

투고일 : 2010. 2. 18

심사일 : 2010. 2. 18

게재확정일 : 2010. 2. 23

티타늄 임플란트 표면처리에서의 나노테크놀로지

원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실

교수 오 승 한

ABSTRACT

Nanotechnology in the Surface Treatment of Titanium Implant.

Department of Dental Biomaterials, College of Dentistry, Wonkwang University
Seunghan Oh, PhD

Tissue engineering has been enhanced by advance in biomaterial nature, surface structure and design. In this paper, I report specifically vertically aligned titania (TiO_2) nanotube surface structuring for optimization of titanium implants utilizing nanotechnology. The formation, mechanism, characteristics of titania nanotubes are explained and emerging critical role in tissue engineering and regenerative medicine is reviewed. The main focus of this paper is on the unique 3 dimensional tubular shaped nanostructure of titania and its effects on creating epochal impacts on cell behavior. Particularly, I discuss how different cells cultured on titania nanotube are adhered, proliferated, differentiated and showed phenotypic functionality compared to those cultured on flat titanium. As a matter of fact, the presence of titania nanotube surface structuring on titanium for dental applications had an important effect improving the proliferation and mineralization of osteoblasts in vitro, and enhancing the bone bonding strength with rabbit tibia over conventional titanium implants in vivo. The nano-features of titania nanotubular structure are expected to be advantageous in regulating many positive cell and tissue responses for various tissue engineering and regenerative medicine applications.

Keywords : Titania nanotube, tissue engineering, titanium implant, osteoblast, in vivo.

1. 서론

나노 구조는 마이크로 구조에 비하여 높은 비표면적과 우수한 생물학적 응용력으로 인하여 최근에 각광받

고 있다. 생체재료 및 임플란트 개발과 관련하여, 세포는 주변의 지형에 의해 상당히 영향을 받고, 이러한 세포들이 나노구조에 세포 부착, 증식 및 기능 형성 면에 있어서 상당히 긍정적으로 작용한다는 여러 연구결

과들이 발표되었다.

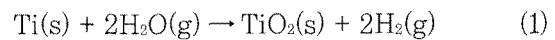
뿐만 아니라, 생체 내 및 생체 외 실험 결과를 통하여 나노 구조에서 배양된 다양한 종류의 세포들이 기존과는 다른 형태임을 최근 연구 결과들에서 나타나고 있다¹³⁾. 세포와 나노 구조간의 상호작용에 관한 연구는 생체재료 연구에 있어서 최근에 가장 각광받고 있는 연구 분야 중의 하나로서, 이는 생체재료 표면에 세포와 거의 같거나 이보다 작은 크기의 정형화된 구조를 가지는 나노크기의 구조를 제조하여, 기존의 매크로 및 마이크로 구조에서 보였던 세포와 표면 간의 상호 작용과는 다른 새로운 세포의 거동 및 진화를 탐구하는 것이다. 이러한 나노구조를 이용한 생체재료 연구 중에서 현재 가장 각광받고 있는 분야는 TiO₂ (티타니아) 나노튜브이다. 티타늄과 티타늄 합금이 뛰어난 기계적 물성 및 우수한 생체친화성 및 내부식성으로 인하여 임플란트 재료로 가장 널리 사용되는 재료 중의 하나라는 것은 이미 익히 알려진 사실이다. 티타니아 나노튜브는 이러한 티타늄 임플란트 재료 표면에 제조가 용이하며, 제조 조건에 따라 수~수백 나노미터의 직경과 수십나노~수백 마이크로 미터의 길이를 가진 나노튜브를 제조할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

2. 티타늄 표면에 티타니아 나노튜브의 형성 메커니즘

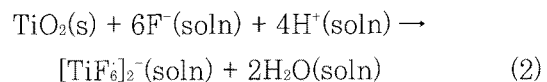
일반적으로, 티타니아 나노튜브를 제조하는 방법은 졸겔법, 진공증착법 및 양극산화법¹²⁾ 등 여러 방법이 있다. 이 중에서 티타늄 표면에 티타니아 나노튜브를 형성시키는 방법은 양극산화법이 주로 사용되며, 불소이온이 포함된 전해질 용액을 이용한다. 불소이온 함유 전해질 용액 내에서의 티타늄 표면에 티타니아 나노튜브를 형성시키는 메커니즘은 크게 3가지의 연속적인 반응과정에 의해 이루어진다. 즉, (1) 티타늄 금속의 산화에 의한 티타니아의 형성, (2) 티타늄 금속 이온의 전해질 용액으로의 용출, 그리고 (3) 수소

이온에 의해 촉진되는 불소이온에 의한 티타늄과 티타니아의 화학적 용해이다^{14,15)}. 티타니아 나노튜브는 순수한 티타늄 표면에서는 형성되지 않고, 티타늄 금속 표면에 존재하는 티타니아 산화막 위에서 형성된다. 그러므로 티타니아 나노튜브의 형성 메커니즘은 산화와 용해 속도와 관련이 있다.

티타늄 금속은 자연적으로 수 나노미터의 티타니아 부동태 산화막을 가지고 있으며, 이러한 산화막은 티타늄 금속 표면에 발생될 수 있는 다른 물질과의 화학적 반응을 막는 역할을 하고 있다. 그리고 산화막은 막 자체가 손상되더라도 재빨리 이를 복구하는 성질을 가지고 있다. 이러한 복구 반응은 티타니아 산화막이 산소를 포함하고 있는 공기 또는 물과 접촉했을 때에만 발생하고, 다음의 반응식에 따라 티타니아뿐만 아니라 수소가스도 발생시킨다.



티타늄 표면이 전해질 용액에 포함된 수용성 불소와 접촉하게 되면, 재빨리 티타니아 산화층을 형성한다. 불소이온 함유 전해질 용액 내에서의 티타니아 나노튜브 형성과 관련된 티타니아의 용해 메커니즘은 다음의 반응식으로 설명된다¹⁶⁾.



이러한 일련의 반응과정 중에서, 중간 반응층인 [TiF₆]₂⁻가 티타늄 표면에 지배적으로 형성된다. 티타니아 나노튜브의 시작점인 기공 형성은 전기장에 의한 티타니아 층의 용해와 불소이온 함유 전해질 용액에 의한 화학적 용해에 의하여 시작된다. 이러한 두 가지의 용해 반응은 동시에 발생되며, 티타늄 표면에 티타니아 나노튜브가 형성되는 것을 이해하는데 가장 중요한 역할을 한다. 이러한 과정을 좀 더 자세하게 설명하면 다음과 같다¹⁷⁾. 티타늄 표면이 전해질 용액에 의해

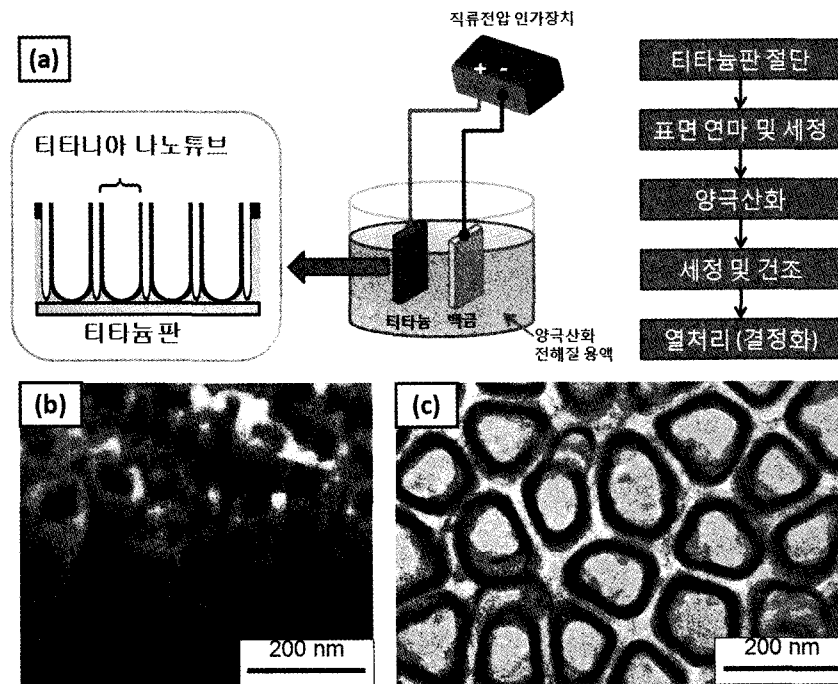


그림 1. Titania nanotube structuring at titanium surface. (a) Schematic illustration of anodization and experimental flow chart to form titania nanotube layer. (b) Scanning electron microscopy (SEM) image showing vertically aligned titania nanotube layer on a titanium sheet. (c) Cross-sectional transmission electron microscopy (TEM) image.

처음으로 부식되면, 아주 작은 pit들 (나노크기보다 작음)이 티타늄 표면에 생성되고 이러한 pit들은 재빠르게 티타니아 층으로 복구된다. 불소 이온에 의하여 티타늄 표면에 연속적인 부식이 발생되면, 이러한 pit들은 나노크기의 기공으로 커지게 된다. 반응 시간이 진행됨에 따라, 나노크기의 기공은 나노튜브의 기본 모체가 되고 반응 후기에 새로이 생성된 작은 pit들은 결국 나노튜브사이의 공간이 된다. 이러한 pit의 형성은 티타니아 층에 존재하는 마이크로 크랙에 의해서 촉진될 수도 있다⁶⁾. 최종적으로 형성된 나노튜브의 구조는 그림1에서 주사전자현미경(Scanning electron microscope) 및 투과전자현미경(Transmission electron microscope)으로 촬영된 티타니아 나노튜브의 그림들로 나타나 있으며 양극산화 실험장치 모식도, 양극산화 실험절차 모식도와 함께 보여주고 있다.

더욱이, 나노튜브 형성 메커니즘을 기반으로 나노튜브의 구조 형성은 양극산화에 전해지는 전압과 전해질 용액 내의 불소 이온의 농도에 영향을 받는다. 따라서 양극산화 전압이 커지면 커질수록 나노튜브의 직경은 커지는 것을 알 수 있다. 이러한 나노튜브의 크기, 특히 직경의 차이가 세포의 흡착, 성장, 기능, 그리고 사멸에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서 좀 더 심도있게 논의하고자 한다.

3. 조직공학으로의 응용

1) 임플란트 재료를 위한 티타니아 나노튜브

골 임플란트 재료로 사용되는 수많은 재료 중에서 생체 내에서 이물반응을 일으키지 않으며 가장 성공적

으로 많이 사용되어온 재료가 티타늄이다. 일반적으로 바람직한 골 결합을 만들기 위해서는 임플란트 재료와 주변의 골 사이에 결합을 저해하는 결합조직세포층(connective tissue layer)이 없어야 한다¹⁸⁻²⁰. 티타늄은 주변의 골과의 직접적인 기계적 결합을 통하여 골유착(osseo-integration)을 이루어 낸다. 이미 직경 100nm, 높이 300nm인 티타니아 나노튜브위에 조골세포를 배양하여 조골세포가 쉽게 나노튜브 안으로 부착·성장함으로써 세포의 분화, 골 형성능 및 석회화가 촉진된다는 것이 보고되었다³. 이러한 나노튜브 시스템의 중요한 요점은 조골세포의 골 형성능에 있어서 나노 크기로 구성된 표면의 구조가 마이크로와 매크로의 구조에 비하여 좀 더 확실하게 재현성과 호환성을 보여주는 특징이 있다는 것이다. 그리고 나노튜브 벽 사이에 존재하는 간격(~10nm)이 향상된 세포

배양 환경을 위하여 지속적인 세포 배양액의 공급, 그리고 가스, 영양분, 및 신호전달 유전자들의 이동·교환 장소로 사용될 수 있다는 것이 상당히 흥미로운 일이다²¹. 다음 장에서는 나노튜브의 직경 변화에 따른 조골세포의 거동 및 분화과정을 통한 나노구조의 최적화에 대해서 논의해보기로 한다.

2) 나노튜브 기공크기의 최적화 및 조골세포의 반응

우수한 골유착 기능을 보이는 티타니아 나노튜브는 원하는 세포 거동 및 골 형성능을 얻기 위하여 정확한 제어를 스스로 할 수 있는 차세대 임플란트 재료의 개발에 상당히 고무적인 의의를 가진다. 저자는 이미 앞서서 말한 연구 이외에 추가로 다양한 직경의 나노튜브

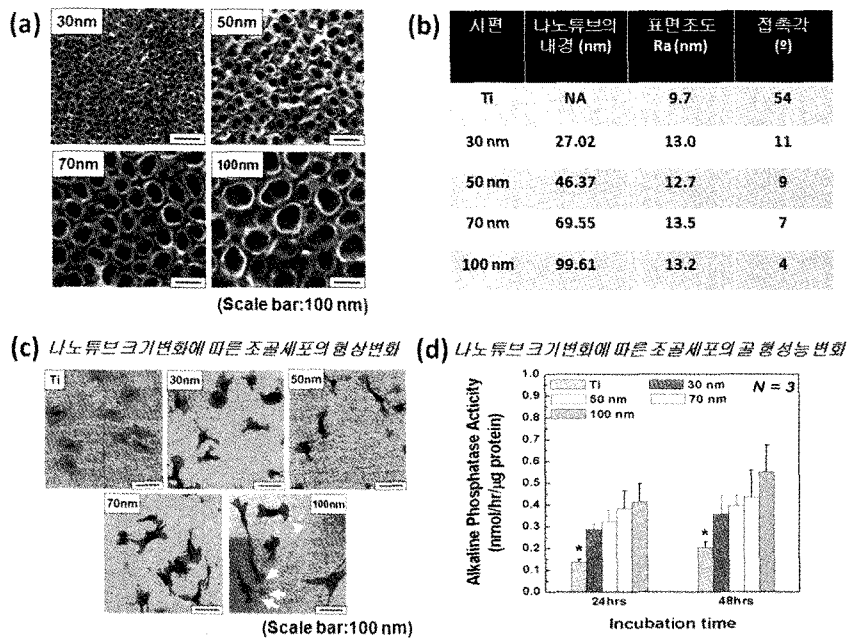


그림 2. (a) SEM micrographs of self-aligned titania nanotubes with different diameters. (b) Table with the average pore size distribution, roughness (Ra), and surface contact angle of titanium and 30~100nm titania nanotube surfaces. (c) SEM micrographs of osteoblast cultured on different sized nanotube surfaces after 24 hour incubation. (d) Bone building functionality represented by alkaline phosphatase activity of osteoblasts cultured on the different sized nanotube surfaces.

임상가를 위한 특집 2

브(30~100nm)를 제조하여 이러한 나노크기의 차이가 조골세포의 흡착, 형상, 분화 및 골 형성능에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 연구 결과, 나노튜브의 이러한 작은 범위 내에서의 차이가 아주 독특한 조골세포의 거동 변화를 만들어낸다는 것을 발견하였다. 그림 2는 30, 50, 70, 그리고 100nm 티타니아 나노튜브의 주사전자 현미경 사진들이다. 서로 다른 크기를 가지는 수직으로 정렬된 나노튜브는 양극산화과정 동안 인가전압을 5~20V로 조절하여 제조되었다. 티타늄 표면 위에 양극산화된 티타니아 나노튜브는 깨끗하고 튼튼하였다. 제조된 티타니아 나노튜브의 표면 특성들(기공크기 분포, 표면조도 및 표면 접촉각)은 그림 2(b)의 표에 설명되었다. 대조군으로 사용된 티타늄 표면에 비하여 나노구조는 ~13nm의 표면조도(표면의 거칠기)를 나타내었고, 접촉각 또한 11 도 이하로서 54 도의 접촉각을 가지는 티타늄 표면에 비하

여 나노튜브 구조에 의한 우수한 친수성을 나타내는 것을 알 수 있다²²⁾.

티타니아 나노튜브의 다른 직경 크기에 따른 효과를 비교하면서, 조골세포의 초기 부착과 성장 vs. 세포의 신장(Elongation)과 골 형성능 간의 경계를 보이는 나노튜브 직경의 뚜렷한 범위가 있다는 것을 발견하였다. 세포 흡착 및 분화의 관점에서, 나노튜브의 직경이 작을수록 세포의 흡착이 우수하였고, 30nm 티타니아 나노튜브에서 가장 우수한 세포 흡착 및 분화를 나타내었다. 그러나 세포 신장의 관점에서, 나노튜브의 직경이 커질수록 세포의 신장은 증가하였고, 100nm 나노튜브에서 가장 큰 세포 신장률을 나타내었다. 골 형성능의 지표인 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase) 활동도에서도 세포 신장률과 유사한 경향을 나타내었으며, 나노튜브의 직경이 커질수록 알칼리성 인산분해효소 활동도가 커지는 것을 확인하였다.

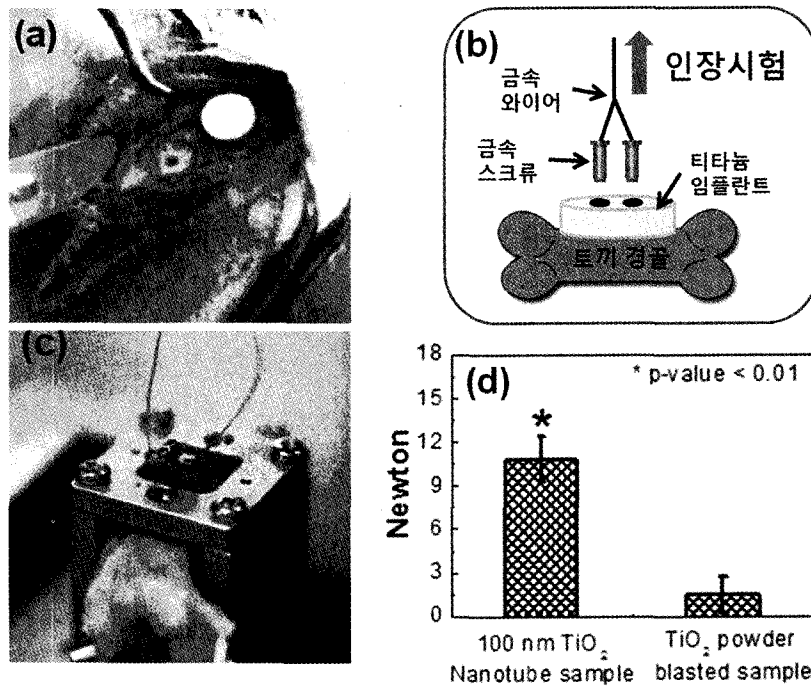


그림 3. Rabbit implant test process and result, (a) Sample positioning on rabbit tibia, (b) mechanical testing arrangement, (c) test fixture for tensile loading, and (d) comparative rabbit implant strengths by tensile pull out test.

이러한 세포 반응의 차이가 세포의 기계적 수용기 (mechano-receptor)에 압축과 인장을 부여하는 기공 내의 다른 곡률(curvature)로 설명될 수 있다^{23, 24)}. 그리고 나노구조의 표면과 직접 접촉하는 세포 바닥의 멤브레인이 인장과 완화의 기계적 응력에 의해 영향을 받으면서, 세포 내의 구성성분을 재배열하고 세포 거동을 직접적인 영향을 주는 이온채널이 개방되기 때문이다²⁵⁾. 이러한 일련의 연구 결과들이 다른 나노튜브의 직경이 세포의 반응에 큰 영향을 미쳤다는 본 연구 결과에 대한 설명에 도움이 된다.

3) 토끼 tibia 내에서의 티타니아 나노튜브 표면 임플란트의 향상된 골유착

앞서 설명된 나노튜브에 의한 조골세포의 골 형성능 촉진은 조골세포를 이용한 생체 외 실험을 토대로 이루어진 결과이다. 하지만, 생체는 조골세포뿐만 아니라 다양한 종류의 세포들이 존재하며 더 복잡한 환경으로 구성되어 있기 때문에, 생체 내 실험은 생체 외 실험과는 또 다른 결과를 나타낸다. 이러한 생체 내에서 나노튜브에 대한 생물학적 반응을 관찰하기 위하여 토끼를 대상으로 100nm 직경의 나노튜브 실험군과 티타니아 입자가 코팅된 실험 대조군을 비교 평가하였다. 자세한 동물실험에 대한 배경과 방법은 이미 출간된 논문에서 나와 있다²⁶⁾. 실험은 4주에 걸쳐서 이루어졌고, 실험 결과를 간략히 설명하면 다음과 같다. 100nm 티타니아 나노튜브가 있는 티타늄 표면에서는 주변의 골과 반응하여 새로운 골이 형성되는 것을 확인하였지만, 대조군으로 사용된 티타니아 입자 코팅 표면에서는 주변의 골과 직접적인 골결합을 방해하는 연조직 결합세포층이 형성됨을 관찰하였다. 기계적 인장 시험 결과에서

도 티타니아 나노튜브 표면을 가진 실험군이 대조군에 비하여 9배나 높은 인장력을 나타내었다.

이러한 생체 내 실험 결과들은 티타니아 나노튜브와 인접한 골의 계면결합이 아주 강력하므로 쉽게 파절되지 않으며, 세포 실험에서 보여주었던 나노튜브에 의한 조골세포의 골 형성능의 촉진이 생체 내 실험에서 우수한 골유착으로 이어지는 것은 알 수 있었다(그림 3).

4. 요약

아직까지 나노관련 기술이 티타늄 임플란트에 직접적으로 사용되는 부분이 상당히 미약하다. 하지만, 수직으로 정렬된 구조를 가지는 티타니아 나노튜브는 생체 내 대부분의 임플란트 재료로 사용되는 티타늄의 차세대 개발에 있어서 가장 중요한 영향을 미칠 것이다. 본문에 설명되어 있는 내용들 뿐 만 아니라, 티타니아 나노튜브는 파골세포의 골 흡수성 방지, 줄기세포의 특정 성체세포로의 분화²⁷⁾, 연골세포의 재분화, 간세포를 이용한 생물 반응기(bio-reactor) 개발 등 생체재료의 여러 분야에서 많이 연구되고 있다. 특히, 줄기세포에 관한 연구는 차세대 임플란트 개발에 있어서 가장 중요한 연구 분야 중의 하나로서, 골을 형성하는 조골세포와 골을 파괴하는 파골세포 모두 줄기세포로부터 만들어진다는 것을 유념해야 할 것이다. 만약, 티타니아 나노튜브의 독특한 나노구조를 이용하여 줄기세포의 조골세포로의 직접 분화를 제어하는 기술이 개발되어 상업화된다면, 이 기술을 기반으로 하여 현재까지 개발된 모든 표면 증착 및 코팅 기술을 새롭게 이용하는 차세대 티타늄 임플란트의 개발을 위한 초석이 되리라고 본다.

참고 문헌

- Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Finones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:97.
- Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S. Enhanced cellular mobility guided by TiO₂ nanotube surfaces. *Nano Lett* 2008;8:786.
- Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomaterialia*, In Press, Available online 15 May 2009.
- Curtis AS, Dalby M, Gadegaard N. Cell signaling arising from nanotopography: implications for nanomedical devices. *Nanomed* 2006;1:67.
- Dalby MJ, Andar A, Nag A, Affrossman S, Tare R, McFarlane S, Oreffo RO. Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies. *J R Soc Interface* 2008.
- Dalby MJ, Johnstone H, et al. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials* 2001;23:2945.
- Gallagher JO, McGhee KF, Wilkinson CD, Riehle MO. Interaction of animal cells with ordered nanotopography. *IEEE Trans Nanobioscience* 2002;1:24.
- Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P. Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett* 2007;7:1686.
- Dalby MJ. Nanostructured surfaces: cell engineering and cell biology. *Nanomed* 2009;4:247-8.
- Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials* 2006; 27:2980-7.
- Dalby MJ, Pasqui D, Affrossman S. Cell response to nano-islands produced by polymer demixing: a brief review. *IEE Proc Nanobiotechnol* 2004; 151:53-61.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Curtis AS, Oreffo RO. Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007;2:129-38.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Herzyk P, et al. Nanomechanotransduction and interphase nuclear organization influence on genomic control. *J Cell Biochem* 2007;102:1234-44.
- Prakasam HE, Shankar K, Paulose M, Varghese OK, and Grimes CA. A New Benchmark for TiO₂ Nanotube Array Growth by Anodization. *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111: p. 7235-7241.
- Prakash S, Tull GD, Basu SK, and Madan RD. *Advanced Inorganic Chemistry*, 2005. 2.
- Tao J, Zhao J, Tang C, Kang Y, Li Y. Mechanism study of self-organized TiO₂ nanotube arrays by anodization. *New Journal of Chemistry* 2008.
- Oh S, Brammer KS, Cobb CJ, Smith G, and Jin S. (2009) TiO₂ nanotubes for enhanced cell and bone growth. In: Karlinsey R.L. (ed) *Recent Developments in Advanced Medical and Dental Materials Using Electrochemical Methodologies*. ISBN: 978-81-308-0335-7, Research Signpost, 199.
- Linder L, Carlsson A, Marsal L, Bjursten LM, Branemark PI. Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70:550.
- Pillar RM LJ, Maniopoulos C. Observation on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clin Orthop Rel Res* 1986;208:108.
- Satomi K, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. Bone-implant interface structures after nontapping and tapping insertion of screw-type titanium alloy endosseous implants. *J Prosthet Dent* 1988;59:339.
- Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* 2005;26:4938.
- Oh SH. The effect of TiO₂ nanotubes on the adhesion, proliferation and osteogenic functionality of osteoblasts. *J Kor Res Soc Dent Mater* 2008;35:297.
- Boyan BD, Humbert, T.W., Dean, D.D., Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137.
- Ingber DE. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1993;104:613.
- Martínez E, Engel, E., Planell, J.A., Samitier, J. *Ann Anat* 2009;191:126.
- Bjursten LM, Rasmusson, L., Oh, S., Smith, G.C., Brammer, K.S., Jin, S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J Biomed Mater Res* 2009;88A.
- Oh S, Brammer KS, Li YS, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 17;106(7):2130-5. Epub 2009 Jan 28.