



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

전기 유체역학 공정을 이용한 조직공학용 바이오리액터 개발

The development of a new bioreactor using
electrohydrodynamic process for tissue regeneration applications

2013년 2월 25일

조선대학교 대학원

기계공학과

진 규 현

전기 유체역학 공정을 이용한 조직공학용 바이오리액터 개발

지도교수 김 근 형

이 논문을 기계공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2012년 10월

조선대학교 대학원

기계공학과

진 규 현

진규현의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 박길문 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이행남 (인)

위 원 조선대학교 조교수 김근형 (인)

2012년 11월

조선대학교 대학원

목 차

List of Table	v
List of Figure	vi
Abstract	xvi

제 1 장 서 론

제1절 연구의 배경	1
제2절 연구의 목적	2

제 2 장 골 조직, 세포담체 그리고 바이오파이브러

제1절 골 조직의 구조와 역할	3
제2절 조직 맞춤형 세포담체 제작	5
제3절 바이오파이브러가 세포에 미치는 영향	7
제4절 참 고 문 헌	9

제 3 장 골 조직 재생을 위한 다양한 세포담체의 제작 및 교류(AC)전기자극과 조골세포 활성화에 대한 영향

제1절 서론	41
제2절 실험	44
2.1 재료 및 세포담체 제작 방법	44
2.2 세포담체의 특성	44
2.3 세포담체의 공극률 측정	45
2.4 세포담체의 기계적 강도 측정	45
2.5 전기 자극을 위한 실험 설계	45
2.6 P/T(PCL/ β -TCP) 세포담체의 칼슘 방출 실험	46
2.7 Cell culture	46
2.8 MTT assay	46
2.9 Live/Dead cell analysis	47
2.10 ALP activity analysis	47
2.11 Alizarin red-S staining	47
2.12 Total protein content	48

제3절 결 과	49
3.1 세포담체의 제작과 특성	49
3.2 기계적 강도	49
3.3 MTT assay를 통한 세포 증식	50
3.4 전기 자극에 의한 MG-63 세포의 이동성	51
3.5 Live/Dead cell analysis	51
3.6 배양된 세포담체의 관찰 및 EDS 분석	52
3.7 전기 자극, 세포 그리고 칼슘 이온의 관계	52
3.8 골 분화도 측정 (ALP activity, ARS-staining)	53
제4절 결 론	54
제5절 참 고 문 헌	55

List of Figures

제 2 장

- Figure 1. An example of a tissue engineering concept that involves seeding cells within porous biomaterial scaffolds. ···· 23
- Figure 2. Various applications of tissue engineered scaffolds. · 24
- Figure 3. Multi-lineage potential of adult mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells which are present in adult bone marrow are multipotent and have an extensive proliferation capacity. They can differentiate into multiple lineages as osteocytes, chondrocytes, fibroblasts, adipocytes, astrocytes and myocytes. ···· 25
- Figure 4. The stem cell niches in bone marrow. In the bone marrow HSCs and their progeny populate the vascular niche which is surrounded by stromal cells derived from MSCs. Naïve MSCs with true stem cell attributes are part of the stroma while MSCs which are committed osteoprogenitor cells reside in the osteoblastic niche. ············ 26
- Figure 5. Schematic diagram of some of the major bone cells, indicating their role in the bone remodeling sequence. ············ 27

Figure 6. Histochemical changes during differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. Phase contrast micrographs(x40) were taken by Alizarin Red S staining after 5 d (A), 10 d (B), 16 d (C) and 30 days (D), respectively. Cells were cultured with a-MEM containing 10% FBS, 50 µg/ml of ascorbic acid, and 10 mM P-glycerophosphate. 28

Figure 7. The expressing of specific protein at each level for forming a bone. 29

Figure 8. Graphical illustration of the complex interdependence of molecular weight loss and mass loss of a strategy I 3D scaffold matrix plotted against the time frame for tissue engineering a cartilage/bone transplant. (A) Fabrication of bioresorbable scaffold, (B) seeding of the osteoblast/cartilage populations into the polymeric scaffold in a static culture (petri dish), (C) growth of premature tissue in a dynamic environment (spinner flask), (D) growth of mature tissue in a physiologic environment (bioreactor), (E) surgical transplantation, (F) tissue-engineered transplant assimilation/remodeling. 30

Figure 9. Graphical illustration of the complex interdependence of molecular weight loss and mass loss of a strategy II 3D scaffold matrix plotted against the time frame for tissue engineering a cartilage/bone transplant. (A) Fabrication of bioresorbable scaffold, (B) seeding of the osteoblast/ cartilage populations into the polymeric scaffold in a static culture (petri dish), (C) growth of premature tissue in a dynamic environment (spinner flask), (D) growth of mature tissue in a physiologic environment (bioreactor), (E) surgical transplantation, (F) tissue-engineered transplant assimilation/remodeling. 31

Figure 10. Conventional methods for scaffold fabrication. 32

Figure 11. SEM photographs for various scaffolds (a) salt leaching process (PDLLA) (b) gas foaming process (PLGA) (c) freeze drying process (PDLLA) (d) electrospinning process (PLGA). 33

Figure 12. Solid freeform fabrication (SFF) for scaffold fabrication. 34

Figure 13. (a) 3D scaffold systems of various porosity and pore geometry fabricated by FDM. Magnification $\times 7.5$, scale bar represents 1 mm. (i)-(iii) lay-down pattern: $0/90^\circ$ nozzle tip: 0.016", porosity: 50, 68, 75%; (iv)-(vi) $0/90^\circ$; 0.010"; 50, 68, 75%;

(vii)–(viii) 0/60/120°; 0.016"; 68, 75%; (ix) 0/60/120°; 0.010"; 80%; (x)–(xii) 0/60/120°; 0.010"; 50, 68, 75%. (b) Left: cross-sectional view of freeze-fractured PCL scaffold with lay-down pattern 0/72/144/36/108°. Right: plan view of same specimen. 35

Figure 14. Representative bioreactors for tissue engineering applications (a) Spinner flask bioreactors have been used for the seeding of cells into 3D scaffolds and for subsequent culture of the constructs (b) Rotating-wall vessels provide a dynamic culture environment to the constructs, with low shear stresses and high mass-transfer rates (c) Hollow-fiber bioreactors can be used to enhance mass transfer during the culture of highly metabolic and sensitive cell types such as hepatocytes (d) Direct perfusion bioreactors in which medium flows directly through the pores of the scaffold can be used for seeding and/or culturing 3D constructs (e) Bioreactors that apply controlled mechanical forces, such as dynamic compression, to engineered constructs can be used as model systems of tissue development under physiological loading conditions, and to generate functional tissue grafts. 36

Figure 15. Vision for a closed-system bioreactor for the automated production of tissue-engineered grafts. (a) The surgeon would take a biopsy from the patient and introduce it into the bioreactor located on-site at the hospital. (b) All reagents (e.g. culture medium, medium supplements, and scaffolds) would be stored in compartments under appropriate conditions (i.e. temperature, humidity). The bioreactor system could then (c) automatically isolate the cells, (d) expand the cells, (e) seed the cells onto a scaffold, and (f) culture the construct until a suitably developed graft is produced. (g) Environmental culture parameters and tissue development would be monitored and inputs fed into a microprocessor unit for analysis. In conjunction with data derived from clinical records of the patient (h), the inputs would be used to control culture parameters at pre-defined optimum levels automatically (i) and provide the surgical team with data on the development of the tissue, enabling timely planning of the implantation (j). Figure generated by M. Moretti. 37

Figure 16. Biomimetic system for vessel culture. 38

Figure 17. Set-up, used for electrically induced fusion (field-lines of the electric field). (a) Two cylindrical platinum wires are mounted in parallel on a slide. The gap between the two electrodes has to be matched to the size of the cells or vesicles to be fused. (b) Stronger divergence of the electric field can be achieved with a set-up in which a central wire is surrounded by an outer cylindrical electrode. (c) Electrode arrangement for the production of large amounts of fused cells. (d) Flow chamber system in which the cells enter centrally the gap between four electrodes, arranged crosswise. Cells move to the region of highest field intensity between the individual electrodes due to dielectrophoresis. (e) Flow chamber system for the production of cell hybrids of different species in high yield. Two highly diluted cell suspensions are successively sucked through the slit between the electrodes. The formation of cell pairs, consisting of species 1 (●) and species 2 (○) is favored. 39

Figure 18. Chamber Design, Electric Field Setup and Strength Calculations. (a) Carbon electrode chamber design for capacitively coupled field (b) Electric field setup including function generator for power supply and oscilloscope for electric field strength verification (c) Chamber side view outlining chamber dimensions for field strength calculations (d) Cell dimensions for morphological assessment 40

제 3 장

- Figure 1. Schematics for (a) fabricating solid-freeform fabricated scaffolds consisted of PCL, SWNT, and β -TCP, (b) electric stimulation with an AC electric field, and (c) a lab-made culture plate with a parallel electrode. 65
- Figure 2. Optical and surface and cross-sectional SEM micrographs for three fabricated scaffolds, (a) pure PCL, (b) P/C (PCL/SWCNT), and (c) P/T (PCL/ β -TCP). 66
- Figure 3. (a) Strut and pore size and (b) porosity for fabricated scaffolds (pure PCL, P/C, and P/T). 67
- Figure 4. (a) Stress - strain curves and (b) Young's modulus for pure PCL, P/C, and P/T at 2 mm/s. The inset figure shows a magnified area of the curves. *P < 0.05 indicates a significant difference. 68
- Figure 5. Viable cell numbers (MTT assay) after cell-culture 1, 3, 4, 7, and 14 days for various scaffolds (pure PCL, P/C, and P/T) without an electric stimulation. *P < 0.05 indicates a significant difference and NS means non-significance. 69

Figure 6. Viable cell numbers after cell-culture 4, 7, and 14 days for various scaffolds (pure PCL, P/C, and P/T) with and without electric stimulation. In this figure, control and E-field mean the scaffolds without the electric stimulation and with the stimulation, respectively. *P < 0.05 indicates a significant difference and NS means non-significance. 70

Figure 7. (a) Schematic for observing cell movement under an electric stimulation. Optical images of cell movement taken for three time periods (0, 15, and 30 min) (b) with and (c) without the electric stimulation (55 mV/cm and 60 Hz). 71

Figure 8. Live (green) and dead (red) MG-63 cells after 14 days in culture on three scaffolds ((a) PCL, (b) P/C, and (c) P/T) with and without electric stimulation. (d) Relative cell viability of electrically stimulated scaffolds normalized with control scaffolds for various scaffolds. 72

Figure 9. SEM micrographs and EDS results for (a) pure PCL, (b) P/C, and (c) P/T after 14 days cell-culture with and without the electric stimulation. 73

Figure 10. Theoretical description for the effect of the electric stimulation on various cellular activities. 74

- Figure 11. Concentration of calcium ions released from the P/T scaffolds for 1, 3, and 7 days in PBS solution. *P < 0.05 indicates a significant difference and NS means non-significance. 75
- Figure 12. Optical images of cell movement taken for various time periods for three different concentrations ((a) 0, (b) 0.05, (c) 0.1 wt%) of b-TCP in culture medium with the electric stimulation (55 mV/cm and 60 Hz). (d) Contraction area (%) of cells under the electric field for various time periods. In the graph, control is the data of cell-contraction taken without the electric stimulation. 76
- Figure 13. (a) Relative ALP activity and (b) calcium deposition on PCL, P/C, and P/T scaffolds from 7 to 14 days. (c) Relatively increased ALP and calcium deposition of the scaffolds with the electric stimulation compared to those of the scaffolds without the electric stimulation. *P < 0.05 indicates a significant difference and NS means non-significance. 77
- Figure 14. Optical micrographs of Alizarin red S staining indicating mineralization of the PCL, P/C and P/T scaffolds after 7 and 14 days cell-culture. 78

Abstract

The development of a new bioreactor using electrohydrodynamic process for tissue regeneration applications

Jin Gyuhyun

Advisor : Prof. Kim GeunHyung, Ph.D.

Department of Mechanical Engineering

Graduate School of Chosun University

In general, various physical stimulations have been widely applied to tissue regenerative applications. In particular, for bone tissue regeneration several experiments reported the electric stimulation can enhance the mineral formation in cultured osteoblasts and even alter the pattern of gene expression promoting in bone tissue formation. However, to date, for rapid-prototyped PCL composites consisted of pure PCL and dispersed material including single wall carbon nanotubes (SWCNT) and β -tricalcium phosphate (β -TCP), the effect of the electric stimulation on various cellular activities has not been analyzed.

Here, a sinusoidal AC electric field (55 ± 8 mV/cm and 60 Hz) between parallel electrodes was applied to the 3 dimensional (3D) scaffolds (pure PCL, PCL/SWCNT 0.2 wt%, PCL/ β -TCP 20 wt%) cultured with osteoblast-like-cells (MG-63) with every 30 min/day for 14 days. For all scaffolds, when exposed with the electric stimulation, the ALP and calcium mineralization for all scaffolds were enhanced, but the PCL/ β -TCP scaffold showed the highest improvement of bone mineralization compared to those of other scaffolds. In this work, we cannot completely explain about the phenomenon, but we can estimate that the improvement can be due to the calcium ions chemically

precipitated from the PCL/ β -TCP scaffolds. To evaluate the effect of the released calcium ions, we measured the change of physical shape of proliferated cells under the electric stimulation.

The result can mean that not only the applied electric field conditions can be important parameters for electric stimulation, but also the scaffold consisting materials are another important parameter to successful electric stimulation.

제1장 서론

제1절 연구의 배경

현대 사회의 노령화와 질병, 사고의 증가로 인해 생명공학이나 조직공학과 같은 생명 현상을 이해하는 연구가 전 세계적으로 부각되고 있다. 이와 더불어 생명 연장과 삶의 질 향상을 위해 손상된 기관이나 조직을 대체하려는 연구가 절실히 요구되는 상황이다.

이러한 질병, 조직의 손실, 복원이 필요한 장기와 조직을 본 기능에 유사 또는 대체하는 학문을 조직공학(tissue engineering)이라고 한다. 조직공학은 단일 학문이 아닌, 생물 및 화학, 의학, 공학 등 여러 전문적인 학문의 융합이 필수적이다. 즉, 손상된 생체 부위를 대체하기 위한 유사한 구조와 기능을 가진 적절한 세포담체를 제작하고, 관련 조직 세포를 체외에서 배양하여 인공 조직을 구성, 체내에 이식하여 정상적인 기능을 하도록 재생하는 것이다.¹⁻³

조직공학은 세포, 성장인자, 세포담체의 중요한 세 가지 요소를 반드시 요구한다. 세포는 각 부위에 따라 신경, 장기, 뼈, 피부 등 손상된 부위에서 분리 배양한 것으로 인체 내에서의 면역거부반응 및 인간복제와 같은 윤리적인 문제로부터 유리한 위치를 나타내며, 세포의 부착, 증식, 분화를 긍정적으로 이끌고, 재활 기간 동안의 각종 부작용과 감염으로부터 보호 할 수 있는 성장인자를 포함한다. 또한, 인체에 이식 후 생체에서 완전히 흡수되고, 세포와 친화력이 있는 조직을 형성하는 세포담체가 요구되어진다. 이 세포담체는 생분해성과 생체적합성이 우수해야 하며, 적합한 기계적 강도를 유지해야 한다.⁴

손상된 조직을 빠른 시간에 재생시키기 위해서는 요구조건이 충족되는 인공 세포담체의 중요성과 함께 이식 후의 환자의 관리 역시 중요하다. 이러한 조직의 재생을 돕기 위한 바이오리액터(bioreactor:생물반응기) 분야의 연구가 활발히 진행 중에 있다. 생물의 체내에서 일어나는 다양한 기계적, 화학적 반응을 체외에서 구현하여 세포의 조직 배양 시 실제 몸과 같은 배양 환경을 구현하여 효율적인 조직 재생을 도모하고자 하는 시스템을 바이오리액터라고 한다.

이처럼, 조직공학에서의 조직 재생을 위한 세포, 성장인자, 세포담체의 영향에 따른 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만, 이식 이후의 환자의 재생능력에 기대하기 보단, 치료기간의 관리에 대한 연구가 미흡한 상태이다. 이는, 손상 조직의 재생을 위한 세포담체 및 성장 인자에 대한 연구에 집중되어 있기 때문에 바이오리액터를 이용한 실험 데이터베이스 구축 및 추후 가능성의 분석이 요구된다.

제2절 연구의 목적

조직 재생에 있어 최적의 세포담체 제작, 다양한 성장인자의 제어/방출, 그리고 높은 효율을 갖는 바이오리액터는 손상된 조직을 대체하는 이상적인 대안을 얻기 위해 많은 연구가 이루어 졌다. 특히, 바이오리액터 시스템은 세포의 증식, 분화, 사이토카인(cytokine)의 방출, 세포외 기질(extracellular matrix)의 단백질 합성과 같은 세포의 활동 및 물리적/전기적인 자극과의 관계를 나타내기 위해, 다양한 자극 조건으로 연구가 행해지고 있다.⁵⁻¹⁰

세포에 가할 수 있는 다양한 자극 중, 기계적 자극은 뼈와 연골 재생에 널리 적용되었다. 조직의 손상을 입히지 않는 범위에서는 지속적인 생리학적 자극은 뼈의 주요 유기 화합물인 골 생성 단백질과 콜라겐의 합성을 향상시키는 결과를 나타낸다. 이러한 기계적 자극은 조골세포의 증식, 분화, 세포의 운동성, 유전자 발현 등 세포의 활동의 다양한 기능에 영향을 준다.¹¹

기계적 자극으로 발생한 전단 응력은 조골세포 성장인자의 신호 전달 활성화, 세포 골격 및 인테그린(integrin)과의 상호작용 등 자극과 세포의 관계에 긍정적인 역할을 하며 다양한 가설을 통해 설명하고 있다.¹²⁻¹⁴

마찬가지로 전기 및 자기와 같은 자극은 신경, 심장, 뼈와 연골, 근육 및 골격 등 다양한 조직에 적용되었다. 일반적으로 전기 자극은 혈관 생성의 촉진, 근육 세포의 재생, 줄기세포의 심장세포화, 심장근육세포의 발달된 형질을 포함한 세포의 다양한 활동을 장려하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁻²⁰ 일부 연구에 의하면, 체외 실험에서 전기 자극은 조골세포의 높은 증식과 다양한 사이토카인(BMP-2, IGF-1, VEGF)의 발생을 유도한 것으로 나타났다.²¹⁻²²

본 연구에서는 평행한 형태(parallel plate)의 전극을 제작하고, 전기장을 포함하는 바이오리액터를 설계하여 세포에 전기장의 자극을 주었다. 평행한 형태의 전극은 세포의 패터닝, 생물학적 물질의 유전이동(dielectrophoresis)등 전통적인 사용방법으로 제어가 쉽고, 재현성이 높으며, 다양한 형태로의 응용이 가능한 장점을 가지고 있다. 전기장의 자극은 전극의 형태와 함께 전기장의 세기 및 진동수, 자극 시간이 매우 중요한 요소로 작용한다. 강한 세기의 전기장의 세포의 사멸을 일으키고, 적절하지 못한 자극은 활성산소의 배출과 열충격 단백질의 생성으로 세포 증식을 저하시키기도 한다. 여러 연구에 따르면 세포의 증식과 분화를 촉진시키는 전기장의 세기는 다양하게 보고되고 있다.¹⁹⁻²⁴

또한, 다양한 재료의 세포담체를 제작하여 조골세포(osteoblast-like-cells : MG63)의 활성 및 배양 특성을 알아보았다. 바이오리액터 내에서의 3차원 격자구조 세포담체와 전기 자극의 영향에 대해 세포의 사멸과 증식, 골 분화도, 칼슘의 증착 정도를 분석하고 관찰하여 통계적으로 처리하였다.

제2장 골 조직, 세포담체 그리고 바이오리액터

제1절 골 조직의 구조와 역할

뼈는 단단한 물리적 특성이 있기 때문에 구조적으로 몸의 형태를 유지하고, 신체 내의 중요 장기들을 보호하며, 우리가 움직일 때 힘을 쓰는 근육이 붙는 자리를 제공하며 지렛대 역할을 한다. 생리적으로는 조혈 기관이며, 칼슘과 인 등 무기물의 저장고로서 이들의 혈중 농도 유지에 중요한 역할을 한다. 이처럼 뼈는 조혈기능, 보호기능, 지지기능, 지렛대 작용의 4가지 주요 기능을 가지고 있다.²⁵⁻²⁶

골 조직은 골세포와 그 사이를 차지하는 풍부한 세포간질로 이루어져 있다. 세포간질은 교원섬유와 무정형기질로 이루어지고, 기질에는 다량의 칼슘염이 축적되기 때문에 다른 조직과 달리 상당한 강도를 가지고 있다. 골세포는 골층판 사이에 배열되어 있으며, 불규칙한 별 모양으로 가는 원형질 돌기로 인접한 다른 골세포와 연결되어 있다. 골질의 성분으로는 수분 20%, 세포를 포함한 유기질 35%, 무기질 45% 로 이루어져 있으며, 뼈는 유기질을 포함하고 있기 때문에 일정한 탄력성을 가진다.²⁷

골 형성은 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cell) 라고 불리는 근원세포에서 시작한다. 이 세포는 다능성(multipotent) 미분화 세포로서, 골모세포(osteoblast), 연골모세포(chondroblast), 지방세포(adipocyte) 등 다양한 형태의 세포로 분화할 수 있다. 골모세포(osteoblast)는 세포간질(intercellular substance or matrix)을 생성하는데 골 형성에 중요한 역할을 하며 이 세포간질에서 석회화가 일어나게 된다. 석회화가 일어난 것을 골(bone)이라고 하며, 골화(calcification)란 세포간질의 생성과 석회화(mineralization)과정 모두를 뜻한다.²⁸⁻²⁹

일반적으로 세포는 성장과 분화를 반복하게 되는데, 세포의 밀도가 낮은 공간에 존재하는 세포는 세포들 사이의 접촉이 거의 일어나지 않아 세포가 성장주기로 들어가 성장(proliferation) 하게 된다. 세포가 증식하는 동안 세포와 세포간 접촉(cell-cell contact)이 일어나면 세포의 증식이 정지하게 되는데, 이를 접촉억제(contact inhibition)이라고 한다. 이후 세포는 분화의 과정을 거쳐 발현하게 된다.³⁰

I. S. Kim 및 B. Zerler 연구팀에 의하면 표적분석에 필요한 성장요소를 포함한 2차원 배지에서 뼈모세포(MC3T3-E1)를 키우기 시작하여 4일에서 10일 사이에 세포 성장 기간을 가지고, collagen type I, fibronectin, TGF- β 1의 단백질이 10일에서 16일 사이에 나타났다. 그리고 골 분화의 중요한 표적인자인 알카라인 포스파타제(ALP)가 10일 이후부터 생성이 된다. 이후 16일에서 30일 정도에 석회화가 일어나는데, 골 흡수에 중요한 역할을 하는 인자의 발현이 아주 높게 나타난다고 한다.³¹⁻³²

위와 같이 골 조직을 형성하는데 크게 3단계로 나누어 볼 수 있는데, 본 연구에서는

세포의 분화에 전기적인 자극이 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 알카라인 포스타파제(ALP), calcium deposition, BCA 분석을 통한 영향을 알아보려고 한다.

제2절 조직 맞춤형 세포담체 제작

손상된 조직 혹은 장기를 재생하기 위하여 다양한 종류의 세포담체가 개발되고 있으며, 전통적으로 조직공학에서 세포담체 가공에 사용되는 염침출법, 염발포법, 상분리법, 전기방사법 등의 방법은 세포의 증식 및 분화에 적절한 환경을 제공하는데 어려움을 가지고 있다.³³⁻³⁶

이에 높은 세포 친화력을 가진 세포담체를 제작하기 위하여 3차원 자유형상가공 기술(Solid Freeform Fabrication)과 같은 새로운 기술들이 조직공학에 적용되고 있다. 세포담체의 특성으로 생체 적합성이 우수해야 하며, 기계적, 물리적 성질 및 성형 가공성이 사용 목적에 맞게 유기적인 특성을 요구한다. 또한, 넓은 표면적과 다공성, 생분해성을 포함하며, 독성이 없어야 한다. 자유형상가공(SFF) 기술을 이용하여 세포담체를 제작하게 되면, 3차원 형태의 공극(pore)의 크기 및 공극률(porosity)를 정밀하게 제어할 수 있으므로 동일한 공극의 크기와 분포를 가진 세포담체를 재현성 있게 제작할 수 있다.³⁷⁻⁴⁰

이렇게 제작된 세포담체는 제작방법에 의한 다양한 형태와 함께 세포담체를 이루고 있는 재료 또한 중요한 요소로 작용한다. 세포담체의 재료로는 천연 고분자 재료와 합성 고분자 재료로 나뉜다. 천연 고분자 재료로는 알지네이트(alginate), 콜라겐(collagen), 피브로인(fibroin), 키토산(chitosan) 등이 널리 알려져 있으며, 비교적 우수한 생체적합성, 세포외기질과 비슷한 성질을 나타낸다. 이에 비해 합성 고분자는 천연 고분자에 비해 값이 싸며, 분자구조와 분자량을 조절할 수 있어 물리적, 기계적 특성 및 생분해성을 쉽게 제어할 수 있는 장점을 가지고 있다. 대표적인 합성 고분자 재료로는 PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PGA(poly(glycolic acid)), PLA(poly(lactic acid)), PCL(poly(ϵ -caprolactone)) 등이 있다.⁴¹⁻⁴⁶

이와 같이 다양한 부위의 손상된 조직을 복원하기 위해서는 그에 맞는 형태와 재료를 선정하여 세포담체를 제작해야 한다. 뼈, 연골과 같은 골 조직 재생을 위해서는 다른 장기에 비해 높은 기계적 물성이 요구되며, 금속, 세라믹 등의 재료는 이식 시 기존의 뼈와 이식된 골 시멘트와의 계면에서 분리에 의해 장기간 사용이 어렵고 염증을 유발하며, 합성 고분자 단독으로 사용할 시에 낮은 기계적 물성을 가진다.⁴⁷⁻⁴⁹

골 결손이 생겼을 때 가장 좋은 치료방법은 자가 골(autograft bone)을 이용하는 것이다. 자가 골은 골 전도성과 골 유도성을 모두 갖추었으며, 골 세포까지 포함되어 있어 치료 속도가 빠르고 면역반응이 전혀 없는 장점이 있으나, 골을 채취하는 부위에 생길 수 있는 병의 부담과 공급의 한계가 있는 단점을 가지고 있다. 최근에는 칼슘과 인을 이용한 세라믹 합성 골(synthetic bone) 증가하는 추세이다.⁵⁰⁻⁵⁴

생체재료 중 세라믹 분류에는 CS(calcium sulphate), TCP(tricalcium phosphate), HA(hydroxyapatite) 등이 있으며, 현재 치과용 임플란트나 골 충전제로 사용 된다. 이들 재료는 골 형성을 유도할 뿐만 아니라 골 재생을 촉진 시키는 Bone Morphogenetic Proteins(BMPs), Transforming Growth Factors(TGF- β)등의 성장인자를 포함하고 있어 골 형성과 발달에 긍정적인 영향을 미친다.⁵⁵⁻⁵⁶

CS는 가장 오랜 기간 동안 임상적으로 활용된 골 전도물질로 생체 내로 이식 후 화학반응이 발생할 때 매우 다양한 결정구조가 발생하여 마지막 산물의 성질이 일정치 않고 매우 빠르게 흡수되는 단점을 가지며, HA의 경우 생체 내에서 생분해성이 너무 늦어 임상적용이 제한적이다. 다른 세라믹에 비해 TCP의 경우 생분해성이 빨라 생체 내로의 재흡수가 수월하게 이루어진다.⁵⁷⁻⁶¹

SWCNT는 다른 소재에 비해 고유의 높은 기계적 특성과 전기전도성을 가지고 있으며, 조직공학에 적합한 생체재료로 간주되어 골 조직 공학에서 고분자 물질과 함께 CNT의 활용도가 광범위하게 검토 되고 있다.⁶²⁻⁶³

이러한 단점을 상호 보완하기 위해 본 연구에서는 높은 기계적 강도와 조직간 친화력의 향상을 위해 생분해성/생체적합성 고분자 물질인 PCL과 TCP(tricalcium phosphate), SWCNT(single wall carbon nanotubes)를 혼합하여 면역거부반응을 최소화 시키고, 높은 기계적 강도를 극복하려 한다.

제3절 바이오리액터가 세포에 미치는 영향

사고나 질병에 의해 장기, 조직이 손상되어 복원시키기 위해 효과적인 치료 방법은 대체 할 수 있는 조직이나 장기를 이식하는 것이다. 하지만 공급 할 수 있는 장기는 한정되어 있고, 환자의 발생을 증가하는 추세이므로 심각한 불균형이 초래 되고 있다. 이에 인체의 장기나 조직을 재생하여 치료하는 조직 공학 연구가 활발히 진행 되고 있으며, 조직공학은 각 조직의 세포를 기본으로 하여 손상된 장기의 역할을 회복, 유지, 기능 향상을 목표로 한다. 이렇게 세포를 기본으로 한 치료 방법은 크게 3가지로 나뉘 볼 수 가 있다. 본인의 세포를 분리, 배양한 세포를 본인에게 이식하는 자가 세포 이식 방법과 성장 촉진 인자와 생체 활성 물질을 손상된 조직 에 이식하는 방법 그리고 체외에서 배양된 조직이나 세포를 3차원 구조의 세포담체에 파종하여 몸속에 이식하는 경우이다.⁶⁴⁻⁶⁵

다양한 세포 치료 방법 중 3차원 구조의 세포담체를 이용하여 체외에서 조직을 재생하고자 하는 경우 세포의 증식이나 분화를 원활하게 하기 위해 일반적인 생물/화학적 자극뿐만 아니라 바이오리액터(bioreactor)와 같은 개념의 새로운 세포 배양 방법이 요구된다. 바이오리액터란 생체 반응기, 생물 유사 반응기 등을 뜻하며 생체 내에서 이뤄지고 있는 생물의 체내에서 이루어지는 갖가지 화학반응을 체외에서 이용하는 시스템으로 체외실험(in-vitro)에서 세포 배양 시 적절한 pH, 온도, 산소의 농도, 영양분의 공급을 통하여 체내실험(in-vivo)의 상황과 유사한 환경을 제공하여 세포의 증식이나 분화를 더욱더 활발하게 하여 조직 재생을 원활하게 만들어 준다.⁶⁶⁻⁶⁷

이러한 바이오리액터는 다양한 조직(피부, 뼈, 혈관, 연골 등)의 재생을 위해 적절한 설계가 필요하고, 이를 위해 의/생물/화학/기계공학 등의 다양한 측면에서의 이해가 필요하다. 일반적인 2차원 세포 배양을 정적 배양(static culture)라고 하면 바이오리액터는 동적 배양(dynamic culture)을 가능하게 하며, 각 세포나 조직에 맞는 적절한 인장(tension), 압력(compression), 전단 응력(shear stress)등의 물리적, 기계적 자극과 전기(electric field) 및 자기장(magnetic field)과 같은 자극을 이용하기도 한다.^{66, 68-69}

혈관은 영구적으로 인장과 혈류에 의한 박동에 의해서 발생하는 기계적인 변형, 전단 응력을 받게 되며, 혈관 조직의 증식을 촉진시키기 위해 Niklason 연구팀은 민무늬 근육세포와 혈관 내피세포를 이용하여 공학적 혈관을 개발하는 연구를 진행하였다. 전단 응력을 이용한 관류 순환형 바이오리액터를 이용하여 주기적인 반경의 확장을 주었으며, 혈관 세포는 압력과 전단응력에 의해 만들어지는 기계적인 자극을 감지하고 반응할 수 있게 하는 수많은 수용체들과 결합되어 이러한 자극이 혈관 조직의 성숙을 촉진시킨다는 것을 확인 하였다.⁷⁰⁻⁷²

인체의 형태를 유지하고, 신체 내의 중요 장기를 보호하는 뼈는 골세포를 자극하는 응력에 의해 성장이 촉진되거나 저하된다. 물리적 자극에는 변형의 방식(인장, 압축, 전단), 변형이 이루어지는 방향, 변형률, 변형 주기, 분포 등의 다양한 종류가 있으며, 어떤 요인이 적합한 신호인지, 독립적인 변형과 두 가지 이상의 상호 변형 등 다양한 물리적 자극이 골 형성에 미치는 영향에 대한 연구가 여러 연구자들에 의해 진행되었다.^{26,73}

특히, 골 형성에는 일정한 응력이나 변형률에 의해서가 아니라, 반복적인 응력과 변형률에 반응한다는 것이 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다. Lanyon 연구팀은 조류의 뼈에 정적 하중과 동적 하중을 2개월 동안 가하여 골의 재흡수 양상과 피질 골 내부의 공극률을 조사하였는데, 정적 하중에는 재흡수가 증가하고 공극률 또한 증가하는 결과를 보였다. 동적 하중에서는 순수 골 형성이 증가하고, 공극률은 억제되는 것을 보고하였다. 이와 유사한 실험으로 개를 움직이지 못하게 고정시키고, 정 압축 하중과 반복 압축 하중을 주어 골 성장을 실험하였으며 정 압축 하중보다 움직였을 때 나타날 수 있는 반복 압축 하중에 의해 골 성장률이 증가되는 것이 더 크다는 것을 실험을 통해 나타내었다.⁷⁴⁻⁷⁶

또한, 뼈 및 연골을 포함한 근 골격의 조직은 전기 및 전자 분야 등의 다양한 생물학적 자극에 반응한다. 이러한 이온 전류 및 잠재 전류는 조직 및 세포내에서 세포의 기능과 성장에 영향을 미친다. 전기장에 의한 세포 표면의 전하 및 이온의 변경은 세포의 신호 전달 경로를 변화시켜 증식, 분화, 세포의 운동성, 유전자 발현 등의 차이를 발생한다.²³⁻²⁴

뼈의 자연적인 전기적 특성의 발견 이후에는 뼈 골절 치료와 분화를 촉진하기 위해 내·외부의 전기적 활동의 결합이 소개되어졌다. 일정기간의 전기적 자극은 골격 조직 재생에 영향을 끼치며, 이러한 기계적 및 전기적 자극은 약물 및 화학 처리보다 생물학적 작용에 유리하다.⁷⁷⁻⁸⁰ Piacentini 및 Aaron의 연구에 의하면 전기장의 자극은 세포가 뼈를 형성하는 동안 민감하게 반응하여 세포내의 칼슘 함량을 증가시키며, 매우 낮은 진동수의 전기 자극은 줄기 세포의 신호 전달 경로를 차별화 시켜 분화 및 세포의 증식에 영향을 끼친다.⁸¹⁻⁸²

제4절 참고 문헌

1. L. G. Griffith, G. Naughton, Tissue Engineering—Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, 295, 1009–1014, 2002
2. S. J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering. *nature materials*, 4, 518–524, 2005
3. J. M. Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano, R. L. Reis, Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomaterialia*, 7, 1009 - 1018, 2011
4. S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue engineering*, 7, 679–689, 2001
5. M. T. Tsai, W. H. S. Chang, K. Chang, R. J. Hou, T. W. Wu, Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *Bioelectromagnetics*, 28, 519–28, 2007
6. D. Ciombor, R. Aaron, The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot Ankle Clin*, 10, 579–593, 2005
7. L. Khatib, D. E. Golan, M. R. Cho, Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts. *FASEB J*, 18, 1903–1905, 2004
8. L. C. Kloth, Physical modalities in wound management: UVC, therapeutic heating and electrical stimulation. *Ostomy Wound Manage*, 41, 18–26, 1995
9. L. J. Walsh, The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue application. *Aust Dent J*, 42, 247–254, 1997
10. J. Rubin, C. Rubin, C. R. Jacobs, Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*, 367, 1–19, 2006
11. H. P. Wiesmann, U. Joos, U. Meyer, Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering: Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33, 523–530, 2004
12. T. Ogata, Fluid flow-induced tyrosine phosphorylation and participation of growth factor signaling pathway in osteoblast-like cells. *J Cell Biochem*, 76, 529–538, 2000
13. R. S. Carvalho, J. L. Schaffer, L. C. Gerstenfeld, Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: Demonstration of a common

- role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J Cell Biochem*, 70, 376-390, 1998
14. C. D. Toma, S. Ashkar, M. L. Gray, J. L. Schaffer, L. C. Gerstenfeld, Signal Transduction of Mechanical Stimuli Is Dependent on Microfilament Integrity: Identification of Osteopontin as a Mechanically Induced Gene in Osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 12, 1626-1636, 1997
 15. M. Zhao, H. Bai, E. Wang, J. V. Forrester, C. D. McCaig, Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci*, 117, 397-405, 2004
 16. H. Kern, S. Salmons, W. Mayr, K. Rossini, U. Carraro, Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle Nerve*, 31, 98-101, 2005
 17. M. Mödlin, C. Forstner, C. Hofer, W. Mayr, W. Richter, U. Carraro, F. Protasi, H. Kern, Electrical Stimulation of Denervated Muscles: First Results of a Clinical Study. *Artif Organs*, 29, 203-206, 2005
 18. E. Serena, E. Figallo, N. Tandon, C. Cannizzaro, S. Gerecht, N. Elvassore, G. Vunjak-Novakovic, Electrical stimulation of human embryonic stem cells: Cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species. *Exp Cell Res*, 315, 3611-3619, 2009
 19. G. Vunjak-Novakovic, K. O. Lui, N. Tandon, K. R. Chien, Bioengineering Heart Muscle: A Paradigm for Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng*, 13, 245-267, 2011
 20. H. T. H. Au, I. Cheng, M. F. Chowdhury, M. Radisic, Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes. *Biomaterials*, 28, 4277-4293, 2007
 21. I. S. Kim, J. K. Song, Y. L. Zhang, T. H. Lee, T. H. Cho, Y. M. Song, D. K. Kim, S. J. Kim, S. J. Hwang, Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 907-916, 2006
 22. I. S. Kim, J. K. Song, Y. M. Song, T. H. Cho, T. H. Lee, S. J. Kim, S. J. Hwang, Novel Effect of Biphasic Electric Current on In Vitro Osteogenesis and Cytokine Production in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*, 15, 2411-2422, 2006
 23. T. D. Brown, Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics*, 33, 3-14, 2000

24. M. Levin, Bioelectromagnetics in morphogenesis. *Bioelectromagnetics*, 24, 295-315, 2003
25. S. R. Simon, Orthopaedic basic science. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994
26. R. B. Martin, D. B. Burr, Structure, function, and adaptation of compact bone. Raven Press, 1989
27. J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, 20, 92-102, 1998
28. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, G. A. Rodan, Principles of bone biology. Academic Press, 1996
29. V. I. Sikavitsas, J. S. Temenoff, A. G. Mikos, Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22, 2581-2593, 2001
30. J. E. Aubin, F. Liu, L. Malaval, A. K. Gupta, Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17, S77-S83, 1995
31. J. Y. Choi, B. H. Lee, I. S. Kim, Expression patterns of bone related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of cellular biochem.*, 61, 609-618, 1996
32. G. R. Beck, Jr., E. C. Sullivan, E. Moran, B. Zerler, Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of cellular biochem.*, 68, 269-280, 1998
33. 김완두, 박수아, 이준희, 맞춤형 스캐폴드 제작을 위한 3차원 바이오조형기술. 2011
34. S. H. Kim, A. Y. Oh, J. H. Choi, S. H. Jung, H. H. Hong, N. R. Jeon, H. S. Shin, J. M. Rhee, G. Khang, Recent advances in manufacturing method of smart scaffold for regenerative medicine. *Tissue Eng. and Regen. Medicine*, 3, 351-369, 2008
35. D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000
36. E. Sachlos, J. T. Czernuszka, Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Euro. Cells Mater.*, 5, 29-40, 2003
37. D. W. Hutmacher, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives. *J. biomater. sci. polymed.* 12, 107-124, 2001
38. M. Gazell, L. Yi, C. Shaochen and R. Krishnendu, Laser-layered microfabrication of spatially patterned functionalized tissue-engineering scaffolds. *J. of Biomed.*

- Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 75, 414-424, 2005
39. A. L. Darling and W. Sun, 3D Microtomographic Characterization of Precision Extruded Poly- ϵ -caprolactone Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 70, 311-317, 2004
 40. S. H. Ahn, H. Yoon, G. H. Kim, Y. Y. Kim, S. H. Lee, W. Chun, Designed Three-Dimensional Collagen Scaffolds for Skin Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part C: Methods*, 16, 813-820, 2010
 41. 김상우, 손은수, 생체재료용 고분자 기술동향. 한국과학기술정보연구원, 2002 23-28
 42. B. Elisa, T. Paola, G. Massimp, G. Roberto, B. Adiana, Alendromate-hydroxy-apatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells. *biomaterials*, 29, 700-796, 2008
 43. X. Liu, P. X. Ma, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, 32, 477-486, 2004
 44. J. P. Fisher, T. A. Holland, D. Dean, Synthesis and properties of photocross-linked poly(propylene fumarate) scaffolds. *Journal of Biomaterials Science*, 12, 673-687, 2001
 45. L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer, A. G. Mikos, In vitro and in vivo degradation of porous poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*, 21, 1837-1845, 2000
 46. A. W. Lloyd, Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Med. Device Technol*, 13, 18-21, 2002
 47. T. M. Keaveny, W. C. Hayes, F. L. Boca Raton, Mechanical properties of cortical and trabecular bone. *CRC3*, 7, 285-344, 1993
 48. P. Zioupos, J. D. Currey, Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone With Age. *Bone*, 22, 57-66, 1998
 49. E. D. Sedlin, A rheological model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. *Acta orthop, scand. Suppl.*, 83, 1965
 50. X. N. Dong, X. E. Guo, The dependence of transversely isotropic elasticity of human femoral cortical bone on porosity. *Journal of Biomechanics*, 37, 1281-1287, 2004
 51. E. B. W. Giesen, M. Ding, M Dalstra, T. M. G. J. van Eijden, Mechanical properties of cancellous bone in the human mandibular condyle are anisotropic. *Journal of Biomechanics*, 34, 799-803, 2001
 52. L. Rohi, E. Larsen, F. Linde, A. Odgaard, J. dorgensen, Tensile and compressive properties of cancellous bone. *Journal of Biomechanics*, 24, 1143-1149, 1991

53. Y. N. Teni, D. P. Fyhrie, Finite element calculated uniaxial apparent stiffness is a consistent predictor of uniaxial apparent strength in human vertebral cancellous bone tested with different boundary conditions. *Journal of Biomechanics*, 34, 1649–1654, 2001
54. D. R. Carter, W. C. Hayes, Compact bone fatigue damage-I. Residual strength stiffness. *Journal of Biomechanics*, 10, 325–337, 1977
55. S. E. Kim, H.W. Choi, H. J. Lee, J. H. Chang, J. S. Choi, K. J. Kim, H. J. Lim, Y. J. Jun, S. C. Lee, Designing a highly bioactive 3D bone- regenerative scaffold by surface immobilization of nano-hydroxyapatite. *Journal of Materials Chemistry*, 18, 4994–5001, 2008
56. M. Peter, N. Ganesh, N. Selvamurugan, S. V. Nair, T. Furuike, H. Tamura, R. Jatakumar, Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nano hydroxy-apatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 80, 687–694, 2010
57. R. Vasita, D. S. Katti, Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 1, 15–30, 2006
58. I. Degasne, M. F. Basle, V. Demais, G. Hure, M. Lesourd, B. Grolleau, L. Mercier, D. Chappard, Effects of Roughness, Fibronectin and Vitronectin on Attachment, Spreading, and Proliferation of Human Osteoblast-Like Cells (Saos-2) on Titanium Surfaces. *Calcif Tissue Int*, 64, 499–507, 1999
59. T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios, Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res*, 51, 475–483, 2000
60. T. J. Webster, L. S. Schadler, R. W. Siegel, R. Bizio, Mechanisms of Enhanced Osteoblast Adhesion on Nanophase Alumina Involve Vitronectin. *Tissue Eng*, 7, 291–301, 2001
61. T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Seigel, R. Bizios, Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 22, 1327–1333, 2001
62. S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56–58, 1991
63. K. Sahithi, M. Swetha, K. Ramasamy, N. Srinivasan, N. Selvamurugan, Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol*, 46, 281–283, 2010
64. P. Ralf, N. H. Stephanie, G. Christiane, A. Peter, M. M. Norbert, Bioreactor design for tissue engineering. *J Bioscience and bioengineering*, 100, 235–245, 2005

65. R. A. F. M. Chamuleau, Artificial liver support in the third millennium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 31, 117–126, 2003
66. M. Ivan, W. Dacid, H. Michael, The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 22, 80–86, 2004
67. D. L. Butler, S. A. Goldstein, F. Guilak, Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng*, 112, 570–575, 2002
68. G. Vunjak–Novakovic, B. Obradovic, I. Martin, P. M. Bursac, R. Langer, L. E. Freed, Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog*, 14, 193–202, 1998
69. L. G. Griffith, G. Naughton, Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities. *Science*, 295, 1009–1014, 2002
70. L. E. Niklason, W. Abbott, J. Gao, B. Klagges, K. K. Hirschi, K. Ulubayram, N. Conroy, R. J. Ami, Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *Journal of Vascular Surgert*, 33, 628–638, 2001
71. J. A. McKee, S. R. Banik, M. J. Boyer, N. M. Hamad, J. H. Lawson, L. E. Niklason, Human arteries engineered in vitro. *EMBO reports*, 4, 633–638, 2003
72. L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, R. Langer, Functional arteries grown in vitro. *Science*, 284, 489–493, 1999
73. H. M. Frost, From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec*, 262, 398–491, 2001
74. L. E. Lanyon, C. T. Rubin, G. Baust, Modulation of bone loss during calcium insufficiency by controlled dynamic loading. *Cal Tissue Intl*, 38, 209–216, 1986
75. L. E. Lanyon, P. T. Magee, D. G. Baggott, The relationship of functional stress and strain to the proce of bone remodelling. An experimental study on the sheep radius. *Journal of Biomechanics*, 12, 593–600, 1979
76. A. Chamay, P. Tschantz, Mechanical influences in bone remodeling. Experimental research on Wolff's law. *Journal of Biomechanics*, 5, 173–180, 1972
77. J. Gan, P. Glazer, Electrical stimulation therapies for spinal fusions: current concepts. *Eur Spine J*, 15, 1301–1311, 2006
78. L. S. Lavine, A. J. Grodzinsky, Electrical–stimulation of repair of bone. *J Bone Joint Surg Am*, 69, 626–630, 1987.
79. C. T. Brighton, W. Wang, R. Seldes, G. H. Zhang, S. R. Pollack, Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg Am*, 83, 1514–1523, 2001.
80. Q. Wang, S. Zhong, J. Ouyang, L. Jiang, Z. Zhang, Y. Xie, S. Q. Luo,

- Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. *Clin Orthop and Rel Res*, 348, 259-268, 1998
81. R. Piacentini, C. Ripoli, D. Mezzogori, G. B. Azzena, C. Grassi, Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of $Ca^{v}1$ -channel activity. *J Cell Physiol* 215, 129-139, 2008.
 82. R. Aaron, D. Ciombor, Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *Journal of Orthopaedic Research*, 14, 582-589, 1996
 83. 아오끼 히데끼, 아파타이트. 세종출판사, 2002, 서울, 한국
 84. T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*, 6, 13-22, 2011
 85. G. Vunjak-Novakovic, L. E. Freed, R. J. Biron, R. Langer, Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. *AIChE J*, 42, 850-860, 1996
 86. B. R. Unsworth, P. I. Lelkes, Growing tissues in microgravity. *Nat Med*, 4, 901-907, 1998
 87. I. Jasmund, A. Bader, Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 74, 99-109, 2002
 88. D. Wendt, A. Marsano, M. Jakob, M. Heberer, I. Martin, Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng*, 84, 205-214, 2003
 89. O. Demartean, M. Jakob, D. Schafer, M. Heberer, I. Martin, Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage. *Biorheology*, 40, 331-336, 2003
 90. O. Demartean, D. Wendt, A. Braccini, D. Schafer, M. Heberer, I. Martin, Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 580-588, 2003
 91. S. G. Gassel, N. Ahmed, Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Frontiers in Bioscience*, 12, 4946-4956, 2007
 92. T. A. Owen, M. Arnow, V. Shalhoub, L. M. Barone, L. Wilming, M. S. Tassinari, M. B. Kennedy, S. Pockwinse, J. B. Lian, G. S. Stein, Progressive development of the rat osteoclast phenotype in vitro: reciprocal relationship in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation

- of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 143, 420-430, 1990
93. S. A. Park, J. H. Lee, W. Kim, Development of Biomimetic Scaffold for Tissue Engineering. *Elastomers and Composites*, 44, 106-111, 2009.
94. Q. Hou, D. W. Grijpma, J. Feijen, Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials*, 24, 1937-1947, 2003
95. L. D. Harris, B. S. Kim, D. J. Mooney, Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomed Mater Res*, 42, 396-402, 1998
96. Q. Hou, D. W. Grijpma, J. Feijen, Preparation of interconnected highly porous polymeric structures by a replication and freeze-drying process. *Journal of Biomed Mater Res*, 67, 732-740, 2003
97. V. Barron, E. Lyons, C. Stenson-Cox, P. E. McHugh, and A. Pandit, Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review. *Annals of biomedical engineering*, 31, 1017-1030, 2003
98. K. Dumont, A new pulsatile bioreactor for tissue engineered heart valve formation. *RUG-FTW 2nd PhD Symposium*, 31, 31-32, 2001
99. K. Dumont, J. Yperman, E. Verbeken, P. Segers, B. Meuris, S. Vandenberghe, W. Flameng, P. R. Verdonck, Design of a new pulsatile bioreactor for tissue engineered aortic heart valve formation. *Artif Organs*, 26, 710-714, 2002
100. S. P. Hoerstrup, G. Zund, R. Sodian, A. M. Schnell, J. Grunenfelder, M. I. Turina, Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 20, 164-169, 2001
101. D. Seliktar, R. A. Black, R. P. Vito, R. M. Nerem, Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng*, 28, 351-362, 2000
102. L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, R. Langer, Functional arteries grown in vitro. *Science*, 284, 489-493, 1999
103. U. Zimmermann, J. Vienken., Electric Field-Induced Cell-to-Cell Fusion. *J Membrane Biol*, 67, 165-182, 1982
104. H. T. Marie, L. R. William, C. G. Mark, L. K. Dacid, G. Irene, Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. *Biomed Eng online*, doi:10.1186/1475-925X-10-9

Table 1. Polymer scaffold processing for tissue engineering⁴

processing	Advantage	Disadvantage
fiber felts	Easy proces High porosity	Lack structural stability
fiber bonding	High porosity	Limit application to other polymers Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues
Phase separation	Nondecreased activity of the molecule	Difficult to control precisely scaffold morphology Solvent residue may be harmful
Solvent casting and particulate leaching	Controlled porosity, up to 93%, Independent control of porosity and pore size Crystallinity can be tailored	Limit to membranes up to 3-mm thick Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues
Membrane lamination	3D matrix	Lack required mechanical strength for the load-bearing tissues Solvent residue may be harmful
Melt molding	Independent control of porosity and pore size Macro shape control	High temperature required for nonamorphous polymer
Polymer/ceramic fiber composite foam	Superior compressive strength Independent control of porosity and pore size	Solvent residue may be harmful
High-pressure processing	No organic solvents	Mostly a nonporous surface Closed-pores structure inside the polymer matrix
Hydrocarbon templating	No thickness limitation Enhanced control over pore structure, porosity, etc.	Solvent residue may be harmful

Table 2. Properties of bioresorbable and bioerodable polymers⁴¹

Polymers	Structure	Melting point (°C)	Modulus (Gpa)	Mass Degradation (month)	Strength retention (month)
Polyglycolide (PGA)	-O-CH ₂ -CO-	225	7.0	3	1
Poly-L-lactide (PLLA)	-O-CHCH ₃ -CO-	175	2.7	18-24	6-12
Poly-D,L-lactide (PDLLA)	-O-CHCH ₃ -CO-	none	1.9	12-16	3-10
Poly-ε-caprolactone (PCL)	-O-(CH ₂) ₅ -CO-	60	0.4	>24	>24
Poly-1,4-dioxane-2-one (PDO)	-O-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₂ -CO-	110	1.5	4-6	1.5

Table 3. Kind of calcium phosphate.⁸³

Title	Abbreviation	Chemical formula	Ca/P ratio
Tetracalcium phosphate	TCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2.0
Hydroxyapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Amorphous calcium phosphate	ACP	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-
Tricalcium phosphate	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Octacalcium phosphate	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Dicalcium phosphate dehydrate	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0

Table 4. Evaluation method for biocompatibility.⁴¹

Biocompatibility	Testing information
Cytotoxicity	Evaluation of cell viability, growth, cycle, activation
Blood Compatibility (Histocompatibility)	Platelet count, Platelet factor 4 assay Antithrombin assay, Fibrinopeptide A assay Protein C assay, Fibrinogen assay Determination of - Coagulation factor and prothrombin activity - Activated partial thromboplastin time (APTT) - Fibrin degradation products (FbDP)
Tissue Compatibility (Histocompatibility)	Quantitative evaluation of soft tissue or bone Determination of cytotoxic activity of Natural killer cells Cytokine assay in the supernatants of cell cultures In vitro measurement of granulocyte activation
Immunocompatibility	Identification of membrane and intra-cell antigens Evaluation of the cytotoxic activity of Natural Killer cells Cytokine assay in the supernatants of cell cultures In vitro evaluation of bacterial adhesion and growth
Infectivity	Bacterial genes for adhesion and antibiotic resistance In vitro evaluation of bacterial adhesion and growth.
Genotoxicity	In vitro induced chromatid exchange.
Structural Analysis	Evaluation of crystallinity degree of biomaterials.

Table 5. Currently applied 3D scaffold fabrication technologies.³⁵

Fabrication technology	Processing	Achievable pore size in μm	Porosity in %	Architecture
Solvent casting in combination with particular leaching	Casting	30-300	20-50	Spherical pores, salt particles remain in matrix
Membrane lamination	Solvent bonding	30-300	<85	Irregular pore structure
Fabrication of non-woven	Carding, Needling, Plate pressing	20-100	<95	Insufficient mechanical properties
Melt moulding	Moulding	50-500	<80	
Extrusion in combination with particular leaching	Extrusion through dies	<100	<84	Spherical pores, salt particles remain in matrix
Emulsion freeze drying	Casting	<200	<97	High volume of inter-connected micro pore structure
Thermally induced phase separation	Casting	<200	<97	High volume of inter-connected micro pore structure
Supercritical-fluid technology	Casting	<100	10-30	High volume of inter-connected micro pore structure
Supercritical-fluid technology in combination with particle leaching	Casting	Micropores <50 macropores <400	<97	Low volume of non-interconnected micro pore structure combined with interconnected macro pore structure
3-D printing in and without combination of particle leaching	Solid free form fabrication	45-150	<60	100% interconnected macro pore (triangles, pentagons, honey comb, etc.), design and fabrication layer by layer, by use of water-based binder incorporation of biological agents into matrix possible
Fused deposition modelling	Solid free form fabrication	>150	<80	100% interconnected macro pore structure (triangles, pentagons, honey comb, etc.), design and fabrication layer by layer

Table 6. Comparison of design parameters of different physiological simulators.⁹⁷

Design considerations	Mass transfer	Flow regime	Shear stress	Dimensionality of construct
Static flask	Molecular diffusion	None	None	2D
Mixed flask	Turbulent convection	Turbulent	High	2D
Rotating wall vessel	Recirculation	N/A	Low	3D
Perfused wall vessel	Perfusion	N/A	N/A	
Perfused wall	Perfusion	Laminar	Low	3D
Dumont system ⁹⁸⁻⁹⁹	N/A	Laminar	Low	N/A
Hoerstrup ¹⁰⁰	High	Laminar	Low	3D
Seliktar ¹⁰¹	N/A	N/A	N/A	N/A
Niklason ¹⁰²	Pulsatile	Laminar	Low	3D

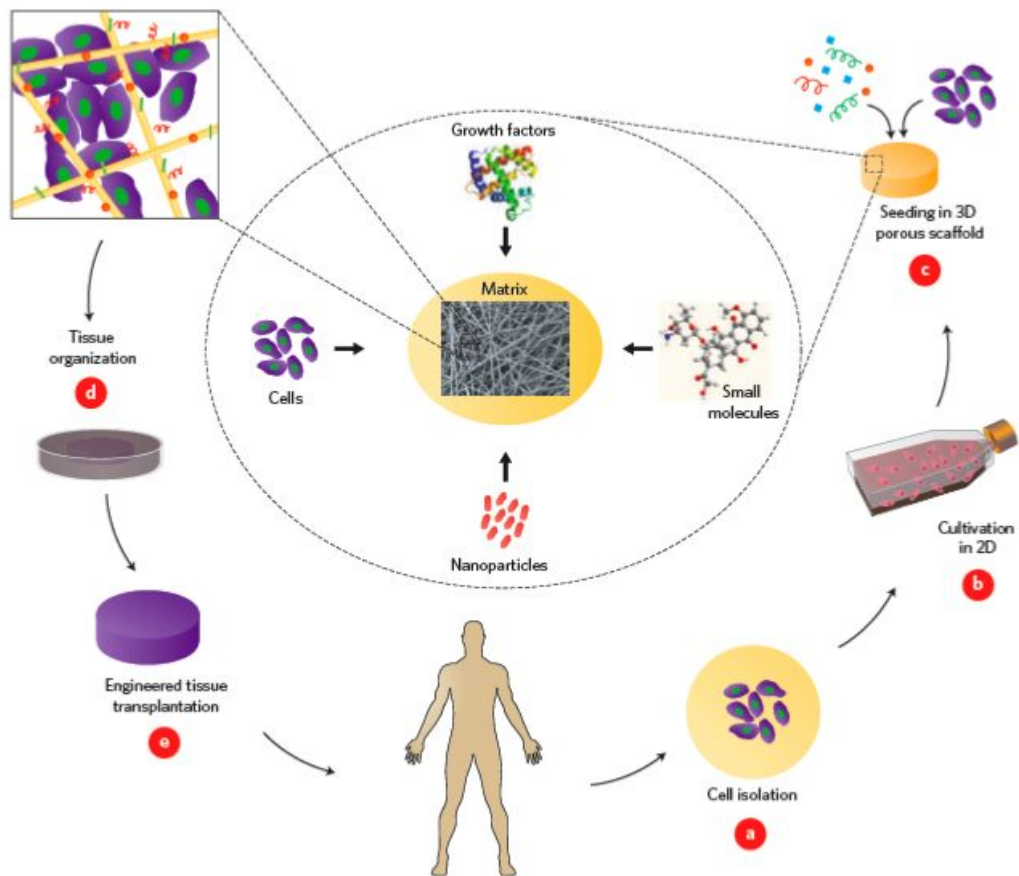


Figure 1. An example of a tissue engineering concept that involves seeding cells within porous biomaterial scaffolds⁸⁴

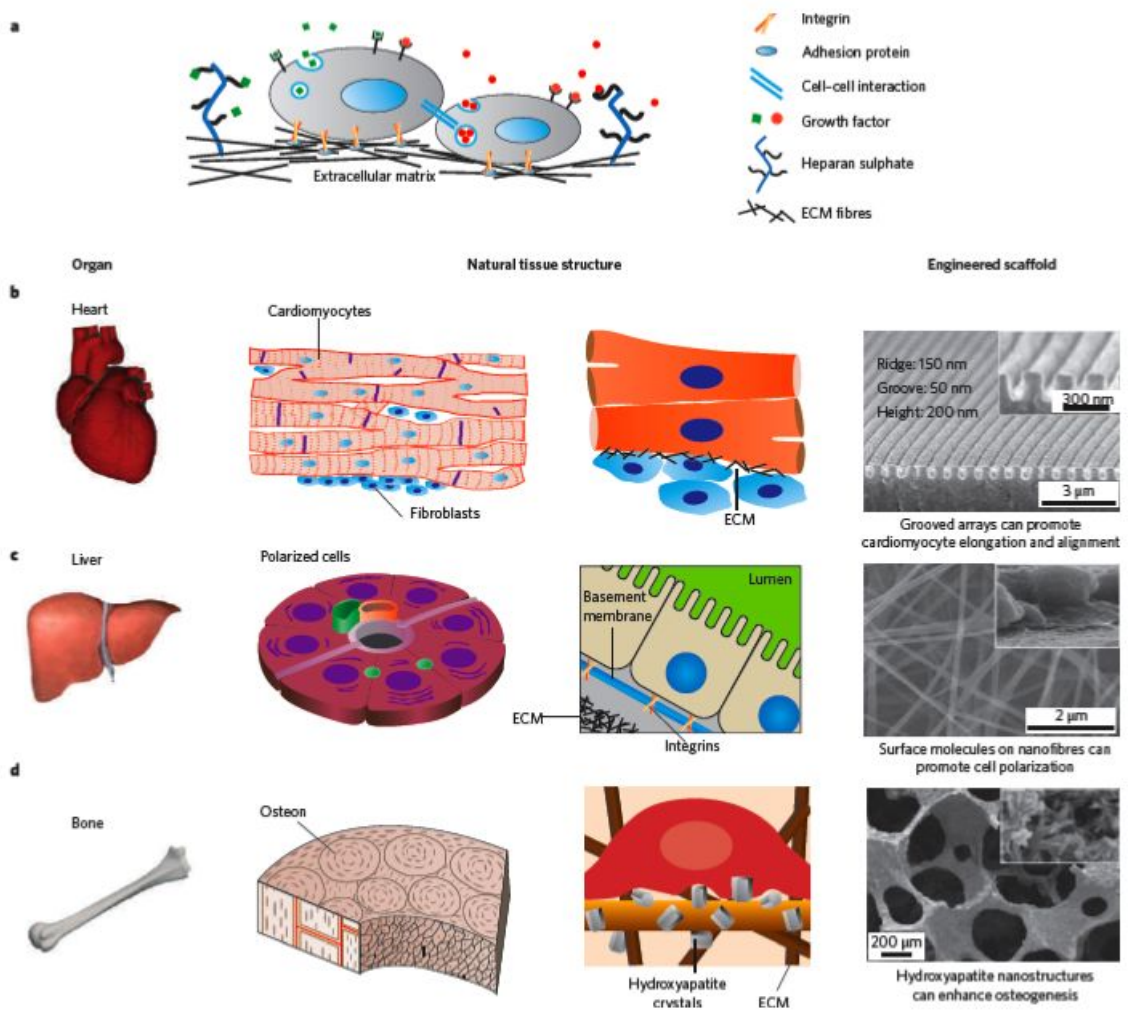


Figure 2. Various applications of tissue engineered scaffolds⁸⁴

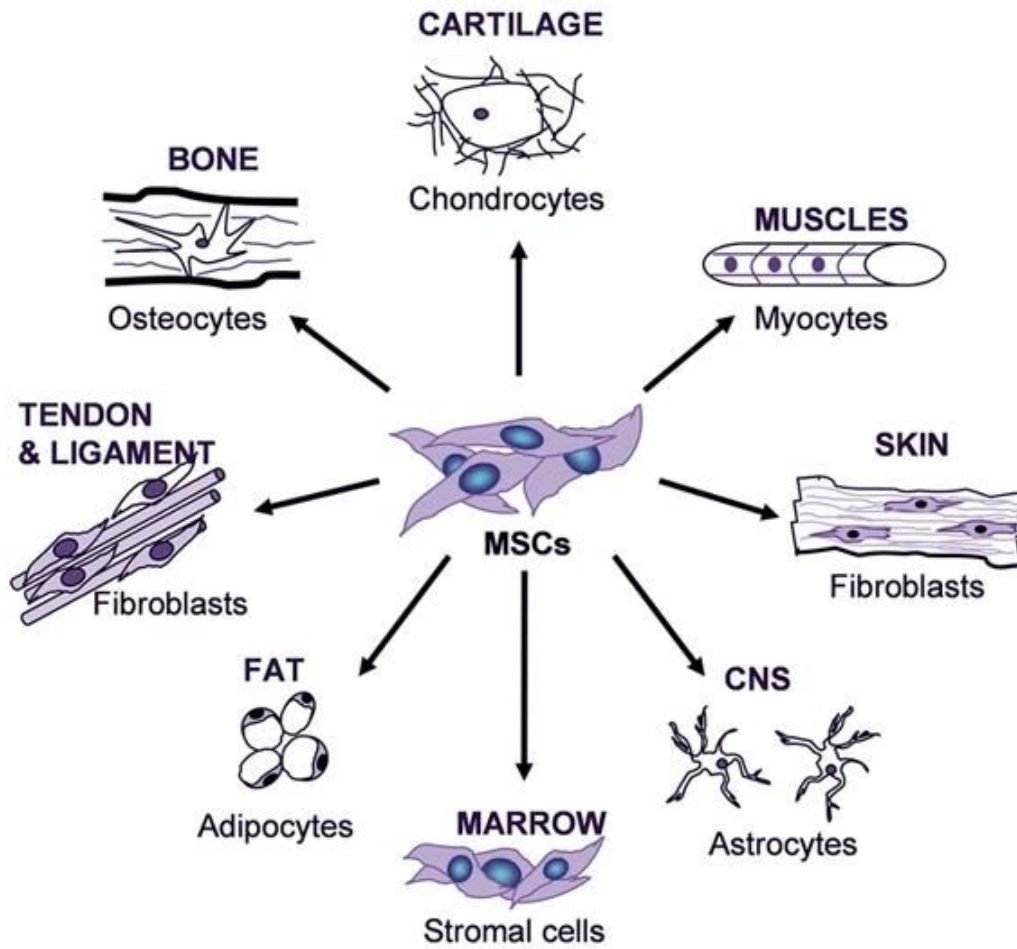


Figure 3. Multi-lineage potential of adult mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells which are present in adult bone marrow are multipotent and have an extensive proliferation capacity. They can differentiate into multiple lineages as osteocytes, chondrocytes, fibroblasts, adipocytes, astrocytes and myocytes⁹¹

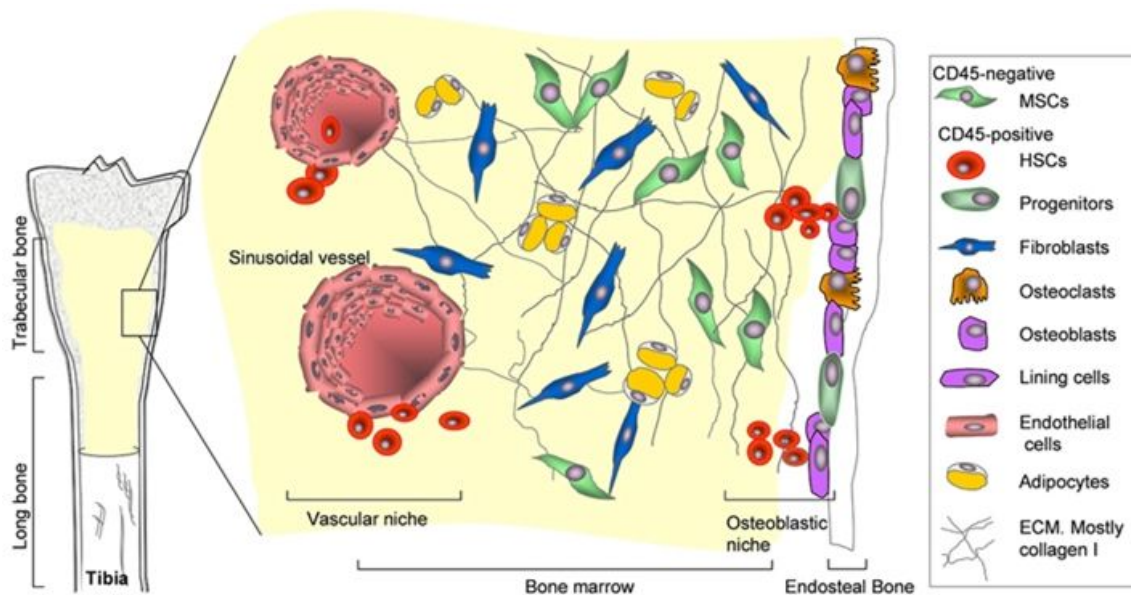


Figure 4. The stem cell niches in bone marrow. In the bone marrow HSCs and their progeny populate the vascular niche which is surrounded by stromal cells derived from MSCs. Naïve MSCs with true stem cell attributes are part of the stroma while MSCs which are committed osteoprogenitor cells reside in the osteoblastic niche⁹¹

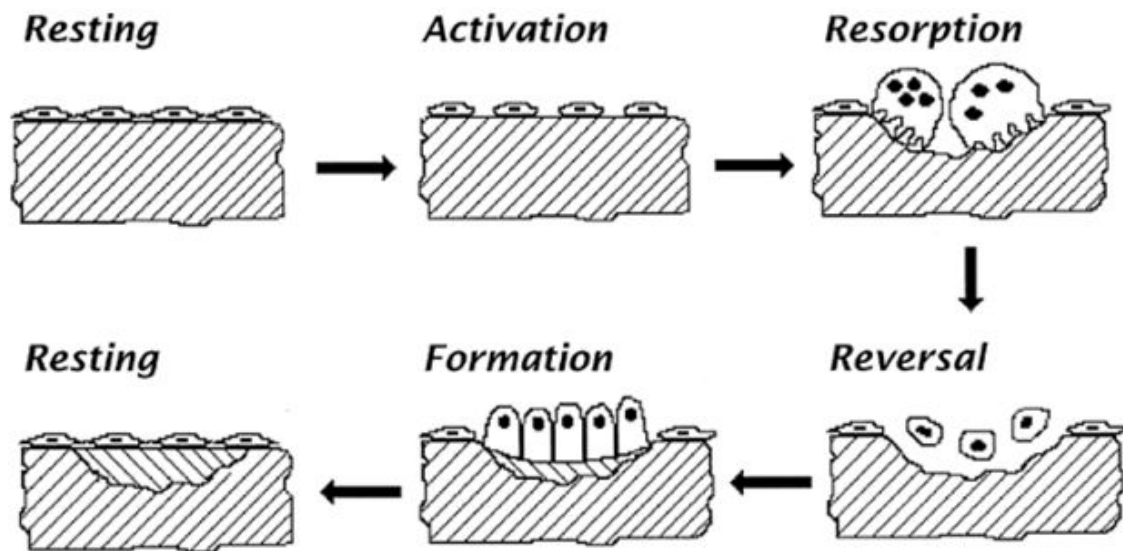


Image source : <http://www.gaucheritalia.org/articoli/images/osteoporosi.gif>

Figure 5. Schematic diagram of some of the major bone cells, indicating their role in the bone remodeling sequence

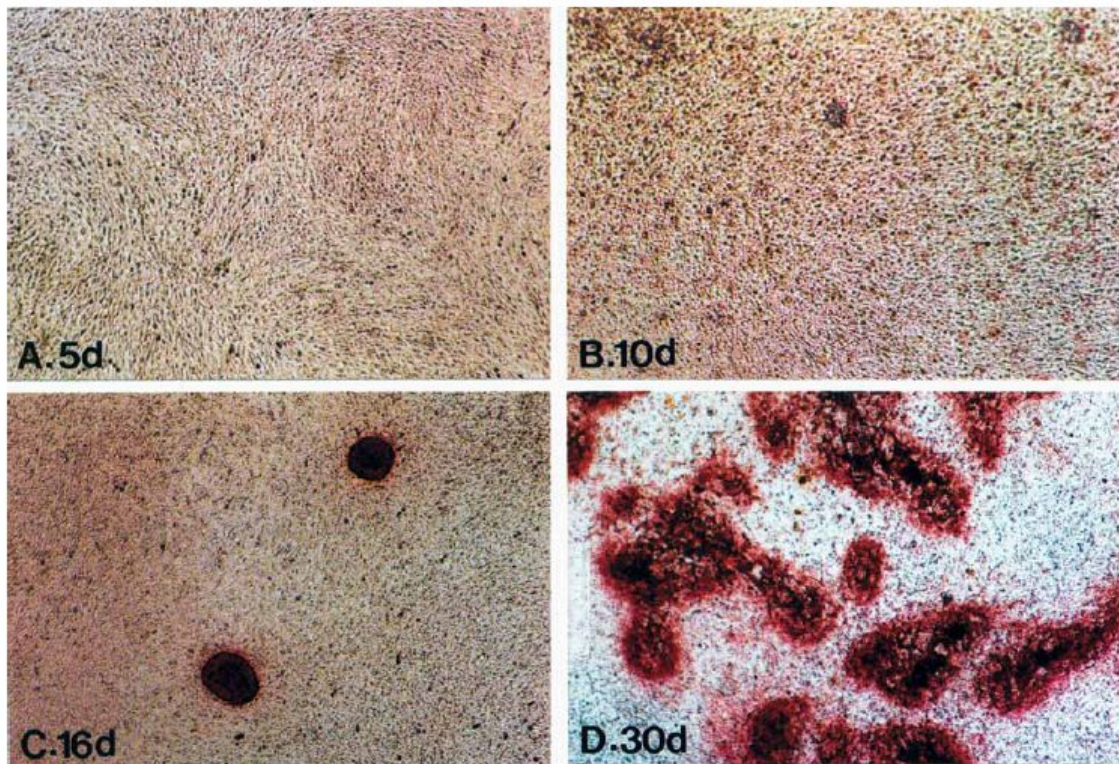


Figure 6. Histochemical changes during differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. Phase contrast micrographs(x40) were taken by Alizarin Red S staining after 5 d (A), 10 d (B), 16 d (C) and 30 days (D), respectively. Cells were cultured with α -MEM containing 10% FBS, 50 μ g/ml of ascorbic acid, and 10 mM P-glycerophosphate³¹

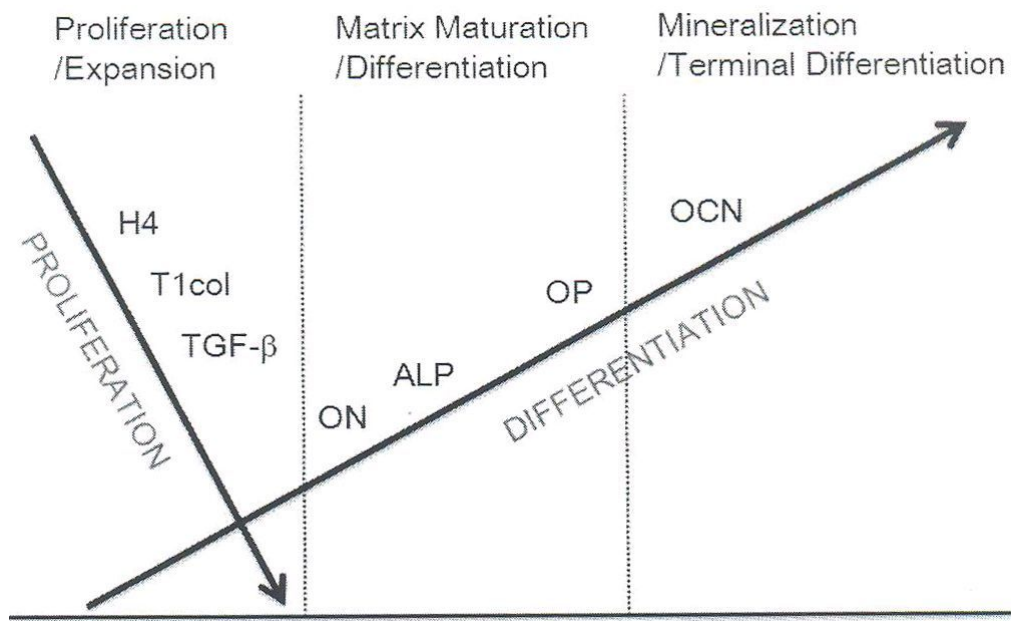


Figure 7. The expressing of specific protein at each level for forming a bone⁹²

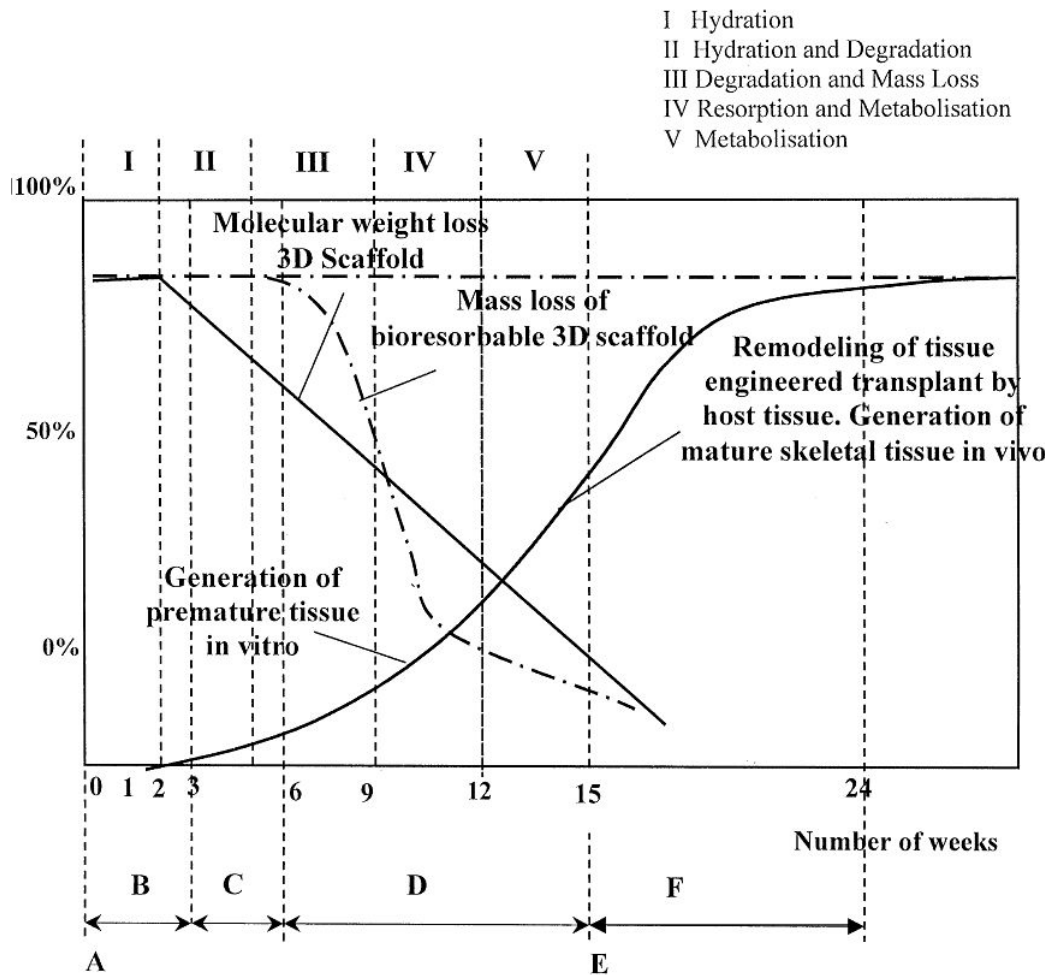


Figure 8. Graphical illustration of the complex interdependence of molecular weight loss and mass loss of a strategy I 3D scaffold matrix plotted against the time frame for tissue engineering a cartilage/bone transplant. (A) Fabrication of bioresorbable scaffold, (B) seeding of the osteoblast/cartilage populations into the polymeric scaffold in a static culture (petri dish), (C) growth of premature tissue in a dynamic environment (spinner flask), (D) growth of mature tissue in a physiologic environment (bioreactor), (E) surgical transplantation, (F) tissue-engineered transplant assimilation/remodeling³⁵

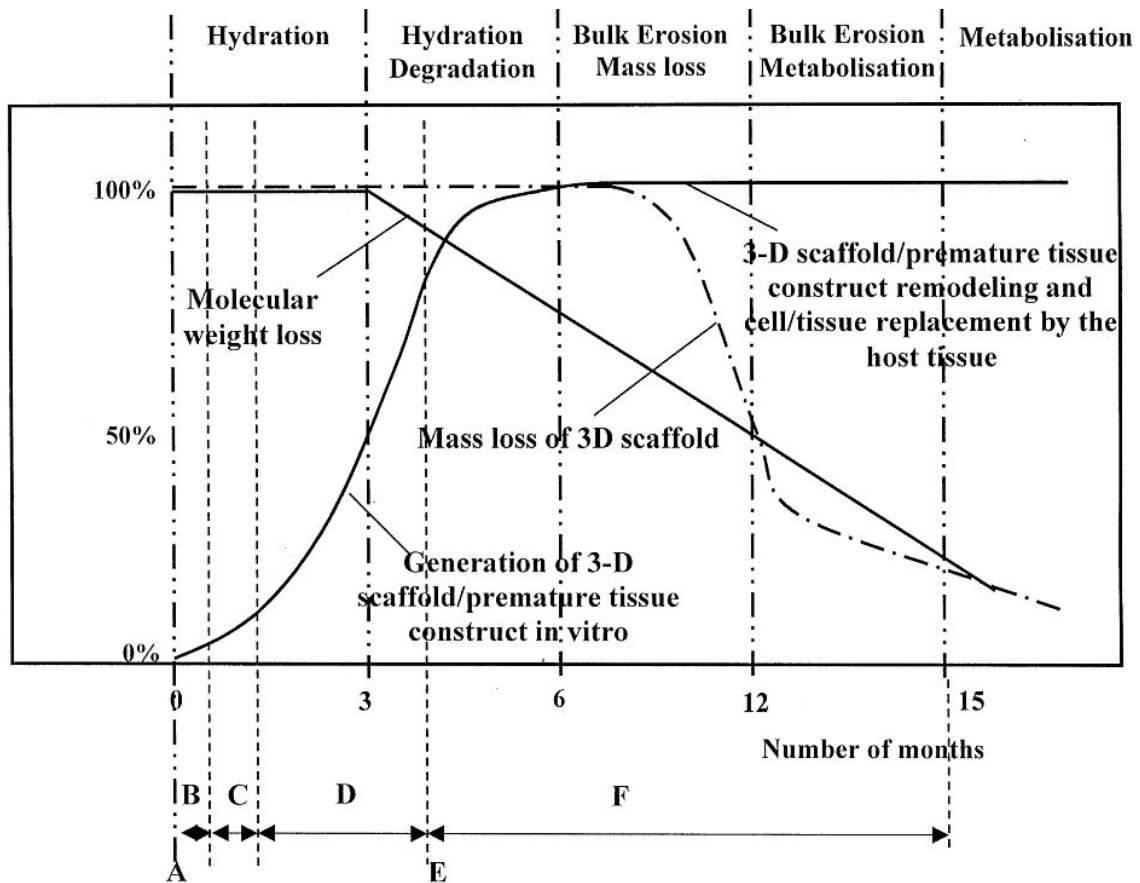


Figure 9. Graphical illustration of the complex interdependence of molecular weight loss and mass loss of a strategy II 3D scaffold matrix plotted against the time frame for tissue engineering a cartilage/bone transplant. (A) Fabrication of bioresorbable scaffold, (B) seeding of the osteoblast/cartilage populations into the polymeric scaffold in a static culture (petri dish), (C) growth of premature tissue in a dynamic environment (spinner flask), (D) growth of mature tissue in a physiologic environment (bioreactor), (E) surgical transplantation, (F) tissue-engineered transplant assimilation/remodeling³⁵

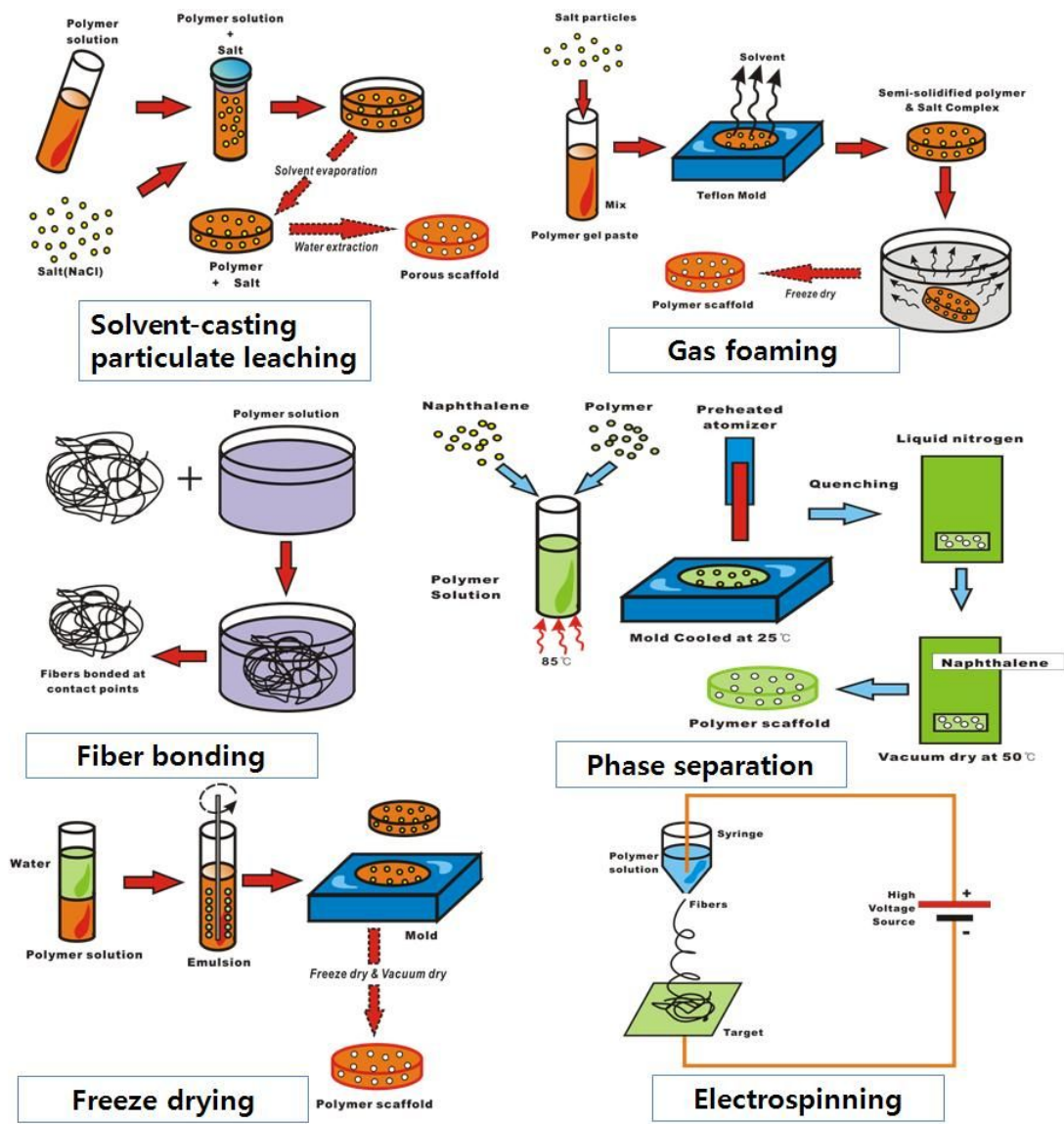


Figure 10. Conventional methods for scaffold fabrication⁹³

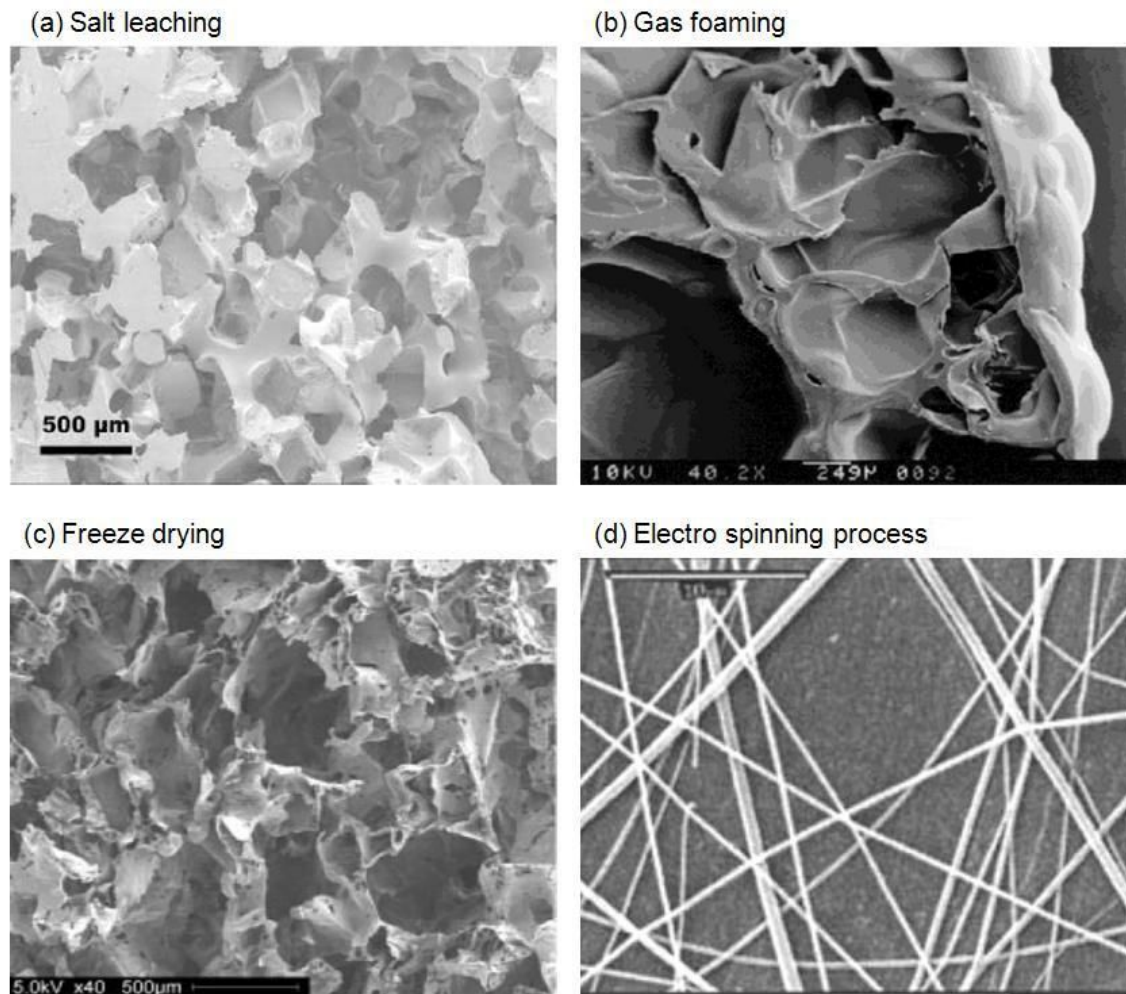


Figure 11. SEM photographs for various scaffolds (a) salt leaching process (PDLLA)⁹⁴ (b) gas foaming process (PLGA)⁹⁵ (c) freeze drying process (PDLLA)⁹⁶ (d) electrospinning process (PLGA)⁵⁸

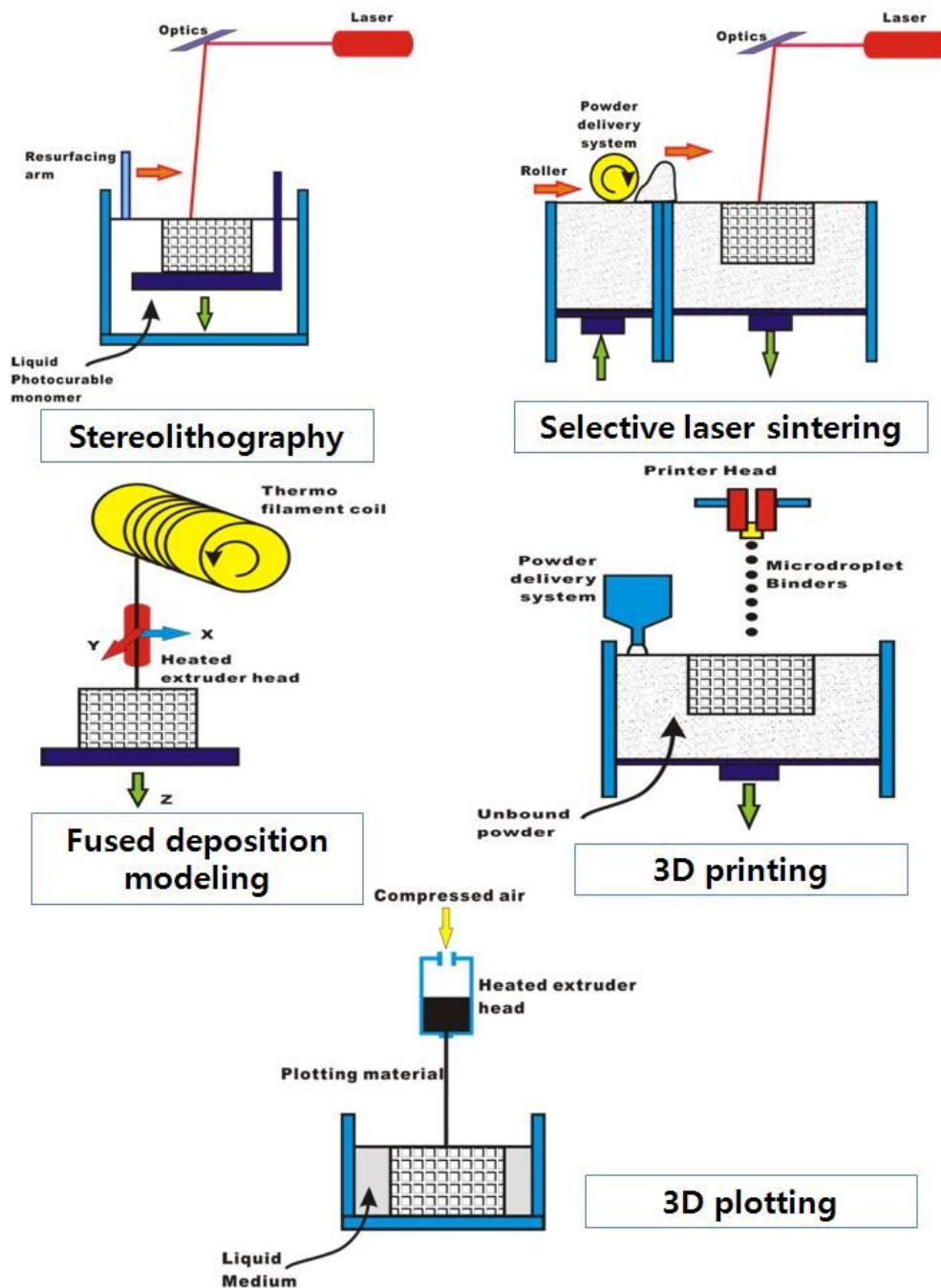
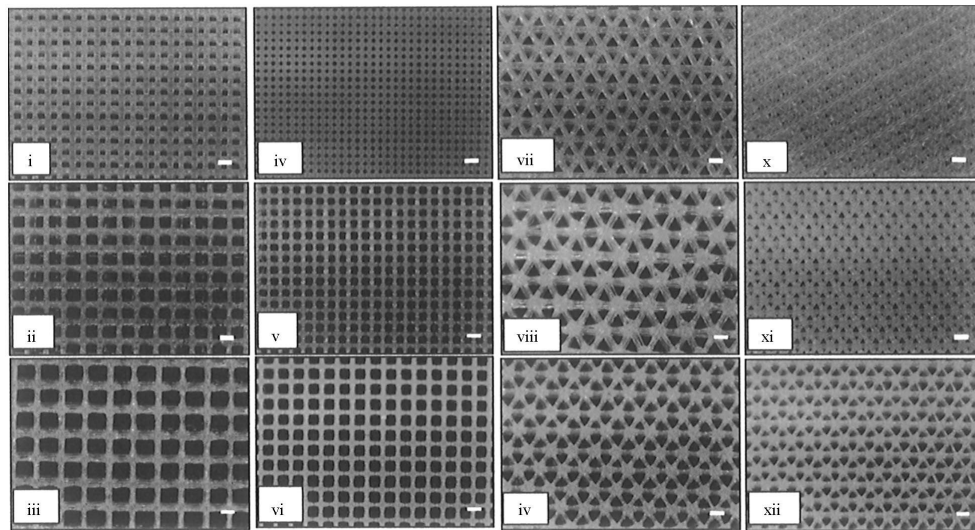
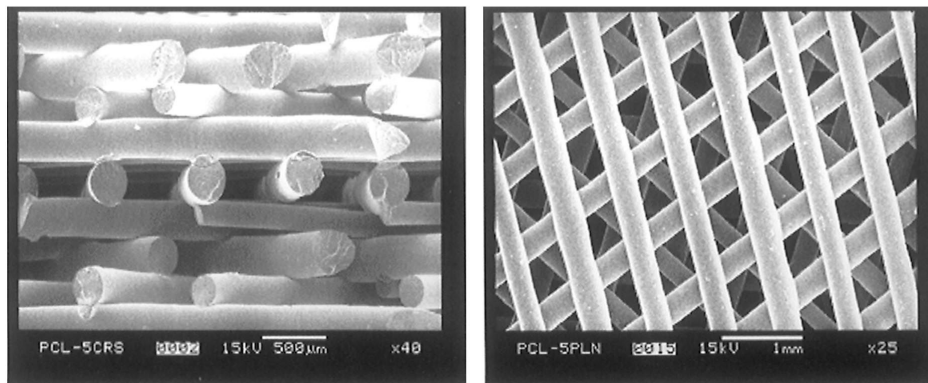


Figure 12. Solid freeform fabrication (SFF) for scaffold fabrication⁹³



(a)



(b)

Figure 13. (a) 3D scaffold systems of various porosity and pore geometry fabricated by FDM. Magnification $\times 7.5$, scale bar represents 1 mm. (i)–(iii) lay-down pattern: $0/90^\circ$ nozzle tip: 0.016", porosity: 50, 68, 75%; (iv)–(vi) $0/90^\circ$; 0.010"; 50, 68, 75%; (vii)–(viii) $0/60/120^\circ$; 0.016"; 68, 75%; (ix) $0/60/120^\circ$; 0.010"; 80%; (x)–(xii) $0/60/120^\circ$; 0.010"; 50, 68, 75%. (b) Left: cross-sectional view of freeze-fractured PCL scaffold with lay-down pattern $0/72/144/36/108^\circ$. Right: plan view of same specimen³⁵

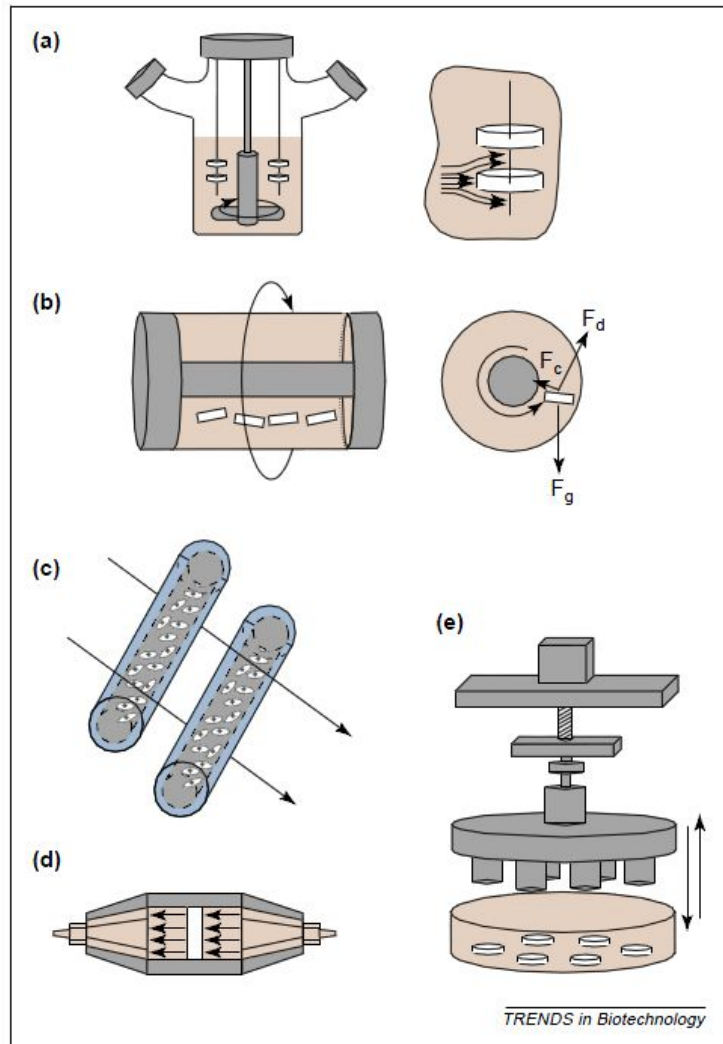
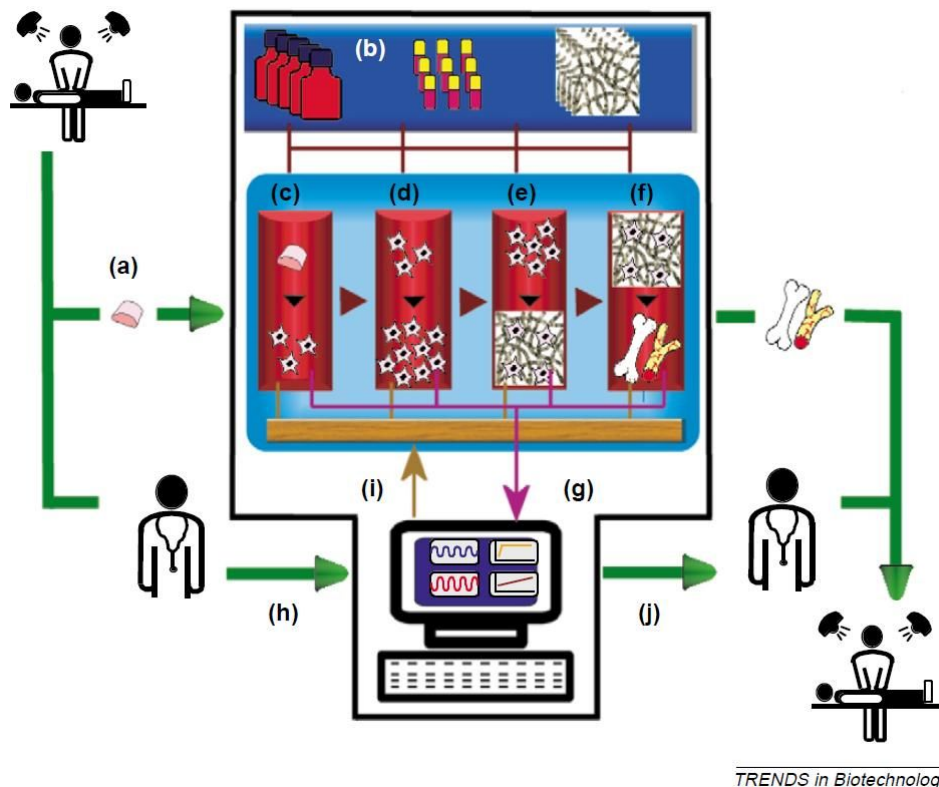


Figure 14. Representative bioreactors for tissue engineering applications.⁶⁶ (a) Spinner flask bioreactors have been used for the seeding of cells into 3D scaffolds and for subsequent culture of the constructs.⁸⁵ (b) Rotating-wall vessels provide a dynamic culture environment to the constructs, with low shear stresses and high mass-transfer rates.⁸⁶ (c) Hollow-fiber bioreactors can be used to enhance mass transfer during the culture of highly metabolic and sensitive cell types such as hepatocytes.⁸⁷ (d) Direct perfusion bioreactors in which medium flows directly through the pores of the scaffold can be used for seeding and/or culturing 3D constructs.⁸⁸ (e) Bioreactors that apply controlled mechanical forces, such as dynamic compression, to engineered constructs can be used as model systems of tissue development under physiological loading conditions, and to generate functional tissue grafts⁸⁹⁻⁹⁰



TRENDS in Biotechnology

Figure 15. Vision for a closed-system bioreactor for the automated production of tissue-engineered grafts. (a) The surgeon would take a biopsy from the patient and introduce it into the bioreactor located on-site at the hospital. (b) All reagents (e.g. culture medium, medium supplements, and scaffolds) would be stored in compartments under appropriate conditions (i.e. temperature, humidity). The bioreactor system could then (c) automatically isolate the cells, (d) expand the cells, (e) seed the cells onto a scaffold, and (f) culture the construct until a suitably developed graft is produced. (g) Environmental culture parameters and tissue development would be monitored and inputs fed into a microprocessor unit for analysis. In conjunction with data derived from clinical records of the patient (h), the inputs would be used to control culture parameters at pre-defined optimum levels automatically (i) and provide the surgical team with data on the development of the tissue, enabling timely planning of the implantation (j). Figure generated by M. Moretti⁶⁶

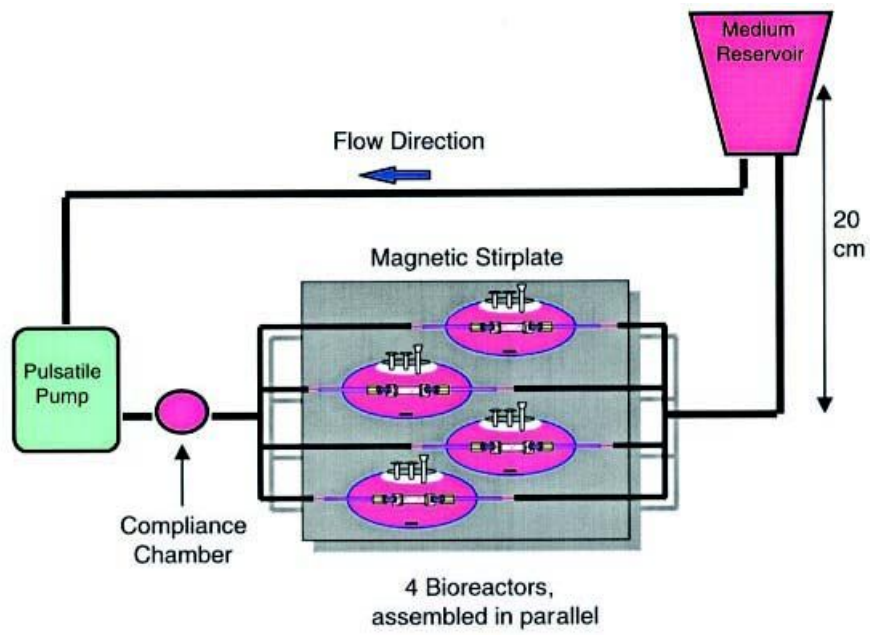


Figure 16. Biomimetic system for vessel culture⁷²

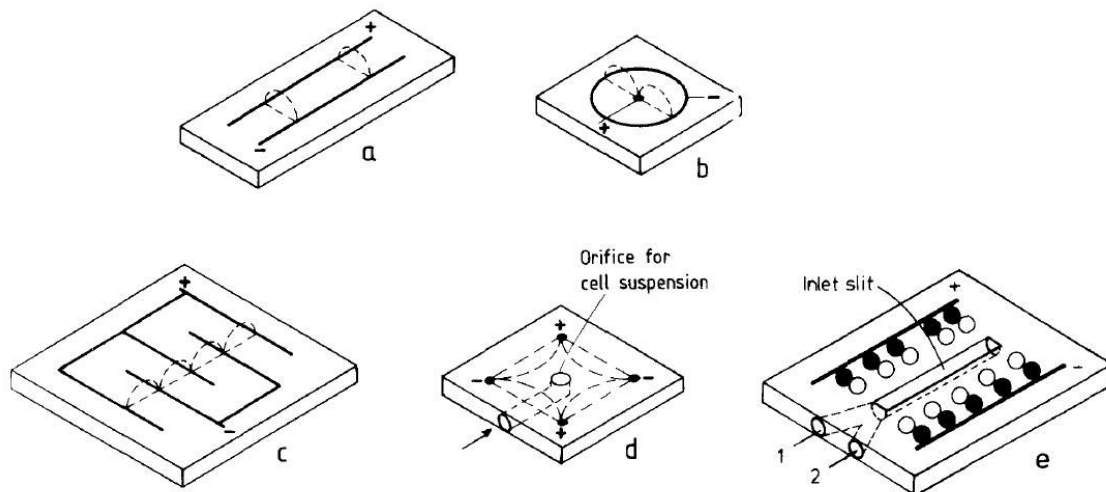


Figure 17. Set-up, used for electrically induced fusion (field-lines of the electric field). (a) Two cylindrical platinum wires are mounted in parallel on a slide. The gap between the two electrodes has to be matched to the size of the cells or vesicles to be fused. (b) Stronger divergence of the electric field can be achieved with a set-up in which a central wire is surrounded by an outer cylindrical electrode. (c) Electrode arrangement for the production of large amounts of fused cells. (d) Flow chamber system in which the cells enter centrally the gap between four electrodes, arranged crosswise. Cells move to the region of highest field intensity between the individual electrodes due to dielectrophoresis. (e) Flow chamber system for the production of cell hybrids of different species in high yield. Two highly diluted cell suspensions are successively sucked through the slit between the electrodes. The formation of cell pairs, consisting of species 1 (●) and species 2 (○) is favored¹⁰³

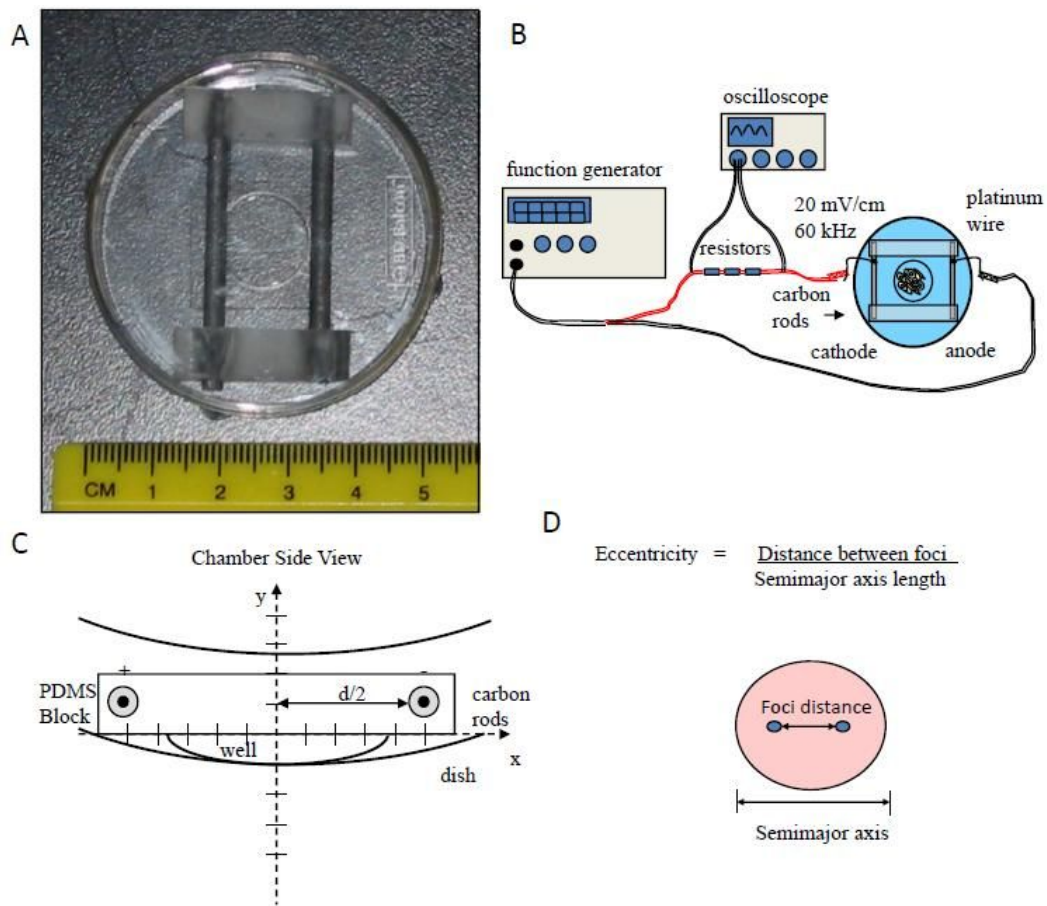


Figure 18. Chamber Design, Electric Field Setup and Strength Calculations. (a) Carbon electrode chamber design for capacitively coupled field (b) Electric field setup including function generator for power supply and oscilloscope for electric field strength verification (c) Chamber side view outlining chamber dimensions for field strength calculations (d) Cell dimensions for morphological assessment¹⁰⁴

제 3 장 골 조직 재생을 위한 다양한 세포담체의 제작 및 교류(AC)전기자극과 조골세포 활성화에 대한 영향

제1절 서 론

조직 공학은 손상된 조직을 대체, 재생시키기 위한 목적으로 향상된 세포 활성화에 적합한 세포담체의 제작, 다양한 성장인자의 제어 및 방출, 고효율의 바이오리액터 등 다양한 분야에 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히, 바이오리액터 시스템은 세포의 증식, 분화, 사이토카인(cytokine)의 방출, 세포외 기질(extracellular matrix)의 단백질 합성과 같은 세포의 활동 및 물리적/전기적인 자극과의 관계를 나타내기 위해, 다양한 자극 조건으로 연구가 행해지고 있다.¹⁻⁶

세포의 활성성을 향상시키기 위한 다양한 자극 중, 물리적 자극은 인체 조직의 뼈와 연골 재생을 위한 방법으로 다양한 연구를 통해 적용되었다. 조직에 손상을 입히지 않는 범위 내에서 외부로부터 뼈에 가해지는 물리적인 자극은 일반적인 생리학적 자극에 비해 골 조직 재생에 향상된 영향을 나타낸다. 이러한 물리적 자극은 골 특유의 기질 단백질과 콜라겐의 합성, 뼈의 주요 유기 화합물에 긍정적인 결과를 보여주며, 골세포의 증식, 세포의 운동성, 유전자 발현 등 세포 활동을 향상시키는데 다양한 영향을 준다.⁷

이러한 물리적인 자극으로 발생한 전단 응력은 세포 골격 및 인테그린(integrin)과의 상호작용, 성장인자의 신호 전달 활성화 등 세포에 가해지는 자극과 세포화의 관계에 긍정적인 역할을 하며 다양한 가설을 통해 설명되었다. R. A. Brown 연구팀의 보고에 따르면, 고리형태로 제작된 콜라겐 세포담체내에 진피 섬유아세포를 배양하면서 주기적인 인장 자극을 가하여 본래의 형상과 향상된 유전자 발현을 나타내었다.⁸⁻¹¹

마찬가지로 전기 및 자기와 같은 자극은 신경, 심장, 뼈와 연골, 근육 및 골격 등 다양한 조직에 적용되었다. 일반적으로 전기 자극은 혈관 생성의 촉진, 근육 세포의 재생, 줄기세포의 심장세포화, 심장근육세포의 발달된 형질을 포함한 세포의 다양한 활동을 장려하는 것으로 알려져 있다. 또한, 체외 실험에서 전기 자극은 조골세포의 높은 증식과 다양한 사이토카인(BMP-2, IGF-1, VEGF)의 발생을 유도한 것으로 나타났다.¹²⁻¹⁹

전기장에 의해 자극받은 세포의 활동은 세포막과 이온의 움직임에 의한 세포의 신호 경로를 변화시켜 증식, 분화, 세포의 움직임, 유전자 발현의 차이를 나타낸다. 또한, 낮은 진동수(frequency)에서의 전기적 자극은 세포 내의 칼슘 함유량을 증가 시키고, 세포

의 신호 경로를 제어함으로써 중간엽줄기세포(MSC : mesenchymal stem cell)의 증식과 분화에 영향을 미친다.²⁰⁻²⁴ 게다가, 뼈의 자연적인 전기적 특성의 발견 이후에는 뼈 골절 치료와 분화를 촉진하기 위해 내·외부의 전기적 활동의 결합이 소개되어졌다. 일정기간의 전기적 자극은 골격 조직 재생에 영향을 끼치며, 이러한 물리적 및 전기적 자극은 약물 및 화학 처리보다 생물학적 작용에 유리한 면을 가지고 있다.²⁵⁻²⁸

전기적 자극은 세포의 활동에 다양하고 긍정적 요인들을 제공하지만, 전기장의 세기(strength), 진동수(frequency), 지속시간, 자극을 가하는 방법, 적용 상태에 따라 부정적인 결과를 나타내기도 한다.^{3, 29} 특히, 높은 전기장의 세기나 부적절한 전기장의 상태는 세포의 손상을 발생시켜 활성산소(ROS : reactive oxygen species)를 배출하거나, 셀의 활동을 방해하는 열 충격 단백질을 생성하기도 한다.¹⁵ 이처럼 전기적 자극에 대해 세포의 다양한 반응을 긍정적인 영향으로 유도하기 위해 전기장의 다양한 범위 및 방법으로 많은 연구가 이루어지고 있다.^{15, 30-34}

Table.1 은 다양한 종류의 세포에 적용된 전기적인 자극을 요약한 표이다. Table.1에서 보는바와 같이, 대부분 넓지 않은 범위의 전기장 세기에서 연구가 이루어졌고, 전기 자극은 골 형성과 관련된 사이토카인(cytokine)의 생성 및 자가 치유 능력이 향상되었다.³⁵ 또한, 전기 자극과 관련된 대부분의 연구는 2개의 전극 사이에서 전기장의 세기, 진동수, 적용된 전기장의 형태, 세포 배양액 내 전해물의 영향 등의 효과에 집중되어있다.³⁵⁻³⁸

본 연구에서는 자유형상가공기술(SFF)을 이용하여 세 가지의 각기 다른 재료가 포함된 세포담체(PCL: pure PCL, P/C:PCL/CNT, P/T:PCL/TCP)(PCL: Poly(ϵ -caprolactone), TCP: tricalcium phosphate, CNT: carbon nanotubes)를 제작하여 전기 자극에 대한 효과를 관찰 하였다. 일반적으로 자유형상가공기술로 제작된 세포담체는 computer aided design system(CAD)에 의해 제어되어 높은 정확도와 반복성을 기반으로 마이크로(micro)크기의 공극(pore)과 지주(strut)을 제공하기 때문에 다양한 조직, 뼈, 피부, 연골 등 넓은 범위로 사용되었다.³⁹⁻⁴³

다양한 바이오세라믹 재료 중 TCP는 생체적합성, 생흡수성, 생리학적 환경에서의 골 전도성과 뼈의 무기물 단계에서의 화학적 유사성 때문에 임상에서 많은 사용이 이루어진다. 또한, 탄소 나노 튜브(CNT)는 높은 기계적인 강도와 신경 조직에 사용되는 세포담체 내에서의 전기 전도성, 섬유막과의 유사성 등 넓은 범위의 조직 재생 분야에서 사용되고 있다.⁴⁴⁻⁴⁸ 이처럼 다양한 분야에서 사용되는 SWCNT(single wall carbon nanotubes)와 β -TCP를 이용하여, 본 연구에서는 PCL을 기반으로 세 가지의 합성 세포담체를 제작 하였으며, PCL은 좋은 가공성과 생분해성을 가지고 있어 세포담체의 좋은 모체가 된다.

제작된 세포담체는 구조에 따른 세포 활동의 차이를 피하기 위해 균일한 3차원 형태의 구조를 가지고 있으며, 약 300~321 μ m의 공극의 크기와 53~55%의 공극률을 가지

고 있다. 또한, 교류(AC) 전기장 내에서 3차원적으로 상호 연결된 형태의 세포담체에 조골세포(osteoblast-like-cells: MG-63)를 배양하여 세포의 사멸과 증식, 골 분화도, 인산가수분해효소(ALP activity), 칼슘의 증착 정도를 관찰하였다.

제2절 실험

2.1 재료 및 세포담체 제작 방법

본 연구에서 사용된 세포담체의 재료는 PCL ($M_w = 80,000$, Melting temperature=60°C Sigma-Aldrich, USA), SWCNT (Sigma-Aldrich, USA), β -TCP (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. Fig.1 (a)는 제작 과정을 나타내는 그림으로 일반적인 용융-플로팅 시스템을 이용하여 순수 PCL, β -TCP (20wt%), SWCNT (0.2wt%)가 각각 혼합된 세포담체를 제작하였다. 용융 플로팅 시스템은 컴퓨터 제어가 가능한 3차원 이송 로봇(DTR3-2210-T-SG; DASA Robot, Korea)과 온도 제어기(AD-3000C; Ugin-tech, Siheung, South Korea), 압력 제어기(A502D, EST, South Korea)로 구성되어 있다.

세포담체를 제작하기 위한 첫 번째 공정으로, 생분해성 합성 고분자인 PCL과 β -TCP, SWCNT를 일정 비율로 혼합한 뒤, β -TCP, SWCNT의 균일한 분포를 위해 1차 동결 분쇄를 거쳐 실린더에서 110°C로 가열하였다. 녹인 P/C, P/T 파우더는 350 μ m의 노즐을 통해 격자 구조(layer-by-layer) 방식으로 토출하였으며, 제작을 위한 압축 공기 압은 600 \pm 30 kPa로 설정되었다. PCL과 β -TCP, SWCNT의 혼합물은 양이 증가할수록 점도가 증가하여, β -TCP와 SWCNT의 질량 분율(weight percent: wt%)는 극소 크기의 350 μ m 노즐을 통하여 제작하기 위한 최대 농도이다. 각각의 세포담체는 지주(strut) 및 공극(pore)의 크기를 제어하기 위해 PCL은 7 mm/s, P/C는 6.25mm/s, P.T는 5mm/s로 속도 변화를 주었으며, 위와 같은 과정을 통해 동일한 직경과 공극률을 가지는 세포담체를 제작할 수 있었다.

2.2 세포담체의 특성

각각 제작된 세포담체의 계층적 구조를 관찰하기 위해 Sputter coater (E-1030, Hitachi)로 60mA에서 5분 동안 7nm의 백금 코팅을 하였으며, 주사전자현미경 (S-4800, Hitachi)을 통하여 5kV의 조건하에 다양한 배율에서 관찰하였다. 또한, 세포담체의 공극(pore) 크기는 주사 전자 현미경 이미지로 측정된 지주(strut) 사이의 거리로 측정하였으며, 세포 배양 후 세포담체 내에 있는 세포의 표면을 관찰하기 위해 에너지 분산형 분석(EDS : energy-dispersive spectroscopy)을 하였다.

2.3 세포담체의 공극률 측정

제작된 세포담체의 공극률은 다음의 방정식에 의해 계산하였다.

$$\text{공극률}(\text{porosity}[\%]) = (1 - M/\rho V) \times 100$$

여기에서 M 은 세포담체의 질량, ρ 는 혼합된 재료의 밀도(PCL, SWCNT, β -TCP), V 는 세포담체가 가득 채워져있다는 가정하에서의 체적이다. 복합 재료를 사용하여 제작된 세포담체의 밀도를 계산하기 위해서 간단한 방정식을 추가 하여 계산하였다. 각각의 밀도는 PCL = 1.145, CNT = 1.8, TCP = 3.14 [g/cm³] 이다.

2.4 세포담체의 기계적 강도 측정

손상된 부위에 세포담체가 이식되어 조직이 재생되는 동안 유지하기 위한 적당한 기계적 강도를 가져야 한다. 세포담체는 5mm × 5mm × 2mm로 절단하여 시편으로 사용하였으며, 측정에 사용된 장비는 micro tensile tester(Top-tech 2000, Chemilab, Korea)를 사용하였다. 기계적 강도의 데이터는 10번의 독립적인 반복 실험을 통해 획득하였고, 모든 데이터는 단일 표준 편차 (SD : standard deviation) 값으로 나타내었다. 세포담체의 두께는 광학 현미경을 통해 다른 3부분의 점을 통해 측정하였으며, 이 값을 평균값을 사용하였다. 실온에서 2mm/s의 속도로 인장 하중을 가하여 Young's modulus를 측정하였다.

2.5 전기 자극을 위한 실험 설계

본 연구에서 제작된 바이오리액터 시스템은 Fig.1 (b)와 같이, 전기장이 적용 가능한 세포 배양 용기, 함수 발생기와 오실로스코프로 구성되어 있다. 세포 배양 용기의 크기는 10mm × 10mm × 8mm 로 평행한 전극이 용기 안에 삽입되어 있으며, 이 배양 용기는 자외선(UV : ultraviolet)과 70% EtOH로 살균 하였다. 실험에 사용된 조골세포(osteoblast-like-cells : MG-63)는 제작된 세포담체(6mm × 6mm × 2mm)에 1×10^5 cell / 50 μ l의 농도로 세포를 각각 접종(seeding)하였다. 배양된 세포담체는 초기 설계한 전기 자극을 가하였으며, Fig.1 (c)에 나타난 바와 같이, 2개의 서로 평행한 전극에서 전기 자극을 주었다. 자극을 위해 사용된 함수 발생기(function generator, WF1944B, NF Corp., Japan)에서 교류(AC) 전기 자극을 공급 하였으며, 가해진 전기장의 세기와 진동수는 세포의 손상을 최소화 하는 안정적인 범위로 table.1을 참고하여, 세기는 $55 \pm$

8 mV/cm, 진동수는 60Hz, 정현파(sinusoidal waveform)를 이용하였다. 전기 자극은 배양 후 세포담체에 세포를 안정하게 부착시키기 위해, 접종(seeding) 후 3일째부터 공급하였으며, 매일 30분씩 11일 동안 자극을 주었으며, 세포 배양액은 이틀마다 교체 하였다. 대조군으로는 각각의 세포담체에 동일한 양의 세포를 접종하여 전기 자극 없이 배양하였다.

2.6 P/T(PCL/ β -TCP) 세포담체의 칼슘 방출 실험

Ca⁺ 방출 실험은 세포를 배양하지 않는 P/T 세포담체를 PBS에 1, 3, 7일 동안 담가 놓은 뒤 PBS 용액의 농도를 ICP-MS(ICP-MS, DRC II, Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.7 Cell culture

실험에 사용된 조골세포(osteoblast-like-cells : MG-63, ATCC, Manassas, VA, USA)의 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Hyclone, Logan, UT, USA)를, 10% FBS(Hyclone)와 1% penicillin/streptomycin(Hyclone)를 첨가하여 사용하였으며, 제작된 세포담체를 절단하여 6 mm × 6mm × 2 mm에 1 × 10⁵cell/50 μ l 농도의 세포를 각각 접종(seeding)하고, 5% CO₂와 37°C incubator에서 배양하였다.

2.8 MTT assay

세포의 성장율은 MTT assay를 통해 1, 3, 4, 7, 14일차에 걸쳐 측정하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 Cell proliferation kit (Roche, Germany)를 사용하였으며, MTT labeling reagent를 통해 4h 동안 37°C CO₂ incubator에서 formazan을 형성시킨 후 solubilization buffer를 통해 24h 동안 formazan 결정을 용해하였다. 흡광도는 570 nm에서 ELISA reader(EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 또한 세포의 성장형태를 관찰하기 위하여 1, 3, 4, 7, 14일에 걸쳐 배양한 후 SEM을 통하여 성장형태를 관찰하였다.

2.9 Live/Dead cell analysis

14일 동안 배양되면서 전기 자극을 받은 세포담체내의 세포 생존률을 측정하기 위해, 0.15 mM calcein AM과 2 mM ethidium homodimer-1을 30분간 incubator에서 염색 반응 시켰다. 염색된 세포는 디지털 카메라(U-LS30-3, Olympus, Japan)와 결합된 형광 현미경(CKX41, Olympus, Japan)을 통해서 관찰 하였다. 촬영한 사진은 Image J(LIH, Bethesda, MD, USA) 프로그램을 통해 분석하였으며, 녹색은 생존, 붉은색은 사멸된 세포로 나타내었다. 프로그램을 이용하여 배양된 세포담체내에 있는 전체 세포 수를 생존한 세포 수의 비율로 계산하여 전기 자극이 없이 배양된 세포담체와 함께 표준화(normalize) 시켰다.

2.10 ALP activity analysis

7, 14일째 조골세포의 alkaline phosphatase (ALP) activity를 확인하기 위하여 조골세포가 seeding된 세포담체를 PBS로 세척하고, 0.1% triton X-100이 포함된 sodium carbonate buffer(25mM, pH10)로 30분 동안 incubation 시키고 p-nitrophenyl phosphate(p-NPP)이 들어있는 sodium carbonate buffer(250mM, pH 10)를 넣어 1시간 동안 반응 시킨 후 생성된 p-nitrophenol을 96-well plate에 옮겨 흡광도 405nm에서 측정 하였다. 측정된 OD 값은 총 단백질 함량(BCA)과 함께 표준화시켜 나타내었다.

2.11 Alizarin red-S staining

Calcium Mineralization의 정도를 확인 하기 위하여 alizarin red-S staining 방법을 사용 하였고, 조골세포를 vitamin C (50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate(10 mM)가 포함된 배양액에서 7, 14일 동안 세포를 키웠다. Calcium mineralization에 사용된 시약은 40mM alizarin red-s(PH 4.2)를 통하여 칼슘을 염색한 후 10mM sodium phosphate buffer + 10% cetylpyridium chloride으로 15분간 용해하였으며, 흡광도는 562nm에서 ELISA reader (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A)를 사용하여 측정 하였다. 또한 7, 14일에 걸쳐 배양한 세포담체를 40mM alizarin red-s를 통해 염색한 후 광학현미경(BX51, Olympus, Japan)으로 내부를 관찰하였다.

2.12 Total protein content

총 단백질 함량 분석은 bicinchoninic acid protein assay (BCA)를 이용하여 측정하였다. 7, 14일 동안 배양된 세포담체를 PBS에 세척하고, 0.1% triton X-100이 포함된 sodium carbonate buffer(25mM, pH10)로 용해시킨 뒤, 용해된 용액(25ml)과 BCA 시약(200 ml)을 혼합하여 30분동안 incubator에서 반응시켰다. 흡광도는 562nm에서 ELISA reader (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, U.S.A)를 사용하여 측정하였다.

제3절 결 과

3.1 세포담체의 제작과 특성

일반적으로 조직 재생을 위한 3차원 형태의 세포담체는 세포의 증식과 분화에 긍정적인 요인으로 작용을 한다.⁴⁹⁻⁵⁰ 3차원 형태의 세포담체는 마이크로 크기의 공극(pore)를 가져야 한다. 적절한 공극의 크기는 세포의 운동성과 골 성장을 촉진 시킬 수 있으며 또한, 공극률과 공극간의 상호 연결성(비틀림과 투과성)은 세포의 초기 부착력, 세포 분화도 및 기계적 특성에 까지 영향을 미친다.⁵¹⁻⁵⁵ 골 조직 재생을 위한 세포담체는 골 형성을 유도하고 혈관 형성을 원활하게 하는 200 μm 이상의 공극이 적절하며, 본 연구에서 세포담체는 앞서 설명한 세포의 활동성과 기계적 특성을 고려하여 300 μm 의 공극크기와 50%의 공극률로 제작하였다.^{39,56}

Fig.2 (a-c)는 제작된 세포담체(6mm \times 6mm \times 2mm) PCL, P/C, P/T의 광학 및 SEM 사진이다. 그림에 나타난 바와 같이, 지주(strut)는 초기 설계한 세포담체의 상호 연결된 공극을 갖추고 있으며, 동일한 형태로 제작한 것을 나타내었다. 본 연구에서 0.2wt%의 SWCNT를 사용하였으며, 0.2wt% 이상의 함유량은 PCL와 SWCNT 혼합물의 점도가 증가하여 압출 성형의 어려움 및 응집도가 발생하며, 동일한 이유로 β -TCP의 함유량 또한, 20wt%로 제한하였다.⁵⁷⁻⁵⁸

세포담체의 공극(pore) 크기는 주사 전자 현미경 이미지로 측정된 지주(strut) 사이의 거리로 측정하였으며, Fig.3(a, b)은 제작된 세포담체의 지주, 공극의 크기 및 공극률을 보여준다. 측정된 공극의 크기는 $313 \pm 12\mu\text{m}$ 이고, 공극률은 약 $53 \pm 2\%$ 를 나타낸다. 이 값들은 이론적으로 설계된 300 μm 와 55%의 공극 크기와 공극률은 일치하지 않지만, 압출 가공 오차(온도, 노즐의 크기, 노즐의 이동속도 등)를 고려하여 제작된 세포담체의 공극 크기와 공극률은 유사한 값을 나타낸다.

3.2 기계적 강도

적절한 기계적 강도는 세포담체의 중요한 요소이다. 손상된 뼈 조직에 이식되는 세포담체는 조직이 재생되는 과정 동안 새로운 조직을 유지할 수 있는 충분한 기계적 성질이 필요하며, 또한 이식되는 주변의 뼈와 유사한 기계적 강도를 가지고 있어야 한다.^{39,59} 일반적인 복합 이론에서 기계적 성질은 모체가 되는 재료와 분산되어져 있는 재료의 상호 관계 및 기하학적 형태에 의해 기계적 특성이 결정된다. 본 연구에서 사용된 SWCNT와 β -TCP는 분산재료로 기계적인 강도를 증가시켰다.

Fig.4 (a)는 제작된 세포담체(PCL, P/C, P/T)의 응력-변형률 선도(stress-strain curves)를 보여준다. 세포담체 제작의 주재료인 PCL은 일반적인 초기 탄성 영역과 높은 necking 영역을 나타낸다. 측정된 P/T 세포담체의 young's modulus는 순수한 PCL 세포담체보다 증가하였다. 하지만, P/C의 세포담체는 낮은 함유량(0.2wt%)으로 인해 순수한 PCL 세포담체보다 미소한 증가치를 나타내었지만 통계적으로 준하지 못한 결과를 나타내었다.

3.3 MTT assay를 통한 세포 증식

몇몇 연구에 의하면 부적절한 전기 자극은 세포의 높은 손상을 일으킬 수 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 여러 연구자들의 연구 결과를 참고(Table.1)하여 안정된 전기 자극으로 실험을 하였다. 전기 자극은 세포의 움직임과 세포 배양액에 미세한 흐름을 유도할 수 있기 때문에 각각의 세포담체에 조골세포(MG-63)를 접종하고 안정적인 부착기간인 초기 3일간은 전기 자극을 주지 않았다. 3일 이후부터는 접종된 세포담체에 교류(AC) 전기장을 매일 30분씩 공급하였으며, 전기장의 세기는 55 ± 8 mV/cm, 진동수는 60Hz를 가하였다.

Fig.5는 전기 자극을 주지 않는 세포담체의 MTT assay 결과를 나타낸다. 각각의 세포담체 모두 세포담체를 이루는 재료에 관계없이 증식이 이루어 졌으며, P/T 세포담체는 높은 증식률을 보여주지만, P/C 세포담체는 순수한 PCL로 이루어진 세포담체와 크게 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는, β -TCP가 PCL로 이루어진 세포담체(P/T)의 표면에서 세포의 증식을 증가시키는 생리활성 물질의 기능을 하였지만, SWCNT는 특별한 세포의 증식을 유도 하지 않는 것으로 판단된다. L. Pen의 연구팀에 의하면, PCL과 0.5 wt% CNT의 혼합비를 가진 세포담체가 분산된 CNT의 표면 거칠기에 의해 0.25, 1, 2 wt% 가 함유되어 있는 세포담체 보다 bone marrow derived stroma cells (BMSCs)의 높은 증식을 유도한다고 보고 하였다.⁵⁷ 이러한 관점에서 CNT가 혼합된 세포담체는 높은 세포의 증식을 유도하는 CNT 최적의 질량비가 존재 할 수도 있지만, 본 연구에서는 0.2 wt% 이상의 혼합량은 높은 점도로 인한 압출 성형의 어려움 때문에 SWCNT의 함유량을 0.2 wt%로 제한 할 수밖에 없었다.

Fig.6은 전기 자극 유무에 의한 세포담체의 MTT assay 결과를 나타낸다. 그림에 나타난 바와 같이, 전기 자극을 받은 세포담체가 그렇지 않고 배양된 세포담체에 비해 세포의 생존율이 약 8 ~ 15% 정도 감소하였다. 이러한 결과는 전기 자극을 세포담체에 공급하였을 때, 전기적인 힘이 세포 및 배양액의 불규칙한 움직임을 발생시켜 세포의 초기 부착 및 증식에 영향을 미친 것으로 판단한다. J. N. Mehrishi이 연구팀에 의하면, 대부분의 세포는 전기영동에 의한 1V/cm의 전기장 세기에 $1 \mu\text{m/s}$ 의 세포 이동성이 나타난다고 보고 하였다.^{60,61}

세포의 이동성은 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$\epsilon_0 \zeta / \eta$$

여기에서 ϵ_0 는 배양액의 유전율, η 는 배양액의 점도, ζ 는 제타 전위로 계면에 고정되는 이온층과 용액 내부의 전위차를 말한다.^{61,62}

3.4 전기 자극에 의한 MG-63 세포의 이동성

전기 자극에 의한 세포의 움직임에 대한 가정을 보충하기 위해 Fig.7 (a)의 그림과 같이 간단한 디자인을 설계하여 전기 자극에 의한 세포의 수축 및 이동성을 관찰하였다. 조골세포(MG-63)를 순수한 PCL plate에 접종하여 전기 자극 없이 12시간동안 배양 한 뒤, 전기 자극(55 ± 8 mV/cm, 60Hz)을 30분 동안 공급하였다. Fig.7 (b, c)는 전기 자극의 유무에 의한 세포의 광학 이미지이다. 그림에 나타난 바와 같이, 전기 자극이 가해지는 동안 세포가 수축하는 것을 확인 할 수 있었다. 간단한 실험을 기반으로, 우리는 전기 자극이 세포담체의 표면에 부착되어있는 세포의 수축 및 분리, 움직임으로 인해 세포의 생존율을 감소시킬 수 있다고 판단하였다. 하지만, 이러한 현상은 적용된 전기장의 상태, 화학/물리적 특성, 세포담체의 종류 등 다양한 조건에 영향을 받기 때문에 본 실험 제한적으로 나타났을 수도 있다.

본 실험과 유사한 결과는 일부의 연구에서 찾을 수 있었다. S. J. Hwang의 연구팀은 3차원 형태의 콜라겐 세포담체에 전기 자극을 가하고,⁶³ I. S. Kim의 연구팀은 hMSCs의 2차원 배양 시에 전기장을 가하였지만,¹⁹ 전기 자극의 유무에 의한 세포의 증식율을 유사하게 나타냈으며, 본 연구를 통해 전기 자극의 동전기적 힘(electrokinetic force)에 의해 세포의 증식이 영향을 받을 수 있다는 가정을 할 수 있었다.

3.5 Live/Dead cell analysis

Fig.8 (a-c)는 14일 동안 배양한 세포담체의 생존/사멸한 세포의 이미지를 나타내었다. 그림에 나타난 바와 같이, 전기 자극을 받은 세포담체는 그렇지 않은 세포담체에 비해 사멸 세포가 넓게 분포되어있으며, 이러한 현상은 세포의 증식율(MTT assay) 결과와 유사한 의미를 가지고 있을 것으로 판단된다. 하지만, Fig.8 (d)의 그래프를 통해 각각 세포담체(PCL, P/C, P/T) 중, P/T의 세포담체가 P/C와 PCL 세포담체에 비해 향상된 세포의 생존율을 얻을 수 있었다. 몇몇 연구자들에 의해 P/T 나노섬유와 젤라틴/TCP 나노섬유 또한 유사한 결과를 나타내었으며, 이러한 결과는 세포담체에 함유되어

져 β -TCP의 친수성과 β -TCP의 입자로 인한 거친 표면을 세포에 제공함으로써 세포와 세포담체간의 결합력(부착력)이 증가한 것으로 판단된다.^{64,65}

3.6 배양된 세포담체의 관찰 및 EDS 분석

Fig.9 (a-c)는 14일 동안 배양된 각각의 세포담체를 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 것이다. 전기 자극의 유무에 관계없이 대부분의 세포담체에서 세포의 고른 분포를 확일 할 수 있으며, 특히, P/T의 세포담체에서 세포의 밀도가 높게 관찰되었다. 세포담체에서 배양된 세포의 표면으로부터 칼슘(calcium)과 인(phosphorus)의 양을 EDS 분석을 통해 확인하였으며, Table.2를 통해 전기 자극을 받은 P/T 세포담체의 칼슘과 인의 양이 PCL, P/C의 세포담체보다 높은 결과를 얻을 수 있었다.

3.7 전기 자극, 세포 그리고 칼슘 이온의 관계

골 조직 재생을 위한 전기 자극은 체외 및 생체 내에서 적용되었으며, 많은 연구를 통해 기계적 및 전기적 자극이 세포의 활동에 영향을 미칠 수 있다고 보고되어졌다. 특히, 골아세포(osteoblasts) 계열의 세포에 교류 전기장을 적용하면 칼슘 석회화(calcium mineralization)가 크게 증가 하였다.^{28,37} 일반적으로 세포와 전기 자극과의 다양한 관계는 확실히 밝혀졌으며, 대부분의 생체 내에서 특별한 기능을 수행하는 메커니즘 중 세포의 신진대사는 다양한 이온 종류 중에 칼슘 이온이 가장 중요한 요소로 세포에 영향을 미친다는 것이다. 전기 자극은 전기-생리학에서 중요한 이온의 움직임을 일으키고, 이 이온들은 세포의 많은 효소계를 자극한다.⁶⁶ Fig. 10⁶⁷은 전기 자극에 의한 collagen I, osteonectin, osteocalcin, 골 석회화 등의 다양한 세포의 활성을 나타낸 계략적인 그림이다.³⁷

세포와 전기 자극간의 이론을 바탕으로, 칼슘 이온은 세포의 활성화에 두드러지는 역할을 한다. 이러한 이유로 P/T 세포담체를 FBS 용액에 담가 칼슘 이온의 방출을 관찰하였다. Fig.11에 나타난 바와 같이, P/T 세포담체가 FBS 용액에 장시간 담겨 있을수록 칼슘 이온의 양도 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로, P/T 세포담체로부터 방출된 칼슘이온이 PCL과 P/C 세포담체 보다 ECM의 높은 칼슘 석회화로 유도한 것을 예상할 수 있었다.

또한, P/T 세포담체에서 방출한 칼슘 이온과 세포, 전기자극의 효과를 관찰하기 위해 다양한 함량(0, 0.05, 0.1 wt%) 의 β -TCP를 세포 배양액에 첨가하고, 전기 자극을 가하여 세포의 이동성을 나타내는 광학 이미지를 측정하였다. Fig.12 (a-c)는 Fig.7 (a)에서 나타난 실험과 동일한 방법을 사용하였으며, β -TCP를 미량 첨가하였다.

Fig.12 (d)는 세포의 수축률을 나타내는 그래프로 측정된 광학 이미지를 computer aided design(CAD, AutoCAD 2009 ver.)을 이용하여 측정하였으며, 세포의 수축은 β -TCP의 함유량이 증가할수록 많은 수축이 일어났다.

3.8 골 분화도 측정 (ALP activity, ARS-staining)

Fig.13 (a, b)는 전기 자극을 받은 세포담체의 ALP activity와 calcium deposition 결과이다. 알카라인 포스파타제(ALP)의 활성화는 골 분화의 중요한 초기 표적이며, Alizarin red-S(ARS) staining을 통하여 칼슘의 증착을 확인 하였다. ARS는 칼슘 및 석회화된 세포외 기질과 반응하여 붉은색으로 나타나며, P/T 세포담체의 β -TCP 입자의 영향을 방지하기 위해 세포를 배양하지 않는 P/T 세포담체를 배양액에 담가 7, 14일 동안 배양 공정을 동일하게 진행하였으며, ARS staining 또한, 동일한 방법으로 진행하였다. 동일한 조건에서 세포가 없이 준비한 P/T 세포담체의 OD 값을 측정하여 세포가 배양된 세포담체의 OD 값에서 차감하였으며, ALP activity 및 calcium deposition은 총 단백질 함량 분석(BCA)과 함께 표준화 시켰다.[Table.3]

Fig.13 (c)에서 보이는 것과 같이, 전기 자극을 가한 세포담체가 일반적인 배양법으로 배양한 세포담체보다 ALP activity와 calcium deposition이 향상 되었으며, 특히, P/T 세포담체에서 크게 향상된 결과를 나타내었다. 7, 14일 동안의 calcium deposition 결과는 Fig. 14 (a-c)의 ARS staining 사진을 통해서도 확인 하였다. 다양한 세포실험을 통해 전기 자극을 받은 P/T 세포담체에서 골 재생을 위한 ALP와 calcium deposition의 향상된 결과를 도출할 수 있었다.

제4절 결론

본 논문에서는 다양한 합성 고분자로 이루어진 세포담체에 전기 자극을 가하여 세포의 활성화와 분화에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해 이론 및 실험적으로 규명하였다. PCL, β -TCP, SWCNT를 이용하여 균일한 공극크기(300~321 μm)와 공극률(53~55%)을 가진 3차원 형태의 세포담체를 제작하고, 교류(AC) 전기 자극을 가하여 세포의 활성화 및 증식, 골 석회화 등을 관찰하였다. 세포담체에 공급되어진 전기적 자극은 55 ± 8 mV/cm, 진동수는 60Hz, 정현파(sinusoidal waveform)를 이용하였다. 다양하게 제작된 세포담체(PCL, P/C, P/T)중 PCL/ β -TCP 20wt% 로 구성된 세포담체가 전기 자극을 통해 높은 골 형성을 보여주었다. 이러한 결과는 전기 자극 내에서 β -TCP의 이온이 보다 효과적으로 세포에 긍정적인 영향을 나타냈으며, 전기적 자극의 효율을 향상 시킬 수 있는 물질로 구성된 세포담체를 찾을 수 있었다. 골 조직 재생을 위한 세포실험으로 MTT assay, Live/Dead cell analysis, ALP activity, calcium deposition을 통해 세포의 생존/사멸, 증식, 골 분화율을 전기장의 유무에 따라 비교 분석 하였다. 이러한 결과를 토대로 전기적 자극은 다양한 세포담체에 적용 될 수 있으며, 세포의 증식과 분화에 영향을 주는 중요한 잠재요인임을 확인하였다.

제5절 참 고 문 헌

1. M. T. Tsai, W. H. S. Chang, K. Chang, R. J. Hou, T. W. Wu, Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *Bioelectromagnetics*, 28, 519-528, 2007
2. D. Ciombor, R. Aaron, The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot Ankle Clin*, 10, 579-593, 2005
3. L. Khatib, D. E. Golan, M. R. Cho, Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts. *FASEB J*, 18, 1903-1905, 2004
4. L. C. Kloth, Physical modalities in wound management: UVC, therapeutic heating and electrical stimulation. *Ostomy Wound Manage*, 41, 18-26, 1995
5. L. J. Walsh, The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue application. *Aust Dent J*, 42, 247-254, 1997
6. J. Rubin, C. Rubin, C. R. Jacobs, Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*, 367, 1-16, 2006
7. H. P. Wiesmann, U. Joos, U. Meyer, Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33, 523-530, 2004
8. T. Ogata, Fluid flow-induced tyrosine phosphorylation and participation of growth factor signaling pathway in osteoblast-like cells. *J Cell Biochem*, 76, 529-538, 2000
9. R. S. Carvalho, J. L. Schaffer, L. C. Gerstenfeld, Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: Demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J Cell Biochem*, 70, 376-390, 1998
10. C. D. Toma, S. Ashkar, M. L. Gray, J. L. Schaffer, L. C. Gerstenfeld, Signal Transduction of Mechanical Stimuli Is Dependent on Microfilament Integrity: Identification of Osteopontin as a Mechanically Induced Gene in Osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 12, 1626-1636, 1997
11. R. A. Brown, R. Prajapati, D. A. McGrouther, I. V. Yannas, M. Eastwood, Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: Mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. *J Cell Physiol*, 175, 323-332, 1998
12. M. Zhao, H. Bai, E. Wang, J. V. Forrester, C. D. McCaig, Electrical stimulation

- directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci*, 117, 397-405, 2004
13. H. Kern, S. Salmons, W. Mayr, K. Rossini, U. Carraro, Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle Nerve*, 31, 98-101, 2005
 14. M. Mödlin, C. Forstner, C. Hofer, W. Mayr, W. Richter, U. Carraro, F. Protasi, H. Kern, Electrical Stimulation of Denervated Muscles: First Results of a Clinical Study. *Artif Organs*, 29, 203-206, 2005
 15. E. Serena, E. Figallo, N. Tandon, C. Cannizzaro, S. Gerecht, N. Elvassore, G. Vunjak-Novakovic, Electrical stimulation of human embryonic stem cells: Cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species. *Exp Cell Res*, 315, 3611-3619, 2009
 16. G. Vunjak-Novakovic, K. O. Lui, N. Tandon, K. R. Chien, Bioengineering Heart Muscle: A Paradigm for Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng*, 13, 245-267, 2011
 17. H. T. H. Au, I. Cheng, M. F. Chowdhury, M. Radisic, Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes. *Biomaterials*, 28, 4277-4293, 2007
 18. I. S. Kim, J. K. Song, Y. L. Zhang, T. H. Lee, T. H. Cho, Y. M. Song, D. K. Kim, S. J. Kim, S. J. Hwang, Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 907-916, 2006
 19. I. S. Kim, J. K. Song, Y. M. Song, T. H. Cho, T. H. Lee, S. J. Kim, S. J. Hwang, Novel Effect of Biphasic Electric Current on In Vitro Osteogenesis and Cytokine Production in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*, 15, 2411-2422, 2006
 20. T. D. Brown, Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics*, 33, 3-14, 2000
 21. M. Levin, Bioelectromagnetics in morphogenesis. *Bioelectromagnetics*, 24, 295-315, 2003
 22. S. Sun, I. Titushkin, M. Cho, Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry*, 69, 133-141, 2006
 23. R. Piacentini, C. Ripoli, D. Mezzogori, G. B. Azzena, C. Grassi, Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of

- Cav1-channel activity. *J Cell Physiol*, 215, 129-139, 2008
24. R. Aaron, D. Ciombor, Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *J Orthop Res*, 14, 582-589, 1996
 25. J. Gan, P. Glazer, Electrical stimulation therapies for spinal fusions: current concepts. *Eur Spine J*, 15, 1301-1311, 2006
 26. L. S. Lavine, A. J. Grodzinsky, Electrical stimulation of repair of bone. *J Bone Joint Surg Am*, 69A, 626-630, 1987
 27. C. T. Brighton, W. Wang, R. Seldes, G. H. Zhang, S. R. Pollack, Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg Am*, 83A, 1514-1523, 2001
 28. Q. Wang, S. Zhong, J. Ouyang, L. Jiang, Z. Zhang, Y. Xie, S. Q. Luo, Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions. *Clin Orthop and Rel Res*, 348, 259-268, 1998
 29. M. R. Cho, A review of electrocoupling mechanisms mediating facilitated wound healing. *IEEE Trans Plasma Sci*, 30, 1504-1515, 2002
 30. M. Hronik-Tupaj, W. L. Rice, M. Cronin-Golomb, D. L. Kaplan, I. Georgakoudi, Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. *Biomed Eng online*, doi:10.1186/1475-925X-10-9, 2011
 31. R. J. Fitzsimmons, S. L. Gordon, J. Kronberg, T. Ganey, A. A. Pilla, A pulsing electric field (PEF) increases human chondrocyte proliferation through a transduction pathway involving nitric oxide signaling. *J Orthop Res*, 26, 854-859, 2008
 32. S. D. McCullen, J. P. McQuilling, R. M. Grossfeld, J. L. Lubischer, L. I. Clarke, E. G. Loba, Application of Low-Frequency Alternating Current Electric Fields Via Interdigitated Electrodes: Effects on Cellular Viability, Cytoplasmic Calcium, and Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part C*, 16, 1377-1386, 2010
 33. U. Zimmermann, J. Vienken, Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membrane Biol*, 67, 165-182, 1982
 34. C. H. Lohmann, Z. Schwartz, Y. Liu, H. Guerkov, D. D. Dean, B. Simon, B. D. Boyan, Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res*, 16, 637-646, 2000
 35. R. K. Aaron, D. M. Ciombor, B. J. Simon, Stimulation of Growth Factor

- Synthesis by Electric and Electromagnetic Fields. *Clin Orthop Relat Res*, 419, 30-37, 2004
36. K. Hammerick, A. James, Z. Huang, F. Prinz, M. Longaker, Pulsed Direct Current Electric Fields Enhance Osteogenesis in Adipose-Derived Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*, 16, 917-931, 2010
 37. P. R. Supronowicz, P. M. Ajayan, K. R. Ullmann, B. P. Arulanandam, D. W. Metzger, R. Bizios, Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *J Biomed Mater Res*, 59, 499-506, 2002
 38. C. Britgton, S. Pollack, Treatment of recalcitrant non-union with a capacitively coupled electrical field. A preliminary report. *J Bone Joint Surgery*, 67, 577-585, 1985
 39. S. J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4, 518-524, 2005
 40. E. Sachlos, J. T. Czernuszka, Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Euro Cells and Mater*, 5, 29-40, 2003
 41. D. W. Hutmacher, M. Sittinger, M. V. Risbud, Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*, 22, 354-362, 2004
 42. H. Lee, G. H. Kim, Three-dimensional plotted PCL/ β -TCP scaffolds coated with a collagen layer: preparation, physical properties and evaluation for bone tissue generation. *J Mater Chem*, 21, 6305-6312, 2011
 43. G. H. Kim, S. H. Ahn, H. J. Lee, S. Y. Lee, Y. Cho, W. Chun, A new hybrid scaffold using rapid prototyping and electrohydrodynamic direct writing for bone tissue regeneration. *J Mater Chem*, 21, 19138-19143, 2011
 44. C. P. A. T. Klein, A. A. Driessen, K. de Groot, A. van den Hooff, Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res*, 17, 769-784, 1983
 45. A. Ravaglioli, A. Krajewski, (1992) *Bioceramics: materials, properties, applications*. (Chapman and Hall, London)
 46. A. Cuneyt Tas, F. Korkusuz, M. Timucin, N. Akkas, An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*, 8, 91-96, 1997

47. B. L. Behan, D. G. DeWitt, D. R. Bogdanowicz, A. N. Koppes, S. S. Bale, D. M. Thompson, Single-walled carbon nanotubes alter Schwann cell behavior differentially within 2D and 3D environments. *J Biomed Mater Res Part A*, 96A, 46-57, 2011
48. N. Saito, Y. Usui, K. Aoki, N. Narita, M. Shimizu, K. Hara, N. Ogiwara, K. Nakamura, N. Ishigaki, H. Kato, S. Taruta, M. Endo, Carbon nanotubes: biomaterial applications. *Chemical Society Reviews*, 38, 1897-1903, 2009
49. J. E. Frith, B. Thomson, P. G. Genever, Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C*, 16, 735-749, 2010
50. E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, K. M. Yamada, Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 294, 1708-1712, 2001
51. P. Kasten, I. Beyen, P. Niemeier, R. Luginbühl, M. Böhner, W. Richter, Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study. *Acta Biomaterialia*, 4, 1904-1915, 2008
52. C. B. Khatriwala, S. R. Peyton, A. J. Putnam, Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290, C1640-C1650, 2006
53. T. Mygind, M. Stiehler, A. Baatrup, H. Li, X. Zou, A. Flyvbjerg, M. Kassem, C. Bønder, Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, 28, 1036-1047, 2007
54. J. L. Simon, T. D. Roy, J. R. Parsons, E. D. Rekow, V. P. Thompson, J. Kemnitzer, J. L. Ricci, Engineered cellular response to scaffold architecture in a rabbit trephine defect. *J Biomed Mater Res A*, 66A, 275-282, 2003
55. D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000
56. F. M. Klenke, Y. Liu, H. Yuan, E. B. Hunziker, K. A. Siebenrock, W. Hofstetter, Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res A*, 85A, 777-786, 2008
57. L. Pan, X. Pei, R. He, Q. Wan, J. Wang, Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 226-234, 2012
58. M. Mattioli-Belmonte, Tuning polycaprolactone-carbon nanotube composites for bone tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C*, 32, 152-159, 2012

59. D. E. Discher, P. Janmey, Y. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310, 1139–1143, 2005
60. J. N. Mehrishi, J. Bauer, Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge. *Electrophoresis*, 23, 1984–1994, 2002
61. L. Voldman, Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu Rev Biomed Eng*, 8, 425–454, 2006
62. M. J. Desai, D. W. Armstrong, Separation, Identification, and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 38–51, 2003
63. S. J. Hwang, Y. M. Song, T. H. Cho, R. Y. Kim, T. H. Lee, S. J. Kim, Y-K. Seo, I. S. Kim, The implications of the response of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture to electrical stimulation for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*, 18, 432–445, 2012
64. C. Erisken, D. M. Kalyon, H. J. Wang, Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 29, 4065–4073, 2008
65. X. Zhang, Q. Cai, H. Liu, S. Zhang, Y. Wei, X. Yang, Y. Lin, Z. Yang, X. Deng, Calcium ion release and osteoblastic behavior of gelatin/beta-tricalcium phosphate composite nanofibers fabricated by electrospinning. *Materials Letters*, 73, 172–175, 2012
66. P. T. Lynch, M. R. Davey, *Electrical manipulation of cells*. (Chapman and Hall, NewYork), 1996
67. L. Vodovnik, D. Miklavcic, G. Sersa, Modified cell proliferation due to electrical currents. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 30, CE21–CE28, 2009
68. Y. Gotoh, K. Hiraiwa, M. Nagayama, In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Miner*, 8, 239–250, 1990
69. A. Soda, T. Ikehara, Y. Kinouchi, K. Yoshizaki, Effect of exposure to an extremely low frequency- electromagnetic field on the cellular collagen with respect to signaling pathways in osteoblast-like cells. *J Med Invest*, 55, 267–278, 2008
70. B. Ercan, T. J. Webster, The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces. *Biomaterials*, 31, 3684–3693, 2010
71. M. T. Tsai, W. J. Li, R. S. Tuan, W. H. Chang, Modulation of osteogenesis in

- human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *J Orthop Res* 27, 1169–1174, 2009
72. S. Meng, Z. Zhang, M. Rouabhia, Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. *J Bone Miner Metab*, 29, 535–544, 2011
73. L. Fassina, L. Visai, F. Benazzo, L. Benedetti, A. Calligaro, M. G. C. D. Angelis, A. Farina, V. Maliardi, G. Magenes, Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold. *Tissue Eng*, 12, 1985–1999, 2006
74. S. Sun, Y. Liu, S. Lipsky, M. Cho, Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *FASEB J*, 21, 1472–1480, 2007

Table 1. Researches for various electric stimulations on diverse cells

Electric field conditions	Cell-types	Results
Extremely low frequency–electromagnetic field (ELF–EMF : 3 mT, 60 Hz) ^[69]	Mouse osteoblast–like cells (MC3T3–E1)	ALP (ERK1/2; PD98059) ↑ Sirius red (collagen detection) ↑
AC electric field (Interdigitated electrodes) 1 V/cm, 1 Hz (4 h/day for 14 days) ^[32]	Human adipose–derived stem cells (hASCs)	Calcium deposition ↑ <u>* 100 V/cm damage,</u> <u>1000 V/cm dead.</u>
AC electric field (parallel electrodes, carbon rods) 20 mV/cm, 60 kHz (40 min/day for 28 days) ^[30]	Human mesenchymal stem cells (hMSCs)	ALP mRNA, Collagen I mRNA ↑ <u>Hsp27, 70 mRNA</u> <u>(Heat shock protein) ↑</u>
Single electric field (parallel electrodes) Square wave electric pulses 1 V/mm(1 or 90s) after 4 days (10 V/cm for 5ms, at 1 Hz) ^[15]	Human embryonic stem cells (hESCs)	<u>Reactive oxygen species (ROS) ↑</u>
DC electrical stimulation (parallel electrodes) 15 V, current density : 4.2 A/m ² (1 h/day for 3 weeks) ^[70]	Osteoblasts (CEL–11372, American Type Culture Collection)	ALP, Calcium deposition ↑ (3 week)
Pulsed electromagnetic fields (PEMFs) single quasi–rectangular pulses 300 ms, 7.5 Hz Electric fields : 2 mV/cm, 0.13 mT ^[71]	Human mesenchymal stem cells (hMSCs)	ALP ↑ (early) <u>Collagen GAPDH ↓</u>
Multiple electrical stimulation 2 V/cm (6 h/day for 4 weeks) ^[72]	SAOS–2 cells (ATCC, Manassas, VA)	ALP, Calcium deposition ↑ ALP, BMP2, Runx2, OC ↑ (Gene expression)
Pulsed electromagnetic fields (PEMFs) 75 ± 2 Hz, 5 ± 1 mV, 2 ± 0.2 mT (24 h/day for 22 days) ^[73]	SAOS–2 cells (ATCC, HTB85, MD)	Decorin, Osteocalcin, Osteopontin ↑ collagen I , III ↑ (Gene expression)
Biphasic electric current stimulates (BEC) 1.5 uA/cm ² at3000pulses/s (6 h/day and 24 h/day for 4days) ^[18]	Rat calvarial osteoblasts	Cell proliferation ↑ (31%)
Biphasic electric current stimulates (BEC) 1) 250us, 1.5 uA/cm ² at100pulses/s 2) 25us, 15 uA/cm ² at100pulses/s ^[19]	Human mesenchymal stem cells (hMSCs)	Cell proliferation, ALP, Calcium deposition ↑
Electrical stimulation (30 min/day) 1) DC : 0.1 V/cm, 1 V/cm, 10 V/cm 2) AC : 1 V/cm – 1Hz ^[74]	Human mesenchymal stem cells (hMSCs)	ALP, Oseteocalcin, Collagen I (Gene expression) ↑ cell density, ALP ↑

Table 2. EDS for 14 days culture PCL, P/C and P/T scaffolds for control and E-field

EDS [%] 14 days culture	Control (No-field)		E-field	
	Calcium (Ca)	Phosphate (P)	Calcium (Ca)	Phosphate (P)
PCL	0.16 ± 0.04	0.84 ± 0.44	0.21 ± 0.07	1.26 ± 0.37
P/C	0.15 ± 0.03	1.02 ± 0.24	0.27 ± 0.10	1.21 ± 0.33
P/T	0.36 ± 0.14	1.58 ± 0.38	0.51 ± 0.17	1.72 ± 0.57

Table 3. Total protein content for PCL, P/C and P/T scaffolds for culturing MG-63 for 7 and 14 days

Total protein content [mg]	7 days		14 days	
	Control (No-field)	E-field	Control (No-field)	E-field
PCL	43.1 ± 9.1	34.6 ± 6.2	53.7 ± 4.7	45.8 ± 7.2
P/C	40.1 ± 4.2	30.6 ± 5.3	56.1 ± 8.6	41.3 ± 9.2
P/T	45.8 ± 2.6	39.4 ± 12.8	64.2 ± 4.6	55.8 ± 7.1

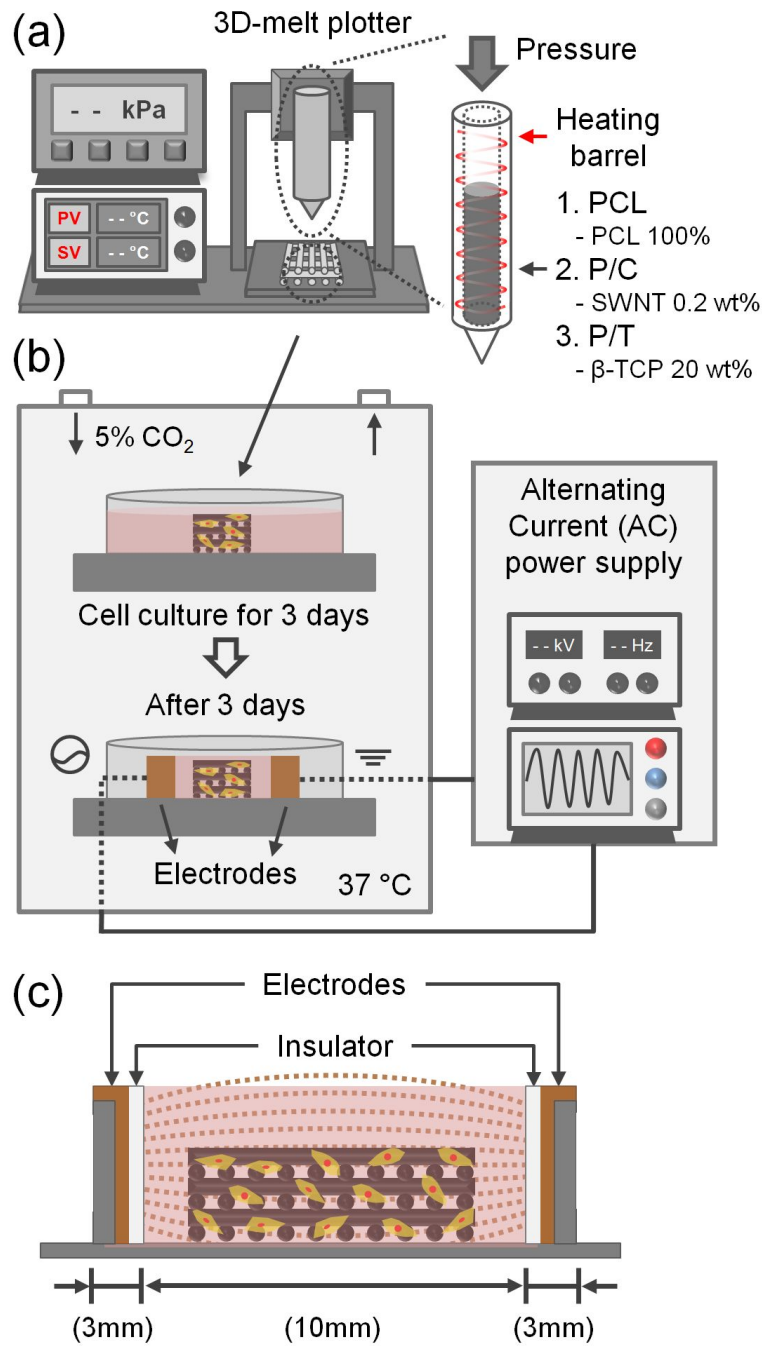


Figure 1. Schematics for (a) fabricating solid-freeform fabricated scaffolds consisted of PCL, SWNT, and β -TCP, (b) electric stimulation with an AC electric field, and (c) a lab-made culture plate with a parallel electrode.

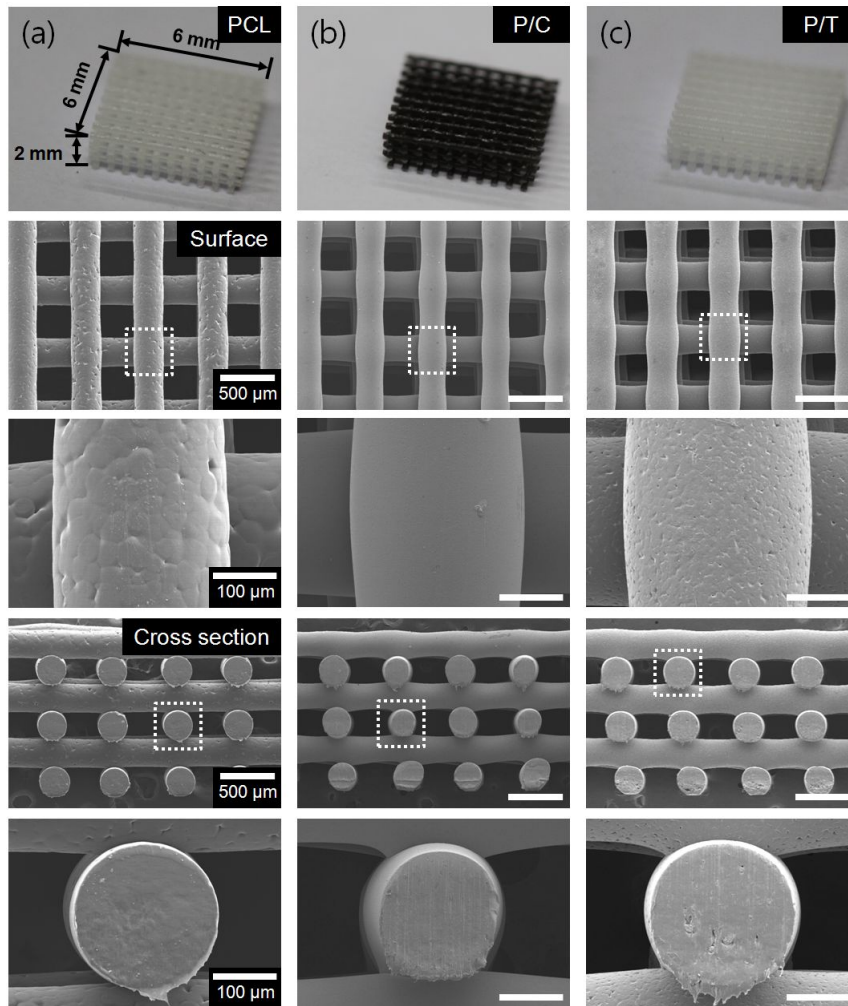


Figure 2. Optical and surface and cross-sectional SEM micrographs for three fabricated scaffolds, (a) pure PCL, (b) P/C (PCL/SWCNT), and (c) P/T (PCL/ β -TCP).

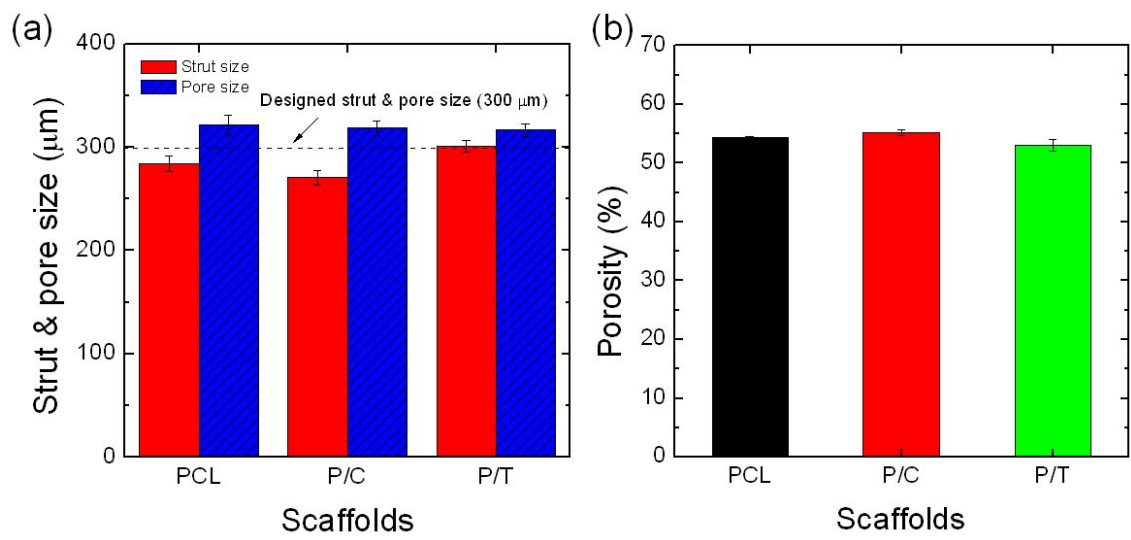


Figure 3. (a) Strut and pore size and (b) porosity for fabricated scaffolds (pure PCL, P/C, and P/T).

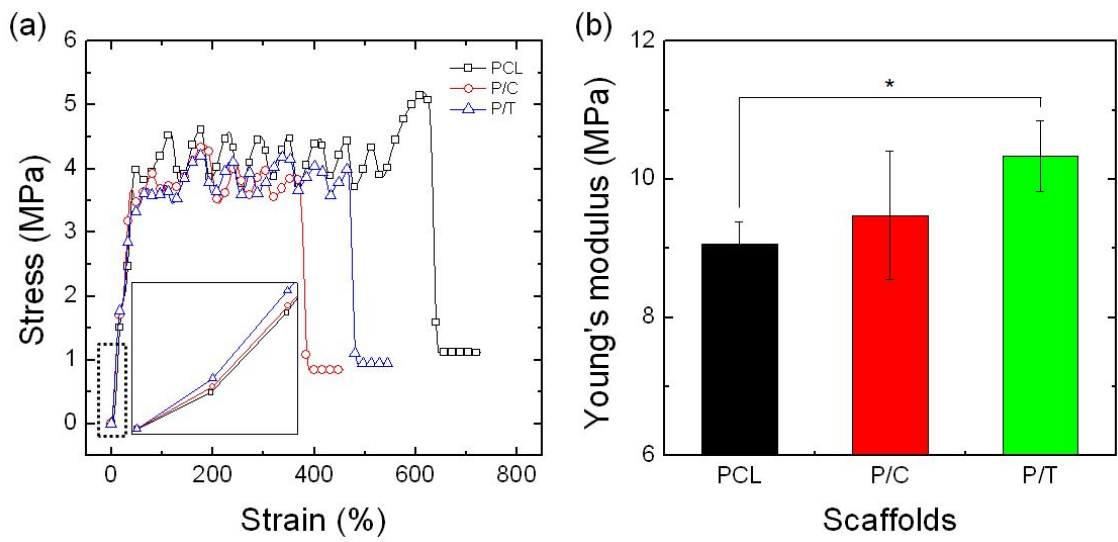


Figure 4. (a) Stress - strain curves and (b) Young's modulus for pure PCL, P/C, and P/T at 2 mm/s. The inset figure shows a magnified area of the curves. *P < 0.05 indicates a significant difference.

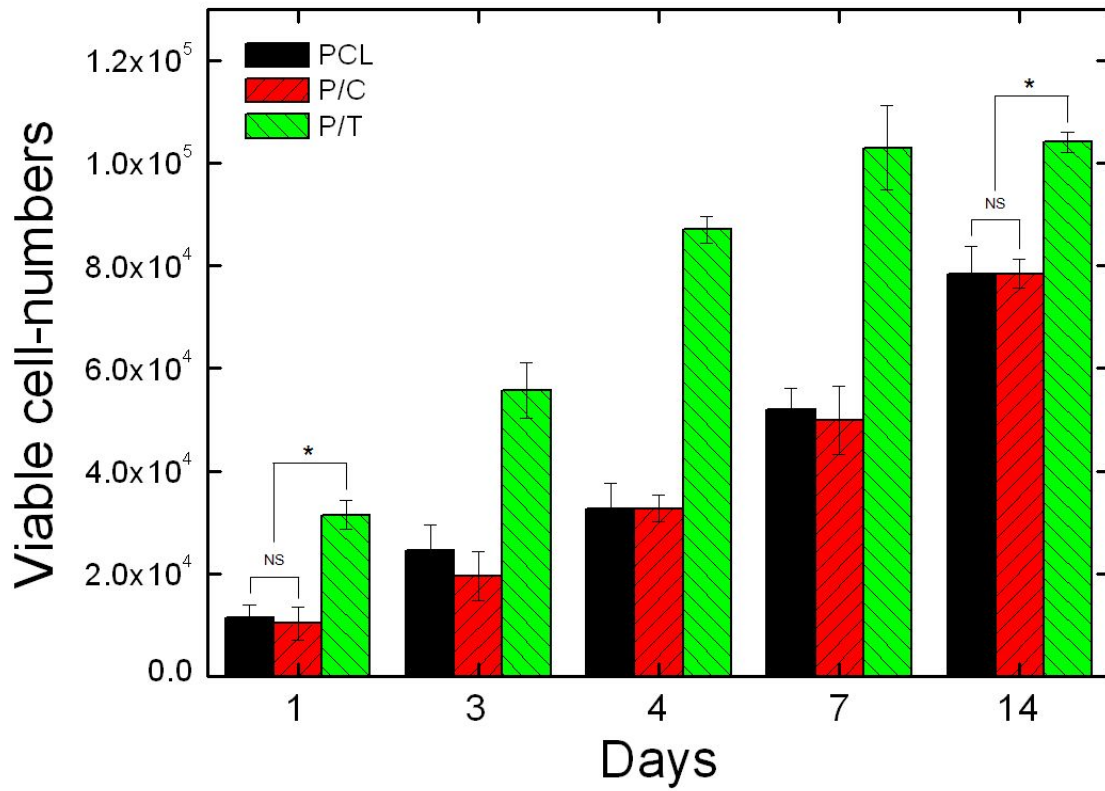


Figure 5. Viable cell numbers (MTT assay) after cell-culture 1, 3, 4, 7, and 14 days for various scaffolds (pure PCL, P/C, and P/T) without an electric stimulation. * $P < 0.05$ indicates a significant difference and NS means non-significance.

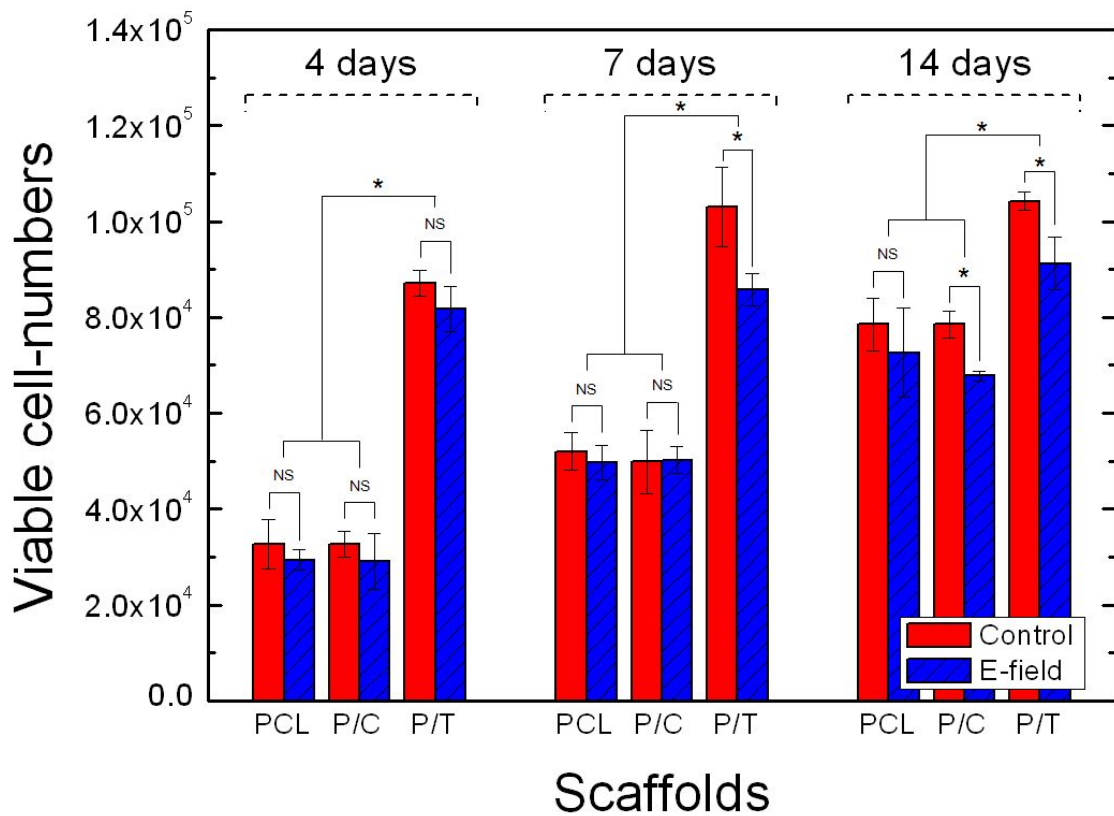


Figure 6. Viable cell numbers after cell-culture 4, 7, and 14 days for various scaffolds (pue PCL, P/C, and P/T) with and without electric stimulation. In this figure, control and E-field mean the scaffolds without the electric stimulation and with the stimulation, respectively. * $P < 0.05$ indicates a significant difference and NS means non-significance.

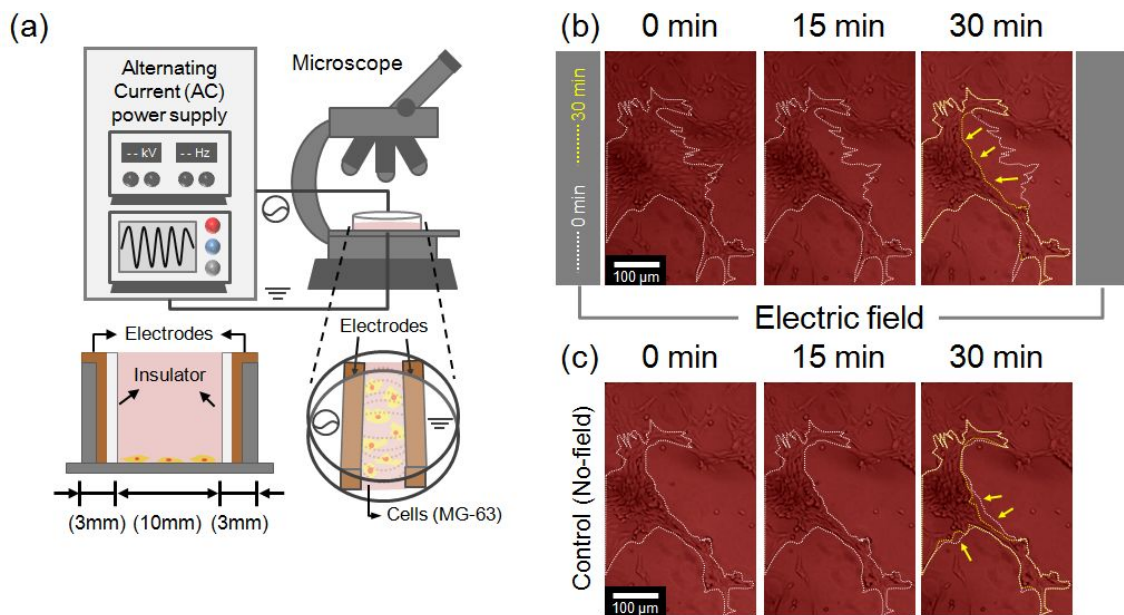


Figure 7. (a) Schematic for observing cell movement under an electric stimulation. Optical images of cell movement taken for three time periods (0, 15, and 30 min) (b) with and (c) without the electric stimulation (55 mV/cm and 60 Hz).

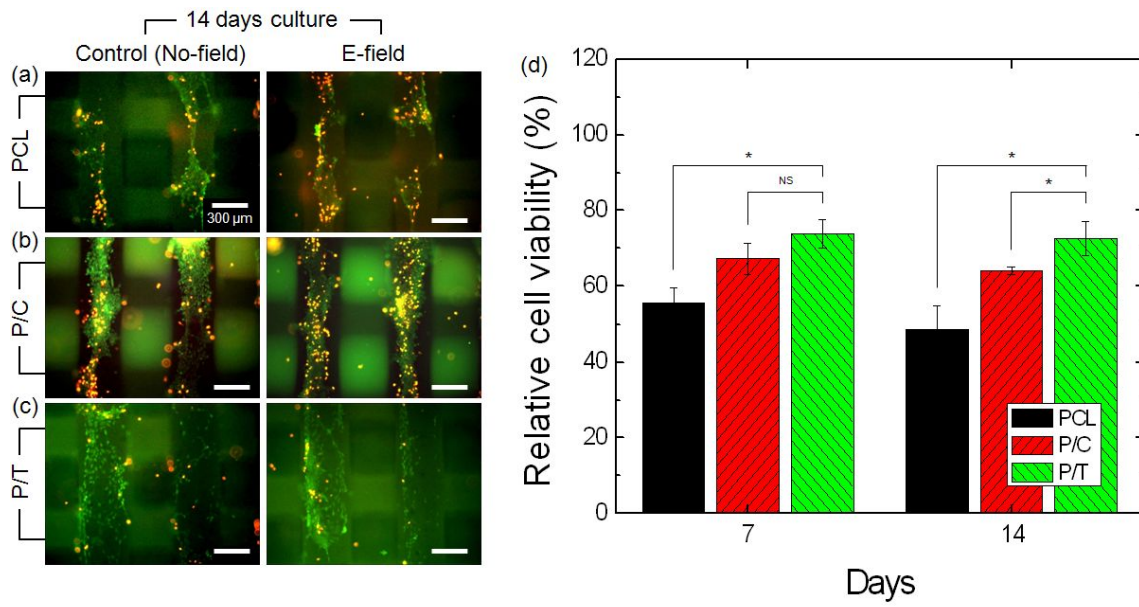


Figure 8. Live (green) and dead (red) MG-63 cells after 14 days in culture on three scaffolds ((a) PCL, (b) P/C, and (c) P/T) with and without electric stimulation. (d) Relative cell viability of electrically stimulated scaffolds normalized with control scaffolds for various scaffolds.

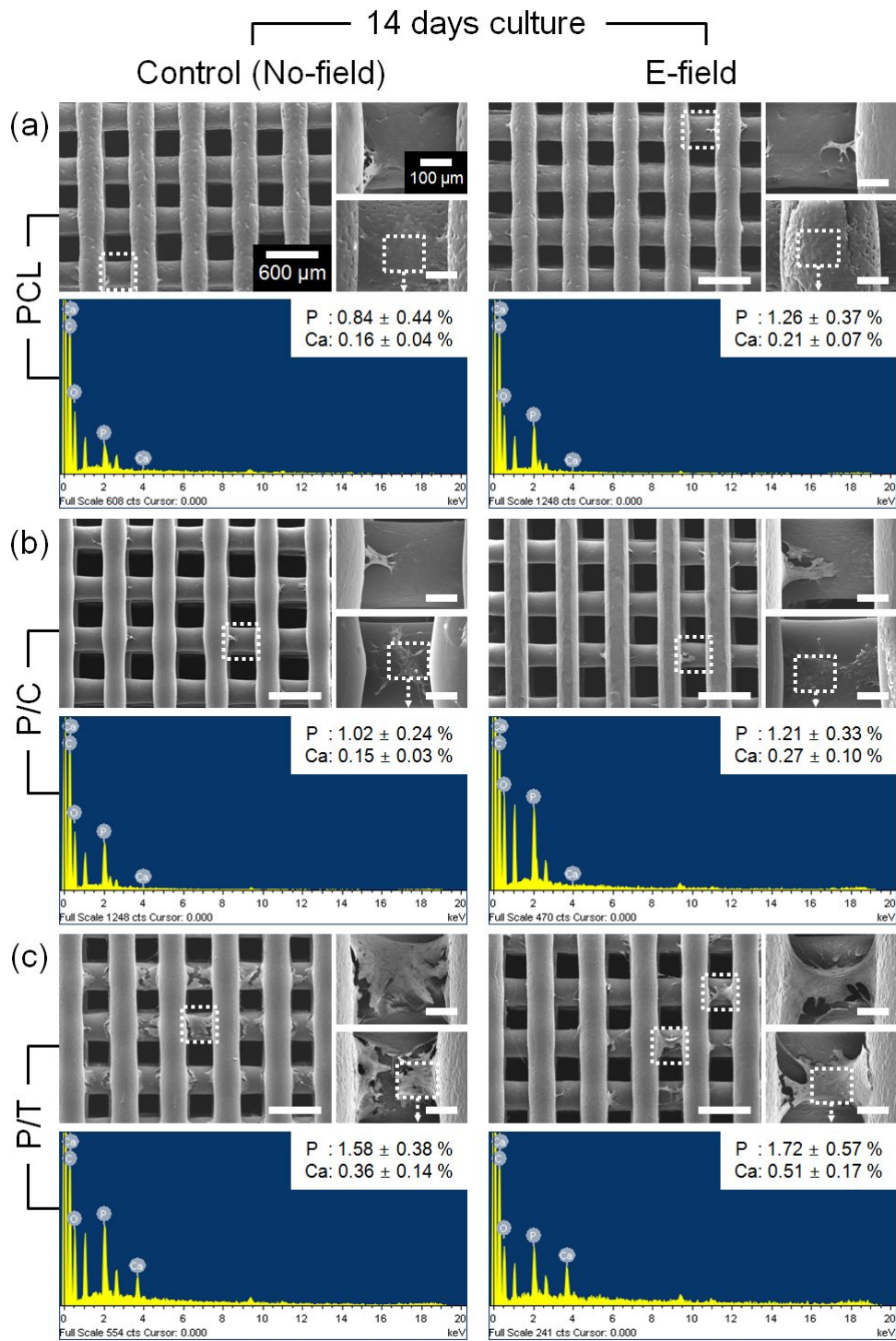


Figure 9. SEM micrographs and EDS results for (a) pure PCL, (b) P/C, and (c) P/T after 14 days cell-culture with and without the electric stimulation.

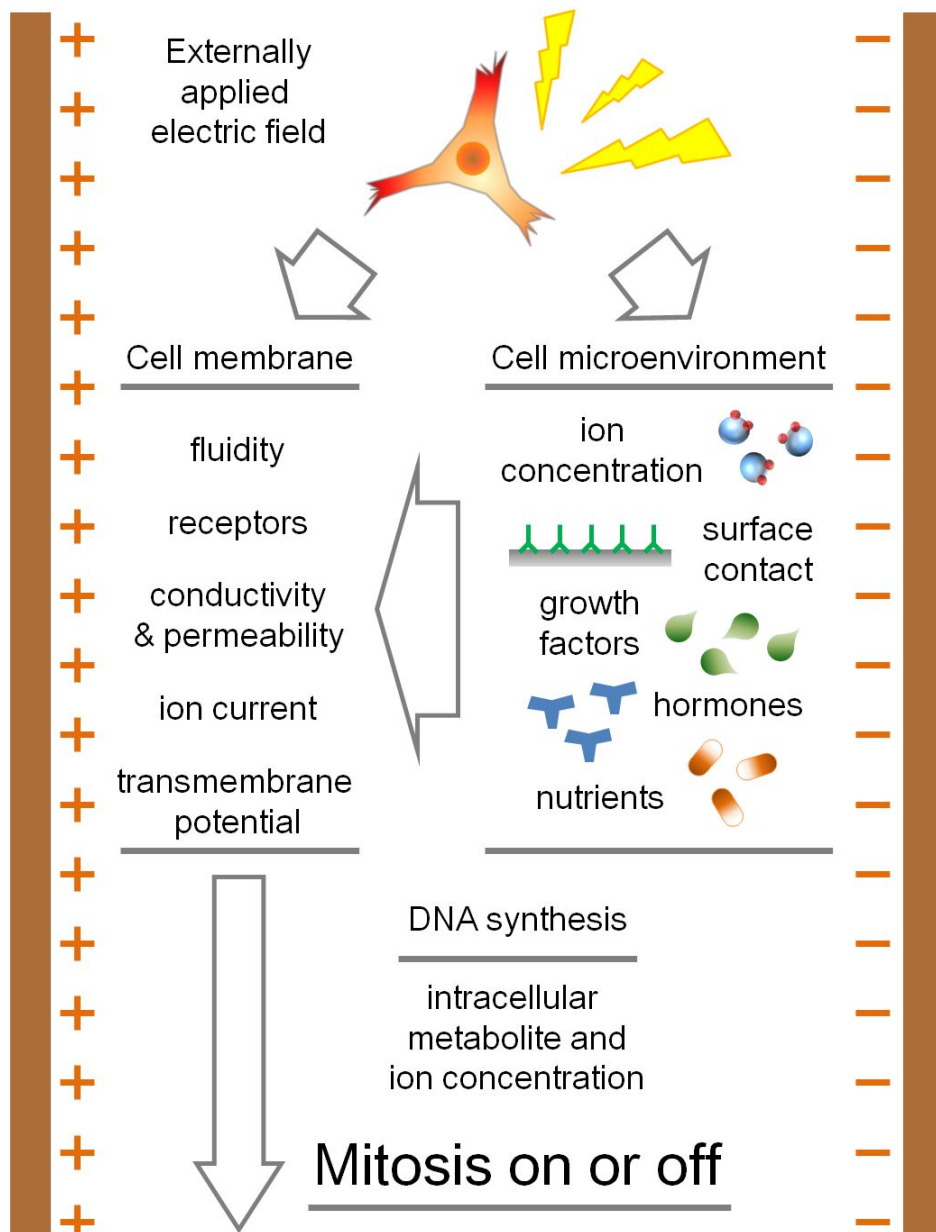


Figure 10. Theoretical description for the effect of the electric stimulation on various cellular activities.^[67]

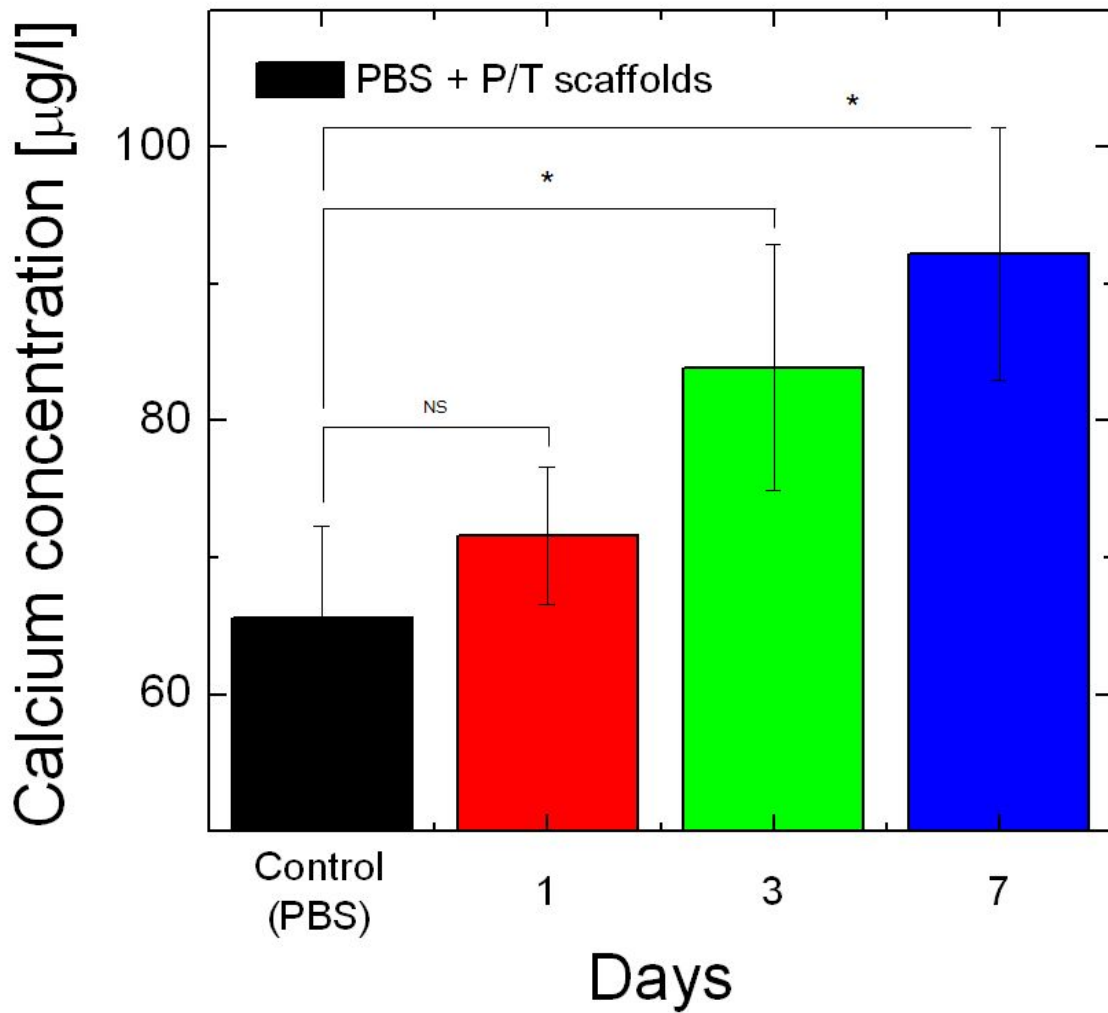


Figure 11. Concentration of calcium ions released from the P/T scaffolds for 1, 3, and 7 days in PBS solution. * $P < 0.05$ indicates a significant difference and NS means non-significance.

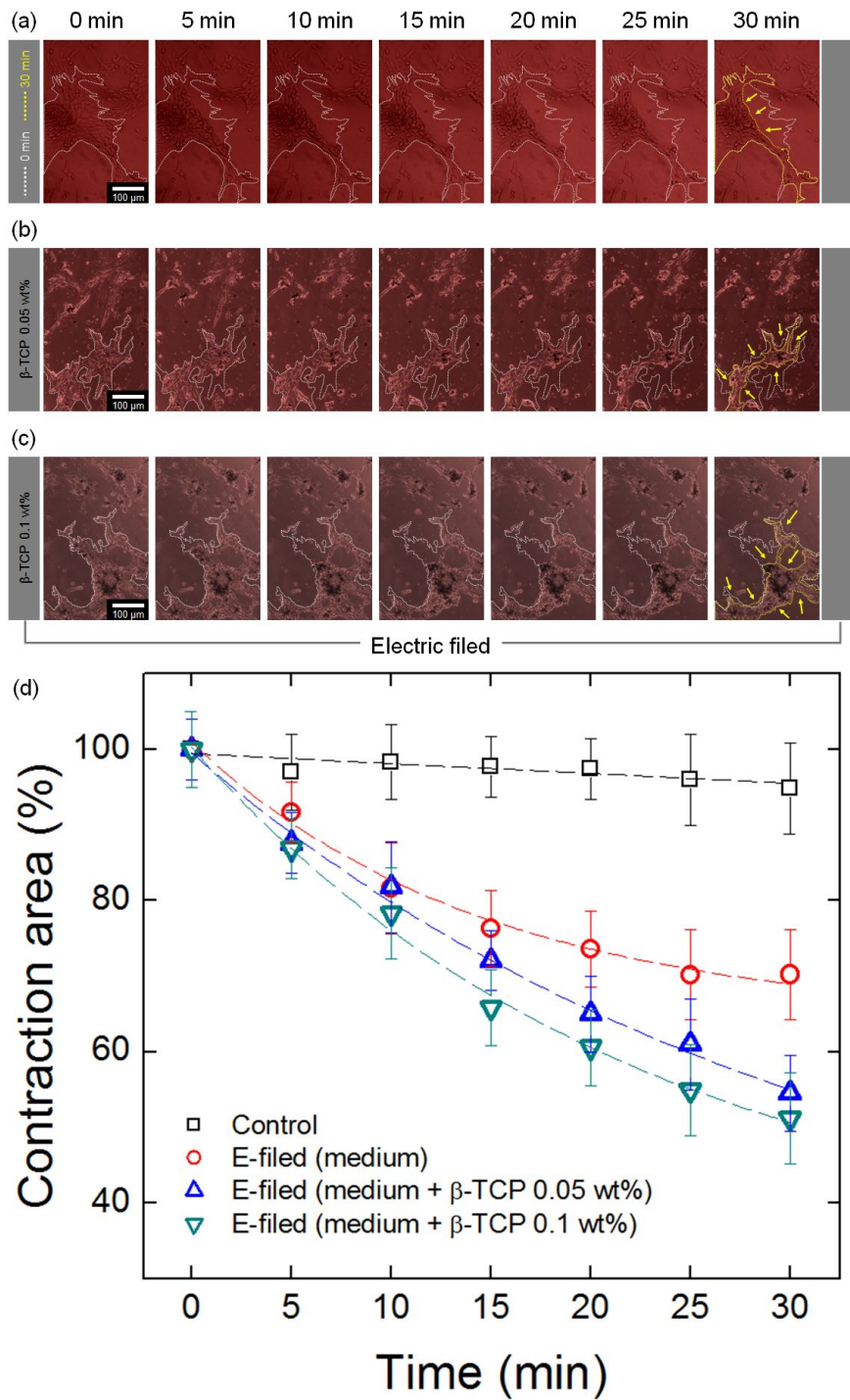


Figure 12. Optical images of cell movement taken for various time periods for three different concentrations ((a) 0, (b) 0.05, (c) 0.1 wt%) of β -TCP in culture medium with the electric stimulation (55 mV/cm and 60 Hz). (d) Contraction area (%) of cells under the electric field for various time periods. In the graph, control is the data of cell-contraction taken without the electric stimulation.

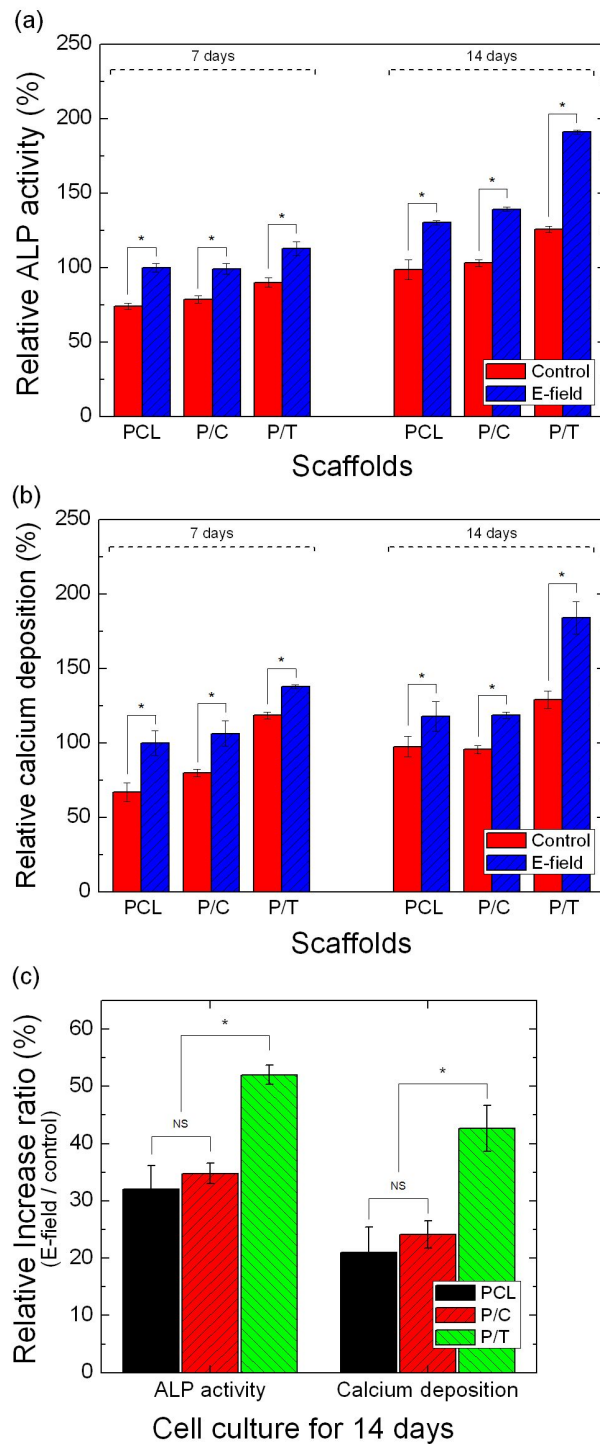


Figure 13. (a) Relative ALP activity and (b) calcium deposition on PCL, P/C, and P/T scaffolds from 7 to 14 days. (c) Relatively increased ALP and calcium deposition of the scaffolds with the electric stimulation compared to those of the scaffolds without the electric stimulation. * $P < 0.05$ indicates a significant difference and NS means non-significance.

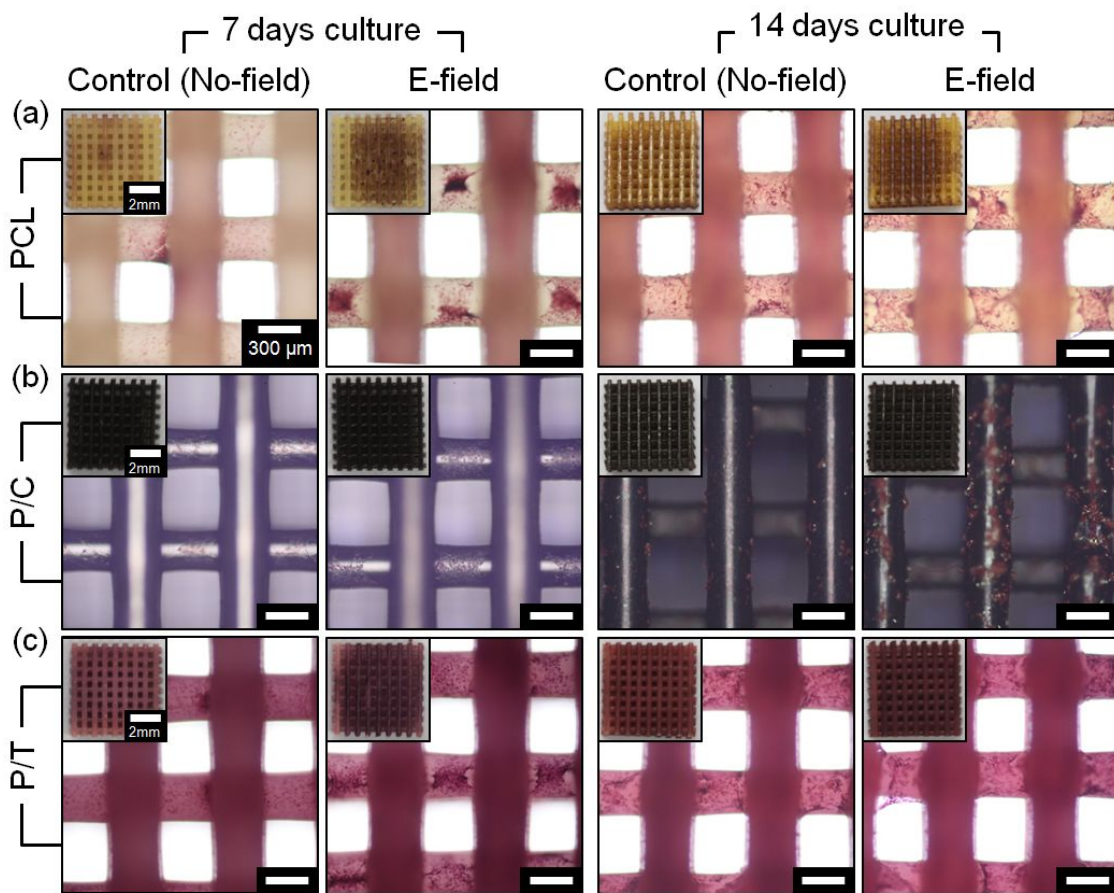


Figure 14. Optical micrographs of Alizarin red S staining indicating mineralization of the PCL, P/C and P/T scaffolds after 7 and 14 days cell-culture.