

2013년 8월

碩士學位論文

티타늄 표면에 제 2형 골 형성단백질  
고정화에 관한 연구

조선대학교 대학원

치의학과

박종환

# 티타늄 표면에 제 2형 골 형성단백질 고정화에 관한 연구

Study on immobilization of bone morphogenic protein-2  
on the titanium surface

2013年 8月 24日

조선대학교 대학원

치의학과

박종환

# 티타늄 표면에 제 2형 골 형성단백질 고정화에 관한 연구

지도교수    고    영    무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2013年 4月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박    종    환

# 박종환의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교수    김    병    훈    印

위    원    조선대학교    교수    강    성    남    印

위    원    조선대학교    교수    고    영    무    印

2013年    5月

조선대학교 대학원

## 목 차

ABSTRACT .....	iv
제 1장 서론 .....	1
제 2장 실험재료 및 방법 .....	3
제 1절 티타늄 시편 준비 .....	3
제 2절 플라즈마 표면처리 .....	4
제 3절 BMP-2 고정화 .....	6
제 4절 MC3T3-E1 세포배양 .....	7
제 5절 MC3T3-E1 세포분화 평가 .....	8
제 6절 세포형상 관찰 .....	9
제 7절 표면분석 .....	10
제 8절 통계학적 분석 .....	11
제 3장 실험결과 및 고찰 .....	12
제 1절 표면분석 .....	12
제 2절 조골모세포 증식 및 분화 .....	21
제 4장 고찰 .....	25
제 5장 결론 .....	27
참 고 문 헌 .....	28

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Schematic diagram of plasma equipment .....	5
Fig. 2. Density of carboxyl group of plasma polymerized acrylic acid thin films with respect to input power. ....	13
Fig. 3. SEM micrographs of cross section of plasma thin film deposited on silicon wafer at (a) 40 W, (b) 60 W, (c) 80 W, (d) 100 W.....	14
Fig. 4. Water contact angles of Ti and COOH/Ti substrates produced at different input powers. ....	16
Fig. 5. FE-SEM micrographs of different Ti substrate deposited plasma polymerized acrylic acid thin film at (a) Ti (b) 40 W, (c) 60 W, (d) 80 W, (e) 100 W. ....	17
Fig. 6. FE-SEM micrographs of COOH (60W)/Ti substrate after BMP-2 immobilization. ....	17
Fig. 7. ATR-FTIR spectra of (a) glass, (b) PPAAc deposited on glass at 60 W, and (c) BMP-2 immobilized glass substrate. ....	19
Fig. 8. XPS survey scan of (a) Ti, (b) COOH(60W)/Ti, and (c) BMP-2/COOH(60W)/Ti substrate. ....	20
Fig. 9. SEM images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) titanium, (b) COOH(60W)/Ti, and (c-e) BMP-2 immobilized surface for 3 hours.....	22
Fig. 10. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) titanium, (b) COOH(60W)/Ti, (c) and (d) BMP-2 immobilized surface for 24 hours. ....	23

Fig. 11. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded different PCL surface for 4 and 7 days. \* $p < 0.05$ ; significant against the differentiation of MC3T3-E1 cells on pristine Ti, COOH/Ti and BMP-2/COOH/Ti at corresponding days. .... 24

# ABSTRACT

## Study on immobilization of bone morphogenic protein-2 on the titanium surface

Jong-Hwan Park, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Yeong-Mu Ko, D.D.S.,Ph.D.

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

In this study, immobilization of bone morphogenic protein-2 (BMP-2) on titanium (Ti) surface using a plasma surface modification was investigated. To introduce proper functional groups on the Ti surface, Ti surface was treated under different plasma discharge powers via acrylic acid plasma polymerization, and then incubated in BMP-2 solution of de-ionized water. Plasma polymerization was carried out at a discharge powers of 40, 60, 80, and 100 W, 60 mTorr for 3 min. The chemical composition and morphology of acrylic acid plasma polymerized (PPAAc) Ti surfaces were characterized by water contact angles, scanning electron microscopy, Fourier Transfer Infrared, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The proliferation and differentiation of MC3T3-E1 preosteoblast cell cultured on the BMP-2 immobilized PPAAc Ti surface in vitro were evaluated by fluorescene microscope and alkaline phosphatase activity, respectively.

The current findings, the following results were drawn.

- 1) The acrylic acid thin film deposited under the discharge powers of 60 W showed the well polymerized polymeric thin film.
- 2) The PPAAc Ti surfaces showed the hydrophilic surface property.
- 3) The immobilization of BMP-2 on PPAAc Ti surface was identified as



nitrogen element (N1s) in BMP-2 molecular structure via XPS analysis.

- 4) The in vitro cell test showed that BMP-2 immobilized Ti surfaces had a beneficial effect on MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation .

From this point of view, the BMP-2 immobilized Ti surfaces are expected to be useful for the fabrication of titanium-based implants for enhanced hard tissue integration.

# 제 1 장 서 론

치과용 임플란트 연구의 역사는 근현대적 연구만으로도 200 여년간량 되며, 원시적 접근까지 포함하게 되면 1000 여 년에 이르는 매우 긴 역사를 갖고 있다. 어느 생체재료 연구와 마찬가지로 최근 치과용 임플란트의 연구는 기능적 요구 만족, 부작용 개선, 기계적 성능 개선, 정상 기능 기간 단축 등을 위한 연구/개발의 과정을 거치고 있다. 20세기 중·후반의 티타늄의 표면 처리에 대한 골유착과 안정성이 증진된 유리한 임플란트 표면을 개발하여 임상적인 성공률을 높이려는 노력이 계속되고 있다. 예를 들면, 임플란트 표면의 거칠기 증가<sup>1,2)</sup>, 코팅<sup>3-5)</sup>, 또는 화학적 처리<sup>6-8)</sup> 등을 통하여 치근형 임플란트의 골 유착 안정성을 증가시키며 미세 형태학을 포함하는 임플란트 표면 형태가 임플란트의 골 유착에 상당한 영향을 준다<sup>7,8)</sup>.

치과 및 정형외과에 많이 쓰이는 생체적합성이 뛰어난 티타늄은 우수한 기계적 성질(높은 강도, 낮은 밀도, 높은 내부식성 등)을 갖고 있다.

골 유착의 증진, 골 증대 등을 목적으로 골 형성 단백질(Bone Morphogenic Protein; BMP)과 같은 생물학적인 활성 인자들을 임플란트 표면에 접목시키려는 시도가 이루어지고 있다. BMP란 뼈 형성에 직접적으로 관여하는 단백질로서 형질전환증식인자  $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ; TGF- $\beta$ ) 슈퍼패밀리에 속한다. 골 형성의 형식에는 연골성 골형성, 결합조직성 골형성, 전조식 골형성의 3가지가 있다. 골격조직을 재생하기 위한 골 유도과정에 필수적인 요소들을 조절하여 MC3T3-E1 세포로부터 골아세포의 증식을 촉진하고 골기질의 생합성을 도움으로써 골 형성을 증진시키는 역할을 한다<sup>9,10)</sup>.

표면 처리 방법에는 티타늄 플라즈마 분사(titanium plasma spray, TPS) 또는 산부식(acid treatment), 샌드블라스트(sandblast)법과 같이, 임플란트 표면적을 증가시키는 방법이 있다<sup>11,12)</sup>.

플라즈마를 이용한 표면개질기술은 세포의 분화 및 부착을 증진시키기 위해 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술법으로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다<sup>13,14)</sup>. 특히 플라즈마 중합기술로 증착된 반응기(카르복실기, 아민기, 하이드록실기, 술폰기 등)는 재료표면에 존재하면서 생체

활성물질과 생체단백질의 공유결합 및 정전기적 결합에 의한 고정화에 매우 유용한 기술로 알려져 있다<sup>15, 16)</sup>.

본 연구에서는 산소 플라즈마 전처리와 폴리 아크릴산(Poly Acrylic acid: PAAc) 플라즈마 중합반응을 이용하여 티타늄표면의 친수성과 생체적합성을 향상시키고, 플라즈마 표면 개질된 티타늄표면에 BMP-2를 고정화시켜 표면의 물리화학적 특성과 조골모세포 MC3T3-E1 세포를 이용한 세포분화 특성을 평가하고자 하였다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절 티타늄 시편 준비

본 실험에서는 상업적으로 사용되는 순수 티타늄을 직경 20 mm, 두께 0.5mm (CP-Ti NSC, Japan)로 가공하여 시료로 사용하였으며, 티타늄의 연마는 습식 연마로써 #60, #80, #600, #800, #1200 grit SiC 연마지로 단계적으로 기계적 연마 처리하였다.

연마한 시료는 아세톤과 에탄올을 1:1 (v:v) 비율로 혼합한 용액에서 1시간 동안 초음파 세척을 한 후 3차 증류수로 세정하여 건조 후 사용하였다.

## 제 2 절 플라즈마 표면처리

플라즈마 중합반응 시 모노머는 아크릴산 (Acrylic acid; 99.5%, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였고, 플라즈마 반응장치의 구성도는 Fig. 1에 나타내었다. 플라즈마 중합에 RF(radio frequency) 13.56 MHz의 축전 결합형 플라즈마(Capacitively Coupled Plasma; CCP)타입의 장비(PLASMART Inc. Korea)를 사용하였다. 325 mm 직경과 175 mm 높이의 진공 챔버는 로타리 펌프로 최대  $10^{-3}$  Torr 진공도를 유지하였다. 시료대는 상부 전극으로부터 30 mm 떨어진 곳에 위치한다.

플라즈마 표면개질 처리 전, 티타늄표면의 유기물제거와 표면의 활성화를 부여하기 위하여 전처리를 실시하였다. 전처리 과정은 산소( $O_2$ )가스를 20 sccm 유속으로 챔버 내의 반응 압력을 100 mTorr로 유지한 후, 플라즈마 방전세기를 200 W로 1분 동안 수행하였다.

이어서 중합반응은 모노머의 증기압과 챔버 내부 반응압력을 60 mTorr로 유지한 후, 40, 60, 80 그리고 100 W로 3분 동안 반응시켰다. 처리된 샘플은 3차 증류수로 표면을 세정하고, 진공오븐에서  $60^{\circ}C$ 로 24 시간 동안 건조를 실시하였다.

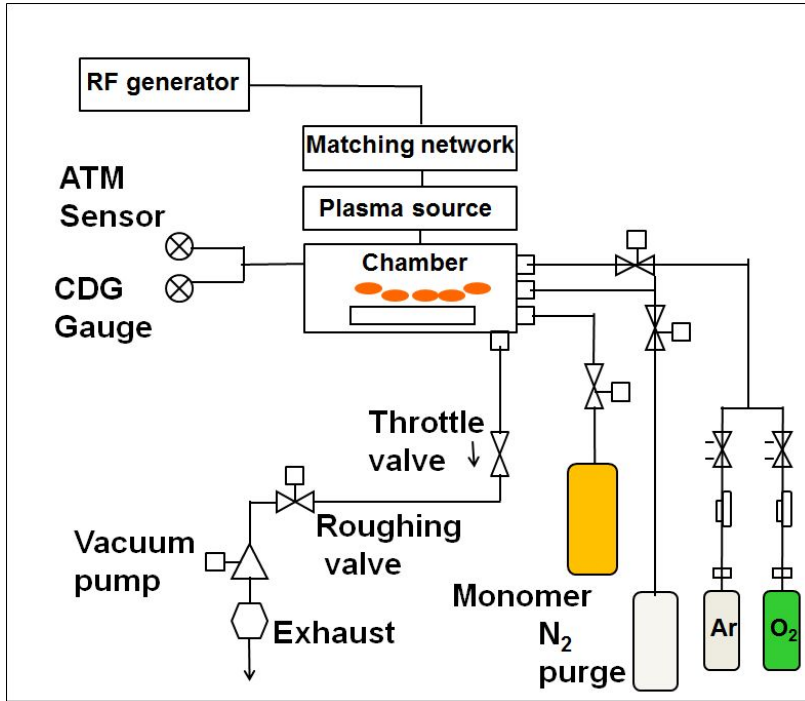


Fig. 1. Schematic diagram for plasma device.

### 제 3 절 BMP-2 고정화

BMP-2 (Cowellmadi, product No. B2025, Korea)를 사용하였다. 백색의 분말로 되어있는 0.25 mg의 BMP-2에 증류수를 0.16 ml 첨가하여 최초 농도를 1.5 mg/ml로 맞추었다. 티타늄 표면에 고정화한 BMP-2의 최종농도는 500 ng/ml, 100 ng/ml로 맞추었으며, 샘플준비는 (a) Ti, (b) COOH(60W)/Ti (c) BMP-2/COOH(60W)/Ti로 하였다. 12 well plate에 티타늄 시편을 넣은 후 500 ng/ml, 100 ng/ml의 BMP-2를 각각 3 ml 씩 첨가하였다. 그 다음 티타늄을 6 시간 동안 실온에서 교반하였다. 교반 후 티타늄 시편을 꺼내서 증류수로 세척을 한 후 건조하였다.

## 4 절 세포배양

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개골에서 유래한 조골모세포 MC3T3-E1을 ATCC에 구입하여 사용하였고, 세포배양은  $\alpha$ -MEM (alpha minimum essential medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog NO. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine sereum (PAA Laboratoris, Inc. A15-751)과 항생제인 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin이 혼합된 세포배양액을 혼합하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C, 100% 습도가 유지되는 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 그리고 3일 마다 80% confluence 할 때 계대 배양 하여 실험에 사용하였다.



## 제 5 절 세포분화 평가

MC3T3-E1 세포 배양 24시간 후 분화배지로 교체하고 2일 마다 분화배지를 교체하였다. 일주일 후 well plate에 cell media를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 세포 lysis buffer를 well당 150  $\mu$ l씩 넣어서 20분 간 wise mix를 이용하여 교반하였다. 스크래퍼를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출하여 microtube에 담근 후 4 $^{\circ}$ C, 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube에 옮겨주고 냉동보관 하였다. 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 상층액이 담긴 microtube를 배양 후 1.2N NaOH 600 $\mu$ l씩 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP (alkaline phosphatase) activity를 계산하였다.

단백질 정량은 1mg/ml bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 표준용액을 제조한 후 측정하고자 하는 단백질을 증류수로 희석하여 20  $\mu$ l로 제조하여 5분간 배양 후 592 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준정량곡선으로부터 단백질의 농도를 결정하였다.

## 제 6 절 세포형상 관찰

### 1. 주사전자현미경에 의한 관찰을 위한 세포 전처리

플라즈마와 BMP-2 고정화 처리한 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 파종하였다. 그리고 3시간이 지나면 2.5%의 Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714)와 Glutaraldehyde(SIGMA ALDRICH G5882)의 혼합용액으로 2시간 전 고정을 하여 주었고 10분 동안 PBS를 이용하여 세척하여 준 후 Osmium tetroxide(SIGMA ALDRICH 201030)를 이용하여 30분 동안 후 고정을 진행하였다. 70%, 90%, 95%, 100% 알코올을 준비하여 건조시켜 주었고 HMDS(Fluka 52619)를 이용하여 샘플위에 남아있는 알코올을 제거하였다.

### 2. 형광현미경에 의한 관찰을 위한 세포전처리

플라즈마와 BMP-2 고정화 처리한 샘플이 담겨진 12 well plate에 배양된 MC3T3-E1 세포를  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 파종하였다. 24시간이 지나면 4% Paraformaldehyde(Electron Microscopy Sciences 15714) 용액을 이용하여 세포를 고정하여 준 후 5분 동안 PBS를 이용하여 세척하였다. 0.1% Triton X-100(바이오 세상 T1020)과 1% BSA(SIGMA A9647) 용액을 이용하여 5분 동안 투과 처리하여 주었고 Rhodamine-phalloidin(Life technologies, R415) 시약을 15분 동안 처리하여 세포를 염색하였다. 3번에 걸쳐 각각 5분 동안 세척하여 준 후 세포 핵 염색을 위한 Fluorescence mounting media(VECTOR H-1200)와 함께 cover glass를 샘플 위에 부착하여 형광현미경으로 관찰하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

## 제 7 절 표면분석

전계방출형 주사전자현미경(FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 아크릴산(Acrylic acid: AA) 플라즈마 표면개질 된 티타늄시편과 아크릴산 표면개질 처리 후 BMP-2를 고정화한 티타늄 표면 시편의 고분자 박막의 두께와 티타늄시편의 표면형상을 관찰하였다.

아크릴산 표면개질 처리 된 티타늄 표면의 카르복실기와 BMP-2의 아민과의 아미드 결합을 확인하기 위하여 전반사 푸리에 변환 적외선 분광기 (Attenuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared spectroscopy, ATR-FTIR spectrum-400, PerkinElmer, England)를 이용하였다.

티타늄시편 표면에 존재하는 원소들의 화학적 결합 구조를 분석하기 위하여 광전자 분광법 (X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)을 이용하였다.

무처리 티타늄 시편 및 아크릴산 플라즈마 표면개질 처리 된 티타늄 표면과 아크릴산 표면개질 처리 후 BMP-2 고정화된 티타늄 시편을 각각 준비하여 60°C에서 24시간 건조한 후 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5  $\mu$ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기 (GSA, Surfactech, Korea)로 5초 후에 접촉각을 측정하였다.

아크릴산이 코팅된 티타늄표면의 카르복실기의 정량분석은 Toluidine Blue 0 (TBO) 정량법을 이용하였다. 0.5 mM 농도의 TBO 용액에 시료를 침지하여 30°C에서 6시간 동안 TBO 염료와 카르복실기를 반응시켰다.

Sodium hydroxide 용액 (PH 9)에서 30초간 50 rpm 으로 세척을 한 후 Acetic acid 50% 수용액에서 12시간 동안 1000 rpm으로 TBO를 탈착 시킨 다음 이수용액을 620 nm의 흡광도로부터 카르복실기를 정량하였다. 이 후 흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200  $\mu$ l씩 분주한 후 ELISA reader(Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 제 8 절 통계학적 분석

모든 실험 데이터는 T-test 분석을 통하여 신뢰도 95% ( $p < 0.05$ ) 내에서 변수의 비교를 통하여 각각의 유의성 차이를 비교하였다.

## 제 3 장 실험결과

### 제 1 절 표면분석

Fig.2는 다양한 입력 파워에서 티타늄 표면에 도입된 단위 면적 당 카르복실기 양을 보여준다. 플라즈마 중합 조건을 최적화하는 두 가지 조건은 TBO 용액 안에서의 고분자 박막의 안정성과 카르복실기 양이다. 플라즈마 중합 조건에 따라 플라즈마 고분자는 TBO 용액에서 탈착 및 분해되는데 플라즈마 중합 시 가교성이 약하면 이런 현상이 발생한다<sup>17,18)</sup>. 입력 파워 40 W에서 위와 같은 현상이 나타났고, 입력 파워 60 W이상부터는 TBO 용액에서 플라즈마 고분자는 박막 형태를 그대로 유지하였다. 또한 카르복실기 양은 입력 파워가 증가함에 따라 줄어드는 특성이 나타났고, 이는 플라즈마 중합 시 아크릴산 모노머의 분쇄가 증가하기 때문이다<sup>19)</sup>. 티타늄 표면에 다량의 카르복실기를 함유한 플라즈마 고분자 박막을 도입하기 위한 최적 조건은 이와 같은 이유로 입력 파워 60 W로 결정하였다. Fig.3은 각 입력 파워에서 실리콘 웨이퍼에 증착된 플라즈마 중합 아크릴산 박막의 두께를 보여준다. 입력 파워가 증가함에 따라 박막의 두께는 증가하였다. 입력 파워의 증가는 플라즈마의 전자 에너지를 증가시켜 이온화율을 증가시킨다. 이로써 플라즈마 고분자가 형성되는 속도가 증가하여 같은 시간 안에 중합물 생성이 증가한다<sup>20)</sup>. 입력 파워에 대한 증착 속도에는 두 가지 영역이 있다: (1) 입력 파워 증가에 따른 증착율의 증가(고분자 형성이 우세)와 (2) 입력 파워 증가에 따른 증착율의 감소 (반대로 ablation이나 degradation의 우세). 입력 파워 100 W까지는 고분자 형성이 우세한 영역으로 판단된다<sup>21,22)</sup>.

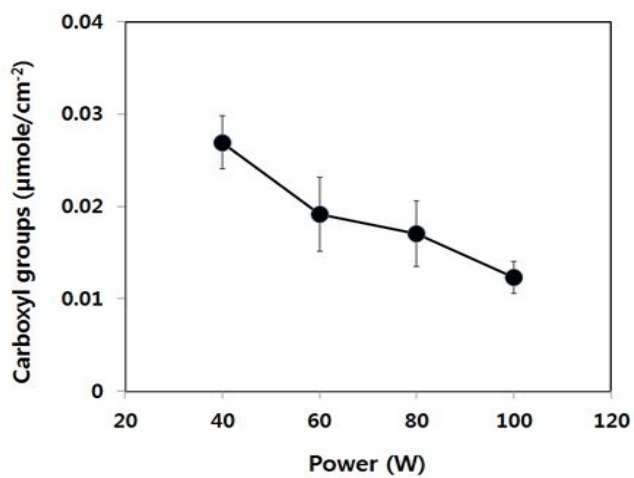


Fig. 2. Density of carboxyl group of plasma polymerized acrylic acid thin films with respect to input power.

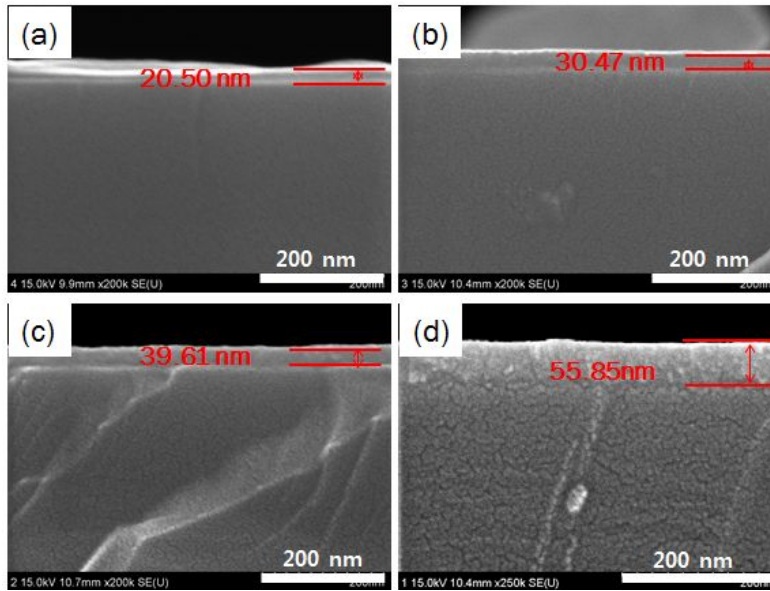


Fig. 3. SEM micrographs of cross section of plasma thin film deposited on silicon wafer at (a) 40 W, (b) 60 W, (c) 80 W, (d) 100 W.

Fig.4는 플라즈마 중합 아크릴산 박막의 접촉각 측정 결과를 나타낸 것이다. 무처리 티타늄의 접촉각은 약  $55^\circ$  로 나타났다. 입력 파워가 증가함에 따라 플라즈마 중합 아크릴산 박막의 접촉각은 증가하는 경향을 보였다. 낮은 입력 파워 40 W는 플라즈마 고분자에 다량의 극성 카르복실기를 도입함으로써 친수성을 부여할 수 있지만 낮은 가교도로 인하여 기재 표면과의 접착력이 약하고, 용매에 의해 용해 및 분해되는 점이 있다. 입력 파워 60 W부터 접촉각이 커지면서 친수성이 감소하는 경향을 보였다. 입력 파워 100 W까지 증가해도 접촉각은 큰 변화가 없고, 친수성을 그대로 유지하였다. 아크릴산 플라즈마 고분자의 카르복실기 양은 줄어들어 극성이 감소할 수 있지만 극성 산소의 존재로 친수성을 부여할 수 있게 된다. 친수성 표면은 소수성 표면에 비하여 생체액, 세포 그리고 조직과의 상호작용이 훨씬 더 바람직하다<sup>23)</sup>.

Fig.5는 주사전자현미경을 이용하여 티타늄의 표면을 관찰한 결과이다. 플라즈마 중합 아크릴산 박막이 증착된 티타늄 표면의 형상은 변화를 관찰되지 않았다. 기계적으로 연마된 티타늄 표면은 거칠고, 일정 방향의 groove가 관찰되었다. 일반적으로 거친 표면은 매끄러운 표면보다 세포 부착, 증식 및 분화에 유리하다고 알려져 있다<sup>24)</sup>. 100, 500 ng/ml 농도의 BMP-2를 플라즈마 중합 아크릴산 박막이 증착된 티타늄에 고정화 한 후 티타늄 표면은 Fig.6에 나타내었다. 6 시간 동안 고정화 시간이 지난 후 건조된 표면의 전자현미경 사진에서도 특이할만한 표면 형상의 변화는 관찰되지 않았다.



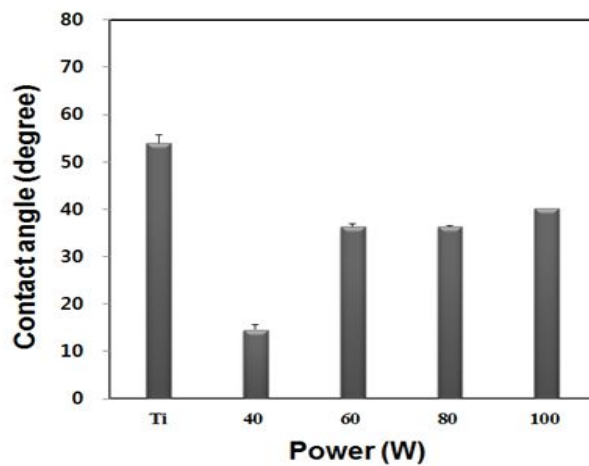


Fig. 4. Water contact angles of Ti and COOH/Ti substrates produced at different input powers.

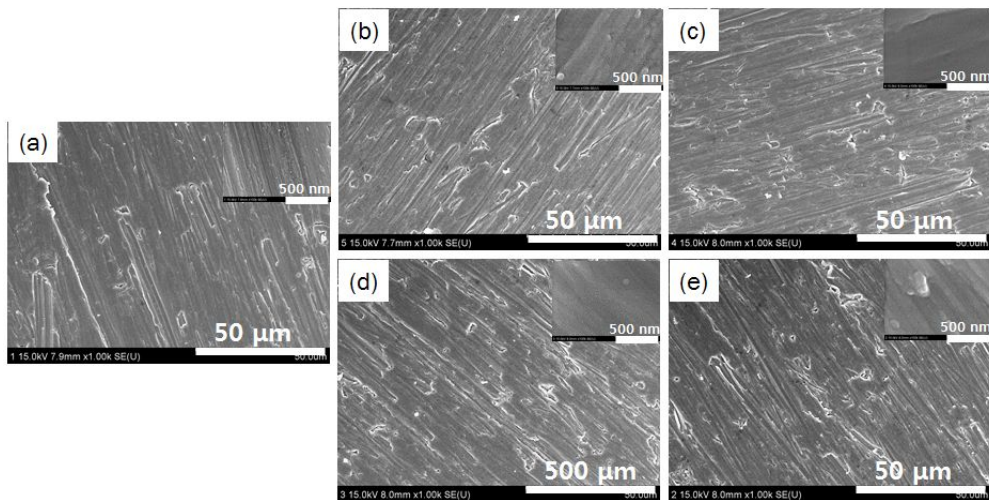


Fig. 5. FE-SEM micrographs of different Ti substrate deposited plasma polymerized acrylic acid thin film at (a) Ti (b) 40 W, (c) 60 W, (d) 80 W, (e) 100 W.

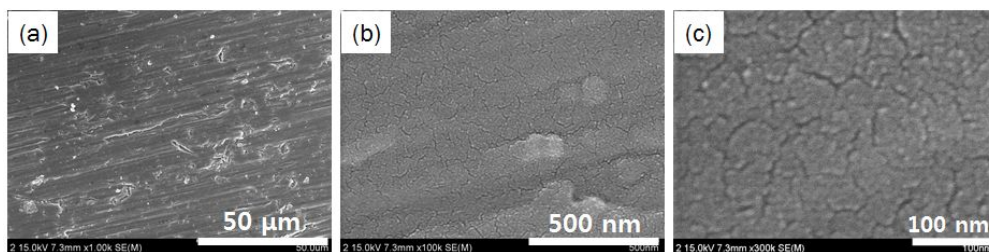


Fig. 6. FE-SEM micrographs of COOH (60W)/Ti substrate after BMP-2 immobilization.

Fig.7은 플라즈마 중합 아크릴산 박막과 이와 함께 BMP-2가 고정화된 표면의 화학적 결합 상태를 확인하기 위한 ATR-FTIR 스펙트럼이다. (a)는 유리 표면의 IR 스펙트럼이고, (b)는 플라즈마 중합된 아크릴산 박막의 IR 스펙트럼이다. 그리고 (c)의 IR 스펙트럼은 플라즈마 중합 아크릴산 박막 표면에 BMP-2를 상대 전하 인력으로 고정화한 후 측정된 것이다. (b)플라즈마 중합 아크릴산의 구조에서  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ 의 C-H stretching,  $1716\text{ cm}^{-1}$ 부근에서 C=O stretching에 의한 특징적인 피크를 확인하였으며 이는 카르복실기의 존재를 확인할 수 있었다. (c)의 스펙트럼에서는 BMP-2의 단백질 구조에 의한 펩타이드 결합으로부터  $1658$ 와  $1579\text{ cm}^{-1}$  아미드 결합(C=O, N-H) 피크를 확인 가능하였다<sup>25)</sup>.

Fig. 8은 플라즈마 중합 아크릴산 박막과 이와 함께 BMP-2가 고정화된 표면의 XPS 원소 분석 결과이다. (a)의 티타늄 표면은 C, O, 그리고 Ti 원소가 있으면, (b)의 플라즈마 중합 아크릴산 박막이 증착된 티타늄 표면은 C와 O 원소만 존재하고, (c)의 BMP-2가 고정화된 티타늄 표면은 C, O, 그리고 N 원소가 존재함을 알 수 있었다. (c) 티타늄 표면의 N 원소는 고정화에 의한 BMP-2의 존재를 의미한다<sup>26)</sup>.

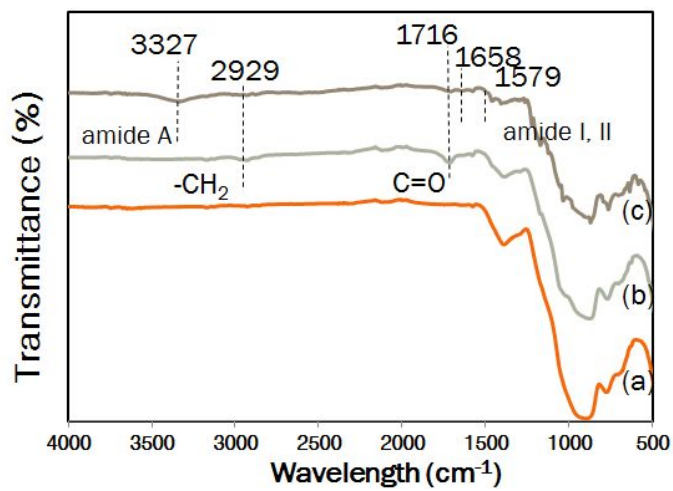


Fig. 7. ATR-FTIR spectra of (a) glass, (b) PPAc deposited on glass at 60 W, and (c) BMP-2 immobilized glass substrate.

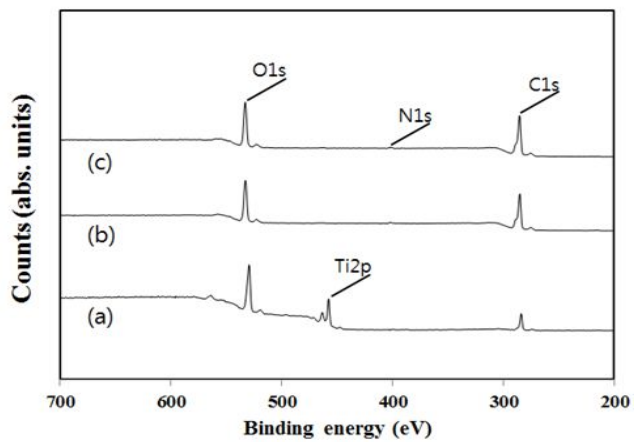


Fig. 8. XPS survey scan of (a) Ti, (b) COOH(60W)/Ti, and (c) BMP-2/COOH(60W)/Ti substrate.

## 제 2 절 조골모 세포(MC3T3-E1) 증식 및 분화

티타늄 표면에 플라즈마 중합된 아크릴산 박막에 존재하는 카르복실기와 BMP-2 고정화된 표면이 MC3T3-E1 세포 부착에 미치는 영향을 평가하기 위하여 주사현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig.9의 (a)는 티타늄 표면에서 3 시간 배양 후 세포의 모양을 관찰한 것이다. (b)의 플라즈마 중합 아크릴산 박막이 증착된 티타늄 표면은 cell spreading이 증가한 것을 알 수 있었으며, (c-e) BMP-2가 고정화된 티타늄 표면에서는 cell spreading과 growth가 증가됨을 확인할 수 있었다. 표면 친수성과 분화 유도 단백질은 티타늄 표면의 특성을 개선하여 세포와의 유착을 증가시킬 수 있는 가능성을 *in vitro* 결과로부터 확인할 수 있었다<sup>27)</sup>.

Fig. 10은 MC3T3-E1 세포의 형광 사진을 나타낸 것이다. 세포의 핵과 세포골격을 팔로이딘-로다민과 DAPI로 염색하여 세포의 성장 상태를 자세하게 관찰할 수 있었다. (b)의 보다 친수성의 플라즈마 중합 아크릴산 박막이 증착된 티타늄 표면에 있는 세포들은 크고, (c-d)의 BMP-2가 고정화된 티타늄 표면에 있는 세포들은 좀 더 크고, 세포 수도 많이 볼 수 있었다. 플라즈마 중합 아크릴산 박막의 음전하 카르복실기로부터 BMP-2의 생체분자의 고정화는 세포의 부착과 성장에 효과를 나타냄을 알 수 있다<sup>28)</sup>.

Fig.11은 티타늄 표면에 플라즈마 중합된 아크릴산 박막을 증착하여 BMP-2를 고정화한 후 MC3T3-E1 세포에 대한 ALP 활성도를 측정한 결과이다. BMP-2 고정화된 티타늄 표면에서 4 일과 7 일 모두 ALP 활성도가 증가되었다. BMP-2가 MC3T3-E1 조골 세포를 골세포로 분화되는 것을 촉진함으로써 ALP 활성이 증가 하였다<sup>29)</sup>.

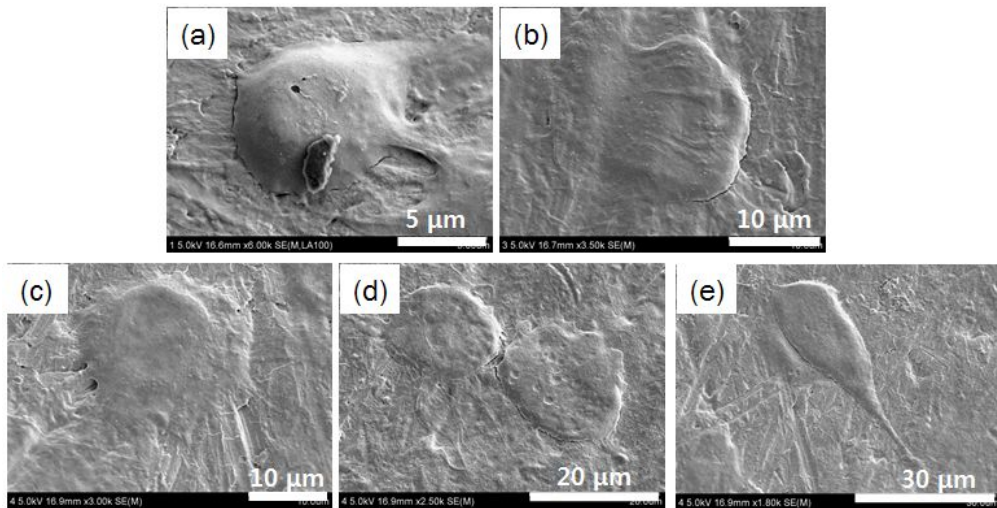


Fig. 9. SEM images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) titanium, (b) COOH(60W)/Ti, and (c-e) BMP-2 immobilized surface for 3 hours.

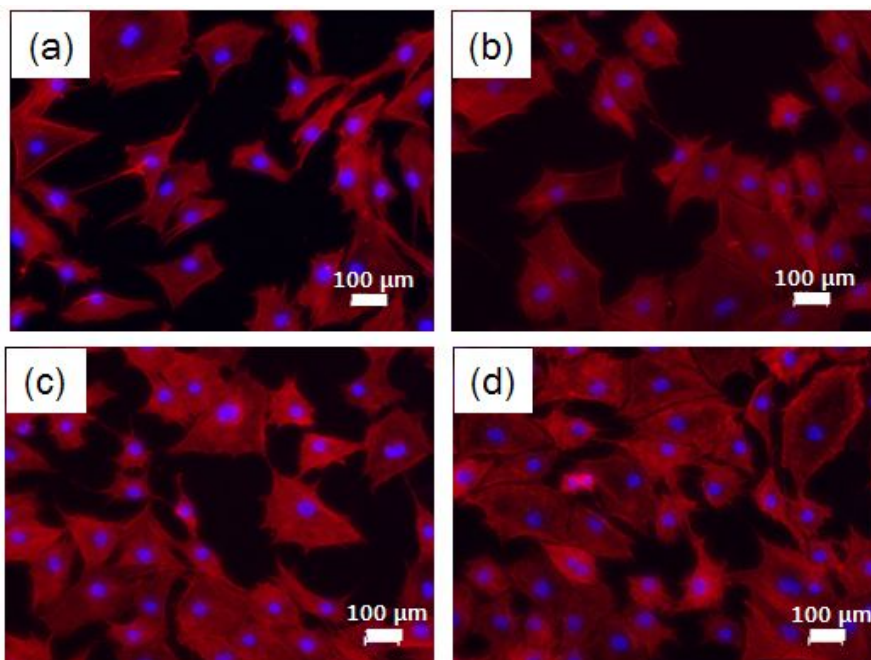


Fig. 10. Fluorescence images of the MC3T3-E1 cell seeded on (a) titanium, (b) COOH(60W)/Ti, (c) and (d) BMP-2 immobilized surface for 24 hours.



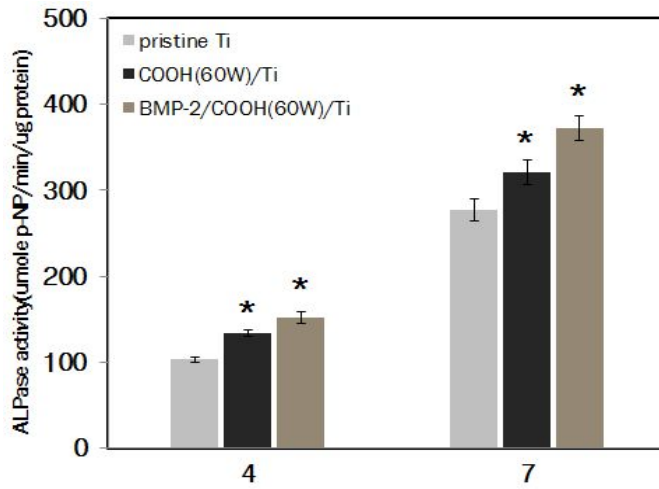


Fig. 11. ALP activity of the MC3T3-E1 cell seeded different PCL surface for 4 and 7 days. \* $p < 0.05$ ; significant against the differentiation of MC3T3-E1 cells on pristine Ti, COOH/Ti and BMP-2/COOH/Ti at corresponding days.

## 제 4 장 고찰

골 형성 단백질(BMP)은 골 형성이나 치유에 아주 중요한 역할을 하는 성장 인자로 널리 사용되고 있다<sup>9,10)</sup>. BMP는 조골세포나 연골세포를 포함하여 다양한 세포들의 증식이나 분화를 조절한다고 알려져 있다<sup>9,30)</sup>. 특히 제 2형 골형성 단백질(BMP-2)는 BMP family 중에서 가장 강력한 성장인자 중에 하나로서 주로 생체 내에서 골 형성의 유도를 담당하고 있다<sup>9,10,30)</sup>. 또한 제 2형 재조합 인간 골 형성 단백질 (recombinant human bone morphogenetic protein-2; rhBMP-2)은 대량으로 이용할 수 있기 때문에 잠재적인 바이러스 감염에 관련된 추출물과 연관된 위험성이 거의 없어서 조직공학 응용에 광범위하게 연구되고 있다<sup>31-34)</sup>.

생체재료표면에 생체분자의 고정화는 세포와 생체재료사이의 계면에 생체분자들이 부착 및 유지되게 한다. 이것은 세포의 거동을 원하는 대로 유도하기 위하여 또는 충분한 기간을 지속하기 위해서는 임계농도에서 성장인자들과 상호결합이 되어야만 하기 때문에 매우 중요하다. 그리고 필요시에는 생체분자들이 장시간 서서히 방출되는 형태를 유지해야만 한다. 비록 고정화된 생체분자들이 정형외과나 치과용 임플란트와 같은 금속생체재료와 주변조직 사이 계면에 존재하는 세포에서 발생하는 일련의 복잡한 과정을 바꾸는데 큰 잠재력을 가지고 있다하더라도, 생체재료표면에 존재하는 관능기가 부족하면 생체재료표면의 생체분자 고정화과정을 복잡하게 만든다.

따라서 생체재료표면에 관능기를 도입하기위한 기술 중에 플라즈마 기술은 재료표면을 개질하는데 유용하게 이용되고 있다<sup>35,36)</sup>. 예를 들면, 특별한 관능기의 증착이나 가교에 의해 플라즈마 표면개질은 고분자의 표면특성을 개질하는데 흔히 사용되어왔다<sup>37,38)</sup>. 금속표면에 세포 부착효율을 향상 시키거나, 클리닝할 목적으로 플라즈마 기술을 이용해 왔다<sup>39-41)</sup>.

본 연구에서는 티타늄표면의 카르복실기는 아크릴산의 플라즈마 중합에 의하여 도입되었고, 표면에 존재한 카르복실기의 표면밀도는 플라즈마 입력파워에 의존하는 경향을 보였다. 친수성, 표면형상, 표면전하상태 그리고 생체적합성과 같은 재료의 표면특성은 플라즈마 표면개질공정 변수를 제어함으로

서 효과적으로 개질할 수 있다. 에스테르기, 하이드록실기, 카르복실기, 카르보닐기 그리고 아민기와 같은 일부 특별한 관능기는 특별한 화학 반응성을 제공하고, 표면의 물리적인 특성을 변화시킨다. 이러한 관능기들은 생체분자를 고정화하는데 유리한 표면상태를 제공할 수 있다. 아크릴산 플라즈마 표면처리는 티타늄표면에 산소원자가 풍부한 카르복실기(-COOH)를 도입하였는데, 일반적으로 산소를 함유한 관능기는 전자를 주는 그룹이기 때문에 티타늄표면의 음전하밀도는 증가한다. 반면에 PI값이 8.5인 BMP-2는 수용액내에서 양전하 단백질이기 때문에 아크릴산 플라즈마 표면처리를 한 티타늄을 BMP-2용액에 넣었을 때 양전하 된 BMP-2와 음전하 된 티타늄과의 사이에 강한 정전기적 인력이 발생하여 BMP-2가 티타늄표면에 부착되는 것이다. 아마도 티타늄표면이 비표면적이 크다면 고정화된 BMP-2의 양은 증가할 것이다.

Shen 등(2009)은 PLGA 고분자지지체에 산소플라즈마를 처리한 후 BMP-2를 각각 농도 5, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 고정화하여 OCT-1 세포를 배양하여 ALP 활성을 조사하였다. 그 결과, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 가장 높은 활성을 보였다<sup>42)</sup>, 본 연구에서는 BMP-2농도를 100 ng/ml와 500 ng/ml에서 고정화하여 ALP활성을 측정하였는데, 500 ng/ml의 활성이 우수하였다. Shen 등의 BMP-2 고정화 농도와 본 연구의 BMP-2 고정화 농도와는 큰 차이가 발생하는데, 이는 Shen 등은 비표면적인 큰 다공성 고분자지지체에 BMP-2를 고정화하는데 많은 양의 BMP-2가 필요한 반면에, 본 실험에서는 기계적 연마된 직경 20 mm의 티타늄 디스크를 사용했기 때문이라고 생각된다<sup>42)</sup>. 또한 고분자표면과 금속표면의 플라즈마 표면처리 후 전하밀도가 상이할 것으로 사료된다.

Puleo 등(2002)는 티타늄표면에 아민 플라즈마 처리 후 EDCA와 NHS를 이용하여 아마이드 공유결합으로 BMP-4를 고정화하여 C3H 세포주에 대한 ALP활성을 측정하였다. 아민기의 표면밀도가 높은 시편이 더욱 더 우수한 활성을 보여주었다<sup>43)</sup>. 이것은 표면에 존재하는 BMP-4가 많기 때문인 것으로 사료된다.

향후에 BMP-2와 티타늄표면의 부착력 및 BMP-2의 방출에 관한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 제 5 장 결론

티타늄 표면에 플라즈마 중합법을 이용하여 플라즈마 중합된 아크릴산 박막을 증착하고, 제 2형 골형성 단백질(BMP-2)을 고정화 후 표면 및 물성을 관찰하였고, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포 분화를 조사하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

- (1) 아크릴산의 플라즈마 중합 최적 입력 파워는 60 W로 티타늄 표면에 안정한 카르복실기가 도입된 박막을 증착할 수 있었다.
- (2) 물 접촉각 측정에서 플라즈마 중합된 아크릴산 박막이 코팅된 티타늄 표면이 친수성을 나타냄을 알 수 있었다.
- (3) BMP-2를 위의 티타늄 표면에 고정화한 후 XPS 원소 분석한 결과, 질소 원소를 확인하여 고정화를 확인하였다.
- (4) ALP 활성 실험에서 BMP-2가 고정화된 티타늄에서 MC3T3-E1 조골세포의 분화가 향상되었다.
- (5) 생체재료 표면에 카르복실기를 도입할 수 플라즈마 중합은 임플란트에 세포 조직 기능을 부여하는 유용한 기술로 활용가능하다고 사료된다.

결론적으로 티타늄의 표면에 플라즈마 중합 표면개질기술을 이용하여 임플란트 표면에 골 재생 및 골 유착을 촉진하는 생체분자를 고정화하는데 유용한 기술로 이용할 수 있었다.

## 참고문헌

- [1] Carsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T (1998). Removal torque for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3:21-24.
- [2] Godfredsen K, Nimb L, Hjörting-Hansen E, Jensen JS, Holmën A (1992). Histomorphometric and removal torque analysis for TiO<sub>2</sub>-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Implants Res* 3:77-84.
- [3] Cook SD, Baffes GC, Palafox AJ, Wolfe MW, Burgess A (1992). Torsional stability of HA coated and grit-blasted titanium dental implants. *J Oral Implantol* 18:354-358.
- [4] Cook SD, Kay JF, Thomas KA, Jarcho M (1987). Interface mechanics and histology of titanium and hydroxyapatite-coated titanium for dental implants applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2:15-22.
- [5] Gottlander M, Albrektsson T (1992). Histomorphometric analysis of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium implants. The importance of the implants design. *Clin Oral Implants Res* 3:71-76.
- [6] Baker D, London RM, o' Neal R (1999). Rate of pullout strength gain of dual-etched titanium implants: A comparative study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:722-728.
- [7] De Leonardis D, Garg AK, Pecora GE, Andreana S (1997). Osseointegration of rough acid etched titanium implants: One-year follow up of placement of 100 minimatic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12:65-73.
- [8] Klokkevold P, Nishmura RD, Adachi M, Caputo A (1997). Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in rabbit. *Clin Oral Implants Res* 8:442-447.

- [9] Jeon O, Song SJ, Kang SW, Putnam AJ, Kim BS (2007) Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials* 28:2763-2771.
- [10] Kirker-head CA (2000) Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliver Rev* 43:65-92.
- [11] Jung SC, Lee K, Kim BH (2012) Biocompatibility of plasma polymerized sandblasted large grit and acid titanium surface. *Thin Solid Films* 521:150-154.
- [12] Lee K, Ko YM, Choe HC, Kim BH (2012) Formation of Nano-Phase Hydroxyapatite Film on TiO<sub>2</sub> Nano-Network. *J Nanosci Nanotechnol* 12:822-827.
- [13] Ko YM, Lee K, Kim BH (2012) Bone like apatite formation on modified Ti surfaces with COOH, NH<sub>2</sub>, and OH functional groups by plasma polymerization. *Thin Solid Films* 521:128-131.
- [14] Song HS, Jung SC, Kim BH (2012) Focal Adhesion of Osteoblastic Cells on Titanium Surface with Amine Functionalities Formed by Plasma Polymerization. *Jpn J Appl Phys* 51:08HE01-08HE04.
- [15] Barber TA, Gamble LJ, Castner DG, Healy KE (2006). In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPN coated titanium implants. *J Orthop Res* 24: 1366-1376.
- [16] Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Scheniders W (2006). Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27: 5561-5571.
- [17] Detomaso L, Gristina R, Senesi GS, d'Agostino R, Favia P (2005). Stable plasma-deposited acrylic acid surfaces for cell culture applications. *Biomaterials* 26:3831-3841.
- [18] Pistillo BR, Perrotta A, Gristina R, Ceccone G, Nardulli M,

- d'Agostino R, Favia P (2011). Water resistant ethylene/acrylic acid plasma-deposited coatings. *Surf Coat Technol* 205:S535–S536.
- [19] Jafari R, Tatoulian M, Morscheidt W, Arefi-Khonsari F (2006). Stable plasma polymerized acrylic acid coating deposited on polyethylene (PE) films in a low frequency discharge(70 kHz). *React Funct Polym* 66:1757–1765.
- [20] Morent R, Geyter ND, Vlierberghe SV, Beaurain A, Dubruel P, Payen E (2011). Influence of operating parameters on plasma polymerization of acrylic acid in a mesh-to-plate dielectric barrier discharge. *Prog Org Coat* 70:336–341.
- [21] Dilsiz N, Akovali G (1996). Plasma polymerization of selected organic compounds. *Polymer* 37:333–342.
- [22] Mangindaan D, Kuo WH, Chang CC, Wang SL, Liu HC, Wang MJ (2011). Plasma polymerization of amine-containing thin films and the studies on the deposition kinetics. *Surf Coat Technol* 206:1299–1306.
- [23] Guéhenec LL, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 23:844–854.
- [24] Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 29:739–767.
- [25] Chiang ZC, Yu SH, Chao AC, Dong GC (2012). Preparation and characterization of dexamethasone-immobilized chitosan scaffold. *J Biosci Bioeng* 113:654–660.
- [26] Kim SE, Song SH, Yun YP, Choi BJ, Kwon IK, Bae MS, Moon HJ, Kwon YD (2011). The effect of immobilization of heparin and bone

- morphogenic protein-2(BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials* 32:366-373.
- [27] Bae SE, Choi JY, Joung YK, Park KD, Han DK (2012). Controlled release of bone morphogenic protein (BMP)-2 from nanocomplex incorporated on hydroxyapatite-formed titanium surface. *J Control Release* 160:676-684.
- [28] Moore NM, Lin NJ, Gallant ND, Becker M (2011). Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients. *Acta Biomaterialia* 7:2091-2100.
- [29] Drevelle O, Daviau A, Lauzon MA, Fauchoux N (2013). Effect of BMP-2/or BMP-9 on preosteoblasts attached to polycaprolactone functionalized by adhesive peptides derived from bone isaloprotein. *Biomaterials* 34:105-1062.
- [30] van den Doldera J, de Ruijtera AJE, Spauwenb PHM, Jansen JA (2003). Observations on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells cultured on titanium substrates of different roughness. *Biomaterials* 24:1853-1860.
- [31] Kato M, Namikawa T, Terai H, Hoshino M, Miyamoto S, Takaoka K (2006). Ectopic bone formation in mice associated with a lactic acid/dioxanone/ethylene glycol copolymer-tricalcium phosphate composite with added recombinant human bone morphogenic protein-2. *Biomaterials* 27:3927-3933.
- [32] Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Ong JL (2002). Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenic protein-2. *J Biomed Mater Res* 61:61-65.
- [33] Kempen DHR, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, et



- al. (2008). Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29:3245-3252.
- [34] Hosseinkhani H, Yamamoto M, Inatsugu Y, Hiraoka Y, Inoue S, Shimokawa H, et al. (2006). Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture. *Biomaterials* 27:1387-1398.
- [35] Hoffman AS (1988). Biomedical applications of plasma gas discharge processes. *J Appl Polym Sci Appl Polym Symp* 42:251-267.
- [36] Ratner BD (1992). Plasma deposition for biomedical applications: a brief review. *J Biomater Sci Polym Ed* 4:3-11.
- [37] Gombotz WR, Hoffman AS (1988). Functionalization of polymeric films by plasma polymerization of allyl alcohol and allylamine. *J Appl Polym Sci Appl Polym Symp* 42:285-303.
- [38] Yuan S, Marchant RE (1994). Surface modification of polyethylene film by plasma polymerization and subsequent chemical derivatization. *J Appl Polym Sci Appl Polym Symp* 54:77-91.
- [39] Baier RE, Meyer AE, Akers CK, Natiella JR, Meenaghan M, Carter JM (1982). Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. *Biomaterials* 3:241-245.
- [40] Aronsson BO, Lausmaa J, Kasemo B (1997). Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 35:49-73.
- [41] Morra M, Cassinelli C (1997). Organic surface chemistry on titanium surfaces via thin film deposition. *J Biomed Mater Res* 37:198-206.
- [42] Shen H, Hu X, Yang F, Bei J, Wang S (2009). The bioactivity of rhBMP-2 immobilized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. *Biomaterials* 30:3150-3157.

[43]Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS (2002) A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* 23:2079-2087.