

신생 골 형성을 위한 마이크로 섬유 구조의 생체복합 세포지지체 제작

김민성^{1*}, 정봉수¹, 박민정¹, 한경엽¹, 이찬송¹, 박지효¹, 정광우¹, 박성식², 김주리³, 최재혁⁴, 여명구^{1*}

대구경북첨단의료산업진흥재단 첨단기술부 의료신소재팀¹

경북대학교 의과대학 분자의학교실²

오송첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터³

휴젤⁴

Fabrication of 3D microfibrinous biocomposites scaffold for new bone formation

Minseong Kim^{1*}, Bongsu Jung¹, Min-Jeong Park¹, Gyeongyeop Han¹, Chansong Lee¹, Jihyo Park¹, GwangWoo Jeong¹, Seong-Sik Park², Kim Ju Ri³, Jae Hyuk CHOI⁴, MyungGu Yeo^{1*}

¹ Advanced Biomaterials Team, Medical Device Development Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation, 80, Cheombok-ro, Dong-gu, Daegu 41061, Republic of Korea

² Department of Molecular Medicine, College of Medicine, Kyungpook National University, Republic of Korea

³ New Drug Development Center, OSONG Medical Innovation Foundation, Cheongju-si, Chungbuk-do 28160, Republic of Korea

⁴ Hugel, Inc. Geodu Plant 23, GEODUDANJI 1-GIL, DONGNAE-MYEON, Chunchon-si, Gangwon-do, 24398, Republic of Korea

*mkim0301@kmedihub.re.kr

Abstract

The fabrication of biomedical composite materials with macroporous structures and unique topographical cues has been widely investigated to achieve successful bone regeneration. In this study, porous biocomposites consisting of microfibrinous bundles fabricated using an electrohydrodynamic direct printing process were prepared. The fibrous composite structure was composed of a fibrous matrix structure of polycaprolactone/ α -tricalcium phosphate and collagen coated in fibrous biocomposites. Various cellular activities, cell proliferation, and osteogenic differentiation in biocomposites have been investigated using preosteoblasts (MC3T3-E1). The in vitro results demonstrated that biocomposites with the microfibrinous topographical cue significantly improved various cellular responses, including cell proliferation and mRNA expression levels of osteoblastic genes of MC3T3-E1 cells, compared to biocomposites without a fibrous topography surface that were fabricated through normal 3D printing. This phenomenon could be attributed to the fibrous structure of composites that stimulated cultured cells, thereby activating extracellular signal-related kinases and p38 signaling pathways. To observe the ability of biocomposites for bone regeneration, a rat calvarial defect model was used; the fibrous biocomposite showed significantly higher level of new bone formation in comparison with the 3D-printed control, a biocomposite without fibrous topographical cues.

1. 연구 배경

골 조직의 주요 성분은 세라믹으로 구성되어 있으며 [1], 세라믹 소재는 높은 기적 강도, 생체 적합성, 조골세포 부착/증식 (골전도), 뼈 형성 (골유도)를 촉진하는 특성을 갖고 있기 때문에 골조직 재생을 위한 바이오소재로 큰 역할을 한다 [2, 3]. 골 조직을 재생하기 위해 사용되는 다양한 세라믹 소재들이 존재하며 (Hydroxyapatite, Tricalcium phosphate, Calcium sulfate 등), 이중 calcium phosphate 계열의 세라믹은 bone apatite와 화학적으로 유사하며, 이를 통해 제작된 세포지지체는 골조직을 재생을 촉진한 다양한 결과들을 보여주고 있다 [4]. 하지만 세라믹 소재는 가공성이 낮기 때문에 조골세포의 부착, 이동 및 분화에 영향을 주는 다공성 구조체를 제작하기 어렵고, 취성 및 낮은 굽힘 강도를 갖기 때문에 세포지지체 제작에 대한 한계를 갖는다. 이를 극복하기 위해 poly(ϵ - caprolactone) (PCL), poly(lactic acid) (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), poly(glycolic acid) (PGA)와 같은 생분해성 고분자 재료와 세라믹/고분자 복합소재로 많이 사용되었다 [5].

한편 전기방사 공정은 유기용매를 이용해 고분자를 용해시켜 사용하기 때문에 세라믹 함량을 쉽게 조절하여 세포지지체를 제작할 수 있다 [6]. 하지만 일반적인 전기방사 공정으로 제작된 세포지지체는 2차원으로 제작된다. 세포분화를 촉진시키는 기능을 갖는 유전자의

신호전달을 증가시키기 위해서는 3D 배양이 반드시 필요하기 때문에 2차원 세포지지체는 골 조직을 재생하는데 적합하지 않다 [7].

기존의 세라믹/고분자 기반 복합 세포지지체가 갖는 문제점들을 해결하기 위해 본 연구팀은 70% 이상의 세라믹이 포함된 세라믹/고분자 용액을 제조하고, 3D printing system과 electrohydrodynamic jet printing system을 결합하여 3차원 복합 지지체를 제작하였다. 제작된 복합 지지체의 조골세포 부착률 및 활성을 촉진시키기 위해 골 조직의 주요성분인 콜라겐을 표면에 코팅하였다. In vitro 시험 결과 세포외기질 구조를 모사한 3차원 섬유 구조의 세포지지체에서 높은 세포 증식과 분화의 결과를 보여주었으며, in vivo 실험 결과에서도 세포외기질 모사 구조체에서 골조직이 빠르게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 연구 결과를 통해 개발된 공정은 다양한 조직공학 분야에 적용 가능한 잠재력을 갖고 있다고 판단하였다.

2. 연구 방법

그림1은 3D PCL/CDHA/collagen 섬유 복합지지체 제작 공정 모식도를 도시하였다. 실험을 진행하기 위해 절연 소재를 사용하여 전기수력학 공정과 3D 프린터를 결합하였다. 3차원 섬유 구조체를 제작하기 위하여 에탄올 용액이 담긴 수집판을 사용하였고, 시린지 펌프로

바이오복합소재 용액을 공급하고 고전압을 가하여 전기수력학 기반 프린팅을 수행하였다. 최종적으로 제작된 3차원 PCL/ α -TCP 섬유 복합지지체는 phosphate buffer saline 용액을 사용하여 37°C에서 24시간 동안 가수분해시켜 α -TCP 파우더가 calcium deficient hydroxyapatite (CDHA) 치밀체가 되도록 유도시켰다. 3차원 PCL/CDHA 섬유 복합지지체는 플라즈마 공정을 통해 친수표면을 갖게 하고, 0.1 wt% collagen을 이용해 표면을 코팅하였다. 최종적으로 콜라겐을 가교시키고, 세척하여 3차원 PCL/CDHA/collagen 섬유 복합지지체를 제작하고 ES biocomposite으로 명명 하였다. 비교군은 3D 프린팅을 통해 제작하였고, PS biocomposite으로 명명하였다.

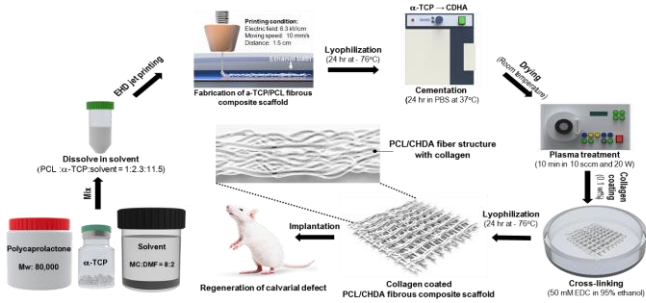


그림1. ES Biocomposite 제조 공정 모식도

3. 연구 결과

작된 ES biocomposite의 제작 공정을 최적화 하기 위하여 다양한 높이, 전기장, 노즐을 사용하여 전기수력학 공정 기반 3D 프린팅을 수행하였다. 그림 2는 공정최적화를 통해 만들어진 제작 조건 윈도우와 최종적으로 제작된 ES 구조체의 주사전자현미경 사진을 도시하였다. 프린팅 다양한 조건에서 프린팅한 결과 21G 노즐, 거리 1.5 cm, 6.3 kv/cm 가 최적조건으로 선정되었다. 주사전자현미경을 통해 일반 프린팅을 통해 제작된 PS 구조체와 ES 구조체를 관찰한 결과 PS 구조체는 표면이 평평한 반면, ES 구조체는 섬유 구조로 이루어진 것을 관찰할 수 있었다.

Collagen의 농도가 ES의 섬유구조를 유지할 수 있는지 확인하기 위해 collagen 0.1 wt%와 1 wt%를 각각 코팅하였다. 코팅된 표면을 관찰한 결과 1 wt% collagen은 농도가 높아 섬유구조를 막는 현상이 발생하였지만, 0.1 wt%는 섬유구조를 유지하였기 때문에 최종적으로 collagen은 0.1 wt% 조건으로 선정하였다.

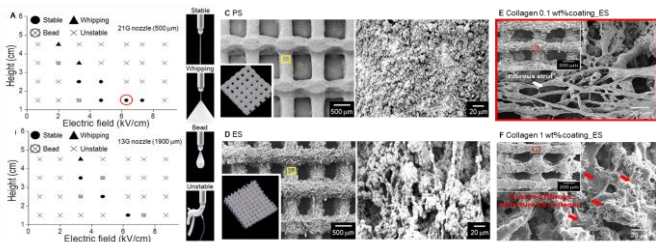


그림2. 공정최적화 및 주사전자현미경 사진 결과

최적화된 공정을 기반으로 PS biocomposite과 ES biocomposite을 제작하였고, 광학 사진과 주사전자현미경을 통해 구조를 분석한 결과 PS와 ES biocomposite은 표면 구조를 제외하고, 가닥 크기, 공극 크기, 세라믹 분포도 등이 기하학 적으로 유사함을 보여주었다.

그림 3은 각각의 세포지지체에 세포를 배양한 결과를

도시하였다. 조골세포를 배양한 결과 ES biocomposite에서 초기 세포 성장률이 매우 높게 나타났으며, DAPI와 Phalloidin을 통해 세포핵과 골격을 염색하여 관찰한 결과 ES에서만 조골세포가 공극이 차오르는 것이 관찰 되었다. Alizarin red s를 통해 칼슘형성도를 확인한 결과 마찬가지로 ES biocomposite은 공극까지 조골세포가 차오르고 분화하여 골조직을 형성한 것을 관찰할 수 있었다.

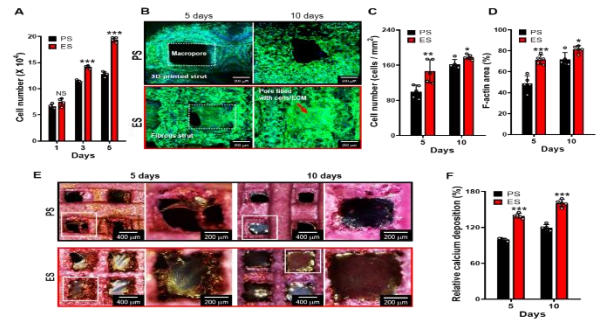


그림3. 조골세포 배양 결과

본 연구를 통해 제작된 ES biocomposite은 골 조직의 구성 성분과 세포외기질의 표면을 모사한 것으로 조골세포를 배양한 결과 일반 프린팅을 통해 제작된 PS biocomposite 보다 세포의 성장속도가 빠르게 일어났고, 분화율도 높게 나타났다. 본 연구를 통해 개발된 공정은 세포외기질을 모사한 특성에 의해 세포의 성장과 분화를 촉진시키기 때문에 골 조직 뿐만 아니라 피부, 연골, 고막 등의 다양한 조직재생에 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음. (NRF-2021R1C1C1009004 and NRF-2021R1F1A1060033)

5.참고 문헌

- [1] D. J. Griffon. "Evaluation of osteoproduative biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics." 2002.
- [2] T. Albrektsson, and C. Johansson. "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration." *European Spine Journal*, Vol 10, S96-S101, 2001.
- [3] K. Y. Lee, M. Park, and et al. "Ceramic bioactivity: progresses, challenges and perspectives." *Biomedical Materials*, Vol 1, R31, 2006.
- [4] T. Kokubo, H.-M. Kim, and M. Kawashita. "Novel bioactive materials with different mechanical properties" *Biomaterials*, Vol 24, 2161-2175, 2003.
- [5] K. Rezwani, Q. Z. Chen, and et al. "Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials*, Vol 27, 3413-3431, 2006.
- [6] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu. "Bone tissue engineering: recent advances and challenges." *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, Vol 40, 2012.
- [7] H. Liu, J. Lin, and K. Roy. "Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells" *Biomaterials*, Vol 27, 5978-5989, 2006.