[UCI]I804:24011-200000241409

2011년 2월

碩士學位論文

티타늄 나노메시 표면처리에 의한 MC3T3-E1세포의 초기부착에 관한 연구

조선대학교 대학원

치의학과

박 성 열

티타늄 나노메시 표면처리에 의한 MC3T3-E1세포의 초기부착에 관한 연구

Study on Initial Adhesion of MC3T3-E1 Cell on the Nano-mesh Titanium Surface

2011年 2月 25日

조선대학교 대학원

치의학과

박 성 열

티타늄 나노메시 표면처리에 의한 MC3T3-E1세포의 초기부착에 관한 연구

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위 논문으로 제출함.

2010年 11月

조선대학교 대학원

치의학과

박 성 열

박성열의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최 한 철 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2010年 11月 日

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF FIGURES ii
ABSTRACT iii

제 1장 서 론 1

제 2장 실험재료 및 방법 3
제 1절 티타늄 시편 3
제 2절 TiO_2 나노메시 표면제조 4
제 3절 표면분석 4
제 4절 MC3T3-E1 세포배양 6
제 5절 MC3T3-E1 세포고정화 7

제 3장 실험결과 9
제 1절 TiO_2 나노메시 표면분석 9
제 2절 MC3T3-E1 세포 초기부착 12

제 4장 고찰 16

제 5장 결론 17

참 고 문 헌 18

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Preparation scheme of TiO_2 nano-mesh surface. 3

Fig. 2. FE-SEM micrograph of TiO_2 nano-mesh surfaces; (a) low magnification, (b) high magnification. 6

Fig. 3. TF-XRD pattern of CP-Ti and TiO_2 nano-mesh surfaces. 7

Fig. 4. MC3T3-E1 cell morphorologies on the CP-Ti surface and nano-mesh surface for various culture time; (a), (b): 20min, (c), (d): 40min, (e), (f): 60 min. 9

Fig. 5. MC3T3-E1 cell morphorologies on the (a) CP-Ti surface and (b) nano-mesh surface for 20 min culturing time. 10

Fig. 6. MC3T3-E1 cell morphorologies on the (a) CP-Ti surface and (b) nano-mesh surface for 60 min culturing time. 10

ABSTRACT

Study on Initial Adhesion of MC3T3-E1 Cell on the Nano-mesh Titanium Surface

Sung-Wul Park, D.D.S, M.S.D
Director : Prof. Yeong-Mu Ko, Ph.D., DDS
Department of Dental Science
Graduate School of Chosun University

Recently, biocompatibility report revealed that the TiO_2 nano-mesh structure has much higher cells colonization than the native TiO_2 on Titanium (Ti) surface. TiO_2 nano-mesh surface could be provided by alkali-treatment. Surface morphology and chemical composition of samples were characterized by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and thin film X-ray diffraction (TF-XRD). The surface of nano-mesh formed on the Ti was contained mainly anatase TiO_2. The changes of MC3T3-E1 cell morphology were observed by FE-SEM at initial adhesion stage of cell culturing time 20, 40 and 60 min. Cell spreading on the untreated Ti surface had extensive area than that of TiO_2 nano-mesh surface after cell culturing time 20 and 40 min. However, after culturing time 60 min, control and experiment group was similar to cell shape and spreading area. These results revealed that TiO_2 nano-mesh surface had negative affect on MC3T3-E1 cell morphology in the initial adhesion.

제 1 장 서 론

티타늄(Ti)금속은 우수한 기계적 특성, 내 부식성 및 생체친화성 때문에 치과 및 정형외과 임플란트 재료로 널리 이용되어져 왔다.[1-4] 티타늄표면은 공기 중에 노출 되었을 때는 치밀한 박막형태의 보호 산화층 (주로 이산화 티타늄; TiO_2)이 빠르게 형성된다. 이러한 산화막은 뛰어난 내 부식성과 생체적합특성을 갖는다. 티타늄 임플란트가 인체에 이식될 때, 주위조직과 직접적으로 TiO_2막이 접촉한다. 이러한 이유 때문에 티타늄 임플란트의 생체적합성은 표면형상, 화학조성, 미세구조와 같은 표면 산화막의 특성에 의존한다. 티타늄을 현재 임상에서 널리 사용하고 있지만, 풀리지 않은 몇 가지 문제점을 안고 있다. 예를 들면, 티타늄 표면에 생성된 이산화 티타늄 산화막의 보호기능은 불소이온에 의하여 파괴될 수 있고, 티타늄 금속과 접촉할 때 환자들은 알러지 반응과 조직변색을 보일 것이다.[5-7]

치과용 임플란트 시술 실패의 일부는 임플란트 표면특성과 관련이 있다.[8-12] 그러므로 적절한 임플란트 표면처리는 성공적인 치과용 임플란트 시스템에서 중요한 역할을 한다고 생각 할 수 있다. 체외실험연구에서 티타늄 표면형상은 조골모 세포의 분화, 증식, 부착과 같은 세포-생체재료 상호반응의 각각의 단계에 영향을 미친다고 제시하였다.[13,14] 조골모세포의 초기부착 후에 세포는 퍼지고 살고있는 환경에 반응하여 변화한다. 여러 연구자들은 즉, 형태학적 또는 구조적 특징에 집중한 각각 다른 방법으로 제조된 표면에서 배양된 조골세포의 거동에 대하여 보고하였다.

생물학적 조직과 임플란트 사이에 계면반응을 향상시키기 위하여 여러 가지 방법들이 사용되었다. 티타늄 임플란트에 대한 표면처리법 중에서, 표면형상개질은 임플란트에 세포반응을 향상시키는데 사용되어왔다. 조골모 세포는 표면 개질된 티타늄금속에 잘 부착하고 스프레딩 된다. 이러한 세포들은 금속표면의 기공 속으로 성장하고 세포외기질(extracellular matrix)을 형성하는 것을 관찰 할 수 있다.[15] 티타늄 임플란트 표면의 적당한 다공성 구조는 생체적합성이 중요한 관건 일 때는 매우 결정적인 역할을 한다. 그러므로 많은 연구자들은 이상적인 생물학적 반응을 얻어내기 위하여 다공성 티타늄

임플란트 표면에 만드는데 사용되는 방법들을 연구해 왔다.[16-18] 연구된 방법 중에 하나는 티타늄금속을 알칼리용액에 60℃, 24시간동안 침적하고, 이를 다시 600℃, 1시간동안 열처리 하는 것이다. 이 과정에서 다공성 티타늄 표면에 소듐 티타네이트(sodium titanate)막이 형성되었고, 이러한 소듐 티타네이트는 유사체액(simulated body fluid)에서 골 모 아파타이트를 유도한다. 이 방법으로 티타늄 표면에 생체활성이 우수한 조대 다공성 표면막이 제조 되었다.[16] 또한 특별한 화학적 그리고 열처리를 수행한 후에 유사한 기공, 생체활성이 우수한 티타늄금속이 개발 할 수 있다는 연구가 밝혀졌다.[17,18] 그러나 생체활성이 우수한 다공성 티타늄을 제조하기 위하여 대부분 침적, 화학적 또는 열처리과정은 비교적 복잡하고 시간이 많이 소요된다. 최근에 전기 화학적방법이 의료용 임플란트 용도로 다공성 티타늄 금속을 제조하기위한 강력한 대안으로서 연구되고 있다. [19-21] 전기 화학적방법은 불소용액에서 티타늄표면에 자기 조직된(self-organized) 그리고 자기 정렬된(self-ordered) TiO_2 나노튜브를 제조하는데 사용되어 왔다.[22,23] 체외에서 진행하는 세포적합성 보고서는 나노 구조를 갖는 티타늄 표면이 종래의 티타늄 표면보다 더욱더 높은 세포 (쥐 상피세포 L929) 군집을 형성한다고 밝혔다.[24] 그러나 전기 화학적방법 또는 알칼리처리로 제조된 다공성 또는 나노-스케일 티타늄표면에 대한 생체 내 그리고 생체 외적인 세포반응에 대한 종합적인 연구보고는 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 알칼리 처리를 이용하여 티타늄표면에 다공성 TiO_2 나노 그물망구조를 제조하고 그 표면이 조골모 세포(MC3T3-E1)의 초기부착, 스프레딩에 미치는 영향을 전자현미경으로 관찰하여 평가하고자 한다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절. 티타늄 시편

본 실험에서는 상업적으로 사용되는 순수 티타늄 원판 (NSC CP-Ti, grade 2, Japan)을 직경 20 mm로 가공하여 시료로 사용하였고, 기계적 연마는 #100, #600, #800, #1200, #2000 grit SiC 연마지로 단계적으로 습식 연마하였다. 연마한 시료는 아세톤과 에탄올을 1:1 비율로 혼합한 용액에 1시간동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수로 세정하여 건조하여 사용하였다

제 2 절. TiO_2 나노메시 표면제조

Fig. 1은 알칼리 처리 공정을 간략히 나타내었다. TiO_2 nano-mesh 표면을 형성하기 위하여 연마와 세척이 끝난 티타늄 원판을 60℃의 5 M NaOH(sodium hydroxide, 99% DAEJUNG Chem., Korea) 용액에 침지한 후 24시간 동안 유지하였다. 알칼리 처리된 시편을 3차 탈 이온수로 세정한 다음 표면의 남아 있는 Na 이온을 제거하기 위하여 80 ℃의 3차 탈 이온수에 48시간동안 침지한 후, 40℃의 진공오븐에서 건조를 실시하였다.

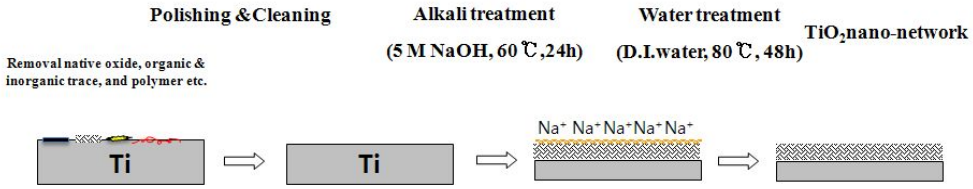

Fig. 1. Preparation scheme of TiO_2 nano-mesh surface

제 3 절. 표면분석

알칼리 처리하여 제조한 TiO_2 나노메시 표면과 조골모세포(MC3T3-E1)의 초기부착 형상은 임계 전자현미경(FE-SEM; S-4800, Hitachi, Japan)를 이용하여 저배율, 고배율로 관찰하였다.

TiO_2 나노메시 표면의 결정구조는 박막 X-ray 회절분석기(TF-XRD; X'pert Philips, Netherlands)를 이용하여 분석하였다.

제 4 절. MC3T3-E1 세포배양

마우스 두개골에서 유래된 조골 모세포인 MC3T3-E1 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection; CRL-2593)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양은 α-MEM(Alpha Minimum Essential Medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine sereum (FBS; PAA Laboratoris. Inc A15-751)과 항생제인 amphotericin(Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO_2가 공급되는 37℃ CO_2 incubator(MCO-15 AC, Sanyo Electric Co. Ltd. Japan)에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

제 5 절. MC3T3-E1 세포 고정화

세포 seeding 후 20분, 40분, 60분이 지나면 시간대 별로 세포의 고정화를 진행했다. 20분이 지난 뒤 배양용기의 배양액을 모두 제거하고 DPBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} free phosphate-buffered saline)를 이용하여 2회 세척을 해주었다. 전 고정액으로는 paraformaldehyde와 glutaraldehyde의 혼합용액을 2.5%로 만들어서 사용했는데 sodium cacodylate(ph 7.4) buffer를 이용하여 제조해 주었다. 세척 후 2.5%의 paraformaldehyde와 glutaraldehyde의 혼합용액 을 well 당 500*u*l 씩 첨가하여 3시간동안 실온에서 전 고정을 수행하였다. 3시간 후 DPBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} free phosphate-buffered saline)를 이용하여 세척하여 주는데 well 당 DPBS를 500*u*l 씩 넣어준 후 전 고정액을 완전히 제거하기 위해 10분 동안 담궈 둔 후 세척을 진행한다. 1%osmium tetroxide를 사용하여 후 고정을 수행하며 1% osmium tetroxide 역시 500*u*l 씩 well에 첨가하여 30분 동안 실온에 두었다. 30분이 지나면 DPBS를 이용하여 10분 동안 세척을 진행하였고 그 다음 탈수의 과정으로 넘어갔다. 탈수는 series ethanol 용액을 이용하여 진행했다. 고순도의 ethanol을 준비하여 70%, 90%, 95% 100% ethanol를 제조한 후 각 농도별로 5분 동안 침지시킨 후 ethanol를 제거했다. 마지막 100% ethanol를 이용한 탈수는 2회 진행을 하였다. 마지막 건조를 위하여 HMDS(Hexamethyldisilazane)를 사용하였으면 well당 500ul를 첨가하여 10분동안 담궈둔 후 HMDS를 제거하였다. 이러한 고정화 과정 후 실험시편은 새로운 배양접시에 옮겨주는데 마른 거즈를 이용하여 시편의 뒷부분에 남아있는 시약을 완전히 제거했다. SEM(scanning electron microscope) 촬영 전까지 수분 제거를 위하여 NaOH 알갱이를 주변에 배치하여 두었다. 40분, 60분 배양해 놓은 세포들도 시간이 되면 같은 방법으로 고정화를 진행하였고 SEM를 통하여 표면의 세포들의 형상을 관찰하였다.

제 3 장 실험결과

제 1 절. TiO_2 나노메시 표면분석

Fig. 2는 TiO_2 나노메시 표면의 전자현미경으로 관찰한 사진이다. (a)는 저배율로 관찰한 표면이고, (b)는 고배율로 관찰한 표면이다. 무 처리 티타늄표면은 편평한 형태를 보이는 반면에 알칼리 처리한 나노메시는 다공성 표면구조를 보이는 것을 알 수 있었다. 자세히 관찰하면, 나노크기의 기공이 층층히 겹겹으로 그물망처럼 쌓여있는 형상을 보여주고 있다. 나노기공의 평균 크기는 약 100±30 ㎚ 정도이며, 나노메시의 막 두께는 1.5±0.3 ㎛로 나타났다.

Fig. 3은 박막 X-ray 회절분석기를 이용하여 2θ 20° 에서 45° 까지의 회절피크를 나타내었다. TiO_2 나노메시 표면은 25도 근처에서 아마타제(anatase)구조의 TiO_2 회절피크를 확인 할 수 있었다. 무 처리 티타늄표면에 비하여 티타늄 결정피크의 세기가 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들로부터 순수 티타늄표면에 강알칼리 처리 후 다공성 TiO_2 아나타제 구조의 산화막이 생성된 것을 알 수 있었다.

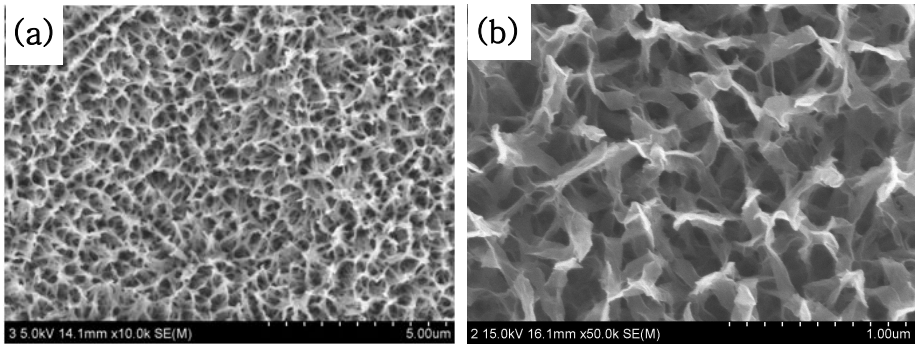

Fig. 2. FE-SEM micrograph of TiO_2 nano-mesh surfaces; (a) lowmagnification, (b) high magnification.

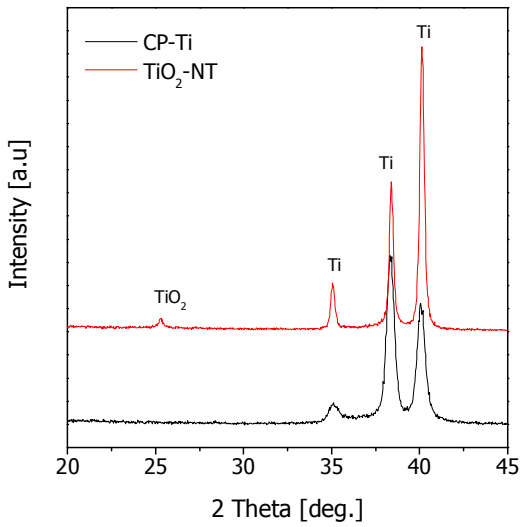

Fig. 3. TF-XRD pattern of CP-Ti and TiO_2 nano-mesh surface.

제 2 절. MC3T3-E1 세포 초기부착

Fig. 5는 대조군(무 처리 티타늄표면)과 실험군(TiO_2 나노메시 티타늄표면)에서 MC3T3-E1세포가 20분, 40분 그리고 60분 동안 배양시간의 변화에 따라 MC3T3-E1 세포의 초기부착 형태를 전자현미경으로 관찰한 사진이다. 배양시간이 경과함에 따라서 세포가 재료표면에 잘 부착된 것을 관찰 할 수 있었다. 20분 배양시간에서는 실험군에 세포가 부착 초기단계로서 사상위족이 뻗어 나가는 것을 관찰 할 수 있었으나, 대조군에서는 이미 세포가 스프레딩되어 세포면적이 커져있음을 관찰 할 수 있었다. 40분도 역시 대조군에서 세포가 많이 스프레딩되어 있는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 60분이 경과하면서 대조군과 실험군이 비슷한 형태로 잘 부착되어 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 60분 이전에서는 대조군에 세포가 잘 부착되어 있는 것으로 보이나, 60분 이후에서는 대조군과 실험군의 별 차이를 알 수 없었다.

Fig. 5와 6은 20분과 60분에서 대조군과 실험군의 세포부착 형태를 확대하여 관찰 한 전자현미경 사진이다. 이 사진결과로 더욱더 뚜렷이 알 수 있듯이 20분에서는 대조군의 세포가 잘 부착되어 있음을 확인 할 수 있고, 60분에서는 대조군과 실험군의 세포가 비슷한 형태로 부착되어 있음을 다시한번 확인 할 수 있었다.

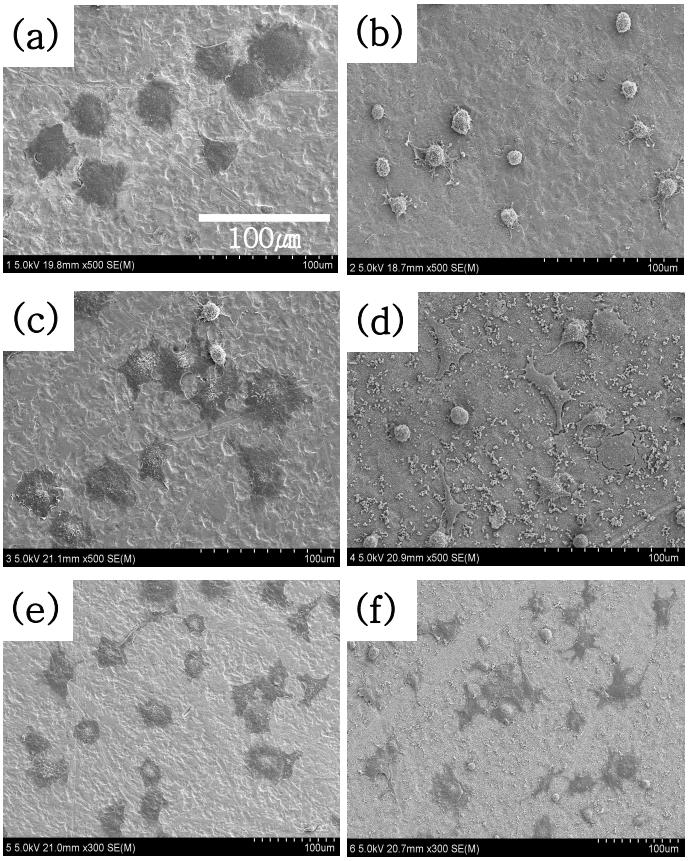

Fig. 4 MC3T3-E1 cell morphorologies on the CP-Ti surface and nano-mesh surface for various culture time; (a), (b): 20min, (c), (d): 40min, (e), (f): 60 min.

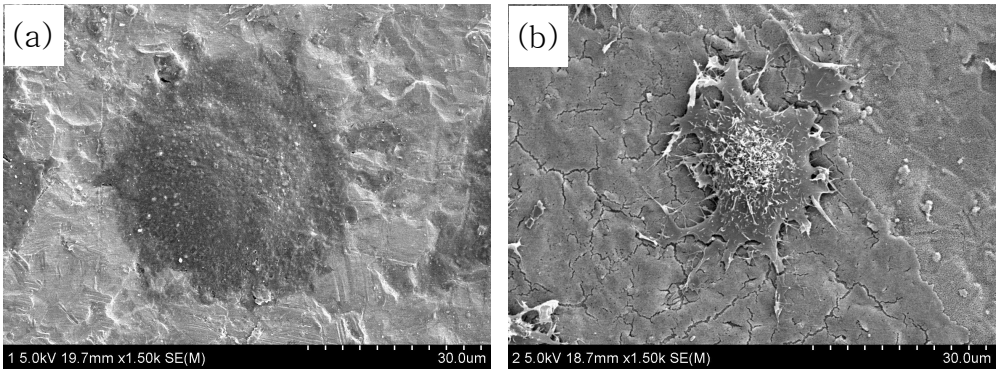

Fig. 5. MC3T3-E1 cell morphorologies on the (a) CP-Ti surface and (b) nano-mesh surface for 20 min culturing time.

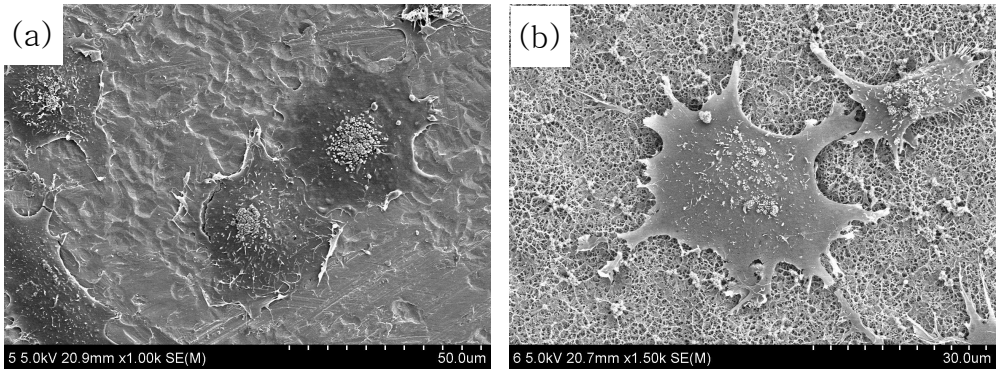

Fig. 6. MC3T3-E1 cell morphorologies on the (a) CP-Ti surface and (b) nano-mesh surface for 60 min culturing time.

제 4 장 고찰

체외실험연구에서 티타늄표면형상은 조골모 세포의 분화, 증식, 부착과 같은 세포-생체재료 상호반응의 각각의 단계에 영향을 미친다고 제시하였다.[13,14] Burridge 등은 조골모세포의 초기부착 후에 세포는 퍼지고 살고있는 환경에 반응하여 변화한다. 세포에 있어서 표면은 초점접촉(focal adhesion)으로 매개되는 부착과정으로서 세포거동을 결정하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다.[25] Clark과 Brugge는 세포에 의해 합성되는 파이브로넥틴(fibronectin)과 콜라겐 1(type 1 collagen)과 같은 세포외 단백질은 "인테그린(integrin)"과 수용체로서 작용하는 "트랜스맴브레인(transmembrane)"과 결합하며, 세포골격에 관련된다고 하였다.[26] 이러한 결합은 세포내부 핵까지 전달되는 신호를 활성화 한다. 그러한 신호들은 세포모양, 이동, 유전자발현, 증식 그리고 분화을 조절한다. Garcia는 2005년에 β1 인테그린이 세포에 강력한 부착분자임을 밝혀냈으며, 이들은 특히 조골세포의 세포의 부착과 스프레딩(spreading)에 아주 중요한 역할을 한다고 하였다.[27,28] 알파 또는 베타 인테그린이 서로 연결되어 있을 때에는 액틴(actin)골격과 관련된 초점접촉을 구성하며, 세포모양과 움직임을 조절한다.

세포부착, 세포모양과 증식 등과 같은 세포대사(cell metabolism)의 많은 면은 에너지공급에 강하게 의존한다. 세포형태의 특징은 세포가 주위환경에 적응하는 과정의 산물이다. 세포막과 세포외 기질사이에 결합이 형성되었을 때, 세포들은 최적의 형태-기능성 설정(morpho-functional setting)을 달성하기 위하여 그들의 세포질을 재 조직화한다. Salido 등은 부착의 초기상태 동안에, 미토콘드리아 네트워크는 특히 초점접촉과 세포연장(cell prolongations)과 같은 필요한 부분에 에너지를 공급하기 위하여 재조직화가 일어난다고 보고하였다.[29]

제 5 장 결론

초기부착은 무 처리 티타늄표면에서 세포의 부착이 좋은 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 배양시간이 경과하면서 60분에서는 무 처리 티타늄 표면이나 나노메시 표면이 비슷하게 MC3T3-E1세포가 잘 부착되었음을 확인 할 수 있었다. 향후 나노메시 형태가 세포초기부착에 미치는 영향에 대하여 더욱더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

[1] Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. Int J Oral Maxillofac Implants 2001;16:323-332.

[2] Olmedo D, Fernandez MM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Macrophages related to dental implant failure. Implant Dent 2003;12:75-80.

[3] Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. Clin Oral Implants Res 2003;14:43-48.

[4] Chiapasco M, Gatti C. Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: a 3- to 8-year prospective study on 328 implants. Clin Implant Dent Relat Res 2003;5:29-38.

[5] Huang HH. Electrochemical impedance spectroscopy study of strained titanium in fluoride media. Electrochim Acta 2002;47:2311-2318.

[6] Huang HH. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. Biomaterials 2002;23:59-63.

[7] Tschernitschek H, Borchers L, Geurtsen W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal-a review. Quintessence Int 2005;36:523-530.

[8] Groessner-Schreiber B, Hannig M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF. Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? Eur J Oral Sci 2004;112:516-522.

[9] Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S. Oxidized titanium implants (Nobel Biocare® TiUniteTM) compared with turned titanium implants (Nobel Biocare® mark IIITM) with respect to implant failure in a group of consecutive patients treated with early functional loading

and two-stage protocol. Clin Oral Implants Res 2005;16:308-312.

[10] Ganeles J, Zollner A, Jackowski J, Ten Bruggenkate C, Beagle J, Guerra F. Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. Clin Oral Implants Res 2008;19:1119-1128.

[11] Yamamichi N, Itose T, Neiva R, Wang HL. Long-term evaluation of implant survival in augmented sinuses: A case series. Int J Periodontics Restorative Dent 2008;28:163-169.

[12] Bugea C, Luongo R, Di Iorio D, Cocchetto R, Celletti R. Bone contact around osseointegrated implants: Histologic analysis of a dual-acid-etched surface implant in a diabetic patient. Int J Periodontics Restorative Dent 2008;28:145-151.

[13] Bowers, K.T, Keller, J.C, Randolph, B.A, Wick, D.G, Michaels, C.M. . Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 1992;7:302-310.

[14] Lincks, J, Boyan, B.D, Blanchard, C.R, Lohmann, C.H, Liu, Y, Cochran, D.L, Dean, D.D, 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.

[15] Assad M, Chernyshov A, Leroux MA, Rivard CH. A new porous titanium-nickel alloy, Part 1: Cytotoxicity and genotoxicity evaluation. Bio-Med Mater Eng 2002;12:225-237.

[16] Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. J Biomed Mater Res 2000;52:553-557.

[17] Nishiguchi S, Fujibayashi S, HM Kim , Kokubo T, Nakamura T. Biology of alkali-and heat-treated titanium implants. J Biomed Mater Res 2003;67A:26-35.

[18] Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. Biomaterials 2004;25:443-450.

[19] Zhu X, Ong JL, Kim S, Kim K. Surface characteristics and structure of anodic oxide films containing Ca and P on a titanium implant material. J Biomed Mater Res 2002;60:333-338.

[20] Rosenberg R, Starosvetsky D, Gotman I. Surface modification of a low modulus Ti-.Nb alloy for use in medical implants. J Mater Sci Lett 2003;1:29-32.

[21] Huang HH, Pan SJ, Lu FH. Surface electrochemical impedance in situ monitoring of cell-cultured titanium with a nano-network surface layer. Scripta Mater 2005;53:1037-1042.

[22] Bauer S, Kleber S, Schmuki P. TiO_2 nanotubes: tailoring the geometry in H_3PO_4/HF electrolytes. Electrochem Commun 2006;8:1321-1325.

[23] Ghicov A, Macak JM, Tsuchiya H, Kunze J, Haeublein V, Frey L, et al. Ion implantation and annealing for an efficient N-doping of TiO_2 nanotubes. Nano Lett 2006;6: 1080-1082.

[24] Valiev RZ, Semenova IP, Latysh VV, Rack H, Lowe TC, Petruzelka J, et al. Nanostructured titanium for biomedical applications. Adv Eng Mater 2008;10:B15-7.

[25] Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C., Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Biol. 1988; 4: 487-525.

[26] Clark, E.A., Brugge, J.S., Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science 1995;268:233-239.

[27]Gronthos, S, Stewart, K, Graves, S.E, Hay, S, Simmons, P.J, Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. J. Bone Miner. Res. 1997;12:1189-1197.

[28]Sinha, R.K, Tuan, R.S, Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. Bone 1996;18:451-457.

[29] Salido, M., Vilches-Perez, J.I., Gonzalez, J.L., Vilches, J., Mitochondrial bioenergetics and distribution in living human osteoblasts grown on implant surfaces. Histol. Histopathol. 2009; 24: 1275-1286.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학	학 번	20087515	과 정	석사
성 명	한글: 박 성 열 한문: 朴 成 烈 영문:Park Sung Wul				
주 소	대전시 서구 도마동 50-6 박치과의원				
연락처	010-4765-5191	E-MAIL	poppey@hanmail.net		
논문제목	한글: 티타늄 나노메시 표면처리에 의한 MC3T3-E1세포의 초기부착에 관한 연구				
	영어: Study on Initial Adhesion of MC3T3-E1 Cell on the Nano-mesh Titanium Surface				

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(O) 반대( )

2010 년 11 월 일

저작자: 박 성 열 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하