

工學碩士學位論文

조직공학적 지지체와 성체줄기세포를  
이용한 골 재생 및 신경재생에 관한  
연구



2008年 2月

釜慶大學校大學院

高分子工學科

曹美熙

工學碩士學位論文

조직공학적 지지체와 성체줄기세포를 이용한 골 재생 및  
신경 재생에 관한 연구

指導教授 李 奉

이 論文을 碩士學位論文으로 提出함.



2008年 2月

釜慶大學校大學院

高分子工學科

曹美熙

曹美熙의 工學碩士 學位論文을  
認准함.

2008年 2日



主 審	工 學 博 士	박 찬 영 印
委 員	工 學 博 士	박 상 보 印
委 員	工 學 博 士	이 봉 印

# 목 차

List of Tables .....	v
List of Figures .....	vi
Abstract .....	x
<b>제 1 장 서론 .....</b>	<b>1</b>
1. 조직공학 .....	1
1. 조직공학의 정의 .....	1
2. 조직공학의 구성 요소 .....	3
2.1 세포 .....	3
2.2 생체 재료 .....	3
2.3 생리활성 물질 .....	5
3. 조직세포의 배양 .....	5
4. 이식 .....	6
2. 참고문헌 .....	7
<b>제 2 장 조직공학적 지지체 및 골수유래줄기세포를 이용한</b>	
<b>중추신경의 재생 .....</b>	<b>13</b>
1. 이론적 배경 .....	13
2. 재료 및 방법 .....	15
2.1 골수유래줄기세포의 분리 및 배양 .....	15
2.2 이식재료의 제조 .....	16
2.3 척수절제 수술 .....	16
2.4 수술 후 관리 .....	17
2.5 운동력 평가 .....	17

2.6 조직학적 염색 .....	17
3. 결과 및 고찰 .....	18
3.1 이식재료의 제조 .....	18
3.2 운동력 평가 .....	19
3.3 육안적 소견 .....	20
3.4 조직학적 평가 .....	20
4. 결론 .....	21
5. 참고문헌 .....	22

### 제 3 장 온도감응성 MPEG-PCL 하이드로젤에 함유된

신경성장인자 BDNF의 서방화 .....	36
1. 이론적 배경 .....	36
2. 재료 및 방법 .....	38
2.1 시약 및 재료 .....	38
2.2 MPEG-PCL의 합성 .....	39
2.3 블록 공중합체의 특성 분석 .....	39
2.4 하이드로젤의 형태 관찰 .....	40
2.5 단백질 및 BDNF를 함유한 하이드로젤의 제조 .....	40
2.6 하이드로젤로 부터 FITC-BSA의 생체 외 방출 실험 ...	40
2.7 하이드로젤로 부터 BDNF의 생체 외 방출 실험 .....	41
3. 결과 및 고찰 .....	41
3.1 MPEG-PCL 블록공중합체의 합성 .....	41
3.2 블록 고분자의 솔-겔 상 전이거동 .....	42
3.3 블록공중합체의 형태관찰 .....	43
3.4 생체 외 방출 실험 .....	43

4. 결론 .....	45
5. 참고문헌 .....	45

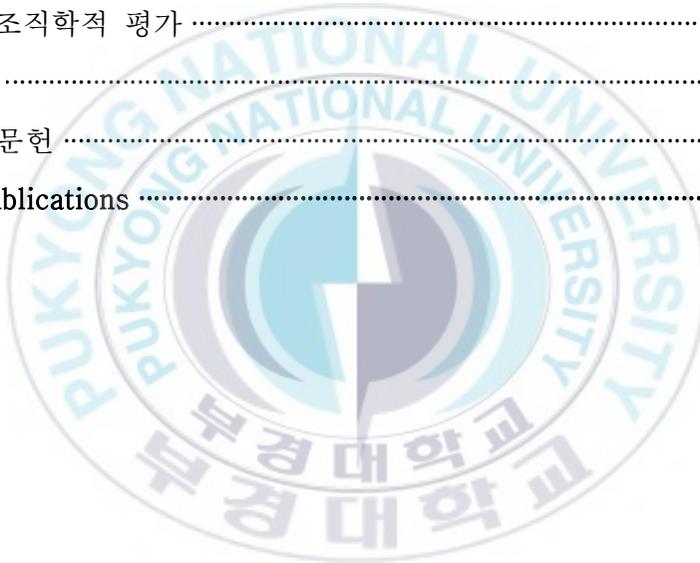
## 제 4 장 저분자 화합물을 이용한 골수유래줄기세포의 신경

<b>분화 유도</b> .....	56
1. 이론적 배경 .....	56
2. 재료 및 방법 .....	57
2.1 골수유래줄기세포의 분리 및 배양 .....	58
2.2 저분자 화합물의 준비 .....	58
2.3 저분자 화합물의 세포독성 평가 .....	58
2.4 신경세포로의 분화 .....	59
2.5 신경세포 특이적 유전자 발현 확인 .....	59
2.6 면역세포화학적 염색 .....	60
3. 결과 및 고찰 .....	60
3.1 골수유래줄기세포의 분리 .....	60
3.2 저분자 화합물의 세포독성 평가 .....	61
3.3 신경세포로의 분화 .....	61
4. 결론 .....	62
5. 참고문헌 .....	63

## 제 5 장 온도감응성 키토산 겔을 이용한 골수유래줄기세포의

<b>전달 및 골 분화 유도</b> .....	74
1. 이론적 배경 .....	74
2. 재료 및 방법 .....	75
2.1 키토산 겔의 제조 .....	75

2.2	키토산 겔의 온도감응성 측정 .....	75
2.3	키토산 겔의 세포적합성 측정 .....	76
2.4	골수유래줄기세포의 추적 .....	76
2.5	In vivo 실험을 통한 세포 전달 및 골 분화 확인 .....	76
3.	결과 및 고찰 .....	77
3.1	키토산 겔의 형성과 온도에 따른 특성 분석 .....	77
3.2	키토산 겔의 세포적합성 측정 .....	77
3.3	In vivo 상에서 키토산 겔의 SEM 측정 .....	78
3.4	조직학적 평가 .....	78
4.	결론 .....	79
5.	참고문헌 .....	79
List of Publications .....		93

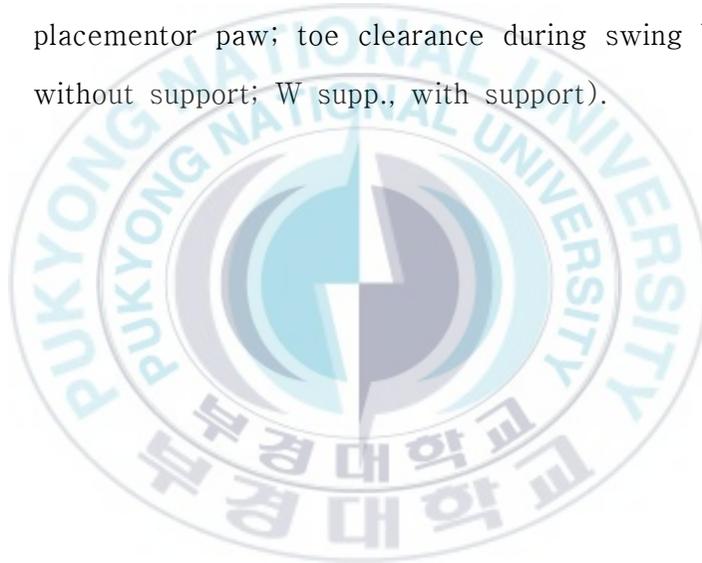


## List of Tables

**Table 1-1.** Classification of biomedical materials

**Table 1-2.** Absorbable biomedical materials used for tissue engineering

**Table 2-1.** The scoring sheet with categories and attributes that accompanies the BBB Locomotor Rating Scale. The left, middle, and right portions of the sheet represent the early, intermediate, and late phases of recovery, respectively (DPO, days postop; L, left; R, right; plantar Pl., plantar placement or paw; toe clearance during swing W/O supp., without support; W supp., with support).



## List of Figures

**Figure 1–1.** Tissue Engineering of Concept

**Figure 1–2.** Tissue engineering generally combines three key elements; cells, scaffolds, and signaling molecules (growth factor). By combining these elements, tissue regeneration can be accomplished.

**Figure 2–1.** Schematic diagram illustrating of fabrication process of PLGA scaffolds by Ice–Particle Leaching Method

**Figure 2–2.** SEM microphotographs of PLGA scaffolds. (a) cross ( $\times 40$ ), (b) side ( $\times 40$ ), (c) surface ( $\times 40$ ), and (d) cross ( $\times 100$ ), (e) side ( $\times 100$ ), (f) surface ( $\times 100$ )

**Figure 2–3.** Pore size distribution of Scaffold made by Ice–Particle Leaching Method

**Figure 2–4.** The Picture of Surgery and Transected Spinal Cord

**Figure 2–5.** Survival of spinal cord transected rat after post–operation: G1 (blank model), G2 (scaffold), and G3 (scaffold, cell, growth factor)

**Figure 2–6.** Time–lapse photographs of movement by representation member of the (a) G3–3 Model (6 weeks) and (b) G3–3 Model (6 weeks), (c) G3–1 Model (4 weeks)

**Figure 2–7.** Basso–Beattie–Bresnehan score in recovering on behavioral performance after spinal cord injury ( $P^* < 0.05$  compared with control)

**Figure 2–8.** Gross anatomy of spinal cord (a) 3 mm Model, (b) 1 mm Model. The spinal cord was exposed by removal of the

spine

**Figure 2–9.** Histological evaluation of spinal cord transection after 8 weeks postoperation: (a) Normal Cord and (b) Lesion Cord

**Figure 3–1.** Chemical scheme for polymerization of MPEG–PCL diblock copolymer (HG–24)

**Figure 3–2.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of MPEG–PCL diblock copolymer (HG–24) in  $\text{CDCl}_3$

**Figure 3–3.** Sol–gel–sol transition curve of MPEG–PCL diblock copolymer (HG–24) in aqueous solution

**Figure 3–4.** Viscosity versus temperature curve for MPEG–PCL diblock copolymer (HG–24) solution at 20 wt%

**Figure 3–5.** AFM images of HG–24 hydrogels in (A) sol state and (B) gel state

**Figure 3–6.** Image of (A) sol at room temperature (B) gel at body temperature, and (C) hydrogel solution at room temperature

**Figure 3–7.** Release behavior of FITC–BSA in the HG–24 20 wt% gel at 37 °C for 20 days

**Figure 3–8.** Release behavior of BDNF in the HG–24 20 wt% gel at 37 °C for 20 days

**Figure 4–1.** Small molecules for neurogenesis (a) KR63240 (b) KR63244

**Figure 4–2.** Characterization of rBMSC (a) CD44 (b) CD45

**Figure 4–3.** Morphological change of rBMSC by concentration (a) control (b) 1  $\mu\text{M}$  (c) 10  $\mu\text{M}$  (d) 100  $\mu\text{M}$  KR63240 (magnification is X100)

**Figure 4–4.** rBMSC viability of KR63240 measured by MTT assay

**Figure 4–5.** rBMSC viability for neuronal induction factor measured by MTT assay

**Figure 4–6.** Inverted microscope pictures of neuronal differentiation of rBMSC (a) control (b) RA (c) KR63240 (d) KR63244 (Magnification is X100)

**Figure 4–7.** Expression of NSE mRNA as a standard of  $\beta$ -actin by RT-PCR method at 1 and 4 days

**Figure 4–8.** NSE staining of differentiated rBMSC (a) control (b) RA (c) KR63240 (d) KR63244 (magnification is X100)

**Figure 4–9.** CNPase stainin of differentiated rBMSC (a) control (b) RA (c) KR63240 (d) KR63244 (magnification is X100)

**Figure 5–1.** Schematic image of chitosan gel formation in the presence of GP

**Figure 5–2.** Viscosity versus temperature curves for chitosan solution containing different concentrations of GP (0–30 wt%)

**Figure 5–3.** Images of a chitosan solution containing 20 wt% GP in (a) the liquid state at 25 °C and (b) the gel state at 37 °C

**Figure 5–4.** SEM micrographs showing the morphology of rBMSCs seeded on chitosan gel surfaces after (a) only gels (b)1 day and (c, d) 7 days (Magnification is (a), (b) and (c) X 500, and (d) 1500)

**Figure 5–5.** rBMSC viability measured by WST–1 assay. Cells grown on a plain culture plate were used as the control.

**Figure 5–6.** In situ chitosan gel formation, (a) subcutaneous injection of chitosan solution prepared at 20 wt% GP, (b) the formed

gel, and (c) the gel following removal from a rat after 28 days.

**Figure 5–7.** SEM micrographs of chitosan gel removed from a rat after 14 days. Magnification is (a) X100, (b) X800, and (c) X1000. Scale bars represent (a) 500, (b) and (c) 50  $\mu\text{m}$

**Figure 5–8.** H&E staining image of chitosan gel. (a) only chitosan (b) chitosan with rBMSC (magnification is X200)

**Figure 5–9.** Triple immunofluorescent detection of rBMSCs seeded on chitosan gel at 28 days using fluorescent microscopy of cells labeled with (a) PKH–67 (green), (b) anti–BrdU(red), (c) DAPI (blue). The merged view is shown in (d). (Magnification is X100)

**Figure 5–10.** Von Kossa staining image of chitosan gels (a) only chitosan (b) chitosan with rBMSC and DBM (Magnification is X200)

Nerve and Bone Regeneration using Tissue Engineered Scaffold  
and Adult Stem Cell

Mi Hee Cho

Department of Polymer Engineering, The Graduate School,  
Pukyong National University

**Abstract**

In chapter 2, Bone marrow stromal cells (BMSCs) were harvested from the femurs and tibias of adult female Fischer rat. The ability of the PLGA with BMSCs to be integrated and to promote nerve regeneration in the transected rat spinal cord was investigated. Fischer rat received an implant consisting of the BMSCs suspended in the PLGA in the gap (T8 ~ T9) created by the spinal cord resection. For histological evaluation, the implants were removed after 4 and 8 weeks. Thin sections were cut from paraffin embedded tissue and histological sections were stained H&E, NSE and NF staining. Motor functional outcome measurements using the Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) score performed weekly to 8 weeks post-injury. It was observed that the effects of the PLGA with BMSCs on neuroinduction (Group III, scaffold, cell, cytokine) are stronger than PLGA without BMSCs (Group II, scaffold) and blank model (Group I). In chapter 3, Temperature sensitive MPEG-PCL diblock copolymer in this work could utilize as a potential carrier of BDNF for nerve regeneration. Methoxy poly(ethylene glycol) (MPEG)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) diblock copolymer was synthesized by ring-opening of  $\epsilon$ -caprolactone ( $\epsilon$ -CL) in the presence of a monomer activator with the terminal alcohol of MPEG as an initiator. The temperature sensitive behavior of the prepared MPEG-PCL diblock copolymer solution was examined. The polymer solution formed translucent sol

at the room temperature. As the temperature increased from room temperature, the sol became gel. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) loaded MPEG-PCL diblock copolymer solution was prepared to examine the release behavior of BDNF. The release of BDNF in MPEG-PCL gel showed the prolonged release profile for 21 days. In chapter 4, To screen for small molecules inducers of neuronal differentiation, rat bone marrow mesenchymal stem cells isolated from adult female Fischer rat were used. Neuronal differentiation were analyzed with immunohistochemistry staining of Tuj1, immunofluorescence staining of NSE and CNPase. In addition, we confirmed that gene expression of neuronal specific marker such as Tuj1 and NSE by RT-PCR. It has been shown that rBMSCs can differentiate into neuron and oligodendrocyte in vitro by small molecules as KR63240 and KR63244.

The last chapter, we describe the manufacture and characterization of in situ-forming chitosan gels containing chitosan and GP, and their ability to offer a suitable scaffold for rBMSCs in vitro and in vivo. Finally, we injected rBMSC-containing chitosan gel and evaluated its incorporation into surrounding tissues without the addition of exogenous biological factors.

# 제 1 장 서 론

## 1.1. 조직공학

### 1.1-1. 조직공학의 정의

조직공학(tissue engineering)이란, 인체의 세포와 조직을 인공적으로 재구성하여 손상된 생체조직을 재생하는 것으로서 적절한 지지체에 세포를 배양하여 인공조직을 만들고 이를 생체에 이식하여 대체하는 기술이다. 조직공학은 불과 몇 년 전만 해도 과학자들에게 생소한 학문이었으나 이제는 너무나 잘 알려진 학문으로 발전하였다.<sup>1</sup> (Figure 1-1)

산업화와 공업화로 인해 고도로 발달된 현대사회는 여러 가지 사고 및 질병에 노출되어 있다. 이러한 각종 질환은 매년 증가 추세에 놓여 있으며 대부분 신체의 여러 가지 장기의 손상을 유발하는 경우이다. 인체의 장기나 기관이 손상되었을 때 그 정도가 미비한 경우에는 간단한 치료에 의해서도 어느 정도 회복이 가능하겠지만 그렇지 않은 경우에는 생명과 직결되는 결과를 낳을 수도 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 생명과학과 공학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 생체 조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고 나아가서 생체 조직의 대용품을 만들기 위해 조직공학을 이용한다.

조직공학의 이론적 배경은 두 가지로 요약할 수 있는데 이는 선택적 세포이식과 인공기질의 개념이라 할 수 있다. 선택적 세포이식이란 장기 전체를 이식하지 않고 장기 중에서 필요한 조직 또는 세포만을 선택적으로 분리하여 이식한다는 개념이고, 인공 기질의 개념은 세포가 조직을 형성하는 데는 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)이 지지체와 같은 역할을 하며 인공적으로 만든 기질에서도 같은 효과가 나타난다는 것

이다. 이러한 이론적 배경을 바탕으로 살아있는 세포와 장기의 모양으로 만들어진 고분자 담체로 인체에서 손상된 부분을 대체하거나 재생되도록 도와주고 매개체의 역할을 감당하도록 할 수 있다.<sup>2-8</sup>

Figure 1-2에 나타난 것처럼 조직공학적 인공장기는 세 가지 중요한 요소로 이루어져 있으며 이 세 가지 요소를 이용하여 적절한 환경에서 일정 시간이 지나 새로운 조직이나 기관이 생성되는 것이다. 골세포나 조직세포, 연골세포, 및 줄기세포와 같은 다양한 세포, 장기의 형태를 갖는 생분해성 담체와 세포의 증식 및 분화에 영향을 주는 여러 가지 싸이토카인이나 성장인자, morphogen, adhesins과 같은 생리활성 물질이다. 이 세 가지 요소들이 어우러져서 이식 후 적절한 환경 하에서 일정 시간이 지나면서 새로운 조직이나 기관이 재생되는 것을 조직공학적 인공장기라 한다.<sup>9</sup> 세포가 생분해성 고분자 담체에 점착되어 성장하고 세포외 기질을 분비하면서 새로운 장기가 형성되며 생분해성 고분자는 점차적으로 분해되어 물과 이산화탄소로 체외로 배출된다. 조직공학을 통해 만들어진 인공 장기는 자신의 세포를 사용하며 고분자 담체에서 배양되기 때문에 인간복제 등과 같은 윤리적 문제를 배제시킬 수 있고 자기 세포를 사용하기 때문에 인체 내에서 면역거부반응을 일으키지 않는다는 장점을 가지고 있다.<sup>10-13</sup>

반면 조직공학을 이용한 인공장기 연구에서의 문제점은, 첫째 이식시 우리가 원하지 않는 과민면역반응, 둘째 건강할 때 채취된 각 개인의 조직세포를 문제가 발생하였을 때 다시 꺼내 쓸 수 있도록 하는 장기적 보관 저장법, 셋째 체내 상태에서 복잡한 세포들간 연락체계 등의 복원 및 각각의 세포들의 기능을 과연 장기의 기능과 어떻게 일치시킬 것인가 하는 것이다. 하지만 이런 문제점들 또한 화학 및 단백질화학을 이용한 분자수준에서 가까운 시일 내에 해결될 것으로 생각된다.

## 1.1-2. 조직공학의 구성 요소

### 1.1-2-1. 세포

조직공학에서 사용되는 세포는 다음의 요소들을 갖추고 있어야 한다. 첫째, 충분한 양의 세포를 확보할 수 있어야 한다. 배양하려는 조직에 적합한 소스가 체내 어느 부위인지 명확히 파악을 한 다음, 필요한 세포만 채집해 분리시킨 후 충분한 양을 배양시켜야 한다. 둘째, 세포의 기질을 잘 분비해야 한다. 다른 세포나 생체 재료와 반응하여 3차원적인 조직을 형성할 수 있어야 하며 특별한 자극에 대하여 필요한 단백질 등을 생산할 수 있어야 한다. 또한 이러한 기능들은 단시간에 끝나서는 안 되며 충분한 기간 지속되어야만 한다. 셋째, 세포가 이식되었을 때 인체 내에서 거부 반응을 일으키지 말아야 한다.

### 1.1-2-2. 생체재료

조직공학에 이용되고 있는 생체재료는 Table 1-1과 같이 분류된다. 생체재료는 조직공학에 없어서는 안 될 중요한 요소로 세포가 본래 기능을 충분히 발휘할 수 있는 환경을 제공하며, 이를 위해 합성고분자나 생체로부터 분리한 세포외기질을 이용하여 Table 1-2과 같이 조직공학용 세포외 기질을 인공적으로 제작하기도 한다. 이러한 재료들 중 합성 고분자 재료와 천연 고분자 재료를 포함하는 생체분해성 고분자 (biodegradable or bioabsorbable polymers)는 단순 가수분해 또는 효소의 작용으로 분해 소멸되는 고분자이다. 이러한 생체분해성 고분자의 특성을 이용하면 의료 제품이 생체 내에서 기능을 다한 후 소멸되므로 별도의 제거 수술이 필요 없고 비분해성 고분자의 고질적 문제인 이물질 반응을 방지할 수 있다. 따라서 이러한 생체분해성 고분자를 이용하여 상처를 접합

하기 위한 흡수성 봉합사와 조직접착제, 부러진 뼈를 지지하는데 쓰이는 골 접합재, 약물을 전달하는데 쓰이는 약물전달체 등이 개발되었고, 특히 최근에는 생체분해성 고분자 지지체에 세포를 배양하여 인체의 조직과 장기를 재생하는 조직공학 연구가 활발히 전개되고 있는 것이다.

일반적으로 고분자 재료가 갖추어야 할 생체적합성은 크게 혈액적합성과 조직적합성으로 구분된다. 혈액적합성 재료는 인체 내에서 혈전 형성을 최소화 할 수 있는 생체불활성 표면을 지닌 재료를, 조직적합성 재료는 인체 내에서 주변 조직과 친화성을 가지며 거부 반응을 나타내지 않는 표면을 지닌 재료를 말한다. 한편, 인체 조직의 체외 배양이 인공장기의 개발에 필수적이므로 최근에는 조직세포적합성 고분자 재료의 필요성이 강조되고 있다.

어떤 종류의 재료를 사용하던지 사용되는 재료는 기본적으로 요구되는 몇 가지 요건을 갖추어야 한다. 첫째, 체내에서 생체적합성이 우수해야 하고 둘째, 대체된 인체 부위의 기능을 잘 수행할 수 있어야 한다. 셋째, 독성이나 발암성을 띠지 않아야 하며 넷째, 화학적으로 체내에서 안정된 물질이어야 하며 다섯째, 충분한 기계적 물성을 가지며 또한 체내에서 물성의 저하가 없어야 한다. 이 밖에도 가격이 비교적 저렴하고, 쉬운 제조와 대량생산이 가능해야 하는 등의 조건이 요구된다.

생체재료는 사용 부위, 사용 시간 및 필요 기능에 따라 요구되는 특성이 다르며 크게 인공장기, 인공조직 및 치료용품으로 분류된다.<sup>14</sup> 현재의 기술은 재료의 구성 성분의 비율을 조정함으로써 인체 내에서 분해되는 속도를 조절할 수도 있고 한 재료 안에서도 재료 표면의 성질을 다르게 배열함으로써 세포의 흡착 정도를 조절하여 원하는 형태의 조직을 만들기도 하고 있다.

### 1.1-2-3. 생리활성 물질

다세포기관의 세포상호작용은 매우 복잡한 그러나 긴밀한 상호작용에 의해서 조절된다. 이처럼 복잡한 세포기능은 여러 가지 생체조절 물질에 의해 그 기능이 유지되고 조절되는데, 대표적인 세포조절물질로서 여러 가지 성장인자 (growth factors), 사이토카인 (cytokines), 호르몬 (hormones), 뉴로펩타이드 (neuropeptides) 등이 있다. 이러한 세포조절물질들은 세포의 성장 (growth), 이동 (migration), 분화 (differentiation)에 중요할 뿐만 아니라 성숙된 세포가 내적 환경의 변화 또는 여러 가지 외적 자극에 의한 손상을 받았을 시, 손상된 세포들의 생존 (survival)과 재생 (regeneration)에 중요한 역할을 수행한다.<sup>15</sup>

### 1.1-3. 조직세포의 배양

다공성 지지체 내에 조직 세포를 주입하고 배양할 때 되도록 고밀도 세포 배양이 가능한 배양기술과 조직 세포가 지지체 내에 균일하게 분포할 수 있는 세포 주입기술이 필요하다. 조직 세포를 다공성 지지체내에 주입하는 방법은 크게 static seeding과 dynamic seeding으로 나뉘어진다. 세포의 종류와 지지체의 형태에 따라 다르지만 현탁상의 조직 세포와 다공성 지지체의 표면의 접촉이 적극적으로 일어나는 dynamic seeding에 의한 세포 주입이 좀 더 효과적인 것으로 보고된다. 정적 세포 주입은 다공성 지지체의 한쪽 면에 집중적으로 세포가 주입되기 때문에 공극내로의 세포주입이 원활하지 못하다.

지지체 내의 조직세포가 증식함에 따라 물질 전달 효율이 감소하는 문제를 방지하기 위하여 관류형의 생물반응기를 설계하여 운용한 예가 있으며,<sup>16,17</sup> 신경세포의 재생에 파손된 신경세포가 한 방향으로 성장하도록 유도하여 주는 nerve cell guide로서 PLGA를 이용한 관형의 템플레이

트 지지체들도 선보이고 있다.<sup>18,19</sup>

#### 1.1-4. 이식

인체의 손상된 조직의 치료는 현재 이식 (implantation)에 의하여 대체되고 있다. 조직이나 장기 이식은 자가이식 (autograft), 동종이식 (homograft), 타종이식 (heterograft) 방법이 사용되고 있다. 그 중 자가이식 방법은 자가골내에 골 형성에 중요한 요소를 다 포함하고 있기 때문에 가장 이상적인 방법으로 알려져 있으나, 이 방법을 사용했을 경우 다른 부위에 골 결손부를 남기고, 또 그 결손부에 감염이나 고통 등을 겪어야 되며, 골 채취량에도 한계가 있다.<sup>20</sup> 2차 선택으로 다른 사람의 골을 이식 받는 경우를 고려할 수 있으나 공여자 (donor)의 장기가 적합하기가 드물고 가져 또한 매우 비싸다. 또 면역억제제가 필요하며, 바이러스성 질병이 전염될 위험성이 있는 문제점들이 있다. 현재 대부분의 골 대체재료는 생체친화성이 우수한 인산칼슘계 세라믹 재료가 많이 사용되고 있다.

손상된 인체조직의 다른 대체방법으로 임플란트가 많이 사용되는데, 인체에 시멘트, 생물학적 또는 생체활성 방법에 의하여 고정되고 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 임플란트들은 모두 생명력이 없는 물질로 인체의 조직과 매우 다르고, 인체 조직에 고정하는데 어려움이 있다. 또 생리학적 환경 변화에 스스로 적응하거나 치료할 수 있는 능력이 없다. 현재 연구 개발 중인 조직공학적으로 제조된 조직을 사용하거나 조직 재생이 가능한 생체활성 재료를 이용하여 선천적 또는 후천적인 조직의 결함을 효과적으로 치료함으로써 이 같은 문제점을 해결할 수 있다.<sup>21</sup> 이를 위해 조직공학적인 방법을 이용해 다공성 지지체를 제조한 후 체외 배양된 세포와 조직을 환부의 크기에 맞도록 적절히 가져다 놓는 방안을 강구해야 하는 것이 해결해야 할 중점 과제 중 하나이다.

## 1.2. 참고문헌

- [1] J. K. Park, *News & information for chemical engineers*, **21**(5), 613 (2003).
- [2] N. L. Heureux, L. Germain, and L. A. Auger, *Science*, **284**, 1621 (1999).
- [3] D. Ferber, *Science*, **284**, 422 (1999).
- [4] S. J. Peter, M. J. Miller, A. W. Yasko, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **43**, 422 (1998).
- [5] R. P. Lanza, R. Langer, and W. L. Chick, *Nature*, **389**, 453 (1997).
- [6] J. J. Yoo and I. W. Lee, *Tissue Engineering: Concepts and Application*, Korea Med. Pub., Seoul, (1998).
- [7] R. C. Thomson, M. C. Wake, M. J. Yaszemski, and A. G. Mikos, *Advance in Polymer Science*, **122**, 247 (1995).
- [8] L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 11 (1993).
- [9] D. J. Mooney, K. Sano, P. M. Kaufmann, K. Majahod, B. Schoo, J. P. Vacanti, and R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **37**, 413 (1993).
- [10] T. H. Kim, C. Jannetta, J. P. Vacanti, J. Upton, and C. A. Vacanti, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **394**, 91 (1995).
- [11] M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. Langer, T. B. Aufdemorte, and A. G. Mikos, *Tissue Engineering*, **1**, 41 (1995).
- [12] M. E. Schwab, *Science*, **295**, 1029 (2002).

- [13] P. J. Horner, and F. H. Gage, *Nature*, **407**, 963 (2000).
- [14] J. H. Lee, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Classification and Characteristics of Biomaterials*, 1nd ed., Kun Ja Publishers, Seoul, Korea, 2002.
- [15] S. M. An, S. D. Kim, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Molecules Involved in Cellular Regulation*, 1nd ed., Kun Ja Publishers, Seoul, Korea, 2002.
- [16] L. E. Freed, A. P. Hollander, I. Martin, J. R. Barry, R. Langer, and G. Vunjak–novakovic, *Exp. Cell. Res.*, **240**, 58 (1998).
- [17] J. M. Pollok, D. Kluth, R. A. Cusick, H. Lee, H. Utsunomiya, P. X. Ma, R. Langer, C. E. Brelsch, and J. P. Vacanti, *Eur. J. Pediatr. Surg.*, **8**, 195 (1998).
- [18] M. S. Widmer, P. K. Gupta, L. Lu, R. K. Meszlenyi, G. R. D. Evans, K Brandt, T. Savel, A. Gurlek, C. W. Patrick Jr., and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **19**, 1945 (1998).
- [19] D. J. Mooney, A. G. Mikos, R. A. Pederson, M. J. Lysaght, P. Aebischer, N. Parenteau, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Scientific American*, 37 (1999).
- [20] M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. Langer, *Biomaterials*, **17**, 175 (1996).
- [21] E. M. Younger, M. W. Chapman, *J. Orthop. Trauma*, **3**, 192 (1989).

Table 1-1. Classification of biomedical materials



Table 1–2. Absorbable biomedical materials used for tissue engineering.

<b>Natural Polymer</b>	<b>Example</b>
Natural Polymer	Fibrin, collagen, gelatin, hyaluronate, Matrigel <sup>®</sup>
Synthetic Polymer	polyglycolide (PGA), glycolide-lactide copolymer (PLGA), polylactides (PLA; PLLA and PDLLA), ethylene oxide block copolymers with PLA or propylene oxide chains
Inorganic Material	tricalcium phosphate, calcium carbonate, non-sintered hydroxyapatite

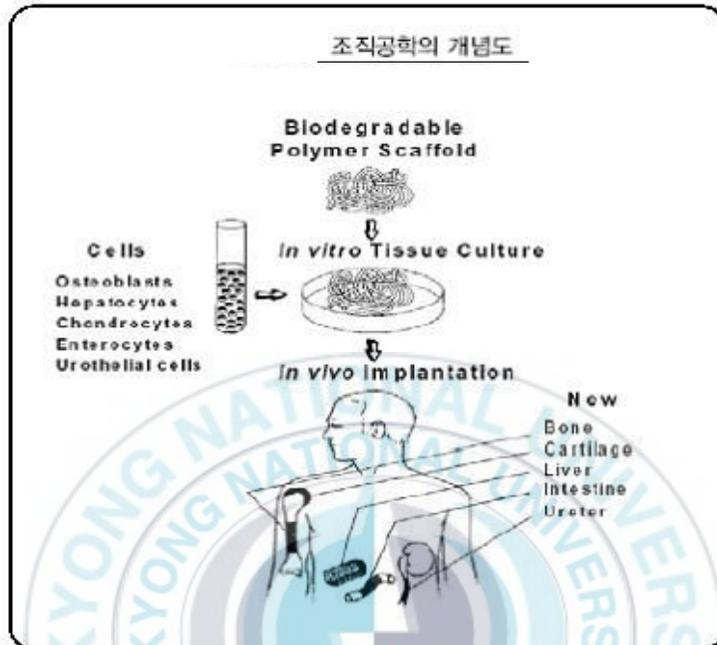


Figure 1-1. Tissue Engineering of Concept

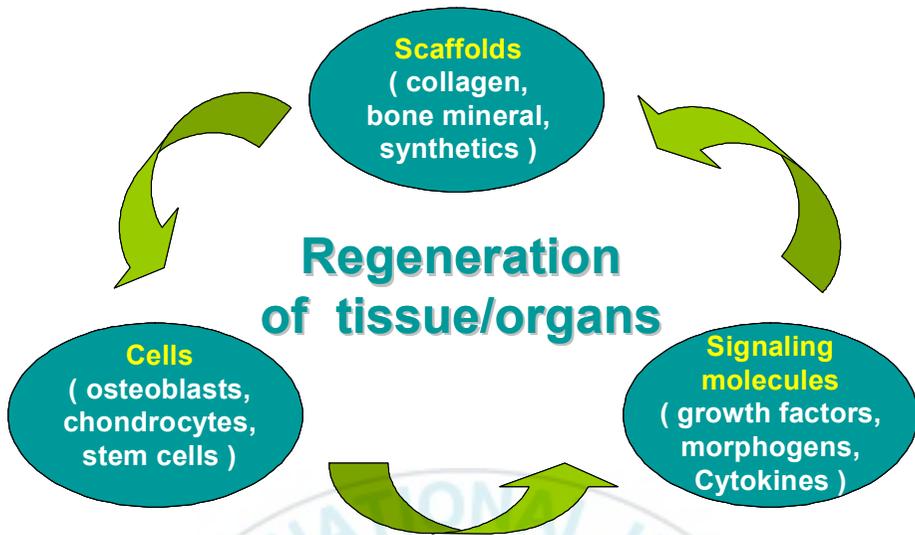


Figure 1–2. Tissue engineering generally combines three key elements: cells, scaffolds, and signaling molecules (growth factor). By combining these elements, tissue regeneration can be accomplished.

## 제 2 장 조직공학적 지지체 및 골수유래줄기세포를 이용한 중추신경의 재생

### 2.1 이론적 배경

뇌를 포함한 신경계는 선사시대부터 인체의 가장 신비한 부분으로 여겨져 왔고 과학이 고도로 발달한 현대에도 그 상당 부분이 베일에 가려져 있다. 신경계는 해부학적으로 중추신경계 (central nervous system, CNS)와 말초신경계 (peripheral nervous system, PNS)로 나뉘어진다. 중추신경계에서 신경계가 손상을 입었을 경우 기능을 상실하게 될 뿐만 아니라 손상된 신경계를 회복시키거나 재생시키는 것은 거의 불가능하다고 알려져 있다. 그러나 최근 수 년 전부터 분자생물학에 의한 신경 과학이 발달되면서 신경세포의 구조와 기능이 분자 수준에서 해명되고 있으며 신경 전달물질과 신경영양성장인자의 중요성이 부각되면서 약 10여 년 전부터 오랜 동안의 정설을 뒤엎고 중추신경을 재생할 수 있다는 사실이 입증되고 있다.<sup>1-3</sup> 그런 까닭에 조직공학 분야에서 가장 도전할만한 분야 중의 하나로 중추신경의 재생이 많이 연구되고 있다. 이러한 중추신경의 재생은 다양한 조직과 세포들에 의해 연구되고 있는데 슈반씨 세포나 후각 조성 세포, 맥락얼기 뇌실막 세포 또는 배아줄기세포 등이 중추신경이 재생될 수 있도록 도와주는데 이용되고 있다.

최근 척추외상으로 중추신경인 척수가 손상되어 완전 마비가 일어난 경우 골수줄기세포 이식과 줄기세포 성장인자를 이용하면 척수신경

의 재생을 증진시킬 수 있다는 연구가 보고되었다. 배아 줄기세포를 손상된 척추에 이식하여 그 기능이 회복되었다고 보고되어 있으며 이식된 배아줄기세포는 이식부위에서 최소 5주 이상 생존하여 희돌기교세포, 성상세포와 신경세포로 분화하는 것이 입증되었다. 또한 이식한 세포는 그들 자신이 체내 특정위치에서 특정 조직 또는 세포로 분화하였다. 섬유아세포는 유전공학적으로 neurotrophin-3 (NT-3)와 신경성장인자 (NGF)를 발현하고 생성시킨다. 이는 척수손상 부위에 처리했을 때 치료의 효과를 나타낸다.<sup>4-9</sup>

신경질환의 치료를 위한 신경전달물질과 성장인자들이 조직과 세포의 복원을 유도하고 성장을 촉진한다는 것이 알려짐에 따라 신경영양인자를 분비하는 세포의 이식에 관련된 연구가 진행되고 있다.<sup>10-11</sup> 그러나 세포를 얻을 수 있는 방법이 제한적이고 세포를 얻는 부분의 조직이 손상되는 문제점을 야기하기 때문에 이를 대처할 새로운 방법과 세포원이 필요하다. 골수간엽줄기세포와 골격근유래 줄기세포는 주변 환경에 따라 다양한 세포로의 분화능을 가진 줄기세포로서, 분리가 간단하고, *in vitro* 상에서 쉽게 증식이 가능하다. 특히 골수간엽 줄기세포는 줄기세포와 같은 전구세포로 중추신경계에 이식하면 신경세포로 분화한다. 성체 골수간엽 줄기세포를 손상된 뇌에 직접 이식하였을 때 그 기능이 회복됨이 보고되었다. 뼈로부터 유래된 간엽세포가 신경세포 형태로 분화하고 뇌의 손상 부위로 이동한다. 이는 또한 성장하면서 성장인자를 발현하여 손상부위의 회복을 촉진시킨다.<sup>12-21</sup>

본 연구팀에서는 일련의 연구로서 중추신경재생에 중요한 역할을 하는 슈반세포를 분리하고 대량 배양 할 수 있는 연구를 진행하였다.<sup>22</sup> 더불어 골수간엽줄기세포를 외배엽성의 신경세포로 분화를 유도하였고, 골격근유래 줄기세포를 신경세포로 분화시키기 위하여 brain-derived

neurotrophic factor (BDNF)를 사용하였으며, 분화여부를 특이적으로 발현하는 단백질인 neurofilament (NF)를 이용한 면역학적 염색방법을 통해 분화여부를 증명함으로써 신경세포의 분화와 성장에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>23,24</sup>

본 연구에서는 위와 같은 선행연구를 바탕으로 완전히 절단된 척수에 생분해성 고분자 담체인 (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체를 사용하여 골수간엽줄기세포를 파종한 후 제조한 조직공학적 지지체를 절단된 척수에 이식하여 시간이 경과하면서 지지체를 통해 신경축삭이 연결되어 중추신경으로의 역할을 복원하는 것이 목적이다. 이는 골수간엽 줄기세포가 결손된 신경세포를 보충하는 역할을 할 뿐만 아니라 조직공학적 지지체가 축삭이 다시 연결되는 다리의 역할을 한다는 가정 하에 중추신경의 재생 가능성을 제시하고자 한다.

## 2.2 재료 및 방법

### 2.2-1. 골수유래줄기세포의 분리 및 배양

초대배양 골수유래줄기세포는 이미 잘 알려진 방법을 이용하여 분리 및 배양하였다. Fischer 쥐 (inbred, female)의 대퇴부를 절단하여 18게이지의 바늘과 PBS 수용액이 든 주사기를 사용하여 2 ~ 3 ml의 골수를 채취하였다. 이를 배양액으로 2 배 희석하여 50% 퍼콜 (Percoll, Sigma Chem. Co., USA) 점진구배용액에 천천히 낙하시켜 퍼콜 층과 섞이지 않도록 하였다. 이를 원심분리기로 500 g에서 25 분간 원심분리 하여 적혈구 층, 퍼콜 층, 세포 층 및 혈장 층으로 구분하였으며 마이크로 피펫을 이용하여 세포층만을 분리하여 배양액으로 다시 희석하여 1000 rpm에서 10 분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거하여 분리한 세포는 20% 우태혈

청 (FBS, Gibco BRL, USA) 및 항생제 (10 U/ml 암프테리신 B, Gibco BRL) 를 첨가한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL)에  $10^3 \sim 10^4$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 배양 플라스크에 배양하였다. 배양된 세포는 3 일에 한번씩 배양액을 교체하였으며 7~9 일에 한번씩 계대배양 하였다.

## 2.2-2. 이식재료의 제조

얼음입자추출법을 이용하여 성장인자인 BDNF를 함유한 다공성 지지체를 제조한 후, E.O gas 하에서 멸균하였다. 골수 간엽줄기 세포를 분리하고 2 주 정도 배양하여 트리판블루 다이와 헤마토사이토메터를 이용하여 생존한 세포의 수를  $2 \times 10^6$  세포로 계산하여 poly(L-lactide-co-glycolide) (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체에 이식한다. 그룹 I 은 손상된 척추에 (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 세포를 넣지 않은 모델 (G1, n = 8)로 만들고, 그룹 II는 담체만 넣은 모델 (G2, n = 8), 그룹 III은 담체와 성장인자와 골수 간엽줄기 세포 ( $2 \times 10^6$ 개/세포)를 넣은 모델 G3, n = 8)을 제조한다.

## 2.2-3. 척수절제 수술.

중추신경 손상 모델로 사용된 Fischer 쥐는 동종간의 면역반응이 없어 세포치료 연구에 매우 유용한 동물이다. 4 주된 암컷 Fischer 쥐를 케타민과 럼폰을 1:1로 혼합한 마취제로 마취시켰다. 중추신경 손상은 먼저 척추의 중간 부위의 피부를 제거하고 근막과 근육을 제거하여 척추 뼈의 T8 - T9 부위를 제거하였다. 이때 척수가 손상되지 않도록 세심한 주위가 필요하다. 척수가 노출되면 마이크로 가위를 이용하여 경막을 조심스럽게 제거하고 척수를 5 mm, 3 mm, 1 mm 및 단순 Cutting 넓이로 완전히 절단한다.

## 2.2-4. 수술 후 관리

척수가 절단되어 척수를 손상 입은 쥐는 하반신이 마비되어 각별한 주의와 관리가 필요하다. 우선 수술 후에는 깨끗한 케이지와 새 베딩으로 옮기고 바닥을 따뜻하게 해주거나 열을 발산하는 적외선 광원으로 따뜻하게 해 주었다. 수술 후 일주일간 항생제를 일정량 주입하였으며 하반신이 마비되기 때문에 원활한 뇨의 배설이 이루어지지 않을 경우에 쥐에 치명적이므로 1 일 2 회 뇨를 제거해 주었다.

## 2.2-5. 운동력 평가

운동력 평가는 수술 후 1주마다 Basso, Beattie 및 Bresnahan (BBB) 스코어를 통해 평가한다.<sup>25,26</sup> 평가 전에 운동력을 향상시키기 위해 훈련이 필요하다. 회전하는 원통위에서 훈련시킨 후 원형의 판 위에서 움직임을 관찰한다. 운동력 측정은 BBB scale (Table 2-1 및 Figure 2-7)을 따라 점수를 정하는 방법을 선택하였다. 점수는 3 명의 평가자가 쥐의 뒷다리의 움직임과 발을 딛는 모양, 발의 각도, 몸통의 안정감 등 관찰한 후 점수를 채점해 평균을 내었다.

## 2.2-6. 조직학적 평가

Hematoxylin and eosin (H&E) 염색은 가장 기본적인 염색법으로 세포의 핵에 특이적으로 염색이 되는 hematoxylin과 세포질에 염색이 되는 eosin을 이용한 염색법으로 핵과 세포질의 성상을 파악할 수 있다. 또한 골수유래줄기세포가 지지체내에서 신경세포로 분화되었는지를 확인하기 위하여 신경세포에서 특이적으로 발현하는 단백질인 Neurofilament (NF; SCYTEK, USA)와 Neuron-Specific Enolase (NSE; Serotec, UK)를 관

찰하였다. 제작된 슬라이드에 1 차 항체를 상온에서 2 시간 동안 처리하였으며, 바이오틴이 결합된 2 차 항체를 20 분간 처리하였다. 여기에 아비딘 - 바이오틴 - 퍼록시다제 (Immunotech, France)를 첨가하여 다시 상온에서 30 분간 인큐베이션하여 세척한 후, 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) 발색제 (Immunotech)를 떨어뜨려 붉은 색으로 염색이 되는지를 광학현미경으로 관찰하였다. 본 연구에서는 지지체를 이식한 부위에 세포와 조직의 형성을 관찰하기 위해 실시하였다.

## 2.3 결과 및 고찰

### 2.3-1. 이식재료의 제조

본 연구에서 인공기질로 사용한 생분해성 고분자 담체로는 미국의 식품의약품안전청에서 인체이식용으로 승인 받은 PLGA를 이용하여 다공성 지지체를 만들어 사용하였다.<sup>27-29</sup> 이는 얼음입자추출법을 이용하였는데 BDNF를 함유한 다공성 PLGA 담체의 제조 모식도를 Figure 2-1에 나타내었다. 90 K의 PLGA를 0.5 ml MC에 용해시켜 -20 °C에서 냉각시킨 후 얼음입자를 액체질소에 증류수를 분무하여 180  $\mu$ m, 250  $\mu$ m 분자채를 사용하여 입자크기를 조절하였다. (Figure 2-3) 그 후 BDNF의 양을 PLGA 0.1 g에 200 ng 으로 하여 제조된 얼음입자와 1 : 6의 비율로 sonicator를 사용하여 혼합하였다. 혼합된 얼음입자를 실리콘몰드에 채워서 지지체를 제조한 뒤 액체 질소에서 급랭시킨 후 동결건조 시켜 실험에 사용하였다. 제조된 담체의 표면을 확인하기 위해 scanning electron microscope (SEM)을 찍어 담체의 형태 및 미세구조를 관찰하였다. (Figure 2-2)

## 2.3-2. 운동력 평가.

총 24 마리의 Fischer 쥐를 8 주 동안 BBB 스코어로 측정하였다. 우선 Figure 2-5에서 보는 것과 같이 수술 후 쥐들의 생존을 측정해본 결과, 수술 후 대조군인 그룹 I은 수술부위의 염증과 방광의 파열로 사망하였다. 그러나 그룹 II인 담체만 넣은 모델과 담체와 BDNF와 골수 간엽줄기 세포를 넣은 그룹 III는 높은 생존력을 보였다. 이는 지지체로 사용된 PLGA는 생분해성 고분자로서 면역반응이 일어나지 않으며 생체 이식 시 세포확산과 성장에 영향을 미치는 다공성 구조를 가지고 있고, 또한 PLGA의 기계적 강도에 의해 손상부위가 재생되는 동안 척추의 형태를 크게 유지시키며, 신경성장의 다리 역할을 하는 것으로 사료된다. BDNF는 중추신경계의 신경 단위들 사이의 시냅스 연결 강도를 증가시켜주는 것으로 알려져 있다.

수술 8 주 후 담체와 BDNF와 골수 간엽줄기 세포를 넣은 모델인 그룹 III는 뒷다리 세관절의 움직임이 미세하게 관찰되며, 발바닥이 지면에 닿아 간헐적으로 체중을 지지하는 것이 관찰되었고 전체적인 운동성이 증가하는 것을 확인하였다. 그룹 III는 그룹 I과 그룹 II보다 운동성이 증가하고 뒷다리의 움직임이 향상됨을 확인할 수 있었다. 그룹 III의 쥐를 운동시켜 1 분 동안 비디오로 촬영하여 이들의 움직임을 사진으로 나타내었다. (Figure 2-6) 결론적으로 그룹 III는 시간이 지나면서 수술로 완전히 절단된 부위에 새로운 조직이 형성되어 완전하지는 않지만 잃었던 감각과 운동신경이 회복됨을 확인할 수 있어 본 실험의 가능성을 제시하였다.

수술 8 주 후 세 그룹의 시간에 따른 운동능력의 향상을 BBB 점수를 바탕으로 Figure 2-7에 나타내었다. 정상의 운동능력을 가진 쥐들의 BBB 점수는 21 점이다. 척추 손상을 가하기 전에 모든 쥐들의 운동력은 최고점수를 나타내지만 수술 후 하반신 마비에 의해 BBB 점수는 0 점을

나타낸다. 수술 후 일정기간이 지나면서 각 그룹의 운동능력은 점차적으로 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 그룹 I 과 그룹 II는 회복시간경과에 따른 점수의 향상이 미미하고 수술 후 주 후에도 그룹 I 은 1 점, 그룹 II는 4 점 이하의 낮은 점수를 가진다. 반면, 그룹 III은 그룹 I 과 그룹 II에 비해 수술 후 1 주부터 BBB 점수가 증가하여 수술 후 7 주와 8 주에 11 점 정도의 점수를 가져 운동력이 그룹 I 과 그룹 II에 비교하여 급진적으로 향상되는 것을 확인할 수 있었다( $P^* < 0.05$ ). 그룹 III의 수술 후 8 주 후 BBB 점수인 11 점은 뒷다리가 몸통을 지탱하지는 못하지만 고관절, 무릎 및 발목의 3 관절을 모두 사용한다는 것을 의미한다.

### 2.3-3. 육안적 소견

수술 8 주 후 쥐의 심장에 10% 포르말린을 주입하여 전신 고정 후 수술한 척추부위를 분리한다. 분리한 척추의 뼈를 완전히 제거하여 척수만 드러나게 한 후 실험한 부위의 조직형성 정도를 육안으로 확인한 결과 3 mm와 1 mm 모델 모두 수술 부위의 조직이 형성됨을 확인할 수 있었다. (Figure 2-8)

### 2.3-4. 조직학적 평가

신경 재생의 여부를 확인하고자 조직학적 평가를 통해 일반 조직과 손상된 조직을 비교하였다. Figure 2-9에서이고 (a)는 정상 조직, (b)는 손상 받은 부분을 나타낸 것이다. 이들을 H&E 염색한 결과 이식 부위에 전체적으로 조직이 형성됨을 알 수 있었다. 본 염색법을 통해 이식된 부위의 핵과 세포질의 성상이 본래의 척수조직과 유사함을 확인할 수 있었다. 하지만 본 염색으로 관찰된 핵과 세포질의 성상만으로는 이식된 부위에 형성된 조직이 신경조직임을 정확히 판단할 수 없다. 이를 더 명확히

확인하기 위하여 일정세포에만 존재하는 항원-항체 반응에 의해 염색함으로써 특정세포를 증명하는 면역화학적 염색법인 NF와 NSE를 시행하였다. 먼저 신경세포에 특이적으로 발현하는 NF 염색을 실시한 결과 손상된 부위에 부분적으로 붉게 염색이 관찰되었다. NSE 역시 Neuron에 염색이 된 것으로 보아 신경의 재생이 일어났다고 사료된다.

## 2.4. 결 론

본 연구는 조직공학적 지지체와 줄기세포를 이용하여 완전히 절단되어 손상된 중추신경을 재생하고자 연구를 진행하였다. 지지체로 사용한 담체로는 생체적합성이 검증된 (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체를 사용하여 다공성 지지체를 만들었다. 세포원인 골수간엽줄기세포는 면역반응을 일으키지 않는 Fischer 쥐의 대퇴부 골수에서 분리 및 배양하였으며, 골수간엽줄기세포를 다공성의 (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체에 파종하기 위해 3가지 그룹을 가지고 실험을 진행하였다. 그룹 I은 T8 - T9 까지 척수를 완전히 제거한 모델, 그룹 II는 척수를 제거하고 (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체만을 삽입한 모델, 그리고 그룹 III은 척수를 제거하고 (락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 성장인자 그리고 골수 간엽줄기세포를 삽입한 그룹이다. 수술 후 쥐가 죽지 않게 관리하면서 BBB 스코어로 중추신경의 기능의 회복과 재생력의 측정하였으며, 조직학적 검사를 통해 이식부위의 조직형성 정도를 확인하였다. BBB 스코어에서 그룹 III은 약 11 점 정도로 뒷다리의 움직임을 보였으나, 나머지 두 그룹은 4 점 이하로 거의 움직임이 없었다. 이는 지지체와 세포를 이식한 그룹이 신경이 재생되고, 기능이 회복된 것으로 확인할 수 있다. 조직학적 검사에서도 그룹 III은 새로운 조직의 형성을 확인할 수 있었다.

골수간엽줄기세포를 이용한 조직공학적 신경재생실험에서 어느 정도의 움직임과 조직의 형성되면서 잃었던 감각과 운동신경이 완전하지는 않지만 어느 정도 회복된 것을 확인하였다.

신경세포에 특이적으로 발현하는 NF를 이용한 조직학적 염색법을 이용해 신경세포의 유무와 신경세포의 축색돌기를 확인하는 연구가 계속적으로 진행 중이다. 또한 PLGA로 제조한 지지체를 이용하여 중추신경재생에 대한 연구가 진행 중이며, 신경성장 인자인 BDNF의 성장인자를 이용하고, 주입한 세포의 영향을 확인하기 위하여 세포 추적 기술을 실험 중에 있다.

## 2.5 참고문헌

- [1] G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 640, (1999).
- [2] J. H. Lee, G. Khang, H.B Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 782 (1999).
- [3] J. .J Yoo, I. Lee, Korea Med. Pub., Seoul, (1998).
- [4] S. Kathryn, *Lancet*, **355**, 1340 (2000).
- [5] C. Brosamle, M. E. Schwab, *Seminars Neurosci.*, **8**, 107 (1996).
- [6] M. P. Vacanti, J. L. Leonard, B. Dore, *Transplant. Proceed.*, **33**, 592 (2001).
- [7] S. Olson, H. Cheng, R. H. Zetterstrom, *Brain Res. Rev.*, **26**, 302 (1998).
- [8] H. Cheng, Y. Cao, L. Olson, *Science*, **273**, 510 (1996).
- [9] H. Cheng, S. Almstrom, L. Gimenez-Llort, *Exper. Neur.*, **148**, 544 (1997).

- [10] S. P. Baldwin, W. M. Saltzman, *Adv. Drug Del. Rev.*, **33**, 71–86 (1998)..
- [11] R. Langer, *J. Control. Rel.*, **62**, 7–11 (1999).
- [12] H. S. Kim, I. Lee, J. M. Lee, H. B. Lee, *J. Korea Soc. Endocrinology*, **17**, 206–217 (2002).
- [13] G. Khang, P. K. Shin, I. H. Kim, H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **6(2)**, 45–52 (2002).
- [14] K. S. Park, E. J. Kim, G. Khang, H. B. Lee *Biomater. Res.*, **7(2)**, 120–127 (2003).
- [15] D. Woodbury, E. J. Schwarz, D. J. Prockop, *J. Neurosci. Res.*, **61**, 364 (2000).
- [16] W. Deng, M. Obrocka, I. Fischer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **282**, 148 (2001).
- [17] J. Sanchez–Ramos, S. Song, F. Cardozo–Pelaez, *Experim. Neurol.*, **164**, 247 (2000).
- [18] D. J. Prockop, S. A. Azizi, D. G. Phinney, *Prog. Brain Res.*, **128**, 293 (2000).
- [19] D. Koy, S. Weiss, *Science*, **287**, 1439 (2000).
- [20] G. Kempermann, L. Wiskott, F. H. Gage, *Cur. Opin. Neur.*, **14**, 186 (2004).
- [21] I. B. Black, D. Woodbury, *Blood Cells, Molec. Dis.*, **27**, 632 (2001).
- [22] J. S. Choi, S. J. Lee, G. Khang, H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **6**, 17 (2002).
- [23] J. S. Choi, S. J. Lee, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **6**, 129 (2002).

- [24] E. J. Kim, J. H. Song, J. W. Jang, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 41 (2004).
- [25] D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, *J. Neurotrauma*, **12**, 1 (1995).
- [26] D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan, *Experim. Neurol.*, **139**, 244 (1996).
- [27] R. M. Day, A. R. Boccaccini, S. Shurey, *Biomaterials*, **25**, 5857 (2004).
- [28] K. Matsumoto, K. Ohnishi, T. Kiyotani, *Brain Res.*, **868**, 315 (2000).
- [29] T. Kiyotani, M. Teramachi, Y. Takimoto, *Brain Res.*, **740**, 66–74 (1996).
- [30] J. W. Jang, S. H. Kim, C. W. Han, I. W. Lee, G. Khang, H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 59 (2004).

Rat #:		Date:		DPO:		Score: L		R																	
Limb Movement			Trunk Position		Abdomen	Paw Placement			Stepping			C Coordination	Toe Clear.		Predominant Paw Position		Trunk Instability	Tail							
Hip		Knee		Ankle		Plantar Pl.			Dorsal		Plantar		Initial Contact	Lift Off											
L	R	L	R	L	R	Side	Prop	Sweep	W/O Supp.	W Supp.	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R					
∅	∅	∅	∅	∅	∅	L	R	L	R	Drag	L	R	L	R	∅	∅	∅	∅	∅	∅*	I	I	I	I	Up
S	S	S	S	S	S	Mid									O	O	O	O	O	O	E	E	E	E	
E	E	E	E	E	E	High									C	C	C	C	C	C	P	P	P	P	Down
Comments:																									
(∅-No, S-Slight, E-Extensive Movement)										(∅-Never 0%, O-Occasional <=50%, F-Frequent 51-94%, C-Consistent 95-100%) *Clearance <=5% (I-Internal Rotation, E-External Rotation, P-Parallel) †D.Steps>4/HL **Toe Drags>4/HL															

Table 2-1. The scoring sheet with categories and attributes that accompanies the BBB Locomotor Rating Scale. The left, middle, and right portions of the sheet represent the early, intermediate, and late phases of recovery, respectively (DPO, days postop; L, left; R, right; plantar Pl., plantar placement or paw; toe clearance during swing W/O supp., without support; W supp., with support).

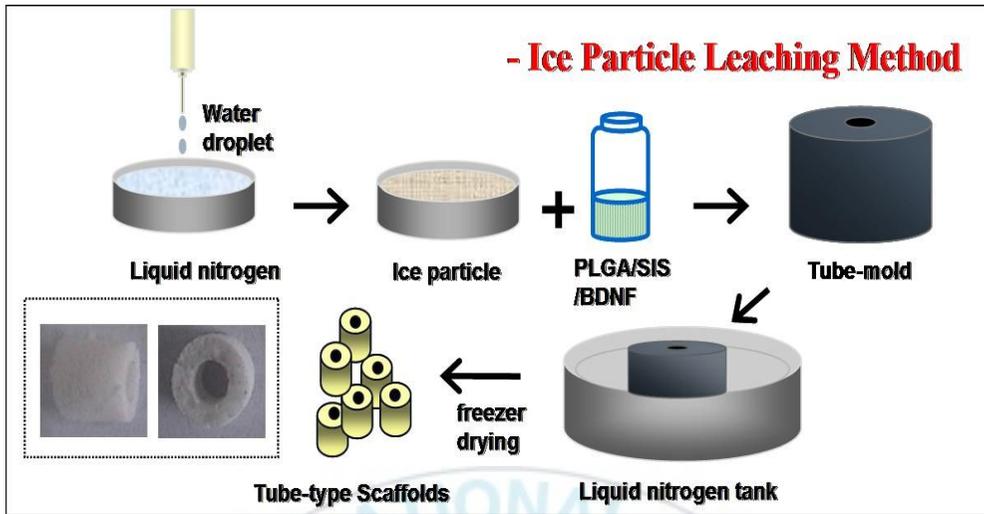


Figure 2-1. Schematic diagram illustrating of fabrication process of PLGA scaffolds by Ice-Particle Leaching Method

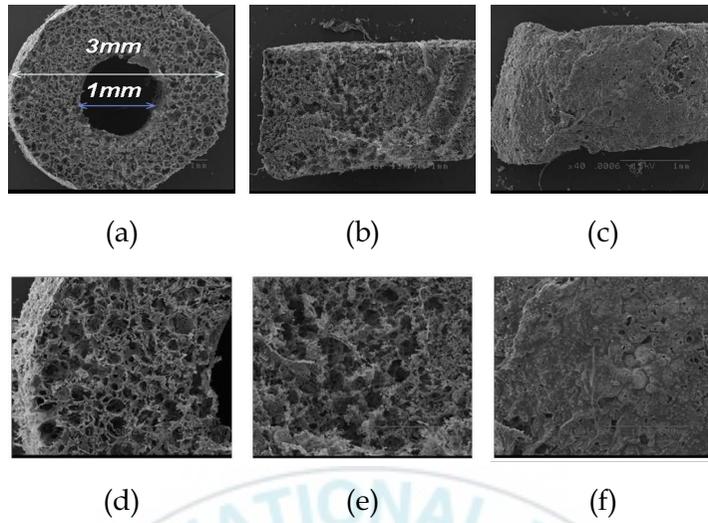
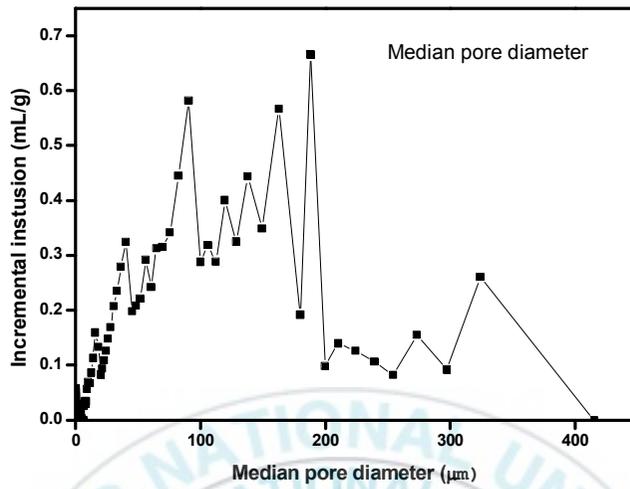


Figure 2-2. SEM microphotographs of PLGA scaffolds. (a) cross ( $\times 40$ ), (b) side ( $\times 40$ ), (c) surface ( $\times 40$ ), and (d) cross ( $\times 100$ ), (e) side ( $\times 100$ ), (f) surface ( $\times 100$ )

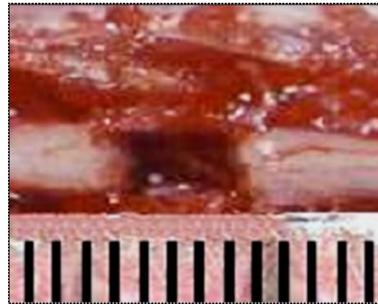


Weight of PLGA (g)	Weight of ice particle (g)	Ice particle size (μm)	Porosity (%)	Median pore diameter (μm)
1	9	180 ~250	90.1	81

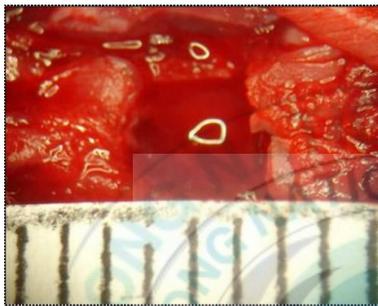
Figure 2-3. Pore size distribution of Scaffold made by Ice-Particle Leaching Method



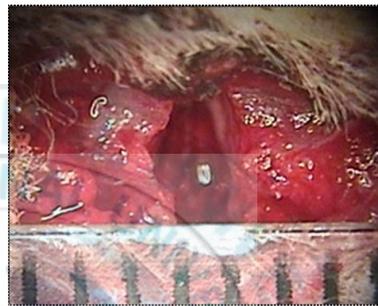
(a) Surgery



(b) 5 mm Model



(c) 3 mm Model



(d) 1 mm Model

Figure 2-4. The Picture of Surgery and Transected Spinal Cord

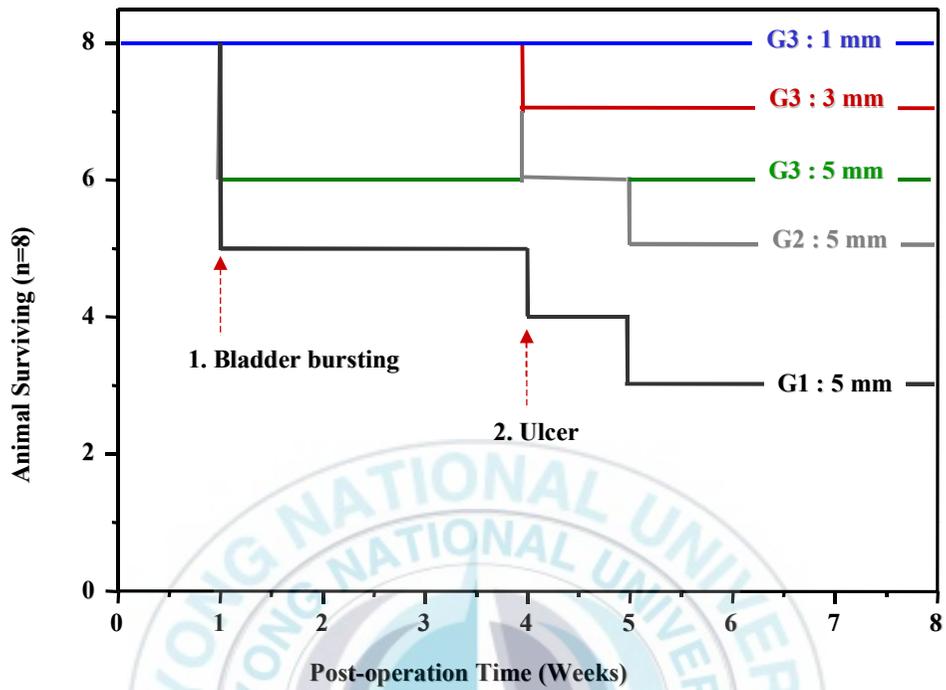
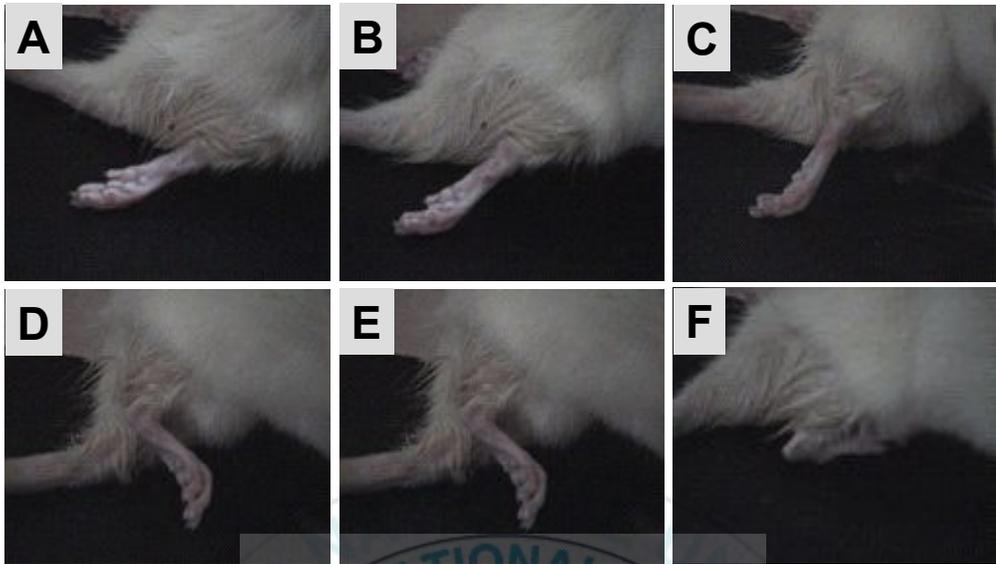
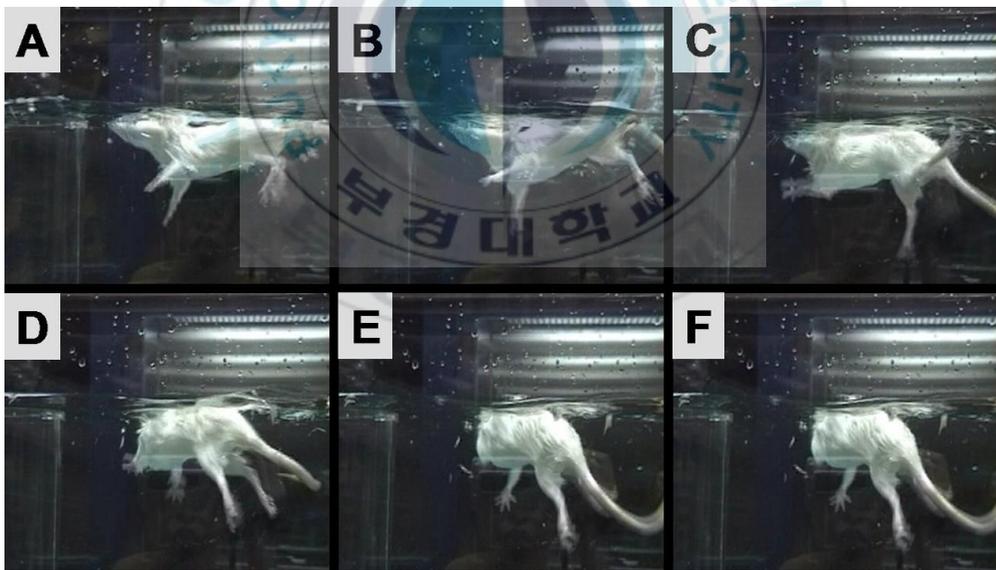


Figure 2-5. Survival of spinal cord transected rat after post-operation: G1 (blank model), G2 (scaffold), and G3 (scaffold, cell, growth factor)

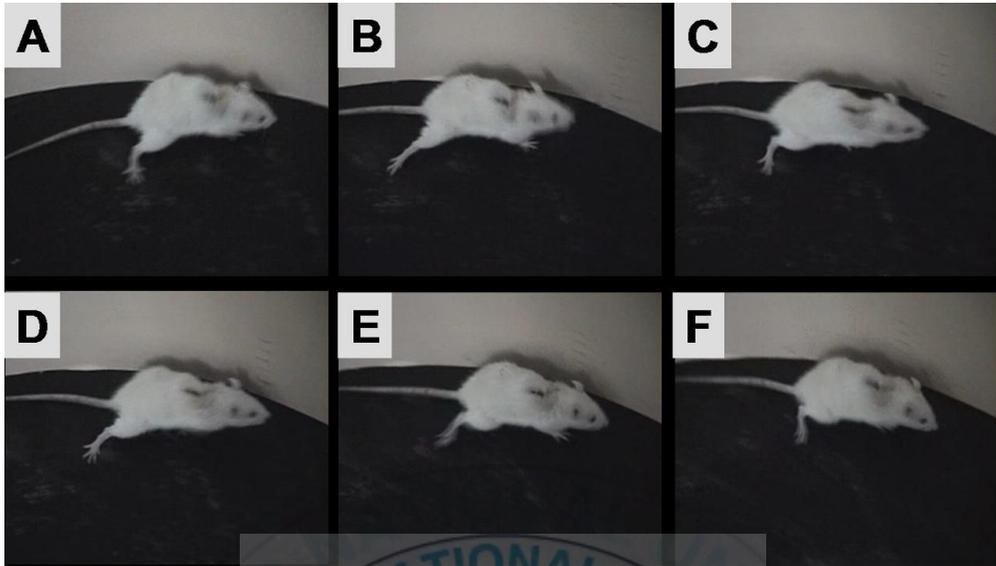


(a) G3-3 Model (6 weeks)



(b) G3-3 Model (8 weeks)

(Continue)



(c) G3-1 Model (4 weeks)

Figure 2-6. Time-lapse photographs of movement by representation member of the (a) G3-3 Model (6 weeks) and (b) G3-3 Model (6 weeks), (c) G3-1 Model (4 weeks)

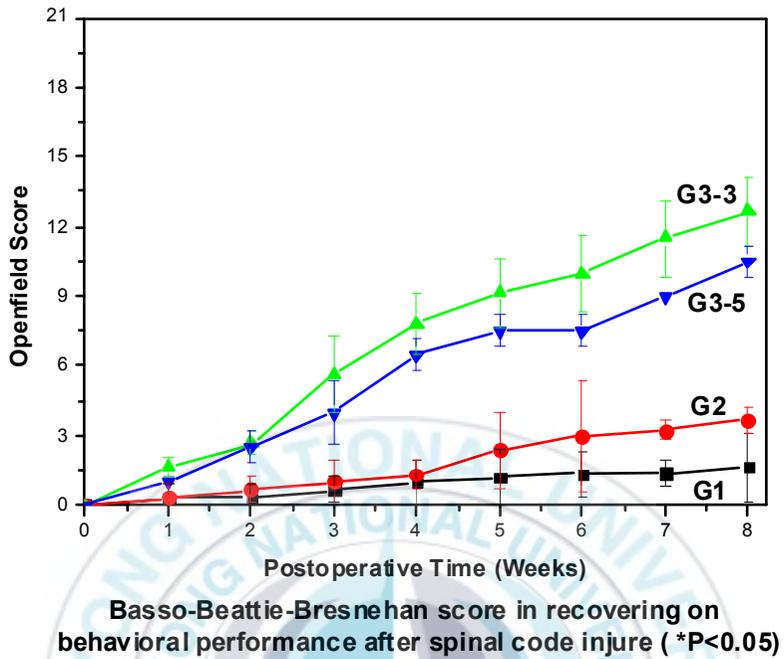
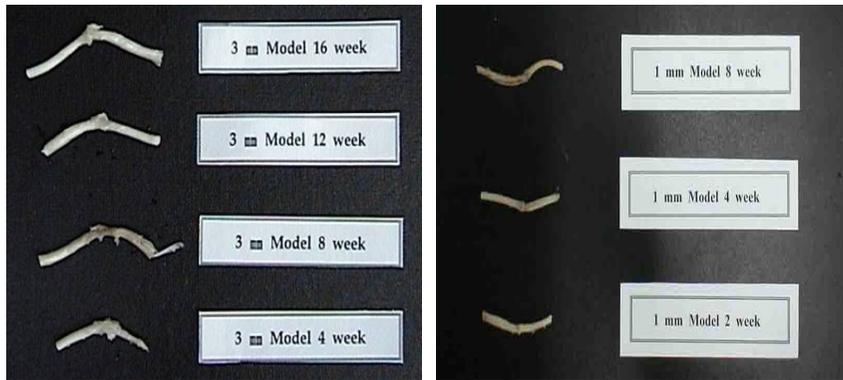


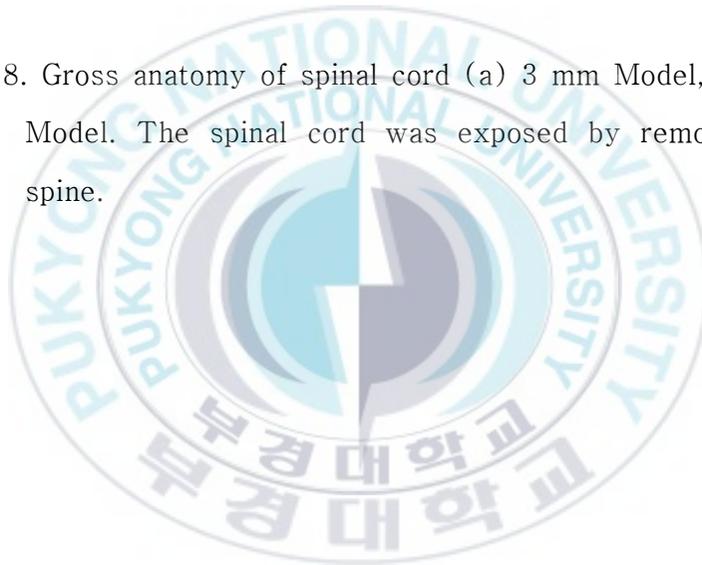
Figure 2-7. Basso-Beattie-Bresnehan score in recovering on behavioral performance after spinal cord injury ( $P^* < 0.05$  compared with control).

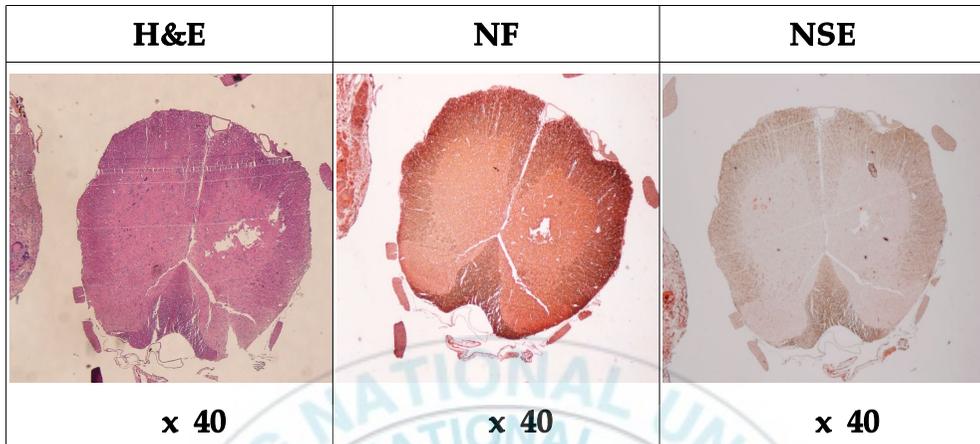


(a) 3 mm Model

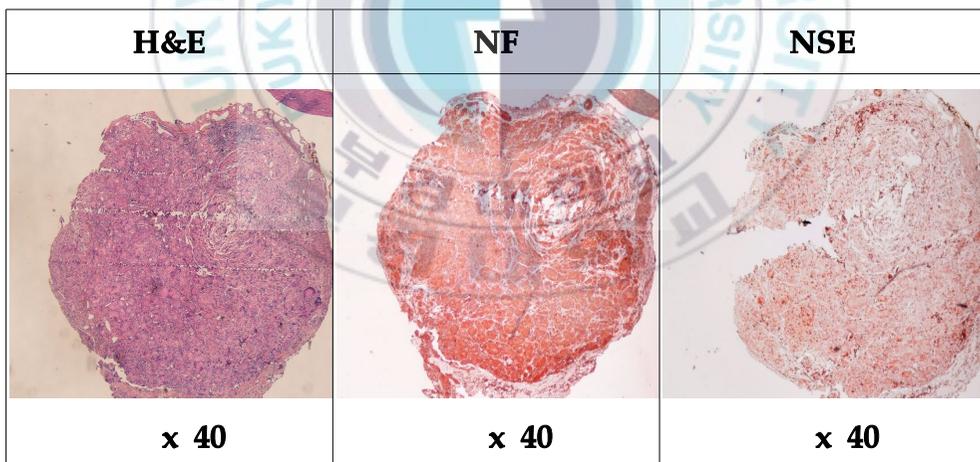
(b) 1 mm Model

Figure 2-8. Gross anatomy of spinal cord (a) 3 mm Model, (b) 1 mm Model. The spinal cord was exposed by removal of the spine.





(a) Normal Tissue



(b) Lesion Tissue

Figure 2–9. Histological evaluation of spinal cord transection after 8 weeks postoperation: (a) Normal Cord and (b) Lesion Cord

## 제 3 장 온도감응성 MPEG-PCL 하이드로젤에 함유된 신경성장인자 BDNF의 서방화

### 3.1. 이론적 배경

온도감응성 하이드로젤은 조직재생용 세포 전달체와 약물전달시스템에서 널리 연구되어 지고 있다.<sup>1-3</sup> 고분자 하이드로젤은 유기 용매를 사용하지 않고 수용액 상에서 온도 변화에 의해, 특히 인체 온도부근에서, 쉽게 젤화 하는 재료의 개발로서 약물이나 생물학적 활성 성분을 함유할 수 있는 장점을 가지고 있어 생체 적합성 고분자로서 가장 큰 발전 가능성을 가지고 있다. 현재까지 널리 사용되고 있는 생체 적합성 고분자 중의 하나인 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)은 물과 유기 용매에 대한 높은 용해도를 가지며 비독성이고 면역 작용에 거부감이 없는 것으로 보고되어 졌으며, 특히 단백질 흡착 억제 효과가 크고 혈액 접촉 물질의 생체 적합성을 향상시키고, 친수성으로 인체 내에서 용해되어 신체 외부로 배출된다.<sup>4,5</sup>

약물 전달체 및 조직공학 분야에서 생분해적 생체재료 개발은 매우 중요하여 지난 20 년간 다양한 재료를 이용해 연구되어 지고 있다. 특히 폴리락타이드 (PLA), 폴리글리콜라이드 (PGA), 락타이드 글리콜라이드 공중합체 (PLGA), 그리고 폴리카프로락톤 (PCL)은 폴리에스터 계열의 고분자로서 생분해 특성과 생체적합성 때문에 약물 전달체 및 다양한 의료용 분야의 연구에 응용되고 있다.<sup>6-12</sup> 폴리에스터 계열의 생분해성 고분자

중에서 PCL은 다양한 고분자와의 상용성을 가지고 있으며, 높은 결정성에 기인하여 장기간의 생분해적 특징을 보이고 있다.<sup>13</sup>

본 연구팀에서는 PEG 및 PCL의 특성을 결합시켜 PEG와 PCL의 블록 공중합체 다양한 구조로 설계 합성하였고 또한 합성된 블록 공중합체 수용액의 온도에 따른 상전이 거동을 평가하였다.<sup>14-16</sup> 본 연구팀에서는 합성된 생체적합성이며 생분해성 PEG와 PCL의 블록 공중합체를 생체 조직공학에 응용하기 위한 단백질 약물의 전달체로서의 사용을 검토하고자 하였다. 생체조직공학에 응용을 위한 단백질 약물은 사이토카인 및 여러 가지 성장인자로서 온도나 유기용매 등에 의해서 쉽게 변성이 일어나고 약물 단독의 주사 투여시 낮은 생체 이용율을 나타내기 때문에 미립구, 하이드로젤, 그리고 이식형 제제 등을 통한 이식형 담체에 대한 연구가 진행되고 있다. 그 중에서 온도 감응형 하이드로젤은 유기 용매 없이 쉽게 제조할 수 있고, 투여 시 다루기가 쉽고 또한 외부 자극에 의해 약물의 방출을 조절할 수 있기 때문에 무한한 발전 가능성을 가지고 있다.<sup>17</sup>

여러 성장인자 중 신경성장인자로 중추신경계와 말초신경계의 세포의 성장, 분화, 생존, 사멸 등의 다양한 기능을 조절하는 인자로서 brain derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) 그리고 neurotrophin-3 (NT-3)가 있다.<sup>18</sup> BDNF는 중추신경계에서 NGF 보다 발현이 높으며 분포도 넓고 신경단위들 사이 시냅스 연결강도를 증가시키며 신경 돌기의 재생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어져 있다.<sup>19,20</sup>

본 연구에서는 온도 감응성 하이드로젤을 신경 재생용 성장인자의 전달체로 응용하고자, 친수성인 MPEG와 소수성이며 생분해성인 PCL로 구성된 MPEG-PCL 블록 공중합체를 합성하였고, 수용액상에서의 온도에 따른 상전이 현상을 검토하였다. 또한 모델 단백질로 소 혈청 알부민

(BSA)과 신경성장인자인 BDNF의 MPEG-PCL 블록 공중합체내에서의 서방형 방출을 검토하고자 하였다.

## 3.2. 재료 및 방법

### 3.2-1 시약 및 재료

메톡시 폴리에틸렌글리콜 (MPEG,  $M_n=750$  g/mole), 카프로락톤 ( $\epsilon$ -CL), 칼슘하이드라이드 ( $CaH_2$ ), 칼슘클로라이드 ( $CaCl_2$ ), 1 M HCl·Et<sub>2</sub>O 은 aldrich로부터 구입되었다. 카프로락톤은 칼슘하이드라이드하에서 67 °C의 온도에서 감압 정제하였고, 4 Å 분자체 (molecular sieve, Junsei chemical Co., Ltd., Japan)에서 냉장 보관하여 중합시에만 사용하였다. 메틸렌클로라이드 ( $CH_2Cl_2$ , MC, Jin Chem. Pharm. Co. Ltd., Korea)는 연속적으로 칼슘클로라이드 ( $CaCl_2$ , Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 칼슘하이드라이드하에서 질소기류 하에서 정제되었다. 반응 후 고분자의 침전을 위한 헥산 (hexane, Junsei chemical Co., Ltd., Japan)과 분자량과 분자량분포의 확인을 위한 GPC분석의 이동상으로 사용되어진 클로로포름 ( $CHCl_3$ , Fisher Scientific Korea Ltd., Korea)은 모두 HPLC 등급을 사용하였고, GPC 분석의 표준시료로서 폴리스티렌 (Showa Denko, Japan)을 사용하였다. 모델 단백질 약물은 형광물질인 FITC가 결합된 소 혈청 알부민 (FITC-BSA, Aldrich, Milwaukee, WI, USA)을 사용하였고, 신경성장인자로 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)를 사용하였다. 하이드로젤과 약물의 방출을 위한 용출액으로 인산염완충용액 (PBS, pH 7.4)을 사용하였다.

### 3.2-2 MPEG-PCL의 합성

MPEG-PCL 블록 공중합체는 단량체 활성화 메커니즘을 경유하여 MPEG의 OH기를 개시제로 하여 카프로락톤의 개환중합을 통하여 합성하였다. MPEG-PCL 분자량 3,150 g/mole의 공중합체 (HG-24)의 합성을 위하여 다음과 같은 과정을 실시하였다. 개시제인 MPEG 1.5 g (2 mmol) 및 톨루엔 80 mL을 건조된 250 mL 둥근 플라스크에 넣고 딥 스탭 트랩을 사용하여 130 °C에서 5 시간 동안 공비 증류하였다. 증류 후 톨루엔을 모두 제거하고 질소기류 하에서 MPEG를 실온 (25 °C)으로 냉각시킨 후 미리 정제된 카프로락톤 4.5 mL (39.4 mmol)를 주사기를 이용하여 넣은 후 반응용매로서 미리 정제된 MC 30 mL을 넣은 다음 중합 촉매로서 1 M HCl:Et<sub>2</sub>O를 4 mL 주입하여 24 시간동안 실온에서 교반시켜 주었다. 반응 후 반응물을 800 mL의 헥산에 서서히 떨어뜨리면서 침전시켰다. MC에 침전물을 녹여 거름종이로 거른 후 회전 증발기를 통하여 용매를 제거하고 감압 하에서 건조시켰다.

### 3.2-3 블록 공중합체의 특성 분석

고분자의 분자량은 내부 기준시료인 0.03 wt%의 테트라메틸실란 (TMS)을 포함한 CDCl<sub>3</sub> (Merck, Germany)를 용매로 하여 <sup>1</sup>H NMR (Bruker 300, 500 MHz, USA)를 통하여 분석하였다. MPEG-PCL 블록 공중합체의 분자량과 분자량분포의 측정을 위하여 두 개의 칼럼 (Shodex K-802 and Shodex Asahipak GF-510, Japan)을 가진 GPC (Shodex RI-71 detector, Japan)를 사용하였다. 표준시료로 폴리스티렌을 이용하여 표준 정량 후 이동상으로 클로로포름을 이용하여 0.6 mL/min의 유속으로 40 °C에서 실시하였다. 솔-젤 전이 온도의 측정을 위하여 MPEG-PCL의 온도에 따른 상전이 현상을 관찰하기 위하여 바이알 기울임 방법을 이용하였다. 증류

수를 이용하여 4 mL 바이알에서 3~20 wt%의 농도를 갖는 블록고분자를 80 °C에서 용해 후 균일한 고분자의 분산을 위해 4 °C에서 15 시간동안 보관하였다. 그 후 항온조에서 15 분마다 2 °C씩 증가시키면서 10 °C부터 각각의 온도에서 10 분간 방치 후 1 분 동안 바이알을 기울이면서 고분자 흐름 상태를 관찰하여 솔-젤 전이 온도를 결정하였다. 온도에 따른 점도 변화는 Brookfield점도계를 이용하여 6 °C부터 70 °C까지 2 °C의 증가로 0.05 rpm의 스핀들로 측정하였다.

### 3.2-4 하이드로젤의 형태 관찰

수용액상에서 합성된 고분자의 솔-젤 형태를 관찰하기 위하여, 제조된 솔 및 젤 형태의 고분자 수용액을 액체 질소에서 급속 냉동 후 동결 건조하여 atomic force microscope (AFM) 측정을 실시하였다.

### 3.2-5 단백질 및 BDNF를 함유한 하이드로젤의 제조

MPEG-PCL 블록 공중합체를 5 mL 바이알에서 PBS 완충액을 넣고 20 wt% 농도로 용해시켜 솔을 형성한 후 하루 동안 4 °C에서 균일 분산 시킨 후 실온에서 FITC-BSA 또는 BDNF와 물리적 혼합하여 37 °C 항온조에서 젤을 형성시켰다.

### 3.2-6 하이드로젤로부터 FITC-BSA의 생체 외 방출 실험

MPEG-PCL 하이드로젤을 통한 FITC-BSA의 방출거동을 조사하기 위하여 동일한 하이드로젤 제형을 3 개씩 제조하여 각각의 젤에 4 mL의 PBS 완충액을 넣은 후 37 °C로 유지되는 항온조에서 100 rpm의 속도로 교반시켜주면서 정해진 시간간격에 1 mL의 분석시료를 취하였고, 동일한 양의 용출액을 보충해 주었다. FITC-BSA 방출을 확인하기 위한 시료는

빛을 차단하여 형광 분광기 (F-4500, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 여기 490 nm, 방출 520 nm의 조건에서 발산 강도를 통하여 정량분석을 실시하였다.

### 3.2-7 하이드로젤로부터 BDNF의 생체 외 방출실험

BDNF의 방출 거동을 조사하기 위하여 각각의 젤에 3 mL의 PBS 완충액을 넣은 후 37 °C로 유지되는 항온조에서 FITC-BSA 방출시험과 동일하게 샘플을 채취하였다. 채취한 시료는 분석시까지 -4 °C에서 보관하였으며 분석방법으로는 효소결합면역흡착검사 (ELISA)를 사용하였다. 효소결합면역학적 방법은 고정화된 BDNF의 수용체에 항원인 BDNF를 결합시킨 후 마이크로 플레이트에서 발색반응을 시킨 후 450 nm의 파장을 조사하여 흡광도를 측정하여 BDNF의 방출 양을 결정하였다.

## 3.3 결과 및 고찰

### 3.3-1. MPEG-PCL 블록공중합체의 합성

온도감응성 약물 전달체로 MPEG-PCL 하이드로젤을 합성하기 위해서 MPEG의 말단 OH을 개시제로 이용하고 산에 의해 활성화된 카프로락톤 모노마의 개환중합을 실시하였다. (Figure 3-1) 카프로락톤의 중합은 1.0 M HCl의 존재 하에서 MPEG 750 g/mole을 개시제로 하여 단량체/개시제의 몰 비를 조절함으로써 다양한 분자량을 갖는 공중합체를 합성할 수가 있다. 본 연구에서는 실험부분에 언급한 것과 같이 분자량 3,150 g/mole의 공중합체의 합성하였다 (HG-24). 중합된 MPEG-PCL 블록 공중합체 HG-24의 특정 관능기에 대한 분자구조는 <sup>1</sup>H NMR을 통해서 분석하

였다. Figure 3-2에서처럼 MPEG의 반복되는 CH<sub>2</sub>의 프로톤은  $\delta = 3.65$  ppm (2)에서 확인할 수 있었고, 말단의 메톡시 프로톤은  $\delta = 3.38$  ppm (A)에서 확인하였다. PCL의 각각의 신호 (3~7)는  $\delta = 2.31, 1.63, 1.39$ , 그리고  $4.07$  ppm에서 확인하였다. 또한 PCL의 말단 OH proton (8)은  $\delta = 3.70$  ppm에서 관찰하였다. 게다가 MPEG의 말단의 OH에 의해 PCL이 중합이 시작됨에 따라 MPEG 말단의 CH<sub>2</sub>가  $4.2$  ppm (B)에서 관찰되어졌고 합성된 블록 공중합체는 A와 B의 면적비가 정확히 3:2의 비율을 나타냄을 확인하여 MPEG 말단의 OH가 카프로락톤의 중합 고분자 개시제로 작용되었다는 것을 확인하였다.

### 3.3-2. 블록 고분자의 솔-겔 상전이거동

합성된 고분자 HG-24의 온도 변화에 따른 솔-겔 상전이 거동을 확인하기 위하여 고분자를 증류수에 다양한 농도로 용해시킨 후 일정한 승온 온도의 간격에서 바이알을 기울임으로서 바이알 내의 HG-24 수용액이 흐르지 않는 점을 솔-겔 상전이 온도로 결정하였다. 그 상전이 특성은 농도 변화에 대해 온도의 함수로 Figure 3-3에 도식화 하였다. Figure 3-3에서 보이는 것처럼 각각의 농도에서 측정된 상전이는 상온 형태에서는 솔의 상에서 온도가 증가되면 겔의 상으로 그리고 더더욱 온도가 증가되면 다시 솔의 상의 상전이를 나타냄을 관찰할 수가 있었다. HG-24 20 wt% 수용액의 경우 상온에서는 솔의 형태이나 약  $31$  °C에서 겔의 상으로 변화됨을 확인할 수가 있었으며 더더욱 온도가 증가하여 약  $52$  °C까지 증가하였을 경우 다시 흐르는 특성을 보임을 관찰할 수가 있었다. 한편 고분자 수용액의 농도를 감소시켰을 경우 상전이 온도가 나타나는 곡선이 좁아짐을 관찰할 수가 있었다. 이와 같이 농도 감소에 따라 솔-겔-솔 상전이의 범위가 좁아진 것은 겔 형성을 위한 소수성 부분의 농도 감소에

기인한 것으로 평가된다.

HG-24 20 wt% 수용액을 온도 증가에 따라 점도 변화 관찰을 실시하여 그 결과를 Figure 3-4에 나타내었다. 고분자 수용액은 32 °C 이하에서는 0의 점도를 나타내었으나 32 °C 이상에서는 점도가 증가하여 약 46 °C 부근에서 최대의 점도값 (80000 Pa·s)을 나타내었고 그 후 급격한 점도의 감소가 관찰되었고, 55 °C 부근에서 다시 0의 점도를 나타내었다. 이 결과는 실제 온도 변화에 따른 바이알 기울임을 통해 관찰한 상전이 측정 결과인 Figure 3-3과 매우 잘 일치되는 것으로 HG-24 20 wt% 수용액이 상온에서는 솔의 상이고 32-55 °C 범위에서는 젤 그리고 다시 솔의 상이 된다는 것을 관찰할 수가 있었다. 그러므로 본 연구에서 합성 제조된 HG-24 20 wt% 수용액은 인체 온도에서 젤을 형성할 수 있는 블록 고분자임을 확인할 수가 있었다.

### 3.3-3. 블록 고분자의 형태관찰

MPEG-PCL 블록 공중합체의 수용액 상에서의 모폴로지 형성을 관찰하기 위해 솔과 젤 상태의 고분자를 AFM을 통해 분석하였다 (Figure 3-5). 제조된 HG-24 20 wt% 수용액의 온도 변화에 따른 솔-젤의 형성은 소수성 부분 고분자의 응집에 의한 영향으로 사료되는데, 솔 상태에서 관찰된 AFM (Figure 3-5A)은 고분자가 완전 분산이 일어나 균일한 형태의 고분자 모폴로지가 관찰된 반면 젤 상태에서 관찰된 경우에는 젤 형성에 의해 소수성 부분 고분자가 응집된 형태의 모폴로지를 확인 할 수 있었다. (Figure 3-5B)

### 3.3-4. 생체 외 방출실험

위와 같은 결과를 통하여 합성 제조된 HG-24 20 wt% 수용액은

술 상태에서는 약물의 봉입을 균일하게 하여 주사제형으로 설계하고 인체에 삽입하여 젤화 된 상태에서 서방형의 약물 방출을 이루게 되는 약물 전달체로서의 가능성을 갖을 것으로 확인할 수 있었다. (Figure 3-6)

그러므로 HG-24 20 wt% 수용액의 온도 감응에 따른 단백질 약물 또는 신경성장인자의 전달체로서의 가능성을 확인하고자 FITC-BSA 또는 BDNF를 함유한 하이드로젤을 제조하고 37 °C에서의 방출 경향을 확인하였다. 먼저 FITC-BSA 방출경향을 확인하기 위하여 HG-24 20 wt% 수용액에 FITC-BSA의 농도를 고분자 함량 대비 0.1, 1 %를 함유한 하이드로젤을 제조하고 20 일 동안 일정한 시간 간격에서 방출 실험을 실시하여 그 결과를 Figure 3-7에 나타내었다. FITC-BSA는 20 일간 지속적 방출 경향을 보였고 약물의 방출 오차도 1 % 이내로 재현성 있는 방출 결과를 보여주었다.

또한 HG-24 20 wt% 수용액에서 BDNF가 함유된 하이드로젤의 방출을 20 일 동안 ELISA를 통해 관찰한 결과를 Figure 3-8에 나타내었는데 방출기간 동안 지속적인 BDNF의 방출 경향을 확인할 수 있었다. 그리고 50 ng과 200 ng이 함유된 BDNF는 초기 방출과 그 후의 방출이 비슷한 경향을 보임으로서 함량의 증가에 따른 방출되는 양을 조절 할 수가 있다고 사료되나 BDNF 증가된 양에 비해 방출 된 양이 매우 적음을 관찰할 수가 있었다. 이는 BDNF의 방출 조건에서의 생리학적 불안정성에 기인한 것으로 사료된다.

MPEG-PCL 블록 공중합체 하이드로젤은 젤의 풀어짐 없이 FITC-BSA 또는 BDNF에 대해 20 일 동안 서방형의 방출 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 MPEG-PCL 블록 공중합체 하이드로젤을 이용하여 약물의 농도 조절을 통해 원하는 기간 동안에 약물의 서방화를 이룰 수 있고, 이로써 다양한 약물의 서방화를 이룰 수 있는 것을 나타내는 결과로

사료된다.

### 3.4 결론

온도 감응성 하이드로젤을 이용한 단백질 약물 전달체를 제조하고자 수행한 본 연구에서는 생체적합성 고분자인 PEG를 개시제로 하여 폴리에스터 계열인 카프로락톤의 개환 중합을 통하여 생분해 특성의 MPEG-PCL 블록 공중합체를 합성하였다. 합성된 MPEG-PCL 하이드로젤은 31 °C 이하의 온도에서는 흐름 특성을 갖는 솔 상태를 유지하였고 31~52 °C 범위에서는 겔을 형성하는 것을 확인하였다. 이 결과는 이 고분자가 인체 온도에서 겔로 변환 가능한 것을 나타내는 것이다. 37 °C에서 형성된 하이드로젤은 겔의 분산 없이 20 일 이상의 겔의 형태를 유지하였다. 또한 하이드로젤에 로딩된 알부민 및 BDNF는 서방형의 방출을 보였다. 이러한 결과로 합성된 MPEG-PCL 블록 공중합체는 생분해 특성을 갖는 하이드로젤로서 신경 성장인자의 전달체로서의 가능성을 확인 할 수 있었다. 현재 MPEG-PCL 하이드로젤을 이용하여 생체내에서의 알부민 및 신경성장인자의 방출에 대한 검토가 실행되고 있다.

### 3.5 참고문헌

- [1] O. Wichterle, D. Lim, Nature, **185**, 117 (1960).
- [2] R. Yoshida, K. Sakai, T. Okano, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., **11**, 85 (1993).
- [3] V. L. Tsang, S. N. Bhatia, Adv. Drug Deliv. Rev., **56**, 1635 (2004).

- [4] L. Zhang, C. C. Chu, I. H. Lou, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1425 (1993).
- [5] J. H. Lee, J. Kopecek, J. D. Andrade, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 351 (1989).
- [6] G. S. Chae, J. S. Lee, J. K. Jeong, et al., *Polymer(Korea)*, **28**, 335 (2004).
- [7] Y. K. Jeon, H. J. Kang, G. Khang, et al., *Polymer(Korea)*, **25**, 893 (2001).
- [8] J. Y. Yoo, J. M. Kim, G. Khang, et al., *Int. J. Pharm.*, **276**, 1 (2004).
- [9] K. S. Park, S. H. Kim, J. W. Jang, et al., *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 34 (2005).
- [10] J. S. Lee, G. S. Chae, M. S. Kim, et al., *Biomed. Mater. Eng.*, **14**, 185 (2004).
- [11] H. Seong, T. K. An, G. Khang, et al., *Int. J. Pharm.*, **251**, 1 (2002).
- [12] M. S. Kim, K. S. Seo, H. Hyun, et al., *Int. J. Pharm.*, **304**, 165 (2005).
- [13] C. Pitt, New York: Marcel Dekker, 71 (1990).
- [14] K. S. Seo, K. D. Hong, H. Hyun, et al., *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 109 (2005).
- [15] M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **70**, 154 (2004).
- [16] M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, et al., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **42**, 5784 (2004).

- [17] K. Y. Lee, D. Mooney, Chem. Reviews, **101**, 1869 (2001).
- [18] G. Vantini, Psychoneuroendocrinology, **17**, 401 (1992).
- [19] S. K. Kim, K. D. Hong, S. H. Kim, et al., Tissue Eng. Regen. Med., **2**, 130 (2005).
- [20] S. K. Kim, S. H. Kim, H. R. Lee, Tissue Eng. Regen. Med., **2**, 388 (2005).



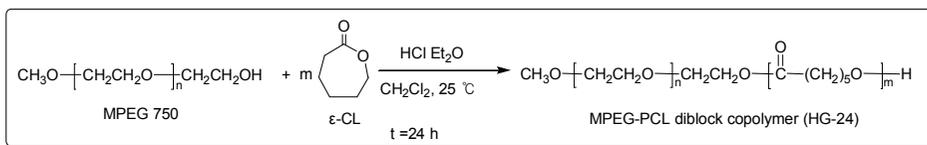


Figure 3-1. Chemical scheme for polymerization of MPEG-PCL diblock copolymer (HG-24).



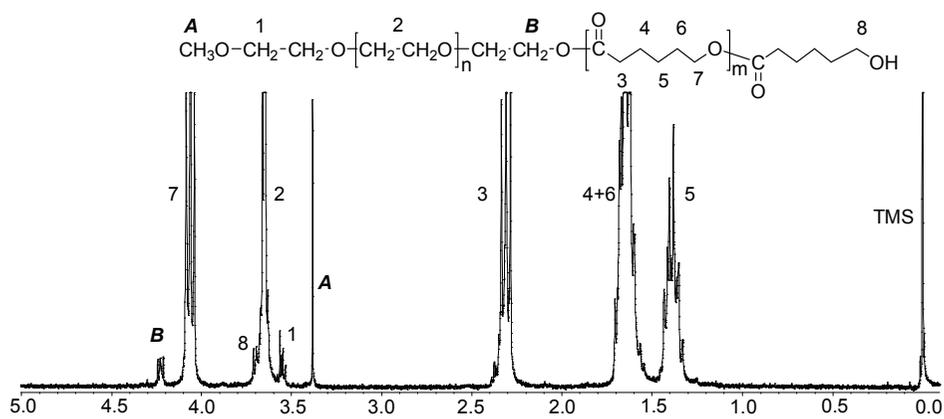
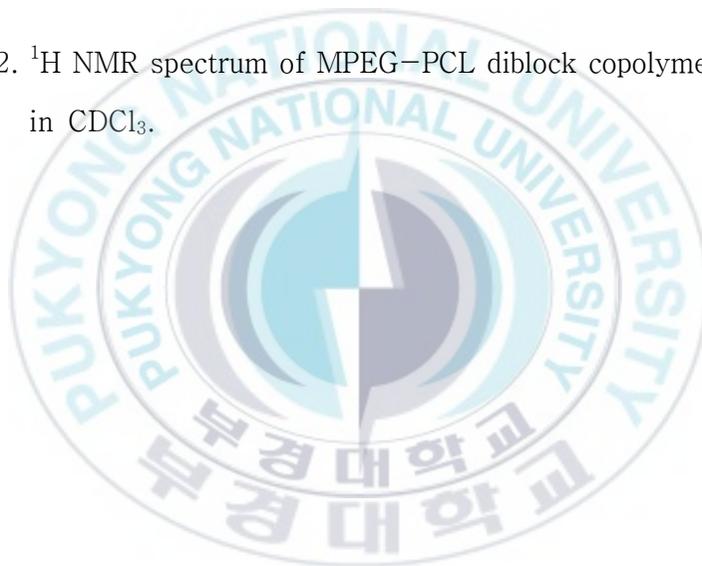


Figure 3-2.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of MPEG-PCL diblock copolymer (HG-24) in  $\text{CDCl}_3$ .



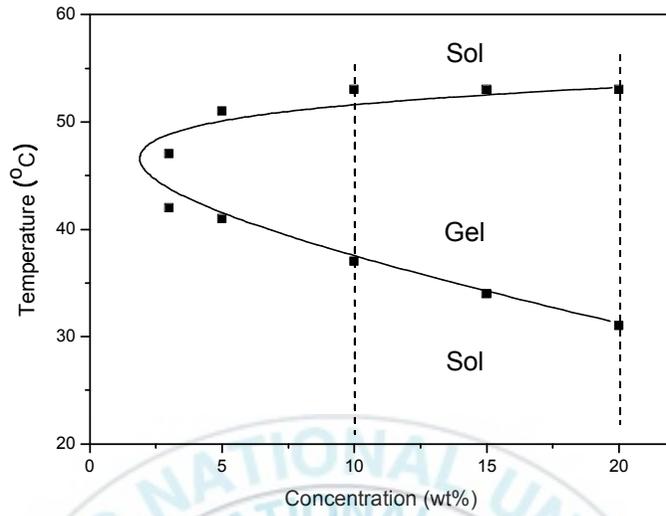


Figure 3-3. Sol-gel-sol transition curve of MPEG-PCL diblock copolymer (HG-24) in aqueous solution.

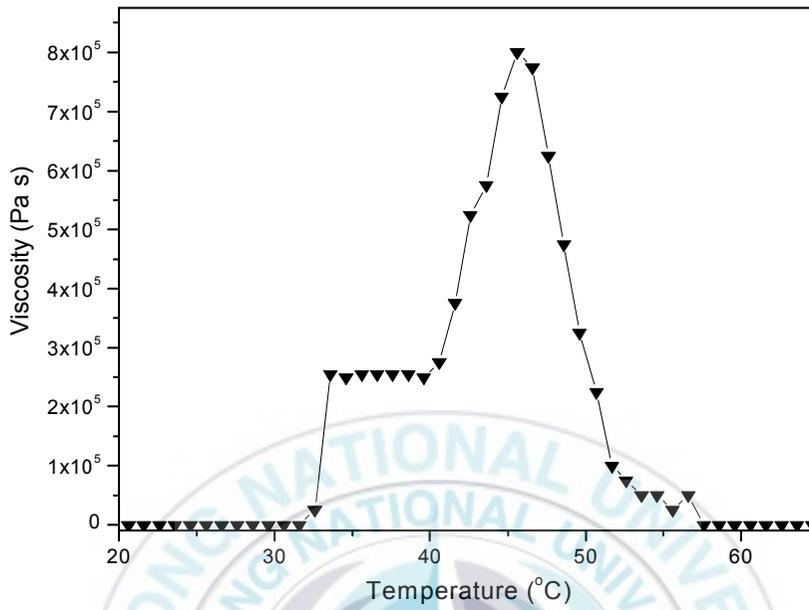


Figure 3-4. Viscosity versus temperature curve for MPEG-PCL diblock copolymer (HG-24) solution at 20 wt%.

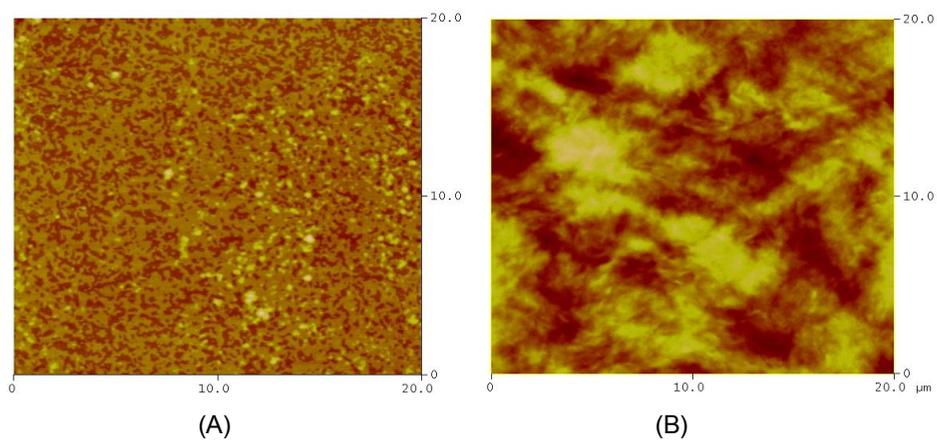
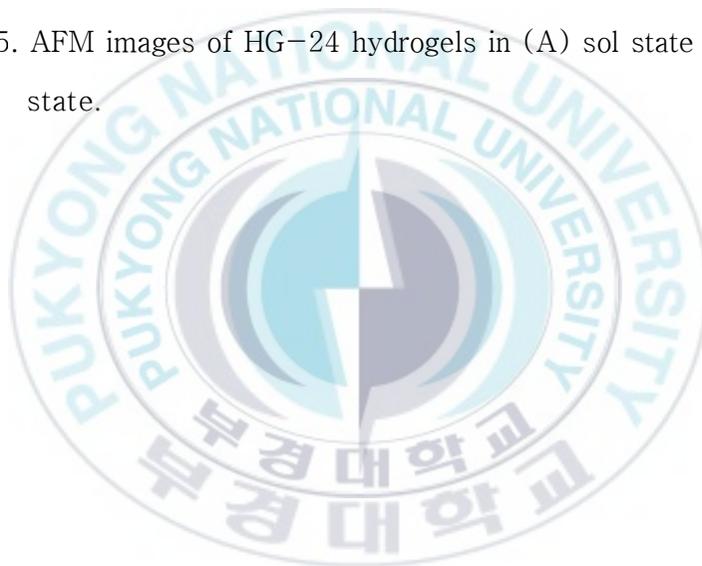


Figure 3-5. AFM images of HG-24 hydrogels in (A) sol state and (B) gel state.



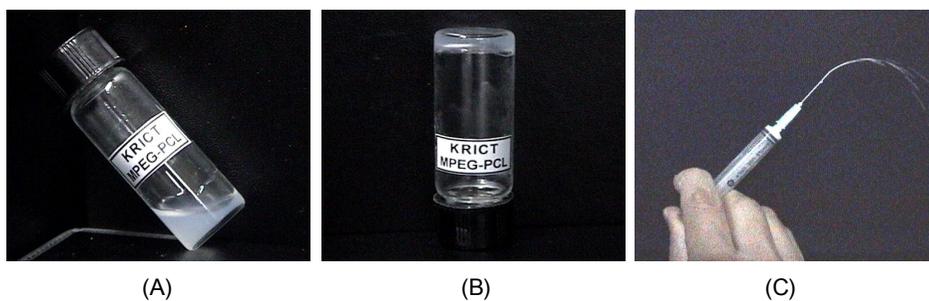


Figure 3-6. Image of (A) sol at room temperature (B) gel at body temperature, and (C) hydrogel solution at room temperature.



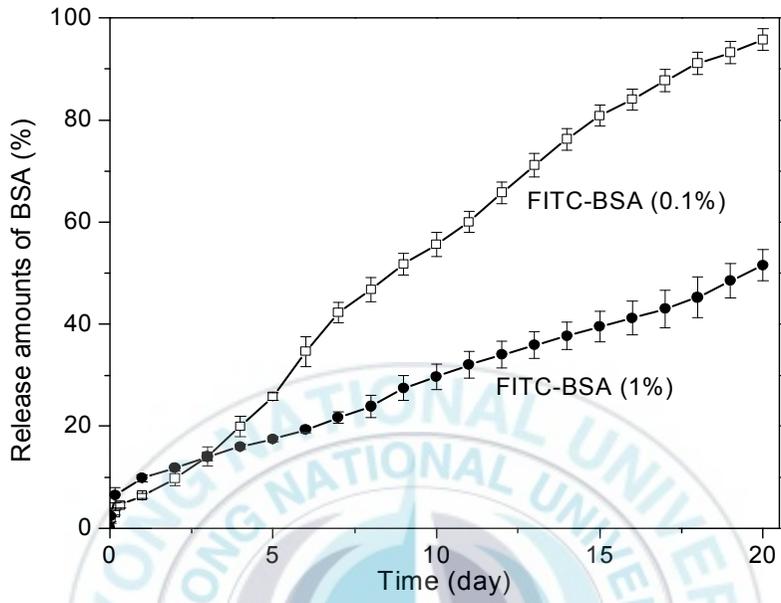


Figure 3-7. Release behavior of FITC-BSA in the HG-24 20 wt% gel at 37 °C for 20 days.

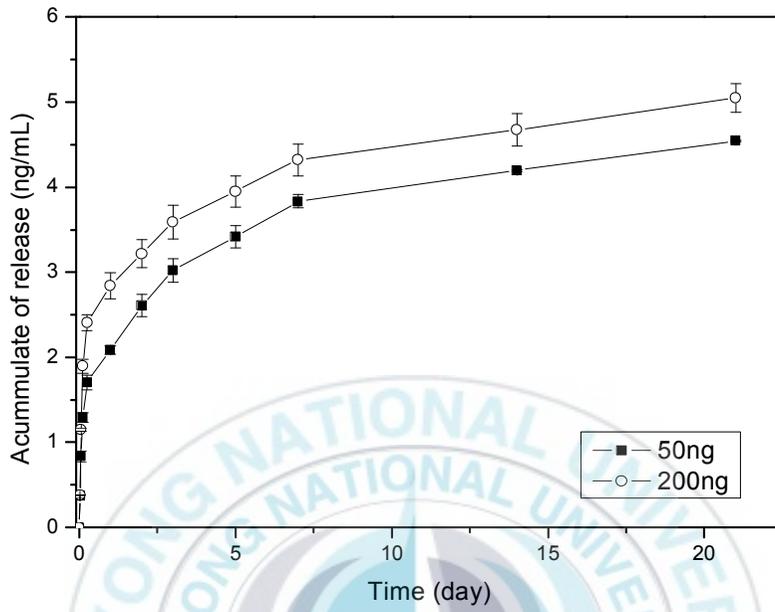


Figure 3-8. Release behavior of BDNF in the HG-24 20 wt% gel at 37 °C for 20 days.

# 제 4 장 저분자 화합물을 이용한 골수유래줄기세포의 신경분화 유도

## 4.1 이론적 배경

줄기세포는 체내의 어느 위치에서도 특정 조직 또는 세포로 정확히 대체할 수 있는 독특한 특징을 가지고 있으며 특정 세포형태의 전구세포로 분화될 수 있는데, 이는 줄기세포가 재생의학의 매우 훌륭한 세포 재원이 될 수 있으며, 손상된 장기의 치료나 복원에 있어서 많은 가능성을 제시하고 있다.<sup>1-7</sup> 줄기세포는 크게 배아 초기 또는 태아 생식세포로부터의 배아줄기세포 (embryonic stem cell)와 성체의 골수나 지방, 및 근육 등에서 분리되는 미성숙세포인 성체줄기세포 (adult stem cell)로 나뉘는데, 이들은 모두 세포치료나 유전자치료에 있어서 크나큰 잠재력을 가지고 있다. 그러나 배아줄기세포의 경우 윤리적인 문제를 배제할 수 없기 때문에 성체줄기세포 연구에 더욱 박차를 가하고 있으며 골수에서 유래된 성체줄기세포를 이용하여 신경질환 치료를 위한 신경 세포화에 많은 연구가 수행되고 있다.

여러 가지 신경질환-알츠하이머병, 헌팅톤씨병-등의 치료를 위해 세포를 이식하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 예를 들면, 신경영양인자나 신경전달물질 등을 분비하는 세포를 이식한다거나, 도파민을 분비하도록 조작된 세포를 이식하는 방법이다. 이러한 일련의 세포 치료 방법은 좋은 결과를 가지고 있다. 그러나 이러한 세포들을 얻을 수 있는 방법은 쉽지 않고 세포 획득 시 신경조직을 손상시키기 때문에 이를 대체할 수

있는 새로운 세포의 재원이 필요한 실정이다.<sup>8,9</sup>

골수유래 간엽줄기세포 (bone marrow stromal cell)는 줄기세포 군의 복합적인 특징을 나타낸다. 즉, 이들은 *in vitro*에서 우수한 확장성을 가지며 복합적인 증배엽성 형태로 분화할 수 있다. 이러한 줄기세포는 다양한 생리활성 물질에 의해 연골세포, 뼈세포, 지방세포, 또는 근육세포 등의 증배엽성 세포로 분화를 유도하였다.<sup>10-14</sup> 그러나 많은 경우에서 증배엽성이 아닌 것으로의 분화는 증명되어지지 못했으나 Woodbury 등은 골수유래 간엽줄기세포를 이용하여 증배엽성이 아닌 신경세포로의 분화를 시도하였으며, 이를 신경세포에 특이적으로 반응하는 항체인 뉴로필라멘트 등을 이용한 면역염색법을 통해 증명하였다.<sup>15</sup> 또한, Azizi 등은 쥐의 뇌를 일정 부위 손상시킨 후에, 골수에서 분리되어 분화되지 않은 간엽줄기세포를 뇌에 삽입하고 일정기간 후에 이 세포를 추적하였다.<sup>16</sup> 세포를 추적한 결과 미분화된 간엽줄기세포가 손상 부위에서 신경세포와 신경교세포 등으로 분화되어 있는 것을 확인하였다. 결과적으로 골수유래 간엽줄기세포의 신경세포로의 분화는 신경질환의 치료에 있어서 매우 획기적인 결과로서 이는 비교적 손쉽게 분리하여 대량으로 배양할 수 있는 세포를 이용함으로써 다양한 신경질환의 새로운 치료방법을 제시하고 있다.<sup>17</sup>

본 연구에서는 쥐에서 분리된 골수유래 간엽줄기세포를 신경세포로 분화시키기 위하여 조절인자로서 저분자화합물을 이용하였으며, 이를 neuron-specific enolase (NSE),  $\beta$ -tubulin III(Tuj1), CNPase 등의 면역학적 염색법과 RT-PCR을 통한 NSE의 유전자 발현을 증명하여 중간엽성 세포의 신경세포화로의 분화 가능성을 제시하고자 하였다.

## 4.2 재료 및 방법

#### 4.2-1. 골수유래 줄기세포의 분리 및 배양

Fischer 쥐의 골수유래 간엽줄기세포는 골수에서 채취하였으며 배양액으로 2배 희석하였다. 이 골수는 50% 퍼콜 (Percoll, Sigma, Chem. Co., USA) 점진구배용액에 천천히 낙하시켜 퍼콜 층과 섞이지 않도록 하였다. 이를 원심분리기로 500 g에서 25분간 원심 분리하여 적혈구 층, 퍼콜 층, 세포층과 혈장 층으로 구분하였으며 마이크로 피펫을 이용하여 세포층만을 분리하여 배양액으로 다시 희석하여 1000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상등 액을 제거하고 세포를  $10^3 \sim 10^4$  세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 배양 플라스크에 배양하였다. 세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco BRL, USA)에 20% 우태혈청 (FBS; Gibco BRL)과 항생제 (10 U/mL 페니실린 G 소디움과 10 $\mu$ g/mL 암프테리신 B; Gibco BRL)을 사용하였다. 배양된 세포는 3일에 한번 씩 배양액을 교체하였으며 9일에 한번 씩 계대 배양하였다. 분리된 세포의 중간엽 줄기세포의 표면 항원 분석 및 특성을 확인하기 위하여 CD44와 CD45 항체를 이용하여 유세포 분류기(Beckman-Coulter, USA)를 통하여 확인하였다.

#### 4.2-2. 저분자 화합물의 준비

줄기세포의 신경 세포화 유도에 사용된 저분자 화합물은 한국화학연구원으로부터 제공받은 KR63240과 KR63244를 사용하였으며(Figure 4-1), 양성 대조군으로 신경 세포화를 유도하는 물질로 잘 알려진 레티놀산(RA, retinoic acid)을 이용하였다. 저분자 화합물은 실험을 통해 신경 세포화 유도의 최적의 농도인 10  $\mu$ M로 사용하였으며, 레티놀 산은 2  $\mu$ M의 농도로 사용하였다.

#### 4.2-3. 저분자 화합물의 세포독성 평가

사용된 저분자화합물의 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 24 well에  $3 \times 10^4$  /well의 rBMSC를 분주하고 하루 동안 세포를 부착시킨 후 b-FGF 10 ng/ml을 함유한 배양액으로 교체하고 overnight 하였다. 그런 후 각각의 화합물을 처리하고 1일, 4일에 MTT 시약을 처리하여 4시간 인큐베이션 후 배양액을 제거하고 DMSO로 생성된 포마전을 녹여 ELISA (590 nm)로 O.D값을 측정하였다.

#### 4.2-4. 신경세포로의 분화

배양중인 골수유래 간엽줄기세포는 5대 계대 배양하여 사용하였으며 신경세포로 분화를 유도하기 위한 전처리로 DMEM에 20% 우태혈청과 10 ng/ml의 염기성-섬유아세포 성장인자 (b-FGF, basic fibroblast growth factor, Sigma Chem. Co.)를 첨가하여 이 배양액으로 24시간 배양하였다. 신경세포로 유도하기 위해 우태혈청을 첨가하지 않은 DMEM에 10  $\mu$ M의 KR63240, KR63244를 첨가한 배양액으로 교체하여 5시간, 1일 및 4일 동안 처리하였다. 음성대조군으로는 10% 우태혈청을 포함한 DMEM 배양액을 처리하였으며 양성대조군으로는 혈청을 포함하지 않은 DMEM에 2  $\mu$ M의 레티놀 산을 포함한 배양액을 처리하였다. 신경세포로 분화된 세포의 모폴로지를 관찰하기 위하여 역상 현미경을 사용하여 관찰하였다.

#### 4.2-5 신경세포 특이적 유전자 발현 확인

골수유래 간엽줄기세포의 신경 세포화를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 신경 특이적 유전자인 neuron-specific enolase (NSE)의 발현을 확인하였다. RNA의 분리 RNeasy Mini Kit (QIAGEN Korea,Ltd.)를 사용하였으며 아가로스 겔 전기 영동법을 이용하여 유전자

의 발현 밴드를 확인한 후 lab work 프로그램을 사용하여 intensity를 측정하였다.

#### 4.2-6. 면역세포화학적 염색

면역세포화학적 염색법이란 특정 세포에만 존재하는 특이적인 단백질을 항원-항체 반응에 의하여 염색함으로써 특정 세포를 증명하는 방법이다. 본 연구에서는 골수유래줄기세포가 신경세포로 분화되었는지를 확인하기 위하여 신경세포에서 특이적으로 발현하는 단백질인 CNPase (Sigma, 1:100)와 neuron-specific enolase (NSE; Serotec, UK, 1:20) 단백질을 면역화학적 염색법으로 관찰하였다. 골수유래줄기세포가 신경세포로 분화되어 접착되어 있는 슬라이드를 4 % 파라포름알데하이드로 20 분간 고정시킨 후, 세포 내의 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소를 5 분간 처리하였다. 그 후 1 차 항체를 4 °C에서 16 시간 동안 처리하였으며, 2 차 항체 rat anti-mouse Alexa Fluor®594 (Invitrogen, 1:1000)를 상온에서 3시간 처리하였다. 마지막으로 DAPI (Sigma)를 30분 처리 한 후 형광현미경(Olympus IX81, Olympus, Japan)을 통하여 발현을 관찰하였다.

### 4.3 결과 및 고찰

#### 4.3-1. 골수유래줄기세포의 분리

분리된 줄기세포가 골수에서 유래된 중간엽 줄기세포임을 확인하기 위하여 유세포 분리기를 통하여 CD44와 CD 45의 발현을 관찰하였다. Figure 4-2에서 보는 것과 같이 중간엽 줄기세포의 마커인 CD44의 발현을 확인하였고, 조혈모세포의 마커인 CD45의 미발현으로 분리된 세포는

중간엽 줄기세포임을 확인하였다.

#### 4.3-2. 저분자 화합물의 세포독성 평가

저분자화합물의 신경 세포화 유도에 사용 될 유도액의 최적의 농도 탐색을 위하여 화합물의 농도별 독성 평가 및 선정된 농도의 세포독성 평가를 위하여 MTT assay를 실시하였다. 우선 Figure 4-3의 KR63240의 농도별 모폴로지 변화와 Figure 4-4의 KR63240의 농도별 MTT assay 결과를 토대로 10  $\mu$ M의 농도가 신경 세포화 유도의 최적의 농도임을 확인하였다. 선정된 농도의 세포독성 평가 결과 일반 배양액에 보다는 약간의 세포독성을 가지고 있지만 양성대조군인 RA과 비슷한 세포독성을 보이는 것을 확인하였다. (Figure 4-5) 이는 기존에 보고되어 온 신경 세포화 유도 배양액에 비해 현저히 낮은 세포독성으로 골수유래줄기세포의 신경 세포화 유도에 KR63240과 KR63244를 이용할 수 있을 것이라 사료된다.

#### 4.3-3. 신경세포로의 분화

Fischer 쥐로부터 분리한 골수유래 줄기세포를 신경세포로 유도하기 위하여 10  $\mu$ M의 KR63240과 KR63244의 저분자화합물을 포함한 배양 배양액에 의하여 신경분화를 유도한 결과 Figure 4-6에서 보이는 것과 같이 형태학적 변화에서 대조군의 납작한 형태와 달리 세포질이 핵을 중심으로 움츠러드는 모습을 관찰하였으며, 신경세포와 같이 세포의 핵으로부터 돌기가 가늘게 뻗어져 나옴을 관찰 하였다.

또한 신경세포 특이적인 유전자의 발현을 확인 하기위하여 RT-PCR을 통한 NSE의 발현을 확인하였다. 그 결과 Figure 4-7에서 보이는 것과 같이 양성대조군인 RA군과 비교하여 RK63240과 KR63244에서 NSE의 발현의 훨씬 많이 일어남을 관찰 하였으며 이것으로 보아 RA과

비교하여 처리해준 저분자화합물로 인해 신경세포화의 유도가 더 많이 일어남을 확인하였다.

신경분화를 유도하는 저분자화합물을 처리한 세포의 신경 세포화를 확인하기 위하여 골격근유래 줄기세포를 분화 1일 후에 고정시켜 신경 세포의 표현형인 NSE와 희돌기아교세포의 표현형인 CNPase에 대해 면역화학적 염색을 실시하였다. Figure 4-8에서 보이는 것과 같이 골수유래줄기세포에서는 NSE의 발현이 거의 일어나지 않는 반면, 신경세포화로의 분화를 유도한 세포의 상당수에서 NSE가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. CNPases의 발현 역시 대조군에서는 발현이 거의 일어나지 않지만 저분자화합물을 처리한 군에서 발현이 일어나는 것으로 보아 희돌기아교세포로 골수유래줄기세포가 분화되었다고 설명 할 수 있다. (Figure 4-9)

#### 4.4 결론

골수에서 분리한 간엽줄기세포는 이미 여러 연구에서 수행된 것과 같이 중배엽성 조직 (뼈, 연골, 지방조직 등)으로 분화되어 조직공학의 발전과 더불어 퇴행성 조직의 재생이나 손상부위가 넓은 부위 치료에 응용되어져 왔다. 조직공학에서 세포는 매우 중요한 역할을 하는데 이러한 세포가 일정 조직을 형성할 수 있도록 미세 환경을 제공해 주어야 한다. 연골조직의 결손을 막기 위해서는 먼저 일정 연골조직을 채취하여 대량 배양해야 한다. 이는 아주 작은 부위이지만 정상 조직을 손상해야 한다. 그러나 줄기세포의 가소성이 이를 해결해 주는 열쇠가 되었다. 또 성체에서 제공되는 세포이기 때문에 배아줄기세포를 이용하는 예와 달리 윤리적인 문제가 전혀 없다는 장점이 있다.<sup>1-7</sup>

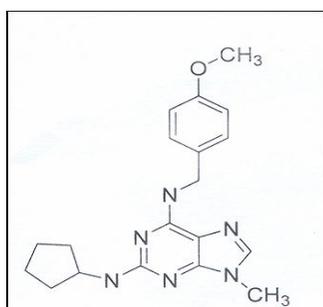
최근에 이러한 중배엽성 줄기세포가 외배엽성인 신경세포로 분화

되었다는 연구와 이 세포를 이용하여 신경질환을 치료하고자 하는 노력이 끊이지 않고 있다.<sup>17-19</sup> 본 연구에서도 쥐의 골수에서 간엽줄기세포를 분리하여 배양하였으며 이 세포는 세포 배양기에서 계대 배양하여 세포의 수를  $10^7$  이상 획득하였다. 본 연구에서는 저분자 화합물을 이용하여 골수유래 간엽줄기세포를 신경세포로의 분화를 유도하였다. 이러한 저분자 화합물을 처리하여 골수유래간엽줄기세포가 신경세포로 유도되어져 신경세포에 특이적 단백질인 NSE와 희돌기아교세포에 특이적인 CNPases가 모두 발현하는 것을 확인하였고 또한 이는 전형적인 신경세포의 형태를 가짐을 확인하였다. 현재 줄기세포의 분화를 유도하는 다양한 화합물을 스크리닝 중에 있으며 신경, 골, 연골로의 분화 연구가 진행 중이다.

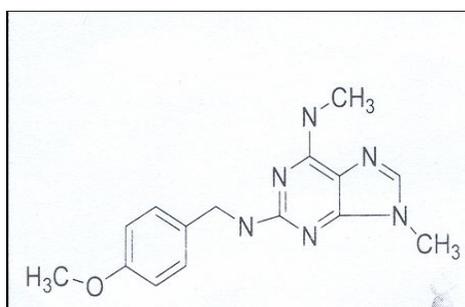
#### 4.5 참고문헌

- [1] G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, et al., *Polymer Sci. Tech*, **13**, 4 (2002).
- [2] H. B. Lee, G. Khang, and S. J. Lee, 2nd Eds., edited by J. J. Yoo and I. Lee, pp 751 (2002).
- [3] A. Caplan, S. P Bruder, *Trends Molec. Med.*, **7**, 259 (2001).
- [4] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, et al., *Stem Cell*, **19**, 180 (2001).
- [5] K. S. Park, E. J. Kim, C. W. Han, et al., *Biomater. Res.*, **7**, 120 (2003).
- [6] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, et al., *Science*, **284**, 143 (1999).
- [7] A. Hani, M. Quinn, A. Holly, et al., *Biomaterials*, **25**, 3211 (2004).

- [8] J. J. Yoo and I. Lee, Korea Med. Pub. (1998).
- [9] I. Lee, G. Khang, H. B. Lee, Polymer Sci. Tech., **10**, 782 (1999).
- [10] J. W. Vonda, P. Hairong, U. Arvydas, et al., Molecular Therapy, **6**, 169 (2002).
- [11] P. Hairong, H. Johnny, Current opinion in pharmacology, **3**, 329 (2003).
- [12] S. Tetsuro, L. Yiqun, R. Thomas, et al., TCM, **12**, 115 (2002).
- [13] M. Bridget, J. Ron, H. Johnny, Blood Cells, Molecules, and Diseases, **27**, 924 (2001).
- [14] A. Thomas, M. Helen, J. Cell Biology, **125**, 1275 (1994).
- [15] D. Woodbury, J. Emily, J. Darwin, et al., J. Neurosci. Res., **61**, 364 (2000).
- [16] L. U. Shing-hwa, W. Tracy, C. Christopher, et al., Urology, **61**, 1285 (2003).
- [17] J. S. Choi, S. J. Lee, G. Khang, et al., Biomater. Res., **6**, 129 (2002).
- [18] J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Experimental Neurology, **164**, 247 (2000).
- [19] D. Weiwen, O. Maria, F. Itzhak, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., **282**, 148 (2001).



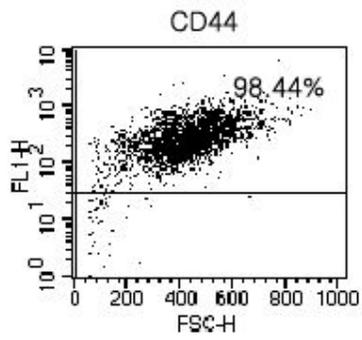
(a)



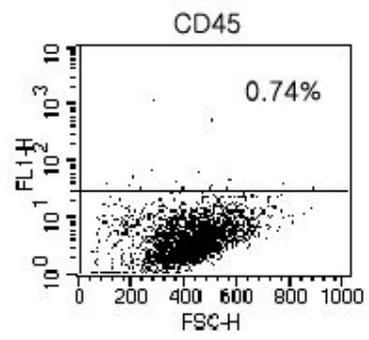
(b)

Figure 4-1. Small molecules for neurogenesis (a) KR63240 (b) KR63244



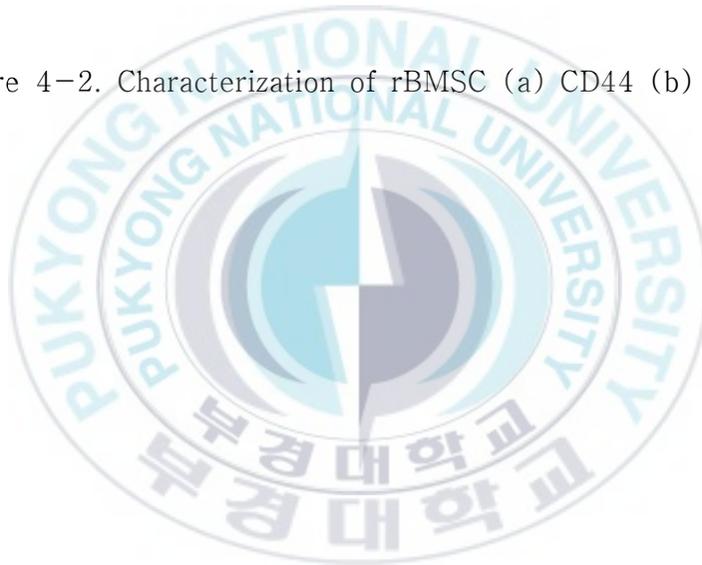


(a)



(b)

Figure 4-2. Characterization of rBMSC (a) CD44 (b) CD45



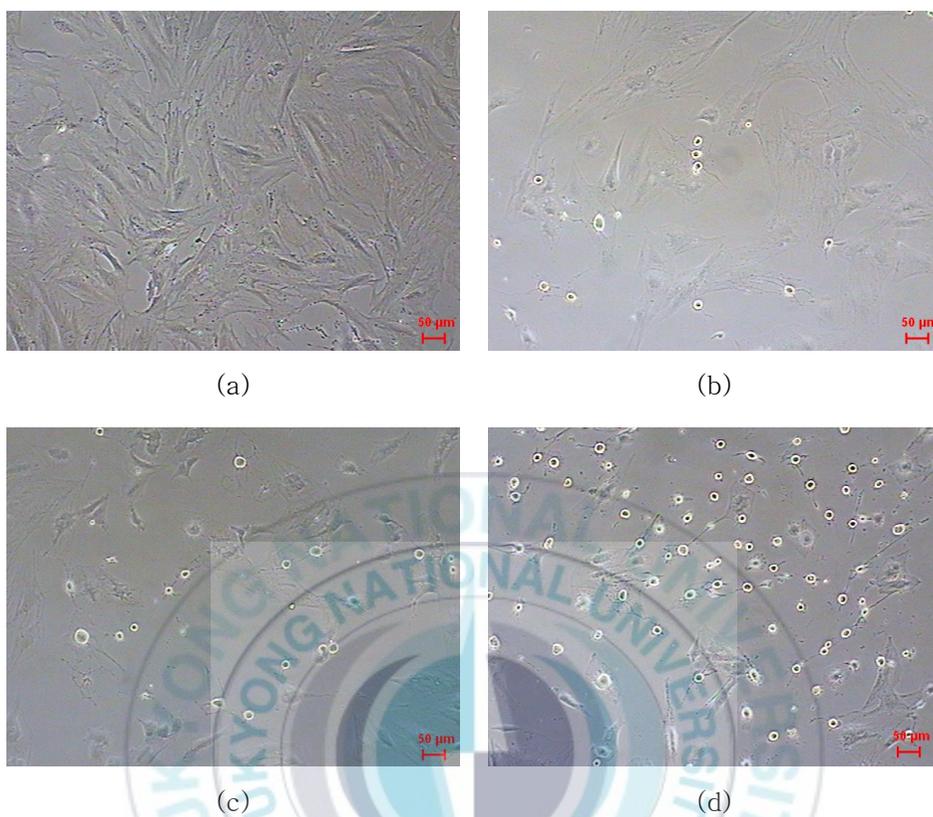


Figure 4-3. Morphological change of rBMSC by concentration (a) control (b) 1  $\mu\text{M}$  (c) 10  $\mu\text{M}$  (d) 100  $\mu\text{M}$  KR63240 (magnification is X100)

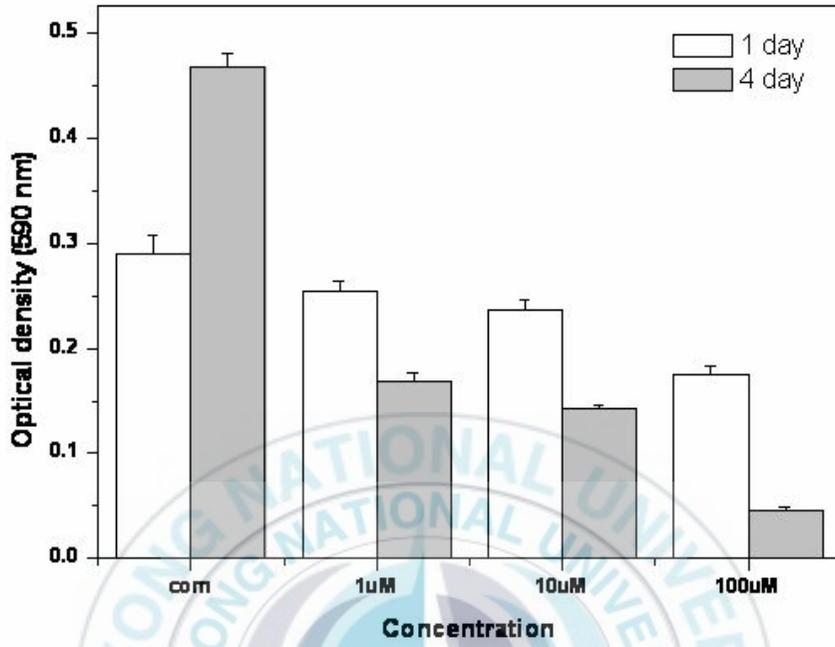


Figure 4-4. rBMSC viability of KR63240 measured by MTT assay

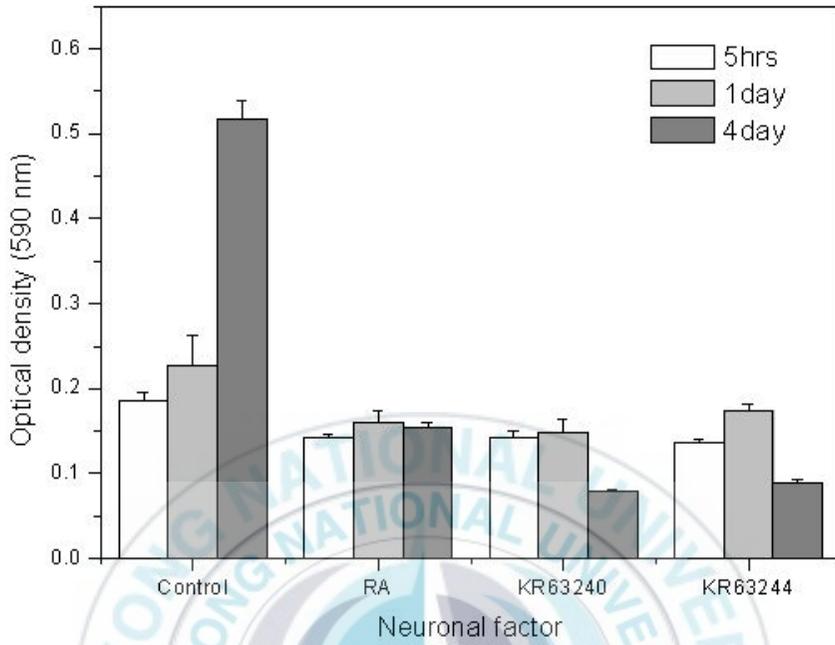


Figure 4-5. rBMSC viability for neuronal induction factor measured by MTT assay

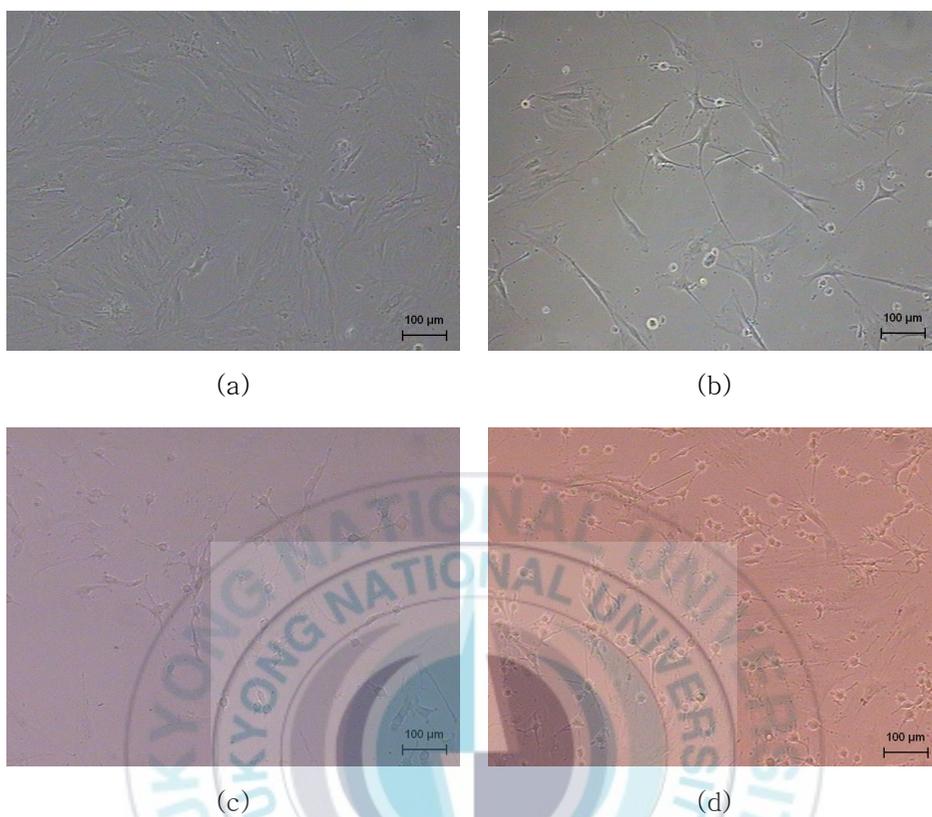


Figure 4-6. Inverted microscope pictures of neuronal differentiation of rBMSC (a) control (b) RA (c) KR63240 (d) KR63244 (Magnification is X100)

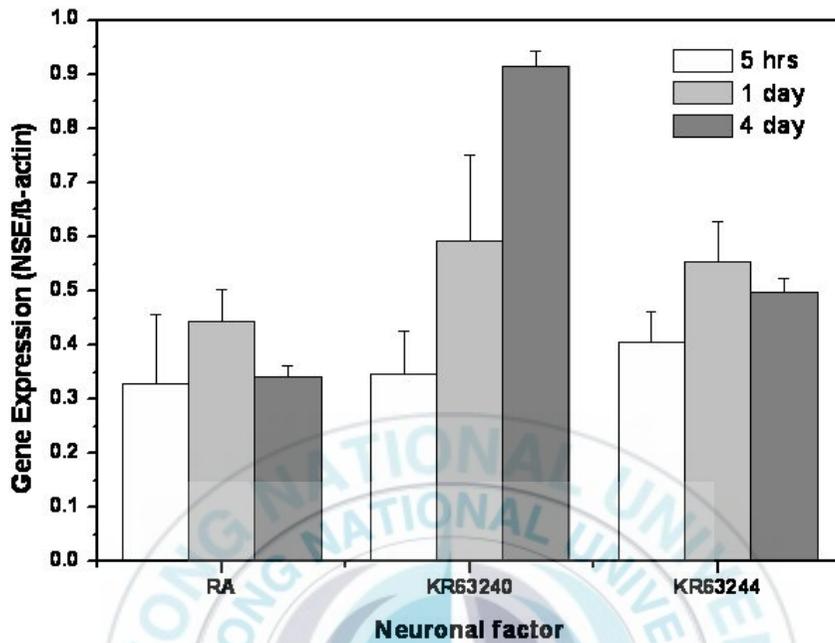


Figure 4-7. Expression of NSE mRNA as a standard of  $\beta$ -actin by RT-PCR method at 1 and 4 days

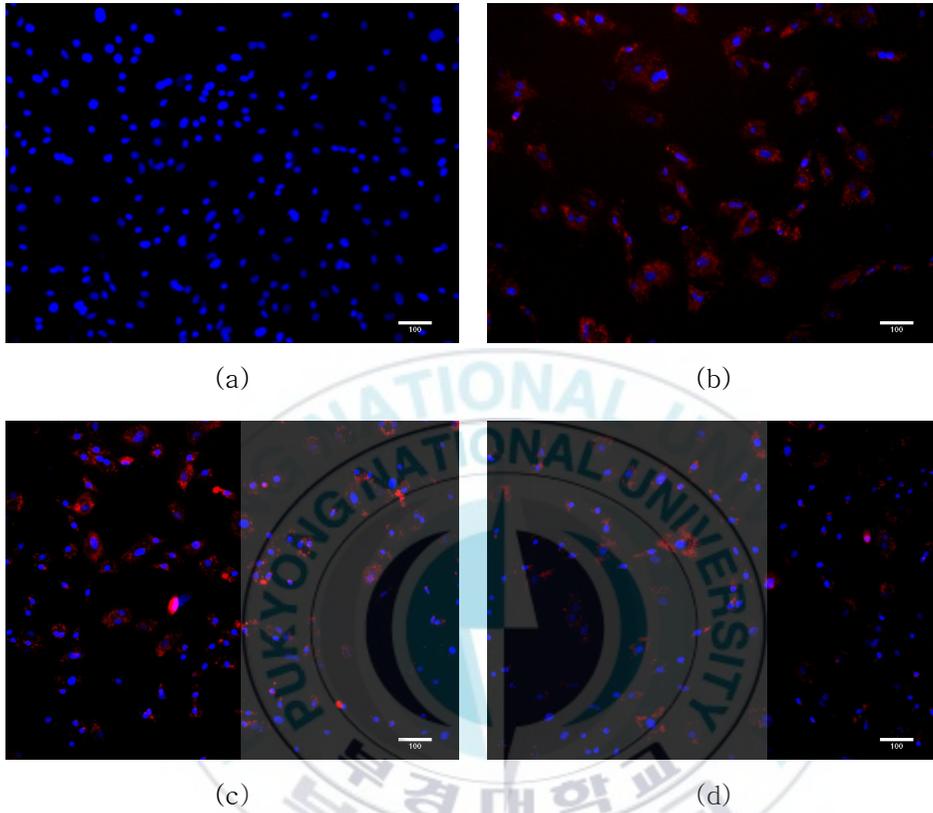


Figure 4-8. NSE staining of differentiated rBMSC (a) control (b) RA (c) KR63240 (d) KR63244 (magnification is X100)

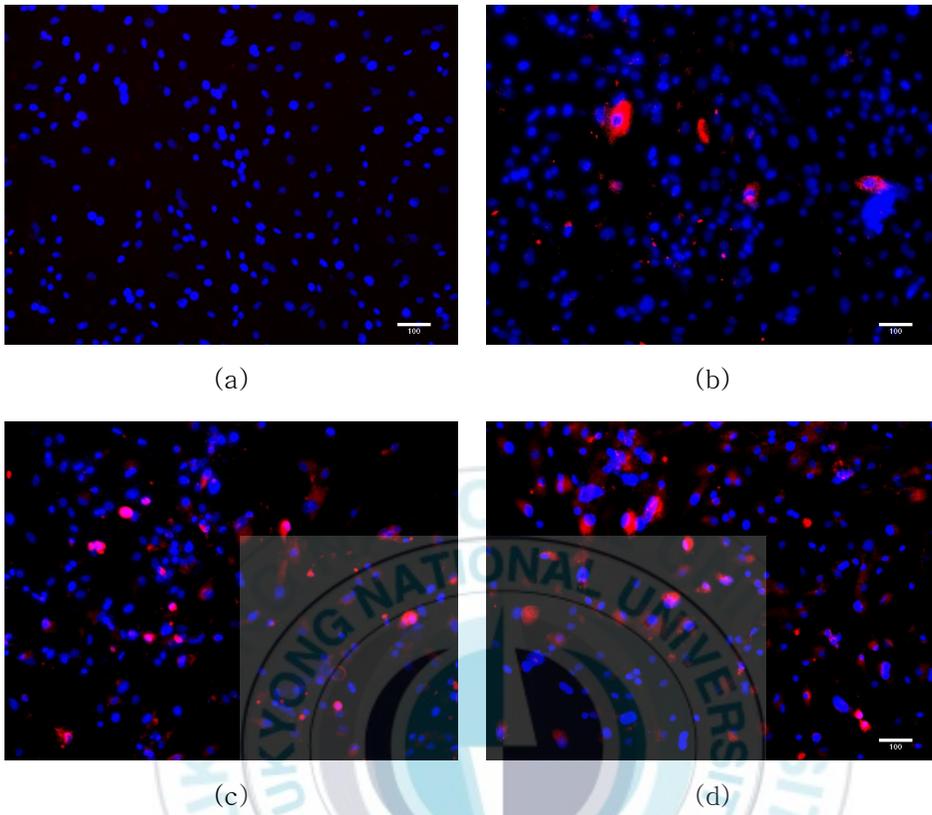


Figure 4-9. CNPase stainin of differentiated rBMSC (a) control (b) RA (c) KR63240 (d) KR63244 (magnification is X100)

# 제 5 장 온도감응성 키토산 겔을 이용한 골수유래 줄기세포의 전달 및 골 분화 유도

## 5.1 이론적 배경

현대 산업사회는 사고 및 재해에 의한 빈번한 골조직의 파괴 및 결손, 나이에 따라 골 밀도의 감소로 인한 골절, 그리고 선천적인 골 형성 부전증 같은 질환에 의한 성장부진 등과 같은 다양한 문제들에 대한 효과적인 재건방법으로 대두되고 있다.<sup>1-6</sup> 골 결손을 치료하기 위한 조직공학 적 방법으로 세포가 성장할 수 있는 담체와 골아세포로 분화할 수 있는 줄기세포 그리고 골조직 형성의 유도분화를 촉진하는 골유도 물질이 필요하다.<sup>7-14</sup>

현재 조직 재생용 지지체의 제조에 이용되고 있는 고분자 재료로는 콜라겐, 젤라틴, 알지네이트 및 키토산 등의 천연고분자 재료와 폴리 아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리  $\epsilon$ -카프로락톤, 폴리오르쏘에스테르, 폴리글리콜산, 폴리락트산 및 이들의 공중합체 등의 합성고분자 재료가 사용되고 있다. 최근 물리학적 자극에 의한 줄-겔 전이현상을 갖는 하이 드로겔은 약물 전달체와 조직공학 응용에 관한 산업분야에 광범위하게 적용되고 있으며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>15-23</sup> 특히 천연고 분자인 키토산은 구하기 쉽고 생체적합성을 가지며 면역거부반응이 적어 조직공학적 지지체로 많이 이용되고 있으며 , 최근 들어 글리세롤 포스페 이트(GP)와 키토산 고분자간의 전기적 결합으로 인한 가교로 온도감응성

을 가지는 하이드로겔의 제조에 대한 연구가 이루어지고 있다.<sup>24-27</sup>

탈회골(Demineralized Bone Matrix, DBM)은 골수복재 중 골유도 기능이 뛰어나다고 알려져 있으며, 전 세계적으로 정형외과 및 신경외과 분야에서 가장 많이 사용하고 있는 물질로써 고분자 복합체를 이용하여 손상된 뼈 구조를 대체하여 치료 할 수 있다.<sup>28</sup>

본 연구에서는 조직공학적 골 재생을 유도하기 위하여 GP로 가교된 온도감응성 키토산 겔을 제조하여 골수유래줄기세포(BMSC)의 전달체로서의 응용을 평가하였으며, 골 분화 유도물질인 DBM을 함유하여 골수유래줄기세포와 함께 체내로 전달하여 골 분화 정도를 조직학적 염색을 통하여 확인하였다.

## 5.2 재료 및 방법

### 5.2-1. 키토산 겔의 제조

키토산 용액의 제조를 위하여 0.1 M의 아세트 산 용액 18 ml에 400 mg의 키토산(medium viscosity, 75-80%)을 24 시간 동안 교반하여 용해 시켰다. 제조된 키토산 용액 4 ml을 취하여 1 ml의 인산염완충용액에 미리 녹여놓은  $\beta$ -GP와 4 °C에서 1시간 동안 가교하여 다양한 농도의 키토산 겔을 제조하였다.

### 5.2-2. 키토산 겔의 온도감응성 측정

제조된 키토산 겔의 온도에 따른 점도 변화를 측정하기 위하여 Brookfield 점도계(Brookfield Engineering Laboratories, INC. USA)를 이용하였다. 6 °C부터 60 °C까지 1분마다 2 °C의 증가로 0.2 rpm의 스피들로

측정하였다.

### 5.2-3. 키토산 겔의 세포적합성 측정

골수유래줄기세포의 키토산 겔 위에서의 생존력을 측정하기 위하여 WST kit(Roche, Germany)를 사용하여 WST-1 assay를 실시하였다. 24 well plate에 50  $\mu$ l의  $\beta$ -GP로 가교된 키토산 용액을 도포 후 37  $^{\circ}$ C에서 겔을 형성 시킨 후  $3 \times 10^4$  cell/well의 골수유래간엽줄기세포를 파종하였다. 1 ml의 배양액에 100  $\mu$ l의 WST-1 용액을 처리 한 후 4시간 인큐베이션 후 450 nm의 파장에서 optical density를 측정하였다. 또한 세포 부착력의 형태관찰을 위해 SEM을 사용하여 형태학적 변화를 관찰하였다.

### 5.2-4. 골수유래줄기세포의 추적

생체내로 이식된 골수유래줄기세포의 세포 추적을 위하여 BrdU 및 PKH67을 사용하였다. 세포핵으로의 표지를 위해 사용된 BrdU (5-bromo-2-deoxy uridine)는 일반 배양액에 5 mM로 희석하여 이식 이틀 전에 표지하여 주었다. 세포질의 표지를 위하여 PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma, USA)를 사용하였으며 형광 현미경을 통하여 추적된 세포를 관찰 하였다.

### 5.2-5. In vivo 실험을 통한 세포 전달 및 골 분화 확인

In vivo 실험을 통하여 체내에서 겔의 형성과 골수유래줄기세포의 전달 및 골 분화 유도를 확인하기 위하여 5주령의 Fischer 쥐를 사용하였다. 20 wt%의  $\beta$ -GP로 가교된 키토산 겔 0.5 ml에 미리 표지된 골수유래 줄기세포  $3 \times 10^5$  개를 파종하고 골 분화 유도를 위하여 DBM 2 %를 함유하여 준비하였다. 준비된 이식체는 1 ml 주사기를 통하여 쥐의 피하에

주사하였으며 이식 된 세포의 확인을 위하여 4주 후 조직을 적출 한 후 H&E 염색 및 BrdU 염색을 실시하였다. 골 분화 유도의 확인을 위한 방법으로는 Von kossa 염색법을 이용하였으며 적출된 조직의 SEM을 측정하여 형태학적 관찰을 하였다.

## 5.3 결과 및 고찰

### 5.3-1. 키토산 겔의 형성과 온도에 따른 특성 분석

Figure 5-1은 키토산과 GP의 가교를 통한 키토산 겔의 형성을 나타낸 모식도 이다. Figure 5-2는 GP의 다양한 농도에 따른 키토산 겔의 온도에 따른 점도를 나타낸 것이다. GP의 농도가 0wt%에서는 온도의 증가에 따른 점도의 변화를 볼 수 없지만, GP의 농도가 10~20wt%에서는 온도의 증가에 따른 점도의 변화를 확인할 수 있었다. 특히, 15wt% 및 20wt%에서는 체온과 유사한 온도 범위 내에서 점도가 나타나는 것을 알 수 있는데 이것은 GP의 농도가 이 범위내로 키토산 용액에 첨가 될 경우 생체 내에서 겔을 형성하는 것을 알 수 있다. GP의 농도에 따른 키토산 용액의 겔화 정도는 GP와 키토산 사슬사이의 정전기적 인력 및 소수성 상호 작용으로 인해 겔이 형성 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 Figure 5-3에서 보는 것과 같이 상온에서는 흐름성을 가지고 체내 온도에서는 겔을 형성하는 키토산 겔을 제조 할 수 있었다.

### 5.3-2. 키토산 겔의 세포적합성 측정

키토산 겔의 세포독성을 측정하기 위하여 얇게 도포된 키토산 겔 위에 골수유래간엽줄기세포를 분주한 후 WST-1 측정을 실시하였다. Figure 5-4에서 보는 것과 같이 대조군인 배양 플레이트에서 보다는 낮은

세포 생존률을 보이지만 시간이 지남에 따라 꾸준한 증식이 이루어짐을 확인하였다. 또한 Figure 5-5의 SEM 이미지를 통하여 겔 위에서 세포가 잘 부착하고 성장한다는 것을 확인 할 수 있었다.

### 5.3-3. In vivo 상에서의 키토산 겔의 SEM 측정

Figure 5-7은 in vivo상에서 형성된 키토산 겔의 모폴로지를 SEM 이미지를 통하여 관찰한 것이다. 이식 4주 후 적출된 조직을 액체 질소 하에서 급랭시켜 SEM을 측정하였다. 다공을 가지며 형성된 겔 사이사이로 부착되어 있는 세포들을 확인함으로써 세포와 함께 생체내로 이식하였을 때 세포의 성장이 원활하게 이루어짐을 알 수 있었다.

### 5.3-4. 조직학적 평가

Figure 5-8의 H&E 염색을 통하여 겔의 형성 정도와 세포의 분포 양상을 관찰 할 수 있다. Figure 5-8 (a)의 키토산 겔 단독 이식의 경우 헤마토실린의 발현이 없는 것으로 보아 겔 내부에 세포가 존재하지 않음을 확인하였고, Figure 5-8 (b)에서 세포의 핵이 관찰됨으로써 이식체 내에 세포가 골고루 분포하여 있음을 확인 하였다. 또한 이식부위에 형성된 조직에 존재하는 세포가 실제 이식한 세포의 생존을 나타내는지 확인하기 위하여 PKH67의 발현 (Figure 5-9 (a))과 미리 태깅된 BrdU (Figure 5-9 (b)) 및 세포핵 염색법인 DAPI (Figure 5-9 (c))의 발현을 관찰하였다. 그 결과 세포질에 염색된 노랑형광의 PKH67, 세포의 핵에 염색되는 BrdU의 빨강 형광 및 파랑 형광의 DAPI의 핵이 일치함을 확인하였으며 실제 이식한 세포가 이식체 내에 존재하고 있다고 판단하였다. (Figure 5-9 (d)) 또한 Figure 5-10에서 보이는 결과와 같이 골 형성 유도 인자인 DBM을 포함한 군에서 Von Kossa 염색의 칼슘침착 발현을 보이는 것으로 보아

DBM이 골수유래줄기세포의 골 분화를 유도하고, 또한 이식체로 키토산 겔의 응용이 적합하리라 사료되어진다.

## 5.4 결론

본 연구에서는 제조된 온도감응성 키토산 겔에 rBMSC를 파종시키고 DBM을 함유하여 골 조직 공학에 응용하고자 하였다. 아세트산에 용해된 키토산 용액에 GP를 가교시켜 상온에서는 흐름의 특성을 보이며 체내온도에서는 겔화를 이루는 온도감응성을 가지는 키토산 겔을 제조하였고 이의 특성을 점도 측정 및 형태학적 관찰을 통해 확인하였다. 이를 이용하여 GP로 가교된 키토산 겔에 rBMSC를 파종하고 골 형성 유도인자인 DBM을 함유하여 rBMSC의 전달 및 골 형성 여부를 조직학적 평가를 통해 알아보았다. H&E 염색 사진을 통해 세포를 함유한 키토산 겔이 조직 내에서 잘 이식 되어 있는 것을 확인 하였으며 세포 추적을 통하여 이식된 세포를 확인 할수 있었다. 또한 Von Kossa 염색을 통하여 rBMSC의 골분화 유도의 가능성도 확인하였다. 이는 BMSCs를 바로 분화하는데 작용하는 DBM의 영향 때문이라고 사료된다.

결론적으로 GP를 통해 가교된 온도감응성 키토산 겔을 통해 생체 내로 골수유래줄기세포를 전달 할 수 있으며 골 분화 유도인자의 전달을 통해 골 조직을 형성한다는 것을 확인하였다. 현재 다양한 골 분화 유도인자의 전달 및 근육 유래 줄기세포를 이용한 골분화의 유도 연구가 진행 중에 있다.

## 5.5 참고문헌

- [1] G. Khang, H. B. Lee, A. Atala and R. Lanza Eds., Academic Press, 771 (2001).
- [2] G. Khang, I. W. Lee, J. M. Rhee, H. B. Lee, Polymer Sci. Tech., **12**, 239 (2001).
- [3] G. Khang, S. J. Lee, C. W. Han, J. M. Rhee, H. B. Lee, In Advances in Experimental Medicine and Biology, 657, Edited by M. Elcin, Kluwer-Plenum Press, London, 235 (2003)
- [4] G. Khang, S. J. Lee, I. W. Lee, H. B. Lee, Polymer Sci. Tech., **13(1)**, 4 (2002)
- [5] G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. W. Lee, J. M Rhee, H. B. Lee, Tissue Eng. Regen. Med., **1(1)**, 9 (2004).
- [6] G. Khang, M. S. Kim, H. B. Lee, Chem World, **45(6)**, 24 (2005)
- [7] G. Khang, C. S. Park, J. M. Rhee, S. J. Lee, Y. M. Lee, I. W. Lee, M. K. Choi, H. B. Lee, Korea Polymer J., **9**, 267 (2001).
- [8] H. S. Kim, I. W. Lee, J. M. Lee, C. W. Han, J. H. Sung, M. Y. Park, G. Khang, H. B. Lee, J. Korea Soc. Endocrinology, **17**, 206 (2002).
- [9] G. Khang, P. K. Shin, I. Y. Kim, B. Lee, S. J. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, I. W. Lee, Macromol. Res., **10**, 158 (2002).
- [10] S. J. Lee, D. H. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, H. B. Lee, Macromol. Chem. Symp., **15(4)**, 201 (2002).
- [11] J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, I. W. Lee, H. B. Lee, G. Khang, Polymer(Korea), **27(3)**, 226 (2003).
- [12] S. J. Lee, I. W. Lee, Y. M. Lee, H. B. Lee, G. Khang, J. Biomater. Sci., Polym. Ed., **15(8)**, 1003 (2004).

- [13] J. W. Jang, B. Lee, C. W. Han, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28(5)**, 382 (2004).
- [14] J. W. Jang, K. S. Park, S. H. Kim, C. S. Park, M. S. Kim, C. W. Han, J. M. Rhee, G. Khang, H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2(1)**, 34 (2005).
- [15] K. S. Seo, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28(3)**, 211 (2004).
- [16] K. S. Seo, S. K. Chon, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28(3)**, 232 (2004).
- [17] M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **70A**, 154 (2004).
- [18] K. S. Seo, M. S. Kim, K. J. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28(4)**, 328 (2004).
- [19] K. S. Seo, C. S. Park, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, G. Khang, *Polymer(Korea)*, **28(4)**, 344 (2004).
- [20] M. S. Kim, K. S. Seo, S. Y. Jeong, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, *Polymer Preprints*, **45(1)**, 1054 (2004).
- [21] M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, *J. Polymer Sci., Part A, Chem. Ed.*, **42(22)**, 5784 (2004).
- [22] K. S. Seo, M. S. Kim, G. Khang, S. H. Cho, H. B. Lee, *Polymer Preprints*, **46(1)**, 820 (2005).
- [23] M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, H. B. Lee, *Macromol. Rapid Commun.*, **26**, 643 (2005).
- [24] Y. Liu, F. Chen, W. Liu, L. Cui, Q. Shang, W. Xia, J. Wang, Y. Cui, G. Yang, D. Liu, J. Wu, R. Xu, S. D. Buonocore, Y. Cao.

Tissue Eng., **8**, 709 (2002).

- [25] H. Yi, L. Q. Wu , W. E. Bentley, R. Ghodssi, G. W. Rubloff, J. N. Culver, G. F. Payne. Biomacromolecules, **6**, 2881 (2005).
- [26] L. Weng, X. Chen, W. Chen. Biomacromolecules, **8**, 1109 (2007).
- [27] M. D. Weir, H. H. Xu, C. G. Simon. Jr. J. Biomed. Mater. Res. A, **77**, 487 (2006).
- [28] K. S. Kim, M. H. Cho, H. H. Ahn, S. B. Song, S. J. Seo, M. S. Kim, B. Lee, G. Khang, H. B. Lee. Tissue Eng. Regen. Med., **4**, 168 (2007).



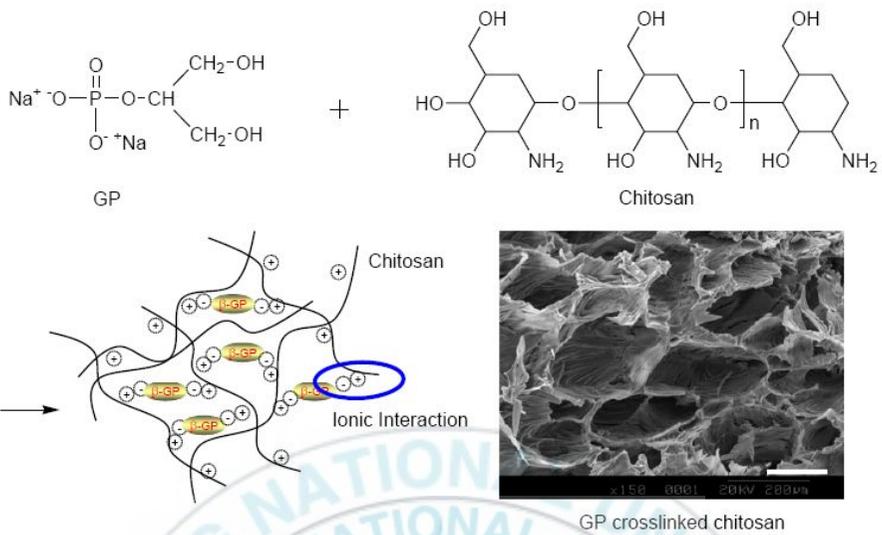


Figure 5-1. Schematic image of chitosan gel formation in the presence of GP

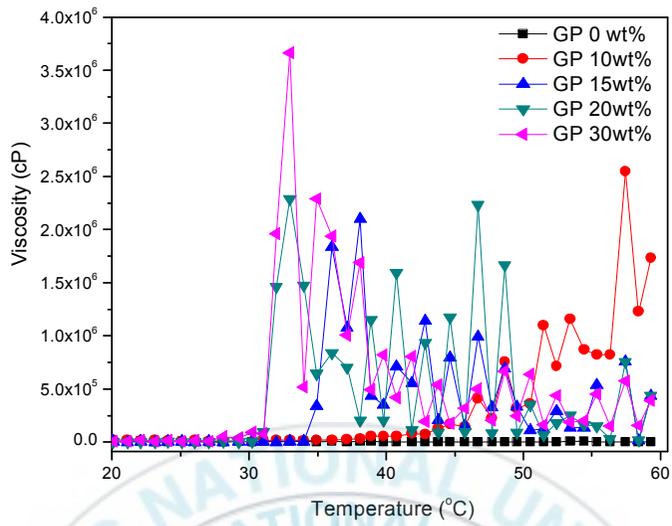


Figure 5-2. Viscosity versus temperature curves for chitosan solution containing different concentrations of GP (0-30 wt%)

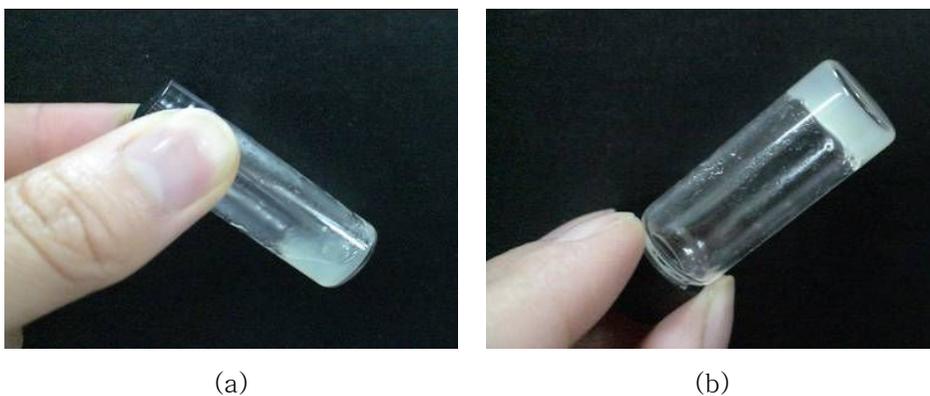
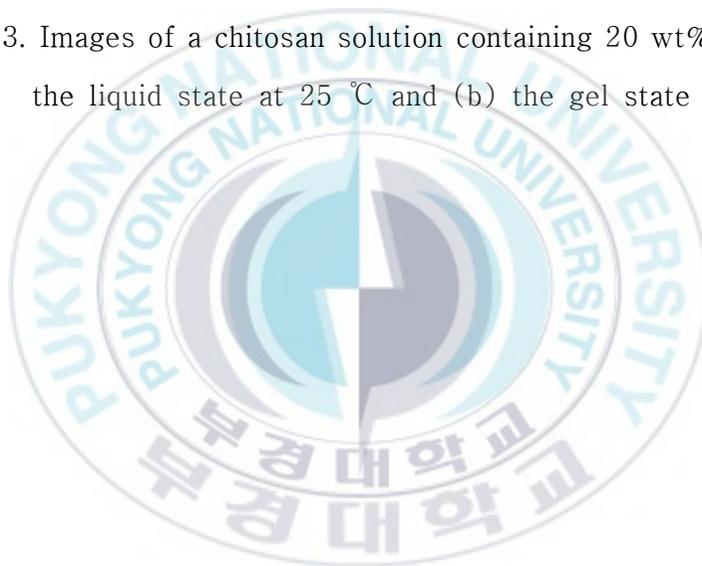


Figure 5-3. Images of a chitosan solution containing 20 wt% GP in (a) the liquid state at 25 °C and (b) the gel state at 37 °C



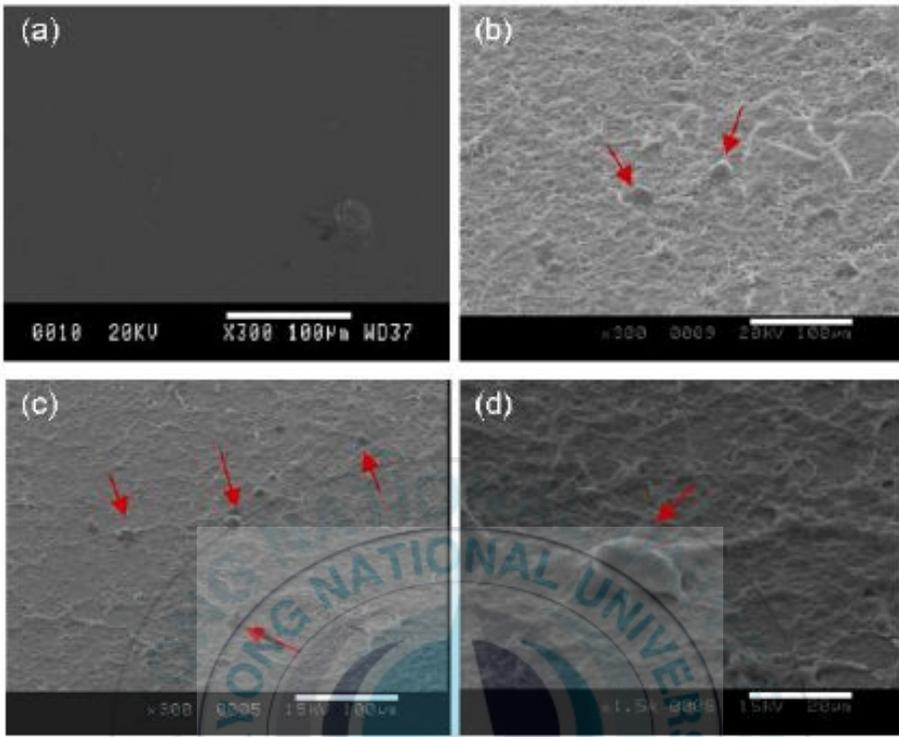


Figure 5-4. SEM micrographs showing the morphology of rBMSCs seeded on chitosan gel surfaces after (a) only gels (b) 1 day and (c, d) 7 days (Magnification is (a), (b) and (c) X 500, and (d) 1500)

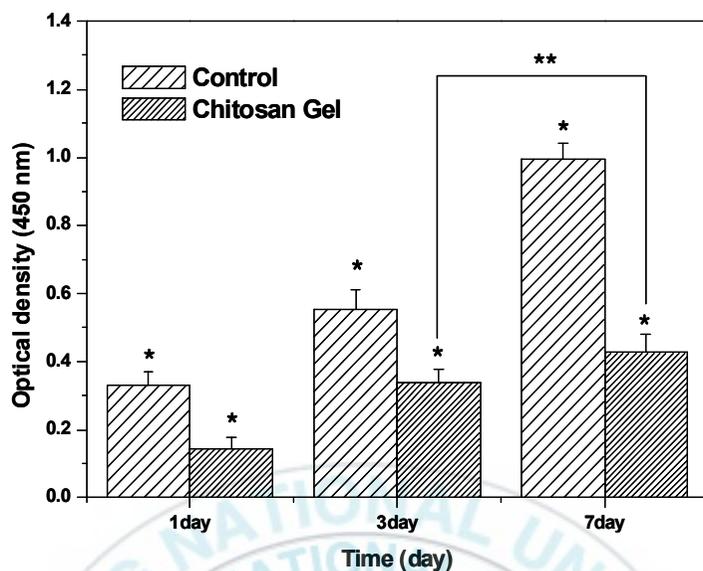
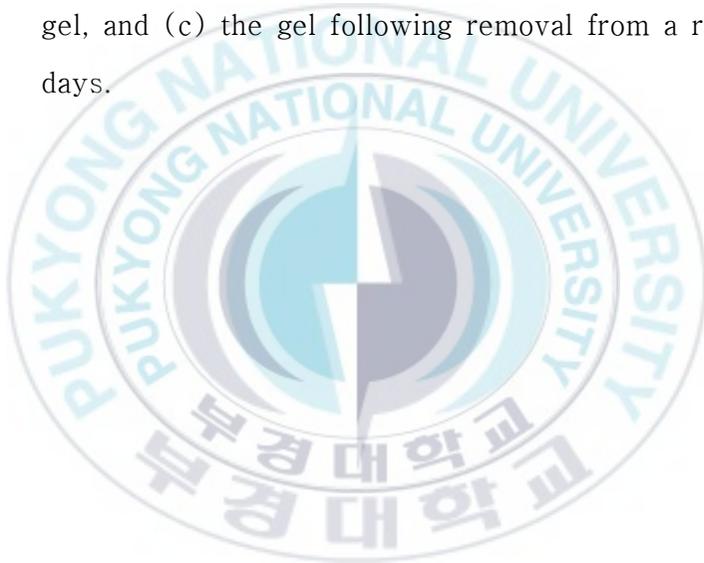


Figure 5-5. rBMSC viability measured by WST-1 assay. Cells grown on a plain culture plate were used as the control. Statistical analysis was performed using one way-ANOVA with Bonferroni's multiple comparison (\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ )



Figure 5-6. In situ chitosan gel formation, (a) subcutaneous injection of chitosan solution prepared at 20 wt% GP, (b) the formed gel, and (c) the gel following removal from a rat after 28 days.



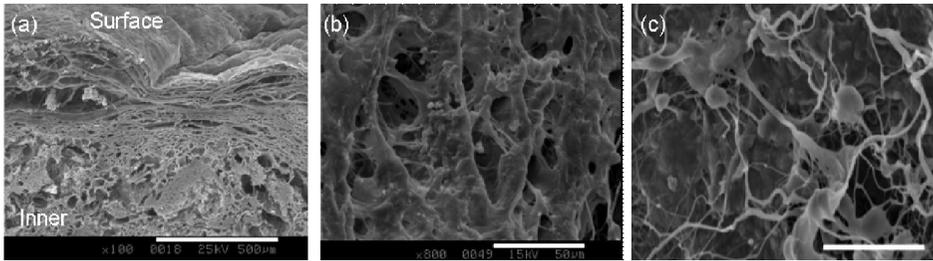
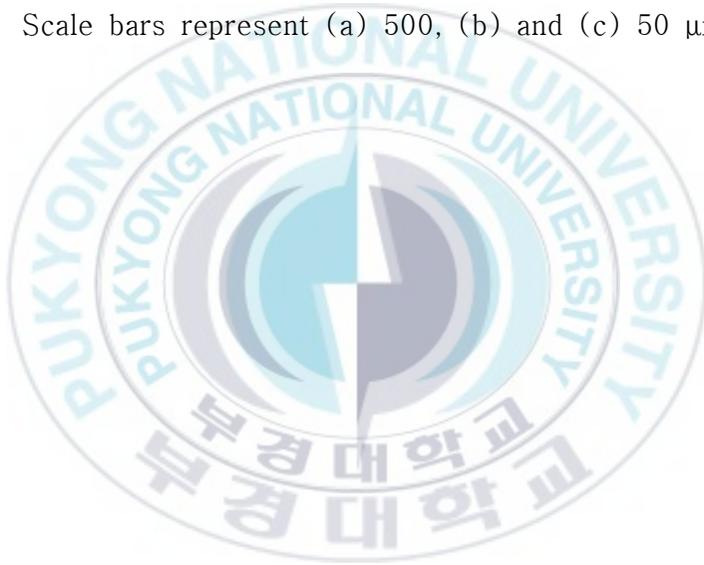


Figure 5-7. SEM micrographs of chitosan gel removed from a rat after 14 days. Magnification is (a) X100, (b) X800, and (c) X1000. Scale bars represent (a) 500, (b) and (c) 50  $\mu\text{m}$



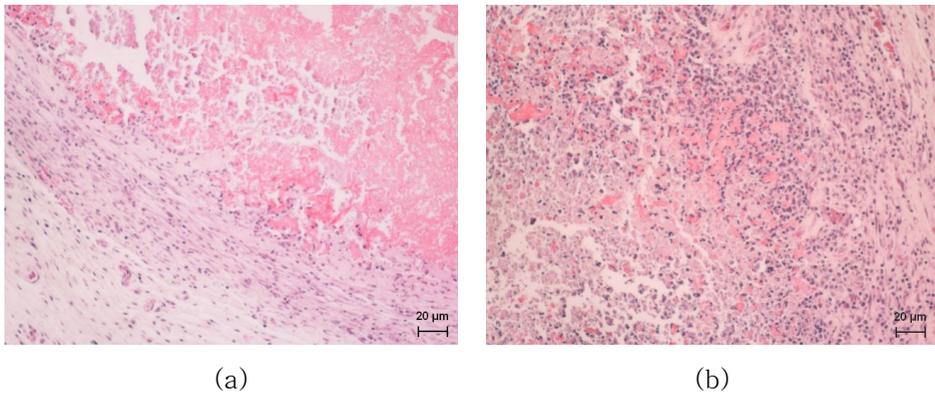


Figure 5–8. H&E staining image of chitosan gel. (a) only chitosan (b) chitosan with rBMSC (magnification is X200)



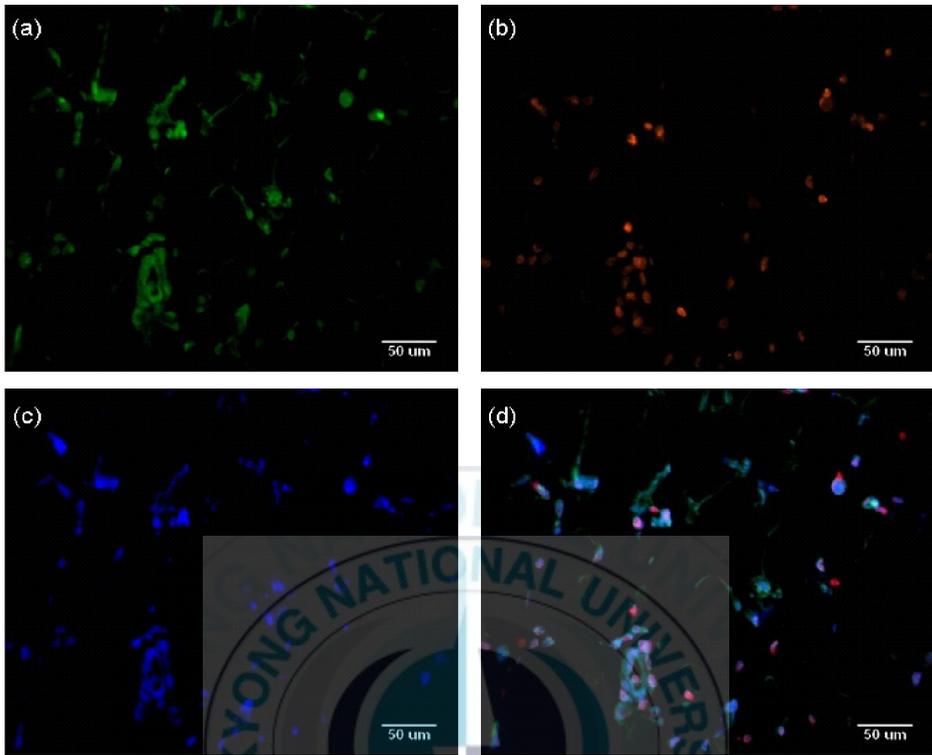


Figure 5-9. Triple immunofluorescent detection of rBMSCs seeded on chitosan gel at 28 days using fluorescent microscopy of cells labeled with (a) PKH-67 (green), (b) anti-BrdU (red), (c) DAPI (blue). The merged view is shown in (d). (Magnification is X100)

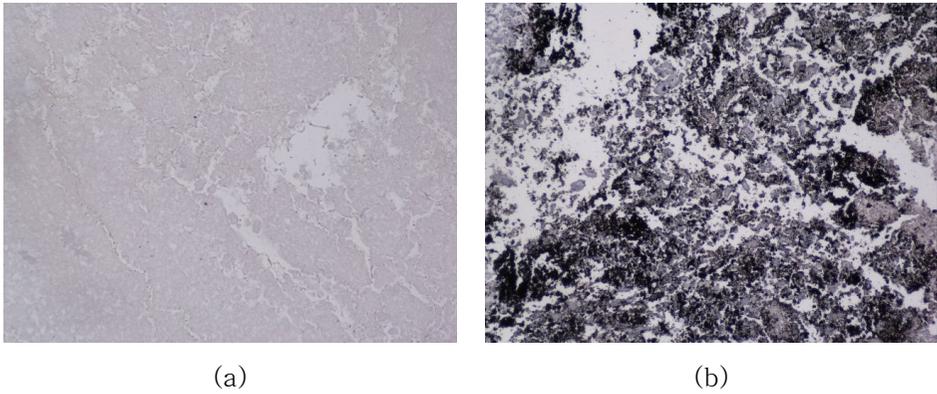


Figure 5-10. Von Kossa staining image of chitosan gels (a) only chitosan  
(b) chitosan with rBMSC and DBM (Magnification is X200)



## List of Publications

### Papers

1. Sun Kyung Kim, Soon Hee Kim, Mi Hee Cho, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Hae Bang Lee "Preparation and Characterization of BDNF-Loaded PLGA Scaffold" Tissue Eng. Regen. Med., 2, 338~391 (2005)
2. Sun Kyung Kim, Mi Hee Cho, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hae Bang Lee "Biological Evaluation of NIH/3T3 Fibroblast Cells with Different Wettability" Tissue Eng. Regen. Med., 2, 58~63 (2006)
3. Mi Hee Cho, Kim Sun Kyung, Hoon Hyun, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hae Bang Lee "Sustained Release of BDNF using Temperature Sensitive MPEG-PCL Hydrogels" Tissue Eng. Regen. Med., 2, 46~51 (2006)
4. Moon Suk Kim, Sun Kyung Kim, Young Ho Cho, Mi Hee Cho, Yu Na Shin, Gilson Khang, Il Woo Lee, Hai Bang Lee "Adhesion Behavior of Human Bone Marrow Stem Cells on Gradient Polymer Surface " Tissue Engineering, 13, 2095~2103 (2006)
5. Mi Hee Cho, Hoon Hyun, Yu Na Shin, Min Suk Lee, Hyun Hee Ahn, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Ghang, Hai Bang Lee " Release Profile of BSA or BDNF from Temperature Sensitive Hydrogels" Key Engineering Materials, 342, 473~476 (2007)
6. Yu Han Kim, Mi Hee Cho, In Bum Song, Hyun Hoon, Moon Suk Kim, Seog-Jin Seo, Ke-Won Kang, Gilson Ghang, Sung Yun Yang, Hai Bang Lee "Injectable Chitosan Carrier for Demineralized Bone

- Martix" Key Engineering Materials, 342, 177~180 (2007)
7. Yu Na Shin, **Mi Hee Cho**, Hyun Hee Ahn, Moon Suk Kim, Gilson Ghang, and Hai Bang Lee "Preparation and Release Profile of BDNF-loaded PLGA/SIS Scaffold" Key Engineering Materials, 342, 413~416 (2007)
  8. Hyun Hee Ahn, Min Suk Lee, **Mi Hee Cho**, Yu Na Shin, Jung Hwa Lee, Kyung Sook Kim, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Il Woo Lee, Scott L Diamond, Hai Bang Lee "DNA/PEI NANOPARTICLES FOR GENE DELIVERY OF ADULT STEM CELLS" Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering, in press.
  9. **Mi Hee Cho**, Kyung Sook Kim, Hyun Hee Ahn, Yu Na Shin, Moon Suk Kim, Soon Hee Kim, Gilson Khang, Bong Lee, Hai Bang Lee "Chitosan Gel as an In Situ-Forming Scaffold for Rat Bone Marrow Stem Cells In Vivo" Tissue Engineering, in revision.
  10. Kyung Sook Kim, **Mi Hee Cho**, Hyun Hee Ahn, Seok Beom Song, Seog-Jin Seo, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hai Bang Lee "Review : Recent Development Trend and Prospects of Demineralized Bone Matrix" Tissue Eng. Regen. Med., 4, 168-173 (2007)
  11. Moon Suk Kim, Hyun Hee Ahn, **Mi Hee Cho**, Yu Na Shin, Gilson Khang, Hai Bang Lee "An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa based scaffolds" Biomaterials, 28, 5137-5143 (2007)
  12. Hyun Hee Ahn, Kyung Sook Kim, **Mi Hee Cho**, Yu Na Shin, Jung

Hwa Lee, Gilson Khang, Moon Suk Kim, Hai Bang Lee "Porcine small intestinal submucosa sheets as a scaffold for human bone marrow stem cells" INT. J. OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 41, 590–596 (2007)

13. **Mi Hee Cho**, Hyun Hee Ahn, Jung Hwa Lee, Bong Lee, Gilson Khang, Moon Suk Kim, Hai Bang Lee "Neurogenesis–Inducing of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell using Small molecules" In Preparation.

## Presentations

### [국외 학회발표]

1. **Mi Hee Cho**, Bong Lee, Sun Kyung Kim, Hye Ran Lee, Soon Hee Kim, Gilson Khang, Moon Suk Kim, Hai Bang Lee "Preparation and Release Profile of Albumin and BDNF–loaded Hydrogels" The 1st World Congress of TERMIS, Apr. 2006, Pittsburgh, USA
2. Moon Suk Kim, **Mi Hee Cho**, Hai Bang Lee, Sun Kyung Kim, Soon Hee Kim, Hoon Hyun, Gilson Khang "Preparation of Thermosensitive MPEG–PCL Diblock Copolymer Gels for Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cells" The 1st World Congress of TERMIS, Apr. 2006, Pittsburgh, USA
3. **Mi Hee Cho**, Hoon Hyun, Yu Na Shin, Jung Won Lee, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Ghang, Hai Bang Lee "Release Profile of BDNF from Temperature Sensitive Hydrogels" ASBM, Aug. 2006, Jeju, Korea

4. Yu Han Kim, Mi Hee Cho, Yu Na Shin, Moon Suk Kim, Gilson Ghang, Hai Bang Lee "Preparation of Chitosan Gels for Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stem Cells" ASBM, Aug. 2006, Jeju, Korea
5. Yu Na Shin, Mi Hee Cho, Sun Kyung Kim, Moon Suk Kim, Gilson Ghang, Hai Bang Lee, "Preparation and Release Profile of BDNF-loaded PLGA Scaffold" ASBM, Aug. 2006, Jeju, Korea
6. Hyun Hee Ahn, Min Suk Lee, Mi Hee Cho, Yu Na Shin, Moon Suk Kim, Scott L Diamond, Gilson Khang, Il Woo Lee, Hai Bang Lee "DNA/PEI Nanoparticles for GeNe Delivery of Adult Stem Cells" AsiaNANO 2006, Nov. 2006, Busan, Korea
7. Yu Na Shin, Mi Hee Cho, Hyun Hee Ahn, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Ghang, Hai Bang Lee "Characterization of PLGA scaffold with SIS for spinal cord regeneration" AISB, Nov. 2006, Shanghai, China
8. Yu Na Shin, Mi Hee Cho, Hyun Hee Ahn, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Il Woo Lee, Hai Bang Lee "Characterization of PLGA scaffold with SIS for spinal cord regeneration" Termis North America, Jun. 2007, Toronto, Canada
9. Mi Hee Cho, Yu Han Kim, Hyun Hee Ahn, Yu Na Shin, Jung Hwa Lee, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hai Bang Lee "In vivo osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells using injectable chitosan gels" International society for stem cell research, Jun. 2007, Cairns, Australia
10. Hyun Hee Ahn, Jung Hwa Lee, Mi Hee Cho, Yu Na Shin, Kyung Suk

Kim, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Il Woo Lee, Hai Bang Lee "Gene Delivery to Adipose Derived Stem Cells Using Polyethylenimine" International society for stem cell research, Jun. 2007, Cairns, Australia

[국내 학회발표]

1. Mi Hee Cho, Kim Sun Kyung, Hoon Hyun, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hae Bang Lee "Sustained Release of BDNF using Temperature Sensitive MPEG-PCL Hydrogels" The Polymer Soc. of Korea, Apr. 2006, Ilsan, Korea
2. Sun Kyung Kim, Mi Hee Cho, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hae Bang Lee "Biological Evaluation of NIH/3T3 Cells on LDPE Film with Corona Treatment" The Polymer Soc. of Korea, Apr. 2006, Ilsan, Korea
3. Yu Na Shin, Mi Hee Cho, Sun Kyung Kim, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Hae Bang Lee "얼음입자 추출법으로 제조된 지지체에서의 골수유래 줄기세포의 성장거동" The Polymer Soc. of Korea, Apr. 2006, Ilsan, Korea
4. Yu Na Shin, Mi Hee Cho, In Bum Song, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Hae Bang Lee " BDNF를 함유한 PLGA 지지체의 제조 및 방출 경향" Tissue Eng. Regen. Med., Jun. 2006, Seoul, Korea
5. Mi Hee Cho, Hoon Hyun, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hae Bang Lee "Release Profile of Dexamethasone using Thermo-Sensitive Hydrogels" Tissue Eng. Regen. Med., Jun. 2006, Seoul, Korea

6. **Mi Hee Cho**, Hyun Hee Ahn, Kyung Sook Kim, Seok Beom Song, Seog-Jin Seo, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hai Bang Lee "Preparation and Evaluation of Injectable Chitosan Carrier for Demineralized Bone Matrix" The Korean Soc. for Biomaterials, Mar. 2007, Seoul, Korea
7. Yu Na Shin, **Mi Hee Cho**, Hyun Hee Ahn, Jung Hwa Lee, Kyung Sook Kim, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Hai Bang Lee "생체조직 공학용 지지체의 제조 및 평가" The Korean Soc. for Biomaterials, Mar. 2007, Seoul, Korea
8. **Mi Hee Cho**, Kyung Sook Kim, Hyun Hee Ahn, Seok Beom Song, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hai Bang Lee " DBM 전달체로서의 키토산 젤의 제조와 평가" Tissue Eng. Regen. Med., Jun. 2007, Seoul, Korea
9. Yu Na Shin, **Mi Hee Cho**, Hyun Hee Ahn, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Hai Bang Lee "Release profile of BDNF-loaded MPEG-PLGA scaffold" Tissue Eng. Regen. Med., Jun. 2007, Seoul, Korea
10. Kyung Sook Kim, **Mi Hee Cho**, Jung Hwa Lee, Hyun Hee Ahn., Yu Na Shin, Moon Suk Kim, Bong Lee, Gilson Khang, Hai Bang Lee " 온도 감응성 키토산 겔을 이용한 골격근유래줄기세포의 골분화 유도" Tissue Eng. Regen. Med., Jun. 2007, Seoul, Korea
11. Hyun Hee Ahn, Jung Hwa Lee, **Mi Hee Cho**, Yu Na Shin, Kyung Suk Kim, Moon Suk Kim, Gilson Khang, Il Woo Lee, Hai Bang Lee "Gene Delivery to Adipose Derived Stem Cells Using Polyethylenimine" Tissue Eng. Regen. Med., Jun. 2007, Seoul, Korea

## Patents

1. 생체적합성의 주사형 하이드로 젤을 이용한 신경 재생용 조직공학용 이식체(한국, 2007-0014505)
2. 생체적합성 및 온도감응성의 폴리에틸렌글리콜/폴리에스터 블록 공중합체를 이용한 약물의 주사제형(한국, 2006-0125541)
3. 상전이가 가능한 생체적합성의 소장점막하조직 파우더 및 이의 제조방법 (한국, 2006-0100430)
4. 저분자 화합물에 의한 성체줄기세포의 신경세포 분화유도 기술 개발 (한국, 2007-0122363)



## 감사의 글

아무것도 모르는 철부지로 한국화학연구원에 첫발을 내딛었던 날이 불과 며칠 전의 일만 같은데 벌써 2년 이라는 시간이 지났습니다. 많은 것을 배우고 깨달았던 2년 동안의 석사과정을 마무리하며 벌써 졸업을 눈앞에 두고 있는 지금, 졸업논문을 출판하며 너무나도 고맙고 감사한 분들이 많습니다. 글로는 너무나 부족하지만 지금 이 자리에 제가 서 있을 수 있게 도와주신 많은 분들에게 감사의 마음을 전하고자 합니다.

우선 학부시절부터 많이 부족한 저를 믿어주시고 한국화학연구원이라는 좋은 곳에서 배울 수 있는 길을 열어 주신 이봉 교수님. 대전에 있다는 핑계로 자주 연락도 못 드렸는데 언제나 따뜻하게 맞아주시고 격려해 주셔서 감사합니다. 학교를 떠나 있는 저를 위해 많은 것들을 배려해 주시고 가르침으로 머리를 채워주신 박상보 교수님, 민성기 교수님, 박성수 교수님, 박찬영 교수님, 이원기 교수님 감사드립니다.

한국화학연구원에서 조직공학이라는 새로운 학문을 접하게 이끌어 주시고 연구인으로서의 자세를 깨우치게 해 주신 이해방 실장님, 쉴 새 없이 바쁜 틈에도 잊지 않으시고 격려의 말로 각오를 다지게 해 주셨던 강길선 교수님, 그리고 늘 옆에서 지켜봐주시고 지도해 주신 김문석 박사님 감사드립니다. 성모병원의 이일우 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 소중한 가르침 잊지 않고 어느 곳에서도 진실 되게 최선을 다하겠습니다.

화연에 오자마자 철부지 가르치느라 밤늦게까지 고생하셨던 순희언니, 친언니처럼 늘 따뜻하게 챙겨주었던 민숙언니, 영원한 사수 선경언니에게 감사의 마음을 전합니다. 화려한 화연생활을 마감하고 먼저 사회에서 멋지게 자리 잡으신 선배님들.. 김태희 금덕언니, 여장부의 진면목을 보여준 성미언니, 왕언니 현정언니, 같이 배우며 함께 했던 유나언니, 코팅기 후유증 사오정 성찬선배, 바비라고 불러주던 영호오빠, 미소가 아름다운 유

한선배, 비밀이야기 좋아하시는 인범선배, 화연 꽃미남 정원이오빠, 흰~칠한 수영선배. 모두 모두 감사드립니다.

동고동락하며 마지막 까지 응원해 준 우리 화연 식구들.. 조용하게 미소 지으며 아주 많은 것들을 알려준 셸팀의 리더 든든한 현희언니 (행복하게 사세요!!), 내 걱정 제일 많이 해주는 이뿌니 짝궁 정화, 묵묵하게 최선을 다하는 모습이 보기 좋은 경숙이, 귀염둥이 꼬맹이 주영이, 따끔한 충고와 따뜻한 마음으로 많은 힘이 되어준 주용이 오빠, 듬직한 거스선배, 합성신기 재송오빠, 지용오빠, 재민이오빠, 입사동기 지선이, 서희 모두 좋은 추억 만들고 나갈 수 있게 해주셔서 감사합니다. 학교 팀 연경이, 수미, 지예, 초민이, 정원이, 미옥이, 아영이, 윤쌤, 정수, 준희, 명진이, 종현오빠, 윤태에게도 고맙다는 말을 전합니다. 다들 더 좋은 모습으로 웃으며 만날 수 있기를 바랍니다.

부경대학교 광기능성 고분자 식구들.. 대장 영수 쌤, 6년 동안 변함없이 우정 지켜준 지영이 언니, 빵소, 혜윤이, 짱금이, 윤미, 이슬이, 귀염둥이 막내들, 멀리 있다고 더 많이 챙겨주고 신경써주신 현주 쌤, 혜주 쌤 모두 감사드립니다. 그리고 우리 이름도 없는 계원들.. 은아, 지영, 경민오빠, 찬영, 건우, 태규에게도 고마움을 전합니다. 일년에 한 두번 밖에 못보지만 어색함 없는 정말 사랑하는 내 친구들 진경이, 지연이, 쫘나, 요비. 사랑한다 친구들아!

마지막으로 지금 이 자리에 오기까지 큰 버팀목이 되어준 우리 가족들 정말 감사합니다. 우리 할머니 건강하게 오래오래 사시구요. 아빠, 엄마, 부족한 딸 항상 믿어 주시고 사랑해 주셔서 감사합니다. 늘 지금처럼 행복한 모습으로 지내셨으면 해요. 말을 늘 차갑게 하지만 언제나 동생 먼저 챙기는 우리 오빠. 고마워~ 우리 꼭 성공하자!! 드디어 시집 간 막내고모.. 이쁜 아기 낳고 행복하세요. 큰고모, 큰고모부, 작은엄마, 작은아빠,

우리 고모들. 늘 감사하는 마음 잊지 않겠습니다. 다시 한 번 지켜봐 주신 모든 분들에게 감사의 마음을 전합니다. 미회를 사랑해 주시는 많은 분들에게 보답하기 위해 부끄럼 없이 최선을 다하겠습니다. 감사합니다.

