R-6. 세포 부착에 관여하는 펩타이드가 흡착된 골이식재와 PepGen P-15™에 대한 골아세포의 활성능 및 골형성능에 대한 상호비교

유현석 , 박진우, 이재목, 서조영
경북대학교 치의학전문대학원 치주과학교실

연구배경

치주치료의 궁극적 목표는 염증을 해소하고 진행 중인 치주질환을 차단하는 것뿐만 아니라 이미 파괴된 치주조직을 재생하고 기능을 회복하는 것이다. 이러한 치료목적의 한 가지 방법으로 여러 가지 골이식재가 사용되고 있다. 이상적인 골 이식재는 우선 생체 적합성이 뛰어나고, , 시간이 지나면 흡수되어 소실된 골을 영구적으로 대체할 수 있어야 한다. , , , 합성물질 등이 있다.

자가골은 가장 예지성이 높은 골 이식재이나 자가골을 채취하기 위해서는 부가적인 수술부위가 필요하고, . , 자가골을 채취하는 양도 제한적이며, . , 연구자들은 오랫동안 자가골을 대체할 골 이식재 개발에 힘써왔고, .

합성골 중 현재 사용되고 있는 PepGen P-15™ 는 조직공학적 원리를 응용하여 제I ! 교원질에 α (I) chain 766-780 15 (^{766}GTPGPQGIAGQ-RGVV^{780})로 구성된 세포부착 도메인을 hydroxyapatite 재에 흡착시킨 골이식재로 골아세포의 부착과 분화를 유도하고 치주질환에 의한 골연하 결손부나 골증대술에 사용 시 골 형성을 증진시킨다고 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 피브로넥틴 및 β ;-h3 : 둘 다 손상된 조직에 치유 효과가 있을 것으로 예상되어 피브로넥핀의 RGD 9 10 Ⅲ β ;-h3 4 fas-1 (Tetra-Cell Adhesion Molecule, T-CAM 라 명명) HA 흡착시켜 골아세포의 활성능 및 골형성능을 측정하여 PepGen P-15™와 상호 비교 평가하고자 한다.

연구방법 및 재료

1. 펩타이드의 합성

피브로넥틴의 주요 모티프인 PHSRN과 RGD를 함유하는 9번 및 10번 타입 Ⅲ 도메인과 βig-h3의 4번 fas-1 도메인을 solid phase procedure에 의해 합성하였다.

2. hydroxyapatite(HA)와 T-CAM 복합체 형성

세포 부착에 대한 T-CAM의 효과를 평가하기 위해 HA 1g당 2ml의 100ug/ml T-CAM이 포함된 생리식염수 용액(PBS) 2ml를 주입하여 24시간 실온에서 배양함에 따라 펩타이드가 HA에 흡착되게 하였다. 비흡착된 펩타이드는 5배 volume의 PBS로 세척함으로써 HA로부터 제거하였다.

3. MTT assay

96 well plate의 각 well당 2×10^4 개 세포를 분주 후 1, 4, 7일에 부착되지 않은 세포를 제거하고, 생리식염수에 용해한 MTT 용액 50ul 씩을 각각의 well에 첨가하여 3시간 동안 배양 후 배지를 제거하고 200ul의 dimethl sulfoxide(DMSO)와 50ul의 glycin buffer를 첨가하였다. 용해된 formazan 결정은 새로운 well plate상으로 옮겨서 ELISA분석기(Precision Mcroplate Reader, Molecular Devices, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 4일째 H & E 염색을 시행하여 세포의 증식상태를 관찰하였다.

4. 골기질 단백질 유전자발현 양상 관찰

10, 20, 30일째 RNA를 추출하여 Chomczynski와 Sacchi의 방법에 따라 분리하였다. 각 샘플의 10ug RNA 전기영동, Northern blot, cDNA labeling 및 분리, hybridization과 자가방사법 시행하였다. cDNA probe는 OPN cDNA, ALP cDNA, type I collagen cDNA를 사용하였다.

5. 광물화 형성 관찰을 위한 Alizarin Red 염색

세포를 배양 후 30일째 배양액을 제거하고, PBS로 세포를 세척한 후, 80% ethanol에 5분간 고정하고 PBS로 다시 세척하였다. 세포들은 1% Alizarin Red S(pH 6.4)에 2시간동안 염색한 후 비반응 염색은 95% ethanol + 5% concentrated HCl 에 10분간 노출시켜 제거한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 골형성능의 조직학적 관찰

3.5kg 내외의 8마리의 New Zealand white rabbit을사용하여 두개골에 내경 8㎜의 trephine bur로 인공적으로 골결손부를 형성한 후 T-CAM이 흡착된 골이식재와 PepGen P-15™ 골이식재를 삽입한 하였다. 시술 2, 4주째 각각 4마리씩 희생하여, Masson's trichrome 염색을 시행한 후, 광학 현미경을 이용하여 골 형성능을 관찰하고, 광학현미경(Axioskop, Carl Zeiss, 독일)과 연결된 컴퓨터를 통해 영상분석시스템(i-Solution®, iMTechnology Inc., 한국)을 이용하여 조직계측학적 분석을 시행하였다.

결과

1. 1, 4, 7일째 T-CAM을 흡착 시킨 HA군이 HA만을 주입한 군에 비해 시간이 경과함에 따라 세포의 활성도가 더 증가하였으나, PepGen P-15™과는 유사하였다. 또한 4 일째 H & E 염색을 시행하여 관찰해 본 결과 같은 결과를 관찰할 수 있었다.
2. 골기질 단백질 유전자 발현 양상을 관찰한 실험에서는 osteopontin의 발현 양상이 20일째 HA만을 주입한 군에 비해 T-CAM을 흡착시킨 HA군과 PepGen P-15™군에서 증가된 양상을 나타내었으며, 알칼라인 인산효소의 활성도와 제1형 교원질의 유전자 발현 양상에서는 별 차이를 나타내지 않았다.
3. 광물화 형성 관찰을 위한 Alizarin Red 염색에서는 HA만을 주입한 군에 비해 T-CAM을 흡착시킨 HA군과 PepGen P-15™군에서 골 이식재 주위에서 더 넓은 범위의 광물화 형성 양상을 관찰할 수 있었며, 골이식재 사이에 더 많은 수의 cellular bridge를 관찰할 수 있었다. 그러나 T-CAM을 흡착 시킨 HA군과 PepGen P-15™군에서는 그 양상이 유사하였다.
4. 조직학적 소견에서 신생골 형성 양상이 T-CAM을 흡착시킨 HA군과 PepGen P-15™군에서 유사하게 나타났다.

결론

본 실험에서 T-CAM을 흡착 시킨 HA군이 PepGen P-15™군과 비교하여 유사한 골아세포의 활성능 및 골형성능을 가짐을 알 수 있었다. 그러므로 T-CAM을 흡착시킨 HA군은 생체적합성이 있는 골대체물로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.