

Electrospray법으로 rhTGF- β 2/PLGA 복합체를 코팅한 티타늄에서의 간엽줄기세포 증식에 관한 연구

김주형¹ · 김성균^{1*} · 허성주¹ · 곽재영¹ · 이우성¹ · 이주희² · 박지만³

¹서울대학교 치의학대학원 치과보철학교실, ²울산대학교 서울아산병원 치과보철과, ³관악서울대학교 치과병원

An *in vitro* study of mesenchymal stem cell proliferation on titanium discs coated with rhTGF- β 2/PLGA by electrospray

Joohyung Kim¹, Seong-Kyun Kim^{1*}, Seong-Joo Heo¹, Jai-Young Koak¹, Woo-Sung Lee¹, Joo-Hee Lee², Ji-Man Park³

¹Department of Prosthodontics, Seoul National University Dental Hospital, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul

²Department of Medical Science, Major in Dentistry, Ulsan University, Seoul

³Department of Prosthodontics and Dental Research Institute, Seoul National University Gwanak Dental Hospital, Seoul, Republic of Korea

Purpose: The purpose of this study is to identify the effect of mesenchymal stem cell proliferation on recombinant human transforming growth factor-beta (rhTGF- β 2) / poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) treated titanium discs by electrospray. **Materials and methods:** Anodized titanium surface coated with PLGA was used for a control group to compare anodized titanium surface coated with 125 ng/ml and 500 ng/ml rhTGF- β 2 as test groups. Atomic force microscope (AFM) test was utilized to determine the difference in coating surface roughness, and field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM) was taken to visualize even distribution of coating particles on titanium discs. The mesenchymal stem cell proliferation was tested by using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide) assay on 1st, 4th, 7th days. **Results:** According to AFM results, there was no statistically significant difference in titanium discs treated with PLGA and with rhTGF- β 2/PLGA ($P > .05$). MTT assay test results showed that there was statistically significant difference in mesenchymal stem cell proliferation on test groups compared to control groups at 7th day, and cell viability on discs coated with rhTGF- β 2 was significantly higher than control groups ($P < .05$). **Conclusion:** Titanium surface coated with rhTGF- β 2/PLGA shows statistically significant higher cell proliferation and the titanium surface coated with the higher concentration of rhTGF- β 2 presents faster cell growth activity. (*J Korean Acad Prosthodont* 2016;54:120-5)

Key words: Titanium; rhTGF- β 2; PLGA; Mesenchymal stem cells

서론

임플란트의 표면처리는 골유착에 직접적인 영향을 미치며, 이를 통해 골융합이 이뤄지는 시간을 단축시키려는 많은 연구가 진행되었다. Hermann 등¹의 연구를 통해 임플란트의 거친표면은 기계절삭 표면보다 세포의 증식이 더 활발하고, 초기 bone to implant contact (BIC)를 향상시키는 이미 알려져 왔다. 이와같은

임플란트 표면처리 방식은 크게 두가지로 나눌수 있는데, 임플란트 표면의 물리적, 화학적인 성질을 변화시키는 연구와 biomimetic engineering을 이용하여 특정 성장인자를 임플란트 표면에 처리하는 방식이 있다. 전자의 경우에는 치과용 티타늄 양극산화 임플란트 표면 처리,² 수산화인회석 코팅을 이용한 방식,³ 샌드블라스팅 표면,⁴ 샌드블라스팅 후 산부식 처리⁵ 등의 방법이 있다. 후자의 경우에는 특정 성장인자를 이용하

*Corresponding Author: Seong-Kyun Kim

Department of Prosthodontics, Seoul National University Dental Hospital, School of Dentistry, Seoul National University, 103, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Republic of Korea

+82 2 2072 2661: e-mail, ksy0617@smu.ac.kr

Article history: Received March 18, 2016 / Last Revision March 29, 2016 / Accepted March 30, 2016

© 2016 The Korean Academy of Prosthodontics

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

※ This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (No.2011-0028067, 2011-0004163) and by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A120304).

여 임플란트 표면과 조골세포사이의 상호작용을 좀더 활성화시켜 골융합을 촉진하는 방법이다. 현재 bone morphogenetic protein (BMP), platelet released growth factors (PRGFs), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor-beta (TGF- β) 등의 다양한 성장인자들이 연구되고 있다.⁶

본 논문은 여러 성장인자들 중 TGF- β 가 티타늄 표면에서 조골세포 증식에 미치는 영향을 알아보고자 계획되었다. TGF- β isoform은 인간 조골세포의 증식을 촉진한다고 알려져 있으며,⁷ Kim과 Valentini 연구⁸에서 TGF- β 2는 인간 조골세포의 단백질 합성을 증가시키는 역할을 한다고 보고하였다. 또한 De Ranieri 등⁹은 *in vivo* 쥐 실험에서도 TGF- β 2가 임플란트 주변의 골융합을 촉진하고 bone-implant contact (BIC)를 증가함을 확인하였다.

여러 성장인자들이 임플란트 초기 골융합을 촉진시키는 것으로 알려져 있음에도 불구하고 성장인자들의 화학적인 불안정성으로 인해 임플란트에 표면처리 방법이 어려움이 있다. 이를 효과적으로 운반하는 방법에 있어서 많은 연구가 있어져 왔으며 Cho 등¹⁰은 1 α ,25-dihydroxyvitamin D를 임플란트에 운반함에 있어 poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA)를 이용하여 조골세포의 증식 속도 및 분화가 촉진 됨을 확인하였다. Lee¹¹도 recombinant human transforming growth factor-beta (rhTGF- β 2) (TGF- β family)를 PLGA 운반체를 사용하여 유의미한 결과를 확인하였다. Fan 등¹² 또한 TGF- β 3를 PLGA 운반체로 고정하여 TGF- β 3의 연골재생의 영향을 연구하였으며 결과 또한 효과적임을 보고하였다.

이에 근거하여 본 실험에서는 TGF- β 2와 PLGA의 복합체를 티타늄 디스크 표면에 코팅하여 간엽줄기세포 증식에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Electrospray 방식을 통해 PLGA 운반체를 사용하여 TGF- β 2가 표면처리 된 티타늄 임플란트를 사용하였을 때 골생성을 촉진할 수 있는 가능성을 알아본다는 점에서 임상적인 의의가 있다.

재료 및 방법

1. 티타늄 디스크의 준비 및 표면 처리

25 mm 직경과 1 mm 두께의 commercially pure Ti grade IV 기계절삭 티타늄 디스크(Warantec Co., Seoul, Korea) 를 준비하였다. 모든 디스크는 20분간 초음파하에서 99% ethanol에 20분간 담그는 과정을 2번 반복하고 증류수에 하루 보관하였다. 0.15 M/L calcium acetate와 0.02 M/L calcium glyceophosphate 전해질 용액에서 300 V 전압으로 실온에서 3분간 양극산화 처리되었다. 이렇게 처리된 디스크는 증류수로 세척한 후 ethylene oxide (E.O.) 가스로 소독하였다.

2. rhTGF- β 2와 PLGA 나노입자의 융합 및 코팅 시행

rhTGF- β 2 (Prospec-TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA) 와

고분자 운반체인 PLGA (PURAC Biochem BV, Gorinchem, Holland) 를 30분 동안 섞어 PLGA 입자와 rhTGF- β 2가 잘 융합되도록 한 후¹³, 일렉트로 스프레이 방식을 이용하여 나노입자로 티타늄 디스크 표면에 코팅을 하였다. rhTGF- β 2는 DMSO에 녹인 후에 사용되었고, group 3과 group 4에서는 PLGA를 acetone에 녹여 농도에 맞게 희석시켰다. 티타늄 디스크를 0.1 A전류, 15 - 20 kV 전압, 5 μ l/min 속도로 복합체(rhTGF- β 2와 PLGA) 용액을 glass syringe (needle gauge 27 G)에 연결하여 고르게 분사하였으며, 디스크는 rotating motor (30 rpm)로 연결하여 고른 농도로 분사하였다. 총 4개의 대조군과 실험군은 다음과 같이 준비하였다.

Group 1: Anodized

Group 2: Anodized + 0.2% 40 μ l PLGA solution

Group 3: Anodized + 40 μ l [(125 ng/ml rhTGF- β 2 +PLGA)/disc] solution

Group 4: Anodized + 40 μ l [(500 ng/ml rhTGF- β 2 + PLGA)/disc] solution

3. FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy) 촬영 및 AFM (atomic force microscope) 측정

균일한 코팅을 확인하기 위해 field emission scanning electron microscopy (FE-SEM, Hitachi S-4700, Tokyo, Japan)으로 $\times 5,000$ 배로 촬영하였다. 캔틸레버의 끝에 매달린 탐침을 통해 표면의 원자상을 측정할 수 있는 AFM (FM XE-10, Park Systems, Suwon, Korea) 을 이용하여 티타늄 디스크 표면의 코팅 물질의 거칠기를 측정하였다.

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

티타늄 디스크 표면 위에서 토끼 골수 간엽줄기세포의 증식을 측정하기 위해, EZ-Cytox cell viability assay kit (Daeil Lab Service Co., Seoul, Korea)을 이용하여 2.0×10^4 의 밀도로 간엽줄기세포를 배양하였다. 1, 4, 7일 배양 후 각 군당 8개의 시편의 색의 흡광도를 440 nm의 흡광도 분석기로 측정하였다.

5. 통계분석

One-way ANOVA로 각각의 1일차, 4일차, 7일차의 유의성을 분석하였으며, 그룹간 유의성결과가 있는 MTT의 7일째 그룹간 차이에 대한 유의성 검증을 위해 Tukey-kramer의 다중분석을 시행했다. AFM실험에서도 anodized disk/PLGA와 rhTGF- β 2/PLGA로 코팅한 티타늄 디스크 표면 거칠기의 차이를 확인하기 위해 t-test를 시행하였으며, 모든 통계는 SPSS (IBM Corp., version 20.0, Armonk, NY, USA) 사용하였고 5%의 유의성으로 검증하였다.

결과

1. FE-SEM 및 AFM 결과

5,000배로 확대한 FE-SEM 촬영 결과 rhTGF-β2/PLGA 입자들이 고르게 분사되어 퍼져있음을 확인하였다 (Fig. 1). 표면 거칠기를 3차원적으로 측정한 결과 평균적으로 Ra값은 대조군에서 0.243 μm 실험군에서 0.252 μm로 관찰되었다. 즉 양극산화 티타늄에 PLGA만 분사한 디스크의 거칠기와 rhTGF-β2를 분사한 티타늄의 거칠기 평균값 차이가 0.009 μm로 나노 입자 크기이며, 이는 통계적으로 유의할만한 차이 (P>.05)가 아니었다 (Fig. 2, Table 1).

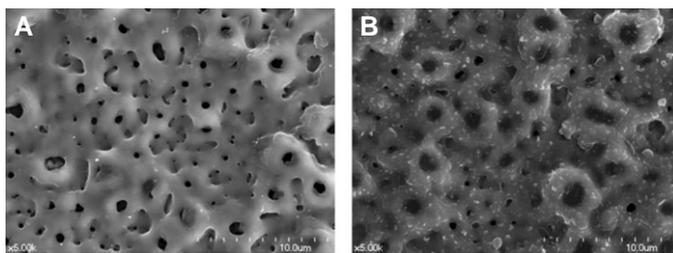


Fig. 1. SEM image of anodized titanium implant coated by electrospray (×5,000). (A) Anodized Ti disc, (B) Anodized Ti disc coated with 40 μl rhTGF-β2 (500 ng/ml) sub-micron particles by electrospray technique.

Table 1. Results of surface roughness (Ra) of anodized titanium disc and 500 ng/ml TGF-β2/PLGA coated anodized titanium disc (unit; μm)

Ra (surface roughness) by AFM (mean value)	
Anodized disk	0.243
TGF-β2 + PLGA coating	0.252

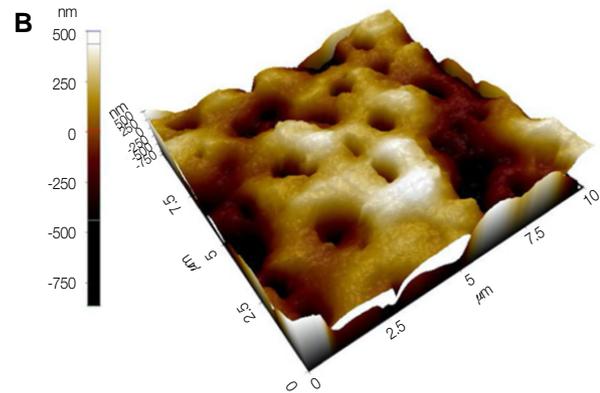
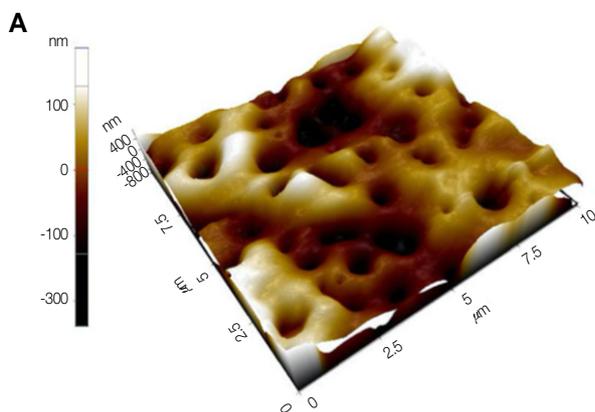


Fig. 2. The results of surface roughness measured by AFM (10 μm × 10 μm). (A) Anodized titanium disc, (B) Anodized titanium disc coated with 40 μl rhTGF-β2 (500 ng/ml per disc).

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

One-way ANOVA test 결과 7일차에서의 대조군 및 실험군 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 확인되었다. 7일차에서의 각 그룹간 유의성 검증을 위해 Tukey-kramer의 다중분석을 시행한 결과, 양극산화 티타늄과 PLGA 분사 디스크에 비해 두가지 농도 모두 rhTGF-β2로 코팅한 양극산화 티타늄 디스크의 7일차 실험결과에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 (P<.05), 125 ng/ml와 500 ng/ml 그룹간에도 통계적으로 유의한 차이를 보였 (P<.05) (Fig. 3).

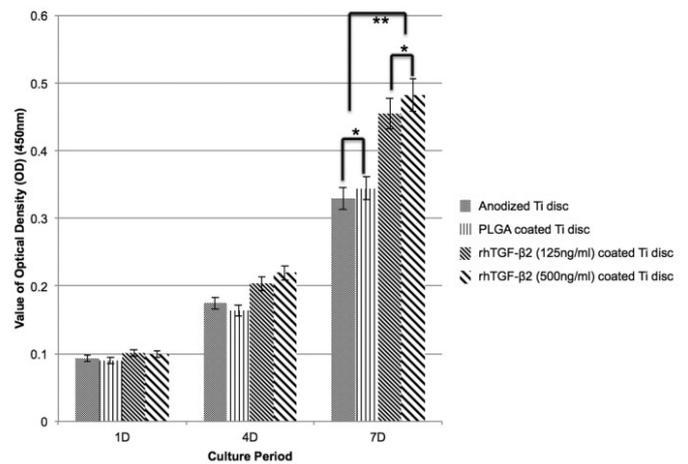


Fig. 3. MTT assay results. The result presents that there was tendency of cell proliferation increasing by time, however, there was no statistically significant difference among groups in 1 day and 4 days. At the 7 days of cell culture, there was statistically significant difference between control groups and experimental groups (*P<.05, **P<.05)

고찰

임플란트 식립 후 반응하는 골 생성과정은 여러 단계의 복잡한 과정으로 일어나는 현상이며, 각 단계마다 유전자의 발현 및 여러 성장인자 단백질의 기능으로 골 형성 또는 골 소실을 일으키는 것으로 알려져 있다.¹⁴ 이 중, TGF- β 2는 골 매트릭스 구성요소의 합성 및 분해 과정에 영향을 미치며 골생성을 조절하는 역할을 담당한다.¹⁵ Centrella 등,^{16,17} Lomri와 Marie,¹⁸ Machwate 등¹⁹의 다수의 *in vivo*와 *in vitro* 연구에서 TGF- β 2가 간엽줄기세포의 성장 및 분화를 조절한다고 보고되어 있으며, 특히 간엽줄기세포에서 조골세포로의 분화를 촉진한다.^{20,21} 한편, Sena 등²²의 TGF- β 2 용액을 pipetting하여 임플란트 표면 처리한 연구에서 고농도의 TGF- β 2를 처리한 그룹에서 오히려 BIC와 임플란트 고정력이 감소되었다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 PLGA 운반체를 선택함으로써 TGF- β 2를 상대적으로 저농도로 서서히 분해하면서 TGF- β 2를 방출시킬 수 있도록 하였다. 이는 이전의 Yoo 등²³의 연구에서 BMP-2/PLGA 복합체를 electrospray 방식으로 임플란트 표면처리를 한 것과 동일한 방법으로 BMP-2 성장인자가 간엽줄기세포의 증식과 분화를 촉진시킴을 밝힐 수 있었던 검증된 임플란트 표면처리 방식이다.

Poly-glycolic acid (PGA)와 poly-lactic acid (PLA)의 합성체인 PLGA는 생체친화적이며 인체에 흡수되더라도 정상 세포의 기능에 영향을 미치지 않으며, PLA와 PGA의 가수분해에 의하여 합성체가 분해되어 서서히 성장인자를 방출시킬 수 있다. PLGA 운반체를 이용한 방법은 조직공학에서 scaffold로 널리 사용되고 있다.²⁴ 본 실험에서는 PGA와 PLA의 비율을 1:1로 하였으며, 5-20일 사이에 합성체가 방출될 수 있도록 하였다. 결과적으로 PLGA를 통해 함께 방출된 TGF- β 2가 티타늄 디스크 표면의 초기 골생성을 증진시키는 환경을 만드는 것이다.

현재까지 널리 사용되는 임플란트 코팅 방법으로는 티타늄 플라즈마 분사 표면처리²⁵를 예로 들 수 있으며, 이를 통해 얻어진 거친 표면은 골-임플란트 계면의 표면 면적을 증가시키고 골형성을 촉진시키는 것으로 보고되었다. 또한 수산화인회석 코팅²⁶ 역시 임플란트 표면의 물리/화학적 변화를 통해 거칠기와 기능성 면적의 증가²⁷를 얻을 수 있다. 그러나 이와같은 코팅 방식은 코팅의 불안정성으로 인해 생물학적인 성장인자들을 코팅하기에는 제한이 있다.

이러한 제한을 극복하기 위해 여러 방법이 연구되고 있다. 본 연구에서는, Yoo 등²³의 연구에서 이미 코팅의 안정성이 검증된 electrospray 방식을 이용하여, 코팅 단백질의 입자를 nano 또는 submicron 크기로 조절하여 임플란트를 식립시에도 입자가 골 계면에서 안정적으로 유지될 수 있었다. 뿐만 아니라, 나노 크기의 간엽줄기세포가 임플란트 표면에 효과적으로 부착하기 위해서는 임플란트 표면 또한 나노크기로 처리되어야 한다고 Catledge 등²⁸은 보고하였다. 또한 나노 크기의 물질이 코팅되어진 임플란트 표면은 세포 대사 능력이 배로 늘어난다는 보

고도 있다.²⁹ 즉 본 실험에서 사용한 electrospray 방식의 나노 입자 코팅은 임플란트의 주위 세포에 직접적으로 영향을 미칠 수 있기 때문에, 골유도능이 있는 물질이 나노 코팅된다면 좀 더 정확하고 효과적인 실험결과를 기대할 수 있을거라 사료된다.

본 실험의 SEM 결과에서 볼 수 있듯이 (Fig 1), PLGA/TGF- β 2 혼합체 용액을 electrospray 분사법을 사용한 결과 티타늄 디스크 표면에 나노입자 코팅이 가능함을 알 수 있다. PLGA/TGF- β 2가 코팅된 티타늄 디스크 위에 간엽줄기세포를 배양한 결과 125 ng/ml와 500 ng/ml 두가지 농도 모두 viable 하였으며, 7일차 배양 결과에서 PLGA/TGF- β 2처리된 그룹에서 대조군에 비해 세포 증식이 더 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다.

대조군과 PLGA/TGF- β 2 복합체로 코팅한 디스크 간에 거칠기에 차이가 없음을 보기 위하여, AFM test을 통해 표면 거칠기를 확인하였으며, 대조군과 실험군 사이에는 통계적으로 유의미한 거칠기 차이를 보이지 않았다. 따라서 TGF- β 2가 세포 증식 속도에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 입증하였다. 결론적으로 나노 코팅된 TGF- β 2는 디스크 표면에 세포 증식을 돕는 역할을 할 수 있으며 이는 임플란트에 응용시 초기 세포 활성성을 증가시키는 가능성을 보여준다. 따라서 임플란트의 골생성을 도울 수 있는 조골세포의 빠른 유도로 임플란트의 초기 고정력을 증가시킬 수 있다는 임상적인 의미가 있겠다. 하지만, 본 연구는 *in vitro* 환경에서 실험한 연구로, PLGA/TGF- β 2 복합체가 코팅된 임플란트 표면이 실질적으로 조골세포의 분화가 촉진되는지 *in vivo* 동물실험을 통해 연구할 필요가 있다고 보여진다.

결론

PLGA/TGF- β 2 복합체를 electrospray 방식으로 양극산화 티타늄 디스크에 표면처리한 본 실험을 통해 다음과 같은 결과를 도출할 수 있었다.

1. rhTGF- β 2를 티타늄 디스크에 나노 입자로 코팅하기 위해, electrospray를 사용하였으며, FE-SEM으로 PLGA/rhTGF- β 2 복합체를 균일하게 농도를 조절하여 티타늄 표면에 coating 할 수 있음을 확인하였다.
2. AFM test 결과 대조군과 PLGA/rhTGF- β 2 코팅된 실험군 사이의 거칠기 차이는 없었다.
3. MTT assay 결과 7일차에서 PLGA/rhTGF- β 2 복합체로 코팅된 티타늄 실험군이 대조군에 비해 통계적으로 유의미한 간엽 줄기 세포의 증식을 확인하였다. 또한 복합체 처리군의 농도가 높을수록 높은 세포 증식 수치를 보였다.

ORCID

Joohyung Kim <http://orcid.org/0000-0001-8943-6051>

Seong-Kyun Kim <http://orcid.org/0000-0001-8694-8385>

Seong-Joo Heo <http://orcid.org/0000-0003-0699-4141>

Jai-Young Koak <http://orcid.org/0000-0002-0190-0778>

Ji-Man Park <http://orcid.org/0000-0003-0018-1166>

References

1. Henmann JS, Cochran DL, Nummikoski PV, Buser D. Crestal bone changes around titanium implants. A radiographic evaluation of unloaded nonsubmerged and submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1997;68:1117-30.
2. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 2002;23:491-501.
3. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A* 2004;71:108-17.
4. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:128-34.
5. Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:779-84.
6. 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.
7. Bosetti M, Boccafocchi F, Leigheb M, Cannas MF. Effect of different growth factors on human osteoblast activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering. *Biomol Eng* 2007;24:613-8.
8. Kim HD, Valentini RF. Human osteoblast response in vitro to platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta delivered from controlled-release polymer rods. *Biomaterials* 1997;18:1175-84.
9. De Ranieri A, Viridi AS, Kuroda S, Shott S, Leven RM, Hallab NJ, Sumner DR. Local application of rhTGF-beta2 enhances peri-implant bone volume and bone-implant contact in a rat model. *Bone* 2005;37:55-62.
10. Cho YJ, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lee JH. Cellular responses on anodized titanium discs coated with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ incorporated Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *J Korean Acad Prosthodont* 2008;46:620-7.
11. Lee SY. Effect of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/bone morphogenic protein-2 coating of anodized titanium surface on osteoblast-like cells. MS Thesis. In: Korea, Seoul University, 2010.
12. Fan H, Tao H, Wu Y, Hu Y, Yan Y, Luo Z. TGF- β 3 immobilized PLGA-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hybrid scaffold for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2010;95:982-92.
13. Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm.* 2004;282:1-18.
14. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:444-51.
15. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1418-28.
16. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987;262:2869-74.
17. Lomri A, Marie PJ. Bone cell responsiveness to transforming growth factor beta, parathyroid hormone, and prostaglandin E₂ in normal and postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1990;5:1149-55.
18. Lomri A, Marie PJ. Effects of transforming growth factor type beta on expression of cytoskeletal proteins in endosteal mouse osteoblastic cells. *Bone* 1990;11:445-51.
19. Machwate M, Jullienne A, Moukhtar M, Lomri A, Marie PJ. c-fos protooncogene is involved in the mitogenic effect of transforming growth factor-beta in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 1995;9:187-98.
20. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol* 1987;105:457-63.
21. Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Seyedin SM. Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro. *J Cell Physiol* 1988;134:337-46.
22. Sena K, Sumner DR, Viridi AS. Effect of recombinant human transforming growth factor-beta2 dose on bone formation in rat femur titanium implant model. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:1210-7.
23. Yoo SY, Kim SK, Heo SJ, Koak JY, Lee JH, Park JM. Biochemical responses of anodized titanium implants with a poly(lactide-co-glycolide)/bone morphogenic protein-2 submicron particle coating. Part 1: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30:512-8.
24. Agrawal CM, Niederauer GG, Athanasiou KA. Fabrication and characterization of PLA-PGA orthopedic implants. *Tissue Eng* 1995;1:241-52.
25. Hahn H, Palich W. Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1970;4:571-7.
26. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70:17-22.
27. de Groot K, Gesink R, Klein CP. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1375-81.
28. Catledge SA, Vohra YK, Bellis SL, Sawyer AA. Mesenchymal stem cell adhesion and spreading on nanostructured biomaterials. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:986-9.
29. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Opin Solid State Mater Sci* 2002;6:319-27.

Electrospray법으로 rhTGF- β 2/PLGA 복합체를 코팅한 티타늄에서의 간엽줄기세포 증식에 관한 연구

김주형¹ · 김성균^{1*} · 허성주¹ · 광재영¹ · 이우성¹ · 이주희² · 박지만³

¹서울대학교 치의학대학원 치과보철학교실, ²울산대학교 서울아산병원 치과보철과, ³관악서울대학교 치과병원

목적: 본 연구는 *in-vitro* 상에서 recombinant human transforming growth factor-beta (rhTGF- β 2)와 poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) 의 복합체를 티타늄 디스크 표면에 코팅하여, 생물학적으로 간엽줄기세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 시행되었다.

재료 및 방법: 양극산화 디스크에 일렉트로스프레이 코팅법을 이용하여 anodized 된 티타늄 디스크를 대조군으로 설정하고, rhTGF- β 2를 125 ng/ml와 500 ng/ml 농도로 코팅한 것을 실험군으로 하였다. 티타늄 디스크 표면에 분사된 복합체가 균일하게 분사되었는지 field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM)을 통해 확인하였으며, atomic force microscope (AFM) test를 이용하여 rhTGF- β 2로 코팅한 디스크와 양극산화 디스크의 거칠기 차이를 확인하였다. 디스크 위에 간엽줄기세포 배양 후 1, 4, 7일에 세포증식 양상을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide) assay 검사를 통해 확인하였다.

결과: AFM 결과 대조군과 실험군에서 거칠기의 유의할만한 차이가 없었다 ($P>.05$). MTT 결과 7일차 배양 결과에서 125 ng/ml와 500 ng/ml PLGA/TGF- β 2처리된 그룹은 각각 평균 0.45와 0.48이었으며, 대조군은 평균 0.33으로 PLGA/TGF- β 2처리된 그룹에서 세포 증식이 더 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다 ($P<.05$).

결론: rhTGF- β 2 복합체를 electrospray법으로 코팅한 티타늄 표면에서 7일차에서 줄기간엽세포의 빠른 증식을 확인하였다. 또한 복합체 처리군의 농도가 증가할수록 높은 세포 성장 수치를 보였다. (*대한치과보철학회지* 2016;54:120-5)

주요단어: 티타늄; rhTGF- β 2; PLGA; 줄기세포

* 교신저자: 김성균

03080 서울 종로구 대학로 103 서울대학교 치의학대학원 치과보철학교실

02-2072-2661: e-mail, ksy0617@smu.ac.kr

원고접수일: 2016년 3월 18일 / 원고최종수정일: 2016년 3월 29일 / 원고채택일: 2016년

3월 30일

© 2016 대한치과보철학회

© 이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 3.0 대한민국 라이선스에 따라
이용하실 수 있습니다.

※ This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (No.2011-0028067, 2011-0004163) and by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A120304).