



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2010년 2월

博士學位論文

티타늄 표면에 히알루론산과
카르복실 메틸 키토산의 고정화가
MG-63 세포에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치의학과

이 종 한

티타늄 표면에 히알루론산과
카르복실 메틸 키토산의 고정화가
MG-63 세포에 미치는 영향

Effect of immobilization of hyaluronic acid and
carboxyl methyl chitosan onto titanium surfaces
on MG-63 cell

2010年 2月 25日

조선대학교 대학원

치의학과

이 종 한

티타늄 표면에 히알루론산과
카르복실 메틸 키토산의 고정화가
MG-63 세포에 미치는 영향

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위 논문으로 제출함.

2009年 12月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 종 한

이종한의 박사학위 논문을 인준함

위원장 부산대학교 교수 김 형 일 印

위 원 조선대학교 교수 김 수 관 印

위 원 조선대학교 교수 최 한 철 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2009年 12月 日

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABSTRACT..... V

제 1장 서 론..... 1

제 2장 이론적 배경..... 3

제 3장 실험재료 및 방법 8

제 1절 실험재료 8

제 2절 플라즈마 중합반응 8

제 3절 CMCH 고정화방법 10

제 4절 HA 고정화 10

제 5절 MG 63 세포 배양 12

제 6절 세포의 생존력 및 세포증식률 실험 12

제 4장 실험결과 및 고찰 13

제 1절 플라즈마 중합과 CMCH, HA 고정화	13
제 2절 표면개질된 티타늄의 표면형상	14
제 3절 <i>In vitro</i> 실험을 통한 생물학적 영향 평가.	17
제 5장 결 론	18
참 고 문 헌	19

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Scheme of polymer and plasma polymer.....	4
Fig. 2. Plasma deposition system for polymerization.....	9
Fig. 3. Titanium disk after plasma polymerization.....	9
Fig. 4. Immobilization reactor and circulation bath.....	11
Fig. 5. Preparation of four modified samples (Ti, Ti/NH ₂ , Ti/NH ₂ /CMCH, Ti/NH ₂ /CMCH/HA).....	11
Fig. 6. ATR-FTIR spectrum.....	13
Fig. 7. SEM images of (a, b) Ti, (c, d) Ti/NH ₂ , (e, f) Ti/NH ₂ /CMCH, and (g, h) Ti/NH ₂ /CMCH/HA	15
Fig. 8. AFM images of (a, b) Ti (c, d) Ti/NH ₂ , (e, f) Ti/NH ₂ /CMCH and (g, h) Ti/NH ₂ /CMCH/HA	16
Fig. 9. MTT assay from the MG-63 seeded on control (a) Ti, (b) Ti/NH ₂ , (c) Ti/NH ₂ /CMCH and (d) Ti/NH ₂ /CMCH/HA for 1 day, 3days and 6days.....	17

LIST OF Table

Table. 1. Surface elemental composition.....	15
--	----

ABSTRACT

Effect of immobilization of hyaluronic acid and
carboxyl methyl chitosan onto titanium surfaces
on MG-63 cell

Jong-Han Lee, D.D.S, M.S.D

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

Department of Dental Dentistry

Graduate School of Chosun University

Plasma surface modification can be used to improve the surface properties of titanium, by creating functional groups to produce bioactive materials and different surface topography. The natural polymer chitosan and Hyaluronic acid (HA) are component of extracellular matrix (ECM) and influence on several cellular events such as attachment and proliferation. These bioactive materials are non-toxic and biodegradable, and also it has been reported several biological. In this study, the biocompatible titanium surface was developed by plasma polymerization of allylamine (AA) and consequently grafting

carboxymethyl chitosan (CMCH) and then, HA was immobilized with covalent bond on the modified substrates in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC).

All surface modified samples were characterized by the attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR) and x-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The surface topology of specimen was investigated by scanning electron microscope (SEM) and atomic force microscope (AFM). *In vitro* studies were performed with L929 mouse fibroblast cell to investigate the effect of biological change on fibroblast cell behavior. The cell viability and proliferation were investigated by the MTT assay and the results revealed that cell adhesion and proliferation were enhanced.

제 1 장 서 론

티타늄 임플란트는 우수한 기계적 성질과 화학적 안정성 및 생체적합성으로 인해 임상에서 성공적으로 사용되고 있다. 일반적으로 티타늄의 이러한 생체적합성은 표면에 있는 산화층에 기인한다고 알려져 있다. 그러나 산화층은 매우 안정하여 티타늄이 생체불활성의 특성을 나타내도록 하며,¹⁾ 이로 인해 골과의 결합이 일어나기까지 오랜 시간이 소요되는 단점이 있다. 이러한 이유로 티타늄과 그 합금이 생체활성도를 향상시키기 위한 많은 표면 처리방법이 연구되어져 왔다.²⁻⁴⁾ 티타늄 임플란트의 표면처리 방법에는 물리적, 화학적 또는 전기화학적인 방법 등이 있으며,⁵⁾ Balasundaram 등은 임플란트 표면의 거칠기를 개선하여 골과 접촉하는 표면적을 증가시키거나 골활성 물질을 표면에 부착시켜 재료의 활성도를 증가시키는 방법에 관하여 조사한 바 있다.⁶⁾ 이들 표면개질 (surface modification) 방법들 중의 일부는 표면에 잔여물질이 남아서 조골세포 (osteoblast)의 기능에 해로운 영향을 미치는 것 등이 보고된 바 있다.⁶⁾ 생체재료 표면에 물리적 또는 화학적인 특성을 변화시킴으로써 생체적합성이 우수하도록 특별한 기능을 부여하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 물리적 특성인 표면 거칠기는 골/임플란트 접촉면적과 제거토크 저항을 증가시킨다고 보고되어 왔다⁷⁻⁹⁾.

또한 표면개질 공법 중 하나인 플라즈마 중합기술은 재료표면의 세포의 분화 및 부착을 증진시키고 또한 생체재료표면을 화학적으로 변화시키는 기술이므로 현재 생체 의공학 분야에 널리 사용되고 있다¹⁰⁻¹¹⁾. 이러한 기술을 이용하여 여러종류의 단량체를 사용하여 재료표면에 활성화 자리가 될 수 있는 다양한 관능기를 도입하는데도 아주 유용하므로 플라즈마 중합을 이용하여 생성된 고분자 박막은 RGD 펩타이드, 키토산, 히알루론산 등의 생체활성물질을 고정화하는데 널리 이용되고 있다. 또한 자연고분자이면서 생체적합성이 우수한 키토산은 낮은 용해도 때문에 바이오산업의 응용이 제한되어 왔다. 이러한 단점을 보완하고자 유리 아민기를 갖는 carboxymethyl chitosan (CMCH)은 수용성 키토산의 유도체로서 독성이 낮고 생체적합성이 우수하며 또한 세포에서도 안정하고 그리고 물에 용해되었을 때 lysozyme에 의해 분

해되어 생체재료로서 매우 우수한 특성을 가지고 있다. 키토산과 카르복시메틸키토산의 구조는 한편, 히알루론산(HA)은 다양한 조직에서 발견되는 점액 다당류로서 세포외 기질을 구성하는 구성물질이며, 점성이 커서, 박테리아와 같은 외부 물질의 침투를 막아 피부 감염 등의 질병을 예방한다¹²⁾. 하지만 히알루론산은 수용성으로, 빠른 체내 분해성으로 인하여¹³⁾ 여러 과학자들에 의해 히알루론산과 합성고분자를 화학반응을 통한 일련의 연구가 진행되고 있다^{14,15)}.

따라서 본 연구에서는 이러한 기능을 보이는 생체활성물질 CMCH와 HA를 티타늄표면에 고정화하여 조골세포의 증식에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

제 2 장 이론적 배경

제 1 절 플라즈마 중합반응 및 장점

1. 플라즈마 중합반응의 원리

플라즈마 중합(plasma polymerization, plasma enhanced chemical vapor deposition)은 유기 및 유기 금속의 가스 상태 모노머들이 플라즈마 방전 상태에서 기체 표면에 가교밀도가 매우 높은 박막이나 분말형태로 합성(증착)되는 것을 말한다. 탄소, 황, 실리콘 등과 같은 사슬을 형성시키는 원자들을 포함하는 화학물질의 모노머 존재하에서 발생한다. 플라즈마 상태에 투입되는 모노머 분자들은 대부분의 경우 플라즈마 에너지에 의해 활성화 입자들로 부서져 투입 모노머의 부분적인 화학적 구조만 보존되고 가교화되고 불규칙적인 구조를 가지게 된다(Fig. 1 참조). 합성물질의 구조 및 성질은 압력, 가스 투입량, 가스의 종류, 전압, 전압 bias 등의 플라즈마 공정 인자에 의해서 정밀하게 조절될 수 있는데 이런 성질을 이용하여 두께 방향에 대하여 물성을 점차적으로 변화하는 구배층 구조를 제조할 수 있다.

플라즈마 중합은 수십여년 전에 소개된 이후 재료공학의 중요한 부분이 되어 왔다. 화학분야(특히, 고분자의 플라즈마 화학)의 경계를 넘어 물리화학분야(플라즈마 물리, 박막 및 표면 물리, 진공물리)를 포함하고 있으며, 응용분야로 광학, 전자, 재료 개질 등의 응용분야를 포함하고 있다. 플라즈마 중합은 플라즈마 화학의 한 타입이며 플라즈마 종들간의 반응이다. 자유라디칼 중합의 관점에서 플라즈마 중합을 본다면 “plasma-induced polymerization” 또는 “plasma-state polymerization”으로 정의 될 수 있다. 전자는 불포화된 탄소-탄소 결합을 포함하는 전통적인 자유라디칼 유도 결합을 의미한다. 후자에서는 플라즈마 중합으로 이끄는 주요공정은 분자의 결합을 깨기에 충분한 에너지를 갖는 전자나 다른 플라즈마 종들의 존재에 의존한다. 중합공정 인자나 장비의 구조들에 따라서 만들어지는 막의 성질에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다. 플라즈마 중합에 의해 형성된 필름들은 통상적으로 복합재료에 사용되는 섬유 표면개질을 할 경우처럼 재료의 전체 특성은 변화시키지

않고 표면 성질만을 개질 할 수 있다는 장점이 있으며, 일반적으로 플라즈마 합성에 의한 응용분야는 다음과 같은 특성들을 갖는다.

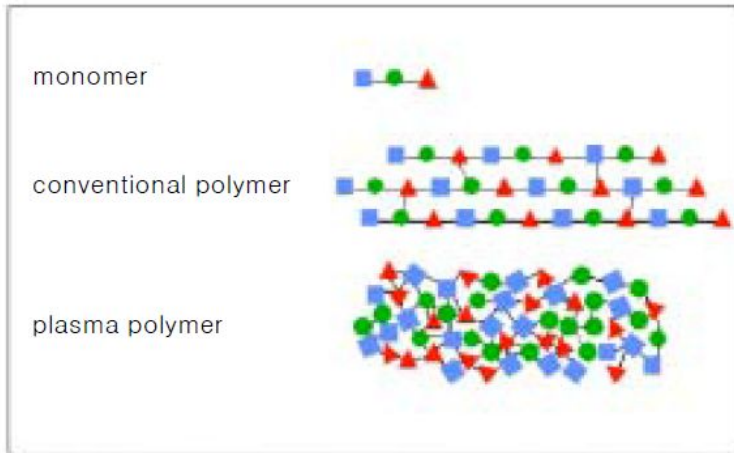


Fig. 1 Scheme of polymer and plasma polymer

2. 플라즈마 중합의 장점

- 1) 플라즈마 중합에 의해 500Å-1000Å 정도의 필름 두께를 형성한다.
- 2) 유리나 금속 등의 기재와의 접착력이 매우 우수하다.
- 3) 플라즈마 중합에 의해 생성된 필름 코팅은 핀홀이 없고 가교도가 높다.
- 4) 다층필름이나 정밀하게 물리적, 화학적 특성의 구배를 갖는 필름제조가 가능하다.
- 5) 플라즈마 폴리머는 보다 높은 탄성율을 보이고 뚜렷한 유리전이온도를 보이지 않는 경우가 많다.

제 2 절 생체재료의 플라즈마 표면처리

1. 플라즈마 표면처리

생체재료란 각막에 접촉하는 콘택트 렌즈, 조직을 꿰매는 수술실, 수혈용 혈액을 보존하는 혈액 백, 혈액을 채취하는 주사기, 골절부를 고정하는 골 접

합제등으로 생체와 접촉하는 재료를 의미한다. 인공관절이나 인공심장등도 포함되며 이러한 생체재료가 아무리 뛰어난 기능을 갖고 있어도 분명한 독성을 보여 주는 경우에는 그것을 임상 사용하는 것은 불가능하다. 이상적인 생체재료는 표면이 생체적합성과 기계적 물성이 우수한 것으로, 이러한 특성을 충족시켜 줄 수 있는 생물학적, 물리화학적 표면처리 기술을 사용하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 또한 독성 물질을 방출하지 않는 재료라 하더라도 재료 표면에 세포가 부착하면 그 세포로부터 사이토카인 등이 방출되고 그것이 정보 전달 물질이 되어 재료에 대하여 생체 반응이 일어나기 때문에 생체재료의 경우 생체 적합성이 무엇보다 중요하다. 생체 적합성이란 일반적으로 생체에 손해를 입히지 않고 방해도 하지 않으며 생체재료가 목적으로 하는 기능을 수행할 수 있는 성질로 정의된다. 티타늄의 플라즈마 표면처리 기술 중에 티타늄에 이온주입법으로 얇은 인산칼슘 층을 형성하여 bone-conductivity가 향상된다고 보고하였다¹⁶⁾. 이외, 금속 및 합금, 고분자, 세라믹 소재를 산소, 암모니아, hydroxyapatite, 플라즈마와 RF 플라즈마를 이용한 플라즈마 표면처리 및 표면코팅 또는 플라즈마 그래프팅을 통하여 경도의 향상, 마찰력과 마모성의 감소를 통한 생체적합성이 우수한 생체재료를 생산하는 것에 대한 많은 연구 및 보고¹⁷⁾가 이루어지고 있다.

2. 플라즈마 발생원 및 플라즈마 표면개질 기술

플라즈마 표면처리는 생체적합성과 재료의 기계적, 화학적 성질을 향상시킬 수 있다. 일반적으로 플라즈마 기체는 압력과 방전 사이의 두께에 의존한 방전 전위와 기체를 통한 potential 인가에 의해 방전이 된다. 많은 저압 플라즈마 소스인 DC, RF 방전, ECR 플라즈마 소스는 전위 전기장이 낮고 전류를 더욱 더 잘 제어할 수 있는 저압에서 플라즈마 방전을 일으킬 수 있다. 이러한 플라즈마 소스는 적절한 제어로 넓은 영역의 균일한 전자 밀도를 가진 플라즈마를 발생시킬 수 있다. 코로나 방전, 아크 플라즈마와 같은 다른 플라즈마는 생체의료 산업에 많이 이용되고 있다.

RF 방전은 넓은 부피의 균일한 플라즈마를 형성할 수 있기 때문에 플라즈

마 표면 개질소스로 넓게 사용하는 것 중에 하나이다. RF 방전은 전기적 부하를 가진 RF power 결합 장치에 따라 Capacitive 결합 장치와 Inductive 결합 장치로 나눌 수 있다. 그 밖에 발생원으로 electron cyclotron resonance (ECR), 코로나 방전, 상압아크, 진공아크, 및 레이저 플라즈마가 있다.

플라즈마 표면처리 기술에는 플라즈마 스퍼터링과 에칭, 플라즈마 이온주입법과 플라즈마 deposition, 플라즈마 중합, 그리고 플라즈마-그래프팅 상호-중합 등과 같은 것이 있다.

3. 생체재료의 표면개질 효과

최적의 생체 적합 임플란트 표면의 제조에 요구되는 물리화학적 특성들에 는 표면에너지 산화막의 두께, 화학적 조성, 그리고 표면 거칠기 등을 들 수 있으며, 생체재료의 0.33-1 nm의 단분자층을 개질하는 것이 이상적인 플라즈마 표면처리 방법이다. 인공관절등에 다공성 코팅을 이용한 접합법이 이용되고 있으며 다공성 표면을 만드는 방법에는 소결과 diffusion-bonding, 플라즈마 표면처리 방법이 있다. 소결은 확산에 의하여 입자간 결합을 형성하거나 입자와 임플란트가 서로 결합한다. 이 방법에 사용되는 금속 분말은 코발트계 합금이나 티타늄계 합금이다. Diffusion-bonding은 소결에 비해 상대적으로 낮은 온도의 공정으로 티타늄의 금속 함유로 다공성 표면을 제조할 때 사용한다. 이것은 notch-sensitivity 효과를 유발시키고 피로강도를 감소시켜 높은 응력이 걸리는 부분에는 적당치 않은 방법이다. 플라즈마 에칭은, 플라즈마 활성화종으로 살아있는 생체와의 생체적합성이 적합한 생체재료의 표면을 마이크로-메트로-크기를 제어하여 다공성 표면을 만든다. 뼈 조직이 다공성 코팅 속으로 올바르게 성장하기 위해서는 정당한 pore의 크기가 필요하다. 실험 결과에 따른 뼈의 성장을 위한 최적의 pore 크기는 100~400um 정도로 간주된다. 또한 단위 부피당 porosity의 양도 중요한데, 구형일 경우 그 값이 30~40um 일 때 뼈 조직이 성장하기에 적당하고 우수한 코팅강도를 나타내는 것으로 연구보고 되어지고 있다.

4. 생분해성 고분자 종류

생분해성 고분자는 천연고분자 및 합성고분자로 구분할 수 없고, 천연고분자는 collagen, alginate, agarose, hyaluronic acid, chitosan 및 fibrin glue와 같은 자연에 존재하는 고분자가 있다. 이들 천연고분자는 응력이 요구되지 않는 인공골 적용에서 신생골 성장을 자극하는 것으로 알려져 있다. 예로, allogeneic collagen type I은 Sprague-Dawley rat의 턱뼈에서 골결손 부위의 치료를 돕는 것으로 확인되었으며, 방사선 분석, 조직학적 분석과 육안분석에서 대조군인 연조직의 흉터형성과 비교하여 6주까지 결손부위를 따라 신생골이 형성되었다. 그러나, 천연 생분해성 재료는 내부조직과 잘 유착된 반면에 응력 위치에 사용하기 위해 요구되는 structural integrity가 취약함. 또한, 키토산 지지체는 생분해성이고 생체 적합하지만 기계적 물성이 약해 골 재건을 위한 지지체로서의 한계가 있다.

위와같은 단점을 해결하기 위해서 천연고분자와 calcium phosphate와 같은 골 구조성분들과의 복합체를 제조하여 기계적 물성을 향상시키려는 연구가 진행되고 있다.

생분해성 합성고분자는 polyglycolide(PGA), polylactide(PLA), polycaprolactone(PCL), polydioxanone(PDS) 및 이들의 공중합체와 같은 α -hydroxy acid 등이 있으며, α -hydroxy acid로 이루어진 재료는 체내에서 가수분해되어 대식세포에 의해 이산화탄소와 물로 전환되는 특징이 있다. 생분해성 고분자의 화학적 성분, 분자량, 결정성, 임플란트의 크기 및 모양, 가공 방법, 이식위치, 환자의 대사상태 등과 같은 많은 요소들이 분해속도에 영향을 줄 수 있으므로 분해속도 조절을 통해 기계적 물성을 조절하는 것이 중요하다. 따라서 최근에는 이런 생분해성 고분자를 개질하여 임플란트 재료에 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구논문도 이와 관련하여 특히 생체적합성과 생분해성이 뛰어난 키토산을 개질하여 본연구에 응용하고자 한다.

제 3 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

상업적으로 사용되는 순수 티타늄 원판(직경 20 mm)를 시료로 사용하였고, 기계적으로 연마하였다. 시료는 아세톤과 에탄올을 1:1비율로 혼합한 용액에 1시간동안 초음파 세척한 후 3차 탈이온수로 세정하고 건조하여 사용하였다. 사용된 CMCH는 AK scientific, Inc.에서 구입하였고, HA는 TCI 제품을 사용하였다. 그 외 사용된 시약 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)와 N-Hydroxysuccinimide (NHS)은 sigma aldrich사 제품을 사용하였다.

제 2 절 플라즈마 중합반응

플라즈마 중합반응은 플라즈마트(Miniplasma station, Korea)에서 구입한 장비를 사용하여 실험을 수행하였고 플라즈마 기기는 Fig. 2에 나타내었다. 티타늄 재료표면에 $-NH_2$ (아민기)를 도입하기 위하여 Allylamine(AA)을 고분자 전구체로 사용하였다. 먼저 시료표면의 클리닝이나 활성화를 부여하기 위하여 시료 전처리를 아르곤(Ar)가스로 유속 6.4sccm, 플라즈마 방전세기 60W로 5분간 수행하였다. AA의 고분자 박막을 티타늄 표면에 생성시키는 플라즈마 중합은 200mTorr에서 50W를 5분간 인가하여 시료표면에 아민기를 형성하도록 하였다. 반응이 끝난 시료는 3차 증류수로 세척한 후 진공오븐에서 건조 시킨 후 생체활성물질 고정화실험에 사용하였다. 반응이 종료된 AA 고분자 박막이 생성된 티타늄의 원판은 Fig. 3에 나타내었다. 티타늄 원판의 표면에 비하여 고분자박막이 코팅되어 빛 반사 굴절율이 변화하여 약간의 색깔이 보이는 것을 관찰할 수 있었다.



Fig. 2. Plasma deposition system for polymerization.

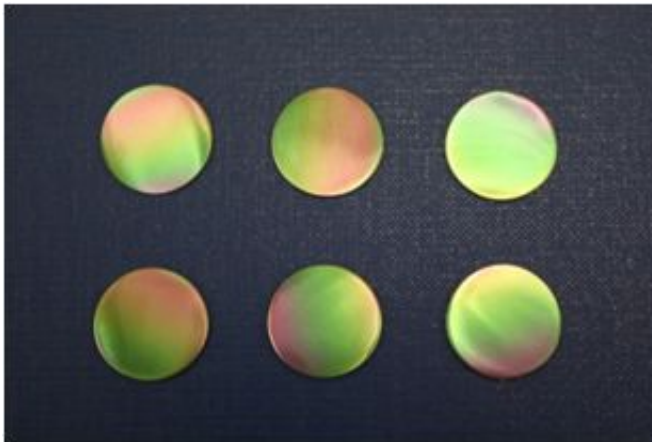


Fig. 3. Titanium disk after plasma polymerization

제 3절 CMCH 고정화

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)와 N-Hydroxysuccinimide (NHS)의 비율을 4/1(w/w)의 중량비로 측정하여 증류수에 녹여 용액을 제조한 후 플라즈마중합으로 개질된 티타늄을 반응기 (Fig. 4)에 넣고 0-4도에서 2시간동안 교반시켰다. CMCH 2g과 증류수 100ml를 이용하여 CMCH용액을 제조한 후 EDC로 활성화된 티타늄표면을 0-4도에서 24시간동안 반응시켰다. 종료된 샘플은 3차 증류수로 여러번 세척하여 미반응된 물질을 제거하였다.

제 4절 HA 고정화

시료를 준비한 반응기(Fig. 4)에 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)와 N-Hydroxysuccinimide (NHS)의 중량비를 (4/1)로 용액을 제조한 후 0-4도에서 2시간동안 반응시켰다. HA 0.05g를 넣고 100 ml 증류수로 HA 용액을 제조한 후 EDC로 활성화된 티타늄표면을 0-4도에서 24시간동안 반응시켰다. 미 반응된 물질을 제거하기 위해 3차 증류수로 여러번 세척 한 후 진공오븐에서 건조시켰다. 각 단계별 실험에 대한 모식도는 Fig. 5에 나타내었다.

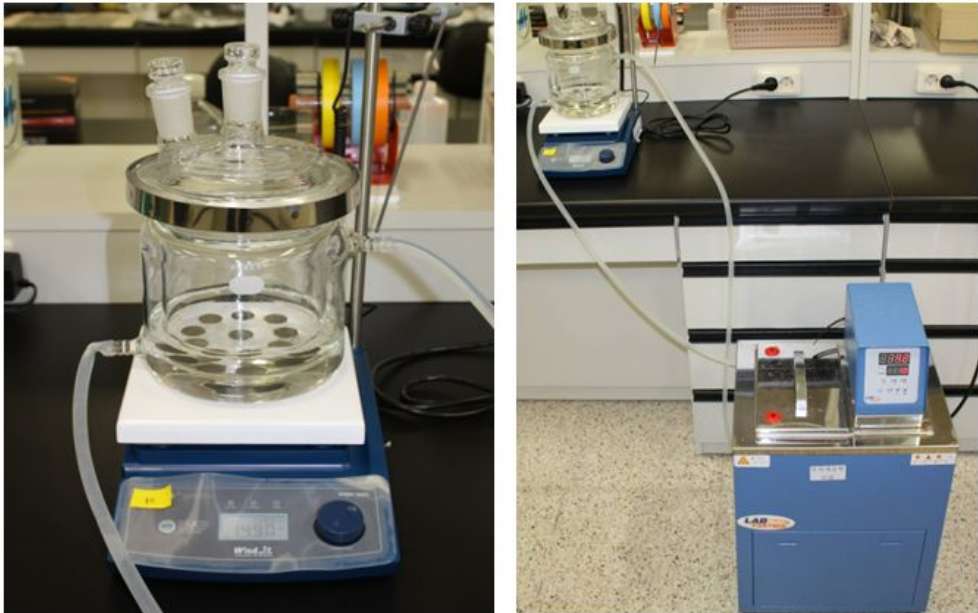


Fig. 4. Immobilization reactor and circulation bath

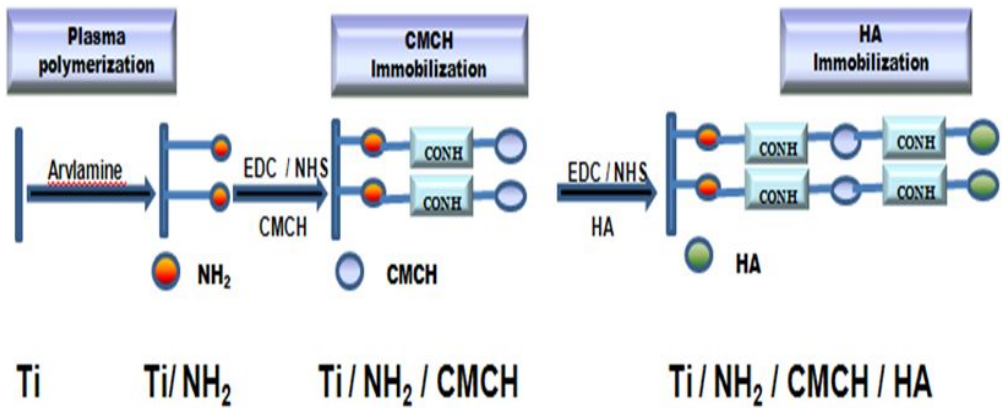


Fig. 5. Preparation of four modified samples (Ti, Ti/NH₂, Ti/NH₂/CMCH, Ti/NH₂/CMCH/HA)

제 5절 MG 63 세포 배양

인간의 골 암세포에서 유래된 MG 63 osteoblast-like 세포가 본 연구활동에 사용되었다. MG 63세포는 실험에 사용된 평균조도가 다른 표면에 배양할 경우 표면의 형상에 따라 골유도의 차이 메카니즘을 보여주는데 우수한 세포라고 할 수 있다¹⁶⁾. MG 63 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였고 1×10^4 cell/cm² 의 농도로 적정 분주하였다. 세포는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 10U/ml penicilin/streptomycin 을 첨가하여 사용하였다. 이를 섭씨 37도 95% 공기와 5% CO₂ 를 계속 공급하면서 배양하고 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

제 6절 세포의 생존력 및 세포증식률 실험

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to a purple formazan product) 방법은 세포부착력과 세포증식률을 측정하는 대표적인 실험 방법이다¹⁷⁾. MG 63 세포는 trypsin/EDTA를 사용하여 분리시킨 후 DMEM 배지를 첨가하여 원심분리기를 이용하여 수거한 후 DMEM 배지를 사용하여 1×10^5 cells/ml 농도로 12 well에 준비된 샘플에 파종하였다. 실험할 target day(1일, 3일, 6일)동안 각각 CO₂ 인큐베이터에서 배양한 후 0.5 mg/ml 의 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 행구고 이소프로필알콜(Isopropyl alcohol, Sigma) 용액을 300 μ L 넣어 10분간 동안 교반하였다. 96 well plate 에 샘플을 200 μ L씩 분주하고 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제 4 장 실험결과 및 고찰

제 1 절 플라즈마 중합과 CMCH, HA 고정화

대조군인 무 처리 Ti과 실험군인 플라즈마 처리한 Ti/NH₂과 CMCH를 고정화한 Ti/NH₂/CMCH 그리고 히알루론산을 고정화한 Ti/NH₂/CMCH/HA 샘플 총 3개를 각각 ATR-FTIR로 분석하여 Fig. 6에 나타내었다. 전영역 ATR-FTIR로 살펴보면 각 샘플의 피크가 전체적으로 CMCH, HA를 순차적으로 고정화 할수록 조금씩 왼쪽으로 shift가 일어난 것을 알 수 있었다. 또한 1700 cm⁻¹부근의 COOH기의 C=O부근의 영역대의 피크를 확인해보면 Ti/NH₂ 샘플에는 전혀 나타나지 않는 피크가 Ti/NH₂/CMCH의 샘플에서는 CMCH의 사슬에 있는 COOH 피크가 관찰되었고, Ti/NH₂/CMCH/HA 샘플에서도 역시 왼쪽으로 조금 shift된 채 뚜렷이 나타남을 확인할 수 있었다. 1220 과 1020 cm⁻¹ 부근의 -NH₂ 피크의 아미노 그룹을 확인하였고 이는 연관된 논문¹⁸⁾에서도 잘 나타나 있다. 이는 CMCH 체인 중 말단기 -NH₂ 와 HA의 말단기 -COOH 간의 공유결합에 의한 것임을 보여주는 것이다.

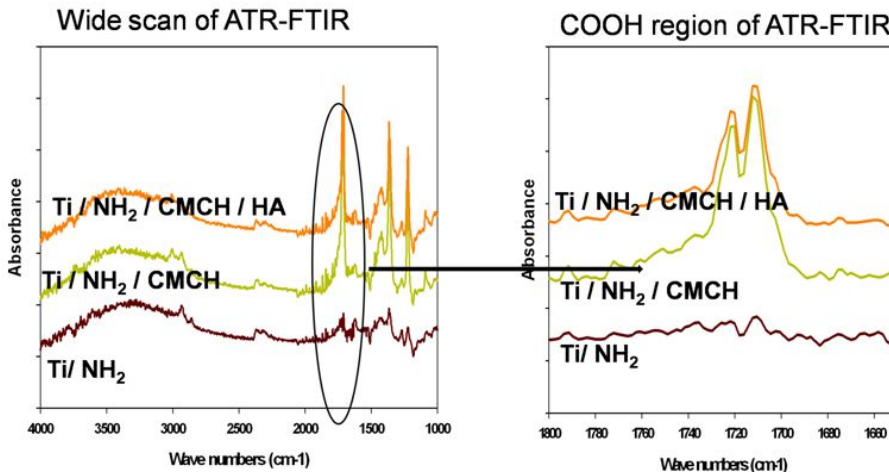


Fig. 6. ATR-FTIR spectrum

제 2 절 표면개질 티타늄의 표면형상

Fig. 7은 SEM image를 통해서 각각 x1000 및 x10,000배를 관찰하여 비교한 결과를 나타내었다. Fig 7 (a)의 티타늄 표면형상을 확인 해 보면 아주 편평한 표면을 관찰할 수 있었고 반면에 생체활성 물질 고정화의 과정을 많이 거친 Ti/NH₂/CMCH/HA 샘플일 경우 티타늄 표면의 고분자 막이 여러겹 생성되어 있는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 Table 1에서는 SEM-EDX 분석법을 통해 Ti/NH₂/CMCH 와 Ti/NH₂/CMCH/HA 샘플에서 각각 C, N의 함량이 검출된것을 확인함으로써 표면에 CMCH와 HA의 고정화가 이루어져 표면에 고분자 막이 생성된 것을 확인하였고 element atomic을 비율로 살펴본 결과, Ti/NH₂/CMCH/HA의 경우 C/N의 비율이 증가함을 확인 할 수 있었다. 표면 형상 변화를 자세히 관찰하기 위하여 AFM 분석법을 이용하여 관찰하였고 이는 Fig. 8에 나타내었다. AFM 분석은 2um X 2um 와 10um X 10um 이미지로 관찰하여 각각의 샘플의 거칠기를 살펴보았다. 10um X 10um에서 관찰한 평균 조도를 살펴보면 무 처리된 Ti의 경우는 4.778 nm, Ti/NH₂의 경우는 36.467 nm, Ti/NH₂/CMCH는 37.541 nm, Ti/NH₂/CMCH/HA는 46.945 nm였다. 이는 생체활성물질이 고정화될수록 고분자 박막이 표면에 형성되면서 평균조도가 커진것로 예상되어진다.

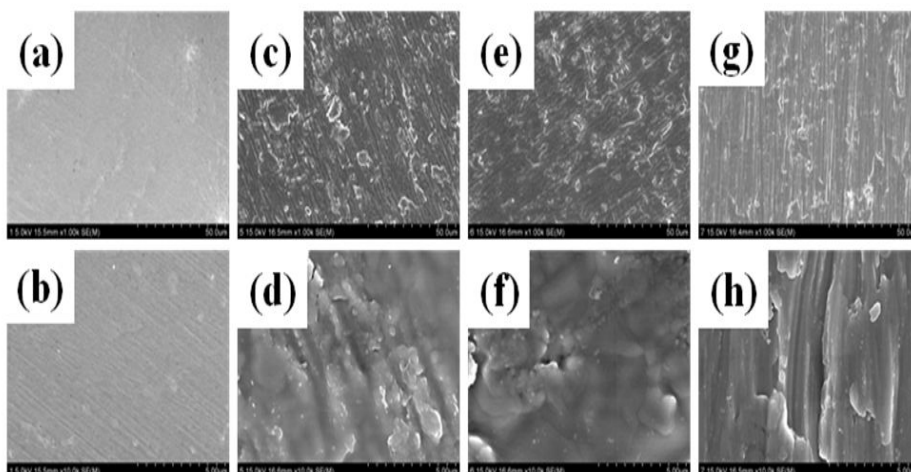


Fig. 7. SEM images of (a, b) Ti, (c, d) Ti/NH₂, (e, f) Ti/NH₂/CMCH, and (g, h) Ti/NH₂/CMCH/HA.

Sample	Element atomic (%)				Element ratios		
	Ti	C	N	O	C/N	C/O	O/N
Ti	100	-	-	-	-	-	-
Ti/NH ₂	35	46.7	18.3	-	2.58	-	-
Ti/NH ₂ /CMCH	24.4	36	12.8	26.8	2.82	1.34	2.09
Ti/NH ₂ /CMCH/HA	24.3	32.3	10.3	33.1	3.12	0.97	3.21

Table. 1. Surface elemental composition

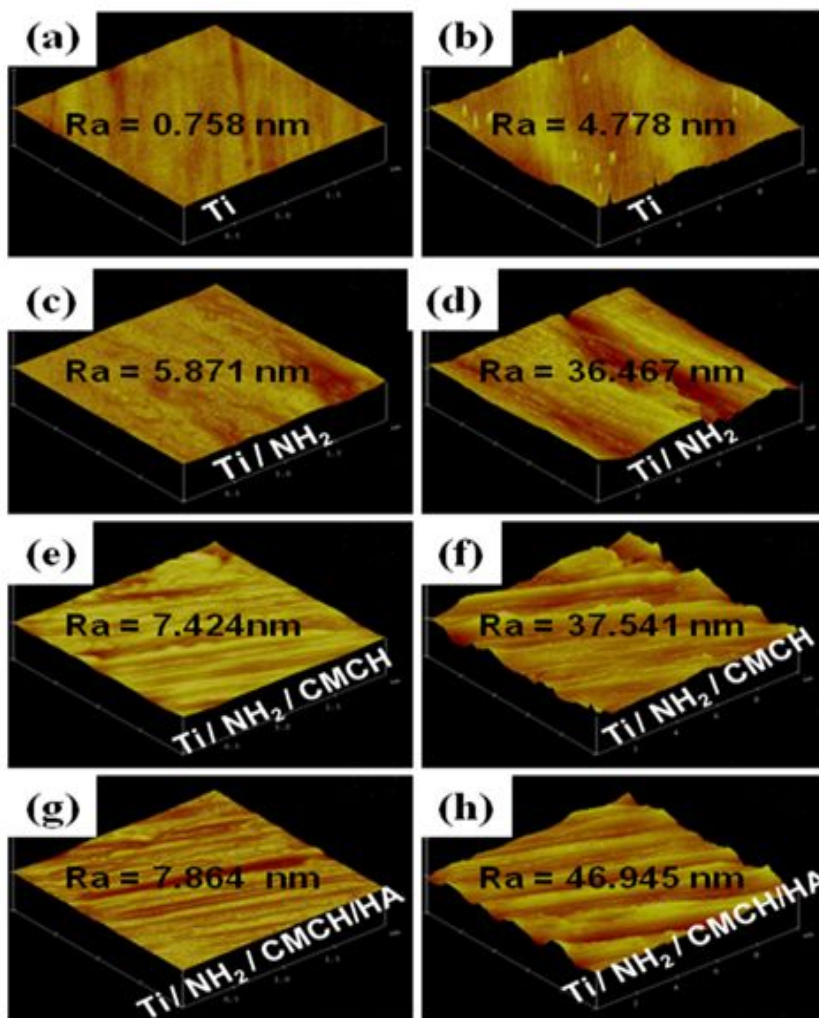


Fig. 8. AFM images of (a, b) Ti (c, d) Ti/NH₂, (e, f) Ti/NH₂/CMCH and (g, h) Ti/NH₂/CMCH/HA

제 3절 *In vitro* 실험을 통한 생물학적 영향 평가

개질된 표면에 대한 MG 63 세포 부착력 및 증식력에 관한 평가는 MTT 분석법을 통해 조사하였다. Ti, Ti/NH₂, Ti/NH₂/CMCH, Ti/NH₂/CMCH/HA를 실험그룹으로 사용하였고 조직배양용기를 대조군 그룹으로 사용하여 실험을 행하였다. 세포의 생존률 및 증식률은 미토콘드리아 활성법과 직접 연관이 있는 MTT 방법을 통해 조사해보았다. MG 63의 세포 생존률은 각각 1일, 3일, 6일동안 배양하여 Fig. 9에 나타내었다. MTT 분석 결과 생체활성물질인 CMCH나 HA를 고정화함으로써 상업용 티타늄에 비해 세포의 초기 부착력에 영향을 나타내고있음을 보여주지만 6일째 되는 결과를 살펴보면 대조군 그룹과 모든 실험그룹의 세포 생존률이 비슷한 결과를 나타내므로 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다.

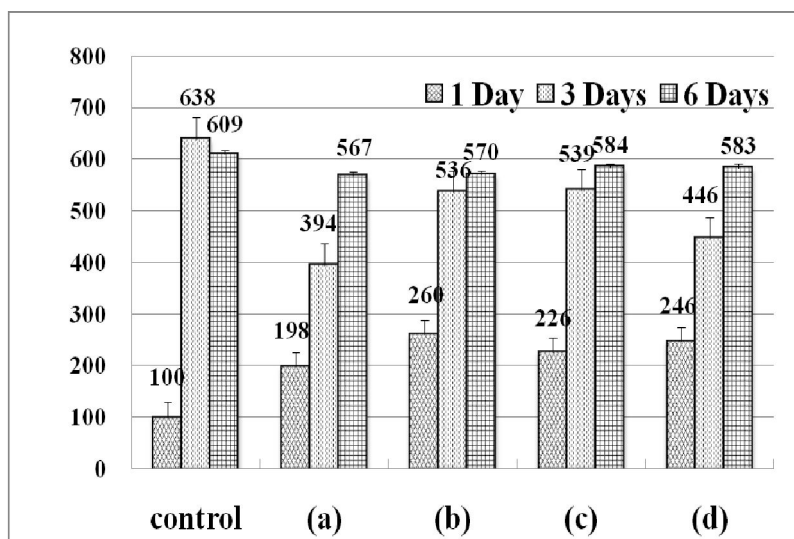


Fig. 9. MTT assay from the MG 63 seeded on control, (a) Ti, (b) Ti/NH₂, (c) Ti/NH₂/CMCH and (d) Ti/NH₂/CMCH/HA for 1 day, 3 days and 6 days

제 5 장 결론

ATR -FTIR을 티타늄 표면을 플라즈마 증합에 의해 아민기 고분자 박막이 생성됨과 CMCH와 HA의 고정화에 따른 공유결합에 의한-CONH 결합이 형성됨을 확인 하였다. SEM 과 AFM 이미지를 통하여 표면의 형상과 거칠기를 관찰 한 결과 고분자 박막이 형성됨을 관찰 할 수 있었다. 이러한 화학적 분석 및 표면형상관찰을 토대로 각각의 실험단계에서 생체활성물질의 고정화는 성공적으로 이루어진 것을 알수 있었다. 개질된 티타늄 표면의 MG 63 세포의 부착력 및 증식률을 알아보기 위해 MTT assay를 실시한 결과 Ti/NH₂/CMCH/HA 표면에서의 초기 부착력이 무처리된 티타늄보다 좋음을 확인 하였으나 시간이 지날수록 모든 실험그룹의 결과에 큰 변화가 없었다. 생물학적 영향평가를 통한 실험결과는 생체활성물질을 고정화한 티타늄 표면이 조골세포에 영향을 미치는 것으로 생각되나 MG63 cell이 암세포주의 일종이므로 뚜렷한 결과 차이를 확인 할 수는 없었다. 따라서 pre-osteoblast cell인 MC3T3-E1을 이용하여 ALP test 및 calcification이나 cell 사진과의 비교를 통하여 정확한 실험을 확인할 수 있으므로 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 제작된 샘플은 향후 임플란트 표면을 생체활성물질로 코팅함으로써 임플란트의 신기능적인 활용 측면에서 많이 이용될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. GA Crawford, N Chawla, K Das, S Bose, A Bandyopadhyay (2007) Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO₂ nanotubes on titanium substrate. *Acta Biomater* 3:359-367.
2. T Kokubo, F Mijaji, HM Kim, T Nakamura (1996) Spontaneous apatite formation on chemically surface treated Ti. *J Am Ceram Soc* 79:1127-1129.
3. T Hanawa, H Ukai, K Murakami, K Asaoka (1995) Structure of surface-modified layers of calcium-ion-implanted Ti-6Al-4V and Ti-56Ni. *Mater Trans JIM* 36:438-444.
4. H Ishizawa, M Fujino, M Ogino (1995) Mechanical and histological investigation of hydrothermally treated and untreated anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res* 29:1459-1468.
5. B Feng, JY Chen, SK Qi, L He, JZ Zhao, XD Zhang (2002) Carbonate apatite coating on titanium induced rapidly by precalcification. *Biomaterials* 23:173-179.
6. G Balasundaram, C Yao, TJ Webster (2008) TiO₂ nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increases osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A* 84:447-453.
7. A Wennerberg, C Hallgren, C Johansson, S Danelli (1998) A

histomorphometric evaluation of screwshaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical Oral Implants Research* 9:11 - 19.

8. DL Cochran, RK Schenk, A Lussi, FL Higginbottom, D Buser (1998) Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acidetched surface: a histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical and Materials Research* 40:1-11.

9. D. Buser, T Nydegger, HP Hirt, DL Cochran, LP Nolte (1998) Removal torque of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 13:611-619.

10. S Rammelt, T Illert, S Bierbaum, D Scharnweber, H Zwipp, W Schneiders (2006) Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27:5561 - 5571.

11. TA Barber, LJ Gamble, DG Castner, KE Healy (2006) In vitro characterization of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) IPNcoated titanium implants. *J Orthop Res* 24:1366 - 1376.

12. JY Lim, SH Kim, JW So (2008) Characterization of tissue engineered scaffold using porcine small intestinal submucosa and hyaluronic acid, *Polymer(Korea)* 32:415-420.

13. HS Nam, JH Kim, JH An (2001) Synthesis of hyaluronic acid scaffold for tissue engineering and evaluation of its drug release behaviors, *Polymer(Korea)* 25:476-485.

14. S Cai, Y Liu, XZ Shu (2005) Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor, *Biomaterials* 26:6054-6067.
15. HS Yoo, EA Lee, JJ Yoon (2005) Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 26:1925-1933.
16. S Monge, A Mas, A Hamzaoui, CM Kassis, JM Desimone, F Schue (2003) Improvement of silicone endothelialization by treatment with allylamine and/or acrylic acid low-pressure plasma, *J Appl Polym Sci* 87:1794-1802.
17. Khuyen, N Quang, JB Kim, Kim, S Byung, S Lee (2009) Influence of allylamine plasma treatment time on the mechanical properties of VGCF/Epoxy *Adv Compos mater* 18:221-232.
16. Y Sun, J Collet, NJ Fullwood, S Mac Neil, S Rimmer (2007) Culture of dermal fibroblasts and protein adsorption on block copolymers of poly(butylmethacrylate-block-(2,3-propanediol-1-methacrylate-stat-ethandiol dimethacrylate)) *Biomaterials* 28:661-670.
17. A Kaminska, A Sionkowska (1996) Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen *Polym Degrad Stabil* 51:19-26.
18. M Prabakaran, RL Reis, JF Mano (2007) Carboxymethyl chitosan-

graft-phosphatidylethanolamine; amphiphilic matrices for controlled drug delivery, *React Funct Polym* 67:43-52.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학	학 번	20087440	과 정	박사
성 명	한글: 이종한 한문 : 李宗漢		영문 : Lee Jong Han		
주 소	경남 하동군 하동읍 읍내리 324-23 서울치과				
연락처	010-9658-8808	E-MAIL	jhanlee@hanmail.net		
논문제목	한글: 티타늄 표면에 히알루론산과 카르복실 메틸 키토산의 고정화가 MG-63 세포에 미치는 영향				
	영어: Effect of immobilization of hyaluronic acid and carboxyl methyl chitosan onto titanium surfaces on MG-63 cell				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제,
기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.
다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가
없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을
경우에는
1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에
의한
권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한
저작물의
전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대()

2009 년 12 월 일

저작자: 이 종 한 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하