



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 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.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2011년

8월

박사학위논문

티타늄표면에 SLA처리와 알칼리 처리에 따른 조골모세포의 증식 및 분화에 관한 연구

고장혁

2011년 8월
박사학위논문

티타늄표면에 SLA처리와 알칼리 처리에 따른 조골모세포의 증식 및 분화에 관한 연구

조선대학교 대학원

치 의 학 과

고 장 혁

티타늄표면에 SLA처리와 알칼리
처리에 따른 조골모세포의 증식 및
분화에 관한 연구

Study on proliferation and differentiation of
osteoblast like cell on the Titanium surface with
SLA and alkali treatment

2011년 8월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

고 장 혁

티타늄표면에 SLA처리와 알칼리
처리에 따른 조골모세포의 증식 및
분화에 관한 연구

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2011년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

고 장 혁

고장혁의 박사학위 논문을 인준함

위원장 부산대학교 교수 김 형 일 인

위 원 서울대학교 교수 양 형 철 인

위 원 조선대학교 교수 최 한 철 인

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 인

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 인

2011년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iii
제 1장 서 론	1
제 2장 실험재료 및 방법	3
제 1절 티타늄 시편	3
제 2절 SLA 표면처리	3
제 3절 알칼리 표면처리	4
제 4절 표면분석	5
제 5절 조골모세포에 의한 생물학적 평가	6
제 3장 실험결과	8
제 1절 표면처리한 티타늄 표면분석	8
제 2절 조골모세포의 증식, 분화 비교평가	14
제 4장 고찰	17
제 5장 결론	18
참 고 문 헌	19

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Schematic diagram for SLA treatment process.	4
Fig. 2. Schematic diagram for alkali treatment process.	5
Fig. 3. FE-SEM micrographs of the Ti specimens before and after SLA treatment: (a) CP-Ti, (b) blasted Ti, (c) SLA treatment $\times 500$, and (d) SLA treatment $\times 3,000$ magnification.	10
Fig. 4. FE-SEM micrographs of the Ti specimens after alkali treatment: (a)60 min, (b)180 min, (c)360 min, and (d)720 min.	11
Fig. 5. XRD patterns of the Ti specimens before and after treatment: (a) CP-Ti, (b) SLA Ti, and (c) alkali treated Ti.	12
Fig. 6. Contact angle value of water droplets measured on the different surface treatment.	13
Fig. 7. Cell viability of the MC3T3-E1 cell seeded on the different Ti surface for 1 day, 3 days and 7 days.	15
Fig. 8. Alkaline Phosphatase activity of the MC3T3-E1 cell seeded on the different Ti surface for 4 days, 7 days and 14 days.	16

ABSTRACT

Study on proliferation and differentiation of osteoblast like cell on the Titanium surface with SLA and alkali treatment

Jang Hyuk Ko, D.D.S, M.S.D

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

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Titanium (Ti) have been widely used as biomaterials due to electrical and thermal conductivity and mechanical properties. To improve the biocompatibility, several surface treatment methods were suggested. Micro- and nano topography of Ti implant surface acts on major factor for osteoblast cell adhesion, proliferation and differentiation. In this study, we prepared nano- and micro structured TiO₂ surface and evaluated the biological activity of osteoblast like cell on the modified TiO₂ surface. TiO₂ surfaces of micro- and nano-mesh structured were prepared by SLA and alkaline treatment. Surface morphology and composition were characterized by Field Emission scanning electron micrographs (FE-SEM), and X-ray diffraction (XRD). To evaluate the MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation on modified TiO₂ surface, MTT assay and ALP activity were used. Alkali treated Ti surface showed nano-mesh TiO₂ topographic characteristics. As the increase of immersing time in alkali solution,

nano-mesh size was gradually increased. SLA treated Ti surface showed good proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cell compared to that of nano-mesh structured Ti surface.

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 산화 피막층 (주로 이산화 티타늄; TiO_2)이 빠르게 형성된다. 이러한 자연 산화막은 우수한 내 부식성과 생체적합 특성을 갖는다. 티타늄 임플란트가 인체에 이식될 때, 주위조직과 직접적으로 TiO_2 막이 접촉한다. 이러한 이유 때문에 티타늄 임플란트의 생체적합성은 표면형상, 화학조성, 마이크로 및 나노미세구조와 같은 표면 산화막의 물리적 화학적 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 조직변색이 발생하는 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. 생체의 실험연구에서 티타늄표면형상은 조골모세포의 분화, 증식, 부착과 같은 세포-생체재료 상호반응의 각각의 단계에 영향을 미친다고 보고되었다.¹³⁾ 조골모세포는 초기부착 후에 퍼지고 살고 있는 환경에 반응하여 변화한다. 여러 연구자들은 재료표면을 형태학적 또는 구조적으로 변화시키기 위하여 여러 가지방법으로 표면처리를 하였고, 그 표면에서 배양된 조골세포의 거동에 대하여 보고하였다.¹⁴⁾

생물학적 조직과 임플란트 사이에 계면반응을 향상시키기 위하여 여러 가지 방법들이 사용되었다. 티타늄 임플란트에 대한 표면처리법 중에서, 표면형상개질은 임플란트 표면에서 세포반응을 향상시키는데 사용되어왔다. 조골모세포는 표면개질된 티타늄금속에 잘 부착하고 스프레딩 된다. 이러한 세포들은 금속표면의 기공 속으로 성장하고 세포외기질(extracellular matrix; ECM)을 형성하는 것을 관찰 할 수 있다.¹⁵⁾ 티타늄 임플란트 표면의 적당한 다공성 구조는 생체적합성이 중요한 관건 일 때는 매우 결정적인 역할을 한

다. 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℃, 24시간 동안 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 나노구조를 갖는 다공성 표면막이 제조 되었다.¹⁶⁾ 또한 특별한 화학적 그리고 열처리를 수행한 후에 유사한 기공, 생체활성이 우수한 티타늄 금속표면을 개발 할 수 있다는 연구결과가 보고되었다.^{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 금속표면을 제조하기위한 강력한 대안으로서 연구되고 있다. ¹⁹⁻²¹⁾ 전기화학적 방법은 불소용액에서 티타늄표면에 자기 조직된 (self-organized) 그리고 자기 정렬된(self-ordered) TiO₂ 나노튜브 표면을 제조하는데 사용되어 왔다.^{22,23)} 생체외에서 수행된 세포적합성 결과는 나노구조를 갖는 티타늄 표면이 종래의 티타늄 표면보다 더욱 높은 세포 (쥐 상피세포 L929) 균집을 형성한다고 보고되었다.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 티타늄표면에 SLA처리와 알칼리 처리를 이용하여 마이크로 및 나노구조 형상을 제조하여 그 표면이 조골모 세포(MC3T3-E1)의 증식 및 분화에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절. 티타늄 시편

본 실험에서는 상업적으로 사용되는 순수 티타늄 판 (NSC CP-Ti, grade 2, Japan)을 직경 20 mm, 두께 2 mm 디스크 형태로 가공하여 시료로 사용하였고, 기계적 연마는 #100, #600, #800, #1200 그리고 #2000 grit SiC 연마지로 단계적으로 습식 연마하였다. 연마한 시료는 아세톤과 에탄올을 1:1 비율로 혼합한 용액에 1시간 동안 초음파 세척한 후 3차 탈 이온수로 세정하고 건조하여 다음 실험에 사용하기 전까지 데시케이터에 보관하였다.

제 2 절. SLA 표면처리

50 μ m 입자크기를 가진 Al₂O₃ 분말을 이용하여 시편과의 거리 1 cm에서 수직방향에서 0.6 MPa의 압력을 주어 세척이 끝난 시편표면에 블라스트 처리를 실시하였다. 블라스트 처리된 시편은 각각 증류수와 알코올로 초음파 세척을 15분간 실시하여 표면에 잔류되어있는 Al₂O₃ 분말을 및 표면에서 떨어져 나온 티타늄 조각들을 제거하였다. 세척이 끝난 시편은 H₂SO₄ 용액과 HCl 용액을 이용하여 산 처리를 실시하는데, 먼저 50 ml의 H₂SO₄ 용액에서 6시간 동안 상온에서 침지한 후, 바로 HCl 용액에서 5분 동안 침지한 후 증류수 및 알코올을 이용하여 표면을 세척하였다. 세척이 끝난 시편은 표면의 잔류되어 있는 산 용액을 제거하기 위하여 80℃의 증류수에서 48시간 동안 담지한 후, 400℃의 전기로에서 가열하였다. Fig. 1은 SLA 표면처리 공정도를 나타낸 그림이다.

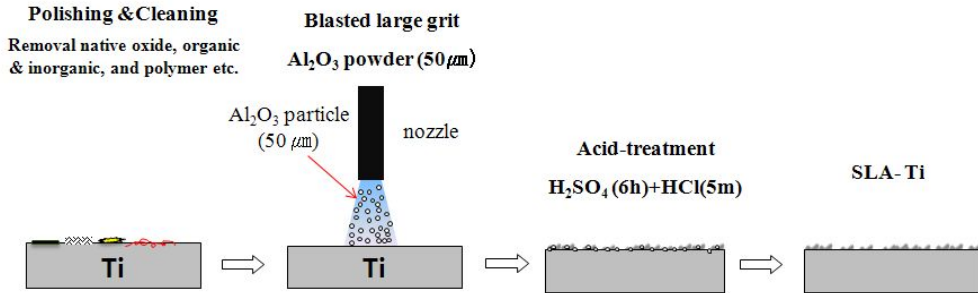


Fig. 1. Schematic diagram for SLA treatment process.

제 3 절. 알칼리 표면처리

강알칼리처리법을 이용한 TiO₂ 나노메시 형성에 관한 실험방법을 Fig. 2에 나타내었다. TiO₂ 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, 수차례 세척하였다. 최종적으로 40℃의 진공오븐에서 건조를 실시하여 실험에 사용하였다.

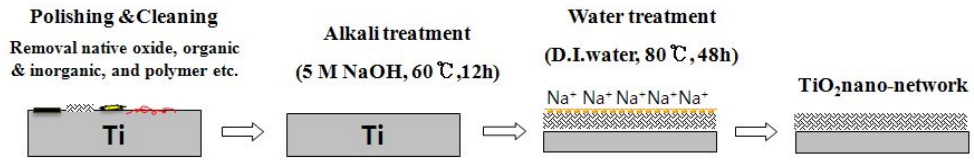


Fig. 2. Schematic diagram for alkali treatment process.

제 4 절. 표면분석

TiO₂ 나노메시 표면 및 SLA 처리한 표면의 결정구조는 X선회절 장치 (TF-XRD; X'pert Philips, Netherlands)를 사용하여 X선회절 실험을 시행하였다. 이때 입사각은 1.5°로 고정하고, 측정 조건은 관전압 30 kV, 관전류 40 mA, Ni 필터를 통과한 Cu K α 선을 사용하였다. 주사속도 1° (2 θ /min)이고, 2 θ 는 20°부터 45° 사이에 측정하였다. 표면의 미세구조 및 형상을 관찰하기 위하여 전계방출주사전자현미경 (FE-SEM; S-4800, Hitachi, Japan)을 사용하여 가속전압 15 kV의 조건으로 관찰하였다. 제조된 시편의 표면 젖음성을 관찰하기 위하여 접촉각을 측정하였다. 접촉각의 변화를 관찰하기 위하여 증류수 5 μ l를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정장치 (contact angle measurement; GSX, Surfacetech, Korea)를 이용하여 5초 후에 관찰하였다.

제 5 절. 조골모세포에 의한 생물학적 평가

MC3T3-E1 세포배양

본 연구에 사용된 MC3T3-E1 조골모세포는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2594)에서 구입하였다. 세포배양은 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 serum (FBS, PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin (Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO₂가 공급되는 37°C CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

MTT assay

배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 첨가된 12-well plate에 각각 1×10^5 cells/well을 파종하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각각 1일, 3일, 7일 동안 배양한 후 MTT를 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인한 후 이소프로필알콜(Isopropyl alcohol, Sigma)을 이용하여 용해하였다. 흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200 μ L씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군(세포배양용기)에서 1일 동안 배양한 생세포수를 100%로 했을 때 실

험균(무처리 티타늄표면, 표면처리 된 Ti 표면)에서 생존한 세포의 비율로 계산하였다.

ALP assay

MC3T3-E1 세포배양 24시간 후 분화배지로 교체하고 2일마다 분화배지를 교체하였다. 일주일 후 well plate에 넣어 cell media를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, 세포 lysis buffer를 well당 150 μ l씩 넣어서 200분간 wise mix를 이용하여 shaking 하였다. 스크래퍼를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출하여 microtube에 담근 후, 4 $^{\circ}$ C, 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube에 옮겨주고 ice에 보관하였다. 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 튜브를 배양한 후, 1.2 N NaOH 600 μ l씩 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP활성을 계산하였다. 단백질 정량은 1 mg/ml BSA를 사용하여 표준용액을 제조한 후 592 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준정량 곡선으로부터 단백질 농도를 결정하였다.

제 3 장 실험결과

제 1 절. 표면처리한 티타늄표면분석

Fig. 3은 주사전자현미경을 이용하여 Al_2O_3 분말로 티타늄표면을 블라스트 처리 전(Fig. 3a)과 처리 후(Fig. 3b), 그리고 블라스트 처리 후에 H_2SO_4 용액과 HCl 용액을 이용하여 처리한 (SLA, sandblasted large-grit and acid-etched treatment) 후(Fig. 3c,d)의 표면을 관찰한 결과이다. Fig. 3a는 무처리 티타늄표면을 관찰한 것으로 표면이 평탄한 형태를 보이고 있다. 하지만 블라스트 처리 후 티타늄표면의 경우, Fig. 3a의 평탄한 표면은 사라지고 표면에 마이크로 조도를 갖는 불규칙한 표면이 형성되었으며, SLA 처리 후의 표면은 Fig. 3c에서 보는 것과 같이 마이크로 피트가 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있습니다. 더욱 확대하여 관찰한 결과(Fig. 3d), 블라스트 처리 후 표면에 형성되어 있던 불규칙적인 티타늄 부스러기들이 산에 의해서 제거되어 피트의 크기가 2-10 μm 정도의 크기를 갖는 것으로 관찰되었습니다.

Fig. 4는 티타늄시편을 5 M NaOH 강알칼리 용액에 침지하여 시간 변화에 따른 티타늄표면을 관찰한 결과이다. 초기 60분 동안 침지한 경우, Fig. 3a의 무처리 티타늄표면과 달리 입자형태의 크랙이 발생하며, 침지시간을 180분 동안 침지할 경우 크랙의 크기가 증가하며, 침지시간이 증가할수록 나노크기의 그물망 구조가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4c,d). 침지시간이 720분을 경과하면서(Fig. 4d) 나노크기의 기공이 층층히 겹겹으로 그물망처럼 쌓여있는 형상을 보여주고 있다. 나노기공의 평균 크기는 약 100 ± 30 nm 정도이며, 나노메시의 막 두께는 1.5 ± 0.3 μm 로 나타났다.

Fig. 5는 박막 X-ray 회절분석기를 이용하여 2θ 20° 에서 45° 까지의 회절 피크를 나타내었다. SLA 처리를 한 Ti의 경우, 순수한 Ti와 일부의 알루미늄 피크가 관찰되었고, TiO_2 나노메시 표면은 25도 근처에서 아나타제(anatase)

구조의 TiO_2 회절피크를 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 순수 티타늄표면에 강알칼리 처리 후 다공성 TiO_2 아나타제 구조의 산화막이 생성된 것을 알 수 있었다.

Fig. 6은 표면처리에 따른 Ti의 접촉각을 측정한 결과이다. 무처리 Ti의 경우는 62° 정도의 접촉각을 가지고 있으며, 블라스트 처리한 시편은 접촉각이 무처리한 표면에 비하여 15° 정도 감소함을 관찰할 수 있었다. 블라스트 처리한 경우와 알칼리 처리한 시편의 경우에는 낮은 친수성을 갖는 것을 관찰 할 수 있는데 이는 다른 문헌에서도 확인할 수 있으며²⁵⁾, 낮은 접촉각이 형성된 표면이 cell과의 접촉 시 세포접착과 매우 밀접한 관련이 있으며 친수성을 가지는 세포의 부착이 우수하여 임플란트와 같은 생체재료로써의 사용이 가능하다고 보고되고 있다²⁶⁾.

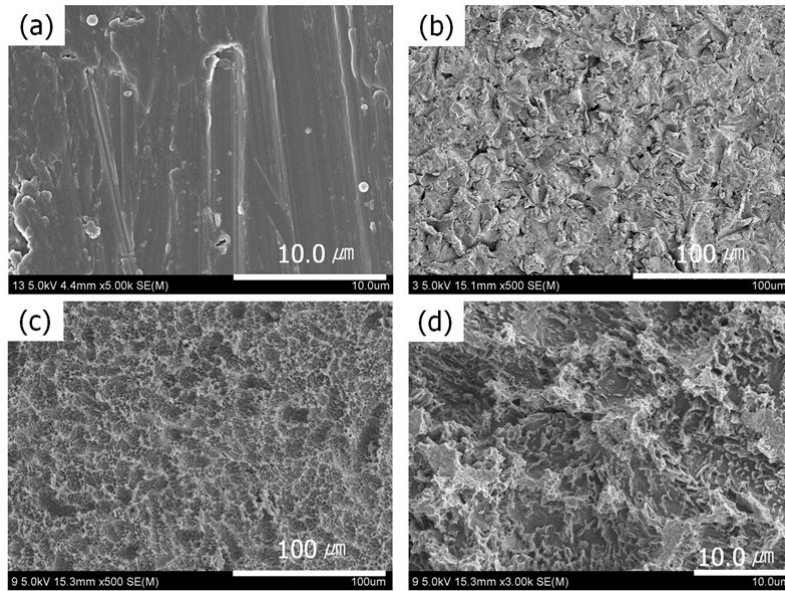


Fig. 3. FE-SEM micrographs of the Ti specimens before and after SLA treatment: (a) CP-Ti, (b) blasted Ti, (c) SLA treatment $\times 500$, and (d) SLA treatment $\times 3,000$ magnification.

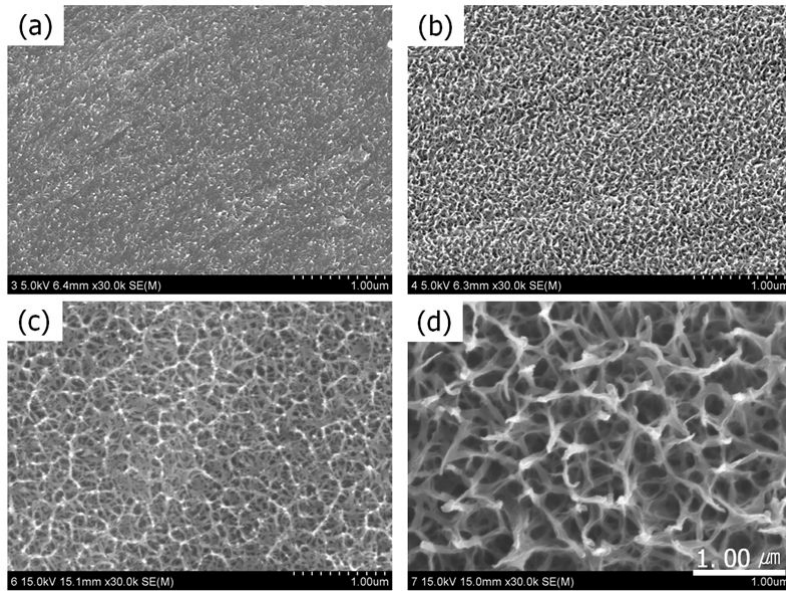


Fig. 4. FE-SEM micrographs of the Ti specimens after alkali treatment: (a) 60 min, (b) 180 min, (c) 360 min, and (d) 720 min.

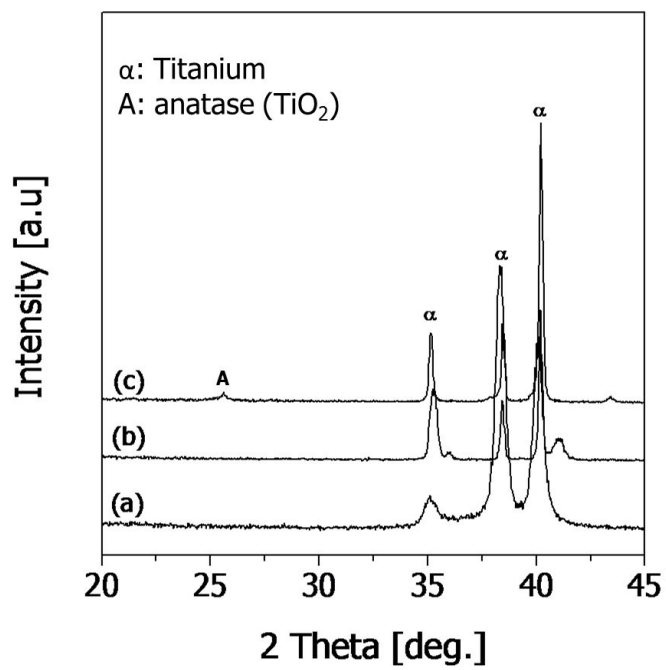


Fig. 5. XRD patterns of the Ti specimens before and after treatment: (a) CP-Ti, (b) SLA Ti, and (c) alkali treated Ti.

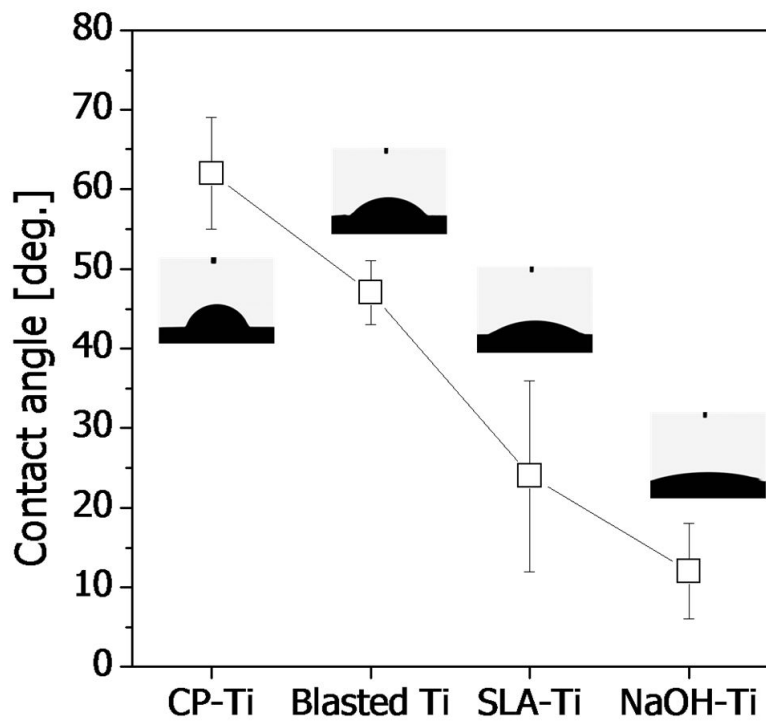


Fig. 6. Contact angle value of water droplets measured on the different surface treatment.

제 2 절. 조골세포의 증식, 분화 비교평가

SLA 및 알칼리 처리된 Ti 표면과 무처리 Ti 표면위에서 MC3T3-E1 세포 생존율에 관한 평가는 세포의 미토콘드리아 활성법과 직접연관이 있는 MTT 방법을 통해 조사하였다. SLA 처리된 Ti 표면과 알칼리 처리하여 나노메시가 형성된 Ti 표면을 실험군으로 사용하였고, 세포배양용기와 무처리 Ti 표면을 포지티브, 네가티브 대조군으로 사용하여 실험을 행하였다. 세포생존율 계산은 MC3T3-E1 세포를 세포배양용기에서 1일 동안 배양한 생세포수를 100%로 했을 때 실험군에서 각각 1일, 3일, 7일 동안 배양했을 때 생존한 세포의 수를 비율로 나타내었다. 이 결과를 Fig. 7에 나타내었다. SLA-Ti의 경우 무처리 된 Ti에 비하여 높은 생존율을 갖는 것으로 관찰되었으나, 나노메시 표면의 경우는 배양시간이 증가할수록 대조군인 무처리 Ti에 비하여 생존율이 감소하는 것으로 관찰되었다.

ALP는 조골세포 분화의 표식자로서 널리 사용된다. 그러므로 MC3T3-E1 조골세포의 ALP활성은 배양용기와 무처리 Ti 표면인 대조군과 비교하여 SLA-Ti와 나노메시 티타늄 표면에서 분화에 미치는 영향을 판단하기 위해서 측정되었다. Fig 8 은 MC3T3-E1 세포를 4개의 표면위에서 배양이 하였으며, 4일의 경우, 대조군에 비하여 실험군에서 ALP활성이 감소되는 경향을 보여주었다. 특히 SLA 처리한 표면이 가장 낮은 활성값을 보였다. 그러나 7일의 경우에는 SLA 처리한 표면이 가장 높은 ALP 활성값을 나타내었다. 14일 동안 분화된 MC3T3-E1 세포의 ALP활성에서도 SLA 처리한 표면이 가장 우수하게 나타났다.

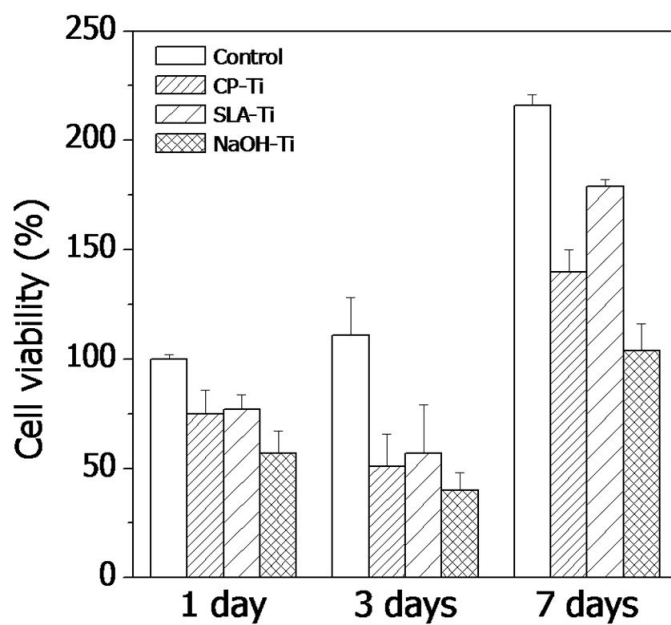


Fig. 7. Cell viability of the MC3T3-E1 cell seeded on the different Ti surface for 1 day, 3 days and 7 days.

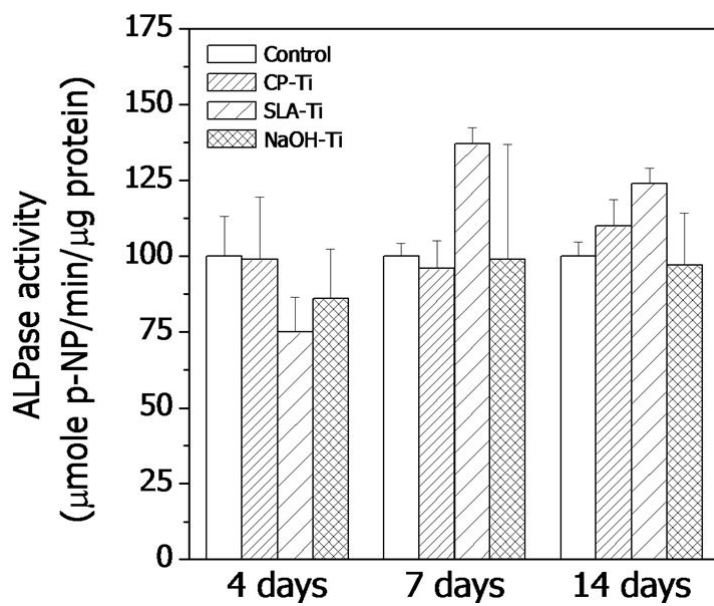


Fig. 8. Alkaline Phosphatase activity of the MC3T3-E1 cell seeded on the different Ti surface for 4 days, 7 days and 14 days.

제 4 장 고 찰

여러 가지 세포생물학적 모델연구에서 MC3T3-E1세포는 광범위하게 사용되는 세포주 중에 하나이다. 이 세포주는 *in vitro*에서 세포외기질의 석회화 과정에서 높은 ALP활성을 나타내는 것으로 잘 알려져있다²⁸⁾. 그러므로 이 세포주는 티타늄표면위에 조골세포의 부착, 증식 그리고 분화를 연구하는데 좋은 후보가 된다. *In vitro* 연구에서 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 초점접착(focal adhesion)으로 매개되는 부착과정으로서 세포거동을 결정하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다.²⁸⁾ 세포형태의 특징은 세포가 주위환경에 적응하는 과정의 산물이다.

산 에칭처리된 티타늄표면에 평균 0.5에서 2미크론 직경을 갖는 마이크로 피트를 만들어낸다²⁹⁾. Wong 등은 산 에칭처리가 골 융합을 아주 향상시킨다고 보고하였다³⁰⁾. 이러한 표면은 빠른 골융합을 촉진하여 3년 이상의 장기간 임플란트 시술 성공을 보장한다고 보고되었다³¹⁾. Park 등은 산 에칭 처리된 표면이 조골세포와 피브린의 부착으로 인하여 골전도 과정을 향상시켜, 결과적으로는 임플란트표면에 골형성을 촉진시킨다고 보고하였다³²⁾. 본 연구결과에서 SLA처리한 표면위에서 배양한 MC3T3-E1 조골모세포주의 증식 및 분화가 무처리 티타늄표면보다 월등히 우수한 결과는 기존연구결과와 일치한다고 볼 수 있다. 2010년 Yang과 Huang은 티타늄표면에 나노메시 구조를 갖는 다공성 형상을 부여하여 Human bone marrow mesenchymal stem cell (hMSCs)를 배양하여 기존의 기계적으로 가공된 티타늄표면에 비하여 세포부착, 증식, 초기분화가 우수함을 보고하였다³³⁾. 따라서 본 연구에서는 나노메시 구조 티타늄표면과 기존에 SLA 처리한 티타늄표면에서 조골세포의 증식 및 분화를 비교 평가해 보았다. 향후 마이크로 구조에 나노구조를 갖는 복합 표면에서 조골세포의 반응에 대한 연구는 더욱더 흥미가 있을것으로 사료된다.

제 5 장 결 론

생체용 CP-Ti을 다양한 마이크로 표면과 나노구조를 갖는 표면으로 개질하고, MC3T3-E1세포를 이용하여 *in vitro* 평가한 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 블라스트 처리 후 H_2SO_4 용액과 HCl 용액으로 산처리를 실시하여 마이크로 표면구조를 갖는 Ti표면을 제조할 수 있었다.

2. 5 M NaOH로 처리한 티타늄 표면에서는 나노크기의 다공질 네트워크 구조를 가진 층이 형성되었고, 침지 시간이 지남에 따라 나노메시의 형태와 크기가 증가하면서 두꺼워진 모습을 확인할 수 있었다.

3. 접촉각을 측정한 결과, SLA-Ti은 24° 를 나타내었고, 나노메시 티타늄의 경우는 12° 의 초친수성을 갖는 표면을 관찰할 수 있었다.

4. SLA-Ti의 경우 대조군인 CP-Ti보다 높은 세포 생존율과 ALP활성을 갖고, 나노메시 티타늄표면은 대조군에 비하여 낮은 세포 생존율을 보였지만 ALP 활성의 경우는 비슷한 결과를 나타내었다.

이는 향후 나노메시 구조형태가 세포에 미치는 영향에 대하여 더욱더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다 .

참 고 문 헌

- [1] Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J (2001) Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16:323-332.
- [2] Olmedo D, Fernandez MM, Guglielmotti MB, Cabrini RL (2003) Macrophages related to dental implant failure. *Implant Dent* 12:75-80.
- [3] Rosa AL, Beloti MM (2003) Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Implants Res* 14:43-48.
- [4] Chiapasco M, Gatti C (2003) Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: a 3- to 8-year prospective study on 328 implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 5:29-38.
- [5] Huang HH (2002) Electrochemical impedance spectroscopy study of strained titanium in fluoride media. *Electrochim Acta* 47:2311-2318.
- [6] Huang HH (2002) Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials* 23:59-63.
- [7] Tschernitschek H, Borchers L, Geurtsen W (2005) Nonalloyed titanium as a bioinert metal—a review. *Quintessence Int* 36:523-530.
- [8] Groessner-Schreiber B, Hannig M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF (2004) Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *Eur J Oral Sci* 112:516-522.
- [9] Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S (2005) 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* 16:308–312.

- [10] Ganeles J, Zollner A, Jackowski J, Ten Bruggenkate C, Beagle J, Guerra F (2008) 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* 19:1119–1128.
- [11] Yamamichi N, Itose T, Neiva R, Wang HL (2008) Long-term evaluation of implant survival in augmented sinuses: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 28:163–169.
- [12] Bugea C, Luongo R, Di Iorio D, Cocchetto R, Celletti R (2008) Bone contact around osseointegrated implants: Histologic analysis of a dual-acid-etched surface implant in a diabetic patient. *Int J Periodontics Restorative Dent* 28:145–151.
- [13] Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM (1992) Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 7:302–310.
- [14] Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z (1998) Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19:2219–2232.
- [15] Assad M, Chernyshov A, Leroux MA, Rivard CH (2002) A new porous titanium–nickel alloy, Part 1: Cytotoxicity and

- genotoxicity evaluation. *Bio-Med Mater Eng* 12:225–237.
- [16] Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T (2000) Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res* 52:553–557.
- [17] Nishiguchi S, Fujibayashi S, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T (2003) Biology of alkali- and heat-treated titanium implants. *J Biomed Mater Res* 67A:26–35.
- [18] Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T (2004) Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 25:443–450.
- [19] Zhu X, Ong JL, Kim S, Kim K (2002) Surface characteristics and structure of anodic oxide films containing Ca and P on a titanium implant material. *J Biomed Mater Res* 60:333–338.
- [20] Rosenberg R, Starosvetsky D, Gotman I (2003) Surface modification of a low modulus Ti–Nb alloy for use in medical implants. *J Mater Sci Lett* 1:29–32.
- [21] Huang HH, Pan SJ, Lu FH (2005) Surface electrochemical impedance in situ monitoring of cell-cultured titanium with a nano-network surface layer. *Scripta Mater* 53:1037–1042.
- [22] Bauer S, Kleber S, Schmuki P (2006) TiO₂ nanotubes: tailoring the geometry in H₃PO₄/HF electrolytes. *Electrochem Commun* 8:1321–1325.
- [23] Ghicov A, Macak JM, Tsuchiya H, Kunze J, Haeublein V, Frey L (2006) Ion implantation and annealing for an efficient N-doping of TiO₂ nanotubes. *Nano Lett* 6:1080–1082.
- [24] Valiev RZ, Semenova IP, Latysh VV, Rack H, Lowe TC, Petruzelka J (2008) Nanostructured titanium for biomedical applications. *Adv Eng Mater* 10:B15–17.
- [25] Oh SH, Finões RR, Daraio C, Chen LH, Jin SH (2005) Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium

- oxide nanotubes. *Biomaterials* 26:4938–4943.
- [26] Zeggel P (2000) Bioactive calcium phosphate coating for dental implant: a summarizing characterization of BONIT-FBR, *Int Mag Oral Implatol* 1:52.
- [27] Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 4:487–525.
- [28] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96:191–198.
- [29] Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetter P, Wieland M, Jeanfils J (2004) Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 25:2695–2711.
- [30] Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E (1995) Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 29:1567–1575.
- [31] Cho SA, Park KT (2003) The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials* 24:3611–3617.
- [32] Park JY, Davies JE (2000) Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 11:530–539.
- [33] Yang WE, Huang HH (2010) Improving the biocompatibility of titanium surface through formation of a TiO₂ nano-mesh layer. *Thin Solid Films* 518:7545–7550.