

2011년 2월

碩士學位論文

티타늄 표면적 증가가 조골모세포  
Alkaline Phosphatase 활성에  
미치는 영향

조선대학교 대학원

치의학과

김 경 천

티타늄 표면적 증가가 조골모세포  
Alkaline Phosphatase 활성에  
미치는 영향

Effect on Activity of Alkaline Phosphatase of  
Osteoblast Cell with Increasing Titanium Surface Area

2011年 2月 25日

조선대학교 대학원

치의학과

김 경 천

티타늄 표면적 증가가 조골모세포  
Alkaline Phosphatase 활성에  
미치는 영향

지도교수    국    중    기

이 논문을 치의학 석사학위 논문으로 제출함.

2010年 11月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 경 천

# 김경천의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교수    최    한    철    印

위    원    조선대학교    교수    고    영    무    印

위    원    조선대학교    교수    국    중    기    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 .....                  | 4   |
| 제 1절 티타늄 시편 .....                     | 4   |
| 제 2절 TiO <sub>2</sub> 나노메시 표면제조 ..... | 5   |
| 제 3절 표면분석 .....                       | 7   |
| 제 4절 MC3T3-E1 세포배양 .....              | 8   |
| 제 5절 MC3T3-E1 ALP 활성평가 .....          | 9   |
| 제 3장 실험결과 .....                       | 10  |
| 제 1절 TiO <sub>2</sub> 나노메시 표면분석 ..... | 10  |
| 제 2절 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성 .....        | 13  |
| 제 4장 고찰 .....                         | 17  |
| 제 5장 결론 .....                         | 18  |
| 참 고 문 헌 .....                         | 19  |

## LIST OF FIGURES

|   |          |
|---|----------|
| Fig. 1. Preparation scheme of $\text{TiO}_2$ nano-mesh surface  | ..... 6  |
| Fig. 2. FE-SEM images of (a) Ti, (b) $\text{TiO}_2$ NM after immersing 6 hr in NaOH solution,(c) $\text{TiO}_2$ NM immersing 12 hr in NaOH solution and (d) $\text{TiO}_2$ NM immersing 24 hr in NaOH solution. | ..... 11 |
| Fig. 3. TF-XRD patterns of the untreated Ti surfaces and $\text{TiO}_2$ NM surfaces as a function of alkali treated time.   | ..... 12 |
| Fig. 4. ALP activity in the cell matrix of differentiation induced MC3T3-E1 cells on control, glass, Ti, and $\text{TiO}_2$ NM surfaces for 5 days.   | ..... 14 |
| Fig. 5. ALP activity in the cell matrix of differentiation induced MC3T3-E1 cells on control, glass, Ti, and $\text{TiO}_2$ NM surfaces for 10 days.  | ..... 15 |
| Fig. 6. ALP activity in the cell matrix of differentiation induced MC3T3-E1 cells on control, glass, Ti, and $\text{TiO}_2$ NM surfaces for 15 days   | ..... 16 |

# ABSTRACT

## Effect on Activity of Alkaline Phosphatase of Osteoblast Cell with Increasing Titanium Surface Area

Gyoung-Cheon Kim, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Joong-Ki Kook, Ph.D., DDS

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Modifications of implant surface topography and chemistry have proven a means to enhance osseointegration, a process that ensures the stability of bone-contacting devices, including titanium dental implants. In the present study, TiO<sub>2</sub> nano-mesh(TiO<sub>2</sub> NM) were prepared and biologically tested *in vitro*. 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). These results revealed that TiO<sub>2</sub> NM surface had positive affect on activity of alkaline phosphatase after 15 days cell culturing time.

## 제 1 장 서 론

티타늄(Ti)금속은 우수한 기계적 특성, 내 부식성 및 생체친화성 때문에 치과 및 정형외과 임플란트 재료로 널리 이용되어져 왔다.<sup>1-4)</sup> 티타늄표면은 공기 중에 노출 되었을 때는 치밀한 박막형태의 보호 산화층 (주로 이산화 티타늄;  $TiO_2$ )이 빠르게 형성된다. 티타늄은 우수한 내식성과 생체적합성을 나타내며 골과의 결합이 매식재료로 이용되고 있는 여타의 금속재료에 비해 빠르므로 임플란트 재료로서 널리 이용되고 있지만, 자연적으로 생성된 산화 피막은 불균일하고, 치밀하지 못한 등의 단점이 있다. 이 같은 이유로 티타늄 임플란트의 표면에 치밀한 부동태 피막을 형성함과 함께 골과의 결합 촉진 및 응력분산을 유도하기 위해 다양한 표면처리 방법이 도입되고 있다. 기계적인 유지력의 증진을 위해 나사산의 형성, sand blasting 처리, 전기화학적 부식 등이 행해지고 있고, 내식성이 강한 피막의 형성과 함께 골 결합 특성을 개선하기 위해 양극산화, 플라즈마 용사, 알칼리 처리, 이온 주입 등이 행해지고 있다.<sup>5)</sup> 양극산화는 전해질 수용액 중에서 전기화학적으로 처리하여 치밀한 산화피막을 형성하는 방법으로, 내식성과 생체적합성이 우수한 피막을 얻을 수 있지만 전해질 수용액 중에서 불순물의 흡착이 일어나는 단점이 있다.<sup>6)</sup> 플라즈마 용사는 초고온의 플라즈마를 이용하여 티타늄이나 생체활성의 세라믹 입자를 티타늄 기판에 용사처리 하는 것으로, 자유에너지가 높은 다공성의피막을 얻을 수 있지만 기판과의 계면에서 균열이 생성되거나 용착된 입자가 탈락하는 등의 문제점이 노출되었다. 최근 알칼리 금속이온을 포함하는 전해질 수용액 중에서 처리하거나 칼슘이온을 주입하는 방법이 도입되었으며, 골과의 빠른 화학적 결합이 가능한 장점 때문에 이 분야에 많은 관심이 집중되고 있다.<sup>6)</sup> 이러한 산화막은 뛰어난 내 부식성과 생체적합특성을 갖는다. 티타늄 임플란트가 인체에 이식될 때, 주위조직과 직접적으로  $TiO_2$  막이 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 보호



기능은 불소이온에 의하여 파괴될 수 있고, 티타늄 금속과 접촉할 때 환자들은 알러지 반응과 조직변색을 보일 것이다.<sup>5-7)</sup> 치과용 임플란트 시술 실패의 일부는 임플란트 표면특성과 관련이 있다.<sup>8-12)</sup> 그러므로 적절한 임플란트 표면처리는 성공적인 치과용 임플란트 시스템에서 중요한 역할을 한다고 생각할 수 있다.

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.<sup>13)</sup> 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.<sup>14-16)</sup> 연구된 방법 중에 하나는 티타늄금속을 알칼리용액에 60°C, 24시간동안 침적하고, 이를 다시 600°C, 1시간동안 열처리 하는 것이다. 이 과정에서 다공성 티타늄 표면에 소듐 티타네이트 (sodium titanate) 막이 형성되었고, 이러한 소듐 티타네이트 는 유사체액 (simulated body fluid) 에서 골 모 아파타이트를 유도한다. 이 방법으로 티타늄 표면에 생체활성이 우수한 조대 다공성 표면막이 제조 되었다.<sup>14)</sup> 또한 특별한 화학적 그리고 열처리를 수행한 후에 유사한 기공, 생체활성이 우수한 티타늄금속이 개발 할 수 있다는 연구가 밝혀졌다.<sup>15,16)</sup> 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 연구되어 지고 있다.<sup>17-19)</sup> 전기 화학적방법은 불소용액에서 티타늄표면에 자기 조직된(self-organized) 그리고 자기 정렬된(self-ordered) TiO<sub>2</sub> 나노튜브를 제조하는데 사용되어 왔다.<sup>20,21)</sup> 체외에서 진행되는 세포적합성 보고서는 나노 구조를 갖는 티타늄 표면이 종래의 티타늄 표면보다 더욱더 높은 세포 (쥐 상피세포 L929) 군집을 형성한다고 밝혔

다.<sup>22)</sup> 그러나 전기 화학적방법 또는 알칼리처리로 제조된 다공성 또는 나노-스케일 티타늄표면에 대한 생체 내 그리고 생체 외적인 세포반응에 대한 종합적인 정보가 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 알칼리 처리를 이용하여 티타늄표면에 다공성  $TiO_2$  나노 그물망구조를 제조하고 그 표면이 조골모세포 (MC3T3-E1)의 alkaline phosphatase(ALP)의 활성에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

## 제 3 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 mm 디스크 형태로 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 1 시간동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수로 세정하여 건조하여 사용하였다.

## 제 2 절. $TiO_2$ 나노메시 표면 제조

$TiO_2$  나노메시 형성에 관한 실험방법을 Fig. 1에 나타내었다.  $TiO_2$  nano-mesh 표면을 형성하기 위하여 연마와 세척이 끝난 티타늄 원판을  $60^\circ C$  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  $80^\circ C$  의 3차 탈 이온수에 48시간동안 침지한 후,  $40^\circ C$  의 진공오븐에서 건조를 실시하였다.

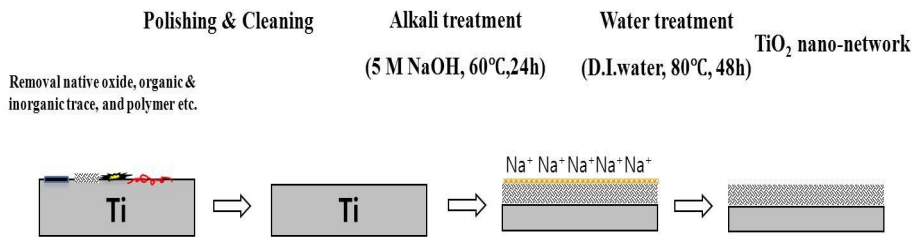


Fig. 1. Preparation scheme of TiO<sub>2</sub> nano-mesh surface.

### 제 3 절. 표면분석

알칼리 처리하여 제조한  $\text{TiO}_2$  나노메시 표면과 조골모세포 (MC3T3-E1)의 초기부착 형상은 임계 전자현미경(FE-SEM; S-4800, Hitachi, Japan)를 이용하여 저배율, 고배율로 관찰하였다.

$\text{TiO}_2$  나노메시 표면의 결정구조는 박막 X-ray 회절분석기(TF-XRD; X' pert Philips, Netherlands)를 이용하여 분석하였다.

#### 제 4 절. MC3T3-E1 세포배양

세포 배양은  $\alpha$ -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 (PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin (Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

## 제 5 절. ALP 활성 평가

MC3T3-E1 세포 배양 24시간 후 분화배지로 교체하고 2일마다 분화배지를 교체한다. 일주일 후 well plate에 cell media 를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 세포 lysis buffer 를 well당 150  $\mu$ l 씩 넣어서 20분간 wise mix를 이용하여 shaking 한다. 세포 스크레퍼 를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출하여 microtube 에 담근 후 4 $^{\circ}$ C 2500rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube 에 옮겨주고 ice에 보관한다. 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 튜브를 배양 후 1.2 N NaOH 600  $\mu$ l 씩 첨가하여 405 nm 에서 흡광도를 측정하여 ALP활성 계산한다. 단백질 정량은 1 mg/ml BSA 을 사용하여 표준용액을 제조한 후 측정하고자하는 단백질을 증류수로 희석하여 20  $\mu$ l 로 제조한다. 실온에서 5분간 배양 후 592 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준정량곡선으로부터 단백질농도를 결정한다.



## 제 4 장 실험결과

### 제 1 절. $TiO_2$ 나노메시 표면분석

Fig. 2 와 Fig. 3 은 표면처리에 따른 나노메시 형성과 피막성장 거동을 관찰하기 위하여 CP-Ti을 이용하여 알칼리 처리 후 표면을 FE-SEM (S-4800, Hitachi)으로 관찰한 결과이다. Fig. 2 (a)는 무처리 CP-Ti, (b) 5 M NaOH 용액으로 6시간 동안 알칼리 처리한 표면으로, 시간이 지날수록 나노메시의 크기와 간격이 조대해지고 두꺼워진 모습을 확인할 수 있었으며, (c) 12시간, (d) 24시간 처리한 결과로 나노메시의 크기와 간격이 규칙적으로 짜여진 망상형 구조가 뚜렷하게 형성됨을 확인 할 수 있었다.

Fig. 3 은 5 M 알칼리 용액 침지 시간에 따른 나노메시의 결정성을 관찰하기 위하여 CP-Ti 과  $TiO_2$  NM 의 표면을 TF-XRD 를 이용하여 관찰한 결과이다. 알칼리 처리시간이 길어짐에 따라 sodium titanate peak 가 증가하고, Ti- $\alpha$  peak는 감소하는 것을 확인하였다.

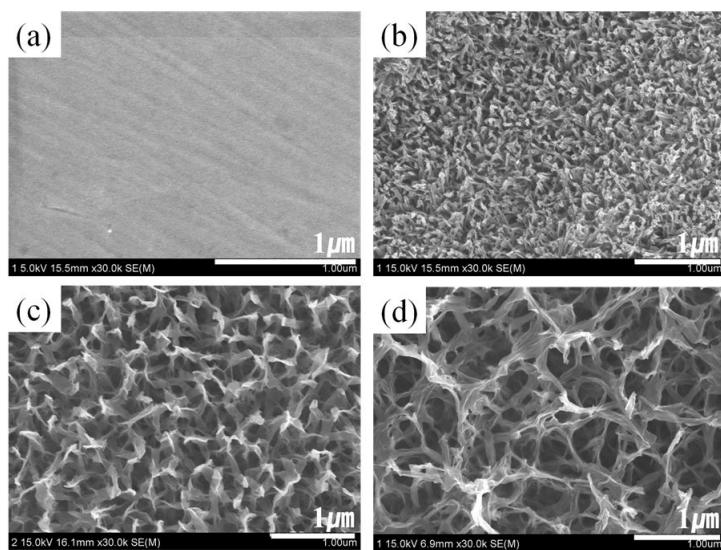


Fig. 2. FE-SEM images of (a) Ti, (b) TiO<sub>2</sub> NM after immersing 6 hr in NaOH solution, (c) TiO<sub>2</sub> NM immersing 12 hr in NaOH solution and (d) TiO<sub>2</sub> NM immersing 24 hr in NaOH solution.

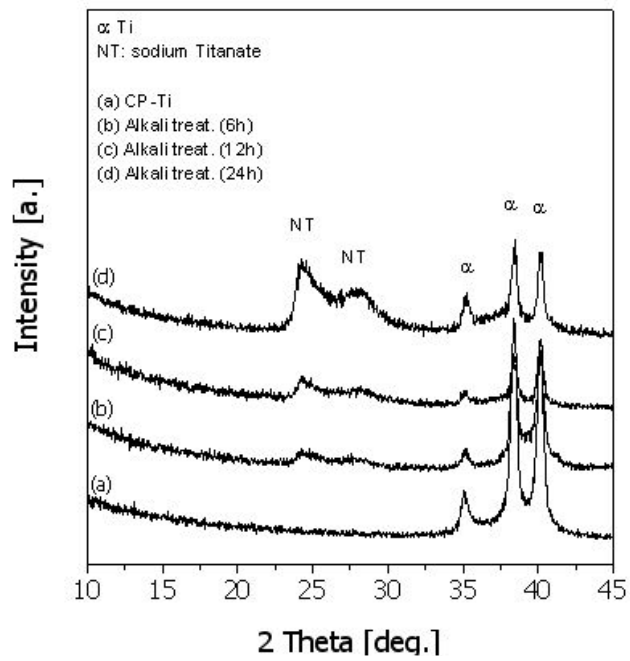


Fig. 3. TF-XRD patterns of the untreated Ti surfaces and  $\text{TiO}_2$  NM surfaces as a function of alkali treated time.

## 제 2 절. MC3T3-E1 세포의 ALP 활성

ALP는 조골세포의 표식자로서 널리 사용된다. 그리고 ALP 활성의 증가는 조골세포의 분화와 관련이 있다. 그러므로 MC3T3-E1 세포와 같은 조골세포의 ALP활성은 배양용기인 대조군과 비교하여 슬라이드 글라스, 티타늄, 나노메시 티타늄 표면에서 분화에 미치는 영향을 판단하기 위해서 측정되었다. Fig. 4, Fig. 5, 그리고 Fig 6 은 세포를 4개의 표면위에서 배양이 되었으며, Fig. 4 와 Fig. 5 의  $TiO_2$  나노메시 를 제외한 세 개의 실험군 표면에서 ALP활성은 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 나노메시 티타늄 표면에서 15일 동안 분화된 Fig. 6 에서 ALP활성은 5일, 10일 결과에 비해 상당히 높은 경향이 나타났다. 이러한 결과는 무처리 티타늄과 나노메시 를 형성한 티타늄 사이에 부착된 세포의 형태를 보여준 기존의 논문과도 일치되는 결과이다.<sup>19)</sup>

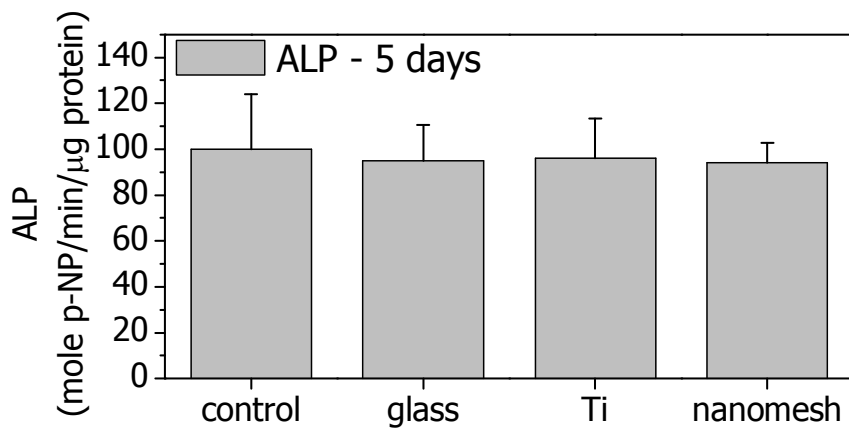


Fig. 4. ALP activity in the cell matrix of differentiation induced MC3T3-E1 cells on control, glass, Ti, TiO<sub>2</sub> NM surfaces for 5 days.

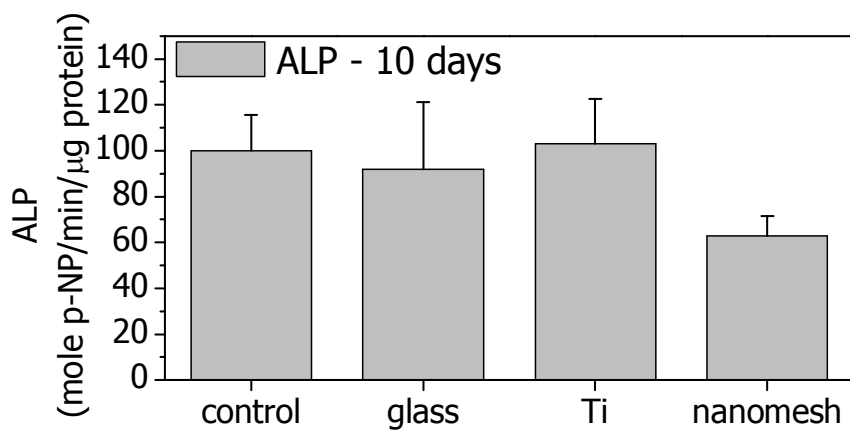


Fig. 5. ALP activity in the cell matrix of differentiation induced MC3T3-E1 cells on control, glass, Ti, TiO<sub>2</sub> NM surfaces for 10 days.

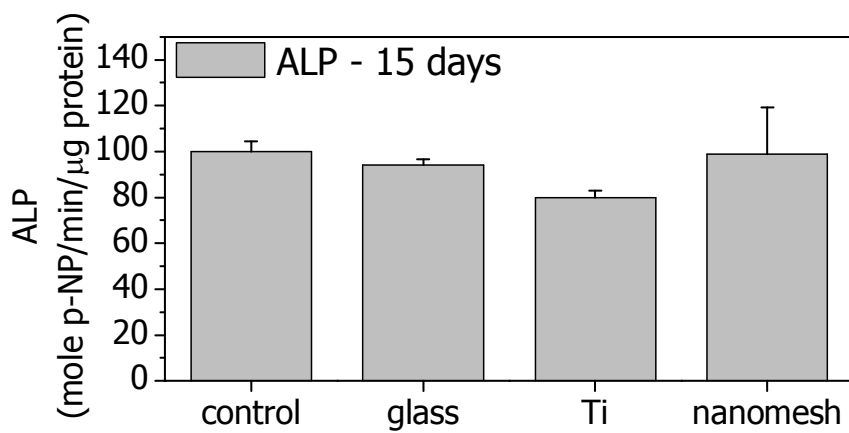


Fig. 6. ALP activity in the cell matrix of differentiation induced MC3T3-E1 cells on control, glass, Ti, TiO<sub>2</sub> NM surfaces for 15 days.

## 제 4 장 고찰

본 연구에서 사용한 조골모세포(MC3T3-E1)는 신생쥐 두개골에서 분리 계대 배양한 세포로서, 배양 초기에는 섬유아세포의 양상을 지나 장시간 배양시 골 기질의 석회화 뿐 만 아니라 조골세포와 골세포로 분화하는 조골기능을 갖고 있는 세포주다.<sup>27)</sup>

조골모세포의 활성을 나타내는 지표로는 ALP가 주로 사용되며 이 효소는 경조직내의 기질 낭포와 세포외측 세포막에 고농도로 존재한다. 본 실험에서 측정된 ALP는 배양액의 교환시에 기질 낭포의 것은 없어졌으므로 측정된 ALP는 세포외막에 존재하는 ALP라 볼 수 있다. ALP는 stein 등에 의하면 그가 구분한 골세포의 3단계인 세포의 분화기, 세포외기질의 성숙기 및 석회화기 과정 중에서 분화기 직후부터 증가가 나타나며, 그 이후 osteocalcin과 osteonectin이 석회화 시기에 나타난다고 하였다.<sup>28)</sup> 따라서 본 연구에서는 알칼리 처리를 이용하여 티타늄표면에 다공성 TiO<sub>2</sub> 나노 그물망구조를 제조하고 그 표면이 조골모 세포(MC3T3-E1)의 alkaline phosphatase(ALP)의 활성에 미치는 영향을 평가하였다.

임플란트 표면과 접촉되는 세포들의 기능적인 활성도는 임플란트 표면 재료에 의해서 결정된다고 예상된다. 일반적으로 골형성 세포인 조골세포는 부드럽고 균일한 표면보다는 거칠고 나노 스케일의 다공성 막이 보다 쉽게 부착되고 퍼진다. 비록 3개의 실험군에서 분화의 백분율이 유사한 것에 대한 이유가 확실하게 규명이 되진 않았지만 세포들은 주변의 남아있는 화학물질에 영향을 쉽게 받기 때문에 그러한 영향일지도 모른다고 추측이 된다. 그렇지만 이러한 주변 화학 물질을 깨끗이 제어할 수 있고 균일한 나노메시를 일정한 두께로 형성할 수 있다면 티타늄 나노메시 표면은 다양한 생체재료의 표면특성을 향상시킬 수 있는 좋은 기술이 될 수 있다고 생각된다.



## 제 5 장 결론

생체용 CP-Ti을 알칼리 처리를 통하여 표면개질하고, 모의생체용액으로 *in vitro* 시험한 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

강알칼리용액으로 표면 개질한  $TiO_2$  나노메시의 표면에서는 다공질 네트워크 구조를 가진 층이 형성되었고, TF-XRD 분석결과 sodium titanate 임을 알 수 있었다. 침지 시간이 지남에 따라 나노메시의 형태, 기공크기 및 막두께가 증가하는 것을 확인 할 수 있었고, 치밀하고 미세기공을 가진 나노메시 층은 기공이 크고 막 두께가 큰 층에 비해 생체 내에서 비교적 물리적으로 안정하고 보다 높은 골 결합강도를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 나노메시 이산화티타늄표면은 MC3T3-E1세포 배양 5일째에서는 대조군에 비하여 ALP 활성이 감소하는 반면, 10일째 와 15일째에서는 대조군에 비하여 ALP 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 향후 나노메시 형태가 생체적합성에 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;16:323-32.
- [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;14:43-8.
- [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] Kasemo B, Lausmaa J. Metal selection and surface characteristics. Quintessence, Chicago 1985:99-116.
- [6] Huang HH. Electrochemical impedance spectroscopy study of strained titanium in fluoride media. *Electrochim Acta* 2002;47:2311-8.
- [7] Huang HH. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials* 2002;23:59-63.
- [8] Tschernitschek H, Borchers L, Geurtsen W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal—a review. *Quintessence Int* 2005;36:523-30.
- [9] 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;112:516-22.
- [10] Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S. Oxidized titanium implants (Nobel Biocare® TiUnite™) compared with turned titanium implants

- (Nobel Biocare® mark III™) 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;16:308-12.
- [11] 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;19:1119-28.
- [12] 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;28:163-9.
- [13] 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;28:145-51.
- [14] 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;12:225-37.
- [15] Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res* 2000;52:553-7.
- [16] Nishiguchi S, Fujibayashi S, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Biology of alkali- and heat-treated titanium implants. *J Biomed Mater Res* 2003;67A:26-35.
- [17] Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 2004;25:443-50.
- [18] 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;60:333-8.

- [19] 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.
- [20] 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;53:1037-42.
- [21] Bauer S, Kleber S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: tailoring the geometry in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HF electrolytes. *Electrochem Commun* 2006;8:1321-5.
- [22] 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<sub>2</sub> nanotubes. *Nano Lett* 2006;6:1080-2.
- [23] 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.
- [24] Kasemo B, Lausmaa J. Aspect of surface physics on titanium implants. *Swed Dent J* 1983;28:19-36.
- [25] Kodama HA, Amagai YJ, Sudo H, Kasai S and Shigehisa Y. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral. Biol* 1981;23:899-901.
- [26] Sudo, Hiroko, Kodama, Hiro-ari, Amagai, Yuji, Yamamoto, Shigehisa and Kasai, Shiro. In Vitro Differentiation and Calcification in a New Clonal Osteogenic Cell Line Derived from New Born Mouse Calvaria. *J. of Cell Biol* 1983;96:191-198.
- [27] Casser, Bette M, Murray A.B, Closs E.I, Erfle V and Schmidt J. Bone Formation by osteoblast-like Cell in a three-Dimensional Cell Culture, *Calcif. Tissue Int* 1990;46:46-56.
- [28] Kodama HA, Amagai YJ, Sudo H, Kasai S and Shigehisa Y. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral. Biol* 1981;23:899-901.

[29] Stein, GS, Lian, JB and Owen, T A. Bone cell differentiation a functionally coupled relationship between expression of cell-growth and tissue specific genes. *Current Opinion in Cell Biology*. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:1018-27.

## 저작물 이용 허락서

|      |   |        |                 |     |    |
|------|---|--------|-----------------|-----|----|
| 학 과  | 치의학   | 학 번    | 20087514        | 과 정 | 석사 |
| 성 명  | 한글: 김 경 천    한문: 金 敬 天    영문: Kim Gyoung Cheon  |        |                 |     |    |
| 주 소  | 부산시 사상구 엄궁동 527-1번지 스마일치과   |        |                 |     |    |
| 연락처  | 010-6219-3689   | E-MAIL | absis@paran.com |     |    |
| 논문제목 | 한글: 티타늄 표면적 증가가 조골모세포 Alkaline Phosphatase 활성에 미치는 영향   |        |                 |     |    |
|      | 영어: Effect on Activity of Alkaline Phosphatase of Osteoblast Cell with Increasing Titanium Surface Area |        |                 |     |    |

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(    )

2010 년    11 월    일

저작자:            김 경 천            (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**