

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000506-01

과제번호 107044-3

보안과제(0), 일반과제()

동물 세포 및 조직 배양을 위한 3차원 생체 자극
배양시스템 개발

Development of a 3D Culture System with Bio-Stimuli
for Animal Cells and Tissues

서울대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동물 세포 및 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 05 월 26 일

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 정 종 훈

연 구 원 : 임 기 택

연 구 원 : 선 우 훈

연 구 원 : 백 수 정

연 구 원 : 임 애 리

연 구 원 : 이 응 태

연 구 원 : 김 창 일

연 구 원 : 이 기 봉

연 구 원 : 홍 운 표

위탁연구기관명 : (주) 바이오트론

위탁연구책임자 : 장 규 호

참 여 기 업 : (주) 바이오트론

요 약 문

I. 제 목

동물 세포 및 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- 가. 동물 세포의 배양 촉진을 위한 전류, 초음파 등의 생체자극기술을 개발한다.
- 나. 동물 세포 및 조직의 생체외 배양을 위해 지지체 등을 이용한 3차원 배양기술을 개발한다.
- 다. 생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직 배양용 3차원 배양시스템을 개발하고 성능을 평가한다.

2. 연구개발의 필요성

- 가. 최근에는 동물 세포로부터 생체 외(in-vitro)에서 실제 생체 내(in-vivo)의 기능을 갖도록 세포 분화 기술을 이용 및 유도하여 다양한 조직을 구성하는 생체조직공학 연구가 활발한 바, 동물의 세포 및 생체조직의 적정 배양시스템 개발 연구가 필요함.
- 나. 현재 국내에서 난치병 치료를 위해 배아줄기세포 및 성체줄기세포에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있음. 하지만, 이와 관련하여 동물 생체조직의 생체 외 3차원 배양은 거의 이루어지고 있지 않음. 이에 국내에서 세계 최초로 동물 세포 및 조직을 3차원으로 배양하는 배양시스템과 배양기술 개발을 확보하고자 함.
- 다. 생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직 배양용 3차원 배양시스템을 설계하기 위해서는 세포의 성장과 분화에 영향을 미치는 전류, 초음파 등의 생체자극 기술 개발과 배양시스템 내

부에서의 산소분압 및 영양소의 물질전달(Mass transfer)에 대한 연구가 절대적으로 필요한 실정임. 국내·외적으로, 동물 세포의 성장촉진을 위한 생체역학적 자극기술에 대한 연구보고는 미흡한 상태이며 동물 세포 및 조직의 생체 외 배양에 대한 연구는 보고된 바가 미흡함.

라. 동물의 세포 및 조직을 생체 외에서 배양하는 경우, 현 기술로는 생체 내 배양에 비해 현저히 떨어지므로 주로 생체 내에서 배양하고 있음. 또한, 동물 세포 및 조직을 생체 외에서 배양시 고가의 영양배지에 의존하고 있음. 그러므로, 이를 촉진시키기 위해서는 전류, 초음파, 유체흐름 등의 생체역학적 자극기술과 배양의 최적조건을 제공하는 조직배양 기술 개발이 반드시 필요함.

마. 생체 외에서 동물의 세포 및 조직을 스트레스를 받지 않고 3차원으로 배양할 수 있는 배양시스템이 없음. 이에 양수에서 태아가 자라듯 생체 외에서 3차원적으로 동물 세포 및 조직을 배양할 수 있는 시스템의 개발이 절실히 필요함.

바. 세포 배양기술, 생체자극 기술, 생물자원(동물뼈) 등을 이용한 인공조직 제조 등의 기술들을 종합적으로 응용하여 동물 세포 및 조직을 생체 외에서 3차원적으로 배양할 수 있는 배양시스템의 개발이 절실히 요구되고 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구분	세부 과제별	연구개발의 내용	연구개발의 범위
1차년도	(세부)	동물 세포의 배양촉진을 위한 생체자극기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> -동물뼈(무균돼지) 및 생물자원을 이용한 생체조직 지지체(scaffold) 제조 및 특성 구명 -세포의 배양촉진을 위한 초음파 생체 자극 기술개발 (자극강도: 50, 100, 200, 300, 400, 500 mW/cm², Duty cycle, 자극시간 효과구명) -동물세포 배양시스템 설계 및 적정 배양기술 개발
	(위탁)	동물세포 배양시스템 설계	-동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 기본설계
2차년도	(세부)	동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템의 설계 및 제작	<ul style="list-style-type: none"> -미세전류 자극이 동물 세포 배양시 증식에 미치는 영향 구명 (자극수준 : 0.5, 38.0, 75.5 mA) -전자기장 자극: 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 mT -자기장 자극: 50, 100, 130, 160, 200, 260 mT -생체자극 기술을 이용한 동물 세포, 조직용 배양시스템 설계 및 제작 -지지체 등을 이용한 3차원 배양기술 개발
	(위탁)	동물세포 배양시스템 제작	-동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 제작
3차년도	(세부)	동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템의 개발 및 성능 개선	<ul style="list-style-type: none"> -생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직 배양용 3차원 배양시스템 개발 -세포, 조직의 배양조건 및 배양특성을 통한 종합적인 3차원 배양환경시스템 구축 -3차원 생체자극 배양시스템을 이용한 동물 세포의 생체 외 배양실험 -생체 외 3차원 동물 세포 배양실험을 통한 동물 세포, 조직의 성장성 평가
	(위탁)	동물세포 배양시스템 제작 및 성능개선	-동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템의 제작 및 성능개선, 보완

IV. 연구개발 결과

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구개발 결과
돼지뼈의 바이오세라믹을 이용한 생체조직 지지체(scaffolds) 제조, 특성 구명 및 배양기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> -돼지뼈의 바이오세라믹을 이용한 생체조직 지지체(scaffolds) 제조 -지지체의 구조, 공극률, 친수성 등의 생체역학적 특성 구명 -지지체의 세포독성 등과 관련된 생체적합성 특성 구명 -3D지지체를 이용한 배양기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 무균돼지뼈를 이용해 바이오세라믹의 생체재료 제조 및 특성을 구명함. - 돼지뼈로 얻은 바이오세라믹(수산화인회석)이 생체적합성이 좋은 생체재료로써 사용될 수 있으며, 생체적합성 지지체를 제조함. - 3D지지체를 이용한 세포배양기술 개발
세포의 배양촉진을 위한 초음파 생체 자극기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> -초음파 강도 효과 구명: 초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300, 400, 500 mW/cm²의 강도로 자극실험을 함. duty cycle은 50%로 설정함. -초음파 duty cycle 효과 구명: 파형은 펄스모드에서는 duty cycle 5%, 10%, 30%, 50%로 자극 실험을 수행함(50, 100, 200, 300 mW/cm², 자극시간: 10 min) - 초음파 자극시간 효과 구명: 1, 3 5, 10, 20, 30분 처리함 (50, 100, 200, 300 mW/cm², Duty cycle: 10%와 30%) 	<ul style="list-style-type: none"> -초음파 프로브가 항은 배양기 내에 위치하여 37℃, 95% 수분, 5% CO₂ 조건이 유지된 상태에서 매일 일정시간 10분씩 3일 동안 자극을 가하였고 대조군은 자극을 주지 않고 3일간 동일한 상태에서 배양함. - 초음파 강도 효과 구명: 50 mW/cm²의 강도와 duty cycle 10%, 자극시간 10분에서 세포증식 효과가 138%로 높게 나타남. - 초음파 duty cycle은 5-10%가 좋음. - 초음파 자극시간은 10분이 적정. - 초음파 자극의 줄기세포 증식율: 138%-157% - 초음파자극이 세포분화 촉진을 가져옴 -치수줄기세포에서도 150% 증식을 보임 (검증 실험)
동물세포 배양시스템 설계 및 적정 배양기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> 배양시스템 설계 및 적정배양기술 개발 -동물세포 배양용 3D 챔버(카트리지) 개발 -정량펌프 선정 및 제어부 -Perfusion Culture System설계 -적정 배양기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 동물세포 배양시스템 설계 및 적정 배양기술 개발 -Animal cell culture chamber 설계,개발 -Perfusion culture system 설계 및 제작 (cell culture cartridge, peristaltic pumps, a fresh medium bottle, a waste medium bottle, and pH/DO measurement 등 구성) -배양시스템 제어부 설계 및 제작
동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 기본설계(위탁)	<ul style="list-style-type: none"> -배양시스템의 주요부 설계 -배양시스템의 계측제어 설계 	<ul style="list-style-type: none"> - 배양시스템의 주요부 제작 - 배양시스템의 계측제어 제작

연구 범위	연구수행 방법 (이론적·실험적 접근 방법)	연구개발 결과
<p>미세전류, 전자기장, 및 자기장 자극이 동물 세포 배양에 미치는 영향 구명</p>	<p>-치수줄기세포에 전기자극을 가했을 때 세포 내, 외의 물질변화에 대해 살펴봄으로써, 전기자극이 주는 효과에 대해 알아봄.</p> <p>- 전자기장 자극이 치조골줄기세포의 증식과 분화에 미치는 영향 구명</p> <p>- 자기장 자극이 치조골줄기세포의 증식과 분화에 미치는 영향 구명</p>	<p>-최적 전류 자극 세기는 38uA로서, 약 120% 줄기세포 증식율이 나타남. 38uA에서 자극을 받은 세포를 배양한 배양플레이트에서 수거한 용액을 다시 치수줄기세포에 적용했을 때 가장 세포증식이 늘어나는 것으로 나타났음.</p> <p>-전기자극을 받은 세포 내부의 단백질 패턴변화를 알아본 결과 혈청이 없는 배지에서 배양한 실험군에서 전기자극에 의해 기준그룹과 비슷한 오스테오칼신 발현을 보였음. 전류자극이 세포분화 촉진을 가져옴</p> <p>- 전자기장 자극(10분/일, 3일)은 줄기세포 증식에는 약 120-125% 효과가 있음(코일 수직 설치시). 줄기세포의 골분화에도 140% 효과.</p> <p>- 자기장 자극(130, 160 mT에서 10분/일, 3일)은 약 115%의 증식 효과 보임.</p> <p>- 자기장 자극(100 mT)의 wound healing 효과는 145%</p> <p>- 자기장 자극(160 mT)의 미네랄화 효과는 140%, ALP 활성화 효과는 200%(130 mT)</p>
<p>생체자극 기술을 이용한 동물 세포, 조직용 3차원 배양시스템 개발 및 종합적인 3차원 배양환경 시스템 구축</p>	<p>배양시스템 개발 및 적정 배양기술 개발</p> <p>-동물세포 배양용 3D Perfusion Culture Chamber System 개발</p> <p>-동물세포 배양용 3D Perfusion Bioreactor System 설계 및 개발</p> <p>-정량펌프 선정 및 제어부</p> <p>-Perfusion Culture 의 영향</p> <p>-Live Cell Monitoring 기술 개발</p> <p>-적정 배양기술 개발</p>	<p>배양시스템 개발 및 적정 배양기술 개발</p> <p>-동물세포배양용 3D Perfusion Culture Chamber System 설계 및 개발하였음.</p> <p>-동물세포배양용 3D Perfusion Bioreactor System 설계 및 개발하였음.</p> <p>-정량펌프시스템 및 제어부 개발</p> <p>-개발한 관류식 배양시스템으로 약 115%의 치조골줄기세포 증식효과가 있었음.</p> <p>-개발한 관류식 배양시스템에서 초음파 자극시 약 130%의 치조골줄기세포 증식효과가 있었음(관류 속도 0).</p> <p>-Live Cell Monitoring System 개발을 통해 세포관찰이 용이한 적정 배양기술 개발</p>

연구 범위	연구수행 방법 (이론적·실험적 접근 방법)	연구개발 결과
<p>동물 세포, 조직 배양을 위한 배양시스템의 비접촉식 실시간 배양배지 분석시스템 개발</p>	<p>- Near-Infrared Reflectance(NIR) Spectroscopy를 이용해 배지의 성분을 비접촉식으로 분석함</p> <p>- 배지의 주 영양소인 glucose와 신진대사 산물인 lactate를 NIR을 이용해 분석함</p>	<p>- NIR을 이용해 배지의 glucose와 lactate를 비접촉식으로 실시간 분석이 가능함을 구명함.</p> <p>- NIR수치와 ion chromatograph값과 상관관계수 값: glucose(r= 0.996), lactate(r=0.975)</p>
<p>동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 제작 및 성능보완 (위탁)</p>	<p>-배양시스템의 주요부 제작 및 성능보완</p> <p>-배양시스템의 계측제어 제작 및 성능보완</p>	<p>-배양시스템의 주요부 제작 및 성능보완</p> <p>-배양시스템의 계측제어 제작 및 성능보완 (소프트웨어 개발)</p>

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

가. 기술적 측면

- 1) 돼지뼈를 이용한 생체조직 지지체 제조기술을 확보함
- 2) 생체친화력이 우수한 생체조직공학용 바이오세라믹재료 기술개발 확보함.
- 3) 초음파 자극기술을 이용한 배양 및 분화 촉진 기술을 확보함
- 4) 전류 자극기술을 이용한 배양 및 분화 촉진 기술을 확보함
- 5) 전자기장 자극기술을 이용한 배양 및 분화 촉진 기술을 확보함
- 6) 자기장 자극기술을 이용한 배양 및 분화 촉진 기술을 확보함
- 7) 생체자극기술을 이용한 동물세포, 조직 배양용 3차원 배양시스템 개발 기술을 확보함

나. 경제적 · 산업적 측면

- 1) 동물세포 배양기 전문 기업인 (주)바이오트론 과의 협동 연구를 통해, 본 연구에서 개발한 생체자극을 이용한 동물세포 배양용 3차원 배양시스템 개발은 산업화가 바로 가능하여 국내·외의 경제적 및 산업적 효과를 가져올 수 있음.
- 2) 동물 생체조직 및 기관의 3차원 배양시스템은 인공장기 개발 산업과 관련한 바이오산업 분야에 큰 경제적 · 산업적 효과를 기여할 수 있음
- 3) 생물자원을 이용한 생체조직 지지체 개발은 수입품에 의존하는 생체재료의 바이오산업 분야에 고부가가치 효과를 가져올 수 있음
- 4) 폐기된 소, 돼지 등의 동물뼈를 재활용한 칼슘화합물(인회석)의 바이오세라믹 제조 개발은 생체재료의 수입 대체로 인해 경제적 및 산업적 측면에서 큰 효과기대.
- 5) 생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직의 3차원 배양시스템 개발은 세포·조직의 배양을 촉진하는 연구임. 이러한 첨단 기술은 고부가가치의 배양 분야에 응용이 가능하여 바이오산업 분야의 배양시스템 산업화 및 국산화에 큰 기여를 할 수 있음.

다. 학술적 측면

- 1) 국내학술지 2건,
- 2) SCI(e) 논문 7건 (아래 목록 참조)
- 3) 국내학회 발표: 16건
- 4) 국외학회 발표: 16건,
- 5) 세미나 1건,
- 6) 인력양성: 박사 1명, 석사 4명,
- 7) 기술지도 1건

* 참고: 현재까지 게재된 논문목록(현재 SCI급 논문 3편 투고중, 추후 더 게재 예정임)

번호	구분	논문	연구책임자 여부	게재지	게재일 (등록일)	Impact Factor	특기사항
1	SCIe	Development of a Perfusion Flow Bioreactor System for Cultureing Human Alveolar Bone Marrow Stem Cells	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(14), 1410~1419	2009.12.01	3.158	IF 2010.7 기준
2	SCIe	Biomechanical Effects of Fluid Dynamics, and Mass Transport on Cell Growth in Perfusion Bioreactors for Tissue Engineering	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(14), 1327~1342	2009.12.01	3.158	
3	SCIe	Mechanical Stimulation of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(1-3), 199~206	2009.03.02	3.158	
4	SCIe	In Vitro Effects of Electromagnetic Field Stimulation on Cells in Tissue Engineering	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(4), 675~684	2009.06.02	3.158	
5	SCIe	Novel Perfusion Bioreactor Systems for Tissue Engineering	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(1-3), 207~218	2009.03.02	3.158	
6	SCIe	Influence of Static Magnetic Field Stimulation on Cells in Tissue Engineering	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 6(1-3), 250~258	2009.03.02	3.158	
7	SCIe	Ultrasound Stimulation on the Proliferation of Alveolar Bone Marrow Stem Cell	연구책임자	Tissue Engineering and Regenerative Medicine 5(4-6), 572~580	2008.12.01	3.158	

2. 성과활용 방안

- 1) 동물뼈를 이용한 생체조직 지지체 제조기술 특허 출원
- 2) 돼지 등의 동물뼈·무균돼지뼈를 재활용한 바이오세라믹재료 제조기술의 특허 출원
- 3) 초음파 자극기술을 이용한 배양촉진 기술 특허출원
- 4) 전류 자극기술을 이용한 배양촉진 기술 특허출원
- 5) 전자기장 자극기술을 이용한 배양촉진 기술 특허출원
- 6) 자기장 자극기술을 이용한 배양촉진 기술 특허출원
- 7) 생체자극기술을 이용한 3차원 배양시스템의 특허출원 및 산업화
- 8) 배양촉진용 관류식 생체자극 배양시스템에 대한 기술 이전 및 산업화 활용

SUMMARY

1. Preparation and Characteristics of Novel Bioceramic Biomaterials from Gnotobiotic Pig Bones

The properties of apatite bioceramics produced by heat treatment from an extracted gnotobiotic pig bones were investigated according to sintering temperatures between 600°C and 1200°C. The sintered gnotobiotic pig bone powders were characterized by thermal analysis (thermogravimetric analysis (TG)/differential thermal analysis (DTA)), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), X-ray diffraction (XRD), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy. The XRD results showed that the annealing process produced useful hydroxyapatite-based bioceramic biomaterials when annealed above 600°C. The FTIR spectra and the TG/DTA thermogram of gnotobiotic pig bone powders indicated the presence of organic compounds, which were completely removed after annealing at temperatures above 600°C. gnotobiotic pig bone powders annealed between 800°C and 1200°C had the characteristics necessary for application as bioceramic biomaterials for tissue engineering.

2. Preparation and Characteristics of Novel Composite Scaffolds using Bio-Resources

Highly porous composite bioceramic scaffolds were developed using sintered teeth. These composite scaffolds consisted of poly-D,L-lactic acid (P(D,L)LA) and bioceramic materials of gnotobiotic pig bone powders. The composite scaffolds promoted biocompatibility and had interconnected pores that could adequately support cell adhesion and proliferation. In this study, we investigated the properties and biocompatibilities of composite scaffolds prepared by a solvent casting/particulate leaching method and a gas forming method. We prepared the composite ceramic scaffold using gnotobiotic pig boneapatites obtained from extracted teeth, and assessed the biocompatibility of the composite scaffolds by the two methods in order to select the most appropriate scaffold for gnotobiotic pig bone regeneration. The human dental pulp stem cells that were seeded on the composite scaffolds were easily attached and well proliferated as confirmed by a cytotoxicity test, cell adhesion assessment and histological study.

3. The Effects of Low Intensity Ultrasound Stimulation on Animal Cells

Low-intensity ultrasound stimulation produces significant multi-functional effects that are directly relevant to bone formation. It was previously found that low-intensity ultrasound stimulation enhanced bone regeneration although the exact cellular mechanism is not clear. The aim of the present study is to investigate the effect of low-intensity ultrasound stimulation on proliferation of alveolar bone marrow stem cells. Before low-intensity ultrasound stimulation, alveolar bone marrow stem cells were cultured for 24h to facilitate their attachment. The cells were cultured in medium with or without low-intensity ultrasound stimulation. The ultrasound frequency was 1 MHz. Cell cultures stimulated with ultrasound were conducted by three treatment groups - group 1: intensity(50, 100, 200, 300, 400 and 500 mW/cm²), group 2: duty cycle(5, 10, 30 and 50%) and group 3: duration time(1, 3, 5, 10, 20 and 30 min). The effect of low-intensity ultrasound stimulation were evaluated by cell number and morphological changes. The proliferation rates of alveolar bone marrow stem cells for the particular stimulated groups were larger than those of control groups. After low-intensity ultrasound stimulation with intensity of 50 (200) mW/cm², 10% (5%) duty cycle and 10 min (10 min) duration time, the alveolar bone marrow stem cell counts were significantly increased to about 138% (157%) ($p < 0.05$). This study suggested that the cell growth could be enhanced by appropriate low-intensity ultrasound stimulation.

4. The Effects of Micro-Electric Current Stimulation on Animal Cells

The use of electric and electromagnetic forces to treat disease has fascinated the general public and scientists. Electric and electromagnetic fields as well as electrophysiology, have been studied with increasing interest during past decades. Despite the growing understanding and interesting of the biologic effects on electro-stimulated tissue, a few have researched whether these properties can be applied to dental pulp stem cells which are the most important type of cells in dental tissue engineering. In this study, the intracellular and extracellular behaviors of dental pulp stem cells stimulated by the micro-electric current as stimulation was observed. Additionally, statistical method, response surface analysis, was applied for finding unknown optimum electrical stimulation conditions. Although it should be understood about the feature of response to the micro-electric current of dental pulp stem cells prior to investigate the effect of electrical stimulation, there was no information about the response of dental pulp stem cells to the

electrical stimulation. That is the reason why the statistical method was required for finding optimum stimulation conditions. On the other hand, an electro-conductive polymer, polypyrrole, was also investigated for suggestion as a material of scaffold normally implicated into the research of tissue regeneration. Dental pulp stem cells extracted from adult teeth were used in this study, and micro-electro current through the prepared micro-electric current supply was introduced in this study. From optimization analysis, optimum current intensity was revealed as 38 μ A. The electro-stimulated dental pulp stem cells excited with 38 μ A, which was an obtained value as an optimum stimulation current intensity, were revealed the greatest proliferation rate compared with a control group. Electro-stimulated exterior cellular proteins were revealed in different patterns compared with proteins contained in normal medium in both cases, serum free media and media with 10% FBS. On the other hand, electro-stimulated cells and normal cells, incubated with the serum free media, osteocalcin was expressed in the same degree. Cell proliferation rate of dental pulp stem cells treated by the electro-stimulated conditioned medium was the highest at 38 μ A current intensity. In the case of experiment through polypyrrole, topology of the surface was tougher at the thicker film according to the result of a scanning electron micrograph. In addition, dental pulp stem cells showed the capacity of adhesion on various types of film according to the thickness.

5. The Effects of Pulsed Electromagnetic Field Stimulation on Animal Cells

This study was performed to investigate the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the proliferation and differentiation of alveolar bone marrow stem cells. After continuous stimulation and 30 min/day for 3 days, the cell viability of alveolar bone marrow stem cells decreased to 10%, and was especially noticeable at the intensity of 2.0, and 3.0 mT with 20 Hz compared to the control. Also, the cell viability of alveolar bone marrow stem cells was no difference with respect to the control after a stimulation time of 10 min/day x 3 days. The cell growth morphology of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture was unable to detect any morphological changes with the pulsed electromagnetic field stimulation for a stimulation time of 10 min /day for 3 days. Moreover, migration rates of alveolar bone marrow stem cells were no difference with an intensity of whole treatments, compared to the control. We investigated the effects of long-term pulsed electromagnetic field stimulation on the differentiation of alveolar bone

marrow stem cells. The formation of mineralized nodules showed that bone nodule formation increased by about 40% at pulsed electromagnetic field of whole treatments, compared to the control. The alkaline phosphatase activity of pulsed electromagnetic field stimulation significantly increased by about 40% at day 25, compared to that of the control. In conclusion, the present findings suggest that long-term pulsed electromagnetic field stimulation at the proper intensity enhances bone formation by promoting the differentiation and maturation of alveolar bone marrow stem cells.

6. The Effects of Static Magnetic Field Stimulation on Animal Cells

To date, no studies have investigated the effects of static magnetic field stimulation on the proliferation and differentiation of alveolar bone marrow stem cells. Here, we investigated the effects of static magnetic fields on osteogenesis by examining its effect on the proliferation and migration of alveolar bone marrow stem cells, mineralized nodule formation, and alkaline phosphatase activity. The cells were cultured in medium with or without static magnetic field stimulation. After stimulation for 10 min/day, the cell viability was significantly increased compared to the control. In addition, cell growth morphology showed that the cell migration rate was higher than the control. We also investigated the effects of long-term static magnetic field stimulation on the differentiation of alveolar bone marrow stem cells. Alizarin red staining showed that bone nodule formation and alkaline phosphatase activity significantly increased compared to the control after static magnetic field stimulation treatments, with intensities of 100, 130, and 160 mT. These results suggest that long-term static magnetic field stimulation at the proper intensity enhances the differentiation and maturation of alveolar bone marrow stem cells. Our study demonstrates that static magnetic field stimulation directly affects osteogenic cells, leading to mineralized nodule formation. In view of the widespread use of static magnetic stimulation in clinical therapy for alveolar bone tissue disease, it is likely to have an important influence on key functional activities of osteoblasts in alveolar bone.

7. Development of a Perfusion Flow Bioreactor System for Culturing Animal Cells

We have developed and evaluated a novel perfusion flow culture system which facilitates the observation of living cells for extended periods of time. Cell viability of alveolar bone marrow stem cells showed that cell growth rate cultured (without medium perfusion) using the novel flow perfusion chamber system revealed a similar trend ($p>0.05$) compared to that of traditional, static culture. Also, the cell viability under the static culture (without perfusion) and flow perfusion culture (flow rate: 0.03 ml/min) with the developed perfusion culture system was compared. The cell growth rate of the perfusion flow culture was significantly higher ($p<0.05$) than that of static culture for 4 days. The cell growth rate was efficiently increased to about 110~115% with the precision perfusion culture. These results indicate that the culture system that can provide mechanical signals has important applications. Additionally, the developed cell culture chamber system has been successfully used to maintain and record the morphology of cultured alveolar bone marrow stem cells. It was possible to monitor and capture the live cell morphology cultured in the perfusion culture system. The characteristics of the culture system developed in this study was fast to culture stem cells with mechanical stimulation and to monitor live cell imaging while promoting healthy cellular activity outside of an incubator environment. Through experimental results, the developed perfusion culture system could increase cell growth with proper flow based on mechanical stimuli.

8. Development of a Novel 3D Culture System with Bio-stimuli for Animal Cells and Tissues

This article presents a novel automatic perfusion flow bioreactor system for the functional tissue engineering using alveolar bone marrow stem cells which enables medium perfusion over long periods of time, under controlled cultivation and physical stimulation conditions while ensuring system sterility. The developed perfusion bioreactor system mainly consists of a small, perfused, autoclavable and cell chamber culture system with several measurement sensors. This precise measurement allows the cell mechanical properties such as shear stress of the cultured tissue to be monitored in real-time. Cell viability showed that cell growth rate cultured (without medium perfusion) using the novel flow perfusion chamber system revealed a similar trend ($p>0.05$) to that of static culture. Also, the cell viability under the static culture (without perfusion) and flow perfusion culture (flow rate: 0.03 ml/min) with the developed perfusion bioreactor system was

compared. The cell growth rate of the flow perfusion culture was significantly higher ($p < 0.05$) than that of static culture for 4 days. The cell growth rate was efficiently increased to about 10–15% by the precision perfusion culture. These results indicate that a bioreactor system that can provide mechanical signals has important applications. Additionally, the developed cell culture chamber system has been successfully used to maintain and record the morphology of cultured alveolar bone marrow stem cells. It was possible to monitor and capture the live cell morphology cultured in the perfusion bioreactor. The characteristics of the bioreactor developed in this study was fast to culture stem cells with mechanical stimulation and to monitor live cell imaging while promoting healthy cellular activity outside of an incubator environment. Through experimental results, the developed perfusion bioreactor could increase cell growth with proper flow based on mechanical stimuli. Experimental data on mechanotransduction and long-term studies on the beneficial effects of combined perfusion and different low intensity ultrasound on alveolar bone marrow stem cells seeded scaffolds will be published separately.

9. Near-Infrared Spectroscopy Analysis for Monitoring Culture Medium Components in an Automatic Cell Culture System of Perfusion Flow

The ultimate goal of perfusion bioreactor system is achieving maximum efficiency in cell proliferation and differentiation in tissue engineering. In this study, main research for control system design is constructed to monitor and control in an efficient way the growth environment in the bioreactor system. The scope of the control system can be extended to include the estimation of the current state of cell culture. This control concept is referred to as physiological state control. Assessment of the cells culture medium state during a culture is essential for cell culture and the design of effective control strategies. For these methods to be truly effective in detecting the cellular response to environmental changes or operating conditions, they must be based on a profound knowledge of the cell metabolism.

Several waste products of cell metabolism have been reported to be inhibitory or toxic to cells. The most important substances are ammonia and lactate. Lactate excretion is due to incomplete oxidation of glucose by the glycolytic pathway. Pyruvate, the end product of this pathway, is transformed to lactate in order to maintain the oxidation state of the cell, i.e., to recover the oxidized form of the redox cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). The toxic action of lactate is probably due to the effect on the pH and osmolarity of the culture medium, only occurring at relatively high concentrations. To overcome this limitation of these flow injection type's drawbacks, continuous supplementation of fresh

media and removal of waste products allow to try to measure with optical measurement method like near-infrared spectroscopy. Furthermore, the appropriate operating conditions must be determined, so as to continuously maintain the cell culture medium. In the present work, an automatic perfusion flow bioreactor system for alveolar bone stem cell culture was to developed. Therefore, The goal of this study was to investigate the near-infrared spectroscopy analysis of culture medium for alveolar bone marrow stem cells in an automatic cell culture system of perfusion flow. By allowing to monitor the culture medium status, this approach can provide an optical sensor for process optimization and control.

The major goal of this paper is to find out the relationship between measred data and data of near-infrared spectroscopy for fast monitoring the concentration of culture medium components(glucose and lactate) in an automatic cell culture system of perfusion flow. Data of quantiative glucose consumption and lactate production in cell culture medium taken during the growth period were obtained from the ion chromatograph instrument. Medium samples extracted from culture dish were analyzed with a near-infrared spectroscopy, providing a development of the non-invasive method to detect culture medium components like glucose and lactate real time.

CONTENTS

CHAPTER 1. NECESSITY, OBJECTIVES AND CONTENTS OF THE STUDY

Section 1. Necessity of the study -----	19
Section 2. Objectives and contents -----	19

CHAPTER 2. SURVEY OF DOMESTIC AND FOREIGN TECHNICAL

DEVELOPMENT -----	21
-------------------	----

CHAPTER 3. RESULTS AND CONTENTS OF RESEARCH AND DEVELOPMENT

Section 1. Preparation and Characteristics of Novel Bioceramic Biomaterials from Gnotobiotic Gnotobiotic Pig Bones

1. Introduction -----	22
2. Materials and methods -----	23
3. Results and discussion -----	25
4. Summary and conclusions -----	29

Section 2. Preparation and Characteristics of Novel Composite Scaffolds using Bio-Resources

1. Introduction -----	30
2. Materials and methods -----	31
3. Results and discussion -----	33
4. Summary and conclusions -----	37

Section 3. The Effects of Low Intensity Ultrasound Stimulation on Animal Cells

1. Introduction -----	38
2. Literature review -----	40

3. Materials and methods	-----43
4. Results and discussion	-----46
5. Summary and conclusions	-----60

Section 4. The Effects of Micro-Electric Current Stimulation on Animal Cells

1. Introduction	-----62
2. Literature review	-----62
3. Materials and methods	-----63
4. Results and discussion	-----65
5. Summary and conclusions	-----75

Section 5. The Effects of Pulsed Electromagnetic Field Stimulation on Animal Cells

1. Introduction	-----76
2. Literature review	-----76
3. Materials and methods	-----78
4. Results and discussion	-----82
5. Summary and conclusions	-----91

Section 6. The Effects of Static Magnetic Field Stimulation on Animal cells

1. Introduction	-----92
2. Literature review	-----92
3. Materials and methods	-----94
4. Results and discussion	-----96
5. Summary and conclusions	-----104

Section 7. Development of a Perfusion Flow Bioreactor System for Culturing Animal Cells

1. Introduction	-----106
-----------------	----------

2. Literature review -----	108
3. Materials and methods -----	117
4. Results and discussion -----	120
5. Summary and conclusions -----	124

Section 8. Development of a Novel 3D Culture System with Bio-Stimuli for Animal Cells and Tissues and Its Performance Improvement

1. Introduction -----	125
2. Materials and methods -----	126
3. Results and discussion -----	135
4. Summary and conclusions -----	148

Section 9. Near-Infrared Spectroscopy Analysis of Culture Medium Components for Animal Cells in Automatic Cell Culture System of Perfusion Flow

1. Introduction -----	150
2. Materials and methods -----	151
3. Results and discussion -----	154
4. Summary and conclusions -----	159

CHAPTER 4. PERFORMANCE ACCOMPLISHMENT AND CONTRIBUTIONS ---	160
--	-----

CHAPTER 5. APPLICATION PLANS -----	162
---	-----

CHAPTER 6. INFORMATION ON FOREIGN SCIENTIFIC TECHNIQUE -----	164
---	-----

CHAPTER 7. REFERENCES -----	169
------------------------------------	-----

제 1 장 연구개발 과제의 개요

1. 연구개발의 목적

- 가. 동물 세포의 배양 촉진을 위한 전류, 초음파의 생체자극 기술을 개발한다.
- 나. 동물 세포 및 조직의 생체 외 배양을 위해 지지체 등을 이용한 3차원 배양기술을 개발한다.
- 다. 생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직 배양용 3차원 배양시스템을 개발하고 성능을 평가한다.

2. 연구개발의 필요성 및 범위

2.1 연구개발의 필요성

가. 최근에는 동물 세포로부터 생체 외(in-vitro)에서 실제 생체 내(in-vivo)의 기능을 갖도록 세포 분화 기술을 이용 및 유도하여 다양한 조직을 구성하는 생체조직공학 연구가 활발한 바, 동물의 세포 및 생체조직의 적정 배양시스템 개발 연구가 필요함.

나. 동·식물세포 배양기 전문 기업인 (주)바이오트론 과의 협동 연구를 통해 본 연구에서 개발한 생체자극을 이용한 세포, 조직 배양용 3차원 배양시스템 개발은 산업화가 바로 가능하여 국내·외의 경제적 및 산업적 효과를 가져올 수 있음.

다. 동물 세포 및 조직을 배양하는 시스템 개발은 인공장기 등의 생체 외 배양과 관련한 바이오산업 분야에 응용이 가능하리라 사료됨. 현재도 동물세포 배양시스템을 전부 수입하고 있는 실정이므로 국내에서 동물 세포 및 조직을 3차원으로 배양할 수 있는 시스템을 개발해 전 세계에 보급하면 외화획득에 큰 기여를 가져올 수 있음. 간단한 동물세포 배양장치도 약 3000만원 이상으로 수입하고 있어서 수입대체 효과가 매우 크리라 생각됨.

라. 동물 세포, 조직 배양시스템을 인공장기 개발 산업과 연계함으로써 바이오산업에 큰 기여를 할 수 있음. 노령인구와 의료 수요가 점점 많아지는 만큼, 인공장기의 수요와 시장규모 비중은 증가할 것임. 인공연골의 2020년 국내 시장 예상 규모는 3000억 이상임.

마. 본 연구의 배양시스템은 손상된 조직의 일부분을 대체할 수 있는 바이오장기 개발에 이용이 가능함. 동물 세포, 조직 배양시스템 개발은 필요로 하는 조직기관의 수급불균형과 같은 사회적 문제 심각성의 해결방안에 크게 기여할 수 있음.

바. 동물 세포, 조직의 3차원 배양시스템 개발은 현재 윤리적으로 문제가 야기되는 배아줄기 세포를 사용하는 것이 아니라 성체줄기세포를 이용함. 그리하여 본 연구는 윤리적인 문제의 소지가 생기지 않으면서, 세포 및 조직의 In vitro 배양에 대한 연구를 가능케 하여 사회·경제적 기여도가 매우 크리라 사료됨.

사. 조직공학용 생체조직 제품은 부가가치가 매우 높을 것으로 예상됨에도 불구하고 국내의 연구 및 임상 분야에서는 완제품 수입에 의존하고 있음. 따라서, 수입품에 대체할 수 있는 생체적합성이 뛰어난 농·축산물의 생물천연자원을 이용하여 생체조직 지지체를 개발함으로써 고부가가치의 바이오산업에 이바지 할 것으로 기대됨.

아. 세포 배양기술, 생체자극 기술, 생물자원(동물뼈) 등을 이용한 인공조직 제조 등의 기술들을 종합적으로 응용하여 동물 세포 및 조직을 생체 외에서 3차원적으로 배양할 수 있는 배양시스템의 개발이 절실히 요구되고 있음.

2.2 연구개발의 범위

가. 동물 세포의 배양촉진을 위한 생체자극기술 개발

- 1) 생물자원(동물뼈 등)을 이용한 지지체(scaffold) 제조
- 2) 생체조직용 지지체의 생체역학적 특성 구명
- 3) 세포의 배양촉진을 위한 초음파 생체자극 기술개발

나. 동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템의 설계 및 제작

- 1) 미세전류 처리가 동물 세포 배양에 미치는 영향 구명
- 2) 생체자극 기술을 이용한 동물세포 배양용 3차원 배양시스템 설계 및 제작
- 3) 지지체 등을 이용한 동물세포의 3차원 배양기술 개발

다. 동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템의 개발 및 성능 개선

- 1) 생체자극을 이용한 동물세포 배양용 3차원 배양시스템 개발
- 2) 동물세포의 배양조건 및 배양특성을 통한 종합적인 3차원 배양환경 시스템 구축
- 3) 동물 세포, 조직 배양용 3차원 배양시스템을 이용한 동물 세포의 배양실험
- 4) 동물 세포 배양용 3차원 배양시스템 성능개선 및 보완

제 2 장 국내외 기술개발 현황

가. 국외 수준에 비하면 5년 이상 조직공학과 관련한 보유기술이 뒤쳐져 있다고 보고되고 있음. 본 연구의 주제와 관련해 초음파, 전기 자극 등을 이용한 생체자극기술과 3차원 배양시스템 및 배양기술은 국·내외적으로 보고된 바 없음.

나. 생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직 배양용 3차원 배양시스템을 설계하기 위해서는 세포의 성장과 분화에 영향을 미치는 전류, 초음파 등의 생체자극 기술 개발과 배양시스템 내부에서의 용존산소 및 영양소의 물질전달(mass transfer)에 대한 연구가 절대적으로 필요한 실정임. 국내·외적으로, 동물 세포의 성장촉진을 위한 생체역학적 자극기술에 대한 연구보고는 미흡한 상태이며 동물 줄기세포 및 조직의 생체 외 배양시스템에 관한 연구는 보고된 바가 미흡함.

다. 동물의 (줄기)세포 및 조직을 생체 외에서 배양하는 경우, 현 기술로는 생체 내 배양에 비해 현저히 떨어지므로 주로 생체 내에서 배양하고 있음. 또한, 동물 (줄기)세포 및 조직을 생체 외에서 배양시 고가의 영양배지에 의존하고 있으며 그 배양기술이 매우 미흡함.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 생물자원(무균돼지뼈)을 이용한 바이오세라믹 제조 및 특성 구명

1. 서론

최근 돈육의 기호증대에 따라 돈육 또는 돈육가공식품의 수요가 급속한 증가 경향을 보이고 있다. 이에 비례하여 도축장에서 돼지를 도축한 후 부산물로 얻어지는 돼지뼈 등의 잔사도 증가하는 경향을 보이고 있다. 이들 잔사는 현재 돼지뼈를 이용하는 음식점에 공급되거나 간단한 분쇄과정을 거쳐 저급 사료로 이용되고 있다. 또한 음식점에서 발생하는 돼지뼈 폐기물은 박테리아 등의 세균번식에 의해 악취와 침출수 등을 발생시켜 1, 2차 환경오염을 유발하고 있는 실정이다. 그러나 현재 국내에서는 돼지뼈를 효과적으로 처리하는 연구 및 돼지뼈를 이용하여 고부가 가치를 창출하는 방안에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 반해 김 등(1992)은 가축도살 후 대량으로 얻어지는 소뼈 등으로부터 아파타이트(apatite)를 추출하였고, 최 등(1998)은 참치뼈에서 천연 수산화인회석(hydroxyapatite)을 추출하였다. 또한 고 등(1989)은 대구뼈에 포함된 단백질, 세균, 대장균 등의 유기물을 고온으로 회화(calcination)시킨 후 잔존하는 주요 무기성분인 아파타이트를 이용하여 정형외과용 생체재료(biomaterials)로 임상적용을 할 수 있다는 가능성을 보고하였다.

돼지뼈에는 칼슘, 인 등 생체재료용 세라믹 재료가 다량 함유되어 있다. 최근 세라믹 재료는 생체재료로서 각광을 받고 있는데 그 이유는 세라믹 재료가 생체 내에서 불활성이며, 높은 압축강도 및 양호한 미적 외관을 나타내기 때문이다. 또한 동물뼈에서 다량으로 추출되고 있는 생분해성 세라믹 재료인 tricalcium phosphate[Ca(PO₄)₂]와 calcium aluminate [CaO · Al₂O₃]는 bone scaffold 제작에 이용되고 있고, 이들로 제작된 이식물은 새로운 뼈의 성장을 유도할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 수산화아파타이트[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]는 인공뼈의 제조, 인공고관절 제조시 표면처리에 사용되며, 생분해성 고분자인 PLA와 함께 사용하는 방법도 연구중에 있다(강과 이, 1998).

이러한 세라믹 재료는 골 대체재로서 유용한 재료이나, 분말의 형태이기 때문에 성형이 어렵다는 단점이 있다. 최근 연구에 따르면 세라믹 재료와 PDLA와 같은 생분해성 고분자와 함께 사용할 경우 세라믹 재료의 단점을 보완할 수 있다는 사실이 보고되고 있다.(정과 김, 2004) 특히 세라믹 재료와 고분자 재료를 함께 사용하여 제조하는 고분자-세라믹 재료는 인공뼈를 제조하는데 있어서, 기존의 고분자 재료만을 이용하여 제작하는 방법이 지닌 한계를 극복하는 데 이용될 수 있을 것으로 전망되고 있다(Crane et al., 1995, Vacanti et al., 1994).

뼈 이식에는 자가골 이식, 동종골 이식, 인공뼈 이식 등이 있다. 자가골 이식(autograft)은

면역학적인 측면, 숙주와의 친화력 및 혈관 신생 등의 관점에서 가장 우수한 골이식이지만, 뼈를 본인 몸에서 채취하는 수술이 필요함에 따른 고통과 경제적 부담이 있는 단점이 있다. 또한 동종골 이식(allograft)은 골을 이식해주는 공여자가 부족하다는 문제점이 있다. 이와 같은 문제점들을 해결하기 위해 제안된 것이 인공뼈 이식이지만, 결정적으로 인공뼈 이식은 아직 면역 거부 반응 문제 등이 해결되지 않은 상태이다. 현재 사용하고 있는 인공뼈 재료는 티타늄을 주성분으로 하는 금속재질로, 부식되거나 인체에 있어서 이물질로 작용하여 알러지 또는 염증을 야기하는 부작용이 있어 일반적으로 2차수술을 하여 이를 제거해 주고 있다. 이 문제점을 해결하기 위해 생체흡수성 고분자를 이용한 PDLA, PLA 또는 PLGA 등의 기존의 고분자를 이용한 인공뼈 제조가 국제적으로 연구되어 왔다. 생분해성 고분자 물질은 생체 내에서 서서히 화학적 분해가 일어나면서 그 형태와 무게가 점차 소멸된다. 따라서 생분해성 고분자를 인공뼈의 재료로 사용할 경우 2차수술을 하여 지지체를 제거할 필요가 없어지게 된다. 또한 PLA 및 PDLA와 같은 생체 적합성 고분자 재료는 인체 내에서 이물질로 작용하지 않아 염증 및 면역반응 등 부작용을 일으키지 않는다. 그러나 고분자 재료는 소수성(hydrophobic)이기 때문에 세포가 고분자 재료 표면에 잘 유착되지 않는다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 친수성인 세라믹 재료를 고분자 재료와 혼합하여 생분해성이면서 세포 유착이 잘 되는 새로운 세라믹-고분자 복합 재료를 개발할 필요가 있다. 따라서 오늘날 폐기물로 취급되고 있는 돼지뼈를 적극적으로 활용하여 고부가 가치 물질인 세라믹 재료를 생산하고, 이를 이용하여 세라믹-고분자 복합 재료를 개발하는 연구가 필요하다. 나아가 고분자-세라믹 복합재료를 골 조직공학에 응용하여 인공뼈 제조를 위한 골 지지체(scaffold)를 개발하는 연구도 필요하다.

본 연구의 목적은 세라믹이 생체에서 흡수가 안 되는 단점과 고분자가 소수성인 단점을 개선하여 세라믹의 장점과 고분자의 장점을 동시에 지니는 세라믹-고분자 복합물질을 개발하고, 나아가 세라믹-고분자 복합물질을 이용하여 조직공학(tissue engineering)용 골 지지체(bone scaffold)를 개발하고자 하는 것이다. 이에 본 연구에서는 무균돼지뼈를 이용하여 세라믹 재료인 bone powder(BP)를 제조하고 생체역학적 특성을 구명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 생체 세라믹재료 제조

무균돼지뼈는 서울대학교 치과병원에서 생체재료를 얻었다. 생체재료의 제조과정 도식도는 Fig. 1-1과 같다. 발취된 무균돼지뼈 주변에 남아있는 조직을 제거하기 위해서 24시간동안 과산화수소에 담가놓았다. 각각의 뼈 조직은 소결 전에 약 20 mm x 20 mm x 20 mm 사이즈로 각각의 파티클로 만든 후 전기로(ST-01045, Daihan scientific, Korea)에서 소결시켰다. 소결온도는 각각 600°C, 800°C, 1000°C, 1200°C 로 소결시켰고 2시간동안 유지시켰다. 그 이후 파우더 제작을 위해 miller (A10, IKA-WERKE, Japan)를 이용하여 미세분말로 제조하였다. 파티클 크기로 선별하기 위해서 채(Sieve/Shaker, Daihan scientific, Korea)를 이용하여 50-200 μm 사

이므로 선별하였다. 마지막으로 선별된 생체재료는 실험 전에 멸균 후 clean bench에서 보관하였다. 또한, 온도조건에 따른 무균돼지뼈 파우더의 색상을 판단하기 위해 Colour Difference Meter(Minolta chromameter CR-300, Japan)를 이용하여 분석하였다.

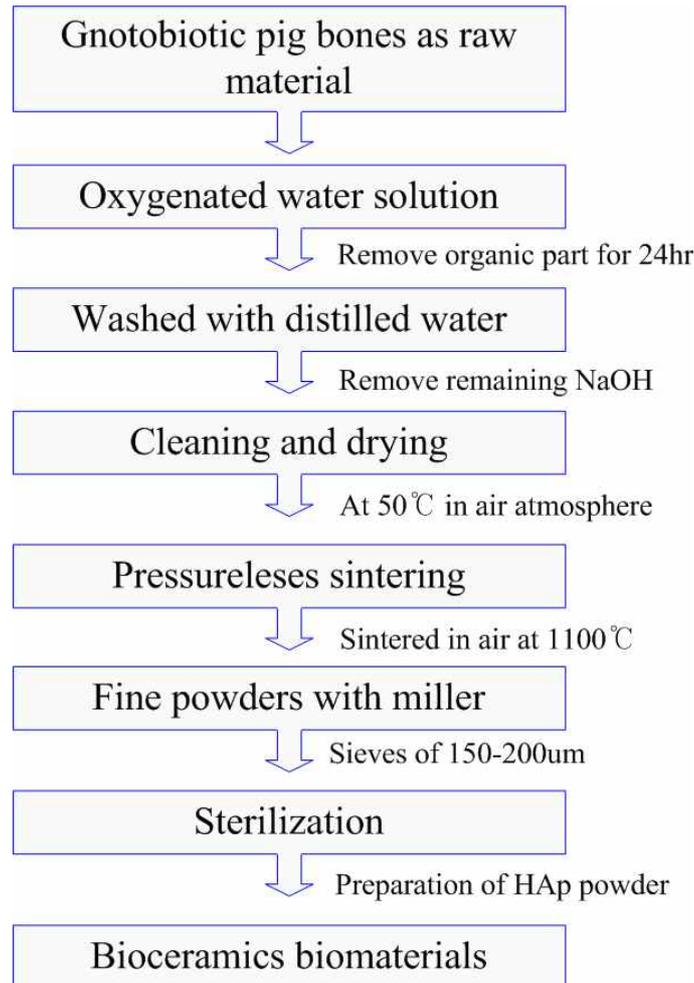


Fig. 1-1 Fabrication process of bioceramics

2.2 전계방사 주사전자현미경(FE-SEM)을 이용한 표면관찰

무균돼지 뼈가루(Gnotobiotic gnotobiotic pig bone powders)의 미세구조 및 파티클 사이즈의 표면은 FE-SEM(SUPRA 55VP, Cal Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다. 샘플을 관찰하기 위한 전처리로서, 모든 파우더 시료는 15mA에서 250초간 BAL-TEC SCD005 sputter coater를 이용하여 금박코팅을 시행하였다.

2.3 X선 회절 분석

X선 회절(X-ray diffraction, XRD)은 결정 및 비결정질의 미세구조와 결정상태, 즉 원자의 배열과 관계가 있는 정보를 밝히는 실험 방법이다. X선 회절에 사용되는 X선의 파장은 원자의 크기와 같은 정도로서 물질을 구성하는 원자에 의해 만들어지는 산란파와 서로 간섭해서 회절

현상이 일어나며, 그 회절현상은 원자의 배열방법과 밀접하게 관련되어 있어서 X선 회절패턴 으로부터 결정화도, 결정의 내부변형 등을 측정할 수 있다. 본 연구에서 사용한 상변화에 대한 XRD(Bruker D5005 X-ray Diffractometer, Germany)는 각(2θ), Step Scan($10-90^\circ$), Scan Speed(1 deg/min)의 Cu K α 방사선 조건에서 수행하였다. 본 실험에 사용된 Generator는 40kV, 40mA 이고 λ (Radiation)은 1.5406이다.

2.4 에너지 분산형 X선 측정

전자 빔이 시편에 입사되면 가속된 입사전자들이 시편 내 원자들의 내각의 전자를 축출하면 외곽에 있는 높은 에너지를 가진 전자가 축출된 전자 자리를 채우면서, 이 에너지 차를 X-선 으로 방출하는데, 이를 특성 X-선이라고 한다. 이 특성 X-선은 원자의 종류 및 전자 궤도에 따라 다르므로 이를 이용하여 시편의 화학적 성분을 정성 혹은 정량분석을 할 수 있는데, 이를 EDX(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) 라고 한다. EDX는 시편상에서 발생하는 미약한 X선을 검출하여 시편을 이루고 있는 원소의 정성 및 정량분석, 성분별 분포맵핑 (X-Ray Mapping) 등을 분석할 수 있다. 본 연구에 사용된 EDX는 FE-SEM(SUPRA 55VP, Carl Zeiss, Germany)에 같이 부착되어 있다. 원소의 정성 및 정량분석을 위해 30.0 kV조건에서 수행하였다.

2.5 세포 독성 평가

본 실험에서 제조된 무균돼지뼈 파우더의 세포독성을 실험하기 위해 사용된 세포는 치조골 줄기세포(Alveolar Bone Marrow Stem Cells)이며 서울대학교 치과대학 무균돼지뼈생체공학 연구실에서 분양받아 실험하였다. 배양액은 Alpha-MEM을 사용하였고, 여기에 $10\mu\text{M}$ 아스코빈 산, 1% 항생제, 10% FBS(FBS, Welgene Inc., South Korea)를 첨가하여 사용하였다. 세포는 항온배양기(Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA) 내에서 온도 37°C , 습도 95%, CO_2 5% 조건에서 배양하였다. 독성 실험은 WST-1 assay(EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD)로 진행하였다. 본 실험에 사용된 WST-1 assay는 수용성 tetrazolium salt로 배양액에서 formazan이 생성된 후 흡광도 460 nm에서 측정하여 독성을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 제조된 무균돼지뼈 파우더의 특성

Fig. 1-2은 제조된 무균돼지뼈 파우더의 색상차이를 나타낸다. 그림에서 보는바와 같이 60°C , 80°C , 1000°C 그리고 1200°C 로 소결온도를 높일수록 짙은 회색에서 흰색으로 변하는 것을 관찰할 수 있다. 또한, 소결온도가 높을수록 protein 이나 collagen과 같은 유기물질과 탄소 성분이 고열에 의해 사라짐으로써 점차적으로 흰색으로 변함을 확인하였다.

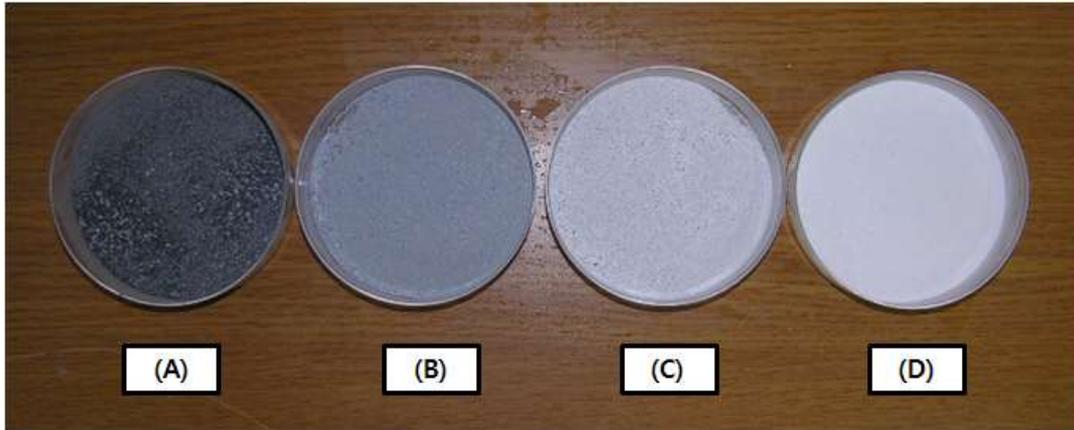


Fig. 1-2. Observed colour changes in gnotobiotic pig bone powders upon annealing at different temperatures. At annealing temperatures of 600°C, 800°C, 1000°C, and 1200°C, the colour of the sintered gnotobiotic pig bone samples changed. The colour of the raw material of an extracted gnotobiotic pig bone was light yellow. Upon annealing at different temperatures from 600°C to 1200°C, the colour of the sintered gnotobiotic pig bone samples changed to black, dark grey, light grey and white, respectively.

Table 1-1은 Fig. 1-2에 대한 각각의 색상차이를 수치적으로 나타낸다. 소결온도가 높을수록 protein 이나 collagen과 같은 유기물질과 탄소성분이 고열에 의해 사라짐으로써 점차적으로 중량의 변화가 증가함을 확인할 수 있다.

Table 1-1. Effect of annealing treatment on the colour of annealed gnotobiotic pig bone

Sample No.	Temperature (°C)	Sintering time (hr)	Colour
A	600	2	Black
B	800	2	Grey(+)
C	1000	2	Grey(-)
D	1100	2	White

(+) dark and (-) light

3.2 X선 회절 분석 결과

Fig. 1-3은 1200°C 조건에서 제조한 무균돼지뼈 파우더의 X선 회절 분석 결과를 나타낸다. 소결한 무균돼지뼈 파우더의 XRD 패턴은 HA 구조와 유사하였고, 결정도와 결정체 크기도 Stoichiometric HA 패턴(XRD, JCPDS data file No. 9-432)과 일치함을 확인하였다. 측정조건으로는 scan주기를 1 deg/min, scan 범위를 10-90°C, 2θ로 측정된 결과, Fig. 1-3와 같이 재료의 화학조성물이 (Ca₁₀(PO₄)₆O) 인산칼슘계 화합물 조성으로 확인되었음.

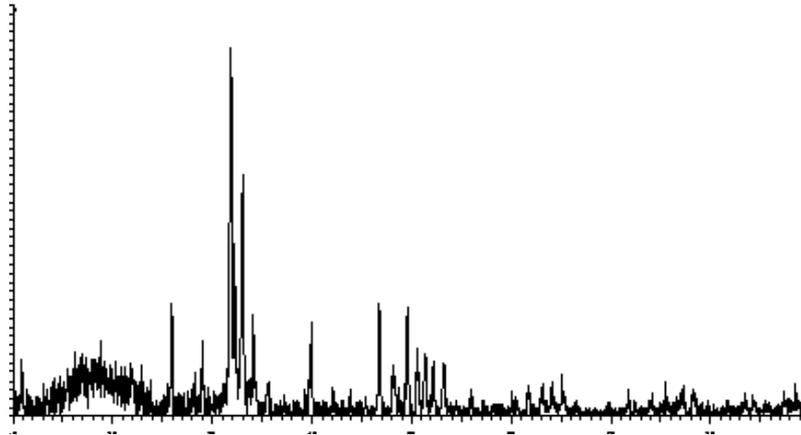


Fig. 1-3. X-ray diffraction patterns of gnotobiotic pig bone powders annealed at 1200°C

3.3 SEM 표면관찰 결과

Fig. 1-4는 1200°C 조건에서 제조한 무균돼지뼈 파우더의 FE-SEM 표면관찰 결과를 보여준다. 그림에서 보는 바와 같이 고온의 소결조건에서 제조한 무균돼지뼈 파우더의 표면이 상당히 거칠고 부분적으로 다공성 구조를 띄는 미세구조를 지님을 확인하였다. 특히, 소결온도가 높을수록 세라믹의 미세구조가 다공성으로 확장됨을 확인하였다. 또한, 파우더의 크기는 약 50-200 μm 크기임을 확인하였다.

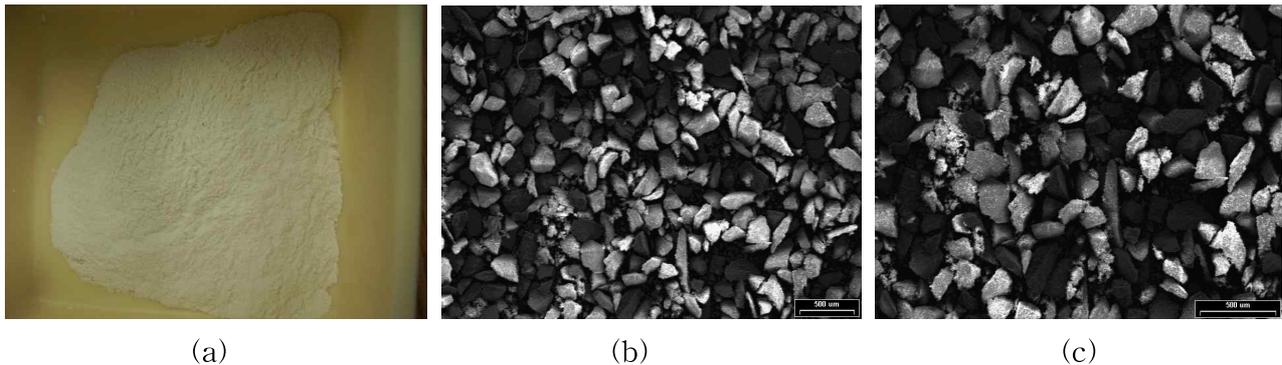


Fig. 1-4 SEM images of gnotobiotic pig bone powders; (a) gnotobiotic pig bone powder image, (b) surface of powders SEM x 35 image and (c) SEM x 100 image.

3.4 EDX 분석 결과

Fig. 1-5는 EDX 스펙트럼을 이용하여 나타낸 무균돼지뼈 파우더에 존재하는 다양한 원소를 나타낸다. EDX 스펙트럼 분석결과, 소결된 무균돼지뼈 파우더에서 주요 성분인 calcium(Ca), phosphorus(P) 이외에도 sodium(Na), chlorine(Cl), magnesium(Mg), oxygen(O) 등의 성분들이 존재함을 보여줬다. 본 실험을 통한 무균돼지뼈 파우더의 화학적 구성성분이 HA의 Ca/P 비율보다 약간 높게 나타났으며, Mg, Al 등과 같은 불순물이 미소하게나마 포함되었다.

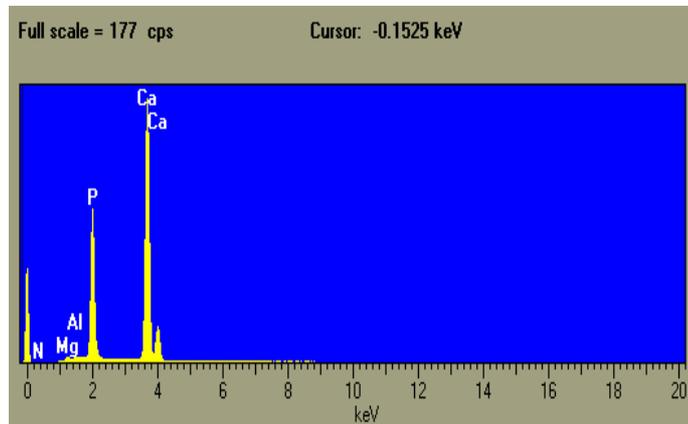


Fig. 1-5 EDX analysis of the chemical composition of gnotobiotic pig bone powder

3.5 세포독성 결과

세포독성 결과는 Fig. 1-6에 나타내었다. 그림 9(A)는 TCPS에서 배양한 대조군과 72시간동안 무균돼지뼈 파우더를 증류수에 20wt.% 용출시킨 용출액으로 Indirect Cytotoxicity 실험 결과를 나타낸 것이다. 모든 세포독성 실험 결과 통계적인 유의성 차이가 없었다.($p < 0.05$)

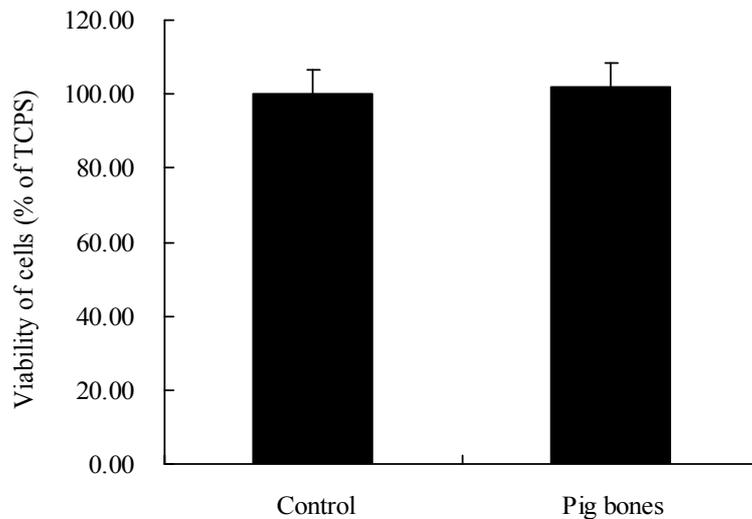


Fig. 1-6. Indirect cytotoxicity evaluation from XTT assays of cell viability. ABMSCs were cultured with extraction media from TA(at 20wt.% concentration), and TCPS (control) for 72 h. The absorbance was normalized with that of control (TCPS), which is taken as 100%. Data are represented as mean \pm SD (n=5).

4. 요약 및 결론

본 연구에서는 발취된 무균돼지뼈를 이용하여 바이오세라믹 생체재료를 제조 및 특성에 대한 연구를 수행하였다. 바이오세라믹 생체재료를 제조하는 방법으로 1200℃에서 2시간 소결한 방법이 생체재료로서 가장 좋은 CaP 생체재료를 나타냈다. 본 연구에서 제조한 생체재료의 주요 성분으로는 Ca, P 로 나타났다. 또한, Na, Cl, Mg, O, Zn, Cu 의 성분들이 존재하였다. 본 실험을 통한 gnotobiotic pig bone Apatite의 화학적 구성성분이 HA의 Ca/P 비율보다 높게 나타났으며, Zn 와 Cu 같은 불순물이 미소하게나마 포함되었다. Ca/P 비율은 약 2.0 이상의 높은 비율을 지닌 Calcium Phosphate를 나타냈다. 본 실험에서 제조된 gnotobiotic pig bone apatite는 Osteoconductive CaP Biomaterials이라 판단되며, 소결온도가 증가할수록, Zinc와 같은 불순물이 완전히 사라짐을 보였다. FTIR 스펙트럼 결과에서도 본 연구에서 제조한 생체재료가 HA, Calcium Phosphate와 흡사한 결정 구조를 지님을 확인하였다. 소결온도 조건에 따른 ICP 원자 방출 분광 분석 결과 Ca/P 원자비율이 약 2.0 으로 나타났다. 본 연구에서 제조된 gnotobiotic pig bone Apatite의 세포독성 결과 Direct/Indirect Cytotoxicity 실험 결과 모두 통계적인 유의성 차이가 없었다.($p < 0.05$) 또한, 복합 바이오세라믹 스캐폴드 제조 및 세포 접착성 평가 결과 치조골 줄기세포가 복합 바이오세라믹 스캐폴드에 잘 부착됨을 확인하였다. 이러한 실험결과를 토대로, 치조골 재생을 위한 생체재료로서 본 연구에서 제조한 gnotobiotic pig bone apatite가 bone graft를 위한 조직공학의 응용에 부합할 수 있는 생체재료라 사료된다.

제 2 절 생물자원을 이용한 지지체 제조 및 특성 구명

1. 서론

일반적으로 골 결손 부 발생 시 그 부분의 재건은 매우 어려우며, 자가골(autogenous)을 이식하는 것이 가장 좋은 방법이나 그 양이 한정되어 있고, 다른 이차적인 결손 부를 만들기 때문에 완전한 방법이라고 볼 수 없다. 그리고 동종골(allogenic) 이식은 면역학적인 문제를 야기한다. 또, 인공합성 물질은 감염의 우려가 높고 아직까지 장기간의 결과들이 보고되지 않고 있다.(유와 이, 1998) 이런 문제점의 대안으로 제기되고 있는, 고분자-세포 구조물에 의한 재건법은 매우 희망적으로 볼 수 있다(Cran-e et al., 1995, Vacanti et al., 1994). 고분자-세포 구조물을 이용하기 위해서는 세포가 자라고 조직화되기 위한 지지체(scaffold)가 필요한데, 가장 널리 사용되고 있는 것이 합성고분자를 사용한 지지체(scaffold)이다. 현재 가장 많이 사용되는 합성 고분자는 폴리글리콜산(polyglycolide-acid, PGA)과 폴리락트산(poly-lactide acid, PLA) 그리고 이들의 공중합체인 폴리락트-글리콜산(poly-lactide-co-glyco-lide acid, PLGA)이다. 그러나 PGA와 PLGA는 너무 빨리 분해되고, 다수의 분해산물을 만들기 때문에 염증반응 및 낭종을 일으키며, 분해기간 동안 주변 조직을 산성화시키는 등 골 조직의 재생에 불리한 영향을 미치는 문제점이 있다(유와 이, 1998). 또한, 소수성이므로 세포의 배양이 어렵다는 단점이 있다(김과 정, 2004). 이에 친수성이며 불활성인 세라믹 재료의 장점을 지니면서 합성 고분자의 장점인 생체흡수 특성을 동시에 가지는 세라믹 복합체의 개발이 요구되었다.

또한, 현재 돼지 뼈는 요리재료, 천연 유기비료재료, 가축 사료재료 등으로 사용되고 있는 물질로서, 실제 돈육에서 차지하는 생산비 비중에 비해 저급한 용도로 사용되고 있으며, 해당 사용처에서 사용된 후의 폐기물은 1, 2차 환경오염을 유발하는 문제점이 있다. 이와 같이 저급 용도로 사용되거나 폐기되는 돼지 뼈를 인체 골 결손 부 재건에 사용할 수 있는, 고 부가가치의 골 구조물 재료와 골 지지체로 가공하는 방법에 대한 연구가 필요하다.

현재, 복합 세라믹 골 지지체의 개발은 연구가 진행되고 있고, 무균돼지뼈인회석(gnotobiotic pig boneapatite, TA)을 이용한 복합 세라믹 골 지지체의 개발이 연구된 바 있다(김과 정, 2004). 또한, 소뼈나 참치 뼈, 대구 뼈 등의 동물 뼈를 이용한 생체재료 개발을 위한 연구도 보고되고 있다(이 등, 1997).

이에 본 연구에서는 또 다른 골 대체재로서 유용한 재료인 무균 돼지 뼈를 이용하여 골 지지체를 제작하고, 이 지지체의 조직적합성 평가를 위한 세포독성을 구명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. Bone Powder의 제조

무균돼지 뼈를 채집하여 과산화수소 용액에 24시간 동안 침지시켜 유기물을 제거하였다. 무균돼지 뼈의 유기물 제거를 위해 1200 소결로에서 2시간 동안 소결한다. 이 때, 전기로 내의 소결 온도변화는 Fig. 2-1과 같다. 소결한 돼지 뼈를 분쇄기(IKA-WERKE A10)에서 분쇄한 후 잔여 유기물질을 제거하기 위해 1시간동안 한 번 더 소결하였다. 소결한 돼지 뼈 가루는 체(Sieve/Shaker, 대한과학 20-500 μm)를 이용하여 입자 크기 별로 선별하였다. 본 연구에서는 150-200 μm 입자크기의 bone powder(B.P)만 사용하였다.

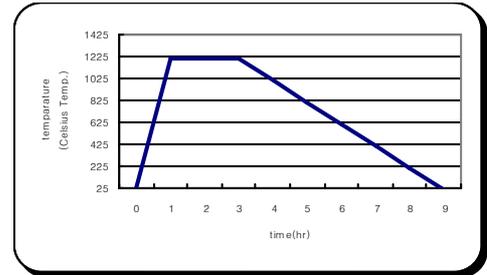


Fig. 2-1 Sintering temperature variation during furnacing gnotobiotic gnotobiotic pig bones

2.2. 복합 세라믹 골 지지체의 제조

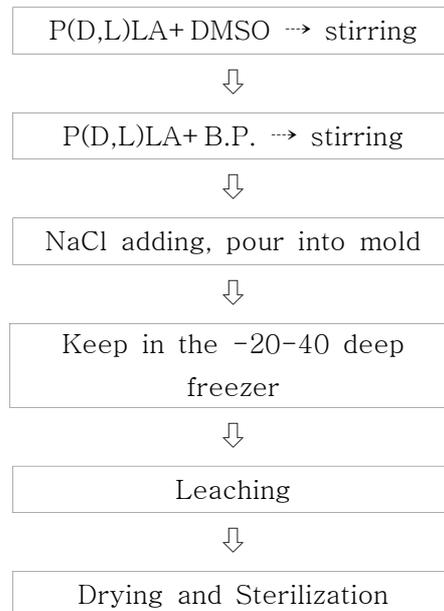


Fig. 2-2 Procedure of P(D,L)LA-Bone Powder scaffold preparation

Fig. 2-2는 복합 세라믹 골 지지체의 제조과정을 개략적으로 나타낸 것이다. P(D,L)LA(poly(D,L)lac-tic acid) 0.3 g을 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 2 ml에 넣고, 12시간동안 밀봉한 채 교반시켜 15 wt%용액을 만들었다. P(D,L)LA와 B.P.의 중량 비율은 1:1로 하였고, NaCl(300-400 μm)은 90 wt% 첨가하였다. 형태 형성을 위해 알루미늄 틀을 사용하였으며, -20

~-40 초저온 냉동고에서 24시간동안 보관하였다. 24시간 후, 이를 37℃에서, 멸균한 3차 증류수로 3일간 leaching시켰다. leaching과정은 형태를 형성한 지지체를 물에 담가서 불순물을 제거하는 과정으로, 인체에 해로운 용매인 DMSO와 세포 배양에 나쁜 영향을 끼치는 NaCl을, 용해를 통해 제거하기 위해 필요하다. 이 때, 물갈이는 처음 2번은 1시간간격, 다음 2번은 4시간간격, 그 다음은 6시간 간격으로 하였다. leaching이 끝난 지지체는 데시케이터에서 10시간동안 건조시켰으며, 소독은 70% Ethyl alcohol에 10분동안 넣어 둔 후, PBS(Phosphate buffer saline)로 10분씩 3번 세척하여 잔여 alcohol을 완전히 씻어 낸 다음, 자외선에 24시간동안 노출시켰다.

2.3. 복합 세라믹 골 지지체의 세포 독성 평가

본 실험에서 제조한 지지체는 체내에 삽입되는 물질로서, 삽입 후 독성물질이 체액이나 세포 외 기질(extracellular matrix) 등에 용출(extraction)되어 주변 세포에 나쁜 영향을 줄 수 있다. 따라서 체내 실험 이전 단계로서, 체외에서 먼저 지지체의 용출물(extract)에 의한 독성을 세포 독성 평가를 통해 알아봄으로써 지지체의 조직적합성을 평가해 보았다. 먼저, 신체 내에 0.013 g 용량의 지지체가 주입 되었을 때, 주위의 체액 2 ml에 용출 되는 독성 물질의 양을 100%라고 가정하였다. 실험군은 다음과 같다. 대조군은 P(D,L)LA만 첨가된 지지체로 두고, 실험군은 P(D,L)LA와 B.P.의 복합 지지체로 설정하였다. 각각의 군에서 용출물의 농도는 0, 20, 40, 60, 80, 100%로 하고, 각 실험군 당 10번씩 동일한 실험을 시행하여 그 평균값을 해당 결과 값으로 사용하였다. 용출액은, 최종 용액에서 용출물 50%, 배양액 50%를 넣어서 희석될 것이므로 2배로 농도(0, 40, 80, 120, 160, 200%)로 만들며, 2 ml의 배양액에 용출시키는 지지체의 질량은 0, 0.0052, 0.0104, 0.0156, 0.0208, 0.0260 g으로 하였다. 용출액은 배양조건과 같은 조건(37, 5% CO₂, 95% 습도)에서 용출시킨다.

독성실험은 MTT test로 진행하였으며, 사용한 시약은 MTT, DMSO(K31902850, MERCK, Germany)이다.

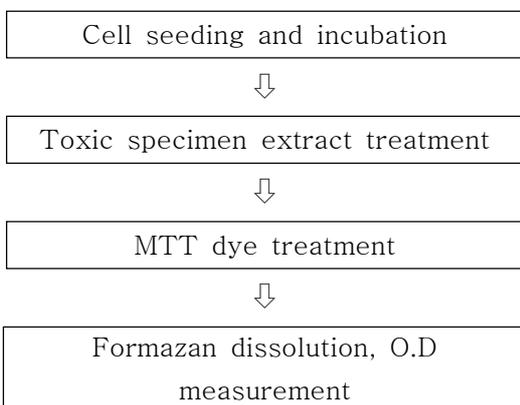


Fig. 2-3 MTT cytotoxicity test procedure of P(D,L)LA-Bone Powder scaffold

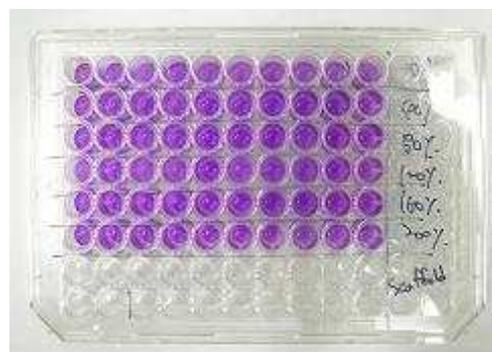


Fig. 2-4 The picture of MTT test plate (experiment at 96well plate)

MTT test는 살아 있는 세포의 효소 활성에 의해 환원된 Tetrazolium salt의 Formazan을 DMSO같은 유기 용매에 녹여 흡광도(O.D.)를 측정하고, 측정된 흡광도를 비교함으로써 독성 정도를 평가하는 실험이다. 실험한 세포는 Dental Pulp Stem Cell(DPSC)이며, 분주 세포 수는 1 well당 15,000개씩 사용하였다. 1 well당 실험 용량은 배양액 100 μ l와 해당 농도의 용출물 100 μ l로, 총 200 μ l로 하였다. 결과 관찰을 위한 흡광도 측정파장은 540 nm로 하였다. MTT test의 개략적인 과정인 Fig. 2-3과 같다. MTT 시약은 동일한 배양 조건에서 4시간동안 처리하였다. MTT의 환원작용으로 생긴 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해시켜서 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 2-4는 MTT test실험을 한 것이다.

측정한 흡광도값은 IC50값으로 산출하여 독성평가에 사용하였다. IC50의 정의는 실험의 재료와 목적에 따라 달리 정해질 수 있지만, 본 실험에서는 1 well의 세포가 모두 살아있을 때 보다 생존수가 50% 감소했을 때의 용출농도(%) (50% Concentration Inhibition)를 IC50이라 정의하였다. 생존수가 50%가 되는 시점은 사용한 MTT 시약과 세포 생존수와의 관계를 통해 알 수 있다. MTT test 결과 측정되는 흡광도 값은 살아 있는 세포수와 정비례한다. 따라서 생존수가 50%되는 시점은, 분주한 세포가 모두 살았을 때의 흡광도의 절반의 값을 나타내는 지점이라 가정할 수 있다. 따라서 50% Concentration Inhibition을 나타내는 IC50값은, 독성물질을 처리하지 않은 0%에서의 흡광도 값의 0.5배에 해당하는 흡광도 값에서의 용출농도(%)라 정의하였다. 정의한 내용을 식으로 정리하면 다음과 같다.

- IC50 = OD for 50% Concentration Inhibition ,
- $OD \text{ for } IC_{50} = \frac{OD \text{ for } 0\% \text{ Extract}}{2}$

3. 결과 및 고찰

Fig. 2-5는 완성된 복합 세라믹 골지지체의 모습을 나타낸 것이고, Fig. 2-6은 완성된 복합 세라믹 골지지체의 SEM 사진을 나타낸 것이다. 완성된 지지체는 육안으로 보기에 큰 공극과 공극률을 가지고 있었으며, 따라서 세포가 자라기 충분한 조건이라고 볼 수 있으므로, 이후 실험을 진행하였다.



Fig. 2-5 A macroscopic image of composite bioceramic scaffolds prepared with gnotobiotic pig bone powder and P(D,L)LA using a solvent casting and NaCl leaching method

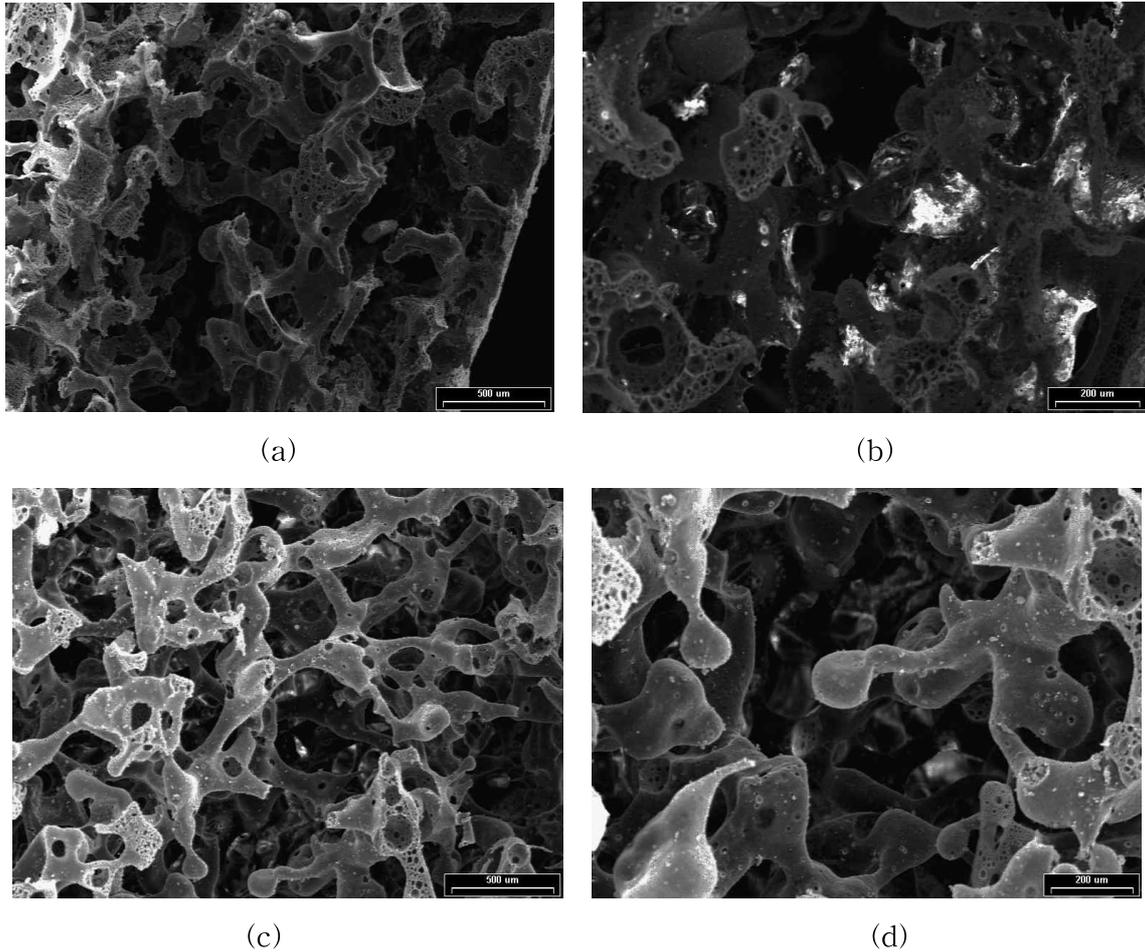


Fig. 2-6 Scanning electron micrographs (SEM) of the pores in the cross-section surface morphology of the P(D,L)LA scaffolds. (a) SEM x 50 image and (b) SEM x 100 image. Scanning electron micrographs (SEM) of the pores in the cross-section surface morphology of the P(D,L)LA and bone powder composite scaffolds. (d) SEM x 50 image and (e) SEM x 100 image.

Fig. 2-7은 독성실험(MTT cytotoxicity test) 결과를 나타낸다. 위의 그래프는 대조군인 P(D,L)LA와 실험군인 지지체 각 각의 용출물을 이용하여 독성실험을 실시한 결과이다. 이 결과를 통해 지지체 0.013 g을 체내에 삽입하였을 때 2 ml 체액에 영향을 줄 수 있는 독성의 정도를 상대적으로 평가할 수 있었다. 결과에 따라, 대조군과 실험군의 0% 용출농도에서의 결과 값이 각각 0.562608, 0.592341 이므로 이 두 값의 평균인 0.577475를 0% 용출농도에서의 흡광도라고 정의하고, 이 값의 0.5배에 해당하는 O.D.값에서의 용출농도(%)값을 그래프를 통해 읽어 보면, 100% 용출물을 처리해도 흡광도가 0.288737에 못 미친다는 것을 확인 할 수 있다. 따라서 독성이 비교적 없다고 판단 할 수 있다. 또, 대조군인 P(D,L)LA에 비하여 소폭차이 이긴 하지만 전체적으로 더 큰 값의 흡광도를 나타내고 있는 것을 확인 할 수 있으므로,

P(D,L)LA만으로 만든 지지체보다 복합 세라믹 골 지지체가 독성 용출물에 의한 독성은 조금 더 약하다고 판단 할 수 있다. 단, 이 실험의 단점으로는, MTT test의 특성상 절대적인 수치로 독성의 정도를 확인 할 수는 없고 상대적으로 비교하여 비교적 독성이 없다고 판단 할 수 밖에 없다는 점을 들 수 있다.

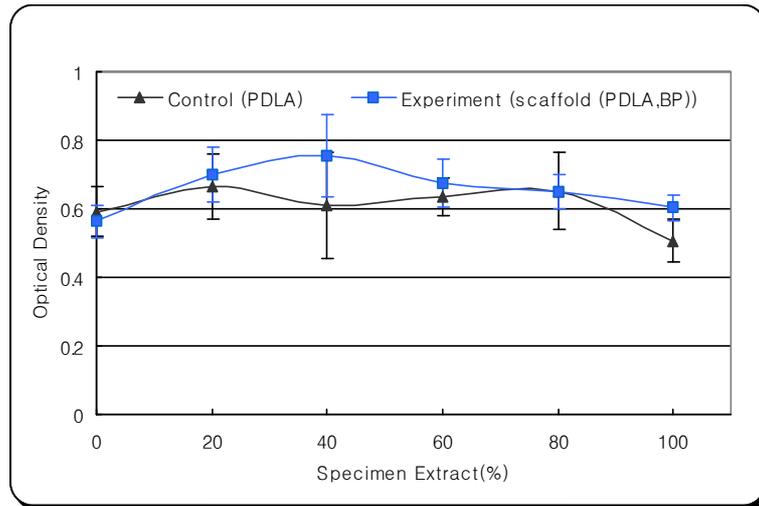


Fig. 2-7 MTT cytotoxicity test result

세포 접착성을 평가하기 위해 세포를 각 각의 지지체(scaffold)에서 3주 동안 배양한 후 주사 전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 각 지지체에서의 세포접착 여부와 부착한 형태(morphology)를 확인하였다. 모든 지지체에서 세포가 잘 부착하여 증식한 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 염발포법으로 제조한 지지체에서는 가장 높은 세포 밀도를 나타내었으며 증식한 세포가 지지체의 기공을 모두 덮은 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 모든 지지체가 매우 생체 적합성이 뛰어나며, 특히 염발포법으로 제조한 지지체가 세포가 자라기에 더 용이하다는 것을 알 수 있었다. Fig. 2-8은 세포가 부착해 성장한 각각의 지지체를 주사전자현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다

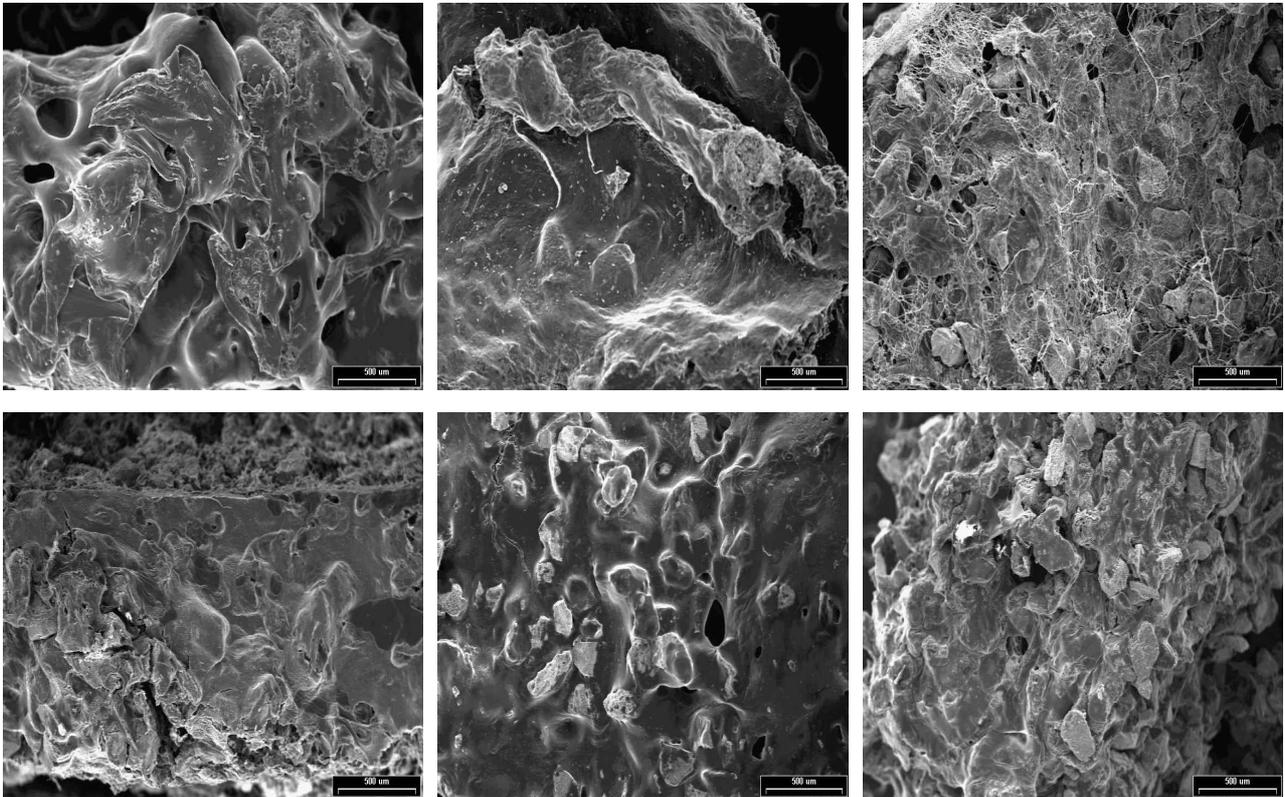


Fig. 2-8 Scanning electron micrograph of cultured cells. It was showed that all cultured cell was well proliferated at each scaffold. All samples cultured within 3 weeks. It was showed that cells were well adhered and cultured in all scaffols. (A),(B)Dental pulp stem cells cultured on scaffold prepared by gas forming method using 20% and 40% citric acid. (C),(D)Dental pulp stem cells cultured on scaffold prepared by solvent-casting salt leaching method. Ratio of P(D,L)LA to bone powder was 1:1 and 1:2. (E),(F)HaCaT cell lines cultured on scaffold prepared by solvent-casting salt leaching method. Ratio of PDLA to bone powder was 1:1 and 1:2.

4. 요약 및 결론

1. 현재 가장 많이 사용되는 합성 고분자 중 하나인, P(D,L)LA만 사용한 지지체는 분해 기간상의 문제와 세포 적합성 등의 문제를 갖고 있기 때문에, 이에 대한 대안으로서 생분해성 복합 세라믹 지지체를 제조하였다. 또, 이에 사용한 세라믹 재료로는 생산 단가에 비해 저렴한 용도로 사용되어, 효율적인 활용방안이 요구 되고 있는 돼지 뼈를 사용하였다.

2. 체외 실험이나 실제 임상적용의 전 단계로서, 생분해성 복합 세라믹 골 지지체의 조직적합성 평가를 위해 세포 독성 평가를 실시하였다. 0.013 g용량의 지지체가 체내에 들어갔을 때 체액 2 ml에 주는 영향에 대해 상대적인 독성 평가를 시행한 결과, 전혀 독성이 나타나지 않는 것으로 나타났다.

3. in-vitro 독성실험의 단점으로는 실험 특성상 상대적인 수치만을 확인 할 수 있으므로, 실제 인체에 주는 독성의 정도를 절대적 수치로 나타낼 수 없다는 단점이 있다.

4. 본 연구는, 체외 실험이나 임상실험의 전 단계 연구로서, 본 연구에서 제조한 지지체의 생체 적합성을 간접적으로 평가해 보는 데 의미가 있다.

제 3 절 동물세포의 배양촉진을 위한 초음파 생체자극기술 개발

1. 서론

인체 내의 조직을 이루는 다양한 세포들은 일정한 물리적 영향을 받고 있는데, 혈액의 흐름에 따른 혈관 내피세포는 전단응력, 연골 세포의 경우 압축하중, 그리고 인대 세포의 경우 인장자극 등에 주로 영향을 받는다. 이에 실제 생체와 유사한 환경을 체외에서 제공하고 생체 적용 능력을 향상시키기 위해 바이오파이저를 이용한 물리적 자극을 세포에 직접 부가하는 시스템이 도입되었다(Sodian 외, 2002). 이러한 생체 외부에서의 물리적 환경이 세포의 증식과 분화 등의 기능에 많은 영향을 끼치며 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 이와 같이 생체 내 각 조직은 각각 특이한 물리적 자극을 일정하게 받고 있으며, 조직의 분화와 형성에도 각각의 조직마다 특이한 물리적 자극이 영향을 준다. 그러므로 바이오파이저를 이용한 물리적, 기계적 자극이 일반적인 화학적인 자극과 함께 세포의 성장과 분화에 꼭 필요한 부분이다.

현재 성체 줄기세포는 무한한 증식능력과 다양한 분화능력으로 인하여 모든 장기의 재생에 이상적인 세포로 인식되어 많은 연구가 진행되고 있으며, 각각의 조직 세포로의 직접적인 분화법에 관한 연구는 매우 활발히 진행 중에 있다(Lee 외, 2005). 이러한 줄기세포는 어떠한 장기로도 분화할 수 있는 능력을 지니고 있기 때문에 특정한 장기로 분화할 수 있는 조절인자를 찾을 수 있다면 그 어떠한 세포로도 만들 수 있다는 장점이 있다(Grigoriadis 외, 1988). 특히 중간엽 줄기세포로부터 연골세포 분화 유도를 시킬 수 있는 직접적인 방법은 현재까지 완벽하게 알려져 있지 않지만, 배양방법이 삼차원 배양(3-dimensional culture)이 효과적이라고 보고되고 있다(Weber 외, 2002). 삼차원 배양에는 fibrin, collagen, alginate 등을 포함한 재료를 사용한 지지체를 이용한 조직공학적인 기법들이 있다.

연골화 분화를 유도하기 위한 물리적·기계적 자극으로는 전기적인 자극, 전단력, 초음파 등 여러 가지 방법이 있다. 이러한 물리적·기계적 자극들 중에 특히 초음파는 조직 내의 세포를 기계적으로 자극시킬 수 있는 수단으로 뼈의 성장, 골절, 근육 조직의 치유, 골형성 세포의 증식 촉진 등 손상된 조직의 수복에 효과적이라 알려져 있다(Busse 외, 2002). 초음파의 생물학적 효과에 대해서는 여러 문헌들을 통하여 보고되고 있으며, 이는 직접적인 열 효과, 비열적인 원인, 세포막 이동 등과 관계가 있다고 보고하고 있다(Kristiansen 외, 1997). 초음파의 생물학적 연구에 관하여 살펴보면 비유합 환자의 임상적 성과가 보고되었고(Xavier 외, 1983), 다른 보고에 의하면 동물실험과 임상실험에서 골절치유시 저장도 초음파를 적용하면 가골의 기계적 강도를 증가시키고 골유합 시간을 감소시킨다고 하였다(Dyson 외, 1983). 이는 골절가골의 세포가 초음파에 의해 전달된 기계적 에너지에 반응한다는 것을 의미한다. 동물실험을 통해 골절치유를 촉진시키는 초음파의 효과가 보고되었으며(Duarte 외, 1983), 시험관내 실험에서 세포막 이동변화가 보고되었다(Chapman 외, 1980).

초음파의 생물학적 효과에 관한 세포수준의 기전으로서 몇 가지가 제시되었는데(Yang 외,

1996), 첫 번째로는 미세공기방울(microbubbles) 혹은 공동화(cavitation)가 생기면서 초음파에 의해 압박을 받으면 미세공기방울들이 진동운동과 음향흐름을 일으켜서 세포막의 침투성을 증가시킬 수 있고 이온이나 단백질의 세포막 이동변화는 유전자 발현을 위한 세포내 신호를 변화시킬 수 있다(Mortimer 외, 1988). 두 번째로는 세포표면에 기계적인 압박이 가해지면 Sachs에 의해 제안된 양이온 통로에서 신장수용기를 활성화시킨다는 것이다(Sachs 외, 1991). 이러한 양이온 농도의 변화로 인하여 유전자 발현을 조절하는 세포내 신호가 변화된다. 세 번째로는 초음파에 의해 전달된 기계적 에너지가 세포외기질에 대한 세포내골격(cytoskeleton)의 부착의 변화를 활성화시킬 수 있다는 것이다. Wang등은 세포내 골격에 대하여 기계적 힘을 적용시키면 세포대사와 유전자 발현에 영향을 미친다고 보고하였다(Wang 외, 1993). 이는 골모세포의 배양에서 기계적 스트레스가 IL-1의 합성을 증가시킨다고 보고한 Sandy에 의해 확인되었다(Sandy 외, 1988). 네 번째로는 초음파 에너지가 골에 가해지면 활동전류가 생길 수 있다는 것이다(Behari 외, 1981). 마지막으로 초음파 에너지가 조직의 온도를 상승시키고, 그것에 의해 세포의 대사활동이 촉진되어 치유과정이 촉진된다는 것이다.

최근 사람의 연골세포를 단층 배양하며 저주파 초음파를 처리하면 세포의 증식과 기질 분비를 증가시킨다는 보고가 있다(Liu 외, 2001). 또한 동물 실험 결과 초음파에 의해 활성화된 연골세포에서 골형성 관련 유전자 (TGF- β , osteocalcin, alkaline phosphatase, α 1(I)-procollagen)의 발현보다 당단백이나 제 2형 교원질 등 연골 형성 유전자의 발현을 상승시켜 연골의 구조를 유지 하고 있는 교원질망을 보호함으로써 연골의 파괴나 분해를 방지하는 효과가 있다고 보고되고 있다(Huang 외, 1978). Cui등의 연구 결과들은 초음파의 효과가 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화를 촉진할 가능성을 제시한다(Cui 외, 2006).

이에 본 연구에서는 자가 조직 이식의 문제점들을 극복하고 좀 더 효과적인 치조골 골수 유래 줄기세포의 대량 생산을 위한 방법으로 초음파 자극을 적용하고자 하였다. 최적의 초음파 강도와 자극 시간 등을 찾고 초음파 강도 및 자극 시간에 따라 세포의 증식에 있어서 어떠한 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다.

앞에서 언급되어진 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화를 촉진하는 가능성을 제시한 연구를 토대로 본 연구에서는 치조골 골수 유래 줄기세포의 분화에 초음파 자극이 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

이에, 생체자극기술을 이용한 배양시스템 개발을 위한 기초 연구로서 치주에 존재하는 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 및 분화에 초음파 자극이 어떠한 영향을 미치는지 구명하고자 하였다. 이러한 줄기세포의 증식 및 분화에 저강도 초음파 자극이 긍정적인 영향을 미치는 것이 입증된다면 일반 동물세포의 대량 배양뿐 아니라 각종 줄기세포의 증식 및 분화에 있어 생체자극 기술을 이용한 중요한 세포 배양방법으로 사용할 수 있을 것이다.

또한 앞으로 각종 세포 배양시스템의 국내외 수요가 늘어날 것으로 예상되는 상황에서 생체자극기술을 이용한 새로운 동물세포 및 줄기세포 배양시스템을 개발하는데 있어 중요한 연구자료로 사용할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 성체줄기세포 증식 및 분화에 초음파 자극기술을 개발하고자 다양한 조건의 초음파 자극을 이용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 구명하고 적정의 초음파 자극 조건을 찾고자 하였다.

본 연구는 성체줄기세포 증식 및 분화에 초음파 자극기술을 개발하고자 다양한 조건의 저장도 초음파 자극을 이용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 구명하고 적정의 초음파 자극 조건을 찾고자 하였다. 본 연구의 구체적인 목적은 다음과 같았다.

1) 다양한 강도의 초음파 자극을 통해 초음파 강도가 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

2) 초음파 duty cycle과 자극시간이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

3) 저장도 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 분화에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

4) 저장도 초음파 자극의 세포 증식효과를 치수줄기세포를 이용해 검증하고자 하였다.

2. 연구사

골 재건을 위한 방법으로 조직공학이 지난 수년간 큰 주목을 받아 왔는데, 조직공학을 이용한 골형성 방법은 골세포를 삼차원적인 지지체(scaffold)에 배양하여 이것을 골 결손 부위에 이식하여 골 조직을 생성시키는 방법이다(Breitbart 외, 1998). 지금까지 조직공학을 이용한 골형성에 대한 연구는 소의 골막세포 또는 쥐의 골세포를 이용하여 무흉선 누드마우스의 피하 조직 내에서 골형성을 이룬 것이 보고되었다(Ishaug 외, 1997). 그러나 소나 쥐에서 얻어진 골세포는 사람의 골세포와 대체될 수 없으며, 사람의 골세포라 하더라도 부위에 따라 표현형(phenotype)에 차이가 있기 때문에 사람 치조골 재건을 위해서는 자가 치조골세포가 가장 적절한 세포가 될 수 있다(Kasperk 외, 1995). 이러한 이유로 생체 내 이식 후에 특정 조직 및 장기 특이적으로 분화할 수 있는 능력이 있고, 또한 본래 세포의 특성과는 다르게 타 조직의 세포로 전이 분화할 수 있는 분화의 유연성을 가진 성체줄기세포를 이용하여 치주조직 재생에 미치는 영향을 알아보는 실험에 대해 관심이 모아지고 있다(오일환, 2004). 또한 골수의 성체줄기세포 이식에 의한 치주조직의 증진에 관한 연구에서 치조골 결손부에서의 적절한 세포이식은 치주조직 재생을 증진시키는 방법으로서 새로운 선택이 될 수 있다고 보고하였다(Hiroyuki 외, 2004).

만약 소량의 치조골 골수 유래 줄기세포를 채취하여 세포배양을 통해 다량의 치조골 조직의 재생이 가능하다면 자가골 이식의 문제점이 극복될 수 있을 것이다. 세포의 대량 배양은 1960년대에 baby hamster kidney(BHK) cell의 연속배양을 시작으로 1980년대 중반부터 연구와 산업화에 대한 노력이 활발히 진행되어 현재까지 단일 클론 항체, 혈압강하제, 조혈제, 혈액응고제, 인터페론, 백신 등과 같은 의약품 단백질을 생산하는 데에 이용되고 있다(Arathoon 외,

1986).

효율적인 배양조의 설계 및 새로운 배양 공정들(perfusion system, 산소전달방식 등)의 개발 등과 같은 공학적인 면에서도 상당한 진척이 이루어지고 있다(Applegate 외, 1992). 특히 목적 단백질의 생산성 향상을 위해 고농도 체외 배양이 가능한 다양한 형태의 배양조들이 개발되었으며(Lehman 외, 1988) 이들은 주로 관류 배양(perfusion cultivation)에 의한 배양장치로서 이 같은 배양장치에서 가장 문제가 되는 배지와 세포의 효율적인 분리 및 재순환을 위한 여과장치 부분에 많은 연구가 추진되고 있다(Smith 외, 1991). 이와 함께 동물세포의 배양장치 개발에 있어 배양조 내에 적은 거품 및 낮은 전단 응력으로서 보다 효율적인 산소전달이 가능한 공정을 개발하고자 하는 노력이 집중되고 있다(Jung 외, 1992). 이 같은 연구의 결과로 silicone tube, hollow fiber 등을 이용한 membrane aeration 방식이 가장 효과적인 것으로 평가받고 있다(Velez 외, 1988).

세포 반응기의 설계시 작은 전단응력, 높은 혼합 능력, 최적의 산소 전달 시스템, scale-up의 가능성 등이 고려해야 할 중요한 조건들로 여겨지고 있다(Beyeler 외, 1991). 위와 같은 조건들이 고려되어 효율적인 배양조의 설계 및 새로운 배양 공정들(perfusion system, 산소전달방식 등)의 개발이 이루어졌다(Applegate 외, 1992). 그 중 연속적인 관류방식은 지속적으로 제어가 되는 환경에서 배양이 가능하다고 하였다(Sittinger 외, 1997). 또한 생체 외부에서의 물리적 환경이 세포의 증식과 분화 등의 기능에 많은 영향을 끼치며 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. Pauwels 나 Roux, 그리고 Cartel 등은 물리학적 자극에 의한 세포의 분화에 대해 관심을 가지고 많은 연구들을 실시하였다(Pauwels 외, 1980). Pauwels 등은 hydrostatic compression이 연골의 형성에 큰 영향을 주며, 뼈의 형성에도 어느 정도의 영향을 준다고 밝혔다(Pauwels 외, 1980). 이는 Hydrostatic compression이 뼈나 연골 형성에 영향을 미치나 hydrostatic tension의 경우에는 skeletal tissue 형성에 큰 영향을 주지 않는다고 밝혔다. 이후에 실제 생체와 유사한 환경을 체외에서 제공하고 생체 적응 능력을 향상시키기 위해 배양시스템을 이용한 물리적 자극을 세포에 직접 추가하는 시스템이 도입되었다(Sodian 외, 2002).

하나의 배양시스템으로 여러 세포를 배양하는 것이 아닌 조직을 구성하는 각각의 타입(예, 피부, 뼈, 혈관, 연골)에 따라 개별적인 디자인의 배양시스템이 요구 되었다(Ratcliffe 외, 2002). 최근 사람의 골수 중간엽 줄기세포가 관류식 배양방법의 3D 지지체에서 증식 및 분화가 더 효과적이라는 연구가 보고 되었다(Braccini 외, 2005). 초음파의 치료적 접근은 1927년 미국물리학자 Wood와 Loomis에 의하여 그 생물학적 효과가 보고되고 의료분야에 응용되기 시작하면서 오늘날 중요한 영역으로 자리 잡게 되었다(Wood 외, 1927). 과거에는 3.0 W/cm² 이상의 강도로 변환기를 움직이지 않은 상태로 3분 이상 적용하면 뼈에서 미네랄이 빠져나가고 성장판에 문제가 생기면서 뼈의 성장이 지연된다고 보고되었다(Baldes 외, 1958). 그러나 한편으로는 초음파치료를 하면 골세포 형성과정을 자극한다는 주장도 있었다(Nyborg 외, 1985). 골형성 세포는 생물학적 자극뿐만 아니라 5~20 uA의 낮은 전류, 특수한 파장의 전자장 그리고 30~50 mW/cm²의 저장도 초음파 에너지와 같은 물리적 자극에 의해서도 촉진될 수 있다(Duarte,

1983). 저장도 초음파는 비열, 기계적 효과로 파장 및 반사파 형태로 영상을 나타내는 성질이 있다고 알려져 있다(Suslick, 1988). 치료용 초음파에서 저장도의 기계적 효과는 인접한 세포의 세포막 투과성을 변화시켜서 세포 안으로 Ca^{2+} 이온을 유입시킴으로써, 세포 내의 Ca^{2+} 농도를 증가시키고 이러한 세포내의 변화는 세포의 움직임이나 성장요소 합성을 증가시켜 상처치유에 이로운 영향을 준다고 보고된 바 있다(Dinno M 외, 1989). 과거에는 골부위에 초음파를 적용하는 것이 해롭다는 연구가 많았으나 최근 연구에 의하면 골부위에 초음파를 적용할 경우에 골절치유 효과뿐만 아니라 손상된 건(tendon)에도 효과가 있을 것이라고 보고되고 있다(Enwemeka 외, 1990). 치료용 초음파는 1~3 MHz의 주파수와 0.1~2.0 W/cm²의 강도로서 열적 및 비열적 기전에 의해 세포와 조직에 물리적 효과가 일어나게 한다(Heckman 외, 1994). 치료용 초음파는 일반적으로 고에너지 고강도 초음파와 저장도 초음파로 나눌 수 있으며, 고강도 초음파는 조직에 의해 흡수되어 조직을 가열시키고 조직을 파괴하는 성질이 있다고 한다(Burdette 외, 1994).

초음파는 조직 내의 세포를 물리적으로 자극할 수 있는 수단으로 초음파를 사용하여 뼈의 성장, 골절, 근육 조직의 치유 등 손상된 조직의 치료에 효과적이며, 특히 골절의 치유에 있어서 골형성 세포의 증식을 촉진하여 뼈의 유합을 촉진한다고 보고되고 있다(Wiltink 외, 1995). 초음파의 생물학적 효과에 대해서는 여러 문헌들을 통하여 보고되고 있으며, 이는 직접적인 열 효과, 비열적인 원인, 세포막 이동 등과 관계가 있다고 보고하고 있다(Kristiansen 외, 1997). 이러한 것은 섬유모세포 배양에서 이들 세포가 융합되기 전에 초음파 치료를 하면 세포 증식을 자극할 수 있음을 의미하며, 이러한 결과는 초음파 치료가 인간 피부모세포 배양에서 세포를 증식한다는 주장과 일치한다(De Deyne 외, 1995).

초음파 자극은 중간엽 줄기세포로부터 연골세포로의 분화를 촉진하는 결과를 관찰하였으며, 이는 초음파 자극이 줄기세포로부터 연골세포로의 분화를 촉진하는 중요한 기계적인 자극이 될 수 있다는 사실로 사료된다(Lee 외, 2005). 초음파의 물리적인 자극이 세포활성에 영향을 줄 수 있다는 것을 확인하였지만 같은 강도를 갖는 초음파라 하더라도 어떤 duty cycle을 부여하느냐에 따라 세포활성에 부정적인 영향을 미칠 수도 있다는 점은 주지해야 할 것이다(홍성민 외, 2004). 저장도 초음파 자극은 인간의 연골을 체외 배양할시 세포의 대사 작용에 영향을 미쳐, 골관절염 연골조직의 회복에 있어서 아주 중요한 방법으로 제안 된다(Min 외, 2006). 뼈의 골절 치료 등에 초음파를 사용한 연구는 활발히 진행되었으나 무균돼지뼈와 관련한 줄기세포의 증식 및 분화에 저장도 초음파를 사용한 연구는 많이 보고되고 있지 않다.

3. 재료 및 방법

3.1 초음파 자극시스템

본 연구를 위하여 사용하는 초음파 자극시스템은 Helbue (Choongwae Pharma Co., Korea) 복합 물리치료기를 변형하여 본체와 초음파 자극부 그리고 전원부로 구성되어 있다(Fig. 2-1). 초음파 변환기(transducer) 머리 지름은 3.6 cm 이고, 초음파 유효 방사 범위는 9.6 cm² 에 이른다. 초음파 자극 시스템은 1 MHz의 주파수를 가지고, 최대 출력 강도는 1.0 W/cm² 까지 조절할 수 있으며, 자극 시간은 1회 10분까지 가능하다. 초음파 파형은 연속모드와 펄스모드 두 가지로 나눌 수 있으며, 펄스 모드에서는 듀티 사이클(duty cycle) 5%, 10%, 30%, 50% 로 자극을 가하였다. 펄스 모드의 듀티 사이클은 방형파가 하이 레벨에 있을 때의 사이클당 시간을 의미하고, 펄스 듀티 사이클은 식 3-1과 같이 정의한다. Fig. 3-2는 duty cycle에 관해 간략화 하여 나타낸 것이다. 여기서, 펄스폭은 펄스 상승 구간의 임계값 50%부터 다음 하강 구간의 임계값 50%까지의 시간을 의미한다.

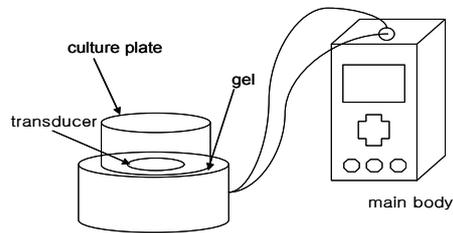


Fig. 3-1. The ultrasound equipment.

$$DutyCycle = \frac{Width\ of\ Pulse}{Cycle} \times 100 \quad (1)$$

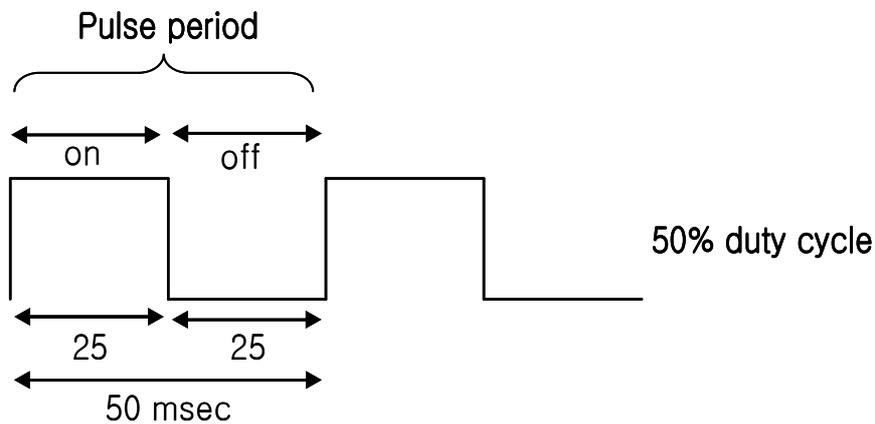


Fig. 3-2. Diagrammatic representation of duty cycle.

3.2 치조골 골수 유래 줄기세포 배양

실험에 사용된 세포는 치조골 골수 유래 줄기세포(alveolar bone marrow stem cell)이며 서울대학교 치과대학 무균돼지뼈생체공학 연구실에서 분양받아 사용하였다. 배양액은 α -MEM을 사용하였고, media에 10 uM ascorbic acid, 1% antibiotics, 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 사용하였다. 세포는 항온 배양기 내에서 37 °C, 95 % 수분, 5 % CO₂ 조건으로 배양하였으며, 100 mm 배양 접시(culture plate)에 3.0×10^4 cell/ml로 seeding하여 24시간 배양한 후 초음파 자극 실험에 사용하였다.

3.3 초음파 자극실험

초음파는 1 MHz의 주파수로 50, 100, 200, 300, 400, 500 mW/cm²의 강도로 조사하며 duty cycle은 5%, 10%, 30%, 50% 로 각각에 대해 3회 반복 실험하였다. 세포의 오염을 방지하기 위해 항온 배양기 안에 들어가는 초음파 자극부는 70 % 에탄올로 소독하였다. 초음파 자극부를 항온 배양기 내에 위치하여 37 °C, 95 % 수분, 5 % CO₂ 조건이 잘 유지된 상태에서 매일 일정시간 1분, 3분, 5분, 10분, 30분씩 3일 동안 자극을 가한다. 대조군은 자극을 주지 않고 3일간 동일한 상태에서 배양하였다.

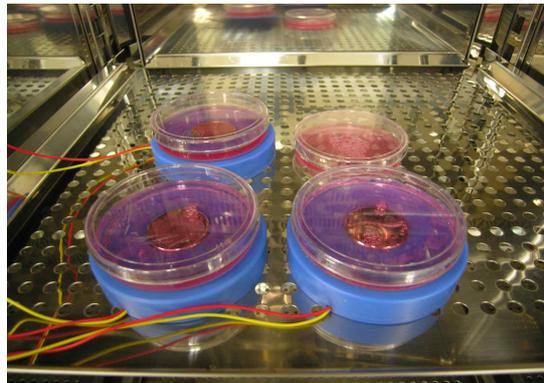


Fig. 3-3. The ultrasonic transducer.

초음파 자극부 부분을 Fig. 3-3과 같이 100 mm 배양 접시가 초음파 변환기 위에 올려 질수 있도록 구성하였다. 100 mm 배양 접시의 바닥과 초음파 변환기 사이에는 공기가 접하지 않고 효과적인 초음파 자극을 주기위해 초음파용 gel(Choongwae Pharma Co., Korea)을 사용하였다. 배양 접시가 초음파 자극부 위에 위치한 상태로 초음파 자극을 가하였다.

3.4 초음파 자극에 따른 세포 관찰

초음파 자극을 가한 후 세포가 자란 형태를 위상차현미경(Nikon TS100, Japan)을 이용하여 200배 확대하여 관찰하였다. 배양접시 단면의 상하 좌우(A)와 중앙(B)을 관찰하여 초음파 변환기 바로 위와 가장자리에서 세포가 어떠한 형태로 자라는지를 비교 분석하였다(Fig. 3-4).

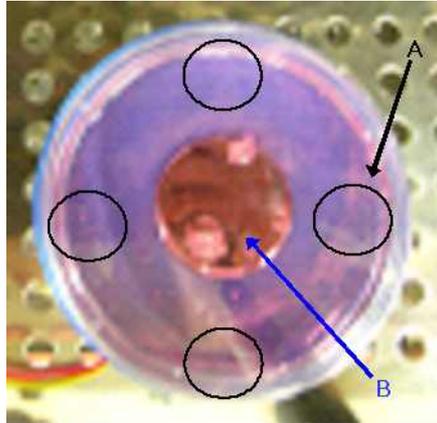


Fig. 3-4. Cell culture plate with ultrasonic transducer.

3.5 초음파 자극시 세포 증식 분석

초음파 자극 후 24시간 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 모두 끝난 후 세포 수 측정을 위해 일반적으로 사용되는 trypsin-EDTA(Gibco, USA)를 사용하여 세포를 수확하였다. 살아있는 세포의 수를 확인하기 위해서 trypan blue 염색방법을 사용하며, 혈구 계수기를 사용하여 세포수를 계산하여 세포 증식 여부를 측정하였다.

3.6 석회화 결절의 확인

치조골 골수 유래 줄기세포를 18일 동안 50 mW/cm², duty cycle 10%, 자극시간 10분의 조건으로 저강도 초음파 자극을 처리한 것을 실험군으로 하였다. 저강도 초음파 자극을 처리하지 않은 대조군과 총 21일 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 모두 끝난 후 석회화 결절의 확인을 위해 Alizarin red-s(Sigma, USA) 염색방법을 사용하였다. 배지를 제거하고, PBS로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 10분 동안 상온에서 고정하고 ethanol를 제거한 후 다시 PBS로 세척하였다. 40 mM/L Alizarin red-s(pH 4.2)로 실온에서 30분 동안 염색하였다. Alizarin red-s 용액을 제거하고 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 증류수로 1회 세척하였다. 염색된 부분을 비교 관찰하기 위하여 digital camera(Nikon, Japan)와 위상차현미경(Nikon TS100, Japan)을 이용하여 200배 확대하여 촬영하였다. 계량적으로 비교하기 위하여 10 mM/L sodium phosphate (pH 7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.7 Western blot

저강도 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 골분화에 어떠한 영향을 주는지를 골분화의 주요 인자인 osteocalcin의 발현 확인을 통해 확인하고자 하였다. 치조골 골수 유래 줄기세포를 18일 동안 50 mW/cm², duty cycle 10%, 자극시간 10분의 조건으로 저강도 초음파 자극을 처리한 것을 실험군으로 하였다. 저강도 초음파 자극을 처리하지 않은 대조군과 총 21일 동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 모두 끝난 후 배지를 제거하고, PBS로 세

척하고 -80°C 에 보관하였다. 보관된 치조골 골수 유래 줄기세포에 lysis buffer를 사용하고 세포를 scapper를 사용하여 모은 후 4°C , 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 단백질을 용출시킨 후 bradford assay를 통하여 정량 한 후 동일한 양의 단백질을 SDS sample buffer를 첨가하여 3분간 100°C 처리하여 단백질을 변형 시킨 후 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 진행하였다. 전기영동은 12%의 polyacrylamide gel을 사용하여 각 well당 25 ul의 단백질 시료를 가하여 25 mA의 전류에서 1시간 동안 실시하였고, 전기영동이 끝난 단백질을 300 mA의 전류에서 3시간 동안 nitrocellulose membrane(Bio rad, USA)으로 transfer 하였다. transfer가 끝난 membrane을 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 5% skim milk에 4°C , 12시간 동안 rocker에서 반응시켰다. blocking solution 제거하고 PBST로 세척한 후 1차 항체와 4°C , 12시간 동안 rocker에서 반응시켰다. 1차 항체 제거 후 PBST로 3회 세척 후 2차 항체와 4°C , 1시간 동안 rocker에서 반응시켰다. 그 후 PBS로 3회 세척하고 ECL kit(Bio rad, USA)를 이용하여 X-ray 필름에 감광시켜서 확인하였다.

3.8 나노파이버 배양시 초음파 자극 처리

저강도 초음파 자극의 3차원 지지체 배양시 적용 가능성을 확인하고자 치조골 골수 유래 줄기세포의 실험 결과 중 증식에 가장 효과적인 50 mW/cm^2 , duty cycle 10%, 자극시간 10분의 조건으로 저강도 초음파 자극을 처리하고 나노 파이버 배양시 치조골 골수 유래 줄기세포가 자라고 있는 형태를 전자현미경으로 관찰하였다.

3.9 초음파 자극 처리시 치수줄기세포 증식 분석

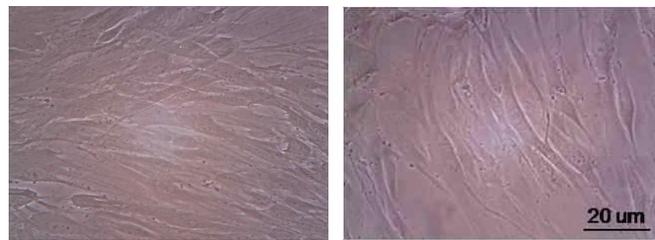
저강도 초음파 자극의 다른 줄기세포 배양시 적용 가능성을 확인하고자 치조골 골수 유래 줄기세포의 실험 결과 중 증식에 가장 효과적인 50 mW/cm^2 의 강도에서 duty cycle 별로 저강도 초음파 자극을 처리한 후 치수줄기세포의 증식 정도를 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 초음파 자극이 세포 배양에 미치는 영향

2차원 세포배양에 초음파 자극이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 2차원 배양인 culture plate에서 초음파 자극 후 광학현미경을 통해 세포의 형태와 움직임을 관찰하였다. Fig. 3-5, 3-6, 3-7은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, 자극시간 10분, duty cycle 50%로 초음파 자극 실험 시 세포의 형태를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300, 400, 500 mW/cm^2 강도에 대해 각각 실험하였다. 자극을 주지 않은 대조군의 경우 culture plate의 중앙과 가장자리 모두에서 세포가 왕성히 잘 자라고 있는 것을 확인할 수 있었다. 100 mW/cm^2 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 culture plate의 중앙 부분에서 세

포가 자라지 못하고 있는 모습을 관찰할 수 있었고, 가장자리 부분에서는 세포가 잘 자라고 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 중앙에서 가장자리로 갈수록 세포가 더 잘 자라는 모습을 확인할 수 있었다. 가장자리에 있는 세포는 그 핵의 모습이 뚜렷하였고 세포 각각의 크기가 대조군에 비해 좀 더 크고 굵은 형상으로 자라는 모습을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 200, 300, 400 mW/cm^2 의 경우에 있어 모두 유사하였다. 하지만 500 mW/cm^2 강도의 초음파 자극의 경우 가장자리에도 세포가 잘 자라지 못하고 있는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 것들로 초음파 변환기 바로 위에 해당하는 culture plate의 중앙 부분에서는 초음파 자극으로 인해 세포가 가장자리로 이동하고 특히 500 mW/cm^2 강도와 같은 경우 자극의 정도가 강하여 세포의 배양에 좋지 않을 것이라 사료된다. 그러므로 각 세포마다 적절한 강도의 초음파 자극만이 세포의 증식에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것이다.



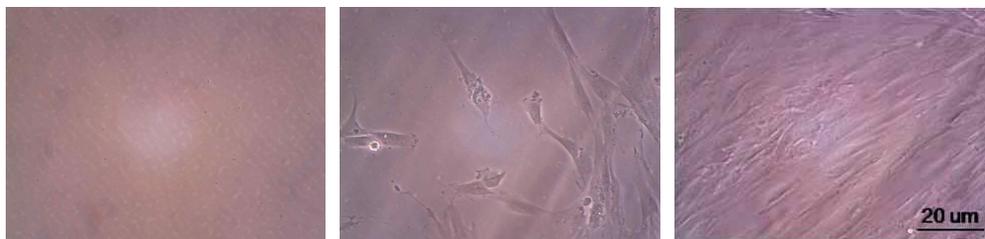
(a) center (b) edge

Fig. 3-5. Non-treatment.



(a) center (b) edge

Fig. 3-6. Ultrasound treatment at 50 mW/cm^2 and 10% duty cycle.



(a) center (b) between center and edge (c) edge

Fig. 3-7. Ultrasound treatment at 200 mW/cm^2 and 10% duty cycle.

다양한 초음파 강도 외 duty cycle과 자극시간의 경우에 관해서도 각각 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 100, 200, 300 mW/cm^2 의 강도로 자극을 주어 세포의 형태를 관찰하였다. 자극

을 주지 않은 대조군의 경우 culture plate의 중앙과 가장자리 모두에서 세포가 왕성히 잘 자라고 있는 것을 확인할 수 있었다. 초음파 강도가 강할수록, duty cycle의 수치가 클수록, 자극시간이 길어질수록 대조군에 비해 culture plate의 중앙 부분에서 세포가 자라지 못하고 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 가장자리 부분에서는 세포가 잘 자라고 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 중앙에서 가장자리로 갈수록 세포가 더 잘 자라는 모습을 확인할 수 있었다. 이러한 것들로 초음파 자극의 정도가 강하고 그 시간이 길어질수록 세포가 가장자리로 이동하는 것으로 사료된다. 그러므로 각 세포마다 적절한 강도, duty cycle, 자극시간 등을 구명하여 그에 맞게 초음파 적용을 한다면 세포의 증식에 매우 효과적일 것이라고 사료되었다.

4.2 2차원 배양시 초음파 자극의 세포증식 효과

4.2.1 세포증식에 초음파 자극 강도의 효과

여러 강도의 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 초음파 자극 강도별 세포 증식을 측정하였다.

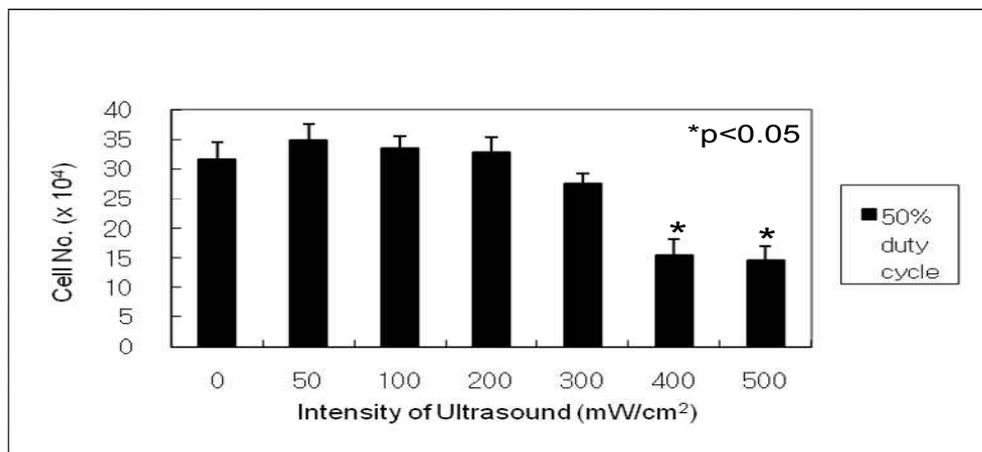


Fig. 3-8. Proliferation of alveolar bone marrow stem cell(ABMSC) in monolayer culture according to the intensity of ultrasound stimulation.

Fig. 3-8은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, 자극시간 10분, duty cycle 50% 로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300, 400, 500 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 초음파를 50, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 작은 차이로 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었고 300 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 400 mW/cm², 500 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 현저한 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 duty cycle 50% 에서는 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져 올 것으로 사료되어

지고, 400 mW/cm², 500 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 그 강도가 강하여 도리어 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 끼치는 것을 확인할 수 있었다.

4.2.2 세포 증식에 초음파 Duty Cycle의 효과 (자극시간 10분)

여러 duty cycle의 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 자극시간 10분에서 duty cycle별 세포 증식 정도를 측정하였다.

1) 치조골세포(ABMSC, Passage 3)의 Duty cycle 5% 경우

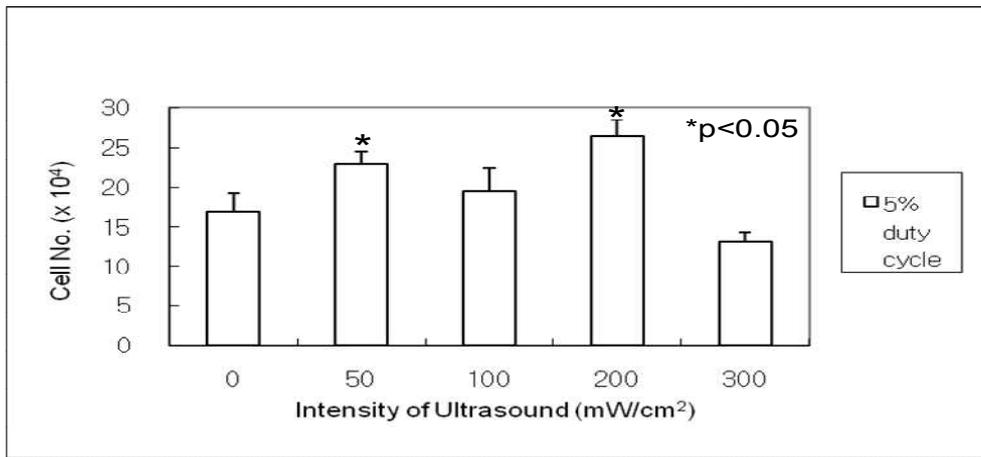


Fig. 3-9. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to the ultrasound intensity at 5% duty cycle and stimulation time of 10 minutes.

Fig. 3-9는 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 3, 자극시간 10분, duty cycle 5% 로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다.

초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 근소한 차이로 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었고 50 mW/cm² 와 200 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 각각 약 136%와 약 157% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 초음파 duty cycle 5% 에서 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극은 대조군에 비해 5%의 유의 수준에서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 가져 왔다. 그러나 300 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 그 강도가 강하여 오히려 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 끼치는 것을 확인할 수 있었다.

2) 치조골세포(ABMSC, Passage 5)의 Duty cycle 10% 경우

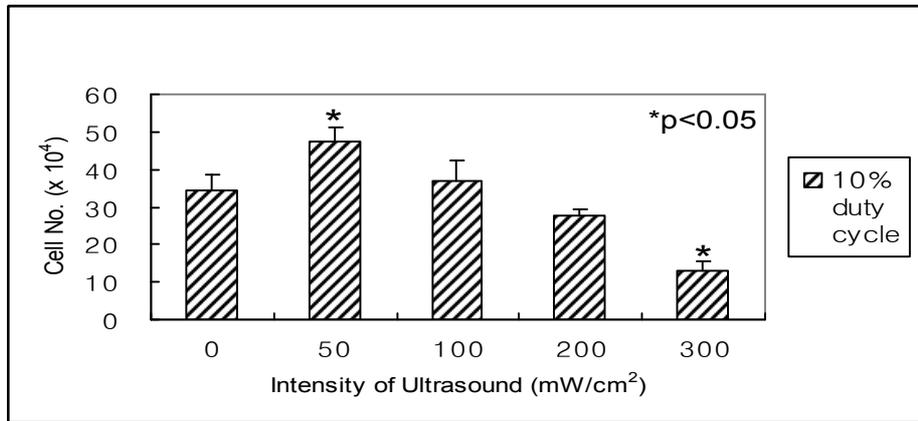


Fig. 3-10. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to the ultrasound intensity at 10% duty cycle and stimulation time of 10 minutes.

Fig. 3-10은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, 자극시간 10분, duty cycle 10% 로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다.

초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 50 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 각각 약 138% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 근소한 차이로 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었고 200 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 현저한 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 duty cycle 10% 의 경우 100 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져 올 것으로 사료되어지고 300 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 그 강도가 강하여 도리어 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 끼치는 것을 확인할 수 있다.

3) 치조골세포(ABMSC, Passage 5)의 Duty cycle 30% 경우

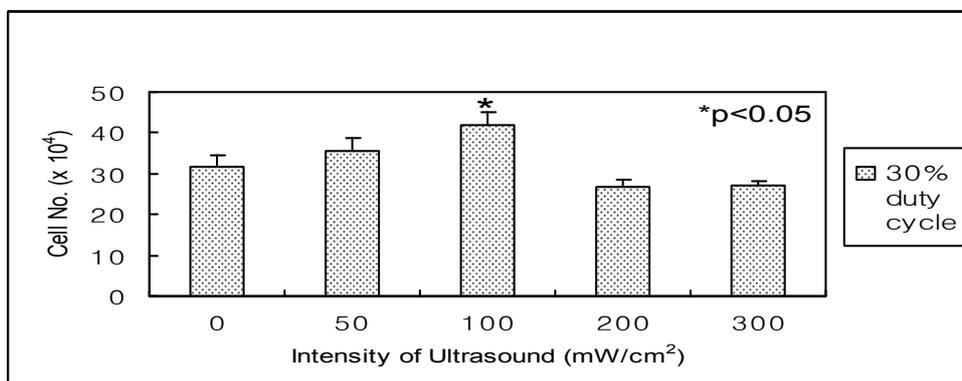


Fig. 3-11. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to the ultrasound intensity at 30% duty cycle and stimulation time of 10 minutes.

Fig. 3-11은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, 자극시간 10분, duty cycle 30% 로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 132% 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 200, 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 duty cycle 30%의 경우 100 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 5%의 유의수준에서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 가져왔다. 200 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 끼치는 것을 확인할 수 있었다.

4) 치조골세포(ABMSC, Passage 5)의 Duty cycle 50% 경우

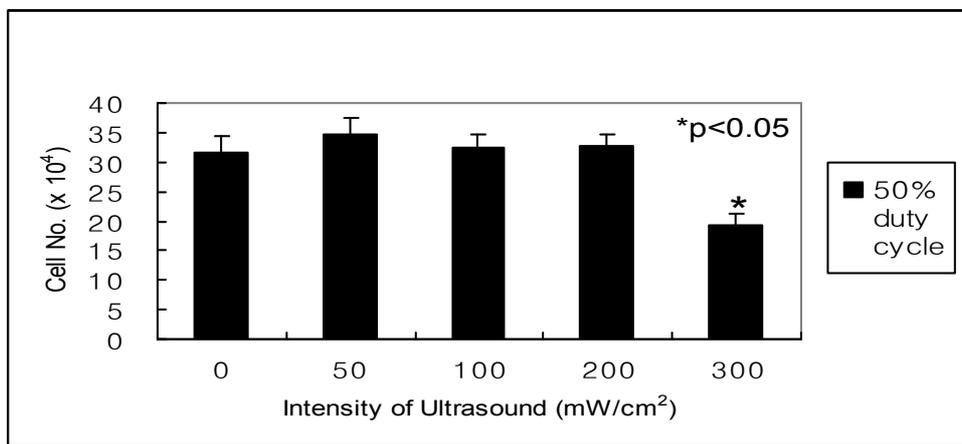


Fig. 3-12. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to the ultrasound intensity at 50% duty cycle and stimulation time of 10 minutes.

Fig. 3-12는 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, 자극시간 10분, duty cycle 50% 로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군과 비교해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식을 거의 확인할 수 없었다. 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 duty cycle 50%의 경우 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하였을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 유의적인 효과를 가져 오지 못하였으며, 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 끼치는 것을 확인할 수 있었다.

4.2.3 초음파 자극시간의 세포 증식 효과(duty cycle 10%와 30%에서)

1) 치조골세포(ABMSC, Passage 3)의 Duty cycle 10%, 자극시간 1분 경우

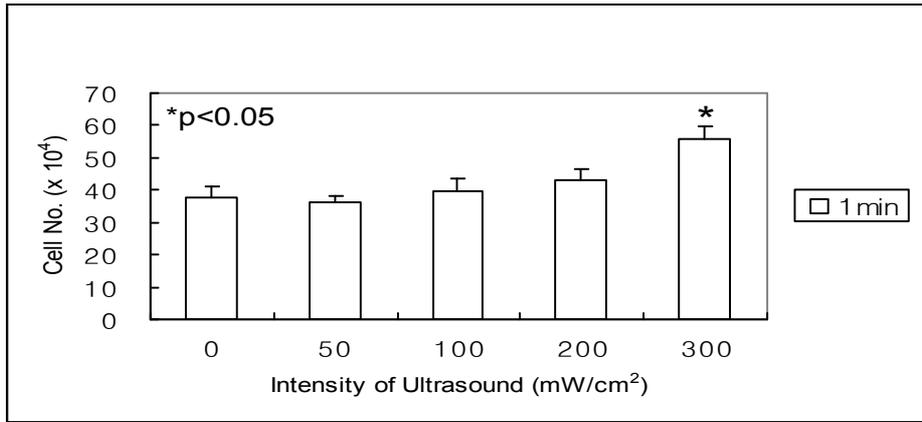


Fig. 3-13. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 10% duty cycle and stimulation time of 1 minute.

Fig. 3-13은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 3, duty cycle 10%, 자극시간 1분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군과 비교해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식을 거의 확인할 수 없었다. 300 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 147% 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 자극시간 1분의 경우, 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하였을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져 오지 못하며 300 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져왔으나, 더욱 낮은 저강도에서 자극시간을 늘리는 것이 바람직하다고 사료되었다.

2) 치조골세포(ABMSC, Passage 3)의 Duty cycle 10%, 자극시간 3분 경우

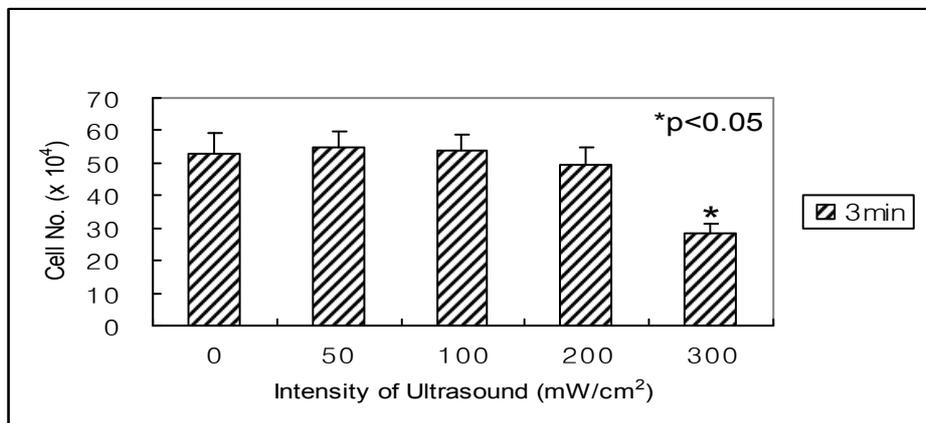


Fig. 3-14. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 10% duty cycle and stimulation time of 3 minutes.

Fig. 3-14는 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 3, duty cycle 10%, 자극시간 3분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군과 비교해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식을 거의 확인할 수 없었다. 300 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 자극시간 3분의 경우 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하였을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져 오지 못하며 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 가져 올 것으로 사료되어진다.

3) 치조골세포(ABMSC, Passage 4)의 Duty cycle 10%, 자극시간 5분 경우

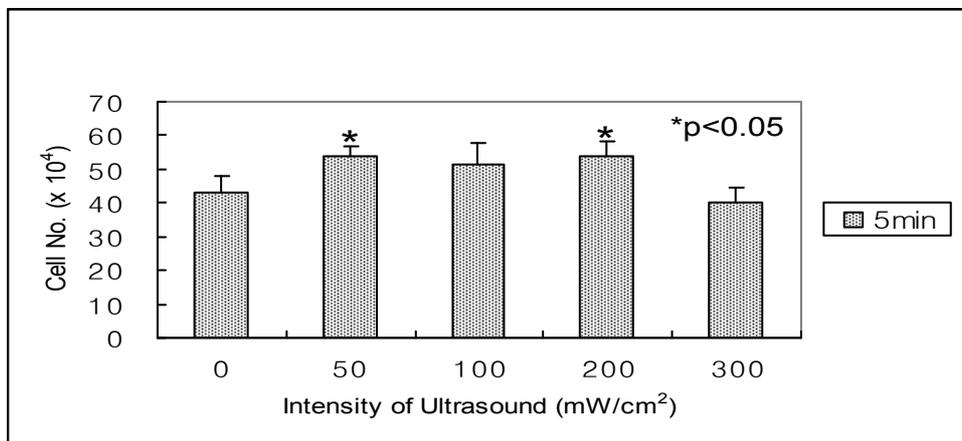


Fig. 3-15. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 10% duty cycle and stimulation time of 5 minutes.

Fig. 3-15는 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 4, duty cycle 10%, 자극시간 5분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다.

초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 50, 100, 200 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 각각 약 125%, 약 119%, 약 125% 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었고 300 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 자극시간 5분의 경우 200 mW/cm² 이하 강도의 초음파 자극을 이용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져 올 것으로 사료되어지고 300 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 가져 올 것으로 사료되어진다.

4) 치조골세포(ABMSC, Passage 5)의 Duty cycle 10%, 자극시간 10분 경우

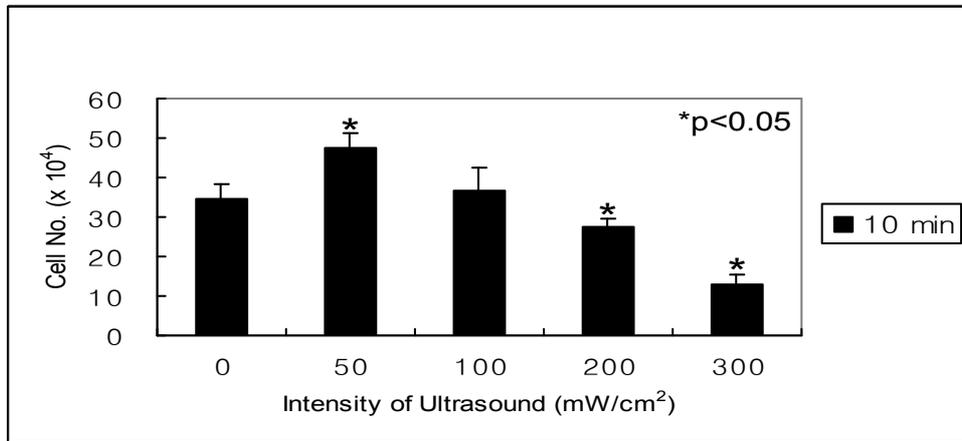


Fig. 3-16. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 10% duty cycle and stimulation time of 10 minutes.

Fig. 3-16은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, duty cycle 10%, 자극시간 10분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다.

초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 50 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 약 138% 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 근소한 차이로 치조골 골수 유래 줄기세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었고 200 mW/cm² 강도의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 300 mW/cm² 강도에 대해서는 세포수의 현저한 감소를 확인할 수 있었다. 이에 100 mW/cm² 강도 조건에서 duty cycle 10% 와 10분의 자극시간을 좀 더 증가시킨 조건에서 실험할 필요가 있었다.

5) 치조골세포(ABMSC, Passage 5)의 Duty cycle 30%, 자극시간 10분 경우

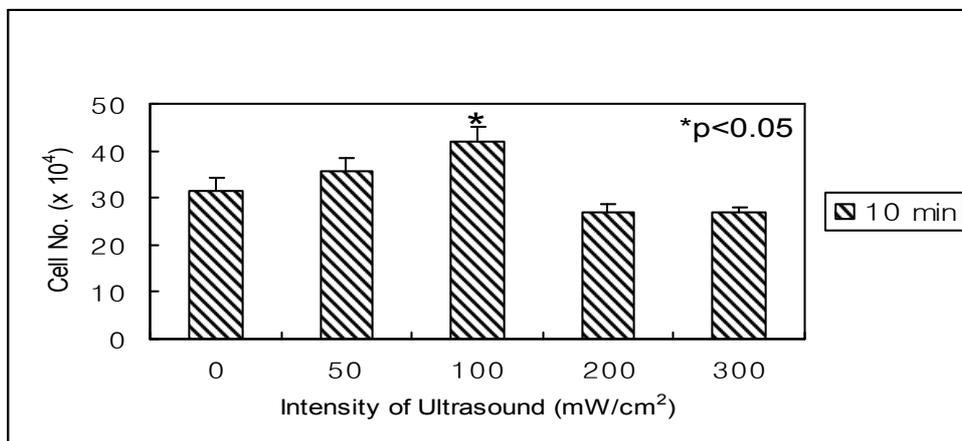


Fig. 3-17. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 30% duty cycle and stimulation time of 10 minutes.

Fig. 3-17은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, duty cycle 30%, 자극시간 10분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 132% 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 200 mW/cm² 강도의 자극부터는 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 duty cycle 30%, 자극시간 10분의 경우 100 mW/cm² 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 가져 올 것으로 사료되어지고, 200 mW/cm² 이상 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 가져 올 것으로 사료되어진다.

6) 치조골세포(ABMSC, Passage 7)의 Duty cycle 30%, 자극시간 20분 경우

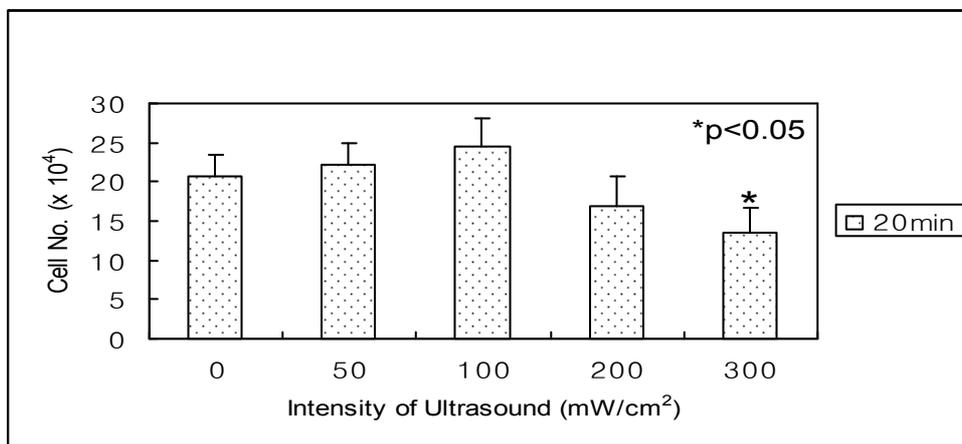


Fig. 3-18. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 30% duty cycle and stimulation time of 20 minutes.

Fig. 3-18은 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 7, duty cycle 30%, 자극시간 20분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 100 mW/cm² 강도로 자극을 준 경우 대조군에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포가 약 113% 증식하는 것을 확인할 수 있었고 200 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 17과 18을 비교해 보면, 100 mW/cm², duty cycle 30%, 자극시간 20분의 경우는 동일 조건 10분의 자극시간에 비해 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과는 떨어지는 것으로 나타났다.

7) 치조골세포(ABMSC, Passage 5)의 Duty cycle 30%, 자극시간 30분 경우

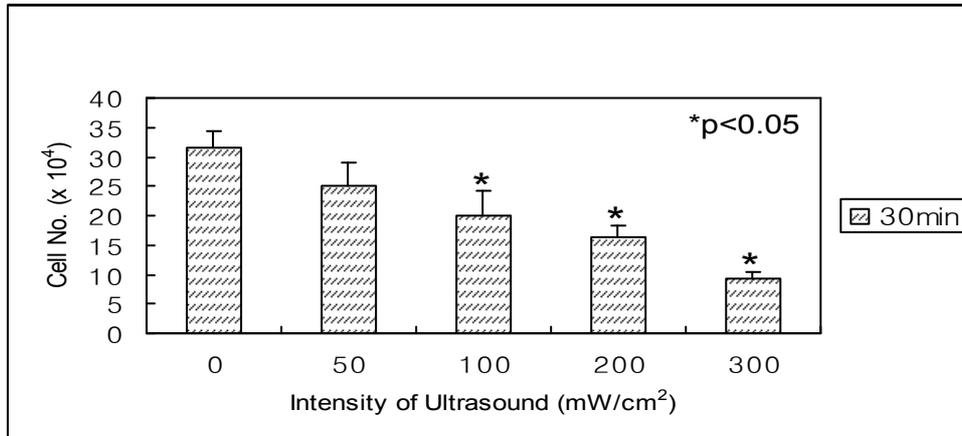


Fig. 3-19. Proliferation of ABMSC in monolayer culture according to ultrasound intensity at 30% duty cycle and stimulation time of 30 minutes.

Fig. 3-19는 치조골 골수 유래 줄기세포 passage 5, duty cycle 30%, 자극시간 30분으로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 50, 100, 200, 300 mW/cm² 강도에 대해 각각 실험하였다. 50 mW/cm² 강도의 자극부터 대조군에 비해 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 100 와 200 mW/cm² 강도의 자극 역시 대조군에 비해 세포수가 감소하였고 300 mW/cm² 강도에서는 세포의 수가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 duty cycle 30%, 자극시간 30분의 너무 장시간 초음파 자극을 가하므로 오히려 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 부정적인 효과를 가져 온 것으로 사료되어진다.

따라서, 초음파 자극 실험을 통해 50 mW/cm² 강도에서 duty cycle 10% 와 10분의 자극시간 조건에서 약 138%의 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과를 가져 올 수 있었다.

4.3 초음파 자극의 석회화 결절 영향 확인

치조골 골수 유래 줄기세포의 분화 정도에 초음파 자극이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 Alizarin red-s 염색방법을 통해 석회화 결절을 확인 하였다.

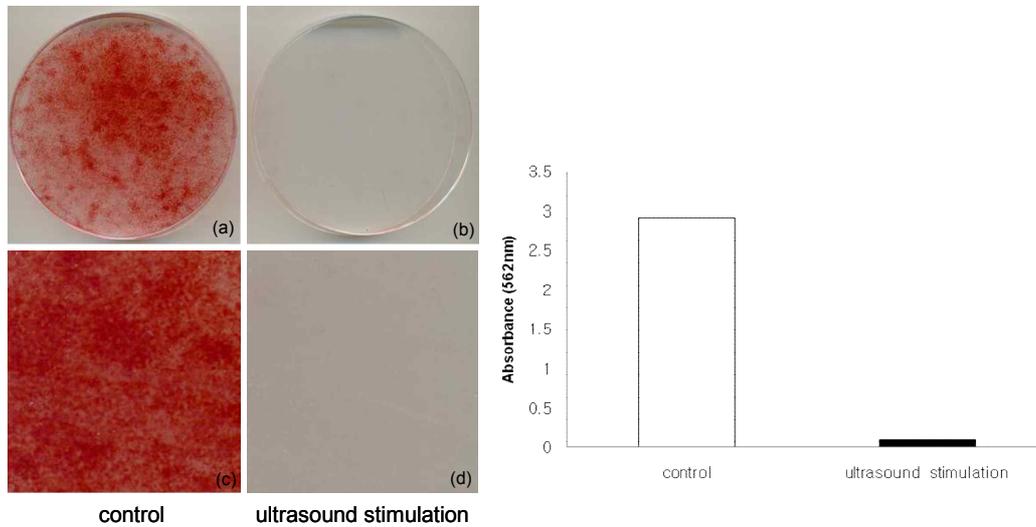


Fig. 3-20. The cells were cultured with or without low intensity ultrasound stimulation and the formation of mineralized nodules were analyzed by staining with alizarin red at day 21 of culture after low intensity ultrasound stimulation. (a)(b) original magnification, (c)(d) x200.

Fig. 3-20의 (a)(c)는 저장도 초음파 자극을 가하지 않은 대조군이며 (b)(d)는 치조골 골수 유래 줄기세포를 18일 동안 50 mW/cm^2 , duty cycle 10%, 자극시간 10분의 조건으로 초음파 자극을 가한 것이다. 총 21일 동안 37°C , CO_2 incubator에서 배양한 후 석회화 결절의 확인을 위해 Alizarin red-s(Sigma, USA) 염색을 하였다. 저장도 초음파 자극이 가해진 실험군에서는 석회화 결절이 발생하지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 그와 반대로 대조군에서는 넓게 분포하여 석회화 결절이 잘 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 장기간의 저장도 초음파 자극은 석회화 결절의 형성에 좋지 않을 것으로 사료된다. 따라서 50 mW/cm^2 강도에서 duty cycle과 자극시간을 적절히 조합하여 자극하는 것이 더 바람직하다고 생각되었다. 따라서 저장도 자극 처리 날짜수를 줄여서 실험을 한다면 석회화 결절 형성에 있어 좀 더 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

4.4 초음파 자극의 골분화 영향 확인

저장도 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 골분화에 어떠한 영향을 주는지를 골분화의 주요 인자인 osteocalcin의 발현 확인을 통해 확인하고자 하였다.

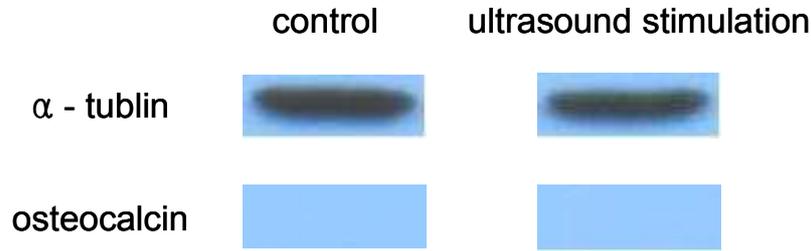


Fig. 3-21. Western blot analysis of the proteins lysed from the transfected cells, with the α -tublin as the control. The result showed that there is no osteocalcin in alveolar bone marrow stem cells.

Fig. 3-21은 저강도 초음파 자극을 처리하지 않은 대조군과 저강도 초음파 자극을 처리한 각각의 치조골 골수 유래 줄기세포를 western blot한 결과이다. 실험군은 치조골 골수 유래 줄기세포를 18일 동안 50 mW/cm^2 , duty cycle 10%, 자극시간 10분의 조건으로 초음파 자극을 가한 것이다. 총 21일 동안 37°C , CO_2 incubator에서 배양한 후 골형성의 중요 인자인 osteocalcin을 확인하고자 하였다. Loading control은 세포의 골격 구성과 성장에 필요한 단백질인 α -tublin을 확인하였다. α -tublin의 경우 대조군과 실험군에서 모두 일정하게 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 저강도 초음파 자극의 효과로 발현을 확인하고자 한 osteocalcin은 골과 상아질에 특이하게 분포하는 단백질로써 골과 연골 형성에 관여하는 무기질 침착시 출현하여 골형성 표지자로 유용하게 사용되어진다. 특히 osteocalcin은 후기 골세포 분화 단계에서 발현되는데 osteocalcin은 광물화 초기에 crystal growth의 조절기능이 있다. 골분화의 대표적인 발현 단백질인 osteocalcin은 대조군과 실험군 모두에서 발현되지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해 치조골 골수 유래 줄기세포의 골분화 조건과 osteocalcin antibody 처리 조건 등의 정립이 필요하다고 판단된다.

4.5 나노파이버 배양시 초음파 자극 처리 효과

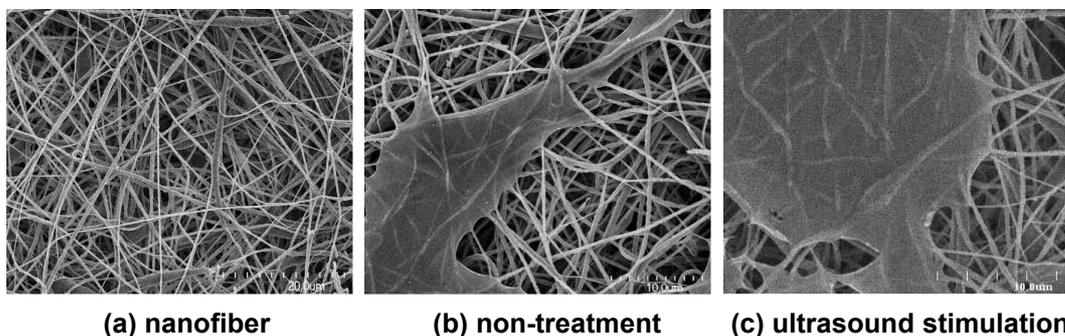


Fig. 3-22. FE-SEM morphology of the PCL nanofiber: (a) nanofiber without alveolar bone marrow stem cell, (b) cell growth morphology without low intensity ultrasound stimulation, (c) cell growth morphology with low intensity ultrasound stimulation. (a) x2000, (b) x3000, (c) x2000.

Fig. 3-22는 50 mW/cm², duty cycle 10%, 자극시간 10분의 조건으로 저장도초음파 자극을 처리하고 나노 파이버 배양시 치조골 골수 유래 줄기세포가 자라고 있는 형태를 전자현미경으로 관찰한 결과이다. 대조군과 실험군에서 큰 차이가 없이 치조골 골수 유래 줄기세포가 배양되고 있는 것이 확인되었다. 또한 이 결과를 통해 줄기세포의 나노지지체 배양시 저장도 초음파 자극의 적용 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

4.6 초음파 자극시 치수줄기세포 증식 분석

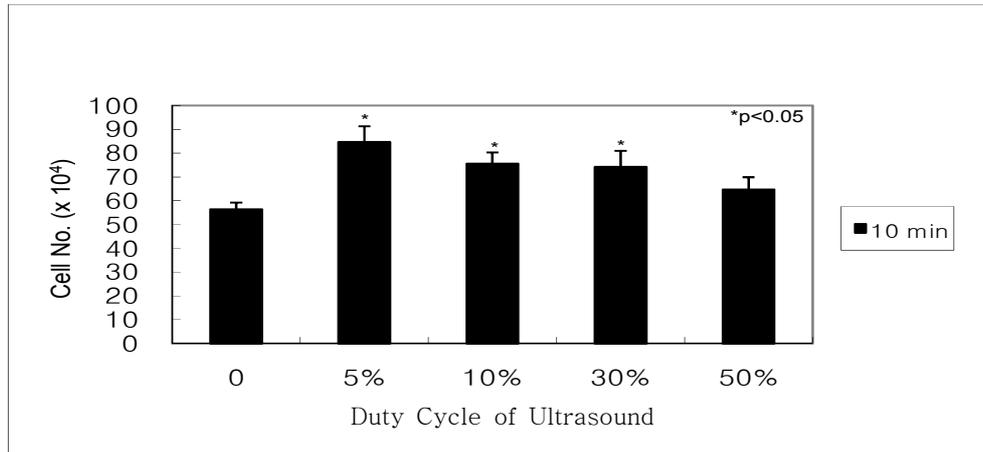


Fig. 3-23. Proliferation of dental pulp stem cell in monolayer culture according to the duty cycle of ultrasound at 50 mW/cm² intensity and stimulation time of 10 min/day × 3 days.

Fig. 3-23은 치수 줄기세포 passage 5, 자극시간 10분, 50 mW/cm² 강도에서, duty cycle 5%, 10%, 30%, 50% 별로 초음파 자극 실험 시 세포의 증식 정도를 나타낸 것이다. 초음파 자극을 주지 않은 대조군과 5%, 10%, 30%, 50% duty cycle 에 따라 각각 실험하였다. 5% duty cycle의 자극에서 대조군에 비해 세포수가 약 150% 증가하였으며, 10% duty cycle의 자극에서는 세포수가 약 134% 증가하였고, 30% duty cycle의 자극에서는 세포수가 약 131%, 50% duty cycle의 자극에서는 세포수가 약 114% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 강도 50 mW/cm², 자극시간 10분의 경우 모든 duty cycle에서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 50 mW/cm² 강도, 5% duty cycle의 저장도 초음파 자극을 3일간 10분씩 주었을 때 치수줄기세포를 최대 약 150%까지 증식시킬 수 있었다. 즉 저장도의 5% duty cycle의 짧은 초음파 자극이 세포 증식에 효과적임을 알 수 있었다. 이는 앞에서 치조골줄기세포를 50 mW/cm² 강도, 5% duty cycle의 저장도 초음파 자극을 3일간 10분씩 주었을 때 치조골줄기세포를 최대 약 136%까지 증식시킬 수 있었던 것과 비교해 아주 유사한 결과를 보였다.

이에 50 mW/cm² 강도, 5% duty cycle, 자극시간 10 분/일 조건의 저장도 초음파 자극이 다른 줄기세포 및 동물세포의 증식에 있어서 아주 효과적인 방법이라고 사료된다.

5. 요약 및 결론

본 연구는 초음파 자극기술을 개발하여 배양시스템에 응용하고자 다양한 특성의 초음파를 사용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 구명하고 적정의 초음파 자극 조건을 찾고자 수행되었다. 최적의 초음파 자극 조건을 찾기 위해 초음파 자극 강도, duty cycle 그리고 자극시간에 대하여 각각의 경우에 대한 영향을 확인하기 위해 세포의 형태, 증식 및 분화 정도를 분석하였다. 주요 연구 결과는 다음과 같았다.

1. 2차원 배양 시 세포가 자라는 형태를 살펴보면 초음파 변환기 바로 위에 해당하는 culture plate의 중앙 부분에서는 초음파 자극으로 인해 세포가 가장자리로 이동하고 자극의 정도가 강할수록 세포 배양에 좋지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 저장도의 초음파 자극과 초음파 센서로부터 적당한 거리의 초음파 자극이 세포 증식에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단되었다.

2. 여러 강도의 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 미치는 영향을 구명한 결과, 200 mW/cm^2 이하 강도의 초음파 자극은 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져왔으며, 300 mW/cm^2 이상 자극은 그 강도가 강하여 도리어 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 역효과를 미치는 것으로 나타났다.

3. $50, 100, 200$ 및 300 mW/cm^2 초음파 강도별로 자극시간 10분 조건과 duty cycle에 따른 초음파 자극이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 구명한 결과, 5%, 10%, 30% duty cycle의 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 긍정적인 효과를 가져왔으나 50% duty cycle의 경우에는 증식에 역효과를 미쳤다. 그리고 각 duty cycle의 경우에 300 mW/cm^2 강도에서는 공통적으로 세포수의 감소를 확인할 수 있었다. 이를 통해 초음파 자극시간 10분에서 30% 이하의 duty cycle과 200 mW/cm^2 이하의 저장도 초음파 강도가 적절히 조합되었을 경우 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

4. 다양한 초음파 자극시간이 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 구명한 결과, 50 mW/cm^2 에서는 duty cycle 10%(5%) 의 자극시간 10분의 경우 증식률이 138%(136%) 이었고, 100 mW/cm^2 에서는 duty cycle 30% 의 자극시간 10분의 경우 증식률이 132% 이었고, 200 mW/cm^2 에서는 duty cycle 5%, 자극시간 10분의 경우에 증식률 157%로서 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식에 가장 효과적이었다. 이에 동일한 강도이라도 duty cycle 과 자극시간에 따라 치조골 골수 유래 줄기세포 증식에 미치는 영향은 달라지며, 강도가 세어질수록 duty cycle과 자극시간은 낮은 조합이 좋았다.

5. 2차원 배양에서는 초음파 강도, duty cycle, 자극시간 및 세포 형태 등을 종합적으로 고려할 때, 치조골 골수 유래 줄기세포 증식에서 50 mW/cm^2 강도, duty cycle 5%(또는 10%)와 자극 시간 10분이 가장 적절한 것으로 나타났다.
6. 저장도 초음파 자극의 골 분화 효과를 평가하고자 석회화 결절과 osteocalcin의 확인을 하고자 하였으나, 두 실험 모두에서 저장도 초음파 자극이 골분화 효과는 나타나지 않았다.
7. 나노 파이버 배양시 저장도 초음파 자극을 처리한 실험군과 저장도 초음파 자극을 처리하지 않은 대조군 모두에서 치조골 골수 유래 줄기세포가 잘 배양되고 있는 것을 전자현미경 촬영을 통해 확인하였다.
8. 치수줄기세포를 이용한 저장도 초음파 자극의 세포증식 효과 검증실험에서도, 50 mW/cm^2 강도, duty cycle 5%와 자극시간 10분의 저장도 초음파 자극이 치수줄기세포를 최대 150%까지 증식시킬 수 있음을 확인하였다.

제 4 절 동물세포의 배양촉진을 위한 미세전류 생체자극기술 개발

1. 서론

전기장과 전자기장을 이용해서 몸의 일부나 병을 치료하는 기술이 과학자에 의해 일반화되어졌다. 다양한 전기적 자극기술을 이용한 의료장치들이 계속해서 소개되어지고 있으며 전기적, 전자기적 힘의 치료효과에 대해서 타당성이 입증되어지고 있다. 이러한 지식으로부터 현재는 특히, 뼈, 연골, 신경과 같은 인체조직에서 전기적 신호로부터 긍정적인 효과를 얻고자 시도되고 있다. 전기 생리학적 뿐 아니라 전기장, 전자기장에서는 더더욱 관심을 가져왔다. 전기적 자극의 3대 생물학적 영향으로서, 첫 번째는 전기적 자극신호는 살아있는 세포에게 물리적 환경의 상호작용을 제공해준다. 이러한 상호작용은 다양한 생물학적 효과를 가지므로 Coulomb와 Gauss fields에 의해 분류된다. 두 번째로 전기적 자극은 성장 인자율을 증대시킨다. 주로 뼈형성 단백질인 (BMP)-2, BMP-4, transforming growth factor- β (TGF- β), an insulin-like growth factor 2 (IGF-2) 등의 생성에 대해서 연구되어진다. 특히, 전기장은 특히 리셉터와 같은 세포 외막 멤브레인에 위치해 있는 전기적으로 성질을 띠고 있는 분자에게 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 세 번째로, 전기적 자극은 살아있는 세포에게 세포성장이나 사멸과 관련된 신호전달계(signal transduction cascade)를 유발한다. 살아있는 세포에게 전기장을 노출시키는 것은 세포에서 내부적인 분자생성을 촉진시킬 수 있는 calcium/calmodulin pathway와 같은 신호전달계를 포함한 미케니즘을 자극시킬 수 있다. 본 연구의 목적은 전기적 자극과 같은 미세전류 전류로 치수세포에게 미세하게 자극함으로써 세포의 내외부의 세포활동 경향을 보고자 한다.

2. 연구사

최근문헌에 의하면, 전기장 자극에 의해서 유발되는 주요 생물학적 영향들이 보고되고 있는데 첫 번째로 Bodamyali T 등(1998)과 Aaron RK 등.(2004)에 의해 기술된 Colulomb Field 와 Gauss Field의 영향을 설명할 수 있다. 이러한 연구에 따르면, Coulomb Field 전하에 유발되는 Inverse Square Force는 생체에서 변위전류를 생성할 수 있고, Gauss Field에서 자기전하에 의해 유발되는 힘은 전자 스핀 처리 현상을 생성시킬 수 있다. 두 번째로, 세포내에서의 성장인자에 대한 연구는 Goodman R 등(1991) 과 Aoran RK 등(2002)에 의해 보고되어졌다. BMP-2, BMP-4, TGF-beta, 그리고 IFG-2 의 생성에 대한 연구가 주를 이루고 있다. 특히, 전기장은 세포의 멤브레인이나, 리셉터와 같은 위치에서 전기적으로 전하를 띠는 molecules의 변화양상에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. Zhao.M 등(1990)은 세포의 신호 경로에 전기장 자극의 효과를 보고하였다. 전기장에 노출된 상피세포와 신경세포들은 칼슘과 calmodulin 신호 경로를 활성화 시켰다. 이 신호전달은 세포내의 특정 분자들을 생산하는데 매우 중요하다.

Gronthos.S 등(2000)은 치수줄기세포가 다른 조직에서 추출된 줄기세포처럼 생체외에서 단일 세포군을 형성하는 다기능성의 분화력을 가지고 있다고 보고하였다.

Kuznetsov.SA 등(1997)은 ex-vivo상태에서 증식된 치수줄기세포들이 생체내의 dentin-pulp와 같은 조직을 형성하는 능력을 갖고 있다고 보고하였다. 더욱이 법랑질 치수줄기세포는 최근에 발표된 것처럼 신경세포와 같이 분화하는 능력을 갖고 있다고 보고되고 있다. 특히, 본 연구에서 사용된 치수줄기세포는 서울대학교 치과대학 구강안면외과 실험실에서 제공되었으며, 이 세포들은 중간엽 줄기세포의 마커인 STRO-1을 발현하는 생체줄기세포의 능력을 갖고 있다. 치수줄기세포에 전기장과 전류의 자극 효과에 대해 발표된 것은 없다. 그러나 골아세포나 섬유아세포에는 전기적인 자극이 생물학적으로 영향을 미친 것이 보고된 바 있다. Han-Peter Wet al.(2001)에 의하면, 전기적 자극이 골아세포나 유사한 세포들의 미네랄 형성 촉진에 영향을 주었다고 보고하였다. 또한, 직류에 의한 전기장 자극이 연골세포의 전위 능력에 영향을 준다고 보고된 바 있다. Pen-Hsiu Grace Chao 등(2000) Ming-Tzu Tsai 등(2007)은 pulse형의 전기장이 골아세포의 증식과 분화 촉진을 가져왔다고 보고하였다. PoH Gruce Chao 등(2007)은 섬유아세포의 이동과 상처치료에 직류 전기장이 큰 영향을 미쳤다고 보고하였다. 특히, 전기 자극이 골형성 성장인자 BMP와 혈관내피 성장인자의 생성을 촉진하였다.

3. 재료 및 방법

3.1 전기자극 시스템

마이크로 전기자극 시스템 (micro-electric current stimulation system) 개발을 위해서, Fig. 4-1과 같이 마이크로 전류공급원(micro-current supply)는 포텐서미터(potentiometer);기계적인 위치 변화에 비례한 전기적 출력 신호를 내기 위해 사용되는 장치, 타이머, 모니터로 구성되어 있다. 전기자극 시스템은 Fig. 4-2와 같이 인큐베이터에 연결되어 있다. 전기자극의 상황은 전기자극을 가하기 전에 통계적인 기법 중 하나인 반응표면해석 (response surface analysis)으로 최적화를 구하여 결정하였다.



Fig. 4-1 Micro-electric supply composed of potentiometer, controlled timer, and monitor manufactured for this study.

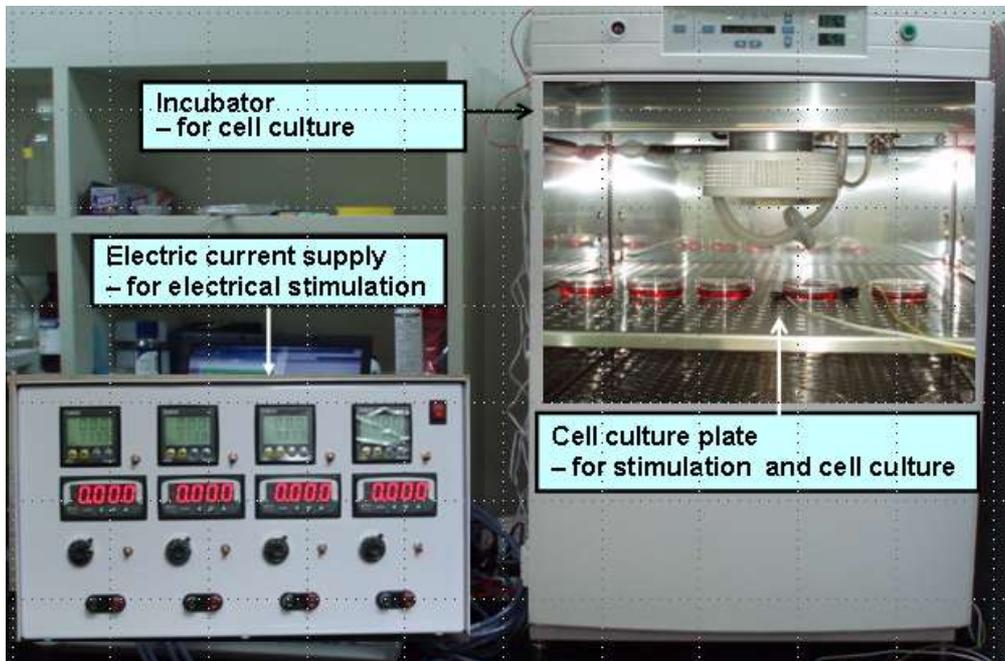


Fig. 4-2 Experimental device for electrical stimulation : System consists of two parts, micro-current supply installed beside of the CO₂ incubator and culture plate with the platinum electrode for stimulation which was located in the CO₂ incubator

3.2 세포에서 분비한 단백질의 SDS-PAGE and immunoblot 분석

세포의 내외부 활동에 관련된 단백질(intracellular and extracellular protein)을 얻기 위해, 전기자극을 가한 배지(electro-stimulated medium)는 10일 동안 수확하였다. 여기서 수확된 배양 배지(harvested supernatant culture medium)는 Centriprep (Millipore, amicon, USA)장치에서 3,000 x g 조건으로 원심분리하여 추출하였다. 추출된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 다시 분석하였다.

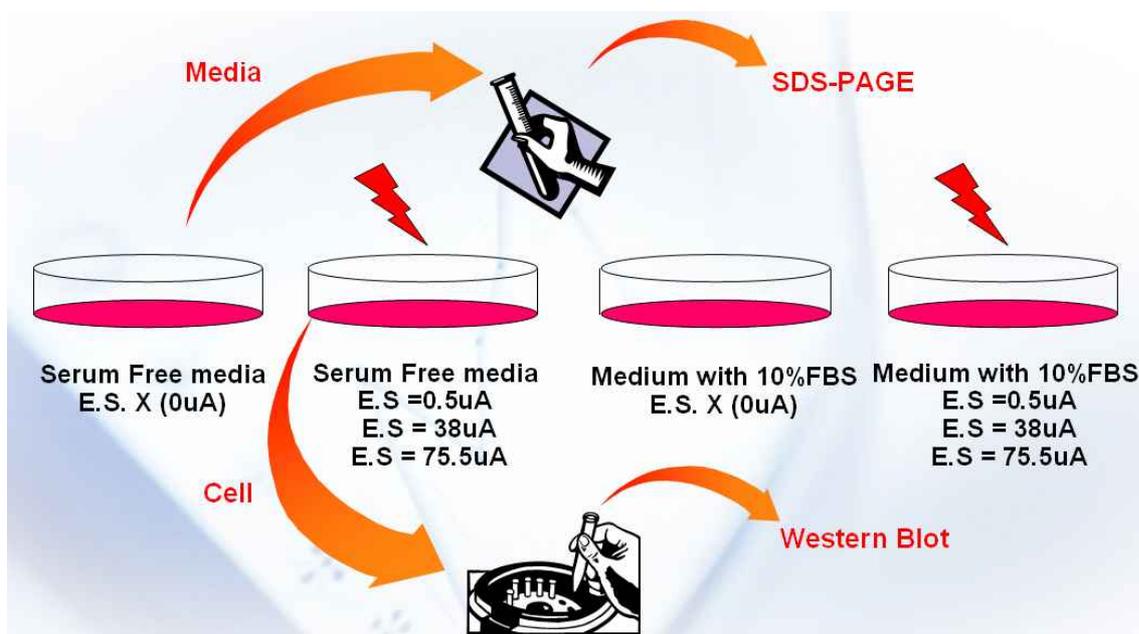


Fig. 4-3 Extraction of cellular protein and analysis : After harvesting the interior and exterior cellular protein, supernatant culture medium was extracted by centrifugation at 3,000xg with Centriprep (Millipore, amicon, USA) which has 3kD a pore size. Extracted protein was resolved and analyzed by SDS-PAGE. Incubated cells were lysed and resolved by SDS-PAGE and western blot analysis at the same time.

4. 결과 및 고찰

4.1 세포증식을 위한 전기적 자극 최적화

치수줄기세포의 증식(Table 4-1)과 관련하여 -1.68에서 1.68까지의 범위내에서 최적 설계결과가 적용되었다. 실험표와 그 실험결과는 Table 4-2에서 나타내었다. 통계처리는 ANOVA로 테스트하였고, 중심합성 계획법(central composite design)은 아래와 같이 2차 다항방정식으로 나타내었다.

Y (Cell Proliferation; O.D) =

$$2.421 + 0.102X_1 + 0.023X_2 + 0.081X_3 - 0.009X_1^2 - 0.054X_1X_2 - 0.120X_2^2 - 0.109X_1X_3 - 0.005X_2X_3 - 0.001X_3^2 \quad (4-1)$$

여기서, Y = Cell Proliferation; O.D

X₁ = Stimulation time interval(sec),

X₂ = Current intensity(uA),

X₃ = Stimulation time(sec)

이 모델의 적합성은 결정계수 R²에 의해 증명하였다. 본 연구에서, R² 값은 0.9870이고, 총 변이성은 98.7%로서 이 모델에 의해 설명되었다. 이 모델의 통계적 유의성은 p<.0001로 나타났다. 반응표면의 그래프와 그의 반응 곡선은 Fig. 4-4와 Fig. 4-5에서 나타내었다. 최적 전류에 대한 강도는 38 uA (Fig. 4-6)로 나타내었다.

Table. 4-1 Experimental ranges and levels of independent variables

Variables	Range and Levels				
	-1.682	-1	0	1	1.682
Stim. Time Interval(sec)	9.54	30	60	90	110.46
Current(uA)	6.36	20	40	60	73.64
Stim. Time(sec)	3.18	10	20	30	36.82

Table. 4-2 Central composite design matrix of three variables in coded and natural units along with the observed responses (cell proliferation (O.D)).

Obs. No.	x1	x2	x3	stim.t.interval (sec)	current (uA)	stim.time (sec)	cell proliferation (O.D)
1	-1	-1	-1	30	20	10	1,861
2	-1	-1	1	30	20	30	2,223
3	-1	1	-1	30	60	10	1,987
4	-1	1	1	30	60	30	2,424
5	1	-1	-1	90	20	10	2,401
6	1	-1	1	90	20	30	2,422
7	1	1	-1	90	60	10	2,408
8	1	1	1	90	60	30	2,311
9	-1,682	0	0	9,54	40	20	2,345
10	1,682	0	0	110,46	40	20	2,548
11	0	-1,682	0	60	6,36	20	2,102
12	0	1,682	0	60	73,64	20	2,159
13	0	0	-1,682	60	40	3,18	2,355
14	0	0	1,682	60	40	36,82	2,580
15	0	0	0	60	40	20	2,432
16	0	0	0	60	40	20	2,425
17	0	0	0	60	40	20	2,421
18	0	0	0	60	40	20	2,413
19	0	0	0	60	40	20	2,406
20	0	0	0	60	40	20	2,411

Table. 4-3 Analysis of variance for the model

Sources	DF	Sum of squares	Mean squares	F value	Pr>F
Lack of Fit	5	0.048857	0.009771	103.51	<.0001
Pure Error	5	0.000472	0.000094		
Total Error	10	0.049329	0.004933		

Mean of response = 2.3317; Root MSE = 0.07024; $R^2=0.9876$

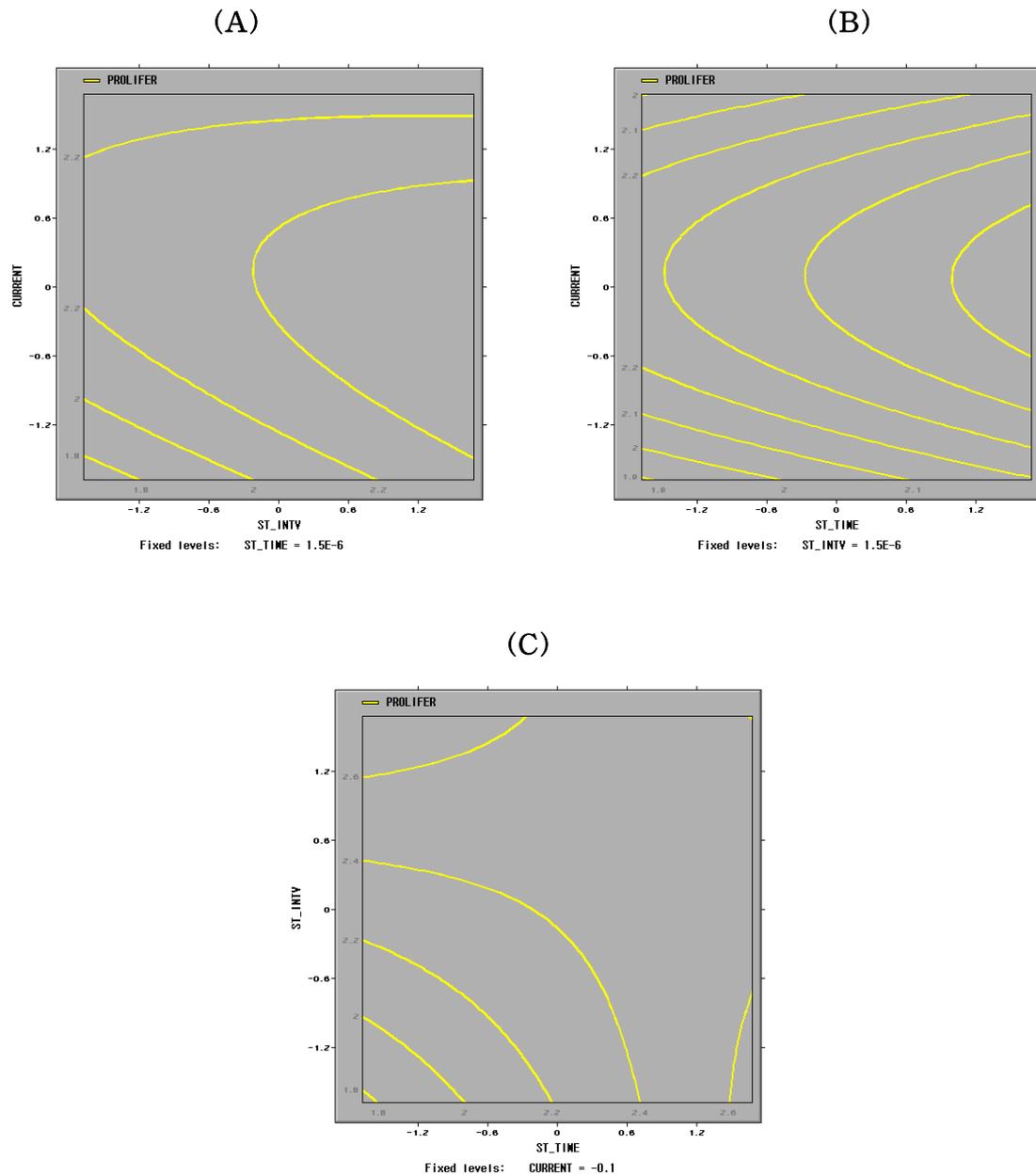


Fig. 4-4 Contour plot of the cell proliferation (O.D): The effect of stimulation time (sec), current (μA), and stimulation time interval (sec) on the proliferation of dental pulp stem cells. The plot of (A) current (μA) and stimulation time interval (sec), (B) current (μA) and stimulation time (sec), and (C) stimulation time interval (sec) and stimulation time (sec) with fixed on (A) stimulation time (sec) = $1.5\text{E}-6$, (B) stimulation time interval (sec) = $1.5\text{E}-6$, and (C) current (μA) = -0.1 .

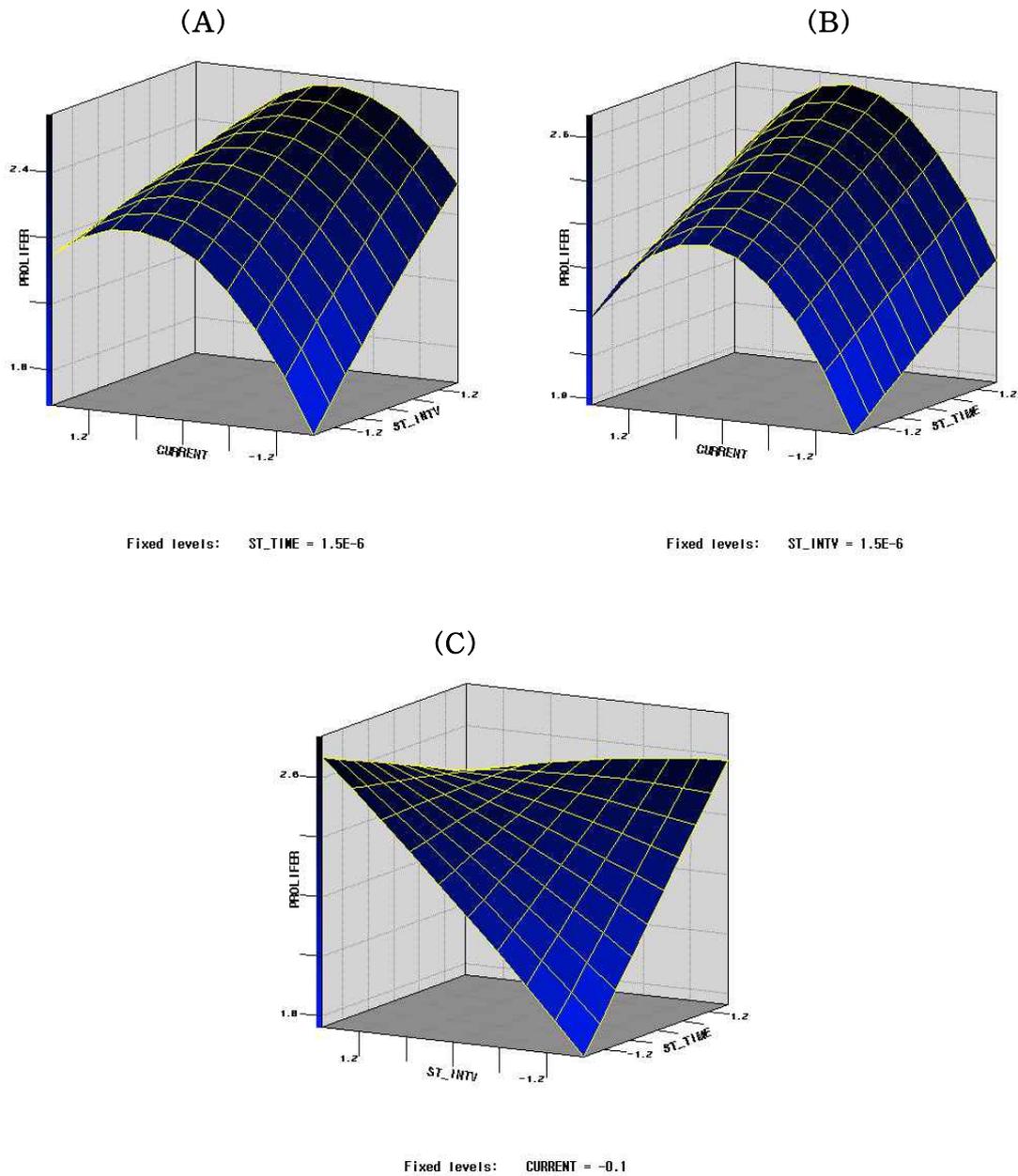


Fig. 4-5 Response surface plots on cell proliferation (O.D): The effect of (A) current (μA) and stimulation time interval (sec), (B) current (μA) and stimulation time (sec), and (C) stimulation time interval (sec) and stimulation time (sec) on proliferation of dental pulp stem cells.

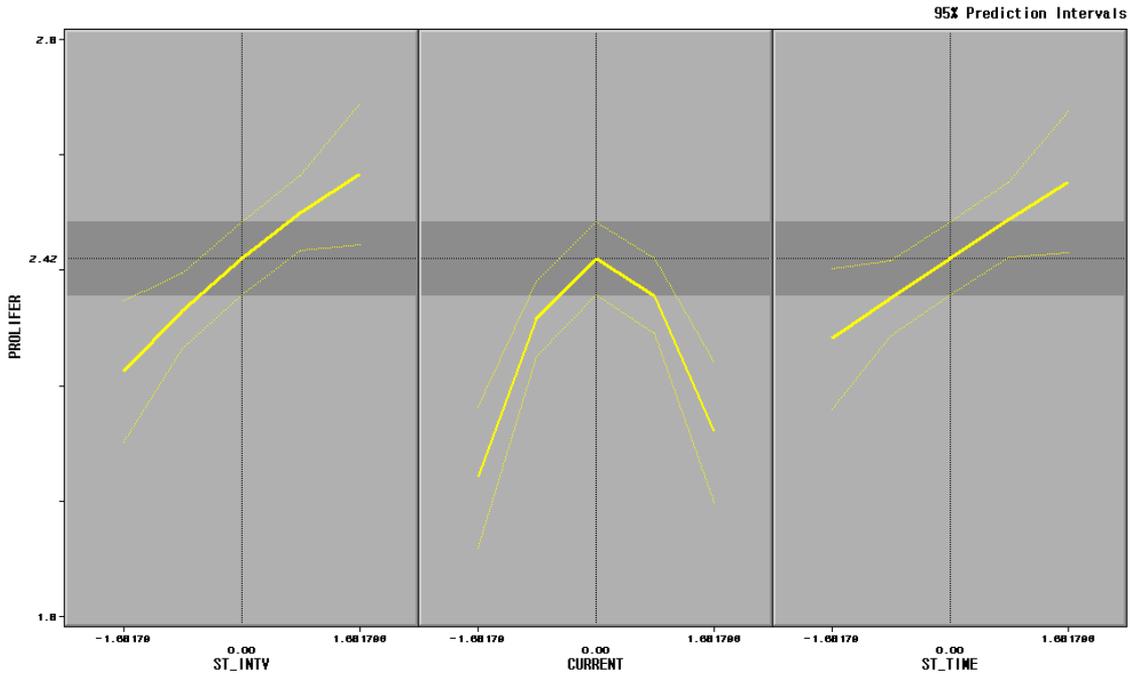


Fig. 4-6 Prediction profiler and desired conditions for cell proliferation of dental pulp stem cells

4.2 최적 조건의 검증

반응표면 분석(Response surface analysis)을 통해서 최적화를 결정하기 위해, 항암활성 실험 (MTT assay)를 통해서 최적조건으로부터 얻어진 세포 증식에 대한 판단이 시행되었다. 전기 자극을 가한 치수세포는 38 uA에서 활성화시켰다. 이를, 최적 자극조건으로 하였으며, Fig. 4-7에서 보여준 결과와 같이 가장 큰 증식률을 보였다.

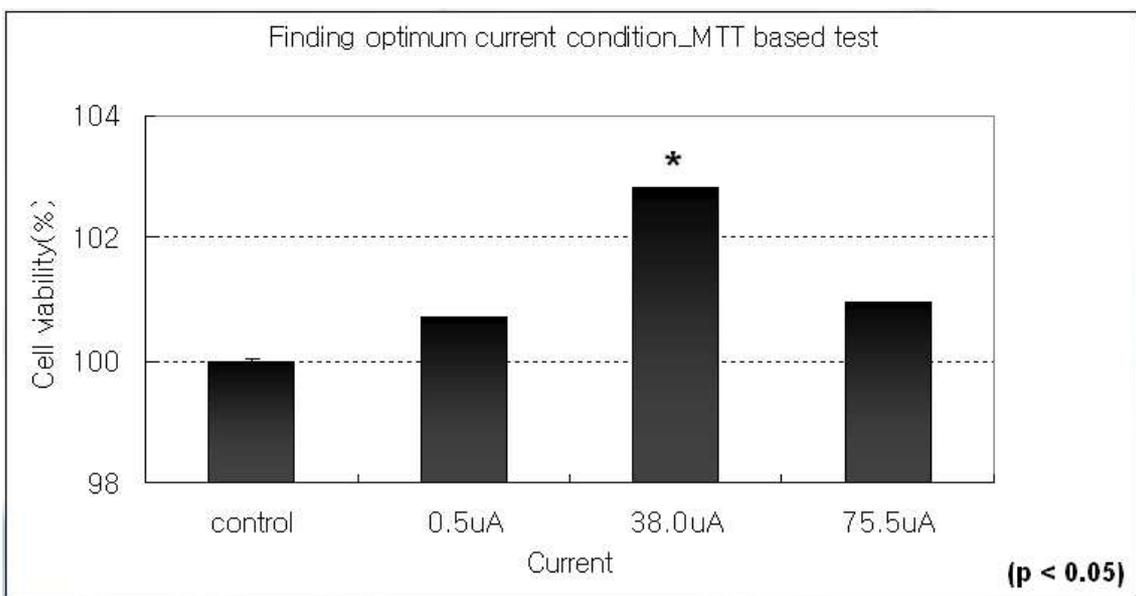


Fig. 4-7 Cell viability assessment for verification of optimization result.

4.3 SDS-PAGE 및 Western blot 분석

전기를 가한 배지(Electro-stimulated conditioned medium)는 Fig. 4-8 (A)에서 보여준 것처럼 8% SDS-polyacrylamide gels에서 추출하여 분석하였다. 여기서 나온 추출된 세포의 대사물질 단백질은 serum free media와 10% FBS 배지에서 각각 실험하였다. 또한, Neurogenesis 마커로서, 오스테오칼신(osteocalcin)을 보고자 western blot analysis을 실행하였다. Fig. 4-8 (B)에서 보여준 SDS-PAGE 결과처럼, 혈청 유무에 따라 서로 다른 단백질 상이 나타났다. 두 그룹간의 전기를 가한 세포와 전기자극을 가하지 않은 세포에서의 오스테오칼신은 Fig. 4-9에서 보여진다.

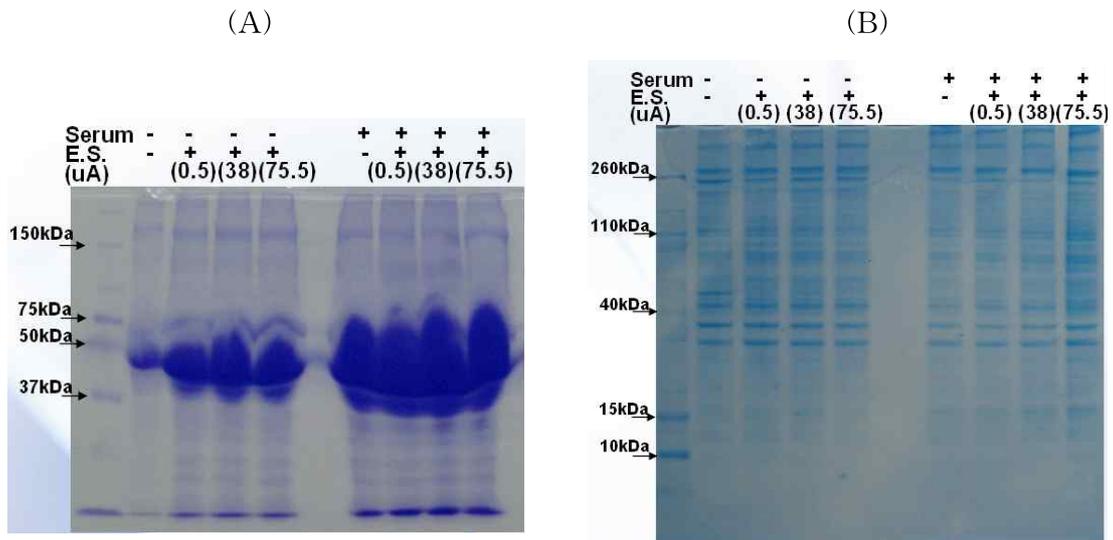


Fig. 4-8 SDS-PAGE with the secreted protein in the electro-stimulated media (A) and in the electro-stimulated cell (B).

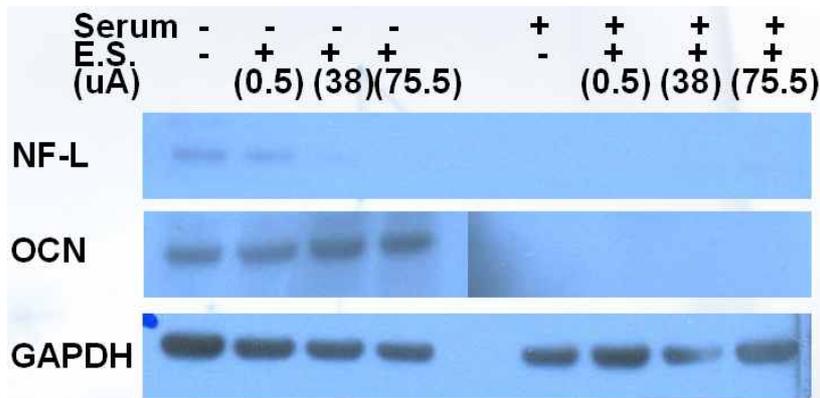


Fig. 4-9 Expression of marker molecules, osteocalcin (OCN) and neurofilament (NF-L) via western blot analysis.

4.4 전기자극의 영향

SDS-PAGE 결과 분석을 증명하기 위해서, SDS-polyacrylamide gel이 일반 세포배양배지에 처리되었다. 전기자극을 가한 배양배지에 의해 처리된 치수세포의 세포증식률은 Fig. 4-10에서 보여진 것처럼 38uA의 전류강도에서 약 120%로 가장 높게 나타났다.

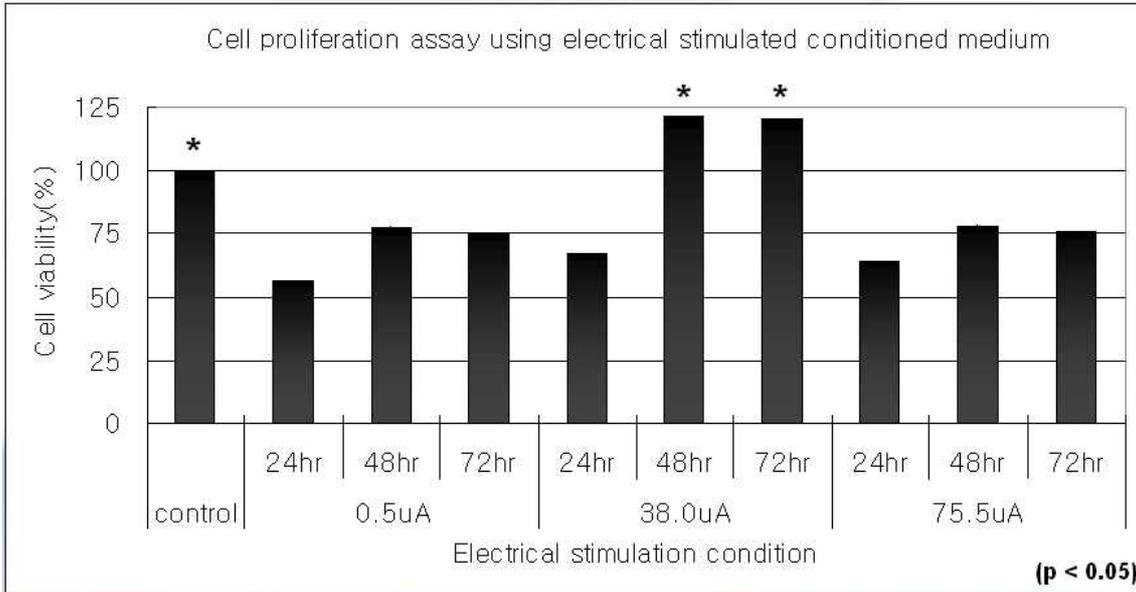


Fig. 4-10 Cell viability test after treatment of conditioned medium

4.5 전기전도성 물질인 폴리피롤(polypyrrole) 필름 제작과 평가

폴리피롤 필름의 표면 성질을 알아보기 위해서 Field-Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM)에 의해 관찰되었다. 폴리피롤 필름의 표면 상태 Fig. 4-11에서 보여진 것처럼 두께가 두꺼워짐에 따라서 더 거칠한 표면을 나타내었다.

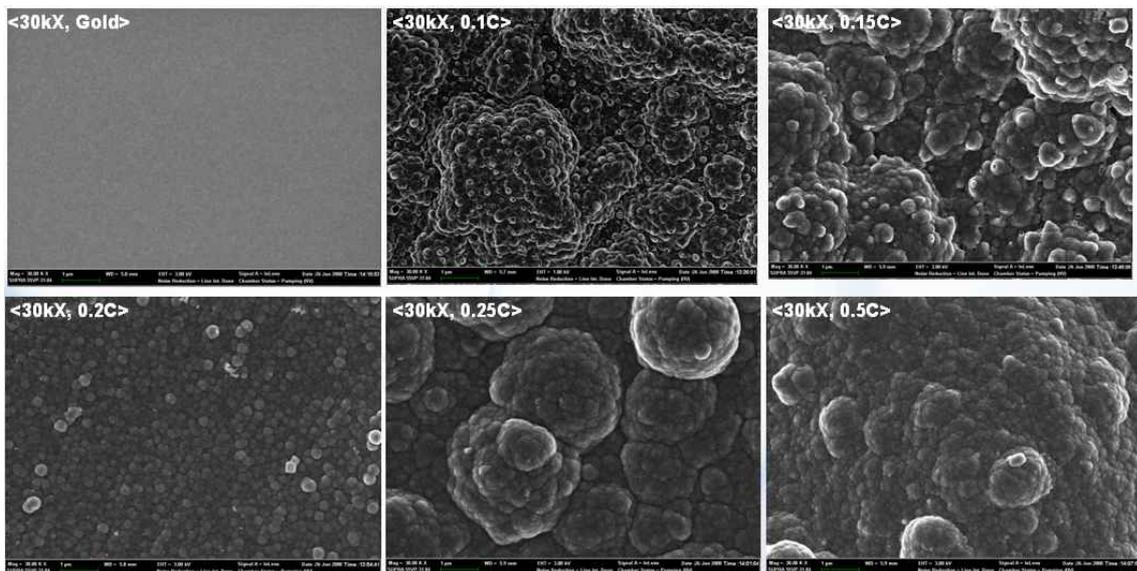


Fig. 4-11 Scanning electro micrograph of the polypyrrole

4.6 세포 접착성 평가

DAPI로 레이블링처리한 세포는 형광현미경을 통해서 관찰된다. 폴리피롤 필름에 부착된 치수줄기세포는 Fig 4-12과 Fig. 4-13에 나타나 있다. 치수줄기세포는 폴리피롤의 두께가 더 두꺼움에 따라서 세포 접착률이 더 좋은 효과를 가졌다.

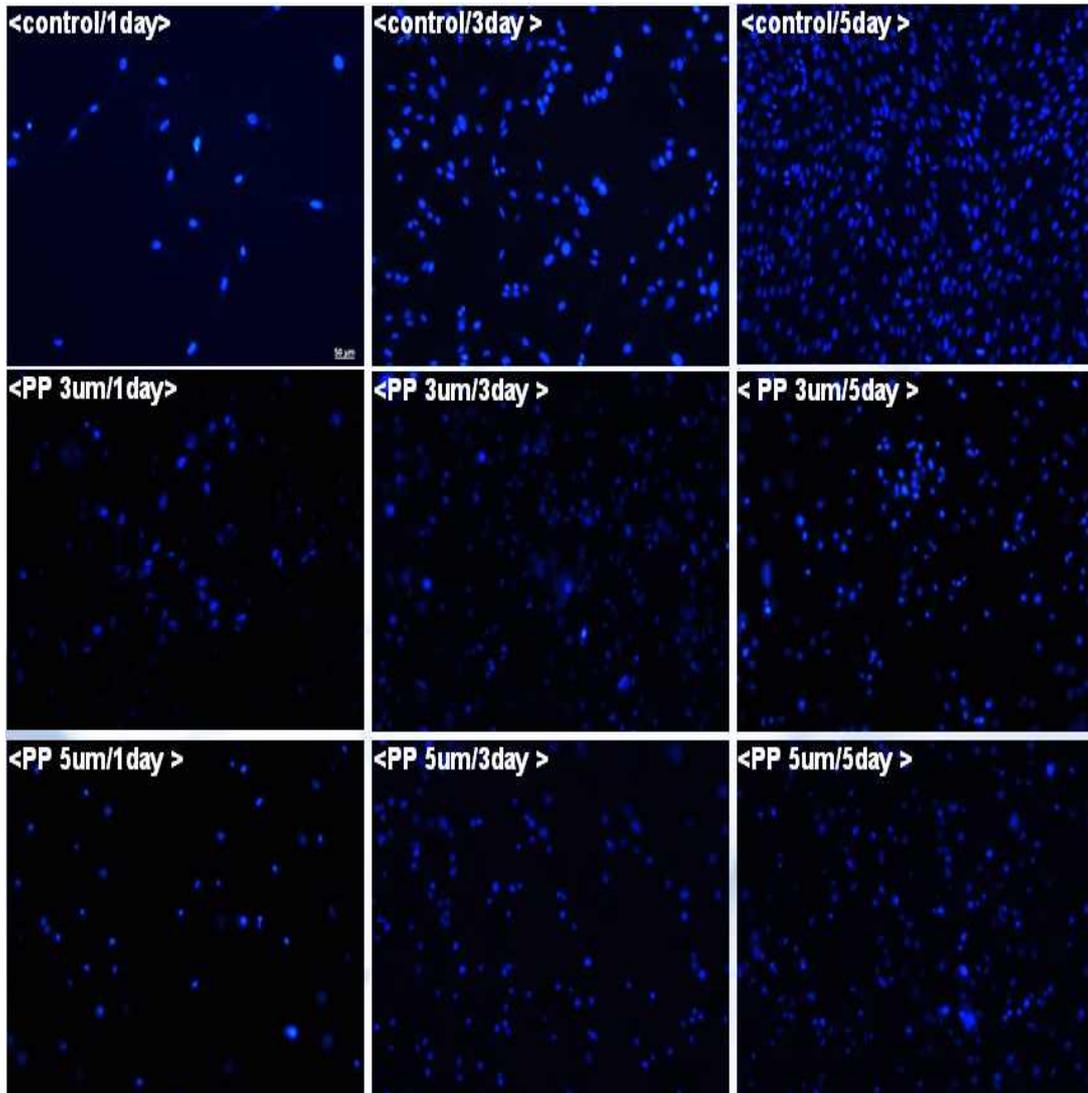


Fig. 4-12 DAPI labeling on the polypyrrole along the thickness conditions

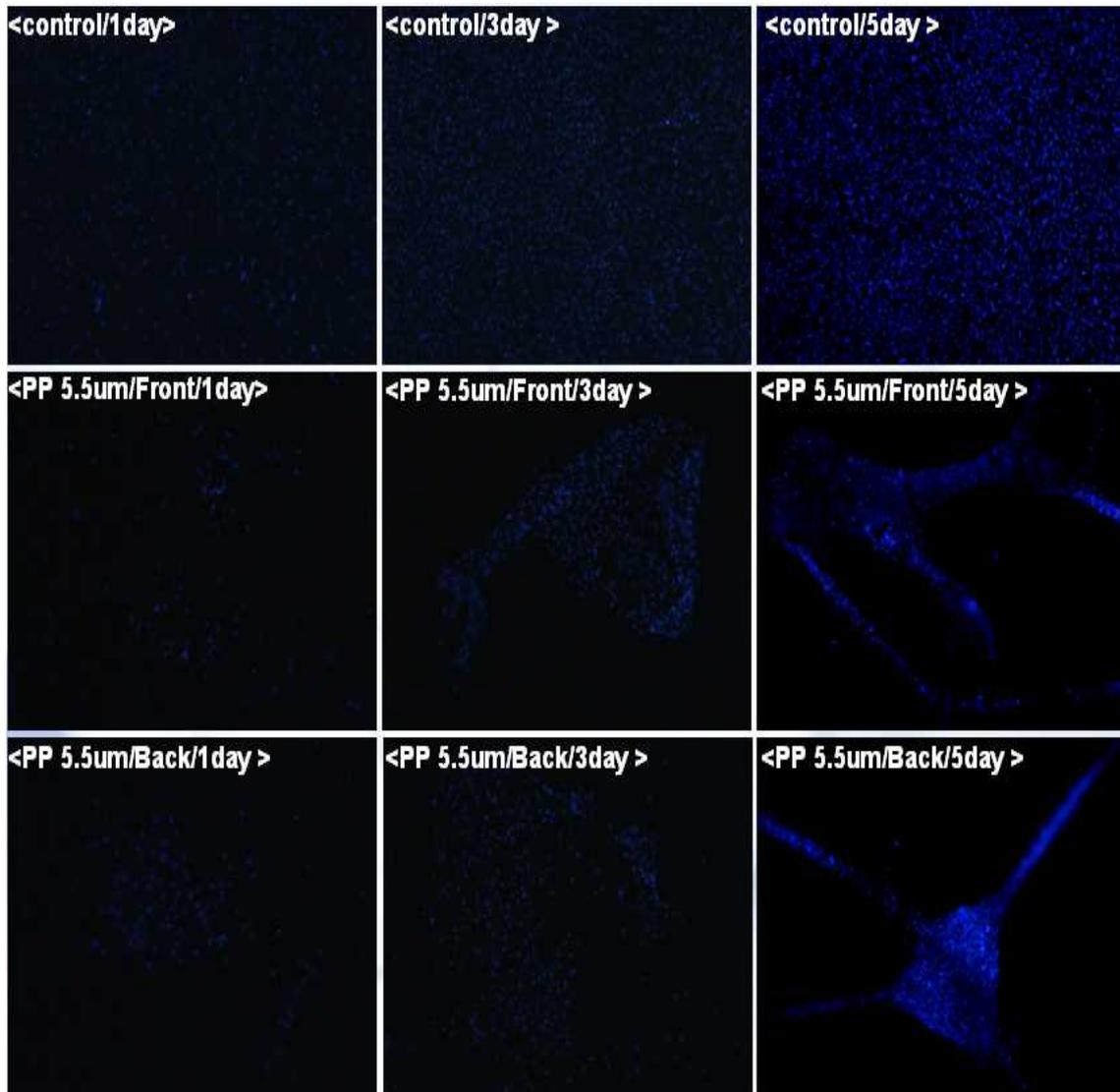


Fig. 4-13 DAPI Labeling on the polypyrrole along the coating conditions

4.7 세포생존을 평가(Cell viability assessment)

세포생존 능력 결과(cell viability)는 MTT assay에 의해 평가된다. Fig. 4-14와 비교해서 5.5um 폴리피롤 필름에서 세포의 생존능력 결과인 세포생존율이 높게 나타났다. 또한, 그에 따른 단백질의 변화는 Fig. 4-15에서 보여진다.

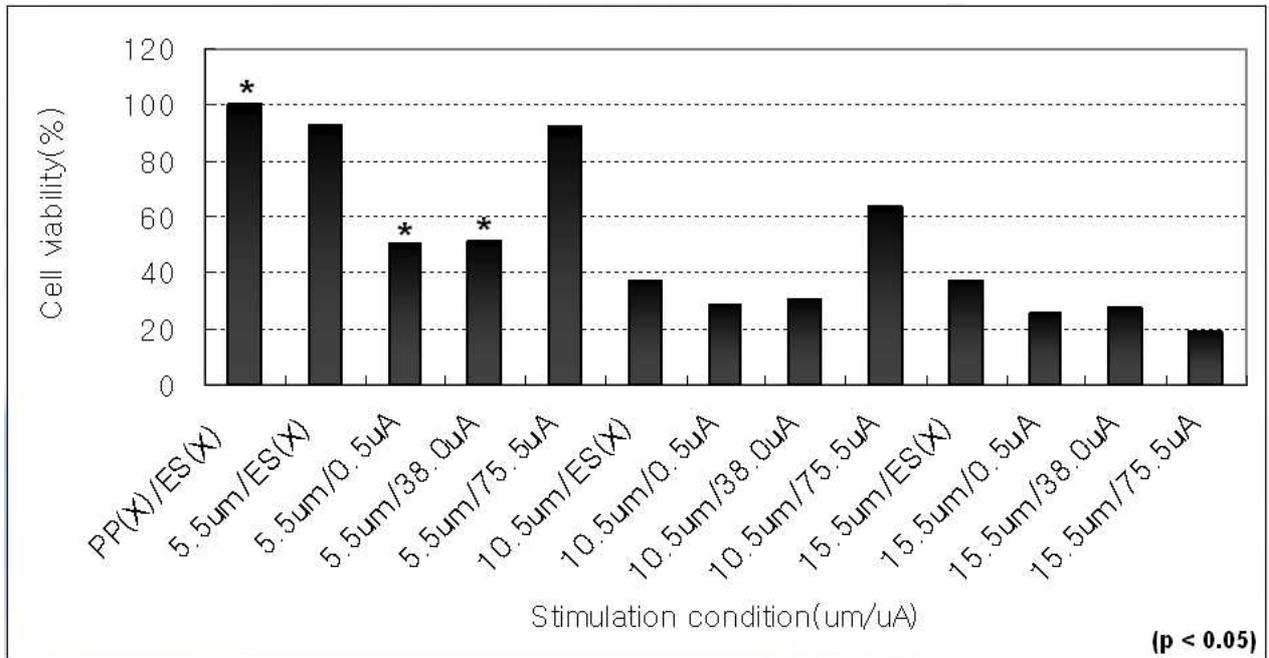


Fig. 4-14 Cell viability test on poly pyrrole film with electrical stimulation

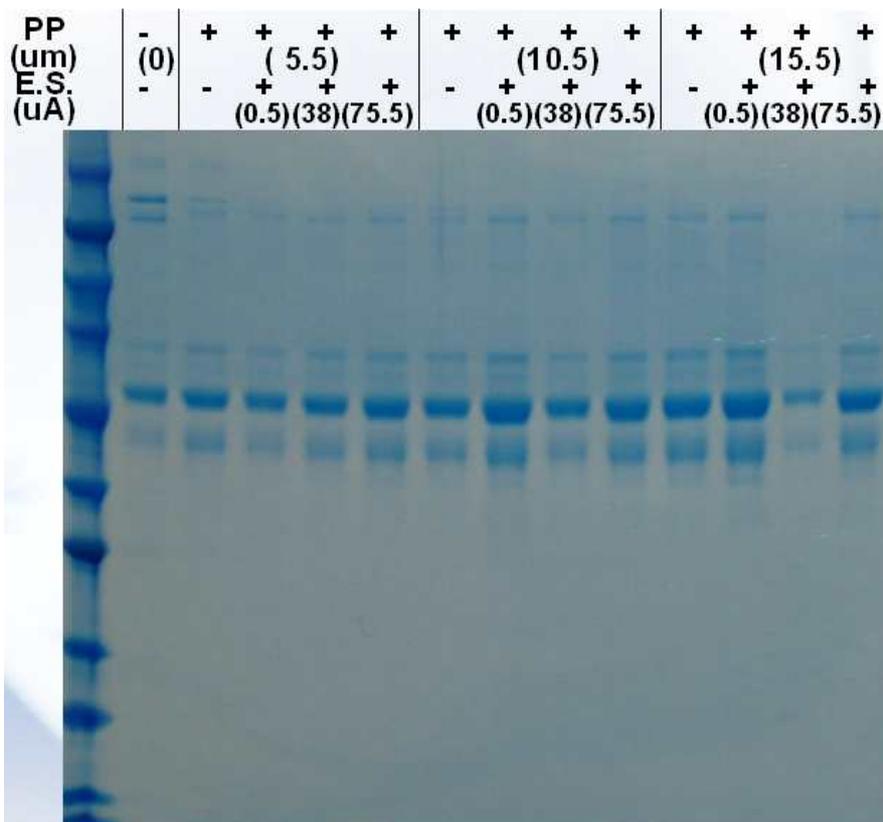


Fig. 4-15 SDS-PAGE with the secreted protein in the electro-stimulated media

5. 요약 및 결론

전자기장을 이용하여 질병을 치료하는 것은 일반 대중과 과학자들에게 널리 알려진 기술이므로, 전기 생리학과 더불어 전자기장과 관련된 연구 역시 수세기에 걸쳐서 지속되고 있다. 이처럼, 전기자극에 의한 생물학적 영향에 대한 많은 연구가 이루어 졌음에도 불구하고 모든 종류의 생물학적 영향이 규명되어 있지 않은 것이 전기자극 연구에서의 한계점이라고 할 수 있다. 따라서, 치수줄기세포에 전기자극을 적용한 연구는 전무한 실정이므로 이 분야의 연구가 필요하다. 본 연구에서는 치수줄기세포에 전기자극을 가했을 때 세포 내, 외의 물질변화에 대해 살펴봄으로써, 전기자극이 주는 효과에 대해 알아보았다. 자극에 대한 최적 반응을 나타내는 최적 자극조건을 찾아보기 위해 통계적 실험계획, 분석 방법인 반응표면분석법을 이용하여 세포증식에 대한 최고 반응을 나타내는 최적자극 조건을 찾아보았다. 또한, 앞으로 치주조직재생연구에 적용하기 위한 전기 전도성 물질에 대해 제안을 하기 위해 폴리피롤이라는 물질에 대해 전기자극을 가했을 때의 효과성에 대해 기본적인 특성에 대해 알아보았다. 폴리피롤의 경우, 두께가 더 두꺼울수록, 부드러운 곡면을 가지는 표면성질을 나타내는 것으로 나타났다.

치수줄기세포에 전기자극을 가했을 때, 최적 전류 자극 세기는 38 μA 임으로 나타났고, 38 μA 에서 자극을 받은 세포를 배양한 배양플레이트에서 수거한 용액을 다시 치수줄기세포에 적용했을 때 가장 세포증식이 늘어나는 것으로 나타났다. 전기자극을 받은 세포 내부의 단백질 패턴변화를 알아본 결과 전기자극을 받지 않은 군과 받은 군의 패턴이 달라져 있음이 나타났고, 혈청이 없는 배지에서 배양한 실험군에서 전기자극 때문에 기준그룹과 비슷한 오스테오칼신(OCN) 발현을 보였다.

결론적으로, 치수줄기세포 배양시 미세전류의 전기자극을 한 경우에 약 120%의 세포 증식률이 발생하였다. 이때 세포로부터 발생하는 물질을 농축해 다른 줄기세포에 넣은 결과 이 경우에도 세포가 증식하였다. 이에 이 분비된 농축물을 western blotting 한 결과 성장인자와 같은 하나의 단백질을 알 수 있었다. 또한 이 전류 자극이 세포가 오스테오칼신의 분화마커를 발현시킴으로써 줄기세포의 분화 촉진을 가져왔다. 마이크로의 미세 전류의 전기자극이 세포 증식과 분화 촉진의 좋은 방법임을 알 수 있었다.

제 5 절 동물세포의 배양촉진을 위한 전자기장 생체자극기술 개발

1. 서론

연구의 관심 주제는 전자기장이 세포 증식에 어떠한 영향을 주는지 알아보는데 있다. 대부분의 세포는 특정한 형상과 기능을 하도록 분화한다. 그러나 현재까지 치조골의 재생에 대한 체외 환경에서의 전자기장 자극 치료의 영향에 대한 연구가 이루어지지 않고 있다. 치과적 생체조직 공학의 중요한 과제 중 하나는 치주 조직의 재생을 통해 백악질과 치조골의 새로운 형성을 유도하는 것이다. 치주 질병의 치료에 전기적 자극이 널리 응용되고 있는 것을 볼 때, 자전자기장 자극이 치조골의 골아세포의 활성화에 중요한 요인임을 알 수 있다.

이에 본 연구에서는 전자기장 자극이 치조골 줄기세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

2. 연구사

본 연구의 목적은 생체조직공학의 일환으로 전자기장의 자극을 이용하여 치조골의 비침투적 치료에 있어 최적화되고 특성화된 조건을 구하는데 있다. 따라서 본 논문은 먼저 전자기장 자극이 치조골 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 주는지를 구명하고자 하였다.

현재까지 펄스타입의 저주파 전자기장이 세포 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 mT 범위의 자속 밀도하의 세포 증식에 대한 많은 연구가 이루어졌다. Khalil 와 Qassem(1991)[1]은 림프구 세포를 1 mT, 50 Hz의 전자기장에 노출시켰을 때 세포 증식의 감소를 보고 하였으며 SV40-3T3 세포를 60분 동안 2 mT, 50 Hz의 자기장에 노출 시킨 후 6시간 뒤 관찰한 결과 세포 수의 약 1%가 감소한 연구결과도 있다(Schimmelpfeng and Dertinger, 1993)[2]. 또 다른 연구에서는 펄스타입의 전자기장 자극이 세포 증식에 거의 효과가 없다고 발표하였다(Parola et al.,1993)[3].

이러한 상반되는 결과는 몇 가지 물리, 생물학적인 이유에 의해 설명된다. 첫째는 적용된 전자기장의 파형, 주파수, 진폭, 노출 방법, 배양세포에 가해지는 전자기장의 방향 등이 다르기 때문이고, 둘째로는 연구에 사용된 세포의 종류와 생리적 환경이 다르기 때문이다. 이러한 생리학적 요인은 전자기장에 대한 세포의 반응에 큰 영향을 주는 것으로 보고되었다(Walleczek and Budinger, 1992; Schimmelpfeng et al., 1995) [4,5].

1979년, 미국 식품의약청은 펄스타입의 저주파 전자기장을 뼈 골절에 대한 치료 목적으로 사용하는 것을 허가 하였으며 펄스타입의 저주파 전자기장의 이용은 70~80%의 치료 성공율을 가진다는 연구결과가 있었다(Basset et al. 1982)[5]. 실제 사용되는 골 치료 시스템은 4.3 kHz의 주파수의 펄스에서 1.25 mT의 자속밀도의 크기에서 사용되고 있다. 또한 전세계적으로 치료용으로 많이 사용 되고 있는 Pulsed Signal Therapy(PST)는 앞서 말한 골 치료용 장비와는

조금 다른 특성을 가지고 있는데 1-30 Hz의 주파수 대에서 1.25 mT의 자속밀도를 사용하고 있다. PST에 의한 자극은 연골조직의 세포 재생 과정을 촉발하는 신호로 작용하는데, PST에 의한 펄스타입의 전자기장 자극이 연골세포가 연골 구성 물질을 생산하는 것을 촉진시켜 손상된 조직의 복구에 도움을 주는 것이라 생각되고 있다(Faensen and Breul, 2001; Markoll et al., 2004)[6, 7].

세포막은 높은 임피던스를 가지고 있기 때문에 전기장은 세포 막 물질들을 분극시키며, 수용기나 채널 등을 전기이동에 의해 이동시키고 위치를 변화시킨다(Finkelstein et al., 2003)[8]. 지난 연구에 따르면 직류에 의한 전기장이 내피세포의 세포질에 위치하는 액틴 섬유의 분포에 영향을 준다고 보고되었다(Li and Kolega, 2002)[9]. 그러나 위 실험에서 전기장의 세기는 1 - 10 V/cm 이었고, 평균 세포막의 두께는 10 nm 이었으며 이에 따른 전기장에 의한 세포막 사이의 전압강하는 10 - 100 pV 에 불과했다. 세포막 중 한 개의 이온 채널이 열리면서 유도되는 전압 변화가 0.3 μ V이고 배경 노이즈가 보통 100 μ V인 것을 감안 하면 이 변화는 중요하지 않은 정도의 값을 가짐을 알 수 있다(Katz and Miledi, 1972)[10].

다른 치료적 장비의 경우와 같이 인위적으로 유도된 펄스타입의 전기장은 세포막 분극을 감극시키기에는 약한 것으로 밝혀졌다(Aaron et al., 2004)[11]. 실험의 결과를 보면 전자기장의 자극이 연골세포의 형태를 변화시킨다는 사실의 결정적 증거가 되기에는 결과가 미미함을 알 수 있다. 세포에 대한 약한 펄스타입의 저주파 자기장 자극에 대한 연구는 많은 연구자에 의해 수행되었는데 그 중 전기화학적 정보전달 이론에 따르면, 약한 펄스타입의 전자기장과 지속적인 자기장은 세포에 영향을 주어 세포질 내에 자유 이온들이 효소와 수용기에 달라붙는 속도를 증가시킨다고 밝혀졌다(Koch et al. 2003; Ohata et al., 2004; Rogachefsky et al. 2004)[12,13,14]. 이온들 중 칼슘은 세포 형상을 결정하는데 중요한 역할을 하며, 또한 연골세포의 세포질 안의 액틴 그물망 섬유의 변화의 중요한 인자이다.

최근 밝혀진 메커니즘에 따르면 왜 지속적인 전자기장의 자극보다 변화 있는 전자기장의 자극이 더 효과적인지, 또한 왜 전자기장 자극이 제거되었을 때 세포에 대한 효과가 가장 크게 나타나는지를 알 수 있다. 이러한 현상은 몇몇의 실험에서 관찰되었는데(E.M. Goodman et al., 1995; D.N. Russell and S.J. Webb 1981; R. Goodman et al 1992; M.R. Cook et al 1992)[16-19] 그러나 지금까지도 정확한 이론적인 설명은 없다.

세포막 양쪽에는 많은 수의 자유 이온(주로 K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , 등)이 분포 되어 있어, 세포의 체적을 조절하고, 신호 전달 과정에 중요한 역할을 하며, 세포막 양쪽 사이의 전압차이를 만들어낸다(B. Alberts et al., 1994)[21]. 세포막간 이온의 흐름은 막 양쪽의 농도구배와 전압구배에 의한 힘에 의해 생성된다. 평형 상태에서는 막 양쪽의 전체 이온 흐름은 0 이며, 세포막간 전압차 $\Delta\psi$ 는 약 100 mV이고, 막 안쪽이 바깥쪽에 비해 항상 음의 값을 가지고 있다. 이러한 전압 구배는 양이온 전기감과성 채널 단백질에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다(P.F. Baker et al., 1962)[22]. 몇 개의 특정 이온에 의한 평형 상태에서 원형질 막 사이의 전압 차이는 Nernst방정식에 의해 구할 수 있다(D.J. Panagopoulos et al., 2000; B. Alberts et al.

1994)[20,21]. 그러나 막 사이의 정확한 전체 전압 차이는 세포질에 존재하는 모든 종류의 이온의 분포를 알아야 구할 수 있다. 펄스타입의 진동하는 외부의 전기장 혹은 자기장에 의해 세포막 양쪽의 모든 자유 전자들은 진동하는 힘을 받으며 채널 단백질 내에 통과하는 자유전자들도 힘을 받게 된다. 위와 같은 외부 진동은 모든 이온들이 무작위적인 열적 운동에 더불어 강제진동을 하도록 일으킨다(F.S. Barnes, 1996)[23].

3. 재료 및 방법

3.1 전자기장 자극 시스템

전자기장 발생 장치에 의해 배양되는 모든 세포들은 균일한 전자기장에 노출되었다. 이 장치는 0-5V 파형 발생기와 코일로 구성되어 있다. 이 연구에서 장치에 의해 발생하는 전자기장의 평균 자속 밀도는 각각 0.5, 2.0, 3.0, 4.0(± 0.3) mT(rms) 이며, peak값으로 5, 20, 30, 40 ± 3 G 이다. 평균 자속 밀도는 치조골줄기세포의 배양 접시 중심 상단부에 가우스 미터를 놓아 관측하였다. 전자기장 자극을 주는 실험군은 지속적인 자극, 하루에 10분 동안의 자극, 하루에 30분 동안의 자극으로 나누어 펄스타입의 전자기장 자극에 노출되게 하였다. 대조군의 배양접시는 실험군을 배양하는 같은 CO₂인큐베이터 안에 위치시켰고, 대조군에 미치는 자기장의 평균 자속밀도는 자연적인 지구의 자기장 세기인 0.05 mT가 넘지 않도록 조절하였다. 자속밀도는 PASCO의 DataStudio software(CI-7599, PASCO Ltd, CA, USA)를 사용하여 측정하고 데이터를 수집, 분석하였다.

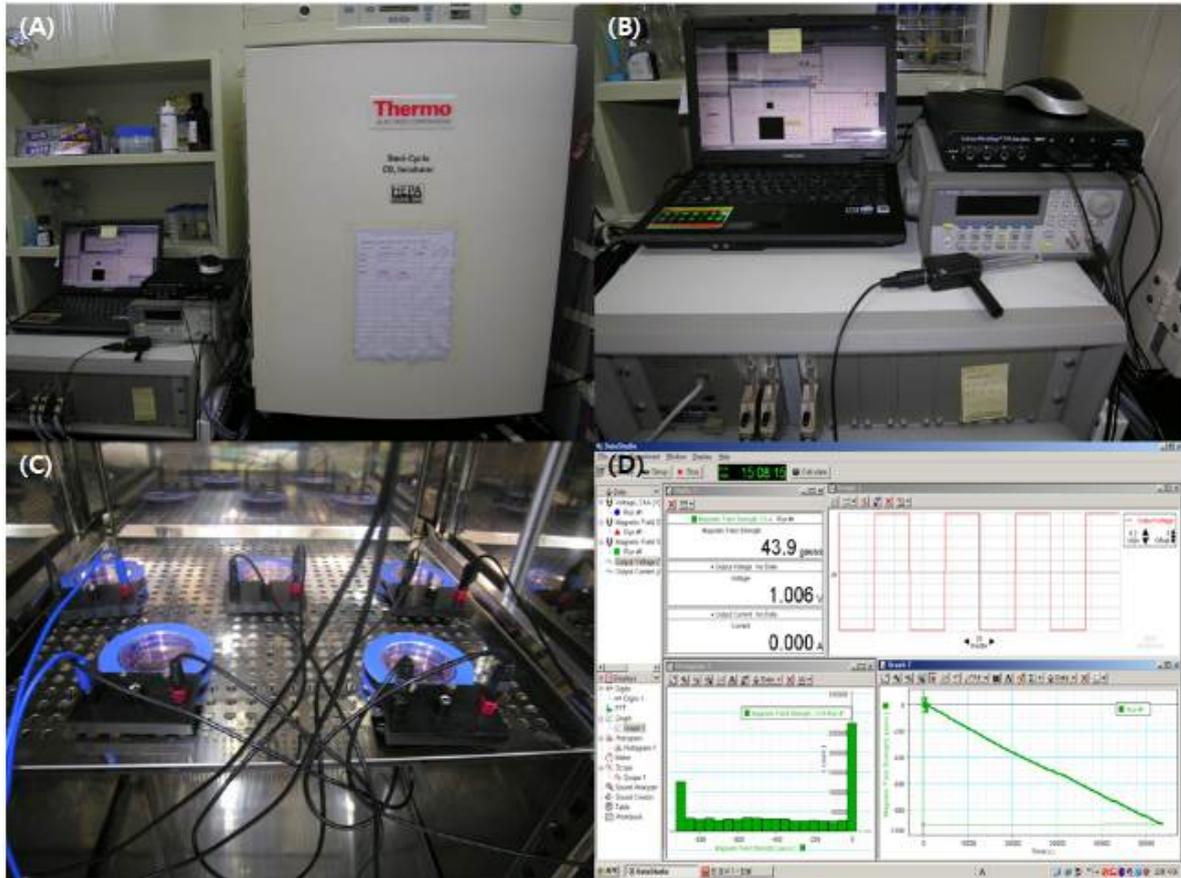


Fig. 5-1. The pulsed electromagnetic field apparatus developed for this study; image of electromagnetic field apparatus system and CO₂ incubator (A), the magnetic field sensor connected in conjunction with a channel of the Science Workshop 750 USB interface (B), image of electromagnetic field apparatus inside CO₂ incubator chamber (C), monitoring system of electromagnetic field stimulation (D).

3.2 치조골 세포 배양

치조골 세포는 서울대 치과대학 바이오인터페이스공학 연구실에 의해 수집된 것을 사용하였다. 세포는 MEM 배지에 10% SERUM(FBS, Welgene Inc., Korea)과 10 nM의 아스코르브산(L-ascorbic acid), 항생제와 중탄산나트륨을 넣은 배양배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂농도 갖는 인큐베이터(Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific. USA)에서 배양되었다.

3.3 전자기장 자극 처리

펄스타입의 전자기장은 20 Hz의 주파수를 가지고 0.5, 2.0, 3.0, 그리고 4.0 ± 0.3 mT (rms) 자속밀도를 갖게 설정하였다. 전자기장에 대한 노출은 전자기장이 배양 세포에 수평 방향(Fig. 5-2(right))으로 작용하게끔 설정하였으며 배양접시가 코어 중심에 위치하도록 배치하였다. 직경 60 mm의 배양접시(Nunc, Denmark)가 사용되었으며, 5개의 접시가 배양되었는데 그 중 4개의 배양 접시에서는 치조골 세포가 전자기장에 노출되는 실험군으로 설정되었고, 각각 0.5, 2.0, 3.0, 4.0 ± 0.3 mT의 자속밀도에 대한 자극을 3일 동안 주었다.

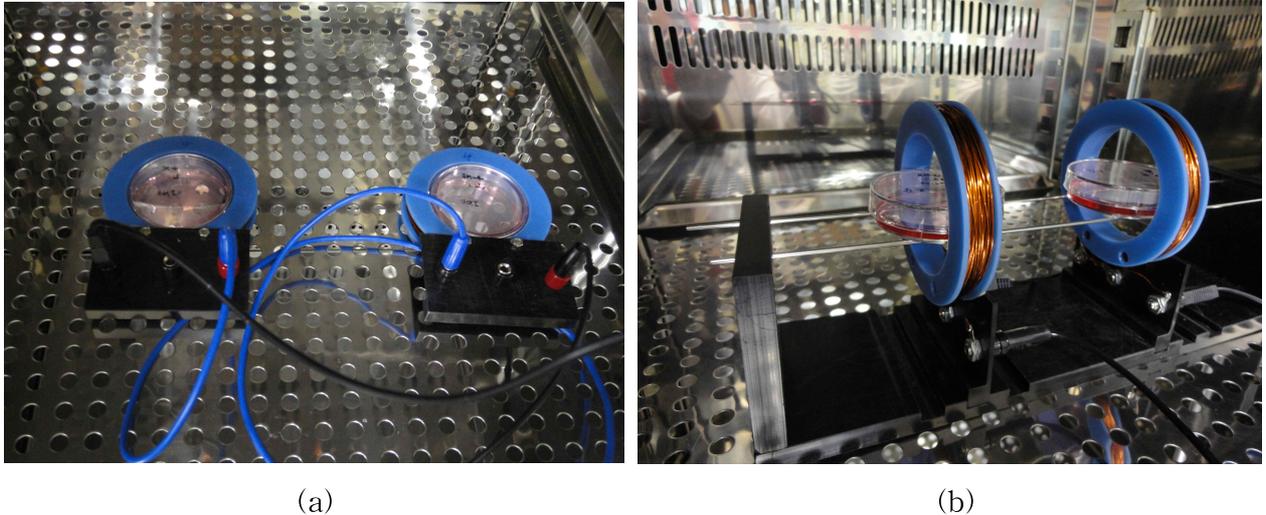


Fig. 5-2. The pulsed electromagnetic field apparatuses in horizontal position(left) and vertical position(right). Incubator system contains pulsed electromagnetic fields coils, and the coils are positioned horizontally(a) and vertically(b).

3.4 세포 생존도(Cell Viability) 평가

치조골 세포의 생존도는 WST-1 분석법(EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD)을 이용하여 분석하였다. 최근 배양 배지에 tetrazolium salts을 넣어 살아있는 세포를 분석하는 염색적 방법이 많이 사용되고 있는데 원리는 tetrazolium salt WST-1가 세포 내 미토콘드리아의 환원효소에 의해 수용성의 포르마잔을 형성하는 성질을 이용하는 것으로, 포르마잔의 양은 살아있는 세포수와 직접적인 관계가 있다. 수용성 포르마잔의 양은 다중 분광광도계(Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 460 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

3.5 전기장 자극의 세포 미네랄화(석회화) 확인

치조골줄기세포를 2.0×10^4 cells/cm²의 밀도로 60 mm culture dish에 놓고서 25일간 배양하였다. 사용한 배지는 50 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid를 포함한 α -MEM 이었다. 이때 대조군은 전기장 자극을 주지 않았고, 처리군은 전기장 강도별로 자극을 주었다. 유도 배양배지는 매일 2,3일마다 교체해 주었다. 처리군의 치조골줄기세포는 하루에 10 min씩 7일간 전기장에 노출되었다. 세포 상태와 미네랄화는 위상차 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 주기적으로 확인하였다. 칼슘 침착의 미네랄화는 alizarin red 염색으로 확인되었다(Williams et al. (1980)[27]. 에탄올로 고정된 세포와 matrix는 40 mM alizarin red-S (pH 4.2)로 1 시간 동안 염색한 후 증류수로 씻어 냈다. 그 염색된 부분을 사진 찍은 후에, 10% (wt/vol) cetylpyridinium chloride를 이용하여 녹여서 분리한 다음에 ELISA reader(Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 544 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비타민 C, β -glycerophosphate, alizarin red-S, cetylpyridinium chloride 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3.6 Alkaline Phosphatase(ALP) 활성도 측정

치조골줄기세포를 전자기장 자극을 준 경우와 주지 않은 경우로 나누어서 4주 동안 50 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid가 포함된 α -MEM 배지로 배양하였다. 그리고 그 유도 배지는 매 3일마다 교체하였다. 처리군의 세포에 하루에 10분씩 첫 1주 동안에는 전자기장 자극을 주었으며 나머지 3주는 자극을 주지 않았다. 세포층의 ALP의 정도는 Sensolyte™ ALP Assay kit (AnaApec, USA)를 사용해 스펙트로포토미터를 이용해 광학적으로 정량화하였다. 그리고 효소 활성도를 보기 위해, 4°C에서 10분 동안 2500g로 원심분리한 후 ELISA reader(Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 405 nm에서 yellow p-nitrophenol product를 측정해 그 효소활성도를 계산하였다.

3.7 통계적 처리

통계적 분석은 SASv8.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였으며 실험군과 대조군 사이의 통계적 유의 수준 $p < 0.05$ 에서 이원분산분석과 Duncan's multiple range tests로 분석되었다. 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

4.1 전자기장 자극(지속적 노출)의 영향

Fig. 5-3은 단층 배양된 치조골 세포의 전자기장 노출 시간에 따른 생존도를 나타낸다. 3일 동안의 지속적인 자극 후엔 치조골 세포는 약 10% 감소하였으며, 감소는 20 Hz 주파수에서 2.0과 3.0 mT의 자속밀도의 자극을 받았을 때 두드러졌다($p < 0.05$). 따라서 3일 동안의 지속적인 자극은 강한 전자기장의 세기 때문에 좋지 않은 결과를 가져오는 것을 알 수 있다.

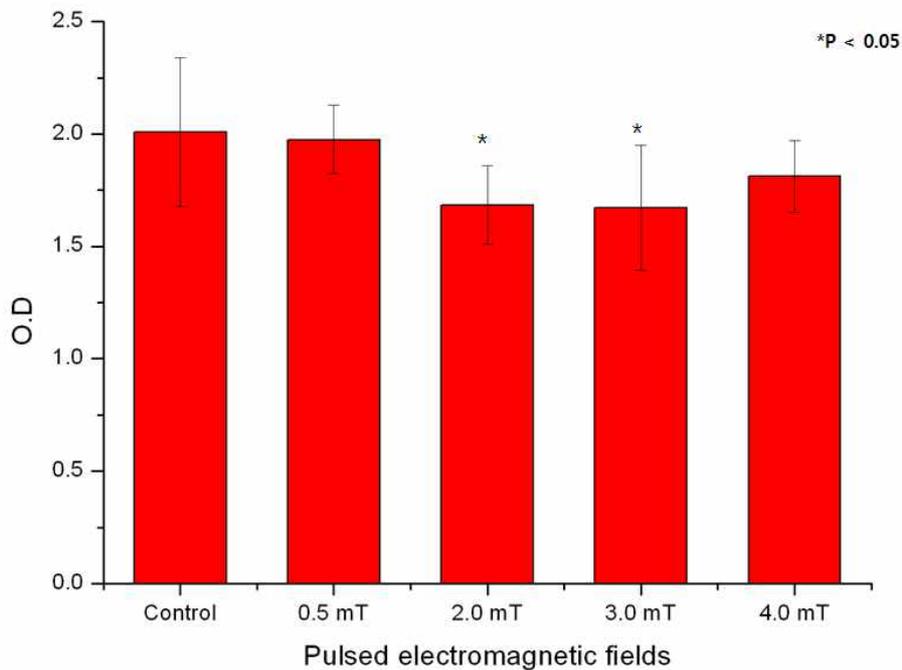


Fig 5-3. The effect of pulsed electromagnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture according to intensity at the stimulation of continuous exposure/day x 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.2 전자기장 자극(30분/일, 3일)의 세포생존도 영향

Fig. 5-4는 30분/일의 자극을 받은 단층 배양된 치조골 세포의 생존도를 나타낸다. 자극 후, 세포의 생존도는 대조군과 비교하여 약 5-10% 감소하였다($p < 0.05$). 이와 같은 결과로 하루 30분의 전자기장 자극은 세포 성장에 역 효과라는 것을 알 수 있었다. 특히 치조골 세포의 감소는 2.0, 3.0 그리고 4.0 mT의 자속밀도 세기에서 두드러짐을 알 수 있는데 이를 통해 전자기장의 자극은 약할수록 세포에 긍정적인 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

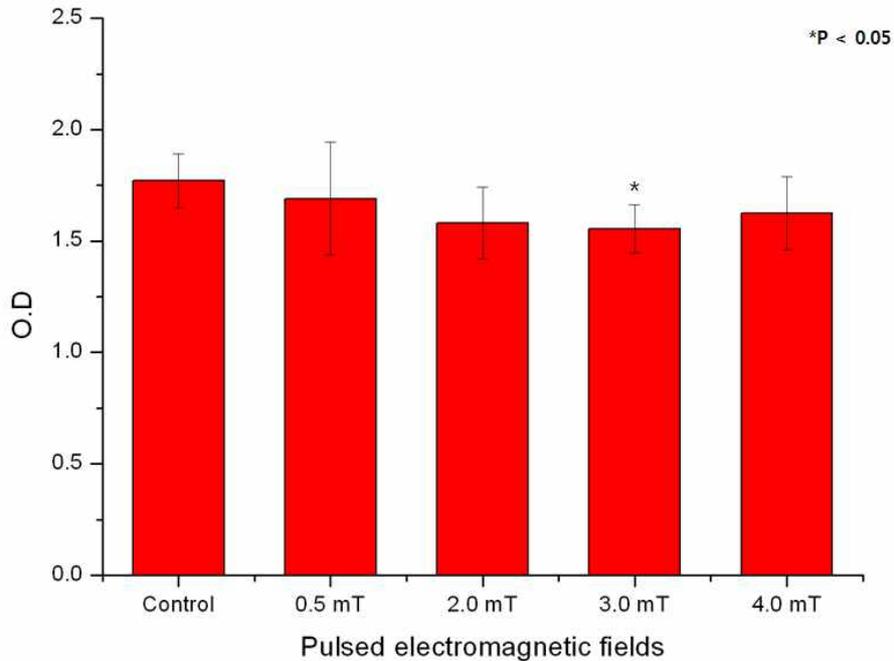


Fig. 5-4. The effect of pulsed electromagnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture at a stimulation of 30 min/day x 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.3 전자기장 자극(10분/일, 3일)의 세포생존도 영향

Fig. 5-5는 10분/하루의 전자기장 자극을 단층배양된 치조골 세포에게 가한 후 나타나는 치조골 세포의 생존도를 나타낸 것이다. 결과를 보면 세포의 생존도는 대조군과 비교하여 별다른 차이가 없는 것을 알 수 있다($p > 0.05$). 또한 세포의 어떠한 세포의 형상적 변화도 관찰되지 않았다. 전자기장 같은 외부 자극은 세포막 전체에 걸쳐 일어나는 신호 전달 과정에 영향을 주기 때문에 세포의 증식과 분화에 영향을 끼친다. 신호 전달에는 2가지 방법이 있는데 하나는 트랜스멤브레인 채널을 활성화 시키는 것이고, 다른 하나는 트랜스멤브레인 채널의 수용기를 변화시키는 것이다. Aaron et al.[11]에 따르면 전자기장에 대한 세포의 반응은 칼슘/칼모둘린 경로에 의해 일어난다고 한다. 그러나 위 결과와 일치하지 않는, 자극에 대한 세포의 반응이 트랜스멤브레인 채널의 활성화에 의한 것으로 간주되는 연구결과가 계속 발표되고 있다. 바꿔 말하면 전자기장의 효율은 아마도 트랜스멤브레인 커플링 과정 중 증폭 메커니즘에 의해 달렸다는 것이다. 또한 펄스타입의 전자기장 자극이 세포의 이온 채널, 리간드 형성, 수용기의 밀도와 분배정도를 변화시킨다는 것이 보고되었다(Bersani et al., 1997; Chiabrera et al., 2000; Massot et al., 2000;)[24, 25, 26]. 아마 각각의 메커니즘은 트랜스멤브레인의 신호전달에 영향을 줄 것이다. 앞서 언급하였듯이 자극을 준 치조골 세포의 변화는 대조군과 별다른 차이를 나타나지 않았다. 이와 같은 관찰은 세포배양기간 중 치조골 세포에 대한 펄스타입의 전자기장

자극이 실험과는 다른 세기와 강도를 가져야 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다는 것을 의미한다.

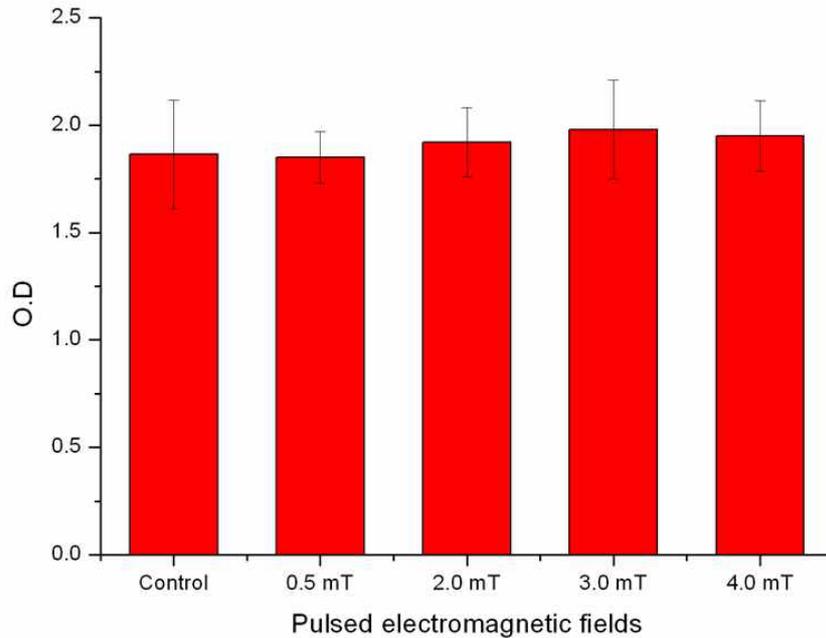


Fig. 5-5. The effect of pulsed electromagnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture at a stimulation of 10 min/day x 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.4 전자기장 자극(10분씩 1일 2회 자극, 3일)의 세포생존도 영향

Fig. 5-6은 전기 코일을 용기에 대해 수평으로 놓고서, 2-3 일 동안 하루 10분씩 2회 전자기장 자극을 주었을 때 치조골 줄기세포의 세포생존도를 나타낸 것으로, 처리군의 세포생존도는 대조군과 비교하였을 때 통계적인 유의성이 없는 것으로 나타났다.

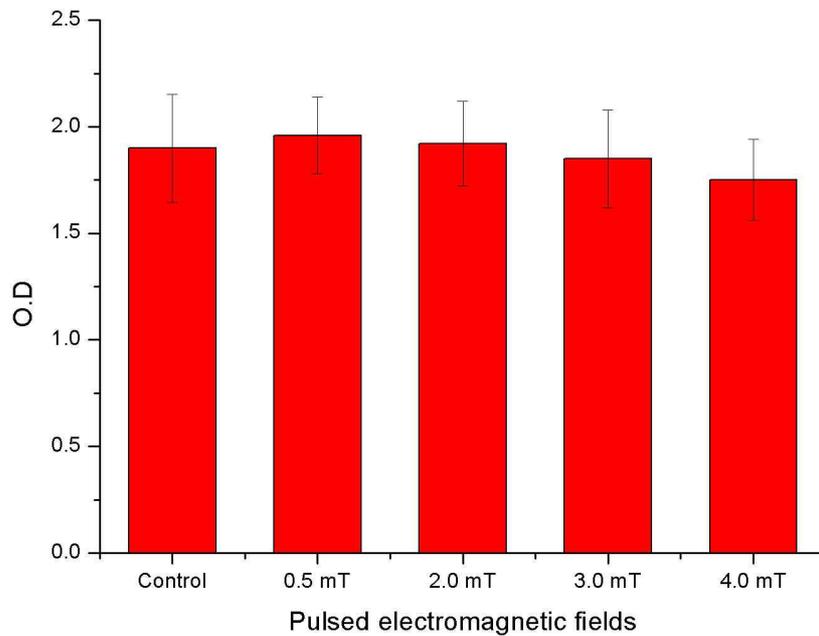


Fig. 5-6. The effect of pulsed electromagnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture at the stimulation of 2 timesx10min/day x 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.5 전자기장 자극(10분/일)의 영향(코일을 수직위치로 놓고 자극시)

Fig. 5-7은 10분/하루의 전자기장 자극을 단층배양된 치조골 세포에게 수직방향으로 자극을 가한 후의 치조골 세포 생존도를 나타낸 것이다. 수평방향과 달리, 수직방향의 전자기장 실험 결과에서는 2.0-3.0 mT, 20Hz 의 실험조건에서 전자기장이 120%, 125%의 증식효과로 유의성 있는 실험결과를 보였다($p>0.05$). JP Elliott (1988) 등 연구에 의하면, 펄스타입의 전자기장 자극이 세포의 이온 채널, 리간드 형성, 수용기의 밀도와 분배정도를 변화시킨다는 것뿐 아니라 전자기장의 코일 방향에 따른 노출 방법에 따라 세포의 접착성질 단백질에 중요한 관계가 있음을 보고하였다.

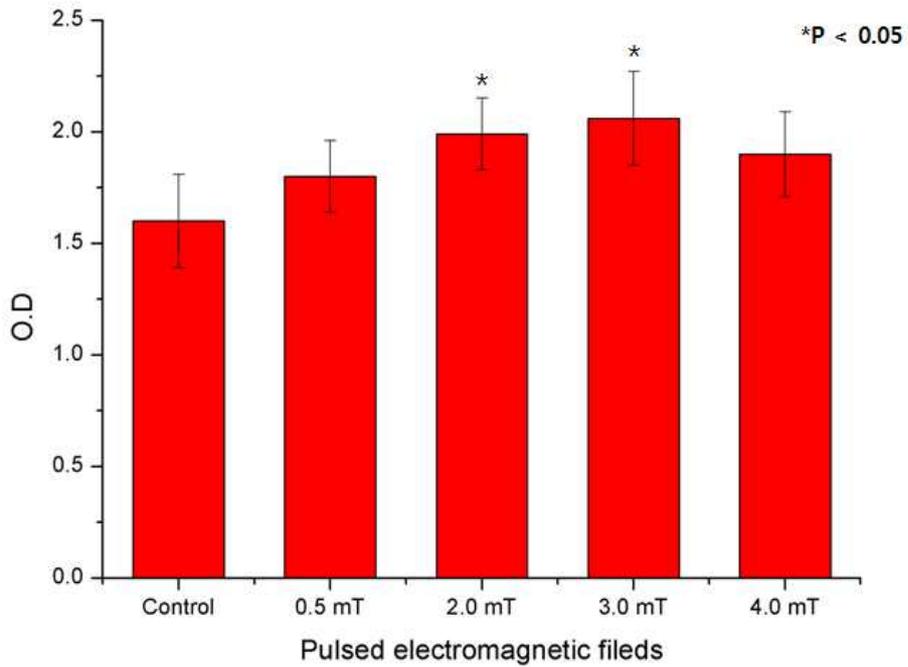


Fig. 5-7. The vertical orientation effect of pulsed electromagnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture at a stimulation of 10 min/day x 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned vertically.

4.6 전자기장 영향에 따른 세포의 형상 변화

Fig. 5-8은 전기 코일을 배양용기에 대해 수평으로 설치했을 때, 각 전자기장 강도에 따른 치조골 세포의 형상 변화를 나타낸 그림이다. 그림에서 보는 바와 같이, 3일 동안 세포를 배양한 결과, 대조군에 비해 세포의 성장성 변화가 유사함을 확인하였다. 그러나 이 실험은 전자기장을 형성하는 코일을 수평을 설치해서 전자기장의 효과를 본 것으로서, 전자기장이 세포에 대해 수직방향으로 작용해 세포의 증식 효과가 나타나지 않았다.



Fig. 5-8. The effect of the cell growth morphology of alveolar bone marrow stem cells in mono-layer culture according to the pulsed electromagnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min /day for 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.7 치조골 세포 증식에 따른 *In vitro* migration 연구

Fig. 5-9는 코일을 수평으로 놓고 치조골 세포에 전자기장 자극시 *In vitro* 세포 이동 (migration)의 결과를 나타낸 것이다. 치조골 세포를 약 7일 동안 60 mm 배양용기에 배양 후 접시 중앙에 피펫을 이용하여 스크래치하였다. 대조군을 제외하고, 약 96시간 동안 하루에 10분씩 전자기장을 노출한 결과는 그림5-8과 같으며 Fig. 5-5와 5-6의 세포 형상변화 및 증식에서 효과가 나타나지 않은 것처럼 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났다. 그러나 수직으로 코일을 설치하면 증식효과가 나타날 것으로 사료된다. 이 실험에서 코일을 수직으로 놓고서 실

험을 하지 않은 이유는 이 실험후 나중에 코일을 수직으로 놓고서 자극실험을 했을 때 그 증식효과가 나타남을 발견했기 때문이다.

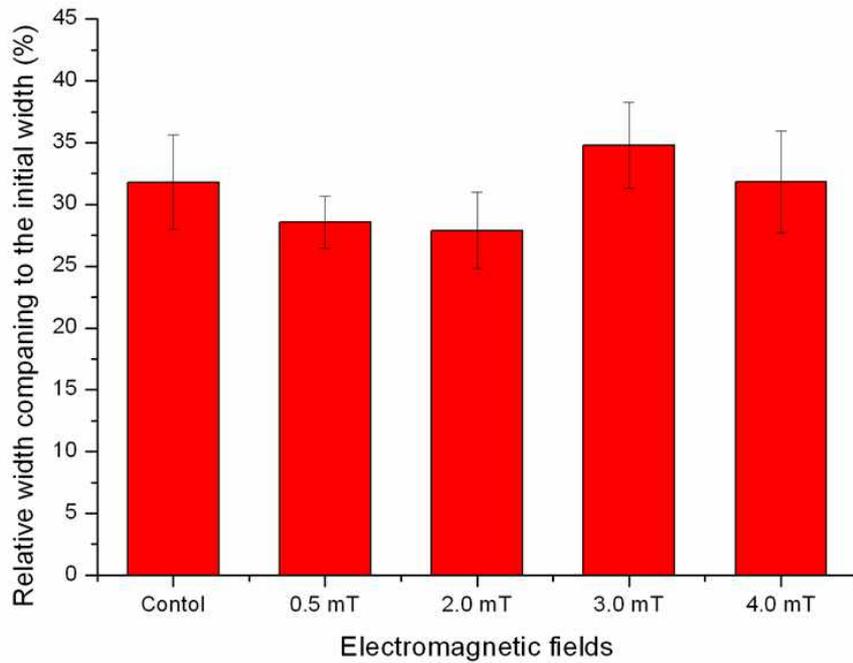


Fig. 5-8. Statistical analysis of in vitro migration as an wound healing test of alveolar bone marrow stem cells under the pulsed electromagnetic field stimulation at the stimulation of 10 min/day for 3 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.8 치조골 세포 분화에 대한 장기적인 전자기장 자극의 효과

이 실험은 장기적인 전자기장 자극이 치조골 세포 분화에 대해 미치는 영향을 알아보기 위해 행해졌다(Fig. 5-9). 미네랄화(mineralized nodules)의 형태는 골화(osteoblastic)의 성숙을 확인하는 마커중의 하나이다. 비타민C(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 β -glycerophosphate (10 mM)가 포함된 배지에서 골세포를 4주간 배양했을 때 mineralized nodules의 형성을 Alizarin red 염색법으로 확인하였다. 치조골 세포는 25일 동안 10분/하루의 비율로 서로 다른 강도 (0.5, 2.0, 3.0, and 4.0 mT with 20 Hz)에 따라 노출되었다. 그 중 2.0 mT with 20 Hz 강도의 전자기장 자극을 주었을 때를 보면, 대조군($p < 0.05$)과 비교하여 골화(bone nodule) 형성이 약 140% 정도 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5-10). 이러한 결과는 적절한 강도의 장기적인 전자기장 자극은 치조골세포의 분화와 성숙을 촉진시킨다는 것을 나타낸다. 그리고 코일을 용기에 대해 수직방향으로 설치한다면 그 분화효과도 증가하리라 예상된다.

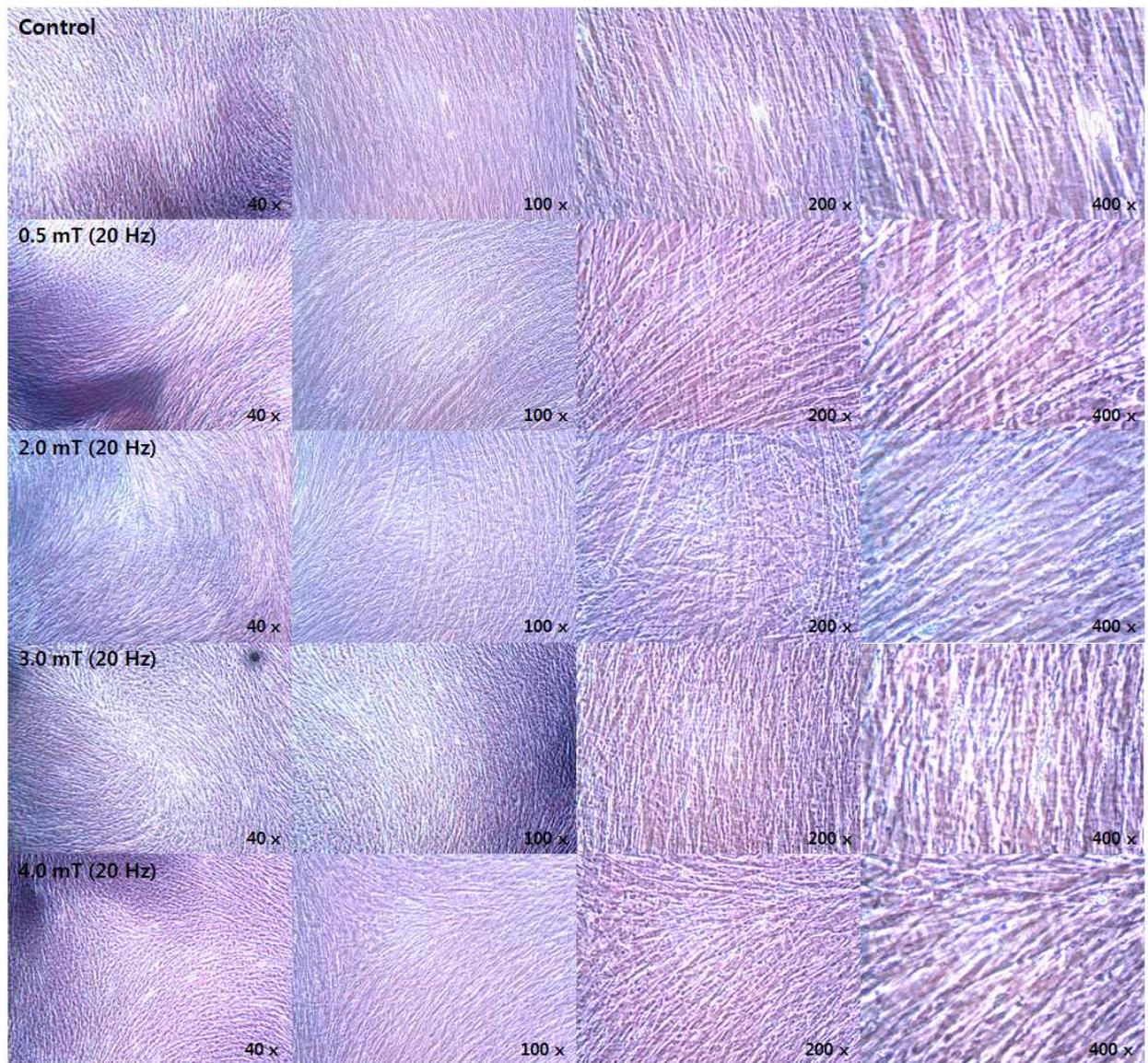


Fig. 5-9. Images of alveolar bone marrow stem cells differentiation on the pulsed electromagnetic field stimulation under the electromagnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min/day for 25 days. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

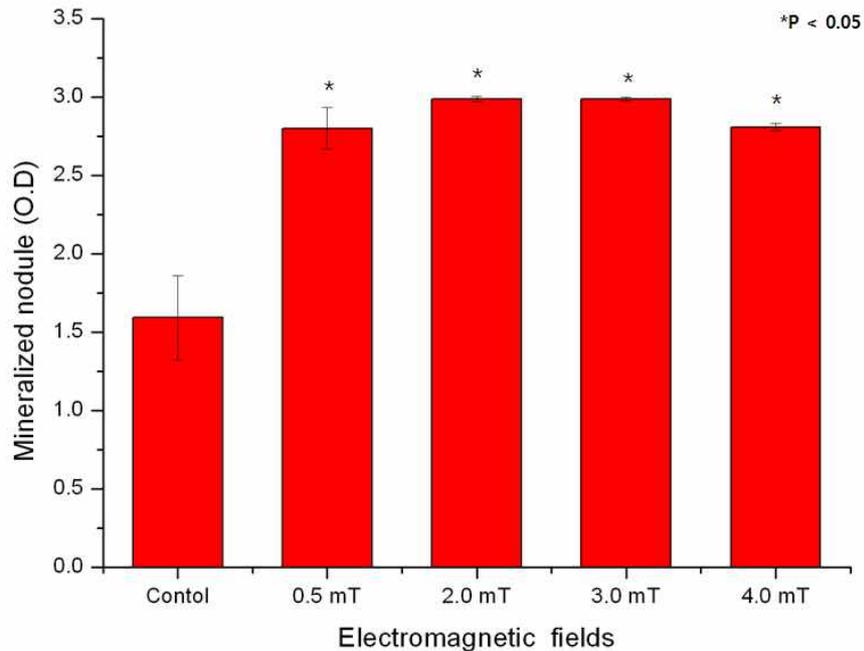


Fig. 5-10. Statistical analysis of the effect of long-term pulsed electromagnetic field stimulation on alveolar bone marrow stem cell differentiation under the electromagnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min/day for 25 days using alizarin red staining. The coils of pulsed electromagnetic fields are positioned horizontally.

4.9 장기적인 전자기장 자극이 치조골세포의 alkaline phosphatase activity에 미치는 효과

이 실험은 장기적인 전자기장 자극이 alkaline phosphatase activity에 대해 미치는 영향을 알아보기 위해 행해졌다. 그 결과 2.0 mT with 20 Hz로 25일간 전자기장 자극을 노출시켰을 때의 alkaline phosphatase activity가 대조군($p < 0.05$)에 비해 약 140% 증가하였다. (Fig. 5-11) 이러한 결과는 적절한 강도의 장기적인 전자기장 자극은 치조골세포의 분화를 촉진시킨다는 것을 나타낸다.

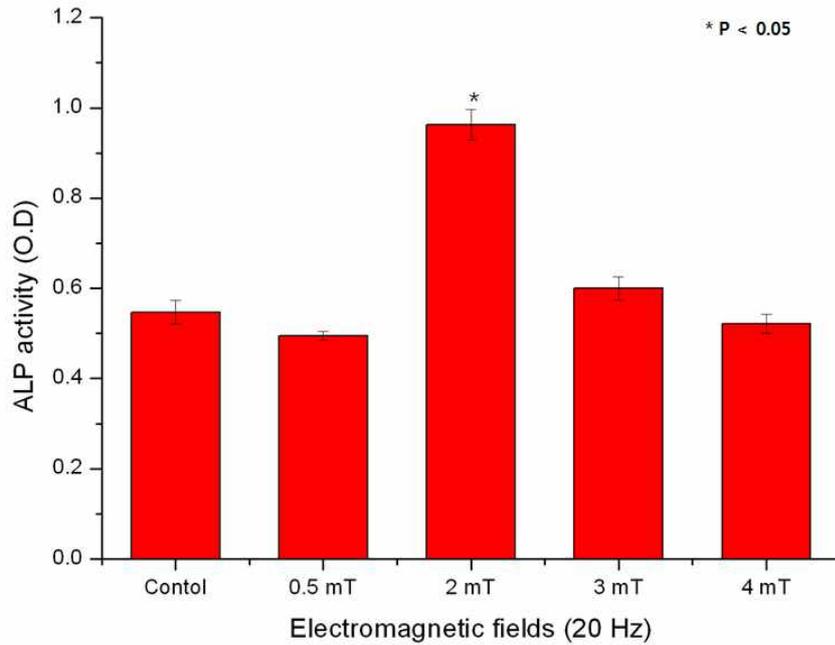


Fig. 5-11. Enhancement of alkaline phosphatase activity by long-term pulsed electromagnetic field stimulation on alveolar bone marrow stem cells under the electromagnetic field stimulation at the stimulation of 10 min/day for 25 days.

5. 요약 및 결론

본 실험은 전자기장 자극이 치조골 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 행해졌다. 치조골 세포에 20Hz 주파수를 갖는 펄스타입의 전자기장 자극(코일을 수평으로 설치시)을 3일 동안 지속적으로, 또는 하루에 30분 비율로 주는 것은 치조골 세포의 생존도를 약 10% 정도 감소시킨다. 이와 같은 감소는 특히 2.0과 3.0 mT의 자속밀도에서 두드러지는 것을 알 수 있었다. 그리고 단층배양된 치조골 세포에 3일 동안 하루 10분 및 하루 10분씩 2회 비율로 전자기장 자극을 주었을 때, 결과는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 또한 하루에 10분 비율의 전자기장 자극에 대한 치조골 세포의 형상 변화도 크게 차이가 나지 않는 것으로 관찰되었다. 그러나, 코일을 배양용기에 대해 수직으로 설치하여 전자기장 자극을 주었을 때에는 2.0 및 3.0 mT에서 각각 약 120%와 125%의 증식 효과를 보였다.

또한, 코일을 수평으로 설치하고서 세포 분화시 전자기장 자극을 주었을 때, 미네랄화(석회화)는 모든 강도에서 그리고 alkaline phosphatase 활성도는 20 Hz, 2 mT에서 각각 약 140% 이상 증가하였다. 적절한 세기의 전자기장 자극은 치조골 세포의 세포성장 및 분화 영향을 주었으며 특히 증식보다는 분화형성을 더 촉진시키는 것으로 나타났다.

제 6 절 동물세포의 배양촉진을 위한 자기장 생체자극기술 개발

1. 서론

본 연구에서는 자기장의 영향이 동물세포의 증식 및 분화에 어떠한 영향을 주는지 연구하는데 있다. 생물체에 자극을 가하면, 특히 콜라겐의 침착과 이온간의 전위변화 증대 및 아미노산의 흡수, 섬유아세포의 마이그레이션, ATP, 단백질과 DNA합성 비 등을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 특히, 자기장 자극시 세포내외 막의 이온채널 활성도가 높아지는 것이 이론적으로도 분석되고 있다. 자기장 노출시 세포내외 이온채널에서 특히 Ca^{2+} 와 mRNA 뿐 아니라, 단백질 합성, 유전자 발현에 영향을 주고 있다. 낮은 강도에서의 자기장 효과는 세포에게 유해함을 주지 않는 것으로 조사되고 있는 실정이다. 이와 같이 이론적으로 동물세포에게 자극을 가하는 것은 세포 내외 기능을 활성도를 높여 단백질 합성 및 유전자발현 등에 증대됨에도 불구하고 특정 세포에게 적절한 자극의 강도 및 주기 등 연구가 이루어져야 하는 어려움으로 관련 분야에 더 많은 연구가 요구되고 있다.

이에 본 연구에서는 치조골의 재생에 대한 체외 환경에서의 정적 상태에서 자기장 자극 치료의 영향에 대한 연구가 이루어지지 않고 있는 바, 자기장 자극이 치조골 줄기세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다.

2. 연구사

생체시스템에 대한 자기장의 영향이 오랫동안 큰 관심사이었다(Hong, 1995; Rosen, 2003) [1,2]. 살아있는 세포와 기관들은 자기장과 같은 다양한 환경적인 자극이나 스트레스에 반응하면서 세포 내외 및 외적인 변화를 하게 된다(Saffer and Phillips, 1996)[3]. 이들 변화는 비가역적 또는 가역적이며, 구조적 또는 기능적인 변화이다. 그리고 세포들과 세포기관들에 다른 변화를 가져다 줄 수도 있다.

생체가 자기장 자극에 노출되었을 때에는 분자생물학적인 세포 변화는 자기장의 노출시간, 조직침투 정도, 열 발생 정도에 의해 좌우되는데 그들은 자기장의 강도 및 주파수와 관련이 있다. 그리고 세포 반응들은 정적 또는 주기적인 자기장 형태, 파 형태(사인, 사각 등), 생물학적인 상태 (Cossarizza et al., 1989; Walleczek and Liburdy, 1990)[4,5] 및 세포의 형태에 의해 좌우된다. 수십년간의 다양한 자기장의 임상적인 적용이 선택된 자기장의 잠재적 효능을 입증해 왔다. 근골격시스템의 문제점들을 잘 해결하면서 근육 및 뼈, 연골 시스템들이 성공적으로 치유해 왔다(Bassett, 1994; Detlavs, 1987; Jerabek, 1994; Markov, 1987; Todorov, 1982)[6,7,8,9,10].

많은 전기적 및 자기적인 치료 방식들이 골절과 상처들을 위해 개발되어 왔다(Markov and Pilla, 1995; Pilla, 1993; Vodovnik and Karba, 1992)[11,12,13]. 특히 상처치료를 촉진하기 위해서 자기장 치료방법이 허혈성 조직의 상태를 개선시키면서 자극 받은 조직부의 혈류 흐름을 유의적으로 증가시켰다. 생체의 연구들에서 자기장 치료법이 상처 치료에 중요한 세포의 증식과 분화에 있어서 유의적인 대안책이라고 제시하고 있다(Bassett, 1989; Dunn et al., 1988; Markov, 1994)[14,15,16].

Rosen(2003)[17]은 증강도의 자기장이 많은 생체시스템에 영향을 미친다고 하였으며, 특히 세포막 채널의 특성들에 연계된 그들의 기능에 영향을 준다고 보고하였다. 그러나 많은 생물학적 초기 보고서에서는 현상적인 서술만이 있었고, 그 현상의 기전에 대해서는 입증하지 못하였고 정확하게 개념도 설명하지 못했다.

50 Hz의 정적 자기장으로 세포를 자극한 바 다양한 결과를 얻었다. 1) Ross(1990)[18] 등은 자기장이 in-vitro에서 포유류의 세포 증식능력에 영향을 미친다고 했으며, 2) Nordenson(1994)과 Miyakoshi(1996)[19,20] 등은 자기장이 돌연변이를 유발하는 다양한 요소에 노출된 세포들의 돌연변이성을 높인다고 하였으며, 3) Liburdy(1993)[21] 등은 자기장이 세포 파괴성의 세포치료후에 종양세포의 생존을 증가를 보고하였으며, 4) Morandi(1996)[22] 등은 자기장이 암에 민감한 쥐 세포주에서 종양율을 높인다고 하였으며, 5) Loberg(2000)[23] 등은 암 관련 유전자 발현에서 유전자대체로 종양 발생에 영향을 준다고 보고하였다.

자기장이 세포기관들의 기능에 미치는 영향에 대해서도 보고되고 있다. 자기장은 지방의 산화를 유도와 활성산소의 생성(Ishisaka et al., 2000)[24], DNA 손상(Fiorani et al., 1992)[25], 세포내 Ca²⁺ 시그널링(Lyle et al., 1997)[26] 등에 영향을 미친다고 보고하였다.

조직배양에서 인간 섬유아세포에 대한 자기장 및 전기장 자극이 콜라겐 점착 증가, 이온 이동 증가, 아미노산 흡수 증가, 섬유아세포 이동, ATP와 단백질 합성 증가, 단백질과 DNA 합성에서의 증가를 가져왔다고 보고하였다(Dini and Abbro, 2005; Luben, 1994; Okano et al., 2005b; Rosch and Markov, 2004; Siskin and Walker, 1995)[27,28,29,30,31].

관심사의 하나는 자기장과 전기장이 세포 증식에 미치는 영향이다. 대부분의 세포는 보통 특정 형태와 기능으로 분화한다. 정적인 자기장 자극은 세포내의 이온 제어, 특히 Ca²⁺, 또한 mRNA 발현에 대한 효과, 단백질 합성, 그리고 유전자 발현에 영향을 줄지도 모른다. 이러한 효과는 약한 자기장에서는 해로운 결과를 초래하지는 않는다. 최근에 정적 자기장이 골 치료율을 증가시켰으며(Darendeliler et al., 1997)[34], 새로운 골 생성을 가져왔고(Darendeliler et al., 1995)[35], 외과적인 치료 및 임플란트에 의해 뼈 미네랄 밀도 감소를 막아 준다고(Yan et al., 1998)[36] 보고된 바 있다.

Bolander(1992)[32] 등은 뼈 골절 치료 및 골화의 혼란은 다양한 세포의 공간적 구성, 많은 유전자, 세포외 기질 등을 포함하는 복잡한 과정으로 구성된다고 하였다. 골 골절 치료과정은 세포 증식과 분화, 주화성, 그리고 세포외 기질의 합성을 포함한다고 하였다.

지금까지 치조골 재생을 위해 치조골 세포에 정적 자기장의 효과는 구명된 바 없다.

치아조직공학에서는 백악질과 치조골 등의 치주조직 재생이 중요하다. 치주조직의 치료를 위해 자기장의 자극이 치조골의 골아세포들의 활성화에 미치는 영향을 구명할 필요가 있다.

이에 본 연구에서는 치조골 줄기세포(alveolar bone marrow stem cells)의 증식과 분화에 정적 자기장의 자극 효과를 구명하고자 한다.

3. 재료 및 방법

3.1 자기장 자극 처리 장치

Neodymium-iron-boron 자석 판들 (50 x 50 mm by 5 mm thick; NEOMAX, Sumitomo Co., Osaka, Japan)과 60 mm 배양 용기(culture dishes, Nunc, Denmark)가 사용되었다. 자기장 측정을 위해 Gauss 미터(CI-6520A, PASCO Ltd, CA, USA)가 사용되었으며, 이 센서를 ScienceWorkshop 750 USB interface (CI-7599, PASCO Ltd, CA, USA)에 연결해 자기장을 측정하였다. 배양 용기위 아래에 자석판을 부치고, 배양용기속의 자속밀도를 Gauss 미터로 측정하였다. 본 연구에서는 세포의 증식과 분화를 조사하고자 50, 100, 130, 160, 200, 260 mT 의 자기장 세기에 노출시킨 후에 조사하였다. 특히 자기장의 적정 강도와 적정 노출 시간을 고려하여 지속적인 노출/일, 30분/일, 10분/일, 10분 강도 2번/일 조건으로 가하여 실험하였다. 대조군 실험에서는 neodymium-iron-boron 자기장 디스크를 이용하지 않은 상태에서 세포를 배양하였다.

3.2 치조골 세포 배양

치조골 세포는 서울대 치과대학 바이오인터페이스공학 연구실에 의해 수집된 것을 사용하였다. 세포는 MEM 배지에 10% SERUM(FBS, Welgene Inc., Korea)과 10 nM의 아스코르브산(L-ascorbic acid), 항생제와 중탄산나트륨을 넣은 배양배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂농도 갖는 인큐베이터(Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific. USA)에서 배양되었다. 배양배지는 2-3일 간격으로 갈아주었으며, 치조골줄기세포 배양시 passage 5-6을 이용하였다.

3.3 자기장 자극 처리

치조골 줄기세포의 자기장 처리는 6개의 그룹(50, 100, 130, 160, 200, 260 mT) 조건으로 실험을 수행하였고 대조군 처리는 자극을 주지 않은 것으로 하였다. 자기장 자극은 약 3일 동안 가하였고 60 mm 배양접시에서 이루어졌다. 본 연구에서는 세포의 증식과 분화를 조사하고자 50, 100, 130, 160, 200, 260 mT 의 자기장 세기에 노출시킨 후에 조사하였다.

3.4 세포 생존도(Cell Viability) 평가

치조골 세포의 생존도는 WST-1 분석법(EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD)을 이용하여 분석하였다. 최근 배양 배지에 tetrazolium salts을 넣어 살아있

는 세포의 분석하는 비색적 방법이 많이 사용되고 있는데 원리는 tetrazolium salt WST-1가 세포 내 미토콘드리아의 환원효소에 의해 불용성의 포르마잔을 형성하는 성질을 이용하는 것으로, 포르마잔의 양은 살아있는 세포의 수와 직접적인 관계가 있다. 불용성 포르마잔의 양은 다중 분광 광도계(Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 460 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

3.5 미네랄화 확인

치조골줄기세포를 2.0×10^4 cells/cm² 의 밀도로 60 mm culture dish에 놓고서 25일간 배양하였다. 사용한 배지는 50 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid를 포함한 α -MEM이었다. 이때 대조군은 자기장 자극을 주지 않았고, 처리군은 자기장 강도별로 자극을 주었다. 유도 배양배지는 매일 2,3일마다 교체해 주었다. 처리군의 치조골줄기세포는 하루에 10 min씩 7일간 전기장에 노출되었다. 세포 상태와 미네랄화는 위상차 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 주기적으로 확인하였다. 칼슘 침착의 미네랄화는 alizarin red 염색으로 확인되었다(Williams et al. (1980)[27]. 에탄올로 고정된 세포와 matrix는 40 mM alizarin red-S (pH 4.2)로 1 시간 동안 염색한 후 증류수로 씻어 냈다. 그 염색된 부분을 사진 찍은 후에, 10% (wt/vol) cetylpyridinium chloride를 이용하여 녹여서 분리한 다음에 ELISA reader(Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 544 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비타민 C, β -glycerophosphate, alizarin red-S, cetylpyridinium chloride 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3.6 Alkaline Phosphatase(ALP) Activity 측정

치조골줄기세포를 자기장 자극을 준 경우와 주지 않은 경우로 나누어서 4주 동안 50 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid가 포함된 α -MEM 배지로 배양하였다. 그리고 그 유도 배지는 매 3일마다 교체하였다. 처리군의 세포에 하루에 10분씩 첫 1주 동안에는 전자기장 자극을 주었으며 나머지 3주는 자극을 주지 않았다. 세포층의 ALP의 정도는 Sensolyte™ ALP Assay kit (AnaApec, USA)를 사용해 스펙트로포토미터를 이용해 광학적으로 정량화하였다. 그리고 효소 활성도를 보기 위해, 4°C에서 10분 동안 2500g로 원심분리한 후 ELISA reader(Victor 3, Perkin Elmer, USA)로 405 nm에서 yellow p-nitrophenol product를 측정해 그 효소활성도를 계산하였다.

3.7 통계적 처리

통계적 분석은 SASv8.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였으며 실험군과 대조군 사이의 통계적 유의 수준 $p < 0.05$ 에서 이원분산분석과 Duncan's multiple range tests로 분석되었다. 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

4.1 연속적인 정적 자기장 자극시 강도에 따른 치조골 세포생존율 비교

Fig. 6-1은 치조골 줄기세포 2차원 배양에서 정적 자기장의 자극 강도에 따른 세포 생존율을 나타낸 것이다. 3일 동안의 연속적인 자기장 자극은 치조골 세포의 생존율을 약 15% 감소시켰으나 표준편차가 커 유의성은 없었고, 260 mT의 높은 강도에서는 대조군에 비해 유의적으로 세포생존율 감소시켰다($p < 0.05$). 이에 낮은 강도의 자기장이 더 효과적이라고 생각되었으며, 3일간의 연속적인 자기장 자극은 치조골 줄기세포의 증식에는 효과적이지 못함을 알 수 있었다.

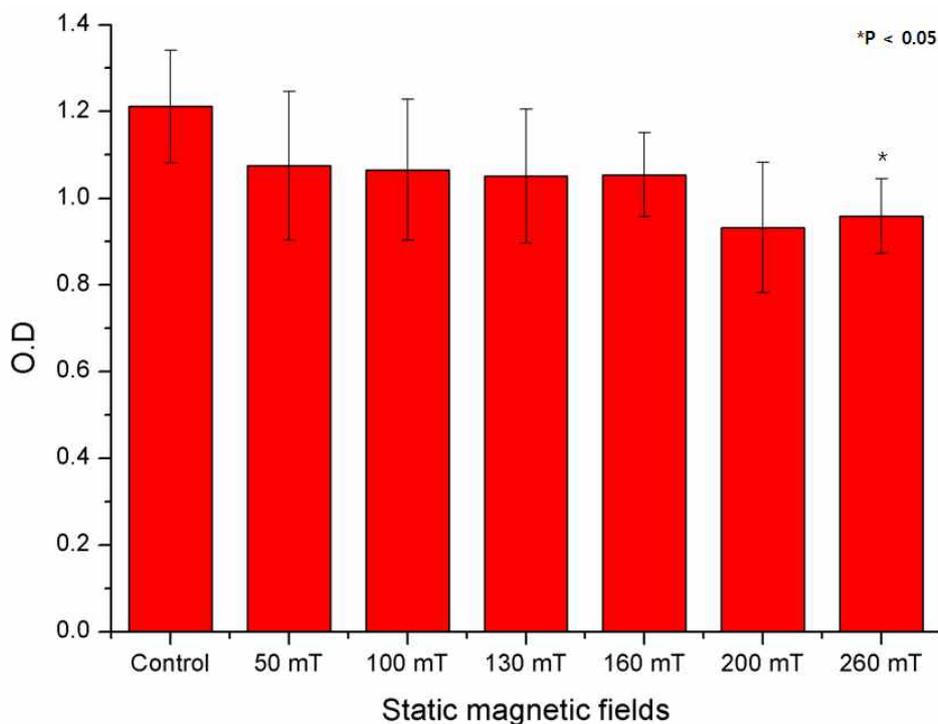


Fig. 6-1. The effect of static magnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells in monolayer culture according to the intensity of static magnetic field at stimulation of continuous exposure/day x 3 days

4.2 3일 동안 30분/일 간헐적 자기장 자극시 자극강도에 따른 세포생존율 비교

Fig. 6-2는 치조골 세포 배양에서 3일 동안 30분/일씩 자기장 자극시 자극강도에 따른 세포 생존율을 비교한 것이다. 자기장 강도 130 및 160 mT에서는 세포생존율이 약 10% 감소하였으며, 통계적으로 5% 수준에서 유의성이 있었다. 이 결과를 볼 때 하루에 30분씩의 자기장 자극이 오히려 세포생존율을 낮추므로 이 자극시간을 줄일 필요가 있었다.

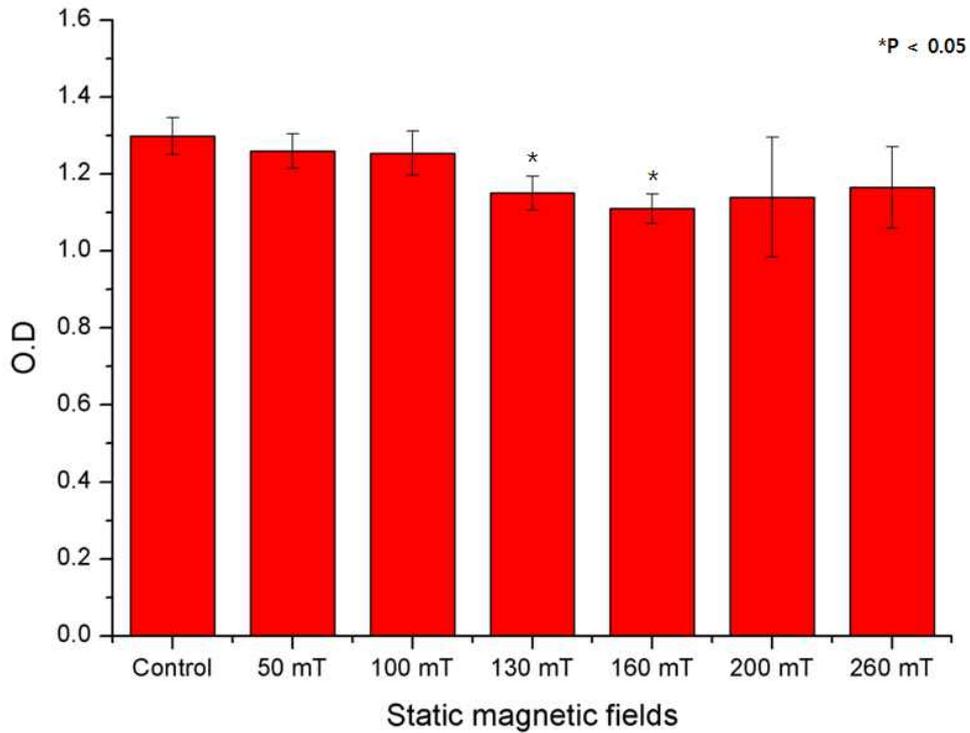


Fig. 6-2. The effect of static magnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells according to static magnetic fields in monolayer culture at stimulation of 30 min/day x 3 days.

4.3 3일 동안 10분/일 간헐적 자기장 자극시 자극강도에 따른 세포생존을 비교

Fig. 6-3은 치조골 세포 배양에서 3일 동안 10분/일씩 간헐적으로 자기장 자극시 자극강도에 따른 세포생존율을 비교한 것이다. 이 때 자기장 강도 130 및 160 mT에서 세포생존율이 약 115% 증가하였으며, 통계적으로 5% 수준에서 유의성이 있었다.

130 및 160 mT 강도에서 3일 동안 하루에 10분씩 치조골 세포가 자극을 받을 때 자기장 자극이 증식에 효과적임을 알 수 있었다. Dini(2005) 등은 자기장 자극이 콜라겐 침착 증가, 이온 이동 증가, 아미노산 흡수 증가, ATP와 단백질 합성 증가를 가져온다고 보고한 바 있다. 이처럼 자기장 자극이 세포내 Ca^{2+} 이온의 증가, 단백질 합성, 유전자 발현 등을 가져와 세포 증식이 약 115% 더 활발해 진 것으로 사료된다.

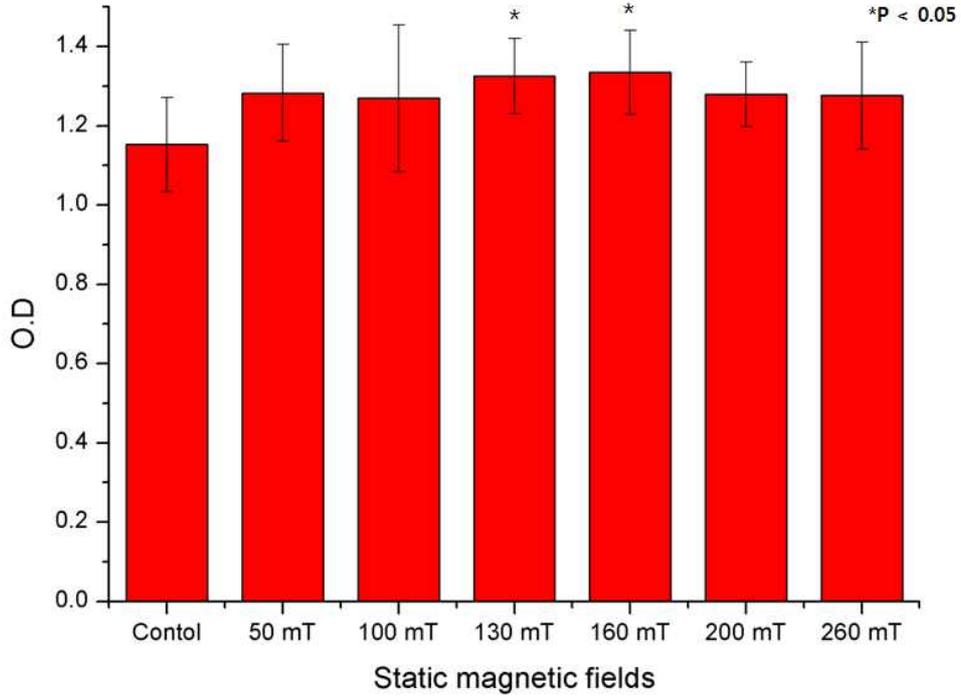


Fig. 6-3. The effect of static magnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells according to static magnetic fields in monolayer culture at the stimulation of 10 min/day x 3 days.

4.4 3일 동안 10분씩 2회/일 간헐적 자기장 자극시 자극강도에 따른 세포생존율 비교

Fig. 6-4은 3일 동안 10분씩 2회/일 간헐적 자기장 자극시 자극강도에 따른 세포생존율을 비교한 것이다. 세포 생존율은 대조군에 비해 100, 130, 160, 및 200 mT에서 약 110% 증가하였으며, 5% 수준에서 통계학적으로 유의성이 있었다. 이 결과는 하루에 1회 자극시에는 약 15% 증가하였으나 2회 자극시에는 10%만 증가하여 1회 자극이 더 효과적임을 알 수 있었다.

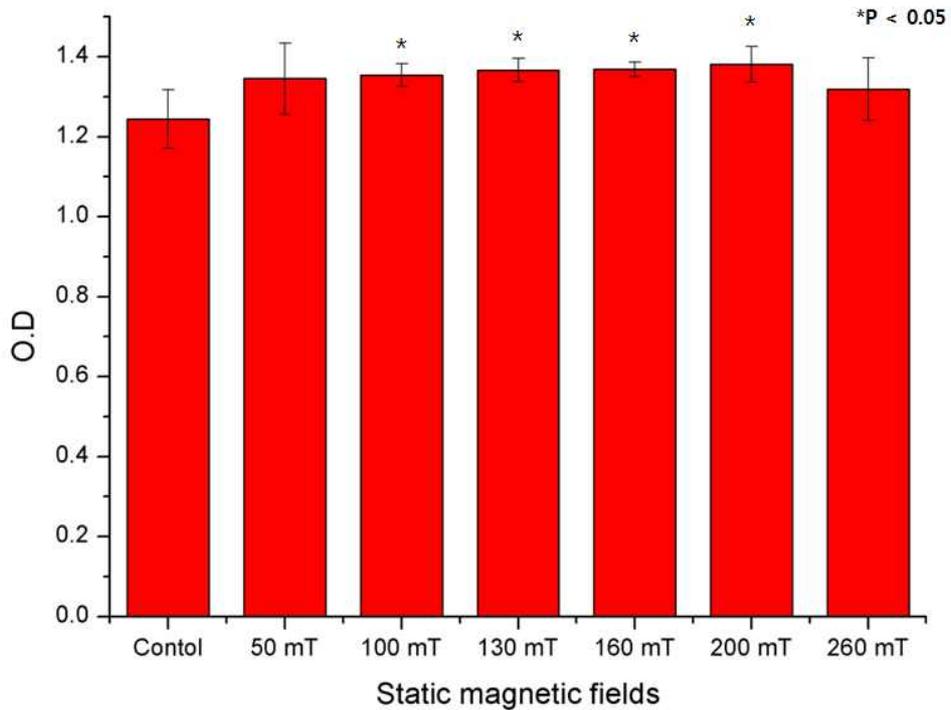


Fig. 6-4. The effect of static magnetic field stimulation on the cell viability of alveolar bone marrow stem cells according to static magnetic fields in monolayer culture at two stimulations of twice-10 min/day x 3 days.

4.5 자기장 자극의 세포 형태에 영향

Fig. 6-5는 치조골 세포에 2일간 하루에 10분씩 자기장 자극을 주었을 때 세포의 형태를 보여준다. Fig. 6-3에서의 결과처럼, 자기장 처리군에서의 세포가 대조군의 세포보다 더 잘 자라는 것을 알 수 있었다.

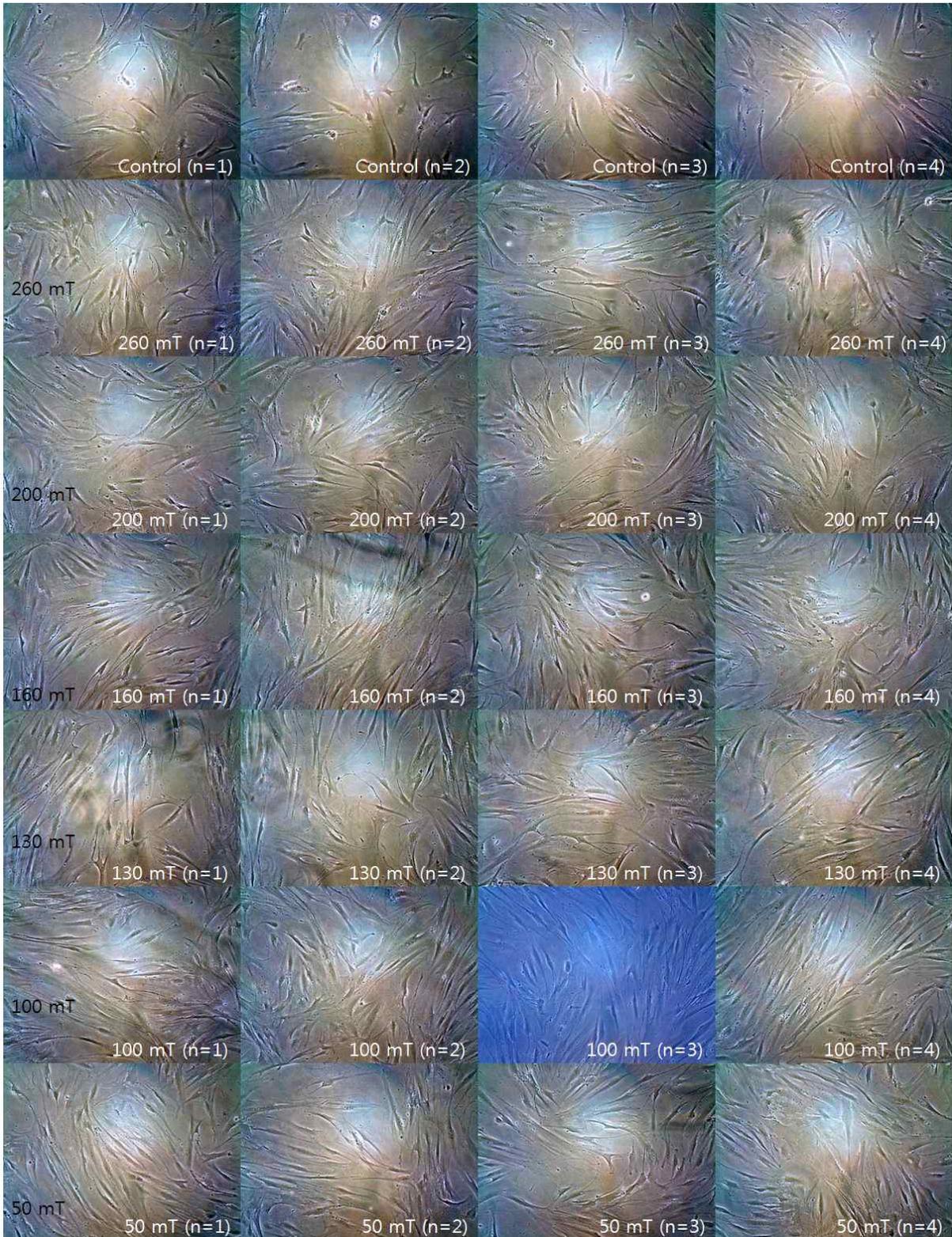


Fig. 6-5. The effect of the cell growth morphology of alveolar bone marrow stem cells in mono-layer culture according to the static magnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min/day for 3 days.

4.6 치조골 세포 증식에 따른 *In vitro* migration 연구

그림 5-8은 치조골 세포 증식에 따른 *In vitro* migration 결과를 나타낸다. 치조골 세포를 약 7 일동안 60 mm 디쉬에 배양 후 접시 중앙에 피펫을 이용하여 스크래치하였다. 대조군을 제외 하고, 약 96시간동안 하루에 10분씩 자기장을 노출한 결과는 그림6-6과 같다.

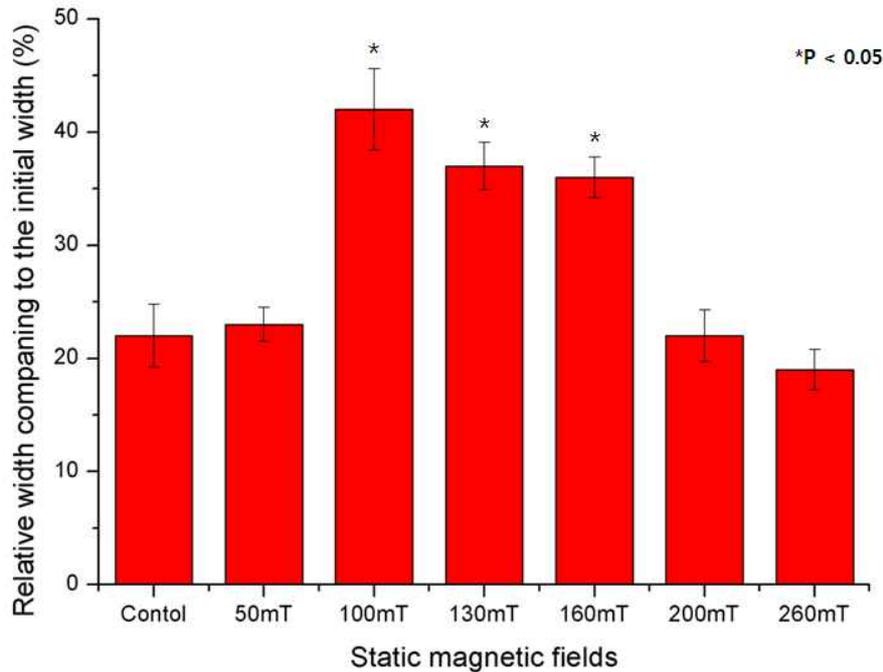


Fig. 6-6. Statistical analysis of *in vitro* migration for proliferation of alveolar bone marrow stem cells.

4.7 간헐적 장기간 자기장 자극시 강도별 세포의 미네랄화 비교

이 실험은 장기적인 자기장 자극이 치조골 세포 분화에 대해 미치는 영향을 알아보기 위해 행해졌다(Fig. 6-7). Mineralized nodules의 형태는 osteoblastic 성숙을 확인하는 마커 중의 하나이다. 비타민C(50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate (10 mM)가 포함된 배지에서 골세포를 4주간 배양했을 때 mineralized nodules의 형성을 Alizarin red 염색법으로 확인하였다. 치조골 세포의 분화에 25일의 장기간 동안 간헐적으로 10분/일씩 자기장을 자극할 때, 치조골 줄기세포의 분화를 Fig. 6-7에 나타내었다. 그리고 자기장 강도에 따른 세포의 미네랄화 정도를 Fig. 6-8에 나타내었다. 세포의 미네랄화 정도는 세포의 골화를 나타내는 척도로서 Alizarin red staining으로 확인되었다. 대부분의 모든 자기장 강도에서 대조군에 비해 미네랄화가 높게 나타났다. 특히, 160 mT 자기장 자극에서는 미네랄화 정도가 대조군에 비해 약 140% 높게 나타났다. 이 결과로서 간헐적 정적 자기장 자극이 치조골 줄기세포 분화에 큰 영향을 미쳤음을 알 수 있었다.

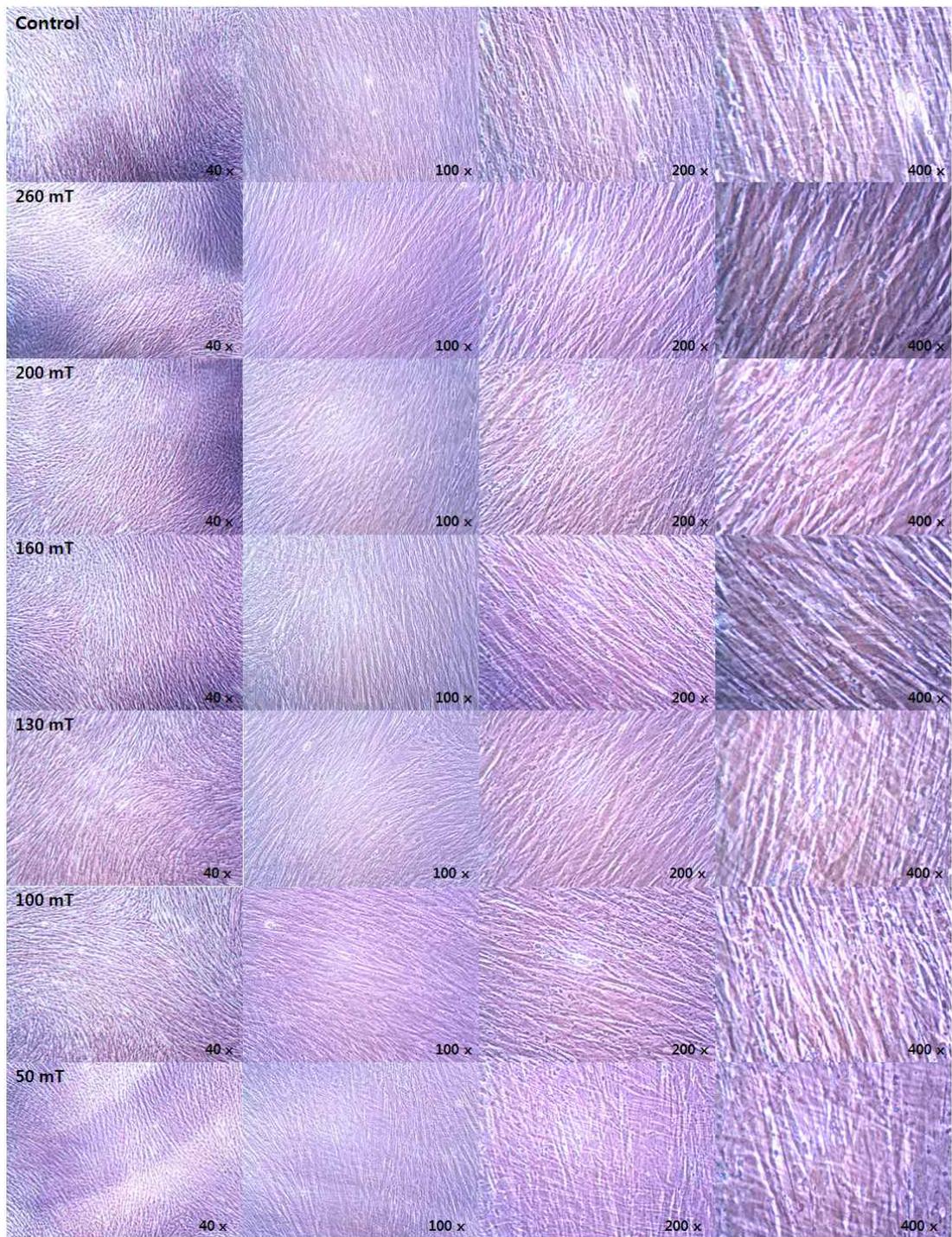


Fig. 6-7. Images of alveolar bone marrow stem cells differentiation on the static magnetic field stimulation under the magnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min/day for 25 days.

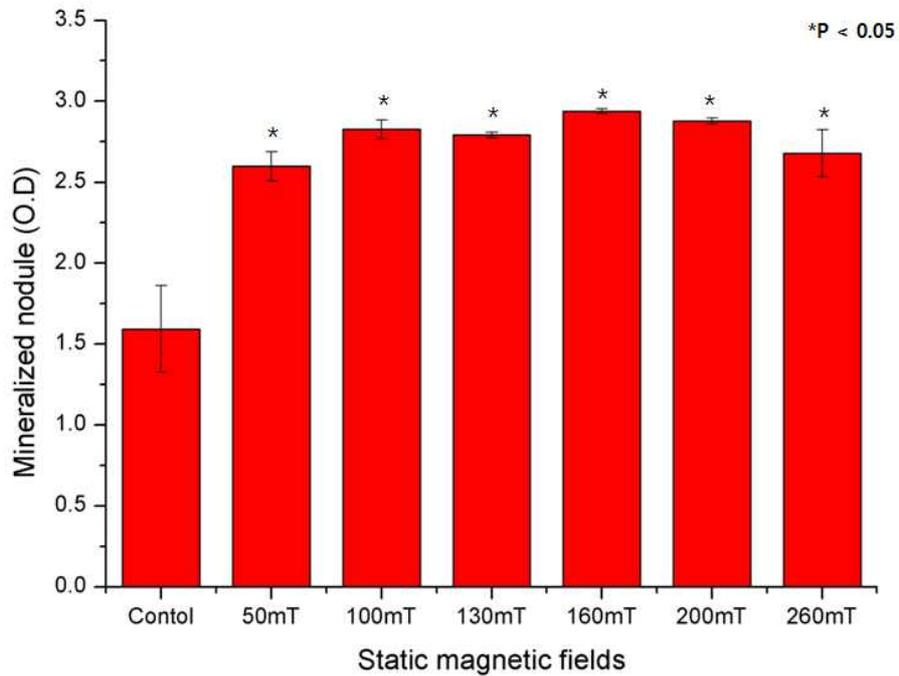


Fig. 6-8. Statistical analysis of the effect of long-term static magnetic field stimulation on alveolar bone marrow stem cell differentiation under the magnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min/day for 25 days using alizarin red staining.

4.8 치조골 세포 분화시 장기간 자기장 자극의 alkaline phosphatase activity 효과

치조골 줄기세포 분화시 25일 동안 10분/일씩 자기장 자극을 한 경우 세포의 alkaline phosphatase(ALP) activity를 분석한 결과를 Fig. 6-9에 나타내었다. 100, 130, 160 mT의 강도에서 대조군에 비해 ALP 활성도가 높게 나타났으며, 130 mT에서는 약 2배 이상 나타났다.

이로써 간헐적인 장기간의 정적 자기장 자극이 치조골 줄기세포의 분화를 촉진시켰다.

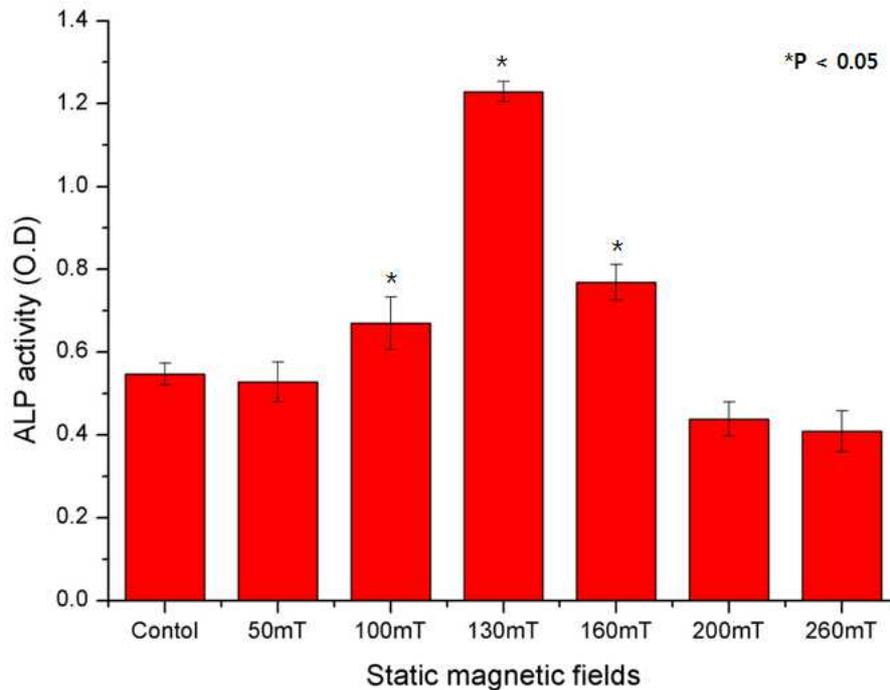


Fig. 6-9. Enhancement of alkaline phosphatase activity by long-term static magnetic field stimulation on alveolar bone marrow stem cells under the magnetic field stimulation at a stimulation time of 10 min/day for 25 days.

5. 요약 및 결론

본 연구는 치조골 줄기세포의 증식과 분화에 정적 자기장의 자극이 미치는 영향을 구명하고자 수행하였다.

1. 130과 160 mT의 자기장 강도에서 하루에 10분씩 3일간 세포 자극을 주었을 때 줄기세포는 대조군에 비해 약 115% 증식하였다. 역상현미경을 사용해 실시간 연속적으로 세포의 증식을 확인할 수 있었다.

2. wound healing 실험에서도 치조골 세포가 100, 130, 160 mT의 자기장 자극에서 세포 이동이 가장 좋게 나타나 wound healing이 효과적이었다. 특히, 100 mT에서 대조군에 비해 세포 이동률이 약 145%로 높게 나타나 wound healing이 가장 효과적이었다.

3. 치조골 세포의 분화에 25일의 장기간 동안 간헐적으로 10분/일씩 자기장을 자극할 때, 치조골 줄기세포의 분화를 분석한 결과, 대부분의 모든 자기장 강도에서 대조군에 비해 미네랄화가 높게 나타났다. 특히, 160 mT 자기장 자극에서는 미네랄화 정도가 대조군에 비해 약 140% 높게 나타났다. 이 결과로써 간헐적 정적 자기장 자극이 치조골 줄기세포 분화에 큰 영향을 미쳤음을 알 수 있었다.

4.. 치조골 줄기세포 분화시 25일 동안 10분/일씩 자기장 자극을 한 경우 세포의 alkaline phosphatase(ALP) activity를 분석한 결과, 100, 130, 160 mT의 강도에서 대조군에 비해 ALP 활성도가 높게 나타났으며, 130 mT에서는 약 200% 이상 나타났다.

제 7 절 동물 세포,조직용 3차원 배양시스템 및 적정 배양기술 개발

1. 서론

조직공학에 관하여, 배양시스템은 다양한 목적을 위해 설계되었다: 작거나 큰 규모의 세포 증식, *in vitro* 에서 격리, 증식시킨 세포를 이용한 3차원 조직 재생, 기관에 직접 지원하는 장치들(M Shachar and S Cohen, 2003)[9] 배양시스템은 주로 *in vivo* 환경의 생물학적, 생화학 적, 물리학적 환경을 재생하는 것을 목표로 한다. 이것의 기능은 지지체 안의 세포의 성장을 확보하고 이화작용 산물을 없애기 위해 적당한 영양분과 산소 공급을 하는 것이다. 다양한 형식의 배양시스템은 조직의 재생 또는 재건을 위한 세포 증식에 이용되어 왔다. 배양시스템은 필수적인 혼합 작용, 물질 교환 그리고 원하는 생물학적 산물을 제공하는 기관을 위해서 통제된 환경을 제공한다.(I Martin et al., 2004; HW Blanch and DS Clark 1996; K Riet J Tramper 1991; ML Shuler and F Kargi 2002)[10-13] 관류 배양시스템의 사용은 세포 밖의 세포간질의 증가와 세포간질 산물의 최소화를 통해 조골세포의 표현형 활동을 크게 증가시킨다.(GH Altman et al., 2002; FW Janssen et al., 2006)[14,15]

최근의 연구(M Radisic et al., 2004; J Glowackiet al., 1998; SH Cartmell et al., 2003; ME Gomes et al., 2003)[17,18,19,20]는 고밀도의 균일한 조직 배양에 관류의 중요성을 보여준다. 몇 개의 관류 배양식 배양시스템 시스템은 뼈와 연골 조직공학을 위해 개발되어 왔다. 관류형 배양시스템에서, 수송 현상은 주로 대류현상에 의해 일어나므로 세포에 공급되는 대사산물은 보다 균일하고(B Rath et al., 2008)[21] 확산이 제한적이지 않다.(GN Bancroft et al., 2003; AS Goldstein et al., 2001)[22,23] 3차원 증식에서 적당한 수송 특성을 확보하기 위해 배양시스템 설계와 세포를 둘러싼 극소 환경을 통제하는 것은 중요하다. 기계적 화학적 자극들에 대한 응답시간을 통해 세포 기능에 대한 지식이 높아진다면, 이러한 외부 영향에 대한 세포 기능의 새로운 수준의 지식을 제공받을 수 있다.(Beckman M, 2003; DJ Stephens and VJ Allan., 2003)[24,25] 살아있는 세포를 이미지화하는 능력은 지지체(scaffold)의 특성과 세포 반응을 증가시키는 관류 조건을 규명하고 최적화하는데 도움을 줄 것이다. 생리학적 조건하에서 이미지화하는 것은 배양시스템의 사용이 필수적이다. 배양시스템은 3차원 지지체와 2차원 기질 모두를 담아낼 수 있으며 관류 배양이 가능해야만 한다.

일반적으로 배양시스템은 세포가 촉진될 수 있는 극소 환경을 만들 수 있도록 설계된다. 대부분의 관류 배양시스템은 지속적인 이미지화가 되지 않는 세포 증식 인큐베이터에서 전형적인 습도, 37°C, 5% 농도의 CO₂ 에서 사용 가능하도록 개발되어왔다.(SP Hoerstrup et al., 2000; MJ Powers et al., 2002; F Zhao and T Ma, 2005; C Williams and TM Wick, 2004)[27,28,29,30] 이미지화 가능한 관류 배양시스템은 단일 세포 평가나 얇은 조직 샘플을 위해 주로 설계된다.(DC Focht, 1996; WA Hing et al., 2000)[31,32] 이러한 시스템에서, 배지는

뼈세포 상에 다양한 유속, 기간, 회수가 결정될 수 있는 챔버(chamber)를 통해 조절가능하며 확정적인 비율로 순환된다. 이러한 방법에서 유체의 흐름은 두 가지 다른 자극, 전단 응력과 전위의 흐름을 유도할 수 있다.(RA Salzstein et al., 1987)[33] 이러한 연구들은 이러한 반응들이 유체 흐름의 전단 응력 때문이라는 것을 강조하고 있다.(AD Bakker et al., 2001)[34]

특히, 치과 조직공학의 중요한 면은 새롭게 형성된 백악질과 치조골을 동반한 치주 조직의 복합적 조직 재생이다. 치조골은 치조에 꽃혀있으며 무균돼지뼈를 유지하고 저작능력을 돕는다. 치조골은 인체에 가장 활동적인 뼈 중에 하나이므로 구강 조직공학을 위한 뼈세포 채취에 유용한 부분이 될 수 있다.(ME Bolander, 1992)[37] 아직 뼈 내에 세 기계적인 자극과 관련된 분자적 경로를 확실히 알지 못하지만, 기계적 자극은 또한 조직공학용 뼈의 구성과 특성을 향상시키는데 널리 이용되고 있다.(A Ignatius et al., 2005; JR Mauney et al., 2004)[38,39] 또한, 높은 주파수와 관련된 낮은 등급의 기계적 자극은 뼈 형성에 더 많은 이점을 보인다.(S Judex et al., 2007)[40] 낮은 진폭의 진동은 조골 세포 증식과 뼈의 구성과 재건에 관련된 조골세포의 유전적 발현을 향상시킨다.(SM Tanaka et al., 2003)[41] 본 연구에서, 유체 역학의 생체역학적 효과와 줄기 세포 배양을 위한 관류형 배양시스템에서의 세포 성장의 물질 교환에 대해 초점을 맞췄다. 또한 배양시스템 시스템의 중요 변수의 효과에 대한 연구를 논의하였고 보다 나은 줄기세포 배양을 위한 배양시스템 설계 조건을 찾고자 하였다. 이에 본 연구에서는 새로운 관류식 세포배양 챔버(chamber)를 설계하고 제작한 후 배양챔버시스템을 평가하고자 한다. 또한, 역상 현미경을 배양챔버에 설치해 세포 배양을 연속적으로 실시간 모니터링할 수 있는 시스템을 개발하고자 한다. 보다 최신의 연구는 세포 활동상에 전단 응력을 유발하는 효과에 초점을 맞추고 있다.(GN Bancroft et al., 2002; Y Martin and P Vermette, 2005; P Pathi et al., 2005; XJ Yu et al., 2004)[1,2,3,4] *in vitro* 증식 환경에서의 관류흐름은 또한 *in vivo* 조건과 거의 비슷하게 모방된 환경을 제공한다. *In vivo* 의 기계적 형질전환은 세포가 기계적 자극을 감지하고 생화학적 신호로 번역함에 따른 과정이다. 전단 응력은 기계적 형질전환 활성화에 가장 중요한 기계적 자극 중 하나라고 생각된다. 세포 배양 성공의 열쇠는 특정 배양을 통제하는 조건의 개발이다. 특히, 관류형 배양시스템은 더 많은 균등 환경과 중요한 배양 변수를 감시하고 통제하는 능력 때문에 정적 혈관 배양에 상당한 이점을 가지고 있다. 본 연구에서는 한 관류식 배양시스템을 설계하고 평가하고자 하였다. 이 연구의 목적은 치조골 골수 줄기세포를 사용하는 인체 치조골 조직 공학을 위한 새로운 관류식 배양시스템 시스템 및 세포배양 모니터링 시스템을 개발하는 것이다.

2. 연구사

2.1 세포에의 기계적 자극

최근 들어 뼈 조직공학에 대한 관심이 높아지고 있다. 치과 임플란트의 빠르고 좋은 골유착은 중요한 사항이다. 게다가, 빠른 골유착은 기능 개선을 촉진하며 환자의 불편을 덜어주는 동시에 임플란트 수술 전 간격을 줄이는데 도움을 준다. 특히, 치과 임플란트의 골유착을 향상시키기 위해 효과적인 기술을 개발하는 것은 의미 있는 일이다. 기계적 자극이 뼈 조직 신진대사에 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 충분한 연구들이 낮은 기계적 자극이 뼈를 강하게 하며, 골감소증을 저해하고 뼈 치유를 강화시켜준다는 것을 일관성 있게 보여준다.

기계적 자극은 또한 조직공학을 이용한 뼈의 형성과 특성을 강화시키는 데 널리 이용되고 있다. 그리고 이것은 뼈 형성에 자극을 주는 낮은 크기의 기계적 신호의 효능이 응력의 크기보다 적용 주파수에 의존한다는 것을 시사한다. 비교적 높은 주파수 상의 낮은 크기의 기계적 자극은 뼈 형성에 더 좋다고 알려져 있다.

기계적 자극에 대한 뼈 반응의 메커니즘을 설명하기 위하여, 뼈 세포상의 기계적 신호의 영향은 널리 연구되어 왔고, 기계적 자극은 골아세포와 골세포, 파골세포와 골수 간질성 세포(BMSC)의 활동과 분화에 영향을 미치는 것을 밝혀냈다. 낮은 크기의 진동은 골아세포 증식과 뼈 형성에 포함되어 있는 골아세포 유전자 발현을 강화시켜줄 수 있다. 기계적 자극은 골아세포 계통의 분화를 지시하는 역할을 가진다. 뼈에서 기계적 자극과 관련된 분자적 경로가 확실히 않더라도, 최근의 연구는 낮은 크기의 기계적 자극이 골아세포와 그들의 전조세포에 유리한 영향을 준다는 것을 나타낸다. 낮은 기계적 자극은 뼈 부피, 골아세포 수, 석회침착률, 그리고 뼈 형성률에 도움을 준다. 더불어, 기계적 진동은 계면의 입자 증착과 칼슘과 인 이온과 같은 빠른 유착에 기여하는 이온들에 대한 요인들을 유발할 수 있다. 조직의 발달과 개조 동안 세포는 차례로 형태를 가지며 생리화학적 과정의 큰 배열을 조절하는 기계적 자극의 다양한 형태의 대상이 된다. 기계적 자극에서, 세포는 이 기계적 신호들을 역학적 전이라 명명된 메커니즘을 통해 생화학적 반응으로 바꾼다. 낮은 크기 진동의 임상 응용은 뼈 조직 재생의 가속으로 때문에 재활시간을 줄여준다. 성공적인 배양의 열쇠는 특정 배양을 위해 제어된 최적의 조건을 개발하는 것이다. 관류 배양시스템은 보다 나은 동질의 환경과 중요한 배양 변수를 감시하고 제어할 수 있는 능력 때문에 정적 배양에 상당한 이점을 가지고 있다. 그러나 적절한 산소 공급 및 전단 응력은 배양 조건 설계에 고려되어야 한다.

조직공학의 가장 효과적인 접근법은 배양시스템 연구를 통해 얻은 지식을 배경으로 *in vitro* 배양에 사용하는 것이다.(KJ Gooch et al., 2001; MJ Yaszemski et al., 1996)[42,43] *In vitro* 관류 배양 시스템의 발달은 지속적인 영양분 공급에 이점을 가져온다. 단층 시스템의 세포에 유체 흐름에 의해 공급되는 기계적 힘의 분석은 뼈세포의 자극에 대한 반응을 간단히 알려주는 표지를 제공하기 때문에 중요하다. 배양시스템은 혈관 이식(LE Niklason et al., 1999; D Seliktar et al., 2000)[44,45]과 심근 조각(SP Hoerstrup et al., 2001)[46]과 같은 조직 공학적

심장구조에 필요한 역동적인 기계적 자극을 제공하기 위해 발달해 왔다. 이러한 장치들은 일반적으로 *in vivo* 조건과 비슷한 복잡한 생화학적 환경을 생성하기 위해 박동성 흐름에 의존하며, 기계적 강도의 발달(LE Niklason et al., 1999; D Seliktar et al., 2000)[44,45]과 이런 구조의 세포 기능 조절(LE Niklason et al., 1999)[45]을 모두 촉진시킨다는 것을 입증해왔다. 넓은 범위의 세포 현상은 유체 전단 응력에 영향을 받을 수 있다. 환경이 세포 현상에 영향을 줄 수 있기 때문에, 몇몇의 배양시스템은 *in vivo* 압력을 복제하기 위해 전단 응력을 유도하는 통합된 방법을 가지고 있다. 영향을 받을 수 있는 현상에는 기계적 자극수용(e.g., plasma membrane receptors, ion channels, integrins/focal adhesions, protein kinase signaling)과 세포 반응(e.g., intracellular calcium, nitric oxide, prostacyclin, and cytoskeletal remodeling)(PF Davies, 1995)[47]을 모두 포함한다.

Goldstein의 다수(AS Goldstein et al., 2001)[23]는 전단 응력에 대한 유량 관계를 위해 원통형 기공 모델을 사용하였다. 우리는 Goldstein(AS Goldstein et al., 2001)[23]의 실험 방법을 사용하여 세포에 영향을 주는 유속 0.3 ml/min 에서 0.03 ml/min에 따른 전단응력을 계산하였다. 이 계산 방법을 위해서, 우리는 지지체가 원통형 기공 모델(scaffold 다공률 85%; 10mm 지름)이라 가정하였다. 원통형 기공 모델은 Eq. (7-1)과 같이 지지체안의 세포가 받는 전단 응력을 추정할 수 있다.

$$\tau_w = \frac{(8\mu V_m)}{d} \quad (7-1)$$

μ 는 점도 (0.01 dyn s/cm^2)(MJ Yaszemski et al., 1996; TL Donahue et al., 2003)[43,57], V_m 는 평균 속도 그리고 d 는 평균 기공 크기 ($100 \mu\text{m}$). V_m 을 계산하기 위해 우리는 아래의 Eq. (4-2)를 계산하였다.

$$V_m = \frac{Q}{\Phi \pi (D/2)^2} \quad (7-2)$$

Q 는 유속(0.03, 0.3 ml/min, respectively), Φ 는 지지체의 다공률(85%) 그리고 D 는 지지체의 지름(10 mm).

이 계산의 결과로, 지지체안의 세포가 느끼는 전단응력(τ_w)은 각각 0.3 ml/min일 때 $5.9947 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ 이며, 0.03 ml/min일 때 $5.9947 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ 임을 알았다. 이 값들은 *in vivo*에서 느끼는 전단 응력보다 작다. 뼈세포 전단 응력의 *in vivo* 수준은 $0.8 - 3.0 \text{ Pa}^8$ 으로 추정되지만, 논문에 보고된 전단응력 값과 비교할 수 있다.(GN Bancroft et al., 2002; J Vance et al., 2005; ME Gomes et al., 2003; AS Goldstein et al., 2001)[1,7,20,23]

이러한 신호들은 조직 수준의 적응을 수행하기 위해서 작용세포(예, 파골세포와 조골 세포)에 작용한다. 뼈의 기공 부분에 흐르는 유체에 의해 유도되는 뼈세포 전단응력은 기계적 자극 수용 신호와 적응을 중재하는데 작용하는 매우 중요한 기계적 자극이라 생각된다.(RL Duncan and CH Turner, 1995; EH Burger and J Klein-Nulend 1999; I Owan et al., 1997)[58,59,60]

따라서 유체흐름유도 전단응력은 *in vitro*에서 기계적 자극수용을 연구하기 위한 기계적 자극으로서 빈번하게 사용된다.

Bancroft의 다수(GN Bancroft et al., 2002)[1]는 관류 배양이 유체 전단응력과 chemotransport를 포함한 여러 다른 메커니즘을 통해 조골 세포에 영향을 발휘할 수 있음을 보였다. 그 연구에서, 관류 조건하에서 scaffold에 배양된 세포가 경험한 최초의 전단응력은 scaffold 다공성의 기하학을 위해 원통형 기공 모델 근사치를 사용하여 계산함으로써 1 dyne/cm^2 (0.1 Pa)를 초과하지 않았다.(GN Bancroft et al., 2002)[1] Vance의 다수(J Vance et al., 2005;)[7]는 쥐의 조골세포 cell line인 MC3T3세포가 평균 유체 유도 전단응력 0.0007 Pa에 노출되었을 때, 정적 제어와 비교하여 PGE₂(prostaglandin E₂; paracrine factors)수준이 2.5배 증가하였음을 발표했다. 기계적 자극은 24시간과 48시간이 지난 후 유체흐름보다 각각 80% 77%더 많은 PGE₂를 생산하였다. 이러한 발견들은 기계적 자극이 PGE₂ 생산의 보다 좋은 강력한 자극기일 뿐만 아니라 유체 흐름을 단독(J Vance et al., 2005;)[7]으로 쓸 때보다 오랜 배양기간 동안 PGE₂를 높게 유지시킬 수 있음을 보인다. 또한, 이 범위의 전단 응력 수준은 유전자 발현과 ECM 산물의 증가를 보인다.(GN Bancroft et al., 2002; XJ Yu et al., 2004; VI Sikavitsas et al., 2001; J Vance et al., 2005; AS Goldstein et al., 2001; SH Cartmell et al., 2003)[1,4,6,7,19]

Goldstein의 다수(AS Goldstein et al., 2001)[23]는 80% 다공성의 polyglycolic acid foams에 심은 조골 세포가 배지를 0.03 ml/s로 흘려주었을 때 정적 배양에 비해 alkaline phosphatase (ALP) 산물의 증가를 보임을 발표했다. Sarah의 등은 DNA 분석을 통해서 관류 속도 0.2 ml/min와 정적 배양에 비해 0.01 ml/min의 관류 속도가 세포 증식을 증가시킨다는 것을 발표하였다. 반대로, Runx2, osteocalcin (OCN) 그리고 alkaline phosphatase (ALP)의 mRNA 발현은 실시간 RT-PCR로 정량했을 때, 낮은 유속에 비해 0.2 ml/min일 때 최대로 조절이 되었다. Runx2, ALP, 그리고 OCN은 여러 가지 골기질 생산 단계의 중요한 표지자이다.(L Malaval et al., 1994)[51] Runx2는 최초의 조골세포 분화와 뼈 구성 이후에 필수적인 전사 활성자이다. 35 ALP는 OCN이 발현되기 전 전조골세포와 조골세포에 의해 발현한다.(EL Smith and C Gilligan, 1989; GP homas and AJ EI Haj, 1996)[52,53] OCN은 hydroxyapatite를 잡아주고 기질이 광화되는 동안 바로 직전의 조골세포에 의해 생산되는 말기 표지자이다.(L Malaval et al., 1994)[51]

이 데이터들은 배지 관류가 영양분과 구조 내의 폐기물 수송을 향상시키고 조정된 흐름의 기계적 자극을 제공함으로써 *in vitro*에서 3차원 조직의 발달에 도움을 준다는 것을 시사한다.(J Vance et al., 2005;)[7] 세포가 분비하는 수용성 단백질이 이웃하는 세포에 영향을 주기 전에 높은 유속에 씻어 내려가므로 낮은 속도의 배지 관류에서 자가 분비 효과가 가능하다.(J Vance et al., 2005;)[7]

여러 연구들은 또한 기계적 자극이 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family (ERKs, JNK, and p38 MAPK)의 활동에 의해 Mesenchymal stem cells (MSCs)의 분화를 증

가시킨다는 것을 보여준다.(HL Holtorf et al., 2005)[55] Simmons와 다수(G Kasper et al., 2007; CA Simmons et al., 2003)[48,49]는 기계적 자극에 의한 MSCs의 반응이 MAPK 신호에 의해 중재된다는 가설을 세웠다. 그들은 이런 형식의 strain이 증식을 억제하고, MSCs의 기계적 자극은 MAPK 신호에 의해 중재된다는 것을 증명하였다. 게다가, Kasper 와 다수(G Kasper et al., 2007)[48]는 matrix metalloprotease (MMP)가 MSC 분화에 역할을 가지기 때문에 기계적으로 자극시킨 MSCs의 matrix metalloprotease (MMP) 활동을 조사했다.

이 저자들은 MSC기능은 세포의 기계적 자극에 의해 조절된 MMP 활동에 의해 제어된다고 본다.(Fig. 7-1).(G Kasper et al., 2007)[48] 이 MSCs의 기계적 자극은 MMP-2, -3, -13의 단백질 수준의 상승과 metalloproteases (TIMP)-2의 조직 특정 억제제를 포함한 세포 밖의 gelatinolytic activity를 높게 조절한다.

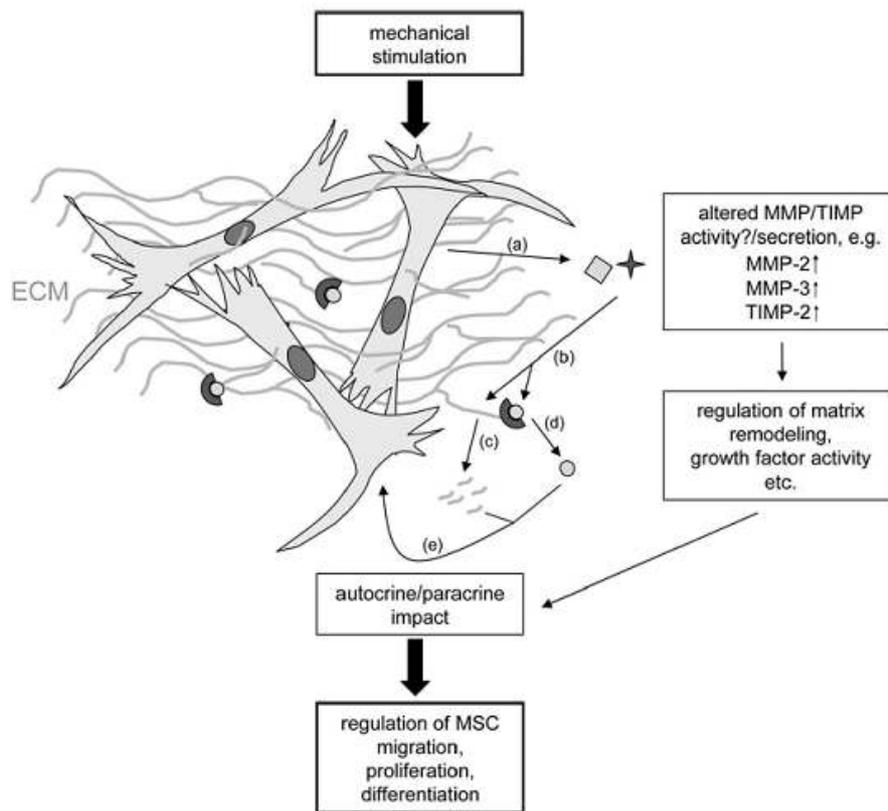


Fig. 7-1. Matrix metalloproteases (MMPs)/Tissue-specific inhibitor of metalloproteases (TIMPs) balance as a potential transducer of mechanical stimuli applied to MSCs. The following mechanism are hypothesized based on the available data: mechanical loading of MSCs leads to enhanced secretion and, potentially, activation of MMPs/TIMPs (a), which mediate different regulatory processes (b), such as degradation of the ECM (c) or release of latent growth factors (d). Interaction of ECM fragments or activated growth factors with cell surface receptors (e) results in altered MSC migration, proliferation, and differentiation in an autocrine/paracrine manner.(G Kasper et al., 2007)[48]

Zhang의 다수(L Zhang et al., 2008)[50]는 BMSCs에서의 합성 collagen과 F-actin 발현량에 대한 기계적 자극의 효과에 대해 조사하였다. 기계적 자극은 MSCs를 특정한 세포 형태로의 분화를 유도하며 따라서 조직 공학 응용에 중요한 역할을 수행한다. 뼈와 하중에 대한 관계를 처음 정의한 Wolff와 많은 연구자들은 *in vitro*와 *in vivo*의 상황에서, 뼈재생상의 다양한 부하 상황에 대해 연구했다.(EL Smith and C Gilligan, 1996)[52] 또한 Thomas의 다수(GP Thomas and AJ EI Haj, 1996)[53]는 *in vitro*에서 MSCs상의 직접적인 부하에 대해 조사하였다. 그들은 기계적 자극을 MSC 배양의 초기 단계 골전구 세포에 적용했을 때, 분화를 촉진할 수 있다고 발표했다. Li의 다수(YJ Li et al., 2004)[54]는 진동하는 유체 흐름은 골전구 세포의 중요한 조절자라는 가설을 세웠다. 그들은 MSCs 상에 부하-유도된 진동하는 유체 흐름의 효과를 검사했다. 진동하는 유체 흐름을 받은 MSCs는 진동 유체 흐름을 준지 24시간 후 Ca^{2+} 유통, 증식 그리고 osteopontin와 osteocalcinehe 유전자의 mRNA 수준이 크게 향상했음을 보였다. Dexamethasone (DEX)는 MSCs의 골분화에 강력한 효과를 미치는 합성 당질코르티코이드이다.

Holtorf의 다수(HL Holtorf et al., 2005)[55]는 관류 배양만으로 쥐 MSCs의 골원성 분화를 유도한다는 것을 증명했다. 그들은 DEX와 관류 배양이 골원성 분화에 시너지 효과를 가진다는 것을 찾아냈다. 그 연구에서 그들은 ALP(초기 단계 표지자), osteopontin (중간 단계 표지자), 그리고 calcium deposition (마지막 단계 표지자)를 포함하는 몇몇의 골아세포 표현형 표지자를 정적 배양보다 자극을 받은 세포로, DEX가 없는 경우라도 검사했다. Zhao의 다수(F Zhao and T Ma., 2005)[29]는 인간 MSCs와 직조하지 않은 섬유 기질 구조와 역학적 부하를 이용한 관류 배양시스템 시스템을 사용하여 3차원 조직 구성을 시도했다. 그들은 관류 시스템에서 자란 구조가 균등한 세포 밀도를 가지며 광범위한 확장 후 다계통 분화 가능성을 유지하고 정적 배양에 비해 높은 세포 밀도를 가진다는 것을 보고했다.

이러한 연구들은 뼈 조직공학을 고려할 때 적절한 기계적 자극이 중요하다는 것을 뜻한다. 이 논의 부분에서, 우리는 기계적 자극이 어떻게 조직 공학 연구에 영향을 미치는 지 논의하였다. 많은 연구들이 기계적 자극과 생화학적 자극이 세포의 분화와 조직 형성에 상호작용을 시너지효과로 촉진한다는 설득력 있는 증거를 보였다.

2.2 줄기세포 배양환경(Stem-Cell Mirco-environment)

영양소 공급과 ECM의 대사산물 제거는 모세관 구조에 의해 이루어지며 이 밀도는 세포의 대사 요구에 따라 달라진다. 세포의 과정은 다양한 분자적, 구조적, 유체역학적, 기계적 그리고 전기적 신호와 공간적, 시간적 수준과 조합에 의해 조정된다. 세포는 조직 기질과 이웃 세포와의 동형 또는 이형적 상호작용을 거쳐 반응하고 그들의 직접적인 미세환경을 개조한다. 생체재료 담체는 세포 부착과 조직 성장을 위한 구조적 형판을 제공하는 반면 배양시스템은 환경 제어를 제공한다. 지지체와 배양시스템은 또한 cytokine(확산 또는 고정된)과 같은 조절 신호 무리와 물리적 요인(유체 역학적 응력, 기계적 장력, 전기적 변화)을 제공한다. 줄기 세포 미세환

경에 대한 중요한 구성요소는 수많은 화학적, 생체 물리적 신호를 포함하고 있는 주변 기질이다. ECM역학과 세포 모양 압축과 같은 요인들은 줄기 세포의 분화에 역할을 수행할 수 있으며 직접적인 분화를 위한 합성 기질을 설계할 수 있다. 물질 합성과 처리의 진전은 제어된 미세환경에서 사용할 수 있는 합성, 천연 물질의 범위를 개방하였다. 다공성 지지체는 세포의 이동과 침투를 위한 육안으로 보이는 구멍들을 제공하는 반면, 섬유 지지체는 천연 ECM을 모방한 크기로 설계될 수 있으며, 세포 정렬을 제어하기 위해 정렬할 수 있다. 더 큰 기계적, 정량적, 세포 미세환경의 이해를 얻기 위하여, 세포 대사를 위한 정교한 모델은 효소 작용에 의해 조절되는 중간 대사산물의 여러 개의 구획을 포함하는 조직공학의 영역 밖에서 제안되었다. 그러므로, 젖산의 산물과 함께 산소와 포도당은 광범위한 측정에 기반하여 특성화할 수 있다. 생화학적 요인과 기계적 요인을 통합함으로써, 이론적 모델은 세포 변형을 지배하는 실제 메커니즘에 대한 가설을 조사하는데 사용될 수 있다. 세포는 앞쪽 언저리와 세포 골격 탄성에서 actin 중합으로 인해 생긴 밀어내는 힘과 myosin에 의한 힘과 integrin을 통한 접착력에 의해 유도된 끌림을 가진 선형의 점탄성 물질로 설계되었다. 또한 myosin 운동 근육은 멤브레인을 향해 필라멘트를 나아가게 할 수 있다. 돌출부는 세포 멤브레인에 부착된 actin 필라멘트의 저항력에 의해 균형이 맞춰진 세포 멤브레인 위의 정역학적 압력에 의해 조종받을 수 있다. 게다가, 접착력에 의한 곡률 마찰에 의존하는 멤브레인의 장력은 중요한 역할을 가진다. 그러나, 이산 탄성 요소는 박동성 동작에 대해서 나중에 추가되었다.

다공성 지지체에 대해, 다음의 단계들은 지지체 상의 콜로니화와 조직형성을 구별해낼 수 있다: (1)부착; (2) 증식과 세포이동; (3)ECM 산물과 (4) 미네랄화. 세포 형성의 과정동안, 세포는 지지체 표면에서 2D 구성을 기질 물질에 포함된 3D 상태로 바꿔주어야 한다. 2D 배양이 3D 상황과 비교하여 세포 발현에 차이를 나타낸다는 것은 잘 알려져 있다. 세포 행동의 차이점은 아마도 세포 부착과 다른 세포골격 기관의 결과에 의해 좌우된다. 더불어, 세포간 상호작용은 3D 세포의 밀접함과 다공성 부분에 세포 생산 요소의 높은 농도 유지에 의해 증가한다.

세포와 지지체의 상호작용은 세포의 세포골격안에서 내부 응력을 생성하는 것이다. 2D배양은 국소 부착 복합체를 통해 기질을 전송한다. 3D조직 형성은 실질적으로 세포의 힘 발생 영향 하에서 변형된다. 이는 parameter를 디자인하는 것과 같이 지지체 재료의 단단함의 중요성을 강조한다. 세포 속도에서 이러한 요소의 전체적인 효과에 큰 질적 통찰력을 얻기 위해, 3D 지지체안에서의 이동이 세포의 돌출, 끄는 힘에 기반되어 설계되어졌다. 이는 수용체의 표현의 적정 수준과 리간드 밀도가 기질 강도에 의존한다는 예상의 결과이다. 표면의 곡률에 대응하여, 세포 스스로 세포골격의 최소 왜곡을 경험하는 식으로 적응한다. 유한 요소 설계는 세포 층에 기계적 자극이 있는 곳에 증식이 집중되는 것과 나중에 미세 기계적 힘 센서 어레이를 사용하여 측정하여 확인한 것을 증명하였다. 이 메커니즘의 향상된 이해는 직접적인 세포 이동을 개척하고 섬유크기, 적응 그리고 표면 기하학에 대해 지지체 구조를 디자인 함으로써 내부 성장을 향상시킬 수 있다. 그러나, 낮은 강도의 지지체 예측과 제어 구조의 행동은 세포의 끄

는 힘과 근모 조직의 변형, 섬유 재배열과 접촉 인동의 사이에 존재하는 기계적 상호작용에 크게 결합된 특징으로 인해 악화되었다.

2.3 생체조직공학을 위한 관류 배양(Perfusion culture)

In vitro 관류 배양의 발달은 배양에 지속적인 영양분 공급의 이점 관측을 가능케 했다. 게다가, 영양분의 지속적인 공급은 높은 세포 밀도는 얻게 해준다. 관류 흐름의 유익한 효과는 대류 수송을 유도하고 전단 응력은 세포와 조직 공학적 구조를 통한 관류 흐름이 영양 수송을 증가시키기 때문에 다양한 형태의 배양시스템을 개발했다. 신선하거나 재사용되는 배지의 지속적인 관류는 culture dish나 지지체 안의 세포에 산소 수송을 증가시킨다. 인간 세포 배양을 위한 배양시스템의 개발은 세포가 기질에 고정되거나 부착되어야 한다는 사실에 의해 큰 영향을 받는다. 관류나 지속적인 공급은 또한 고갈된 영양소를 대체하고 대사 부산물을 제거함으로써 배양 성능을 강화시켜 준다. 배양시스템은 in vivo 환경의 생물학적, 생화학적 그리고 물리학적 조건을 재생산하는 것에 초점을 맞춘다. 그 기능은 지지체 안의 세포에 적절한 영양분과 산소를 공급해주는 것과 세포 성장을 보장하고 이화 산물을 제거해주는 것이다. 다양한 형태의 배양시스템은 조직 재건이나 수선을 위한 세포 배양에 사용된다. 최근의 연구들은 균등하고 고밀도의 조직을 배양할 시 관류의 중요성을 보여준다. Gomes의 다수는 3차원 관류가 어떻게 골원성의 분화를 향상시키는지 보여주었다. 관류형 배양시스템에서, 수송 현상은 주로 대류를 통해 일어나기 때문에 세포의 대사 공급은 보다 균일하고 보급이 제한적이지 않다. 3D 배양에서 적절한 수송 속성을 보장하고 세포 주위의 미세 환경을 조절하는 배양시스템을 설계하는 것은 중요하다. 수학적 모델은 조직공학 조직 배양에 포함된 복잡한 화학적, 기계적, 생물학적 요소를 더 잘 이해하기 위해서 매우 유용하다. 특히 골아세포에 대한 많은 연구가 주목을 받은 이래로, 많은 연구들은 배양시스템 안에 유체 역학을 만들어냈다. 세포 성장과 물질 교환은 배양시스템 성능에 영향을 미치는 중요한 2가지 현상이다. 이러한 이유로, 세포 성장과 자라는 세포에 대사를 공급을 설명하는 노력이 있어 왔다. Allen과 Bhatia는 Nehring이 구형 연골세포 펠렛에 반응, 확산 모델을 제안하는 동안, 평평한 배양시스템을 세우고 정적 2D 산소 도표를 모델화 했다. Malda는 3차원 지지체안의 산소 구배 계산을 위한 수학적 모델을 개발했고 유리 미소전극에 의한 실험적 데이터를 비교했다. Pisu는 시간과 공간의 세포 밀도 변화를 설명하기 위해 반응 기간에 인구 균형을 삽입했다. 용적 평균 방법을 사용하여, Pathi는 배지가 흐르는 2개의 관류 챔버 사이에 위치한 관류형 배양시스템 상의 조혈원시세포의 성장을 위한 역학적 수학 모델을 개발했다. 모델의 한계는 그것이 정적 상태나 2D상태로 간주되어야 한다는 것이다.

산소 물질 교환은 대류와 확산에 의한 것이며 높은 산소섭취율에 영향을 준다: 더 높은 물질 교환은 더 높은 산소섭취율과 더 많은 세포 증식을 보인다. 가장 일반적이고 간단한, 조직 공학에서 배양 전략은 정적 배지에서 세포를 배양하는 것이다. 그러나, 불충분한 영양소, 폐기물 교환 때문에 장기간의 정적 배양은 제한된 세포 활성화와 구조 가운데에 ECM형성을 유발한다.

최근의 연구는 불충분한 확산과 관련한 문제들이 관류형 배양시스템을 완화시킬 수 있다는 것을 보여주고 있다.

부가적이며 결정적인 관류형 배양시스템에서의 배양 이점은 관류 유도적 기계적 자극이 기질 산물을 강화시켜준다는 것이다. 몇 가지 관류형 배양시스템은 뼈와 관절 조직공학을 위해 개발되어 왔다. 대부분의 배양시스템은 티타늄, 세라믹, 다양한 고분자물질과 같이 특별히 딱딱한 지지체 재료(modulus=1 - 3,000 MPa)를 사용하여 설계되었다.

최근에, 다공성 콜라겐과 콜라겐-글리코사미노글리칸 지지체(modulus=0.5 - 50 kPa) 와 같은 아교질 지지체는 뼈와 관절 조직공학에 좋은 가능성을 가지고 있는 것을 보여주고 있다. 정적 유체흐름은 주로 관류형 배양시스템에 쓰인다. 그러나, 뼈와 관절은 모두 in vivo에서 동적 로딩의 대상이 된다. 2차원 배양에서 골아세포는 정적, 진동성 유체 흐름과 비교하여 박동성의 유체흐름에 더 많은 기계적 응답을 보였다. 그럼에도 불구하고, 결과는 진동성 유체 흐름이 세라믹 지지체 상의 골아 세포에 의한 뼈 형성을 증가시키는데 사용될 수 있다는 것을 보여주었다. 그러므로 골아세포와 조혈모세포에 활성을 미치는 정적, 진동성, 박동성 흐름의 다른 효과를 세밀히 조사하는 것은 뼈와 관절 조직공학의 배양시스템 배양의 최적화를 위한 결정적인 정보를 줄 수 있다.

2.4 관류배양에서의 물질교환 및 전단응력 분포에 관한 모델링

배지내의 물질교환과 세포 성장 조건 하에서 전단응력 분배를 정량하기 위한 유체 역학적 모델은 조직 공학 적용을 위한 배양 시스템 설계를 촉진시켜 준다. 특히, 균등하고 양적 성장 환경을 제공하는 배양시스템은 성장 구조의 기초 연구와 인간 이식에 사용하기 위한 생화학적 생체역학적 특성을 가진 조직을 개발하기 위해 중요하다. 그러므로, 산소, 포도당 아미노산과 같은 기질 분자의 접근과 대사산물의 제거는 세포에 있어 결정적인 부분이다. 이러한 분자의 이동은 물질 교환과 같이 집합적으로 언급된다. 물질 교환은 순환 시스템과 세포 외 공간 모두에서 혈관강과 세포 멤브레인 사이의 유체 흐름에 의해 중재될 수 있다. 유체 흐름 패턴에 의한 압력 변화는 조직 변형, 역학적 로딩, 근육 수축, 흐름 그리고 맥박에 의해 유발될 수 있다. 대류는 세포가 큰 분자의 수송을 향상시키는 중요한 역할을 수행하고 있는 밀집한 세포외 기질에 박혀있을 때 특히 중요하다. 대부분의 조직들에서 농도 기울기에 따른 확산은 특히 작은 분자에 대해 물질교환을 위한 주 메커니즘이라 볼 수 있다.

관류형 배양시스템 시스템에서의 세포는 유체 역학적 전단 응력에 노출된다. 유체 역학적 전단 응력은 압축기 반경과 rpm을 증가시킨다. 전단 응력은 또한 프로브의 존재와 흐름 패턴을 방해하는 다른 내부 설비에 의해 증가된다. Gilbertson의 다수는 전조 신경 세포 합상의 배양은 계산된 최대 전단 응력을 기반으로 확장될 수 있다는 것을 보였다. 다른 줄기 세포 형태는 다른 최적의 전단 응력 값을 가진다.

대부분의 교반 리액터 안의 줄기세포는 최대 세포 밀도와 공기층에서 충분한 산소를 전송하는 배양 체적을 이용하는 것을 수행한다. 기체 방울을 살포하는 것은 큰 체적과 높은 세포 밀

도 리액터에 충분한 산소 공급을 달성하기 위해 필요할 것이다. 살포는 세포가 기체 방울에 부착되기 때문에 세포 손상을 일으키고 거품이 파열하는 동안 높은 전단 응력을 받는 대상이 된다.

Computational fluid dynamic (CFD) 모델은 배양시스템 안에 유체 흐름과 배양 구조 표면상의 전단 응력을 측정하기 위해 이전부터 개발되어 왔다. CFD 모델은 역학적 기계적 압축에 의해 유도되는 유체 흐름과 같은 조건을 결정하는 데 사용되어 왔다. CFD 모델링은 레이저 도플러 풍력 측정법과 입자영상유속계 같은 실험적 속도 파형 기술에 의해 입증된 모델을 제공하는 유동장 특성화에 가장 효과적인 기술 중 하나이다.

이러한 연구들에서, 지지체 안의 실제 유체 역학은 지지체를 다공성 연속체 모델로 간주하기 때문에 값을 구할 수가 없다. 지지체 구멍안의 국부적 유체역학 환경을 더 좋게 하려는 시도 속에서, CFD 모델은 이상적인 지지체 구조물을 기반으로 개발되었다. 이러한 모델들은 3D 지지체의 내벽 표면에서 작용하는 전단응력의 견적을 제공한다. 최근에, 3차원 지지체의 μ CT 재건에 기반한 미세크기 CFD모델이 소개되었다.

확산과 반응 사이의 관계를 설명한 미분방정식을 무차원으로 만들 때., ϕ^2 로 표시된 변수는 확산의 상대속도에 대한 반응의 상대속도에 대한 것으로 얻는다. $\phi^2 = 1$ 일 때, 산소 농도는 표면 농도의 50%이다. $\phi^2 = 2$ 일 때, 산소 농도는 0이 된다. 세포 밀도와 확산 거리 제한의 대략적인 견적은 $\phi^2 = 1$ 로 설정할 때 만들 수 있다. 식(7-3) 방정식은 지지체 안의 세포의 산소 확산과 반응 역학을 계산할 때 사용된다.

$$\frac{d(C/C_0)}{d(x/L)} = \phi^2 = \frac{[cell]Q_{oxygen}L^2}{C_0D_{oxygen}} \sim \frac{Reaction\ rate}{Diffusion\ rate} \quad (7-3)$$

지지체 중심의 확산 거리는 L로 정의한다. 지지체 안의 세포 농도는 [CELL]로 표시한다. 장치 표면의 산소 농도는 C_0 로 정의한다. 산소는 이식 부위로 확산하고 Q_{cell} 이 초당 세포의 산소 소비율이고, x는 기질 안의 깊이일 때, $Q_{O_2} = Q_{cell}x[Cell]$ 의 체적 비율에서 세포에 의해 소비된다. DO_2 가 산소의 확산 계수이고 C가 장치 안의 국부적 산소 농도일 때, 확산과 소비 사이의 관계를 결정하는 방정식은 $DO_2 \frac{d^2C}{dx^2} = Q_{O_2}$ 이다. 다음 방정식의 풀이는 장치 안의 산소 농도를 알려준다: $C/C_0 = 1 - Q_{O_2} L^2/(DO_2 C_0) [x/L - 0.5(x/L)^2]$. 최소의 산소 농도는 장치 안의 중심부에서 나타날 것이다(i.e, $x=L$). 장치의 중심부의 산소 농도를 0보다 크게 하기 위하여, 변수를 $Q_{O_2} L^2/(DO_2 C_0)$ 로 묶는 것은 2보다 작아야 한다. 그러므로, 중앙 피사 없이 산소 확산이 이루어지는 최대의 세포 농도는 $Cell < 2DO_2C_0/(Q_{cell}L)$ 로 재배치해 나타낼 수 있다. Cioffi와 다수는 관류형 배양시스템 시스템의 3차원 지지체 안에서 배양되는 인체 연골세포의 산소 수송과 유체 전단 응력을 정량하기 위해서 매크로 스케일과 마이크로 스케일을 조합한 연산 접근법을 발표했다.

3. 재료 및 방법

3.1 관류식 세포배양 챔버시스템

조직공학을 위한 새로운 관류식 세포 배양용 챔버(chamber)시스템을 개발하였다. 이 챔버 시스템은 가열부분, 60 mm cell culture dish, 배지 관류를 위한 입구 및 출구 부분, CO₂ 공급 출입구 부분, 기체 확산 부분, 온도 센서로 구성되어 있다. 이 세포 배양 챔버시스템은 주로 치조골 골수줄기세포를 사용하는 치조골 조직공학을 위해 설계되었다. 이 시스템은 출입구 필터 (0.2 μm pore size, PALL)를 통과하는 순환 기체(95% 공기, 5% CO₂)로 구성된다. 기체는 지속적으로 정밀 유량계 챔버(Dwyer, Rate-Master[®] Flowmeter, USA)로 공급되었다. 배양시스템 시스템은 뚜껑에 커버 글라스와 세포 배양 챔버 그리고 바닥은 유리창으로 구성되어있다.

Fig. 7-2는 분해된 배양시스템 시스템의 개략도(A)이며 이 시스템의 사진(B)이다. 특히, 바닥의 동그란 유리는 세포 배양을 모니터할 수 있는 창이다. 이 배양시스템은 관류 배양 시스템이다. 배지는 다양한 연동 펌프에 의해 저장용기에서 세포 배양 챔버로 공급되고 다른 펌프에 의해 폐기물 병으로 제거된다. 이 시스템을 연결하는 데 사용하는 튜브는 내경 1/16 in (1.59 mm)이고 외경 1/8 in (3.20 mm)인 Tygon R3603 라는 특수한 튜브이다. 이 튜브는 가압멸균이 가능하며 가스 투과성이 있기 때문에 사용되었다.

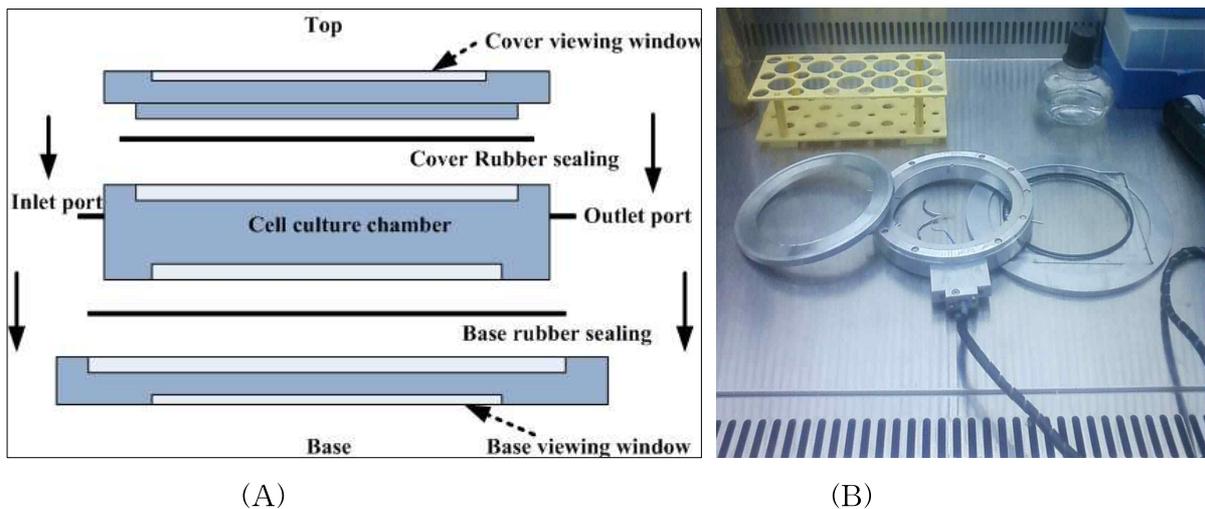


Fig. 7-2. The developed perfusion flow bioreactor system: (A) schematic of disassembled bioreactor; top (ϕ :140 mm, h :7mm), cover viewing window (ϕ :110 mm), base (ϕ :180 mm, h :6mm), base viewing window (ϕ :110 mm), inlet (ϕ :1/8 in), outlet (ϕ :1/8 in), and cell culture chamber (ϕ :140 mm, h :25mm); (B) photograph of disassembled bioreactor

가압멸균을 고려하여, Fig. 7-2에서 보여 지듯이 배양 챔버시스템을 구성하는 뚜껑, 챔버, 바닥, 봉합부, 입출구 등이 쉽게 분리되도록 설계하였다. 가압멸균기(Autoclaves-Steam Sterilizer, DAIHAN-sci, Korea)사용해 커버 글라스와 봉합부의 70%를 담그고 1시간 동안 멸균했으며, 밤새 말린 후, 자외선을 각 면에 1시간씩 비추고, 증류수로 3번 씻어냈다. 이 시스템

은 세포 배양 후드 안에서 멸균을 유지한 채 조립되었다.

3.2 새로운 관류식 배양 시스템

이 연구에서 개발된 새로운 세포배양용 챔버시스템과 제어장치는 Fig. 7-3(A-C)에서 보이는 것과 같다. 또한, Fig. 7-4(A)는 관류 배양을 위한 간단한 디자인을 개략적인 다이어그램으로 보여준다. 이 관류식 배양시스템은 주로 세포 chamber 시스템, 배지를 순환시키는 다양한 유동 펌프(400 low flow pump, Watson-Marlow Bredel Pump, South Korea), 배지 용기, 자성 교반장치 그리고 챔버시스템에 온도와 CO₂를 지속적으로 공급해줄 제어장치로 구성하였다. 또한, 살아있는 세포의 이미지화를 위한 역상 현미경, 모니터링 시스템, 폐배지 용기, CO₂ 조절 장치, 멤브레인 필터 등은 세포 배양 챔버시스템에 연결하였다. 이 시스템에 Fig. 7-4(B)에서와 같이 챔버를 통과하는 배지의 관류 배양을 위해 내외에 출입구를 장착하였다.



Fig. 7-3. A novel perfusion flow chamber system and its controller; (a) image of a novel perfusion chamber system on the microscope stage, (b) image of medium perfusion in a novel perfusion chamber system, and (c) temperature(37°C) and 5% CO₂ controller

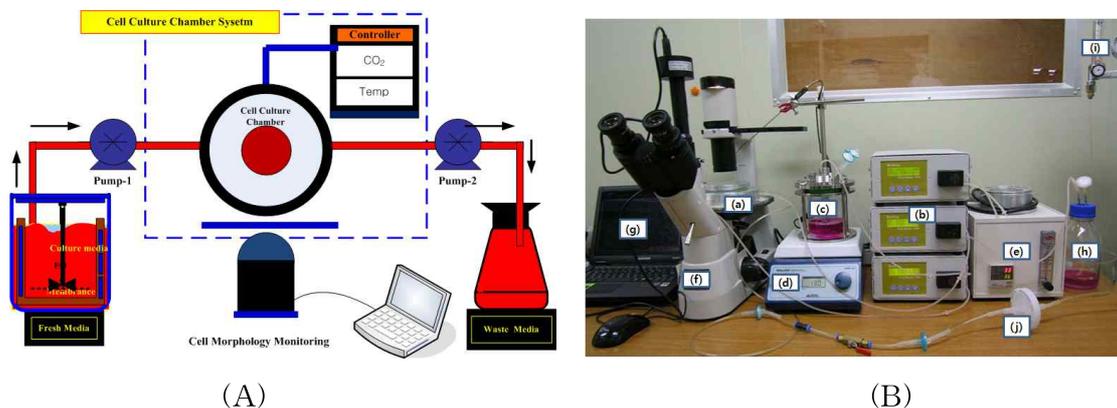


Fig. 7-4. Schematic diagram of the bioreactor design (A) and a perfusion culture system and its elements (B); (a) a perfusion flow cell chamber system; (b) variable peristaltic pumps to circulate the medium; (c) a reservoir vessel; (d) a magnetic stirring device; (e) controller for temperature and CO₂ gas control into cell chamber system; (f) an inverted

microscope; (g) monitoring system; (h) a waste medium bottle; (i) CO₂ regulating device; and (j) a 0.2 μm membrane filter.

3.3 치조골 골수줄기세포 배양

치조골 골수줄기세포는 Intellectual Biointerface Engineering Center, Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University에서 공급받았다. 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS, Welgene inc., south korea), 10 mM ascorbic 산 (L-ascorbic acid) 그리고 항생제와 탄산수소나트륨을 포함한 α-minimum 필수 배지에서 37°C, 대기 중 습도, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양되었다. 배지는 매일 바꾸어주었다. 치조골 골수줄기세포는 부착을 촉진하기 위해 24시간이 지난 후 배양했다. 세포들이 합쳐졌을 때, 1mL trypsin-EDTA로 분리시키고 계대배양을 수행하였다. 인간 치조골 골수줄기세포가 합쳐지기 전에 계대배양을 하였고 본 실험에서 5~6번의 계대배양을 수행하였다.

3.4 Live cell imaging의 지속적인 모니터링

세포 배양 챔버시스템은 주로 치조골 골수줄기세포를 실시간 모니터링하기 위해 설계되었다. 이 발달된 관류 배양시스템은 Fig. 4-3에서 보이는 것과 같이 역상 현미경 위에 쉽게 위치할 수 있다. Chamber 시스템에서 배양되는 인간 치조골 골수줄기세포의 Live cell image를 위상차 현미경(Nikon TS100, Japan)과 디지털 카메라 (ScopeTek DCM200, China)를 사용하여 4일 동안 30초 간격으로 찍었다. 세포 형태 이미지는 정확하게 컴퓨터 스크린에 나타났다. 세포 형태는 세포 성장과 치조골 골수줄기세포의 움직임과 같은 세포의 가능성에 대한 기본 정보를 제공한다.

3.5 세포 생존 기반 WST-1 테스트 분석

치조골 골수줄기세포 증식은 WST-1 assay (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit, Daeillab Service Co., LTD) 기법으로 측정하였다. 최근에, colorimetric assay 기법이 배지에 첨가하는 tetrazolium salts의 분열에 의해 생존하는 세포를 분석하는데 이용이 가능해졌다. 이 assay 기법은 생존 세포만이 보이는 활동과 미토콘드리아의 호흡 작용에 속하는 succinate-tetrazolium 환원 효소 시스템에 의해서, tetrazolium salt WST-1이 수용성 formazan에서 분열하는 것에 기반하고 있다. 그러므로 formazan 염색 양이 직접적으로 살아있는 세포의 수와 비례한다. 생존 세포에 의한 Formazan 염색은 multi-well spectrophotometer (Victor 3, Perkin Elmer, USA)를 이용해 460 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다.

3.6 정적 배양과 관류 배양

치조골 골수줄기세포는 처음 세포 밀도 3.0×10^4 cells/ml로 60 mm Nunc's culture dish에서 4일 동안 배양하였다. 배지는 매일 바꾸었다. 치조골 골수줄기세포의 세포 형태는 위상차 현미

경으로 관찰하였다. 배지 용기는 500 ml의 완전한 배지로 채워지고 실리콘 고무로 밀봉하였다. 배지는 Watson-Marlow 400을 사용하여 낮은 흐름으로 지속적인 공급을 하였다. 배양 chamber 시스템에 세포가 부착된 지 12시간이 지난 후, 펌프를 가동시켰다. 관류 속도는 각각 0.03과 0.3 ml/min이었다. 정적 배양(관류가 없는)과 관류 배양은 4일 동안 지속되었다. 1일 관류 속도에 따라 50 ml에서 450 ml까지 신선한 배지로 대체하도록 하였다. 본 연구에서 정적 배양은 관류 없이 전형적인 culture dish와 배양 챔버시스템에서 37°C, 5% CO₂, 0.2 µm 멤브레인 필터를 사용한 95%의 필터처리 실내 공기 속에서 수행하였다.

3.7 통계 분석

통계 분석은 SAS Statistical Analysis System for Windows v8.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 실시하였다. 실험군과 대조군 사이의 통계적 의미는 ANOVA와 $p < 0.05$ 일 때 Duncan's multiple range test 두 방향으로 비교하였다. 데이터는 ±표준 편차의 의미로 보고했다.

4. 결과 및 고찰

4.1 개발된 배양시스템 시스템을 사용한 정적 배양과 관류 배양의 비교

Fig. 7-5는 개발한 배양시스템에서, 72시간 동안 정적 배양과 동적 관류 배양에서 치조골 골수줄기세포의 세포 성장 형태를 보여주는 것이다. Fig. 4-5를 보면 알 수 있듯이, 세포 성장 형태는 개발된 챔버시스템에서의 관류식 배양이 정적 배양과 비슷한 것을 보여준다.

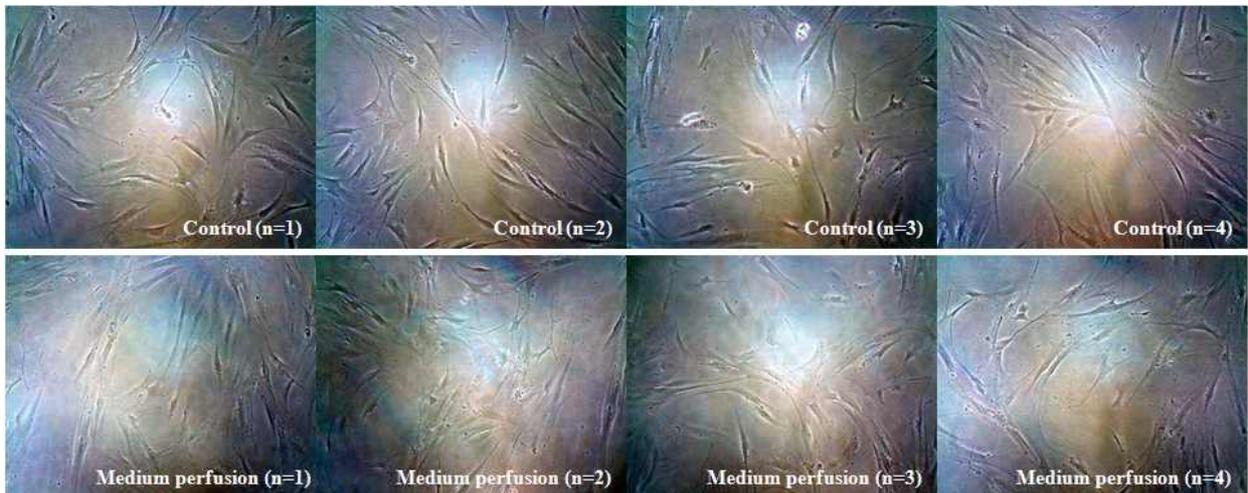


Fig. 7-5. Morphology of alveolar bone marrow stem cells in a static culture (without perfusion) and a medium perfusion flow culture using the developed perfusion bioreactor system.

4.2 기존 배양과 개발된 배양시스템 시스템 사이의 세포 생존

Fig. 7-6은 통제군(전형적인 CO₂ 인큐베이터 배양)과 개발된 배양시스템 시스템을 4일 동

안 관류 배양하지 않았을 시 세포 생존을 비교한 것이다. Fig. 4-6에서 나타나듯, 새로운 관류 챔버시스템을 사용한 세포 성장 비율(배지 관류 없이)과 정적 배양의 세포 생존을 비교했을 때 비슷한 추세를 보였다($p>0.05$). 개발된 시스템과 전형적인 CO₂ 인큐베이터 배양 사이의 이러한 세포 생존 결과에 따라, 새로운 관류 챔버시스템이 잘 설계되었음을 알 수 있다.

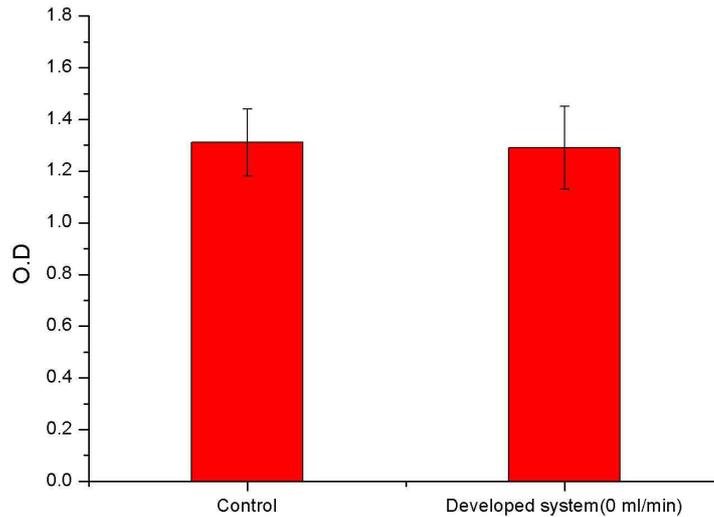


Fig. 7-6. Comparison of cell viability between the control (conventional culture at the CO₂ incubator) and the developed bioreactor system without perfusion (0 ml/min) for 4 days.

4.3 정적 배양과 개발된 배양시스템 시스템을 사용한 관류 배양 사이의 세포 생존

Fig. 7-7은 정적 배양(관류가 없는)과 개발된 배양시스템 시스템을 사용한 관류 배양 사이의 세포 생존의 결과를 보여준다. 관류 배양의 유속은 4일 동안 각각 0.03과 0.3 ml/min으로 작동시켰다. 또한, 정적 배양과 관류 배양은 4일 동안 지속하였다. Fig. 7-7의 결과는 4일 동안 0.03 ml/min의 관류 배양의 세포 성장률이 정적 배양 조건보다 월등히 높게 나왔다는 것을 보여준다. 또한, 0.3 ml/min보다 0.03 ml/min에서 보다 큰 세포 성장이 나타났다. 본 연구의 이러한 실험 결과에 따라, 0.03 ml/min의 낮은 유속이 정적 배양보다도 세포 성장을 높여주는 것을 알 수 있었다. 0.03 ml/min의 정확한 관류 배양에서 세포 성장률이 약 110~115% 효과적으로 증가하였다.

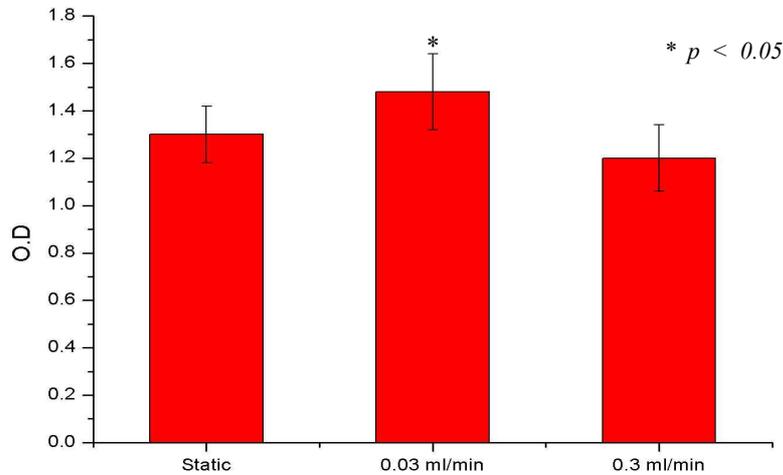


Fig. 7-7. Comparison of cell viability between the static culture (without perfusion) and the perfusion flow culture using the developed bioreactor system (the perfusion rate was 0.03 and 0.3 ml/min, respectively).

4.4 세포의 실시간 연속적인 모니터링

관류 배양시스템 시스템에 설치한 역상 현미경으로부터 살아있는 세포의 이미지를 얻었다. 개발한 배양시스템은 치조골 골수줄기세포 배양을 성공적으로 유지하고 기록하였다. Fig. 7-8은 개발된 배양시스템 시스템을 통해 찍은 살아있는 세포 형태를 보여준다. 세포 행동과 세포 분열에 대해 관찰하였다. 관류형 배양시스템에서 배양한 살아있는 세포 형태를 모니터하고 찍는 것이 가능했다. 이 연구의 배양시스템 설계의 핵심요소는 인큐베이터 환경에서 세포 활동을 진행시키는 동안 살아있는 세포를 모니터할 수 있는 능력과 사용의 용이성이었다. 그러므로 온도 평가와 pH 안정성, 시스템의 충실한 이미지, 흐름의 영향 그리고 세포 생존상의 CO₂ 비의 존적 세포 성장배지 등은 배양시스템의 유용성을 결정하는 중요한 요소들이다. 특히, 기존 현미경에 맞는 배양챔버시스템의 설계로, 배양시스템의 높이가 그것의 기능과 디자인의 핵심요소로 간주될 수 있다. 개발된 배양시스템 시스템의 이미지 창은 지름 110 mm이다. 이 챔버는 지름 140 mm와 깊이가 25 mm로 cell culture dish를 놓기 위한 적절한 공간을 제공한다. 온도와 CO₂의 안정성을 측정하기 위해, 이 배양시스템 시스템은 세포 배양 조건에서 지속적으로 작동하였다. 그리고 세포 배양챔버시스템 안에 열전대를 배치했다. 이 시스템의 온도의 안정성은 4일 동안 지속적으로 모니터하였다. 온도 시스템이 37°C에 도달하자마자, 4일 동안 온도를 37±1°C로 안정하게 유지하였다.

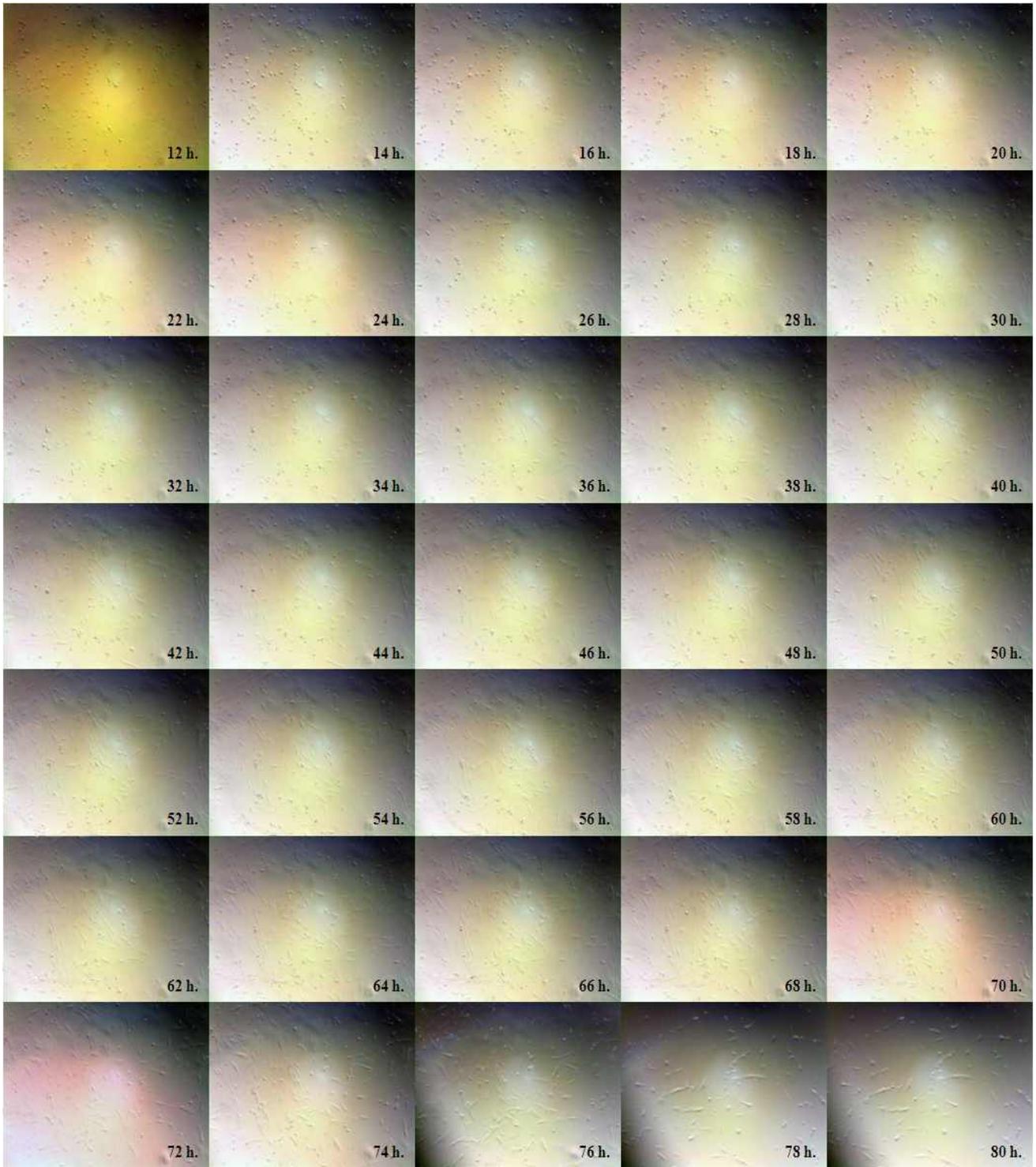


Fig. 7-8. Live cell images of alveolar bone marrow stem cells captured using the developed bioreactor system for about 3 days.

5. 요약 및 결론

본 연구에서, 새로운 관류식 배양시스템 시스템을 개발하고 평가하였다. 세포 생존 능력 테스트에서 관류식 배양 챔버시스템의 세포 성장은 정적 배양과 비슷한 추세를 보였다. 또한, 살아있는 세포는 개발된 시스템에서 연속적인 기간 동안 관찰할 수 있었다.

본 연구에서 개발된 관류 배양시스템은 세포 생존 결과를 통해 보았을 때, 정적 배양보다 관류 배양시의 세포성장률이 약 115%로서 현저하게 높은 것을 보였다. 그러므로 이 시스템은 치조골 골수줄기세포 배양에 성공적으로 사용될 수 있다. 또한, 이 시스템은 살아있는 세포의 형태를 모니터링하고 찍는 것도 가능하다. 이식 조직 형성에 관하여, 배양시스템 시스템은 배양 계획, 생체검사 포함, 세포 확장, 세포 증식 그리고 배양시스템에 세포 심기 등을 완전하게 통합해야만 한다. 이 배양 시스템은 조직 공학적 치조골을 생산하는데 필요한 세포에 줄기세포 분화를 촉진할 수 있는 *in vivo*환경을 보다 면밀히 모방한 *in vitro*환경의 적용을 가능하게 해준다.

제 8 절 동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 의 개발 및 성능 개선

1. 서론

최근에 세포에 유체흐름을 가한 전단응력에 대한 기계적 자극 영향에 대한 연구들이 중요시되고 있다.(Bancroft et al., 2002; Martin and Vermette, 2005; Pathi et al., 2005; Yu et al., 2004) [1,2,3,4]. 이러한 생체 외 배양에 대한 연구는 생체 내 배양환경을 생체모방하려는 연구의 일환이다. 생체 내의 역학적전이(mechanotransduction)는 세포에게 기계적 자극을 가하고 이는 즉, 생체화학적 신호로 전환되는 에너지 변환의 일환이다. 전단응력은 특히, 역학적전이활동을 증대시킴으로써 가장 중요한 기계적 자극 중의 일부로 여겨진다. (Liebschner, 2004; Sikavitsas et al., 2001; Vance et al., 2005; Weinbaum et al., 1994) [5,6,7,8]. 또한, perfusion flow bioreactor는 체외세포의 합성 및 미네랄생성 등을 촉진시킴으로써 골아세포의 활동을 촉진시킬수 있는 인자들과 상당히 관련됨을 보고하고 있다. (Altman et al., 2002; Janssen et al., 2006; Wang et al., 2002) [9,10,11].

일반적으로, 배양시스템은 세포가 자랄 수 있는 환경을 제공하도록 설계하는 것이다. 대부분의 관류식 흐름형태인 배양시스템은 일반적인 환경, 즉 온도 37°C, CO₂ 5%환경에서 이루어지지만, 실시간 세포배양 이미지 모니터링은 가능하지 못한 실정이다. (Hoerstrup et al., 2000; Powers et al., 2002; Vance et al., 2005; Williams and Wick, 2004)[15,16,17,18,]. 실시간 세포 배양 모니터링을 위한 관류식 흐름 배양시스템은 부착성세포 또는 단일세포를 고려해서 설계되고 있다(Focht, 1996; Hing et al.,2000) [19,20]. 이러한 시스템개발에 있어서, 세포배양 배지는 챔버 내에서 적절한 배지 흐름속도를 유지하면서 순환시킬 수 있어야 한다. 유체의 흐름에 대한 영향은 세포에게 각각 다른 자극을 제공하는데, 특히, 전단응력과 streaming electrical potentials 신호를 제공한다(Salzstein et al., 1987; Salzstein and Pollack, 1987) [21]. 많은 연구자들이 보고하기를 이러한 유체의 흐름에 대한 세포의 영향은 streaming electrical potential 보다는 유체의 흐름에 의한 전단응력에 기인한 것으로 보고되고 있다 (Bakker et al., 2001) [22].

조직공학과 관련해서, 배양시스템은 3차원 조직을 재생시키고자 세포의 증식용으로 사용될 수 있고 특히 장기의 장기적 배양을 위한 support장치로서 부각될 수 있다 (Shachar et al., 2003) [23]. 이러한 배양시스템은 산소의 전달, pH, 온도, 기계적 자극뿐 아니라 멸균상태의 공급과 샘플링 운전이 가능하도록 제어되어야 한다. 게다가, 배양시스템은 자동적인 운전스텝이 요구되어진다. 이 시스템은 기본적인 세포의 증식을 위한 연구뿐 아니라, 임상의 응용측면이나 drug screening 측면에서도 응용가능성이 있다 (Nagelheyer et al., 2005)[24]. 이러한 시스템을 설계할 때 가장 중요한 설계인자들로서는 세포의 집착성을 고려하고, 배지의 순환, 영양소의

상태파악, pH, 온도, 배양배지내의 용존산소량(DO) 상태, CO₂, O₂, flow perfusion rate, 기계적 자극과 같은 자극기술 등을 모두 고려해야 한다.

본 연구의 목적은 동물 (줄기)세포를 생체내에서 배양되는 것처럼 생체의 배양을 목적으로 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 개발함으로써 생체모방형 생체의 세포 배양시스템을 개발하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 관류식 배양시스템의 공정도

Fig. 8-1은 인간 치조골 줄기세포 배양을 위한 관류식 배양시스템의 공정도를 나타낸다.

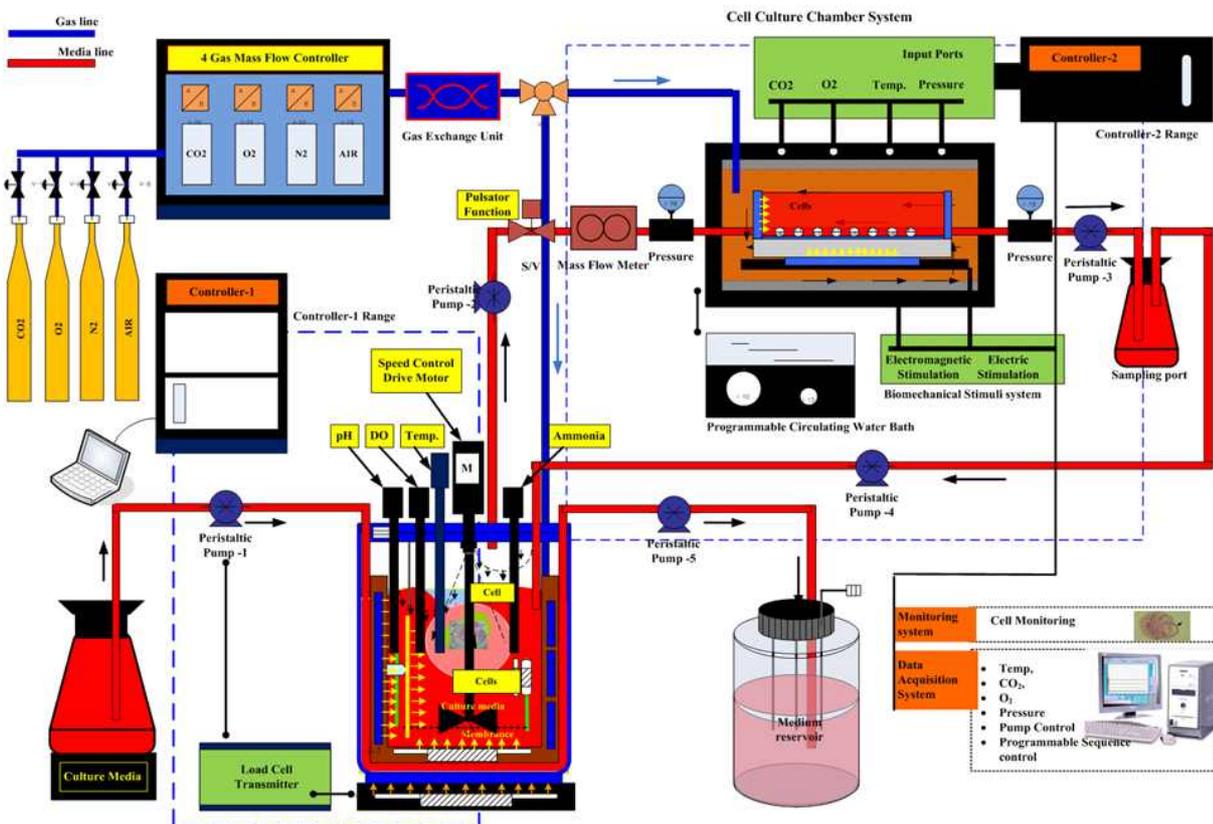


Fig. 8-1. Schematic layout of perfusion flow culture system developed with a cell culture chamber system, gas mass flow controllers, precision peristaltic pumps, vessels for fresh and spent medium, and a monitoring system.

2.2 관류식 배양시스템 설계

Fig. 8-2는 관류식 배양시스템의 P & ID(Piping & Instrument Drawing)를 나타낸다. 시스템 설계시 주 요소로는 신선한 배지의 Injection Part, 배지를 순환시키기 전 신선 배지를 제어해주는 신선 배지용기(Control based Vessel, 교반 및 pH, DO 등 계측 part), 세포를 직접 배양시키는 배양 챔버시스템 및 세포환경 계측부, 배지의 pH 및 DO를 유지시키고 세포배양 환경을 최적화시키기 위한 CO₂, O₂, N₂, AIR 의 4-gases 혼합용 MFC(mass flow controller) 제어부, 마지막으로 사용된 배지를 적정 조건별로 선택하여 배출시킬 수 있는 폐기용기(waste vessel) 제어부로 구분 할 수 있다.

본 연구에 사용한 가변식 정량펌프로는 Variable Speed Peristaltic Pump 에 의해서 제어가 된다 (Table 8-1).

Table 8-1. The specifications of the peristaltic pump used in this study

<i>Items</i>	<i>Specifications</i>
Silicone tubing	1.6 mm wall tubing
Maximum pressure	bar 2.4 with silicone tubing
Tube bore	1.02
Flow rate(ml/revolution)	0.001 (ID :0.13 mm)
Max. low rate	0.01 ml/min
Min. flow rate	34 ml/min

적정 세포배양을 위해서는 정밀제어가 가능한 정량펌프를 이용하는데, 약 0.03~0.1 ml/min 에서 배양배지를 공급해주고 순환시켜준다. 이러한 적정배지는 세포에게 적당한 전단응력 (shear stress)를 유발하여 성장에 긍정적인 환경적 영향을 제공해 줄 수 있다. 또한, 세포의 신진대사에 의해 발생하는 젖산(lactic acid)를 펌프로서 선택적으로 제거가 가능하다. Table 8-2는 P&ID design 의 BOM (Bill of Material) 리스트를 나타낸다.

Table 8-2 Material list for P & ID design of a novel perfusion culture system

No		Description	Item	Spec
1	G01	Gas Line	4 Gas Mixer(MFC Type)	CO2, O2, N2, Air(500cc/min)
2	G02	Gas Line	MFC ReadOut	
3	G03	Gas Line	Gas Mixing Unit	N/A
4	G04	Gas Line	Air Flow Meter(GX2에 포함)	0~500CC/min
5	G05	Gas Line	Hose Tee	1/16" Hose Tee
6	G06	Gas Line	Hose Clamp	
8	G08	Gas Line	Air Filter	0.2um
9	G09	Gas Line	Silicon Hose	
11	G21	Gas Line	Hose Reducer	Φ6.35 x Φ4
12	G22	Gas Line	One Touch Fitting	TeeΦ4
13	G23	Gas Line	Uretan Hose	Φ4
15	F01	Vessel Unit	500ml Vessel	Φ85 x 118H(3 Arm)
16	F02	Vessel Unit	Servo Motor	APM-SA01ACN (100W)
17	F03	Vessel Unit	Servo Motor Controller	APD-VS01N
18	F04	Vessel Unit	pH Sensor	InPro3030/120
19	F05	Vessel Unit	DO Sensor	InPro6800/12/120
20	F06	Vessel Unit	Temp Sensor	Φ4 x 160
21	F07	Vessel Unit	Heater Plate	210 x 210
22	F08	Vessel Unit	Load Cell	200 x 200 x 18t (20kg)
23	F09	Vessel Unit	Load Cell Transmitter	
25	M01	Media Line	Cooler	10℃
26	M02	Media Line	Media Bottle	500ml
27	M03	Media Line	Air Filter	0.2um
28	M04	Media Line	Peristatic Pump	#400
29	M05	Media Line	Gerd Motor(Peristatic Pump용)	0.01~1ml/hr
30	M06	Media Line	Peristatic Pump	#400
31	M07	Media Line	Gerd Motor(Peristatic Pump용)	0.01~1ml/hr
32	M08	Media Line	Pressure Transmitter	
33	M31	Media Line	Pressure Indicator	
34	M09	Media Line	Mini Incubator	
35	M10	Media Line	ISFET pH Sensor(Incubator)	
36	M37	Media Line	ISFET pH Sensor Indicator	
37	M11	Media Line	O2 Sensor(Mini Incubator용)	
38	M32	Media Line	O2 Sensor Indicator	
39	M12	Media Line	CO2 Sensor(Mini Incubator용)	
40	M33	Media Line	CO2Sensor Indicator	
41	M13	Media Line	Temp Sensor(Mini Incubator용)	
42	M34	Media Line	Temp Indicator	
43	M14	Media Line	Humidity Sensor(Incubator용)	
44	M35	Media Line	Humidity Indicator	
45	M15	Media Line	Peristatic Pump	#400
46	M16	Media Line	Gerd Motor(Peristatic Pump용)	0.01~1ml/hr
47	M17	Media Line	Sampling Bottle	
48	M18	Media Line	Pressure Transmitter	
49	M36	Media Line	Pressure Indicator	
50	M19	Media Line	Peristatic Pump	#400
51	M20	Media Line	Gerd Motor(Peristatic Pump용)	0.01~1ml/hr
52	M21	Media Line	Hose Tee	1/16" Hose Tee
53	M22	Media Line	Hose Clamp	
55	M24	Media Line	Media Bottle	1000ml

Fig. 8-3은 관류식 배양시스템을 개발하고자, 세포가 직접 배양할 수 있는 환경을 제공해주는 세포 배양 챔버의 설계도를 나타낸다. 본 시스템의 가장 큰 특징은 세포의 배양환경을 실시간으로 Live-cell monitoring이 가능하도록 설계하였으며, 세포 환경제어가 가능하도록 pH, DO, CO₂, O₂ 및 온도, 습도 등을 설치하여 실시간으로 자료수집하여 분석할 수 있다. 또한, 가변식 정량 펌프를 통해서 배지의 working volume을 약 3 ml로 정밀하게 유지할 수 있도록 기구학적으로 설계하였다.

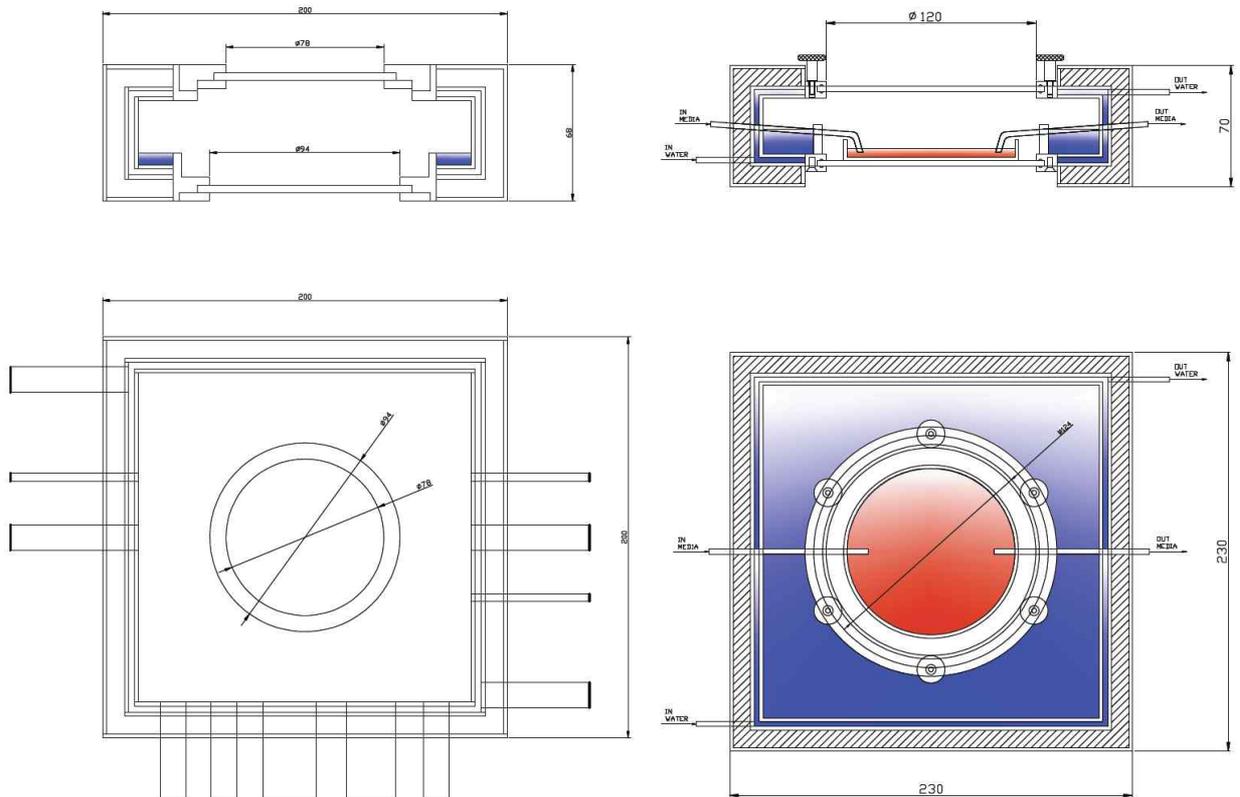


Fig. 8-3 P & ID design of cell culture chamber system

2.3 관류식 배양시스템의 제작 및 개발

Fig. 8-4는 (주)바이오톨론의 연구소에서 본 관류식 배양시스템의 제작 및 개발을 수행하고 있는 모습을 보여준다. 또한, Fig. 8-5는 현장에서 개발된 시스템의 평가 및 보완작업을 수행하고 있는 그림을 보여준다.

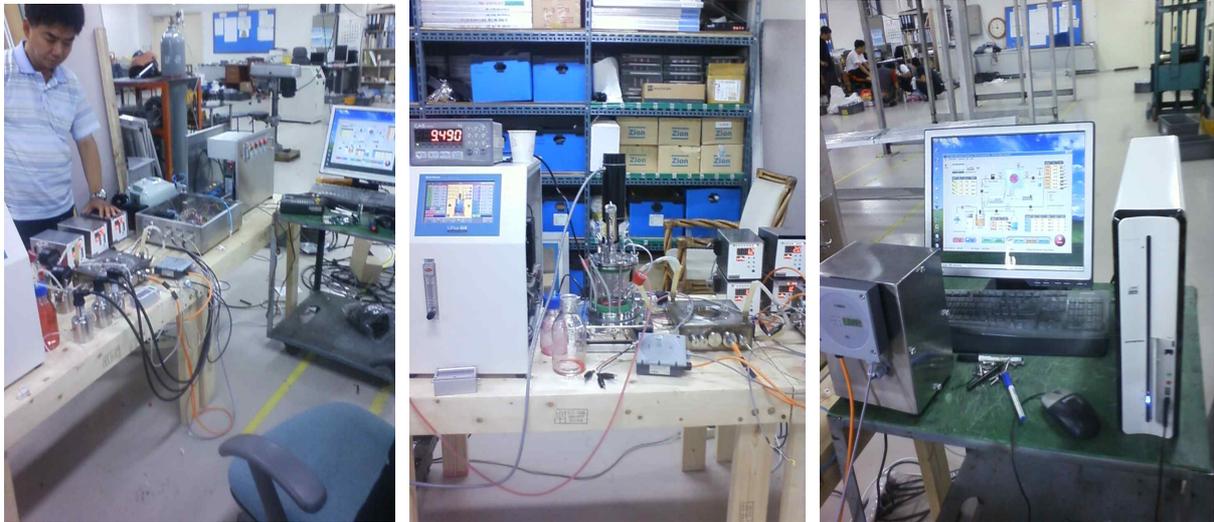


Fig. 8-4 Pictures of a perfusion flow culture system developed at the BIOTRON Inc.

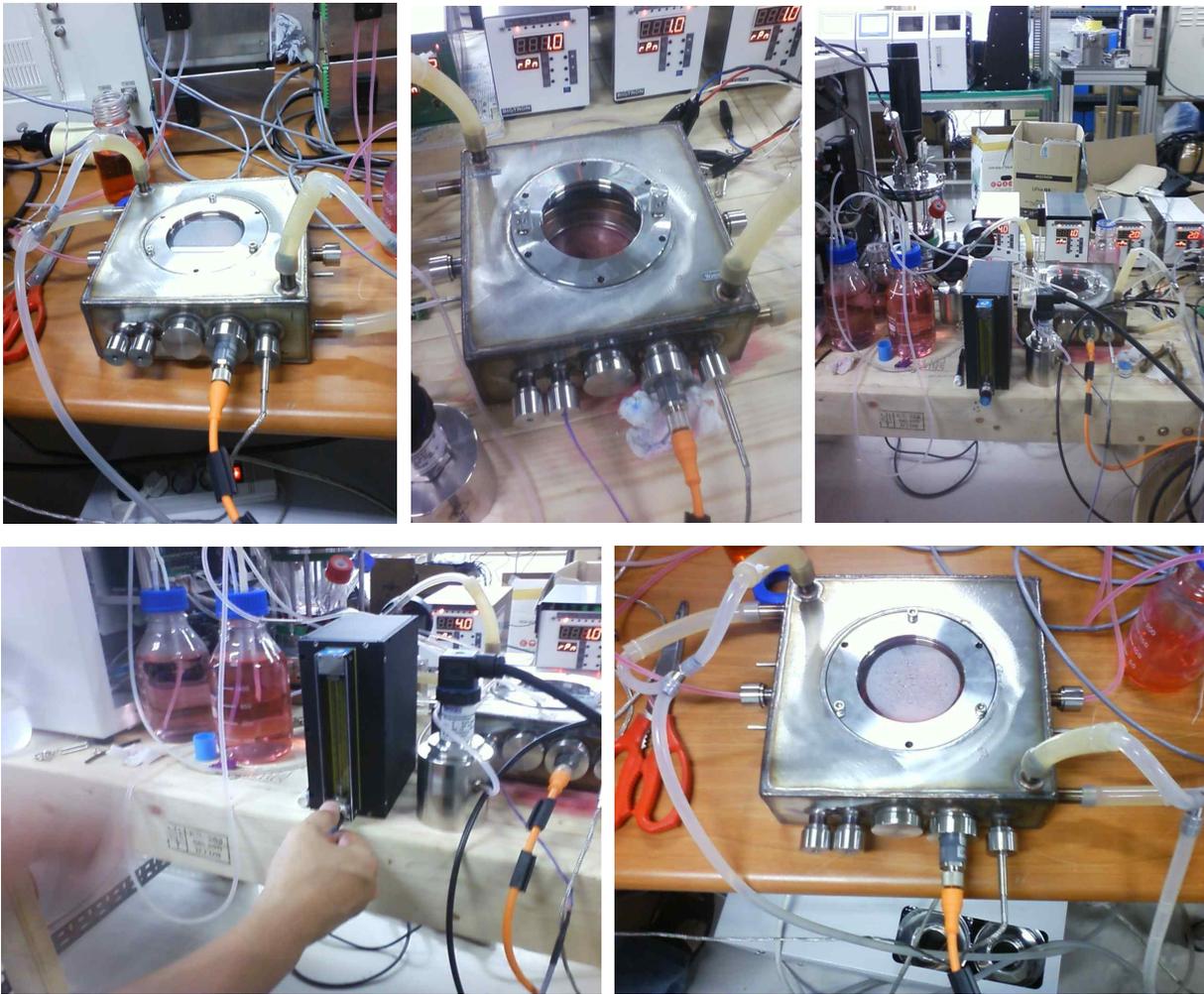


Fig. 8-5 Validation of a perfusion flow culture system made at the BIOTRON Inc.



Fig. 8-6 Validation of a 4 gas mass flow controller(air, N₂, CO₂, O₂) of a perfusion flow culture system made at the BIOTRON Inc.

2.4 3차원 관류식 배양시스템의 제작 및 개발

Fig. 8-7은 3차원 관류식 배양시스템을 개발하고자, 세포가 직접 배양할 수 있는 환경을 제공하는 세포 배양 챔버 내에 3차원 지지체를 삽입하여 조직을 재생시킬 수 있는 3차원 관류식 배양시스템의 설계도를 나타낸다. 본 시스템의 가장 큰 특징은 세포 환경제어(pH, DO, CO₂, O₂ 및 온도, 습도 등)가 가능하도록 설계된 배양 시스템 내에 3차원 배양을 할 수 있도록 설계 및 제작하였다.

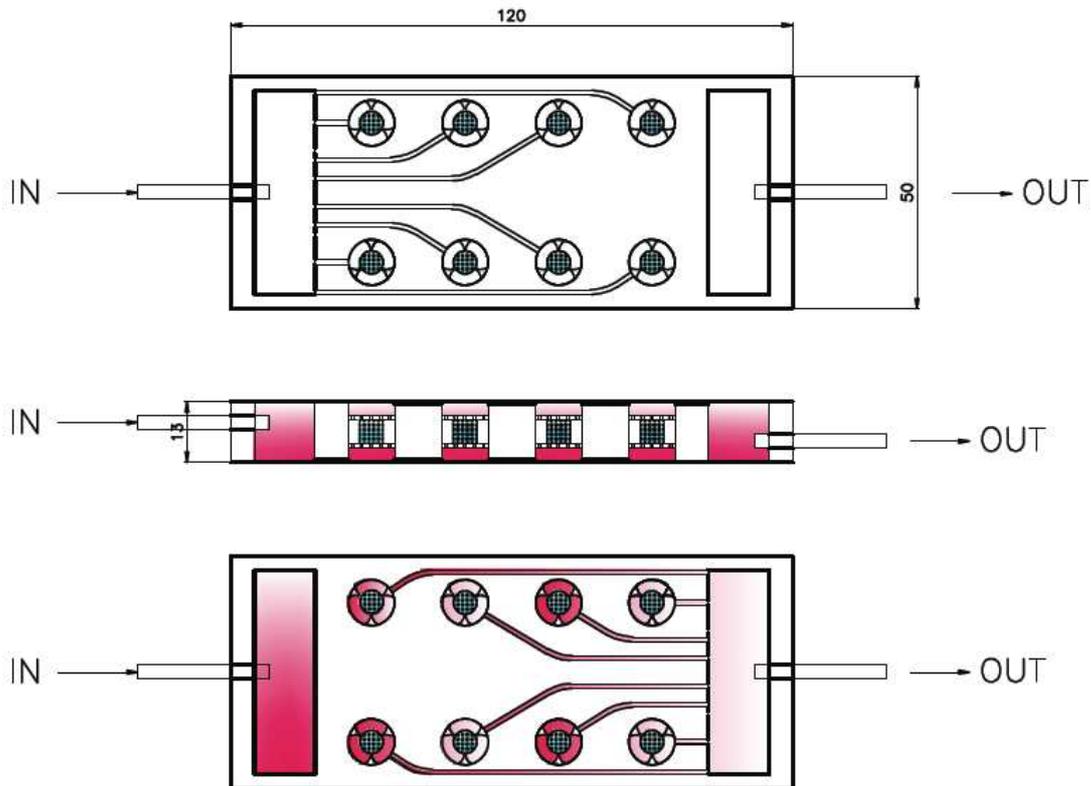


Fig. 8-7 P & ID design of 3D cell culture chamber system

Fig. 8-8은 본 연구의 인간 치조골 줄기세포 배양을 위한 3차원 관류식 배양시스템의 공정도를 나타낸다.

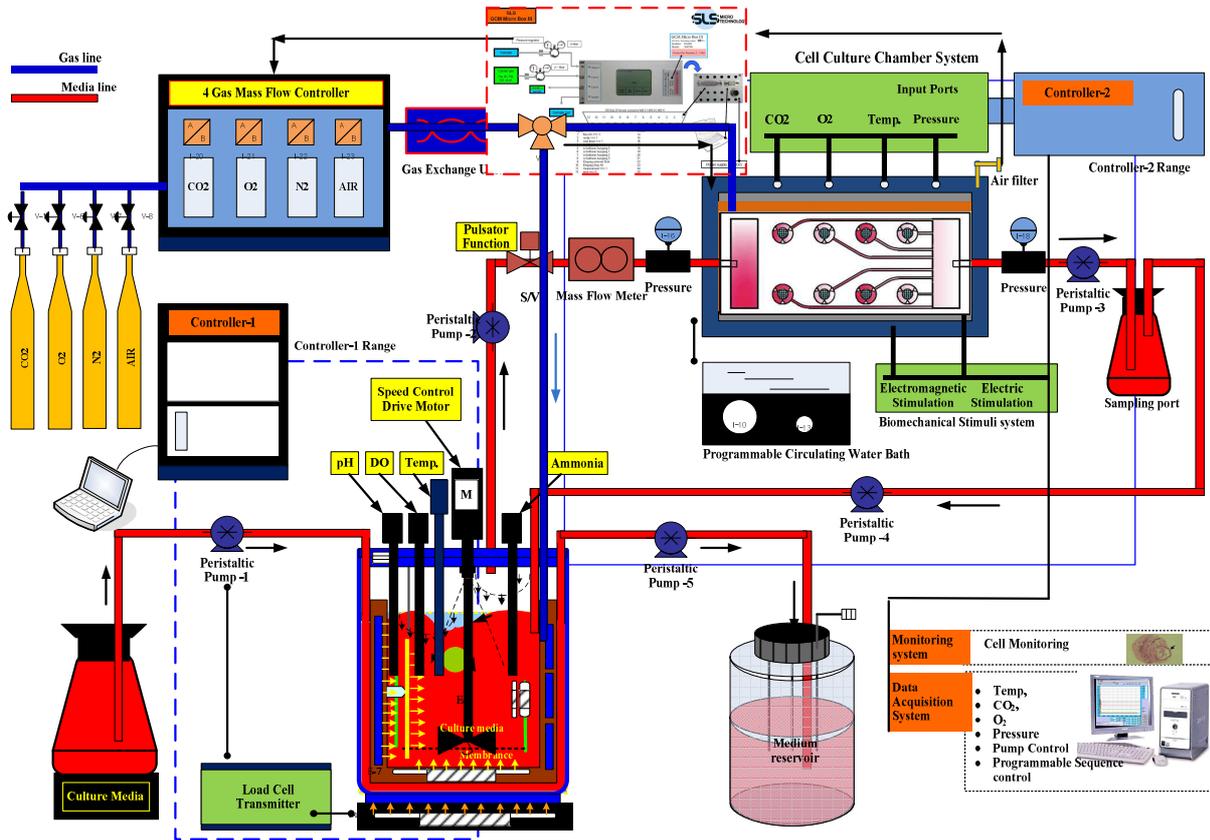


Fig. 8-8. Schematic layout of 3D perfusion flow culture system developed with a cell culture chamber system, gas mass flow controllers, precision peristaltic pumps, vessels for fresh and spent medium, and monitoring system.

Fig. 8-9은 (주)바이오톨론의 연구소에서 본 3차원 관류식 배양시스템을 제작하고 있는 모습을 보여준다.



Fig. 8-8. Pictures of a 3D perfusion flow culture system developed at the BIOTRON Inc.

3. 결과 및 고찰

3.1 관류식 세포 배양시스템의 성능 평가

Fig. 8-9은 개발한 관류식 세포 배양시스템을 실험 및 성능평가를 수행하고 있는 모습을 보여준다. 본 시스템은 도립현미경 상단에 설치할 수 있도록 설계되었다. Fig. 8-10은 신선 배지를 본 시스템에 설치하는 것을 보여준다. 그림과 같이 500 mL 배양 배지를 설치하게 되면, 자동으로 적정 양만큼 Control Based Vessel part로 공급하도록 제어된다.



Fig. 8-9. Pictures of a novel perfusion chamber system and its controller part

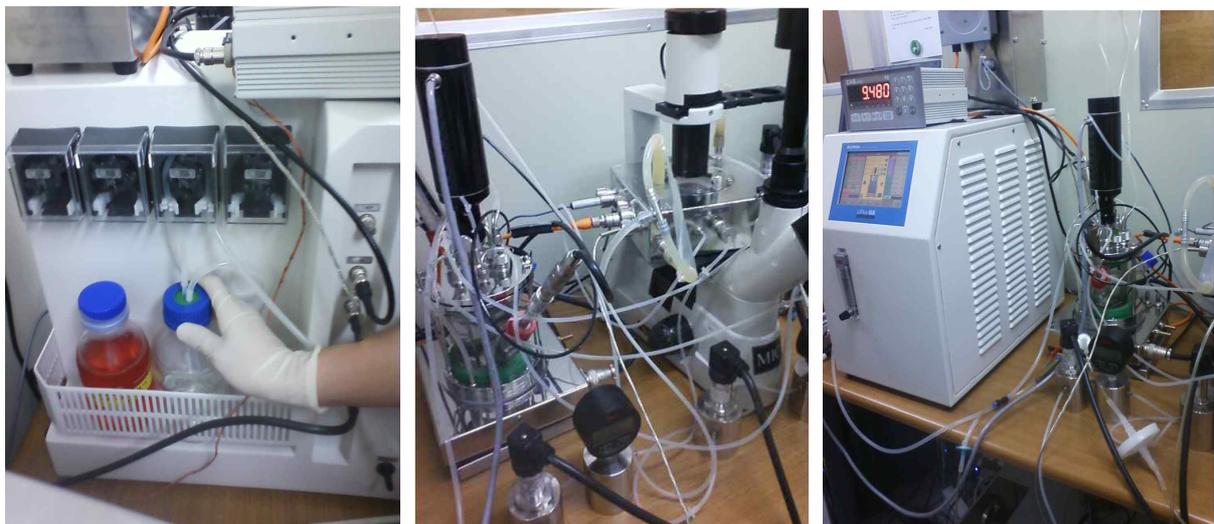


Fig. 8-10. Pictures of media injection and media measurement (pH, DO)

Fig. 8-11은 세포의 배양환경을 제어하기 위한 4 gases mass flow controller (air, N₂, CO₂, O₂)를 나타낸다. Fig. 8-12는 세포배양 챔버의 내부 압력을 측정하기 위한 pressure transmitter를 나타낸다.



Fig. 8-11 Pictures of 4 gases mass flow controller (air, N₂, CO₂, O₂)



Fig. 8-12. Pictures of pressure controller for controlling internal pressure of culture chamber

Fig. 8-13은 본 연구의 배양시스템을 컴퓨터에서 제어할 수 있는 GUI (Graphic User Interface) 화면을 나타낸다. GUI 화면을 통해서 모든 컨트롤러의 RUN, STOP 및 ON, OFF를 제어할 수 있으며 실시간 데이터의 저장을 통해 데이터를 분석할 수 있다. 또한, Fig. 8-11은 자동으로 배양을 할수 있도록 시퀀스 제어 기능을 제공하는 기능을 보여 주고 있다. 각각의 센서류에 대해서 작동순서와 시간 설정 등을 지정할 수 있도록 하였다.

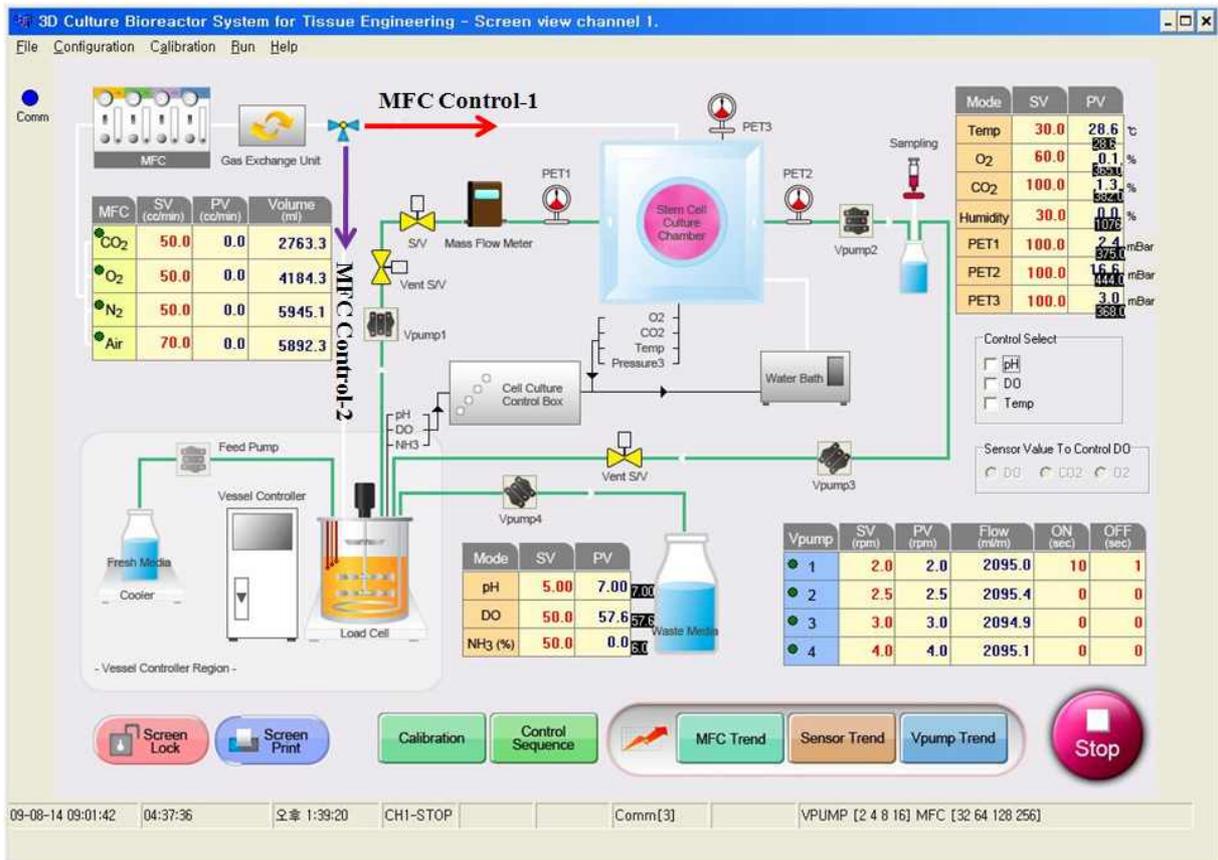


Fig. 8-13. Main GUI monitoring program of the culture system for tissue engineering

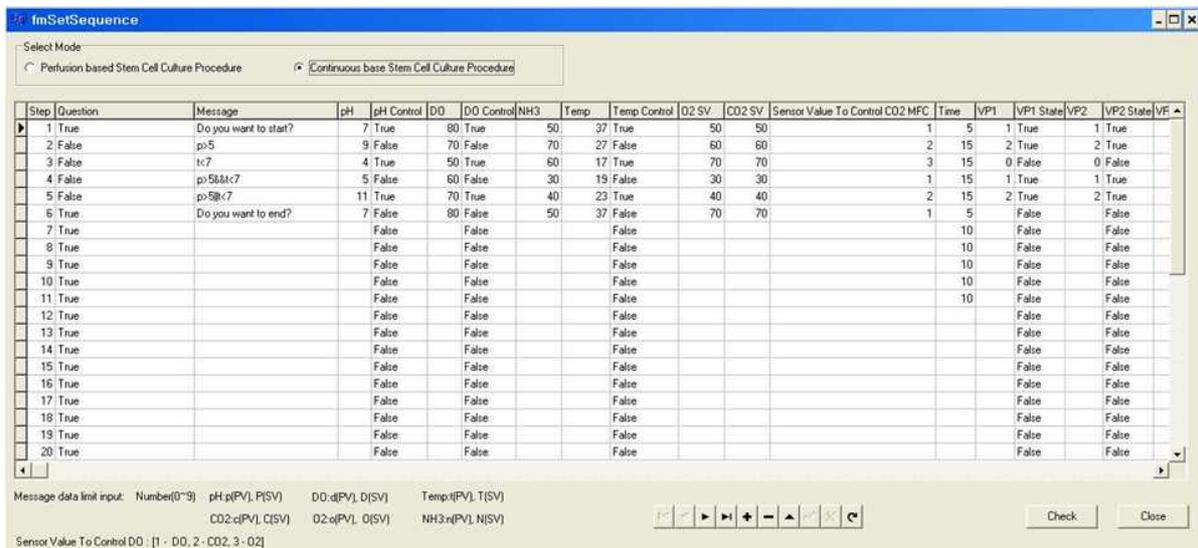


Fig. 8-14. Sequence program for automatic cell culture control of perfusion culture system

Fig. 8-15는 본 시스템의 센서 신호를 그래프로 나타내주는 Trend 화면을 나타낸다.
 Fig. 8-16은 GUI 스크린에 대한 컴퓨터상의 사진을 나타낸다.



Fig. 8-15. Trend graph of perfusion flow culture system for tissue engineering

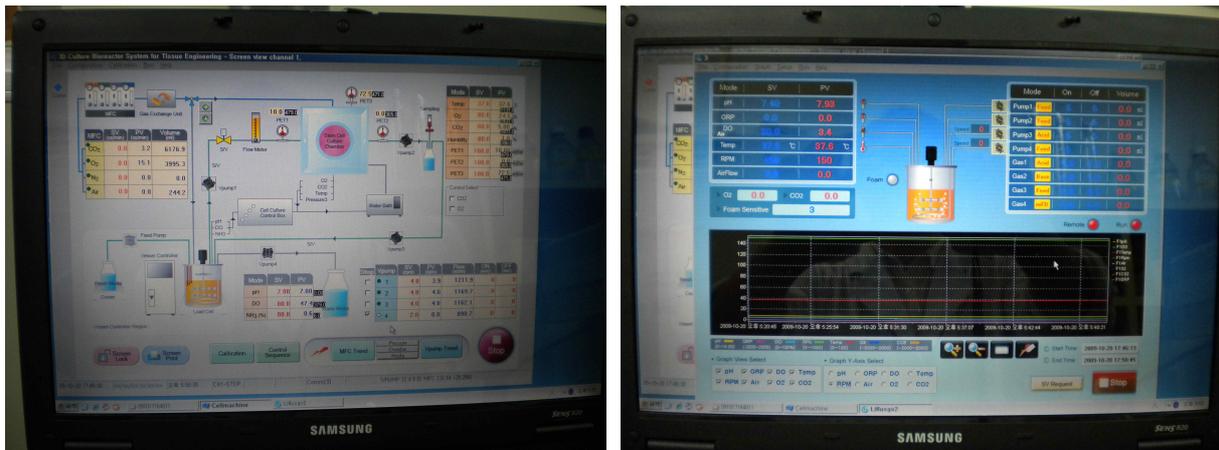


Fig. 8-16. GUI screen of perfusion flow culture system for tissue engineering

3.2 관류식 세포 배양시스템의 배양 기술

Fig. 8-17는 개발한 배양시스템으로 관류식으로 세포를 배양하는 실험을 보여 준다. 500 mL의 신선 배지를 연결하면, 자동으로 교반부 측정시스템에서 적정 양을 계산하여 교반 저장부 Vessel로 주입하게 된다. 세포 배양 준비를 끝낸 후 GUI 화면을 통해 최적의 운전조건을 이미 설정한 값으로 운전시킨 후 배양운전 과정을 마친다.



Fig. 8-17. Pictures of cell culture process via the developed perfusion culture system

또한, Fig. 8-18는 본 시스템의 세포관찰을 역상 현미경을 통해 실시간으로 관찰 및 모니터링 할 수 있도록 설계하였으며, 이에 대한 실험자가 세포를 관찰하는 사진을 나타낸다.



Fig. 8-18. Pictures of pressure controller for controlling internal pressure of culture chamber

3.3 배양시스템의 배양환경 평가 및 세포 배양실험 평가

본 연구에서는 개발된 배양시스템의 배양환경 제어를 평가하였다. 시스템의 세포배양 환경 제어 요소로는 온도, CO₂, O₂, 습도, 챔버시스템의 내압 제어를 비롯하여, 배양배지를 측정하였을 때의 교반부의 온도 제어, pH, DO, RPM을 각각 성능 평가하였다. 각각의 성능평가 결과들을 Fig. 8-19에서부터 Fig. 8-28까지 나타내었다.

3.3.1 세포배양 챔버 시스템의 온도 제어

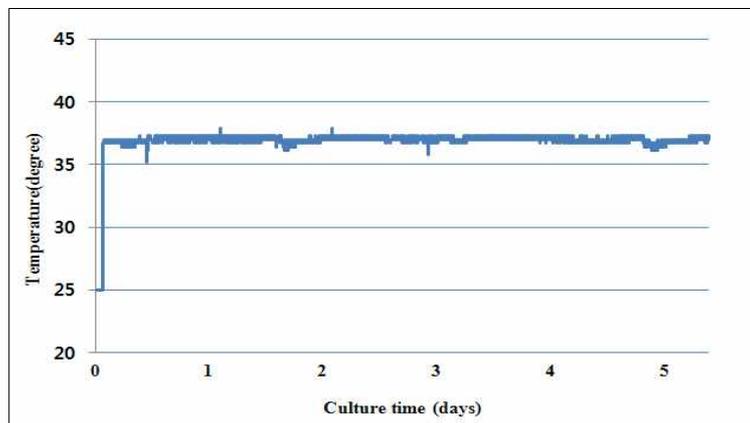


Fig. 8-19. Temperature control during 5 day culture in the cell culture chamber system

3.3.2 세포배양 챔버 시스템의 CO₂ 제어

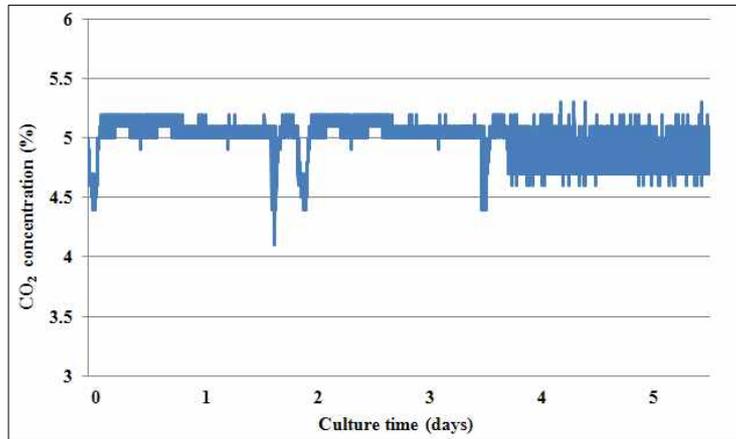


Fig. 8-20. CO₂ control during 5 day culture in the cell culture chamber system

3.3.3 세포배양 챔버 시스템의 O₂ 제어

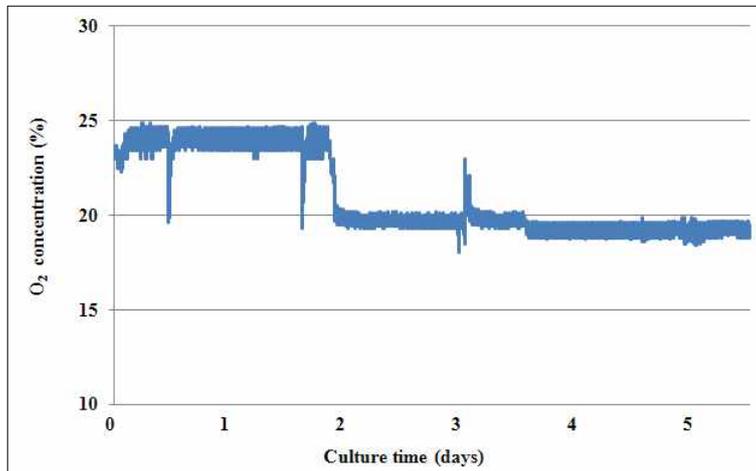


Fig. 8-21. O₂ control during 5 day culture in the cell culture chamber system

3.3.4 세포배양 챔버 시스템의 습도 모니터링

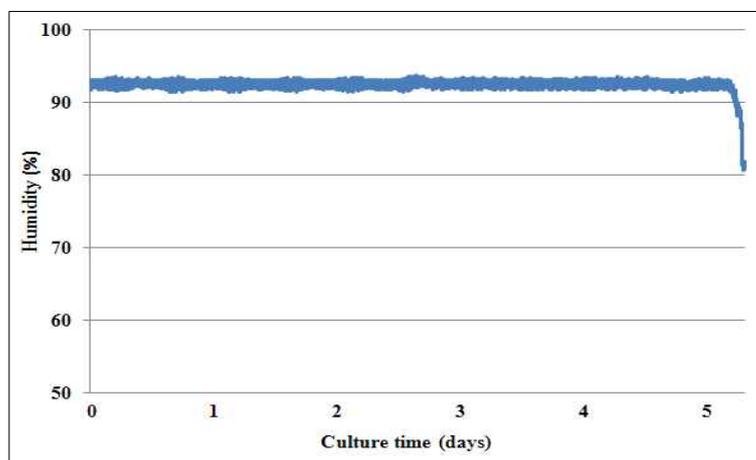


Fig. 8-22. Humidity (R.H) monitoring during 5 day culture in the culture chamber system

3.3.5 세포배양 챔버 내의 압력 제어

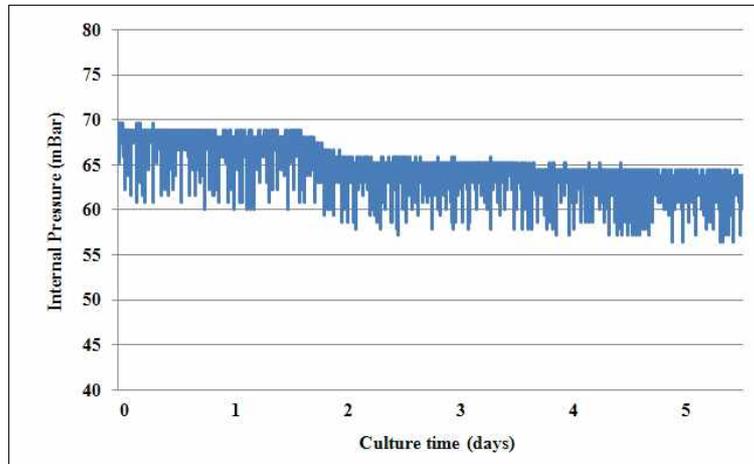


Fig. 8-23. Internal pressure control during 5 day culture in the culture chamber system

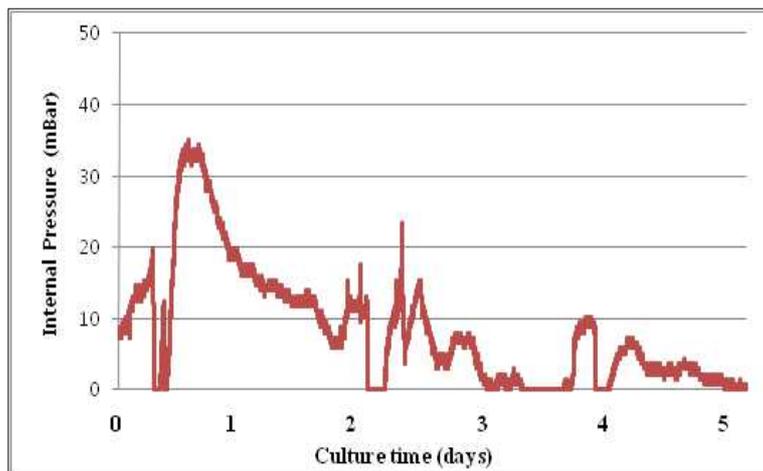


Fig. 8-24. Pressure values as subtracting an internal pressure into the chamber system (F) during 5 day culture.

3.3.6 배지 교반부의 온도 제어

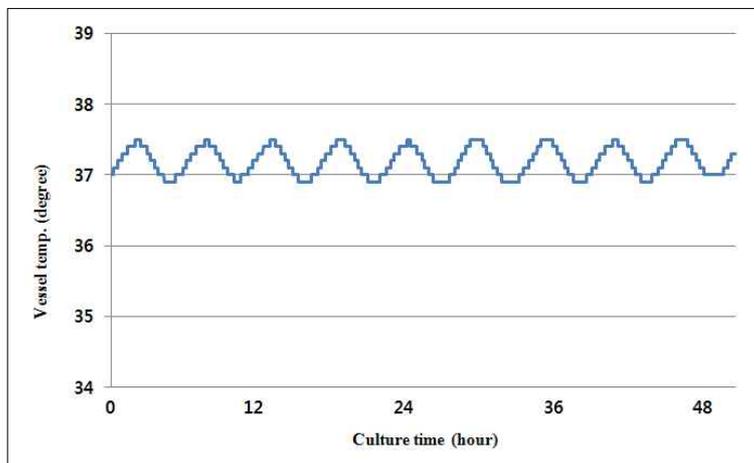


Fig. 8-25. Temperature control during 48 hour culture in the culture chamber system.

3.3.7 배지 교반부의 pH 제어

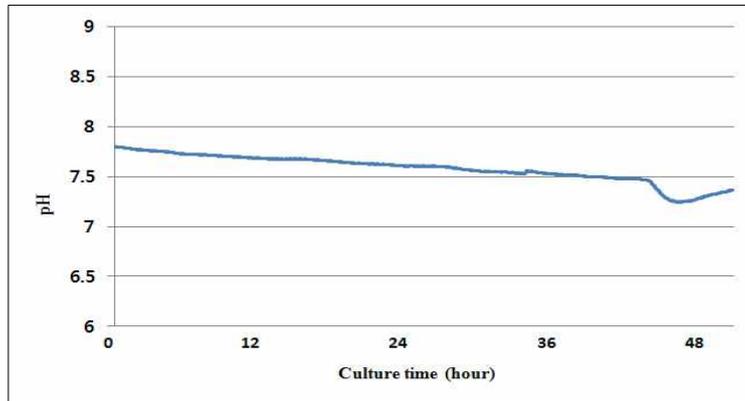


Fig. 8-26. pH control during 48 hour culture in a stirring vessel of the perfusion flow culture system.

3.3.8 배지 교반부의 DO 제어

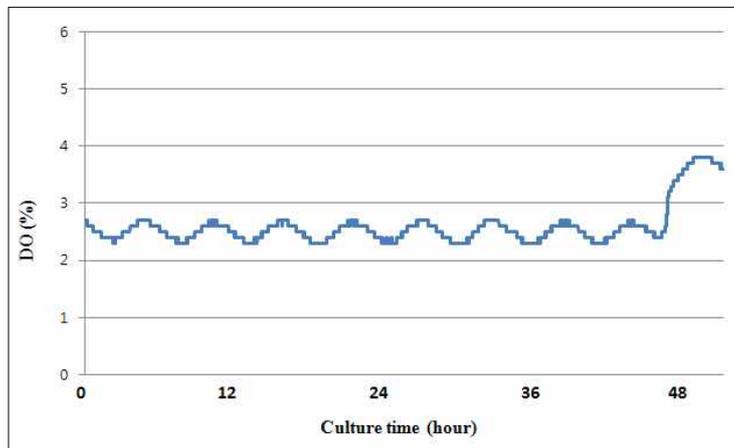


Fig. 8-27. DO control during 48 hour culture in a stirring vessel of the perfusion culture system

3.3.9 배지 교반부의 RPM 제어

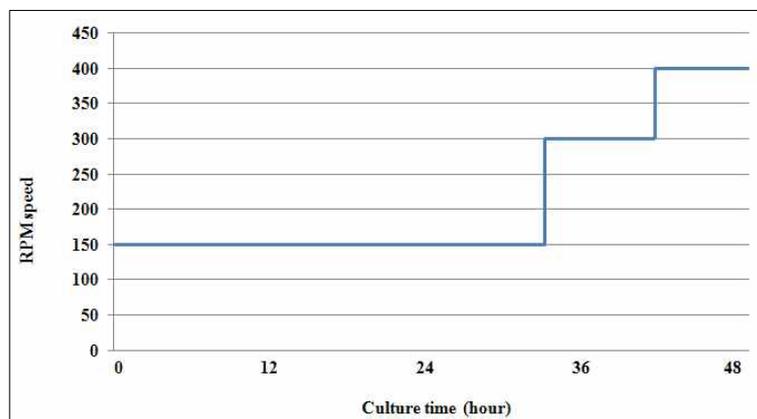


Fig. 8-28. RPM control during 48 hour culture in a stirring vessel of the perfusion culture system

3.4 관류식 배양시스템의 배양 실험 결과

Fig. 8-29는 본 연구에서 개발된 세포배양 챔버시스템과 상용화제품인 CO₂ 인큐베이터에서 약 3일 동안 세포를 배양하였을 때의 세포성장 관찰을 나타낸다. 그림에서 보여주는 바와 같이 4 반복 횟수시 상용화제품인 CO₂ 인큐베이터에서와 본 연구에서 개발된 세포배양 챔버시스템에서의 세포 배양시 세포의 성장 morphology가 거의 유사함을 관찰하였다.

3.4.1 개발한 배양시스템을 이용한 정적 및 관류 배양의 세포 성장 비교

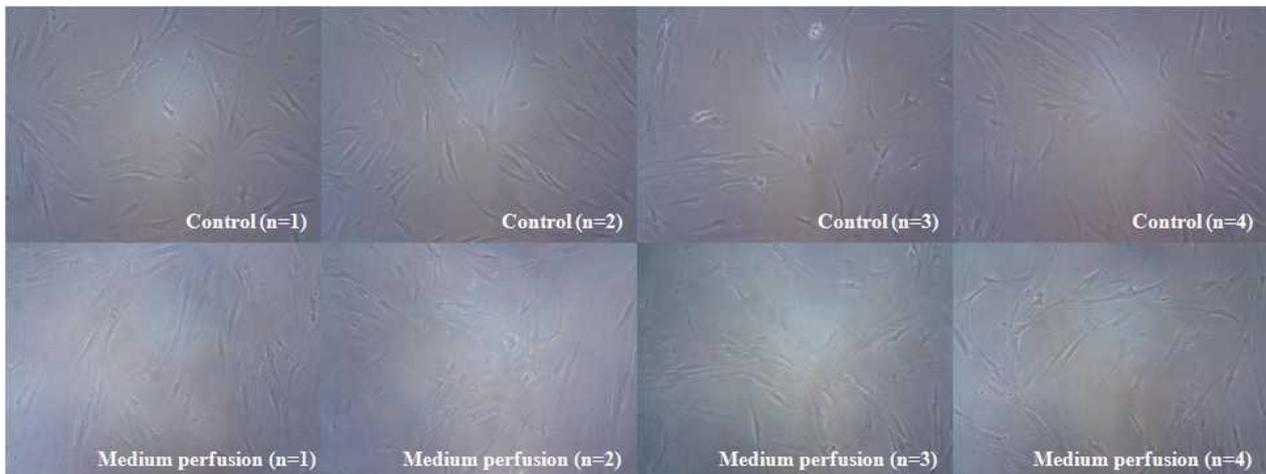


Fig. 8-29 Morphology of alveolar bone marrow stem cells in a static culture (without perfusion) and a medium perfusion flow culture using the developed perfusion bioreactor system.

3.4.2 인큐베이터와 개발한 배양시스템에서의 정적 배양의 세포생존도 비교

Fig. 8-30은 대조군 (conventional culture at the CO₂ incubator) 과 개발한 배양시스템에서 약 4일 동안 배양하였을 때의 cell viability 결과를 나타낸다. 본 실험에서는 관류식 배양 실험 전 개발된 시스템의 세포배양 성능 테스트를 위함이다. Cell viability 결과는 대조군과 개발된 시스템과의 유의성이 없게 나타났다 ($p > 0.05$).

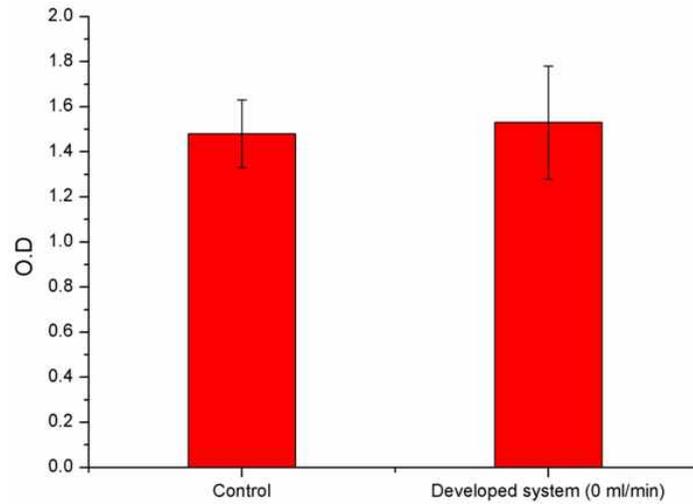


Fig. 8-30 Comparison of cell viability between the control (conventional culture at the CO₂ incubator) and the developed culture system without perfusion (0 ml/min) for 4 days.

3.4.3 개발한 관류식 배양시스템에서의 정적 및 관류 배양의 세포생존도 비교

Fig. 8-31은 개발한 배양시스템에서 정적 및 관류 배양의 세포 생존도를 비교한 것이다. 관류 배양실험의 배지 흐름속도는 가변식 정량펌프를 이용하여 약 4일 동안 0.03 ml/min, 0.3 ml/min으로 배양하였다. 실험 결과, 정적(static) 상태로 세포를 배양했을 때 보다 유속을 천천히 0.03 ml/min으로 관류 배양하였을 때 세포생존도(cell viability)가 약 110-115% 향상되었다. 또한, 배지의 관류 유속을 0.3 ml/min으로 실험한 결과 cell viability가 증가하지는 않았다. 하지만, 본 실험은 단지 cell viability test로 확인을 하였으므로, 향후 세포의 분화 마커와 관련해 추가적인 실험이 필요한 실정이다.

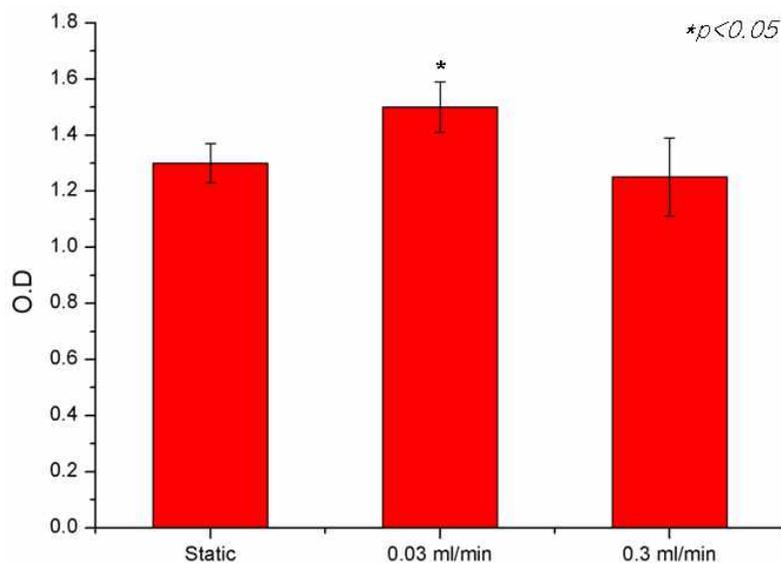


Fig. 8-31 Comparison of cell viability between the static culture (without perfusion) and the perfusion flow culture using the developed culture system (the perfusion rate was 0.03 and 0.3 ml/min, respectively).

3.4.4 MFC 가스 제어기를 이용한 산소 농도에 따른 세포생존도 비교

Fig. 8-32은 MFC 가스 제어기를 이용하여 산소의 농도가 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 산소의 농도가 높을수록 세포의 cell viability가 감소하였다.

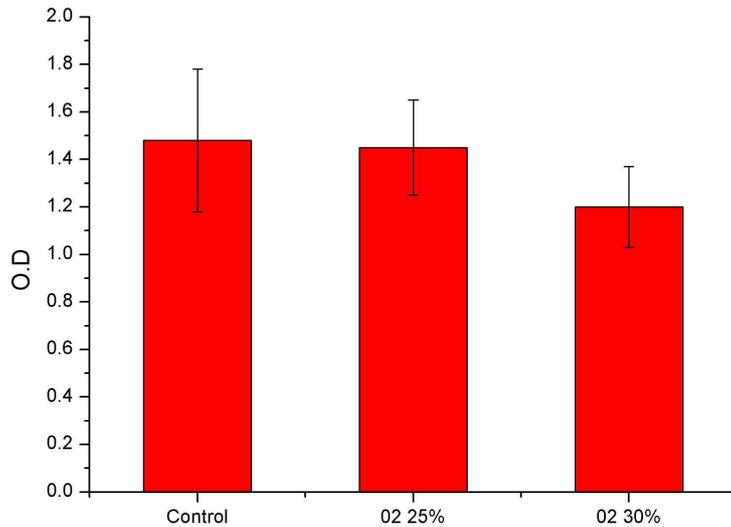


Fig. 8-32 Comparison of cell viability between the control (conventional culture at the CO₂ incubator) and O₂ oxygen variation using MFC gas control of developed culture system.

3.4.5 생체자극(초음파) 관류식 세포 배양시스템의 평가

Fig. 8-33는 초음파 생체자극을 관류식 세포 배양시스템에 적용하여 실험 및 성능평가를 수행하고 있는 사진이다. 본 실험에서의 초음파 조건으로는 50 mW/cm² 에서 duty cycle 10%, 자극시간 10분의 자극을 가하였다.

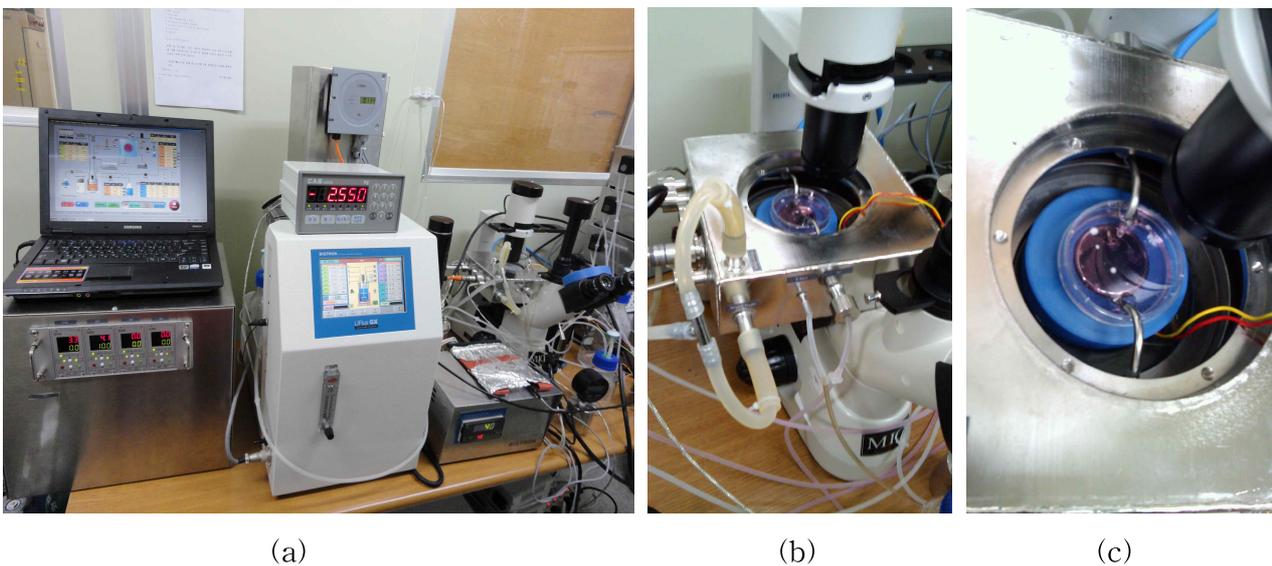


Fig. 8-33. Pictures of a novel perfusion chamber system with low intensity ultrasound stimulation (b, c) and its controller part (a).

Fig. 8-34은 초음파 생체자극을 관류식 세포 배양시스템에 적용하여 실험 및 성능평가를 수행하고 있는 사진이다.

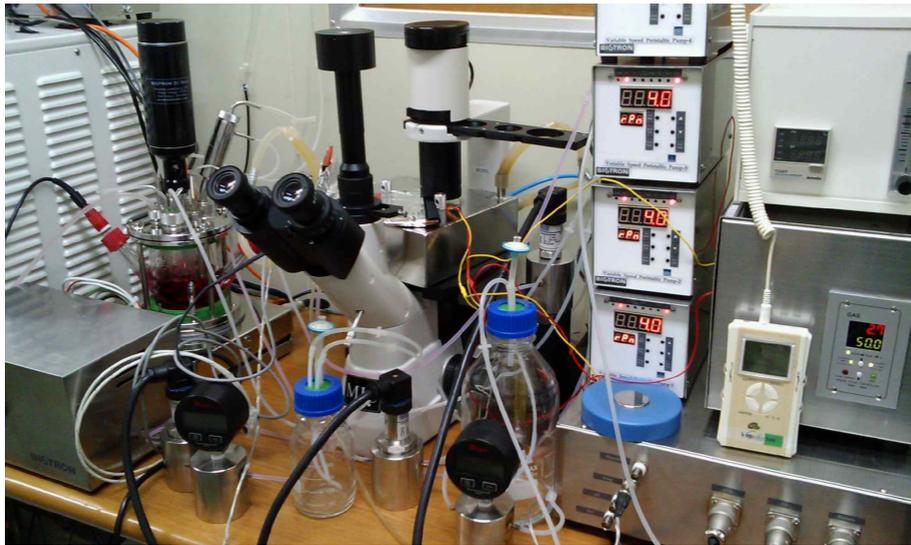


Fig. 8-34. Pictures of a novel perfusion chamber system with low intensity ultrasound stimulation

Fig. 8-35은 초음파 생체자극을 관류식 세포 배양시스템에 적용하여 실험하였을 때의 모니터링시스템 화면을 나타낸다.

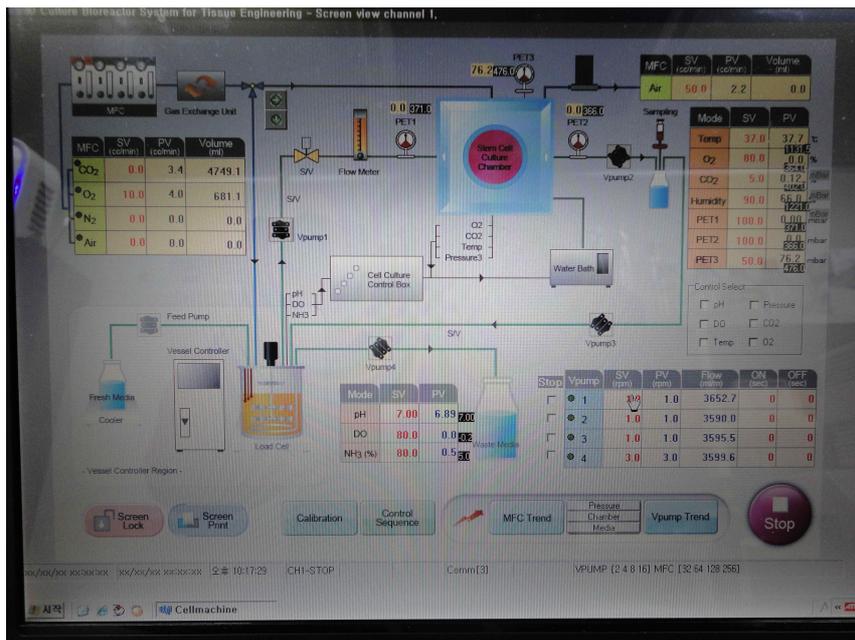


Fig. 8-35. Monitoring screen picture of a novel perfusion chamber system with low intensity ultrasound stimulation.

Fig. 8-36는 초음파 생체자극을 관류식 세포 배양시스템에 적용하였을 때의 실험결과를 나타낸다. 시스템에서 관류하지 않았을 때 대조군에 비해서 초음파 자극군 LUS(Low Ultrasound Stimulation, 50mW/cm², 10% duty cycle, 10min)이 약 130% 증식효과가 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 culture dish에서 초음파 자극을 준 경우와 비슷한 같은 증식효과를 나타내었다. 하지만 0.3 ml/min의 빠른 관류배양 조건과 초음파 LUS(Low Ultrasound Stimulation, 50mW/cm², 10% duty cycle, 10min) 실험을 같이 유도하였을 때 세포의 생존도 값이 대조군이 비해 효과가 없는 것으로 나타났다. 이에 시스템에서 약 0.03 ml/min 저속의 관류가 필요하였다.

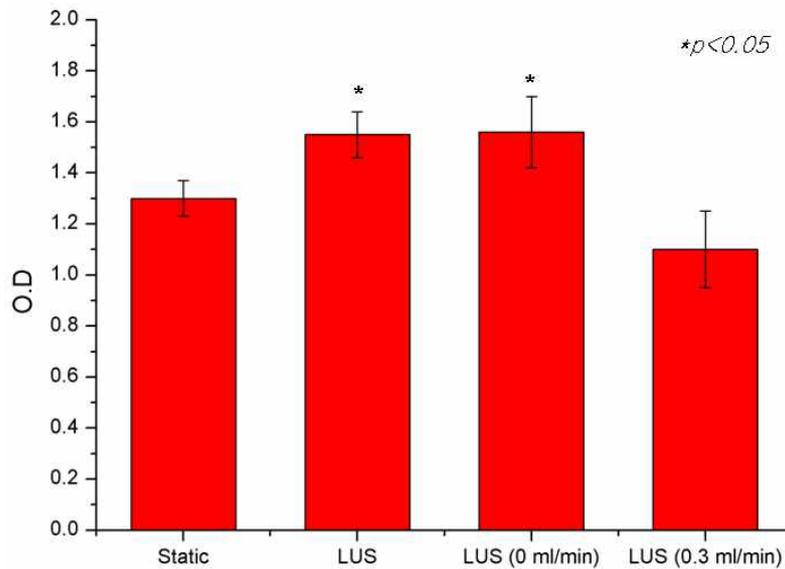


Fig. 8-36. Comparison of cell viability between the control (conventional culture at the CO₂ incubator) and LUS(Low Ultrasound Stimulation, 50mW/cm², 10% duty cycle, 10min) using perfusion culture system.

5. 요약 및 결론

본 연구에서는 동물 (줄기)세포를 생체내에서 배양되는 것처럼 생체의 배양을 목적으로 새로운 관류식 배양 챔버시스템을 개발하였다. 세포 생존 능력 테스트에서 관류식 배양 챔버시스템의 세포 성장은 정적 배양과 비슷한 추세를 보였다. 또한, 살아있는 세포는 개발된 시스템에서 연속적인 기간 동안 관찰할 수 있었다.

본 연구에서 개발된 관류 배양시스템은 세포 생존 결과를 통해 보았을 때, 정적 배양보다 관류 배양시의 세포성장률이 약 115-120%로서 현저하게 높은 것을 보였다. 그러므로 이 시스템은 치조골 골수줄기세포 배양에 성공적으로 사용될 수 있다. 또한, 이 시스템은 살아있는 세포의 형태를 모니터링하고 찍을 수 있도록 챔버 시스템을 설계 및 제작하였다. 또한, 3차원 지지체를 삽입하여 조직을 재생시킬 수 있는 3차원 관류식 배양시스템을 설계 및 제작하였다. 본

시스템에서는 세포 환경제어(pH, DO, CO₂, O₂ 및 온도, 습도 등)가 가능하고, 배양 시스템에서 3차원 배양을 할 수 있도록 설계 및 제작하였다. 또한, 초음파 생체자극을 관류식 세포 배양시스템에 적용하였을 때의 실험결과, 대조군에 비해서 초음파 자극군이 약 130% 증식효과가 있는 것으로 나타났다.

제 9절 동물 세포, 조직 배양을 위한 배양시스템의 비접촉식 실시간 배양배지 분석시스템 개발

1. 서론

관류식 배양시스템의 최종 목표는 조직공학에 있어서 세포의 증식과 분화를 최대한 끌어올리는데 있다. 본 연구에서는 관류식 배양시스템 설계 및 제어를 위한 주된 연구로서 시스템 내의 세포의 성장 환경을 효율적 방법으로 모니터링하고 제어하도록 제작하는데 있다. 이러한 제어 개념은 Konstantinov (1989)[1]등 연구에 의해 생리학적 상태 제어(physiological state control)로 언급되어진다. 배양 중의 세포배양 배지상태를 평가하는 것은 세포배양시 꼭 필요할 뿐 아니라 효과적인 관류식 배양시스템의 제어 전략 설계에 있어 필수적이라 할 수 있다. 세포의 반응을 실시간으로 검출함으로써 동시에 시스템의 환경적 변화 또는 시스템의 작동 조건 등을 효과적으로 대응하기 위해서는 세포의 대사과정 반응 등의 심오한 지식 또한 수반되어야 한다. 세포의 생리학적 상태의 적절한 평가를 위해서는 부산물 상태를 분석 및 작동시킬 수 있는 최적화가 필요하겠다(K. Konstantinov, 1996)[2]. 세포의 농도(K. Konstantinov, 1994 등; P. Ducommun, 2001 등)[3,4]와 세포의 respiration (S.J. Yoon 등, 1994; K. Eyer 등, 1995; U. Behrendt 등, 1994) [5-7]은 세포 배양시 세포의 대사반응 상태를 온라인으로 평가하는 중요한 인자이다. Flow injection 분석기술은 glucose (K.B. Male, 1997; G. Blankenstein, 1994)[8, 9], glutamine (G. Blankenstein, 1994, J. van der Pol, U, 1994)[9,10], lactate (R. Singhvi, 1996)[11] 그리고 ammonia (G. Blankenstein, 1994)[9]와 같은 세포의 신진대사 반응 농도와 다양한 영양소들을 실시간 모니터링이 가능하도록 해준다. 세포 신진대사에서 발생하는 몇몇의 폐 부산물은 세포의 성장을 억제시키거나 또는 독소로서 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그 중에서 가장 중요한 물질로는 암모니아와 락테이트(lactate)이다. 락테이트의 배설작용은 glycolytic pathway에 의해 glucose의 불완전한 oxidation 으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히, 이러한 pathway의 부산물 중에 하나인 Pyruvate은 세포의 oxidation 상태 (예로서 redox cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)의 oxidized form으로 전환 및 복구를 유지하기 위해서 lactate로 전환된다. 락테이트의 독성 영향은 상대적으로 높은 농도에서 세포배양 배지의 pH와 삼투압에 크게 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Hassell, T, 1991) [15].

그러므로, 일반적인 세포배양 처리 과정에서는 세포에게 불완전한 배양배지 상태를 포함하고 있다. 기존의 온라인 측정 방법들로는 상당히 고가의 센서를 유지해야 할 뿐 아니라 잠재적인 오염 가능성 역시 가지고 있다. 최근까지의 연구로는 핵자기공명(nuclear magnetic resonance) (S.T. Sharfstein, 1994)[12] 및 mass spectroscopy (H.P.J. Bonarius, 2001) [13]와 같은 연구의 개발 및 응용이 진보되어 세포내 외의 신진대사 모델 변화를 측정하는 기술까지 진보되었다.

세포배양 배지의 상태를 온라인으로 측정시 세포배양 배지와 센서류가 생리학적 상태를 측정시 접촉에 의해 오염을 유발할 수 있기 때문에 비오염원으로서의 기능을 가지는 것이 중요하다. 이러한 기존의 온라인 측정시스템의 단점을 보완 및 해결하기 위해서 NIR(near-infrared spectroscopy)과 같은 계측장비를 이용하여 신선한 배양 배지와 폐 부산물 배지를 상호적으로 적절하게 지속적으로 보충 및 버릴 수 있는 비 접촉식 계측장치가 요구된다. 게다가, 적정 운전 조건을 결정함으로써 지속적으로 세포 배양 배지를 유지하는 것 또한 중요하겠다.

본 연구에서는 치즈골 줄기세포의 배양 환경을 정밀하게 유지시키기 위하여 관류식 세포 배양시스템 내에 비접촉식 센서를 지속적으로 계측하고자 한다. 이를 위해서 새로운 형태의 자동식 관류배양 시스템을 개발하였다. 세포배양 배지 상태를 온라인으로 모니터링함으로써 이러한 접근 방법은 최적의 운전조건 및 환경을 제공하리라 사료된다.

2. 재료 및 방법

2.1 치즈골 세포배양 및 배양배지

치조골 세포는 서울대 치과대학 바이오인터페이스공학 연구실에 의해 수집된 것을 사용하였다. 세포는 Alpha-MEM 배지에 10% SERUM(FBS, Welgene Inc., Korea)과 10 nM의 아스코르브산(L-ascorbic acid), 항생제와 중탄산나트륨을 넣은 배양배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂농도 갖는 인큐베이터(Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA)에서 배양되었다.

2.2 배양배지

본 실험을 위해서 그림 9-1(A) 와 같이 인큐베이터 내에 세포를 배양하였으며 그림 9-1(B)는 이에 대해서 초기배지, 1일, 3일, 5일, 7일 별로 deep-freezer(NIHON freezer CO., Ltd.)에서 냉동보관을 한 사진이다.



Fig. 9-1 Samples of cultured cells(A), refrigerated cell culture medium (B), and alpha MEM components (C).

본 연구에서 사용된 배지는 (주)웰진에서 제조된 Alpha-MEM(LM 008-01, Welgene Inc., South Korea)으로 구성성분은 다음과 같다.

Components	LM 008-01	LM 008-02
CaCl ₂ (anhydrous)	200.00	200.00
KCl	400.00	400.00
MgSO ₄ (anhydrous)	98.00	98.00
NaCl	6800.00	6800.00
NaHCO ₃	2200.00	2200.00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	122.00	122.00
D-Glucose	1000.00	1000.00
Lipoic Acid	0.20	0.20
Phenol Red	10.00	10.00
Sodium pyruvate	110.00	110.00
L-Alanine	25.00	25.00
L-Arginine · HCl	127.00	127.00
L-Asparagine · H ₂ O	50.00	50.00
L-Aspartic Acid	30.00	30.00
L-Cystine · 2HCl	31.00	31.00
L-Cystine · HCl · H ₂ O	100.00	100.00
L-Glutamic Acid	75.00	75.00
L-Glutamine	292.00	292.00
Glycine	50.00	50.00
L-Histidine · HCl · H ₂ O	42.00	42.00
L-Isoleucine	52.00	52.00
L-Leucine	52.00	52.00
L-Lysine · HCl	73.00	73.00
L-Methionine	15.00	15.00
L-Phenylalanine	32.00	32.00
L-Proline	40.00	40.00
L-Serine	25.00	25.00
L-Threonine	48.00	48.00
L-Tryptophan	10.00	10.00
L-Tyrosine · 2Na · 2H ₂ O	52.00	52.00
L-Valine	46.00	46.00

Fig. 9-2 Samples of alpha MEM components

그림 9-3은 본 자동화 세포배양시스템의 중앙 conditioning vessel 내에 NIR 분석 장치 위치를 나타낸다. 또한 그림 9-3(B)는 Liangzhi Xie(1997) 등에 보고된 동물세포 배양시 세포배양 전략적 내용에 대한 문헌을 나타낸다.

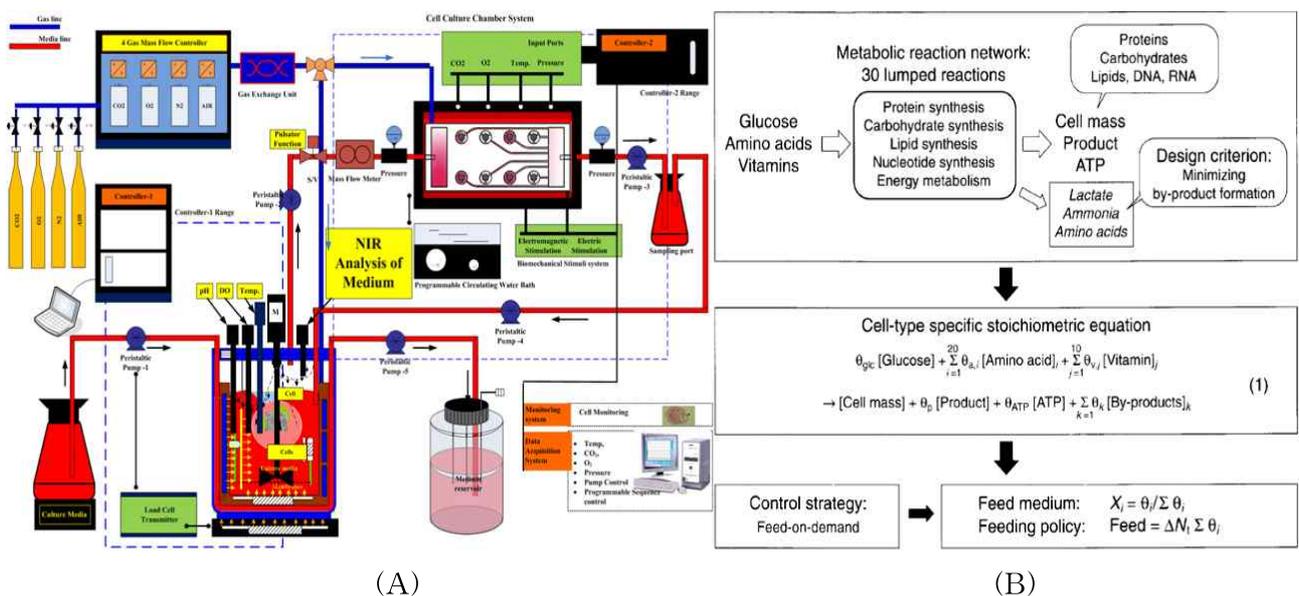


Fig. 9-3 NIR Analysis of cell culture medium in the bioreactor system (A) and integrated

approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells cited by Liangzhi Xie and Daniel I. C. V, TIBTECH MARCH 1997 (VOL 15) (B).

2.3 NIR(Near-infrared spectroscopy)과 자료 처리

본 연구에서 사용한 Near-infrared spectroscopy(1100 - 1750 nm)는 HN1100 NIR model (Spectrontech Co. Ltd., Korea)을 이용하여 자료를 수집하였다. 본 시스템에는 tungsten-halogen source와 diode-array detector를 장착하고 있다. 검출기 온도는 약 30℃에서 제어되었고, 시그널은 1스캔당 42 ms 이상으로 조작되었다. 본 시스템의 그림 및 상세규격은 그림 9-4와 같다. 또한, 본 측정 시스템에는 liquid transmission sampling compartment를 가지고 있다. 샘플에는 3 mm pathlength Infrasil quartz cells을 포함하고 있다. 모든 스펙트럼처리에는 Unscrambler[®] 7.5 version 프로그램을 이용하여 처리 및 분석하였다. Near-infrared spectroscopy의 raw data를 분석하기 위해서 partial least-squares regression 로 캘리브레이션 하여 분석하였다. 또한, 그 이외도 spectra pretreatments of multiplicative scatter correction(MSC) 방법과 standard normal variate(SNV) 방법을 이용하여 회귀분석 결과를 분석하였다.

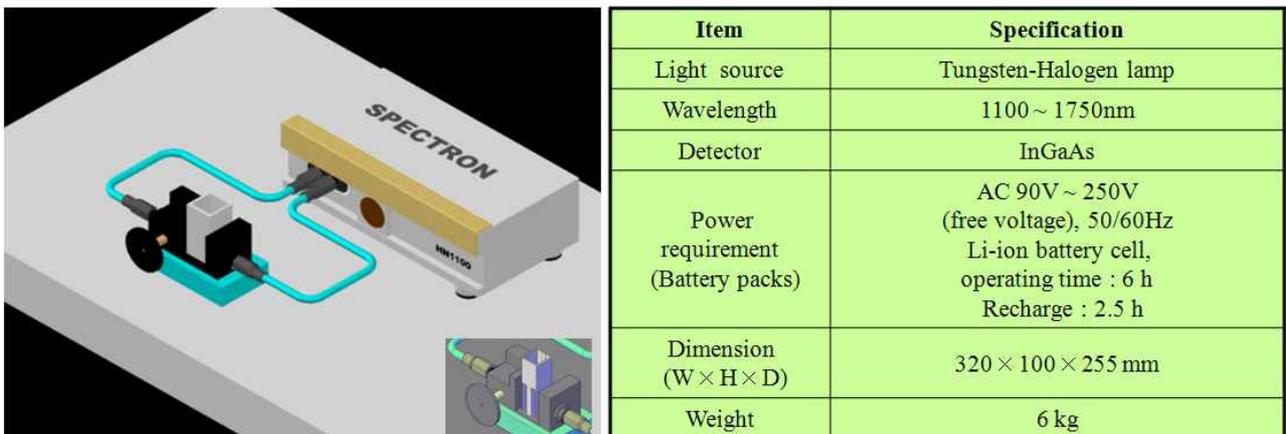


Fig. 9-4 HN1100 specification of NIR spectrometer. Samples were contained in 3 mm pathlength Infrasil quartz cells (A) and specification of NIR spectrometer (B).

2.4 Bio-Liquid Chromatograph 분석

그림 9-1에서 세포 배양배지 샘플을 화학적으로 분석하기 위해서 bio-liquid chromatograph(DX-500, Dionex Inc.)를 이용하여 분석하였다. 본 분석장치를 통해서 글루코스와 락테이트를 비교분석하였다.

2.5 pH 와 oxygen tension 배지

개발된 세포 배양시스템에서 배양배지의 pH와 oxygen tension을 일정하게 유지하도록 하기 위해 본 실험에서는 MFC(mass flow controller)를 이용하여 정밀하게 제어하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 pH 와 oxygen tension

정밀제어를 통해 일정하게 pH와 pO₂ 세포의 배양배지 분석 결과는 그림 9-5와 같다. 약 7일 동안 세포를 배양시 배양배지의 pH 값이 일정하게 유지됨을 모니터링 하였고, pO₂ 값도 5% 내외에서 일정하게 유지됨을 모니터링하였다.

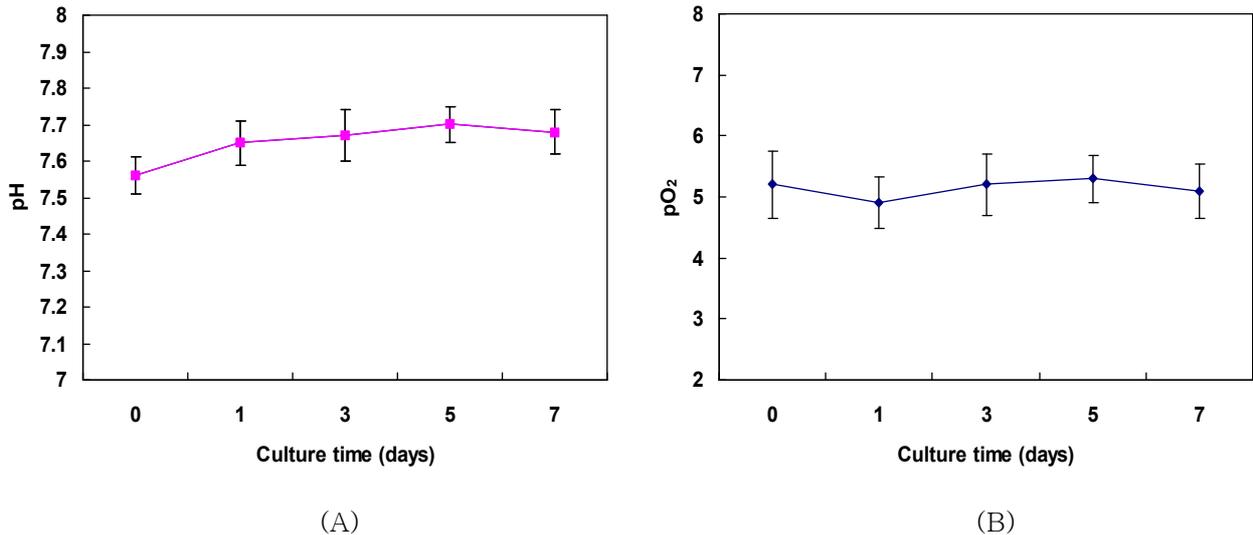


Fig. 9-5 Graph of pH(A) and pO₂(B) variation during seven days in a bioreactor system

3.2 배양배지 분석

배지 내에서 세포가 증가함에 따라서 배지에서의 carbohydrates는 소비되어지고 이는 에너지로 전환되어져 이용이 된다. 만약 배지내에서 이러한 변화가 일어나지 않는다면, 시간에 지남에 따라서 글루코스의 농도변화는 명백히 감소되지 않는다. 게다가, 젖산(lactic acid) 와 암모니아 역시 시간이 지남에 따라서 세포가 증가하게 되면 명백히 부산물로서 증가된다. 이는 바로 세포가 반응하려는 신진대사과정이 수행되는 것을 보여준다 (M. Butler, 1996)[14].

그림 9-6은 본 실험에서 배양배지 샘플을 ion chromatograph 실험장치로부터 획득한 글루코스 소비량을 나타낸다. 또한, 그림9-7은 본 실험에서 배양배지 샘플을 ion chromatograph 실험장치로부터 획득한 락테이드(lactate) 소비량을 나타낸다. 본 실험결과 글루코스의 소비량과 락테이트의 부산물이 서로 밀접하게 관련되어 있음을 보여주었다. 배지의 글루코스 함량은 7일 동안 배양시 1400 ppm에서 100 ppm으로 감소가 된 반면에, 락테이트는 0.1 ppm에서 1.4 ppm으로 크게 증가함을 나타냈다.

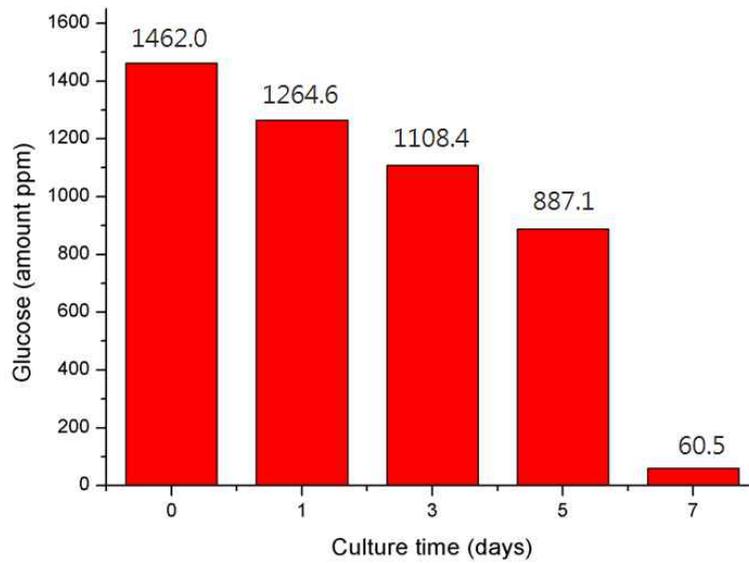
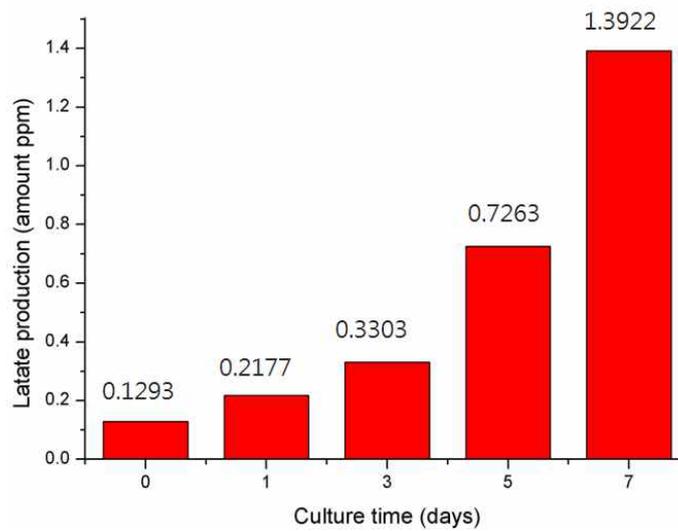


Fig. 9-6 Change of a glucose concentration in cell culture medium taken during the growth period.



(A)

(B)

Fig. 9-7 Change of a lactate production in cell culture medium taken during the growth period.

3.3 스펙트럼 실험 결과

그림 9-8은 각각의 샘플에 대한 스펙트럼 결과를 나타낸다. 그래프에서 보는 바와 같이 1일에서 7일까지의 세포배양배지의 각 샘플마다 1650 nm에서 1700 nm 사이에서 명백히 차이가 나는 것을 보였다. Burmeister et al (1999)[9]가 보고한 바에 의하면 락테이트는 1675, 1690 and 1730 nm 영역에서, 글루코스는 1613, 1689, 1732 nm 영역에서 차이가 있음을 보고하였다. 본 실험에서의 결과와 유사함을 확인하였다. 그림9-9는 각 샘플의 전처리로서 MSC pretreatment를 하였을때의 그래프를 나타낸다. 그림 9-10은 각 샘플의 전처리로서 SNV pretreatment를 하였을때의 그래프이다. 그림 9-11은 각 샘플에 대해서 raw 데이터, MSC 데이터, SNV 데이터에 대해서 각각 비교를 한 그래프를 나타낸다.

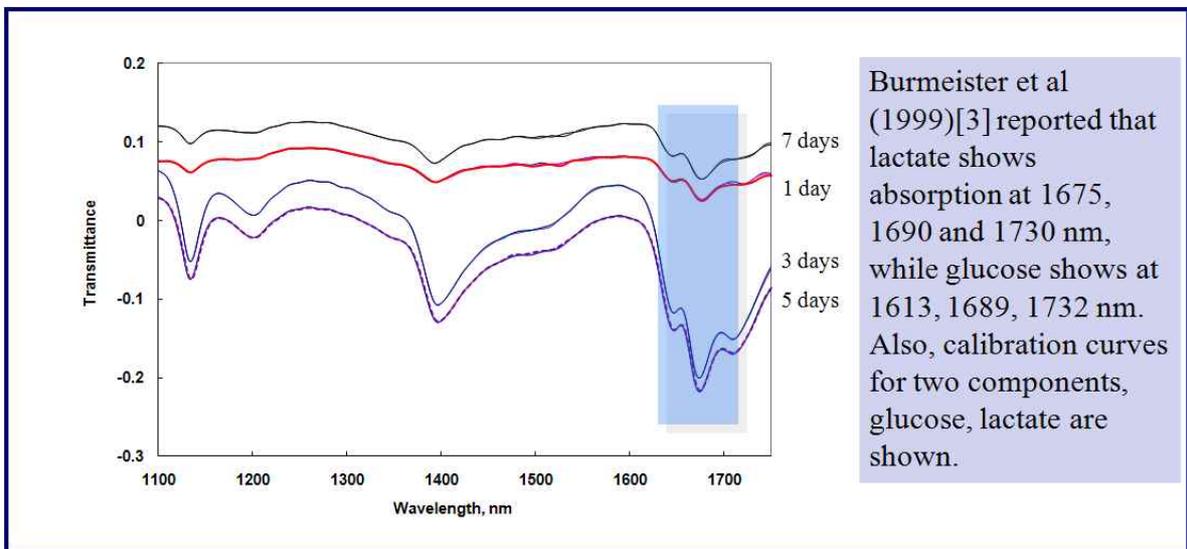


Fig. 9-8 Graph of absorbance spectroscopy for cell culture medium; raw data.

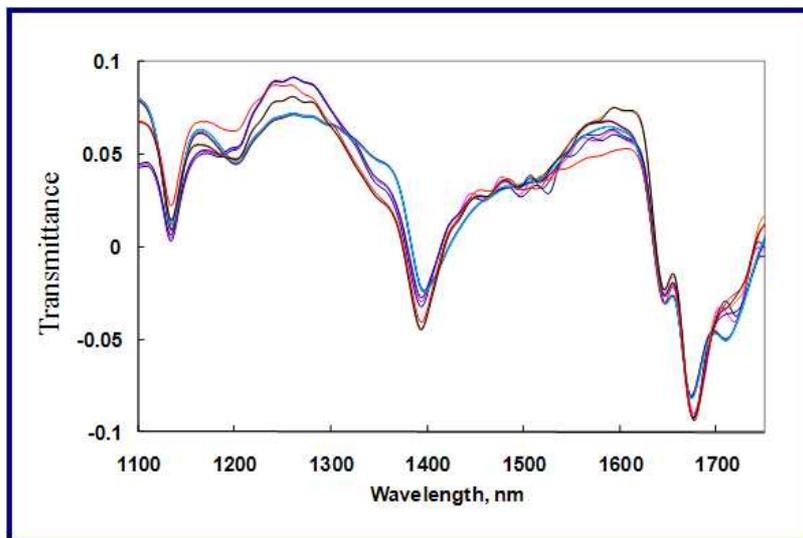


Fig. 9-9 Graph of absorbance spectroscopy for cell culture medium; MSC pretreatment.

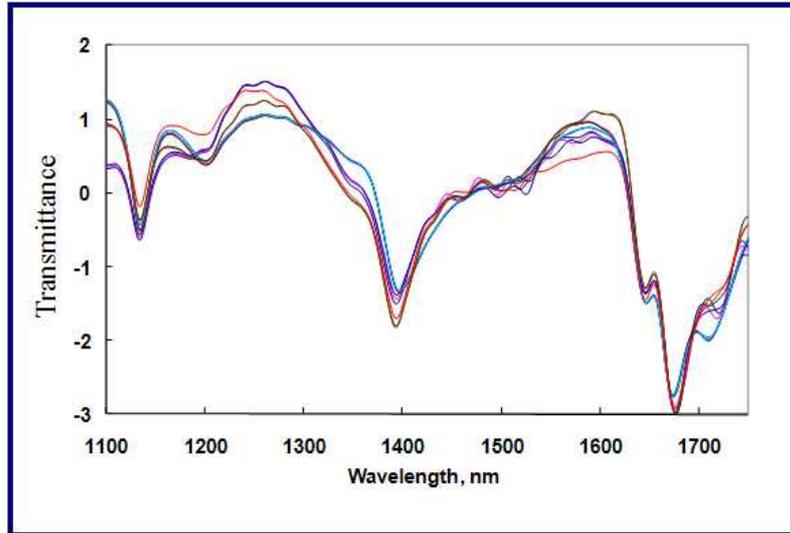


Fig. 9-10 Graph of absorbance spectroscopy for cell culture medium; SNV pretreatment.

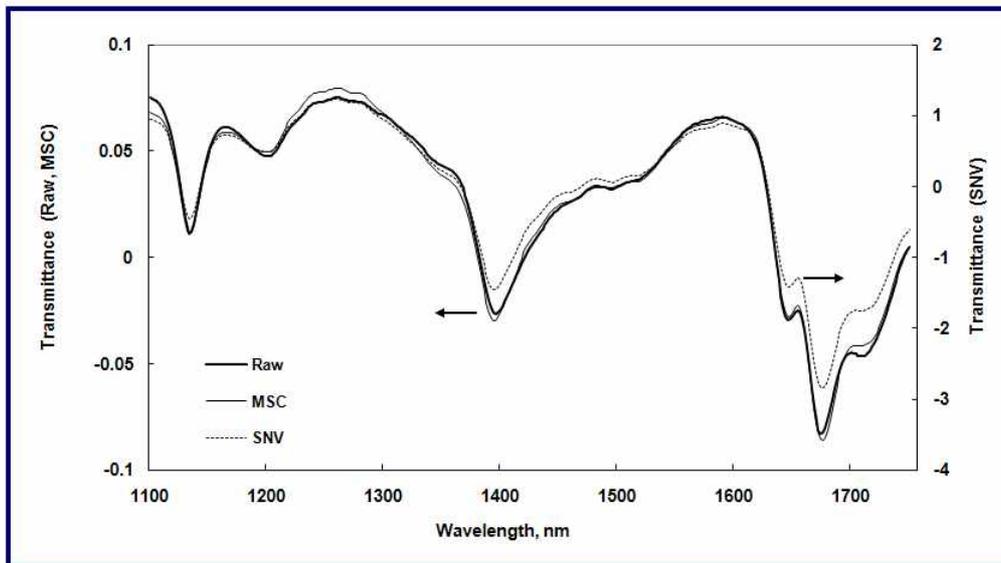


Fig. 9-11 Graph of absorbance spectroscopy for cell culture medium; comparison of raw, MSC, and SNV data.

그림 9-12는 SNV 전처리를 통하여, ion chromatograph 실험 장치로부터 획득한 글루코스 소비량과 Near-infrared spectroscopy(1100 - 1750 nm, HN1100 NIR model, Spectrontech Co. Ltd.)에서 측정된 글루코스 값의 회귀분석 상관관계를 분석한 결과, $r=0.996$ 로 나타나 통계적으로 유의성이 있음을 확인하였다. 마찬가지로, 그림 9-13은 SNV 전처리를 통하여, ion chromatograph 실험 장치로부터 획득한 락테이트 소비량과 Near-infrared spectroscopy에서 측정된 락테이트 값의 회귀분석 상관관계를 분석한 결과, $r=0.975$ 로 나타나 통계적으로 유의성이 있음을 확인하였다. 이로써 NIR장치로 배지의 glucose와 lactate 성분을 비접촉식으로 실시간 분석이 가능함을 알 수 있었다.

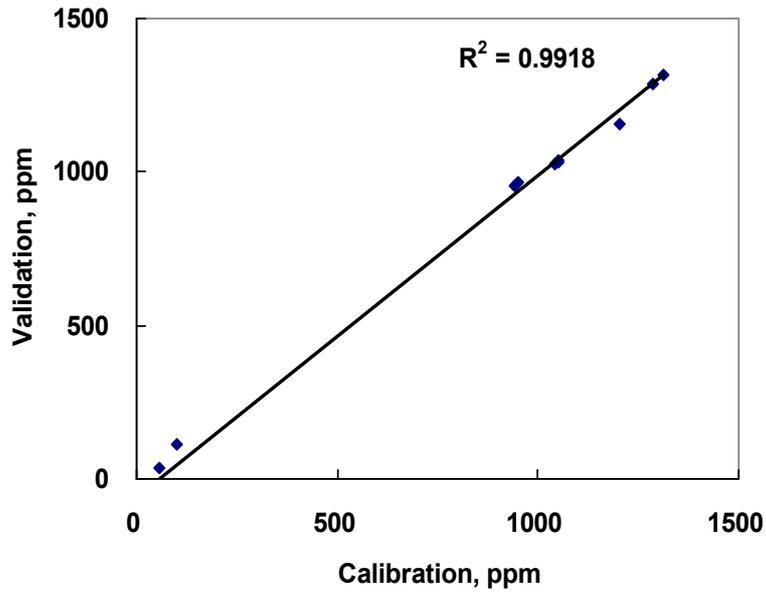


Fig. 9-12. Graph of predicted glucose concentration vs. measured glucose concentration using SNV pretreatment. Correlation coefficient between NIR values and ion chromatograph values of glucose concentration: $r=0.996$.

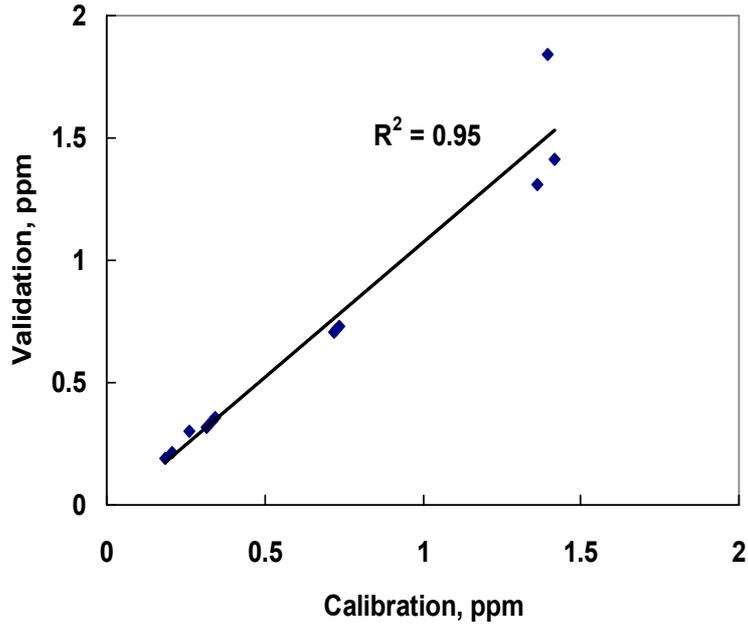


Fig. 9-13. Graph of predicted lactate concentration vs. measured lactate concentration using SNV pretreatment. Correlation coefficient between NIR values and ion chromatograph values lactate concentration: $r=0.975$.

4. 요약 및 결론

본 연구에서는 치즈골 줄기세포의 배양 환경을 정밀하게 계측하기 위하여 관류식 세포 배양 시스템 내에 비접촉식 센서를 계측적으로 온라인 측정할 수 있는 시스템을 개발하고자 하였다. 본 연구에서 세포배양 배지 상태를 온라인으로 모니터링함으로써 비접촉 방식으로 배양배지를 분석할 수 있는 접근 방법은 최적의 운전조건 및 환경을 제공하리라 사료된다. 본 연구에서는 세포의 대사반응 과정에 따라 특이적으로 발현양상을 확인할 수 있는 글루코스와 락테이드를 ion chromatograph 장치로부터 분석하였다. 본 실험결과 글루코스의 소비량과 락테이트의 부산물이 서로 밀접하게 관련되어 있음을 보여주었다. 글루코스 소비량은 7일 동안 배양시 1,400 ppm에서 100 ppm으로 감소가 된 반면에, 락테이트는 0.1 ppm에서 1.4 ppm으로 크게 증가함을 나타냈다. 또한, 글루코스 실험치의 회귀분석 상관관계 결과 $r=0.997$ 로 나타나 통계적 유의성이 있음을 확인하였고 락테이트의 회귀분석 상관관계 결과 $r=0.975$ 로 나타나 통계적 유의성이 있음을 확인하였다. 이로써 NIR장치로 배지의 glucose와 lactate 성분을 비접촉식으로 실시간 분석이 가능함을 알 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2007.5- 2008.5)	(세부) 동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발 및 평가	생물자원을 이용한 지지체 제조 및 특성구명	100	- 생물자원을 이용한 지지체 제조 및 특성구명
		동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발 및 평가	100	- 세포의 배양촉진을 위한 초음파 생체자극 기술개발
		동물세포 배양시스템 설계 및 적정 배양기술 개발	100	- 동물세포 배양시스템 설계 및 적 정 배양기술 개발
	(위탁) 동물 세포, 조직 배양용 생체자극 배양시스템 설계 및 제작	동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 기본설계(위탁)	100	- 동물 세포, 조직용 생체자극 배 양시스템 기본설계(위탁)
2차 연도 (2008.5- 2009.5)	(세부) 동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발 및 평가	미세전류, 전자기장, 자기장 자극이 동물 세포 배양에 미치는 영향 구명	100	- 미세전류 자극이 동물 세포 배양 에 미치는 영향 구명 - 전자기장 자극이 동물 세포 배양 에 미치는 영향 구명 - 자기장 자극이 동물 세포 배양에 미치는 영향 구명
		동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발 및 평가	100	- 생체자극 기술을 이용한 동물 세포, 조직용 3차원 배양시스템 제작 -실시간 세포 모니터링시스템 개발
		지지체 등을 이용한 3차원 배양기술 개발	100	- 지지체 등을 이용한 3차원 배양기술 개발
	(위탁) 동물 세포, 조직 배양용 생체자극 배양시스템 설계 및 제작	동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 제작(위탁)	100	- 동물 세포, 조직용 생체자극 배양시스템 제작(위탁)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2009.5- 2010.5)	(세부) 동물 세포, 조직 배양을 위한 3차원 생체자극 배양시스템 개발 및 평가	생체자극을 이용한 동물 세포 및 조직 배양용 3차원 배양시스템 개발	100	- 생체자극 3차원 배양시스템 개발
		세포, 조직의 배양조건 및 배양 특성을 통한 종합적인 3차원 배양 환경시스템 구축	100	- 3차원 배양환경 시스템 구축 - 배지 성분 비접촉식 분석
		생체자극 배양시스템을 이용한 동물 세포의 생체 외 배양실험	100	- 배양시스템을 이용한 생체 외 배양실험
	(위탁) 동물 세포, 조직 배양시스템 설계, 제작 및 성능개선	동물 세포, 조직 배양시스템의 제작, 프로그램 개발, 성능 개선 및 보완(위탁)	100	- 동물 세포, 조직 배양시스템의 제작, 프로그램 개발, 성능 개선 및 보완 (위탁)

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과의 기술적 측면

- 1) 동물 세포 및 생체조직을 생체 외의 배양시스템에서 모니터링함으로써, 생체 내에서처럼 배양시킬 수 있는 기술을 확보함
- 2) 동물 세포 및 생체조직의 성장촉진을 위한 초음파 자극기술을 확보함
- 3) 동물 세포 및 생체조직의 성장촉진을 위한 미세 전류 자극기술을 확보함
- 4) 동물 세포 및 생체조직의 성장촉진을 위한 전자기장 자극기술을 확보함
- 5) 동물 세포 및 생체조직의 성장촉진을 위한 자기장 자극기술을 확보함
- 6) 동물 세포 및 생체조직의 성장촉진을 위한 유체역학적 자극기술을 확보함
- 7) 생물자원을 이용하여 생체적합성이 월등한 다공성 지지체의 인공 생체조직 제조 기술을 확보함
- 8) 소, 돼지의 동물뼈·무균돼지뼈는 수산화인회석(Hydroxyapatite; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)이라는 물질로 구성되어 있어 우리 인간의 뼈와 유사한 화학적 조성을 가지고 있으므로 인공뼈, 인공무균돼지뼈와 같은 바이오세라믹스의 소재로서도 이용이 가능한 바 바이오소재 개발기술을 확보함.

2. 연구개발 성과의 경제 산업적 측면

- 1) 동물 생체조직 및 기관의 3차원 배양시스템을 인공장기의 생체외 배양 분야에 응용한다면, 바이오 산업분야에 매우 큰 경제적 효과를 가져올 수 있음
- 2) 동물 생체조직 및 기관의 3차원 배양시스템은 인공장기 개발 산업과 관련한 바이오산업 분야에 큰 경제적·산업적 효과를 기여할 수 있음
- 3) 생물자원을 이용한 생체조직 지지체 개발은 수입품에 의존하는 생체재료의 바이오 산업 분야에 고부가가치 효과를 가져올 수 있음

- 4) 폐기된 소, 돼지 등의 동물뼈를 재활용한 칼슘화합물(인회석)의 바이오세라믹 제조 개발은 생체재료의 수입 대체로 인해 경제적 및 산업적 측면에서 큰 효과기대.
- 5) 인구노령화가 사회적 문제화되고 있는 현 시점에서, 골밀도 저하 등에 따른 골 조직의 손상은 연령이 증가할수록 완치율이 낮은 것으로 보고됨. 3D 생체조직 및 기관 배양 기술을 통해 대량으로 의료기술에 크게 이바지할 것으로 기대됨.

3. 학술적 연구성과

- 1) 국내학술지 2건, 2) SCIE급 논문 7건, 3) 국내학회 발표: 16건
- 4) 국외학회 발표: 16건, 5) 세미나 1건, 6) 인력양성: 박사 1명, 석사 4명,
- 7) 기술지도 1건

4. 연구성과 활용 계획

- 1) 생물자원을 이용한 생체조직 지지체(Scaffold) 제조의 특허 출원
- 2) 동물 세포 및 조직 관류식 배양시스템의 특허출원 및 산업화
- 3) 자극기술을 이용한 생체조직 및 기관배양 기술의 특허출원 및 산업화
- 4) 미세 전류 자극기술을 이용한 동물세포 및 조직의 생체자극기술의 특허출원
- 5) 초음파 자극기술을 이용한 동물세포 및 조직의 생체자극기술의 특허출원
- 6) 유체역학적 물리적 자극기술을 이용한 동물 세포 및 조직의 생체자극기술의 특허출원
- 7) 동물 세포 및 조직 배양 촉진용 관류식 배양시스템에 관한 기술 이전 및 산업화 활용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

<동물뼈 생물자원을 이용한 생체조직 지지체(scaffold) 제조 및 특성 해외과학기술정보>

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University of Technology, 재료과학공학부, 호주	산호로부터 뼈 및 자연으로부터 추출할 수 있는 천연 바이오세라믹: 산호를 이용한 생체세라믹 재료의 제조에 관한 연구	산호로부터 추출할 수 있는 바이오세라믹으로 제조된 생체 재료를 이용한 의학적 응용에 관한 방안을 제시
폴란드 AGH 파기원; 세라믹 재료공학부, 바이오테크놀로지공학부	천연 수산화인회석의 열처리 현상: 돼지뼈에서 HAp를 추출하고, 추출물을 다른 온도에서 소결시켜 HAp와 소결물의 성분에 관해 연구.	화학적절차를 통해 돼지뼈로부터 수산화인회석을 추출함. 유기물질은 350°C에서 없어짐. 천연수산화인회석은 탄산염과 미량Mg 포함하며 Ca/P비율은 합성재료보다 높게 나타남.
터키 Middle East 산업기술 대학, 재료금속공학부	미세다공성의 칼슘 수산화인회석 바이오세라믹 제조 : 메틸셀룰로오스와 HAp 가루에 초음파 자극을 주어 바이오세라믹 재료를 만드는 연구	균일한 포어 사이즈를 가지는 HA 바이오세라믹 재료를 만들 수 있는 방안에 대해서 연구.
미국 치의학협회 재단, 미국 표준 과학 기술 연구원	Calcium phosphate에 수용성 mannitol과 키토산을 이용해 강하고 다공성의 CPC 지지체 제조와 제조물의 생체적합성을 시험하기 위한 연구	새로운 방법으로 기계적 강도가 강화된 이식체가 CPC의 적당한 응력지지체로서의 활용범위를 확대시킬 수 있다는 것을 제시함.
University of Malaya, Malaysia, 기계설계공학부, University of Tenaga Nasional, 세라믹공학부	소뼈의 열처리를 통해 다공성 수산화인회석 바이오세라믹을 400-1200°C 사이에서 제조 및 평가하였음. 소결체는 TG/DTA, SEM, XRD, EDX, FTIR 측정으로 분석하였음.	XRD측정결과, 700°C 이상에서 Bone matrix의 HA결정구조가 향상됨을 나타내었음. 1100-1200°C에서는 β -tricalcium phosphate로 HA가 분해되었음. 600°C 이상에서는 유기물질이 완벽히 제거되었음. 결과적으로 800-1000°C 사이에서 소결한 소뼈가 가장 구조적으로 잘 나타났음.
홍콩 과학기술 대학 기계공학부, Sichuan대학, 생체재료연구 센터	생체내와 생체외에서 바이오세라믹의 calcium phosphate형성에 관한 비교연구. 생체 내의 다양한 bioceramic의 표면상에서 Ca-P의 형성 능력은 비슷했지만 생체 외에서는 다양하게 나타났음	같은조건상태에서 Ca-P형상 결과 (1) β -TCP를 제외하고 생체내·외 모두 바이오세라믹의 표면성질이 동일함(2)생체내서 Ca-P형성이 발생하지 않음(3)생체외에서 바이오세라믹표면의 Ca-P형성능력이 생체내보다 낮음.
일본 Tokushima대학교 치과대학 구강악외과.	바이오세라믹의 응용분야로서 calcium phosphate cement를 이용하여 생체내에서 빨리 석고화가 일어나도록 연구함	Conventional CPC와 Fast-setting CPC를 쥐의 femoral muscles에 In-vivo setting behaviour를 보았을 때 대조군은 48분인 소요된 반면 Fast-setting CPC는 5-7분으로 나타났음.

< 생체자극기술 및 동물 세포 및 조직 배양용 배양시스템의 개발 해외 과학기술정보 >

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발 성과의 활용 현황
Harvard-MIT대학 Division of Health Science and Tech.	지지체에 배양된 심근육세포의 전기자극영향으로 근육세포를 배양하기 위해, 생체외에서 8일간 전기자극(5V/cm, 1Hz) 실험 결과 세포원형질의 초미세구조 변화 및 세포분화가 일어남	생체의 지지체에 배양된 세포의 전기자극 실험은 세포의 성장을 촉진시킬 수 있음.
Northeastern 대학 Chemical Eng. & Rohm and Haas Company. USA.	세포분화 및 지지체 점착을 촉진하기 위해 Wavy-Walled Bioreactor에서 배양환경 인자의 특성을 연구. 특히, 배양시스템의 환경인자 중 유체흐름, 혼합시간, 용존산소량, 체류시간분포, 배지성분 등의 특성 연구.	배양시스템의 물리적 환경 인자에 따라, 세포분화 및 점착율에 영향을 받음. 본 연구에서도 여러 특성 환경인자를 고려하여 설계함을 시사.
슬로바키아과학기술원, 화학공학부	신경회로망을 이용하여 생물발효기의 PH, DO 농도 제어를 설계함. 신경회로망 모델 기반 시스템은 실제 환경에서 비선형 공정을 취급할 수 있음	신경회로망의 오류역전과 알고리즘을 이용하여 발효공정시스템의 최적화 제어 모델을 제시함
미국 Pittsburgh대학 Bioengineering 학부, 재생의학연구소	심장판막을 외부에서 실험할 수 있는 생물 반응장치의 설계 및 평가. 특히, Pulsatile pressure 와 flow waveform을 이용함.	생물 반응장치를 만들어 생체외부에서 생체 내에서 일어나는 것과 동일한 조건에서 실험 할 수 있는 가능성 제시
일본 나고야 대학 약학대학 구강수술과	기계적인 간헐적 반복 압축 자극을 태아 쥐의 악관절의 연골에 가했을 때 생기는 변화에 대한 연구.	뼈 조직의 대부분을 차지하는 Type I 콜라겐과 섬유결합소를 많이 생성할 수 있는 물리적 방법 제시
미국 버지니아대학 Biomedical Eng. & Chemical Eng.	두개골모세포를 삼차원 배양할 때 배지의 흐름에 따른 표현형의 변화와 무기질 침착의 변화에 대한 연구.	뼈세포의 배양을 위한 최적화된 배지 흐름의 기초를 제시
스위스 연방과학기술원	작은 사이즈의 여러 개의 실험을 위한 생물 반응 장치 시스템 연구.	여러 개의 작은 실험을 동시에 하며, 자동화의 가능성 제시
Northeastern 대학, 화학공학과	물결모양의 벽면으로 된 생물반응 장치 시스템이 연골응집에 미치는 영향에 관한 연구.	기존의 벽면으로 인한 생물 반응장치의 것보다 더 나은 연골응집을 나타내며, 유체역학적인 분석을 통해 새로운 형태의 모양계산 가능성 제시

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
이스라엘과학기술원, 바이오테크놀러지 협동과정	배아줄기세포를 회전하는 배양기에 배양하여 배양특성을 알아보는 연구.	회전하는 자극으로 인해 배아줄기세포가 신경도관이 형성되는 등의 조직의 형태를 띄게 된 결과를 분석하여 대량생산의 가능성 제시
플로리다주립대학 Biomedical Eng. & Chemical Eng.	중간엽 줄기세포배양을 위한 삼차원 관류 생물반응장치를 개발하여 관류흐름에 따른 세포의 점착특성을 알아보는 연구.	정적인 점착보다는 관류흐름에 의한 동적인 점착의 효율이 높다는 결과에서 생물반응장치의 점착에 대한 새로운 가능성 제시
미국 Pittsburgh대학, Bioengineering, 재생의학연구소	심장의 압력특성과 동일한 동적인 휨 자극을 줄 수 있는 생물반응장치의 개발과 생체재료의 압력특성의 연구.	생체재료의 압력에 의한 변화로 인한 결과를 토대로 세포점착후의 압력 변화를 예측할 수 있는 토대 제시
미국 Hoffmann-La Roche 회사	햄스터의 난소세포와 곤충세포가 효과적으로 자랄 수 있는 진동 생물반응장치의 개발과 연구.	각 세포들이 효과적으로 자란 결과에서 더 커다란 생물반응장치의 개발가능성 제시
일본 나고야 대학 약학대학 구강수술과	기계적인 간헐적 반복 압축 자극을 태아 쥐의 악관절의 연골에 가했을 때 생기는 변화에 대한 연구.	뼈 조직의 대부분을 차지하는 Type I 콜라겐과 섬유결합소를 많이 생성할 수 있는 물리적 방법 제시
미국 버지니아대학 Biomedical Eng. & Chemical Eng.	두개골모세포를 삼차원 배양할 때 배지의 흐름에 따른 표현형의 변화와 무기질 침착의 변화에 대한 연구.	뼈세포의 배양을 위한 최적화된 배지 흐름의 기초를 제시
스위스 연방과학기술원	작은 사이즈의 여러 개의 실험을 위한 생물반응 장치 시스템 연구.	여러 개의 작은 실험을 동시에 하며, 자동화의 가능성 제시
Northeastern 대학, 화학공학과	물결모양의 벽면으로 된 생물반응 장치 시스템이 연골응집에 미치는 영향에 관한 연구.	기존의 벽면으로 인한 생물 반응장치의 것보다 더 나은 연골응집을 나타내며, 유체역학적인 분석을 통해 새로운 형태의 모양계산 가능성 제시
이스라엘과학기술원, 바이오테크놀러지 협동과정	배아줄기세포를 회전하는 배양기에 배양하여 배양특성을 알아보는 연구.	회전하는 자극으로 인해 배아줄기세포가 신경도관이 형성되는 등의 조직의 형태를 띄게 된 결과를 분석하여 대량생산의 가능성 제시
플로리다주립대학 Biomedical Eng. & Chemical Eng.	중간엽 줄기세포배양을 위한 삼차원 관류 생물반응장치를 개발하여 관류흐름에 따른 세포의 점착특성을 알아보는 연구.	정적인 점착보다는 관류흐름에 의한 동적인 점착의 효율이 높다는 결과에서 생물반응장치의 점착에 대한 새로운 가능성 제시

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
플로리다주립대학 Biomedical Eng. & Chemical Eng.	중간엽 줄기세포배양을 위한 삼차원 관류 생물반응장치를 개발하여 관류흐름에 따른 세포의 점착특성을 알아보는 연구.	정적인 점착보다는 관류흐름에 의한 동적인 점착의 효율이 높다는 결과에서 생물반응장치의 점착에 대한 새로운 가능성 제시
미국 Pittsburgh대학, Bioengineering, 재생의학연구소	심장의 압력특성과 동일한 동적인 휨 자극을 줄 수 있는 생물반응장치의 개발과 생체재료의 압력특성의 연구.	생체재료의 압력에 의한 변화로 인한 결과를 토대로 세포점착후의 압력 변화를 예측할 수 있는 토대 제시
미국 Hoffmann-La Roche 회사	햄스터의 난소세포와 곤충세포가 효과적으로 자랄수 있는 진동 생물반응장치의 개발과 연구.	각 세포들이 효과적으로 자란 결과에서 더 커다란 생물반응장치의 개발가능성 제시
독일 Munster대학 구강악안면외과	0~2000 μ strain을 3차원 표본에 적용시킬수 있는 배양시스템을 개발함으로써, 3차원 생체조직공학을 위한 배양시스템의 설계 및 성능을 평가함.	유한요소법을 이용하여 기질 표면의 스트레인 분포를 분석하여 기계적 하중에 의한 기질의 변형요인을 분석할 수 있음.
미국 해양과학연구소, 바이오공학센터	신경세포를 typeI 콜라겐에 부착시킨 후 회전형 생물반응장치에 배양하여 배양특성을 알아보는 연구	신경세포가 빨리 분화하고 자라게 되었고, 신경세포의 분화기술을 이용한 신경재생치료의 가능성 제시
미국 버지니아대학, 바이오메디컬공학	생체조직공학을 위한 회전형 배양시스템에서 3차원 유체흐름의 정량적 분석	회전 생물반응장치에서 지지체의 밀도에 따른 유체특성을 이용한 새로운 생물반응장치 제시

< 동물 세포 및 조직 배양용 배양시스템의 모니터링 기술 개발 해외과학기술정보 >

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 The University of Iowa, 화공학과, 화학과	Simultaneous measurement of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy	Insect cell bioreactors에서 cell culture media 의 성분을 모니터링하기 위해 non-invasive techniques을 개발함. 특히, insect cell culture bioreactor에서 glucose 와 glutamine농도는 near-infrared (NIR) absorption spectroscopy를 이용하여 측정함.
미국 Florida Inst. of Technol., Electr. Eng.	Determination of glucose concentrations in an aqueous matrix from NIR spectra using optimal time-domain filtering and partialleast-squares regression	FT-NIR spectrometer를 이용하여 1538-1786nm에서 고농도의 글루코오스 수용액 실험을 통해 밝혀냄. 2083-2381nm에서 조금 더 강한 글루코오스 피크를 확인함. 2273nm에서 물의 영향을 가장 적게 받는 글루코오스의 피크를 확인함.
미국 University of Iowa., Department of Chemistry	Near-infrared spectroscopic measurement of glucose in a protein matrix Near-Infrared Spectroscopic Measurement of Physiological Glucose Levels in Variable Matrices of Protein and Triglycerides	혈장내에서 FT-NIR spectrometer를 이용하여 글루코오스 피크를 확인함. 단백질과 트리글리세라이드로 이루어진 모형 매질에서 FT-NIR spectrometer를 이용하여 2105, 2273, 2326nm의 피크를 확인함.
독일 Friedrich Schiller University, 의학부	Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy: methods for improving the reliability of the calibration models.	PDA 타입의 NIR spectrometer를 이용하여 800-1350nm에서 비침투적인 혈당 측정을 통해 1.02-1.88 mmol/l(18-34mg/dl)의 RMSP와 0.997의 상관성을 확인함.
벨기에 Gent 대학 약학과, Laboratory of Pharmaceutical Technology	Near-Infrared (NIR) Monitoring of H2O2 Vapor Concentration During Vapor Hydrogen Peroxide (VHP) Sterilisation	과산화수소수의 농도를 근적외선광분석법을 사용하여 분석하고 모델을 개발하는 연구로서 약학산업에서 사용하는 barrier system을 vapor H2O2로 살균할 때 포장매질에 따른 침투력의 차이를 근적외선으로 모니터링.
미국 Abbott Laboratories, 의약진단부서	Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements	형광광도법, 편광측정법, Raman분광 분석법 등의 빛을 이용해 glucose를 측정하는 방법을 연구함.
일본 Nagoya University, 농공학부	Nondestructive Measurement of the Subsurface Structure of Biological Material Having Cellular Structure by Using Near-Infrared Spectroscopy	인체 내 성분측정 중 Glucose 외에 계량분석의 다양한 분석장비 개발 측면에서 가능성을 확인할 수 있는 연구 시도.
영국 Silsoe Research Institute	비료성분을 구명하기 위한 연구에 EC(전기전도도)를 이용하는 것이 값싸고 확실한 측정방법임을 제시 (Estimating nutrients of animal slurries using electrical conductivity)	전기전도도를 이용하여 우분과 돈분 slurry의 비료성분을 구명하기 위한 연구에서 각 가축 분뇨의 slurry 속의 비료성분은 전기전도도와 매우 밀접한 상관관계를 갖고 있으나 인 함량은 EC 보다 DM과 보다 높은 상관관계를 갖고 있음.

제 7 장 참고문헌

제 1 절 참고문헌

1. 유지, 이일우. 1998. 생체조직공학 -개념과 응용-.고려의학. p.109-152.
2. Kim, E. S. and Chung, J. H., Fabrication and Biochemical Characteristics of Composite Ceramic Bone Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. of Biosystems Eng*, 2004, 29(5), 457-466.
3. Lee, C. K. and Choi, J. S., The Properties of Natural Hydroxyapatite Isolated from Tuna Bone. *J. Korean Fish. Soc*, 1997, 30(4), 652-659.
4. Lee, M. S., Na, C. K., Park, H. Y., Kim, O. B. and Kwon, M. S., The Reusability of Natural Hydroxyapatite(animal bone) as Inorganic Ion Exchanger for Purifying the Heavy Metal Pollutants, *J. Korea Solid Wastes Engineering Society*. 1997, 15(1), 66-75.
5. Jang H. and Kang, S. H. Phosphorous removal using cow bone in hydroxyapatite crystallization. *Water Research*, 2002, 36, 1324-1330.
6. Nissan B. B., Natural bioceramics : from coral to bone and beyond. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2003, 7, 283-288.
7. Hassan R. R. and Zhang M., Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials*, 2003, 24, 3293-3302

제 2 절 참고문헌

1. Periodontal disease: cause, symptoms, and treatments, 2006, National Institute of Health, USA.
2. Kursad Turksen, Adult Stem Cells, 2004, Humana Press, p.67.
3. Chantal E.Holy et al., Engineering 3D bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: In vestigating initial cell-seeding density and culture period, 2000, Bone Tissue Engineering, p.376-382.
4. A.L. Im et al., Preparation and biocompatibility of composite bone scaffolds using gnotobiotic gnotobiotic pig bones, 2007, J. of Biosystems Eng., 32(1):49-55.
5. Chung, J.H., W. Lee., P.H. and Choung., J.E. Davies. 2004. A Novel Bioresorbable Bone Cement Using gnotobiotic pig bone Apatite, Chitosan, and Cyanoacrylate for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biosystems Engineering*. 29(4):347-456.

6. LeGeros RZ, et al., Comparative properties of bioactive bone graft materials, 1995, Bioceramics, New York, Elsevier, p.81-87.
7. Spector M. Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration, 1994, Clin Plastic Surg, 21:437-444.
8. S.W.Seo, et al., particulate leaching 기법을 사용한 polymer scaffolds 상의 세포증식에 있어서 젤라틴 입자의 효과, 2004, 의공학학회지, 25(1).
9. J.S.Oh, et al., poly(p-dioxanone) scaffold의 초기 분자량이 in-vitro 특성에 관한 연구, 2001, 한국섬유공학학회지, 38(7).

제 3 절 참고문헌

1. Ardan Jr., N.I., Janes, J.M., Herrick, J.F., 1957. Ultrasonic energy and surgically produced defects in bone. J. Bone Joint Surg. Am. 39-A (2), 394 - 402.
2. Bender, L.F., Janes, J.M., Herrick, J.F., 1954. Histologic studies following exposure of bone to ultrasound. Arch. Phys. Med. Rehabil. 35 (9), 555 - 559.
3. Binderman I, Shimshoni Z, Somjen D. Biochemical pathways involved in the translation of physical stimulus into biological message. Calcif Tissue Int 1984;36:S82 - S85.
4. Binderman I, Zor U, Kaye AM, Shimshoni Z, Harell A, Somjen D. The transduction of mechanical force into biomechanical events in bone cells may involve activation of phospholipase A2. Calcif Tissue Int 1988;42:261 - 266.
5. Bolander, M.E., 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 200, 165 - 170.
6. Buchtala, V., 1950. Present state of ultrasound therapy. Dia. Med. 22 (70), 2944 - 2950. Maintz, G., 1950. Animal experiments in the study of the effect of ultrasonic waves on bone regeneration. Strahlentherapie 82 (4), 631 - 638.
7. Buckley MJ, Banes AJ, Levin LG, Sumpio BE, Sato M, Jordan R, Gilbert J, Link GW, Tran Son Tay R. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. Bone Miner 1988;4:225 - 236.
8. Chang, W.H., Sun, J.S., Chang, S.P., Lin, J.C., 2002. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. Bioelectromagnetics 23 (4), 256 - 263.
9. Chen, Y.J., Wang, C.J., Yang, K.D., Chang, P.R., Huang, H.C., Huang, Y.T., Sun, Y.C., Wang, F.S., 2003. Pertussis toxin-sensitive Galphai protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. FEBS Lett. 554 (1 - 2), 154 - 158.
10. Cook, S.D., Ryaby, J.P., McCabe, J., Frey, J.J., Heckman, J.D., Kristiansen, T.K., 1997.

Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 337, 198 - 207.

11. Corradi, C., Cozzolino, A., 1953. Effect of ultrasonics on the development of osseous callus in fractures. *Arch. Ortop.* 66 (1), 77 - 98.
12. De Nunno, R., 1952. Effect of ultrasonics on ossification; experimental studies. *Ann. Ital. Chir.* 29 (4), 211 - 220.
13. Dinno, M.A., Dyson, M., Young, S.R., Mortimer, A.J., Hart, J., Crum, L.A., 1989. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Phys. Med. Biol.* 34 (11), 1543 - 1552.
14. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 1983;101:153 - 159.
15. Dyson M, Brookes M. Stimulation of bone repair by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1983;101:S153 - S159.
16. Dyson, M., 1982. Non-thermal cellular effects of ultrasound. *Br. J. Cancer Suppl.* 45 (5), 165 - 171.
17. Ebisawa, K., Hata, K., Okada, K., Kimata, K., Ueda, M., Torii, S., Watanabe, H., 2004. Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 10 (5 - 6), 921 - 929.
18. El-Mowafi, H., Mohsen, M., 2005. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on callus maturation in tibial distraction osteogenesis. *International Orthopaedics* 29, 121 - 124.
19. Elmer, W.A., Fleischer, A.C., 1974. Enhancement of DNA synthesis in neonatal mouse tibial epiphyses after exposure to therapeutic ultrasound. *J. Clin. Ultrasound* 2 (3), 191 - 195.
20. Gross, T.S., Edwards, J.L., McLeod, K.J., Rubin, C.T., 1997. Strain gradients correlate with sites of periosteal bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 12 (6), 982 - 988.
21. Hantes, M.E., Mavrodontidis, A.N., Zalavras, C.G., Karantanas, A.H., Karachalios, T., Malizos, K.N., 2004. Low-intensity transosseous ultrasound accelerates osteotomy healing in a sheep fracture model. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A (10), 2275 - 2282.
22. Harle, J., Salih, V., Knowles, J.C., Mayia, F., Olsen, I., 2001. Effects of therapeutic ultrasound on osteoblast gene expression. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12 (10 - 12), 1001 - 1004.
23. Harvey, W., Dyson, M., Pond, J.B., Grahame, R., 1975. The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatol. Rehabil.* 14 (4), 237.
24. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial

- fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg A* 1994;76:26 - 34.
25. Herrick, J.F., Janes, J.M., Ardan Jr., N.I., 1956. Experimental studies relative to the therapeutic use of ultrasound. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 128 (12), 571 - 577.
 26. Heybeli, N., Yesildag, A., Oyar, O., Gulsoy, U.K., Tekinsoy, M.A., Mumcu, E.F., 2002. Diagnostic ultrasound treatment increases the bone fracture-healing rate in an internally fixed rat femoral osteotomy model. *J. Ultrasound Med.* 21 (12), 1357 - 1363.
 27. Hill, C.R., 1971. Ultrasonic Exposure Threshold for Changes in Cells and Tissues. *J. Acoust. Soc. Am.* 52 (2 (Pt 2)), 667 - 672.
 28. JH Cui, K Park, SR Park, BH Min, 2006. Effects of Low-Intensity Ultrasound on Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Embedded in Polyglycolic Acid: An in Vivo Study. *Tissue Engineering* 12-1, 75-81
 29. Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, Turner E, Veltel D. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblastlike cells. *Biomaterials* 1991;12:101 - 110.
 30. Klug, W., Franke, W.G., Knoch, H.G., 1986. Scintigraphic control of bone-fracture healing under ultrasonic stimulation: an animal experimental study. *Eur. J. Nucl. Med.* 11 (12), 494 - 497.
 31. Knoch GH, Klug W. Stimulation of fracture healing with ultrasound. Telger TC, translator. New York: Springer; 1991.
 32. Leung, K.S., Cheung, W.H., Zhang, C., Lee, K.M., Lo, H.K., 2004a. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (418), 253 - 259.
 33. Leung, M.C., Ng, G.Y., Yip, K.K., 2004b. Effect of ultrasound on acute inflammation of transected medial collateral ligaments. *Arch. Phys. Med. Rehab.* 85 (6), 963 - 966.
 34. Li, J.G., Chang, W.H., Lin, J.C., Sun, J.S., 2002. Optimum intensities of ultrasound for PGE(2) secretion and growth of osteoblasts. *Ultrasound Med. Biol.* 28 (5), 683 - 690.
 35. Mayer, E., Frankle, V., Ruter, A., 2000. Ultrasound—an alternative healing method for nonunions? *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 120, 1 - 8.
 36. Mayer, E., Laule, A., Suger, G., Ruter, A., Claes, L., 2001. Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound. *Journal of Orthopaedic Trauma* 15, 407 - 414.
 37. Mortimer, A.J., Dyson, M., 1988. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med. Biol.* 14 (6), 499 - 506.
 38. Mukai, S., Ito, H., Nakagawa, Y., Akiyama, H., Miyamoto, M., Nakamura, T., 2005. Transforming growth factor- β 1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound

in chondrocytes. *Ultrasound in Medicine & Biology* 31, 1713 - 1721.

39. Murolo, C., Claudio, F., 1952. Effect of ultrasonics on repair of fractures. *G. Chir.* 8 (11), 897 - 903.
40. Murray DW, Rushton N. The effect of strain on bone cell prostaglandin E sub 2 release: a new experimental method. *Calcif Tissue Int* 1990;47:35 - 39.
41. Nolte, P.A., van der Krans, A., Patka, P., Janssen, I.M., Ryaby, J.P., Albers, G.H., 2001. Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions. *Journal of Trauma* 51, 693 - 702.
42. Parvizi, J., Wu, C.C., Lewallen, D.G., Greenleaf, J.F., Bolander, M.E., 1999. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J. Orthop. Res.* 17 (4), 488 - 494.
43. Pavalko, F.M., Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y.F., Qiu, J., Duncan, R.L., 1998. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton - integrin interactions. *Am. J. Physiol.* 275 (6 (Pt 1)), C1591 - C1601.
44. Pilla, A.A., Mont, M.A., Nasser, P.R., Khan, S.A., Figueiredo, M., Kaufman, J.J., Siffert, R.S., 1990. Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J. Orthop. Trauma* 4 (3), 246 - 253.
45. Rawool, N.M., Goldberg, B.B., Forsberg, F., Winder, A.A., Hume, E., 2003. Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *J. Ultrasound Med.* 22 (2), 145 - 153.
46. Rubin J., Biskobing D., Fan X., Rubin C., McLeod K., Taylor W.R.. Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture. *J Cell Physiol* 1997;170:81 - 87.
47. Rubin, C., Bolander, M., Ryaby, J.P., Hadjiargyrou, M., 2001. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83-A (2), 259 - 270.
48. Ryaby JT, Mathew J, Pilla AA, Duarte-Alves P. Low-intensity pulsed ultrasound modulates adenylate cyclase activity and transforming growth factor beta synthesis. In: Brighton CT, Pollack SR, editors. *Electromagnetics in medicine and biology*. San Francisco: San Francisco Press; 1991. p 95 - 100.
49. Ryaby, JT., Bachner, E., Bendo, J., Dalton, P., Tannenbaum, S., Pilla, A.A., 1989. Low Intensity Pulsed Ultrasound Increases Calcium Incorporation in Both Differentiating Cartilage and Bone Cell Cultures, vol. 15. Orthopedic Research Society, Las Vegas, NV.
50. Schortinghuis, J., Bronckers, A.L., Stegenga, B., Raghoobar, G.M., de Bont, L.G., 2005.

- Ultrasound to stimulate early bone formation in a distraction gap: a double blind randomized clinical pilot trial in the edentulous mandible. *Archives of Oral Biology* 50, 411 - 420.
51. Shimazaki, A., Inui, K., Azuma, Y., Nishimura, N., Yamano, Y., 2000. Low intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. *Journal of Bone and Joint Surgery* 82, 1077 - 1082 (B).
 52. Somjen D, Binderman I, Berger E, Harell A. Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E sub 2 mediated. *Biochim Biophys Acta* 1980;627:91 - 100.
 53. Spadaro, J.A., Albanese, S.A., 1998. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound Med. Biol.* 24 (4), 567 - 573.
 54. Tsai, C.L., Chang, W.H., Liu, T.K., 1992. Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair. *Chin. J. Physiol.* 35 (1), 21 - 26.
 55. Wang, F.S., Kuo, Y.R., Wang, C.J., Yang, K.D., Chang, P.R., Huang, Y.T., Huang, H.C., Sun, Y.C., Yang, Y.J., Chen, Y.J., 2004. Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1 α activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts. *Bone* 35 (1), 114 - 123.
 56. Warden, S.J., Favalaro, J.M., Bennell, K.L., McMeeken, J.M., Ng, K.W., Zajac, J.D., Wark, J.D., 2001. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 (3), 443 - 450.
 57. Watson, T., 2000. The role of electrotherapy in contemporary physiotherapy practice. *Man. Ther.* 5 (3), 132 - 141.
 58. Webster, D.F., Pond, J.B., Dyson, M., Harvey, W., 1978. The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 4 (4), 343 - 351.
 59. Webster, D.F., Harvey, W., Dyson, M., Pond, J.B., 1980. The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vitro' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics* 18 (1), 33 - 37.
 60. Wimsatt, J., Dressen, P., Dennison, C., Turner, A.S., 2000. Ultrasound therapy for the prevention and correction of contractures and bone mineral loss associated with wing bandaging in the domestic gnotobiotic pigeon (*Columba livia*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 31 (2), 190 - 195.
 61. Wolff J. The law of bone remodeling. Maquet P, Furlong R, translators. New York: Springer; 1986.
 62. Wu, C.C., Lewallen, D.G., Bolander, M., Bronk, J., Kinnick, R., Greenleaf, J.F., 1996. Exposure to Low Intensity Ultrasound Stimulates Aggrecan Gene Expression by

Cultured Chondrocytes, vol. 622. Orthopedic Research Society, Atlanta, GA.

63. Xavier CAM, Duarte LR. Estimulaca ultra-sonica de calo osseo: applicaca clinica. Rev Bras Ortop 1983;18:73 - 80.
64. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME. Exposure to low intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res 1996;14:802 - 809.
65. Yang, R.S., Lin, W.L., Chen, Y.Z., Tang, C.H., Huang, T.H., Lu, B.Y., Fu, W.M., 2005. Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. Bone 36 (2), 276 - 283.
66. Yeh CK, Rodan GA. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. Calcif Tissue Int 1984;36:S67 - S71.
67. Zhang, Z.J., Huckle, J., Francomano, C.A., Spencer, R.G., 2003. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. Ultrasound Med. Biol. 29 (11), 1645 - 1651.

제 4 절 참고문헌

1. Jack B. H., Alexis G. O., Phillip S., The biologic effects and the Therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation of bone and cartilage : New findings and a review of earlier work, J of Alternative and Complement Med. 2007;13(5):485-490.
2. Hao M, Dick A, Forrester JV, McCaig CD, Electric field-directed cell motility involves up-regulated expression and asymmetric redistribution of the epidermal growth factor receptors and is enhanced by fibronectin and by laminin. Mol. Biol. Cell, 1999;10:1259-1276.
3. Falanga V, Bourguignon GJ, Bourguignon LWY, Electrical stimulation increases the expression of fibroblasts receptors for transforming growth factor-beta. J Invest Dermatol;1987;88:488-491
4. Hang H, Wang W, Selves RM, et al., Electrical stimulation induces the level of TGF- β mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium calmodulin pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. ; 1997;237:225-229.
5. Lohmann CH, Schwartz Z, Hummert TW, et al., Pulsed electromagnetic field stimulation of MG36 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. J Orthop. Res. ;2000; 56A:237-243
6. Gronthos S., Mankani M., Brahim J., Robey PG., Shi S. Postnatal human dental pulp

- stem cells(DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* ;2000;97(13);625-630
7. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K., et al., Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts from bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner. Res.* ;1997;12;1335-1347
 8. Xia Li, Tongcheng Xu, Xiaohang Ma, et al., Optimization of culture conditions for production of cis-exoxysuccinic acid hydrolase using response surface methodology. *Bioresource Technology*; 2008;99;5391-5396
 9. Hermann Berg, Possibilities and problems of low frequency weak electromagnetic fields in cell biology. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*;1995;38;153-159
 10. In Sook Kim, Jong Keun Song, Yu Lian Zhang, et al., Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*; 2006;1763;907-916
 11. Vidal JC, Espuelas J, Garcia-Ruiz E, Castillo JR. Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers. *Talanta* 2004;64(3):655-664.
 12. You-Young Jo, Hee-Jung Lee, Pill-Hoon Choung et al., Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues. *Tissue Eng.*2007;13;767-773.
 13. Hans-Peter Wiesmann et al., Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001;1538;28-37.
 14. Pen-Hsiu Grace Chao et al., Chondrocyte Translocation Response to Direct Current Electric Fields. *J of Biomechanical Eng.*2000;122;261-266
 15. Ming-Tzu Tsai, et al., Pulsed Electromagnetic Field Affect Osteoblast Proliferation and Differentiation in Bone Tissue Engineering. *Bioelectromagnetics*;2007;28;519-528.
 16. Pen-hsiu Grace Chao, et al., Effects of Applied DC Electric Field on Ligament fibroblast Migration and Wound Healing. *Connective Tissue Res.*;2007;48;188-197.
 17. Nagarajan S. et al., Effects of BMP-2 and Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) on Rat Primary Osteoblastic Cell Proliferation and Gene Expression. *J of Orthopaedic Res.*;2007;1213-1219.
 18. Goodman R, Shirley-Henderson A. A transcription and translation in cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Cancer Biochem. Biophys.*;1991;25;335-355
 19. Zhuang H., Wang W., Seldes R., et al., Electrical stimulation induces the level of TGF-beta 1 Mrna in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*;1997;237;225-229.
 20. Aaron RK., Ciombor DM., Keeping HS., Power frequency fields promote cell

differentiation coincident with an increase in transforming TGF-beta 1 expression. *Bioelectromagnetics* 1999;10:453-458.

21. Aaron RK., Wang S., Ciombor DM., Upregulation of basal TGF-beta 1 levels by EMF coincident with chondrogenesis: Implications for skeletal repair and tissue engineering. *J Orthop. Res.* 2002;20:233-240.

제 5 절 참고문헌

1. Khalil AM, Qassem W (1991): Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: Chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutat Res* 247:141 - 146.
2. Schimmelpfeng J, Dertinger H (1993): The action of 50 Hz magnetic and electric fields upon cell proliferation and cyclic AMP content of cultured mammalian cells. *Bioelectrochem Bioenerg* 30:143 - 150.
3. Parola AH, Porat N, Kiesow LA (1993): Chicken embryo fibroblasts exposed to weak, time-varying magnetic fields show cell proliferation, adenosine deaminase activity and membrane characteristics of transformed cells. *Bioelectromagnetics* 14:215 - 228.
4. Walleczek J, Budinger TF (1992): Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett* 314: 351 - 355.
5. Schimmelpfeng J, Stein JC, Dertinger H (1995): Action of 50 Hz magnetic fields on cyclic AMP and intercellular communication in monolayers and spheroids of mammalian cells. *Bioelectromagnetics* 16:381 - 386.
5. Basset CAL, Mitchell SN, Gaston SR (1982) Pulsing electromagnetic field treatment in ununited fractures and failed arthrodeses. *JAMA* 247: 623 - 628
6. Faensen M, Breul R (2001) Prospektive multi-centric study for the treatment of Gonarthrosen (Kellgren II and III) with the PST. *Orthop Pract* 37: 701 - 709
7. Markoll R, Da Silva Ferreira D, Toohil T (2004) Pulsed signal therapy for the treatment of musculoskeletal conditions: a millennium paradigm. *J Rheumatol* 7: 292 - 305
8. Finkelstein E, Chang W, Chao PHG, Gruber D, Minden A, Hung CT, Bulinski JC (2003) Roles of microtubules, cell polarity, and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 117: 1533 - 1545
9. Li X, Kolega J (2002) Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 39:391 - 404
10. Katz B, Miledi R (1972) The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J Physiol* 224:665 - 699

11. Aaron R, Boyan B, Ciombor D, Schwartz Z, Simon B (2004) Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop* 419: 30 - 37
12. Koch CLMB, Sommarin M, Persson BRR, Salford LG, Eberhardt JL (2003) Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. *Bioelectromagnetics* 24:395 - 402
13. Ohata R, Tomita N, Ikada Y (2004) Effect of a static magnetic field on ion transport in a cellulose membrane. *J Colloid Interface Sci* 270:413 - 416
14. Rogachefsky RA, Altman RD, Markov MS, Cheung HS (2004) Use of a permanent magnetic field to inhibit the development of canine osteoarthritis. *Bioelectromagnetics* 25:260 - 270
15. Onuma E, Hui S (1988) Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J Cell Biol* 106:2067 - 2075
16. E.M. Goodman, B. Greenebaum, M.T. Marron, Effects of electromagnetic fields on molecules and cells, *Int. Rev. Cytol.* 158 (1995) 279 - 38.
17. D.N. Russell, S.J. Webb, Metabolic response of *Danaus archippus* and *Saccharomyces cerevisiae* to weak oscillatory magnetic fields, *Int. J. Biometeorol.* 25 (1981) 257 - 62.
18. R. Goodman, J. Bumann, L.-X. Wei, A.S. Henderson, Exposure of human cells to electromagnetic fields: effect of time and field strength on transcript levels, *Electro-Magnetobiology* 11 (1992) 19.
19. M.R. Cook, C. Graham, H. Cohen, M.M. Gerkovich, A replication study of human exposure to 60Hz fields: effects on neurobehavior measures, *Bioelectromagnetics* (NY) 13 (1992) 261 - 86.
20. D.J. Panagopoulos, N. Messini, A. Karabarounis, A.L. Filippetis, L.H. Margaritis, A mechanism for action of oscillating electric fields on cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (3) (2000) 634 - 40.
21. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, Garland, New York, 1994.
22. P.F. Baker, A.L. Hodgkin, T.L. Shaw, The effects of changes in internal ionic concentration on the electrical properties of perfused giant axons, *J. Physiol.* 164 (1962) 355 - 74.
23. F.S. Barnes, Interaction of DC and ELF electric fields with biological materials and systems, in: C. Polk, E. Postow (Eds.), *CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1996, pp. 27 - 6.
24. Bersani F, Martinelli F, Ognibene A (1997) Intramembrane protein distribution in cell cultures is affected by 50 Hz pulsed magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 18:463 - 469

25. Chiabrera A, Bianco B Moggia E (2000) Zeeman-Stark modeling of the RF EMF interaction with ligand binding. *Bioelectromagnetics* 21:312 - 324
26. Massot O, Grimaldi B, Bailly JM (2000) Magnetic field desensitizes 5-HT1B receptor in brain: pharmacological and functional studies. *Brain Res* 858:143 - 150
27. Williams, D.C., Boder, G.B., Toomey, R.E., Paul, D.C., Hillman Jr., King, K.L., Van Frank, R.M., Johnston Jr., R.M, 1980. Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcified Tissue International* 30, 233 - 246.
28. D.J. Panagopoulos, N. Messini, A. Karabarbounis, A.L. Filippetis L.H. Margaritis, A mechanism for action of oscillating electric fields on cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (3) (2000) 634 - 640.
29. Dimitris J. Panagopoulos,a,* Andreas Karabarbounis,b and Lukas H. Margaritisa, Mechanism for action of electromagnetic fields on cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298 (2002) 95 - 102
30. B.H. Honig, W.L. Hubbell, R.F. Flewelling, Electrostatic interactions in membranes and proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15 (1986) 163 - 193.

제 6 절 참고문헌

1. Hong, F.T., 1995. Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms. *Biosystems* 36, 187 - 29.
2. Rosen, A.D., 2003. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cellular Biochemistry Biophysics* 39, 163 - 73.
3. Saffer, J.D., Phillips, J.L., 1996. Evaluating the biological aspects of in vitro studies in bioelectromagnetics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 40, 1 - 20.
4. Cossarizza, A., Monti, D., Bersani, F., Cantini, M., Cadessi, R., Sacchi, A., Franceschi, C., 1989. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 160, 692 - 98.
5. Walleczek, J., Liburdy, R.P., 1990. Nonthermal 60-Hz sinusoidal magnetic field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Letters* 271, 157 - 60.
6. Bassett, C. A. L. (1994). Therapeutic uses of electric and magnetic fields in orthopedics. In: Karpenter, D., Ayrapetyan, S., eds. *Biological Effects of Electric and Magnetic Fields*. San Diego: Academic Press, pp. 13 - 8.
7. Detlavs, I. (ed.) (1987). *Electromagnetic Therapy in Traumas and Diseases of the*

Support-motor Apparatus. Riga RMI, p. 198.

8. Jerabek, J. (1994). An overview of present research into magnetotherapy. In: Coghill, R., ed. Proceedings of First World Congress on Magnetotherapy. Lower Race, Pontypool: England, pp. 5 - 8.
9. Markov, M. S. (1987). Biophysical aspects of the application of electromagnetic fields in orthopedics and traumatology. In: Detlav, I., ed. Electromagnetic Therapy in Traumas and Diseases of the Support-Motor Apparatus. Riga: Zinatie, pp. 76 - 6.
10. Todorov, N. (1982). Magnetotherapy. Sofia: Meditzina i Physcultura Publishing House, p. 106.
11. Markov, M. S., Pilla, A. A. (1995). Electromagnetic field stimulation of soft tissues. Wounds 7:143 - 51.
12. Pilla, A. A. (1993). State of the art in electromagnetic therapeutics. In: Blank, M., ed. Electricity and Magnetism in Biology and Medicine. San Francisco: San Francisco Press Inc., pp. 17 - 2.
13. Vodovnik, L., Karba, R. (1992). Treatment of chronic wounds by means of electric and electromagnetic fields. Med & Biol. Eng. & Comput. 30:257 - 66.
14. Bassett, C. A. L. (1989). Fundamental and practical aspects of therapeutical uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). Crit. Rev. Biomed. Eng. 17:451 - 29.
15. Dunn, M. G., Doillon, C. H., Berg, R. A. (1988). Wound healing using a collagen matrix: effect of DC electrical stimulation. J. Biomed. Mater. Res. 22A:191 - 06.
16. Markov, M. S. (2004). Magnetic and electromagnetic field therapy: basic principles of application for pain relief. In: Rosch, P. J., Markov, M. S., eds. Bioelectromagnetic Medicine. New York: Marcel Dekker, pp. 251 - 64.
17. Rosen, A.D., 2003. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. Cellular Biochemistry Biophysics 39, 163 - 73.
18. Ross, S.M., 1990. Combined DC and ELF magnetic fields can alter cell proliferation. Bioelectromagnetics 11, 27 - 6.
19. Nordenson, I., Mild, K.H., Andersson, G., Sandstrom, M., 1994. Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty hertz magnetic fields. Bioelectromagnetics 15, 293 - 301.
20. Miyakoshi, J., Yamagishi, N., Ohtsu, S., Mohri, K., Takebe, H., 1996. Increase in lipoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutations by exposure to high-density 50 Hz magnetic fields. Mutation Research 349, 109 - 14.
21. Liburdy, R.P., Sloma, T.R., Sokolic, R., Yaswen, P., 1993. ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 50 Hz fields block melatonin' oncostatic action on ERCbreast

- cancer cell proliferation. *Journal of Pineal Research* 14, 89 - 7.
22. Morandi, M.A., Pak, C.M., Caren, R.P., Caren, L.D., 1996. Lack of an EMF-induced genotoxic effect in the Ames assay. *Life Science* 59, 263 - 271.
 23. Loberg, L.I., Engdahl, W.R., Gauger, J.R., Mc Cormick, D.L., 2000. Expression of cancer-related genes in human cells exposed to 60 Hz magnetic fields. *Radiation Research* 153, 679 - 84.
 24. Ishisaka, R., Kanno, T., Inai, Y., Nakahara, H., Akiyama, J., Yoshioka, T., Utsumi, K., 2000. Effects of a magnetic fields on the various functions of subcellular organelles and cells. *Pathophysiology* 7, 149 - 52.
 25. Fiorani, M., Cantoni, O., Sestili, P., Conti, R., Nicolini, P., Vetrano, F., Dacha, M., 1992. Electric and/or magnetic field effects on DNA structure and function in cultured human cells. *Mutation Research* 282, 25 - 9.
 26. Lyle, D.B., Fuchs, T.A., Casamento, J.P., Davis, C.C., Swicord, M.L., 1997. Intracellular calcium signaling by Jurkat T-lymphocytes exposed to 60 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 18, 439 - 45.
 27. Dini, L., Abbro, L. (2005). Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 26:195 - 17.
 28. Luben, R. A. (1994). Membrane signal transduction as a site of electromagnetic action in bone and other tissues. In: Fray, A., ed. *On the Nature of Electromagnetic Field Interactions with Biological Systems*. Austin TX: RG Landes, pp. 83 - 8.
 29. Okano, H., Masuda, H., Ohkubo, C. (2005b). Decreased plasma levels of nitric oxide metabolites, angiotensin II and aldosterone in spontaneously hypertensive rats exposed to 5 mT static magnetic field. *Bioelectromagnetics* 26:161 - 72.
 30. Rosch, P. J., Markov, M. S. eds. (2004). *Bioelectromagnetic Medicine*. Marcel Dekker, p. 850.
 31. Sisken, B. F., Walker, J. (1995). Therapeutic aspects of electromagnetic fields for soft tissue healing. In: Blank, M. ed. *Electromagnetic Fields: Biological Interactions and Mechanisms*, *Advances in Chemistry*, V.250, Washington, D.C.: pp. 277 - 86.
 32. Bolander, M.E., 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 200, 165 - .170.
 33. Williams, D.C., Boder, G.B., Toomey, R.E., Paul, D.C., Hillman Jr., King, K.L., Van Frank, R.M., Johnston Jr., R.M, 1980. Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcified Tissue International* 30, 233 - 246.
 34. Darendeliler MA, Darendeliler A, Sinclair PM (1997). Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. *Int J Adult Orthod Orthognath Surg*

12:43-53.

35. Darendeliler MA, Sinclair PM, Kusy RP (1995). The effects of samarium-cobalt magnets and pulsed electromagnetic fields on gnathostomatid pig bone movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 107:578-588.
36. Yan QC, Tomita N, Ikada Y (1998). Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. *Med Eng Phys* 20:397-402.

제 7 절 참고문헌

1. GN Bancroft, VI Sikavitsas, Jvd Dolder, *et al.*, Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in adose - dependant manner, *PNAS*, 99, 12600 (2002).
2. Y Martin, P Vermette, Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances, *Biomaterials* 26(35), 7481 (2005).
3. P Pathi, T Ma, BR Locke, Role of nutrient supply on cell growth in bioreactor design for tissue engineering of hematopoietic cells, *Biotechnol Bioeng*, 89(7), 743 (2005).
4. XJ Yu, EA Botchwey, EM Levine, *et al.*, Bioreactor based bone tissue engineering: The influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization, *PNAS*, 101, 11203 (2004).
5. L Schropp, A Wenzel, L Kostopoulos, *et al.*, Bone healing and soft tissue contour changes following single-gnathostomatid pig bone extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study, *Int J Periodont Restor Dent*, 23, 313 (2003).
6. VI Sikavitsas, JS Temenoff, AG Mikos, Biomaterials and bone mechanotransduction, *Biomaterials*, 22, 2581 (2001).
7. J Vance, S Galley, DF Liu, *et al.*, Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E-2 release, *Tissue Eng*, 11, 1832 (2005).
8. S Weinbaum, SC Cowin, Y Zeng, A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading induced bone fluid shear stresses. *J Biomech*, 27, 339 (1994).
9. M Shachar, S Cohen, Cardiac tissue engineering, ex vivo: design principles in biomaterials and bioreactors, *Heart Fail Rev*, 8(3), 271 (2003)
10. I Martin, D Wendt, M Heberer, The role of bioreactors in tissue engineering, *Trends Biotechnol*, 22(2), 80 (2004)
11. HW Blanch, DS Clark, Biochemical Engineering: Basic Concepts, 2nd edn, *Marcel Dekker Inc* (1996).

12. K Riet J Tramper, Basic Bioreactor Design, *Marce IDekker Inc* (1991).
13. ML Shuler, F Kargi, Bioprocessing Engineering: Basic Concepts NJ: Upper Saddle River, *Prentice-Hall Inc* (2002).
14. GH Altman, RL Horan, I Martin, *et al.*, Cell differentiation by mechanical stress. *J FASEB* , 16, 270 (2002).
15. FW Janssen, J Oostra, A van Oorschot, *et al.*, A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: *In vivo* bone formation showing proof of concept, *Biomaterials*, 27, 315 (2006).
16. Y Wang, T Uemura, J Dong, *et al.*, Perfusion culture system improves osteogenesis of rat bone marrow derived osteoblastic cells in porous ceramic materials, *J Bone Miner Res*, 17, 338 (2002).
17. M Radisic, L Yang, J Boublik, *et al.*, Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(2), 507 (2004).
18. J Glowacki, S Mizuno, JS Greenberger, Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture, *Cell Transplant*, 7(3), 319 (1998).
19. SH Cartmell, BD Porter, AJ Garcia, *et al.*, Effects of Medium Perfusion Rate on Cell-Seeded Three-Dimensional Bone Constructs *in vitro*. *Tissue Eng*, 9(6), 1197 (2003).
20. ME Gomes, VI Sikavitsas, E Behraves, *et al.*, Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds, *Biotechnol Bioeng*, 67(1), 87 (2003).
21. B Rath, J Nam, TJ Knobloch,*et al.*, Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts, *J Biomech*, 41, 1095 (2008).
22. GN Bancroft, VI Sikavitsas, AG Mikos, Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications, *Tissue Eng*, 9, 549 (2003).
23. AS Goldstein, TM Juarez, CD Helmke, *et al.*, Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds, *Biomaterials*, 22(11), 1279 (2001).
24. Beckman M, Play by play imaging rewrites cells rules, *Science* 300, 76 (2003).
25. DJ Stephens, VJ Allan, Light microscopy techniques for live cell imaging, *Science*, 300, 82 (2003).
26. C Thomas, P De Vries, J Hardin, *et al.*, Four dimensional imaging: Computer visualization of 3D movements in living specimens, *Science*, 273, 603 (1996).
27. SP Hoerstrup, R Sodian, JS Sperling, *et al.*, New pulsatile bioreactor for *in vitro* formation of tissue engineered heart valves, *Tissue Eng*, 6, 75 (2000).
28. MJ Powers, K Domansky, MR Kaazempur-Mofrad, *et al.*, A microfabricated array

- bioreactor for perfused 3D liver culture, *Biotechnol Bioeng*, 78(3), 257 (2002).
29. F Zhao, T Ma, Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development, *Biotechnology and bioengineering*, 91(4), 482 (2005).
 30. C Williams, TM Wick, Perfusion bioreactor for small diameter tissue engineered arteries, *Tissue Eng*, 10(5-6), 930 (2004).
 31. DC Focht, Live-cell microscopy: Environmental control for mammalian specimens, *Nat Biotechnol*, 14, 361 (1996).
 32. WA Hing, CA Poole, CG Jensen, *et al.*, An integrated environmental perfusion chamber and heating system for long-term, high resolution imaging of living cells, *J Microsc Oxf*, 199, 90 (2000).
 33. RA Salzman, SR Pollack, AFT Mak, *et al.*, Electromechanical potentials in cortical bone a continuum approach, *J Biomech*, 20, 261 (1987).
 34. AD Bakker, K Soejima, J Klein-Nulend, *et al.*, The production of nitric oxide and prostaglandin e₂ by primary bone cells is shear stress dependant, *J Biomech*, 34, 671 (2001).
 35. CH Hammerle, R Glauser, Clinical evaluation of dental implant treatment, *Periodontol*, 2000(34), 230 (2004).
 36. WV Giannobile, Periodontal tissue engineering by growth factors, *Bone*, 19(1S), 23S (1996).
 37. ME Bolander, Regulation of fracture repair by growth factors, *Proc Soc Exp Biol Med*, 200(2), 165 (1992).
 38. A Ignatius, H Blessing, A Liedert, Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices, *Biomaterials*, 26, 311 (2005).
 39. JR Mauney, S Sjostrom, J Blumberg, Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro*, *Calcif Tissue Int* 74, 458 (2004).
 40. S Judex, X Lei, D Han, *et al.*, Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude, *J Biomech*, 40, 1333 (2007).
 41. SM Tanaka, J Li, RL Duncan, *et al.*, Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts, *J Biomech*, 36(1), 73 (2003).
 42. KJ Gooch, JH Kwon, T Blunk, *et al.*, Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage, *Biotechnol Bioeng*, 72(4), 402 (2001).
 43. MJ Yaszemski, RG Payne, WC Hayes, *et al.*, Evolution of bone transplantation:

- Molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone, *Biomaterials* 17, 175 (1996).
44. LE Niklason, J Gao, WM Abbott, *et al.*, Functional arteries grown *in vitro*, *Science*, 284, 489 (1999).
 45. D Seliktar, RA Black, RP Vito, *et al.*, Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs including remodeling *in vitro*, *Ann Biomed Engineering*, 28, 351 (2000).
 46. SP Hoerstrup, G Zund, R Sodian, *et al.*, Tissue engineering of small caliber vascular grafts, *Europe J Cardio-thoracic Surg*, 20, 164 (2001).
 47. PF Davies, Flow mediated endothelial mechanotransduction, *Physiology Review*, 75, 519 (1995).
 48. G Kasper, JD Glaeser, S Geissler, Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior, *Stem Cells*, 25, 1985 (2007).
 49. CA Simmons, S Matils, AJ Thornton, Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cell via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech*, 36, 1087 (2003)
 50. L Zhang, N Tran, HQ Chen, Cyclic stretching promotes collagen synthesis and affects F-actin distribution in rat mesenchymal stem cells, *Biomed Mater Eng.*, 18(4-5), 205 (2008).
 51. L Malaval, D Modrowski, AK Gupta, *et al.*, Cellular expression of bone-related proteins during *in vitro* osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures, *J. Cell Physiol*, 158, 555 (1994).
 52. EL Smith, C Gilligan, Mechanical forces and bone, *Bone Miner Res*, 6, 139 (1989)
 53. GP Thomas, AJ El Haj, Bone marrow stromal cells are load responsive *In vitro*, *Calcif Tissue Int*, 58, 101 (1996)
 54. YJ Li, NN Batra, L You, *et al.*, Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation, *J Orthop Res*, 22(6), 1283 (2004).
 55. HL Holtorf, JA Jansen, AG Mikos, Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stromal cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone, *J Biomed Mater Res A*. 72(3), 326 (2005).
 56. CC Huang, KL Hagar, LE Frost, *et al.*, Effects of Chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 22(3), 313 (2004).
 57. TL Donahue, TR Haut, CE Yellowley, *et al.*, Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport, *J*

Biomech. 36, 1363 (2003).

58. RL Duncan, CH Turner, Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain, *Calcif Tissue Int*, 57(5), 344 (1995).
59. EH Burger, J Klein-Nulend, Mechanotransduction in bone: Role of the lacuno-canalicular network, *FASEB J*, 13S, S101 (1999).
60. I Owan, DB Burr, CH Turner, *et al.*, Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain, *Am J Physiol*, 273, 810 (1997).
61. MM Sandberg, HT Aro, EI Vuorio, Gene expression during bone repair. *Clin Orthop*, 289, 292 (1993).
62. AL Bronckers, S Gay, RD Finkelman, *et al.*, Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in gnotobiotic pig bone germs and bones of the rat, *Bone Miner*, 2, 361 (1987).
63. MA Aronow, LC Gerstenfeld, TA Owen, *et al.*, Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol*, 143, 213 (1990).

제 8 절 참고문헌

1. Bancroft GN, Sikavitsast VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12600 - 12605.
2. Martin Y, Vermette P. 2005. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 26:7481 - 7503.
3. Pathi P, Ma T, Locke BR. 2005. Role of nutrient supply on cell growth in bioreactor design for tissue engineering of hematopoietic cells. *Biotechnol Bioeng* 89:743 - 758.
4. Yu XJ, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT. 2004. Bioreactor-based bone tissue engineering: The influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11203 - 11208.
5. Lichtenberg A, Dumlu G, Walles T, Maringka M, Ringes-Lichtenberg S, Ruhparwar A, Mertsching H, Haverich A. 2005. A multifunctional bioreactor for three-dimensional cell (co)-culture. *Biomaterials* 26: 555 - 562.
6. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. 2001. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22:2581 - 2593.
7. Vance J, Galley S, Liu DF, Donahue SW. 2005. Mechanical stimulation of MC3T3

- osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E-2 release. *Tissue Eng* 11:1832 - 1839.
8. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. 1994. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 27:339 - 360.
 9. Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PRH, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. 2002. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 16:270 - 272.
 10. Janssen FW, Oostra J, van Oorschot A, van Blitterswijk CA. 2006. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 27:315 - 323.
 11. Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tateishi T. 2002. Perfusion culture system improves osteogenesis of rat bone marrow derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. *J Bone Miner Res* 17: S338.
 12. Beckman M. 2003. Play-by-play imaging rewrites cells' rules. *Science* 300: 76 - 77.
 13. Stephens DJ, Allan VJ. 2003. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300:82 - 86.
 14. Thomas C, De Vries P, Hardin J, White J. 1996. Four-dimensional imaging: Computer visualization of 3D movements in living specimens. *Science* 273:603.
 15. Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE. 2000. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng* 6:75 - 79.
 16. Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, Kurzawski P, Wack KE, Stolz DB, Kamm R, Griffith LG. 2002. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng* 78:257 - 269.
 17. Vance J, Galley S, Liu DF, Donahue SW. 2005. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E-2 release. *Tissue Eng* 11:1832 - 1839.
 18. Williams C, Wick TM. 2004. Perfusion bioreactor for small diameter tissue engineered arteries. *Tissue Eng* 10:930 - 941.
 19. Focht DC. 1996. Live-cell microscopy: Environmental control for mammalian specimens. *Nat Biotechnol* 14:361 - 362.
 20. Hing WA, Poole CA, Jensen CG, Watson M. 2000. An integrated environmental perfusion chamber and heating system for long-term, high resolution imaging of living cells. *J Microsc Oxf* 199:90 - 95.
 21. RA Salzstein, SR Pollack, AFT Mak, N Petrov, Electromechanical potentials in cortical bone - a continuum approach, *J Biomech*, 20, 261 (1987).

- 22 AD Bakker, K Soejima, J Klein-Nulend, EH Burger, The production of r nitric oxide and prostaglandin e2 by primary bone cells is shear stress dependant, J Biomech, 34, 671 (2001).
23. M Shachar, S Cohen, Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors, Heart Fail, Rev 8, 271 (2003).

제 9절 참고문헌

1. Konstantinov, K. B., Yoshida, T. 1989. Physiological state control of fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1145-1156.
2. K. Konstantinov, 1996. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 52: 271 - 289.
3. K. Konstantinov, S. Chuppa, E. Sajan, Y. Tsai, S. Yoon, F. Golini, 1994. Real-time biomass concentration monitoring in animal cell cultures, *Trends Biotechnol.* 12.
4. P. Ducommun, I. Bolzonella, M. Rhiel, P. Pugeaud, U. von Stockar, I.W. Marison, 2001. On-line determination of animal cell concentration, *Biotechnol. Bioeng.* 72: 515 - 522.
5. S.J. Yoon, K.B. Konstantinov, Continuous real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors, 1994. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 983 - 990.
6. K. Eyer, A. Oeggerli, E. Heinzle, 1995. On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine, *Biotechnol. Bioeng.* 45: 54 - 62.
7. U. Behrendt, S. Koch, D.D. Gooch, U. Steegmans, M.J. Comer, 1994. Mass spectrometry: a tool for on-line monitoring of animal cell cultures, *Cytotechnology.* 14: 157 - 165.
8. K.B. Male, P.O. Gartu, A. Kamen, J.H.T. Luong, 1997. On-line monitoring of glucose in mammalian cell culture using a flow injection analysis (FIA) mediated biosensor, *Biotechnol. Bioeng.* 55: 497 - 504.
9. G. Blankenstein, U. Spohn, F. Preuschoff, J. Thommes, M.R. Kula, 1994. Multi-channel flow injection analysis biosensor system for on-line monitoring of glucose, lactate, glutamine, glutamate and ammonia in animal cell culture, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20: 291 - 307.
10. J. van der Pol, U. Spohn, R. Eberhardt, J. Gaetgens, M. Biselli, C. Wandrey, J. Tramper, 1994. On-line monitoring of an animal cell culture with multi-channel flow injection analysis, *J. Biotechnol.* 37: 253 - 264.
11. R. Singhvi, J.F. Markusen, B. Ky, B.J. Horvath, J.G. Aunins, 1996. Assessment of virus

- infection in cultured cells using metabolic monitoring, *Cytotechnology* 22: 79 - 85.
12. S.T. Sharfstein, S. Tucker, A. Mancuso, H.W. Blanch, D.S. Clark, 1994. Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism, *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1059 - 1074.
 13. H.P.J. Bonarius, A. Ozemre, B. Timmerarends, P. Skrabal, J. Tramper, G. Schmid, E. Heinzle, 2001. Metabolic-flux analysis of continuously cultured hybridoma cells using CO₂ mass spectrometry in combination with lactate nuclear magnetic resonance spectroscopy and metabolite balancing, *Biotechnol. Bioeng.* 74: 528 - 538.
 14. M. Butler, *Animal Cell Culture and Technology: The Basics* (Oxford University Press, New York, 1996), pp. 1±71.
 15. Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M. 1991. Growth inhibition in animal cell culture: The effect of ammonia and lactate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 29-41.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.