



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

의학 석사학위 논문

골막조직 배양액이 연골세포
배양계에 미치는 영향

아주대학교 대학원

의학과

김현곤

골막조직 배양액이 연골세포
배양계에 미치는 영향

지도교수 강 신 영

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

1999 년 12 월

아주대학교 대학원

의 학 과

김 현 곤

김현곤의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 _____ (인)

심사 위원 _____ (인)

심사 위원 _____ (인)

아 주 대 학 교 대 학 원

1999 년 12 월

차 례

논문인준서	i
국문요약	ii
차례	iii
그림차례	iv
그림 1. 골막 조직 배양액의 농도에 따른 연골 세포의 증식	7
그림 2. 배지의 종류에 따른 연골 세포 수의 변화	8
그림 3. 배지의 종류에 따른 연골 세포의 증식 속도	9
그림 4. 배지의 종류에 따른 연골 세포의 당단백 합성	10
그림 5. 배지의 종류에 따른 연골 세포의 제 2형 교원질 분비	11
본문	v
I. 서론	1
II. 연구 대상 및 방법	3
III. 결과	7
A. 골막 조직 배양액의 적정 농도	7
B. 골막 조직 배양액의 연골 세포 증식에 대한 영향	8
C. 골막 조직 배양액의 연골 세포 기질 분비에 대한 영향	10
D. 골막 조직 배양액의 연골 세포 표현형 발현에 대한 영향	11
IV. 고찰	12
V. 결론	17
참고 문헌	vi
영문 요약	vii

- 국문 요약 -

골막조직 배양액이 연골세포 배양계에 미치는 영향

자가 연골세포 이식술(autologous chondrocyte transplantation)의 과정에서 사용되는 골막의 역할은 불분명 하며 또한 실험적인 결과가 보고된 바도 없다. 본 연구는 골막조직이 연골세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 골막조직 배양액을 만들어 연골세포를 배양하여 연골세포의 증식, 기질 분비 및 표현형의 변화를 관찰하였다. 1 단계 실험에서는 연골세포 증식을 위한 적정 농도의 골막조직 배양액을 설정하기 위하여 여러가지 농도의 골막조직 배양액을 만들어 여기에 연골세포를 배양한 후 연골세포 수의 증가를 측정하여 적정 농도의 골막조직 배양액을 설정하였다. 생후 3개월 된 가토에서 양측 장골과 양측 슬관절을 채취한 후 장골의 골막을 분리하여 조직 배양을 시행하였다. 48 시간 배양 후 배양액을 회석하여 0%, 25%, 50%, 75% 농도의 골막조직 배양액을 만들어 슬관절의 초자연골로부터 분리한 연골세포를 단층 배양하였다. 2 단계 실험에서는 1 단계 실험에서 설정된 적정 농도의 골막조직 배양액을 이용하여 4 가지 군의 배지를 설정하고, 여기에 연골세포 배양을 시행하여 연골세포 수의 증가(direct cell counting), 연골세포 증식률(^3H -thymidine uptake), 연골세포의 당단백 생성(Dimethyl methylene blue assay), 연골세포의 제 2 형 교원질 분비(Western blot)를 측정하여 비교 분석 하였다. 1 단계 실험에서 연골세포의 수는 50% 농도의 골막조직 배양액에서 가장 많이 증가하여, 이를 적정 농도로 설정하고 2 단계 실험을 진행하였다. 배지는 4 가지 군으로 분류하여 대조군인 1 군은 무혈청 배지인 Ham F-12 배지, 2 군은 Ham F-12 와 10% 우태아혈청을 함유한 배지, 3 군은 50% 골막조직 배양액 배지, 4 군은 50% 골막조직 배양액과 10% 우태아혈청을 함유한 배

지로 설정하였다. 각각의 배지에서 연골세포를 배양한 결과 연골세포 수의 증가는 4 군에서 가장 높았으며, 1 군에서 가장 낮은 결과를 보였다. 연골세포의 초기 증식 속도는 3 군에서 가장 높은 결과를 보였다. 연골세포의 당단백 합성은 초기에는 4 군에서 가장 높았으며, 시간 경과에 따라 2, 3, 4 군에서 비슷한 증가를 보였고, 1 군에서는 시간이 경과하여도 당단백의 합성이 증가하지 않았다. 연골 세포의 제 2형 교원질의 분비는 4 군에서 가장 많이 증가되었으며, 2 군 및 3 군에서도 증가된 결과를 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 골막조직 배양액을 함유한 배지에서 연골 세포 수, 연골세포의 초기 증식 속도, 당단백의 합성 및 제 2형 교원질의 분비가 모두 증가하였으며, 10% 우태아혈청은 추가의 상승작용을 나타내었다. 따라서 자가 연골세포 이식술에서 골막은 이식된 연골세포가 누출되는 것을 방지하는 물리적 장벽의 역할 외에 연골세포의 증식을 촉진시키는 생물학적 인자로 사료된다.

핵심되는 말 : 골막조직 배양액, 연골세포 배양

I. 서론

관절 연골은 일단 손상을 받으면 재생이 매우 제한적이라 치료에 많은 어려움이 있어 왔다. 연골 결손의 깊이가 연골층에만 국한된 경우 자연적으로 치유되기는 어려운 반면에, 연골하골을 포함한 골연골 결손의 경우는 초자연골이 아닌 섬유연골로 재생되는 경우도 있으나 이는 초자연골과는 조직학적 구성 및 기계적 강도에서 많은 차이를 보인다^{7,13,21,25,27,34,38}. 손상 받은 연골의 재생을 위하여 임상적으로 많은 방법이 시도되어 왔지만 성공적인 결과를 보이지는 못하였다^{1,3,11,35,40,41}. 최근에는 자가 연골세포 이식술(autologous chondrocyte transplantation)이 개발되어^{15,16} 우수한 임상적 결과가 보고되었으며^{4,39}, 국내에서도 1996년부터 자가 연골세포 이식술이 시술 되고 있고 또한 이를 더욱 발전시키기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

자가 연골세포 이식술은 자가 연골조직에서 추출된 연골세포를 단층 배양하여 세포의 수를 증가 시킨 후 연골 결손 부위를 자가 골막으로 덮어 봉합한 공간에 이식하는 방법이다^{15,16}. 이때 사용되는 골막이 이식된 연골세포가 누출되지 않게 하는 물리적 장벽으로서의 역할을 하지만, 관절 연골 재생에 있어 생물학적 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 골막의 연골 재생 능력은 많은 연구에서 입증되었으며^{9,14,22,28,34,35,36,37,38,44}, 골막 이식을 이용한 골막연골성형술(periosteal arthroplasty)에 대하여 많은 실험적 연구가 시행되어져 왔다^{9,29,34,35,37,38,42,43,44,49}. 골막 조직을 사용하지 않은 것에 비하여 골막조직을 사용하는 것이 우수한 조직학적 결과를 보고하는 것으로 보아 골막조직이 연골 재생에 중요한 역할을 할 것으로 짐작할 수 있다. 그러나 대부분의 실험은 골연골 결손과 함께 연골하골을 천공하

고 있어 재생된 연골조직이 골막에서 기원한 것인지, 연골하골의 골수에서 기원한 것인지는 의문이다.

한편 골막 조직의 사용이 없이 연골세포 또는 연골막의 이식만으로도 관절 연골의 재생이 가능하다는 많은 보고가 있으며^{2,6,8,10,18,20,45,46,47} 이는 골막조직의 연골 재생에서의 역할에 대한 규명을 추궁하고 있다.

본 연구의 목적은 골막 조직이 연골 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 골막 조직 배양액을 만들어 연골 세포를 배양하여 연골세포의 증식, 기질 분비 및 표현형의 변화를 관찰하고자 함이다.

II. 연구 대상 및 방법

A. 실험 단계 및 실험군의 설정

1 단계 실험은 세포 증식률이 가장 높은 골막 배양액의 적정 농도를 측정하는 단계로 미리 제조된 골막 조직 배양액을 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 함유된 DMEM(Dulbecco minimum essential medium)으로 희석하여 0%, 25%, 50%, 75%농도의 배지를 만들었다. 각각의 농도의 골막조직 배양액 배지에 연골 세포를 배양한 후 광학 현미경 하 세포수 측정을 통한 연골 세포 성장률을 측정하여 최적의 골막 조직 배양액 농도를 결정하였다. 이 후 실험은 설정된 적정 농도의 골막 조직 배양액을 이용하여 시행되었다.

2 단계 실험은 1 단계 실험에서 설정된 적정 농도의 골막 조직 배양액에서 혈청의 연골 세포 배양에 대한 효과를 비교하기 위하여 4 가지 군의 배양액을 설정한 후 세포를 배양하고 그 결과를 비교 분석 하였다. 대조군인 1 군은 무혈청 배지인 Ham F-12 이며, 2 군은 Ham F-12 와 10% 무태아혈청이 혼합된 배지, 3 군은 50% 골막 조직 배양액 배지, 4 군은 50% 골막 조직 배양액과 10% 우태아혈청이 혼합된 배지로 설정하였다. 각각의 배지에서 시간 경과에 따른 연골 세포 수의 변화, 연골 세포의 성장률, 연골 세포의 당단백 생성 및 연골 세포의 표현형 발현을 나타내는 제 2 형 교원질의 분비 측정하여 그 결과를 비교 분석 하였다.

B. 골막 조직 및 연골 조직의 채취

생후 3 개월 된 1.6Kg 의 가토에서 양측 슬관절 및 양측 장골을 무균적으로 채취하였다. 멸균 상태에서 양측 슬관절로부터 연골 조직을 채취하고, 양측 장골로

부터 골막조직을 캄비움층을 보존한 상태로 채취하였다.

C. 연골 세포의 분리 및 단층 배양

슬관절로부터 분리된 연골 조직을 mincing 을 하고, 200 units/ml penicillin 과 200 μ g/ml streptomycin 이 포함된 PBS (Phosphate buffered saline)로 2 회 세척하였다. 여기에 0.2% 교원질분해효소(collagenase)가 들어 있는 10% 우태아혈청을 함유한 DMEM (Dulbecco minimum essential medium) 으로 3 시간 처리하였다. 처리된 세포를 1,700 rpm 으로 20 분 동안 원심 분리하여 세포를 모아 세포수를 hemocytometer 에서 측정하여 적절한 세포밀도(cell density)로 60 mm dish, 24 well plate, 48 well plate 에 넣고 10% 우태아혈청이 함유된 DMEM 으로 배양하였다.

D. 골막 조직 배양액의 제조

장골로부터 근육 조직을 제거한 후 캄비움층을 보존하여 골막을 분리하였다. 분리된 골막 조직을 PBS 에 2 회 세척한 후 2 x 2 mm 크기로 잘라 60mm dish 에서 약 15 개씩 10% 우태아혈청이 함유된 DMEM 으로 배양하였다. 매 48 시간 배양 후 배양액만 분리하여 0.22 μ m filter 를 이용하여 debri 를 제거하고 사용하였다.

E. 연골 세포의 증식률 측정

연골 세포의 증식률은 두 가지 방법으로 측정하였다. 첫째는 직접적인 세포수 측정을 통해 측정한 방법으로, 일정한 농도의 세포를 24well 배양용기에 부착시킨 직후부터 각기 다른 조성의 골막조직 배양액으로 배양하면서 매일 세포의 수를 측정하였다. 세포수 측정 방법은 부착되어 있는 세포를 PBS 로 1 회 세척한

후 **trypsin** 을 처리하여 세포를 분리하고, 이를 **trypan blue** 로 염색하여 광학 현미경 하에서 **hemocytometer** 를 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 측정하였다. 4 회 반복 측정하여 평균을 측정치로 삼았다.

다음으로는 **³H-thymidine Incorporation** 방법으로, 48well 배양용기에 세포를 일정한 농도로 부착시킨 후 각각 다른 조성의 골막 조직 배양액으로 세포를 배양하면서 측정하고자 하는 시기, 즉 배양 4, 6, 12, 18, 24, 48, 72 시간이 되는 때에 [**methyl-³H**]-thymidine (부경사)을 최종 농도 1.0 uCi/ml 되게 처리하여 37°C, CO₂ incubator 에 24 시간 방치하였다. 그 후 세포를 **PBS** 로 3 회 세척한 다음 **trypsin** 으로 세포를 분리하고 처리한 **trypsin** 과 동량의 0.2% **SDS** + 0.6N **NaOH** 용액을 부가하여 세포를 터트린 다음 **scintillation cocktail** (Wallac)에 녹여 **scintillation counter** 로 측정하였다. 4 회 반복 측정하여 평균을 측정치로 삼았다.

F. 연골 세포의 당단백 (proteoglycan) 분비 측정

연골 세포의 세포의 기질 분비에 대하여 당단백 생성을 측정하기 위하여 **DMB** (Dimethyl methylene blue) assay 를 시행하였다. 일정한 농도의 세포를 24well 배양용기에 부착시킨 후 각기 다른 조성의 골막 조직 배양액을 처리하여 배양하면서 매일 1 회 그 배양액을 취하여 세포가 생산하여 배지 내로 배출한 당단백의 농도를 측정하여 상대적으로 비교하였다. 세포를 배양하던 배양액을 100 μ l 취하여 동량의 **DMB** 용액을 섞고 10 분 이내에 525nm 파장으로 **ELISA** 를 사용하여 측정하였다. **Standard curve** 는 **chondroitin sulfate** 가 0, 0.11, 0.22, 0.44, 0.88, 1.75, 3.5, 7, 14 μ g 함유된 100 μ l의 **DMEM** 을 100 μ l의 **DMB** 용액과 섞어 위와 동일한 조건으로 측정한 것을 기초로 하였다.

G. 연골 세포의 표현형의 발현 (Western blotting in vitro)

연골 세포를 단층 배양하면서 시간에 따른 표현형의 변화를 보기 위하여 1 주, 2 주, 3 주, 4 주 별로 세포내와 세포를 배양하던 배양액에 함유된 제 2 형 교원질의 증감을 확인 하였다. 세포내의 단백질 추출은 60 mm dish 에 연골 세포가 융합하게 되면 0.25% trypsin 을 처리하여 1,700 rpm 에서 15 분 동안 원심 분리하여 세포를 모은 후, 여기에 proteinase inhibitor 가 포함된 EBC buffer 를 넣고 얼음에 보관 하면서 10 분에 1 번씩 3 회간 vortexing 하면서 배양하였다. 그 후 11,000rpm 에서 10 분간 4°C 를 유지하면서 원심 분리를 하여 상등액만 취하여 단백질 정량을 하고 나머지는 동량의 SDS-sample buffer 와 섞어 90 도에서 10 분간 처리하였다. 이를 단백질 정량을 통해 일정한 농도의 단백질이 함유 된 양을 취해 SDS-PAGE 를 한 후, nitrocellulose membrane 에 transfer 하여 type II collagen primary antibody 를 붙여 표현형의 변화를 보았다.

세포가 배지내로 방출한 제 2 형 교원질의 발현을 확인하기 위하여 일정 농도로 부착된 24well 배양용기에 각기 다른 조성의 골막조직 배양액을 처리하고 1, 2, 3, 4 주에 그 배지를 취하였다. 그 배지 20 μ l 와 동량의 SDS-sample buffer 를 섞어 SDS-PAGE 한 후 위와 동일한 방법으로 제 2 형 교원질의 발현을 확인 하였다.

III. 결과

A. 골막 조직 배양액의 적정 농도

각각의 골막 조직 배양액에서의 연골 세포의 증식은 배양 6 일째에 50% 골막 조직 배양액에서 가장 세포수가 증가한 결과를 나타내었다 (그림 1). 따라서 50% 골막 조직 배양액을 최적의 적정 농도로 설정하여 2 단계 실험을 시행하였다.

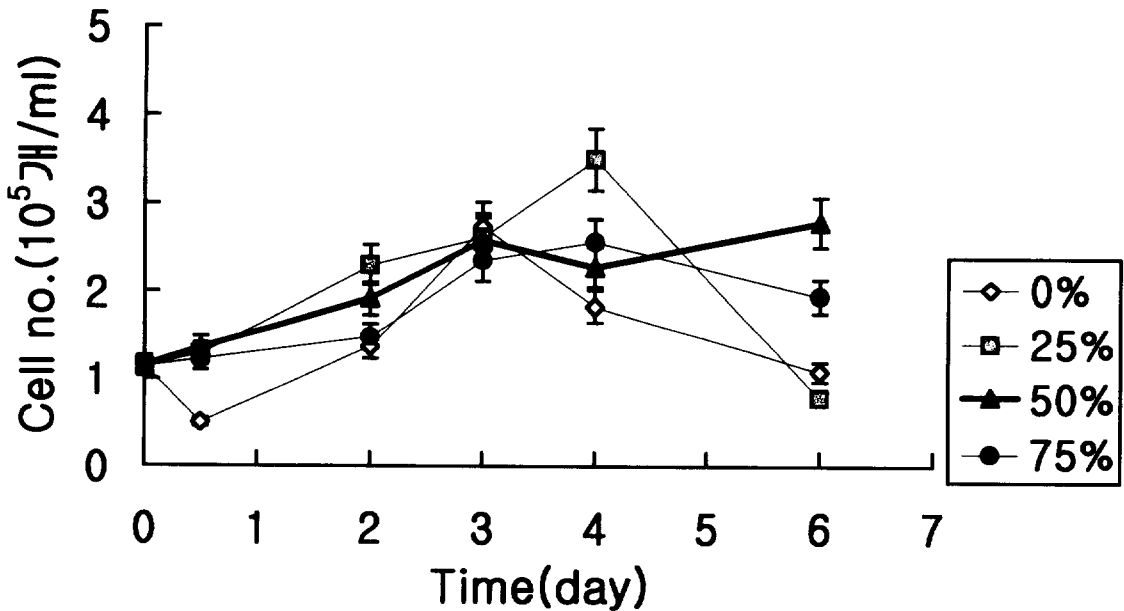


Fig. 1. Chondrocyte proliferation according to the concentration of conditioned media of the periosteum. (0% : 0 % periosteal conditioned media, 25% : 25% periosteal conditioned media, 50% : 50% periosteal conditioned media, 75% : 75% periosteal conditioned media)

B. 골막 조직 배양액의 연골 세포 증식에 대한 영향

4 가지 군의 배양액에서 연골 세포의 증식을 관찰한 결과 연골 세포 수의 증가는 대조군인 무혈청 배지인 Ham F-12 배지에서 가장 낮은 세포수의 증가를 보였으며, 50% 골막 조직 배양액을 함유한 3 군 및 4 군의 배지에서 1 군 및 2 군의 배지 보다 높은 세포수의 증가를 보였다 (그림 2). 따라서 50% 골막 조직 배양액이 연골 세포수의 증가를 촉진 시키는 결과를 나타내었다.

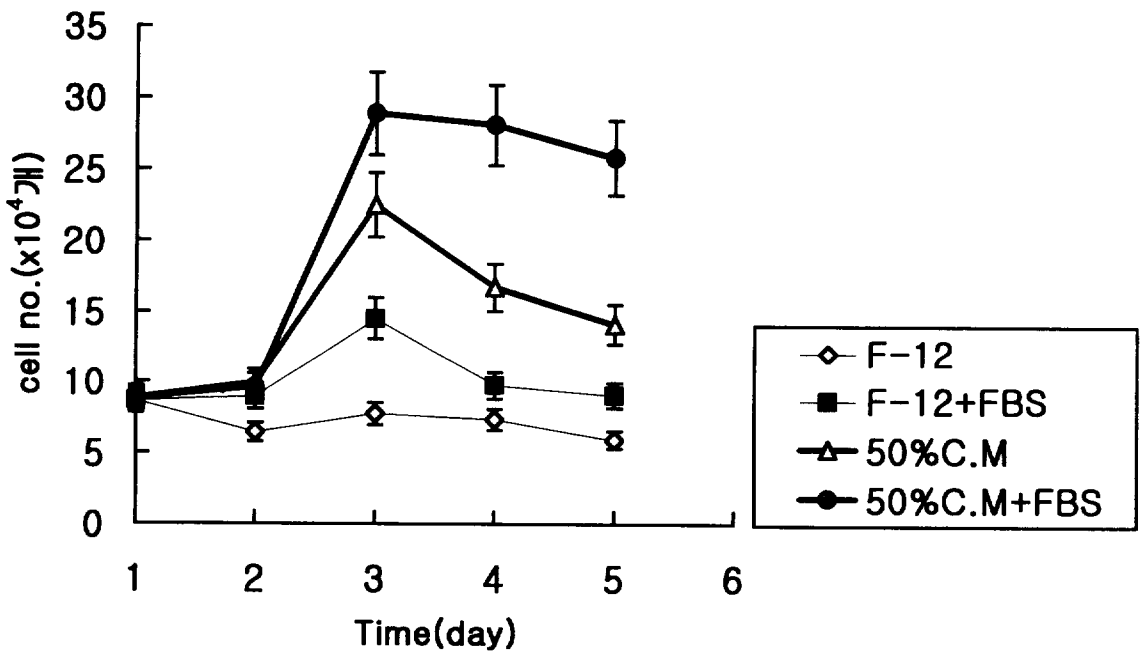


Fig. 2. Chondrocyte proliferation (direct cell counting) according to the four types of media.

(F-12 : Ham F-12, FBS : fetal bovine serum, C.M : periosteal conditioned media)

^3H -thymidine uptake 를 이용하여 측정 한 연골 세포의 증식 속도는 50% 골막 조직 배양액에서 초기 증식 속도가 가장 높은 것으로 측정 되었으며, 시간 경과에 따라 2, 3, 4 군 모두 증식속도가 감소 하였다 (그림 3).

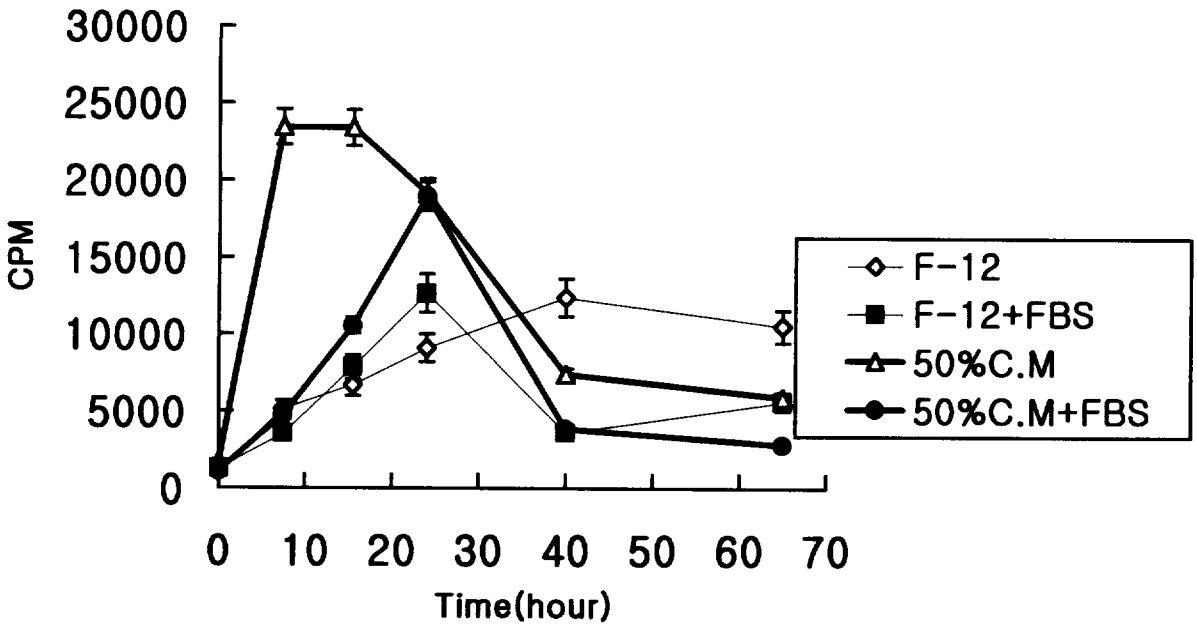


Fig. 3. Chondrocyte proliferation rate (^3H -thymidine uptake) according to the four types of media. (F-12 : Ham F-12, FBS : fetal bovine serum, C.M : conditioned media)

C. 골막 조직 배양액의 연골 세포 기질 분비에 대한 영향

연골 세포의 세포외 기질 분비와 관련된 당단백의 생성 정도를 비교하기 위하여 행해진 **DMB assay**에서 초기 당단백의 생성은 50% 골막 조직 배양액과 10% 우태아혈청을 함유한 4군의 배지에서 가장 높았다. 6일째의 당단백의 생성은 **Ham F-12** 배지보다 2,3,4군의 배지에서 높은 결과를 보여 10% 우태아혈청과 50% 골막 조직 배양액이 모두 당단백 생성을 촉진시키는 것으로 나타났다 (그림 4).

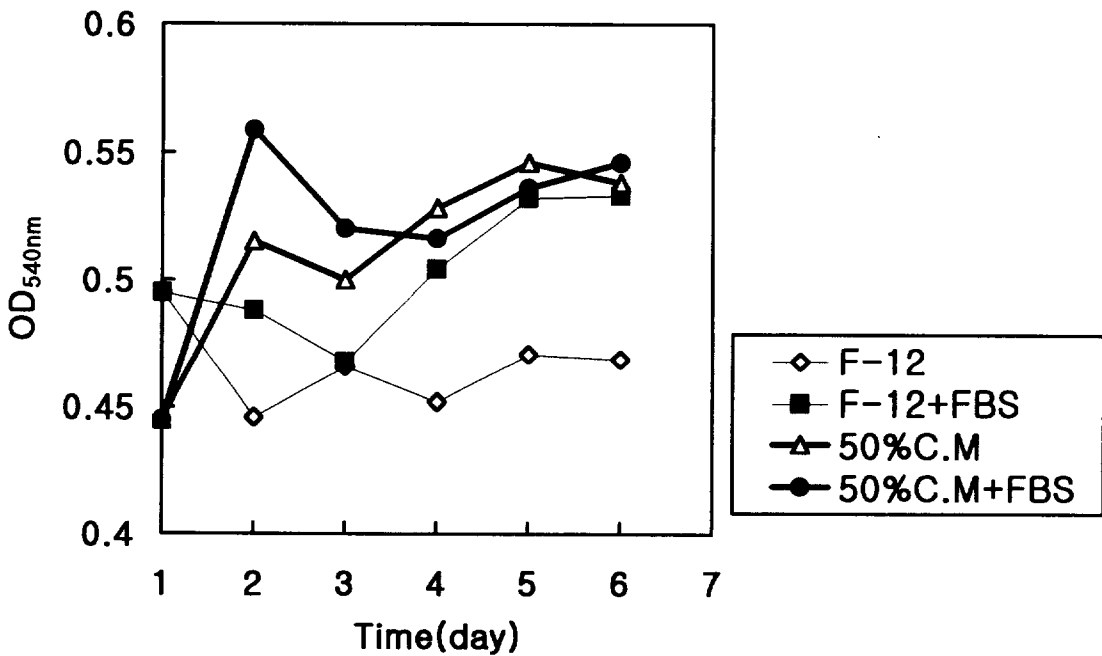


Fig. 4. Synthesis of proteoglycan from chondrocytes according to the four types of media.

(F-12 : Ham F-12, FBS : fetal bovine serum, C.M : periosteal conditioned media)

D. 골막 조직 배양액의 연골 세포 표현형 발현에 대한 영향

연골 세포의 표현형의 발현을 보기위한 제 2 형 교원질을 Western blot 으로 분석한 결과 연골 세포의 세포 외 제 2 형 교원질의 분비는 Ham F-12 배지와 비교하여 2,3,4 군의 배지에서 증가되어 있었으며, 특히 4 군의 50% 골막 조직 배양액과 10% 우태아혈청을 함유한 배지에서 가장 높은 결과를 보였다 (그림 5).

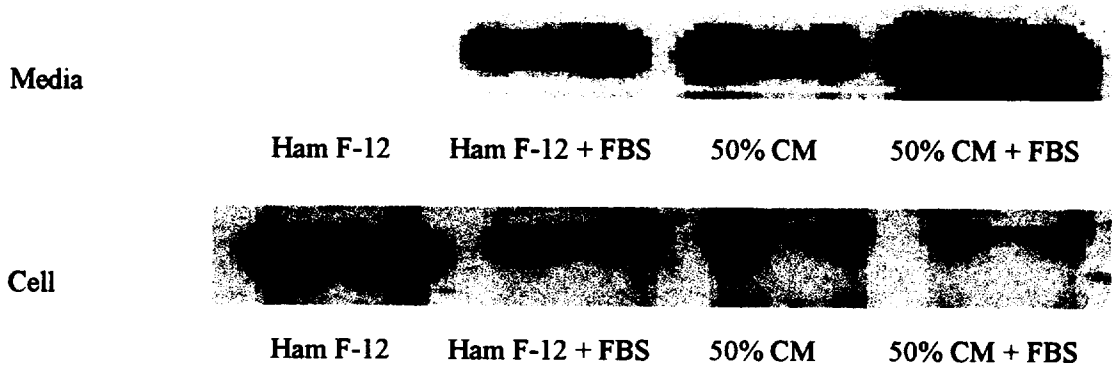


Fig. 5. Secretion of type II collagen from chondrocyte according to the four types of media.

(FBS : fetal bovine serum, CM : periosteal conditioned media)

IV. 고찰

자가 연골세포 이식술은 1987년 Grande 등^{15,16}에 의해 가토에서 실험적으로 처음 시행 되었으며 1996년에 Brittberg 등⁵이 가토에서 시행한 자가 연골세포 이식술의 결과를 보고한 바 있다. 1 단계 수술 시 채취된 관절 연골조직에서 연골세포를 분리한 후 세포 수를 증식 시키는 단층 배양을 시행하고, 2 단계 수술에서는 연골 결손부위를 자가 골막으로 덮어 미세수술 기법으로 봉합한 후 형성된 공동 내에 배양된 연골세포를 액체 배지에 부유시켜 주입하게 된다. 이때 골막의 챔비움층은 골막연골성형술과는 달리 연골 결손면을 향하여 위치한다. 이러한 자가 연골세포 이식술로 재생된 연골의 기원은 이식된 연골세포 일수도 있으며, 골막으로부터 분화된 세포 일수도 있고, 또는 주위 연골 조직이나 연골하골에 남아있던 연골세포일수도 있다^{5,33}. Grande 등¹⁵에 의한 실험에서 배양한 연골 세포를 이식하기 전에 ³H-thymidine 으로 표시한 후 이식한 결과 재생된 연골의 세포 중 8%가 이식된 연골 세포인 결과를 보였으며, 이는 이식한 연골 세포가 시간 경과 후에도 생존해 있으면서 연골 재생에 기여하고 있음을 의미한다. 또한 민 등²⁶의 연구에 의하면 연골 세포는 결손 부위에 이식된 후 많은 부분이 잔존하여 연골 조직을 재생하는데 기여 한다고 한다. 그러나 그 외의 세포들이 연골하골, 골막 또는 주위 연골에서 기원한 세포일 가능성을 배제 할 수는 없다.

골막은 2 층으로 되어있어 바깥층은 섬유층으로 불규칙하게 배열한 교원섬유 및 탄력섬유로 된 두꺼운 섬유결합 조직층으로서 골막의 기계적 강도를 유지하며 건, 인대, 관절막 등이 부착 한다. 내층은 챔비움층 또는 골발생층이라고 하며 미분화된 중간엽 모세포와 골모세포가 배열되어 있고 혈관이 풍부한 층이다^{17,48}.

중간엽 모세포는 주위 환경에 따라 골세포 또는 연골세포 등으로 분화 할 수가 있다^{22,30,31}.

자가 연골세포 이식술에서 골막의 역할은 확실히 밝혀져 있지 않으며, 연골 세포 배양에 대한 골막의 영향에 대하여 실험적 결과가 보고된 바도 없다. **Brittberg** 등⁵에 의하면 가토에서 자가 연골세포 이식술, 골막 연골 성형술 및 탄소섬유 pad를 scaffold로 한 연골세포 이식술을 각각 시행하고 그 결과를 비교한 결과 자가 연골세포 이식술을 시행한 군에서 월등히 양호한 결과를 보였다고 하였다. 이는 골막 또는 연골세포를 단독으로 이식한 경우 보다 두 가지 조직을 동시에 이식한 경우 연골 재생이 더욱 촉진되고, 골막이 단순한 물리적 장벽이 아닌 생물학적 영향력을 가지고 있음을 시사한다. 동물 실험에서 골연골 결손에 대하여 자가 골막 이식을 통한 골막연골성형술을 시행하여 90%이상의 type II collagen을 함유하는 초자 연골로 재생되었다는 보고가 있으며^{34,35}, 인체에서도 골막연골성형술이 시행되어 비교적 양호한 결과가 보고된 바 있다^{12,19,23,32}. 이와 같이 골막 조직은 단독 혹은 연골 세포와 같이 관절 표면에 이식되었을 때 연골 조직을 재생할 수 있는 생물학적인 능력이 있는 것으로 보여진다. 그러나 골막조직이 연골 세포 혹은 중간엽 모세포 등 다른 세포와 병존하였을 때 이에 대한 임상 또는 실험실적 연구 보고는 현재까지는 없는 것으로 보인다.

따라서 본 연구는 골막 조직 배양액과 타 배양액에서의 연골세포의 증식, 기질 분비, 표현형의 발현을 비교 분석하여, 자가 연골세포 이식술에서 골막의 역할을 규명하기 위하여 시행 되었다.

골막에 존재하는 중간엽 모세포의 수는 미성숙 골막과 비교하여 성숙된 골막에서 급격히 감소하는 것으로 보고되어 있으며³¹, 가토에서 원위 대퇴골의 성장

판 폐쇄는 생후 4.4 - 4.5 개월에 이루어 지며 생후 4.2 개월까지의 성장이 지속되는 것으로 보고되어 있다²⁴. 또한 2 개월 된 가토의 골막 중 장골의 골막이 연골 재생 능력이 가장 높으며, 그 다음으로 근위 경골의 골막이 연골 재생 능력이 높은 것으로 보고되어 있다¹⁴. 따라서 본 실험에서는 생후 3 개월 된 가토의 장골을 골막 채취 표본으로 하였다.

골막을 조직 배양하는 방법으로는 O'Driscoll 등^{14,36} 이 시행 한 방법에 따라 10% 우태아혈청을 함유한 Dulbecco minimum essential medium (DMEM)을 배지로 사용하였다. 배양은 48 시간 시행하였으며, 배양 후 배양액만 분리하여 다시 10% 우태아혈청을 함유한 DMEM 으로 희석하여 0%, 25%, 50%, 75% 농도의 골막조직 배양액을 제작하였다. 골막의 조직 배양 시 별도의 연골 세포 이식 없이도 연골이 합성됨은 이미 밝혀진 바 있다^{14,36}. O'Driscoll 등³⁶ 에 의하면 골막 조직을 10% 우태아혈청을함유한 DMEM 에서 배양한 결과 agarose gel 또는 transforming growth factor - β 1 (TGF - β 1) 을 첨가한 경우 배양 4-6 주에 조직학적 및 생화학적으로 연골조직이 합성되었음을 증명하였으며, agarose gel 또는 TGF - β 1 이 첨가되지 않은 경우는 연골조직이 합성되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 배양액에 agarose gel 또는 TGF - β 1 을 첨가하지 않았으며, 48 시간 배양액에 대한 별도의 성분 분석은 시행하지 않았다.

골막 조직 배양액의 적정 농도를 설정하기 위한 1 단계 실험에서 연골세포 수의 증가는 배양 4 일째 25% 배양액에서 가장 높았으나, 배양 6 일째 50% 배양액에서 가장 높은 수치를 보여 50% 골막 조직 배양액을 적정 농도로 설정하였다. 본 실험은 골막 조직에 대한 연골 세포의 반응 여부를 관찰하고자 하였으며, 일 단 세포분열에서 최적 농도를 보이는 50% 골막 조직 배양액을 선택하였다. 연골

세포에 대한 반응을 극대화 시키는 농도를 찾기 위해 세포의 생존, 연골의 기질 분비 등에 대한 더 많은 연구가 필요할 것이다.

2 단계 실험은 골막 조직 배양액과 다른 종류의 배지 간의 연골 세포 배양에 대한 영향을 비교 분석하기 위하여 4 가지 군을 설정하여 시행하였다. 대조군으로 무혈청 배지인 Ham-F12 배지를 1 군, Ham-F12 와 10% 우태아혈청을 함유한 배지를 2 군, 50% 골막 조직 배양액 배지를 3 군, 50% 골막조직 배양액과 10% 우태아혈청을 함유한 배지를 4 군으로 하였다. 연골 세포 배양 후 세포 수의 증가는 대조군인 1 군에 비하여 2,3,4 군에서 높게 나타났으며, 2 군 보다 3 군에서 많이 증가하여 10% 우태아혈청보다는 골막조직 배양액이 연골 세포 수 증가에 대한 효과가 큼을 나타내었다. 4 군에서 가장 높은 연골 세포 수의 증가를 보여 골막조직 배양액과 10% 우태아혈청이 상호 상승작용이 있는 것으로 나타났다. ^3H -thymidine uptake 를 이용한 연골 세포 증식 속도는 초기에는 골막 조직 배양액을 함유한 3 군과 4 군에서 높았으나 시간 경과에 따라 증식속도가 둔화되는 결과를 보였다. DMB assay 로 측정 한 당단백의 합성은 배양 2 일째인 초기에는 연골 세포 수 증가와 동일하게 4 군에서 가장 높았으며 그 다음이 3 군, 2 군의 순서였고, 대조군인 1 군에서는 감소되는 결과를 보였다. 시간이 경과하여도 1 군에서는 당단백 생성의 증가가 없었으며, 배양 6 일째에 2,3,4 군에서는 비슷하게 증가된 결과를 보여 골막조직 배양액과 10% 우태아혈청간에 당단백 합성에는 영향력의 차이가 없음을 나타내었다. 초자 연골의 표현형을 나타내는 제 2 형 교원질 분비에 대한 Western blot 분석에서, 연골 세포의 세포 외 제 2 형 교원질의 분비는 1 군에서는 관찰되지 않았으며 4 군에서 가장 증가된 결과를 나타내었다.

이상의 결과에서 볼 때 무혈청 배지인 1 군의 Ham-F12 배지와 비교하여 골막

조직 배양액을 함유한 3 및 4 군의 배지에서 연골 세포 수의 증가, 초기 연골 세포 증식 속도, 당단백의 합성, 제 2 형 교원질의 분비가 모두 높게 나타나 골막 조직 배양액이 연골세포 배양을 촉진시키는 생물학적 인자일 가능성이 높은 것으로 판명되었다. 비록 50% 골막 조직 배양액을 추가한 경우 대조군과 현저한 차이를 보이지 않았지만, 2 일간 골막을 조직 배양한 배양액이라는 점을 감안하면 생체의 골막 조직은 더 큰 영향을 미치리라 짐작할 수 있다. 여기서 **fetal serum bovine** 은 골막 조직 배양액에 비하여 영향력은 작지만 그 자체에 함유된 영양물질과 **transforming growth factor - β 1** 과 같은 성장인자의 영향으로 연골 세포 증식을 촉진시키는 인자로 사료되며, 골막조직 배양액과 동시에 사용될 경우 서로 상승 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

V. 결론

골막 조직 배양액을 배지로 한 연골 세포 배양에서 대조군인 무혈청 Ham F-12 배지와 비교하여 연골세포의 수, 연골세포의 초기 증식 속도, 당단백의 합성 및 제 2 형 교원질의 분비 모두가 증가한 결과를 보였다. 10% 우태아혈청은 골막 조직 배양액에 비하여 상대적으로 낮지만 연골 세포 배양을 촉진 시키는 효과가 있었으며, 골막 조직 배양액과 동시에 배지로 상용된 경우는 상승 효과가 있었다. 따라서 자가 연골세포 이식술에서 골막은 이식된 연골세포가 누출되는 것을 방지하는 물리적 방벽의 역할 외에 연골세포의 증식을 촉진시키는 생물학적 인자로 사료된다.

참고 문헌

1. Aglietti P, Buzzi R, Bassi PB and Fioriti M : Arthroscopic drilling in juvenile osteochondritis dissecans of the medial femoral condyle. *Arthroscopy* 10 : 286-291, 1994
2. Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijer R, vander Linden AJ and Bulstra SK : Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Internat Orthop* 21 : 313-317, 1997
3. Bradley J and Dandy DJ : Results of drilling osteochondritis dissecans before skeletal maturity. *J Bone and Joint Surg* 71-B(4) : 642-644, 1989
4. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O and Peterson L : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England J Med* 331 : 889-895, 1994
5. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C and Peterson L : Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 326 : 270-283, 1996
6. Bulstra SK, Homminga GN, Buurman WA, Terwindt-Rouwenhorst E and vander Linden AJ : The potential of adult human perichondrium to form hyalin cartilage in vitro. *J Orthop Res* 8 : 328-335, 1990
7. Convery FR, Akeson WH and Keown GH : The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop* 82 : 253-262, 1972
8. Coutts RD, Woo SL, Amiel D, von Schroeder HP and Kwan MK : Rib perichondrial

- autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Clin Orthop* 275 : 263-273, 1992
9. Delancy JP, O'Driscoll SW and Salter RB : Neochondrogenesis in free intraarticular periosteal autografts in an immobilized and paralyzed limb. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop* 248 : 278-282, 1989
 10. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos A and Langer R : Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 27 : 11-23, 1993
 11. Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ and Ferkel RD : Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop* 182 : 200-205, 1984
 12. Fujii K, Sai S, Tanak T, Tsuji M, Mori M and Murota K : Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar cartilage utilizing autogenous periosteal grafts. Read at the Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of USA, Japan, and Canada, Banff, Alberta, Canada, Oct. 27, 1991
 13. Furukawa T, Eyre DR, Koide S and Glimcher MJ : Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone and Joint Surg* 62-A : 79-89, 1980
 14. Gallay SH, Miura Y, Comisso CN, Fitzsimmons JS and O'Driscoll SW : Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *J Orthop Res* 12 : 515-525, 1994
 15. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D and Klein M : The repair of

- experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7 : 208-218, 1989
16. Grande DA, Singh IJ and Pugh J : Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec* 218 : 142-148, 1987
 17. Ham AW and Cormack DH : *Histology*. 8th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1979
 18. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H and Lust G : Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 12 : 485-497, 1994
 19. Hoikka VE, Jaroma HJ and Ritsilä VA : Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scandinavica* 61 : 36-39, 1990
 20. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM and vander Linden AJ : Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone and Joint Surg* 72-B(6) : 1003-1007, 1990
 21. Hunter W : The classic of the structure and disease of articulating cartilages. *Clin Orthop* 317 : 3-6, 1995
 22. Izumi T, Scully SP, Heydemann A and Bolander ME : Transforming growth factor-beta 1 stimulates type II collagen expression in cultured periosteum-derived cells. *J Bone and Min Res* 7 : 115-121, 1992
 23. Korkala OL : Periosteal primary resurfacing of joint surface defects of the patella due to injury. *Injury* 19 : 216-218, 1988
 24. Kaweblum M, del Carmen Aguilar M, Blancas E, Kaweblum J, Lehman WB, Grant AD

- and Strongwater AM : Histological and radiographic determination of the age of physeal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of the New Zealand White rabbit. *J Orthop Res* 12 : 747 –749, 1994
25. Mankin HJ : Current concepts review. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone and Joint Surg* 64-A : 460-466, 1982
26. Min BH, Park SR, Hwang TS, Kim WH and Kweon OK : Origin of cells in regenerated cartilage following autologous chondrocyte transplantation. Read at the 5th Annual Meeting of the Korean Orthopaedic Research Society, Seoul, Korea, Oct. 13, 1999
27. Mitchell N and Shepard N : The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone and Joint Surg* 58-A : 230-233, 1976
28. Miura Y, Fitzsimmons JS, Comisso CN, Gallay SH and O'Driscoll SW : Enhancement of periosteal chondrogenesis in vitro. Dose-response for transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). *Clin Orthop* 301 : 271-280, 1994
29. Moran ME, Kim HKW and Salter RB : Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit. Investigation of autogenous periosteal grafts subjected to continuous passive motion. *J bone and Joint Surg* 74-B(5) : 659-667, 1992
30. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM and Caplan AI : In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop* 259 : 223-232, 1990
31. Nakahara H, Goldberg VM and Caplan AI : Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 9 : 465-476, 1991

32. **Niedermann B, Boe S, Lauritzen J and Rubak JM : Glued periosteal grafts in the knee. Acta Orthop Scandinavica 56 : 457-460, 1985**
33. **O'Driscoll SW : Current concepts review. The healing and regeneration of articular cartilage. J Bone and Joint Surg 80-A(12) : 1795-1812, 1998**
34. **O'Driscoll SW, Keeley FW and Salter RB : The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. J Bone and Joint Surg 68-A : 1017-1035, 1986**
35. **O'Driscoll SW, Keeley FW and Salter RB : Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. J Bone and Joint Surg 70-A : 595-606, 1988**
36. **O'Driscoll SW, Recklies AD and Poole AR : Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in vitro study. J Bone and Joint Surg 76-A : 1042-1051, 1994**
37. **O'Driscoll SW and Salter RB : The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. J Bone and Joint Surg 66-A : 1248-1257, 1984**
38. **O'Driscoll SW and Salter RB : The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. Clin Orthop 208 : 131-140, 1986**
39. **Peterson L : Read at the meeting of the International Cartilage Repair Society, Boston,**

Massachusetts, Nov. 16. 1998

40. Rae PJ and Noble J : Arthroscopic drilling of osteochondral lesions of the knee. *J Bone and Joint Surg* 71-B(3) : 534, 1989
41. Rand JA : Role of arthroscopy in osteoarthritis of the knee. *Arthroscopy* 7 : 358-363, 1991
42. Ritsilä VA, Santavirta S, Alhopuro S, Poussa M, Jaroma H, Rubak JM, Eskola A et al. : Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery. *Clin Orthop* 302 : 259-265, 1994
43. Rubak JM : Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. An experimental study. *Acta Orthop Scandinavica* 53 : 175-180, 1982
44. Rubak JM, Poussa M, and Ritsilä V : Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits. *Acta Orthop Scandinavica* 53 : 181-186, 1982
45. Seradge H, Kutz JA, Kleinert HE, Lister GD, Wolff TW and Atasoy E : Perichondrial resurfacing arthroplasty in the hand. *J Hand Surg* 9A : 880-886, 1984
46. Skoog T and Johansson SH : The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts. *Plast and Reconstr Surg* 57 : 1-6, 1976
47. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H et al. : Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone and Joint Surg* 71-B(1) : 74-80, 1989
48. Weinstein SL and Buckwalter JA : *Turek's Orthopaedics*. 5th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1994

49. Zarnett R, Delaney JP, O'Dricoll SW and Salter RB : Cellular origin and evolution of neochondrogenesis in major full-thickness defects of a joint surface treated by free autogenous periosteal grafts and subjected to continuous passive motion in rabbits. Clin Orthop 222 : 267-274, 1987

- Abstracts -

**Effect of Conditioned Media from Periosteum on Proliferation
and Matrix Synthesis of Rabbit Articular Chondrocyte**

Hyun Kon Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Ajou University

(Directed by Professor Shin Young Kang)

Function of the periosteum used in autologous chondrocyte transplantation is unclear. Experimental results of the effect of periosteum in chondrocyte culture has not been reported. The purpose of this study was evaluation of the biological function of the periosteum in chondrocyte culture by analysis of the effect of periosteal explants culture media to the chondrocyte proliferation, proteoglycan synthesis, and type II collagen secretion *in vitro*.

In first stage experiment, optimal concentration of the periosteal explants culture media for the chondrocyte proliferation was decided. Periosteal explants and hyaline cartilage were harvested from the both ilium and both knee joints of a rabbit that was 3 months old. Periosteum explants were cultured for 48 hours in Dulbecco minimum essential medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). 0%, 25%, 50%, and 75% conditioned

media were prepared by dilution. Chondrocytes isolated from the cartilage were monolayer cultured in each media and proliferation was measured by direct cell counting. The number of chondrocyte was most increased in 50% conditioned medium, which was regarded as optimal concentration.

In second stage experiments, four groups of media were prepared; Group I – serum free Ham F-12, Group II – 10% FBS, Group III – 50% conditioned medium, and Group IV – 50% conditioned medium with 10% FBS. Chondrocytes were cultured in each medium and chondrocyte proliferation , proteoglycan synthesis, and type II collagen secretion were measured and compared. The number of chondrocyte was most increased in Group IV and early proliferation rate was highest in Group III. Proteoglycan synthesis was increased in Group II, III, and IV as compared with Group I, but there were no significant differences between Group II, III, and IV. Type II collagen secretion into media was most increased in Group IV, but there were some increase in Group II and III compared to Group I.

In conclusion, chondrocytes proliferation, proteoglycan synthesis, and type II collagen were increased in media containing periosteal explants culture media compared to serum free Ham F-12, and 10% FBS showed synergistic effect. These results demonstrate that periosteum may have a biological function in autologous chondrocyte transplantation in addition to the mechanical barrier preventing chondrocytes leakage.

Key Words : Conditioned Media, Periosteum, Chondrocyte Culture