

2012년 2월

碩士學位論文

골 전도 향상을 위한  
나노 수산화인회석 코팅

조선대학교 대학원

치의학과

서 기 원

골 전도 향상을 위한  
나노 수산화인회석 코팅

Hydroxyapatite nanocrystal coating for bone-conductive  
improvement

2012年 2月 24日

조선대학교 대학원

치의학과

서기원

골 전도 향상을 위한  
나노 수산화인회석 코팅

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2011年 10月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

서 기 원

# 서기원의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    부교수    최    한    철    印

위    원    조선대학교    조교수    김    병    훈    印

위    원    조선대학교    교    수    고    영    무    印

2011年 11月

조선대학교 대학원

## 목 차

ABSTRACT .....	iv
제 1장 서론 .....	1
제 2장 실험재료 및 방법 .....	2
제 1절 실험재료 .....	2
제 2절 나노 수산화인회석 제조 ...	2
제 3절 플라즈마 표면개질 ...	2
제 4절 나노 수산화인회석 코팅 ...	5
제 5절 표면분석 ...	5
제 6절 조골모세포 배양 ...	5
제 7절 생체적합성 평가 ...	6
제 3장 실험결과 .....	7
제 1절 나노 수산화인회석 ...	7
제 2절 나노 수산화인회석 코팅 ...	9
표면특성	
제 3절 조골모세포 증식 및 ...	14
분화 특성	
제 4장 고찰 .....	17

제 5장 결론	.....	18
참 고 문 헌	.....	19

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Schematic diagram for plasma device.....	4
Fig. 2. TF-XRD pattern and microstructure of nanocrystalline HAp particles.....	8
Fig. 3. FE-SEM images of (a) untreated CP-Ti, (b) COOH/Ti and (c and d) HAp/COOH/Ti surfaces.....	10
Fig. 4. TF-XRD patterns of (a) CP-Ti, (b) COOH/Ti and (c) HAp/COOH/Ti surfaces.....	11
Fig. 5. ATR-FTIR spectrum of HAp coated on Ti/COOH.....	12
Fig. 6. Contact angle values of water droplets measured on the different surface treatment.....	13
Fig. 7. The results of MTT assay for MC3T3-E1 cell seed on different surface conditions.....	15
Fig. 8. Alkaline phosphatase (ALP) activity of MC3T3-E1 cells cultured for 6 and 12 days.....	16

# ABSTRACT

## Hydroxyapatite nanocrystal coating for bone-conductive improvement

Ki-Won Seo, D.D.S, M.S.D

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

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp) is materials mainly known for its special ability to contact bone tissue. Nanostructures on implant surfaces, a coating composed of nano-HAp particles on Ti, have aroused increasing research interest in the biomedical field. In this study, we prepared HAp nanocrystal coated Ti surface by plasma surface modification and wet chemical method and then evaluated biological behavior of MC3T3-E1 on the HAp coated on plasma modified Ti surface. Nano-size crystals of sintered HAp were uniformly coated on polyacrylic acid (PAA) deposited Ti surface through the ionic interaction between calcium ions on the HAp nanocrystal and carboxyl groups on the PAA/Ti. *In vitro* cell tests revealed surface modification of Ti surface with HAp nanocrystal significantly improved the adhesion and growth of the osteoblastic MC3T3-E1 cells and induced to differentiate at an enhanced level.



## 제 1 장 서 론

생체 기관을 인공적으로 대체하기 위한 생체용 재료의 연구는 고분자, 세라믹, 금속재료 등 거의 모든 재료분야에서 다양하게 연구 개발되고 있으며, 특히 금속재료의 경우 높은 하중이나 고강도가 요구되는 치아나 관절 및 screw 등에 사용되고 있다.<sup>1, 2</sup>

일반적으로 티타늄 합금이 대기중에 노출되면 티타늄 표면에서 산소와 결합하여 2~5 nm의  $TiO_2$ 라는 자연적인 산화막을 형성하여 내식성을 향상시키며 생리적 구성성분, 단백질, 경조직 및 연조직이 재료표면에 부착하는데 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 골 유착에도 중요한 역할을 하여 생체적합성에 많은 기여를 한다.<sup>3</sup> 그러나 자연적인 산화막은 두께가 얇고 경도와 내마모성이 낮으며 공식을 발생하기 쉬운 단점이 있다.<sup>4</sup> 또한 골과의 화학적 결합에 의해 골 형성을 적극적으로 유도하지 못해 치유기간이 다소 긴 것으로 알려져 있다.<sup>5</sup> 이러한 이유로 골 조직 내에 임플란트의 접합을 개선하고자 하는 연구, 즉 골과의 결합을 높이기 위하여 티타늄 표면 개질을 통하여 생체활성도(bioactivity) 증진을 위해 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 들어서는, 티타늄 임플란트 표면조직의 개선을 통해 골조직이 생역학적인 방법으로 우수한 결합을 유도하기 위해 티타늄 소결 코팅, 티타늄 플라즈마 스프레이 코팅법, 전기화학적 방법에 의한 양극산화처리, 칼슘-인산 코팅, 입자분사 후 양극산화처리 공법, 물리기상증착법을 이용한 질화물 코팅과 칼슘인산코팅법 등 다양한 기법으로 임플란트 표면의 개질향상을 위해 연구가 새롭게 이루어지고 있다.<sup>6-11</sup>

따라서 이에 본 연구에서는 플라즈마처리를 이용하여 티타늄표면에 카르복실기를 코팅하고, 코팅된 카르복실기와 결정화된 나노 수산화인회석과의 공유결합층을 형성하여 그 표면의 특성과 MC3T3-E1 세포를 이용한 MTT와 ALP활성도를 관찰하였다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절. 실험재료

상용 티타늄(NSC, grade 2, Japan)을 직경 10mm 디스크형태로 제작하여 기계적 연마를 하고 세척 한 후 연구에 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. 나노 수산화인회석 제조

본 연구에서 수산화아파타이트 합성법으로 가장 폭넓게 이용되고 있는 방법인 습식합성법을 이용하여 제조하였다. 25mM의 질산칼슘 ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 99% Junsei Co.)에 암모니아수 ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Samchon Co.)를 이용하여 pH를 10으로 적정한 15mM의 인산암모늄 ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 99%, Junsei Co.) 적하시켜 침전물을 얻어내고, 침전물을 3차 증류수를 이용하여 5회 이상 세척한 후 80°C에서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 침전물을 800°C에서 1시간 동안 하소처리를 실시하였다.

### 제 3 절. 플라즈마 표면개질

플라즈마 중합반응시 모노머는 아크릴산 (99.5%, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였고, 플라즈마 반응장치의 구성도를 Fig. 10에 나타내었다. 플라즈마 표면개질 처리 전, 시료표면의 유기물제거와 표면의 활성화를 부여하기 위하여 전처리를 실시하였다. 전처리 과정은 아르곤 (Ar)가스와 산소를 각각 유속 25 sccm을 흘려주어 챔버내의 반응 압력을 200 mtorr로 유지한 후, 플라

즈마 방전세기를 200W로 10분 동안 수행하였다. 이어서 중합반응은 모노머의 증기압과 25 sccm의 Ar가스의 유속으로 챔부내부 반응압력을 200mtorr로 유지한 후, 50W, 5분 동안 반응시킨후 3차 증류수로 표면을 세정하고, 진공오븐에서 60℃로 24시간동안 건조를 실시하였다.

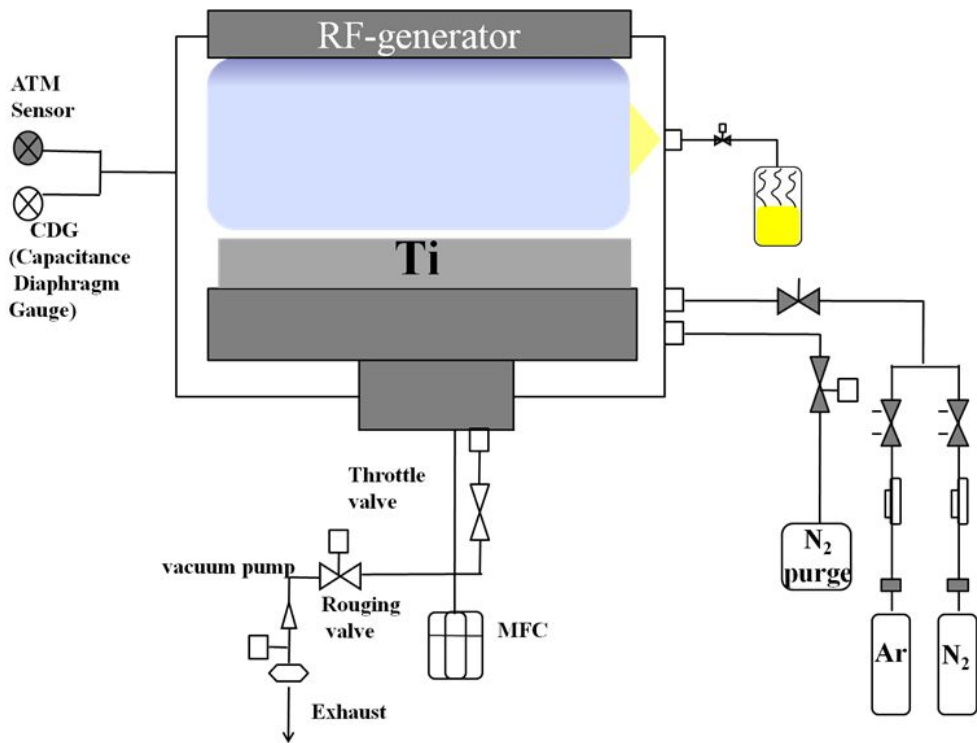


Fig. 1. Schematic diagram for plasma device.

#### 제 4 절. 나노 수산화인회석 코팅

하소처리된 나노수산화인회석을 코팅하기 위하여 1ℓ의 고순도 에탄올 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, 99.9% Merck)에 10g을 분산처리한 후, 플라즈마 표면개질처리된 티타늄 시료를 1시간동안 침지처리한 후, 3차 증류수를 이용하여 표면을 세정하고, 진공오븐에서 60℃로 24시간동안 건조를 실시하였다.

#### 제 5 절. 표면분석

주사전자현미경 (FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, S-4800, Hitachi, Japan)을 이용하여 플라즈마 처리된 티타늄의 표면과 나노수산화인회석의 코팅층 형성을 관찰하다. 플라즈마 처리된 티타늄 표면과 나노수산화인회석과의 결합을 확인하기 위하여 푸리에 변환 적외선 분광기 (FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy, FT/IR-4100, Jasco, Japan)를 이용하였다. 표면의 결정구조를 관찰하기 위하여 X-선 회절분석장치 (X-ray diffractometer, X'pert, Philips, Netherlands)를 이용하였다.

나노 수산화인회석 코팅표면의 젖음성을 관찰하기 위하여 접촉각을 측정하였다. # 1200번까지 티타늄, 아크릴산이 코팅된 티타늄 시편을 각각 준비하여 60℃에서 24시간 건조한 후 접촉각을 측정하였다. 각 시편의 접촉각 변화를 관찰하기 위하여 증류수 약 5 $\mu$ ℓ를 시편에 떨어뜨린 후, 접촉각 측정기 (GSA, Surfacetech, Korea)로 5 초 후에 접촉각을 측정하였다.

#### 제 6 절. 조골모세포 배양

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 serum(PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin(Lonza

walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

## 제 7 절. 생체적합성 평가

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  $1 \times 10^5$  cells/well을 파종하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 각각 1일, 2일, 3일 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  $\mu$ L씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 제 3 장 실험결과

### 제 1 절. 나노 수산화인회석

Fig. 2는 800℃로 하소처리된 수산화인회석을 Fe-SEM과 X-rd를 이용하여 미세구조와 결정구조를 관찰한 결과이다. 제조된 수산화인회석은 100nm이하의 사이즈를 갖는 구형의 분말임을 관찰할 수 있었고, 결정구조는 JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, PCPDFWIN) #74-0565와 대조하여 확인한 결과 수산화인회석임을 확인할 수 있었다. 수산화인회석의 산화칼슘이나 수산화칼슘등은 발견되지 않았다.

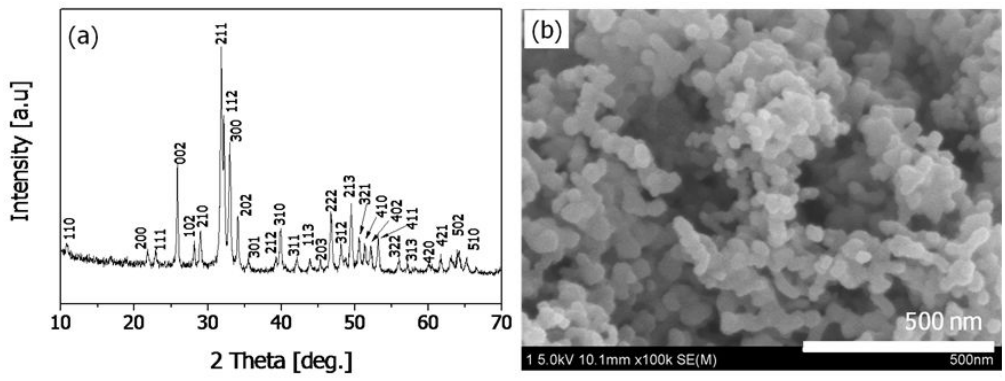


Fig. 2. TF-XRD pattern and microstructure of nanocrystalline HAp particles.



## 제 2 절. 나노 수산화인회석 코팅 표면특성

Fig. 3은 FE-SEM을 이용하여 연마처리 된 티타늄, 플라즈마 표면처리된 티타늄, 그리고 나노수산화인회석이 코팅된 티타늄 표면을 관찰한 결과이다. Fig. 3(b)는 아크릴산을 플라즈마 처리를 통하여 티타늄표면에 중합한 표면이며, Fig. 3(a)와는 다른 표면임을 관찰할 수 있다. Fig. 3 (c)와 (d)는 플라즈마 처리된 티타늄을 나노수산화인회석이 분산된 에탄올용액에 1시간동안 침지처리한 표면을 각각 3만배와 5만배로 관찰한 결과이다. Fig. 2 (b)의 분말형태가 고르게 분산되어 코팅된 것을 관찰할 수 있었고, 응집된 표면은 관찰되지 않았다.

Fig. 4는 X-rd를 이용하여 나노수산화인회석이 코팅된 표면의 결정구조를 관찰한 결과이다. Fig. 2 (a)와 비슷한 결정구조를 갖는 것으로 확인되었고, 나노수산화인회석의 코팅막의 두께가 얇아 회절피크가 낮고, 티타늄의 결정구조가 발견되었다.

Fig. 5는 플라즈마 표면처리된 티타늄과 나노수산화인회석이 코팅된 표면의 FT-IR 결과이다. 플라즈마 표면처리된 티타늄의 경우에는  $1750\text{ cm}^{-1}$  부근에서 COOH(카르복실기)을 나타내었고, 나노 수산화인회석이 코팅된 표면에서는 카르복실기의 피크가 감소하였다. 또한 나노수산화인회석이 코팅된 표면의 경우  $1065$ 와  $1135\text{ cm}^{-1}$ 의 P-O 결합피크가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 6은 나노 수산화인회석이 코팅된 표면에 접촉각을 측정한 결과이다. 카르복실기 형성된 티타늄표면의 접촉각이 감소하고 이는 일반적인 카르복실기 친수성임과 일치하며 나노 수산화인회석이 코팅된 경우 더 낮은 접촉각을 나타내었다. 이는 다른 문헌에서도 확인할 수 있으며<sup>12</sup> 낮은 접촉각이 형성된 표면이 cell과의 접촉시 세포접착과 매우 밀접한 관련이 있으며 친수성을 가지는 세포의 부착이 우수하여 임플란트와 같은 생체재료로써 사용이 가능하다고 보고되고 있다.<sup>13</sup>

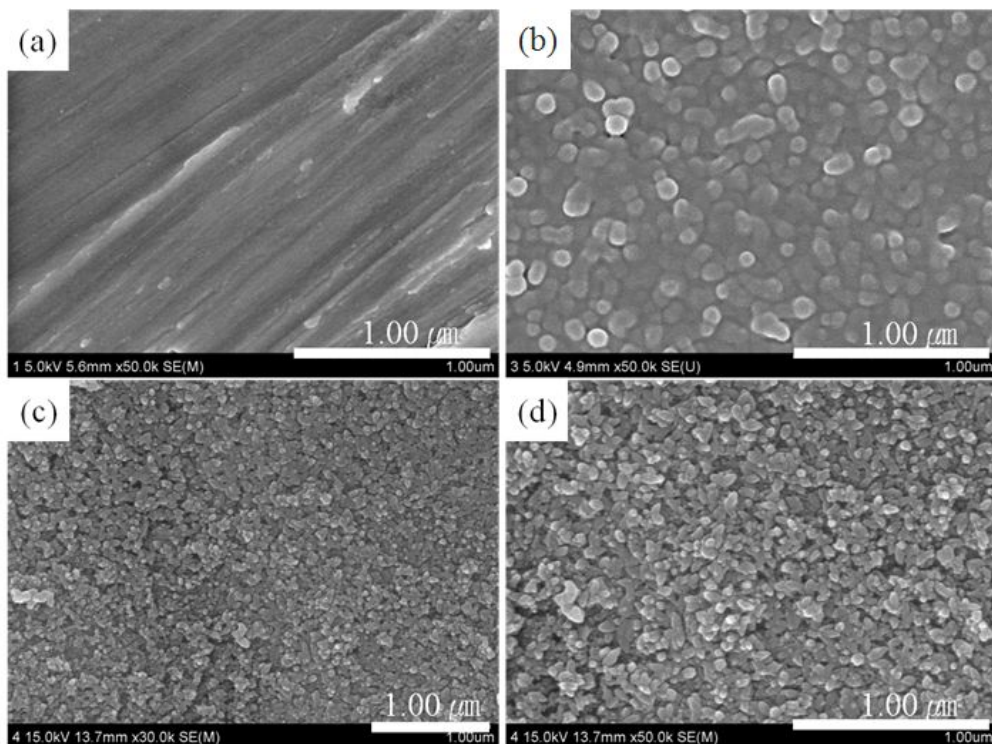


Fig. 3. FE-SEM images of (a) untreated CP-Ti, (b) COOH/Ti and (c and d) HAp/COOH/Ti surfaces.

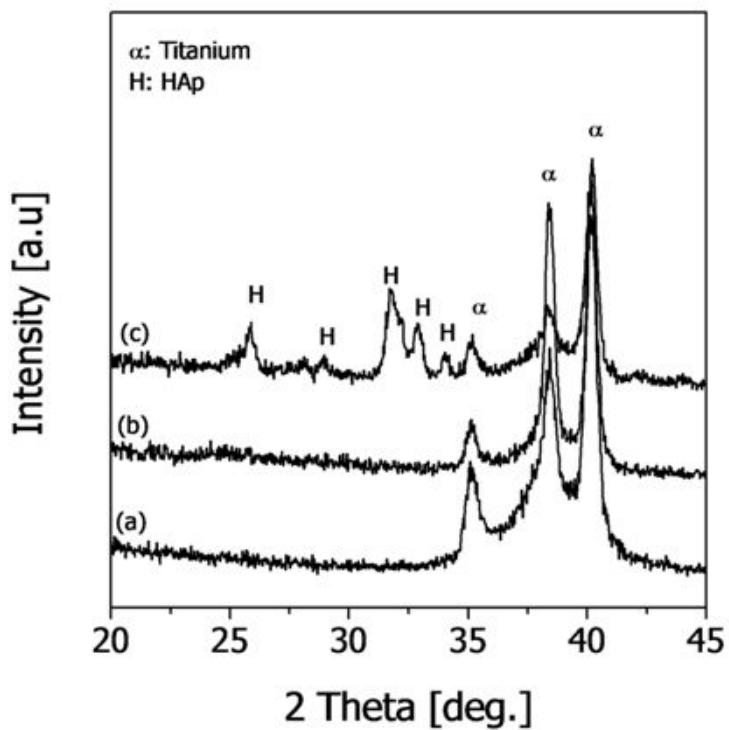


Fig. 4. TF-XRD patterns of (a) CP-Ti, (b) COOH/Ti and (c) HAp/COOH/Ti surfaces.

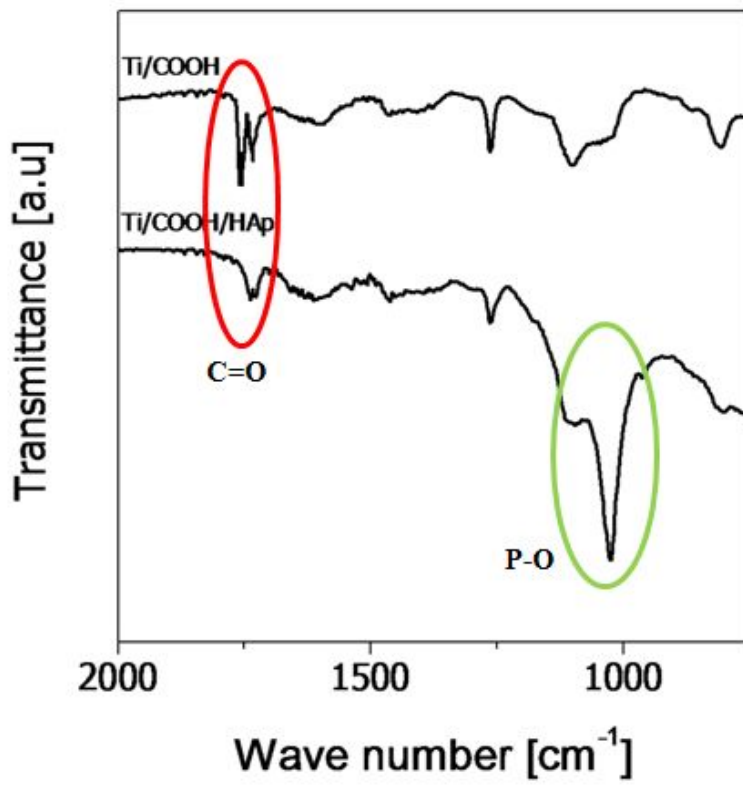


Fig. 5. ATR-FTIR spectrum of HAp coated on Ti/COOH.

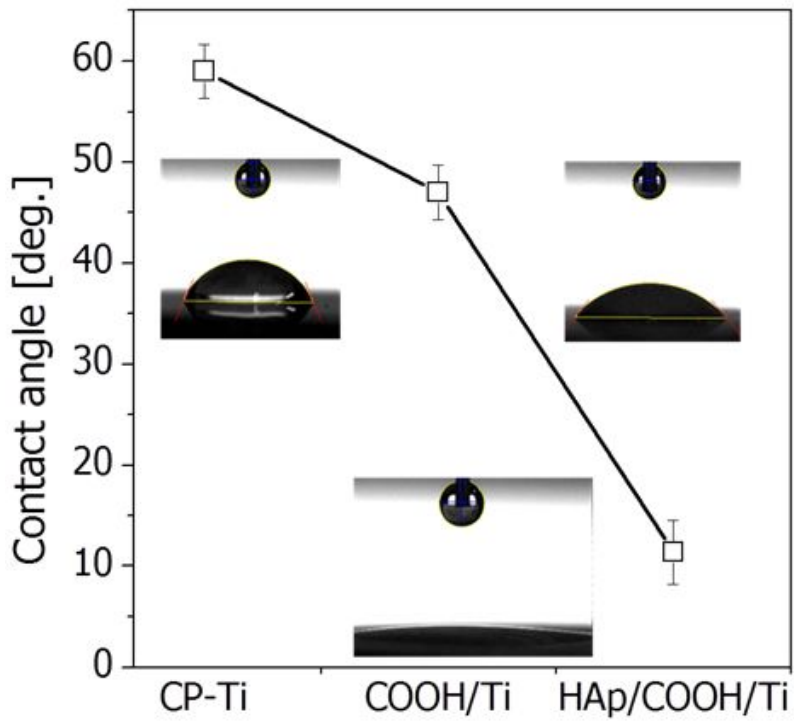


Fig. 6. Contact angle values of water droplets measured on the different surface treatment.

### 제 3 절. 조골모세포 증식 및 분화 특성

나노 수산화인회석이 코팅된 표면에 MC3T3-E1 세포 부착력 및 증식력에 관한 평가는 MTT 분석법을 통해 살펴보았다. 처리되지 않은 표면과 카르복실이 코팅된 표면 그리고 나노 수산화인회석이 코팅된 표면을 실험그룹으로 사용하였고 tissue culture plate를 컨트롤 그룹으로 사용하여 실험을 행하였다. 세포의 생존률 및 증식률은 미토콘드리아 활성법과 직접연관이 있는 MTT 방법을 통해 조사하였다. MC3T3-E1 세포 생존률은 각각 1일, 4일 동안 배양하여 Fig 7에 나타내었다. MTT 분석결과 초기의 반응은 표면처리되지 않은 표면과 비슷하거나 오히려 더 낮은 결과를 나타내고 있고, 7일째 되는 결과를 살펴보면 나노 수산화인회석이 코팅된 표면이 높은 생존율을 나타내는 것으로 관찰되었다.

Fig. 8은 나노 수산화인회석이 코팅된 표면에 MC3T3-E1 세포를 이용하여 ALP활성도를 관찰한 결과이다. 관찰결과 6일에 비해 12일에서 더 뚜렷한 ALP 활성도를 관찰 할 수 있었고, 나노 수산화인회석이 코팅된 표면이 처리하지 않은 티타늄 표면과 카르복실산이 코팅된 표면보다 월등히 높은 ALP활성도를 갖는 것을 관찰할 수 있었다.

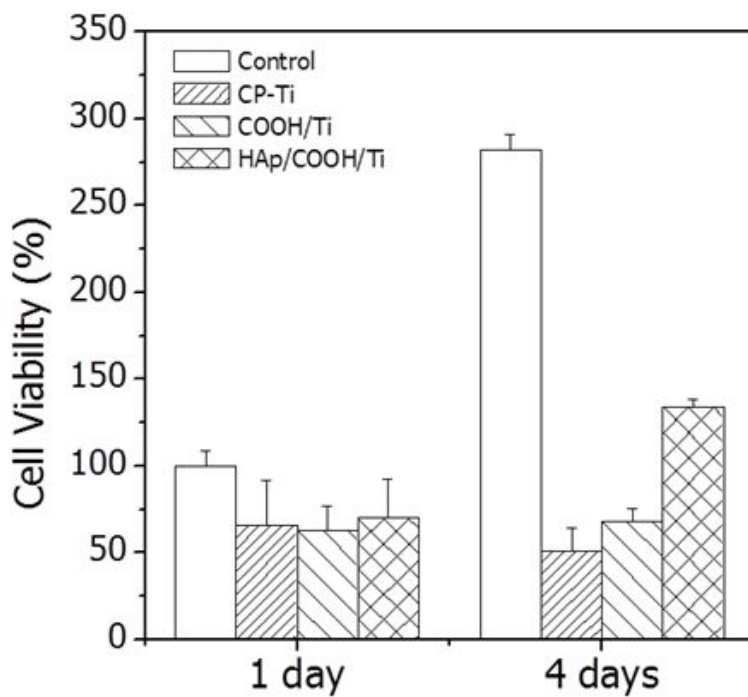


Fig. 7. The results of MTT assay for MC3T3-E1 cell seed on different surface conditions.

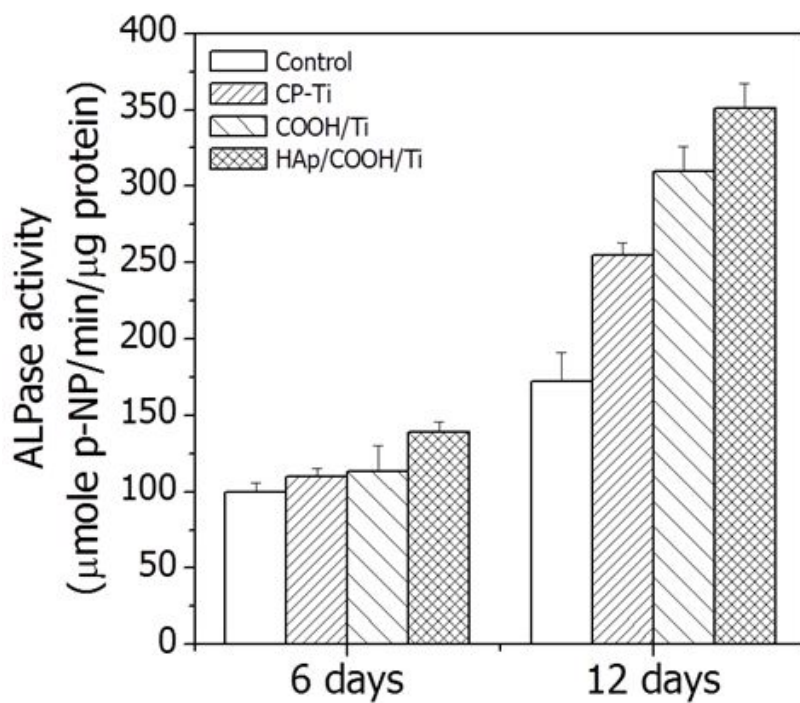


Fig. 8. Alkaline phosphatase (ALP) activity of MC3T3-E1 cells cultured for 6 and 12 days.



## 제 4 장 고찰

수산화인회석은 인공적으로 제조할 때만 얻을 수 있는 것으로 자연골에서 얻는 미네랄 성분과는 차이가 있다. 자연골 성분은 부위에 따라 차이가 있지만 인공 수산화인회석에 비해 저 결정성이며, Ca이 결핍된 상태이고,  $PO_4^{-3}$ 의 일부를  $CO_3^{-2}$ 가 치환한 특징이 있다. 결정화된 수산화인회석을 체내에 이식할 경우 먼저 수산화인회석 결정 표면에 비정질인회석이 형성되고, 3개월 후 뼈와 유사한 아파타이트 층이 임플란트와 뼈조직 사이에 생성된다. 6개월 후에는 뼈와 아파타이트사이에 직접적인 결합이 생기고 콜라겐 섬유질이 임플란트의 내부로 성장한다. 이러한 생체반응을 나타내는 특성을 생체활성이라고 하며 수산화인회석은 이러한 과정을 통해 신생골과 화학적으로 결합한다. 특히 나노화될 경우, 비표면적의 향상에 의한 빠른 골생성의 증대를 기대할 수 있다. 그러나 결정화된 수산화인회석 코팅 표면을 얻기 위해서는 대부분의 방법들이 높은 온도의 소결처리가 필요하며, 높은 온도의 결정화처리에 의한 티타늄표면의 열팽창계수의 차이로 인해 수산화인회석의 균열이 발생할 수 있다.<sup>14</sup> 본 연구는 결정화 처리된 나노 사이즈의 수산화인회석을 고분자박막을 형성된 티타늄층과 공유결합을 유도함으로써, 코팅 후의 결정화처리와 같은 후처리를 피할 수 있고, 단순한 공정에 의한 코팅면을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 그러나 나노 수산화인회석이 체내에 분해 및 재흡수되며, 어떻게 신생골을 유도하는지, 인체환경에는 어떤 영향을 끼칠지의 문제 등은 *in vivo* 실험을 통한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 제 5 장 결론

습식합성법을 이용하여 구형의 100nm이하의 크기를 갖는 분말형태의 수산화인회석을 제조하였고, 플라즈마 중합반응을 이용하여 카르복실기를 티타늄표면 코팅한 후, 제조된 결정화 나노 수산화인회석 분산 용액에 침지하여 공유결합을 유도하여 코팅막을 형성하여 표면분석과 MC3T3-E1세포를 이용하여 MTT 및 ALP활성도를 관찰하였다.

티타늄표면에 결정화된 나노 수산화인회석이 분산된 형태로 코팅됨을 확인하였고, MTT 및 ALP활성도 관찰결과 나노 수산화인회석이 코팅된 티타늄표면이 무처리 조건과 카르복실기가 코팅된 티타늄보다 높은 분화도와 ALP활성도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. M Niomi (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Sci Eng A* 243:231-236.
2. JE Davies, B Lowenberg, A Shinga (1990). The bone-titanium interface *in vitro*. *J Biomed Mat Res* 24:1289-1306.
3. D Krupa, J Baszkiewicz, JA Kozibowski, Barcz A, JW Sobzak, A Bilinski, MD Lewandowska-Szumiel, B Rajchel (2001). Effect of calcium-ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. *Biomaterials* 22:2139-2151.
4. XY Liu, KC Paul, CX Ding (2004) Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R* 47:49-121.
5. CG Moran, TC Horton (2000). Total knee replacement: the Joint of the decade. *BMJ* 320:820.
6. E Giglio, MR Guascito, L Sabbatin, G Zambonin (2001). Electropolymerization of pyrrole on titanium substrates for the future development of new biomaterials surfaces. *Biomaterials* 22:2609-2616.
7. 김태영, 손원우, 권태엽, 강인규, 김교한 (2002). 전기화학법에 의한 Ti 양극산화피막의 특성. *대한치과기재학회지* 29:253-261.
8. S Ban, K Matsuo, N Mizutani, J Hasegawa (1999). Hydrothermal-electrochemical deposition of calcium phosphates on various metals. *Dent Mater Jour* 18:259-270.
9. K Groot, R Geesink, Klein CPAT, P Serekian (1987). Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 21:1375-1381.
10. T Hanawa, K Asami, K Asaoka (1996). Microdissolution of calcium ions from calcium-ion-implanted titanium. *Corros Sci* 38:1579-1594.
11. HC Choi, YM Ko (2005) Effects of HA/TiN coated film on the

- surface activation of bone plate alloys. *Mater Sci Forum* 475-479:2287-2290.
12. P Zeggel (2000) Bioactive calcium phosphate coatings for dental implants : a sumarizing characterization of BONIT-FBR *Int Mag Oral Implantol* 1 52.
  13. YJ Lim, Y Oshida, CJ Anders, MT Barco (2001) Surface treat characterization of variously treated titanium materials *Int J Oral Maxillofac Implant* 16 333.
  14. J. Chen, W. Tong, Y. Cao, J. Feng, X. Zhang (1997) Effect of atomosphere on phase transformation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings during heat treatment. *J Biomed Mater Res* 34 15-20.