

양극산화 티타늄 표면에 서로 다른 RGD 펩타이드 코팅 방법이 인간간엽줄기세포 반응에 미치는 영향

김민수¹ · 정창모¹ · 전영찬¹ · 류재준² · 허중보¹ · 윤미정^{1*}

¹부산대학교 치의학전문대학원 치과보철학교실, ²고려대학교 안산병원 치과보철과

연구 목적: 양극 산화 티타늄 임플란트의 표면에 RGD 펩타이드를 화학적 고정 및 물리적 흡착 방법을 통해 코팅하고, 이러한 코팅방법에 따른 표면 변화와 펩타이드의 코팅 여부, 인간간엽줄기세포 배양시의 부착, 증식, 분화를 비교하여, 펩타이드를 임플란트 표면에 코팅시키는 방법과 세포의 반응 간의 관계를 분석하고자 하였다.

연구 재료 및 방법: 직경 12.0 mm, 두께 3.0 mm의 양극 산화 티타늄 디스크 상에, 대조군은 아무런 코팅을 시행하지 않았으며, 실험군은 표면에 형광 물질이 고정되어 있는 RGD 펩타이드를 화학적 고정 방법 과 물리적 흡착 방법으로 코팅시켰다. 펩타이드 코팅 이후의 표면 변화를 살펴보기 위해 주사전자현미경관찰, 형광현미경 관찰, X-ray Photoelectron Spectrometry (XPS) 분석을 시행하였다. 세포 부착 정도와 형태의 변화 및 증식 정도를 평가하였다. 분화의 정도를 살펴보기 위해, 정량중합효소연쇄반응, alkaline phosphatase activity assay, alizarin red assay를 이용하여 각각 분석하였다. 통계 분석은 SPSS (ver. 17.0, SPSS, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Kruskal-Wallis test로 유의성을 검증하였고, 사후 검정은 Bonferroni test를 시행하였다($P=0.05$).

결과: 형광 현미경, XPS 분석 결과, 두 가지 코팅 방법에서 모두 펩타이드의 코팅이 확인되었으며, 물리적 흡착 방법이 화학적 고정 방법보다 더 많은 양의 펩타이드를 코팅시킬 수 있었다. 코팅 방법의 차이에 따른 세포의 초기 부착 정도와 형태 변화, 증식의 정도에는 유의할만한 차이가 나타나지 않았다($P>0.05$). 세포의 분화 정도는 물리적 흡착 실험군에서 대조군과 화학적 흡착 실험군에서보다 collagen type I과 osteocalcin, osteopontin의 양이 증가되었으며, ALP activity가 유의하게 증가되었다($P<0.05$).

결론: RGD-펩타이드를 양극 산화 티타늄 표면에 코팅함으로써 인간간엽줄기세포의 반응에 영향을 주어 임플란트의 골유착을 증진시킬 수 있는 가능성을 확인하였으며, 특히 많은 양의 펩타이드를 코팅할 수 있는 물리적 흡착 방법이 화학적 고정 방법보다 인간간엽줄기세포 반응에 더 효과적임을 알 수 있었다. (대한치과보철학회지 2011;49:245-53)

주요단어: 양극산화 티타늄, RGD 펩타이드, 인간간엽줄기세포, 부착, 증식, 분화

서론

치과 임플란트 치료의 장기적 안정성은 골조직과 임플란트 간의 결합인 골유착에 의해 좌우된다.¹ 임플란트의 표면의 처리는 골과의 성공적인 결합을 유도하고 그 기간을 단축시키며, 골 유착력에 영향을 주기 때문에 다양한 표면 처리 방법들이 연구되고 있고,¹² 최근 임플란트 표면 개발은 골 유착 반응이 우수하도록 생체 내 조직 반응을 유도하기 위하여 표면의 화학적 특성, 전하, 표면 미세 구조와 다공성의 정도 등 임플란트와 골 사이의 접촉계면 특성을 최적화하는데 초점이 맞추어져 있다.¹⁴

현재 임플란트 재료는 생체 적합성과 기계적 강도, 부식 저항이 우수한 티타늄 혹은 티타늄 합금이 주로 사용되고 있다.⁵ 티타늄은 임플란트로 가공되는 과정에서 표면이 자발적으로 공기중의 산소와 반응하여 약 2-5 nm 두께의 티타늄 산화막을 형성한다.⁶ 하지만 일반적으로 자연 발생한 티타늄 산화막은 두께가 얇고 불균일하여 생체 시술용 재료의 부동태 층으로는

부적합하다. 이러한 자연 티타늄 산화막의 한계를 극복하기 위한 방법으로 화학 산화법, 플라즈마 산화법, 전기 화학적 방법에 의한 양극 산화법 등이 있으며, 다양한 방법으로 인공 산화 피막을 형성하여 생체 적합성을 개선하고 있다.⁷ 이 중 티타늄의 양극 산화 처리는 전기 화학적 방법으로 다공성의 구조와 나노 단위의 표면을 형성하여,⁸ 표면적을 증대시키고 접촉하는 세포의 활동성을 증가시킨다고 보고되고 있다.^{5,6}

최근에는 임플란트 표면을 생화학적인 물질을 이용한 표면 처리 방법으로서 생체 내 골형성을 유도하는 세포 외 기질이나 세포 성장인자 등의 생체 활성 물질을 티타늄 산화막 표면에 코팅하여 임플란트 표면의 강한 골 결합을 능동적으로 유도하는 연구들이 진행되고 있다.⁹

생체 활성 물질 중 Arg-Gly-Asp (RGD) 펩타이드는 세포와 세포 외 기질 단백질의 부착에 관여하는 인테그린 내의 주된 아미노산 배열체로서, 세포 표면의 수용체와의 상호 작용에 중요한 역할을 하여, 세포와 혈장 그리고 fibronectin, vitronectin, collagen type I, osteopontin, bone sialoprotein 등의 세포 외 기질 단백질과의

*교신저자: 윤미정

626-870 경상남도 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 치의학전문대학원 치과보철학교실 055-360-5130; e-mail, p-venus79@hanmail.net

원고접수일: 2011년 6월 25일 / 원고최종수정일: 2011년 7월 4일 / 원고채택일: 2011년 7월 5일

결합을 증대한다.^{10,11} 작고 단순한 펩타이드에 의한 세포 인식은 특정 재료의 표면에 세포 부착 능력을 부여하여 세포와 재료의 상호 작용을 증진시키는데 유용하며, 이를 위한 펩타이드를 생체재료의 표면에 코팅시키는 방법이 연구되고 있다.¹²

임플란트 표면에 RGD 펩타이드와 같은 생체 활성 물질을 코팅시키기 위한 방법으로는 물리적 흡착(physical adhesion), 공유 결합을 통한 화학적 고정(chemical fixation) 등의 방법이 있다.¹³ 물리적 흡착 방법은 표면에 자발적 흡착이 이루어지게 하여 코팅하는 방법으로, 코팅 방법이 간단한 반면 흡착되는 생체 활성 물질의 양을 조절하기 어렵고 흡착된 물질이 쉽게 표면으로부터 유리 될 수 있다는 단점이 있다. 한편 티타늄 표면에 생체 활성 물질을 화학적 공유 결합을 통해 고정시키는 것은 물리적 흡착 방법보다 견고한 코팅 층을 형성할 수 있고 코팅된 양을 예측할 수 있는 장점이 있으나 코팅 방법이 복잡하고 물리적 흡착에 비해 코팅 양이 적은 단점이 있다.⁴

본 연구의 목적은 양극 산화 티타늄 임플란트 표면에 화학적 고정 방법 또는 물리적 흡착 방법을 이용한 RGD 펩타이드 코팅이 임플란트의 표면 변화와 인간간엽줄기세포의 부착, 증식, 분화 및 광화에 미치는 영향을 비교, 평가하는 것이다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 펩타이드

본 연구에서는 합성 RGD 펩타이드(Pepton Inc., Daejeon, Korea)을 사용하였다. 펩타이드는 N-CAAALLLKERGDSK-C 배열로 RGD 기반의 14개의 서열로 되어 있으며, 탄소 말단에 펩타이드의 코팅 여부 확인을 위해 형광 표지자로서 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 연결하였다. 합성된 RGD 펩타이드는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 통해 86%의 순도로 평가되었으며, 동결 건조 되고 빛이 차단된 상태로 -20℃에서 보관된 것을 사용하였다. 보관 중인 RGD 펩타이드는 실험 직전에 증류수 및 완충 용액에 녹여 1회 한정하여 사용하였다.

2) 시편의 제조 및 펩타이드 코팅

(1) 시편의 제조

양극산화 처리를 시행한 직경 12.0mm, 두께 3.0mm 크기의 티타늄 디스크를 시편으로 사용하였다(0.1 M H₂SO₄, 0.1 M H₂PO₄, 3 Å, 180 volt : Cowellmedi Co., Pusan, Korea).

코팅을 하지 않은 양극산화 티타늄 디스크를 대조군으로 사용하였으며, 펩타이드를 화학적 고정, 물리적 흡착 방법으로 코팅한 시편을 실험군으로 하였다.

(2) 펩타이드의 화학적 고정

시편을 UV/O cleaner (Jelight Co. Inc., Irvine, CA, USA)를 통해 표면을 활성화시킨 후, 실란의 도입을 위해 aminopropyltriethoxysilane

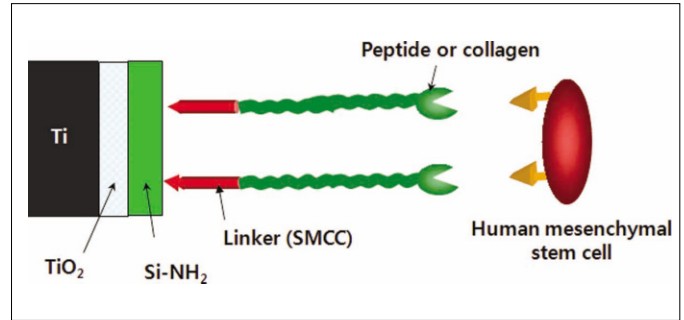


Fig. 1. Schematic diagram of the chemical fixation.

(APTES)을 2.5% (v/v) 농도로 에탄올로 희석한 용액에 90분간 침지하였다. 이후 시편 표면을 에탄올로 세척한 후 질소로 건조하고, 110℃의 오븐에서 1시간 동안 건조시켰다.

펩타이드와의 연결을 위한 연결자(linker) 도입을 위해서 succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)를 0.1 mg/ml 농도로 희석시킨 pH 7.4의 인산 완충 용액에 1시간 동안 암실 조건에서 반응시켰다. 반응이 완료된 시편을 인산 완충 용액 및 증류수로 세척 후 질소로 건조하였다.

펩타이드의 고정화(fixation) 반응을 위해 펩타이드를 0.2 mg/ml의 농도로 pH 6.6의 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 완충 용액에 10 mM의 tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) 용액을 첨가해서 사용하였다. 제조된 펩타이드 용액에 maleimide기가 도입된 시편을 12시간 동안 암실에서 반응시켰다 (Fig. 1). 반응이 종료된 시편은 HEPES 완충 용액 및 증류수로 세척 후 질소로 건조하였다.

(3) 펩타이드의 물리적 흡착

시편을 질소로 건조 후, 0.2 mg/ml의 농도로 펩타이드를 증류수에 녹인 용액에 12시간 동안 암실 조건으로 담가두어 흡착시켰다. 펩타이드가 흡착된 시편은 wrinkle-free paper (Kim's wiper, Kimberly, Lodi, CA, USA)로 표면에 남아있는 반응 용액을 제거 후, 질소를 통해 건조하였다.

2. 연구 방법

1) 펩타이드 코팅에 따른 표면 특성 평가

화학적 고정과 물리적 흡착을 통해 펩타이드를 코팅한 시편의 표면 구조를 평가하기 위하여 전계 방출형 주사전자현미경 (FE-SEM; Stereoscan 440, Leica Cambridge, England)을 이용하여 50,000 배로 관찰하였다.

형광현미경(Nikon instruments inc., Melville, NY, USA)으로 이미지를 촬영하여 위치 별 밝기를 해석하고 코팅의 균일성을 확인하였다. 이때 9개의 기준용액을 큐벳(cuvette)에 넣은 후 형광 분광기(fluorescence spectroscopy; FP-6500, JASCO, Tokyo, Japan)를 이용하여 여기 파장은 495 nm, 발광 파장은 516 nm 조건으로 파

장을 측정하여 농도와 파장 관계의 표준 곡선을 작성하여 정량에 이용하였다.

코팅에 따른 시편의 표면 원소 변화를 평가하기 위해서 X선 광전자분광법(XPS; X-ray photonic spectrometry, ESCA, Sigma Probe, ThermoVG, West Sus-sex, UK)를 이용하여 분석을 시행하였다.

2) 세포 배양

간엽줄기세포성장배지(Lonza, Walkersville, MD, USA)를 사용하여 37°C에서 5% CO₂세포 배양기에 넣고 인간간엽줄기세포(Lonza, Walkersville, MD, USA)를 배양하였다. 세포 증식이 80% 상태에 도달하면 0.25% trypsin과 0.1% glucose를 1 mM의 EDTA-saline에 용해시킨 trypsin-EDTA 용액(Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA)으로 제거하여 원심 분리한 후 계대 배양 하였다. 배양 배지는 2-3일에 한번씩 교체해 주었다. 분화를 관찰하기 위해서, 세포를 배양한 후 24시간 뒤에 골모세포분화유도배지(Lonza, Walkersville, MD, USA)로 교체 후 14일, 또는 21일 동안 배양하였다. 실험에 사용한 세포는 passage 6에서 8까지의 세포를 사용하였다.

3) 세포의 부착 특성 평가

(1) 공초점 레이저 현미경 검사(Confocal laser scanning microscopy)

세포의 형태를 관찰하기 위해서 공초점 레이저 현미경으로 관찰하였다. 세포를 파종한 후 2시간과 24시간 뒤에 시편을 인산완충용액으로 세척하여 배지를 제거하였다. pH 7.4의 4% paraformaldehyde 인산완충용액(Sigma, Castle Hill, Australia)으로 10분간 실온에서 고정한 뒤, 0.1 M glycine 인산완충용액으로 5분간 3회 세척하였다. 0.1% TritonX-100 인산완충용액으로 2분간 투과 과정을 거친 뒤, 인산완충용액으로 3회 세척하였다. 세포를 인산완충용액으로 희석한 50 µg/ml 농도의 형광 phalloidin 공액용액(Sigma, Castle Hill, Australia)으로 actin filament를 대상으로 암실조건에서 염색시켰다. 여러번 인산완충용액으로 세척하고 고정용액(Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA)으로 고정한 뒤, 공초점 레이저 현미경(LSM 700, Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 세포의 모양을 관찰하였다.

(2) Crystal violet assay

세포의 부착에 대한 정량적 특성을 평가하기 위해 crystal violet assay를 시행하였다. 각각의 시편이 들어있는 24-well plate에 4 × 10⁴/well의 세포를 파종한 후 배양하였다. 3시간 뒤에 남은 배지

용액을 제거하고 인산완충용액으로 흡착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포를 10% 에탄올에 희석 시킨 0.2% crystal violet 염색액(Georgiachem, Tokyo, Japan)으로 염색하고 5분간 실온에 두었다. 남은 염색액을 제거하고 24-well plate을 정제 증류수로 여러 번 세척하였다. 염색된 세포를 95% 에탄올로 실온에서 최소 15분간 용해시켜 96-well plate에 담았다. 효소결합면역흡착 검사(ELISA; Spectra MAX 250s Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포의 증식 특성 평가

24-well plate에 적절한 수(1 × 10⁴/well)의 세포를 파종하고, 3일, 7일 동안 배양 후에 증식의 정도를 측정하였다. XTT assay kit (Cell Proliferation Kit II, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 사용하였다. XTT 표지시약(sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonicacidhydrate)와 electron coupling reagent (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate)을 미리 녹여 섞은 후, well 당 250 µl/500 µl 농도가 되도록 투여했다. 세포를 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 모든 well의 formazan 생산물을 충분히 용해시킨 다음, 96-well plate에 넣고, 효소결합면역흡착검사를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 세포의 분화 특성 평가

(1) 정량중합효소연쇄반응(Real time polymerase chain reaction; RT-PCR)

분화에 관여하는 여러 유전자의 mRNA의 발현 정도를 알아보기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 24-well plate에 0.5 × 10⁴/well의 세포를 7일 동안 배양한 후 mRNA를 추출하였다. 전체 RNA는 RNeasymini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용해 제조사의 지시대로 분리하였다. 추출된 RNA는 one step SYBR primescrpt RT-PCR kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 사용하여 제조사의 지시대로 RT-PCR mixture를 준비하였다. 위의 과정으로 확보된 RT-PCR mixture에 다음 조건의 20 pmole의 primer를 넣었다(Table 1).

Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA)을 이용하여 RT-PCR을 실시하였고, delta-delta Ct method로 결과를 분석하였다.

(2) Alkaline phosphatase (ALP) activity assay

Alkaline phosphatase assay kit (Biovision Research, Mountain View, CA, USA)을 사용하였다. 24-well plate에 0.5 × 10⁴/well의 세포를 파

Table 1. RT-PCR primer sequence of bone forming related gene

	Primer (forward) 5' → 3'	Primer (reverse)
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
Osteopontin	CCCTGGCTGCGCTCTGT	GCGCCGGAGTCTGTTTCC
Collagen type I	AAGATGTGCCACTCTGACTG	ATAGGTGATGTTCTGGGAGG
Osteocalcin	CATGAGAGCCCTCACACTCC	CTAGACCGGGCCCTAGAAGCG

중하여 7일, 또는 14일 동안 배양하였다. 세포를 인산완충용액으로 수세한 후, ALP activity assay 완충 용액으로 세포를 회수한 후 초음파 처리를 하여 세포를 용해시켰다. 3분 동안 4℃에서 13,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액을 얻었다. Bradford assay kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 이용하여 단백질의 양을 측정하고, 동량의 단백질 80 µl씩 96-well plate에 넣은 후 50 µl의 5 mM p-nitrophenylphosphate를 각 well에 넣어주었다. 빛을 차단한 상태로 1시간 동안 실온에 반응시켜서 p-nitrophenylphosphate가 가수분해되어 형성된 p-nitrophenol를 효소결합면역흡착검사를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 세포의 광화 특성 평가

분화를 통해 세포에 침착된 칼슘의 양을 측정하기 위해 alizarin red S stain 법을 이용하였다. 24-well plate에 0.5×10^4 /well의 세포를 파종하고, 21일 동안 배양하였다. 세포를 인산완충용액으로 2회 수세하고 70% 에탄올로 -20℃에서 1시간 동안 고정한 후 수회 증류수로 수세하였다. 실온에서 15분간 40 mM alizarin red S (Sigma, Castle Hill, Australia)로 염색 후, 남은 용액을 제거한 뒤 여러 번 증류수로 수세하였다. 염료를 10% cetylpyridinium chloride (Sigma, Castle Hill, Australia)에서 1시간 동안 녹여낸 다음, 효소결합면역흡착검사를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계분석

본 연구의 통계처리는 SPSS (Ver.17.0, SPSS, USA)를 사용하여

통계 처리하였다. Kruskal-Wallis test로 유의성을 검증하였고, 사후검정은 Bonferroni test를 시행하였다($P < .05$).

결과

1. 표면특성

시편의 표면 구조는 전계 방출형 주사전자현미경 촬영을 통하여 Fig. 2와 같이 나타났다. 0.7 - 1.2 µm 직경의 다공성 구조가 관찰되었으며, 펩타이드의 고정 후에도 이미지 상의 차이는 나타나지 않았다.

형광현미경으로 확인된 세 가지 군의 이미지와 농도와 파장간의 표준 곡선을 Fig. 3, 4에 나타내었다. 대조군에서는 형광이 나타나지 않았으며, 펩타이드가 코팅된 실험군 모두 명확하게 형광을 나타내었다. 물리적 흡착 실험군에서는 높은 형광의 밝기가 나타났으며, 일부 점 형태의 좀 더 녹색을 띠는 부분이 관찰되었다. 전체적인 색상도 다른 이미지들에 비하여 녹색이 더욱 높게 나타났다. 화학적 고정 실험군은 물리적 흡착 실험군에 비하여 낮은 밝기를 나타내었다.

X선광전자분광법을 통하여 각 시편의 원소 함량 비율을 관찰하였으며, 이를 백분위 함량으로 정리하였다(Table 2). 실란 화합물에서만 선택적으로 존재하는 Si 원소가 APTES 처리를 한 시편과 화학적 고정 실험군에서만 나타났다. 펩타이드의 양이 많은 물리적 흡착 실험군에서는 C와 N의 증가가 다른 경우에 비하여 높게 나타났다.

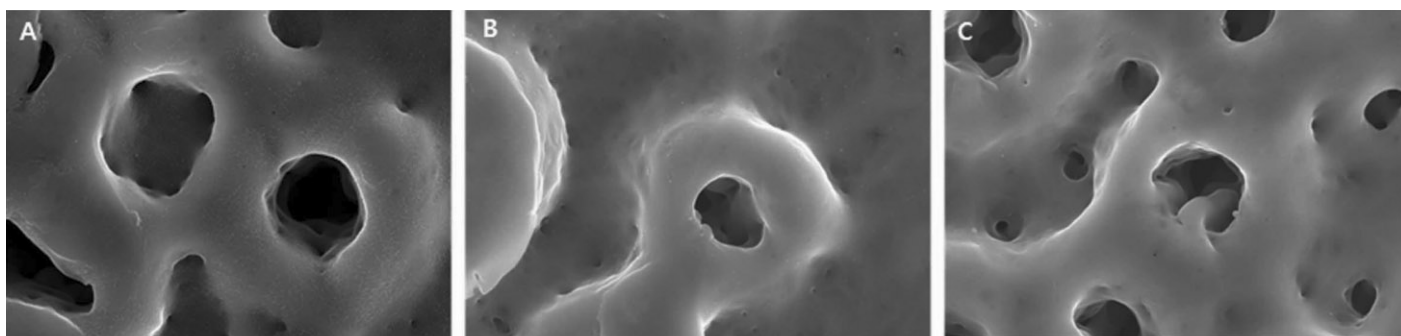


Fig. 2. FE-SEM images after peptide coating (×50,000 magnification). A: Control, B: Chemical fixation, C: Physical adhesion.

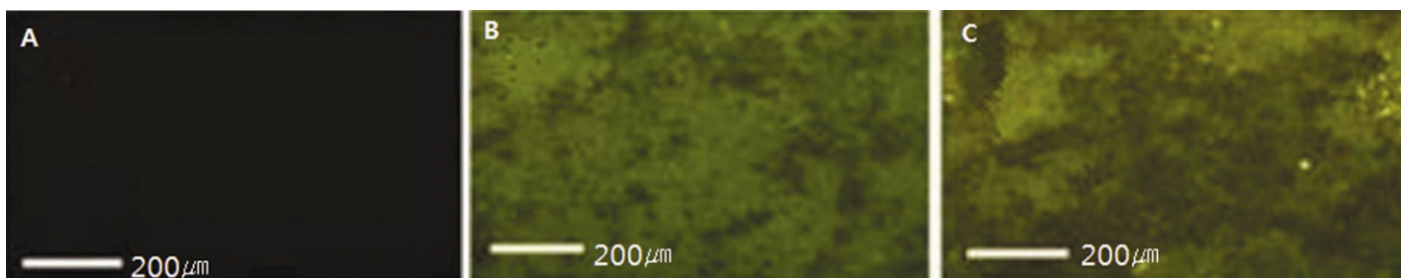


Fig. 3. Fluorescent microscope images after peptide coating. A: Control, B: Chemical fixation, C: Physical adhesion.

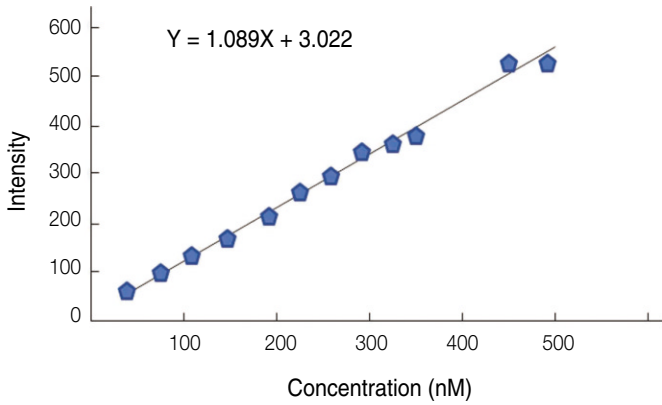


Fig. 4. Concentration curve by fluorescent spectroscopy.

Table 2. The percentage of element content (%)

Element	Control	APTES	Chemical fixation	Physical adhesion
N	2.9	4.1	4.6	17.9
Si	0.0	5.9	3.0	0.0
C	46.6	40.0	55.4	92.0
S	3.8	3.4	2.6	2.7

APTES: aminopropyltriethoxysilane

2. 세포 부착

(1) 공초점 레이저 현미경

세포 배양 2시간과 24시간 후 공초점 레이저 현미경 촬영을 통해 세포 외형을 관찰한 결과(Fig 5), 400배율로 확대한 사진에서 대조군과 각 실험군 간에 세포가 부착되어 있는 정도에서 큰 차이를 나타내지 않았다($P>.05$).

(2) Crystal violet assay

각 시편에서 3시간 동안 세포 배양 후 crystal violet assay를 이용한 초기 세포 부착력을 측정 한 결과(Fig 6), 대조군과 각 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P>.05$).

3. 세포 증식

각 시편에서 3일과 7일 동안 세포배양 후 XTT assay를 이용해 세포증식 정도를 측정 한 결과(Fig 7), 배양 3일째와 7일째 모두 대조군, 각 실험군 사이의 세포증식 정도가 유의할만한 차이를 보이지 못했다($P>.05$).

4. 세포 분화

1) 정량중합효소연쇄반응

분화 표지 단백질인 osteopontin, collagen type I, osteocalcin의

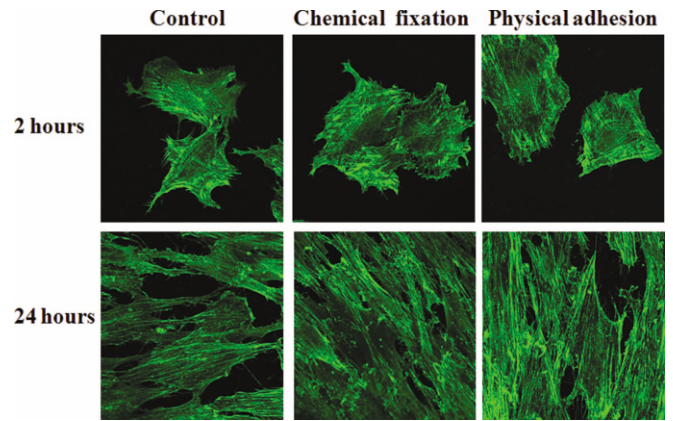


Fig. 5. Confocal laser scanning microscopy images of cells grown on the surface of titanium specimen after incubation of 2 hours and 24 hours ($\times 400$ magnification), actin staining.

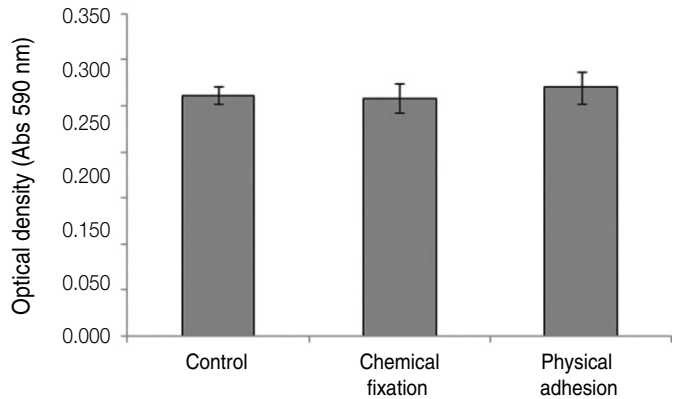


Fig. 6. Crystal violet assay of human mesenchymal stem cells grown on the surface of titanium specimen after incubation of 3 hours.

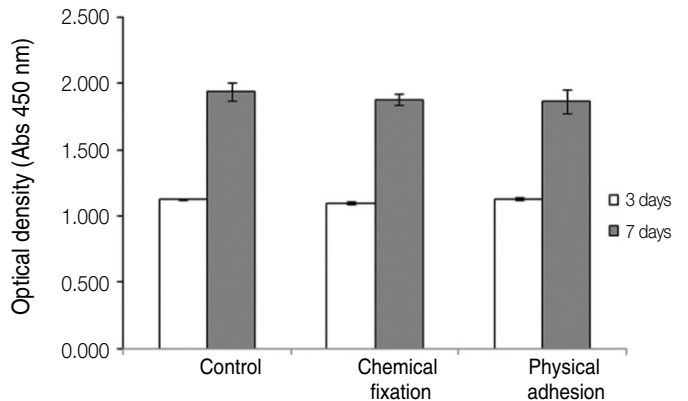


Fig. 7. Cell proliferation of human mesenchymal stem cells grown on the surface of titanium specimen after incubation of 3 days and 7 days.

mRNA 양을 정량중합효소연쇄반응분석(RT-PCR)을 통해 측정하였다. 각각의 단백질에 대한 mRNA의 발현양을 Figs. 8 - 10에 나타내었으며, 세 가지 단백질 모두에서 물리적 흡착 실험군의 경우가 대조군과 화학적 고정 실험군보다 유의하게 증가되었다($P < .05$).

2) Alkaline phosphatase activity assay

각 시편에서 7일과 14일 동안 세포 배양 후 ALP activity를 측정하고 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 배양 14일째, 물리적 흡착 실험군에서 대조군과 화학적 고정 실험군보다 유의성있게 ALP activity가 높아진 것을 확인 할 수 있었다($P < .05$).

4. 세포 광학

분화의 마지막 단계인, 칼슘 침착량을 알아보기 위해 각 시편에서 21일 동안 배양한 후 alizarin red assay를 시행하였다(Fig. 12). 물리적 흡착 실험군에서 대조군과 화학적 고정 실험군에

서 보다 칼슘 침착량이 유의할 정도로 증가하였다($P < .05$). 또한 화학적 고정 실험군이 대조군보다 더 많은 칼슘의 침착량을 보였으나, 유의할만한 차이를 보이지는 못하였다($P > .05$).

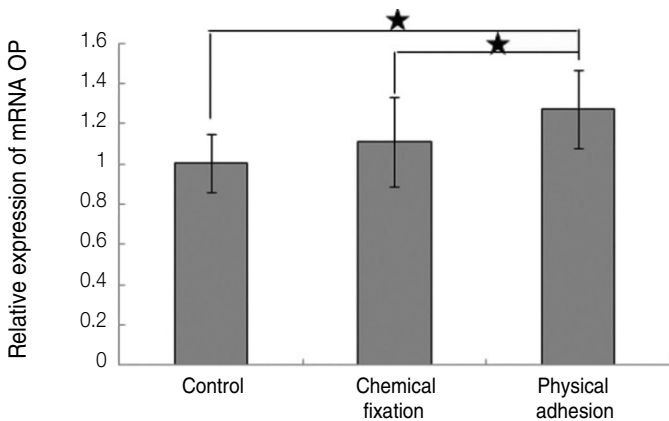


Fig. 8. Real time-PCR analysis for mRNA of osteopontin grown on the surface of titanium specimen after incubation of 7 days (★: $P < .05$, Bonferroni test).

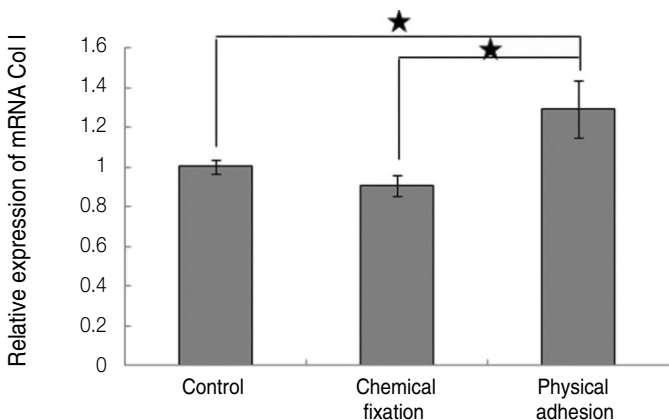


Fig. 9. Real time-PCR analysis for mRNA of collagen type I grown on the surface of titanium specimen after incubation of 7 days (★: $P < .05$, Bonferroni test).

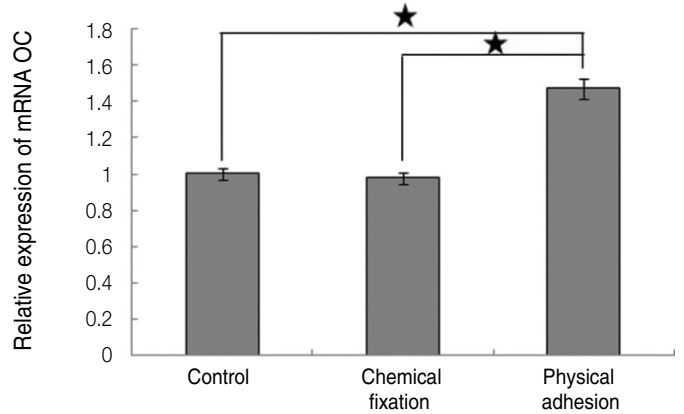


Fig. 10. Real time-PCR analysis for mRNA of osteocalcin grown on the surface of titanium specimen after incubation of 7 days (★: $P < .05$, Bonferroni test).

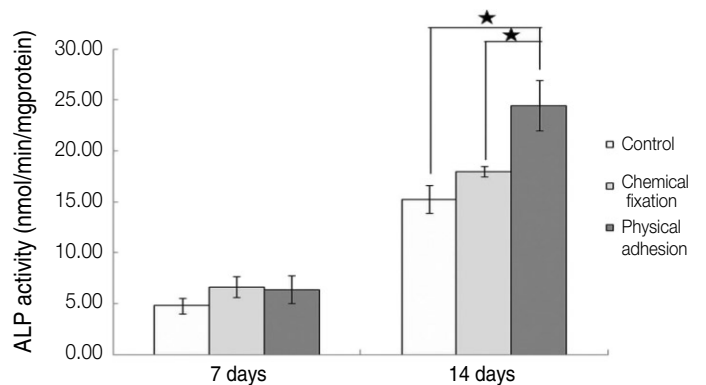


Fig. 11. ALP activity of humen mesenchymal stem cells grown on the surface of titanium specimen after incubation of 7 days and 14 days (★: $P < .05$, Bonferroni test).

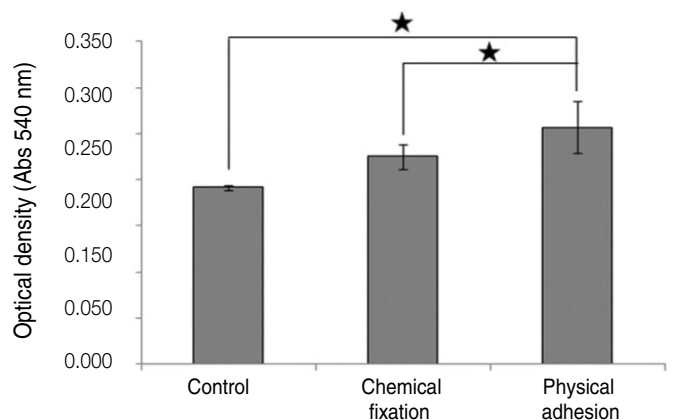


Fig. 12. Alizarin red assay of humen mesenchymal cells grown on the surface of titanium specimen after incubation of 21 days (★: $P < .05$, Bonferroni test).

고찰

이상적인 임플란트는 식립되는 부위나, 골질, 골양에 관계없이 골형성을 유도하고, 전도할 수 있는 표면 특성을 가져야 한다.³ 최근에는 세포의 부착과 분화에 관한 생물학과 생화학의 발전에 힘입어, 생체활성물질을 표면 처리하여 특정 세포의 활성화와 조직 반응을 촉진하는 연구가 활발히 진행되고 있다. RGD 펩타이드는 인테그린과 같은 세포막 수용기와 결합하여 세포에 부착하는 특징을 가지고 있으며,¹⁴ 골모세포를 이용한 여러 연구에서 RGD 펩타이드를 임플란트 표면에 코팅하였을 때 세포의 부착과 증식을 촉진할 수 있다는 보고가 있었다.^{15,16} 생체활성물질을 임플란트와 조직계면 간의 반응에 전달하기 위해 물리적 흡착 방법이 고안되었으며, 생체활성물질용액에 단순히 담그는 것으로 흡착시켜서 사용하는 방법으로 TGF- β , 알칼리성 인산분해효소 등을 흡착시켰을 때 골형성을 향상시킨 사례들이 보고되었다.^{17,18} 하지만 흡착되는 양과 생체활성물질의 유지와 방출, 배위를 조절할 수 없고, 약한 물리적 흡착의 원인으로 표면으로부터 쉽게 유리되는 단점이 있다.³⁴ 이에 대한 대안으로 화학적 고정 방법이 소개되었으며, 흡착 방법에 비해 과정이 복잡하지만 흡착된 단백질보다 화학적 고정에 의한 단백질의 활성이 더 우수하고,¹⁹ 생체화학물질을 특정 배위로 표면에 고정시킬 수 있다. 본 연구에서는 물리적 흡착 및 화학적 고정 방법으로 RGD 펩타이드를 코팅한 표면을 이용하여 인간간엽줄기세포의 반응실험을 진행하였다.

실험 시편을 제작하고 표면 특성을 살펴보기 위해 형광 현미경으로 관찰하고, X선광전자분광법을 통하여 성분을 분석한 결과, 두 가지 방법 모두에서 RGD 펩타이드의 코팅을 확인할 수 있었다. 형광 현미경 관찰에서 물리적 흡착 실험군은 전체적으로 밝기가 높게 나타나며 부분적인 단파장에 가까운 녹색점과 약간 어두운 영역들이 관찰되었다. 이것은 물리적 흡착 과정에서 뭉쳐진 펩타이드들로 인해 단파장에 가까운 녹색점들이 나타났으며, 약간 어두운 영역들은 시편의 처리 과정에서 부분적인 손상을 받은 부위로 판단된다. 화학적 고정 실험군의 경우 물리적 흡착 실험군에 비하여 낮은 형광 세기를 보이고 있으며 색상도 장파장에 가까운 적색을 띄고 있었다. 또한 물리적 흡착 실험군과 마찬가지로 부분적으로 어두운 부분이 나타나며, 세척 과정이 들어갔기 때문에 점의 비율은 적게 나타났다. X선광전자분광법 분석에서 물리적 흡착으로 코팅한 실험군에서 C와 N의 양이 많이 관찰되어 화학적인 방법보다 많은 양의 펩타이드가 코팅된 것을 알 수 있었고, ATPES 처리 이후, Si 원소의 존재로 실란이라는 화학물질이 고정된 것을 확인할 수 있었으며, 펩타이드가 화학적으로 고정된 이후에도 Si 원소가 관찰되어 실란이 안정적으로 남아있는 것을 확인할 수 있었다. X선광전자분광법 분석은 시편 표면의 7-30 nm 정도의 영역만 선택적으로 신호 분석을 하므로, 표면에 펩타이드가 안정적으로 도입이 되었음을 확인하는 방법으로 적합하였다.

본 연구에서는 양극 산화 임플란트에 대한 RGD 펩타이드의 코팅을 시행했을 때 인간간엽줄기세포의 부착과 증식에 대해서는 대조군과 비교하여 별다른 차이를 나타내지 못하였다. 양극 산화 표면처리를 한 경우 나노 단위의 다공성 표면을 형성하게 되는데,⁵ 기존 실험의 machined surface에 대한 부착 실험에 대하여 임플란트 표면의 구조 특성 차이가 세포의 부착에 영향을 주었을 가능성에 대해서 생각해 볼 수 있다. 또한 줄기 세포의 부착에 대한 작용기전이 골모세포의 작용기전과는 다른 점을 생각할 수 있다. Kilpadi 등²⁰은 특정 단백질이 부착된 hydroxyapatite에 대한 부착 관계에 있어서 골모세포와 줄기세포의 부착 기전이 다르다고 보고하였다. 골모유사세포인 saos-2 osteosarcoma 세포는 $\alpha 5$ 와 αV 를 포함하는 인테그린에 대하여 반응하지만 인간줄기세포는 αV 를 포함하는 인테그린에 대해서는 반응하는 반면 $\alpha 5$ 를 포함하는 인테그린에 대해서는 반응하지 않는다고 보고하였다. 또한 RGD 펩타이드에 proteoglycan이나, heparin, hydroxyapatite 등을 함께 적용하였을 때 RGD 펩타이드만을 코팅한 경우보다 줄기세포의 부착과 증식을 보다 향상시킬 수 있었다는 연구가 있었다.²¹ 따라서 본 연구에서 사용한 인간간엽줄기세포의 부착과 증식을 향상시키기 위해서는 RGD 펩타이드와 병행하여 부가적인 코팅 물질이 추가되어야 할 것으로 예상되며, 이에 대한 구체적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

인간간엽줄기세포를 이용한 본 실험에서는 물리적 흡착 실험군에서 대조군과 화학적 고정 실험군보다 세포의 분화와 관련된 지표에서 유의할 정도로 향상된 결과를 보였다. 골모세포의 분화 초기에 발현되는 collagen type I, osteopontin, osteocalcin의 mRNA 양이 증가했으며, ALP activity 또한 14일째에 유의하게 증가하였다. 골모세포의 분화 마지막 단계인 광화정도를 살펴보는 alizarin red assay에 의한 결과 또한 물리적 흡착 실험군에서 석회화 정도가 유의하게 증가되었다. 많은 연구에서 RGD 펩타이드의 세포 부착에 관한 효과에 대해서 보고되고 있지만,^{15,16} 세포 분화에 대한 효과에 대해서는 연구가 많지 않았다. 최근 들어 RGD 펩타이드를 이용한 표면 처리가 골모세포의 분화와 파골 세포의 활성을 증진하여 골개조에 영향을 줄 수 있다는 연구결과들이 보고되고 있다.^{22,23} Kilpadi 등²⁰의 연구에서 $\alpha 5$ 를 포함하는 인테그린이 줄기세포의 초기 부착에는 기여하지 못하지만, $\alpha 5\beta 1$ 인테그린의 활성화가 골모세포의 후기 분화에 중요한 역할을 한다고 보고하였으며, 이러한 이유로 본 연구에서 RGD 펩타이드 코팅이 부착과 증식보다는 분화과정에서 영향을 나타내었다고 판단된다.

본 연구에서 더 많은 양의 펩타이드를 고정할 수 있었던 물리적 흡착 실험군이 대조군과 화학적 고정 실험군보다 인간간엽줄기세포의 분화에 효과적이었음을 알 수 있었다. Yang 등²⁴은 RGD 펩타이드의 농도가 증가될수록 골수줄기세포의 골형성 표지자인 osteocalcin의 발현양과 alkaline phosphatase의 activity가 증가되었다고 보고하였다. 하지만 Sawyer 등²⁵의 연구에서는 소태아혈청과 RGD 펩타이드를 함께 사용한 실험군에서 높

은 RGD 펩타이드 농도가 세포의 초기 부착과 증식을 방해할 수 있다고 보고한 바 있다. 따라서 RGD 펩타이드의 적절한 농도와 펩타이드와 함께 적용할 수 있는 단백질 군과의 상호 작용에 대한 보다 진전된 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 세포 반응 연구에 한정하지 않고 적절한 동물 모델을 이용한 성능 및 유효성 평가를 통하여 더욱 구체적인 검증을 해 볼 필요가 있을 것이다.

결론

본 연구를 통하여 RGD 펩타이드를 양극 산화 임플란트에 코팅함으로써 인간간엽줄기세포의 반응에 영향을 주어 임플란트의 골유착을 증진시킬 수 있는 가능성을 확인하였으며, 특히 많은 양의 펩타이드를 코팅할 수 있었던 물리적 흡착 방법이 화학적 고정 방법보다 인간간엽줄기세포의 반응에 더욱 효과적이라고 판단된다.

참고문헌

1. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844-54.
2. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:185-206.
3. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999;20:2311-21.
4. Detin M, Conconi MT, Gambaretto R, Bagno A, Di Bello C, Menti AM, Grandi C, Parnigotto PP. Effect of synthetic peptides on osteoblast adhesion. *Biomaterials* 2005;26:4507-15.
5. Kim KH, Kwon TY, Kim SY, Kang IK, Kim S, Yang Y, Ong JL. Preparation and characterization of anodized titanium surfaces and their effect on osteoblast responses. *J Oral Implantol* 2006;32:8-13.
6. 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.
7. Kataoka Y, Tamaki Y, Miyazaki T. Synergistic responses of superficial chemistry and micro topography of titanium created by wire-type electric discharge machining. *Biomed Mater Eng* 2011;21113-21.
8. Sato M, Webster TJ. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev Med Devices* 2004;1:105-14.
9. Dard M, Sewing A, Meyer J, Verrier S, Roessler S, Scharnweber D. Tools for tissue engineering of mineralized oral structures. *Clin Oral Investig* 2000;4:126-9.
10. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* 1986;44:517-8.
11. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND. Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir* 1998;14:5507-16.
12. Massia SP, Hubbell JA. Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci* 1990;589:261-70.
13. Rezaia A, Johnson R, Lefkow AR, Healy KE. Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response. *Langmuir* 1999;15:6931-9.
14. Grzesik WJ, Robey PG. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9:487-96.
15. Schaffner P, Meyer J, Dard M, Wenz R, Nies B, Verrier S, Kessler H, Kantlehner M. Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:837-9.
16. Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Hölzemann G, Goodman SL, Kessler H. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem* 2000;1:107-14.
17. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Effects of alkaline phosphatase on bone healing around plasma-sprayed titanium implants: a pilot study in rabbits. *Biomaterials* 1996;17:1443-9.
18. Lind M, Overgaard S, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Bünger C, Søballe K. Transforming growth factor-beta 1 stimulates bone on-growth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:377-82.
19. Liu SQ, Ito Y, Imanishi Y. Cell growth on immobilized cell growth factor: 5. Interaction of immobilized transferrin with fibroblast cells. *Int J Biol Macromol* 1993;15:221-6.
20. Kilpadi KL, Sawyer AA, Prince CW, Chang PL, Bellis SL. Primary human marrow stromal cells and Saos-2 osteosarcoma cells use different mechanisms to adhere to hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res A* 2004;68:273-85.
21. Rezaia A, Healy KE. The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *J Biomed Mater Res* 2000;52:595-600.
22. Zreiqat H, Akin FA, Howlett CR, Markovic B, Haynes D, Lateef S, Hanley L. Differentiation of human bone-derived cells grown on GRGDSP-peptide bound titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:105-13.
23. Huang H, Zhao Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang H, Fu T, Ma X. Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. *J Oral Implantol* 2003;29:73-9.
24. Yang F, Williams CG, Wang DA, Lee H, Manson PN, Elisseeff J. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005;26:5991-8.
25. Sawyer AA, Hennessy KM, Bellis SL. Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins. *Biomaterials* 2005;26:1467-75.

Effect of RGD peptide coating of implant titanium surface on human mesenchymal stem cell response

Min-Su Kim¹, DDS, MSD, Chang-Mo Jeong¹, DDS, MSD, PhD, Young-Chan Jeon¹, DDS, MSD, PhD, Jae-Jun Ryu², DDS, MSD, PhD,
Jung-Bo Huh¹, DDS, MSD, Mi-Jung Yun^{1*}, DDS, MSD

¹Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan,

²Department of Prosthodontics, Ansan Hospital, Korea University, Ansan, Korea

Purpose: The aim of this *in vitro* study was to estimate surface characteristic after peptide coating and investigate biological response of human mesenchymal stem cell to anodized titanium discs coated with RGD peptide by physical adhesion and chemical fixation. **Materials and methods:** Fluorescence isothiocyanate (FITC) modified RGD-peptide was coated on the anodized titanium discs (diameter 12 mm, height 3 mm) using two methods. One was physical adhesion method and the other was chemical fixation method. Physical adhesion was performed by dip and dry procedure, chemical fixation was performed by covalent bond via silanization. In this study, human mesenchymal stem cell was used for experiments. The experiments consisted of surface characteristic evaluation after peptide coating, analysis about cell adhesion, proliferation, differentiation, and mineralization. Obtained data are statistically treated using Kruskal-Wallis test and Bonferroni test was performed as post hoc test ($P=.05$). **Results:** The evaluation of FE-SEM images revealed no difference at micro-surfaces between each groups. Total coating dose was higher at physical adhesion experimental group than at chemical fixation experimental group. In cell adhesion and proliferation, RGD peptide coating did not show a statistical significance compared with control group ($P>.05$). In cell differentiation and mineralization, physical adhesion method displayed significantly increased levels compared with control group and chemical fixation method ($P<.05$). **Conclusion:** RGD peptide coating seems to enhance osseointegration by effects on the response of human mesenchymal stem cell. Especially physical adhesion method showed more effective than chemical fixation method on response of human mesenchymal stem cell. (*J Korean Acad Prosthodont* 2011;49:245-53)

Key words: Anodized titanium, RGD peptide, Human mesenchymal stem cell, Adhesion, Proliferation, Differentiation

*Corresponding Author: **Mi-Jung Yun**

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Pusan National University, Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan, 626-870, Korea

+82 55 360 5130: e-mail, p-venus79@hanmail.net

Article history

Received June 25, 2011 / Last Revision July 4, 2011 / Accepted July 5, 2011