

분사처리 후 양극산화 처리한 임플란트 표면이 골모 유사 세포의 반응에 미치는 영향

서보용^{1a} · 김영민^{2a} · 최재원¹ · 윤미정¹ · 전영찬¹ · 정창모¹ · 김규천² · 허중보^{1*}

부산대학교 치과대학¹치과보철학교실, ²구강해부학교실

The effect of blasting and anodizing-combined treatment of implant surface on response of osteoblast-like cell

Bo-Yong Seo^{1a}, Young-Min Kim^{2a}, Jae-Won Choi¹, Mi-Jung Yun¹, Young-Chan Jeon¹, Chang-Mo Jeong¹, Gyu-Cheon Kim², Jung-Bo Huh^{1*}

¹Department of Prosthodontics, ²Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Republic of Korea

Purpose: The purpose of this study is to examine characteristics of implant surface with RBM and anodizing treatments, and to evaluate the responses of osteoblast-like cell (MG-63 cell). **Materials and methods:** Grade IV titanium disks were fabricated (Diameter 10 mm, thickness 3 mm). Anodizing treatment (ASD) group, RBM and anodizing treatment (RBM/ASD) group, control (machined surface) group were divided. In this study, osteoblast-like cell was used for experiments. The experiments consist of surface characteristics evaluation by FE-SEM images, energy dispersive spectroscopy and stereo-SEM. In order to evaluate cell adhesion evaluation by crystal violet assay and observe cells form by confocal laser microscopy. To assess cell proliferation by XTT assay, cell differentiation by RT-PCR and mineralization by Alizarin red S stain assay. ELISA analyzer was used for Quantitative evaluation. Comparative analysis was run by one-way ANOVA (SPSS version 18.0). Differences were considered statistically significant at $P < .05$. **Results:** In ASD group and RBM/ASD group, the surface shape of the crater was observed and components of oxygen and phosphate ions in comparison with the control group were detected. The surface average roughness was obtained $0.08 \pm 0.04 \mu\text{m}$ in the control group, $0.52 \pm 0.14 \mu\text{m}$ in ASD group and $1.45 \pm 0.25 \mu\text{m}$ in RBM/ASD group. In cell response experiments, ASD group and RBM/ASD group were significantly higher values than control group in cell adhesion and mineralization phase, control group was the highest values in the proliferative phase. In RT-PCR experiments, RBM/ASD group was showed higher ALP activity than other groups. RBM/ASD group in comparison with ASD group was significantly higher value for cell adhesion and proliferation phase. **Conclusion:** In the limitation of this study, we are concluded that the surface treatment with RBM/ASD seems more effective than ASD alone or machined surface on cellular response. (*J Korean Acad Prosthodont 2015;53:9-18*)

Key words: Anodizing treatment; RBM treatment; Surface roughness; Osteoblast-like cell; Adhesion; Proliferation; Differentiation

서론

임플란트는 티타늄 표면과 골조직간의 직접적인 접촉으로 유지되며, 식립 시 골과 임플란트 사이의 일차접촉이 많을수록 임플란트의 안정성이 높아진다.^{1,2} Albrektsson 등은 골유착에 영향을 미치는 요소로 임플란트 재료의 생체적합성, 임플란트 디자인, 임플란트 표면, 수술 부위 골 상태, 외과적 술식, 하중조건을 제시하였다. 이 중 임플란트의 생체적합성, 표면의 구성

성분과 거칠기, 친수성이 골유착의 중요한 요소로 여겨지며,⁴ 다양한 임플란트 처리에 따른 골 유착 양상에 대하여 연구가 이루어져왔다.^{5,6} Cochran 등⁷은 동물실험에서 임플란트의 표면 특성에 따라 일차 골접촉 정도에 차이가 난다고 보고하였고, Roberts 등⁸은 임플란트의 표면특성은 일차 골접촉 뿐만 아니라 이차 골접촉에도 지속적인 영향을 미친다고 보고하였다.

성공적인 골유착을 위해 티타늄 임플란트의 기계적, 화학적 특성을 개선시키는 다양한 개질방법이 제시되었으며, 초기의

*Corresponding Author: Jung-Bo Huh

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Pusan National University

20 Geumo-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 626-770, Republic of Korea

+82 55 360 5130: e-mail, huhjb@pusan.ac.kr

Article history: Received November 7, 2014 / Last Revision December 18, 2014 / Accepted January 7, 2015

^a These authors are equally contributed to this work.

* This study was supported by Pusan National University research grant (2 years).

© 2015 The Korean Academy of Prosthodontics

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

단순한 기계절삭 처리에서, 표면거칠기 증가 및 미세형상변화, 화학적 성분변화에 이르기까지 보다 생체 활성화된 표면을 제공하기 위해 발전해왔다.⁴ 임플란트 표면거칠기의 증가는 골과 임플란트의 접촉면적을 증가시켜, 골유착 및 기계적인 고정성을 높이는데 기여한다.⁷ Buser 등⁹은 조직형태학적 계측연구에서, 표면거칠기가 큰 임플란트가 활택한 표면을 가진 임플란트보다 골내에서 더 좋은 골유착 안정성을 보이며, 생역학적 연구에서 임플란트 제거 시 더 높은 값의 토크를 얻는다고 보고하였다.⁵ 거칠기를 증가시키기 위해 현재 보편적으로 사용되고 있는 알루미늄 입자를 이용한 모재분사 후 산처리법(sandblasting large-grit and acid-etching, SLA)의 경우, 불규칙한 표면구조의 변화를 통해 세포부착을 개선시키는 방법으로, 동물실험에서 기계절삭된 임플란트보다 더 강한 골반응을 보여주며, 골형성의 양과 질을 높이고, 초기 고정을 향상시킬 수 있다.^{10,11} 그러나 세척 및 산부식 이후에도 일부 알루미늄 입자가 잔류하여 주변조직으로 용출되어 골융합을 방해할 수 있으며, 산부식 처리에 의한 표면의 불균일성으로 부식저항성 감소의 위험성이 지적되고 있다.¹² 이를 보완하기 위해 알루미늄 입자 대신 골전도성을 가지는 수산화인회석 등의 재료를 임플란트 표면에 분사하는 방법(resorbable blasting media, RBM)이 소개되었다.¹³

양극산화처리법(anodic spark deposition, ASD)은 골유착을 촉진시키기 위해 임플란트 표면의 산화막을 변형시키는 화학적 표면개질방법이다.¹⁴ 티타늄 표면에 자연적으로 생성되는 산화막은 낮은 전기전도성과 높은 부식저항성을 가지고 있으며, 열역학적으로 안정하고, 수용성 환경에서 낮은 이온형성능을 가지지만,^{15,16} 이런 자연 발생적인 산화막은 두께가 얇고 불균일하여, 적절한 골유착을 유도하기에 적합하지 않다.¹⁷ 임플란트 표면의 양극산화처리를 통해 산화막의 두께, 화학적 조성, 표면의 다공성이 변화하여 골유착 및 안정성이 증가한다.¹⁴ 이런 화학적 표면개질방법의 장점에도 불구하고, 임플란트 표면의 적절한 거칠기가 중요하다는 의견이 존재한다.^{18,19} 따라서 더 좋은 골유착 안정성을 위해 기계적 표면처리방법과 화학적 표면처리방법의 장점을 혼용한 임플란트 표면처리 방법에 대해 생각해 볼 수 있다.

이에 본 연구는 tricalcium phosphate 입자를 사용한 모재분사 후 양극산화처리를 한 티타늄 시편의 표면성분 및 미세구조 변화를 살펴보고, 골유착에 중요한 요소인 골모 유사세포의 반응을 비교 평가해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

직경 10 mm, 두께 3.0 mm 크기의 Grade 4 titanium (Dynamet, Santa Fe Springs, CA, USA) 디스크를 시편으로 사용하였다. ASD군, RBM/ASD군, 그리고 대조군으로 나누어 표면처리하였다.

ASD군은 5% H₂SO₄과 3% H₃PO₄ 전해액속에 양극에는 기계적

삭된 시편, 음극에는 백금 rod를 설치하여 180volt에서 3분간 불꽃 산화 처리를 시행하였다.

RBM/ASD군은 기계절삭된 시편에 직경 0.18 - 0.5 mm의 tricalcium phosphate 입자를 0.8 MPa의 힘으로 네방향에서 5초간 분사를 시행한 후, ASD군과 동일한 조건으로 양극산화 처리를 시행하였다.

아무런 처리를 하지 않은 기계절삭표면의 시편을 대조군으로 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 표면분석

(1) 미세구조관찰

처리된 시편의 미세구조를 관찰하기 위해, 티타늄 시편에 이온증착기(sputter coater; Eiko IB, Tokyo, Japan)를 이용하여 백금을 코팅하고, 전계방출형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, FE-SEM; Quanta 200 FEG, FEI, Hillsboro, OR, USA)으로 표면 촬영을 진행하였다.

(2) 표면성분분석

표면성분을 알아보기 위하여 에너지분산분광기(energy dispersive spectrometer; Quanta 200, METEK, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

(3) 표면거칠기 측정

6개의 시편표면에 백금코팅을 한 후, 입체주사전자현미경(stereo scanning electron microscope, Stereo-SEM; Zeiss EVO25, Zeiss, Oberkochen, Germany)과 MeX V5.1 software (Alicona, Grambach, Austria)를 사용하여 표면을 6도의 각도로 80배 확대하여 표면형상의 3차원 이미지를 산출하였다. Gaussian filter (cut-off wavelength $\lambda_c = 31 \mu\text{m}$)를 이용하여, 단위 면적당 평균거칠기(Sa), 각 관측치의 자승의 산술평균의 평방근(Sq), 돌출면의 최대 높이와 최소 높이 거리(Rt)를 산출하였다.

2) 세포배양

MG-63 세포(osteoblast-like cell; The Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 37°C, 5% CO₂ 조건하에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; PAA, Pasching, Austria)과 1% penicillin-streptomycin을 포함한 Dubecco's minimum essential media (DMEM; PAA, Pasching, Austria)에서 배양하였다. 세포를 시편에 부착시켜 배양하는 모든 실험에서 분화 유도 배지를 사용하였다. 분화 유도배지는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 100 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM이다.

3) 세포의 부착특성관찰

세포의 부착에 대한 정량적 특성을 평가하기 위해 crystal violet assay를 시행하였다. 시편이 포함된 24-well plate에 세포 (4×10^4

cells/well)를 파종하여, 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 인산완충용액으로 부착되지 않은 세포를 세척하여 제거하였다. 부착된 세포는 10% 에탄올에 희석된 0.2% crystal violet (Georgiachem, Fukuoka, Japan)으로 염색하고, 5분 동안 실온에 두었다. 남은 염색약을 씻어내고, 염색된 세포를 95% 에탄올로 15분간 용해 후, 96-well plate에 옮겨 담았다. 효소결합면역흡착검사 분석기 (ELISA analyzer; Spectra MAX 250s, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다(각 군당 n=7).

또한 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM; HITACHI S3500N, Tokyo, Japan)을 사용해 세포부착 양상을 관찰하였다. 각각의 시편이 포함된 24-well plate에 MG-63 세포(2×10^4 cells/well)를 파종 후, 37°C에서 1일 동안 배양하였다. 티타늄 시편은 인산완충용액(pH 7.4)으로 3번 세척 후, 2.5% glutaraldehyde 용액으로 20분간 1차 고정용을 시행하였다. 1% osmium tetroxide로 2차 고정 후, 4°C에서 70%에서 100%까지 매 10분마다 10%씩 증가시킨 에탄올과 증류수의 혼합액에 탈수하였다. 세포형태를 관찰하기 위해 백금코팅을 시행 후, 주사전자현미경으로 관찰하였다.

4) 세포의 형태관찰

티타늄 표면에서 성장한 세포의 형태를 관찰하기 위해 세포 골격유지에 중요한 역할을 하는 F-actin을 형광물질로 염색 후, 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope; LSM700, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 관찰하였다. 시편이 포함된 24-well plate에 세포(1×10^4 cells/well)를 파종하여 2시간과 24시간 동안 배양한 후, 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하였다. 시편을 인산완충용액으로 세척 후, 4°C에서 cytoskeleton buffer (5×10^{-3} M NaCl, 15×10^{-3} M MgCl₂, 5×10^{-4} M Tris-base, 0.5% TritonX-100)에 5분 동안 담그고, 이 후 37°C에서 blocking buffer (인산완충용액에 5% FBS, 0.1% Tween-20과 0.02% sodium azide를 혼합)에 30분 동안 담그었다. 그 후, 실온에서 30분간 50 mg/mL의 phalloidin-conjugated tetramethylrhodamine B isothiocyanate와 20 mg/mL의 Hoechst33342 (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)용액에 염색하고, 공초점 레이저 현미경을 사용해 세포의 형태를 관찰하였다.

5) 세포의 증식특성관찰

세포파종(1×10^4 cells/well) 후, 3일 동안 배양하고, 인산완충용액으로 세척하였다. XTT assay kit (Cell Proliferation Kit II, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 첨가하여 2시간 더 배양하였다. 생성된 formazan crystals를 dimethyl sulfoxide로 용해시키고, 96-well plate로 용액을 옮기고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(각 군당 n=7).

6) 세포의 분화표지단백질 유전자 발현 평가

분화에 관여하는 여러 유전자의 mRNA의 발현 정도를 알아보기 위해 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하였다. 시편이 담긴 24-

well plate에 세포(0.5×10^4 cells/well)를 파종하여 7일간 배양하고, RNA를 추출하였다. 전체 RNA는 TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 분리하였고, One-step PreMix kit (iNtRON Biotechnology Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR master mix (Doctor Protein Corp., Seoul, Korea)와 특정한 primer를 첨가하여 PCR (Takara, Shiga, Japan)로 증폭시켰다. 자외선 광선에서 보이는 ethidium bromide로 염색하고, 1.5% agarose gel에 전기영동을 시행하였다.

7) 세포의 광화특성평가

분화를 통해 세포에 침착된 칼슘의 양을 측정하기 위해 Alizarin red S stain 법을 이용하였다. 24-well plate에 세포를 파종 (5×10^3 cells/well)하고, 21일 동안 배양하였다. 세포를 인산완충용액으로 3회 세척하고, -20 °C에서 70% 에탄올로 1시간 동안 고정 후, 증류수로 세척하였다. 실온에서 15분간 40 mM의 alizarin red S (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)로 세포염색 후, 남은 용액을 제거한 후, 수세하였다. 염색된 세포의 염료를 10% cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)에서 1시간 동안 용해시킨 후, 96-well plates로 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(각 군당 n=7).

8) 통계분석

세포부착, 증식, 그리고 광화정도의 비교평가를 위한 통계 처리는 SPSS Ver. 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 one-way ANOVA로 분석하였으며 Tukey test로 사후 분석하였다. 모든 실험에서 유의 수준 5%와 1%에서 검정하였다.

결과

1. 표면 분석

티타늄 임플란트는 골조직에 직접 접촉하여 골유착 반응을 일으켜 인공 지지체로서의 역할을 한다. 표면형상의 거칠기가 골과의 접촉면적을 변화시키고, 표면 처리시의 방법에 따라 생긴 표면성분의 변화가 표면에너지 변화를 유도하여 친수성을 변화시키는 것으로 알려져 있다.²⁰

표면 처리에 따른 표면의 미세구조를 관찰하기 위하여 전체 방출형 주사전자현미경 촬영을 하였다. Fig. 1의 C, D에서 나타나는 바와 같이 ASD군은 인산과 황산을 이용하여 전해조에서 양극산화반응을 일으켰을 때, 분화구 모양의 특징적인 표면형상이 나타났으며, 단위면적당 거칠기(Sa)는 $0.52 \pm 0.14 \mu\text{m}$, 돌출부의 최대 높이와 기저부의 최저깊이와의 거리(Rt)는 $6.44 \pm 1.51 \mu\text{m}$ 로 나타났다. RBM/ASD군은 티타늄 표면을 직경 0.18-0.5 mm 크기의 tricalcium phosphate를 이용하여 분사시켜 깊이 $15 \mu\text{m}$, 폭경 10 - 50 μm 정도의 홈들이 있는 불규칙한 표면을 만든 후, 양극산화처리를 한 결과, Sa 값은 $1.45 \pm 0.25 \mu\text{m}$, Rt 값은 $13.76 \pm 2.69 \mu\text{m}$ 로 큰 변화를 볼 수 있었다(Table 1). Fig. 1의 E, F에

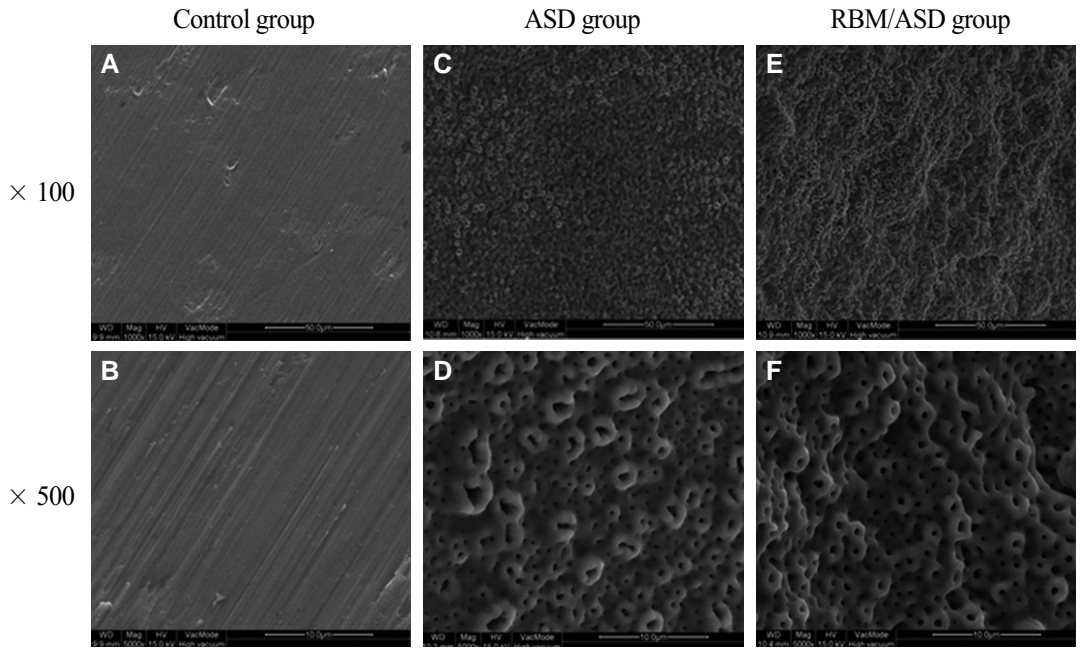


Fig. 1. FE-SEM images of each group. (A) Control group ($\times 100$), (B) Control group ($\times 500$), (C) ASD group ($\times 100$), (D) ASD group ($\times 500$), (E) RBM/ ASD group ($\times 100$), (F) RBM/ ASD group ($\times 500$).

Table 1. Surface roughness by stereo-SEM in each group

| Group | Sa (μm) \pm SD | Sq (μm) \pm SD | Rt (μm) \pm SD |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Control | 0.08 \pm 0.04 | 0.09 \pm 0.02 | 1.95 \pm 0.11 |
| ASD | 0.52 \pm 0.14 | 0.68 \pm 0.19 | 6.44 \pm 1.51 |
| RBM/ASD | 1.45 \pm 0.25 | 1.85 \pm 0.33 | 13.76 \pm 2.69 |

Sa: Average roughness, Sq: Root Mean Square roughness, Rt: Distance between the highest and the lowest point.

Table 2. The percentage of components in each group's surface

| Element (%) | Carbon | Oxide | Phosphate | Titanium |
|-------------|--------|-------|-----------|----------|
| Control | 2.21 | 6.27 | 0.74 | 90.77 |
| ASD | 2.66 | 43.09 | 7.34 | 46.91 |
| RBM/ASD | 3.03 | 48.60 | 7.63 | 40.74 |

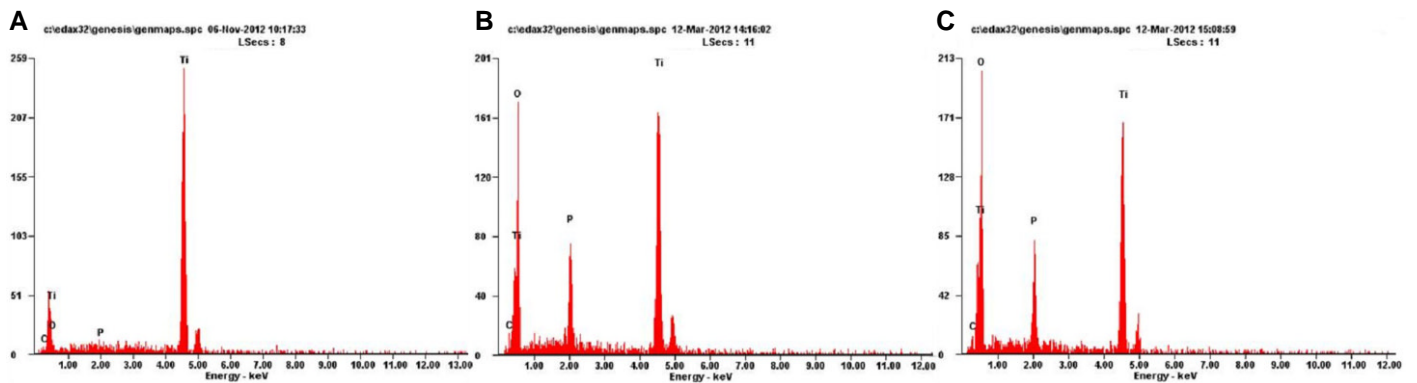


Fig. 2. The results of the energy dispersive spectrometry. (A) Control group, (B) ASD group, (C) RBM/ASD group.

서 보여지는 바와 같이 분사의 영향으로 비교적 큰 크기의 거친 구조 위에 분화구 모양의 특징적인 양극산화 표면을 관찰할 수 있다.

각 표면처리에 대한 성분을 상호 비교하기 위해 FE-SEM 촬

영 후, 에너지분산분석기로 분석을 시행하였다. Fig. 2와 Table 2에서 보면 대조군과 비교해서 ASD군과 RBM/ASD군에서 산소와 인 성분의 피크가 나타남을 볼 수 있고, ASD군과 RBM/ASD군 사이에는 구성 성분의 큰 차이가 없음을 알 수 있다.

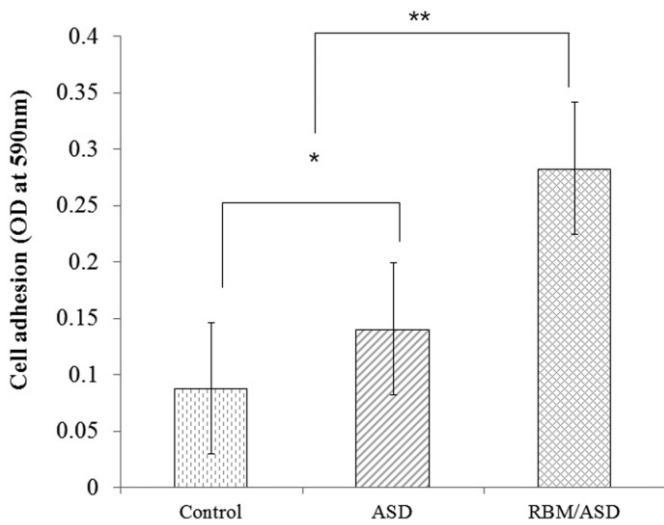


Fig. 3. The degree of cell adhesion by crystal violet staining assay after 3 hours incubation time (n=7 in each group). * $P<.05$, ** $P<.01$.

2. 세포부착평가

표면거칠기와 이온성분의 차이로 인한 세포부착 정도를 관찰하기 위하여 각각의 표면에 세포를 배양하였다. 각 시편에서 3시간 동안 세포 배양 후, crystal violet assay를 이용한 세포부착 정도를 측정하였다. 결과, ASD군은 대조군과 비교 시 세포부착 정도가 높았으며($P<.05$), RBM/ASD군은 다른 두 그룹과 비교하여 더 높은 세포부착 정도를 보였으며($P<.01$), 이 차이는 통계학적으로 유의성 있는 결과를 보였다(Fig. 3).

또한 세포부착 양상을 관찰하기 위하여 주사전자현미경으로 촬영하였고, Fig. 4와 같이 대조군은 ASD군과 RBM/ASD군에 비해 세포의 부착정도가 적었다.

3. 세포형태평가

세포 배양 2시간과 24시간 후, 세포의 골격 유지에 중요한

역할을 하는 F-actin을 염색하여 공초점 레이저 현미경 촬영을 통해 세포 외형을 관찰한 결과, Fig. 5에서 보는 것처럼, 2시간을 배양한 시편에서는 세 그룹간의 큰 차이가 보이지 않았다. 그러나 24시간 배양 후 관찰한 시편에서는 대조군에 비해 ASD군과 RBM/ASD군에서 더 역동적인 모양의 세포들을 관찰할 수 있었다.

4. 세포증식평가

각 시편에서 3일과 7일 동안 세포배양 후, XTT assay를 이용해 세포증식 정도를 측정하였다. 결과, 3일간 배양한 시편에서 ASD군과 RBM/ASD군이 대조군에 비해 유의하게 높은 결과를 보였으며($P<.01$), RBM/ASD군이 ASD군보다 유의하게 높은 세포증식 결과를 보였다($P<.05$). 7일간 배양한 시편에서는, 반대로 대조군에서 가장 높은 수치를 기록하였고, 대조군이 ASD군과 RBM/ASD군보다 유의하게 높은 결과를 보였고, RBM/ASD군은 ASD군보다 유의하게 높은 결과를 보였다($P<.05$) (Fig. 6).

5. 분화표지단백질 유전자 발현 평가

분화에 관여하는 분화표지단백질인 osteocalcin, osteonectin, osteopontin, collagen type I, ALP 및 GAPDH에 대한 발현 정도를 알아보기 위해, mRNA 추출하여 전기영동을 실시하였고, 그 결과는 Fig. 7에서 보여주고 있다. Osteocalcin, osteopontin, collagen type I은 세 군 모두 비슷한 발현정도를 보여주고 있으며, ALP는 RBM/ASD군에서 가장 높은 발현정도를 보여주고 있다.

6. 세포광화평가

세포분화의 마지막 단계에서, 칼슘 침착량을 알아보기 위해 각각의 시편에서 21일 동안 배양한 후, alizarin red S 염색법을 시행하였다. 대조군과 나머지 두 군 사이에는 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보였으며($P<.01$), ASD군과 RBM/ASD군 간에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 8).

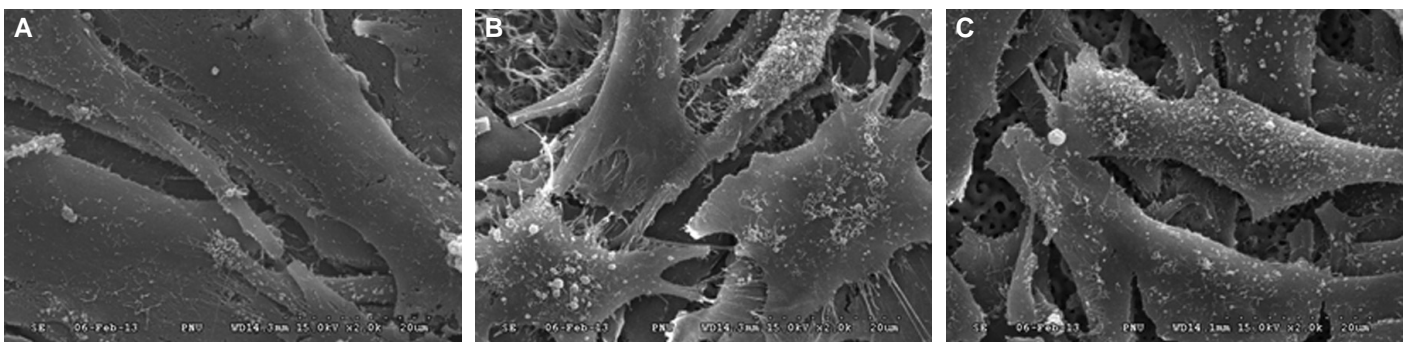


Fig. 4. Adhesion pattern images of MG-63 cells by SEM ($\times 40,000$ magnification). (A) Control group, (B) ASD group, (C) RBM/ASD group.

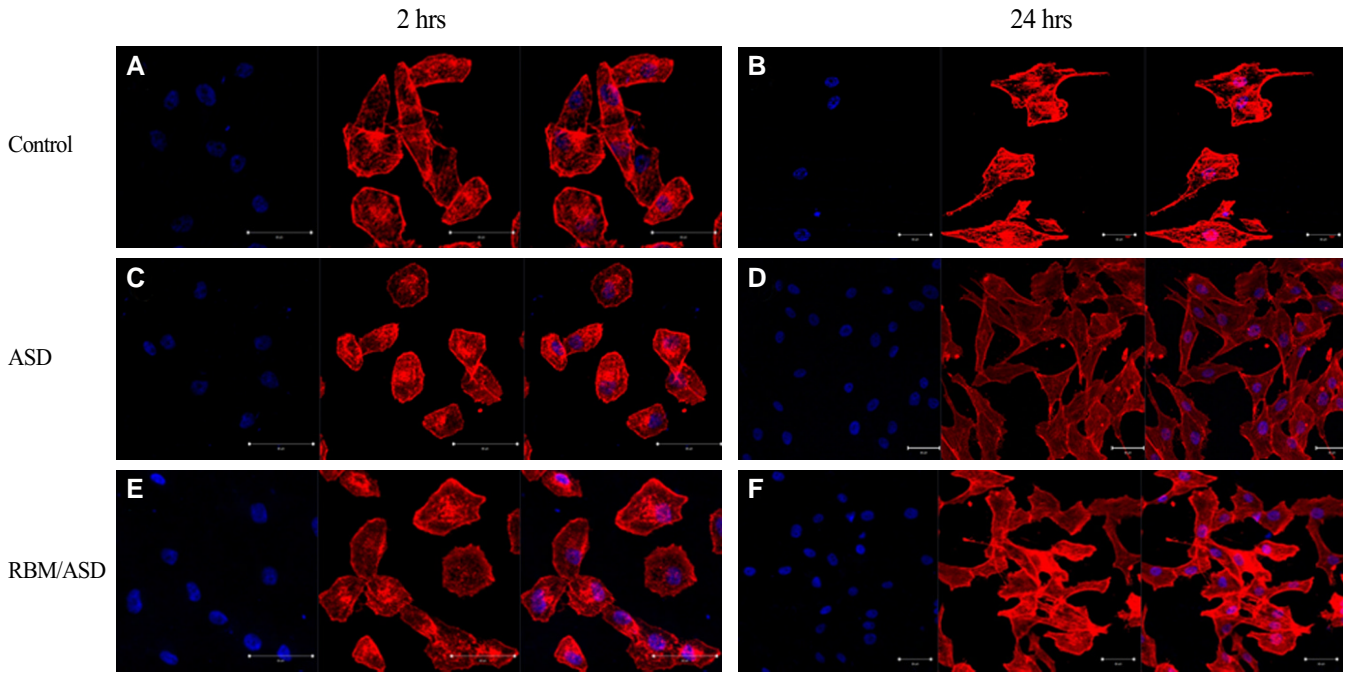


Fig. 5. Confocal laser scanning microscopy images of MG-63 cells ($\times 400$ magnification). (A) Control group (incubation for 2 hours), (B) Control group (incubation for 24 hours), (C) ASD group (incubation for 2 hours), (D) ASD group (incubation for 24 hours), (E) RBM/ASD group (incubation for 2 hours), (F) RBM/ASD group (incubation for 24 hours).

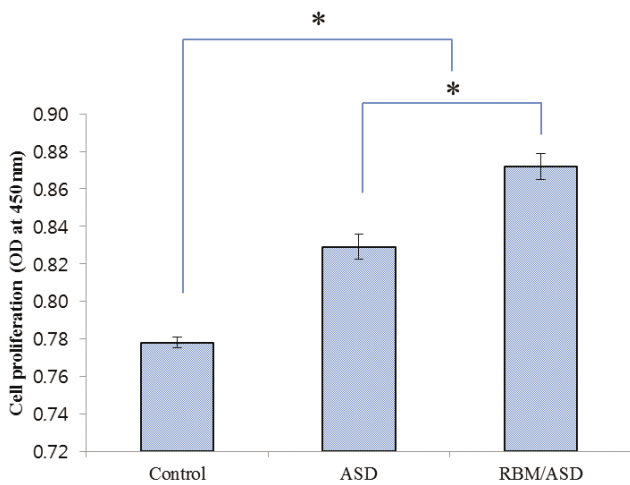


Fig. 6. The degree of cell proliferation by XTT assay after 3 days incubation time (n=7 in each group). * $P < .05$.

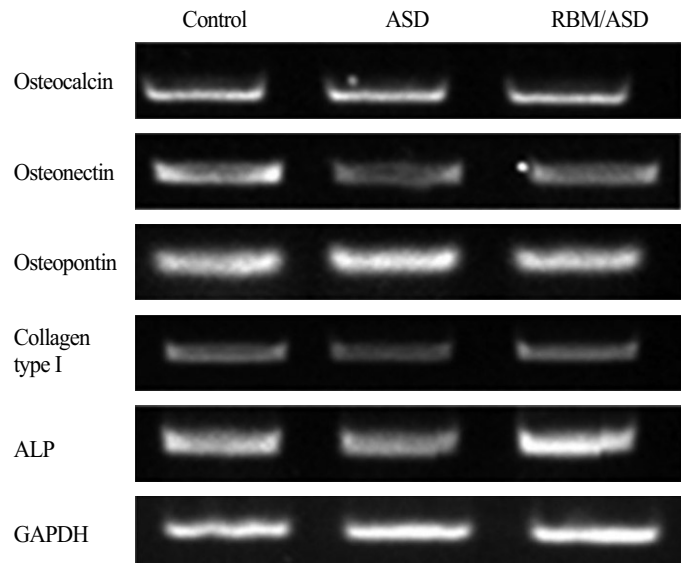


Fig. 7. The Results of electrophoresis after RT-PCR. Osteocalcin, osteopontin and collagen type I were to show a similar expression levels in all three groups, ALP showed the highest expression levels in RBM / ASD group.

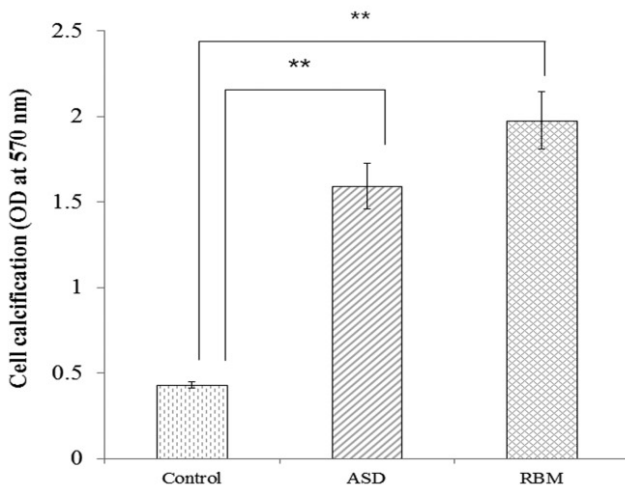


Fig. 8. The degree of cell calcification by Alizarin red S assay after 21 days incubation time (n=7 in each group). **P<.01.

고찰

골유착은 임플란트 표면과 골조직이 직접적으로 접촉하여 외부의 하중이나 부하를 바로 골조직으로 전달할 수 있는 기능적, 구조적 결합으로 정의된다. 임플란트 치료의 임상적 성공은 골유착에 절대적으로 의존하며,²¹ 식립 초기의 기계적 고정과 조골세포의 빠른 부착, 증식 및 분화 단계가 중요한 역할을 한다.²²

티타늄과 그 합금은 생적합성을 가지나, 뼈와 직접적으로 화학적 결합을 하지는 못하는 것으로 알려져 있어¹⁷ 임플란트 표면과 골조직간의 생화학적 결합을 얻기 위한 많은 시도들이 이루어져왔다. 이 중 양극산화처리법은 화학적 처리를 통해 티타늄 표면의 산화막의 두께, 구조, 구성, 미세 형태를 변형시키는 방법으로,¹⁴ 재현성의 수준이 높고, 다른 표면 처리 방법들과 비교하여 비교적 적은 경비와 간단한 공정으로 제작 가능하다.²³ 이렇게 발생한 다공성의 표면을 가진 티타늄 산화막은 티타늄 기질과 견고하게 부착되고, 세포부착, 증식, 분화 등의 세포 활성을 개선시키고, 골-임플란트간의 결합력 또한 증가시킨다.²⁴ 이 등²¹은 조직형태학적 분석결과 양극산화 처리된 임플란트에서 골접촉율이 증가하며, 동물실험에서 양극산화 처리된 임플란트의 회전제거력이 RBM처리된 임플란트와 비교해 유의성 있게 높은 값을 보인다고 보고하였다.

임플란트 표면의 화학적인 특성과 함께 골과의 반응에서 중요한 부분은 표면의 물리적 특성, 즉 표면 거칠기이다. 임플란트는 식립 후 가장 먼저 단백질, 지질, 당 등과 각종 혈액 구성물들에 의해 덮히게 되며, 이런 세포 외 기질 단백질에 간접세포의 integrin이 흡착하여 세포의 부착, 이주, 증식 및 분화 등의 세포반응들이 일어난다.²⁵ 이런 과정에서 임플란트 표면거칠기

정도에 따라 integrin의 표현양식이 변화할 수 있고, 부착하는 단백질의 양과 유형, 그리고 부착하는 양상에도 변화가 생길 수 있다.²⁶ Martin 등²⁷은 조골세포의 세포반응실험을 통해 불규칙적인 거친 표면을 가진 임플란트가 기계절삭된 임플란트보다 세포접착이 더 잘 되는 것으로 보고하였고, Wong 등²⁸은 물리적, 화학적으로 개질된 거친 표면이 기계절삭된 표면에 비해 임상적으로 불리한 골질에서 골형성을 촉진하고, 성공적인 임플란트 고정을 얻는데 효과적이라고 보고하였다. Wennerberg²⁹는 거친 표면을 가진 임플란트가 골 창상 부위에서 치유 능력이 우수하며, 골 접촉율과 회전 제거력에서 통계적으로 유의한 증가를 나타내는 안정된 골 유착을 가져다 주지만, 어느 일정한 수치를 초과한 표면 거칠기의 임플란트의 경우, 골 창상 치유가 오히려 제한되어 골유착에 불리하다고 보고하였다.

본 실험에서는 하나의 시편에 두 가지 표면 처리를 진행하였다. 먼저 많이 사용되고 있는 RBM처리를 시행하여 적절한 수준의 기계적 거칠기를 부여하고, 양극산화처리를 통해 화학적인 변화를 시행하였다. 이후 표면구조 및 성분, 거칠기를 조사하고 양극산화처리만 시행한 시편과 골모유사세포의 반응을 비교 실험하였다.

ASD군에 비해 RBM/ASD군에서 더 높은 표면거칠기 값을 보여주며, FE-SEM 사진에서도 3차원적으로 더 역동적인 표면 구조를 보여주었다. ASD군과 RBM/ASD군 모두 대조군과 비교해 인과 산소 피크가 나타났으며, 이것은 양극산화처리 과정에서 전해질 내의 인 이온이 임플란트 시편 표면에 침착된 것으로 생각된다. ASD군과 RBM/ASD군 간에는 표면 성분의 큰 차이를 보이지 않았는데, RBM처리 후 세척과정을 통해 대부분의 입자가 제거되었음을 알 수 있었다.

골모유사세포의 부착정도에서 RBM/ASD군은 대조군과 ASD군에 비해 높은 부착정도를 보이며, 유의성 있는 결과를 보여주었다. 이는 적절한 거칠기의 부여로 임플란트의 표면적을 높여, 세포부착에 관여하는 단백질들의 부착 가능성이 높아진 것으로 볼 수 있다. 세포증식평가에서는 3일 동안 세포 배양 후, XTT assay를 통해 시행하였으며, 3일간 배양한 실험결과에서는 RBM/ASD군이 가장 높은 값을 보였다. ALP 활성정도의 평가에서는 유의성이 없었으나, RT-PCR을 통해 전기영동을 실시한 결과, RBM/ASD군에서 ALP가 높은 발현정도를 보여주었다. 이는 표면거칠기가 증가할수록 낮은 세포증식을 보이고, ALP 활성도는 증가한다는 Lincks 등³⁰의 보고와 일치하며, 김 등³¹의 연구에서도 동일한 결과를 보였다. 세포분화의 마지막 단계인 광화정도의 평가에서 대조군과 비교해 ASD군과 RBM/ASD군이 높은 값을 보이며, 유의성 있는 결과를 보였다.

RBM/ASD군에서 의도한 대로 적절한 거칠기의 값을 얻을 수 있었고, ASD군과 비교해 부착과 증식단계에서 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 골모유사세포의 부착, 증식, 분화 및 광화의 단계에서 실험적인 오류나 생체내와 다른 환경 등에 의해 그 결과에 오차가 있음을 예상할 수 있다. 이 결과를 바탕으로 앞으로 추가적인 동물실험을 통해 RBM처리 후 양

극산화 처리한 임플란트의 표면이 골유착에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

결론

본 실험의 한계내에서 모재분사 후 양극산화 처리한 티타늄 표면 처리 방식이 단순 양극산화 처리한 군이나 대조군보다 골모유사세포의 반응에 효과적인 방법임을 확인하였다.

References

- Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3:81-100.
- Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981; 9:15-25.
- Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 1:11-25.
- Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844-54.
- 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.
- Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981;52:155-70.
- Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998;40:1-11.
- Roberts WE, Garetto LP, DeCastro RA. Remodeling of devitalized bone threatens periosteal margin integrity of endosseous titanium implants with threaded or smooth surfaces: indications for provisional loading and axially directed occlusion. *J Indiana Dent Assoc* 1989;68:19-24.
- Buser D, Brogginini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529-33.
- He FM, Yang GL, Li YN, Wang XX, Zhao SF. Early bone response to sandblasted, dual acid-etched and H₂O₂/HCl treated titanium implants: an experimental study in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:677-81.
- Yang GL, He FM, Yang XF, Wang XX, Zhao SF. Bone responses to titanium implants surface-roughened by sandblasted and double etched treatments in a rabbit model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:516-24.
- Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* 2003;24:263-73.
- Piattelli M, Scarano A, Paolantonio M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A. Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol* 2002;28:2-8.
- Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 2002;23:491-501.
- Lausmaa J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *J Electron Spectrosc Relat Phenom* 1996;81:343-61.
- Olefjord I, Hansson S. Surface analysis of four dental implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8:32-40.
- Machnee CH, Wagner WC, Jaarda MJ, Lang BR. Identification of oxide layers of commercially pure titanium in response to cleaning procedures. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8:529-33.
- Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17:536-43.
- Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 2004;17:544-64.
- Stadlinger B, Lode AT, Eckelt U, Range U, Schlottig F, Hefti T, Mai R. Surface-conditioned dental implants: an animal study on bone formation. *J Clin Periodontol* 2009;36:882-91.
- Lee HJ, Song KY, Yoon TH. Effect of different surface treatments to increase biocompatibility of dental implant. *J Korean Acad Prosthodont* 2006;44:594-605.
- 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.
- 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.
- Macak JM, Tsuchiya H, Taveira L, Ghicov A, Schmuki P. Self-organized nanotubular oxide layers on Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V formed by anodization in NH₄F solutions. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:928-33.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
- Villarreal DR, Sogal A, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J Oral Implantol* 1998;24:67-73.
- Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, 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.

28. Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1567-75.
29. Wennerberg A. The importance of surface roughness for implant incorporation. *Int J Mach Tools Manufact* 1998;38:657-62.
30. 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;19:2219-32.
31. Kim HJ, Son MK, Park JI, Chung HJ, Kim YJ. Biological response of primary rat calvarial cell by surface treatment of Ti-8Ta-8Nb alloy. *J Korean Acad Periodontol* 2008;38:595-602.

분사처리 후 양극산화 처리한 임플란트 표면이 골모 유사 세포의 반응에 미치는 영향

서보용^{1a} · 김영민^{2a} · 최재원¹ · 윤미정¹ · 전영찬¹ · 정창모¹ · 김규천² · 허중보^{1*}

부산대학교 치과대학¹치과보철학교실, ²구강해부학교실

목적: 본 연구는 Tricalcium phosphate 입자를 사용한 모재분사 후 양극산화처리를 한 임플란트 표면의 특성을 분석하고, 골모 유사 세포의 반응을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법: 직경 10 mm, 두께 3.0 mm 크기의 Grade IV 타이타늄 디스크를 시편으로 사용하였으며, 양극산화처리(ASD)군, 모재 분사 후 양극산화(RBM/ASD)군, 대조군(machined surface)으로 나누어 표면처리하였다. 표면처리 후 FE-SEM, 에너지분산분광기와 주사전자현미경을 사용하여 표면 특성을 평가하였다. 세포의 부착을 평가하기 위해 골모 유사 세포를 이용해 crystal violet assay를 통해 세포부착을 평가하고, 세포 형태는 공초점 레이저 현미경을 사용하여 관찰하였다. 세포증식을 평가하기 위해 XTT 시험을, 세포분화는 역전사 중합효소연쇄반응을 사용하였으며 침착된 칼슘의 양을 측정하기 위해 Alizarin red S stain 을 이용하였다. 비교분석은 one-way ANOVA (SPSS version 18.0)로 유의수준 5%에서 검정하였다.

결과: ASD군과 RBM/ASD군에서, 분화구 모양의 표면 형상이 나타났으며, 대조군과 비교하여 산소와 인산 이온이 관찰되었다. 단위면적당 거칠기는 대조군에서 $0.08 \pm 0.04 \mu\text{m}$, ASD군에서 $0.52 \pm 0.14 \mu\text{m}$, RBM/ASD군에서 $1.45 \pm 0.25 \mu\text{m}$ 를 보였다. 세포반응실험에서, ASD군과 RBM/ASD군이 대조군에 비해 세포의 부착정도가 높았으며 대조군이 세포증식에서 가장 높은 값을 보였다($P < 0.05$). RT-PCR 실험에서, RBM/ASD군이 다른 군들보다 높은 ALP를 보였다($P < 0.05$). ASD군과 비교했을 때 RBM/ASD군은 세포부착과 증식 정도에서 큰 값을 보였다($P < 0.05$).

결론: 본 연구의 한계내에서 모재분사 후 양극산화 처리한 티타늄 표면 처리 방식이 단순 양극산화 처리한 군이나 대조군보다 골모 유사 세포의 반응에 효과적인 방법임을 확인하였다. (*대한치과보철학회지* 2015;53:9-18)

주요단어: 양극산화처리; RBM 처리; 표면 거칠기; 골모 유사 세포; 부착; 증식; 분화

*교신저자: 허중보

626-770 경남 양산시 물금읍 범어로 20 부산대학교 치과대학 치과보철학교실

055-360-5130; e-mail: hujb@pusan.ac.kr

원고접수일: 2014년 11월 7일 / 원고최종수정일: 2014년 12월 18일 / 원고채택일:

2015년 1월 7일

© 2015 대한치과보철학회

이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 3.0 대한민국 라이선스에 따라 이용할 수 있습니다.

^a 두저자는 본 연구에 같은 기여를 하였음.

*이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.