

Electrospray법을 이용한 MS275/PLGA submicron 코팅 티타늄에서의 표면변화와 간엽줄기세포증식에 관한 연구

유수연¹ · 김성균^{1*} · 허성주¹ · 곽재영¹ · 이주희² · 박윤경¹ · 김에나¹

¹서울대학교 치의대학원 치과보철학교실, ²울산대학교 서울아산병원 치과보철과

연구 목적: 본 실험은 MS275와 PLGA (poly lactic-co-glycolic acid)의 복합체를 submicron 크기로 티타늄 디스크 표면에 코팅하여, 표면의 변화를 알아보고 생물학적으로 간엽 줄기세포 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 시행되었다.

연구 재료 및 방법: 양극산화 디스크에 electrospray 코팅법을 이용하여 PLGA를 분사한 것을 대조군으로 설정하고, MS275를 0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M 농도별로 코팅한 것을 실험군으로 하였다. 티타늄 디스크 표면에 분사된 복합체가 submicron 입자 크기로 이루어졌는지 SEM을 통해 확인하였으며, MS275로 코팅한 디스크와 양극산화 디스크의 거칠기 차이를 확인하기 위해 AFM으로 관찰하였다. 디스크 위에 간엽줄기세포 배양 후 1, 4, 7일에 세포증식 양상을 SEM과 MTT 검사를 통해 확인하였다.

결과: AFM (atomic force microscope) 결과 대조군과 실험군에서 거칠기의 유의할만한 차이가 없었다($P>.05$). MTT 결과 1, 4, 7일 시간이 지남에 따라 세포 증식이 활발해졌으며 세포 배양 7일에 0.5 μ M - 1.5 μ M MS275 농도 안에서, MS275의 농도가 커짐에 따라 세포의 활성도가 높아짐이 유의할 수준으로 확인되었다($P<.05$). 세포 부착을 SEM으로 확인한 결과, 세포의 부착 수는 시간이 갈수록 증가하고 부착 형태 역시 돌기가 크고 넓어지며, 표면과 긴밀함 접촉이 증가하였다.

결론: FE-SEM과 MTT 결과 MS275/PLGA 복합체로 표면 처리된 타이타늄 표면에서 세포가 초기에 (7일 내) 빠르게 증식하였다. 또한 복합체 처리군의 농도가 증가할수록 높은 세포 성장 수치를 보였다. (대한치과보철학회지 2012;50:285-91)

주요단어: 티타늄; MS275; PLGA; 줄기세포

서론

임플란트의 표면처리는 골유착에 영향을 미치며, 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들어, 더 거친 표면¹은 임플란트 식립시 마찰력과 고정을 증대시킬 수 있다. Hermann 등²은 1.5 mm의 매끈한 collar를 가지는 매끈하고 거친 표면 혼합형 임플란트를 골 하방에 심고, 거친 표면의 다른 임플란트를 골 정에 맞춰 심은 결과 교합하중이 가해지기 전에, 거친 표면이 초기 치유기 동안 초기 bone implant contact (BIC)를 향상시킨다는 결론을 발표하였다.

치과용 임플란트에서 티타늄 양극산화 임플란트 표면 처리,³ 수산화인회석 코팅을 이용한 방식⁴ 샌드블라스팅 표면⁵ 샌드블라스팅 후 산부식 처리⁶ 등의 임플란트 처리법은 이미 시판되는 제품들이 있으며 여러 학자들은 이들 표면이 기계절삭 표면보다 세포의 증식이 더 활발하고, BIC가 향상되었으며 초기 임플란트 고정효과가 증대되었다고 발표한바 있다.

임플란트 표면의 거칠기를 물리적, 화학적으로 증가시키는 방법 외에도 biomimetic engineering을 이용하여 임플란트의 초기 고정력 등 물성을 향상시키려는 노력이 진행 중이다. 2004년 Zhu 등⁷은 임플란트 표면 biomaterial이 조골세포의 process에 영향

을 미친다고 밝혔으며, Huang 등⁸은 임플란트 주위골이 loading에 견디기 위해서는 임플란트 표면과 주변 조골세포가 강한 세포 부착을 일으켜야 한다고 발표한 바 있다. 즉 임플란트의 골유합은 임플란트 성공에 중요하며 표면의 biomaterial은 그 효과를 더욱 증대화시키는 방법이 될 수 있다.

본 논문은 histone deacetylase inhibitor의 하나인 MS275가 티타늄 디스크 표면에서 세포활성에 어떠한 영향을 미치는지 알고자 계획되었다. MS275는 유전자 발현과 생리학적 단백질 조절에 중요한 역할을 하는 HDAC inhibitor의 일종으로, 최근 김 등⁹은 이것이 골 조직에서 초기 골유도 인자(early osteogenic marker)의 활성화와 유전자 발현을 촉진한다고 밝혔다. 즉 MS275를 사용함으로써 초기 골세포 반응을 활성화시킬 수 있다는 것이다.

MS275와 같이 골유도능이 있다고 알려진 성장유도인자를 어떻게 효과적으로 임플란트 주위골에 운반할 것인가는 중요한 문제이다. 이미 조 등¹⁰은 poly lactic-co-glycolic acid (PLGA)를 운반체로 사용하여 PLGA/1,25-dihydroxyvitamin D 혼합체를 submicron 입자로 티타늄 디스크에 표면처리 했을 경우, 세포 증식 속도가 증가하고 조골세포로의 분화가 촉진된다는 결과를 발표하였다. 또한 이 등¹¹도 운반체인 PLGA를 이용하여 rhBMP (TGF- β family)를 티타늄 디스크에 submicron 코팅하여 실험한 결

*교신저자: 김성균

110-768 서울특별시 중로구 대학로 101 서울대학교 치의대학원 치과보철학교실

02-2072-2661; e-mail, ksy0617@snu.ac.kr

원고접수일: 2012년 9월 17일 / 원고최종수정일: 2012년 10월 9일 / 원고채택일: 2012년 10월 16일

*본 연구는 Korea government (MEST)가 지원하는 National Research Foundation of Korea (NRF) (No.2011-0028067&2011-0004163) 기금에 의해 수행되었습니다.

과, 세포증식효과와 분화속도 증가에 대한 긍정적인 결과를 발표한 바 있다.

이에 근거하여 본 실험에서는 PLGA와 MS275 복합체를 submicron 크기로 티타늄 디스크 표면에 코팅하여, 생물학적으로 세포활성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 이러한 복합체가 티타늄 임플란트 표면에 사용되었을 때 골세포 증식을 활성화시킬 수 있다는 가능성을 알아본다는 점에서 그 의의가 있다.

연구 재료 및 방법

1. 티타늄 디스크 준비 및 표면 처리

티타늄 디스크는 commercially pure 기계절삭 디스크(Warantec Co., Seoul, Korea)를 준비하였다. 디스크는 25 mm 직경과 1 mm의 두께를 가지고 있으며, 모든 디스크를 초음파하에서 20분간 처리 후에 99% ethanol에 20분간 담그는 과정을 2번 반복한 후에 증류수에 하루 보관하였다. 양극산화 처리는 0.02 M/L calcium glyceophosphate와 0.15 M/L calcium acetate 전해질 용액에서 300 V 전압으로 3분간 실온에서 시행되었다. 양극산화 티타늄 디스크는 증류수로 세척 후 ethylene oxide (EO) 가스에서 소독 후 실험에 사용되었다.

2. MS275와 PLGA submicron 입자의 융합 및 코팅 시행

골유도 기능이 있다고 알려진 MS275와 고분자 캐리어인 PLGA를 30분 동안 섞어 PLGA 입자와 MS275가 잘 융합되도록 한 후¹²에, electrospray 기계(Nanonc Co., Seoul, Korea)를 이용하여 submicron 입자로 티타늄 디스크 표면에 코팅을 시행하였다. MS275는 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 후에 사용되었으며, PLGA는 acetone에 녹여 각 군마다 농도에 맞게 희석시켰다. 복합체 (MS275와 PLGA) 용액을 glass syringe (미세경 노즐 : 0.05 mm)에 연결하여 0.1 A 전류, 15 - 20 kV 전압, 5 μ l/min 속도로 분사하여 고르게 티타늄 디스크를 코팅할 수 있게 하였으며, 고농도의 적용을 위해 디스크는 회전 장치(30 rpm)에 연결하였다. 대조군과 실험군은 모두 4개이며 아래와 같다. PLGA의 영향이 없다는 것을 보이기 위해, 대조군으로 양극산화 티타늄 디스크 표면 위에 PLGA를 분사하였다.

Group 1: Anodized under 300 V then, coated with 50 μ l

[PLGA in DMSO] solution

Group 2: Anodized under 300 V then, coated with 50 μ l

[(0.5 μ mole MS275 (25 μ l) + PLGA (25 μ l))/disc] solution

Group 3: Anodized under 300 V then, coated with 50 μ l

[(1.0 μ mole MS275 (25 μ l) + PLGA (25 μ l))/disc] solution

Group 4: Anodized under 300 V then, coated with 50 μ l

[(1.5 μ mole MS275 (25 μ l) + PLGA (25 μ l))/disc] solution

3. Cell culture

토끼 골수(Approval No. SNU-120312-5)는 1 : 100,000 epinephrine 함유 lidocaine (Yuhan Co. Gunpo, Korea)으로 국소마취 후 bone marrow aspirator (Klima-Rosegger modif, Lausanne, Switzerland)를 이용하여 토끼 대퇴골에서 채취하였다. 채취한 골수를 70 mm nylon mesh filter (Becton Dickinson, NJ, USA)에 통과시켜 거른 후, 모아진 골수세포를 ACK lysing buffer에 담가 실온에서 6분간 2번 반복하여 처리하였다. 이 후, released cell들은 15% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 55 μ M 2-mercaptoethanol, penicillin-streptomycin (Sigma Co., MO, USA), 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma Co., MO, USA)를 포함한 배양액에 넣어, 37°C 5% CO₂ 습기 하에 보관되었다.

4. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay

토끼 골수 간엽줄기세포 1 × 10⁵를 티타늄 디스크 표면 위에 분주 후 측정하였다. 세포 분주 1, 4, 7일에 각 군당 5개를 측정하였다. 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성기질인 MTT tetrazolium을 보라색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 살아있는 세포내의 미토콘드리아의 능력을 이용한 검사법이다. 살아있는 세포가 많을수록 이 formazan의 생성도 많아지기 때문에 세포의 증식을 측정할 수 있다. 비수용성의 보라색 formazan 생성물이 측정도구에서 공급되는 용해시약에 녹아 나타나는 색의 흡광도를 ELISA reader (Bio-Rad Model 550; Hercules, CA, USA)로 OD 450 nm에서 측정하였다.

5. FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) 검사

세포부착의 형태학적 특성을 결정하기 위해 SEM (Hitachi S-4700, Japan)을 이용하였다. 티타늄 디스크 표면을 pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer serum (PBS) 1 ml에 5분 간격으로 3회 세척하고 2.5% glutaraldehyde와 paraformaldehyde 혼합액 4%로 4°C에서 1시간 동안 1차 고정하였다. 세척 후 osmium tetroxide로 2차 고정한 후 60-100% ethanol로 단계적으로 탈수하고 t-butyl alcohol로 tBA과정 후 냉동건조, 이온코팅 후 500배 배율로 관찰하였다.

6. AFM (atomic force microscope) 측정

캔틸레버의 끝에 매달린 탐침을 통해 표면의 원자상을 측정할 수 있는 AFM XE-100 (Park systems Co., Suwon, Korea)을 이용하여 티타늄 디스크 표면의 코팅 물질의 거칠기를 측정하였다.

7. 통계분석

각 데이터는 각 배양으로부터 평균±평균의 표준오차로 나타냈다. One way ANOVA로 세포 증식에 대한 전체 유의성을 분석 후, 세포 배양 7일째 MTT 결과에 대한 그룹간 차이의 유의성 검증을 위해 Tukey의 다중분석을 시행했다. AFM실험에서도 PLGA와 MS275/PLGA로 코팅한 양극산화 티타늄 디스크 표면 거칠기의 차이를 확인하기 위해, SPSS 통계분석을 사용하였고 5%의 유의성으로 검증하였다.

결과

1. 티타늄 표면 형태

양극 산화 티타늄 표면에 PLGA와 MS275을 섞은 용매를 sub-micron 입자 형태로 뿌렸을 때 PLGA만 뿌렸을 때보다 MS275가 첨가되었을 때 좀 더 점성이 있고 입자가 많은 편이다. 하지만 모든 실험군의 입자가 전자기장을 이용한 electrospray 기계를 이용함으로써 submicron 크기로 뿌려졌음이 확인되었다(Fig. 1).

2. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay 결과

MTT assay 결과 0.5 μM, 1.0 μM, 1.5 μM MS275는 토끼 골수 간엽 줄기 세포에 독성을 나타내지 않았으며 1.5 μM 농도 안에서는 농도가 커질수록 세포가 더 잘 자라는 경향을 보여준다. 또한 Fig. 2에서 볼 수 있듯이, 4일째까지는 cell이 자라는데 농도 간

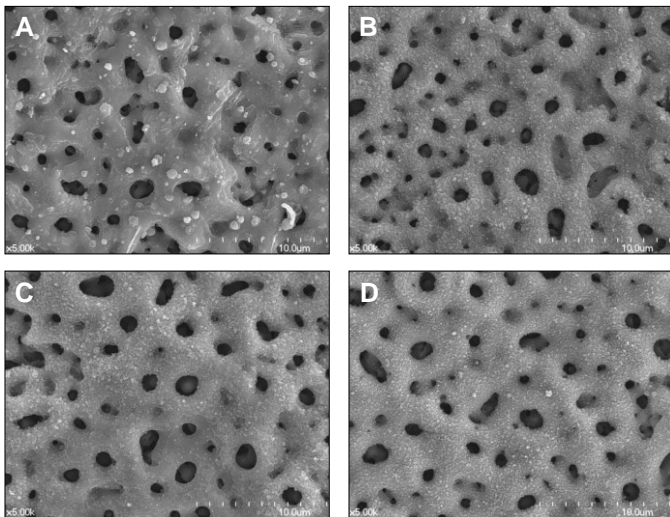


Fig. 1. SEM (×5000) image of anodized titanium disc by electrospraying (A) PLGA + DMSO (control) /disc. Anodized titanium discs are coated with submicron-sized PLGA particles. (B) 0.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc. Anodized titanium disc coated with PLGA/MS275 shows more sticky and fine texture than control group. (C) 1.0 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc (d) 1.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc.

유의한 차이를 보이지 않으며 ($P>.05$) 7일째 유의한 차이를 보인다 ($P<.05$).

3. FE-SEM 결과

MTT assay 결과와 마찬가지로 세포의 수는 시간이 갈수록 증가하고 부착 형태 역시 넓어지고, 표면과 긴밀할 접촉이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 0.5 μM - 1.5 μM MS275 농도 범위에서는 농도가 커질수록 세포가 더 잘 자라고 세포돌기가 많이 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. AFM (atomic force microscope) 결과

티타늄디스크 위에 뿌린 줄기세포의 증식이 MS275의 농도에 따른 성장유도 역할 때문에 변하는 것인지, 표면의 성장인자 때문에 생긴 거칠기의 변화인지 확인하기 위하여 표면 거칠기를 3차원적으로 측정된 결과 평균적으로 Ra값은 대조군에서 0.262 μm, 실험군에서 0.273 μm로 관찰되었다. 즉 양극산화 티타늄에 PLGA만 분사한 디스크의 거칠기와 MS275 1.5 μM를 분사한 티타늄의 거칠기 평균값 차이가 0.011 μm로 submicron 입자 크기이며, 이는 유의할만한 차이가 아니었다 ($P>.05$) (Fig. 4, Table 1).

Table 1. Surface roughness (Ra) of anodized disc coated with PLGA (control group) and MS275 + PLGA (test group)

Ra (surface roughness) measured by AFM (mean value) : (μm)	
Anodized disc with PLGA	0.262
Anodized disc with 1.5 μM MS275 + PLGA	0.273

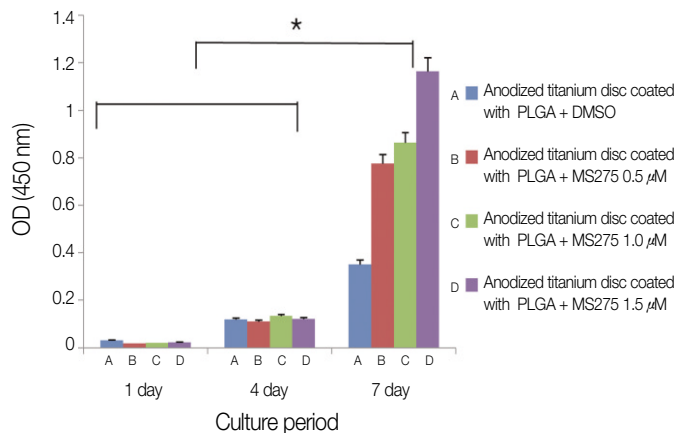


Fig. 2. MTT assay measured as cell proliferation. The result shows that cell proliferation is increased by time and after 7 day of cell culture, there is a significant difference ($*P<.05$; the graph bar represents mean ± SE). And the cell activity of test groups (anodized titanium disc coated with PLGA + MS275 0.5 μM, 1.0 μM, 1.5 μM) is significantly higher than control group (anodized titanium disc coated with PLGA/DMSO) at 7 day.

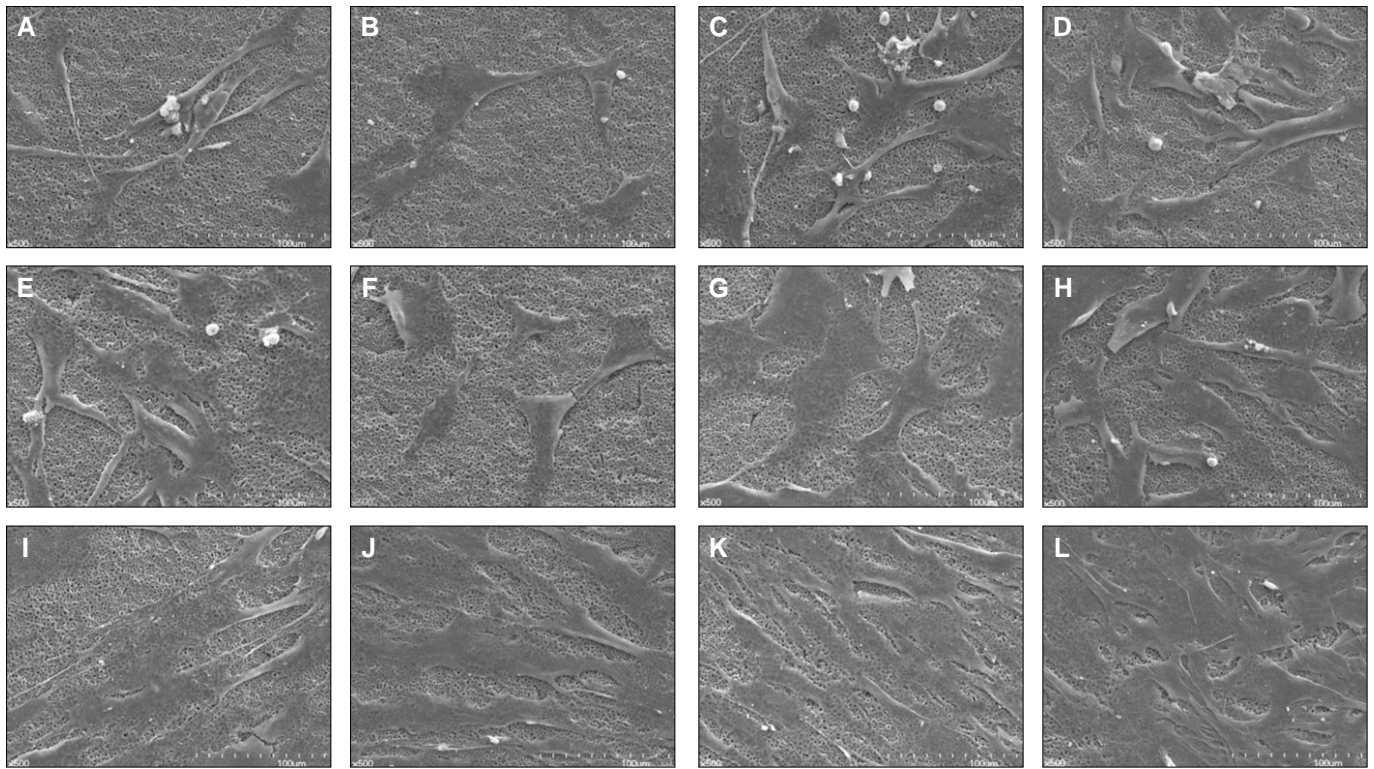


Fig. 3. SEM ($\times 500$) images of 1 day cell culture (A) PLGA + DMSO (control) /disc, (B) 0.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, (C) 1.0 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, (D) 1.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, SEM ($\times 500$) images of 4 day cell culture, (E) PLGA + DMSO (control) /disc, (F) 0.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, (G) 1.0 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, (H) 1.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, SEM ($\times 500$) images of 7 day cell culture, (I) PLGA + DMSO (control) /disc, (J) 0.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, (K) 1.0 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc, (L) 1.5 μM MS275 (25 μl) + PLGA (25 μl)/disc.

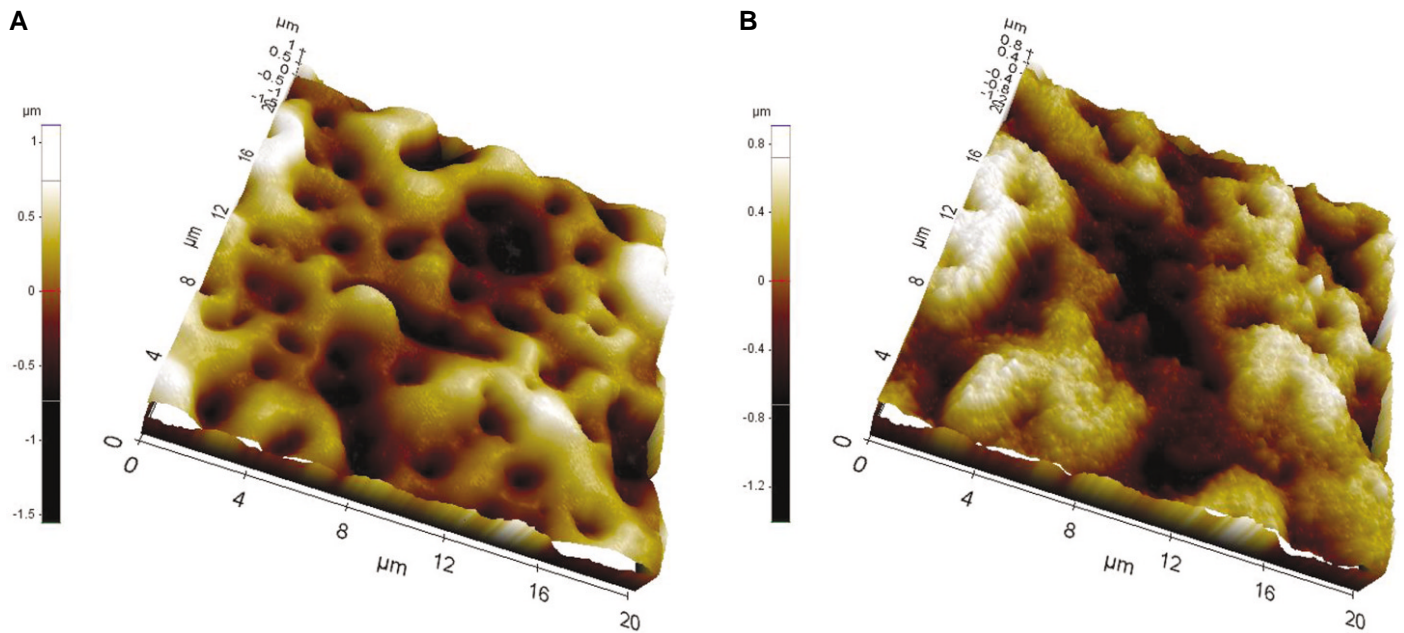


Fig. 4. The results of surface roughness measured by AFM (20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$) (A) Anodized titanium disc coated with PLGA, (B) Anodized titanium disc coated with MS275 and PLGA. There is no significant difference between group (A) and (B) ($P > .05$).

5. 통계분석

유의성 검증을 위해 Tukey의 다중분석을 시행한 결과, 0.5 μM MS275, 1.5 μM MS275로 코팅한 양극산화 티타늄 디스크에서, 세포 배양 7일 후 세포 증식 정도의 유의한 차이를 보였다($P < .05$). AFM 실험에서는 t-test 수행한 결과, PLGA만 코팅한 표면과 1.5 μM MS275와 PLGA를 같이 코팅한 표면 거칠기에 유의한 차이가 없었다($P > .05$).

고찰

골 생성은 복잡한 여러 단계 과정에 의해 일어나는 현상이며, 각 단계마다 골 형성을 일으킬지, 골 소실을 일으킬지에 관한 결정은 여러 유전자의 발현으로 결정된다.¹³ 이 중, MS275는 histone deacetylase (HDAC)의 기능을 억제하여 새로운 골형성을 돕는 역할을 한다. 즉, tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) 발현을 조절함으로써 골형성에 영향을 미친다는 것은 knockout mice를 이용한 *in vivo* 실험에서 이미 밝혀졌다.

PLGA¹⁴는 인체에 흡수되고 생체친화적이며 정상 세포의 기능에 영향을 미치지 않는다. 이미 조직공학에서 scaffold로 널리 사용되고 있으며, 임상에서도 흡수성 suture 재료, 인공 조직 재료로 응용되고 있다. 친수성을 띠는 poly glycolic acid (PGA)와 소수성을 띠는 poly lactic acid (PLA)의 합성체인 PLGA는 PLA와 PGA의 비율을 조절함으로써 술자가 원하는 대로 방출속도를 결정할 수 있다. 본 실험에서는 PGA와 PLA의 비율을 1:1로 하여 5-20일 사이에 대부분의 합성체가 모두 방출될 수 있도록 하였다. 결과적으로 PLGA를 통해 같이 방출된 MS275가 티타늄 디스크 표면의 초기 세포부착을 증진시켜 골 성장 반응 속도를 증가시킬 수 있는 환경을 만드는 것이다.

지금까지 임상에서 골유합 속도의 초기 증가를 위해 임플란트 디자인의 변화뿐만 아니라 여러 코팅 방법이 연구되었다. 예를 들어 티타늄 플라즈마 분사 표면은 1970년대 정형외과 연구에서 보고되었으며¹⁵ 골-임플란트 계면의 표면 면적을 증가시키고, 3차원 표면과 비슷하게 작용하여 부착성 골형성을 촉진시키는 것으로 여겨진다. 표면 면적이 기계절삭 임플란트에 비해 600%나 증가했다고 보고한 연구¹⁶도 있다. 또한 수산화 인회석 코팅¹⁷ 역시 티타늄 플라즈마 분사 표면과 비슷한 거칠기와 기능성 면적의 증가¹⁸를 가진다고 한다. 그러나 이러한 코팅은 코팅이 부서질 수도 있고, 금이 갈 수도 있다는 단점을 가진다.

이러한 단점을 보완하기 위해 여러 방법이 연구되고 있으며, 본 실험에서는 코팅 단백질의 입자를 submicron 크기로 조절하여, 임플란트 식립시 입자가 골 계면에서 떨어져 나가는 것을 감소시켰으며 혹시 단백질 입자가 떨어져 나간다고 하더라도 빠르게 세포가 대사하여 이물질로 인식되지 않도록 하였다. Catledge 등¹⁹은 임플란트 표면에 줄기세포가 부착하기 위해서는 나노 크기의 세포 물질이 작용하기 때문에, 나노 크기로

임플란트 표면을 조절해야 효과적이라고 밝힌 바 있다. 신체에서 가장 작은 모세혈관은 5 μm 보다 작아서 입자가 이보다 작아야 embolism을 일으키지 않고 세포내 확산 및 대사가 쉽고 한다. 또한 나노 크기의 물질을 사용하면 세포 대사 능력이 배로 늘어난다.²⁰ 즉 본 실험에서 사용한 submicron 입자 코팅은 가장 작은 모세혈관의 크기보다도 작은 사이즈의 세포 성장인자 코팅으로, 임플란트에 응용되었을 때 주위 세포에 빠르게 영향을 미칠 수 있기 때문에, 세포 성장 속도를 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

PLGA/MS275 혼합체 용액을 15-20kV 전압 하에 0.05 mm 미세경 분사노즐을 이용하여 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 속도로 미량 토출하는 electrospray 코팅법을 사용한 결과, SEM 결과에서 볼 수 있듯이, 티타늄 디스크 표면에 submicron 입자 코팅이 가능하였다. PLGA/MS275 submicron 입자로 코팅된 티타늄 디스크 표면 위에 토끼 골수 간엽세포를 배양한 결과 1.5 μM 농도 안에서는 독성을 보이지 않았으며, 0.5 μM 에서 1.5 μM 로 MS275의 농도가 커짐에 따라 세포 증식이 더 활발해지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 2에서 볼 수 있듯이, 4일째까지는 cell이 자라는데 농도간 유의한 차이를 보이지 않았지만 7일째에서 유의한 차이를 보인다. 세포 부착을 SEM으로 확인한 결과, 세포의 부착 수는 시간이 갈수록 증가하고 부착 형태 역시 돌기가 크고 넓어지며, 표면과 긴밀함 접촉이 증가하는 것을 알 수 있었다.

양극산화 티타늄/PLGA 분사 디스크(대조군)와 PLGA/MS275 복합체로 코팅한 디스크(실험군) 간에 세포 부착 증식 속도에 차이가 있다는 것은, 코팅 물질의 성질 때문일 수도 있고, 코팅에 의한 거칠기 차이 때문일 수도 있다. 본 실험에서는 거칠기의 증가와 상관없이 MS275의 그 자체의 성질 때문에 초기에 토끼 간엽 줄기세포 반응성도 증가했다는 가정 하에, 디스크 표면 거칠기를 AFM을 통해 확인하였다. 그 결과 디스크의 거칠기는 양극산화 디스크/PLGA와 PLGA/MS275 복합체로 코팅한 티타늄 디스크에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 결론적으로 submicron 코팅된 MS275는 일정 농도 하에서 디스크 표면에 세포 부착, 성장을 돕는 역할을 할 수 있으며 이를 임플란트에 응용한다면 초기 세포 활성도를 증가시키는 결과를 얻을 수 있을 것이다. 또한 김 등²¹이 주장한대로 MS275가 골유도능을 가진다면, 임플란트의 골유합을 도울 수 있는 조골세포의 빠른 유도로 임플란트의 초기 고정력을 증가시킬 수 있을 것이다. 이를 확인하기 위해서는 PLGA/MS275 복합체로 코팅된 양극산화 티타늄 디스크 위에서 간엽 줄기세포의 골세포 분화 유도 실험이 이루어져야 한다. 또한 본 세포 증식 실험결과를 바탕으로 PLGA/MS275 복합체가 치과 임플란트 표면에 submicron 코팅 처리될 때 세포의 성장이 촉진되는지는 동물실험을 통해 더 연구할 필요가 있다.

이번 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 본 연구에서는 electrospray를 사용한 결과, PLGA/MS275 복합체를 submicron 입자 크기로 다양하고 자동적이며 균일하게 임플란트 표면에 코팅 할 수 있다는 것을 보였다. 이 방법

으로 임플란트 표면에도 부착 및 유지가 가능할 것으로 보인다.

2. MS275에 PLGA를 scaffold로 사용함으로써 PLGA/MS275 복합체를 천천히 유리시켜 골 성장에 이용할 수 있으며, cell study 결과 MS275는 toxicity를 보이지 않았다.
3. FE-SEM과 MTT assay 결과 PLGA/MS275 복합체로 표면 처리된 티타늄 표면에서 세포가 대조군에 비해 초기에(일주일내) 빠르게 증식하였다. 또한 복합체 처리군의 농도가 증가할수록 높은 세포 성장 수치를 보였다.

참고문헌

1. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topography on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1567-76.
2. Hermann JS, Cochran DL, Nummikoski PV, Buser D. Crestal bone changes around titanium implants. A radiographic evaluation of unloaded nonsubmerged and submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1997;68:1117-30.
3. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 2002;23:491-501.
4. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A* 2004;71:108-17.
5. Ivanoff CJ, Widmark G, Hallgren C, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:128-34.
6. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:779-84.
7. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kem D. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 2004;178:13-22.
8. Huang HH, Ho CT, Lee TH, Lee TL, Liao KK, Chen FL. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol Eng* 2004;21:93-7.
9. Kim HN, Lee JH, Bae SC, Ryoo HM, Kim HH, Ha H, Lee ZH. Histone deacetylase inhibitor MS-275 stimulates bone formation in part by enhancing Dlx36-mediated TNAP transcription. *J Bone Miner Res* 2011;26:2161-73.
10. Cho YJ, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lee JH. Cellular responses on anodized titanium discs coated with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ incorporated Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *J Korean Acad Prosthodont* 2008;46:620-627.
11. Lee SY. Effect of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/bone morphogenic protein-2 coating of anodized titanium surface on osteoblast-like cells. MS Thesis. In: Korea, Seoul University, 2010.
12. Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 2004;282:1-18.
13. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:444-51.
14. Agrawal CM, Niederauer GG, Athanasiou KA. Fabrication and Characterization of PLA-PGA Orthopedic Implants. *Tissue Eng* 1995;1:241-52.
15. Hahn H, Palich W. Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1970;4:571-7.
16. Sammons RL, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:657-66.
17. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70:17-22.
18. de Groot K, Geesink R, Klein CPAT, Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1375-81.
19. Catledge SA, Vohra YK, Bellis SL, Sawyer AA. Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:986-9.
20. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2002;6:319-27.

A study of mesenchymal stem cell proliferation and surface characteristics of the titanium discs coated with MS275/PLGA by an electrospray

Soo-Yeon Yoo¹, DDS, MSD, Seong-Kyun Kim^{1*}, PhD, Seong-Joo Heo, PhD,
Jai-Young Koak¹, PhD, Joo-Hee Lee², PhD, Yoon-Kyung Park¹, PhD, Ena Kim¹, BSD

¹Department of Prosthodontics, Seoul National University Dental Hospital, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

²Department of Prosthodontics, Seoul Asan Medical Center, Ulsan University, Seoul, Korea

Purpose: This study was conducted to identify the surface characteristics of titanium discs coated with MS275/PLGA by electrospray and which is effective to mesenchymal stem cell proliferation. **Materials and methods:** We used anodized surface coated with PLGA as a control group and anodized surface coated with MS275 0.5 μ M, 1 μ M, 1.5 μ M as test groups. To examine that the coating particles are nanometer sized, FE-SEM was used and AFM was utilized to determine the difference of coating surface roughness. We checked the mesenchymal stem cell proliferation by using MTT assay on 1st, 4th, 7th days. **Results:** There was no significant difference between control groups and test groups in AFM results ($P > .05$). In MTT assay results, mesenchymal stem cell proliferation was increased with time, at 7th day, cell viability on discs coated with 1.5 μ M MS275 was significantly higher than control group ($P < .05$). As SEM showed, the number of cells on all discs was increased and the morphology of cell attachment was also wider and closer with time. **Conclusion:** Titanium surface coated with MS275/PLGA showed significantly higher cell proliferation and the more density of MS275 was dispersed on titanium discs, the faster cells grew. (*J Korean Acad Prosthodont* 2012;50:285-91)

Key words: Titanium; MS275; PLGA; Mesenchymal stem cells

*Corresponding Author: Seong-Kyun Kim

Department of Prosthodontics, Seoul National University Dental Hospital, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongum-Dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-749, Korea
+82 2 2072 2661: e-mail, ksy0617@snu.ac.kr

Article history

Received September 17, 2012 / Last Revision October 9, 2012 / Accepted October 16, 2012