

인간 BMP-2-생리기능 복합 바이오활성 세라믹스를 이용한 조골 세포 분화 유도

김 향 · 문성환 · 이정욱 · 김현민* · 박 민* · 이환모

연세대학교 의과대학 정형외과학교실, Brain Korea 21, 연세대학교 공과대학 신소재공학부*

Osteoinduction using by Human BMP-2-physio-functional Bioactive Ceramics

Hyang Kim, M.S., Seong-Hwan Moon, M.D., Jeong-Wook Lee, M.S.,
Hyun-Min Kim, Ph.D.*, Min Park, M.S.*, and Hwan-Mo Lee, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Brain Korea 21, Yonsei University College of Medicine,
Department of Advanced Material Engineering, Yonsei University*, Seoul, Korea

Purpose: To assess the properties and the osteogenic potency of the calcium phosphate-recombinant human morphogenetic protein-2 (CaP-rhBMP-2 composite) on glass-ceramics.

Materials and Methods: Bioactive glass-ceramics, as a scaffold, and a calcium phosphate (CaP) solution (pH7.4) were prepared. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) was purified from CHO-K1 cells by transfecting the cells with BMP-2 cDNA. The glass-ceramics were soaked for 3 days at room temperature in saline, a CaP only solution, and a CaP solution containing rhBMP-2. Scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared reflection spectroscopy (FT-IR), thin film X-ray diffraction (TF-XRD) and immunofluorescent staining (IF) of the anti-human BMP-2 to composite-coated scaffold were performed to verify the characterization of the scaffold surface. In addition, RT-PCR of osteogenic marker gene and SEM photography were performed after adhering the mouse preosteoblast MC3T3-E1 cells in order to assess the osteoinductivity.

Results: CaP-rhBMP-2 composite was coated on the surface of glass-ceramics, as confirmed by SEM, FT-IR, TF-XRD spectrum, and IF. The CaP-rhBMP-2 composite on the glass-ceramic showed a globular shape covered with fine spikes while the CaP on the glass-ceramic showed a fine spike structure on the flat glass surface. The expression of collagen type I and alkaline phosphatase mRNAs had increased 4 hours after cell seeding. In addition, the level of osteocalcin mRNA expression had increased significantly by 3 days in the CaP-rhBMP-2 composite compared with the control and CaP group. The SEM photographs showed more active filopodia formation in the CaP-rhBMP-2 composite than the other groups. There was extensive newly synthesized extracellular matrix around the osteoblasts and CaP-rhBMP-2 composite nodule.

Conclusion: The application of CaP-rhBMP-2 composite-surface coating technique on bioactive glass-ceramic is a powerful tool for osteoinduction.

Key Words: Calcium phosphate-rhBMP-2 composite, Surface coating technique, Osteoinductivity

통신저자 : 문 성 환

서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
TEL: 02-2228-2188 · FAX: 02-363-1139
E-mail: shmoon@yumc.yonsei.ac.kr

Address reprint requests to

Seong-Hwan Moon, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine,
134, Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-2188, Fax: +82-2-363-1139
E-mail: shmoon@yumc.yonsei.ac.kr

*본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(과제번호: R01-2006-000-10933-0) 지원으로 수행됨.

*본 연구는 부분적으로 (주)코리아본뱅크로부터 연구 지원되었음.

*본 연구는 연세대학교 의과대학 교수연구비의 지원을 받아 수행됨.

서론

골절 또는 종양에 의한 광범위한 골 손실은 정형외과적으로 중대한 문제점으로 대두되고 있으며, 이러한 골 결손 부위를 재건하고자 뼈 조직의 자가 이식과 동종간 이식이 널리 시행되고 있다²⁾. 그러나 자가 이식의 경우, 추가 수술의 필요, 공여 부위의 제한된 문제점이 있고, 동종간 이식의 경우에도 기증자로부터의 감염 및 면역 반응이 발생할 수 있다는 단점이 있다. 이러한 이유로 현재에는 티타늄, 세라믹, 폴리머 등의 골 이식 대체 물질들이 빠르게 개발, 이용되고 있지만⁷⁾, 이러한 물질 역시 영구 이식의 경우, 생체 내에서 파손되거나 이형성 유발 등으로 인해 골 형성 이식체로의 문제점이 부각되고 있으며, 폴리머의 경우에서도 생 분해 과정 중 산도가 높아져 자연적인 골 재생이 지연된다는 연구 보고가 있어왔다.

여러 관점에서 볼 때, 골 결손 재생에 있어서 골 이식 대체 물질을 이용하는 것보다는 자가 생성 골조직 이용에 대한 필요성이 요구되고 있으며, 이러한 면에서 골 조직 공학은 골 손실 부의 재생에 매우 유용한 실험 기법이다^{15,20)}. 골조직공학에 있어서는 조골세포를 도입하기 위한 매트릭스 소재, 즉 지지체의 응용이 필수적인 바, 현재 다양한 재료를 통한 3차원적 지지체 개발이 중요한 요소로 부각되고 있다. 3차원적 지지체 재료의 대부분은 자가 이식골의 하나 또는 그 이상의 뼈 구성 인자들의 모방하는 형태로 이루어져 있으며, 이러한 재료의 이용은 지지체로의 혈관 형성을 유도하고 골 형성을 위한 가장 이상적인 외부 환경을 유지하고자 하는 목적으로 이용되는 경우가 많다^{3,19,22)}. 현재까지 대부분의 지지체 재료에 대한 연구는 하이드록시 아파타이트(Hydroxyapatite, HA), 트리칼슘 포스페이트(Tricalcium phosphate, TCP) 등 인산 칼슘계 다결정체, 콜라겐 및 그 복합체, PLA 등 생 분해성 폴리머에 대한 연구가 주를 이루고 있다^{1,12)}.

바이오 활성 glass 및 glass-ceramics 소재는 골 결손 부 이입 후 그 표면에 골 유사형의 인산칼슘을 형성하여 골조직의 생성과 결합을 유기하는 특성을 지닌다. 대표적 바이오 활성 glass-ceramics인 Bioglass[®]는 Hench 등⁴⁻⁸⁾에 의해 시험관 및 생체 실험의 예에서 지주골의 증식과 재생을 유도한다는 연구 보고가 있으며, Oonishi 등¹⁸⁾에 의하면 토끼의 장골에 6 mm 정도의 결손부위를 만들고, Bioglass[®]를 이용하여 결손 부위를 채워 넣은 지 1주일만에 새로운 지주골의 생성을 관찰할 수 있었다고

한다. 바이오 활성 glass-ceramics인 A-W는 Kokubo 등¹³⁾에 의하여 개발되어 척추 수술에 많이 사용되고 있다.

한편, 골 유도 성장 인자인 골 형태형성 단백질-2 (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)는 조골아세포의 분화를 촉진하는 것으로 널리 알려져 있으며, 많은 연구자들이 척추골 유합술 연구에 이용하고 있다. 그러나 BMP-2의 경우, 생체에 직접 적용할 시에 혈류나 주변 조직으로 빠르게 확산되어 BMP-2 단독으로 이용하기보다는 매개체와 융합하여 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 척추골 유합술에 있어서는 교원질 스폰지, 폴리머 등의 매개체를 이용하는 연구가 많이 보고되고 있으며^{17,21)}, INFUSE[®] Bone Graft (Medtronic 사)의 예에서는 rhBMP-2와 교원질 스폰지를 이용한 척추골 유합술용 키트를 상품화 한 예도 있다.

그러나 많은 실험 예에서, 이식재에 rhBMP-2를 흡착시키는 방법으로 동결 건조 방법^{11,16)}이나 단순확산을 많이 이용하였으나^{17,21)} 이러한 방법은 앞서 말한 바와 같이 단시간에 주변 조직으로 rhBMP-2가 확산되어 성장인자의 지속적인 활성능이 떨어지거나 국지적인 골 형성이 아닌 주변 조직에 이형성골 조직 생성이 일어날 수 있다. 그리하여 본 연구에서는 glass-ceramics 바이오 활성 소재와 혈장형 무기수용액을 이용하는 생체 모방 공정에 의한 골 유사형 인산칼슘 코팅을 제조하여, 골조직공학용 지지체 소재로서의 응용성을 평가하고, rhBMP-2를 소재에 코팅함으로써 그 골화 유도능을 실험적으로 검증하고자 하였다.

대상 및 방법

1. CaP-rhBMP-2 복합체 코팅을 위한 glass-ceramics 기판

MgO-CaO-SiO₂-P₂O₅를 1,450°C에서 2시간 동안 녹인 후, 스테인리스 틀에 부어 2 mm 두께로 가압하였다. 가압한 유리를 분쇄하여 가루로 만든 후, 44µm의 체반으로 미세 분말화하여, 증류수와 무게비가 10 : 1이 되도록 섞었다. 교반한 glass를 5×4 mm (높이 1 mm)가 되도록 스테인레스 틀에 넣은 후, 400 kg/cm²로 가압하였다. 가압한 glass를 다시 분당 5°C의 비율로 1,050°C까지 가열한 후, 1,050°C에 도달하면 2시간 동안 추가 가열하였다. 가열을 마친 glass-ceramic의 열을 식힌 후, 샌드페이퍼를 이용하여 연마한 후, 아세톤에 담가 미

세초음파 수조에서 수 차례 세척하였다. 이러한 방법에 의하여 CaP 코팅을 위한 A-W (Apatite-Wollastonite) 형의 glass-ceramic기판을 제조하였다.

2. 단백질 침적을 위한 CaP 용액 제조

142 mM NaCl, 1.50 mM K₂HPO₄ · 3H₂O, 3.75 mM CaCl₂를 멸균 3차 증류수에 녹인 후, 50 mM TRIS (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH., Steinheim, Germany) 와 1 M HCl (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH., Steinheim, Germany)를 이용하여 pH 7.4로 조정하였다. 이러한 방법에 의하여 CaP 코팅을 위한 전구용액을 제조하였으며, 용액의 제조 온도는 25°C 조건 하에서 수행하였다. 제조한 용액은 세포 배양을 위해 0.2µm의 bottle top filter (Nalgene, NY, USA)로 멸균하여, 기판을 함침할 때까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

3. CaP-rhBMP-2 복합체의 기판 표면 코팅

기판의 절개 면적 1 cm² (높이 1 mm)당 30 ml의 인산 칼슘용액에 함침되도록 계획하였다. 표준군은 기판을 생리 식염수에, 대조군은 CaP 용액에 함침하고, 실험군은 CaP 용액에 최종농도가 0.1-1,000µg/ml이 되도록 rhBMP-2를 섞어 기판을 함침하였다. 기판을 함침한 용액은 상온에 3일간 보존하여 CaP-rhBMP-2 복합체가 침적되도록 유도하였다(Fig. 1).

4. CaP-rhBMP-2 복합체의 기판 표면 코팅에 대한 SEM, FT-IR 및 TF-XRD 촬영

5×4 mm (높이 1 mm)의 기판을 각 군별로 5 ml의 생리 식염수, CaP 용액, 10µg/ml의 rhBMP-2가 첨가

된 CaP 용액에 함침하여, 25°C의 항온 조건에서 3일간 반응시킨 후, Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier transform infrared reflection spectrometry (FT-IR) 및 thin-film X-ray diffraction (TF-XRD)를 통해 기판 표면 형태 변화와 물질 변화를 검사하였다.

5. rhBMP-2에 대한 면역형광 염색

5×4 mm (높이 1 mm)의 기판을 5 ml의 CaP 용액, 1µg/ml의 rhBMP-2와 10µg/ml의 rhBMP-2가 각각 첨가된 CaP 용액에 함침하여, 25°C의 항온 조건에서 3일간 반응시켜 CaP-rhBMP-2 복합체를 기판 표면 침적시켰다. 반응 3일째에 기판을 Phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen Corp., NY, USA)로 두 차례 세척한 후, 3% formaldehyde 용액에 담가 4°C에서 20분간 고정하였다. PBS로 5분간 두 차례 세척한 뒤, 인간 BMP-2에 대한 일차 항체(goat polygonal anti-human BMP-2 antibody, Santa Cruz Biotech, Inc., CA, USA)를 1% 우 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH., Steinheim, Germany)에 1 : 200의 비율로 희석한 용액을 기판에 적용하여 상온에서 2시간 동안 반응하고, 다시 PBS로 5분간 세 차례 세척하였다. 2차 항체인 형광 anti-goat IgG (Vector Lab, Inc., CA, USA)를 1% BSA에 1 : 300으로 희석하여 기판에 적용한 후, 상온, 암 조건에서 45분간 반응하여 PBS로 세 차례 세척하였다. 세척이 끝난 기판에 형광 현미경용 mounting media (Vector Lab, Inc., CA, USA)를 적용한 후, cover glass로 덮어 형광현미경 하에서 관찰하였다.

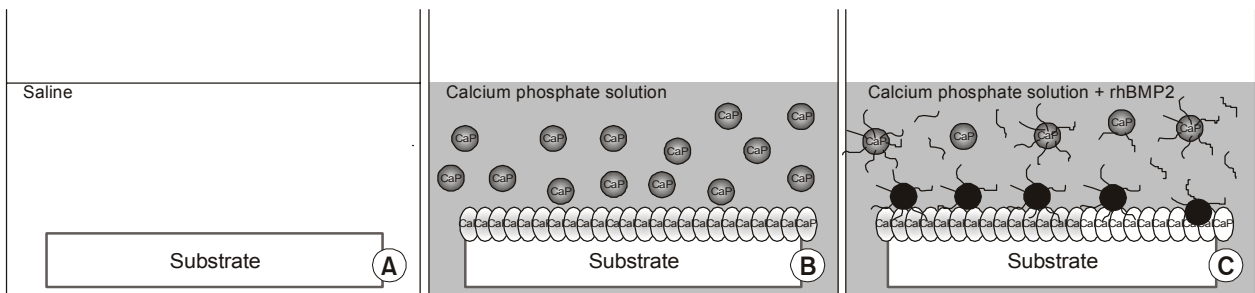


Fig. 1. Diagram of CaP-rhBMP-2 composite generation and surface coating technique (A) standardized group, (B) control group with CaP coating, (C) experimental group with CaP and rhBMP-2 coating.

Table 1. PCR Primer and Condition for Osteogenic Marker Genes

Group	Primer name		5'->3'	Product size (bp)	Rxn temp. (cycle)
1	Mouse 18S r RNA	Forward	ggt aca gtg aaa ctg cga at	168	50 (28)
		Reverse	ggg ttg gtt ttg atc tga ta		
2	Mouse type (I) collagen	Forward	cct ggt aaa gat ggt gcc	222	58 (28)
		Reverse	cac cag gtt cac ctt tgc cac c		
3	Mouse osteocalcin	Forward	cct cag tcc cca gcc cag atc c	219	58 (28)
		Reverse	cag ggc aga gag aga gga cag g		
4	Mouse ALP	Forward	gcc ctc tcc aag aca tat a	372	55 (35)
		Reverse	cca tga tca cgt cga tat cc		

6. 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포의 기판 흡착 후, 조골세포 표식 유전자의 발현

5×4 mm (높이 1 mm)의 기판을 5 ml의 생리식염수, CaP 용액, 10µg/ml의 rhBMP-2가 첨가된 CaP 용액에 함침하여, 25°C의 항온 조건에서 3일간 반응시킨 후, 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포를 2×10⁴ 세포의 비율로 흡착하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 추가 배양하였다. 4시간, 12시간, 24시간 그리고 72시간 간격으로 RNeasy mini kit (Invitrogen Corp., NY, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고, 추출한 RNA 1µg에 0.2µg/ml의 Oligo d(T)₁₅₋₁₇ primer를 첨가하여 70°C에서 5분간 부착 반응한 후, 얼음에서 5분간 식혔다. Accupower[®] RT Premix (Bioneer, Daejeon, Korea) tube에 반응액을 옮겨 담은 후, 42°C에서 60분간, 94°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA 1µl를 검색하고자 하는 유전자의 primer (Table 1)와 섞어 Sapphire PCR premix (Superbio, Korea) tube에 옮겨 담은 후, Table 1과 같은 조건 하에서 반응시켰다. 최종 PCR 생성물은 1µg/ml의 EtBr이 포함된 2%의 agarose 젤을 이용하여 전기영동을 실시한 후, TINA 프로그램을 이용하여 각 PCR band의 양을 수치 정량화하였다. Internal control로는 β-actin 유전자를 이용하였다.

7. 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포의 기판 흡착 후, SEM을 이용한 세포 형태 분석

5×4 mm (높이 1 mm)의 기판을 5 ml의 생리식염수, CaP 용액, 10µg/ml의 rhBMP-2가 첨가된 CaP 용액에 함침하여, 25°C의 항온 조건에서 3일간 반응시킨 후, 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포를 2×10⁴ 세포의 비율로 흡착하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 추

가 배양한 뒤, PBS로 두 차례 세척하였다. 세척한 세포가 흡착된 기판을 4% paraformaldehyde (w/v, Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH., Steinheim, Germany)으로 2일간 고정한 뒤, 에탄올의 농도를 10-95%까지 순차적으로 처리하여 탈수반응을 하였다. 진공 건조기에 기판을 넣고 완전히 말린 다음 DESK II gold sputter coater (Denton)을 이용하여 gold 코팅을 시행하였다. 코팅한 기판을 Hitachi 3500 scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

결 과

1. CaP-rhBMP-2 복합체의 코팅에 따른 glass-ceramic 기판 표면의 변화

각 군별로 기판을 코팅한 후, SEM을 촬영한 결과, 표준군과 비교하여 대조군에서는 glass-ceramics 기판 표면에 염상의 CaP 입자의 코팅이 고르게 이루어져 있었으며, 실험군이 rhBMP-2와 CaP 용액을 혼합한 예에서는 rhBMP-2 단백질을 중심으로 핵을 이루어져 기판 표면에 결정질을 형성하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 rhBMP-2의 농도를 0.1µg/ml, 1µg/ml 그리고 10µg/ml로 변화시킴에 따라 기판 표면에 코팅된 결정질의 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Glass-ceramic 기판의 표면 물질 변화를 확인하고자 TF-XRD와 FT-IR 스펙트럼을 측정된 결과, Fig. 3(A)의 XRD 결과와 같이 표준군과 비교하여 대조군과 실험군에서 glass 성분인 울라스토나이트(Wollastonite) 성분이 CaP 코팅에 의해 감소하며, (B)의 FT-IR 결과에서도 대조군과 실험군에서 아파타이드의 표면 침착물이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

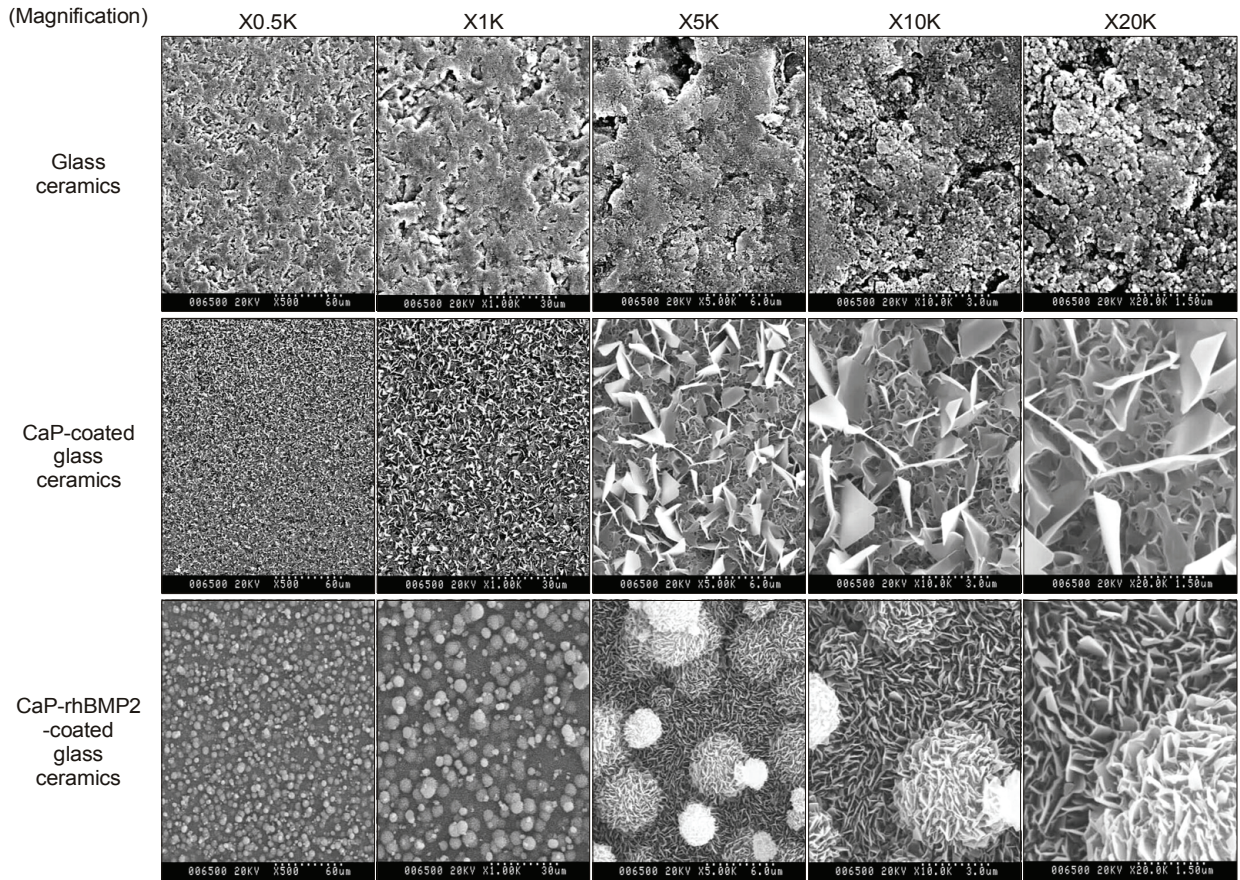


Fig. 2. Scanning electronic microscopic finding of glass ceramic only, glass ceramic with CaP coating, and glass ceramic with CaP and rhBMP-2 coating.

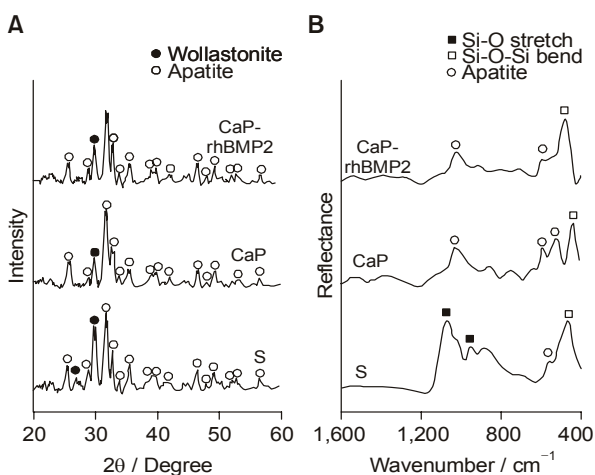


Fig. 3. TF-XRD and FT-IRRS analysis after glass ceramic coating.

2. CaP-rhBMP-2 복합체-glass-ceramic에 대한 인간 BMP-2의 면역 형광염색

기관을 생리 식염수와 CaP 용액에 함침한 표준군과 대조군에서는 BMP-2에 대한 형광항체반응이 관찰되지 않았으며, 1µg/ml과 10µg/ml의 rhBMP가 포함된 CaP 용액에 함침한 실험군에서는 단백질 농도 의존적으로 형광 항체 반응이 일어나는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 면역 형광 반응으로 기관 표면에 코팅된 CaP-rhBMP-2 복합체의 rhBMP-2는 단백질의 구조적 변화 없이 안정적으로 복합체를 구성하고 있음을 알 수 있다.

3. CaP-rhBMP-2 복합체-glass-ceramic에 흡착된 MC3T3-E1 세포의 조골세포 표식 유전자 발현

마우스 조골아세포인 MC3T3-E1세포를 각 군의 기관에 흡착한지 4시간째에 표준군, 대조군과 비교하여 실험

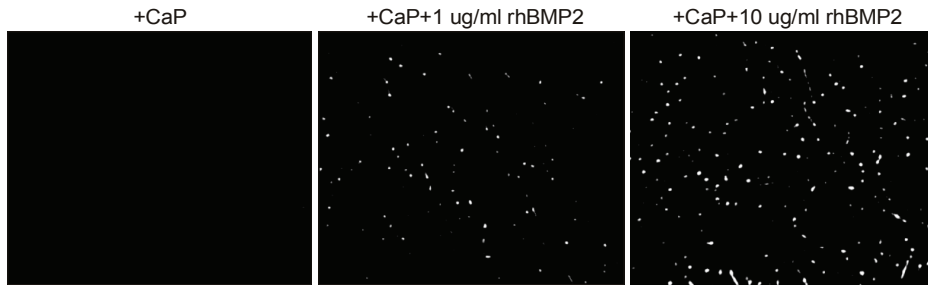


Fig. 4. Immuno-fluorescent stain with antibody to rhBMP-2 (magnification $\times 100$).

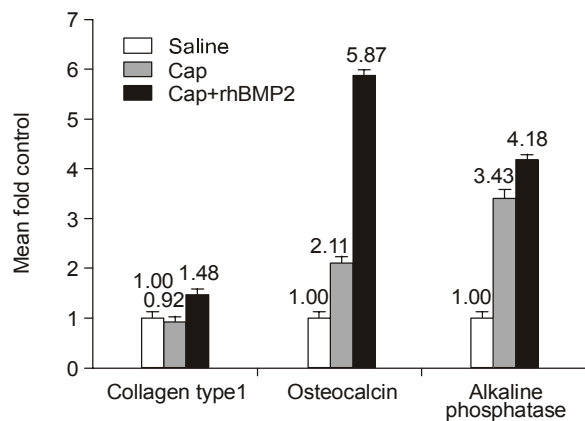


Fig. 5. mRNA expression of osteogenic marker gene mRNA (collagen type I, osteocalcin, alkaline phosphatase) in mouse osteoblasts (MC3T3-E1) on glass ceramic, treated with saline, CaP, CaP+rhBMP-2.

군인 CaP-rhBMP-2 복합체-glass-ceramic에 흡착된 세포에서 제1형 교원질과 알칼리 인산화효소(Alkaline phosphatase, ALP) mRNA의 발현이 각각 1.5배, 5.9 배 증가하였으며, 또한 세포 흡착 3일째에는 osteocalcin mRNA의 발현이 다른 군과 비교하여 비약적으로 증가하며 표준군과 대조군에서는 12시간 이후에는 osteocalcin 유전자의 발현이 현저히 감소되는 반면, 실험군에서 지속적으로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). Fig. 5에서 제1형 교원질과 ALP의 mRNA의 발현량은 4시간째에, osteocalcin mRNA의 발현량은 3일째에 측정된 결과를 도식화하였다.

4. CaP-rhBMP-2 복합체-glass-ceramic에 흡착된 MC3T3-E1 세포의 세포 흡착능 및 분화 형태 분석

세포 흡착능 면에서는 표준군이 대조군, 실험군에 비해 약 30% 향상된 흡착능을 보였으나, 세포 분화 형태에

있어서는 대조군과 실험군에 흡착된 세포가 보다 활성화된 filopodia를 발현하고 있었으며, 세포 신호 전달에 따른 세포 표면의 형태 변화는 실험군이 가장 두드러진 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 또한 CaP-rhBMP-2 복합체-glass-ceramic에 흡착된 MC3T3-E1세포의 경우, 세포와 CaP-rhBMP-2 복합체 nodule 주변으로 신생 교원질의 합성이 관찰되었으며, 세포 자체가 기판에 완전 침적되지 않은 CaP-rhBMP-2 복합체 nodule을 모아서 세포 표면에 흡착한 후, 점진적으로 복합체를 분해하여 이용하는 형상이 관찰되었다.

고 찰

정형외과적, 치과적 재건 수술에 있어서 금속, 세라믹, 또는 폴리머 소재의 사용은 슬관절과 고관절, 척추, 치아/치주, 그리고 광범위한 골 손실 및 골절 치료 등에 매우 중요한 역할을 담당해 왔다. 이러한 보형물의 수명은 보통 10년 후에 80-90% 정도 유지된다 예상되고 있으나⁶⁾, 보형물의 이완, 외과술 이후 감염, 파손 및 예상하지 못한 과 재생 등 여전히 연구돼야 할 부분이 많은 것이 사실이다. 이에 보형물의 수명을 10-20년 정도 더 연장하고, 생체적합성 신소재에 기능성 물질 또는 단백질들의 결합시켜 뼈 및 인접 연 조직과의 결합력을 증대하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 예로 골조직 재생에 있어서, 2005년 Krout 등¹⁴⁾은 티타늄에 바이오 유사 아파타이트와 osteocalcin 단백질코팅을 시도하여 시험관 수준에서 조골세포 생성에 대한 의미 있는 결과를 보고한 바 있고, Kamakura 등¹⁰⁾의 연구에서는 옥타-인산칼슘 (Octacalcium phosphate, OCP)에 rhBMP-2 단백질을 코팅하여 두개골 결손 백서 모델에서 신생 골조직 생성을 유도한바 있다. 또한 척추골 융합술에 대해 최근에 상품화된 INFUSE[®] Bone Graft (Medtronic)의 경우, 콜라

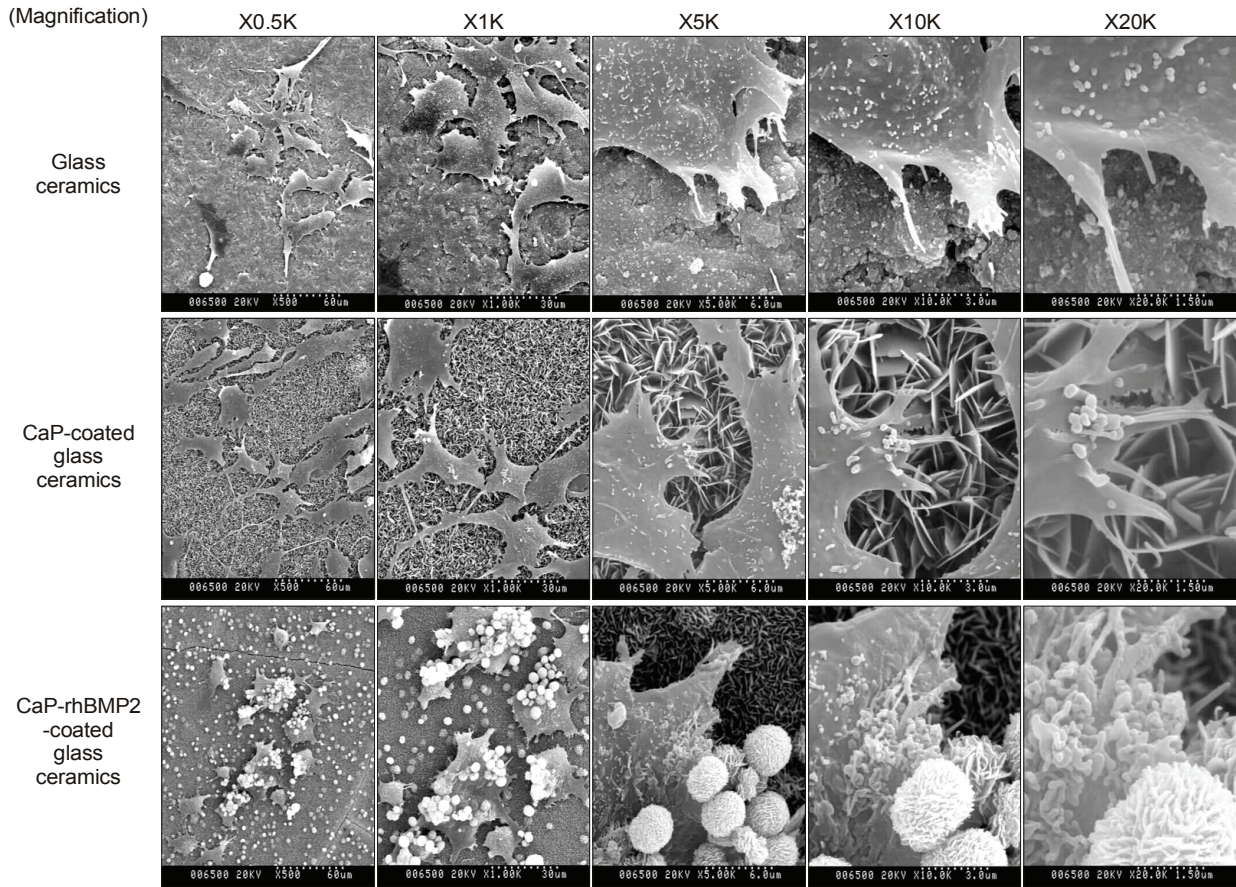


Fig. 6. Scanning electronic microscopic finding of mouse osteoblasts (MC3T3-E1) on glass ceramic only, glass ceramic with CaP coating, and glass ceramic with CaP and rhBMP-2 coating with 3 days ' incubation.

겐 스폰지에 rhBMP-2가 담긴 용액을 적서, 티타늄 케이지의 구멍에 삽입하는 방식을 채택하고 주변 조직으로의 rhBMP-2의 확산을 감안하여 고농도의 rhBMP-2를 적용할 것을 권장하는 것으로 알려져 있다. 나노 구체를 이용하여 rhBMP-2-전달 체계를 개발한 Jiang 등⁹⁾의 연구에서도 한 pool당 최소 1 mg 이상의 용량을 나노 구체와의 흡착에 이용하였다.

본 연구에서는 최소 0.1-10µg/ml의 rhBMP-2를 이용하여 CaP-rhBMP-2 복합체를 형성하였으며 개발된 CaP 과포화용액만을 이용하여 glass-ceramic 기판 표면에 CaP-rhBMP-2 복합체를 코팅할 수 있음을 증명하였다. 이러한 CaP-rhBMP-2 복합체가 기판의 전 표면에 고르게 분포되어 있음을 TF-XRD와 FT-IR 스펙트럼 검사, SEM 관찰을 통해 확인할 수 있었다. rhBMP-2의 방출이 기판으로부터 이루어지지 않더라도 생체 내에서

의 중간엽 줄기세포의 조골세포 분화 유도는 충분히 가능 하리라 예측할 수 있다. 이유는 BMP-2와 같은 성장인자 단백질은 세포표면에 있는 성장인자 단백질에 대한 수용체를 통해 그 신호전달이 이루어지기 때문에 glass-ceramic 기판 표면에 CaP과 복합체를 이룬 rhBMP-2가 단백질 변형 없이 노출되어 있다면 골 형성 유도가 충분히 이루어 질 수 있음을 미루어 짐작할 수 있기 때문이다. 본 연구에서의 CaP-rhBMP-2 복합체의 기판 코팅은 면역형광 염색법에서도 확인한 바와 같이 rhBMP-2 단백질의 구조적 변화 없이 CaP 복합체 표면에 노출되어 있었으며, 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포를 이용한 분화 검증에서도 확인한 것과 같이 표면 코팅이 없는 표준군, CaP만을 코팅한 대조군과 비교하여, CaP-rhBMP-2 복합체가 코팅된 기판이 매우 우수한 조골세포 분화를 유도함을 관찰할 수 있었다. 또한 더욱 놀라운

사실은 세포에 대한 전자현미경 관찰 결과, 조골아세포 각각이 세포의 filopodia를 이용해 기관 표면에 코팅된 CaP-rhBMP-2 복합체를 기관으로부터 떼어 내어 직접 세포 표면에 흡착시킨 후, 시간에 따라 순차적으로 분해하여 이용하고 있는 형태를 관찰할 수 있었으며, 세포의 활발한 대사와 신호전달이 이루어 질 때 세포 외부로 분출되는 다양한 종류의 수용체 및 단백질의 분비 양상을 직접 관찰할 수 있었다. 이렇게 활발한 활성을 보이는 세포 주변으로는 신생 세포기질이 생성되는 것도 관찰할 수 있었다.

본 연구의 CaP-rhBMP-2 복합체의 표면 코팅 기술은 단순히 glass-ceramic 기관에 대한 코팅에만 국한된 것이 아니며, CaP 과포화 용액을 이용하여 모든 종류와 소재의 기관에 대해 CaP-단백질 복합체 코팅이 가능하다는 점과 기관으로부터의 생리활성 단백질의 방출 없이 골 분화를 유도할 수 있다는 점에서 매우 독창적임을 강조하고 싶다. 또한 평평한 평면의 기관뿐만 아니라 유형을 가진 표면이나 기공 지지체에 대해서도 표면 코팅이 가능할 것이라 여기며, 이러한 기술은 추후 다양한 형태의 이식 물에 대해 빠른 시간 내에 국지적인 골 유합률을 높이고, 생체 조직 내에서 자가조직 재생능을 유도하여, 인공 보형물의 수명을 연장할 수 있을 뿐만 아니라 보다 다양한 신소재 기관에 대한 생리활성 단백질 복합체를 구성하여 표면 코팅을 유도할 수 있다면, 다양한 조직 장기에 대한 조직공학적 재생을 도모할 수 있으리라 생각된다.

결 론

본 연구에서는 CaP-rhBMP-2 복합체를 바이오 활성 glass-ceramic 기관에 표면 코팅을 시도하였으며, 이러한 코팅은 rhBMP-2의 구조 및 활성의 변화 없이 이루어 졌다. 또한 CaP-rhBMP-2 복합체 코팅에 의해 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포의 조골 세포 분화를 유도할 수 있었다. 이는 골 지지능이 우수한 바이오 활성 glass-ceramic에 골 유도능이 있는 rhBMP-2를 코팅한 점에 있어서 정형외과적, 임상적으로 매우 유용한 기관 표면 코팅기술이라 사료된다.

참고문헌

1. Chang MC, Ikoma T, Kikuchi M, Tanaka J: The cross-linkage effect of hydroxyapatite/collagen nanocomposites on a self-organization phenomenon. *J Mater Sci Mater Med*, 13: 993-997, 2002.
2. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater*, 2: 187-208, 1991.
3. Grenga TE, Zins JE, Bauer TW: The rate of vascularization of coralline hydroxyapatite. *Plast Reconstr Surg*, 84: 245-249, 1989.
4. Hench LL: Bioactive ceramics. *Ann N Y Acad Sci*, 523: 54-71, 1988.
5. Hench LL: Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*, 41: 511-518, 1998.
6. Hench LL: Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, 19: 1419-1423, 1998.
7. Hench LL, Wilson J: Surface-active biomaterials. *Science*, 226: 630-636, 1984.
8. Hench LL, Xynos ID, Polak JM: Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*, 15: 543-562, 2004.
9. Jiang BB, Gao CY, Hu L, Shen JC: Water-dispersed bone morphogenetic protein nanospheres prepared by co-precipitation method. *J Zhejiang Univ Sci*, 5: 936-940, 2004.
10. Kamakura S, Nakajo S, Suzuki O, Sasano Y: New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res A*, 71: 299-307, 2004.
11. Keskin DS, Tezcaner A, Korkusuz P, Korkusuz F, Hasirci V: Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials*, 26: 4023-4034, 2005.
12. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J: Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials*, 22: 1705-1711, 2001.
13. Kokubo T: Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, 12: 155-163, 1991.
14. Krout A, Wen HB, Hippensteel E, Li P: A hybrid coating of biomimetic apatite and osteocalcin. *J Biomed Mater Res A*, 73: 377-387, 2005.
15. Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926, 1993.

16. Liao SS, Cui FZ, Zhang W, Feng QL: Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 69: 158-165, 2004.
17. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Tamaki T: Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. *Spine*, 26: 933-939, 2001.
18. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, et al: Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res*, 334: 316-325, 1997.
19. Schliephake H, Neukam FW, Klosa D: Influence of pore dimensions on bone ingrowth into porous hydroxylapatite blocks used as bone graft substitutes. A histometric study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 20: 53-58, 1991.
20. Stock UA, Vacanti JP: Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*, 52: 443-451, 2001.
21. Suh DY, Boden SD, Louis-Ugbo J, et al: Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. *Spine*, 27: 353-360, 2002.
22. Tancred DC, McCormack BA, Carr AJ: A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. *Biomaterials*, 19: 2303-2311, 1998.

= 국문초록 =

목 적: Glass-ceramics 표면에 코팅된 인산칼슘-재조합 인간 BMP-2 (CaP-rhBMP-2) 복합체의 특성과 조골 세포 분화능 검증을 위함이다.

대상 및 방법: 기관으로는 바이오활성 glass-ceramics를, 기관 함침을 위한 인산칼슘용액(CaP, pH7.4)을 준비 하였다. 재조합 인간 골 형태형성 단백질-2 (rhBMP-2)은 BMP-2 cDNA가 전이된 CHO-K1 세포로부터 분리 정제하였다. Glass-ceramics은 생리식염수, CaP 단독 용액, rhBMP-2가 포함된 CaP 용액에 3일 동안 상온에서 함침하였다. 복합체가 코팅된 기관 표면의 특성을 확인하고자, 주사 전자현미경, 적외선 반사 분광학, 박막 X-선 회절과 항-인간 BMP-2에 대한 면역 형광 염색을 시행하였다. 또한, 조골세포 분화능을 평가하고자, 마우스 조골아세포인 MC3T3-E1 세포를 흡착시킨 후, 조골세포 표식 유전자에 대한 RT-PCR과 SEM을 시행하였다.

결 과: CaP-rhBMP-2 복합체가 glass-ceramics 표면에 코팅되어 있음을 SEM, FT-IR 및 TF-XRD, IF 결과를 통해 확인할 수 있었다. Glass-ceramics 위의 CaP-rhBMP-2 복합체는 미세한 침상 구조로 덮인 구형을 나타낸 반면, CaP 군에서는 glass-ceramics 표면에 미세한 침상 구조가 평평하게 퍼져있었다. 제1형 교원질과 알칼리 인산화 효소 mRNA의 발현은 세포 흡착 후 4시간째에, 또한 osteocalcin mRNA의 발현은 3일째에 CaP-rhBMP-2 복합체군에서 표준군, CaP군과 비교하여 뚜렷하게 증가되어 있었다. SEM 촬영 결과, 실험군에 흡착된 MC3T3-E1세포에서 다른 군과 비교하여 활성화된 filopodia 형성이 관찰되었다. 조골세포와 CaP-rhBMP-2 복합체 주변에는 신생 세포기질의 합성도 관찰되었다.

결 론: 바이오 활성 glass-ceramic에서의 CaP-rhBMP-2 복합체-표면 코팅 기술의 적용은 조골 분화 유도에 있어서 매우 강력한 기법이다.

색인 단어: CaP-rhBMP-2 복합체, 표면 코팅기술, 조골 분화 유도능