creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000239633

2010년 2월
박사학위논문

# 티타늄 표면처리방법이 전조골세포의 반응에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 재 훈

2010년 2월 박사학위논문 티타늄 표면처리방법이 전조골세포의 반응에 미치는 영향 이 재 훈

# 티타늄 표면처리방법이 전조골세포의 반응에 미치는 영향

Effect of Titanium Surface Treatment on Pre-osteoblast Response

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 재 훈

# 티타늄 표면처리방법이 전조골세포의 반응에 미치는 영향

지도교수 강 동 완

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 재 훈

# 이재훈의 박사학위 논문을 인준함

위원장 전)서울대학교 임상교수 윤 창 근 인

위 원 조선대학교 교 수 정 재 헌 인

위 원 조선대학교 교 수 김 병 옥 인

위 원 조선대학교 교 수 김 수 관 인

위 원 조선대학교 교 수 강 동 완 인

2009년 12월 일

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT ····· iv

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 실험 재료 및 방법 ····· 3

Ⅲ. 실험결과 ····· 7

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 13

Ⅴ. 결론 ····· 17

참고문헌 ····· 19

# 표 목 차

Table I. Surface roughness(Ra) ····· 7

# 도 목 차

Fig. 1. SEM images of 4 different titanium surfaces ····· 8

Fig. 2. SEM images of MC3T3-E1 cells cultured for 24 hours on (a) SA70, (b) SA150, (c) SA300, (d) SAmix titanium surfaces ····· 9

Fig. 3. MTT assay (cell proliferation) of MC3T3-E1 cells cultured for 24-and 48-hours on 4 different titanium surfaces ····· 10

Fig. 4. mRNA expression of osteonectin, Runx2 and bone sialoprotein in MC3T3-E1 cells cultured for 24 hours on 4 different titanium surfaces ····· 11

Fig. 5. Mean expression levels relative to the GAPDH for osteonectin and Runx2 analyzed by scanning densitometry ····· 12

# ABSTRACT

## Effect of titanium surface treatment on pre-osteoblast response.

Lee, Jae-Hoon, D.D.S., M.S.D.
Advisor : Prof. Kang, Dong-Wan , D.D.S., M.S.D., Ph. D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

Surface roughness has been shown to be an important factor in the successful osteointegration of titanium implants. At the implant-bone interface, implant surface roughness modulates osteoblast response.

In this study, 4 kinds of titanium(Ti-6Al-4V) discs with different surface treatments were examined. 1) SA70 ; sandblasted with 70 ㎛ $Al_2O_3$particles and acid-etched(with 38% HCL), 2) SA150 ; sandblasted with 150 ㎛ $Al_2O_3$particles and acid-etched, 3) SA300 ; sandblasted with 300 ㎛ $Al_2O_3$particles and acid-etched, 4) SAmix ; sandblasted with mixed-sized $Al_2O_3$particles and acid-etched(3 sizes of particles were mixed with the same proportion). Mouse pre-osteoblasts(MC3T3-E1 cells) were cultured on these titanium discs for 24 and 48 hours.

Cell morphology was analyzed by SEM(S-4300, Hitachi, Japan) and cell proliferation was measured by MTT assay. mRNA expression of osteonectin, Runx2 and bone sialoprotein(BSP) were analyzed by RT-PCR technique.

Ra values were 0.68±0.02 ㎛ (SA70), 1.04±0.01 ㎛ (SA150),

1.79±0.12 ㎛(SA300) and 1.16±0.11 ㎛ (SAmix), respectively.

In SEM, pre-osteoblasts did spread well on all titanium surfaces. Morphology of pre-osteobalsts differed on surface roughness. Pre-osteoblasts cultured on SA70 were thin, flat and covered the surface. Pre-osteoblasts cultured on SA150, SA300 and SAmix showed elongated shapes with irregular extended processes.

In MTT assay, cell proliferation was increased in pre-osteoblasts cultured on SA70 than SA150, SA300.

In RT-PCR analysis, mRNA expression of Osteonectin and Runx2 was increased in pre-osteoblasts cultured on SA150, SA300 than SA70. It was highest in pre-osteoblasts cultured on SA300. SAmix was higher than SA70 and lower than SA150, SA300.

These results indicate that titanium surface roughness affects pre-osteoblast morphology, proliferation and gene expression, and that SA300 (Ra:1.79±0.12㎛) seems to be the most favorable surface inducing increased expression of bone specific protein such as osteonectin and Runx2. Further studies are needed to determine the effect of sand-blasting with mixed-sized particles.

# I. 서 론

임플란트는 가철성 의치의 불편함을 해결해주는 완전 및 부분 무치악의 수복뿐만 아니라, 단일치 수복에 이르기까지 다양한 임상증례에서 효과적인 치료방법으로 인정받고 있다. 임플란트가 처음 소개되었을 때는 생존율 혹은 성공률에 관심이 있었지만, 점차 기능적인 면 뿐 아니라 심미적인 면도 고려하게 되었고, 치료기간을 짧게 단축하기 위한 노력도 계속되고 있다.

임플란트가 구강 내에서 성공적으로 기능하기 위한 가장 중요한 요소는 골 유착이라고 할 수 있는데, 임플란트와 골 조직과의 직접적인 접촉이 이루어진 상태에서 장기간 유지될 수 있어야 한다[1]. 식립 초기에 골 유착이 성공적으로 이루어지기 위해서는 적절한 혈류공급과 임플란트에 최소한의 유동성이 존재하면서 신생 골조직과의 기계적인 결합이 이루어져야 한다.

Albrektsson 등[2]은 임플란트가 신뢰할 만한 골 유착을 이루기 위해 필요한 조건들로 임플란트 재료의 생체적합성, 임플란트 표면의 형태, 골조직의 상태, 수술방법, 치유기간, 보철물 설계 및 부하 등을 제시했다. 따라서, 빠르고 쉬운 수술방법, 우수한 골 반응, 더 나은 예후, 보철물의 안정성 등의 임상적 요구사항에 맞춰 임플란트 고정체의 설계, 표면처리방법, 지대주 연결방법 등이 지속적으로 개선되고 발전되어 가고 있다[3].

Schwartz 등[4]은 외과적인 방법으로 매식된 임플란트가 골조직 내에서 치유과정을 통해 골 유착을 이루게 되는데, 성공적인 치유과정에 임플란트의 표면특성이 많은 영향을 미친다고 하였다. 표면 특성으로는 표면에너지, 표면 거칠기, 표면 조성, 표면 형태 등의 요소들이 서로 밀접하게 연관되는데, 이 중에서 표면에너지와 표면 거칠기가 중요한 역할을 한다고 하였다.

임플란트의 표면특성을 변화시키기 위해 임플란트 표면에 특정재료를 부착시키는 방법으로 수산화인회석(Hydroxyapatite) 피복, 티타늄 분사피복(titanium plasma spray), bead sintering 등이 사용되고 있고, 임플란트 표면에 흠집을 내어 거칠기를 증가시키는 방법으로 분사(sand-blasting)하는 방법, 산 처리(acid-etching)하는 방법, 분사 후 산 처리하는 방법(Sandblasted with large grit and acid-etched, SLA), 산화법 등이 사용되고 있다[3].

임플란트 표면 특성이 골의 형성 및 유지에 영향을 미치며, 골 유착에 중요한 역할을 한다는 것은 많은 연구들을 통해 보고되었다[5,6]. 거친 표면의 임플란트는 골조직-임플란트 계면의 접촉면적을 넓혀 더 나은 기계적 안정성을 제공하고, 초기 고정을 우수하게 하며, 초기 골 치유과정을 촉진한다고 하였다[7,8,9]. 거친 표면의 임플란트를 사용하게 되면서 임플란트의 조기부하가 가능해져 치료기간을 단축시키게 되었고, 골질이 좋지 않은 부위에서의 예후를 증진시키게 되었다. 또한, 주변 골조직과의 접촉율이 높게 나타났으며, 회전 제거력(removal torque value)측정에서도 매끄러운 표면에 비해 우수한 결과가 보고되었다[10,11].

임플란트와 골조직 계면에서 조골세포에 의해 유도되는 골 형성과정은 세포의 부착, 이동, 증식, 분화, 기질생산, 석회화 등의 복잡한 과정을 통해 일어나게 된다[12,13]. 많은 실험실적 연구들[12-14,17-19]에서 티타늄의 표면 거칠기가 조골세포의 골 형성 과정에 중요한 영향을 미친다고 하였으며, 표면 거칠기가 증가할수록 임플란트 표면에서 골 형성에 유리한 조건들이 조성된다고 하였다[9,30,32]. 표면 거칠기는 조골세포의 부착, 형태 변화, 증식 등에 영향을 미치며[14,15,16], 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase, ALP) 활성도[17,18]와 type I collagen, osteocalcin, matrix gla protein(MGP), osteopontin, bone sialoprotein(BSP)와 같은 세포외기질(ECM)의 생성[12,13,19,20], 그리고, bone morphogenic proteins(BMPs), transforming growth factor-ß (TGF-ß)와 같은 국소인자의 생성[21] 등에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

임플란트 표면의 거칠기를 증가시키는 방법으로 분사 후 산 처리하는 방법이 임상적으로 좋은 결과를 거두고 있다고 보고되고 있으나 분사 처리시 사용되는 $Al_2O_3$입자의 조성에 따라 어떠한 골 반응을 보이는지에 대한 연구가 미비하였다. 이에 본 연구에서는 서로 다른 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사한 후 산 부식 처리한 티타늄 표면(sand-blasted & acid-etched surface)을 분석하여 분사입자의 크기에 따른 티타늄의 표면 거칠기의 정도를 살펴보고, 조골세포의 반응이 양호하게 나타나는 표면 거칠기를 확인해보고자 했으며, 그리고 다양한 크기의 입자를 혼합하여 분사한 표면처리방법에 대한 조골세포의 반응을 분석하고자 하였다.

# Ⅱ. 실험재료 및 방법

## 1. 티타늄 시편 제작

Grade V 티타늄 합금(Ti-6Al-4V)으로 직경 10 mm, 두께 5 mm의 티타늄 디스크를 제작하였다. 서로 다른 크기의 $Al_2O_3$입자를 3.2 bar의 공기압에서 시편과 분사기계를 10 cm의 거리를 두고 분사한 후 38 % HCl로 산 부식(sand-blasted & acid-etched, SA)시켜서 표면 거칠기가 다른 4개 군을 만들었다. 표면처리를 시행한 후, 증류수와 무수 알코올에 담가 초음파 세척하였고, 135℃로 고압 증기멸균 소독하였고, 자외선 처리하여 보관하고 실험시편으로 사용하였다.

- 제1군 (SA 70) : 70 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사한 후 산 부식 처리한 군
- 제2군 (SA 150) : 150 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사한 후 산 부식 처리한 군
- 제3군 (SA 300) : 300 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사한 후 산 부식 처리한 군
- 제4군 (SA mix) : 세 가지 크기의 $Al_2O_3$입자를 같은 비율로 혼합하여 분사한 후 산 부식 처리한 군

## 2. 표면 거칠기 측정

Surfcorder SE 1700(Kosaka Lab., Tokyo, Japan)을 이용하여 티타늄 시편의 표면 거칠기(Ra 값)를 측정하였다. 각 군당 3개의 시편을 무작위로 뽑아 시편 당 5회씩 표면 거칠기를 측정한 후, 평균과 표준편차를 구하였다.

중심선 평균 거칠기(arithmetical average roughness, Ra)는 거칠기 곡선에서 기준길이 전체에 걸쳐 평균선으로부터 벗어나는 모든 봉우리와 골짜기의 편차평균값을 표면 거칠기로 사용한다. 즉, 거칠기 곡선에서 중심선이 평균선으로부터 떨어진 거리가 중심선 평균 거칠기에 해당된다.

또한, 주사전자현미경(S-4300, Hitachi, Japan)으로 티타늄 시편의 표면 구조를 관찰하였다.

## 3. 세포 배양

생쥐의 전조골세포(pre-osteoblast)인 MC3T3-E1 세포주를 10 % FBS (fetal bovine serum, Gibco, USA)과 100 units/㎖의 penicillin, 100 ㎍/㎖의 streptomycin이 함유되고 L-ascorbic acid가 제거된 α-minimum essential media(Gibco, USA)를 이용하여, 2 x 105 cells/㎖로 37 ℃, 5 % CO2 배양기에서 배양하였다.

## 4. 주사전자현미경 관찰

티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포 1.0 x 106 cells/㎖를 24시간 동안 37 ℃, 5 % CO2 배양기에서 배양한 후, 세포의 고유한 형태를 유지하기 위하여 2.5 % paraformaldehyde-glutaraldehyde로 1 시간 고정하고, phosphate buffer(4 ℃, pH 7.2)로 3회 수세한 시료를 1 % osmium tetroxide 고정액으로 2시간 고정하고, 동일한 완충용액으로 3회 세척하였다. 알코올 농도 상승순(50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 %)에 따라 탈수시킨 시료들을 자연건조시킨 다음, sputter coater(E-1030, Hitachi, Japan)를 사용하여 20 ㎚로 백금 도금한 후, 주사전자현미경(S-4300, Hitachi, Japan)으로 10-20 ㎸에서 관찰하였다.

## 5. MTT 분석 (세포증식 분석)

배양된 세포를 trypsin과 EDTA를 이용하여 배양용기에서 분리한 후, STI (soybean trypsin inhibitor, Gibco BRL, USA)용액을 이용하여 trypsin을 중화하였다. 세포 증식을 분석하기 위하여 Promega사의 분석 시약(CellTiter 96 Non-radioactive Cell Proliferation Assay: Promega - #G4000)을 이용하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포 5000 cells/50 ㎕를 24시간, 48시간 동안 37 ℃, 5 % CO2 배양기에서 배양하고, 각각의 시편에 15 ㎕의 dye용액(3-[4,5-dimethylthiazol-2 -yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)을 첨가하였다. 반응액을 37 ℃, 5 % CO2 배양기에서 4시간 동안 배양하고, 100 ㎕의 solubilization solution/

stop 혼합액을 처리하여 반응액을 96-well plate로 옮겨 ELISA reader(μ Quant, Bio-Tek Instrument, USA)로 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

## 6. 역전사 중합효소 연쇄 반응
(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

### 1) total RNA 분리

티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포 2 x 106cells/㎖를 37 ℃, 5 % CO2 배양기에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 Trizol 용액 (Gibco. Cat # 15596-018)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 티타늄 시편에 배양한 MC3T3-E1 세포에 1 ㎖의 Trizol 용액을 처리한 후 세포를 용해시키고 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응액에 0.2 ㎖의 chloroform을 처리하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 4 ℃에서 12,000 x g로 15분간 원심분리하고 상층액을 회수한 후 0.5 ㎖의 isopropanol을 처리하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 4 ℃에서 8분간 12,000 x g로 원심 분리하여 RNA를 침전시키고 1 ㎖의 75 % ethanol로 RNA 침전물을 세척하고 7,500 x g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 RNA를 증류수에 용해하고, spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양과 순도를 측정하였다. 본 실험에서는 순도 (A260/A280) 1.8이상의 RNA를 이용하였다.

### 2) 역전사효소 반응(RT)

먼저 5 ㎕의 total RNA (2 ㎍ RNA, 0.5 ㎍ Oligo(dT), nuclease-free water)을 준비한 후, 70 ℃에서 5분간 반응시키고 4 ℃에 보관하였다. 여기에 15 ㎍의 RT 반응액 (5X reaction buffer : 4.0 ㎕ , MgCl2 (최종 농도 5 mM): 4.8 ㎕ , dNTP mix (최종 농도 0.5 mM): 1.0 ㎕ , Ribonuclease inhibitor: 0.5 ㎕ , 역전사 효소: 1.0 ㎕)과 5 ㎕ 의 total RNA를 혼합하고 25 ℃에서 5분간 반응시켰다. 반응액을 42 ℃에서 1시간 반응시키고, 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 72 ℃에서 15분간 변성시키고 4 ℃에 보관하였다.

3) 중합효소 연쇄반응(PCR)

합성된 cDNA를 증폭시키기 위하여 중합효소 연쇄 반응을 실시하였다. 20 μl의 PCR 반응액을 다음과 같이 준비하였다. Nuclease-free water: 9.8 μl, 10X PCR reaction buffer: 5 μl, $MgCl_2$(최종 농도 2 mM): 1.6 μl, dNTP (최종 농도 0.2 mM) : 0.4 μl, Sense primer (10 pmol): 0.5 μl, Anti-sense primer (10 pmol): 0.5 μl, Taq DNA polymerase (5.0 units): 0.2 μl, RT reaction (cDNA): 2 μl. PCR 반응 조건은 94 ℃에서 2분간 변성시키고 나서, 94 ℃에서 15초/ GAPDH와 Runx2는 58 ℃, osteonectin은 56℃, BSP는 49℃에서 각각 20초/ 72℃에서 30초 과정을 30 cycles 반응시켜 cDNA 를 증폭하고, 72 ℃에서 5분간 반응하여 4 ℃에 보관하였다. PCR 과정은 Gene Amp PCR system 9700(Applied Biosystems)을 이용하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.8 % agarose gel에서 전기영동을 실시하여, ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator (TFX-20, Valber Lourmat Co.)을 이용하여 확인하였다.

7. 통계분석

각 군 간의 비교를 위해 ANOVA(analysis of variance) 및 Scheffe′ test를 시행하였다($p<0.05$).

# Ⅲ. 실험 결과

## 1. 티타늄 시편의 표면 분석

분사입자의 크기가 커질수록 표면 거칠기 값은 더 커졌다. SA 70군이 가장 낮은 Ra값을 나타냈고, SA 300군이 가장 높은 Ra값을 나타냈다. SA mix군은 SA150군보다 약간 큰 값을 나타냈다(Table 1).

주사전자현미경 사진에서도 입자의 크기가 커질수록 더 거친 양상을 보였고, 불규칙한 등방성(isotropic)의 표면구조를 관찰할 수 있었다. 다양한 크기와 깊이를 가진 함요부를 관찰할 수 있었고, 산 부식에 의해 소공들이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 표면처리 과정에서 남아 있을 수 있는 불순물은 모든 군에서 관찰되지 않았다(Fig. 1).

Table 1. Surface roughness(Ra) (unit ;㎛)

| Surface Treatment | Ra value(SD) |
|---|---|
| SA 70 : sandblasted with 70 ㎛ particles & acid etched | 0.68(0.02) |
| SA 150 : sandblasted with 150 ㎛ particles & acid etched | 1.04(0.01) |
| SA 300 : sandblasted with 300 ㎛ particles & acid etched | 1.79(0.12) |
| SA mix : sandblasted with mixed-sized particles & acid etched | 1.16(0.11) |

* Ra : the arithmetic mean value of the surface departures from the mean plane(average height deviation).

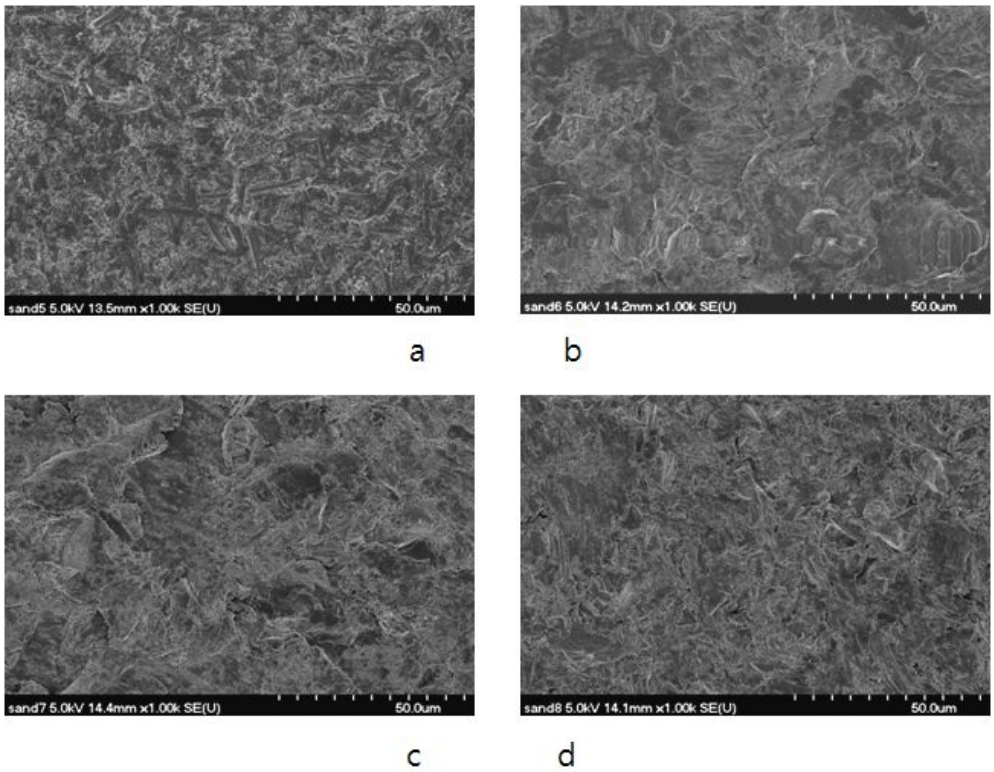


Fig. 1. SEM images of 4 different titanium surfaces. (a) SA 70, (b) SA 150, (c) SA 300, (d) SA mix. (original magnification × 1,000; bar = 5 ㎛)

## 2. 조골세포의 부착 및 형태 (주사전자현미경 관찰)

각 티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포 1.0 x 106 cells/ ml를 24시간 동안 배양하고, 주사전자현미경으로 세포의 부착상태 및 형태를 관찰하였다(Fig. 2).

방추형의 세포들이 서로 합쳐져서 티타늄 표면을 덮고 있었다. SA 70군에서 자란 조골세포는 얇고 편평한 모양이었으며 잘 퍼져 있었고 티타늄 표면을 거의 덮고 있는 상태였다. SA 150군에서 자란 조골세포는 함요부를 가로질러 불규칙한 작은 돌기들이 뻗어 있었고 SA 70군에서 자란 조골세포에 비해 세포가 신장되었고 세포간 간격이 넓어져 티타늄 표면을 덮고 있는 면적이 조금 줄어들어 있는 상태였다. SA 300군에서 자란 조골세포는 돌기들

이 더 길게 뻗어 나가 있었으며 세포의 폭이 더 작아지고 더 길게 신장되었으며 약간 뚱뚱해져 있었고, 세포간 간격은 더 넓어져 있고 티타늄 표면을 덮고 있는 면적이 더 줄어들어 있었다. SA mix군에서 자란 조골세포도 함요부를 가로 질러 돌기들이 뻗어 나가 돌출부에 매달려 티타늄 표면에 잘 부착하고 있었다.

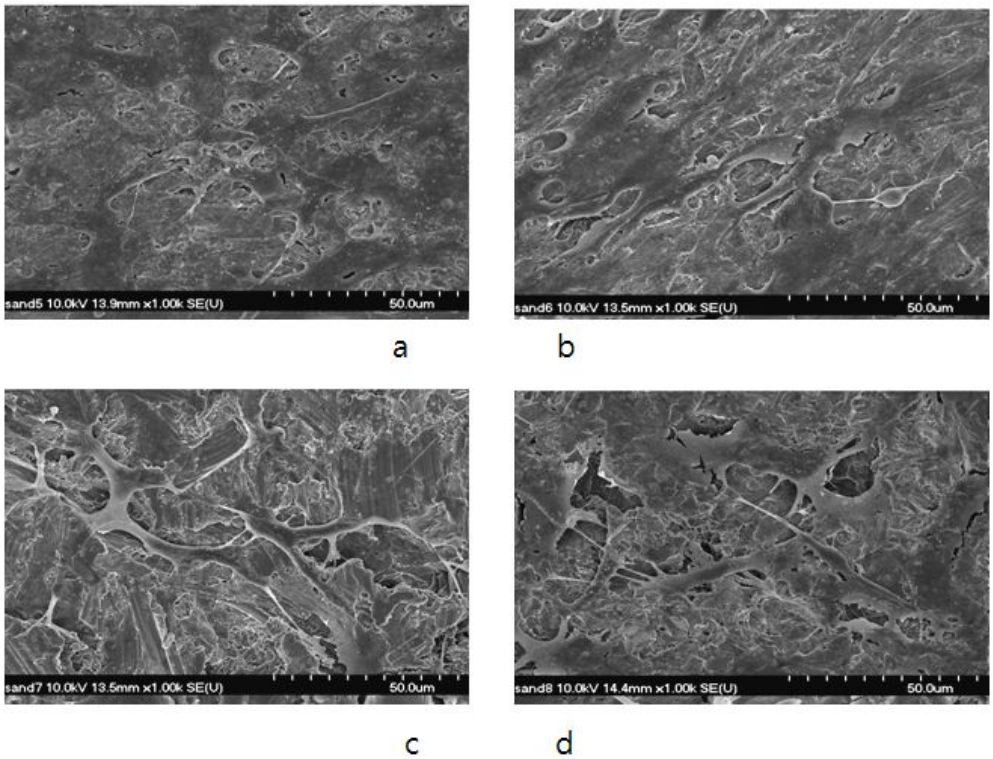


Fig. 2. SEM images of MC3T3-E1 cells cultured for 24 hours on (a) SA 70, (b) SA 150, (c) SA 300, (d) SA mix titanium surfaces. (original magnification × 1,000 ; bar = 5 ㎛)

## 3. MTT 분석 (세포증식 분석)

각 티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포를 24시간, 48시간 동안 배양하고, MTT분석법을 이용하여 세포증식능을 살펴보았다(Fig. 3). 24시간 배양 후

의 결과는 분사입자의 크기가 가장 작은 SA 70군에서 가장 많은 세포증식이 관찰되었으며, SA 70군과 비교하였을 때 SA 150군과 SA 300군은 유의하게 감소되었으며($p<0.05$), SA mix군은 SA 70군과 SA 150군의 중간정도로 증식하였다. SA 150군과 SA 300군 간에는 유의한 차이가 인정되지 않았다($P>0.05$).

48시간 배양 후의 결과는 모든 군에서 24시간 배양 후보다 세포증식이 증가했으며, 군간의 양상은 SA mix군에서 가장 많은 세포증식이 관찰된 것을 제외하고는 24시간 배양 후의 결과와 비슷해서 SA 150군과 SA 300군에서 SA 70군에 비해 세포증식이 유의하게 감소했으며($p<0.05$), SA 300군과 SA 150군 간에는 유의한 차이가 인정되지 않았다($p>0.05$).

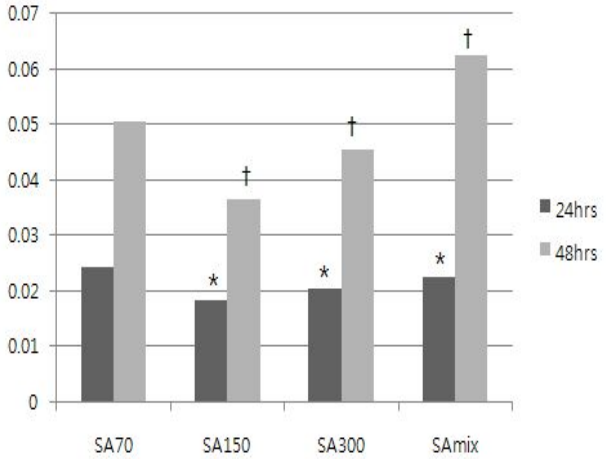


Fig. 3. MTT assay (cell proliferation) of MC3T3-E1 cells cultured for 24 and 48 hours on 4 different titanium surfaces.
* † Significant difference compared with SA 70($P<0.05$).

## 4. 역전사 중합효소 연쇄 반응 분석법을 통한 유전자 발현 관찰

각 티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포를 24시간 동안 배양하고, 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 Runx2, osteonectin, bone sialoprotein(BSP)의 mRNA 발현을 분석하였다(Fig. 4). GAPDH mRNA 발현을 대조군으로 사

용하여, GAPDH와 Runx2, osteonectin, bone sialoprotein 간의 상대적인 명암도(intensity)차이를 비율로 비교하였다(Fig. 5).

osteonectin과 Runx2는 표면 거칠기가 커질수록 더 높게 발현되어 SA 300군에서 자란 조골세포에서 가장 높게 발현되었고 그 다음으로 SA 150군, SA mix군, SA 70군의순서로 낮게 발현되었다. SA 70군에서 자란 조골세포에서 발현된 수준과 비교했을 때, SA 300군과 SA 150군에서 자란 조골세포에서는 확연하게 높게 발현되었다($P<0.05$). SA mix군에서 자란 조골세포는 SA 70군에서 자란 조골세포에서 발현된 수준보다 약간 높게 발현되었다. bone sialoprotein은 SA 300군에서 자란 조골세포에서 약간 높게 발현되긴 했지만, 네 군에서 거의 비슷한 수준으로 발현되었다.

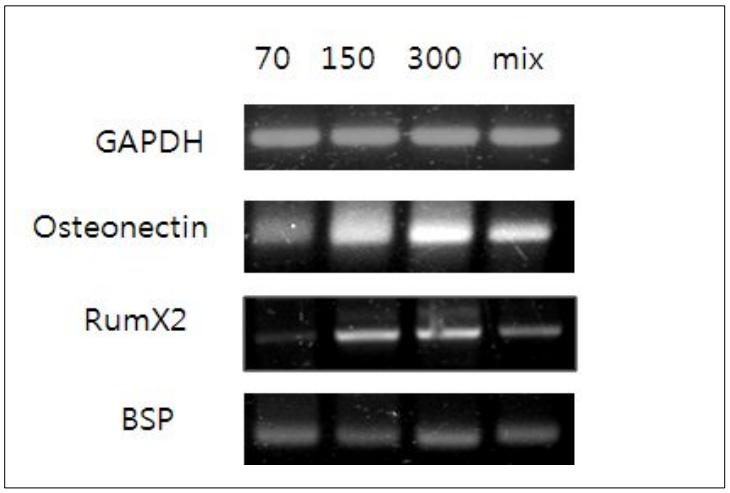


Fig. 4. mRNA expression of osteonectin, Runx2 and BSP(bone sialoprotein) in MC3T3-E1 cells cultured for 24 hours on 4 different titanium surfaces. The mRNA were analyzed by RT-PCR technique.

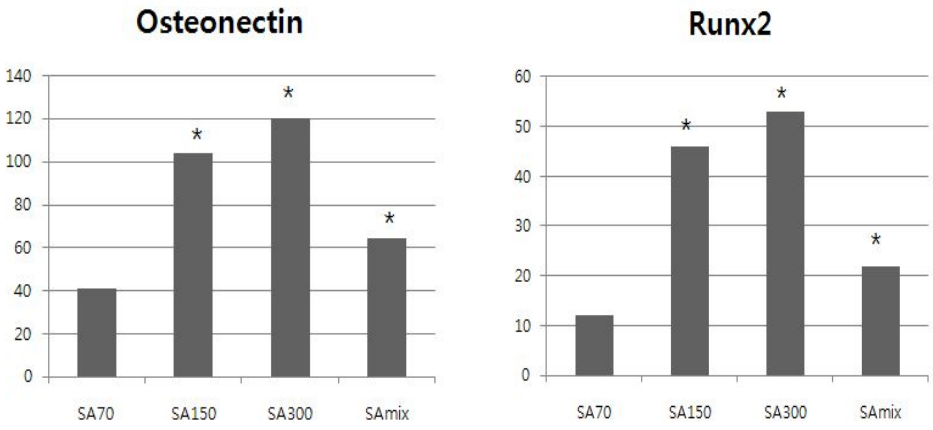


Fig. 5. Mean mRNA expression levels relative to the GAPDH for osteonectin and Runx2 analyzed by scanning densitometry.
* Significant difference compared with SA 70($P<0.05$).

# Ⅳ. 총괄 및 고안

치과 임플란트에서 골 유착은 매우 중요하며, 골유착의 초기단계에서 조골세포가 중요한 역할을 한다. 골 유착의 초기단계에서 티타늄 표면에 조골세포가 어떻게 반응하는지 평가해보기 위한 많은 실험실적 연구들이 시행되어 왔다5,6,22). 임플란트의 표면 특성에 따른 조골세포의 반응에 대한 실험실적 연구는 매우 다양하여, 표면 특성이 조골세포의 부착, 형태, 증식, 분화 등에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다12-21).

MC3T3-E1 세포는 여러 조골세포들 가운데 많이 사용되어 온 세포주 가운데 하나이며, 티타늄 표면에 대한 조골세포의 부착, 증식, 분화 등을 연구하기에 적절한 세포임이 입증되었다22).

본 연구에서는 서로 다른 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사한 후 산 부식 처리한 4개 군의 티타늄 표면에 전조골세포인 MC3T3-E1 세포를 배양하고, 표면처리방법의 차이가 조골세포의 부착, 증식, 유전자 발현 등에서 어떠한 반응을 나타내는지 알아보고자 하였다.

각 티타늄 시편들의 표면 특성을 표면 거칠기 값(Ra value)측정과 주사전자현미경 관찰을 통해 살펴보았다. mechanical contact profilometer (contact stylus instrument)의 일종인 Surfcorder SE 1700(Kosaka Lab., Tokyo, Japan)을 이용하여 표면 거칠기를 분석한 결과, 0.68 ~ 1.79 ㎛의 Ra값을 보였다. 분사한 $Al_2O_3$입자의 크기가 커질수록 티타늄 표면은 더 거칠어졌으며, 주사전자현미경 관찰에서도 분사입자가 커질수록 더 거친 양상을 관찰할 수 있었다. 다양한 크기의 분사입자를 혼합하여 분사하고 산 부식 처리한 SA mix군은 150 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사하고 산 부식 처리한 SA 150군보다 약간 더 큰 표면 거칠기 값을 보였다.

Wennerberg 등23,24,25)은 토끼의 장골에서 시행한 일련의 동물실험들을 통해, 표면 거칠기(height parameter: Ra 또는 Sa)가 1.0 ~ 1.5 ㎛ 인 경우에 현저하게 강한 골 반응이 있었으며 2.0 ㎛ 이상의 표면 거칠기의 경우는 상대적으로 거친 표면에서 이온누출이 증가하여 골 반응을 감소시킨다고 하여, 적절한 표면 거칠기 범위로 1.0 ~ 1.5 ㎛를 제시하였다. 본 실험에 사용한 티타늄 시편 중에서 70 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사하고 산 부식

처리한 SA 70군은 0.68 ± 0.02 ㎛의 표면 거칠기로 이 범위에 미치지 못해 약간 덜 거친 표면이었고, 150 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사하고 산 부식 처리한 SA 150군은 1.04 ± 0.01 ㎛, 300 ㎛ 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사하고 산 부식 처리한 SA 300군은 1.79 ± 0.12 ㎛의 표면 거칠기를 나타내, 분사입자의 크기가 커질수록 표면 거칠기 값은 더 커지는 양상이 관찰되었다. 세 가지 크기의 입자를 같은 비율로 혼합하여 분사하고 산 부식 처리한 SA mix군은 1.16 ± 0.11 ㎛의 표면 거칠기로, SA 150군과 SA 300군의 중간정도의 표면 거칠기를  보였다. 세 가지 크기의 분사입자를 같은 비율로 혼합하여 분사하기 보다는 큰 입자의 비율은 높이고 작은 입자의 비율은 줄여서 혼합하여 분사하는 경우에는 표면 거칠기 값에서 어떤 차이가 관찰되는지 비교해 볼 필요가 있다고 사료되며, 서로 다른 크기의 입자를 혼합하여 동시에 분사하는 방법과 서로 다른 크기의 입자를 순차적으로 분사하는 방법에 따라 표면 거칠기 양상에 어떠한 차이가 관찰되는지도 실험해 볼 필요가 있다고 사료된다. Mustafa 등12)은 거친 표면의 티타늄 표면을 만드는데 분사입자의 크기만 영향을 미치는 것이 아니라, 분사입자의 모양, 파괴인성(fracture toughness), 분사에 적용된 압력 및 속도 등의 요인들도 영향을 미칠 수 있으므로, 이러한 변수들에 대한 실험도 고려해 볼 필요가 있다고 하였다.

표면 거칠기가 다른 4개 군의 티타늄 시편에 MC3T3-E1 세포를 배양하고 주사전자현미경으로 관찰해 본 결과, 모든 군에서 전조골세포들이 티타늄 표면에 잘 부착하고 있었다. 표면 거칠기가 가장 낮은 SA 70군에서는 얇고 편평한 모양의 전조골세포가 잘 퍼져 있었고 티타늄 표면을 거의 덮고 있었으나, 표면 거칠기가 증가할수록 전조골세포는 함요부를 가로지르는 불규칙한 작은 돌기들을 뻗치고 있었고 SA 150군보다 SA 300군에서 돌기들은 더 길게 신장되어 있었다. 세포간 간격은 SA 70군에 비해 표면 거칠기가 큰 군으로 갈수록 더 넓어져서 티타늄 표면을 덮고 있는 면적이 조금씩 줄어들어 있었으며, 세포의 크기도 SA 70군에 비해 다른 군에서 세포가 더 신장되어 폭이 더 작아지고 뚱뚱해지는 양상이 관찰되었다. 이는 티타늄의 표면 거칠기가 전조골세포가 부착하여 퍼지는 양상이나 세포의 형태 변화에 영향을 미친다는 것을 보여주는 실험결과라 하겠다.

MTT 분석법을 이용해서 세포 증식능을 살펴 본 결과, 표면 거칠기와 반비례하여 약간 덜 거친 표면 거칠기를 나타낸 SA 70군에서는 많은 세포증식이 관찰되었고, 상대적으로 더 거친 SA 150군, SA 300군에서는 SA 70군 비해 유의하게 세포증식이 감소하는 것으로 나타났다. Martin 등19)은 인간 골육종에서 추출한 조골세포주(MG63)를 사용한 실험실적 연구에서 표면 거칠기가 증가할수록 조골세포의 증식이 감소했다고 하였는데, MC3T3-E1 세포를 사용하여 배양한 본 실험에서도 같은 결과를 보였다. SA 150군과 SA 300군은 표면 거칠기 값에서는 두 군 간에 큰 차이를 보였지만, 세포증식에서는 두 군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. SA mix군은 24시간 후에는 SA 70군보다 낮은 증식을 보였지만, 48시간 후에는 더 높은 증식을 보였다.

많은 실험실적 연구들에서 표면 거칠기가 증가 할수록 조골세포의 증식은 감소하는 반면 분화는 증가한다고 하여, 표면 거칠기가 증가할수록 임플란트 표면에서 골 형성에 유리한 조건이 조성된다 하였다29,30).

Kieswetter 등21)은 티타늄 표면처리방법이 $PGE_2$, TGF-ß의 생성에 미치는 영향에 대해 실험한 결과, 표면 거칠기가 증가할수록 티타늄 표면에 부착된 조골세포의 수는 감소하였고, $PGE_2$와 TGF-ß의 생성은 더 증가함을 관찰하였고, 이는 활택한 표면에 부착한 세포보다 거친 표면에 부착한 세포가 더 분화된 형태이기 때문일 것이라고 하였다. 일반적으로, 세포 증식의 감소가 분화된 조골세포 표현형질(phenotype)의 발현에 선행되어 일어나며 31), 세포증식의 감소는 세포형태의 변화, 표현형질 발현과 분화를 유발(signaling)하는 것과 연관된다고 하였다4).

역전사 중합효소연쇄반응 분석법을 이용해서 골 형성 관련 단백질들의 mRNA 발현 양상을 살펴보았다. 조골세포의 분화에서 전사(transcription) 과정에 관여하는 단백질인 Runx2(Runt-related transcription factor 2)13)에는 3가지의 isoform이 있는데, 제3형이 생쥐에서 분리된 것이어서 본 실험에서는 제3형 Runx2의 발현상태를 분석하였다31). Runx2는 표면 거칠기가 증가할수록 높게 발현되어 SA 70군에서 자란 전조골세포에 비해 SA 150군과 SA 300군에서 자란 전조골세포에서 유의하게 높게 발현되었고 SA 300군에서 자란 전조골세포에서 가장 높게 발현되었다. SA mix군에서 자란

전조골세포는 SA 70군에서 자란 전조골세포보다는 높았지만, SA 150군과 SA 300군에서 자란 전조골세포보다는 낮게 발현되었다.

골 형성 과정에서 조골세포에서 분비되어 골의 광화, 세포-기질 간의 상호작용, 교원질 결합 등에 작용하는 당단백질(glycoprotein)인 osteonectin 13,32)은 본 실험에서 가장 선명하게 높은 수준으로 발현되었는데, SA 300군에서 자란 전조골세포에서 가장 높은 수준으로 발현되었고, SA 150군과 SA 300군에서 자란 전조골세포에서 SA 70군에서 자란 전조골세포보다 유의하게 높은 수준으로 발현되었다. SA mix군에서 자란 전조골세포에서는 SA 70군에서 자란 전조골세포보다는 높았지만, SA 150군과 SA 300군에서 자란 전조골세포보다는 낮게 발현되었다. BSP는 네 군에서 거의 비슷한 수준으로 발현되었는데, SA 300군에서 약간 희미하게 높게 발현되었다. 이는 티타늄의 표면 거칠기가 전조골세포 표현형질의 발현에 중요한 영향을 미친다는 것을 보여주는 실험결과라 하겠다.

본 실험의 결과, SA 150군과 SA 300군에서 자란 전조골세포가 상대적으로 덜 거친 SA 70군에서 자란 전조골세포에 비해 골 형성 관련 단백질들의 발현이 더 높게 나타났으며, 1.79 ± 0.12㎛의 표면 거칠기를 보인 SA 300군에서 골 형성 관련 단백질의 발현이 가장 높게 나타났다.

한편, SA mix군의 유전자 발현은 SA 70군보다는 양호한 반응을 보였으나, SA 300군과 SA 150군의 발현 정도에는 미치지 못한 것으로 보인다. 앞에서도 언급했듯이, 다양한 크기의 분사입자를 혼합하는 방법에서 같은 비율로 혼합하는 방법보다는 혼합 비율에 변화를 주거나 분사 순서를 바꾸는 방법으로 분사해 본다면 티타늄의 표면 거칠기 값에 변화가 생기면서 조골세포의 반응에서 다른 결과가 나타나지 않을까 추측되며, 이에 대한 추가적인 실험이 필요하리라 사료되었다.

# V. 결 론

서로 다른 크기의 $Al_2O_3$입자를 분사한 후 산 부식 처리한 티타늄 표면에 전조골세포인 MC3T3-E1 세포를 배양하여 이들 표면처리방법들이 조골세포의 반응에 미치는 영향을 비교해 보고자 한 본 실험에서 주사전자현미경 관찰, MTT 분석, 역전사 중합효소 연쇄반응 분석 등을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 티타늄 시편의 표면거칠기(Ra)값은 SA 70군이 0.68 ± 0.02㎛, SA 150군이 1.04 ± 0.01㎛, SA 300군이 1.79 ± 0.12㎛, SA mix군이 1.16 ± 0.11㎛이었다.
2. 주사전자현미경 관찰에서 SA 70군은 편평한 세포들이 넓게 퍼져 있었으며 세포의 부착면적이 더 넓었고, SA 150군, SA 300군, SA mix군에서는 함요부를 가로 질러 세포돌기들이 뻗어 나와 있었고 세포간 간격이 넓어져 세포의 부착면적이 더 줄어들었다.
3. MTT 분석에서 24시간 후에는 SA 70군에 비해 SA 150, SA 300, SA mix군에서 유의하게 세포증식이 감소되었다($p<0.05$). 48시간 후에는 SA 70군에 비해 SA 150군, SA 300군에서 유의하게 세포증식이 감소되었고, SA mix군에서는 SA 70군보다 약간 증가하였다($p<0.05$).
4. 역전사 중합효소연쇄반응 분석에서 osteonectin과 Runx2는 SA 300군에서 자란 전조골세포에서 가장 높게 발현되었고, 그 다음으로 SA 150군, SA mix군, SA 70군의 순서로 낮게 발현되었다($p<0.05$). bone sialoprotein은 네 군에서 거의 비슷한 수준으로 발현되었다.

본 실험의 결과 티타늄의 표면 거칠기가 전조골세포의 부착, 증식, 유전자 발현에 중요한 영향을 미치며, 표면 거칠기가 증가할수록 전조골세포의 증식은 감소되고, 유전자 발현은 증가하는 경향이 있다는 것을 확인할 수 있었다. osteonectin, Runx2와 같은 골 형성 단백질이 가장 뚜렷하게 발현된 군은 1.79 ± 0.12 ㎛의 표면 거칠기 값을 보인 SA 300군이었다. 다양한 크기의

$Al_2O_3$입자를 혼합하여 분사하는 표면처리방법이 전조골세포의 반응에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 실험이 필요하리라 사료되었다.

# Ⅵ. 참고 문헌


1. Zarb GA, Albrektsson T. Osseointegration-A requiem for the periodontal ligament? Editorial Int J Periodont Restorative Dent 1991;11:88-91.
2. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficiency of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. Int J Oral Maxillofac Implants 1986;1:11-25.
3. Kim YG, Hwang JW. Controversy in dental implant. Koonja Publ 2004. 4. Schwartz Z, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Bone regulating mechanism on implant surfaces. Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology, Implant Dentistry 1999;41-54.
5. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. J Prosthet Dent 2000;84:522-534.
6. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res 1991;25:889-902.
7. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. Bone 1997;21:507-514.
8. Hansson S, Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone anchored implants. A mathematical model. J Biomech 1999;32:829-836.
9. Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. Biomaterials 2005;26:1837-1847.

10. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Kroll JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw shaped titanium implants with three different surface topographies. Clin Oral Implants Res 1995;6:24-30.
11. Buser D, Nydegger T, Hirt H, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. Int J Oral Maxillofac Implants 1998;13:611-619.
12. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of $TiO_2$ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. Clin Oral Impl Res 2001;12:515-525.
13. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Belcastro S, Guerra M, Calvitti M, Lilli C, Calvi EM, Locci P. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants 2006;21:719-725.
14. Kim HJ, Kim SH, Kim MS, Lee EJ, Oh HG, Oh WM, Park SW, Kim WJ, Lee GJ, Choi NG, Koh JT, Dinh DB, Hardin RR, Johnson K, Sylvia VL, Schmitz JP, Dean DD. Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. J Biomed Mater Res 2005;74:366-373.
15. Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to the dental implants of different surface characteristics. Int J Oral Maxillofac Implants 2001;16:627-636.
16. Brugge PJ, Jansen JA. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. Biomaterals 2002;23:3269-3277.
17. Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, Macaluso GM. Comparison of human mandibular osteoblasts

grown on two commercially available titanium implant surfaces. J Periodontol 2005;76:364-372.

18. Guizzardi S, Galli C, Martini D, Belletti S, Tinti A, Raspanti M, Taddei P, Ruggeri A, Scandroglio R. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. J Periodontol 2004;75:273-282.
19. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). J Biomed Mater Res 1995;29:389-401.
20. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effect of fluoride-modified titanium surface on osteoblast proliferation and gene expression. Int J Oral Maxillofac Implants 2006;21:203-211.
21. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. J Biomed Master Res 1996;32;55-63.
22. Shi GS, Ren LF, Wang LZ, Lin HS, Wang SB, Tong YQ. $H_2O_2$ /HCl and heat-treated Ti-6Al-4V stimulates pre-osteoblast proliferation and differentiation. Oral Surg Oral Med Oral Patho Oral Radio Endod 2009;108;368-375.
23. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. Int J Oral Maxillofac Implants 1996:11:38-45.
24. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. Clin Oral Implants Res 1998;9:11-19.

25. Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants 2000;15:331-344.
26. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relations in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J of cellular physiology 1990;143:420-430.
27. Martin JY, Dean DD, Cochran DL, Simpson J, Boyan BD, Schwartz Z. Proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63) cultured on previously used titanium surfaces. Clin Oral Implants Res 1996;7:27-37.
28. Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann HP. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. Biomaterials 2004;25:625-631.
29. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. Biomaterials 1998;19:2219-2232.
30. Lossdörfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. J Biomed Mater Res 2004;70:361-369.
31. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. Front Biosci 2007;12:3068-3092.
32. Ku CH, Pioletti DP, Browne M, Gregson PJ. Effect of different Ti-6Al-4V surface treatment on osteoblasts behaviour. Biomaterials 2002;23:1447-1454.

# 저작물 이용 허락서

| 학 과 | 치의학과 | 학 번 | 20067596 | 과 정 | 박사 |
|---|---|---|---|---|---|
| 성 명 | 한글: 이 재 훈 한문 : 李 在 勳 영문 : Lee Jae Hoon | | | | |
| 주 소 | 광주광역시 북구 일곡동 821-1 일곡부부치과의원 | | | | |
| 연락처 | 010-6244-7321 | E-MAIL | duodent@live.co.kr | | |
| 논문제목 | 한글 : 티타늄 표면처리방법이 전조골세포의 반응에 미치는 영향<br>영문 : Effect of titanium surface treatment on pre-osteobalst response | | | | |

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 의사표시가 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( ○ ) 반대( )**

2010년 2월 일

저작자: 이 재 훈 (서명 또는 인)

## 조선대학교 총장 귀하