

다양한 rhBMP-2 코팅 임플란트 표면에서의 인간 간엽 줄기세포의 부착, 증식, 분화반응 분석

이인구¹ · 한인호² · 황선욱³ · 류재준^{4*}

¹고려대학교 의과대학 치의학교실, ²특허청 화학생명공학 심사국,
³고려대학교 안산병원 의과학연구소 신경생리학과, ⁴고려대학교 안산병원 치과 보철과

연구 목적: 본 실험은 거친 표면으로 유의성 있는 줄기세포반응을 나타냈던 4가지의 티타늄 표면 위에 rhBMP-2를 코팅했을 때 어떤 유의한 줄기세포반응(세포부착, 증식, 분화)이 나타나는지 비교 분석함으로 rhBMP-2 코팅을 위한 가장 적절한 표면을 평가하기 위해 시행되었다.

연구 재료 및 방법: 대조군인 기계절삭표면(machined surface)과 실험군인 양극산화(anodized), RBM, SLA 표면에 rhBMP-2를 코팅한 후 코팅하지 않은 표면과 같이 8가지 표면 위에 인간간엽줄기세포를 배양하였다. 배양 후 24시간 후 SEM을 통해 줄기세포의 부착을 평가하였고 배양 3, 7, 14일 후 MTT와 ALP 검사를 통해 줄기세포의 증식과 분화반응을 평가하였다. 그리고 배양 7일 후 RT-PCR 검사를 통해 Type I collagen, osteocalcin, osteopontin의 유전자 발현의 변화를 평가하였다.

결과: SEM 평가에서 4가지 rhBMP-2표면이 코팅하지 않은 표면에 비해 세포부착면적이 넓고 긴밀하며 세포돌기가 더 많이 관찰되었다. 양극산화 rhBMP-2코팅표면에서 가장 두드러지게 관찰되었다. MTT 검사에서 크게 의미 있는 차이는 나타나지 않았다. ALP 검사에서 양극산화 rhBMP-2코팅 표면은 대조군과 비교해서 (3, 14일) 또 RBM rhBMP-2 코팅 표면과 비교해서 (14일) 유의성 있는 ALP 활성도의 증가를 나타내었다($P<0.05$). RT-PCR 검사에서 osteocalcin과 osteopontin의 유전자 발현은 양극산화 rhBMP-2코팅 표면에서 높게 나타났다.

결론: 양극산화 rhBMP-2코팅표면이 줄기세포의 부착과 분화실험에서 대조군표면과 rhBMP-2를 코팅한 기계절삭표면이나 RBM 표면에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다($P<0.05$). (대한치과보철학회지 2012;50:44-52)

주요단어: 줄기세포; rhBMP-2; 양극산화 표면; RBM 표면; SLA 표면

서론

임플란트가 임상에서 사용된 후 골 반응을 향상시키기 위한 표면처리법이 계속 연구 개발되고 있다. 임플란트의 표면처리는 평활한 기계 절삭면(machined surface)으로부터 임플란트 표면의 거칠기가 증가할수록 골과 임플란트의 접촉면적이 증대되어 골 유착은 증가한다는 연구결과¹ 이후 표면 거칠기를 증가시키기 위해 산부식이나 분사(blasting) 등 많은 방법들이 개발되었다. RBM방법, SLA방법과 양극 산화(Anodic oxidation)방법 등에 의한 표면의 변화를 통해 티타늄 임플란트의 골 전도성(osteoconduction)이 증가되었다. 하지만 최근에 개발되고 있는 rhBMP (recombinant human bone morphogenetic protein)를 이용한 코팅 방법은 골 형성을 촉진하는 단백질질을 코팅함으로 골 유도성(osteoinduction)도 기대할 수 있게 되었다. rhBMP의 잠재성은 특히 불량한 골질이나 골다공증, 심한 골 결손부의 임플란트 시술에 유용할 것이다. 1999년 Bessho 등²은 동물실험을 통해

rhBMP-2가 임플란트 주위 골 형성을 촉진하는 효과를 나타내는 것을 관찰하였다. 기계 절삭면의 티타늄 위에 하는 rhBMP표면처리하는 골 형성의 효과가 미미함으로³ rhBMP의 골이식 때 캐리어로 자주 사용되었던 collagen과 chondroitin sulfate,^{4,5} HA (Hydroxyapatite)^{6,9}표면 위의 rhBMP코팅을 통한 골 형성의 유의성에 관한 연구들이 발표되었다. 최근에는 물리적으로 변형된 티타늄 표면 위에 rhBMP를 코팅하는 방법들이 개발되어 양극산화 표면 위에 rhBMP를 코팅해 그 유의성을 검증하는 실험들이 진행되었다.¹⁰ 그러나 rhBMP의 특성상 표면처리를 통해 우수한 반응을 보일 것으로 예상되나 큰 유의성을 찾지 못한 실험도 있는데,^{4,5} 그것은 rhBMP자체의 문제라기보다는 코팅방법이나 코팅하는 표면의 rhBMP와의 부적합성 때문이라고 하였다.³ rhBMP와의 부착력 향상을 위해서는 거친 표면구조에 의한 기계적 결합력의 증가나 화학적 결합에 의한 부착력 향상 등이 고려될 수 있을 것이다.

본 연구는 그 동안 물리적인 방법으로 표면 거칠기를 증가시

*교신저자: 류재준

425-707 경기 안산시 단원구 고잔1동 516 고려대학교 의료원 안산병원 치과 031-412-5370; e-mail, koprosth@unitel.co.kr

원고접수일: 2011년 12월 26일 / 원고최종수정일: 2012년 1월 6일 / 원고채택일: 2012년 1월 11일

*본 연구는 2009년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 지원(09142의료기464)에 의해 수행되었습니다.

켜 유의한 골 전도성을 나타내는 것으로 알려진 4가지 임플란트 표면에 rhBMP-2를 코팅했을 때 유의한 줄기세포 반응이 나타나는지 비교, 분석함으로써 rhBMP-2코팅을 위한 합당한 표면을 검증하고자 한다. rhBMP-2는 rhBMP 종류 중 하나로 임상에서 골 형성을 촉진하는데 가장 효과적인 골 유도 물질 중 하나로 밝혀졌다. 표면 거칠기가 증가된 표면은 접촉면적의 증가로 임플란트의 고정을 증진시킬 수 있는 장점 외에도 코팅된 rhBMP-2를 유지하는데 도움이 될 것이라 생각된다. 하지만 여러 가지의 거친 표면이 코팅된 rhBMP-2와 같이 줄기세포의 부착, 증식, 분화 반응을 방해할지 아니면 상승작용할지 또 얼마나 그 효과를 나타낼 수 있을지 세포실험을 통해 확인하고자 계획하였다.

그 동안 rhBMP-2를 코팅한 표면에 대한 많은 동물실험과 세포실험이 이루어졌다. 하지만 줄기세포를 이용한 실험은 많지 않았고, 특히 표면 거칠기를 증가시켜 유의한 골세포 반응을 보였던 표면을 대상으로 해서 rhBMP-2 코팅한 표면에 대한 세포비교실험은 거의 이루어지지 않았다.

그래서 본 실험의 목적은 기계절삭 표면을 대조군으로 하고 그 동안 표면 거칠기를 증가시켜 유의한 골세포 반응이 나타난 것으로 알려진 SLA 표면과 RBM 표면 그리고 양극산화 표면에 rhBMP-2를 코팅해 인간 간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cell)에 어떤 유의한 세포반응을 나타내는지 비교 분석함으로써 합당한 rhBMP-2 코팅 표면을 찾기 위해 시행되었다.

연구 재료 및 방법

1. 재료

두께 1 mm, 직경 10 mm의 동전 모양의 순수 티타늄(grade 2, Newjapan iron manufacture Co, Japan)디스크에 각각 표면처리를 달리한 8종류의 티타늄 디스크를 준비하였다(Table 1).

rhBMP-2코팅전의 4종류 시편을 SEM (Hitachi S-4700, Japan)으로 500배율, 2000배율로 관찰하였다. 또 시편의 거칠기(Roughness, Ra value)는 Surfscout SV-3000 (Mitutoyo Co, Japan)으로 측정했다.

Table 1. 4 different surfaces and rhBMP-2 treated surfaces

Surface	rhBMP-2 (600ng)
Machined surface (control)	Coated
	Uncoated
Anodized surface	Coated
	Uncoated
RBM surface	Coated
	Uncoated
SLA surface	Coated
	Uncoated

2. 표면처리

*양극산화 표면 (Cowellmedi Co, Korea): 기계절삭된 표면상태의 시편을 0.2M 황산용액과 0.2M 인산 용액을 전해액 내에 +극에 시편을 연결하고 -극에 백금판을 연결한 후 전기를 가하여 산화시켰다. 양극산화 처리된 시편은 수세건조한 다음 감마멸균(Greenpia)하여 보관하였다.

*RBM (Osstem Co, Korea): 기계절삭된 티타늄표면에 치조골을 형성하는 인산칼슘계열로 생체친화성이 우수하고 안정성이 확보된 HA(Hydroxyapatite)분말을 6 - 6.3 atm으로 10초 동안 분사시킨 후 30% nitric acid로 잔여 HA 잔사를 제거하여 거칠기를 형성하였다.

*SLA (Osstem Co, Korea): 기계절삭된 티타늄표면에 알루미늄분말을 고압으로 분사시켜 Ra 2.5 - 3.0 um 범위의 표면거칠기를 구현시킨 후 부식과정을 통해 균일한 미세 거칠기를 형성하였다.

*rhBMP-2 코팅(Cowellmedi Co, Korea): 각각의 시편의 한쪽 면에만 600 ng의 rhBMP-2를 코팅하였다(Table 1). 먼저 티타늄 시편을 24well plate에 각 well 당 시편을 코팅할 면이 위로 오게 두어 감마 멸균시켰다. 감마멸균된 시편의 한쪽 면에 멸균된 rhBMP-2 단백질 용액(75 µg/ml pH5, MES buffer) 8 µl를 여러 부분에 나누어 점적하여 골고루 퍼지게 하였다. 이 모든 과정은 소독실내의 크린벤치 속에서 시행되었다. 40℃에서 3시간을 두어 냉동시킨 후 선반 온도를 단계적으로 높여 진공 하에서 건조하였다. 온도 및 유지시간은 다음과 같이 하였다. -20℃에 1시간, -10℃에 1시간, 0℃에 1시간, 10℃에 1시간, 20℃에서 20시간 동안 건조시켰다. 각 시편당 600 ng의 rhBMP-2는 배지 1 ml에 담그어 농도 600 ng/ml가 되게 하였다. rhBMP-2의 농도는 Choi 등의 논문¹⁾에 근거했다.

3. 세포 배양(Cell culture)

인간 간엽 줄기세포(PT-2501, Lonza Co, USA)를 10 ml씩 미리 T-75 세포 배양판에 분주하고 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂, 90% 습도) 1시간 정도 CO₂양과 온도를 맞추어준 후 3일에 한번씩 배지를 교환하였고 5일에 한번씩 2차 배양(subculture)하였다. 2차 배양 시에는 PBS (phosphate buffer serum)으로 2회 이상 세척 후 0.25% trypsin EDTA (Invitrogen Co, USA) 2 ml을 이용하여 세포를 떼어낸 후 10% FBS (fetal bovine serum) 배지로 trypsin을 억제시킨 후 1000 RPM에서 5분간 원심분리 후 새로운 배양판으로 옮겨 주었다. 세포는 약 5000개를 각 시편 위에 분주했고 분주 후 세포가 붙기 시작하면서부터 분화배지로 교환하였다. 분화배지(PT-3002, Lonza Co, USA)를 사용하였고 분화배지는 3일마다 교환하였으며 ALP/MTT/ RT-PCR 분석 시에는 PBS로 부드럽게 세척한 후 실험했다.

4. SEM (Scanning electron microscopy)

SEM을 배양과정에서 세포부착의 형태학적 특성을 결정하기 위해 사용하였다.

세포 분주 1일(24시간)후에 각 종류의 샘플을 0.1 M phosphate buffer 1 ml로 5분씩 2회 세척하고 2.5% glutaldehyde 1.5 ml로 1차 고정하고 다시 세척 후 osmium tetroxide로 2차 고정을 하였다. 그리고 60 - 100% 에탄올로 단계 적으로 탈수(dehydration)하고 t-butyl alcohol로 tBA과정 후 냉동건조 후 이온 코팅 후 SEM (S-4700, Hitachi Co, Japan)을 이용하여 50배, 500배로 관찰하였다.

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

시편표면에 부착한 세포 증식(proliferation)의 평가로 MTT 분석법을 이용했다.

세포분주 후 3, 7, 14일에 각 시편 당 5개를 측정 했다. 이 분석은 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 많아 지므로 이 방법을 이용해 세포의 증식을 측정할 수 있다. 비수용성의 보라색 formazan 생성물이 측정도구에서 공급되는 용해시약에 녹아 나타나는 색의 흡광도를 440 nm의 흡광도 분석기로 측정했다.

CCK8 (Dojindo Co, Japan) 을 사용하여 세포의 증식여부를 검증했다. 세포 배양액에 CCK8 용액을 50 ul 넣은 후 37℃, 5% CO₂, 90% 습도에서 3시간 동안 반응을 시킨 후 ELISA 기계로 OD 440에서 측정하였다.

6. ALP (Alkaline phosphatase) 활성도 검사

세포의 분화를 측정하기 위해 ALP 활성도 검사를 시행했다.

ALP (Alkaline phosphatase)는 Type I collagen과 함께 조골세포의 초기 분화를 대표하는 지표이다. ALP는 조골세포의 바깥 표면에 많이 분포하면서 석회화(calcification)에 관여하므로 ALP 활성도의 측정은 세포 분화를 평가하는 가장 대표적인 방법이다. 세포 분화 평가는 조골세포에서 나타나는 특징인 ALP의 활성도를 분석하여 얻어지는데 ALP는 p-Nitrophenyl phosphate (p-NPP)로부터 p-Nitrophenol (p-NP)을 분비하는데 작용한다. 만약 조골세포의 분화가 진행되지 않으면 p-NP를 형성하지 못하므로 세포실험을 통해 생성된 p-NP양을 측정하여 세포의 분화정도를 평가할 수 있다.

세포 분주 후 3, 7, 14일에 각 5개 샘플을 측정했다. ALP 활성도는 alkaline phosphatase 분석장치(Biovision, Mountain Co, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 시편에 붙어있는 세포는 PBS 로 10회 세척한 후 ALP 분석 완충액 80 ul로 녹여 내고 14,000 RPM에서 3분

간 원심분리 후 상층액을 96 well로 옮긴 후 50 ul pNPP 시약으로 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후 stop dyddor 20 ul 넣은 후 ELISA 기계로 OD 405 값으로 ALP 활성도를 측정하였다. ALP 활성도 값은 표준곡선(standard curve) 를 기반으로 pNP양을 환산한 후 메뉴얼에 나온 방법으로 계산했다. ALP 활성도 = pNP 환산량(nmol) / 샘플의 양(ml) / 반응시간(min) 으로 나타내었고 3일, 7일, 14일 각각 시료를 상기 프로토콜대로 활성도를 측정하였다. 각각의 샘플에 대한 ALP 활성도는 1-WAY ANOVA (tukey)로 통계 처리 하였다.

7. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-역전사 효소 중합효소 연쇄반응)

RT-PCR로 조사한 유전자는 Type I collagen, osteopontin, osteocalcin 유전자이다. RT-PCR primer는 NCBI 유전자 은행과 primer plus 3 프로그램을 이용하여 디자인 했다. Primer는 IDT에서 합성의뢰하여 주문하였다.

세포 분주 후 7일에 시편 표면으로부터 세포들을 수집해 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Co, USA)를 이용하여 Type I collagen, osteopontin, osteocalcin의 생성에 관련되는 mRNA를 추출하였다. 추출된 mRNA는 nano-drop 을 이용하여 정량하였으며, 10 ng/ μ l - 80 ng/ μ l의 total RNA가 추출되었다. RNA 100 ng을 one step RT-PCR kit (Dakara Co, Japan) 를 이용하여 증폭하였다. PCR 장치는 DAKARA thermocycler 을 이용하였고 1% agarose gel에서 전기영동한 후 밴드 명암(band intensity)을 image J 1.36 (NIH Co, USA) 프로그램을 이용하여 젤 농도를 측정하였다.

8. 통계분석

각 데이터는 각 배양으로부터 평균 \pm 평균의 표준 오차(standard deviation)로 나타냈다. One way ANOVA로 전체 유의성을 분석 후 차이에 대한 유의성 검증을 위해 Tukey의 다중분석을 시행했다. SPSS가 통계분석을 위해 사용됐고 5%의 유의성으로 검증했다. 분석은 첫째, 각 표면을 rhBMP-2를 코팅하지 않은 기계절삭 표면을 대조군으로 해서 분석했고 둘째, 각 표면에서 rhBMP-2 코팅한 표면과 코팅하지 않은 표면과의 차이를 분석했고 셋째, rhBMP-2코팅표면 내에서의 차이의 유의성을 분석하였다.

결과

1. 시편 표면의 거칠기(Roughness)

티타늄 시편의 거칠기는 SLA(이하 S라고 표기), RBM(이하 R이라고 표기) 표면이 양극산화(이하 A라고 표기)표면과 기계절삭(이하 M이라고 표기) 표면보다 높은 Ra value를 보여 거친 양상을 나타냈다(Table 2).

Table 2. Surface roughness (Ra) of each surface treated titanium discs

Surface	Roughness (Mean ± SD)
Machined (control)	0.153 ± 0.039 μm
Anodized	0.186 ± 0.095 μm
RBM	1.508 ± 0.071 μm
SLA	2.742 ± 0.155 μm

2. 시편 표면 세포부착 관찰(SEM)

세포 부착 양상은 각 표면에 따라 달랐다. A, Anodized rhBMP-2코팅(이하 AB라 표기) 표면이 세포 부착이 넓고 표면과 긴밀

하게 가장 잘 되어 보였고 특히 AB 표면에선 표면과의 넓고 긴 밀한 부착양상과 세포 돌기(cell process)가 더 많이 생성 되어 있었다. 각 표면에서 rhBMP-2코팅 표면이 코팅하지 않은 표면에 비해 세포 부착이 넓고 세포 돌기가 더 길고 많이 생성되어 있었다(Fig. 1).

3. 세포 증식 평가(MTT assay)

3일, 7일에서 rhBMP-2 코팅군과 코팅하지 않은 표면간의 큰 차이는 없었지만 14일째 rhBMP-2 코팅 표면들의 세포증식이 감소되게 나타났다(Fig. 2).

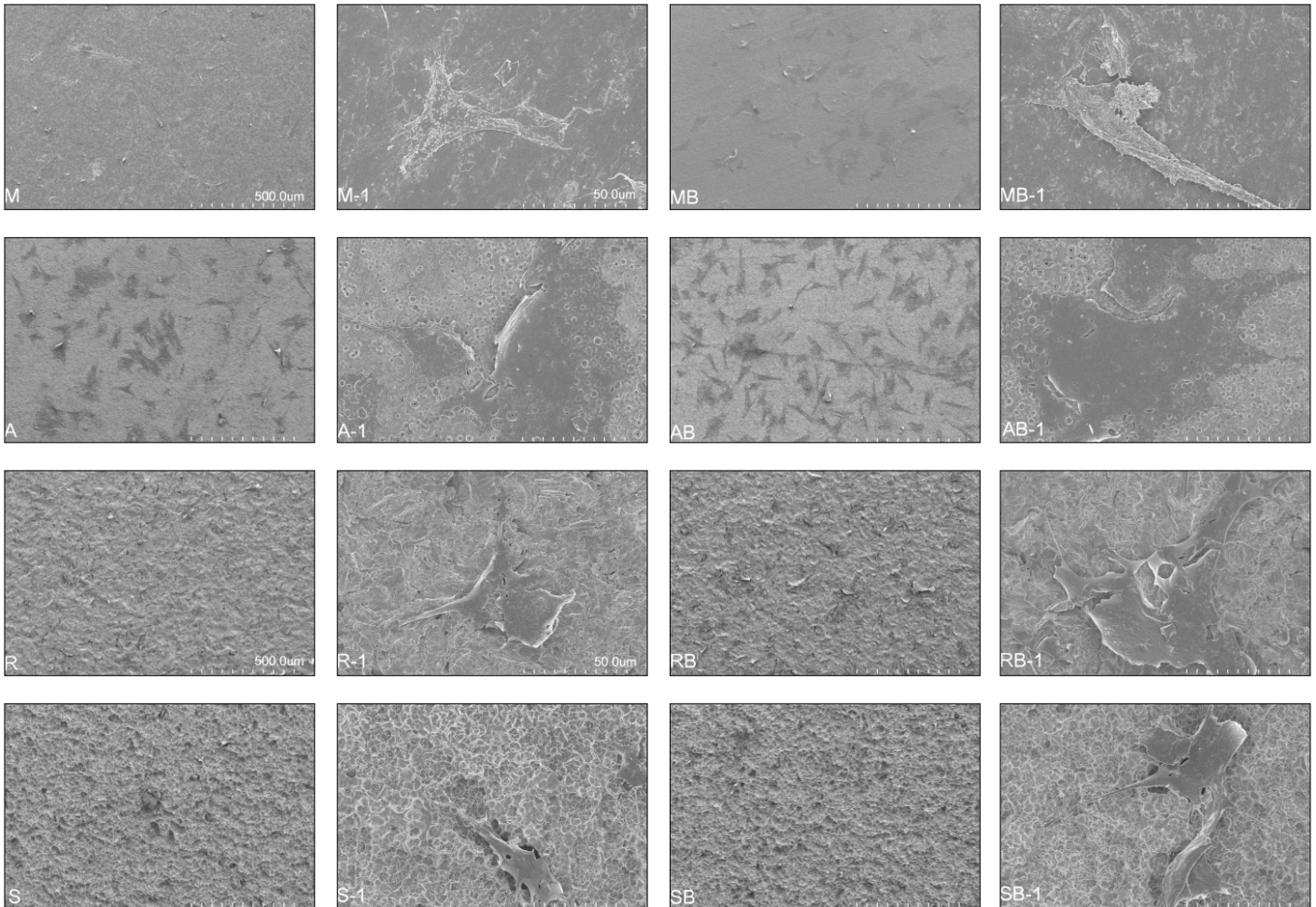


Fig. 1. SEM of treated surfaces after 24 hours culture.

M: machined surface (× 50), M-1: (× 500), MB: machined rhBMP-2 coated surface (× 50), MB-1: (× 500), A: anodized surface (× 50), A-1: (× 500), AB: anodized rhBMP-2 coated surface (× 50), AB-1: (× 500) R: RBM surface (× 50), R-1: (× 500), RB: RBM rhBMP-2 coated surface (× 50), RB-1: (× 500), S: SLA surface (× 50), S-1: (× 500), SB: SLA rhBMP-2 coated surface (× 50), SB-1: (× 500).

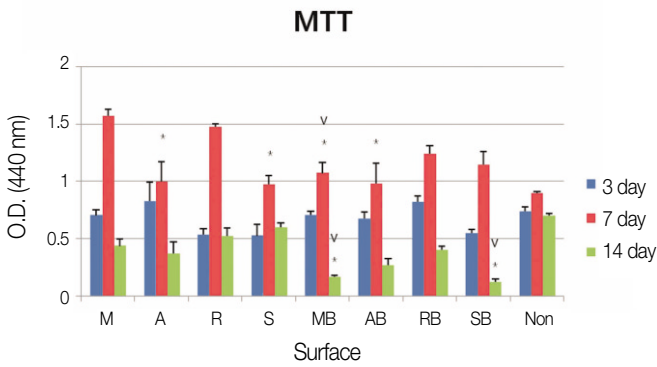


Fig. 2. MTT assay measured as cell proliferation.
* significant differences ($P<.05$) compared with control group, v significant differences ($P<.05$) compared with no BMP-2 coating group. Non: culture plastic. Error bars represent the standard errors of each group.

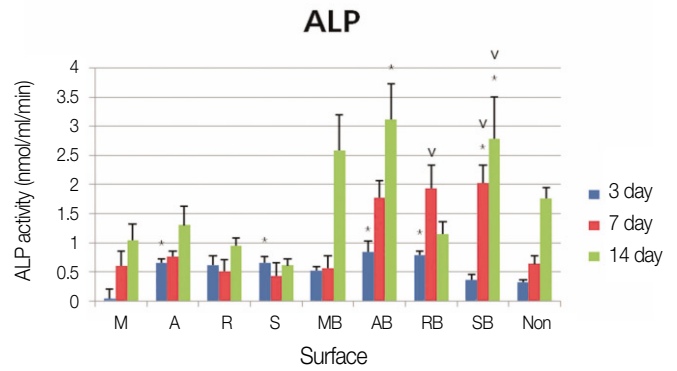


Fig. 3. ALP activity in the cells attached to each type of titanium surfaces indicates osteoblast differentiation.
* significant differences ($P<.05$) compared with control group, v significant differences ($P<.05$) compared with no BMP-2 coating group. Non: culture plastic.

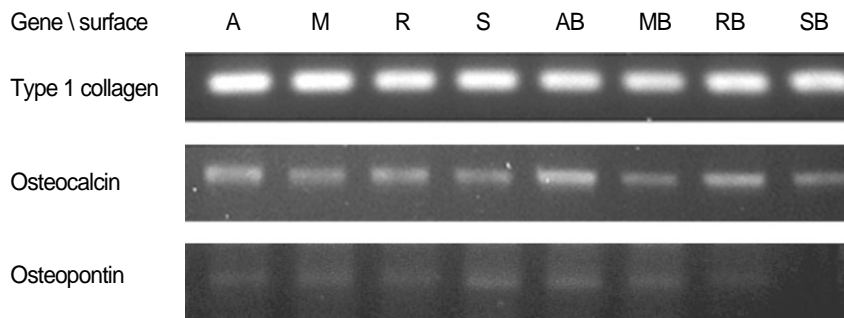


Fig. 4. RT-PCR of Type 1 collagen, osteocalcin, and osteopontin of eight surface treated samples.

4. 세포 분화 평가(ALP activity assay)

rhBMP-2 코팅군들의 비교에서 SLA rhBMP-2 코팅(이하 SB라 표기) 표면이 7일에 기계절삭 rhBMP-2코팅(이하 MB라 표기) 표면에 비해, 14일에 RBM rhBMP-2 코팅(이하 RB라 표기) 표면에 비해 통계적으로 유의하게 높았고 14일에 AB 표면이 RB 표면에 비해 유의하게 높았다(Fig. 3).

5. 세포 유전자 평가(RT-PCR assay)

Type 1 collagen은 모든 표면에서 높은 발현도를 나타냈고 각 표면간의 차이의 뚜렷한 유의성은 없었다. osteocalcin, osteopontin은 AB 표면에서 높은 발현을 보였다(Fig. 4).

고찰

인간 간엽 줄기 세포(Human mesenchymal stem cell)는 골 재생과 임플란트의 골 유착 과정에서 중요한 역할을 한다. rhBMP의

효과는 줄기세포의 초기 골 형성 과정에서 중요한 영향을 끼친다.¹² 줄기 세포를 유도해 조골세포로 분화시키는데 중요한 역할을 할 수 있다.¹³ 그래서 rhBMP를 코팅한 임플란트 표면은 특히 초기고정에 부족한 골질(Type IV)에서 임플란트의 초기 골 융합 과정의 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

BMP는 TGF- β (transforming growth factor β) 상과(superfamily)의 한 종류로서, 1965년 Urist¹⁴가 백서의 근육내 골 유도에 의한 골 형성을 통해 처음 발견하고 1988년 Wozney 등¹⁵이 처음으로 클로닝(cloning)에 성공하면서 rhBMP에 대한 많은 연구가 이루어졌다. rhBMP는 줄기 세포를 골과 연골 형성 세포로 분화시켜주는 분화 요소(differentiate factors)로 rhBMP가 이식된 후 줄기 세포는 연골 세포를 경유한 연골내 골화(endochondral ossification) 방법 또는 직접적인 막내골화(intramembranous bone formation)를 통해 미성숙골(woven bone)을 형성하고 재골화를 통해 완전한 골을 형성한다.¹⁶ 그 외 다른 여러 연구에서 rhBMP가 골 형성 과정에서 나타나는 조골 세포의 분화의 표시인 alkaline phosphate, collagen 형성, osteocalcin과 osteopontin의 생성 등을 촉진한다고 하였다.^{17,18} rhBMP는 농도에 따라 반응의 양상이 진전되어 높은 농도의

rhBMP는 더 실제적인(substantial) 골 형성과 조기 골 형성을 유도한다고 하였다.¹⁶

임플란트에 rhBMP를 적용하기 위해선 적절한 전달 시스템(carrier)이 필요하다. rhBMP의 생물학적 반감기(biological half-time)는 짧기 때문에 이것의 효과를 연장시킬 수 있는 전달 시스템이 필요하다. 전달 시스템의 필요조건으로는 생체친화성, 다공성 구조, 세포부착의 가능성 그리고 성장 인자(growth factor)의 골 활성을 방해하지 않은 것이다.¹⁹

그 동안 rhBMP의 골 이식 때 사용했던 캐리어인 collagen,⁴⁵ HA⁶⁹ 등으로 표면 처리된 표면 위에 rhBMP를 코팅해 사용한 실험들이 진행됐었다. 하지만 표면 거칠기를 증가시켜 유의한 골 반응을 보였던 표면들도 생체친화성이나 세포부착의 가능성 등이 검증되었고 거친 표면이 스며든 rhBMP를 유지하는 rhBMP코팅 표면으로서 유의성을 찾을 수 있을 것이라 생각하였다. 그러나 물리적으로 변형된 표면이 rhBMP의 골세포작용을 방해할지 아니면 상승작용할지 또 얼마나 그 효과를 나타낼 수 있을지 세포 실험을 통해 확인하고자 계획하였다.

본 실험에서는 rhBMP-2를 각 표면에 코팅할 때 단지 표면에 점적하여 동결 건조시켜 사용하였지만 뚜렷하게 모든 표면에서 rhBMP-2 코팅하지 않은 표면에 비해 24시간 후의 세포부착 양상이 나아 보였고 또 몇 개 표면은 ALP 활성도를 이용한 세포분화에 유의성을 나타냈고 다른 표면들도 유의하지 않지만 높은 수치를 나타냈다. ALP (Alkaline phosphatase)는 Type I collagen과 함께 조골 세포의 초기 분화를 대표하는 지표이다.

여러 논문에서 rhBMP-2표면은 코팅하지 않은 표면에 비해 줄기세포의 부착과 분화는 증진시켜도 세포 증식에 도움을 주지 않는다고 하였다. 특히 세포 분화가 시작되면서 세포 증식의 감소가 나타나는데 그 이유로써 Lim 등²⁰은 분화중에 세포는 증식이 감소되거나 심지어 세포주기(cell cycle)를 벗어나기 때문이라고 하였고 Shi 등²¹은 rhBMP-2 표면은 줄기세포 증식의 감소와 함께 분화 과정을 통해 골 형성 작용을 증가시키기 때문이라고 하였다.

본 실험에서도 rhBMP-2 코팅표면이 코팅하지 않은 표면에 비해 세포 증식과정에서 증가를 보이지 않았지만 뚜렷하게 세포 부착과 ALP로 검사한 분화과정에서 효과를 나타냈다. 또 14일째 ALP 세포 분화가 많이 나타난 rhBMP-2코팅표면은 상대적으로 세포증식이 감소되게 나타났다.

rhBMP-2 코팅군내에서 세포 부착과 분화의 유의한 차이가 나타났다. rhBMP-2 코팅군내에서 SB 표면이 7일에 MB 표면에 비해, 14일에 RB 표면에 비해 통계적으로 유의한 ALP활성도의 증가를 보였고 14일에 AB 표면이 RB 표면에 비해 유의한 증가를 보였다. rhBMP-2 SLA표면의 다른 실험²²에서도 이 표면이 rhBMP-2 기계 절삭 표면보다도 높은 ALP 값을 나타냈다고 하였다. 또 rhBMP-2 RBM표면의 다른 실험²³에서 저자는 RBM 표면에선 rhBMP-2 효과가 기계 절삭 표면보다 미미하게 나타났다고 하였다.

AB 표면은 다른 rhBMP-2 코팅 표면보다 세포 부착 면적이나

긴밀도, 세포 돌기 등의 세포 부착양상도 더 나아 보였다.

RT-PCR 분석에서도 rhBMP-2 코팅 표면간의 차이가 나타났다. Type I collagen은 조골 세포의 초기 분화를, osteocalcin과 osteopontin은 조골 세포 분화의 성숙 단계(후기)를 나타내는 지표이다. 본 실험에서 RT-PCR로 측정된 Type I collagen 유전자의 발현도는 모든 표면에서 전체적으로 높은 발현도를 보였지만 각 표면에서의 발현도의 차이점은 발견할 수 없었다. 하지만 osteocalcin과 osteopontin의 유전자의 발현은 rhBMP-2 코팅 표면 중 AB표면에서 높은 발현도가 관찰되었다.

여러 연구에서(*in vitro*) 표면 거칠기가 증가될수록 세포 부착, 증식은 감소하지만 ALP 분화는 증가된다고 하였다.^{22,26} 하지만 본 연구에서 부드러운 표면인 A표면, M표면과 상대적으로 거친 표면인 S표면, R표면간의 SEM, MTT, ALP값의 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 본 실험에서 rhBMP-2코팅 표면으로써의 유의성은 표면 거칠기와는 큰 관계없이 나타났다. 세포 부착과 증식, 분화 반응은 단지 표면 거칠기 뿐 아니라 표면 거칠기를 포함한 표면형상과 성분의 차이가 복합적인 영향을 끼치는 것이 아닌가 추측한다.

본 연구에서 AB 표면은 세포 부착 때부터 14일 분화 때까지 꾸준한 유의성을 나타냈다. rhBMP-2 코팅은 임플란트가 고정되는 초기의 세포 부착과 분화 반응에 큰 의미를 갖는데 SB 표면은 7일, 14일 후에야 대조군에 비해 세포 분화에 유의성을 나타냈다.

양극산화 표면이 다른 거친 표면에 비해 다른 점은 산화막(oxide layer)의 두께이다. 티타늄은 정상적으로 얇은 보호 산화막으로 덮여있고 이 산화막 두께는 평균 17 nm이고 화학적 성분은 주로 TiO₂이다. 양극 산화법을 통해 임플란트 표면의 산화층이 두꺼워지면서 접촉되는 세포의 ALP 활성도가 증가되고 Ca와 P 이온이 포함되면서 HA나 다른 인산칼슘(calcium phosphate)으로 결정화된다고 한다.²⁵ 또 산화 처리로 인한 구조적 변화가 간엽 세포를 자극해 조골 세포가 되게 한다고 하였다.²⁷ 본 실험에 사용된 양극산화 표면의 산화막 두께는 평균 2.26 μm이다. 하지만 두꺼워진 산화막이 rhBMP-2와 상호작용을 하는지 또 어떤 상호 작용에 의해 세포 활성을 나타내는지 아직 명확히 알 수 없다.

rhBMP-2코팅표면으로써의 양극 산화 표면의 유의성은 여러 논문에서도 발표되었다. 동물실험¹⁰에서 또 세포 실험²⁸에서 발표되었고, Balasundaram 등²⁸은 양극 산화 방법은 티타늄 표면을 빠르고 쉽게 변형시켜 세포 부착을 증진시키기 위한 rhBMP-2 코팅을 용이하게 한다고 했다. 또 Hall 등¹⁰은 양극 산화 표면의 다공성의 표면 성질은 기계 절삭 표면에 비해 rhBMP-2를 많이 함유하며 지속적으로 유리함으로 더 나은 세포 반응을 나타낸 것이라 하였다.

본 실험에서도 양극 산화 표면이 다른 기계 절삭 표면이나 거친 표면의 RBM 표면보다 다공성의 성질 때문에 더 뚜렷한 rhBMP-2 표면으로써의 세포 부착과 분화 반응을 나타낸 것으로 예상된다.

결론

물리적으로 티타늄표면을 변형시킨 양극산화, RBM, SLA 표면과 대조군인 기계절삭 표면에 rhBMP-2를 코팅해 인간간엽 줄기세포의 발현을 관찰한 본 실험을 통해

1. 줄기 세포의 세포 부착은 4가지 rhBMP-2코팅 표면에서 코팅하지 않은 표면에 비해 더 넓은 부착 면적과 세포 돌기의 생성 등 더 나은 세포 부착 양상이 관찰됐다. 특히 양극산화 rhBMP-2코팅 표면에서 가장 넓고 긴밀한 부착 면적과 세포 돌기의 생성을 보였다.
2. 양극산화 rhBMP-2코팅 표면과 SLA rhBMP-2코팅 표면이 대조군 기계 절삭 표면에 비해 또 기계 절삭 rhBMP-2코팅과 RBM rhBMP-2코팅 표면에 비해 ALP 활성도를 이용한 세포 분화 검사에서 유의한 증가를 나타냈다.
3. 종합적으로 양극산화 rhBMP-2코팅표면이 줄기세포의 부착과 분화실험에서 대조군 표면과 rhBMP-2를 코팅한 기계 절삭 표면이나 RBM 표면에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다($P < .05$).

향후 이들 표면들을 대상으로 더 긴 기간 동안 다양한 rhBMP-2 농도와, 다양한 코팅 방법의 세포실험이 이루어져야 할 것이고 또 동물실험도 같이 이루어진다면 rhBMP-2코팅을 위한 합당한 표면을 찾는 데 더 명확한 결론에 도달할 것이라고 사료된다.

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. Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen HY, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:212-8.
3. Liu Y, Huse RO, de Groot K, Buser D, Hunziker EB. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res* 2007;86:84-9.
4. Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, Mai R, Bierbaum S, Scharnweber D, Kuhlisch E, Loukota R, Eckelt U. Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:54-9.
5. Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Roessler S, Sewing A. Effect of immobilized bone morphogenetic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:563-9.
6. Hartwig CH, Esenwein SA, Pfund A, Küsswetter D, Herr G. Improved osseointegration of titanium implants of different surface characteristics by the use of bone morphogenetic protein (BMP-3): an animal study performed at the metaphyseal bone bed in dogs. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003;141:705-11.
7. Esenwein SA, Esenwein S, Herr G, Muhr G, Küsswetter W, Hartwig CH. Osteogenic activity of BMP-3-coated titanium specimens of different surface texture at the orthotopic implant bed of giant rabbits. *Chirurg* 2001;72:1360-8.
8. Aebli N, Stich H, Schawalder P, Theis JC, Krebs J. Effects of bone morphogenetic protein-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite-coated implants: an experimental study in sheep. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:295-302.
9. Sumner DR, Turner TM, Urban RM, Turek T, Seeherman H, Wozney JM. Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. *J Orthop Res* 2004;22:58-65.
10. Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UM. Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J Clin Periodontol* 2007;34:444-51.
11. Choi KH, Moon KO, Kim SH, Yun JH, Jang KL, Cho KS. Purification and biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by E. coli expression system. *J Korean Acad Periodontol* 2008;38:41-50.
12. Song SJ, Jeon O, Yang HS, Han DK, Kim BS. Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17:1113-9.
13. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-41.
14. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
15. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.
16. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27:S2-8.
17. Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1997;60:283-90.
18. Takuwa Y, Ohse C, Wang EA, Wozney JM, Yamashita K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:96-101.
19. Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998;43:380-98.
20. Lim TY, Wang W, Shi Z, Poh CK, Neoh KG. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:1-10.
21. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh CK, Wang W. Surface functionalization of titanium with carboxymethyl chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 for enhanced osseointegration. *Biomacromolecules* 2009;10:1603-11.
22. Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z, Boskey AL. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int* 2002;71:519-29.
23. Citeau A, Guicheux J, Vinatier C, Layrolle P, Nguyen TP, Pilet P, Daculsi G. In vitro biological effects of titanium rough surface

- obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* 2005;26:157-65.
24. Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater* 2008;4:535-43.
 25. Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, Koak JY. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* 2004;25:2867-75.
 26. Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone* 2009;45:17-26.
 27. Wennerberg A. On surface roughness and implant incorporation (Thesis). Göteborg: Dept of Biomaterials, University of Göteborg, Sweden, 1997.
 28. Balasundaram G, Yao C, Webster TJ. TiO₂ nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increases osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A* 2008;84:447-53.

Analysis of attachment, proliferation and differentiation response of human mesenchymal stem cell to various implant surfaces coated with rhBMP-2

In-Ku Lee¹, DDS, MSD, PhD, In-Ho Han², PhD, Sun-Wook Hwang³, PhD, Jae-Jun Ryu^{4*}, DDS, MSD, PhD

¹Department of Medical Science, Major in Dentistry, Korea University, Seoul,

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Patent and Trademark office, Daejeon,

³Department of Neuroscience, Medical research institute, Ansan Hospital, Korea University, Ansan,

⁴Department of Prosthodontics, Ansan Hospital, Korea University, Seoul, Ansan, Korea

Purpose: In this paper we tried to evaluate the most appropriate surface for rhBMP-2 coating among 4 rough titanium surfaces. **Materials and methods:** We used machined surface as a control group and anodized, RBM and SLA surfaces as test groups. We coated rhBMP-2 on the 4 surfaces and with uncoated surfaces for each case, we cultured human mesenchymal stem cells on all 8 surfaces. 24 hours after we measured the stem cell attachment with SEM, and on 3rd, 7th, and 14th days, we checked the cell proliferation and differentiation by using MTT and ALP activity assay. And on the 7th day after the culture, we performed RT-PCR assay to determine whether the expression levels of Type I collagen, osteocalcin, osteopontin were changed. **Results:** We observed with SEM that 4 rhBMP-2 coated surfaces exhibited wider and tighter cell attachment and more cell process spreading than uncoated surfaces. The anodized rhBMP-2 surface caused robustest effects. In MTT assay we could not find any meaningful difference. In ALP assay there was a significant increase ($P < .05$) in the ALP activity of anodized rhBMP-2 coated surface compared with that of the control (3rd and 14th days) and with that of the RBM rhBMP-2 coated surface (14th day). In RT-PCR assay there was increased expressions in the anodized rhBMP-2 coated surface for osteocalcin, and osteopontin. **Conclusion:** We found that the anodized rhBMP-2 coated surface were most prominent stem cell attachment and differentiation in compared to control and Machined rhBMP-2 coated, RBM rhBMP-2 coated surface. (*J Korean Acad Prosthodont 2012;50:44-52*)

Key words: Stem cell; rhBMP-2; Anodized; RBM; SLA surface

*Corresponding Author: Jae-Jun Ryu

Department of Prosthodontics, Ansan Hospital, Korea University, Gojan 1-dong, Danwon-gu, Ansan, 425-707, Korea

+82 31 412 5370: e-mail, koprosth@umitel.co.kr

Article history

Received December 26, 2011 / Last Revision January 6, 2012 / Accepted January 11, 2012