

마이크로웨이브법에 의해 제조된 HAp 및 BCP 분말이 뼈모세포 및 파골세포의 활성화에 미치는 영향

송호연[†] · 민영기* · 양훈모* · 맹주양**

순천향대학교 의과대학 미생물학교실, 생리학교실*, 순천향대학교 화학과**

The Effects of HAp and BCP Nano Powders Synthesized by Microwave-Assisted Synthesis on the Activation of Osteoblast and Osteoclast

Ho-Yeon Song[†], Young-Ki Min*, Hun-Mo Yang* and Joo-Yang Mang**

Department of Microbiology and *Physiology, School of Medicine, **Department of Chemistry Soonchunhyang University, 366-1 Ssangyoung-dong, Cheonan City, Chungnam, 330-090, Korea

(2007년 12월 4일 접수 : 2007년 12월 10일 채택)

Abstract Hydroxyapatite (HAp) and biphasic calcium phosphate (BCP) nano powders were synthesized using the microwave-assisted synthesis process dependent on pH and microwave irradiation time. The average size of a powder was less than 100 nm in diameter. Through in-vitro cytotoxicity tests by an extract dilution method, the HAp and BCP nano powders have shown to be cytocompatible for L-929 fibroblast cells, osteoblast-like MG-63 cells and osteoclast-like Raw 264.7 cells. The activation of osteoblast was estimated by alkaline phosphatase (ALP) activity. When the HAp and BCP were treated to MG-63 cells, alkaline phosphatase activities increased on day 3, compared with those of the untreated cells. Also, the collagen fibers increased when the HAp and BCP powders suspension were treated to MG-63 cells, compared to those of the untreated cells. Quantitative alizarin red S mineralization assays showed a trend toward increasing mineralization in osteoblast cultured with powder suspension. In conclusion, hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate appeared to be a bone graft substitute material with optimal biocompatibility and could be further applied to clinical use as an artificial bone graft substitute.

Key words Hydroxyapatite, Biphasic calcium phosphate, Microwave, Biocompatibility.

1. 서 론

뼈의 생성과 흡수에 관여하는 세포들에는 뼈모세포(osteoblast), 뼈세포(osteocyte) 및 파골세포(osteoclast) 등이 있다. 뼈모세포와 뼈세포는 외부로부터 공급받은 영양분을 이용하여 뼈모세포의 주변에 칼슘-인산을 축적, 저장하여 뼈의 형성을 촉진하는 역할을 한다. 반면에 파골세포는 뼈를 흡수하는 세포로 뼈에 저장되어 있는 칼슘-인산을 분해하여 혈류를 통해 여러 세포들이 이용할 수 있게 해 준다. 따라서 뼈의 성장과 흡수는 뼈모세포와 파골세포의 조절에 의해서 균형을 이루게 되는데, 어린이나 성장기의 청소년은 뼈모세포의 활성이 왕성하여 뼈의 성장이 이루어지고 노인이나 폐경기 여성에서는 파골세포의 활성이 증가하게 되어 뼈의 흡수에 의한 골다공증 등이 유발 된다.^{1,2)}

각종 사고나 골다공증으로 인한 골절 및 골 증양 등

으로 인한 인체의 골 조직 결손이 발생하였을 경우 결손 부위의 뼈 재생 및 빠른 치료를 위해 여러 가지 뼈 이식체가 사용되고 있다. 이식하는 뼈의 종류에 따라 자가골 이식(autograft), 동종골 이식(allograft), 이종골 이식(xenograft) 및 합성골 이식(synthetic bone graft) 등으로 나눌 수 있다.³⁻⁶⁾ 골 이식의 가장 좋은 방법은 자가골 이식 방법으로 환자의 다른 부위에서 뼈를 직접 채취하여 골 결손 부위에 이식하는 것으로 인체 내 면역반응을 일으키지 않고 뼈 성장인자를 풍부하게 함유하고 있어 임상적으로 좋은 결과를 얻을 수 있다.⁷⁾ 그러나 부가적인 수술로 인한 환자의 고통과 충분한 양의 뼈를 얻을 수 없는 단점이 있다. 동종골 이식은 죽은 사람의 사체로부터 얻어진 뼈를 이식하는 방법으로 에이즈와 같은 바이러스성 질병의 확산 우려가 있고 채취 부위에 따른 골유도 정도가 심하게 차이가 나고, 사체의 매매에 대한 윤리적 문제점을 가지고 있다. 이종골 이식은 소뼈 등 동물의 뼈를 이식하는 방법으로 면역학적 거부 반응으로 인해 생체적합성이 떨어지며 광우병과 같은 동물의 전염병

[†]Corresponding author

E-Mail : songmic@sch.ac.kr (H. Y. Song)

전과 위험성이 있다. 마지막으로 합성골 이식은 사람의 뼈와 유사한 생체 친화성 칼슘-인산계 세라믹 뼈 이식체를 이식하는 방법으로 최근 유럽을 중심으로 널리 사용되고 있다.^{8,9)}

인체의 뼈는 유기 성분인 3차원 구조의 단백질 섬유로 이루어진 콜라겐과 많은 양의 무기질로 구성된 복합체이다.²⁾ 뼈를 구성하는 무기 성분 중 70% 이상이 hydroxyapatite(HAp)와 β -tircalcium phosphate(β -TCP)로 구성되어 있으며 Ca/P 비율은 1.68-1.71로 보고되고 있다.¹⁰⁾ 인체의 뼈를 구성하는 무기성분과 가장 비슷한 합성 뼈 이식제로는 칼슘-인산계 세라믹이 있다.^{2,7)} 일반적으로 칼슘-인산계 세라믹은 생체 친화성이면서 생체 활성 재료들로 인체의 경조직을 대체할 수 있는 생체 소재로 알려져 있는데 HAp(hydroxyapatite)와 α -TCP(α -tircalcium phosphate) 및 β -TCP(β -tircalcium phosphate) 등이 많이 연구되고 있고 특히, HAp와 β -TCP를 혼합하여 만든 biphasic calcium phosphate(BCP)는 어느 정도의 강도를 유지 하면서도 생분해되는 특성이 있어 신생골 유도 및 뼈 대체가 우수한 뼈 이식재료로 현재 정형외과나 치과 영역에서 주로 사용되고 있다.^{11,12)}

따라서 본 연구에서는 생체친화성 칼슘-인산계 뼈 이식체의 원료분말을 합성하기 위해 microwave 합성법을 사용하여 나노 수준의 HAp와 BCP 분말을 합성하였고, 특히 pH를 조절함에 따라 다양한 Ca/P 조성을 갖는 BCP를 합성할 수 있는 기술을 확보 하였다. 또한 이들 HAp 및 BCP 분말을 뼈 이식제 등 생체소재의 원료 분말로 사용하기 위한 전 단계로 이들 분말이 뼈모세포 및 파골세포의 활성화에 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다. 즉, 이들 HAp와 BCP 분말의 생체적합성 및 생체 활성을 평가하기 위해 국제 표준 규격(ISO: international Standard Organization) 10993 항목인 'biological evaluation of medicine devices'에 준하여 세포독성 평가 및 세포 성장 거동을 관찰하였다.^{9,14)} 또한 HAp와 BCP를 처리한 MG-63 세포에서 뼈 형성 초기에 생산되는 효소인 alkaline phosphatase를 측정하여 세라믹 뼈 이식제가 뼈모세포의 활성화에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였고, 장기간 배양된 뼈모세포에서 콜라겐 섬유의 생성 및 칼슘 침전 여부를 관찰하여 뼈모세포의 in vitro mineralization 정도를 관찰하였다.

2. 실험 방법

2.1 Microwave 법을 통한 hydroxyapatite와 biphasic calcium phosphate의 합성

Microwave를 이용한 HAp와 BCP의 합성법은 2.45 GHz의 마이크로파를 조사하여 분자들의 회전운동을 유도하고 분자간의 회전에 의한 마찰의 증가로 급속히 가

열시키는 방법으로 분자간의 충돌 횟수를 급격히 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 운동에너지와 반응수율을 혁신적으로 증가시킬 수 있는 합성법이다. 따라서 기존의 합성법인 원료 분말을 고온에서 고상 반응시키는 건식법과 실온에서 수용액 반응에 의한 습식법에 비해 반응시간이 짧고 과정이 간단하여 이물질의 오염이나 CaO와 같은 제 2상 발생을 줄일 수 있는 새로운 합성법이다.

본 실험은 마이크로파를 이용하여 나노 크기를 갖는 칼슘-인산계 (HAp, α -TCP, β -TCP) 화합물 및 단상 HAp 분체를 제조하는 방법이다. 이를 자세히 기술하면, Ca(OH)₂와 H₃PO₄을 출발물질로 하여 마이크로파를 사용하여 pH를 조절함으로써 단상의 수산화아파타이트 및 인산-칼슘계 화합물을 합성하였고 건조단계를 거쳐 입자 크기가 100 nm 이하인 구형의 칼슘-인산계 혼합분체 및 단상의 수산화아파타이트를 제조하였다. 이들 분체의 미세조직을 관찰하기 위해 SEM(JSM-635F, JEOL)과 TEM(JEM-2010, JEOL)에 의해 분석하였고, XRD(D/MAX250, Rigaku, Japan)을 사용하여 결정상을 관찰하였다. 또한 이들 분말을 뼈 이식제 등 생체소재의 원료 분말로 사용하기 위한 전 단계로 이들 HAp 및 BCP 분말이 뼈모세포 및 파골세포의 활성화에 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다.

2.2 HAp와 BCP 분말이 섬유아세포, 뼈모세포 및 파골세포의 증식에 미치는 영향

세포배양; 세포독성 평가에 흔히 사용되는 섬유아세포인 L-929 세포와 뼈모세포 유래인 MG-63 세포(KCLB 21427) 및 파골세포 유래의 Raw 264.7 세포의 배양은 10% 우혈청(FBS, #SH30088, Hyclone)과 항생제(antibiotic-antimycotic solution, #15240-062, Gibco)가 포함된 DMEM(Gibco, 11965-092) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 증식시켰다.

HAp와 BCP 분말 현탁액 제조; microwave법으로 제조된 100 nm 이하의 HAp와 BCP 분말은 고압증기멸균 방법으로 121°C에서 15분 동안 멸균하여 dry-oven에 24시간 이상 건조 시킨 후, 0.1 mg/ml의 비율로 10% 우혈청이 첨가된 DMEM 배지에 현탁시켜 사용하였다.

세포독성 평가; 용출액은 분말을 0.1 mg/ml의 비율로 배양 배지에 첨가 한 뒤 37°C에서 100 rpm으로 72시간 동안 진탕 배양하여 제조 하였고, 이를 새로운 배양배지를 사용하여 2 배수로 연속 희석하여 용출-희석액을 만들었다.⁹⁾ 섬유아세포인 L-929 세포를 24-well 배양 용기에 1.0×10⁵ cells/well의 농도로 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양 하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척한 다음, 각 well 마다 희석된 용출액을 넣고 다시 72시간 동안 배양 하였다. 이렇게 배양된 세포의 배양액에 100 ul의 MTT용액(5 mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 1 ml의 DMSO를 넣어 형성된

formazan crystal을 완전히 용해 시켰다. 용해된 MTT 용액을 96 well 배양 용기에 옮겨 595 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정 후 용출액의 희석농도(%)에 대한 각 흡광도로부터 상대적 세포 생존율(%)을 구하였다.¹⁵⁾

뼈모세포와 파골세포의 성장 거동 관찰; 0.1 mg/ml의 비율로 제조된 HAp 및 BCP 분말 현탁 원액을 배양배지로 10배수로 희석하여 세포배양에 사용하였다. MG-63 세포들은 24 well 배양 용기에 5.0×10^3 세포를 넣어 24 시간 동안 배양한 뒤 0.1 M PBS 완충용액 (pH 7.2)으로 두 번 수세하였고, 배양배지로 10배수로 희석된($10^4 \sim 10^6$) HAp 및 BCP 분말 현탁액을 첨가한 후 3일 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 대조군으로는 분말이 포함되지 않은 배양배지에서 자란 뼈모세포를 사용하여 비교 관찰하였다. 세포의 성장 거동은 상기의 MTT 분석법 및 SEM으로 관찰하여 비교하였다.

SEM에 의한 세포의 형태학적 관찰; Scanning electron microscope(SEM)에 의한 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 HAp 및 BCP 분말과 함께 단층 배양된 MG-63 및 Raw 264.7 세포를 2% glutaraldehyde로 2시간 동안 고정 후, 0.1 M 인산 완충용액으로 희석된 1% OsO₄로 1.5시간 동안 후 고정을 실시하였다. 세포들은 0.1 M PBS (pH 7.4)로 10분 동안 3회 수세한 후 50-100%의 에탄올로 탈수시켰다. 건조제로 hexamethyldisilazene (Sigma)를 사용하였고, 준비된 시편은 금 스퍼터링을 이용하여 코팅한 후 SEM(JSM-541-LV, JEOL)으로 관찰하였다.

2.3 HAp와 BCP 분말이 뼈모세포의 alkaline phosphatase 활성화에 미치는 영향

뼈모세포 유래 MG-63 세포를 24-well 배양용기에 1×10^4 cells/well이 되도록 분주한 후, 10% 우혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 0.1 mg/ml의 비율로 제조된 HAp 및 BCP 분말 현탁 원액을 배양배지로 10배수로 희석(1:1, 10⁻¹, 10⁻²)하여 첨가한 후 3, 7, 14일 동안 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 완전히 제거하고 PBS(pH 7.4)로 2번 수세한 후 0.5% triton x-100을 250 µl를 첨가하였다. 세포막을 완전하게 파괴하기 위해 얼림과 녹임을 3번 반복한 후 3000 rpm에서 2분간 원심 분리 하였다. 세포 추출액 50 µl에 2 mg/ml p-NPP (sigma, P5744)를 50 µl을 첨가하여 30분간 배양한 후 100 µl의 2N NaOH를 첨가하였다. 그 후 ELISA reader (EL 312e, Bio-tek)를 사용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 ALP의 농도는 p-NP(sigma, N7660)를 기준으로 정량하였다. 또한 각각의 ALP 측정치를 보정하기 위해 BCA kit (Pierce, 23225)를 사용하여 총 단백질 양을 측정하였다.

2.4 뼈모세포의 콜라겐 섬유 발현 및 칼슘 정량을 통한 in vitro mineralization assay

Alizarin red-S 염색을 통한 칼슘 정량; Alizarin red-S는 calcium salt와 특이적으로 결합하는 염색 시약으로 뼈모세포의 배양에서 석회화의 정도를 측정하는 방법으로 이용되고 있다.^{16,17)} In vitro mineralization assay를 위해 뼈모세포 유래인 MG-63 세포를 10% 우혈청, 항생제, 50 µg/ml ascorbic acid 및 10 mM L-glycerophosphate가 포함된 세포 분화용 배지를 사용하여 28일 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 즉 MG-63 세포를 24-well 배양 용기에 well 당 1×10^3 세포씩 분주하여 24시간 동안 배양한 뒤 배지를 제거하고 0.1 mg/ml의 비율로 제조된 HAp 및 BCP 분말 현탁 원액을 배양배지로 희석(1:1, 10⁻¹, 10⁻²)하여 첨가한 후 28일 동안 배양 하였다. 배양 28일 후 배지를 완전히 제거하고 PBS(pH 7.4)로 2번 수세한 후 실온에서 5% formaldehyde로 15분간 고정시켰다. 고정된 세포들은 차가운 증류수로 2번 수세한 후 40 mM AR-S 용액을 실온에서 10분간 처리 하였다. 염색된 세포를 차가운 증류수로 4번 수세한 후 PBS buffer로 15분간 탈염색을 시켰다. 실온에서 100 mM cetylpyridium choloride 용액을 1시간 처리 후 calcium과 결합한 AR-S의 양을 통해 칼슘의 양을 정량하였다. ELISA reader (EL 312e, Bio-tek)로 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 칼슘의 농도는 100 mM cetylpyridium choloride 용액으로 희석된 AR-S의 농도를 기준으로 하여 정량하였다.

TEM에 의한 콜라겐 섬유 관찰; TEM에 의한 뼈모세포에서의 콜라겐 생성을 관찰하기 위해 HAp 및 BCP 분말 현탁액과 함께 배양한 세포에 직접 2.5% glutaraldehyde-1.5% paraformaldehyde PBS 고정액을 2 ml씩 첨가한 후 4°C에서 2시간 동안 고정하였고 1% OsO₄로 1.5시간 동안 후 고정을 실시하였다. 이어 세포들은 0.1 M PBS(pH 7.4)로 10분 동안 3회 수세한 후 50-100%의 에탄올로 탈수시켰다. 세포들을 수집하여 microtube에 옮긴 후 알코올과 propylene oxide를 1:1로 혼합한 용액과 propylene oxide를 첨가하여 상온에서 20분 동안 처리하였다. propylene oxide와 araldite mixture(araldite epoxy resin 502 52 ml + DDSA 48 ml + DMP 30 1.5)의 1:1 혼합액에서 2시간 동안 정치시킨 뒤 새로운 혼합액으로 교환하여 12시간 동안 실온에서 정치시켰다. 세포들을 다시 캡슐로 옮긴 후 araldite 혼합액을 채워 60°C에서 2-3일 동안 중합시킨 후 전자현미경용 절편을 만들었다. LKB-V ultratome으로 1 µm 두께의 절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 세포 부위를 확인한 후 60-70 nm 두께로 초박절편을 만들었다. 각각의 절편들은 전자현미경(JEM 100 CXII)으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Microwave법을 통한 hydroxyapatite와 biphasic calcium phosphate의 합성

HAp와 BCP의 합성에 일반적으로 사용되는 wet-reaction 합성법을 사용하면 sub-micron 크기의 침상형 HAp가 합성되는데 비해 마이크로파를 이용하여 합성하면 나노 크기의 구형 HAp 분말을 합성할 수 있었고 특히 pH 조건을 조절함에 따라 HAp와 β -TCP의 상비를 조절할 수 있었으며, pH가 증가함에 따라 더욱 미세한 분말 구조를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 마이크로파를 이용하여 합성된 HAp와 BCP 분말을 XRD에 의해 분석하였다. pH 6인 경우, HAp, β -TCP 그리고 α -TCP의 상이 섞여 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 pH가 증가함에 따라, HAp 상의 비가 증가하였고 β -TCP, α -TCP의 상비는 낮아짐을 확인할 수 있었다. 특히 pH 12의 조건에서는 고순도의 HAp 분말을 합성할 수 있었다(Fig. 2). 이는 HAp, β -TCP 및 α -TCP 상의 비가 pH를 조절함에 따라 제어되고 있음을 확인할 수 있었다. 일반적으로 나노 크기의 HAp와 β -TCP 분말이 상용의 HAp와 β -TCP 분말보다 기계적 강도가 더 뛰어나고 생분해 능력을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 따라서 이들 원료 분말을 사용하여 뼈 이식제를 개발한다면 HAp에 의한 기계적 강도 조절과 β -TCP에 의한 생분해 특성 조절이 가능해져 인체 내 이식 부위의 뼈의 특성에 맞게 환자 맞춤형 치료도 가능할 것으로 생각된다.

3.2 HAp와 BCP 분말이 섬유아세포, 뼈모세포 및 파골세포의 증식에 미치는 영향

HAp와 BCP의 생체적합성을 확인하기 위해 국제 표준 규격인 ISO 10993-5 항목에 준하여 HAp와 BCP에 대한 세포단계의 독성 평가 실험을 수행하였다.¹⁴⁾ 배양된 L-929 세포의 각 well마다 분말의 용출 회석액을 넣고 72시간 동안 배양 한 후 MTT 분석법에 의해 살아

있는 세포수를 간접 측정하였다. HAp와 BCP 용출액을 첨가하여 배양한 L-929 세포의 생존율은 저농도의 용출액을 첨가한 배지에서는 정상 배양배지에서 자란 세포와 유사한 세포성장 거동을 나타내었으나 고농도의 용출액이 첨가된 배양배지에서 자란 세포는 대조군에 비해 약간 낮은 세포성장을 나타내었다(Fig. 3, 4). 그러나 세포 독성 평가 기준인 IC 50(Inhibitor concentration 50) 보다는 훨씬 높은 세포 성장 거동을 나타내고 있어 microwave 합성법으로 제조된 HAp와 BCP는 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 한편, HAp 용출액과 배양된 L-929 세포의 생존율이 BCP 용출액에서 배양된 세포 보다 높게 나타났는데 그 기전은 아직 확실치 않다(Fig. 4). 한편 HAp와 BCP 분말이 뼈모세포 및 파골세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 5×10^3 의 MG-63 세포를 24-well 배양용기에 배양한 후 배양 상층액을 제거하고 microwave 합성법으로 제조된 나노 크기의 HAp와 BCP의 분말이 첨가된 배양배지에서 3일 동안 배양하였다. HAp와 BCP의 첨가 농도에 따른 뼈모세포의 성장 거동 관찰에서는 농도에 상관없이 세포의 증식 억제나 형태학적 변화가 관찰 되지 않았다(Fig. 5, Top). 이는 나노 크기의 HAp와 BCP 분말이 세포독성에 영향을 끼치지 않는 것으로 판단된다. 한편, HAp와 BCP 나노

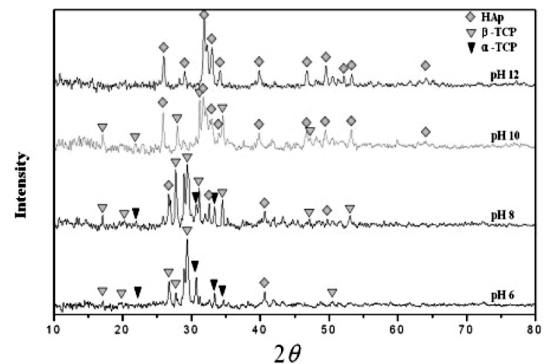


Fig. 2. The XRD patterns of HAp and β -TCP according to the pH.

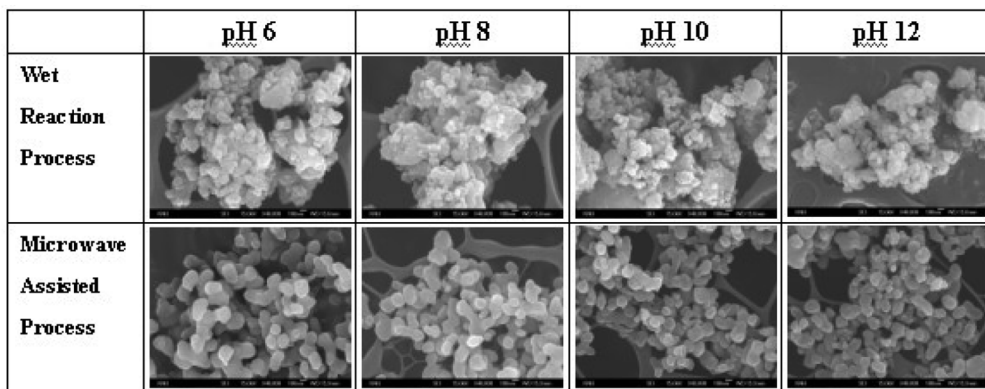


Fig. 1. The SEM images of HAp and BCP powders according to the pH.

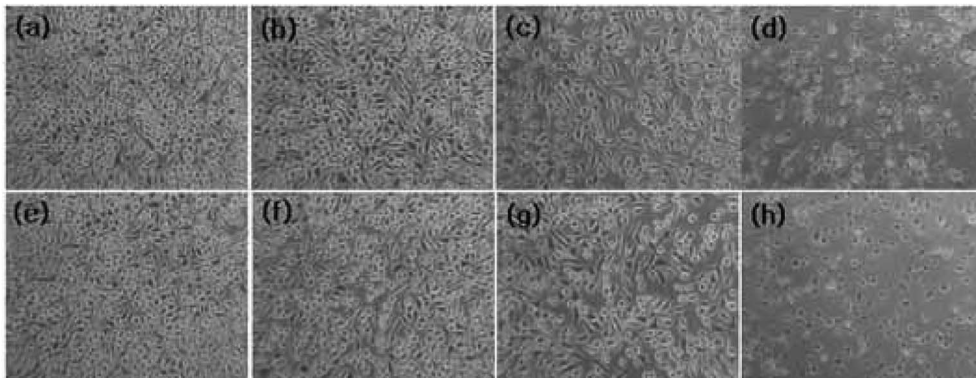


Fig. 3. Inverted light microscopic findings of L-929 fibroblast treated with HAp extract solution(top) and BCP extract solution(bottom). a, e); control cells cultured without extract solution: b, f); cells cultured with 25% extract solution: c, g); cells cultured with 50% extract solution: d, h); cells cultured with 100% extract solution ($\times 200$).

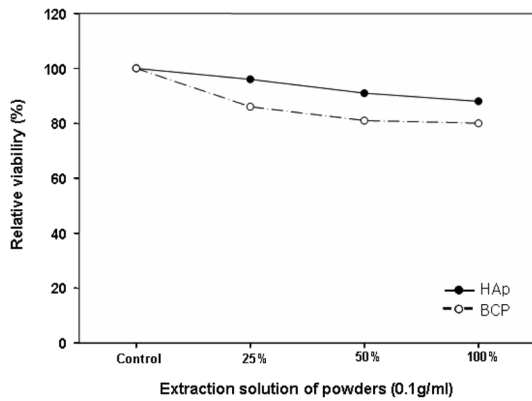


Fig. 4. The relative viabilities of L-929 fibroblast cells cultured with the diluted extract solution of HAp and BCP on day 3.

분말이 포함된 배지에서 배양된 Raw 264.7 세포의 SEM 사진에서는 세포들의 돌기가 잘 발달되어 있고 돌기에 의해 세포들이 서로 연결되어 있는 등 대조군과 비교하여

형태학적 큰 차이점은 발견되지 않았으나, 고농도를 처리 해준 세포에서는 세포 표면이 세포내로 들어가고 있는 듯한 함몰 현상이 관찰되었다(Fig. 5, bottom). 그러나 TEM 소견에서는 세포질 내에서 HAp 나 BCP 입자가 관찰되지 않았으며 핵과 세포질 내의 세포 소기관들의 손상 또한 관찰되지 않았다. 이는 파골세포가 뼈모세포와는 달리 대식세포의 일종으로 근본적으로 이물질들을 쉽게 포식하여 제거하는 특성을 가지고 있어^{18,19} 적은 수의 입자는 세포막의 손상 없이 세포내로 포식될 수 있고 포식된 입자에 의한 세포 내 소기관들의 손상도 유도되지 않은 것으로 사료된다.

3.3 HAp와 BCP 분말이 뼈모세포의 alkaline phosphatase 활성화에 미치는 영향

Alkaline phosphatase는 뼈 형성 초기단계에 뼈모세포에서 발현하는 효소로 뼈모세포의 활성화 및 분화의 정도를 나타낸다.²⁰ 본 실험에서는 2×10^3 의 MG-63 세포를

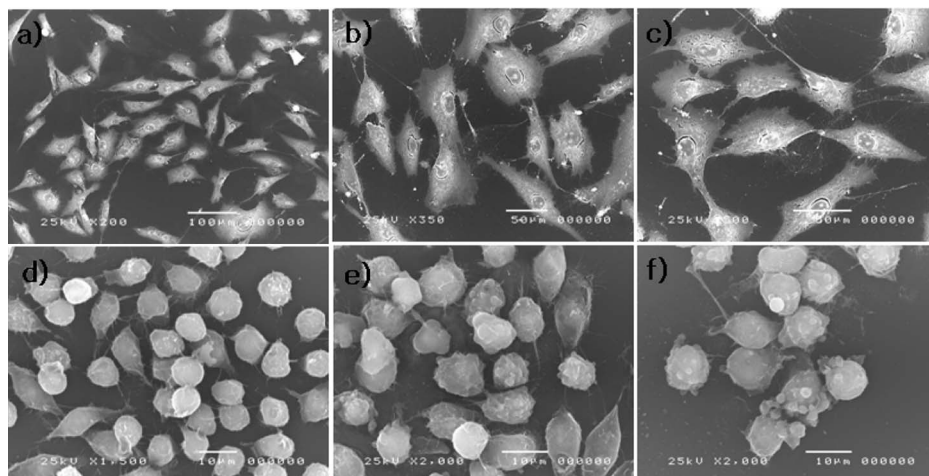


Fig. 5. The SEM images of osteoblast (a, b, c) and osteoclast (d, e, f) cultured with the suspension of HAp (b, e) and BCP (c, f) nano powders.

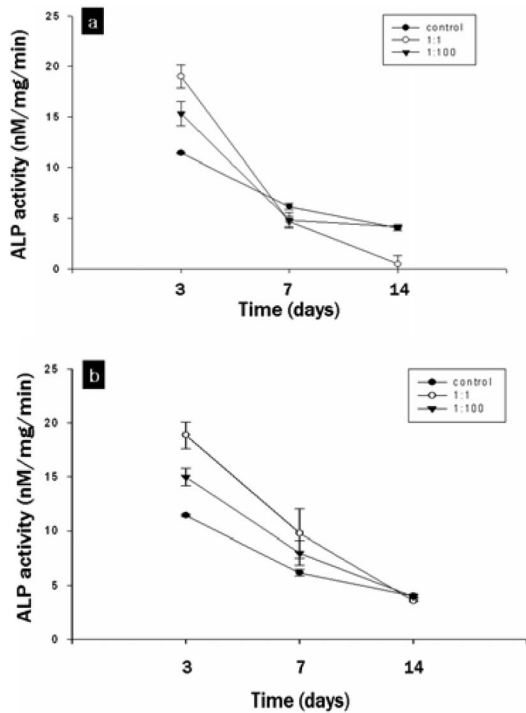


Fig. 6. ALP activities expressed by osteoblast-like MG-63 cells cultured with the suspension of HAp(a) and BCP(b) powders.

24-well 배양용기에 24시간 동안 배양한 후 배양 상층액을 제거하여 microwave 합성법으로 제조된 HAp와 BCP의 분말이 첨가된 배양배지에서 3, 7, 14일 동안 배양하였다. ALP의 활성은 분말 현탁액을 넣고 3일 동안 배양한 세포에서 현저하게 높게 나타났고, 7과 14일 동안 배양한 세포에서는 점차 감소하는 양상이 관찰되었다.

특히 배양 3일째에 뼈모세포의 ALP 활성을 비교해 보면 분말과 함께 배양된 세포에서 대조군에 비해 현저하게 높은 활성을 나타냈는데 이는 HAp와 BCP가 뼈모세포의 활성을 현저하게 유도하는 것으로 뼈 이식제 제조를 위한 우수한 원료 소재로 사료된다(Fig. 6).

3.4 뼈모세포의 콜라겐 섬유 발현 및 칼슘 정량을 통한 in vitro mineralization assay

인체 뼈의 형성(biomineralization)은 칼슘과 인산 등의 무기 성분과 콜라겐 섬유들이 뼈의 세포외 기질(extracellular matrix)에 축적되는 것으로²¹⁾ 이런 현상은 배양배지의 조건과 뼈 형성 유도물질의 첨가에 의해 in vitro에서도 관찰될 수 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 HAp와 BCP가 뼈모세포의 석회화 과정을 유도하는지를 TEM을 통해 관찰하였다. 콜라겐 섬유들은 단층 배양된 뼈모세포의 주위에서 관찰되었으며, HAp와 BCP 분말이 첨가된 배양배지에서 증식된 세포에서 정상 대조군 보다 더 많은 콜라겐 섬유들이 관찰되었다. 또한 이들 세포내에서 콜라겐 섬유의 합성에 관여하는 것으로 알려진 lamellar body가 현저히 증가된 것이 관찰되었는데 이는 HAp와 BCP가 뼈모세포의 콜라겐 생성을 강력히 유도하는 것으로 사료된다(Fig. 7). 그러나 TEM 소견상 기대되었던 Ca-P 결정체는 세포 주변에서 관찰되지 않았다. 따라서 칼슘과 특이적으로 결합하는 AR-S 염색을 하여 석회화 과정에 필수적인 Ca-P의 침전을 정량적으로 측정하였다. HAp와 BCP 분말이 첨가된 배양배지에서 증식된 뼈모세포에서 대조군에 비해 높은 칼슘 축적률을 나타내었고 첨가된 HAp와 BCP의 농도가 높아질수록

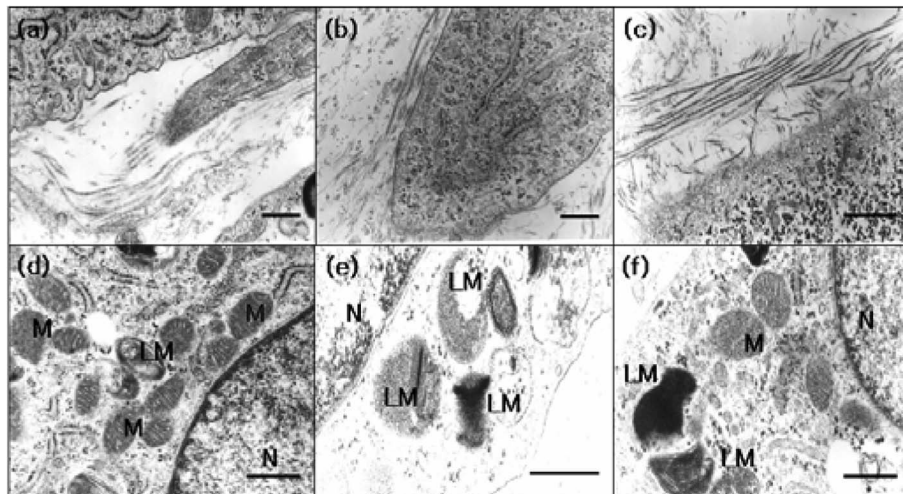


Fig. 7. TEM micrographs of osteoblast-like MG-63 cells cultured with osteogenic medium for 28 days. The collagen fibers were found when the suspension of HAp(b) and BCP(c) powders were treated to MG-63 cells, in contrast to the untreated cells(a). The morphologic changes of the micro-organelles were observed as vesicles formation (lamellar body) when MG-63 cells were cultured with the suspensions of HAp(e) and BCP(f) powder; N: nucleus, M: mitochondria, GC: Golgi complex, LM: lamellar body. Bar = 1 μ m.

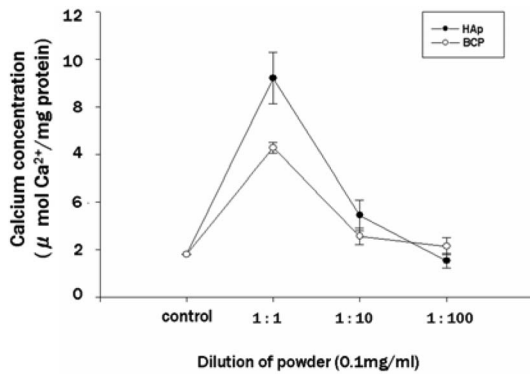


Fig. 8. The calcium concentrations in MG-63 cells cultured with the suspension of HAp and BCP powders.

칼슘의 양이 증가하였다(Fig. 8). 이는 세포 시료 처리과정에서 충분한 수세가 이루어졌기 때문에 칼슘양의 증가가 첨가된 HAp 나 BCP에 의한 것으로는 보이지 않지만 보다 정확한 확인을 위해 SEM-EDS 등을 통한 관찰이 요구된다.

4. 결 론

인공 뼈 이식체의 원료 분말로 사용하기 위해 microwave 합성법을 이용하여 HAp와 BCP 분말을 합성하였고 이들 분말의 생체접합성과 뼈모세포 및 파골세포의 활성화에 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다.

1. Microwave 합성법을 이용하여 100 nm 이하의 HAp와 BCP 분말을 합성하였고 pH 조건을 조절함으로써 HAp와 β -TCP의 상의 비를 조절할 수 있었다.

2. ISO 기준에 준하여 평가한 세포독성 평가 결과 HAp와 BCP 분말은 세포독성을 나타내지 않는 생체 친화성 소재임을 확인 하였다.

3. HAp와 BCP 분말과 함께 배양된 뼈모세포와 파골세포에서 세포 증식의 억제나 세포 손상에 의한 형태학적 변화는 관찰되지 않았다.

4. 뼈모세포의 ALP 활성을 비교해 보면 HAp 와 BCP 분말과 함께 배양된 세포에서 대조군에 비해 현저하게 높은 활성을 나타냈는데 이는 칼슘-인산계 뼈이식체인 HAp와 BCP가 뼈모세포의 활성을 현저하게 유도하는 생체 소재로 사료된다.

5. HAp와 BCP 분말과 함께 배양된 뼈모세포의 석회화 과정을 TEM으로 관찰한 결과, 분말을 처리한 군에서 콜라겐 섬유 합성에 관여하는 세포 소기관인 lamella

body 형성이 두드러지게 증가하였고, 세포와 세포 사이의 콜라겐 섬유도 증가 하였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역혁신센터 사업비의 지원을 받아 수행되었음 (MOCIE-RIC60605).

참 고 문 헌

- H. Suh, Tissue engineering for artificial organs, **40**, 13, Yonsei Univ., Korea (1999).
- T. S. lesson, C. R. Lesson, Histology, 4th ed., p.115-145, W. B. Saunders Company, Canada, (1981).
- H. Burchardt, Clin Orthop Relat Res., **174**, 28 (1983).
- S. P. Hughes, M. K. Benson and C. L. Colton, Orthopaedics: The principles and Parctice of Musculoskeletal surgery, p500-535, Churchill Livingstone, New York, (1987).
- T. D. McGee, Kor. J. of Ceram., **7**(1), 41 (2001).
- W. H. Hiatt and R. G. Schallhorn, J. Periodontol., **42**, 642 (1971).
- K. Groot, Bioceramics of calcium phosphate, Boca Raton, FL: CRC press Inc, 1983.
- P. Ducheyne, Q. Qiu, Biomaterials, **20**, 2287 (1999).
- J. E. Lee, J. C. Park, Y. H. Kim and H. Suh, Biomet Res., **2**(2), 65 (1998).
- Y. I. Yang, Y. K. Kim, K. D. Park, J. W. Lee, I. H. Jo, Y. J. Kim, Biomaterials, **25**, 527 (2004).
- JM. Boulter, J. Guicheux, P. Pilet, P. Weiss, G. Dawlasi, J. Mater. Sci. Mater. Med., **12**(5), 385 (2001).
- J. D. Bruijn, K. Groot, X. Zhang, Biomaterials, **22**(19), 2617 (2001).
- J. J. Chris Arrts, N. Verdonshot, B. W. Schreurs, P. Buma, Biomaterials, **27**, 1110 (2006).
- ISO 10993, Biological evaluation of medical devices-Part 5: Test for cytotoxicity: in vitro methods.
- J. J. Christ Arrts, N. Verdonshot, B. W. Schreurs, P. Buma, Biomaterials, **27**(15), 2951 (2006).
- C. M. Stanford, P. A. Jacobson, E. D. Eanes, L, S. Lembke and R. J. Misure, J Biological Chemistry, **270**(16), 9420 (1995)
- C. Ratisoontorn, M. L. Seto, K. M. Broughton, M. L. Cunningham, Bone, **36**(4), 627 (2005).
- S. Higashi, T. Yamamuro, T. Nakamura, Y. Ikada, S. H. Hyon and K. Jamshidi, Biomaterials, **7**(3), 183 (1986).
- F. H. Albee, Ann Sur, **71**, 33 (1920).
- H. Declercq, N. V. Verken and E. D. Maeyer, Biomaterials, **25**, 757 (2004).
- A. L. Boskey, Conn Tissue Res., **36**, 357 (1996).