub>2</sub>/37°C 유지 배양기 내에서 30분간 반응시켜 경화 시켰다. 디스크 형태로 제작된 시편은 6-well 배양 플레이트로 옮겨진 뒤, 골분화용 배지 상에서 배양하였다. 골분화용 배지 조성은  $\alpha$ -MEM 배지에 10% FBS, 0.1 mM Nonessential amino acid, Ascorbic acid-2-phosphate(50  $\mu$ g/ml), 100 nM Dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphate, Penicillin(100 U/ml), Streptomycin (100  $\mu$ g/ml), Fungizone(0.25  $\mu$ g/ml)을 포함하며, 이를 주기로 배양 중인 배지의 절반을 교환하며 5% CO<sub>2</sub>/37°C 유지 배양기 내에서 배양되었다.

#### 4. 기계적 강도 측정

제작된 CPC100, CPC90, CPC75, CPC50( $n = 6$ )의 기계적 강도 측정을 위해 만능 시험기(universal testing machine; UTM)를 이용한 분석을 진행하였다. 기계적 특성 분석 시 요구되는 시편에 대한 직경 및 면적은 각각 측정하였으며, 20 mm/min의 일정 속도로 분석을 진행하였다.

#### 5. 지지체 내 흡수성 분석

제작된 시편 내부의 세포에 원활한 영양분 공급을 가능하게 하며, Gelatin fiber 함유 및 분해를 통해 형성된 미세 채널 확인을 위한 거동 분석을 시행하였다. 제작된 시편의 흡수성에 따른 액체 함유 확인을 위해 FITC 형광 시약이 분주된 6-well plate에 샘플을 두어 흡수시킨 후, 제작된 시편 내부 확인을 위해 공초점 레이저 주사 현미경(LSM 7000, Oberkochen, ZEISS)을 이용하여 1시간 동안 형광 이미지 관찰 및 촬영을 수행하였다.

#### 6. 주사전자현미경(scanning electron microscope) 분석

제작된 샘플의 구조 관찰을 위해 주사전자현미경(SEM; Zeiss FESEM Supra55VP, Oberkochen, Germany) 분석을 시행하였으며, 해당 실험 수행을 위해 모든 샘플은 0.4% Glutaraldehyde 상에서 24시간 고정된 뒤 순차적 탈수 과정을 통해 준비되었다. 모든 샘플은 현미경 관찰 전 3분간 Gold/Palladium으로 코팅 되었으며, 표준 시험 과정을 통해 분석을 수행하였다.

#### 7. 세포 생존/사멸 분석

CPC 내에 포함된 Gelatin fiber 혼합 비율에 따른 세포 독성여부 확인을 위해 Live/Dead 분석을 시행하였다. 앞선 분석을 통해 선택된 CPC100과 CPC75 및 제작된 지지체의 골 분화 향상을 위해 골 형태 형성 단백질-2(BMP-2)가 혼합된 BMP-CPC75(B-CPC75) 그룹 또한 분석 수행되었다. 제

작된 CPC100, CPC75, BMP-CPC75는 Calcein/Ethidium homodimer 혼합액에 담겨진 뒤 5% CO<sub>2</sub>/37°C 유지 배양기 내에서 30분간 반응하였다. 염색 이후 PBS 이용 세척 과정을 진행하였으며, 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 생존 및 사멸 세포를 관찰하였다.

#### 8. 생화학적 분석

CPC 내에 탑재된 hASC의 생존 및 증식 확인을 위해 배양 중인 CPC75와 B-CPC75를 각각 1, 3, 5, 7일차에 수거하여 Thermo Fisher Science(MA, USA)사로부터 구매한 AlamarBlue (AlamarBlue Cell Viability Reagent)를 사용하여 분석하였다. 각 그룹당 희석된 분석 시약을 처리한 후 60분간 반응시켰으며, 수거된 용액은 96-well micro plate에 분주하여 570 nm 파장에서 형광 검출을 시행하였다. 이후 그룹당 감소된 값을 계산하여 도식화 하였다.

ALP 발현 확인을 위해 1, 2주차에 수거된 시편을 이용한 p-Nitrophenyl phosphate/p-Nitrophenol 변환 활성 검증을 시행하였다. 해당 분석 실험은 Sigma-Aldrich(MO, USA)사에서 제공된 표준 프로토콜에 따라 진행되었으며, 간단하게 다음과 같다. 제작된 시편 용해 후 1700 g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 수거하여 염색 시약과 30분간 반응시켰으며, 이는 405 nm 파장에서 측정되었다.

배양 기간에 따른 CPC75와 B-CPC75 내의 콜라겐 형성 확인을 위해 1, 2, 4주차에서 수거된 시편을 이용한 정량 분석을 시행하였다. 배양 중이던 시편은 총 콜라겐 함량 확인을 위해 Pepsin solution(1 mg/ml of Pepsin, pH 3.0) 상에서 48 시간 동안 반응 시켰다. 이후, 1.3% Picric acid에 Sirius red의 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 포화 시킨 후 염색 과정을 거쳤다. 용해된 샘플은 96-well micro plate에 분주 되었으며, 37°C에서 24시간 동안 건조 후 염색 시약을 첨가하여 1시간 동안 교반 되었다. 미반응 물질 제거를 위한 0.01 N HCl 이용 5번의 세척 과정을 시행하였으며, 시편과 결합된 결합 분자 검출을 위해 0.1N NaOH를 첨가하여 용해하였다. 반응을 마친 샘플은 550 nm 파장에서 측정되었으며, 돼지 유래 콜라겐으로 도출한 표준 곡선 그래프를 이용하여 샘플 내 총 콜라겐 함량 계산을 수행하였다.

#### 9. 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR) 분석

제작된 지지체의 골 유도 확인을 위해 CPC75와 B-CPC75( $n = 4$ )를 이용한 분석을 진행하였으며, 잘게 조각낸 시편에 1 ml의 Trizol을 추가하여 12000 g에서 10분간 원심 분리 하였다. 수거된 상층액에 0.2 ml의 Chloroform을 추가하여 상온에서 5분간 반응 후 12000 g에서 15분간 원심 분리를 진행한 뒤 상부 용액을 새로운 튜브로 옮겨주었다. 같은 부피의 70% Ethanol을 처리해준 용액을 Qiagen(Hilden, Germany)

사의 RNeasy mini spin column에 옮긴 뒤 제조사의 프로토콜에 따라 이후 과정을 수행하였다. 유전자 증폭 반응 조건은 95 °C에서 10분 진행 후 95 °C에서 15초, 60 °C에서 1분 동안 진행하여 총 50 사이클을 수행하였으며, 상대적 발현 비교를 위해 하우스키핑 유전자인 GAPDH를 이용하여 분석을 진행하였다. 골 분화 관련 인자인 Col1 $\alpha$ 1, ALP, bone sialoprotein(BSP), Osteopontin(OP)를 확인하고자 하였으며, Applied Biosciences(CA, USA)사를 통한 probe 구입 후 제공된 절차에 따라 분석을 시행하였다.

10. 통계적 분석

생화학적 및 기계적 정량 분석 시 Mann-Whitney U test (독립 표본 t-test, SPSS) 방법을 이용하여 통계적 유의성을 확인하였으며, 통계적 유의 수준에 따른 표기는 각각 \* $P$ ( $< 0.05$ ), \*\* $P$ ( $< 0.01$ ), \*\*\* $P$ ( $< 0.001$ )와 같이 표기하였다.

III. 연구 결과

1. 지지체의 기계적 물성 측정

제작된 CPC100, CPC90, CPC75, CPC50의 기계적 특성 분석을 시행하였다. 표 1은 각 그룹당 측정된 압축계수 및

압축 강도 값을 보여준다. CPC100의 압축계수는  $112.3 \pm 21.5$  MPa 이고 압축 강도는  $4.5 \pm 1.7$  MPa이며, CPC90의 압축계수는  $61.8 \pm 11.3$  MPa 이고 압축 강도는  $2.8 \pm 0.5$  MPa, CPC75의 압축계수는  $45.5 \pm 7.8$  MPa 이고 압축 강도는  $2.1 \pm 0.4$  MPa이며, CPC50의 압축계수는  $12.2 \pm 7.3$  MPa 이고 압축 강도는  $0.3 \pm 0.05$  MPa로 측정되었다. 압축계수 및 압축 강도 분석을 위해 CPC50 그룹과의 통계적 유의성을 확인하였다. 그림 1-A의 압축계수 분석 그래프에서, CPC100, CPC90, CPC75 그룹 모두 CPC50과 통계적 유의성이 확인되었다. 그림 1-B의 압축 강도 분석 그래프에서는 비교 그룹 모두 CPC50와 통계적 차이를 통한 유의미함을 확인하였다. 해당 분석을 통해 CPC 내의 Gelatin fiber의 포함이 증가할 수록 압축계수 및 압축강도 모두 감소함을 확인하였다.

2. 지지체 내 흡수성 확인

본 실험은 Gelatin fiber 함량에 따른 시편 내부 미세 채널을 확인하고자 수행하였다. 시편의 gel 함량이 증가할 수록 흡수된 형광 염료의 양이 증가되고, 이는 그림 2와 같이 관찰되었다. 시편의 바닥 부위에서 500  $\mu$ m 거리 지점에서의 검출된 형광 강도를 확인하였을 때, 그림 2-A의 control 그룹에서는 시편 내부에 미세 채널이 존재하지 않기에 0  $\mu$ m

표 1. 압축 계수 및 강도

Table 1. Compressive modulus and strength

|                            | CPC100           | CPC90           | CPC75          | CPC50          |
|----------------------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Compressive modulus (MPa)  | $112.3 \pm 21.5$ | $61.8 \pm 11.3$ | $45.5 \pm 7.8$ | $12.2 \pm 7.3$ |
| Compressive strength (MPa) | $4.7 \pm 1.7$    | $2.8 \pm 0.5$   | $2.1 \pm 0.4$  | $0.3 \pm 0.05$ |

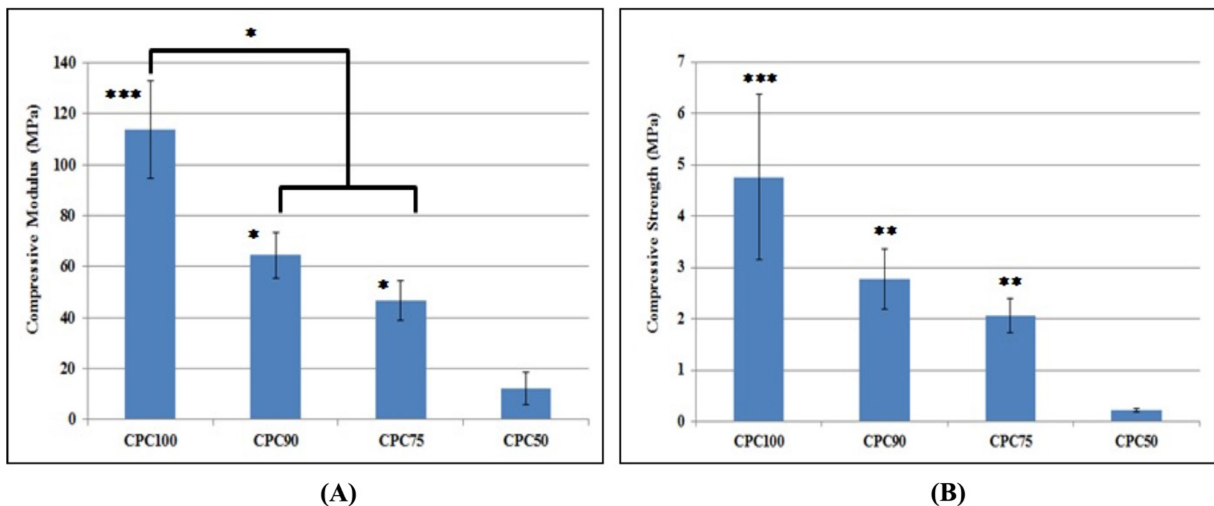


그림 1. 기계적 특성 분석 그래프 (A) 제작된 CPC100, CPC90, CPC75, CPC50에 대한 압축 계수 측정 그래프 (B) 제작된 시편에 대한 압축 강도 측정 그래프. 도출된 실험값은 평균값  $\pm$  표준편차로 표시되었으며 Mann-Whitney U test를 이용함, 통계적 유의 수준은 \* $P$ ( $< 0.05$ ), \*\* $P$ ( $< 0.01$ ), \*\*\* $P$ ( $< 0.001$ )와 같이 표시함

Fig. 1. Graph of mechanical properties (A) Compressive modulus of CPC100, CPC90, CPC75, CPC50 (B) Compressive strength of samples. Measured data were presented mean  $\pm$  SD and analyzed Mann-Whitney U test, \* $P$ ( $< 0.05$ ), \*\* $P$ ( $< 0.01$ ), \*\*\* $P$ ( $< 0.001$ )

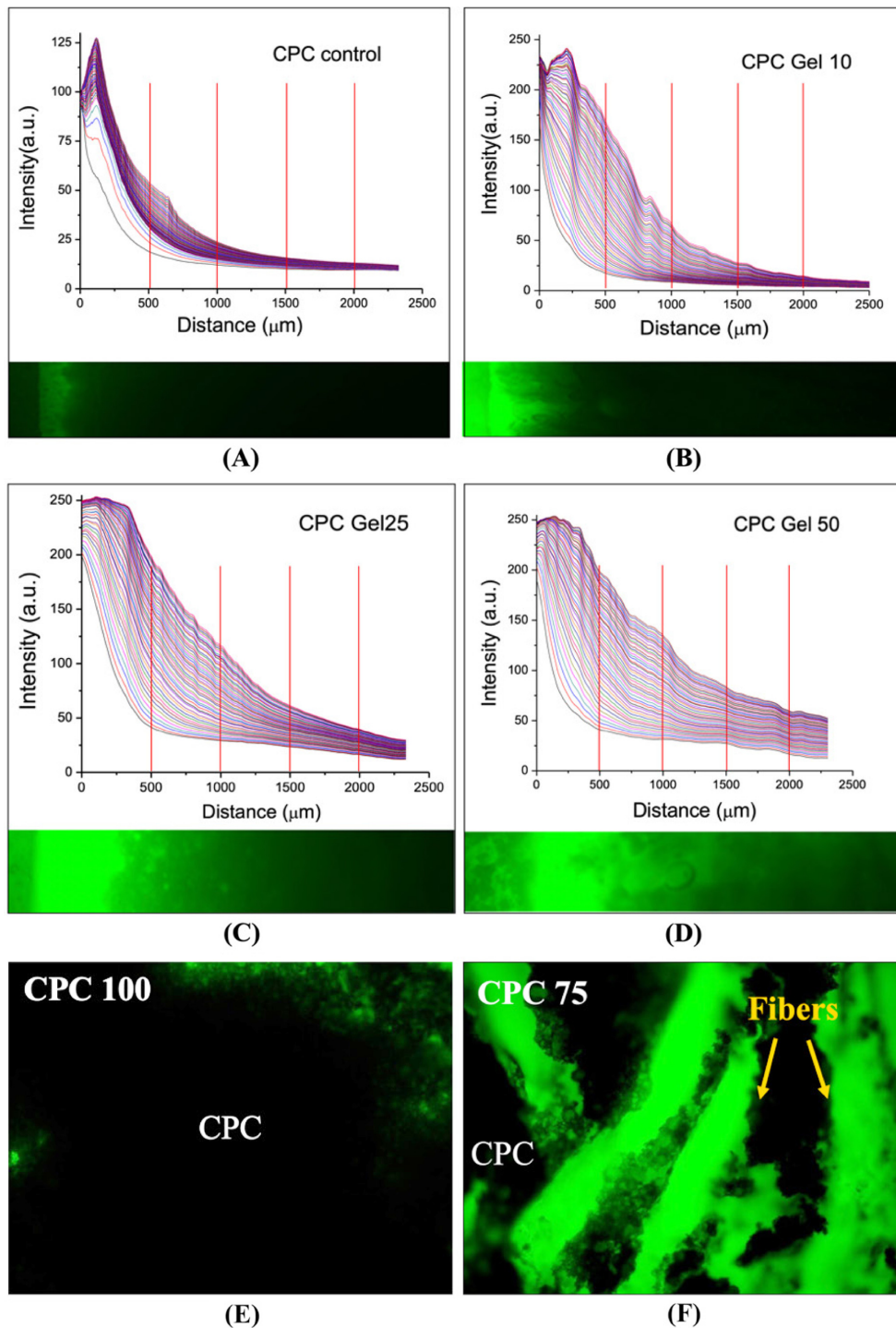


그림 2. 제작된 시편의 흡수성 분석에 대한 그래프 및 사진 (A) CPC100에 대한 외부 유체 흡수 분석 결과 (B) CPC90에 대한 흡수성 분석 결과 (C) CPC75의 유체 흡수 결과 (D) CPC50에 대한 결과 (E) CPC100의 내부 형광 이미지 촬영 사진 (F) CPC75 내부 형성된 채널의 형광 이미지 사진

Fig. 2. Graph and images of absorption test within scaffolds (A) Result of CPC100 absorbing fluid (B) Result of CPC90 (C) Result of CPC70 (D) Result of CPC50 (E) Fluorescent image within CPC100 (F) Microchannel image in CPC75

지점 대비 50% 가량 감소된 것을 확인할 수 있다. 그림 2-B-D에서 도출된 결과를 보면, gel의 함량이 증가될 수록 더 많은 거리까지 형광 염료가 흡수되어 검출된 것을 알 수 있다.

흡수되어 관찰 가능한 관 형태의 채널 확인을 위해 현미경 촬영을 수행하였다. 그림 2-E에서는 내부 채널이 존재하지 않아 연속된 관 형상을 관찰할 수 없었지만, 그림 2-F에서는



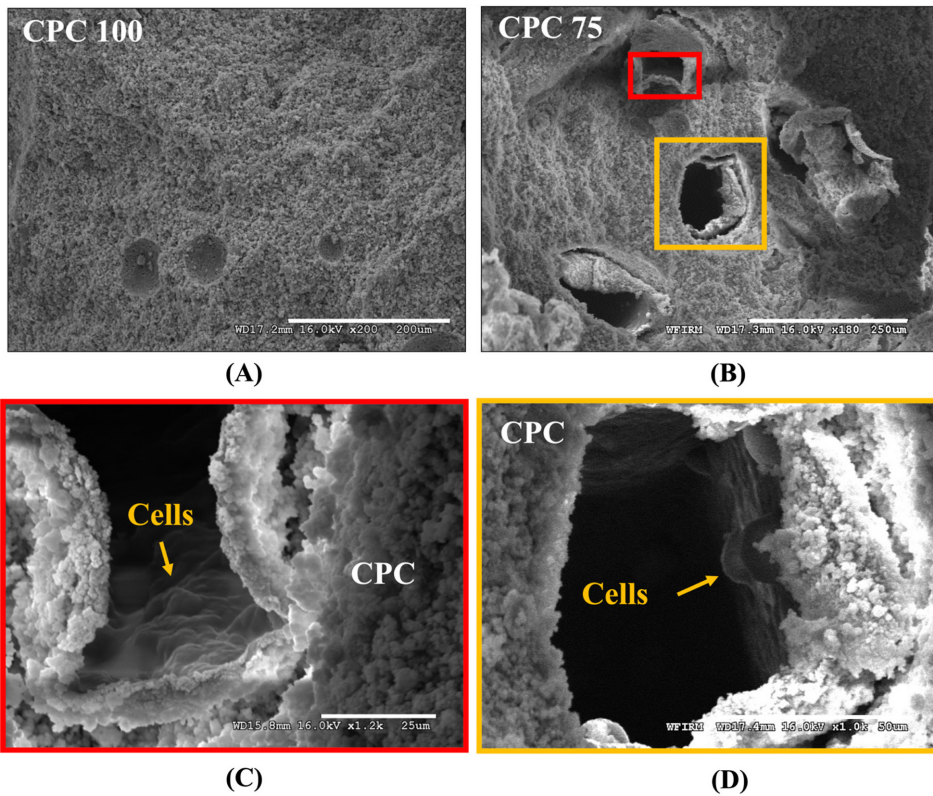


그림 3. CPC100과 CPC75에 대한 주사전자현미경 이미지 (A) CPC100 내부 표면에 대한 이미지 (B) CPC75 내부 구조에 대한 이미지 (C) CPC75 확대 이미지 (D) CPC75 내부 채널에 부착된 세포 관찰 이미지 (Scale bar: 200, 250, 25, and 50 µm)

Fig. 3. SEM images of CPC100 and CPC75 (A) Surface morphology in CPC100 (B) Surface morphology in CPC75 (C) Magnifying image of CPC75 with red rectangle (D) Cell attached morphology of microchannel in CPC75 with yellow rectangle (Scale bar: 200, 250, 25, and 50 µm)

66

시편 내부에 미세 관이 존재하여 확인할 수 있다. 이를 통해 gel 함량 증가에 따른 시편 내부 미세 채널 형성이 증가됨을 판단할 수 있다.

### 3. 지지체 내 미세 채널 및 세포 분포 관찰

제작된 샘플 내의 미세 구조 확인 및 세포 부착 여부 확인을 위하여 SEM 분석을 시행하였다. 그림 3-A의 CPC100 분석 결과에서 지지체 전반적으로 거친 표면을 확인할 수 있었으며 일부 크레이터와 같은 형태가 관찰되었지만 고른 분포를 지니지 않았다. 그림 3-B의 CPC75 결과의 경우, CPC100과 비교하였을 때 연속적인 채널 형성이 관찰되었다. 그림 3-C, D 이미지 상에는 형성된 채널 내부에 세포가 부착되어 있는 것을 알 수 있으며, 전체적으로 고르게 세포가 분포된 것을 확인할 수 있다. SEM 분석 시행을 통해 CPC 내의 Gelatin fiber 혼합 비율에 따른 내부 연속 채널 형성과 세포 부착 및 분포 확인을 수행하였다.

### 4. 세포 생존 및 증식 분석 결과

세포 증식 확인을 위해 세포 내부의 핵산 함량 측정 실험을

진행하였다. 그림 4-A의 그래프 상의 1주차에서 배양된 CPC75, B-CPC75의 결과를 통해 1일차에 비하여 약 2.45배 증가됨을 확인하였다. CPC75와 B-CPC75 사이의 비교를 수행한 결과, B-CPC75는 CPC75에 비하여 약 1.6배 더 많은 양의 DNA를 포함하여 통계적으로 유의미한 결과를 도출하였다. 해당 결과를 통해 Gelatin fiber가 포함된 그룹 중에서도 BMP-2가 포함된 경우 더 높은 세포 증식이 이뤄졌음을 알 수 있다. 이외에도 세포 증식 및 생존을 관찰 확인을 위해 Alamar blue assay를 시행하였으며 이는 그림 4-B에 도식화 하였다. 세포가 포함되지 않은 CPC100에서는 7일간의 배양을 진행하여도 Alamar blue의 검출 값이 감소되지 않았다. CPC75의 경우 배양 1일차 대비 3, 5, 7일차에 각각 0.11, 0.20, 0.24%, B-CPC75는 0.13, 0.31, 0.33% 감소되었다. 특히, B-CPC75 그룹의 1~5일차 사이에서 확연한 감소가 확인됨을 통해 활발한 증식이 이뤄졌음을 알 수 있다. 이후 장기 배양에 따른 지지체의 세포 독성 확인을 위해 Live/Dead 염색을 진행하였고 실험 수행 결과 그림 4-C의 CPC100 그룹에서는 실험 진행 24시간에서 전반적인 세포 사멸이 관찰되었다. CPC 75와 B-CPC75의 경우는 7일간 배양하여도 세

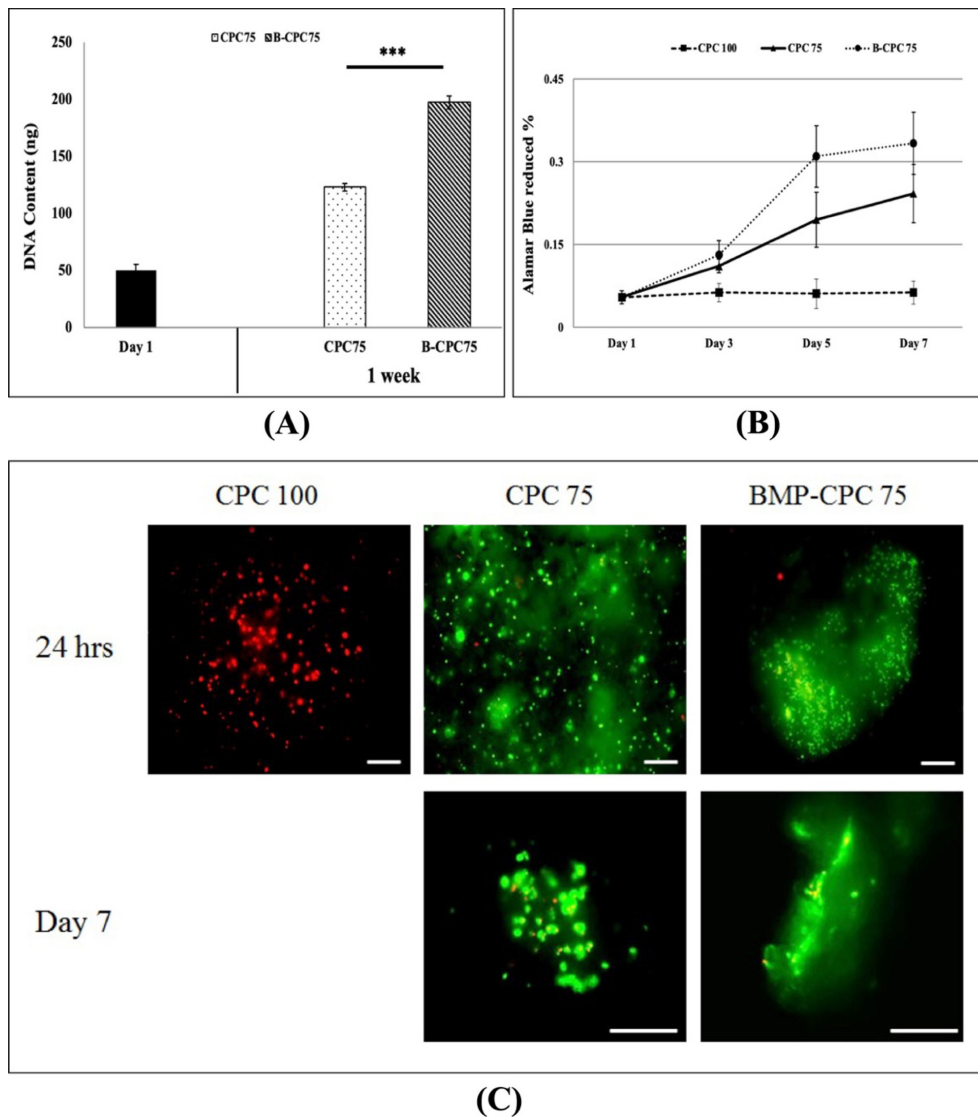


그림 4. 제작된 시편의 세포 생존, 증식, 및 독성 분석 결과 그래프 및 이미지 (A) CPC75, B-CPC75 배양 1일 및 1주차의 DNA 함량 분석 그래프,  $***P < 0.001$  (B) CPC100, CPC75, B-CPC75 배양 1, 3, 5, 7일차 별 alamar blue 감소율 분석 그래프 (C) CPC100, CPC75, B-CPC75의 24시간 및 7일차 Live/Dead 염색 결과 이미지(Scale bar: 100  $\mu$ m)  
 Fig. 4. Graph and images for cell viability, proliferation, and toxicity (A) DNA content graph of cultured CPC75 and B-CPC75 at 1 and 7 day,  $***P < 0.001$  (B) AlamarBlue reduced graph of CPC100, CPC75, B-CPC75 at 1, 3, 5, and 7 day (C) Live/Dead images of CPC100, CPC75, B-CPC75 at 1 and 7 days(Scale bar: 100  $\mu$ m)

포가 정상적으로 생존함을 확인함으로써 CPC의 함량에 따른 세포 독성 발생을 관찰할 수 있었으며, CPC75 그룹에서 지지체 내 미세 구조를 통한 원활한 영양분 공급 및 부산물 배출이 이뤄졌음을 알 수 있었다.

### 5. 골 분화 관련 유전자 발현 확인

제작된 CPC75, B-CPC75의 골 분화 확인을 위한 관련 인자의 유전자 발현 검증을 수행하였으며, 이는 그림 5에 나타내었다. 각 그룹의 지지체를 4주간 배양하였을 때 그림 5-A, D의 BSP와 OP의 경우 두 그룹 사이에서 통계적 차이점을

확인할 수 없었으며, 그림 5-B, C의 B-CPC75 그룹에서 ColI $\alpha$ 1은 CPC75 대비 13%, Runx-2는 19%의 증가를 확인하였다. B-CPC75 그룹에서 증가된 ColI $\alpha$ 1과 Runx-2는 골 분화 초기에 발현되는 인자로 잘 알려져 있으며, BMP-2의 포함으로 골 분화 및 성숙을 가속화하였다.

### 6. 골 분화 관련 단백질 발현 확인

배양 기간에 따른 골 분화도 확인을 위하여 그림 6과 같이 ALP 활성 및 합성된 콜라겐의 총 함량 측정 분석을 시행하였다. 그림 6-A의 ALP는 골 분화 초기 단계에 활발하게

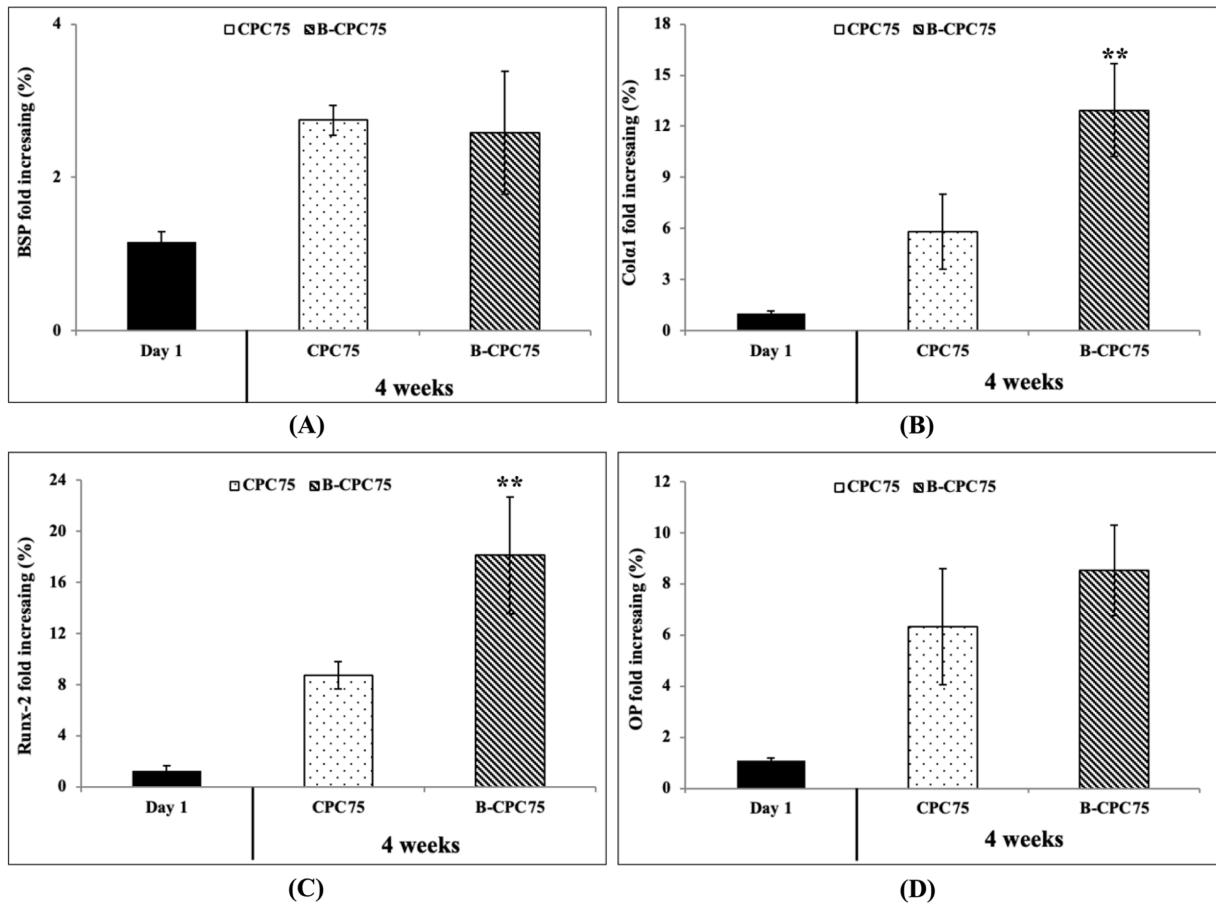


그림 5. CPC75 및 B-CPC75의 골 관련 유전 인자 발현 그래프 (A) 1일차 및 4주차의 BSP 유전자 발현 그래프 (B) 1일차 및 4주차의 Col1α1 유전자 발현 그래프 (C) 1일차 및 4주차의 Runx-2 유전자 발현 그래프 (D) 1일차 및 4주차의 OP 유전자 발현 그래프, \*\* $P < 0.01$ )  
 Fig. 5. Graph of expressing osteogenesis-related gene (A) Graph for BSP culturing at 1 day and 4 weeks (B) Graph for Col1α1 culturing at 1 day and 4 weeks (C) Graph for Runx-2 culturing at 1 day and 4 weeks (D) Graph for OP culturing at 1 day and 4 weeks, \*\* $P < 0.01$ )

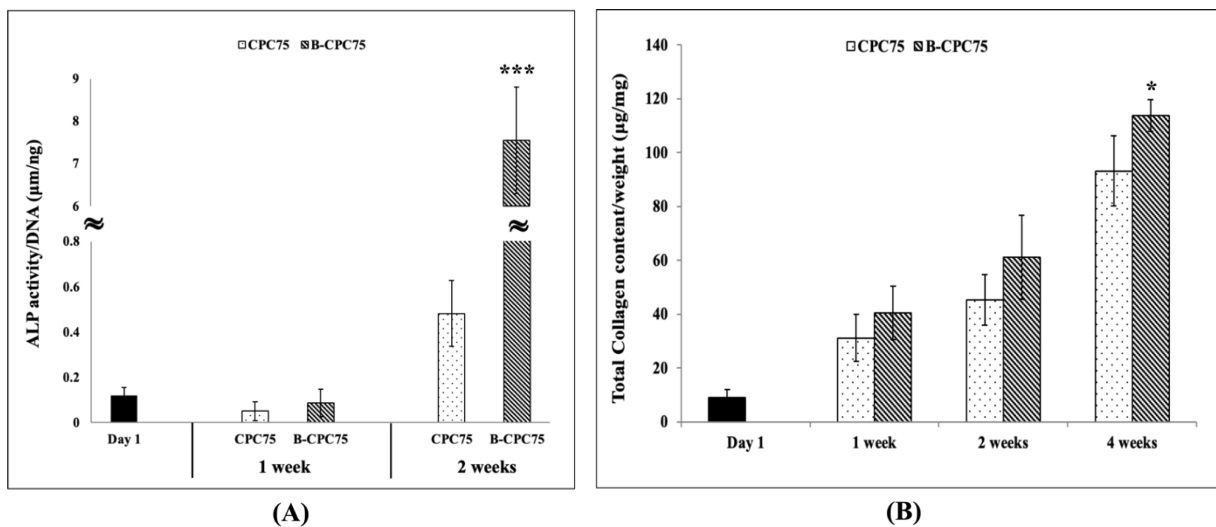


그림 6. CPC75 및 B-CPC75의 골 관련 단백질 발현 그래프 (A) CPC75 및 B-CPC75의 1일, 1주 및 2주차의 DNA 대비 ALP 활성 그래프, \*\*\* $P < 0.001$ ) (B) 배양 기간에 따른 CPC75 및 B-CPC75의 총 콜라겐 함량 그래프, \* $P < 0.05$ )  
 Fig. 6. Graph of expressing osteogenesis-related proteins (A) ALP activity assay of CPC75 and B-CPC75 culturing at 1 day, 1, and 2 weeks, \*\*\* $P < 0.001$ ) (B) Total collagen content assay of CPC75 and B-CPC75 culturing at 1 day, 1, 2, and 4 weeks, \* $P < 0.05$ )



발현되는 인자로 1주간 배양된 CPC75와 B-CPC75의 ALP 활성을 실험 시작점인 1일차와 비교하였을 때, 큰 변화가 관찰되지 않았지만 2주 배양을 통해 B-CPC75 그룹에서 CPC75 대비 약 15.67배의 ALP 발현 증가를 확인함으로써 활발한 골 분화가 유도됨을 파악할 수 있다. 그림 6-B에서 제작된 시편의 콜라겐 함량을 분석한 결과, 4주간 배양된 B-CPC75 그룹에서 CPC75 대비 통계적 유의성을 확인하였다. 이는 앞서 진행한 유전자 분석 결과에 상응하는 경향을 보여주었다.

#### IV. 고찰 및 결론

뼈 재건을 위한 생체 소재는 일정 기간 동안 세포에게 고정 부위를 제공하며 안정적인 기계적 강도를 통해 체내에서 구조적 기능을 수행해야 한다. 또한 이식 부위 주변에 존재하는 생화학적 반응을 수행할 수 있는 플랫폼으로 작용하며, 기능 수행 이후 분해 시 독성 물질을 방출하지 않아야 한다. 이와 같은 목표 수행을 위한 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 골 이식을 위한 완벽한 물질은 존재하지 않는다. 따라서 한계를 극복하고자 제3인산칼슘과 같은 골 성분 재료를 이용한 효과 검증 및 골 관련 인자 발현 확인과 같은 다양한 연구가 소개되었다[24].

여러 골 이식 후보 재료 중 경화 시간이 정확하며 수술에 적용하기 적합하고 병변 부위에 다른 재료와 혼합하여 사용하기 용이한 인산 칼슘 시멘트인  $\beta$ -BSM을 선택하였다[25].  $\beta$ -BSM은 여는 골 이식용 재료에 비하여 충분한 기계적 강도를 지니고, 주입 가능하여 다양한 골 결손 부위에 적용 가능하다. 인간 지방유래 줄기세포는 조직으로부터 많은 수의 세포를 추출할 수 있어 세포원 확보에 유리할 뿐 아니라 골 조직으로의 분화능을 지닌다.

단순 인산칼슘 시멘트를 이용한 지지체와 hASC 함유 Gelatin fiber 포함 지지체의 내부를 비교하였을 때, 복합화한 그룹에서 지지체 내부를 관통하는 미세 채널 상에 고르게 분포된 세포 형상을 확인하였다. 이에 골 결손 치료용 세포 전달체로 적용 시 기존 한계로 지적되던 인산칼슘 시멘트의 낮은 흡수성을 해결할 수 있는 새로운 접근법이 될 수 있다. 이외에도 제작된 CPC75와 B-CPC75는 배양 1주 차에도 DNA 함량의 증가 및 활발한 세포 증식이 이뤄졌음을 확인하였다. 이는 배양 기간 동안 원활한 영양분 공급 및 노폐물 제거가 되었을 뿐 아니라 복합 인산칼슘 시멘트 상에서도 세포가 정상 기능을 수행할 수 있음을 보여준다.

제작된 Gelatin fiber/nCPC의 골유도능 향상을 위해 골 형성 촉진 단백질을 추가 탑재한 뒤 분화 관련 유전자 발현 분석을 수행하였다. 지지체 배양 4주차에 대한 유전자 발현 분석 결과, 골 형성 촉진 단백질 포함 그룹에서 배양 초기 인자인 Runx-2와 Col1 $\alpha$ 1에 대한 통계적 유의미성을 확인

할 수 있었다. 이는 BMP-2가 포함됨에 따라 미포함 그룹 대비 골 분화 시작을 가속화 하였음을 의미한다. 해당 분석에서 골 분화 후기 유전자인 BSP와 OP에 대한 통계적 차이를 보이지 않았지만, 이는 4주 이상의 기간 부여 시 골 기질이 축적되어 발현 됨으로써 해당 인자에 대한 비교 분석이 가능할 것으로 판단된다. 이후 단백질 발현 분석을 수행한 결과 2주차에서의 ALP 발현과 4주차에서의 콜라겐 총 함량에서 통계적 유의미함을 확인하였다. 이는 이전의 유전자 발현에서 보인 경향과 유사하였으며, 여러 문헌을 통해 알려진 기간 별 골 분화 인자의 발현 양상과 동일하였다.

조직공학 분야에서 생체 재료는 조직이 형성되고 재생될 수 있는 가이드를 제시한다. 본 연구는 인산칼슘 시멘트를 골 결손부 치료용 세포 전달 지지체로 이용하기 위하여 hASC가 탑재된 Gelatin fiber를 제작한 뒤, 이를 nCPC와 복합화하였다. 제작된 지지체는 내부에 탑재된 세포를 보호하고 주사 가능한 제형으로의 제작이 가능하여 의학적 적용 시 큰 이점을 지닐 뿐만 아니라 기존 골 이식 충전재의 한계를 극복할 수 있는 새로운 대안이 될 것이라 판단된다.

#### References

- [1] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3 Suppl 3:S131-139.
- [2] Grabowski P. Physiology of Bone. Endocr Dev. 2015;28:33-55.
- [3] Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone. Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. J Orthop Trauma. 2019;33:203-213.
- [4] Lobb DC, DeGeorge BR, Chhabra AB. Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations. J Hand Surg Am. 2019;44:497-505.e492.
- [5] Winkler T, Sass FA, Duda GN, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. Bone Joint Res. 2018;7:232-243.
- [6] Iijima K, Otsuka H. Cell Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Bioengineering (Basel). 2020;7.
- [7] LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chem Rev. 2008;108:4742-4753.
- [8] Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. J Mater Sci Mater Med. 1998;9:723-726.
- [9] Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. Biomater Res. 2019;23:4.
- [10] Li X, Song T, Chen X, et al. Osteoinductivity of Porous Biphasic Calcium Phosphate. Ceramic Spheres with Nanocrystalline and Their Efficacy in Guiding Bone Regeneration. ACS Appl Mater Interfaces. 2019;11:3722-3736.
- [11] Vaccaro AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics. 2002;25:s571-578.
- [12] Verret DJ, Ducic Y, Oxford L, Smith J. Hydroxyapatite cement

- in craniofacial reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;133:897-899.
- [13] Cao Q, He Z, Sun WQ, et al. Improvement of calcium phosphate scaffold osteogenesis. *in vitro* via combination of glutamate-modified BMP-2 peptides. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;96:412-418.
- [14] Xu HH, Simon CG. Self-hardening calcium phosphate composite scaffold for bone. *tissue engineering.* *J Orthop Res.* 2004; 22:535-543.
- [15] Liu M, Lv Y. Reconstructing Bone with Natural Bone Graft: A Review of In Vivo Studies. in *Bone Defect Animal Model.* *Nanomaterials (Basel).* 2018;8.
- [16] Wong SK, Wong YH, Chin KY, Ima-Nirwana S. A Review on the Enhancement of Calcium. Phosphate Cement with Biological Materials in Bone Defect Healing. *Polymers (Basel).* 2021;13.
- [17] Li TL, Tao ZS, Wu XJ, Yang M, Xu HG. Selenium-modified calcium phosphate cement. can accelerate bone regeneration of osteoporotic bone defect. *J Bone Miner Metab.* 2021;39:934-943.
- [18] Huang B, Wu Z, Ding S, Yuan Y, Liu C. Localization and promotion of recombinant. human bone morphogenetic protein-2 bioactivity on extracellular matrix mimetic chondroitin sulfate-functionalized calcium phosphate cement scaffolds. *Acta Biomater.* 2018;71:184-199.
- [19] Levingstone TJ, Herbaj S, Dunne NJ. Calcium Phosphate Nanoparticles for Therapeutic. Applications in Bone Regeneration. *Nanomaterials (Basel).* 2019;9.
- [20] Ahlfeld T, Doberenz F, Kilian D, et al. Bioprinting of mineralized constructs utilizing. multichannel plotting of a self-setting calcium phosphate cement and a cell-laden bioink. *Biofabrication.* 2018;10:045002.
- [21] Lin Y, Huang S, Zou R, et al. Calcium phosphate cement scaffold with stem cell co-culture and prevascularization for dental and craniofacial bone tissue engineering. *Dent Mater.* 2019;35:1031-1041.
- [22] Jang JH, Shin S, Kim HJ, et al. Improvement of physical properties of calcium phosphate. cement by elastin-like polypeptide supplementation. *Sci Rep.* 2018;8:5216.
- [23] Ghaffari S, Solati-Hashjin M, Zabihi-Neyshabouri E, Rabiee SM. Novel calcium. phosphate coated calcium silicate-based cement: *in vitro* evaluation. *Biomed Mater.* 2020;15:035008.
- [24] Kolk A, Handschel J, Drescher W, et al. Current trends and future perspectives of bone. substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40: 706-718.
- [25] Diaz MA, Branch EA, Paredes LA, Oakley E, Baker CE. Calcium Phosphate Bone Void. Filler Increases Threaded Suture Anchor Pullout Strength: A Biomechanical Study. *Arthroscopy.* 2020;36:1000-1008.