

역오팔 구조 지지체를 이용한 인간 지방 유래 줄기 세포의 연골 분화 촉진

방석호* · 유태경**†

*세인트루이스 워싱턴대학교 생물의공학과

MO 63130 미국 세인트루이스

**경희대학교 화학공학과

446-701 경기도 용인시 기흥구 서천동 1

(2013년 10월 10일 접수, 2013년 11월 1일 수정본 접수, 2013년 11월 7일 채택)

Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells with Inverse Opal Scaffolds

Suk Ho Bhang* and Taekyung Yu**†

*Department of Biomedical Engineering Washington University, Saint Louis, MO 63130, USA

**Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Kyung Hee University,

1 Seocheon-dong, Kiheung-gu, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea

(Received 10 October 2013; Received in revised form 1 November 2013; accepted 7 November 2013)

요 약

본 연구는 역오팔 지지체를 이용하여 인간지방유래 줄기세포의 연골 분화를 촉진하는 내용을 담고 있다. 비 다공성 구조를 가진 지지체에서 세포를 분화 시도하였을 경우 분화가 잘 촉진되지 않는 것에 비해 200 nm 정도의 균일한 구멍을 가지는 poly(D,L-lactide-co-glycolide)로 구성된 역오팔 지지체는 그 다공성 구조로 인하여 지지체의 내부까지 산소와 유기물의 수송을 가능하게 하여 지지체 내에서 어떤 유전적, 약물적 처리 없이 인간지방유래 줄기세포가 분화가 잘 되게 하는 것을 확인하였다.

Abstract – In this report, we present an inverse opal scaffold that can enhance the chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hADSCs) without drug, gene, or cytokine supplement. Inverse opal scaffolds based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) were formed with uniform 200 μm pores. Due to uniform pore sizes and well-controlled interconnectivity of inverse opal scaffold, hADSCs were allowed to distribute homogeneously throughout the scaffolds. As a result, high cell density culture with scaffold was possible. Since the hADSCs cultured in inverse opal scaffolds were subjected to limited supplies of oxygen and nutrients, these cells were naturally preconditioned to a hypoxic environment that stimulated the up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). As a result, apoptotic activity of hADSCs until 3 weeks after initial cell seeding was significantly reduced and chondrogenic differentiation related molecular signal cascades were up regulated (transforming growth factor-beta, phosphorylated AKT, and phosphorylated p38 expression). In contrast, hADSCs cultured with small and non-uniform porous scaffolds showed significantly increased apoptotic activity with decreased chondrogenic differentiation. Taken together, inverse opal scaffold could potentially be used as an effective tool for improving chondrogenesis using stem cells.

Key words: Chondrogenesis, Human Adipose Derived Stem Cells, Hypoxia Preconditioning, Inverse Opal Scaffolds

1. 서 론

연골 조직은 특성상 주변 조직에 존재하는 혈관의 양이 적어 한 번 손상되면 치료나 재생이 어렵다. 실험을 통해 천공술 등을 이용한 자가 연골 이식법이 새로운 치료법으로써 제시되었으나, 자가 연골을 추출하기 위한 추가적인 수술 과정으로 인해, 이차 연골 손상을 야기할 수 있다는 단점이 있다[1]. 이를 극복하기 위한 대체 방식

으로 인간 지방 유래 줄기 세포 이식법이 주목받고 있다[2]. 인간 지방 유래 줄기 세포는 자가 연골 세포나 여타의 줄기 세포에 비해 간단한 효소 처리 방식으로 많은 양의 세포를 추출하고 배양할 수 있다는 장점이 있다[3,4]. 이러한 장점을 이용하여 시험관 내에서 인간 지방 유래 줄기 세포의 연골 분화를 유도한 뒤 연골 치료에 활용할 수 있다[5]. 그러나 일반적인 세포 배양법과 같이 인간 지방 유래 줄기 세포를 단층으로 배양할 경우 연골 분화 관련 유전자의 발현은 증가할 가능성이 있어도, 치료 및 재생에 필요한 완전한 형태의 연골 분화는 그 비율이 낮은 편이다[6]. 이를 극복하기 위해 일반적으로

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: tkyu@khu.ac.kr

줄기 세포의 연골 분화는 고밀도 세포 배양법을 사용하여 수 주 동안 배양시키면서 연골 세포외기질 단백질의 발현을 증가시킨다. 하지만 이러한 고밀도 세포 배양법도 오랜 시간 동안 세포를 배양함에 따라 세포 덩어리의 크기에 따른 산소 투과율 감소, 분화 유도 첨가 물질의 전달 효율 감소 등 문제점이 발생한다. 이에 따라 세포 덩어리의 중심 부분에서 세포 사멸이 발생하며, 결과적으로 전체적인 연골 분화 효율이 떨어지게 된다[5]. 또한 고밀도 세포 배양법은 임상 치료 적용에서 요구되는 만큼의 세포를 대량으로 배양하기에는 부적합한 방식이다. 따라서 이를 해결할 수 있는 새로운 연골 분화 세포 배양법이 필요하다.

생분해성 다공성 지지체는 지지체 내부로 세포가 쉽게 이동하여 부착될 수 있도록 수많은 기공 구조를 포함하고 있으며, 이를 통해 부착된 세포가 산소, 영양분, 및 특정 첨가물의 공급을 원활히 받을 수 있다는 장점이 있다. 생분해성을 갖는 재료는 이식된 세포가 조직으로 완전히 분화되는 시점에서 분해되고 사라져 이차적인 외과적 제거 수술이 필요 없다는 장점이 있다[7,8]. 이러한 장점을 바탕으로 다양한 방법을 이용해 생분해성 다공성 지지체를 성형하였으나, 기존의 연구들에 사용된 지지체들은 지지체 내의 기공 크기와 기공 간의 연결도를 균일하게 유지할 수 없었다[9]. 이에 따라 다공성을 가지는 지지체라고 하더라도, 세포의 이동, 산소, 및 특정 첨가물의 공급이 원활하지 않거나 고밀도 세포 배양법의 단점과 같이 시간이 지남에 따른 세포 증식 억제, 세포 사멸 증가가 나타나 원하는 방향으로의 세포 분화 비율을 떨어뜨리는 결과가 나타났다.

본 연구는 고밀도 세포 배양법과 기존 방식으로 성형된 생분해성 다공성 지지체의 단점을 극복하고, 줄기 세포의 연골 분화 효율을 증진시키기 위해, 일정한 크기의 기공과 각 기공들간의 높은 연결도를 가지는 역오팔 구조 지지체를 인간 유래 지방 줄기 세포의 연골 분화 배양에 적용해보았다. 역오팔 구조 지지체를 통해 고밀도 세포 배양 시 그리고 불균일한 기공을 가지는 다공성 지지체에서 발생하는 내부 세포 사멸을 방지하여 지지체에 이식된 세포의 생존율을 높이고, 이에 따라 줄기 세포의 연골 분화 효율을 증진시킬 수 있을 것이라고 가정하였다[10]. 3주간의 세포 배양 기간을 거치면서 역오팔 구조 지지체에서 배양된 인간 유래 지방 줄기 세포의 연골 분화 비율을 불균일 다공성 지지체에서 배양된 세포의 연골 분화 비율과 비교하였으며, 정성, 정량적인 비교를 위해 연골 분화 유전자 및 관련 단백질의 발현을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), real time PCR, western blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 확인하였다. 추가적으로 역오팔 지지체에서만 발견되는 특이적 유전자 발현을 통해 여타의 세포 분화 방식에 비해 역오팔 지지체가 연골 분화를 더욱 촉진되는 이유를 밝혔다.

2. 재료 및 방법

2-1. 생분해성 다공성 지지체 제작

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA, lactide 75: glycolide 25, $M_w \approx 66,000-107,000$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 이용하여 생분해성 다공성 지지체를 제작하였으며 기존의 방식을 참고하였다[11]. 간략히 설명하면, 200 μm 의 지름을 가지는 젤라틴 마이크로 스피어 (Sigma-Aldrich)를 메탄올에 분산시킨 뒤, 50 mL 원심분리용 튜브에 넣고 tapping하여 cubic-close packed (ccp) 격자 구조로 균일하게 배열시켰다. 이후 ccp 격자 구조로 배열된 상태에서 75 °C, 1시간 오른

열처리한다. 상온에서 온도를 떨어뜨린 후, ccp 격자 구조 덩어리를 모으고, 1,4-dioxane (Sigma-Aldrich)에 녹인 PLGA (20 wt%, lactide: glycolide=75:25, $M_w \approx 66,000-107,000$, Sigma-Aldrich) 용액을 격자 구조에 부어 침투시킨다. 여과지로 과량의 PLGA 용액을 제거하고 -20 °C에서 5시간 처리 후 12~18시간 가량 동결 건조한다. 잔존하는 공기방울을 제거하기 위해 동결 건조된 PLGA 덩어리를 에탄올과 함께 처리하고, 45 °C, 900 mL 증류수로 옮겨 3시간 동안 처리하여 젤라틴을 최종적으로 제거하였다. 불균일 다공성 지지체는 상기의 PLGA 용액을 실리콘 주형에 넣고 12~18시간 동안 동결 건조시켰다. 이를 통해 기공 연결성이 떨어지고, 5 μm 이하의 기공을 가지는 다공성 지지체를 제작하였다.

2-2. 세포 배양 및 부착

인간 지방 유래 줄기 세포는 Lonza (Basel, Switzerland)에서 구입하였으며, α -minimum essential medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco BRL), 100 U/mL penicillin, 그리고 100 mg/mL streptomycin을 혼합하여 배양하였다. 실험에 사용된 인간 지방 유래 줄기 세포는 모두 6회 계대 배양 횟수 내에서 사용되었다. 연골 분화를 유도 시 인간 지방 유래 줄기 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (Gibco BRL) 배지에 50 mg/mL ascorbic acid과 100 nM dexamethasone 그리고 10 ng/mL of transforming growth factor-beta3 (R&D systems, Minneapolis, MN)를 혼합하여 3주간 배양하였으며, 배지 교환은 3일마다 실시하였다. 인간 지방 유래 줄기 세포는 분화 유도 전 지지체에 부착하였으며, 5×10^5 세포를 하나의 지지체에 부착시킨 뒤 3주간 분화를 유도하였다. 세포가 부착된 지지체들은 agarose가 코팅되어 세포가 부착되지 않는 세포 배양 접시에서 배양함으로써 지지체로부터 세포가 빠져나가는 것을 방지하였다.

2-3. 지지체 관찰

각 지지체의 구조와 인간 지방 유래 줄기세포 부착 후 지지체의 모습을 주사 전자 현미경을 사용하여 관측하였으며, 세포가 부착된 지지체의 경우 glutaraldehyde (1% v/v PBS, Sigma-Aldrich)에서 1시간 동안 고정하고, 농도별 에탄올을 이용해 탈수시킨 뒤 건조하였다. 이미징은 60초간 금을 코팅을 한 뒤 5~10 kV 전압으로 Nova NanoSEM 2300 (FEI, Hillsboro, OR) 주사 전자 현미경을 이용해 촬영하였다.

2-4. 세포 생존도 및 연골 분화 정도 조사

지지체에 세포를 부착시키고, 3주간 배양한 뒤, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) assay와 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride (Neutral Red) assay, RT-PCR, real-time quantitative PCR, western blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 실시하여 세포의 생존도와 연골 분화 정도를 조사하였다. RT-PCR는 샘플을 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 처리한 뒤, chloroform (Sigma-Aldrich)과 isopropanol (80% v/v water, Sigma-Aldrich)을 이용하여 RNA를 추출하고, 75% 에탄올처리, 건조 과정을 거쳐 0.1 vol.% diethyl pyrocarbonate-treated water (Sigma-Aldrich)와 반응시켰다. Spectrophotometer를 사용하여 RNA 농도를 260 nm에서 측정한 뒤, Reverse transcription는 5 μg 의 RNA와 SuperScript™ II reverse transcriptase

(Invitrogen)를 사용하였으며 이후 PCR 증폭을 실시하였다. 35 cycles의 denaturing (94 °C, 30초), annealing (58 °C, 45초), extension (72 °C, 45 초) 그리고 final extension (72 °C, 10분)의 구성으로 실시하였으며 2 wt% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. Real-time quantitative PCR은 1 mL Trizol reagent와 200 μ L chloroform을 사용하여 샘플을 녹이고, 12,000 rpm에서 10분간 4 °C를 유지하여 원심 분리하였다. RNA pellet은 75 vol.% 에탄올로 워싱하였고 건조되었다. 건조가 끝난 샘플은 RNase-free water에 녹였다. iQTM SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)와 MyiQTM single color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)를 사용하였다. 단백질 분석은 Western blot을 통해 실시되었으며, ice-cold lysis buffer (15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M sucrose, 15 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM sodium pyrophosphate (NaPPi), 1 μ g/mL pepstatin A, 2.5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.125 mM Na₃VO₄, 25 mM sodium fluoride (NaF), 10 μ M lactacystin)에 샘플을 녹였다. BCA protein assay kit을 사용하여 단백질 정량을 한 뒤 각 샘플에서 동량의 단백질을 sample buffer과 섞고 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 로딩하였다. SDS-PAGE에서 분리된 단백질은 Immobilon-P membrane (Millipore, Billerica, MA)에 apply하여 분석 대상 항체와 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 이후 한 시간 동안 상온에서 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 이용해 결과를 확인하였다. 연골 분화 시 방출되는 transforming growth factor-beta의 양을 세포 분화 배지를 수거하여 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용해 측정하였다. 배지에 첨가된 transforming growth factor-beta의 양은 측정된 총량에서 제외하여 계산하였다.

2-5. 통계처리

통계처리는 analysis of variance (ANOVA, Bonferroni test)를 사용하였으며, 유의 수준이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의함을 표시하였다(p value < 0.05).

3. 결과 및 고찰

기존 연구에서 사용되는 삼차원 구조 지지체들은 기공이 존재하지 않거나 불균일한 기공을 가지는 경우가 많아 함께 이식되는 세포가 지지체 내부까지 부착되지 않거나 물질 교환의 한계로 인해 세포 사멸로 진행되는 경우가 많았다. 이를 극복하기 위해 본 역오팔 구조 지지체를 활용하여, 균일한 크기의 기공을 제작하였으며 균일한 배열을 통해 기공 연결도를 크게 증진시켰다. Fig. 1A와 B는 불균일 다공성 지지체와 역오팔 구조 지지체의 차이점을 보여준다. 주사 전자 현미경을 통해 확인해본 결과, 역오팔 구조 지지체는 200 μ m의 균일한 기공이 각 층에 조성되어 있고, 이를 통해 각 층이 연결되는 부분이 발생함에 따라 기공 연결도가 불균일 다공성 지지체에 비해 크게 높아졌다. 이러한 결과는 역오팔 구조 지지체의 단면에서도 확인할 수 있었으며 불균일 다공성 지지체의 경우 내부에서 기공이 서로 연결되지 않고 막히는 결과가 관찰되어 두 구조체의 외부와 내부

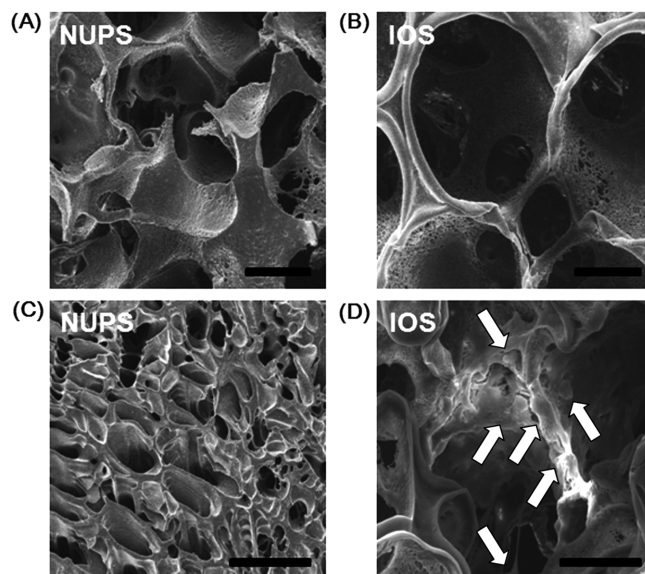


Fig. 1. SEM images of the non-uniform porous scaffolds (NUPS) and inverse opal scaffolds (IOS). (A) Top view of a non-uniform porous scaffold. (B) Top view of an inverse opal scaffold. (C) Cross-sectional view of a non-uniform porous scaffold after culture with hADSCs for 3 weeks. hADSCs were hardly found in inner part of NUPS. (D) Cross-sectional view of an inverse opal scaffold after culture with hADSCs for 3 weeks. Scale bars: 100 μ m. White arrows indicate hADSCs attached in inner part of IOS.

가 세포의 초기 이동 및 부착에 차이를 나타낼 수 있음을 보여준다. 역오팔 구조 지지체는 하나의 기공 아래 다시 균일한 크기의 세 기공이 다시 연결되고 있었으며, 이를 통해 산소, 영양분, 세포 대사물 등의 교환이 원활히 이루어질 수 있음을 확인했다. 3주간 인간 지방 유래 줄기 세포를 배양한 후 각 지지체를 다시 주사 전자 현미경으로 확인해본 결과, 역오팔 구조 지지체는 지지체 중심부까지 세포가 잘 분포하고 있었지만, 불균일 다공성 지지체의 경우 내부까지 도달한 세포의 수가 극히 적어 존재를 확인하기 어려웠다(Fig. 1C와 D).

인간 지방 유래 줄기 세포가 각 지지체에서 3주간 연골 분화 과정을 거친 뒤 생존율에 변화가 있는지를 DNA 정량(RT-PCR 중 계산), neutral red assay, MTT assay를 통해 확인한 결과, 초기에 불균일 다공성 지지체와 역오팔 구조 지지체에 이식된 세포의 수가 차이가 없었음에도 불구하고(Fig. 2A, 왼쪽), 3주 후 불균일 지지체에 존재하는 줄기 세포의 양이 역오팔 구조 지지체에 비해 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, 오른쪽). 역오팔 구조 지지체의 경우, 인간 지방 유래 줄기 세포가 지지체의 연결된 기공을 통해 내부까지 이동할 수 있었으며, 이를 통해 세포가 부착, 증식할 수 있는 표면이 증가함에 따라 많은 양의 세포가 3주 후까지 존재할 수 있었던 반면 불균일 다공성 지지체의 경우 세포의 이동 자체가 어려워 상반되는 결과를 나타낸 것으로 보인다. 본 연구는 200 μ m 크기의 균일한 기공이 존재하는 역오팔 구조 지지체와 불균일 다공성 지지체를 비교하였는데, 이는 역오팔 구조 지지체의 세포 부착 및 성장 능력이 표면적의 증가와 함께 극대화되는 지점이 200 μ m의 기공을 포함하고 있었을 때라는 기존 연구를 참고하였다. 같은 역오팔 구조를 가진다고 하더라도, 세포의 부착 및 이동은 기공의 크기 증감에 따라 차이를 보이기 때문에, 역오팔 구조 자체의 장점을 나타내기 위해 최

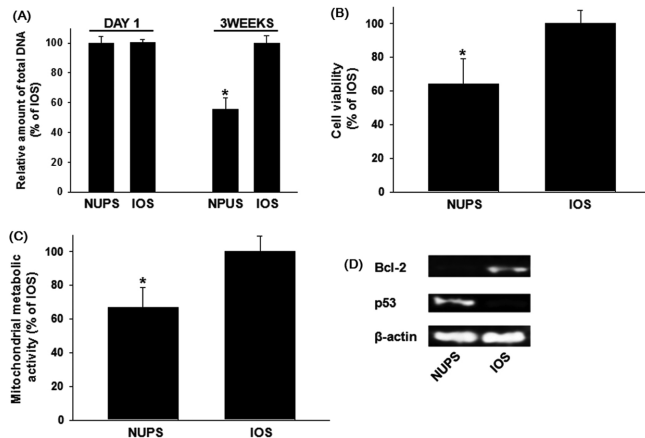


Fig. 2. Viability of hADSCs cultured on the non-uniform porous (NUPS) and in the inverse opal scaffolds (IOS). (A) The amount of total DNA of hADSCs in the scaffolds at day 1 and 3 weeks of culture. (B) Cell viability (neutral red assay) and (C) mitochondrial metabolic activity (MTT assay) at 3 weeks of culture in the scaffolds. * $p < 0.01$. (D) RT-PCR analysis results for Bcl-2 (anti-apoptotic) and p53 (pro-apoptotic) expressions in the two types of scaffolds.

적화된 형태의 구조를 제작하고, 기존의 지지체와 비교해야 했었다 [12].

연골 분화 유도 배양 3주 후 불균일 다공성 지지체에 배양된 세포의 생존율이 역오팔 구조 지지체에 비해 떨어짐을 확인하였으며(Fig. 2B와 C) 세포사멸억제 유전자(Bcl-2)의 발현량이 감소하고 세포사멸 유도 유전자(p53)의 발현이 역오팔 구조 지지체에 비해 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2D). 이러한 결과는 기공 연결도가 높은 역오팔 구조 지지체에서 세포의 생존에 필요한 물질의 대사가 원활히 이루어질 수 있음을 의미하며, 세포가 지지체 중심부로 이동한 이후에도 이러한 현상이 잘 유지되고 있음을 나타낸다[13]. 불균일 다공성 지지체의 경우 기공 연결도가 매우 낮아 세포의 생존에 결정적인 역할을 하는 세포 부착 표면적이 적고, 세포가 이동하기에 부적합한 크기의 기공들이 존재함에 따라 세포의 이동이 저해되어 장기간 배양 시 공간적 제약으로 인해 세포 사멸이 진행되는 것으로 보인다.

줄기 세포의 연골 분화는 줄기 세포 자체의 유전적 발현에 의해 진행되며, 이에 더해 분화가 진행되는 동안 줄기 세포가 분비하는 물

질이 다시 인접한 줄기 세포에게 들어가 상호 연골 분화(paracrine effect)를 촉진시키는 과정이 연골 분화 효율에 큰 영향을 미친다. 특히 줄기 세포의 연골 분화에 있어서는 paracrine effect를 통한 transforming growth factor-beta의 분비량이 연골 분화 효율을 높이는데 결정적으로 작용한다. 이러한 paracrine effect는 세포의 분화를 위해 외부에서 인위적으로 첨가하는 요인(유전자, 단백질, 등)에 의해서 촉진되기도 하지만, transforming growth factor-beta의 경우 HIF-1 α 의 발현 증가로 인해 분비량이 증가된다[14]. 역오팔 구조 지지체가 많은 양의 세포를 포함하면서 시간이 지남에 따라 산소 교환 비율이 상대적으로 떨어지게 되면서, 세포의 생존율은 유지가 되지만 세포 자체는 저산소 환경(mild hypoxia)에 노출되게 된다. 이러한 환경은 세포가 저산소 환경에 적응할 수 있도록 HIF-1 α 유전자의 발현을 증가시켰다(Fig. 3). 이를 통해 역오팔 지지체에 존재하는 세포들은 불균일 다공성 지지체에 존재하는 세포들에 비해 세포 생존도가 높게 유지될 수 있었으며, 추가적으로 연골 분화에 영향을 미치는 transforming growth factor-beta의 분비 매커니즘을 작동시켜 연골 분화 효율이 높아지는 효과를 나타낼 수 있었다. Fig. 3에서 확인된 바와 같이 역오팔 지지체에서 배양된 인간 지방 유래 줄기 세포는 HIF-1 α 의 유전자 발현 증가와 더불어 transforming growth factor-beta의 유전자 발현량이 증가하였으며, 그 결과 세포 배양 배지 내에 존재하는 transforming growth factor-beta의 양이 불균일 다공성 지지체에 비해 현저히 증가함을 확인할 수 있었다. 불균일 다공성 지지체의 경우, transforming growth factor-beta의 발현량이 비약적으로 증대되지 못하였는데, 이는 역오팔 구조 지지체와는 달리 HIF-1 α 유전자의 발현이 증대되지 않았기 때문으로 생각할 수 있다. 불균일 다공성 지지체에서 관찰된 상대적으로 소량의 transforming growth factor-beta 양 분비량 증가는 외부에서 인간 지방 유래 줄기 세포의 연골 분화를 위해 넣어준 성장인자의 영향에 의한 것으로 보인다.

역오팔 구조 지지체를 사용함으로써 추가적인 외부 요인의 개입 없이 구조체 자체적인 특성에 기인하여 인간 지방 유래 줄기 세포의 연골 분화를 촉진시킬 수 있었으며 이는 HIF-1 α 유전자 발현이 주요 요인이었던 것으로 보인다. HIF-1 α 유전자의 발현은 연골 분화 transcription factor인 SOX-9의 증가를 유도함으로써 인간 지방 유래 줄기 세포의 연골 분화를 촉진시킨다[15]. 비록 연골 분화의 핵심 요인인 2형 콜라겐과 aggrecan의 증가가 HIF-1 α 유전자의 발현과 비례하지는 않지만, SOX-9의 발현과는 직접적인 연계성을 가지고 있다[16]. 연골 분화 매커니즘을 확인해본 결과, p-p38, pAKT의 발현

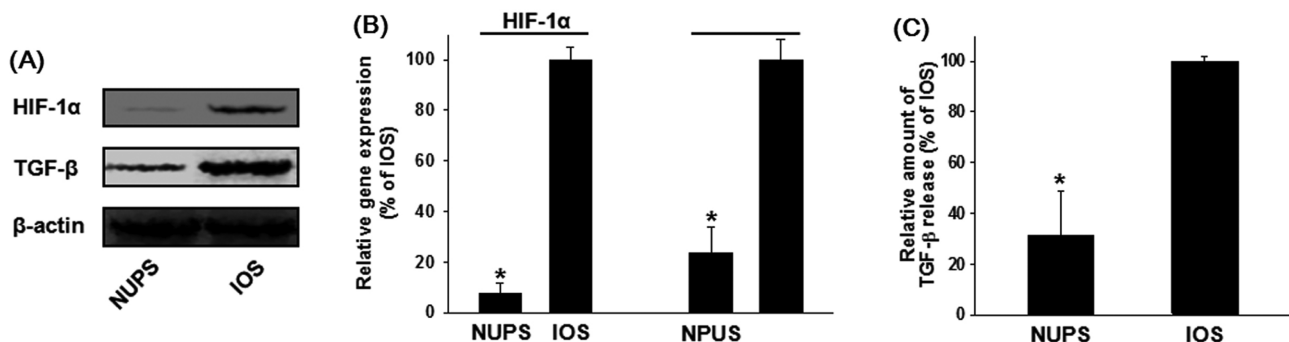


Fig. 3. Enhanced expression of hypoxia-induced survival factor (HIF-1 α) and transforming growth factor-beta in hADSCs cultured in the inverse opal scaffolds for 3 weeks. (A) Western blot analysis and (B) real time quantitative PCR results for HIF-1 α and transforming growth factor-beta expressions in the two types of scaffolds. (C) The amount of transforming growth factor-beta secreted from hADSCs cultured in the non-uniform porous (NUPS) and inverse opal scaffolds (IOS). * $p < 0.01$.

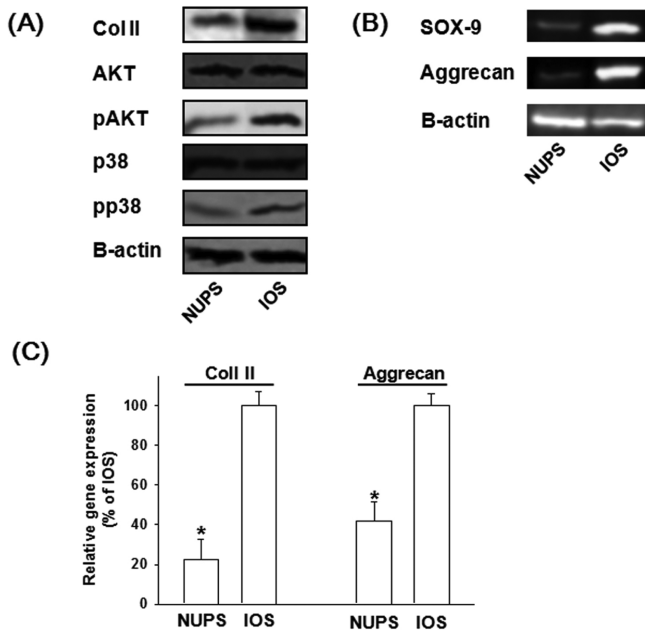


Fig. 4. Enhanced chondrogenesis of hADSCs by transplanting the cells cultured in the inverse opal scaffolds. (A) Western blot analysis, (B) RT-PCR analysis, and (C) real time quantitative PCR results showing the representative chondrogenic gene (collagen type II and aggrecan) expression levels. *p<0.01.

이 역오팔 구조 지지체에서 배양된 인간 지방 유래 줄기 세포에서 증가되었다. p38과 pAKT는 줄기 세포의 연골 분화에 관여하는 인자로 보고되어 있으며 transforming growth factor-beta의 발현량을 제어하는 것으로 알려져 있다[16]. p38과 pAKT의 발현은 transforming growth factor-beta의 발현량 증가와도 연계성을 가지지만 저산소 환경 조건에 의해서도 영향을 받으며 이러한 요인이 줄기 세포의 연골 분화를 촉진시키는 것으로 보고된 바 있다[18]. Fig. 4에서 보여진 바와 같이 역오팔 지지체를 사용한 경우에서 불균일 다공성 지지체를 사용한 경우보다 pAKT의 발현이 증가하였으며, p38의 발현도 함께 증가되는 것을 확인하였다. 상기의 내용과 결과를 토대로, 불균일 다공성 지지체가 200 μ m 크기의 기공을 가질 경우 세포 배양 결과를 예측할 수 있다. 역오팔 구조의 경우 Fig. 1과 같이 내부 연결도가 높으나 불균일 다공성 지지체는 연결도가 낮아 세포가 내부로 이동할 수 없었으며, 3주 후 세포 생존율이 감소함을 확인할 수 있었다. 역오팔 구조 지지체의 경우 내부 연결도가 증가함에 따라 세포 부착 표면적이 함께 증가하는 반면, 불균일 다공성 지지체의 경우 내부 연결도가 낮아 세포 부착 표면적이 크게 증가되지 않을 확률이 높다. 세포의 부착, 이동, 그리고 이후 연골 분화에 필수적인 유전자의 발현에는 지지체에 이식된 세포가 지지체 내부까지 부착되고 증식되어야 한다는 조건이 필요하다. 따라서 불균일 다공성 지지체가 200 μ m 크기의 기공을 가진다고 하더라도, 역오팔 구조와 같이 기공 간의 연결도가 낮다면 세포 생존율의 증가, 연골 분화 효과는 기대하기 어려울 것으로 보인다.

유전자 발현에서 SOX-9의 발현이 역오팔 구조 지지체의 경우가 불균일 다공성 지지체의 경우보다 현저히 증가되었으며, 연골 분화의 대표적인 표지인 aggrecan의 발현 역시 SOX-9의 결과와 같은 경향성을 보였다. 이는 또 다른 연골 분화의 대표 표지인 2형 콜라겐의 발현량에서도 같은 현상을 보였다. 연골 분화 유도 과정에서 일부 줄

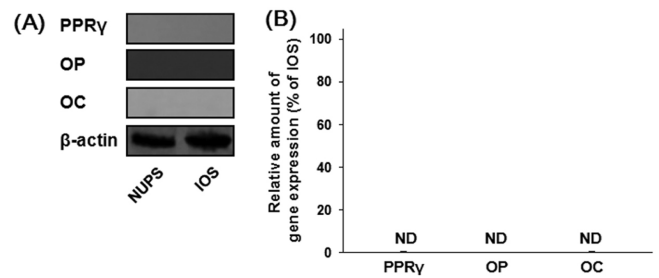


Fig. 5. The expression of adipogenic (PPR γ) and osteogenic (OP and OC) differentiation markers in the hADSCs cultured with different scaffolds as evaluated by (A) western blot analysis and (B) real time quantitative PCR (ND: not detected).

기 세포가 지방 또는 뼈로 분화할 가능성을 확인하기 위해 추가적인 western blot 을 실시하였으며 이를 통해 역오팔 구조 지지체에서 배양된 세포가 연골로 분화하는 과정에서 다른 계열의 세포로 분화되는 현상이 없음을 확인하였다(Fig. 5). 지방 분화 가능성을 조사하기 위해 PPR γ 의 발현양을, 뼈 분화 가능성을 조사하기 위해 osteocalcin (OC)과 osteopontin (OP)의 발현양을 확인해보았으나 NUPS, IOS에서 배양된 세포에서 관련 단백질의 증가를 관찰할 수 없었다.

4. 결 론

본 연구는 연골 재생을 위해 줄기 세포와 함께 사용될 수 있는 지지체의 구조가 줄기 세포의 연골 분화 효율을 증진시킬 수 있음을 고찰하였다. 200 μ m 크기의 균일한 기공과 높은 기공 연결도를 가진 역오팔 구조 지지체는 세포의 이동 및 부착이 불균일 다공성 지지체에 비해 지지체의 중심부까지 용이하게 진행되었으며, 세포의 생존과 분화에 필요한 물질 교환이 용이하여 장기간 배양 이후에도 높은 연골 분화율을 나타내었다. 뿐만 아니라 고밀도 세포 배양을 통해 hypoxia preconditioning 효과를 추가적인 유전자, 단백질 등의 사용 없이 나타냄으로써 연골 분화를 촉진시킬 수 있는 유전자의 발현을 자체적으로 증진시키는 효과를 나타내었다. 결과적으로 인간 지방 유래 줄기 세포가 역오팔 구조 지지체에 배양됨으로써, 연골 분화 촉진 메커니즘이 작동할 수 있었으며, 나아가 paracrine 효과가 증진되어 transforming growth factor-beta3의 분비량이 증가함을 확인할 수 있었다. 이상의 연구 결과를 통해, 역오팔 구조 지지체의 구조적 특징이 줄기 세포의 이동, 부착, 및 치료 효과 증진에 활용될 수 있음을 확인하였으며, 연골 재생 연구뿐만 아니라 다양한 분야의 조직 재생에 활용될 가능성이 있음을 확인하였다.

References

- Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., Hsu, H. P., Martin, S. D. and Spector, M., "Effects of Harvest and Selected Cartilage Repair Procedures on the Physical and Biochemical Properties of Articular Cartilage in the Canine Knee," *J. Orthop. Res.*, **18**, 790(2000).
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, E. Z., Ailhaud, G. and Dani, C., "The Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells," *Biochimie.*, **87**, 125(2005).
- Casteilla, L., Planat-Benard, V., Cousin, B., Silvestre, J. S., Laharrague, P., Charrie're, G. and Penicaud, L., "Plasticity of Adipose Tissue: A

- Promising Therapeutic Avenue in the Treatment of Cardiovascular and Blood Diseases; *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.*, **98**, 922(2005).
4. Oedayrajsingh-Varma, M., Ham, S. V., Knippenberg, M., Helder, M. N., Klein-Nulend, J., Schouten, T. E., Ritt, M. J. and Milligen, F. J. V., "Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell Yield and Growth Characteristics Are Affected by the Tissue-harvesting Procedure; *Cytotherapy*, **8**, 166(2006).
 5. Yoon, H. H., Bhang, S. H., Shin, J. Y., Shin, J. and Kim B. S., "Enhanced Cartilage Formation via Three-dimensional Cell Engineering of Human Adipose-derived Stem Cells; *Tissue Eng.*, **18**, 1949(2012).
 6. Afizah, H., Yang, Z., Hui, J. H., Ouyang, H. W. and Lee, E. H., "A Comparison Between the Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow Stem Cells (BMSCs) and Adipose-derived Stem Cells (ADSCs) Taken From the Same Donor; *Tissue Eng.*, **13**, 659(2007).
 7. Park, S. J., Kim, S. H. and Hong, S. K., "Preparation of Microcapsules and Release Behaviors of Biodegradable Poly(L-lactide)/Poly(ethylene glycol) Copolymers; *Korean Chem. Eng. Res.(HWA-HAK KONGHAK)*, **41**, 497(2003).
 8. Lee, M. J., Seo, D. Y., Lee, H. E. and Choi, G. J., "Therapeutic Effect of Chitosan Modification on Salmon-calcitonin-loaded PLGA Nanoparticles; *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 1406(2011).
 9. Yoo, D. J., "Computer-aided Design and Fabrication of Bio-mimetic Scaffold for Tissue Engineering Using the Triply Periodic Minimal Surface; *J. Kor. Soc. Prec. Eng.*, **28**, 834(2011).
 10. Shin, Y. M. and Shin, H. S., "Current Status of Tissue Engineering Scaffolds Using Biodegradable Polymers; *Polym. Sci. Tech.*, **18**, 458(2007).
 11. Choi, S. W., Zhang, Y. and Xia, Y., "Three-dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: the Importance of Uniformity in Pore Size and Structure; *Langmuir*, **26**, 19001(2010).
 12. Oh, M. J., Moon, S. K., Kim, S. E. and Choi, S. W., "Preparation of Inverse Opal Scaffolds with Uniform Pore Sizes and Their Effect on Cell Proliferation; *Biomaterials Research*, **17**, 126(2013).
 13. Zhang, Y., Choi, S. W. and Xia, Y., "Modifying the Pores of An Inverse Opal Scaffold with Chitosan Microstructures for Truly Three-dimensional Cell Culture; *Macromol. Rapid Commun.*, **33**, 296(2012).
 14. Amarilio, R., Viukov, S. V., Sharir, A., Eshkar-Oren, I., Johnson, R. S. and Zelzer, E., "HIF1alpha Regulation of Sox9 is Necessary to Maintain Differentiation of Hypoxic Prechondrogenic Cells During Early Skeletogenesis; *Development*, **134**, 3917(2007).
 15. Murphy, C. L. and Polak, J. M., "Control of Human Articular Chondrocyte Differentiation by Reduced Oxygen Tension; *J. Cell Physiol.*, **199**, 451(2004).
 16. Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A. and Noda, M., "SOX9 Enhances Aggrecan Gene Promoter/Enhancer Activity and is Upregulated by Retinoic Acid in a Cartilage-derived Cell Line TC6; *J. Biol. Chem.*, **275**, 10738(2000).
 17. Oh, C. D., Chang, S. H., Yoon, Y. M., Lee, S. J., Lee, Y. S., Kang, S. S. and Chun, J. S., "Opposing Role of Mitogen-activated Protein Kinase Subtypes, erk-1/2 and p38, in the Regulation of Chondrogenesis of Mesenchymes; *J. Biol. Chem.*, **275**, 5613(2000).
 18. Kanichai, M., Ferguson, D., Prendergast, P. J. and Campbell, V. A., "Hypoxia Promotes Chondrogenesis in Rat Mesenchymal Stem Cells: a Role for AKT and Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1alpha; *J. Cell Physiol.*, **216**, 708(2008).