

임플란트 표면의 Ca-P 코팅 방법이 MG63 골모유사세포 반응에 미치는 영향에 대한 *in vitro* 연구

김일연¹ · 정성민² · 황순정³ · 신상완^{4*}

고려대학교 임상치의학대학원 고급치과보철학과, 임상치의학연구소, ¹대학원생, ²교수
³웰치과 원장, ⁴서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과 교수

연구목적: 본 연구에서는 양극산화 임플란트 표면에 서로 다른 두 가지 방법, Ion beam-assisted deposition (IBAD)법과 Sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 임플란트 시편에 골모세포를 배양하였을 때 세포의 증식, 분화, 형태에 어떠한 영향을 미치는지 조사하고자 한다.

연구재료 및 방법: 지름 10 mm, 두께 2 mm 인 상업용 순수 titanium grade IV 재료의 디스크를 제작하였고, 모든 시편은 acetone, 70% ethanol, 증류수에서 각각 10분씩 세척 후 건조하였다. 모든 표면은 300 V의 constant voltage하에서 양극 산화(anodized)시킨다. 실험군은 양극산화 임플란트 표면에 각각 IBAD법과 Sol-gel법으로 Ca-P 코팅하였다. 각 표면의 미세표면 거칠기(Ra)를 측정하였고, SEM을 통해 표면의 형상을 관찰하였다. 골모세포를 배양한 후 각 표면군의 세포 증식, ALP 활성화 및 RT-PCR를 통한 골세포 분화 능력 검증을 하였으며, SEM을 통해 세포의 형상도 확인하였다. 통계분석은 SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 Kruskal-Wallis Test로 각군의 유의성을 검증하였다($\alpha=0.05$).

결과: IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 Sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면보다 표면 거칠기 (Ra) 값이 더 크게 나타났다($P<.05$). IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 Sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면 보다 세포 증식이 더 활발하고 골세포 조기 분화 정도를 확인 할 수 있는 ALP 활성화도 또한 더 높게 나타났다($P<.05$). SEM 관찰 결과 IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면에 골모세포들이 친화성을 띄면서 안정적으로 부착되었다.

결론: IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 Sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면보다 더 우수한 세포 반응을 보였다. IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면의 세포들은 증식이 잘 이루어지고 잘 분화된 골모세포 형상을 보이고 ALP 활성화도 또한 높아 골 형성을 증가시켜 높은 골-임플란트 접촉을 보일 것이다. (*대한치과보철학회지* 2009;47:376-84)

주요단어: 임플란트 표면, 양극산화, Hydroxyapatite, Ion beam-assisted deposition, Sol-Gel, 세포반응

서론

Brånemark은 titanium 표면과 골과의 결합을 설명하기 위해서 “골유착”이라는 용어를 소개했다.¹ 치과용 임플란트의 성공적인 골유착을 얻기 위해서 임플란트의 재료, 형태, 그리고 표면처리 등이 중요한 요소로 작용한다.² 특히, 임플란트 표면의 형태적, 화학적 변화로 인한 거친 표면은 절삭형 (machined) 표면에 비해 임상적으로 불리한 골질에서 뼈형성을 촉진하고 성공적인 임플란트 고정을 얻는데 효과적이라고 보고되었다.³

현재까지 거친 임플란트 표면을 얻기 위한 여러 처리 방법 중 titanium plasma spraying, grit blasting, acid etching, anodizing 등에 관한 많은 연구들이 이루어졌고 좋은 임상결과를 보이고 있다.⁴

Titanium과 그 합금은 생적합성 (bio-inert)을 띠지만, 뼈와 직접적으로 화학적 결합을 하지는 못하는 것으로 알

려져 있어⁵ 임플란트 표면과 골조직 간의 생화학적 결합 (biochemical bonding)을 얻기 위한 많은 시도들이 이루어져 왔다. 이 중 calcium phosphate (Ca-P), 특히 hydroxyapatite (HA)는 생활성 재료로서⁶ 골전도성을 보이며 bone-like apatite층을 형성하여 살아있는 골조직과 결합하여 골유착을 형성한다고 보고되었고,⁷ Ca-P 코팅 임플란트는 빠른 고정과 치유가 요구되는 불량한 골질에서 유용하게 사용될 수 있다고 하였다.^{8,11}

이러한 HA의 훌륭한 성질에도 불구하고 기존에 많이 사용되고 있는 plasma spraying법으로 코팅한 HA 표면은 비교적 두꺼운 코팅 두께 (> 30 μm), 금속 기질과 코팅 계면의 기계적 결합 실패,¹² 무정형의 비결정화 HA 코팅의 용해,¹³ 임플란트 표면과의 점진적인 결합 상실에 따른 임플란트 후기 실패¹⁴ 등이 보고되었다.

따라서 HA 코팅 임플란트에서 HA 코팅의 안정성은 성공의 가장 중요한 요소로 작용한다고 할 수 있는데, 두

*교신저자: 신상완

136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1 고려대학교 임상치의학대학원 고급치과보철학과 02-818-6874; e-mail, swshin@korea.ac.kr

원고접수일: 2009년 6월 19일 / 원고최종수정일: 2009년 6월 29일 / 원고채택일: 2009년 9월 29일

께가 얇으면서 치밀하고 결정화된 HA 코팅을 얻기 위한 연구들을 통해, ion beam-assisted deposition (IBAD)¹⁵, sol-gel process¹⁶, hydrothermal method¹⁷, electrophoretic deposition¹⁸ 등의 다양한 방법들이 보고되었다.

이에 본 연구에서는 ion beam-assisted deposition (IBAD) 법과 sol-gel법을 이용하여 Ca-P를 코팅한 양극산화 (anodized) 임플란트 시편에 골모세포를 배양함으로써 이러한 표면처리 방법이 세포의 증식, 분화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하고자 하였다.

연구재료 및 방법

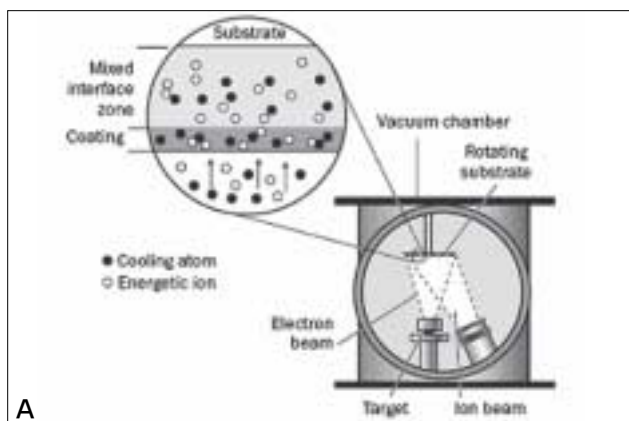
1. 연구재료

1) 시편 제작

지름 10 mm, 두께 2 mm인 상업용 순수 titanium grade IV 재질의 디스크 60개를 제작하여 acetone, 70% ethanol, 증류수에서 각각 10분씩 세척 후 건조하고 표면을 300 V의 constant voltage하에서 양극산화시켰다. 60개의 디스크들을 20개씩 세 개의 군으로 나누어 양극산화 임플란트 표면에 각각 기존에 소개된 방법으로 ion beam-assisted deposition (IBAD)법 (group 2)¹⁵과 sol-gel법 (group 3)¹⁹으로 Ca-P 코팅한 것을 실험군으로 하고 Ca-P 코팅을 시행하지 않은 군을 대조군 (group 1)으로 하였다 (Table I, Fig. 1).

Table I. Experimental Groups and Methods of Surface Treatment

Groups (No. of specimens)	Methods of surface treatment
Group 1 (N=20)	Anodized surface
Group 2 (N=20)	Anodized + IBAD Ca-P coated surface
Group 3 (N=20)	Anodized + Sol-Gel Ca-P coated surface



2) 실험세포

실험에 사용한 악성 골종양 세포주는 MG63 (osteosarcoma, primary, human, 한국세포주은행) 세포를 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 표면 거칠기 (Ra) 측정 및 scanning electron microscopy (SEM) 관찰

표면 거칠기는 5개의 시편에서 optical interferometer (Accura 2000, Intekplus Co., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였고, SEM을 통해 표면을 관찰하였다.

2) 세포배양

지름 100 mm 크기의 세포 배양용 접시에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 100 U/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin이 함유된 α-MEM(minimal essential medium)(Gibco, Grand Island, NY, USA)액을 넣고 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합배양기에서 배양시켰다.

3) 세포증식 측정(10⁶ cells)

각 group에서 3개의 시편을 각각 1, 4, 7일 동안 세포 배양 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)(BioAssay Systems assay, Hayward, USA)를 이용하고, 450 nm로 filter를 고정시킨 후 ELISA microplate reader (THERMOmax, Alpha Diagnostics Texas, USA) 흡광도를 측정하였다.

4) Alkaline phosphatase (ALP) 활성도 측정

티타늄 디스크를 6 well plate에 넣은 후 배양된 MG63세포를 well당 2×10⁵개의 수가 되게 접종한 후 7 day에 각 3

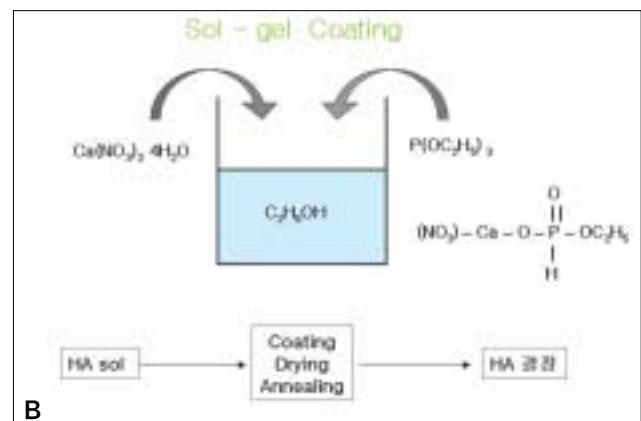


Fig. 1. Diagram of IBAD method (A) and sol-gel process (B).

개의 시편을 7일간 세포배양 후 cell layer를 HBS (Hank's balanced salt solution, Gibco, Grand Island, NY, USA)로 세척하고 trypsin-EDTA solution으로 분리시킨 후 ALP assay kit를 이용하여 측정하였다.

5) 골세포 분화 능력 검증 (RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction)

각 3개의 시편에서 ALP 이외의 다른 골세포 분화 관련 유전자들의 발현을 알아보기 위해서 세포에서 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 역전사 효소, RNase inhibitor 등이 포함된 First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이렇게 하여 얻은 cDNA와 20pmole의 primer를 DNA 중합효소, dNTPs 및 reaction buffer 등이 포함된 AccuPower PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 넣고 증류수를 가하여 50 µl로 만든 후 thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. PCR생성물은 2% agarose gel상에서 전기영동을 시행하였으며 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색하여 GelDoc 2000 Gel Documentation system (BIO-RAD, California, USA)으로 확인하였다. 발현된 mRNA의 양을 측정하기 위하여 semi quantitative RT-PCR법을 이용하였다.

6) 세포형상 관찰

7일간 배양한 시편을 PBS (phosphate buffer solution)로 세척한 후 0.01 M HBSS하에서 2.5% glutaraldehyde로 60분간 고정하였다. 그리고 1% osmium tetroxide로 2차 고정한 후 critical point drying을 하고 gold sputter coating을 시행하였다. Scanning electron microscopy (SEM)을 이용하여 디스크 표면에서 세포의 형태를 확인하였다.

3. 통계분석

SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 비모수 통계 방법인 Kruskal-Wallis Test로 군간의 유의성을 검증하였다 ($\alpha = .05$).

결과

1. 미세표면 거칠기 (Ra) 측정 및 SEM 관찰

시편의 표면 거칠기는 group 2가 가장 높은 측정값인 평균 0.366 µm를 보였고, group 1과 3에서는 서로 비슷한 측정값인 평균 0.318, 0.310 µm를 각각 나타내었다 (Table II). Kruskal-Wallis 검증 결과 group 2에서 유의한 차이를 나타내었다 ($P < .05$).

SEM 관찰에서는 group 1, 2에서 균일한 소공과 분화구 형태를 띄며 전체적으로 균일한 양식을 보였지만, group 3에서는 다소 큰 분화구 형태와 소공을 갖는 다소 균일하지 않는 양식을 보였다 (Fig. 2).

Table II. The Surface Roughness (Ra) of the Titanium Discs

Groups	Mean ± SD (µm)
Group 1	0.318 ± 0.008*
Group 2	0.366 ± 0.015*
Group 3	0.310 ± 0.012*

*Kruskal-Wallis test of the data demonstrated significant differences among groups ($P < .05$).

Group 1: Anodized surface

Group 2: Anodized + IBAD Ca-P coated surface

Group 3: Anodized + Sol-Gel Ca-P coated surface

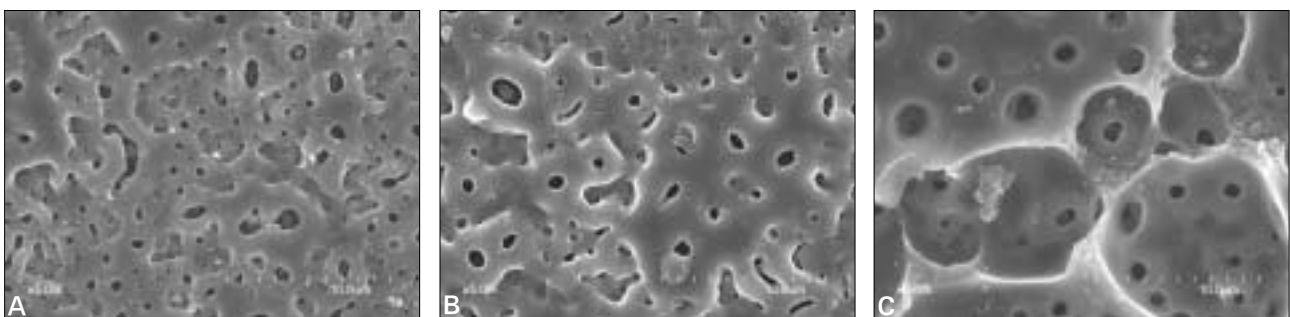


Fig. 2. SEM images of three treated surfaces (Magnification × 5000).

A: anodized surface, B: anodized + IBAD Ca-P coated surface, C: anodized + Sol-gel Ca-P coated surface.

2. 세포증식에 미치는 효과

각 시편에서 1, 4, 7일 간 세포 배양 후 MTT assay에 의한 흡광도 측정에서 1, 4일에서는 Kruskal-Wallis 검증 결과 각 그룹간 유의한 차이가 없었지만, 세포 배양 7일 후의 세포증식 측정결과 group 1에서 가장 세포증식이 활발하게 나타났고, group 2, group 3 순으로 세포 증식이 잘 되는 것으로 나타났다 ($P < .05$) (Table III, Fig. 3).

3. Alkaline phosphatase (ALP) 활성도 측정

각 시편에서 7일간 세포 배양 후 ALP assay kit로 측정된 결과 group 2에서 가장 높은 ALP 활성도를 보였으며, Kruskal-Wallis 검증 결과 다른 group들과 유의한 차이가 있었다 ($P < .05$) (Table IV, Fig. 4).

Table III. Optical density (mean \pm SD) of MG63 osteoblast-like cells (10^6 cells) after culturing

	1 day	4 days	7 days
Group 1	0.548 \pm 0.022	0.493 \pm 0.054	0.461 \pm 0.038*
Group 2	1.279 \pm 0.301	1.017 \pm 0.078	0.660 \pm 0.316*
Group 3	2.533 \pm 0.351	1.777 \pm 0.199	1.025 \pm 0.688*

*Kruskal-Wallis test of the data demonstrated significant differences among groups at 7 days ($P < .05$).

Group 1: Anodized surface

Group 2: Anodized + IBAD Ca-P coated surface

Group 3: Anodized + Sol-Gel Ca-P coated surface

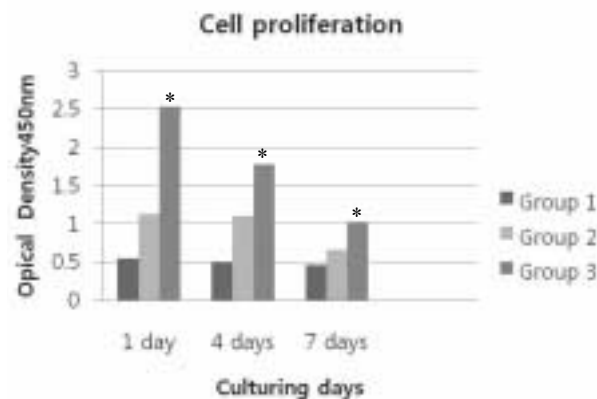


Fig. 3. Cell proliferation of three treated groups.

*Kruskal-Wallis test of the data demonstrates significant differences among groups ($P < .05$).

Group 1: Anodized surface

Group 2: Anodized + IBAD Ca-P coated surface

Group 3: Anodized + Sol-Gel Ca-P coated surface

4. 골세포 분화 능력 검증 (RT-PCR)

세포 배양 7일 후 ALP 유전자 발현 결과가 ALP 활성도와 일치하게 group 3보다 group 2에서 많이 발현되었다. 비콜라겐성 골단백질의 특이적 유전자인 osteocalcin은 group 3에서 다소 높게 나타났다. Type 1 collagen은 모든 군에서 골고루 발현 되었고, 성장인자인 TGF- β 1와 IGF-1의 유전자는 전체적으로 모든 group에서 발현이 되었다. b-actin은 각 샘플의 농도를 비교하기 위해서 확인하였다 (Fig. 5).

5. 세포 형상 관찰 (SEM)

세포 배양 후 SEM 관찰 결과 700배율과 5000배율에서 각각 group 1, 2에서는 골모세포들이 친화성을 띄면서 디스크 표면에 잘 부착되었다. 하지만 group 3에서는 세포들이 불규칙적으로 산재해 있으면 세포 부착도 잘 이루어지지 않는 형태를 보였다 (Fig. 6).

Table IV. ALP activity (nmol/mg/min) of MG63 osteoblast-like cells

Groups	Mean \pm SD
Group 1 (Anodized)	84.207 \pm 3.725*
Group 2 (Anodized + IBAD Ca-P coated)	231.947 \pm 8.645*
Group 3 (Anodized + Sol-Gel Ca-P coated)	24.857 \pm 1.294*

*Kruskal-Wallis test of the data demonstrates significant differences among groups ($P < .05$).

Group 1: Anodized surface

Group 2: Anodized + IBAD Ca-P coated surface

Group 3: Anodized + Sol-Gel Ca-P coated surface

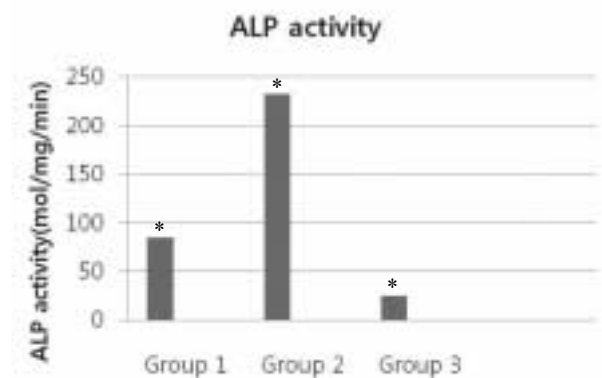


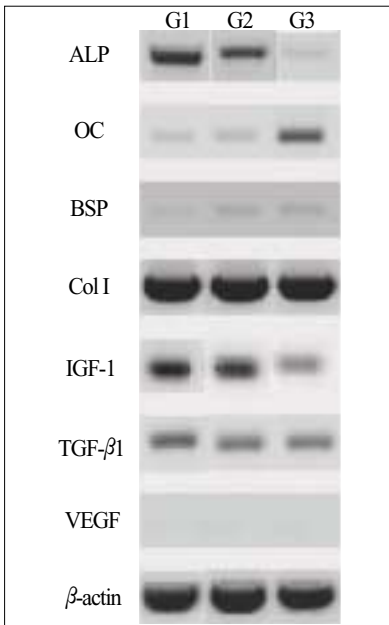
Fig. 4. ALP activity of three treated groups.

*Kruskal-Wallis test of the data demonstrates significant differences among groups ($P < .05$).

Group 1: Anodized surface

Group 2: Anodized + IBAD Ca-P coated surface

Group 3: Anodized + Sol-Gel Ca-P coated surface



G1: Group 1 (anodized surface)
 G2: Group 2 (anodized + IBAD Ca-P coated surface)
 G3: Group 3 (anodized + Sol-gel Ca-P coated surface)
 ALP: Alkaline phosphatase
 OC: osteocalcin
 BSP: bone sialoprotein
 Col I: Type 1 collagen
 IGF-1: insulin-like growth factor-1
 TGF-β1: transforming growth factor-β1
 VEGF: vascular endothelial growth factor

Fig. 5. RT-PCR of three treated groups.

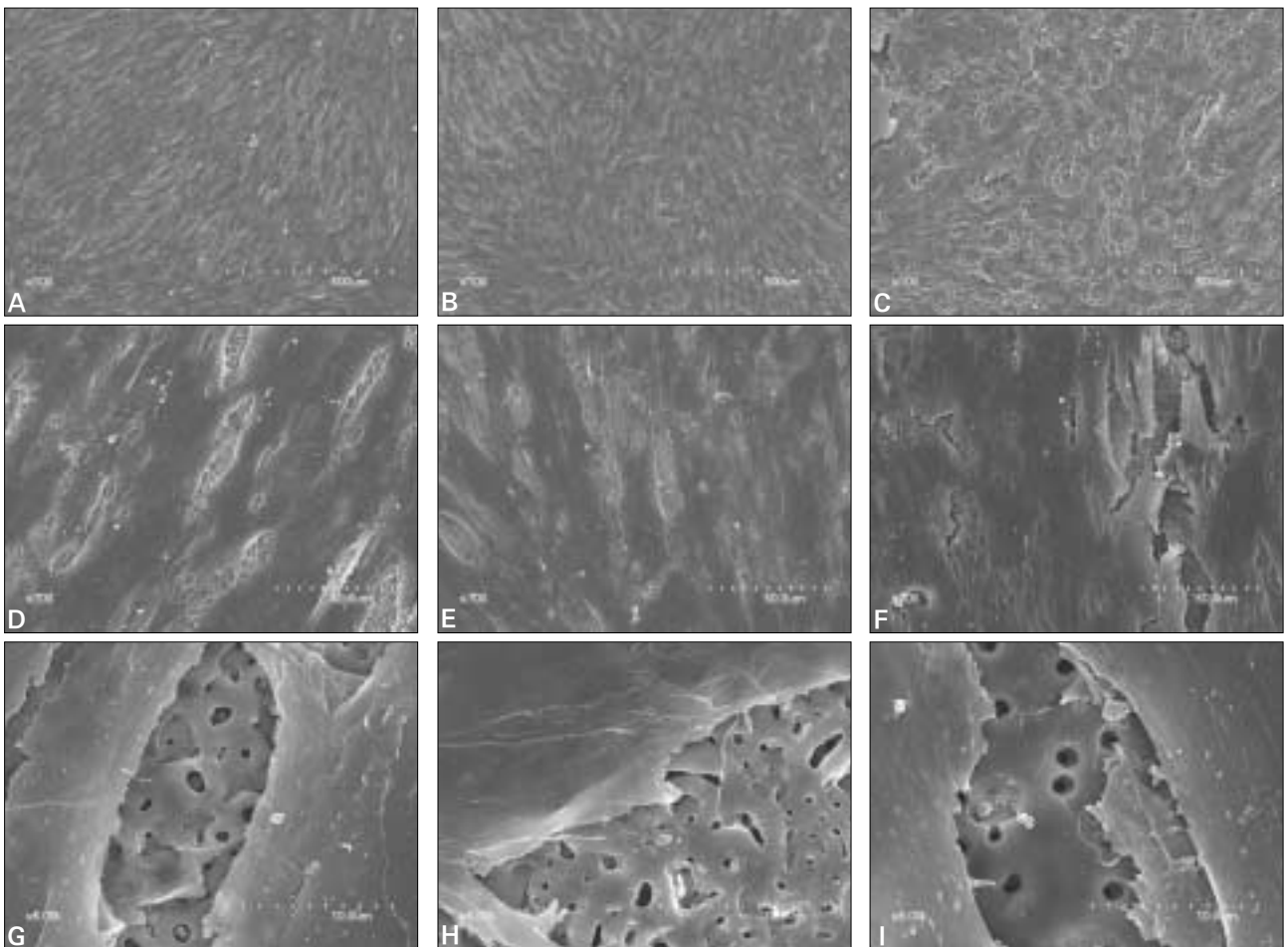


Fig. 6. SEM of cell morphology after culturing for 7 days.

A, D, G: anodized surface, B, E, H: anodized + IBAD Ca-P coated surface, C, F, I: anodized + Sol-gel Ca-P coated surface
 A, B, C: Magnification × 100, D, E, F: Magnification × 700, G, H, I: Magnification × 5000.

고찰

Titanium 표면은 실온에서 공기에 노출 시 자연적으로 1.5 - 10 nm 두께의 산화막을 형성한다.²⁰ 이런 산화막은 titanium 임플란트가 생체적합성을 나타내는데 중요한 역할을 하게 된다. 최근 titanium 표면에 전해질 하에서 양극 전압을 가하여 TiO₂ 표면층을 전기화학적 방법으로 만드는 양극산화법이 제안되었다. 이렇게 새로 생긴 TiO₂ 층은 다공성이고 titanium 기질과 견고하게 부착되어 titanium 임플란트의 생체 적합성에 더욱 유용하게 작용한다.

Legeros 등²¹에 따르면 calcium phosphate 는 bone mineral 과 유사한 성분으로 표면에 bone apatite like mineral 또는 carbonate HA를 형성하여 생활성 (bioactivity)을 가지는데 이들은 세포 기능을 증진시키고 강한 bone-calcium phosphate interface를 형성하여 골전도성을 보이며 bone morphogenetic proteins (BMPs)를 부착시켜 골유도성을 보일 수도 있다고 하였다. 현재 모든 종류의 calcium phosphate의 형태에 이를 적용할 수는 없지만, calcium phosphate가 생활성 능력을 갖는다는 점은 일반적으로 인정되어 왔다. 이러한 HA의 생활성 특징을 임플란트 표면 처리에 이용하고자 다양한 방법들이 연구되었고, plasma spraying법이 소개 되었지만 쉽게 파절되는 현상, 낮은 인장 응력, HA 용해성 등의 문제점들이 보고되어 보다 얇고 치밀하면서 결정화된 HA 코팅을 위한 연구들이 진행되고 있다. 본 연구에서는 최근에 소개된 ion beam-assisted deposition (IBAD)법과 sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면을 이용하여 세포 반응실험을 진행하였다.

이전 연구에서 Jung²² 등은 가도를 이용한 실험에서 절삭형 표면에 IBAD법으로 HA를 코팅한 표면이 grit-blasted 표면보다 골 임플란트 접촉면적과 골부피에서 더 우수한 결과를 보였다고 보고 하였다. 또한 Park²³ 등은 가도를 이용한 동물실험에서 grit-blasted 표면에 IBAD법으로 HA 코팅한 표면은 서로 상승효과를 보이며 grit-blasted 표면 보다 더 높은 removal torque와 더 많은 골-임플란트 접촉 영역을 나타내었다고 보고하였다. 그리고 sol-gel법은 간단하면서 비용이 적게 들고 얇고 치밀한 생활성 HA 코팅표면을 얻을 수 있는 방법으로 여러 연구에서 밝혀졌다.^{16,25,26} Ramires 등²⁷은 *in vitro*, *in vivo* 연구에서 sol-gel법으로 코팅된 임플란트가 코팅 안된 임플란트에 비해서 높은 농도의 ALP와 collagen을 형성하였고, 더 높은 removal torque와 더 많은 골-임플란트 접촉 영역을 나타내었다고 하였다.

본 연구에서는 양극산화방식으로 TiO₂층을 형성한 표

면에 얇고 치밀한 Ca-P 코팅을 위해서 IBAD법과 Sol-gel법을 이용하였고, 양극산화 표면에 Ca-P 코팅한 표면이 두 가지 처리 방법에 따른 상승효과를 보일 것인지에 대해 세포반응을 통해 알아보려고 했다.

먼저 실험 시편을 제작한 후 표면 거칠기를 측정하기 위해서 접촉식 표면 조도기를 사용하였다. Listgarten²⁸ 등은 표면 거칠기의 측정방법에 대하여 접촉식 표면조도 측정기보다 주사전자 현미경이 비교평가에 유리하다고 하였다. 하지만 주사전자현미경은 측방관찰에는 유리하지만 요철의 수직 고경을 측정하는 데는 정확하지 못하고 다른 연구와 비교하기 곤란하여 정량적인 방법으로 측정하기 위해서 표면조도기를 사용하였다. 표면 거칠기 검사 결과 양극산화 표면에 IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 다른 두 군에 비해서 통계적으로 유의하게 가장 거친 표면으로 나타났다 ($P < .05$). 이는 Ca-P 코팅이 요철의 수직 고경을 증가시킨 것으로 생각되고, 주사 현미경 관찰 결과 sol-gel법에 의한 표면은 기존의 양극산화 표면이 갖는 다공성의 표면이 sol-gel과정을 거치면서 균일한 소공들이 뭉개지면서 표면 거칠기는 증가하지 않는 양상을 띄었다.

임플란트의 재료뿐만 아니라 임플란트 표면의 화학적 조성 및 표면 거칠기 등도 세포 반응에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. Rodriguez²⁹ 등은 고도로 결정화된 표면이 세포 증식을 증가시킨다고 하였고, 이는 칼슘이온의 존재가 세포 성장에 영향을 주기 때문이라고 하였다. 본 연구의 세포증식 실험에서는 세포배양 1, 4일 후 세포증식은 각 군간의 유의적 차이가 없었지만, 세포배양 7일 후 세포증식 측정 결과 IBAD법으로 코팅한 표면이 sol-gel법으로 코팅한 표면보다 세포 성장이 잘 이루어졌는데, 이는 IBAD법에 의한 표면에서 결정화가 잘 이루어졌고, 양극산화 처리의 균일한 소공을 갖는 표면이 IBAD법에 의한 Ca-P 코팅 후에도 그대로 유지되었기 때문일 것이다. 또한 대조군인 양극산화 표면에서는 다른 두 Ca-P 코팅표면들보다 더 많은 수의 세포들이 증식한 것으로 나타났다. 이는 양극산화 표면 처리시 전해질 하의 양극산화과정에서 칼슘이온이 표면에 침착 되어서 나타난 결과라고 생각되고, XRD (X-ray diffraction)와 EDS (Energy dispersive X-ray spectroscopy) 통한 표면의 미세구조와 화학조성을 검사했다면 세포 증식에 대한 표면요인을 더욱 효과적으로 추론할 수 있었을 것이라고 생각된다.

일반적으로 표면의 거칠기는 세포의 증식과 분화에 영향을 미치는데 표면 거칠기가 증가할수록 세포 증식은 감소하고 ALP 활성도는 증가한다고 보고 되었다.^{30,31} 본 연구에서 ALP assay를 이용한 검사에서는 표면이 가장

거친 IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 가장 높은 ALP 활성도를 보인 반면 RT-PCR 검사에서는 양극산화 표면에서 ALP 인자가 가장 발현이 잘되었다. 이는 소량의 RNA를 추출하여 실시한 RT-PCR에서 다소의 실험오차가 있을 것으로 생각되며, 극산화로 생긴 TiO_2 층에 칼슘과 인 이온들이 고도로 결정화된 IBAD법으로 코팅한 표면이 ALP 활성도에 큰 영향을 주었을 것으로 생각된다. TGF- β 1와 BSP은 각 군이 비슷하게 나타났지만 IGF-1은 양극산화 표면군과 IBAD법의 Ca-P 코팅군에서 뚜렷이 발현되었고, Osteocalcin은 sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면에서 뚜렷이 발현되었다. 그리고 VEGF인자는 모든 군에서 거의 발현되지 않았다.

각 표면에 부착된 세포 형상 관찰에서 양극산화 표면과 IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면에서 세포들이 잘 분화된 모습을 보이며 표면에 친화성을 띠면서 잘 부착된 모습을 보이지만 sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면에서는 세포들이 산재되어 있고 세포 부착도 잘 이루어지지 않는 형태를 보였다. 표면의 균일한 양상이 세포 반응에 호의적인 환경을 제공한 것으로 생각된다.

앞으로 산화층의 두께, Ca/P 비율의 변화와 Ca-P 코팅 방법에 따른 세포 반응에 대한 좀 더 세분화된 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

결론

본 연구에서 ion beam-assisted deposition (IBAD)법과 sol-gel법을 이용하여 Ca-P를 코팅한 양극산화 임플란트 시편에 골모세포를 배양함으로써 이러한 표면처리 방법이 세포의 증식, 분화에 미치는 영향을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면 보다 표면 거칠기 (Ra) 값이 더 크게 나타났다 ($P < .05$).
2. IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면이 sol-gel법으로 Ca-P 코팅한 표면 보다 세포 증식이 더 잘 되고 골세포 조기 분화 정도를 확인 할 수 있는 ALP 활성도도 더 높게 나타났다 ($P < .05$).
3. 세포배양 7일 후 SEM 관찰 결과 IBAD법으로 Ca-P 코팅한 표면에서 골세포들이 친화성을 띄면서 안정적으로 부착되었다.

참고문헌

1. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental back-

ground. *J Prosthet Dent* 1983;50:399-410.

2. 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.
3. 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.
4. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 2004;17:544-64.
5. Osborn JF, Newsly H. Dynamic aspects of the implant-bone-interface. In:Heimke G (ed). *Dental Implants. Materials and Systems*. Munich: Hanser 1980:111-23.
6. Hench LL. Bioceramics: material characteristics versus *in vivo* behavior. *Ann N Y Acad Sci* 1988;523:54-71.
7. Kim HM, Takadama H, Miyaji F, Kokubo T, Nishiguchi S, Nakamura T. Formation of bioactive functionally graded structure on Ti-6Al-4V alloy by chemical surface treatment. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:555-9.
8. Caulier H, van der Waerden JP, Paquay YC, Wolke JG, Kalk W, Naert I, Jansen JA. Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: a histological study. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1061-9.
9. Caulier H, Vercaigne S, Naert I, van der Waerden JP, Wolke JG, Kalk W, Jansen JA. The effect of Ca-P plasma-sprayed coatings on the initial bone healing of oral implants: an experimental study in the goat. *J Biomed Mater Res* 1997;34:121-8.
10. Caulier H, van der Waerden JP, Wolke JG, Kalk W, Naert I, Jansen JA. A histological and histomorphometrical evaluation of the application of screw-designed calciumphosphate (Ca-P)-coated implants in the cancellous maxillary bone of the goat. *J Biomed Mater Res* 1997;35:19-30.
11. Caulier H, Hayakawa T, Naert I, Van Der Waerden JP, Wolke JG, Jansen JA. An animal study on the bone behaviour of Ca-P-coated implants: influence of implant location. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:531-6.
12. Cook SD, Thomas KA, Dalton JE, Volkman TK, Whitecloud TS 3rd, Kay JF. Hydroxylapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength. *J Biomed Mater Res* 1992;26:989-1001.
13. Tong W, Yang Z, Zhang X, Yang A, Feng J, Cao Y, Chen J. Studies on diffusion maximum in x-ray diffraction patterns of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *J Biomed Mater Res* 1998;40:407-13.
14. García F, Arias JL, Mayor B, Pou J, Rehman I, Knowles J, Best S, León B, Pérez-Amor M, Bonfield W. Effect of heat treatment on pulsed laser deposited amorphous calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res* 1998;43:69-76.
15. Choi JM, Kim HE, Lee IS. Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti-based metal

- substrate. *Biomaterials* 2000;21:469-73.
16. Li P, de Groot K. Better bioactive ceramics through sol-gel process. *J Sol-Gel Sci Technol* 1994;2:797-801.
 17. Hamad K, Kon M, Hanawa T, Yokoyama K, Miyamoto Y, Asaoka K. Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. *Biomaterials* 2002;23:2265-72.
 18. Ma J, Wang C, Peng KW. Electrophoretic deposition of porous hydroxyapatite scaffold. *Biomaterials* 2003;24:3505-10.
 19. Milella E, Cosentino F, Licciulli A, Massaro C. Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. *Biomaterials* 2001; 22:1425-31.
 20. Kasemo B, Lausmaa J. Aspect of surface physics on titanium implants. *Swed Dent J* 1983;28:19-36.
 21. Hulbert SC. Bioactive ceramic-bone interface. In: Yamamuro T, Hench L, Wilson J (eds). *Handbook of Bioactive Ceramics*. Vol I. Boca Raton. FL:CRC 1990; 32:409-17.
 22. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:81-98.
 23. Jung YC, Han CH, Lee IS, Kim HE. Effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the osseointegration of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:809-18.
 24. Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:31-8.
 25. Haddow DB, Kothari S, James PF, Short RD, Hatton PV, van Noort R. Synthetic implant surfaces. 1. The formation and characterization of sol-gel titania films. *Biomaterials* 1996;17:501-7.
 26. Milella E, Cosentino F, Licciulli A, Massaro C. Preparation and characterization of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. *Biomaterials* 2001;22:1425-31.
 27. Ramires PA, Wennerberg A, Johansson CB, Cosentino F, Tundo S, Milella E. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:539-45.
 28. Listgarten MA, Buser D, Steinemann SG, Donath K, Lang NP, Weber HP. Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva. *J Dent Res* 1992;71:364-71.
 29. Rodriguez R, Kim K, Ong JL. *In vitro* osteoblast response to anodized titanium and anodized titanium followed by hydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65:352-8.
 30. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Med Eng Phys* 2001;23:329-46.
 31. 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.

The effect of Ca-P coatings of anodized implant surface on response of osteoblast-like cells *in vitro*

Il-Yeon Kim¹, DDS, MSD, Sung-Min Jung², DDS, MSD, PhD,

Soon-Jung Hwang³, DDS, MD, PhD, Sang-Wan Shin^{1*}, DDS, MPH, PhD, MSc

¹Graduate student, ⁴Professor, Department of Advanced Prosthodontics, Graduate School of Clinical Dentistry, Institute for Clinical Dental Research (ICDR), Korea University

²Well Dental Clinic, Clinical researcher, ³Professor, School of Dentistry, Seoul National University

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the response of osteoblast-like cells to Ca-P coated surface obtained via Ion beam-assisted deposition (IBAD) method and Sol-Gel process on anodized surface by cellular proliferation and differentiation. **Material and methods:** The surface of a commercially pure titanium (Grade IV) discs with dimension of 10mm diameter and 2 mm thickness was modified by anodic oxidation under a constant voltage of 300 V. The experimental groups were coated with Ca-P by the IBAD method and Sol-Gel process on anodized surface. The surface roughness (Ra) of specimens was measured by optical interferometer and each surface was examined by SEM. To evaluate cell response, MG63 cells were cultured and cell proliferation, ALP activity and the ability of cell differentiation were examined. Also, cell morphology was examined by SEM. The significant of each group was verified by Kruskal-Wallis Test ($\alpha = .05$). **Results:** The Ra value of Ca-P coated surface by IBAD method was significantly higher than Ca-P coated surface by Sol-gel process ($P < .05$). The level of cell proliferation and ALP activity was higher in Ca-P coated surface by IBAD method ($P < .05$). The expression of ALP showed higher level expression in Ca-P coated surface by IBAD method. Cells grown on Ca-P coated surface by IBAD method were uniformly distributed and developed a very close layer. **Conclusion:** These experiments showed better performances of Ca-P coated surface by IBAD method with respect to Ca-P coated surface by Sol-gel process. Ca-P coated surface by IBAD method appear to give rise more mature osteoblast characteristics and might result in increased bone growth and bone-implant contact. (*J Korean Acad Prosthodont 2009;47:376-84*)

Key words: Implant surface, Anodic oxidation, Hydroxyapatite, Ion beam-assisted deposition, Sol-gel, Cellular response

*Corresponding Author: Sang-Wan Shin

Department of Advanced Prosthodontics, Graduate School of Clinical Dentistry, Institute of Clinical Dental Research, Korea University

97 Guro-Dong, Guro-Ku, Seoul, 136-705, Korea

+82 2 866 1422: e-mail, swshin@korea.ac.kr

Article history

Revised June 19, 2009/ Last Revision June 29, 2009/ Accepted September 29, 2009