

# Synthesis and characterization of Li-doped tricalcium phosphate for improving the differentiation of human dental pulp stem cells

Jiyu Lee, Juyoung Lee, Kyung-Hyeon Yoo\* and Seog-Young Yoon†

School of Materials Science Engineering, Pusan National University, Busan 46241, Korea

\*Institute of Engineering Innovation, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan

(Received October 7, 2024)

(Revised October 25, 2024)

(Accepted November 4, 2024)

**Abstract** The interactions of human dental pulp stem cell (hDPSCs) with Li-doped  $\beta$ -tricalcium phosphates ( $\beta$ -TCP) and their degradation behavior in biological environment were investigated. For this purpose, three different amounts of Li ions-doped  $\beta$ -TCP were synthesized by co-precipitation method. The lattice constants of crystal structure were slightly changed with addition of lithium due to the replacing site and the difference of ionic radius. Li-doped  $\beta$ -TCP showed significantly higher ALP activity compared to pure  $\beta$ -TCP, suggesting that lithium ion positively effects the cell differentiation. In addition, the osteogenic performance was also improved by the adding Li ions. These could demonstrate the benefit of incorporating an important trace elements, lithium, into  $\beta$ -TCP to achieve better osteogenesis activity. As a result, the combination of Li with  $\beta$ -TCP may be a promising method to improve bone regeneration, suggesting excellent in vitro osteogenic stimulation properties by inducing bone related gene expression in hDPSCs.

**Key words**  $\beta$ -Tricalcium phosphate, Lithium, Lattice parameters, Dental pulp stem cell

## 인간치수세포(hDPSC) 분화개선을 위한 리튬도핑 인산삼칼슘의 합성 및 특성평가

이지유, 이주영, 유경현\*, 윤석영†

부산대학교 재료공학부, 부산, 46241

\*동경대학교 공과대학 공학혁신센터, 교토, 113-8656

(2024년 10월 7일 접수)

(2024년 10월 25일 심사완료)

(2024년 11월 4일 게재확정)

**요약** 인간 치수 세포와 Li 이온이 도핑된  $\beta$ -인산삼칼슘( $\beta$ -TCP)의 상호 작용과 생물학적 환경에서의 분해 거동을 조사하였다. 이를 위해 3가지 다른 양의 리튬 이온이 첨가된  $\beta$ -TCP를 공침법을 통해 합성하였다. 결정 구조의 격자 상수는 치환 부위와 이온 반경의 차이로 인해 리튬을 첨가하면 변화하였다. 리튬이온이 첨가된  $\beta$ -TCP는 순수한  $\beta$ -TCP에 비해 우수한 생체 활성을 보였으며, 이는 리튬 이온이 세포 분화에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 시사한다. 또한, 골형성 성능도 리튬 이온을 첨가될 때 더욱 향상되었다. 이는 더 나은 골 형성 활성을 달성하기 위해 중요한 미량 원소인 리튬을  $\beta$ -TCP에 첨가하는 이점을 입증할 수 있다. 결과적으로, 리튬과  $\beta$ -TCP의 조합은 골 재생을 향상시키는 유망한 방법이 될 수 있으며, 이러한 결과는 인간 치수 세포에서 뼈 관련 유전자 발현을 유도함으로써 우수한 골 형성을 자극하는 효과를 가진다.

### 1. 서론

임플란트는 치아를 잃은 환자에게 시행되는 가장 널리 알려진 수술 방법이다. 임플란트는 잇몸에 나사를 고정하는 과정이 필요하며, 이 과정에서 뼈 재생은 잇몸 상태가

좋지 않은 환자에게 필수적이다. 따라서 가장 많이 사용되는 유도 골 재생 전략(GBR, Guided Bone Regeneration Strategy)은 교체된 분절 및 미적 측면과 동일한 해부학적 위치를 모방하여 적절한 임플란트 지지를 가능하게 한다. 전통적인 GBR 수술에서 뼈 회복까지의 총 기간은 12주에서 24주라는 상당히 긴 기간으로 알려져 있다. 따라서 뼈 회복 기간을 단축하기 위해 단백질 성장인자(BMP-2)를 첨가하는 방법에 대한 연구가 활발히 이루어

†Corresponding author  
E-mail: syy3@pusan.ac.kr

지고 있다[1,2]. 그러나 여기에는 수술 후 염증, 관련 부작용, 이소성 골 형성, 파골세포 매개 골 흡수 및 부적절한 지방 형성이 포함되어 있다[3]. 이러한 이유로 뼈 재생을 위한 줄기세포의 반응을 자극하기 위해 무기질 자극 성분을 방출할 수 있는 적절한 무기질 화합물을 제조하는 것이 매우 중요하다. 인산칼슘계 화합물은 생체 흡수성 세라믹으로 널리 알려져 있으며, 그 중에서  $\beta$ -TCP는 주로 정형외과 및 구강악안면 임플란트 수술에서 임시 지지 지지체로 사용되고 있다[4-7]. 그러나 줄기 세포의 골 형성 분화를 자극하여 조직 결합의 최적의 치유 시간을 달성하는 데는 여전히 문제로 남아 있으며, 이를 해결하기 위하여 지난 몇 년 동안 많은 연구가 이루어지고 있다[5,8-11]. 골유도를 향상시키기 위해  $\beta$ -TCP에 미량의 금속원소를 첨가하여 성장 인자 신호 전달 경로를 통해 골아세포 전구체 분화를 유도하거나 뼈 조직 성장을 촉진시키기 위한 시도가 이루어지고 있다. 단백질 성장인자와 비교했을 때, 뼈 조직 복원을 유도하기 위해  $\beta$ -TCP에 미량의 금속 이온을 치환하는 방법의 이점은 더 낮은 비용, 더 큰 단순성 및 더 높은 안정성을 포함하기 때문에 다양하게 연구가 진행되고 있다[3,8]. 한편,  $\beta$ -TCP에 치환하는 미량 원소 중 골형성 특성에 대한 리튬의 영향에 대하여 관심이 높아지고 있다[10,12-14]. 리튬은  $\beta$ -카테닌의 안정화 및 Wnt 경로의 음성 조절자인 글리코젠 합성효소 키나아제 3(GSK3)의 억제를 통하여 Wnt/ $\beta$ -카테닌의 경로를 활성화 시키는 것으로 보고되고 있다[12,15-17]. 특히, Han et al.[18]은 Li-doped  $\beta$ -TCP가 인간 치수 세포(hPDSC)와 인간 골수 기질세포(hBMSC) 모두에서 뼈/시멘트 관련 유전자 발현을 유도함으로써 우수한 시험관 내 골 형성 및 시멘트 생성을 촉진시키는 특성을 가지고 있기 때문에 Li와  $\beta$ -TCP의 조합은 뼈/시멘트 재생을 향상시키는 유망한 방법이 될 것이라고 보고된다. 한편, 인간 치수 세포(hDPSC)는 면역원성이 낮고 증식률이 높기 때문에 치과 분야에서 사용되어 왔다[19,20]. 생체 활성 물질에 의한 인간 치수 줄기세포의 골형성 잠재력의 활성화는 결손 부위의 뼈 재생을 크게 가속화할 것이다. 1가 금속 이온(K와 Na)이 미량  $\beta$ -TCP에 치환되는 경우, 9.09 mol%의 한계를 가지는 것으로 알려져 있다[21,22].

이러한 이유로, 본 연구에서는 리튬 도핑에 따른  $\beta$ -TCP의 구조적인 변화를 분석하기 위하여 서로 다른 량의 리튬(상기 치환 한계 9.09 mol% 포함)을 도핑한  $\beta$ -TCP 분말을 합성하고 Rietveld 법을 활용하여 구조해석을 수행하였다. 또한, 유도 골 재생 전략(GBR) 수술에서 골 이식 가능성을 결정하는 골 형성 능력에 대한 pure TCP에서 리튬 이온의 효과는 세포 배양 배지에서 용해 시험 및 세포 시험을 통해 조사하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. Li-doped $\beta$ -TCP 합성

$\text{Ca}_{3-0.5x}\text{Li}_x(\text{PO}_4)_2$ 의 화학 조성을 갖는 Li-doped  $\beta$ -TCP는  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Junsei, Japan, > 98%),  $\text{LiNO}_3$ (Kanto chemical, Japan, > 98%),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Junsei, Japan, > 98%)을 이용한 화학적 공침법으로 합성하였다. 4개의 샘플은 pure TCP, 0.15Li-TCP(리튬 함량 4.88 mol%), 0.30Li-TCP(리튬 함량 9.52 mol%) 및 0.45Li-TCP(리튬 함량 13.95 mol%)로 표시되었다. 원하는 몰 비율을 함유하고 있는 용액을 첨가 교반하여 1.5( $\beta$ -TCP의 화학량론)의 타겟(Ca + 0.5Li)/P 비율을 맞추었다. 용액의 pH는 암모니아의 존재와 함께 침전 중에 7로 유지하였다. 침전 후, 용액을 24시간 동안 숙성, 80°C에서 24시간 동안 건조하여, 마지막으로 1,000°C에서 2시간 동안 소성하였다. 소성된 분말을 분쇄하고, 체질하여 입자 크기가 45에서 63  $\mu\text{m}$ 인 분말을 얻었다. pure  $\beta$ -TCP 분말은 리튬을 첨가하지 않고 화학양론적 공침법으로 합성하고, 대조군으로 사용하였다.

X선 회절 패턴(XRD, Ultima 4, Rigaku Corp., Japan)을 활용하여 소성된 분말의 결정상을 확인하였다. 합성된 분말에 대한 결정학 정보 파일(CIF)을 얻기 위해 통합 X선 분말 회절 소프트웨어 패키지 PDXL(Rigaku, 버전 2.1.3.4), ICSD 카드 번호 97500을 사용하였다. 구조 분석 결과  $\beta$ -TCP는 R3c 공간 그룹을 가지는 것으로 나타났다. 소성 분말의 결정 구조 분석은 Fullprof 소프트웨어를 사용하여 Rietveld refinement을 사용하여 분석하였다. Li-doped  $\beta$ -TCP 분말의 Li 함량은 유도 결합 플라즈마 발광 분광법(ICP-OES, Perkin-Elmer Optima 7000DV)으로 측정하였다.

### 2.2. Li-doped $\beta$ -TCP의 용해

분말의 용해 거동을 이해하기 위해 pure  $\beta$ -TCP와 Li-doped  $\beta$ -TCP 분말을 10 ml의 최소 필수 배지로, 10% 소 태아 혈청( $\alpha$ -MEM, 10% FBS, pH = 7.4)에 넣어 150 rpm으로 지속적으로 흔들며 36.5°C에서 1, 3, 7일 동안 배양하였다[9,23]. 이 과정에서 샘플 준비는 ISO 10993-12에 따라 수행되었다. 1일, 3일, 7일 후, 배지를 수집하고 튜브에 10 ml의 새 배지를 다시 채웠다. 무게 감소와 pH는 용출 시험 중과 후에 측정하였다. 수집된 매체는 다음을 사용하여 칼슘 및 리튬 이온 농도를 분석하였다. ICP-OES ppm 범위에서. 조성당 중복 샘플을 평가하고 각 샘플에서 3개의 측정을 수행하였다. 용출 시험 후, Li-doped  $\beta$ -TCP의 용해되지 않은 잔류물과 그 상층액을 원심분리로 분리하였다. 그런 다음 잔류물을

세척하고 수집하여 잔류물의 결정 구조를 확인하였다.

### 2.3. 세포 테스트

#### 2.3.1. CCK-8 분석

세포 검사를 위해 통로 7의 인간 치수 줄기 세포 (hDPSCs)를 사용하였다. 세포 증식은 D-Plus™ CCK 세포 생존도 분석 키트(Donginbio, KOREA)를 사용하여 콜레스티스토키닌 옥타-펩타이드 분석(CCK-8)을 평가하였다. hDPSCs는 48-well plate에서 배양된 세포를 처리 전 1일 동안 배양하였다. 1일 후, 배양액을 추출된 배양액으로 교체하고 1, 2, 3일 동안 배양하였다. 배양 배지는 0, 24, 48 및 72시간 후에 30 µl의 MTT 용액(평균 PBS, Sigma에서 0.5 mg/ml MTT)을 함유하는 300 µl의 신선한 배양 배지로 교체하였다. 그 후, 세포를 웰당 20 µl CCK로 처리하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 매체를 48-well에서 96-well plate(NUNC, Roskilde, Denmark)로 옮기고, 생성된 용액의 흡광도는 450 nm에서 플레이트 리더(OpsysMR, DYNEX Technologies Inc.)에 의해 측정하였다.

#### 2.3.2. Alkaline Phosphatase (ALP) staining

hDPSCs는 48-well plate에서  $2 \times 10^4$  세포에 대하여 1일 동안 배양하였다. 1일 후, 배양액을 골형성 배지로 교체하고 7, 14일 동안 배양하였다. 배지-  $\alpha$ -MEM(Gibco), 10% 소 태아 혈청(FBS, Merck), 1% 페니실린-스트렙토마이신(PS, Gibco) 및 5 µg/mL 플라스모신(InvivoGen, San Diego, CA) 함유 골 형성 배지 - 배지 + 100 nM 아스코르브산(Sigma-Aldrich), 10 mM  $\beta$ -글리세로포스페이트(Sigma-Aldrich), 100 nM 텍사메타손(Sigma-Aldrich).

골형성 배지는 2일 또는 3일마다 교체하였다. 7, 14일 후, ALP 염색 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 골형성 분화를 관찰하였다.

#### 2.3.3. Alizarin red S (ARS) activity

hDPSCs는 배양된 세포였으며 48-well plate에서  $2 \times 10^4$  세포를 파종하였다.  $\alpha$ -MEM(Gibco), 10% 소 태아 혈청(FBS, Merck), 1% 페니실린-스트렙토마이신(PS, Gibco) 및 5 µg/mL 플라스모신(InvivoGen, San Diego, CA) 및 100 nM 아스코르브산(Sigma-Aldrich), 100 mM  $\beta$ -글리세로포스페이트(Sigma-Aldrich), 100 nM 텍사메타손(Sigma-Aldrich)을 함유하는 골형성 배지를 제조하였다. 골형성 배지는 3일마다 교체하였고, 14일, 21일 후에는 alizarin red s(ARS)를 이용하여 골형성 분화를 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 합성된 분말의 상 및 구조 분석

Figure 1은 공침법으로 합성된 pure  $\beta$ -TCP, 0.15Li- $\beta$ -TCP, 0.30Li- $\beta$ -TCP 및 0.45Li- $\beta$ -TCP 분말에 대한 XRD 패턴을 보여준다. Figure 1(a)에서 볼 수 있듯이 모든 합성 분말에는  $\beta$ -TCP(ICSD 97500)의 단상만 있어 합성 과정에서 2상이 형성되지 않았음을 알 수 있다. 한편, Fig. 1(b)에서  $\beta$ -TCP 위상에 해당하는 메인 피크(2 1 7)는 Li 이온의 양에 관계없이  $\beta$ -TCP에 Li 이온이 첨가 되면 오른쪽으로 이동하였다. 이러한 현상은 리튬 이온이  $\beta$ -TCP 상에 치환될 때 우선적으로  $\text{Ca}^{2+}$  이온(이온

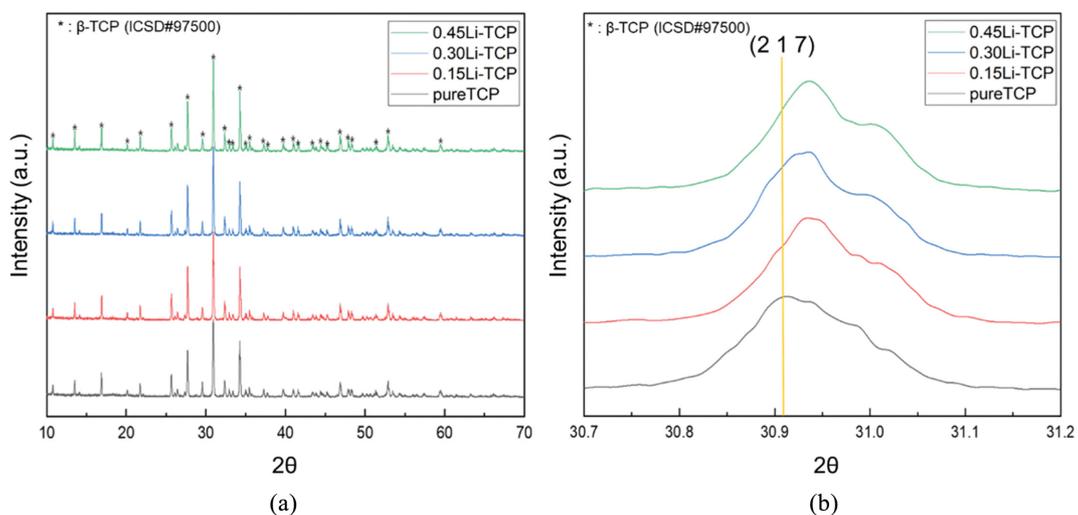


Fig. 1. XRD patterns for the Li-doped  $\beta$ -TCP powders with different amounts of Li ion (a) and the variation of main peak for the  $\beta$ -TCP (b).

반경~0.99Å)을  $\text{Li}^+$  이온(이온 반경~0.76Å)이 대체됨으로 격자 수축 및  $\beta$ -TCP의 반사각의 변위를 유도하여 더 높은 2 $\theta$  각으로 향하게 되었다는 사실을 확인할 수 있으며, 이러한 결과는 이전 보고된 문헌과 일치하였다[21].

합성된 분말에서 Ca, P 및 Li의 양을 추정하기 위해 ICP-OES 분석을 수행하였으며, 결과를 Table 1에 요약하였다. Table 1에서 볼 수 있듯이 Li-doped  $\beta$ -TCP의 Ca/P 비율은 주로 Li 이온의 양을 증가시킴으로써 감소된다. 치환 과정에서 두 개의 리튬 이온이 하나의 Ca 이온을 대체함으로써 일어나는 결과로 보인다. 특히, 0.30Li-TCP 및 0.45Li-TCP에 대한 리튬 이온 함량은 각각 9.52 mol% 및 13.95 mol%였다. 이 값은 일반적으로 1가 이온의 치환 한계로 알려진 9.09 mol%보다 높다. 이러한 결과는 Li-doped  $\beta$ -TCP에 대한 구조 분석을 통하여 알아

볼 수 있다.

Figure 2는  $\beta$ -TCP 및 Li-doped  $\beta$ -TCP의 격자 파라미터와 셀 부피의 변화를 각각 나타낸다. Figure 2(a)에서 볼 수 있듯이 0.15Li-TCP에 해당하는 격자 파라미터 및 셀 부피 값은 pure TCP보다 낮다. 이러한 이유는 리튬 이온이  $\beta$ -TCP 상에 통합되는 동안 Ca 이온이 리튬 이온으로 대체되기 때문에 발생하는 격자 수축으로 설명할 수 있다. 그러나, Fig. 2(b)에서 Li-doped  $\beta$ -TCP의 격자 파라미터 및 셀 부피는 Li 이온이 상기 일반 한계인 9.09 mol%의 함량에 첨가될 때 Li 이온의 양이 증가함에 따라 반비례하여 증가하였다. 이러한 현상은 Li 이온이 일반적인 한계인 9.09 mol% 이하의 함량을 첨가할 때 Ca(4) 자리만 Li 이온이 교체하는 대신, Ca(1) 부위와 Ca(4) 부위에서 동시에 치환될 수 있다고 설명할 수

Table 1  
ICP results for pure  $\beta$ -TCP and Li-doped  $\beta$ -TCP after dissolved in nitric acid

|                    | Pure TCP | 0.15Li-TCP | 0.30Li-TCP | 0.45Li-TCP |
|--------------------|----------|------------|------------|------------|
| Ca/P (Theoretical) | 1.5      | 1.4625     | 1.425      | 1.3875     |
| Ca/P (ICP-OES)     | 1.545    | 1.4879     | 1.4569     | 1.4352     |
| Lithium (ppm)      | 0        | 14.358     | 24.874     | 42.308     |

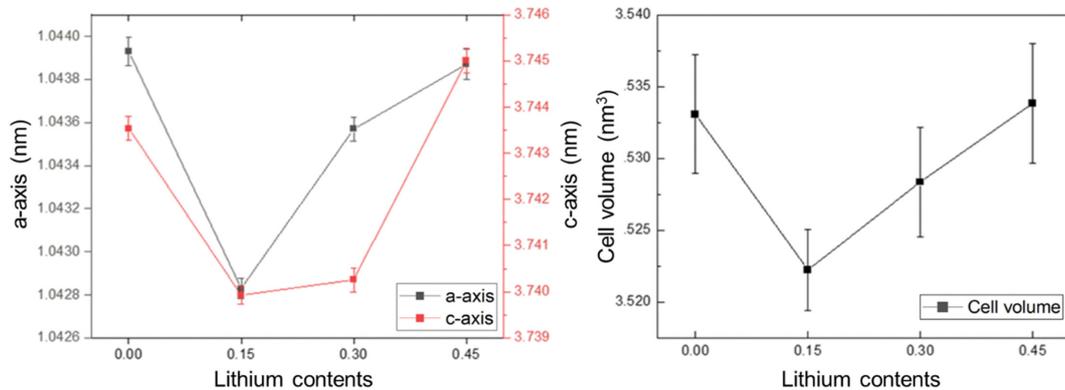


Fig. 2. Lattice parameter change (a) and cell volume of  $\beta$ -tricalcium phosphate containing different amounts of lithium ions resulted in Rietveld refinement (b).

Table 2  
Occupancy of calcium sites in TCP structure

|             | Elements  | Pure TCP'  | 0.15Li-TCP | 0.30Li-TCP | 0.45Li-TCP |
|-------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Ca (1) site | Ca        | 1.00       | 1.00       | 0.92       | 0.89       |
|             | Li        | 0.00       | 0.00       | 0.08       | 0.11       |
| Ca (4) site | Ca        | 0.43       | 0.49       | 0.46       | 0.37       |
|             | Li        | 0.00       | 0.25       | 0.54       | 0.63       |
|             | Pure TCP' | 0.15Li-TCP | 0.30Li-TCP | 0.45Li-TCP |            |
| $R_p$       | 7.69      | 7.72       | 8.09       | 8.98       |            |
| $R_{wp}$    | 11.2      | 11.3       | 11.7       | 13.6       |            |
| $R_{exp}$   | 4.47      | 4.52       | 4.72       | 5.06       |            |
| $R_{bragg}$ | 3.31      | 3.35       | 3.43       | 5.19       |            |
| $R_f$       | 2.43      | 2.47       | 2.48       | 3.56       |            |

있다. 다음 섹션에서 Rietveld refinement을 통한 결과와 함께 자세히 논의될 것이다. 셀 부피 측면에서는 β-TCP에 리튬 이온을 첨가하여 4,87 mol%의 양이 될 때까지 감소한 다음 Table 2(b)와 같이 일반적인 한계인 9.09 mol%보다 훨씬 더 많은 리튬 이온을 첨가하여 증가시킨 격자 매개 변수와 같은 것으로 나타났다.

일반적으로 β-TCP는 치환 금속 이온의 종류에 따라 다른 치환 자리를 제공할 수 있다. 치환과정에서 자리 점유를 이해하기 위해 Rietveld refinement을 수행하였다. ICSD 97500에서 모델링된 합성 분말의 자리 점유 Rietveld refinement 분석은 β-TCP 구조에서 Ca 및 Li 자리 점유를 보여주었다(Table 2). Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이, Li 이온은 0.15 Li-TCP까지 Ca(4) 자리에 점유되고 있다. 칼슘 및 나트륨과 같은 1가 이온의 경우, 이전에 보고된 것과 일치한다[21,24]. 그러나, 본 실험의 결과는 Li 이온의 양이 일반적인 한계인 9.09 mol% 이상으로 첨가될 때 Ca(4) 부위와 Ca(1) 자리에서 동시에 치환될 수 있음을 보여주었다. 결과적으로, Li 이온은 점유 위치를 Ca(4)에서 Ca(1)로 변경함으로써 일반적인 한계인 9.09 mol% 이상으로 Ca 이온을 치환할 수 있음을 확인할 수 있다. 따라서, β-TCP에 리튬 이온이 치환되는 과정에서 리튬 이온의 비율은 다음과 같이 두 영역을 나누어 설명할 수 있다. i) 9.09 mol% 미만; ii) 9.09 mol% 이상으로; 첫째, 리튬 이온이 β-TCP에 첨가될 때 일반적인 한계치인 9.09 mol%보다 작으면, 리튬 이온은 Ca(4) 자리로 치환될 것이다. Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이, pure β-TCP 경우, 칼슘 이온은 Ca(4) 부위에서 최대 0.43까지 점유하고, 가장 적은 부분은 0.57의 공공이다. 리튬 이온을 Ca 이온으로 치환하는 동안 두 개의 리튬 이온이 다음과 같이 하나의 Ca(4)와 하나의 공공 부위를 생성한다[21].



이 과정에서 Li-doped β-TCP의 격자 파라미터는 Ca<sup>2+</sup> 이온(이온 반경~0.99Å)을 Li<sup>+</sup> 이온(이온 반경~0.76Å)으로 대체하여 감소되었다. 이는 β-TCP 상의 주 피크가 리튬 이온을 추가하면서 오른쪽으로 이동한 XRD의 결과와 일치하며, 이는 격자 수축 및 더 높은 2θ 각도로 β-TCP 반사각의 변위를 암시한다. 둘째, β-TCP에서 Li 이온이 9.09 mol% 이상 첨가되면 Table 2와 같이 Ca(1) 자리와 Ca(4) 자리에서 Li 이온을 동시에 치환할 수 있다. Ca(1) 자리의 경우, 자리의 점유는 1.00으로 Ca(4) 자리의 점유 0.43에 비해 매우 높다. 따라서 Li 이온을 Ca 이온으로 치환하는 동안 두 개의 Li 이온이 다음과 같이 Ca(1) 위치에 위치한 하나의 Ca 이온으로 교체된다.



이 경우 이전의 경우와 달리 Li 이온이 공공 부위로 들어가지 않아 1.18Å의 Ca 이온 1개에 두 개의 Li 이온(이온 반경~0.76Å)이 삽입된다. 따라서, 격자 파라미터는 Fig. 2(a)와 같이 증가될 것이다.

### 3.2. Li-β-TCP의 분해 거동

1일, 3일, 7일 동안 배양 배지에 담근 후 추출물에 대한 ICP-OES 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Figure 3에서 볼 수 있듯이 칼슘 이온은 pure β-TCP 및 Li-doped β-TCP에서 단 1일 침지 후 빠르게 방출되었다. 그러나 방출된 칼슘 이온의 양은 pure β-TCP와 Li-doped β-TCP 간에 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 이온의 방출이 짧은 시간 침지를 위해 매트릭스 물질에 크게 의존한다는 것을 시사한다. 그러나 Li-doped β-TCP에서 방출된 칼슘 이온은 3일 동안 침지한 후 pure β-TCP에서 방출된 칼슘 이온보다 약 2배 높았다. 이러한 현상은 Li-doped β-TCP이 칼슘 이온을 리튬 이온으로 대체하기 때문에 β-TCP 상에 비해 불안정하다고 예기할 수 있다.

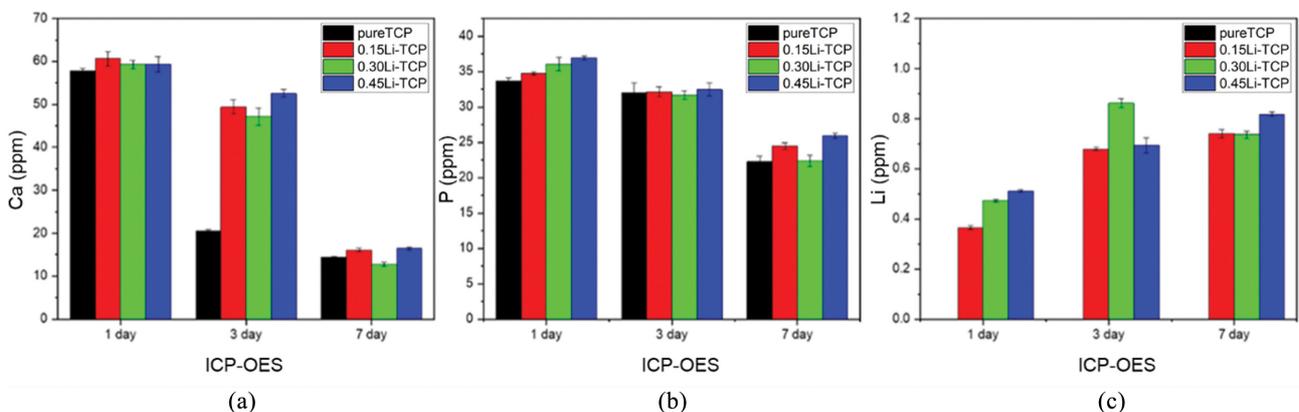


Fig. 3. The concentration of (a) calcium, (b) phosphorus, and (c) lithium ion for pure TCP and Li-doped β-TCP after immersion in the culture medium during 1, 3, and 7 days.

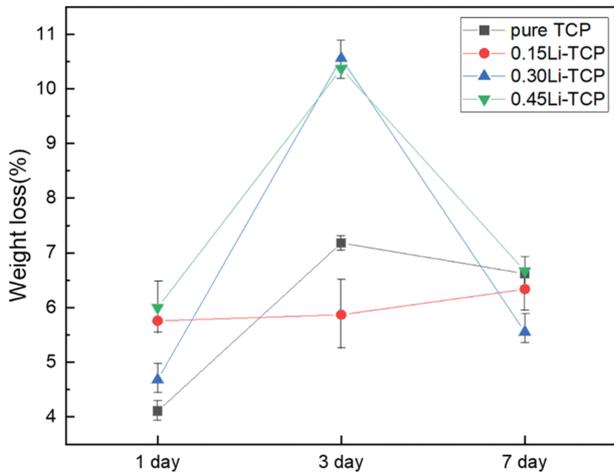


Fig. 4. The variation of weight loss for pure TCP and Li-doped β-TCP after 1, 3, and 7 days of culture.

7일 동안 담근 후 모든 샘플은 리튬 이온의 양에 관계없이 유사한 양의 방출된 칼슘 이온을 가졌다. 그것은 침수 도중 표본의 표면에 놓인 칼슘 이온의 재흡수로 이해할 수 있다. P 이온의 경우, Li-doped β-TCP에서 방출된 P 이온은 칼슘 이온의 방출 결과와 비교하여 1일과 3일 사이에 큰 변화가 없었다. 이것은 P 이온의 위치가 Li 이온을 Ca 이온으로 치환하는 동안 영향을 받지 않았기에 기인한다. 5일 동안 담근 후, 방출된 이온의 감소는 침지 중 Ca 이온의 거동과 동일하게 방출된 P 이온이 분말 표면에 재흡수되기 때문이다. 예상대로 Li-doped β-TCP에서 치환 량 만큼 Li 이온이 원활하게 방출되었다. 방출된 Li 이온의 양은 침지 시간이 증가함에 따라 증가하였다. 흥미롭게도 3 일째에 0.30 Li-TCP에서 방출된 Li 이온은 다른 Li-TCP의 리튬 이온보다 매우 높았다. 이것은 침수 후 얻은 중량 감소와 관련이 있을 수 있다.

Figure 4는 pure β-TCP 및 Li-doped β-TCP의 중량 감소를 보여준다. β-TCP를 배양 매체에 담근 후, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 0.15 Li-TCP의 중량 감소는 침수 시간에 관계없이 거의 일정했다. 이 현상은 다음과 같이 설명할 수 있다. β-TCP는 이전 보고서에서 언급한 바와 같이 치환된 Li 이온이 Ca(4) 부위와 공공 부위에 치환되었기 때문에 Li 이온의 치환으로 더 안정적일 것이다 [21]. 리튬 도핑의 점에서 β-TCP는 일반적인 한계치인 9.09 mol%를 초과한 경우 이러한 중량 감소는 다른 것보다 매우 컸다. 이 이유는 리튬 이온이 너무 많이 치환되어 결정이 불안정성 되었기 때문이다.

3.3. 세포 테스트

β-TCP의 Li 이온이 세포 증식 및 분화에 미치는 영향

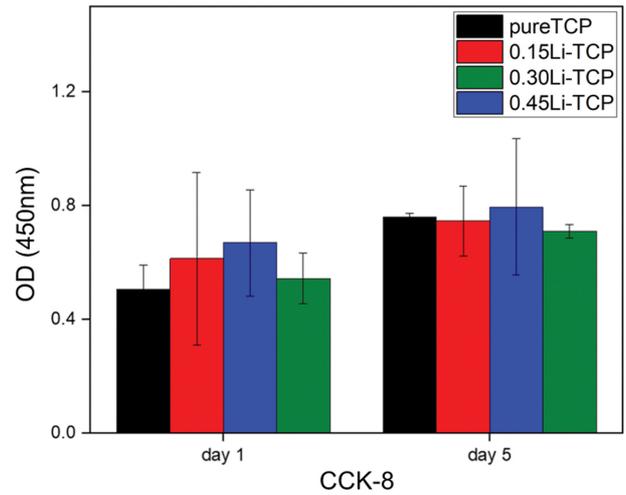


Fig. 5. The optical cell density on pure TCP and Li-doped β-TCP after 1 and 5 days of culture.

을 조사하기 위해 먼저 β-TCP의 Li 이온이 있는 세포 배양 배지에서 Li 이온이 검출되었음을 확인하였다. 앞서 Fig. 3에서 나타난 바와 같이, 세포 배양 배지 내의 Li 이온 농도는 Li-doped β-TCP 에서의 Li 농도와 상관 관계가 있었다. Li-doped β-TCP에서 Li 농도가 높을수록 매체에서 리튬 이온의 농도가 높아졌다. 다음으로, Li-doped β-TCP의 세포 독성 유무를 Fig. 5와 같이 hDPSCs를 사용하여 CCK-8 분석으로 평가하였다. Li-doped β-TCP 중 어느 것도 hDPSCs에 대한 독성을 나타내지 않았으며, 이는 hDPSCs에 세포 독성 효과가 없는 pure β-TCP와 같았다. 1일에서 β-TCP 상에서의 세포 증식 및 분화는 Li의 양에 관계없이 Li-doped β-TCP 보다 약간 낮았다. 이는 Li 이온이 hDPSC의 세포 증식 및 분화를 자극할 수 있음을 의미한다. 그러나 5일 후 모든 샘플의 흡광도는 서로 크게 다르지 않았다. 이는 세포가 5일 동안 배양 배지에서 이미 증식하고 분화된 것으로 판단된다.

세포 분화를 조사하기 위해 pure β-TCP 및 Li-doped β-TCP의 추출물을 사용한 ALP 활성을 각각 7일 및 14

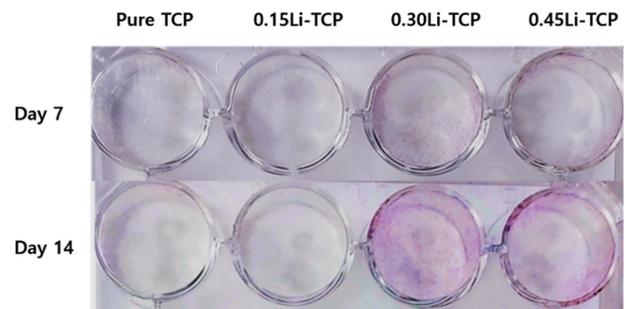


Fig. 6. Relative osteoblast differentiation according to ALP activity with hDPSCs on pure TCP and Li-doped β-TCP after 7 and 14 days of culture.

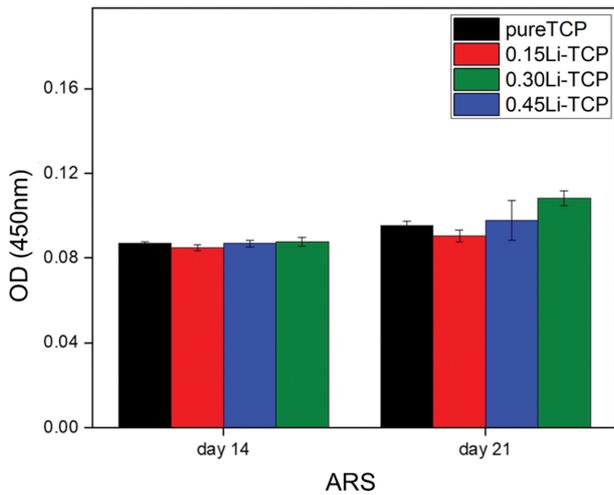


Fig. 7. Expected distribution of bone explained by ARS activity with hDPSCs after culturing in extracts from pure TCP and Li-doped  $\beta$ -TCP.

일 동안 24-well plate에서 수행하였다. 7일 후, pure  $\beta$ -TCP와 0.15 Li-TCP에 대한 ALP 활성은 Fig. 6과 같이 서로 유사하였다. 그러나 0.30 Li-TCP 및 0.45 Li-TCP의 경우 7일 후 적색 염색 흔적을 관찰되어 세포 분화가 시작된 것으로 보인다. 배양 시간이 7일에서 14일로 늘어남에 따라 세포 배양 플레이트의 모든 영역에 붉은 염색 흔적이 퍼졌다. 결국, pure  $\beta$ -TCP에 비해 Li-doped  $\beta$ -TCP는 ALP 활성이 훨씬 더 높았으며, 이는 Li가 세포 분화에 강력한 영향을 미친다는 것을 시사한다.

골전도도 평가에서 pure  $\beta$ -TCP 및 Li-doped  $\beta$ -TCP의 추출물을 사용한 hDPSCs의 Alizarin Red staining (ARS)은 Fig. 7과 같이 각각 14일 및 21일 동안 24-well plate에서 수행되었다. Figure 7에서 볼 수 있듯이 14일 후 ARS는 모든 그룹에서 유사하게 나타났다. 그러나 배양 기간이 21일로 증가함에 따라 Li-doped  $\beta$ -TCP는 pure  $\beta$ -TCP에 비해 골형성 세포 분화(Alizarin Red staining 영역은 hDPSC의 골형성 세포 분화)를 향상하였다.

#### 4. 결 론

본 연구의 목적은 Li-doped  $\beta$ -TCP의 구조 및 골형성 능력에 미치는 영향을 조사하는 것이다.  $\beta$ -TCP에 Li 이온이 첨가되었을 때,  $\beta$ -TCP의 격자 파라미터와 셀 부피는 Li 첨가량에 따라 변화하였다.  $\beta$ -TCP에 첨가된 Li 이온의 양이 일반적인 한계인 9.09 mol%보다 작을 경우, 2개의 Li 이온이 1개의 Ca(4) site와 1개의 vacancy site에 치환되었다. 따라서, Li-doped  $\beta$ -TCP의 격자 파라미터와 셀 부피가 감소하였다. 그러나,  $\beta$ -TCP에서 리

튬 이온이 9.09 mol% 이상 첨가되면, Ca(1) 부위와 Ca(4) 부위에서 두 개의 Li 이온을 동시에 치환할 수 있었다. 이전의 경우와 달리 Li 이온이 공공 자리로 들어가지 않기 때문에 1.18Å의 Ca 이온 1개에 2개의 Li 이온(이온 반경~0.76Å)이 치환된다. 따라서, Li-doped  $\beta$ -TCP의 격자 파라미터와 셀 부피는 Li 이온의 양이 증가함에 따라 증가하였다. 침지 시간에 따른 이온의 방출 시점에서, 방출된 Ca 이온의 양은 pure  $\beta$ -TCP와 Li-doped  $\beta$ -TCP간에 큰 차이가 없었다. 그러나 Li-doped  $\beta$ -TCP에서 방출된 Ca 이온은 3일 동안 담근 후 pure  $\beta$ -TCP에서 방출된 Ca 이온보다 약 2배 높았다. 흥미롭게도 3일 후 0.30 Li-TCP에서 방출된 Li 이온은 다른 Li-TCP의 Li 이온보다 매우 높았다. ALP 활성과 ARS 테스트를 통해 Li-doped  $\beta$ -TCP의 세포 증식 및 분화는 Li 이온의 양에 관계없이 pure  $\beta$ -TCP보다 약간 높았다. 이는 Li 이온이 hDPSC의 세포 증식 및 분화를 자극할 수 있음을 의미한다. 또한, Li-doped  $\beta$ -TCP를 사용한 hDPSCs는 pure  $\beta$ -TCP를 사용한 hDPSCs에 비해 골형성이 촉진됨을 보여주었다.

#### 감사의 글

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었습니다.

#### References

- [1] I.A. Urban and A. Monje, "Guided bone regeneration in alveolar bone reconstruction", *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics* 31 (2019) 331.
- [2] C.H. Hämmeler and T. Karring, "Guided bone regeneration at oral implant sites", *Periodontol.* 2000, 17 (1998) 151.
- [3] A.W. James, G. LaChaud, J. Shen, G. Asatrian, V. Nguyen, X. Zhang, K. Ting and C. Soo, "A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2", *Tissue Eng. Part B Rev.* 22 (2016) 284.
- [4] Y. Kang, S. Kim, J. Bishop, A. Khademhosseini and Y. Yang, "The osteogenic differentiation of human bone marrow MSCs on HUVEC-derived ECM and  $\beta$ -TCP scaffold", *Biomaterials* 33 (2012) 6998.
- [5] C. Li, C. Jiang, Y. Deng, T. Li, N. Li, M. Peng and J. Wang, "RhBMP-2 loaded 3D-printed mesoporous silica/calcium phosphate cement porous scaffolds with enhanced vascularization and osteogenesis properties", *Scientific Reports* 7 (2017) 41331.
- [6] A. Ogose, N. Kondo, H. Umezumi, T. Hotta, H. Kawashima, K. Tokunaga, T. Ito, N. Kudo, M. Hoshino, W. Gu and N. Endo, "Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion®) in human bones", *Biomaterials* 27 (2006) 1542.

- [ 7 ] P. Asvanund and P. Chunhabundit, "Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion®) in human bones", *Biomaterials* 27 (2006) 1542.
- [ 8 ] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah and K.W.H. Lo, "The roles of ions on bone regeneration", *Drug Discov. Today* 23 (2018) 879.
- [ 9 ] K.-H. Yoo, H. Kim, W.G. Sun, Y.-I. Kim and S.-Y. Yoon, "Fe-doped tricalcium phosphates: Crystal structure and degradation behavior", *Mater. Res. Express* 7 (2020) 125403.
- [10] D. Drdlik, M. Slama, H. Hadraba, K. Drdlikova and J. Cihlar, "Physical, mechanical, and biological properties of electrophoretically deposited lithium-doped calcium phosphates", *Ceram. Int.* 44 (2018) 2884.
- [11] M. Gallo, B. Le Gars Santoni, T. Douillard, F. Zhang, L. Gremillard, S. Dolder, W. Hofstetter, S. Meille, M. Bohner, J. Chevalier and S. Tadier, "Effect of grain orientation and magnesium doping on  $\beta$ -tricalcium phosphate resorption behavior", *Acta. Biomater.* 89 (2019) 391.
- [12] J. De Boer, R. Siddappa, C. Gaspar, A. Van Apeldoorn, R. Fodde and C. Van Blitterswijk, "Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells", *Bone* 34 (2004) 818.
- [13] T.B. Huang, Y.Z. Li, K. Yu, Z. Yu, Y. Wang, Z.W. Jiang, H.M. Wang and G.L. Yang, "Effect of the Wnt signal-RANKL/OPG axis on the enhanced osteogenic integration of a lithium incorporated surface", *Biomater. Sci.* 7 (2019) 1101.
- [14] P.S. Klein and D.A. Melton, "A molecular mechanism for the effect of lithium on development", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996) 8455.
- [15] W.J. Ryves, R. Dajani, L. Pearl and A.J. Harwood, "Glycogen synthase kinase-3 inhibition by lithium and beryllium suggests the presence of two magnesium binding sites", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 967.
- [16] M. Arioka, F. Takahashi-Yanaga, M. Sasaki, T. Yoshihara, S. Morimoto, M. Hirata, Y. Mori and T. Sasaguri, "Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteo-blastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis", *Biochem. Pharmacol.* 90 (2014) 397.
- [17] P. Leucht, S. Lee and N. Yim, "Wnt signaling and bone regeneration: Can't have one without the other", *Biomaterials* 196 (2019) 46.
- [18] P. Han, M. Xu, J. Chang, N. Chakravorty, C. Wu and Y. Xiao, "Lithium release from  $\beta$ -tricalcium phosphate inducing cementogenic and osteogenic differentiation of both hPDLs and hBMSCs", *Biomater. Sci.* 2 (2014) 1230.
- [19] G. Morad, L. Kheiri and A. Khojasteh, "Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature", *Archives of Oral Biology* 58 (2013) 1818.
- [20] S. Shi, P. Robey and S. Gronthos, "Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis", *Bone* 29 (2001) 532.
- [21] K. Yoshida, H. Hyuga, N. Kondo, H. Kita, M. Sasaki, M. Mitamura, K. Hashimoto and Y. Toda, "Substitution model of monovalent (Li, Na, and K), divalent (Mg), and trivalent (Al) metal ions for  $\beta$ -tricalcium phosphate", *J. Am. Ceram. Soc.* 89 (2006) 688.
- [22] N. Matsumoto, K. Yoshida, K. Hashimoto and Y. Toda, "Dissolution mechanisms of  $\beta$ -tricalcium phosphate doped with monovalent metal ions", *J. Ceram. Soc. Jpn.* 118 (2010) 451.
- [23] F.A. Shah, D.S. Brauer, R.M. Wilson, R.G. Hill and K.A. Hing, "Influence of cell culture medium composition on in vitro dissolution behavior of a fluoride-containing bioactive glass", *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 647.
- [24] M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama and A. Hoshikawa, "Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction", *J. Solid State Chem.* 175 (2003) 272.