블라스팅과 양극산화된 티타늄 표면이 조골세포의 부착 및 분화에 미치는 영향

*강릉대학교 치과대학 치과보철학교실, **약리학교실 및 구강과학연구소

박찬진*·조리라*·이양진*·고성희**

Ⅰ. 서 론

일반적으로 티타늄 금속은 실온의 공기 중에서 자연적으로 1.5~10 nm의 표면 산화막으로 덮히게 된다.[1] 기계절삭형 티타늄 임플란트는 이 산화막이 대부분 TiO_2로 구성된다. 자연적인 얇은 표면 산화막은 전기전도성이 낮고, 열역학적 안정성이 높으며, 수성환경에서 이온형성 경향이 낮아, 부식에 대한 저항성이 높다. 이와 같은 산화막의 성질로 인하여 티타늄 임플란트는 다른 금속에 비해 생체친화성이 우수하다.[2-5] 1990년대 초반부터 티타늄 표면특성의 중요성이 대두되면서 다양한 표면조도 변화를 목표로 하는 표면처리 방안이 보고되었다. 표면조도를 증가시키는 방법으로는 표면에 특정 재료를 첨가하는 수산화인회석 피복, 티타늄 분사 피복법 및 beading법 등이 있고, 티타늄 표면으로부터 티타늄을 제거하여 표면조도를 증가시켜주는 방법으로는 산화티타늄 분사법, 산화알루미늄 분사법, 칼슘인산 분사법과 산 부식법, 산화알루미늄 분사 후 산 부식법 등이 이용되고 있다.

표면조도에 따라 세포 부착, 세포 증식, 세포 분화, 기질 생산, 석회화 등으로 진행되는 골유착의 각 단계에서 세포는 각기 다른 양상을 보인다.[6] 매끈한 표면에는 상피세포와 섬유아세포의 부착이 증가되고, 거친 표면에서는 조골세포양 세포의 부착이 크게 향상되었으며, 조도를 증가시킨 표면이 주변 골 형성에 유리하였다.[6,7] 이후의 세포 증식, 분화 및 대사에 관한 연구에서 조도가 높은 임플란트 표면에서 골형성에 보다 유리한 미세 환경이 조성되어[8] 골세포의 알칼리성 인산분해효소 활성이 증가되며, 세포외기질 및 osteocalcin의 생산도 증가되었으나 세포 증식은 감소한다고 하였다.[9,10]

또한 표면조도는 골형성에 관여하는 국소인자인 prostaglandin,[11,12] TGF-β1[11,13,14]의 생산에도 영향을 준다고 하였으며, 표면이 거칠수록 파골세포의 형성 및 활성을 억제한다고 하였다[15,16]. 조직학적 연구에서 조골세포는 금속 표면의 peak-to-peak 사이의 거리보다 세포체의 크기가 작으면 더 성숙한 분화형을 나타내고 매끈한 표면에서는 편평한 모양의 섬유아세포와 비슷한 형태를 나타내며[17] 표면조도를 증가시킨 임플란트에서 주변 골과의 더 높은 접촉률을 보였으며[18-21]임플란트의 성공에 중요한 영향을 끼치는 것으로 알려진 초기 고정력을 평가하는 회전제거력 측정에서도 표면이 거칠수록 더 우수한 결과를 보여주었다.[18-25]

그렇지만 Linck등[26]은 티타늄과 티타늄 합금을 이용한 실험에서 표면조도와 아울러 표면조성이 조골세포의 행동 양상에 중요하다고 하였으며, Stefano등[27]은 불규칙한 표면의 깊이, 분포,

* 연구는 강릉대학교 치과병원 협동임상연구비 (A054/2004-0157)지원으로 수행되었음.

와동 형태 및 표면 처리 과정에서 남은 오염 요소의 존재여부가, 그리고 Lohmann등[28]은 세포의 분화도가 조골세포양세포 행동양상에 영향을 준다고 하였다.

그러나 표면조도에 대한 조골세포양세포의 반응에 대한 현재까지의 연구결과는 매우 다양하다. 표면조도가 간엽세포의 평균 길이인 5~12 ㎛ 보다 클 경우 세포는 이 면을 거칠지 않다고 인식한다는 보고[29]와 조골세포양세포는 매끈한 면보다는 거친 티타늄 면에 더 강하게 부착한다는 연구결과가 있다.[9] 그리고 표면조도가 조골세포 크기 이내에서 표현될 정도로 미세하면 조골세포의 부착과 증식은 저하되고, 조골세포의 크기 이상이면 조골세포의 부착과 증식이 증가한다는 보고[30]와 표면조도가 세포의 부착에 영향을 주지 않는다는 보고도 있다.[31] 이러한 차이는 실험조건 즉, 사용한 임플란트 표면, 실험에 이용한 세포의 종이나 성숙도 등의 차이 때문일 수 있으며,[9] 적절한 표면조도를 훨씬 넘거나 제대로 조절되지 않으면 임상적 성공률이 크게 떨어지는 것으로 보고되고 있다.

최근에 발표된 몇몇 생체 실험은 티타늄 임플란트의 산화막 성질 변형이 골조직 반응을 향상시킬 수 있다는 결과를 보여주었다.[32-35]표면의 산화막 두께가 600 ㎚ 이상인 다공성 표면구조를 가진 양극산화 티타늄 임플란트의 경우 기계절삭형 티타늄 임플란트에 비해 동물실험에서 매우 좋은 결과를 보여 주었다. 양극산화법은 티타늄 표면에 존재하는 산화막을 보다 균일하고, 두껍고, 치밀하게 만들어주며, 높은 전압을 가했을 경우에는 표면에 분화구 형태의 다공성 구조를 형성해 준다. 양극산화에 의해 형성된 다공성 구조는 임플란트 식립 시 골과의 접촉면적을 증가시켜줄 뿐 아니라 골 단백질과 같은 골 재생에 관여하는 인자들을 골 내에 장기간 전달할 수 있는 전송수단으로 이용할 수 있다. 티타늄에 대한 양극산화는 전해질의 종류, 전해질의 농도, 전해질의 온도, 상대 음극의 종류, 전류의 양 등 여러 가지 요소들에 의해 다른 결과를 나타낸다. 양극산화 시 각각 다른 이온들(Ca, S, P)을 포함한 전해질 용액을 사용하여 산화층의 성질을 변형한 임플란트에 대한 골조직 반응을 비교한 이 연구에서 Ca와 P 이온이 포함된 임플란트의 경우 골과 티타늄 임플란트 사이의 생화학적 결합이 이루어졌을 가능성이 제시되었다.

본 연구의 목적은 적절한 범위의 표면조도를 가지도록 블라스팅 및 양극산화처리를 하여 얻은 티타늄 디스크와 표면처리를 하지 않은 티타늄 디스크에 대한 조골세포양세포의 부착, 증식, 분화를 비교 평가하는데 있다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시편제작

순수 티타늄(ASTM grade 4)을 직경 10 mm, 두께 1 mm의 디스크로 제작하였다. 티타늄 디스크를 400 grit 사포와 800 grit 사포로 연달아 연마한 후 trichloroethylen과 100% 알코올을 이용하여 각각 2회 초음파 세척한 후 전용오븐을 이용하여 50˚C에서 24시간 건조시켰다. 블라스팅 시편은 0.25 Mpa의 압력에서 시편과 blasting gun을 150 mm 떨어뜨려 약 75 ㎛의 Al_2O_3 입자로 시편을 4회 회전시키면서 블라스팅하였다. 양극산화시편은 멸균 전 마그네슘 이온이 포함된 전해질 시스템에서 높은 전압과 전류의 galvanostatic mode로 양극산화시킨 후 멸균하였다.

2) 주사전자현미경 관찰 및 표면조도 측정

시편을 ion sputting coater (Eiko Engineering Co. IB-3, Japan)를 이용하여 0.1 Torr 진공 상태에서 4분간 금으로 피복시킨 후 주사전자현미경(Hitachi Co. S-3000, Japan)을 이용하여 25 kV 상태에서 관찰하였다. 각 시편의 표면조도의 변화를 측정하기 위해 Optical Interferometry (MicroXamTM)를 이용하여 Sa값을 구하였다.

2. 세포 배양

세포는 사람 골육종에서부터 확립된 조골세포양세포주인 Saos-2 세포를 한국세포주은행(서울,

대한민국)으로부터 구입하여 사용하였다. Saos-2 세포를 100 mm 크기의 세포배양접시 (Coring Co. Coring, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)과 100 U/㎖의 penicillin, 100 ㎍/㎖의 streptomycin이 함유된 α-MEM (Invitrogen, Gibco brand, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 공기혼합배양기 (37°C, 100% 습도, 5% CO_2)에서 배양하였다.

3. 세포 부착 및 세포 증식능 측정

배양된 세포에 0.25% trypsin과 4 mM EDTA 혼합용액을 넣고 37°C에서 5분간 처리하여 부착된 세포를 분리한 후, 혈구계수기로 세포수를 세어 48 well 세포배양접시(Coring Co.)내의 대조군과 실험군 시편위에 시편 당 50,000개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 분주 1시간 후, 배양 1일, 6일째에 시편을 PBS(phosphate buffer saline)으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 이후 0.25% trypsin, 4 mM EDTA 혼합용액을 넣고 37°C에서 5분간 배양하여 부착된 세포를 시편으로부터 탈리시키는 과정을 2회 반복한 후 tryphan blue로 염색하고 혈구계수기로 염색되지 않은 세포의 수를 측정하였다.

4. 알칼리성인산분해효소의 활성측정

배양 1일과 6일째에 0.1% Triton X-100이 포함된 10 mM Tris-HCl 용액(pH 7.4)과 cell scraper를 사용하여 세포를 모으고 얼음 위에서 초음파분쇄기를 이용하여 1분간 초음파 처리하여, 일부는 알칼리성인산분해효소활성 측정에 일부는, 단백질 정량에 사용하였다. 알칼리성인산분해효소 활성은 0.05 M glycin-NaOH buffer (pH10.3)를 완충액으로 사용하고, 15 mM p-nitrophenol phosphate (p-NPP) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA)를 효소기질로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 0.1 N NaOH로 반응을 중지시키고, 효소작용에 의해서 기질로부터 유리된 p-nitrophenol을 410 nm에서 spectrophotometer (amersham pharmacia biotech, Cambridge, England)로 비색 정량하였다. 총 단백질량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 BCA protein assay reagent (Pierce Inc, Rockford, IL)로 정량하였다.

5. 통계분석

초기 부착, 세포 증식능 그리고 알칼리성인산분해효소의 활성을 SPSS 12.0을 사용하여 통계처리하였다. 실험군과 대조군 간의 세포 증식능 및 알칼리성인산분해효소 활성을 일원배치분산분석을 이용하여 검증하였다($p<0.05$).

Ⅲ. 실험결과

1. 주사전자현미경 관찰 및 표면조도 측정

주사전자현미경 관찰에서 대조군에 비해 실험군에서 더 거친 상을 볼 수 있었다(Fig. 1, 2). 표면조도를 측정한 결과 대조군에 비해 블라스팅과 양극산화를 거친 실험군에서 더 높은 표면조도 값을 얻었다(Table 1).

2. 초기 부착 및 세포 증식

배양 1 시간 후에 초기 부착을, 세포 증식능은 배양 1일 및 6일 째에 각각 관찰하였다. 대조군에서 초기 부착 및 세포 증식능에 있어 통계적으로 유의하게 많은 세포수를 보였다($p<0.05$) (Table 2, Fig. 3).

3. 알칼리성인산분해효소의 활성 측정

대조군과 실험군에 접종된 Saos-2 세포의 알칼리성인산분해효소의 활성도를 배양 1일 및 6일 째 관찰하였다. 배양 1일째와 6일째 모두 실험군에서 알칼리성인산분해효소의 활성이 높게 나타났다. 그렇지만 6일째에만 통계적으로 유의성있는 차이를 보였다($p<0.05$) (Table 3, Fig. 4).

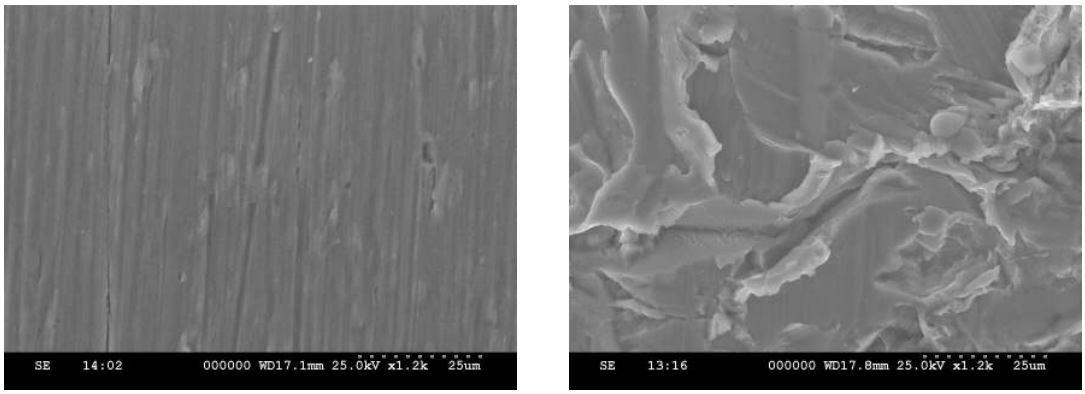

Fig. 1. SEM images. left(machined surface, right) blasted surface.

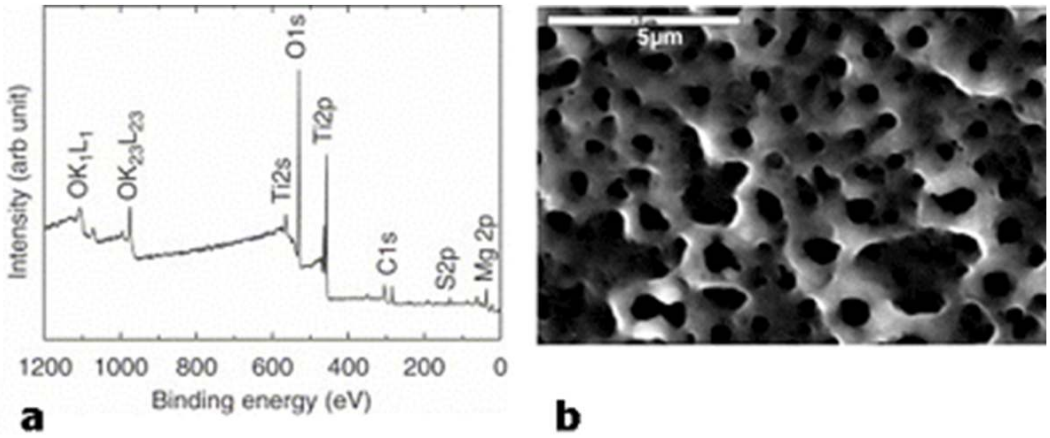

Fig. 2. SEM images. Mg-incorporated anodized surface

Table 1. Surface Roughness (㎛)

Surface	machined	blasted	anodized
Sa	0.16	1.30	0.68

Table 2. Cell adhesion and proliferation ($\times 10^4$ cell count)

Surface	1 hour	1 day	6 days
Machined	3.241 ± 0.080	2.058 ± 0.198	5.463 ± 0.725
Blasted	1.824 ± 0.170*	1.235 ± 0.000*	2.870 ± 0.370*
Anodized	2.027 ± 0.240*	1.790±0.267	2.519±0.026*

Values are Mean ± S.D (n=4)

* Statistically significant difference at the p=0.05

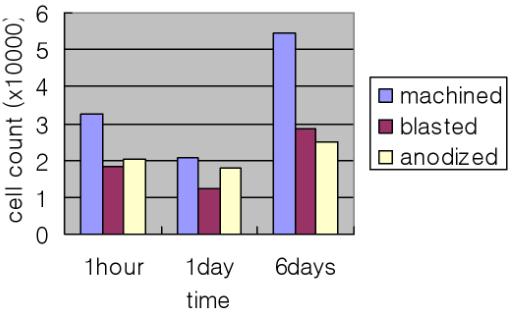

Fig. 2. Cell adhesion and proliferation(x 10^4 cell count)

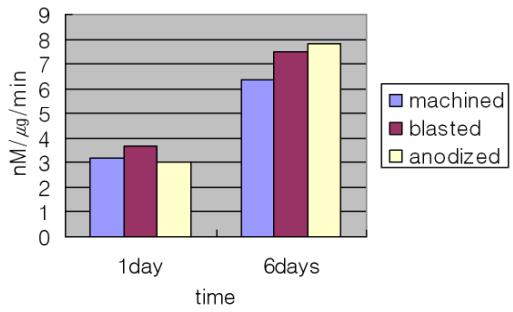

Fig. 4. Alkaline phosphatase activity (nM/μg/min)

Table 3. Alkaline phosphatase activity

(nM/μg/min)

Surface	1 day	6 days
Machined	3.196±0.291	6.362±0.130
Blasted	3.646±0.704	7.512±0.693*
Anodized	3.025±0.454	7.812±0.425*

Values are Mean ± S.D (n=4)

* Statistically significant difference at the p=0.05

Ⅳ. 고 안

초기에 세포 부착을 평가하기 위해 배양 후 1시간째에 세포수를 측정하였으며, 이후 세포의 증식을 평가하기 위해 배양 1일과 6일째에 세포수를 측정하였다. 초기에는 상대적으로 매끈한 표면을 가진 기계절삭 표면에서 더 많은 수의 세포가 관찰되었으나, 1일째의 결과에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았는데 이는 초기에 부착되었던 세포들 중에서 일부는 살아남지 못하고 증식과정 중 탈락했기 때문인 것으로 생각된다. 그리고 배양 6일째는 블라스팅한 표면이나 마그네슘 티타네이트에 비해 기계절삭 표면에서 조골세포의 증식이 더 많이 일어난 것으로 관찰되었다. 조골세포의 분화 정도를 평가하기 위해 1일과 6일째 알칼리성인산분해효소의 활성을 평가하였다. 세포의 초기 부착이나 증식의 결과와는 달리 배양 6일째 실험군 시편의 세포에서 더 높은 수준의 알칼리성 인산분해효소 활성도를 나타내고 있었다. 즉 실험군의 시편에서 성장한 Saos-2 세포가 더 높은 수준으로 분화하였다는 것을 의미한다. 여러 연구에서 SEM과 TEM 관찰에서 세포가 디스크의 함요부로 이동하여 트립신 처리에 매우 저항성이 크다는 것을 보인 바 있으며, 트립신 처리를 두 번 하면, 표면조도가 높을수록 두 번째 트립신 처리에서 더 많은 수의 세포를 금속 표면에서 유리시킬 수 있음을 보였다. Martin등[9]의 실험에서도 titanium plasma spraying 처리를 한 거친 티타늄 표면보다 electropolishing 처리를 한 매끈한 표면에서 더 높은 세포 증식률을 보여주었고, Kieswetter등[13]의 연구에서도 거친 표면에서 적은 세포 증식을 보였으며, Links등[26]의 MG 63 cell을 이용한 실험에서도 거친 티타늄에서 보다 부드러운 티타늄 표면에서 더 많은 세포 수를 보여주었다. 또한 Boyan등[7]의 실험에서도 더 높은 표면조도를 보이는 TPS 표면보다 더 낮은 표면조도를 보이는 SLA 표면에서 골아세포가 더 잘 자라는 것을 보였다. 그러나 거친 표면에서 더 높은 증식률을 보인 연구들도 있었다.

골성 세포분화의 각 단계에서는 각기 다른 골기질 단백질이 발현된다고 보고되어 왔다. 조골세포의 초기분화단계에서 collagen type Ⅰ이 최대로 발현되고 기질 성숙단계에서는 알칼리성인

산분해효소가 최대로 발현된다. 비록 골형성 과정에서 이 효소의 역할이 완전히 규명되지는 않았지만, 일반적으로 조골세포가 성숙함에 따라 이 효소의 활성이 높으므로, 알칼리성인산분해효소는 조골세포의 성숙도를 나타내는 지표로 이용된다. 본 실험에서 알칼리성인산분해효소의 기능으로 평가한 세포 분화 역시 표면조도가 높은 표면에서 더 우수한 결과를 보여주었다. 특히 6일째의 결과는 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 활성을 보여주었다($p<0.05$). 이번 결과는 이전의 여러 연구와도 일치한다.[7,9,13] Lincks등[26]의 연구에서도 거친 티타늄 표면에서 세포 모양, 세포외기질 혹은 osteocalcin의 생산량, 알칼리성인산분해효소의 활성에서 더 분화한 특징을 보여주었다. 각기 다르게 표면 처리를 한 티타늄 표면을 대상으로 한 실험에서 표면이 거칠수록 알칼리성인산분해효소 활성이나 기질 생산이 증가하였다.[9] Schwartz등[23]의 실험에서는 거친 표면의 티타늄을 쥐 경골에 매식했을 때 기질 소포체의 알칼리성인산분해효소의 절대치가 세라믹을 매식했을 때보다 낮았고 석회화도 지연된 연구도 있었는데, Brugge와 Jansen등[31]은 실험에 사용한 세포유형, 표면조도의 정도, 표면조도에 대한 정의 및 측정 방법의 차이, 사용한 기구와 방법의 차이로 표면조도와 관련된 실험결과에 상당한 차이를 야기한다고 하였다.

여러 가지 방법을 이용하여 표면조도에 변화를 주는 이유는 골과 임플란트 사이의 기계적인 상호고정 효과를 증진시키고[18-24] 임플란트 표면에서 골이 형성되는 과정에 표면조도가 크게 영향을 주기 때문이다.[5,6,7] 임플란트는 식립 후 수초 이내에 혈액과 접촉하여 단백질과 세포의 복잡한 생체막(complex bio-film)을 형성하며, 생체막은 세포 부착을 촉진하는 단백질인 integrin과 세포 활성 리간드로 구성된다. 이 중 integrin이 임플란트 표면에 붙은 단백질 및 세포외 기질층에 결합하여 다양한 경로를 통한 신호 전달을 시작하여 연쇄적인 세포반응들이 일어나게 된다. 그런데 표면특성에 따라 결합 단백질인 integrin의 표현양식이 변할 수 있고 부착하는 단백질의 양과 유형, 그리고 부착하는 양상에도 변화가 올 수 있다. 또한 각종 단백질 분자들이 표면에 부착하는 방식은 향후 부착하게 되는 세포의 종류와 부착양식에도 큰 영향을 나타낸다. 또한 알칼리성인산분해효소의 활성도 거친 표면에서 배양된 조골세포나 연골세포에서 훨씬 크게 나타났고[26] apatite crystal의 성장을 조율하는 세포외 기질 단백질인 osteocalcin도 표면조도가 높은 표면에서 훨씬 증가하였다.[9] Khosla[15]과 Lossdorfer[16]은 표면조도가 높은 표면에서만 RANK ligand regulatory system에서 파골세포의 활성을 감소시키는 osteoprotegerin이라는 수용체의 양을 증진시킬 수 있다고 하였다. 이처럼 표면조도는 단백질이 부착되는 과정에서부터 시작하여 골생성이 완성되는 시점까지 골생성 전 과정에 걸쳐서 영향을 나타낸다.

임플란트의 표면조도 변화와 아울러 또 하나의 임플란트 표면 개질의 경향은 화학적 변화를 시도하는 것으로 보다 안정적인 화학적 개질 변화를 위해 1990년대 후반부터는 열처리 기술을 응용한 임플란트와 생체 반응, 간단한 표면 화학처리 및 패시베이션 처리와 생체 골조직 반응, sol-gel법에 의한 임플란트 표면처리, 전기화학적 임플란트 표면처리 등의 방법이 제시되고 있다. 임플란트 표면의 형태 및 화학적 성질을 개선하는데 있어 양극산화법은 간단하고, 조절가능하며 비용대비 효과적인 방법이다. 최적의 생체 골조직 반응은 티타늄 임플란트의 표면 산화막 두께가 600~1500 nm이며, 다공성 구조로 12~24% 공극률을 가지며, 순수한 티타늄 옥사이드(TiO_2)보다는 칼슘 티타네이트(Ti_2CaO_3) 혹은 마그네슘 티타네이트($MgTiO_3$)와 같은 생활성 화합물의 경우에서 더 우수한 것으로 알려져 있다.[32-35]

본 연구에서 블라스팅 및 양극산화하여 얻은 표면조도에서 조골세포양세포의 증식은 억제되었으나 알칼리성인산분해효소의 활성은 증가되었다. 그러나 이번 실험은 조골세포의 초기분화단계에 대한 표면조도의 효과를 확인한 것에 불과하다. 따라서 osteopontin, osteo- calcin, bone sialoprotein 등의 정량을 통해서 후기분화단계에 대한 표면조도의 효과의 관찰이 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

블라스팅 및 양극산화처리를 하여 조도를 증가시킨 티타늄에 대한 세포반응을 평가하기 위해 시험관 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 표면조도를 증가시킨 시편에서 조골세포 증식이 억제되었다.
2. 표면조도를 증가시킨 시편에서 조골세포의 알칼리성인산분해효소의 활성이 증가되었다.

참 고 문 헌

1. Kasemo B, Lausmaa J. Aspect of surface physics on titanium implants. Swed Dent J 1983;28(Suppl.): 19-36.
2. Lausmaa J, Kasemo B. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. Appl Surf Sci 1990;45:133-46.
3. Olefjord I, Hansson S. Surface analysis of four dental implant systems. Int J Oral Maxillofac Impl 1993;8:32-40.
4. Johansson CB. On tissue reactions to metal implants. Thesis, University of Gteborg, Sweden, 1991.
5. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants 1992;7:302-10.
6. Michaels CM, Keller JC, Stanford CM, Solursh M. In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. J Dent Res 1989;68:276.
7. Boyan, BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 oteoblast-like cells to 1α, 25-$(OH)_2D_3$. J Biomed Mater Res 1998;39:77-85.
8. Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. Eur Cell Mater 2003;6:22-27.
9. 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.
10. Cochran DL, Simpson J, Weber H, Buser D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough-titanium. Int J Oral Maxillofac Implants 1994;9:289-97.
11. Batzer R, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to 1 alpha,25-$(OH)_2D_3$. J Biomed Mater Res 1998;41:489-96.
12. Sisk M, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson JP, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Inhibition of cyclooxygenase by indomethacin modulates osteoblast response to titanium surface roughness in a time-dependent manner. Clin Oral Implants Res 2001;12:52-61.
13. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cells. J Biomed Mater Res 1996;32: 55-63.
14. Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1α, 25-$(OH)_2D_3$ is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. Biomaterials 2001;22:731-741.
15. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology 2001;142:5050-5055.
16. Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. J Biomed Mater Res 2004;70:361-369.
17. Brunette DM. Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. Exp Cell Res 1986 ;164:11-26.
18. Thomas K, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation and direct bone appostition. J Biomed Mater Res 1985;19:875-901.
19. D Buser, R K Schenk, S Steinemann, JP Fiorellini,

CH Fox, H Stich. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res 1991;25:889-902.
20. L Carlsson, T Rostlund, B Albrektsson, T Albrektsson. Removal torques for polished and rough titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1988;3:21-24.
21. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of remour in rabbits. Bone 1997;21:507-514.
22. Hansson S, Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. J Biomech 1999;32:829-836.
23. A Rich, AK Harrisl. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. J Cell Sci 1981;50:1-7.
24. HJ Wilke, L Claes, S Steineman. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone, in Clinical Implant Materials: Advances in Biomaterials, Elsevier, Amsterdam 1990;9:309-314.
25. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants. A review of proposed criteria of success. Int J Oral Maxillofac Implants 1986;1 :11-25.
26. Lincks J, Boyan BD, Cochran DL, Liu Y, Blanchard CR, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. J Dent Res 1998;2219-2232.
27. Stefano G, Carlo G, Desiree M, Alessandro R, and Renato S. Different titanium surface treatment infuences human mandibular osteoblast response. J Periodontol 2004;75:273-282.
28. Lohmann CH, Bonewald LF, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1α, 25-dihydroxyvitamin D3. J Bone Miner Res 2000;15:1169-1180.
29. Schwartz Z., Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Bone regulating mechanism on implant surfaces. Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology. Implant Dentistry. 1999;41-54.
30. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. J Biomed Mater Res 2000;49: 155-166.
31. Brugge PJ , Jansen JA. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. Biomaterials 2002;23: 3269-3277.
32. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, R. oser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidised implants and their influence on the bone response. J Mater Sci Mater Med 2001;12:1025-31.
33. Sul YT, Johansson CB, Kang YM, Jeon DG, Albrektsson T. Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemically anion S and P incorporation. Clin Implant Dent Relat Res 2002;4:478-87.
34. Sul YT, Johansson CB, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. Int J Oral Maxillofac Implants 2002;17:625-634.
35. Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. Biomaterials 2003;24: 3893-3907.

Corresponding Author: Dr. Chan-Jin Park
Dept. of Prosthodontics, College of Dentistry, Kangnung National University. Gangneung daehangno 120, Gangneung. Gangwondo

ABSTRACT

Effect of Blasted or Anodized Titanium Surface Roughness on Adhesion and Differentiation of Osteoblasts

Chan-Jin Park*, Lee-Ra Cho*, Yang-Jin Yi*, Sung-Hee Ko**

*Department of Prosthodontics, **Department of Pharmacology
College of Dentistry, Kangnung National University and Oral Science Institute

The success of an implant is determined by its integration into the tissue surrounding the biomaterial. Surface roughness is considered to influence the behavior of adherent cells. The aim of this in vitro study was to determine the effect of surface roughness on Saos-2 osteoblast-like cells. Titanium disks, blasted with 75 ㎛ aluminum oxide particles and anodic oxidized and machined titanium disks were prepared. Saos-2 were plated on the disks at a density of 50,000 cells per well in 48-well dishes. After 1 hour, 1 day, 6 days cell numbers were counted. One day, 6 days after plating, alkaline phosphatase(ALPase) activity was determined. Compared to experimental groups, the number of cells was significantly higher on control group. The stimulatory effect of surface roughness on ALPase was more pronounced on the experimental groups than on control group. These results demonstrate that surface roughness alters proliferation and differentiation of osteoblasts. The results also suggest that implant surface roughness may play a role in determining phenotypic expression of cells.

Key words : surface roughness, blasted, anodic oxidized, osteoblast-like cell