NaCl 수용액에 담근 Hydroxyapatite 코팅된 타이타늄 시편의 표면 변화

서울대학교 치의학대학원 치과보철학 교실

백연화 · 김명주 · 권호범 · 임영준

Hydroxyapatite 코팅 임플란트의 세포반응성을 증가시키기 위한 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 본 연구에서는 Hydroxyapatite 코팅된 타이타늄 시편을 NaCl 수용액에 다양한 기간 동안 담그어 놓았을 때 발생하는 표면거칠기, 표면접촉각, 표면에너지 등의 표면 특성의 변화를 관찰하였다. Hydroxyapatite 코팅 타이타늄 시편을 0.9% NaCl 용액에 담근 후 각각 7일, 14일, 21일간 37℃를 유지하였다. 담그지 않은 동일한 시편을 대조군으로 하였다.(n=3) 모든 시편을 공기 중에서 완전 건조 후 공초점레이저주사현미경(CLSM)를 이용하여 표면거칠기를 측정하였다. 증류수를 시편 표면에 떨어뜨린 후 표면접촉각을 video contact angle analyzer를 이용하여 측정하였고 세 가지 용액을 떨어뜨려 접촉각을 측정하여 표면에너지를 산출하였다. 표면을 관찰하기 위해 Field Emission-Scanning Electron Microscope 촬영을 시행하였다. 본 연구 결과 Hydroxyapatite 시편을 Nacl 수용액에 담그는 간단한 방법을 통해 표면거칠기 및 친수성이 증가하는 것을 관찰할 수 있으며, 이러한 표면특성의 개선을 통하여 세포반응성이 증가하는 것을 기대할 수 있다.

주요어: Hydroxyapatite 코팅 임플란트, 표면거칠기, 표면접촉각, 표면에너지, 친수성

(구강회복응용과학지 2012:28(4):339~347)

서 론

최근까지의 임플란트 표면에 관한 연구에 의하면 임플란트의 표면 특성, 즉 표면거칠기, 구조, 화학적 성분, 표면 전하, 친수성, 표면에너지 등이 임플란트 주변 조직의 반응에 중요한 영향을 주는 요소로 보고되고 있다. 임플란트 표면의 거칠기를 증가시키면 골과의 접촉면적이 증가하고 세포의 부착이 증가하여 임플란트와 골간 접촉(bone to implant contact)이 증가한다고 하였고,[1] Gu YX 등은 미세거칠기와 친수성은 osteoblast의 증식 및 분화의 초기에 영향을 미친다고 하였다.[2]

한편 임플란트 표면을 개선하기 위해 blasting, etching, Ti plasma spraying, oxidizing 등 다양한 기술이 행해졌는데 그 중 하나로 골 및 치아의 주요 구성성분인 Hydroxyapatite 코팅 처리를 한 임플란트가 도입되었다. Hydroxyapatite 코팅 임

교신저자: 임영준
서울대학교 치의학대학원, 치과보철학교실,
서울특별시 종로구 연건동 28번지,110-749, 대한민국
Fax: 82-2-2072-3860, E-mail: limdds@snu.ac.kr
원고접수일: 2012년 10월 05일, 원고수정일: 2012년 11월 03일, 원고채택일: 2012년 12월 25일

플란트는 다양한 실험실적 연구에서 우수한 세포반응성이 보고되었고,[3,4] Gottlander M 등에 의하면 Hydroxyapatite 코팅되지 않은 타이타늄 임플란트보다 더 빠른 골반응과 높은 임플란트 생존률이 관찰되었다고 하였다.[5]

생체 내에서 발생하는 치아나 골의 형성은 생체 내 Hydroxyapatite와 체내의 수용성 용액 간의 세포들에 의해 조절되는 화학적 작용의 결과라고 알려져 있다. 정확한 반응과 기전이 알려져 있지는 않으나 기존 몇몇 연구들이 체액과의 상호작용에 의한 Hydroxyapatite 표면의 변화가 Hydroxyapatite 표면에 작용하는 세포에 영향을 줄 것으로 가정하고 진행되어 왔다. Anselme K 등은 Hydroxyapatite 시편을 세포배양액 내에 다양한 기간 동안 담근 후 세포 배양 실험 결과, 15일 이상 담근 시편에서만 세포 부착이 나타났다고 보고하였다.[6] 한편 Bertazzo S 등은 Hydroxyapatite 시편을 각각 NaCl/$CaCl_2$용액과 deionized water에 15일간 담가 둔 후 세포 배양 실험 결과 용액에 담그지 않은 시편에서보다 더 높은 세포 부착이 관찰되었다고 보고하였다.[7,8]

기존의 연구들을 살펴보면 수용액 내 Hydroxyapatite에서 세포 부착에 더 유리하게 표면 변화가 일어난다는 것을 가정할 수 있다. 이에 본 논문에서는 Hydroxyapatite 코팅 타이타늄 시편을 NaCl 수용액에 담근 후 표면거칠기, 표면접촉각 및 표면에너지를 측정하고 표면 형태를 관찰하여 표면의 변화를 알아보고자 한다.

연구재료 및 방법

Hydroxyapatite로 한 쪽면이 코팅된 타이타늄 시편(Osstem, Busan, South Korea)을 지름 10mm 두께 1mm의 동일한 크기로 준비하였다. 4x6 24 well에 주사용 0.9% NaCl 수용액 2ml씩 주입하고 군당 3개의 시편을 사용하여 각 군별로 7일, 14일, 21일간 침전시킨 후 37℃를 유지하였다. 수용액에 담그지 않은 건조한 시편을 대조군으로 하였다.

1. 표면거칠기 측정

모든 시편을 증류수로 3회 헹군 후 공기 중에서 완전히 건조시킨 후 공초점레이저주사현미경(CLSM, PASCAL LSM5, CARL ZEISS, Jena, Germany)를 이용하여 표면을 촬영하고 표면거칠기를 측정하였다. 측정 넓이는 900㎛ x 900㎛로 각 시편 당 각각 5회씩 다른 부위에 시행하여 표면거칠기(Sa : arithmetic mean deviation of the surface) 평균값을 산출하였다.

2. 표면접촉각 측정 및 표면에너지 산출

모든 시편을 증류수로 3회 헹군 후 공기 중에서 완전히 건조시킨 후 증류수를 시편 표면에 떨어뜨린 후 표면접촉각을 video contact angle analyzer(General type Phoenix 150, SEO, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다. 시편에 증류수를 떨어뜨리는 즉시 촬영하여 표면접촉각을 Image XP program(General type Phoenix 150 SEO)측정, 기록하였다. 각 시편 당 3회 시행하였다.

표면에너지는 증류수(polar basic), formamide (polar acidic), 1-bromonaphtalene(nonpolar)의 세 가지 다른 용액을 떨어뜨려 접촉각을 측정한 후 산-염기 이론 공식에 근거하여 산출하였다.

3. 표면 특성 관찰 (FE-SEM)

4개의 군에서 각각 1개의 시편씩을 선택하여 Field Emission-Scanning Electron Microscope (FE-SEM, Hitachi S-4700, Tokyo, Japan)을 이용하여 15kV의 전압으로 10,000배, 30,000배로 촬영을 시행하였다. 각 시편당 각각 3회씩 다른 부위에 시행하였다.

4. 통계 분석

정규성 검정을 Shapiro test로 시행하였고 표면거칠기 측정값에 대해서는 one way ANOVA를

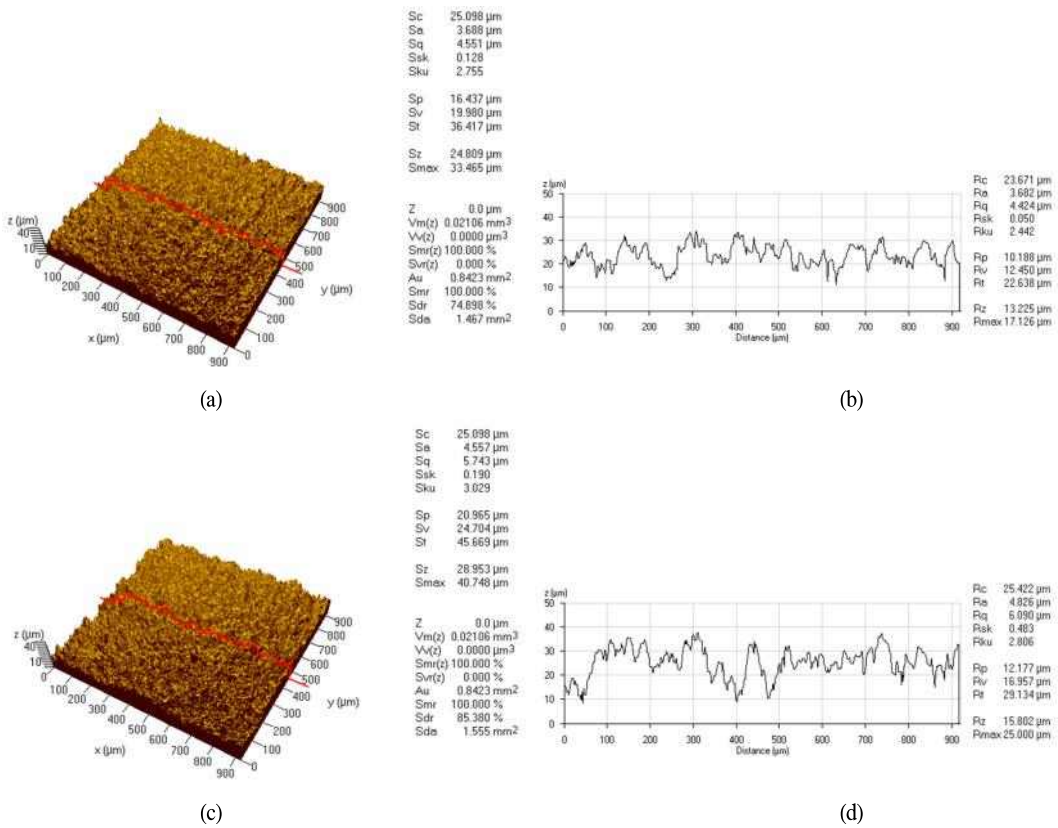


Fig. 1. Surface roughness of (a)disc not immersed,(b)disc immersed in NaCl solution for 7 days.

이용하여 분석한 후 Scheffe Test(p=0.005) 로 사후 검정하였다. 표면접촉각 측정값에 대해서는 Kruskal-Wallis rank sum test를 이용하여 그룹 전체를 분석한 후 Mann-Whitney-Wilcoxon Test(p=0.0083, Bon ferroni correction 적용)를 이용하여 두 그룹 간 차이 유무를 검정하였다.(PASW statistics 18.0 software, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)

결 과

1. 표면거칠기

Hydroxyapatite 코팅 시편의 표면거칠기를 측정한 결과 담그지 않은 시편과 NaCl 수용액에 7일, 14일, 21일간 담근 시편의 표면거칠기 값은 차례로 평균 3.9±0.15, 4.2±0.20, 4.1±0.11, 4.1±0.14㎛를 나타내었다. NaCl 수용액에 담그지 않은 시편과 담근 시편의 평균 표면거칠기의 차이는 통계적으로 유의하였으나($p < 0.05$) 담근 시편들 간의 담근 기간에 따른 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($p>0.05$). (Table Ⅰ, Fig 1)

2. 표면접촉각, 표면에너지

Hydroxyapatite 코팅 시편의 증류수 표면접촉각을 측정한 결과 NaCl 수용액에 담그지 않은 시편, 7일, 14일, 21일 간 담근 시편 순으로 표면접촉각은 평균 80.0±5.22, 38.3±14.78, 36.7±11.52,

Table Ⅰ. Surface roughness of hydroxyapatite coated Ti discs immersed in NaCl solution for 0,7,14 and 21 days

Immersion period (day)	Surface roughness (㎛)
0	3.9 ± 0.15[a]
7	4.2 ± 0.20[b]
14	4.1 ± 0.11[ab]
21	4.1 ± 0.14[b]

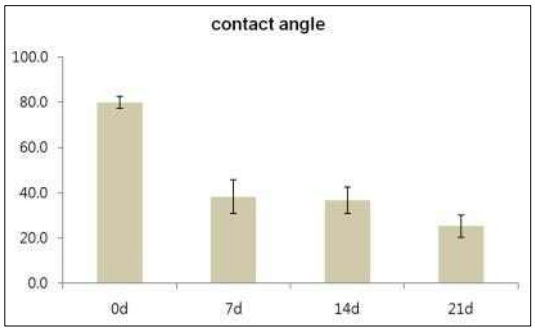


Fig. 2. Contact angle of Hydroxyapatite coated Ti discs immersed in NaCl solution for 0,7,14 and 21 days

25.2±9.74도를 나타내었다. 담그지 않은 시편과 담근 시편의 표면접촉각 간에는 통계적으로 유의할만한 차이가 존재하였고 담근 기간별로는 7일, 14일간 담근 그룹보다 21일간 담근 그룹의 표면접촉각이 유의하게 작은 값을 나타내었다.

(Table Ⅱ, Fig 2,3) 표면에너지는 각각 42.7, 51.2, 30.9, 46.1 mN/m으로 나타났다.

3. SEM 촬영 결과

모든 군의 Hydroxyapatite 코팅 시편 표면에 5-50㎛ 정도의 다양한 지름의 알갱이들이 붙어 있었으며 곳곳에 매끄러운 표면들이 관찰되었다. NaCl 수용액에 21일간 담근 Hydroxyapatite 코팅 시편에서는 0.5-5㎛ 정도 길이의 바늘모양의 결정들이 관찰되었고 이러한 결정들이 모여 그물 형태로 붙어있는 것이 관찰되었다.(Fig. 4)

고 찰

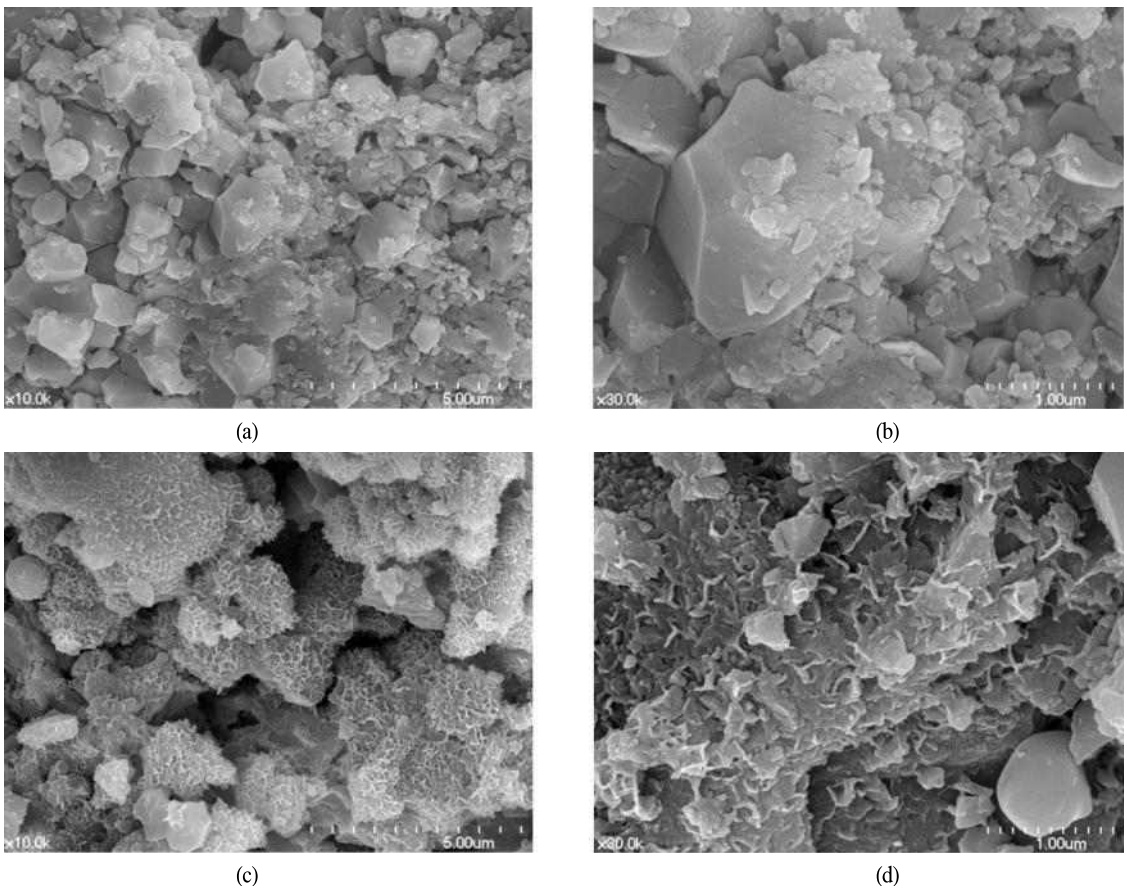
본 연구에서는 Hydroxyapatite코팅 표면의 타이타늄 시편을 NaCl수용액 내에 담가 놓은 후 발생하는 표면거칠기, 표면접촉각과 표면에너지 및 표면 형태의 변화를 관찰하였다. 기존 연구에



Fig. 3. Distilled water droplet images taken by the video contact angle analyzer (a) disc not immersed, (b-d) discs immersed in NaCl solution for (b)7 days, (c) 14 days and (d) 21 days.

Table Ⅱ. Contact angle and surface energy of Hydroxyapatite coated Ti discs immersed in NaCl solution for 0,7,14 and 21 days

Immersion period (day)	Contact angle (°)	Surface energy (mN/m)
0	80.0 ± 5.22[a]	42.7
7	38.3 ± 14.78[b]	51.2
14	36.7 ± 11.52[b]	30.9
21	25.2 ± 9.74[c]	46.1



(a) (b)

(c) (d)

Fig. 4. SEM images of (a),(b): disc not immersed (a: x10,000, b: x30,000), (c),(d): disc immersed in NaCl solution for 21 days (c: x10,000, d: x30,000)

서는 Hydroxyapatite 시편을 담그는 용액으로 cell culture medium[6], NaCl 수용액[7] 및 deionized water[8] 등을 사용하였다. 본 실험에서는 가장 생리적이면서 간편한 0.9%의 NaCl 수용액을 선택하였다.

표면거칠기를 살펴보면 NaCl 수용액에 7일간 담근 시편의 평균 표면거칠기가 가장 높게 나타났고 수용액에 담그지 않은 시편의 표면거칠기가 가장 낮게 나타났다. 담그지 않은 시편 군의 표면거칠기와 담근 시편 군의 표면거칠기 간의 차이는 통계적으로 유의하였다(p<0.05).

이번 실험에서는 NaCl수용액에 Hydroxyapatite 코팅 시편을 담금으로서 발생하는 친수성의 변화를 살펴보기 위해 증류수를 떨어뜨려 표면접촉각을 측정하였다. 담그기 전의 80.0±5.22도에서 7일, 14일, 21일 담금에 따라 38.3±14.78, 36.7±11.52, 25.2±9.74도로 감소하여 친수성이 증가함을 알 수 있었다. 담그지 않은 시편과 담근 시편 간의 접촉각의 차이는 통계적으로 유의성이 있었으며 7일, 14일 담근 시편 간에는 유의성 있는 차이가 없었으나 21일 담근 시편에서는 그 이하 기간 동안 담근 시편보다 유의성 있게 접촉각이 감소하였다. 증류수, formamide, 1-bromonaphtalene을 이용하여 표면에너지를 측정한 결과 14일간 담근 시편을 제외하고는 담그지 않은 시편보다 수용액에 담근 시편에서 높은 표면에너지를 나타내었고 이는 높은 친수성을 의미한다. 기존의 여러 연구들에 의하면 임플란트 주변 조직 반응에 영향을 주는 임플란트 표면의 여러가지 요소들 중 하나가 임플란트 표면의 거칠기이며 높은 거칠기는 임플란트와 골간 접촉(bone to implant contact)을 증가시키고[1,9] removal torque를 증가시킨다고 보고하였다.[10,11] 또한 표면의 친수성은 생체적합성을 결정하는 중요한 요인이고 이는 표면에너지와 밀접한 관계가 있다.[12] Eriksson C 등은 친수성이 높은 임플란트를 식립 시 골 형성 비율 및 범위가 증가하는 것으로 보고하였다.[13] Gu YX 등은 SLA, SLActive시편과 편평하게 가공한 Ti disc에 각각 osteoblast cell을 배양 및 분화 실험한 결과 표면의 미세거칠기와 친수성이 높은 SLActive 시편에서 가장 높은 osteoblast cell의 활동성이 관찰되었다고 하였고 미세거칠기와 친수성은 osteoblast의 증식 및 분화의 초기에 영향을 미친다고 하였다.[2]

본 연구 결과 Hydroxyapatite 코팅 시편을 NaCl 수용액에 담근 시편에서 표면거칠기와 친수성이 통계적으로 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 표면거칠기와 친수성의 증가는 기존 연구 결과들을 고려할 때 임플란트 주변 세포들의 반응성을 증가시킬 수 있을 것이라 기대해 볼 수 있다.

SEM 촬영 결과를 살펴보면 모든 군의 Hydroxyapatite 코팅 시편 표면에 5-50㎛ 정도의 다양한 지름의 알갱이들이 붙어 있었으며 곳곳에 매끄러운 표면들이 관찰되었다. NaCl 수용액에 21일간 담근 시편에서는 0.5-5㎛ 정도 길이의 바늘모양의 결정들이 관찰되었고 이러한 결정들이 모여 그물 형태로 붙어있는 모습도 관찰되었다. (Fig.3)

Anselme K 등은 Hydroxyapatite 코팅 시편을 1, 3, 7, 15, 22일간 세포배양액에 담가 놓은 후 세포배양 결과 15일과 22일간 담가 놓은 시편에서만 세포 부착이 관찰되었는데 이는 용해-재침착(dissolution-reprecipitation)과정에 의해carbonated hydroxyapatite가 형성되었기 때문으로 생각된다고 하였다.[6] 한편 Bertazzo S 등은 NaCl/ $CaCl_2$용액에 15일간 담근 Hydroxyapatite 시편에 세포 배양 결과 담그지 않은 시편에 비해 높은 세포 부착율이 관찰되었다고 하였는데 수용액 내의 Hydroxyapatite시편에서 원래의 Hydroxyapatite 표면은 용해되고 $CaHPO_4$와 같은 새로운 인산칼슘 화합물이 형성된다고 하였다.[7]

담근 기간별로 살펴보면 7일, 14일보다 21일에서 표면접촉각은 더 통계적으로 유의성 있게 감소하였으나 표면거칠기 및 표면에너지 값은 담근 기간과 뚜렷한 상관관계는 보이지 않았다. Anselme K 등과 Bertazzo S 등에 의하면 Hydroxyapatite 시편을 용액 내에 15일 이상 담근 경우에 담그지 않거나 그 이하 기간 동안 담근

시편에서보다 세포 부착율이 증가하는 것으로 보고하였다.[6,7] 본 실험에서는 표면거칠기는 7일, 14일, 21일 담근 시편 간에 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았으나 표면접촉각은 7일과 14일간 담근 시편과 21일간 담근 시편 간에 유의성 있는 차이가 나타나 이전의 연구에서의 15일 이상 담근 시편에서 세포 부착율이 증가한 결과와 연관이 있다고 생각된다.

한편 코팅에 포함된 결정 Hydroxyapatite 코팅 비율이 코팅의 용해율에 영향을 미치며 이는 골세포의 활성에 영향을 미친다는 보고들이 있다. Frayssinet P 등은 48%의 결정 비율과 100%의 결정 비율을 가지는 Hydroxyapatite 코팅표면 시편에 세포를 배양한 결과 100%의 결정 시편에서 세포 증식 및 alkaline phosphatase의 활성이 더 낮게 나타났고 이를 결정 비율이 낮은 Hydroxyapatite 코팅에서 무결정 상태의 Hydroxyapatite 코팅이 용해되면서 배양액 내의 Ca 및 P의 농도가 증가하고 특히 Ca 농도가 세포 활성화에 영향을 주었다고 주장하였다.[14] 이번 연구에서는 열플라즈마를 이용해 코팅한 98% 결정화율을 보이는 Hydroxyapatite 코팅시편을 사용하였다. Hydroxyapatite 코팅 방법과 결정화율 등의 차이 등에 따라 실험 측정치가 달라질 수 있을 것이라 생각된다.

본 실험 결과 Hydroxyapatite 시편을 NaCl수용액에 담그는 간단한 방법을 통해 표면거칠기 및 친수성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 표면 특성의 개선으로 세포반응성이 증가할 것을 기대할 수 있으며 이를 임플란트의 표면 처리 및 보관 등에 응용한다면 간단한 방법으로 Hydroxyapatite 코팅 임플란트의 세포 반응성을 개선할 수 있을 것이다.

결 론

1. Hydroxyapatite 코팅 시편을 0.9% NaCl 수용액에 7,14,21일간 담가 놓은 결과 담그지 않은 시편에 비해 표면거칠기가 통계적으로 유의하게 증가하였다($p<0.05$).
2. Hydroxyapatite 코팅 시편을 0.9% NaCl 수용액에 7,14,21일간 담가 놓은 결과 담그지 않은 시편에 비해 표면접촉각이 통계적으로 유의하게 감소 ($p<0.05$), 즉 친수성이 증가하였다.
3. Hydroxyapatite 코팅 시편을 0.9% NaCl 수용액에 담근 기간별로는 표면접촉각은 7,14,21일로 증가할수록 점점 감소하였으나 표면거칠기와 표면에너지는 담근 기간과 상관관계를 보이지 않았다.
4. Hydroxyapatite 코팅 시편을 0.9% NaCl 수용액에 담근 결과 담그지 않은 시편에 비해 표면거칠기과 친수성이 증가하여 세포반응성이 증가할 것을 기대할 수 있다.

연구비 지원 및 사의

This work was supported by: the Korea Health R&D project(A120092), granted by Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

The authors wish to thank OSSTEM Implant Co.(Busan, Korea), for kindly supplying the specimens for this experiment.

참 고 문 헌

1. Goldberg VM, Jinno T. The bone-implant interface: a dynamic surface. Journal of long-term effects of medical implants 1999;9:11.
2. Gu YX, Du J, Si MS, Mo JJ, Qiao SC, Lai HC. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2012.
3. Jansen J, Waerden J, Wolke J. A histological evaluation of the effect of hydroxyapatite coating on interfacial response. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1993;4:466-70.
4. Lugscheider E, Knepper M, Heimberg B, Dekker A,

Kirkpatrick C. Cytotoxicity investigations of plasma sprayed calcium phosphate coatings. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1994;5: 371-5.
5. Gottlander M, Albrektsson T. Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. The International journal of oral & maxillofacial implants 1991;6:399.
6. Anselme K, Sharrock P, Hardouin P, Dard M. In vitro growth of human adult bone-derived cells on hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. J Biomed Mater Res 1997;34:247-59.
7. Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DDP, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2010;78:177-84.
8. Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DDP, Ferreira CV, Bertran CA. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. Clin Oral Implants Res 2010;21:1411-3.
9. Buser D, Schenk R, Steinemann S, Fiorellini J, Fox C, 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.
10. Li D, Ferguson SJ, Beutler T, Cochran DL, Sittig C, Hirt HP, Buser D. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. J Biomed Mater Res 2002;60:325-32.
11. Wennerberg A, Ektessabi A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. The International journal of oral & maxillofacial implants 1997;12:486.
12. Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. J Biomed Mater Res 1994;28:1419-25.
13. Eriksson C, Nygren H, Ohlson K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. Biomaterials 2004;25:4759-66.
14. Frayssinet P, Tourenne F, Rouquet N, Conte P, Delga C, Bonel G. Comparative biological properties of HA plasma-sprayed coatings having different crystallinities. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1994;5:11-7.

The Surface Characteristic Changes of Hydroxyapatite Coated Ti Disc When Immersed in NaCl Solution

Yeon-Wha Baek, Myung-Joo Kim, Ho-Beom Kwon, Young-Jun Lim,

Department of Prosthodontics and Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University

In previous studies, methods for enhancing cellular response on the Hydroxyapatite coated implant surface were described. In this study, the changes of surface characteristics such as surface roughness, contact angle, surface energy and surface morphology were observed when Hydroxyapatite coated Ti discs were immersed in NaCl solution for various time. Hydroxyapatite coated Ti discs were immersed in 0.9% NaCl solution for 7, 14 and 21 days at 37℃. The control group comprises dry identical discs not immersed in a solution. (n=3) All discs were dried in air completely and the surface roughness was measured using confocal laser scanning microscopy(CLSM). Static contact angle was recorded by video contact angle analyzer after dropping distilled water on the surface. The surface energy was calculated from contact angles of the three liquids. Surface was observed using a field emission-scanning electron microscope(FE-SEM).

As a result, the surface roughness of immersed Hydroxyapatite coated Ti discs increased significantly and the contact angle decreased comparing with control group discs. The surface energy of immersed discs increased except for discs immersed for 14 days.

Key words: contact angle, hydrophilicity, Hydroxyapatite coated implant, surface energy, surface roughness

Correspondence to : Young-Jun Lim DDS,MSD,PhD
Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Seoul National University
28 Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-749, Korea
Fax: 82-2-2072-3860, E-mail: limdds@snu.ac.kr
Received: October 05, 2012, Last Revision: November 03, 2012, Accepted: December 25, 2012