

구배가 적용된 다공성 크기가 골세포

및 혈관세포 증식에 미치는 영향

김희진^{1*}, 정아라^{2*}, 반훈영³, 이은숙³, 임도형^{2, 3†}, 권보미^{2†}

세종대학교 바이오융합공학과¹, 세종대학교 기계공학과², 알엔엑스(주)³

Effect of gradient in pore size on proliferation of osteoblasts and endothelial cells

Heejin Kim^{1*}, Ara Jung^{2*}, HunYeong Ban³, Eunsuk Lee³, Dohyung Lim^{2, 3†}, Bomi

Gweon^{2†},

Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Korea

Department of Mechanical Engineering, Sejong University, Korea

RNX, 209 Neungdong-ro Gwangjin-gu, Seoul 05006, Republic of Korea

*equally contributed

†dli349@sejong.ac.kr †bgweon@sejong.ac.kr

Abstract

Total joint arthroplasty is one of the most effective treatments in orthopedics for end-stage joint degeneration. Recently, a lot of effort has been devoted to developing a highly functional porous structure on an implant surface. Here, we investigated the effect of porous size on the osseointegration and angiogenesis of implant. To confirm the efficiency of osseointegration and angiogenesis *in vitro* on different pore size, titanium-based specimens with five different porous structures were designed and fabricated using 3D printing method. Following the 3D printing, specimens were observed with micro-CT to measure the porosity and pore connectivity. Saos-2 cells showed enhanced proliferation on the specimens with large pore size. On the other hand, HUVEC showed enhanced cell proliferation on the specimens with small spore size. Saos-2 cells also exhibited enhanced osteoblast differentiation efficiency on porous structure. Collectively, these results show that pore size can be one of the key regulators in osseointegration, thus suggest that proper arrangement of pore size can be important when fabricating a porous structure for implants.

1. 연구 배경

최근 정형용 임플란트는 표면에 시멘트를 도포하는 기존 방법에서 표면 다공성 구조를 통해 접착하는 골조직과의 직접적인 생물학적 고정을 유도하는 방법으로 그 개발방향이 변화하고 있다[1]. 시멘트를 사용한 식립 경우 장시간 사용한 경우에 시멘트-인공관절 계면에서 해리(loosening)가 발생할 수 있으며, 이는 전치환술의 장기적 예후가 나빠지는 주요 원인이 된다고 알려져 있다. 또한, 전치환술 실패로 재치환술(revision)을 하는 과정에서 시멘트 제거를 위해 필요 이상의 정상 골조직이 손실될 수 있다[2, 3, 4, 5].

기존의 임플란트 표면에 다공성구조를 형성하기 위한 방법으로 티타늄 플라즈마 분사(titanium plasma spraying), 금속분말 소결(metal-bead sintering), 금속매쉬 확산접합(metal-mesh diffusion bonding) 등이 활용되고 있다. 그러나 기존방법은 임플란트 본체에 금속 입자(particle)를 코팅하는 방식이므로 공극크기 및 공극률 제어범위가 극히 제한적이며, 따라서 복잡한 다공성구조를 정밀하게 구현할 수 없다[6, 7, 8]. 또한, 코팅층 박리(마모)의 문제로 임상적용 시 부작용 발생할 수 있다[9, 10, 11].

최근 도입되고 있는 3D 프린팅의 경우, 제약 없는 정밀가공이 가능하므로 기능성 생체모사 다공성구조를 충분히 구현할 수 있으며, 개선된 내박리(마모)성까지 보장되어있다[12].

본 연구의 목표는 골생성과 골유합을 보다 빠르고 강하게 유도하는 다공성구조 임플란트를 개발하는 것이며, 이를

통하여 식립 직후 골조직과 임플란트 접촉영역에서 충분한 고정력 및 초기안정성을 보장하는 데에 있다. 다공성구조의 경우 골생성 및 혈관생성 촉진시킬 수 있으며, 응력차폐(stress shielding) 완화를 통해 식립 후 골약화를 방지할 수 있다

2. 연구 방법

1) 시편 제작

공극 크기가 400, 600, 800, 1000 μm 시편의 설계 모델을 도출하였다. 모든 시편은 Ti-6Al-4V powder (grade 23, ASTM F136)로 metal 3D printer (M290, EOS)를 이용하여 제작되었으며 세포배양시 사용되는 plate 사이즈에 맞춰서 직경 14.6mm, 높이 4.0mm 맞춰서 제작되었다.

제작된 시편은 micro-CT 단층촬영을 진행 후 획득한 단층 이미지를 3D복원하여 각각의 공극 특성 측정값을 이미지 기반 분석을 통해 얻었다. 또한 압축시험을 규격(ISO 13314) 절차에 따라 진행하였다.

2) 세포 실험

실험에 사용된 세포는 인간 조골세포인 Saos-2 세포와 인간 혈관내피세포인 HUVEC 세포로 Saos-2는 한국세포주 은행에서 구입하였으며 MEM media에 10% FBS와 1% Anti-Anti를 첨가하여 배양하였고 HUVEC은 LONZA에서 구입하였으며 EBM media에 EGM-2 kit을 첨가하여 배양하였다.

Saos-2와 HUVEC의 증식을 평가하기 위하여 CCK assay를 수행하였다. 세척 및 멸균한 시편을 표면처리 되지 않은 24

well plate에 넣은 뒤 세포를 시편위에 올려서 총 14일간 배양하였다. 세포를 시편 위에 뿌린 뒤, 3, 7, 10, 14일에 CCK-8 reagent를 넣은 뒤 37°C 인큐베이터에서 90분간 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 450nm 파장에서 Optical Density(OD)값을 측정하였다.

Saos-2의 분화를 평가하기 위하여 ALP assay를 수행하였다. 세척 및 멸균한 시편을 표면처리 되지 않은 24 well plate에 넣은 뒤 Saos-2를 총 21일간 배양하였다. 7, 14, 21일에 각각 배양중인 세포의 배양액을 얻은 후 원심분리하여 세포 debris를 제거하였다. 96well plate에 ALP assay buffer 35μL와 세포 배양액 45μL 넣은 뒤 5mM pNPP solution 50μL을 넣고 25°C에서 한시간 동안 반응시켰다. Stop solution을 넣은 뒤 microplate reader를 이용하여 405nm 파장에서 OD값을 측정하였다.

3. 연구 결과

공극크기형태에 따라 4개 종류의 시편을 3D 프린팅 제작한 후 구현 수준을 확인하였다. 먼저, 공극크기는 공극영역에 내접하는 원들의 평균직경으로 측정하였으며, 설계입력에 따라 구현됨을 확인하였다.

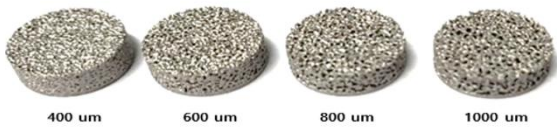


그림 1. 3D 프린팅으로 제작한 시편

공극 연결성은 전체 공극부피에서 폐쇄공극(closed pores)을 제외한 연결공극(connected pores)만의 비율로 측정하였으며, 설계입력에 따라 구현됨을 확인하였다.

다음으로, 시편의 공극 크기 및 구배가 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 조골세포인 Saos-2와 혈관 내피세포인 HUVEC의 증식을 CCK-8을 이용하여 측정하였다. 조골세포의 경우 세포 증식 초반인 3일과 7일에는 공극 크기가 작은 400μm과 600μm에서 세포의 증식이 잘 이루어지고 공극의 크기가 큰 800μm과 1000μm에서는 세포 증식이 잘 이루어 지지 않았다. 증식 후반부인 14일이 되면 공극의 크기가 큰 800μm과 1000μm에서 세포의 증식이 잘 이루어지는 것을 확인하였다.

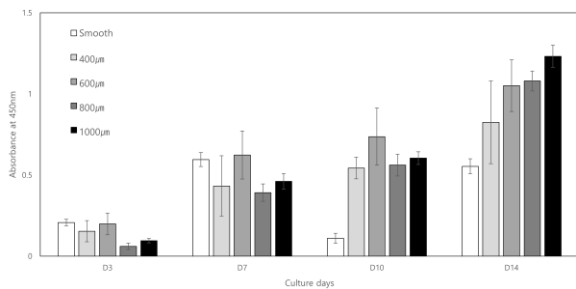


그림 2. Saos-2의 세포증식 결과

시편에서 증식한 조골세포가 잘 분화되는지 확인하기 위하여 ALP assay를 진행하였다. ALP assay를 7일과 14일에 수행한 결과, 7일째에는 시편간에 큰차이가 없었으나 14일에는 공극이 클수록 ALP activity가 높은 것을 확인하였다.

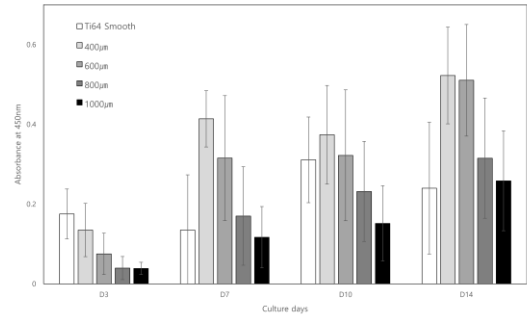


그림 3. HUVEC의 세포 증식 결과

조골세포가 임플란트에 잘 정착되기 위해서는 혈관의 생성도 중요하므로 혈관내피세포의 증식도 확인하였다. 혈관내피세포의 경우 증식 초반부터 공극이 작은 400μm에서 세포 증식이 가장 잘 되었고 그 다음으로는 600μm, 800μm, 1000μm 순서로 증식이 잘 되었다. 이 경향은 14일까지 동일하게 유지되었다.

위 결과를 종합하여 볼 때, 공극의 크기가 작으면 조골세포의 초반 증식에는 유리한 반면 공극의 크기가 클 경우 조골세포의 장기적인 증식에서 유리한 것을 확인하였다. 반면 혈관 내피세포의 경우에는 공극의 크기가 작을 때 세포증식이 유리함을 보여주었다.

4. Acknowledgements

이 연구는 한국연구재단 과제(NRF-2022R1A2C2010940)와 중소벤처기업부의 창업성장기술개발사업(S3104224)의 지원을 받아 수행하였음.

5.참고 문헌

- [1] 한국보건산업진흥원, 의료기기 품목시장 리포트 volume 17, 2014.
- [2] 권순용, 다공성 수산화인회석 혼합 골시멘트의 골내성장 효과, volume 8, 1996.
- [3] Lawrie C.M, The cost of implanting a cemented versus cementless total knee arthroplasty, volume 101, pp 61-63, The bone&joint journal, 2019.
- [4] Karageorgiou V, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, volume 26, pp 5474-5491, Biomaterials, 2005.
- [5] Kevin L, Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice, pp 332-333, CRC Press, 2014.
- [6] John Gerald Odhiambo, Porosity and Its Significance in Plasma-Sprayed Coatings, Volume 9 pp 460, Coatings, 2019.
- [7] David H. Kohn, A parametric study of the factors affecting the fatigue strength of porous coated Ti-6Al-4V implant alloy, Volume 24, pp 1483-1501, Journal of Biomedical Materials Research, 1990.
- [8] Fabrizio Matassi, Porous metal for orthopedics implants, Volume 10(2), pp 111-115, Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism, 2013.
- [9] Kevin L. Ong, Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice, pp 332-333, CRC Press, 2014.
- [10] Todd Smith, The Effect of Plasma-Sprayed Coatings on

the Fatigue of Titanium Alloy Implants, Biomaterial, 1994, Volume 46, pp 54-56

[11] Annette Kienle, Does impaction of titanium-coated interbody fusion cages into the disc space cause wear debris or delamination?, Volume 16, pp 235-242, The Spine Journal, 2016.

[12] Shin T et al, A Laser-Aided Direct Metal Tooling Technology for Artificial Joint Surface Coating, International, volume 18, pp 233-238, Journal of Precision Engineering and Manufacturing, 2017.