PSII를 이용한 마그네슘 이온 주입 임플란트에 대한 MC3T3-E1 골모양 세포 반응 연구

[1]강릉원주대학교 치과대학 보철학교실 및 구강과학연구소
[2]강릉원주대학교 치과대학 구강해부학교실 및 구강과학연구소
[3]울산대학교 의과대학 강릉아산병원 치과보철학교실

신형주[1] · 김대곤[1] · 박찬진[1] · 조리라[1] · 이희수[2] · 차민상[3]

임플란트와 골 반응을 개선하기 위한 생화학적 표면 처리 방법으로 다양한 이온을 이용한 이온주입법에 대한 관심이 높아지고 있다. 본 연구는 플라즈마 상태의 마그네슘 이온을 임플란트 표면에 주입하여 이온 피막을 형성하는 방법으로 표면 처리를 한 임플란트에 대한 MC3T3-E1 골모양 세포의 초기 반응을 평가해 보고자 하였다. 티타늄 디스크를 네 가지 군으로 표면처리를 달리하였다. A군은 연마만 하였고 B군은 연마 후 마그네슘 이온을 주입하였다. C군은 알루미늄 입자분사 하였고, D군은 알루미늄 입자분사 후 마그네슘 이온을 주입하였다. 조골세포의 반응을 세포 부착, 증식, 분화의 단계별로 평가하였다. 세포 부착을 평가하기 위해 MC3T3-E1 골모양 세포를 4시간, 24시간, 48시간 금속 표면에서 배양하여 주사현미경으로 관찰하였다. 세포분화도평가는 세포를 4일간 배양 후 알칼리성 인산분해효소 활성도 분석을 통해 시행하였다. 세포외기질의 세포내 발현은 RT-PCR을 통해 평가하였다. 이상의 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 주사현미경 관찰시 시간의 흐름에 따라 세포 부착량은 증가하였으며, 마그네슘 이온을 주입한 시편에서 더 많은 양 세포 증식이 관찰되었으며 분화정도도 더 높은 것으로 관찰되었다.
2. RT-PCR 분석시 알루미늄 입자분사 후 마그네슘 이온을 주입한 시편에서 c-fos와 osteonectin의 발현이 증가된 소견을 보였다.
3. 알칼리성 인산분해효소 활성도 분석시 금속 표면처리 방법에 따른 차이는 발생하지 않았다.

이상의 결과를 종합하면 Mg 이온이 주입된 군의 세포가 Mg 이온이 주입되지 않은 군보다 초기의 세포반응이 더 우수하다는 것을 알 수 있다.

주요어: Mg 이온, 이온 주입, 세포 반응, 샌드블라스팅 (대한치과턱관절기능교합학회지 2009:25(4):359~372)

서 론

임플란트와 골 간의 골유착 기전은 세포부착, 증식, 분화 및 골기질 침착과 같은 연속적인 과정을 내포하고 있다.[1] 성공적인 골유착을 이루는 메커니즘으로는 기계적 결합 (biomechanical interlocking)에 의한 골유착과 생화학적 결합 (biochemical bonding)을 들 수 있다. 기계적 결합을 향상시키기 위해 적절한 정도로 표면 조도를 증가시키면 세포 부착, 조골세포의 활동성 및 증식, 표면에 대한 광화골 형성 등의 반응을 촉진시킨다고 알려져 있다.[2,3] 세포 반응 및 생물학적 반응을 향상시키기에 "적절한 조도 (moderately rough)"를 가진 표면을 만들기 위해 산부식, 블라스팅 및 다양한 복합 표면 개질법이 등장하였다.[4,5]

최근에는 임플란트 표면처리를 이용한 생화학적 결합에 대한 연구가 증가하고 있다. 양극산화

법을 이용하여 임플란트 표면에 다양한 이온을 함입시켜 생화학적 골유착을 유발할 수도 있다는 가능성이 제시되었다.[6] 그 외의 생화학적 표면개질법으로는 열처리를 동반한 NaOH 처리법과 불소처리법 및 이온주입법 등을 들 수 있다. 열처리를 동반한 NaOH 처리법을 이용하여 티타늄 표면에 인회석 층을 형성시킬 수 있다는 연구가 발표되었다.[7] Ellingsen 등[8]이 개발한 불소처리법은 불소함입에 의해 우수한 골반응을 나타내는 생화학적 표면처리법이라고 발표되었으나 그 효과가 실제 불소의 효과인지 표면의 나노 크기의 조도변화에 의한 것인지는 명확히 제시되지 않고 있다.

재료의 표면에 이온을 주입함으로써 표면의 화학 상태를 변화시키는 이온주입(ion implantation) 방법은 표면의 조도나 형태를 변화시키지 않으면서 이온 주입에 의한 생화학적 특성만 변화시키는 방법이다. 이온주입이란 전기장을 이용하여 주입하고자 하는 이온들을 높은 운동에너지를 갖도록 가속시켜서 고체 상태인 재료의 표면에 충돌시킴으로써 이온을 주입시키는 표면기술의 하나로서, 열역학적 평형 상태에서 일어나는 과정이 아니므로 열역학적으로 성립되지 않는 새로운 성분의 표면층을 형성할 수도 있는 즉 용도에 따른 표면 개질이 가능하다는 특징을 갖는다.[9,10]

기존의 이온주입법은 대부분 빔을 이용한 이온빔주입 (Beam Line Ion Implantation, BLII) 방법으로서 빔이 도달하지 못하는 면에는 이온이 주입되지 못한다는 한계가 있어 3차원 형상을 갖는 임플란트를 처리하려면, 소재의 표면 형상에 따라서 여러 개의 이온빔을 설치하거나 이온빔을 고정시키고 소재를 여러 각도로 회전시켜야 했다. 그 결과 설비 제작비용이 비싸고 공정제어가 어려울 뿐만 아니라 처리시간이 길어 임상적인 임플란트에는 응용이 되지 못했다.

이와 같은 이온빔 주입 기술의 한계를 극복할 수 있는 기술이 플라즈마 이온주입(plasma source ion implantation, 이하 PSII)이다. PSII는 IBII와는 달리 별도의 이온 발생원과 가속장치를 사용하지 않는 대신에 주입하고자 하는 물질을 기체 또는 금속 플라즈마 상태로 만든 후, 처리하고자 하는 소재에 고전압의 바이어스를 인가함으로써 플라즈마 중의 양이온들이 소재의 표면에 충돌, 주입되도록 하는 것이다. 소재 주위에는 플라즈마 층이 형성되며 이온들은 소재의 모든 표면에 입사, 충돌을 일으키게 된다.

이온주입 표면에 대한 생물학적 반응 결과를 살펴 보면 Johansson 등[11]은 질소 이온주입을 한 표면을 이용하였고 Sawase 등[12]은 산소 이온주입을 이용한 연구를 발표한 바 있다. 또한 Hanawa 등[13]은 칼슘 이온 주입의 결과와 Mändl 등[14]의 산소주입 표면의 결과는 우수한 골유착을 보인다고 하였다. 하지만 이러한 BLII 표면은 기술의 한계로 인해 디스크나 판형태, 봉형태 등에만 적용이 가능하기 때문에 대부분의 연구에서도 디스크를 이용한 결과를 발표한 것이다. 또한 마그네슘 (Mg)과 같은 2가 양이온을 주입하여 우수한 골재형성을 유도한 연구도 있다.[15]

Mg 이온이 임플란트 표면에 함입되었을 때의 생체내 효과에 대해서는 많은 연구가 제시되었다. Mg 이온을 이용하면 세포 표면의 수용체에 인테그린이 결합하는데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 fibronectin, vitronectin, fibrinogen 및 세포와 세포의 부착에 관여하는 수용체 등의 결합에 큰 영향을 미친다고 하였다.[16,17] Sul 등[18]은 Mg 이온이 함입된 양극산화 임플란트를 이용하여 임플란트 표면에서 주변까지의 Mg 이온농도의 차이를 밝힘으로써 Mg 이온의 화학적 이동에 의한 integrin-ligand 결합 유도 때문에 Mg 임플란트는 생화학적 골유착을 유발할 수 있다고 하였다. Zreiquat 등[15]은 Mg 이온이 세포 부착 및 integrin 발현 및 세포내 신호전달에 주요한 역할을 하는 물질이라고 하였다.

연구진의 이전 연구[19]에서 Mg 이온을 주입한 임상 임플란트가 흡수성 분말 분사 (resorbable blasting media, RBM) 임플란트에 비해 우수한 골반응을 보인다는 사실이 입증되었다. 또한 특정

한 마그네슘 이온 농도에서 골반응이 더 우수해지는 것이 밝혀져 마그네슘 이온의 골유도성을 확인할 수 있었다. 표면의 화학적 특성이 골유도성의 초기단계에서 어떤 기전으로 작용하는지 알기 위해서는 표면에 대한 조골세포의 부착, 증식 및 분화와 같은 일련의 반응을 살펴 보아야 한다. 본 연구의 목적은 PSII를 이용하여 티타늄 표면에 Mg 이온을 주입한 경우와 알루미나 분말을 분사하여 표면 조도를 증가시킨 경우에 조골세포가 어떤 반응을 나타내는지 관찰함으로써 표면의 두 가지 특성이 골반응의 초기에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 시편제작

1) 표면처리

순수 티타늄(ASTM grade 1)을 직경 15 mm, 두께 1 mm의 디스크로 제작하였다. 전체 시편 중 반은 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. 또한 나머지 반의 시편은 0.25 Mpa의 압력에서 시편과 blasting gun을 150 mm 떨어뜨려 약 75 ㎛의 Al_2O_3 입자(#240, A&C Chemical Ind. Co. Ltd, Quebec, Canada)로 시편을 4회 회전시키면서 블라스팅하였다.

각 표면처리한 디스크의 반수에 Mg 이온을 PSII법으로 주입하였다. 사용한 음극은 99.99 % 순도의 Mg 봉 (직경 6.25 mm)이며, 양극은 내경 25mm의 동관으로 구성되어 있다. 아크전류 펄스는 직육면체 형태로 진폭 400 A 펄스폭 350 ㎲ 그리고 펄스 반복율은 3 pps 로 조절하였다. 임플란트 주위에 인가된 고전압 펄스로 인하여 플라즈마 층이 형성되며, 플라즈마 중의 양이온들이 플라즈마층 경계에 수직하는 방향으로 임플란트 표면에 입사하게 된다. 표면에 입사된 이온들은 높은 운동에너지로 인해 표면을 뚫고 침투하게 되어 이온주입이 일어나게 되며, 이러한 과정을 반복하여 이온주입층을 표면 직하에 형성하게 된다. 이때 임플란트에 인가하는 전압의 크기를 조절해서 이온의 침투깊이를 제어하였으며, 플라즈마의 밀도 및 주입시간을 조절함으로써 이온주입량을 제어하였다. 디스크에 15 KeV의 에너지로 Mg 이온을 주입하여 잔여 이온량이 $5.0x10^{15}ions/cm^2$이 되게 하였다. 실험군을 다음과 같이 4군으로 나누었다.

A: 연마군 (대조군)
B: 연마후 Mg 이온주입군
C: 샌드블라스팅군
D: 샌드블라스팅후 Mg 이온주입군

2) 표면분석

시편의 표면구조를 관찰하기 위하여 시편을 ion sputting coater (Eiko Engineering Co. IB-3, Japan)를 이용하여 0.1 Torr 진공 상태에서 4분간 금으로 피복시킨 후 주사전자현미경 (SEM, JSM-5800;JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 시편의 표면조도의 변화를 측정하기 위해 Mitutoyo 사 모델 접촉식 표면조도 측정기(SURFTEST 301, Mitutoyo, Selangor Darul Ehsan, Malaysia)을 이용하여 평균 표면조도인 Ra를 구하였다. 표면의 화학성분은 Auger electron spectroscopy (AES; PHI650; Physical Electronics, Chanhassen, Minnesota, USA)으로 분석하였다. AES 분석 시, 40 μm 직경의 일차 전자빔을 3 keV 및 2.6 μA로 사용하였다. 심층분석시 분석하는 표면과 47°가 되도록 Ar 이온빔이 입사되도록 하였다. 원자농도는 제조사에 의해 주어진 상대 민감도에 따라 결정하였다.

2. 세포 반응 실험

1) 세포배양

세포는 쥐의 두개골에서 유래한 MC3T3-E1 골모양세포 을 이용하였다. MC3T3-E1 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.

2) 세포 부착에 대한 주사전자현미경 관찰

배양된 세포에 0.25% trypsin과 4 mM EDTA 혼합용액을 넣고 37°C에서 5분간 처리하여 부착된 세포를 분리한 후, 혈구계수기로 세포수를 세어 12 well 세포배양접시(Coring Co.)내의 대조군과 실험군 시편위에 시편 당 10,000개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 분주 4시간 후, 24시간 후에 시편을 알코올의 농도를 점진적으로 높여가며 (70%, 90%, 100%), 탈수시키고 hexamethyldislazane으로 고정시켰다. 그 후 금으로 피복시킨 후 주사전자현미경 (SEM, VEGA, TESCAN, Seoul, Korea)으로 10 kV의 가속전압하에 세포의 형태와 수를 관찰하였다.

3) 역전사효소 분석(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

시편 당 10,000개의 세포가 들어가도록 분주한 24시간 배양후 MC3T3-E1 세포에서 RNA extraction kit (RNeasy Mini kit, QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA를 Super Script II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 전환하였다. PCR 증폭의 지표로 사용한 cDNA는 type Ⅰ collagen αⅠ(Col ⅠαⅠ), β3 integrin, ostonectin, osteopontin, osteoclacin, c-fos, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 등이었다 (Table I). GAPDH를 표준 대조군으로 하여 결과를 분석하였으며 1.5% agarose gel에서 RNA를 증폭하고 ethidium bromide으로 착색한 후 자외선분석을 시행하였다.

4) 알칼리성인산분해효소의 활성측정

시편 당 100,000개의 세포가 들어가도록 분주한 배양 4일째에 0.25% trypsin과 4 mM EDTA 혼합용액을 넣고 시편으로부터 탈리시키는 과정을 시행하였다. 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 405 nm에서 microplate analyzer (Model EL312e Bio Kinetics Microplate Reader, Bio Tek Instruments, Winooski, USA)로 비색 정량하였다.

Table Ⅰ. PCR primers: sequence (5′ 3′)

Gene	sense primer	antisense primer
Col-ⅠαⅠ	5'-AACCCGAGGTATGCTTGATCT-3'	5'-CCAGTTCTTCATTGCATTGC-3'
β3-integrin	5'-TGTGAGTGCGATGACTTCTCC-3'	5'-TGTAGTACAGTTGCAGTAGTAGCC-3'
osteonectin	5'-TGGTCACCTTGTACGAGAGA-3'	5'-GGTGTTAGCAGCTTATCCAC-3'
osteopontin	5'-ACACTTTCACTCCAATCGTCC-3'	5'-TGCCCTTTGGCTTGTTGTCC-3'
osteocalcin	5'-TCTCTCTGCTCACTCTGCTGG-3'	5'-ACCGTATAGGCGTTTGTAGGCG-3'
c-fos	5'-GCCTCTGCACAGCAATTCCT-3'	5'-CAGCTTCAGGGTAGGTGAAGACA-3'
GAPDH	5'-ATCAGAAGGGTGTGAACCAC-3'	5'-AAGTCGCAGGAGACAACCTG-3'

3. 통계분석

SPSS 14.0 KO를 사용하여 통계 처리하였다. Kruskal Wallis를 이용하여 알칼리성 인산분해 효소 활성도가 각 표면처리에 따라 유의수준 0.05에서 차이가 있는지 확인한 후 Mann Whitney 법을 이용하여 군간의 차이를 검증하였다.

연구성적

1. 표면분석 결과

연마군과 샌드블라스팅군의 표면 및 그 후 Mg 이온주입한 임플란트의 표면변화 여부를 조사하기 위하여 이온주입 후의 표면을 전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 1은 X3,000배로 관찰한 주사전자현미경 사진이다. 연마군에 이온을 주입하면 연마군에 비해 약간의 scratch가 난 것을 알 수 있지만 샌드블라스팅하여 표면조도가 증가한 경우 이온주입을 하게 되면 입사하는 이온에 의한 표면에칭에 의해 샌드블라스팅한 표면의 예각부가 다소 부드러워 진 것을 제외하고는 표면 형상 변화는 관찰 할 수 없었다. 고배율의 관찰에서 이 정도의 변화가 있기 때문에 이온 주입에 의해 거의 변화를 관찰하기 어렵다. 시편의 표면조도 분석 결과 A군과 B군은 Ra가 0.53㎛인 반

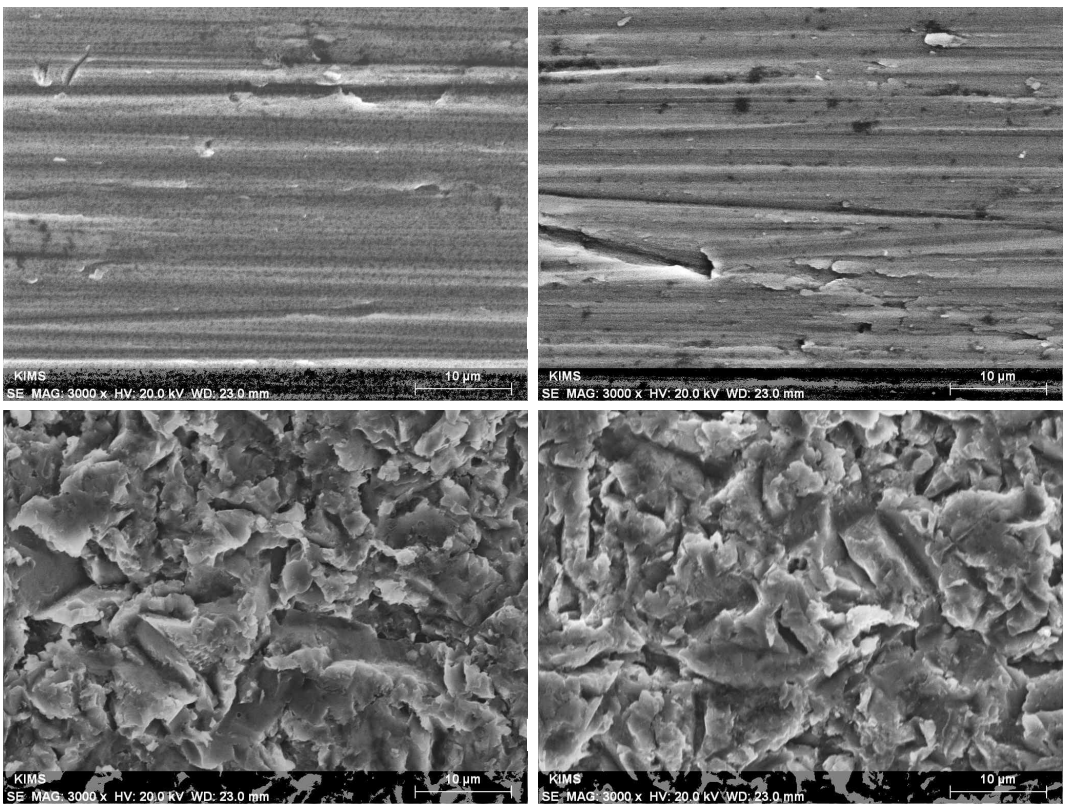


Fig. 1. Surface morphologies in SEM analysis. Upper left : A, ground surface, control.
Upper right : B, Mg-implanted on ground surface. Lower left : C, sandblasted surface.
Lower right : D, Mg-implanted on sandblasted surface.

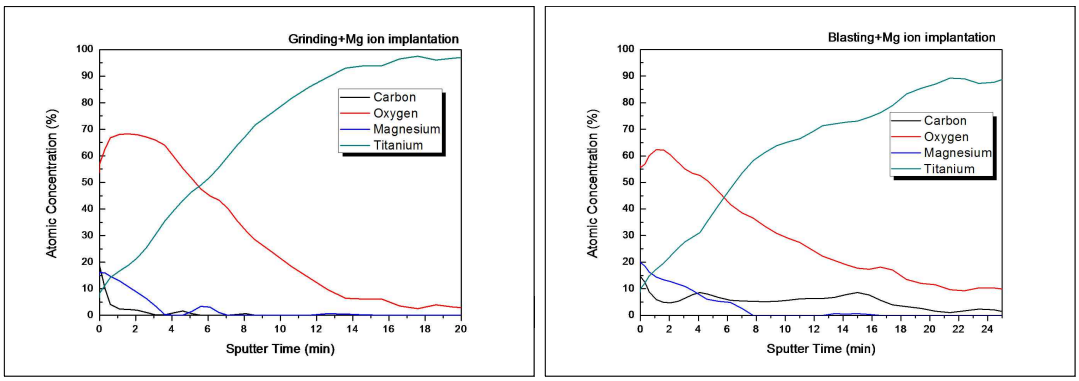


Fig. 2. AES depth profile for B, Mg-implanted on ground surface (upper) and for D, Mg-implanted on sandblasted surface (lower).

면 샌드블라스팅한 C군과 D군은 1.1.㎛여서 C군과 D군은 "적절히 거친" 표면을 가지고 있다고 할 수 있다.

Fig. 2는 Mg 이온주입한 B와 D군의 AES depth profile이다. 이 경우 임플란트 표면에서의 이온주입 깊이는 약 8분, 최표면에서의 Mg 농도는 B군에서는 약 16.1 at%, D군에서는 19.8 at%여서 샌드블라스팅하여 표면적이 증가함에 따라 같은 조건으로 이온주입을 해도 더 많은 양의 이온이 샌드블라스팅한 군에 주입됨을 알 수 있다.

2. 세포반응 결과

세포를 4시간 및 24시간 배양한 상태에서 각각의 표면에 대한 세포의 부착도를 전자현미경으로 관찰하였다 (Fig. 3, 4). 4시간 배양은 세포의 초기부착 정도의 차이를 알기 위한 것으로 대부분의 세포는 둥글고 부분적으로만 퍼진 형태를 보였다. A군의 표면에 부탁한 세포들은 티타늄 표면에 있는 구의 형태와 평행한 배열을 보이는 경우가 많았다. 24시간 배양 후 대부분의 MC3T3-E1 세포는 초기 4시간에 비해 많이 증식되어 있으며 4군 모두에서 표면의 대부분을 덮고 있는 양상을 보이고 있다. 또한 24시간 배양 후 세포의 형태는 4시간 배양후에 비해서 더 평평해져 있으며 표면을 따라 잘 퍼지는 형태를 나타내었다. 각군에서의 세포 형태를 비교해 보면 Mg 이온이 주입된 B군과 D군에서 A군과 C군에 비해 더 많이 증식되는 양상을 나타내었다. B군과 D군 간의 세포 증식양상은 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 A군과 B군의 연마군에 비해 샌드블라스팅한 C군과 D군에서는 세포가 표면의 굴곡진 형태를 따라 접촉하기 때문에 세포의 크기가 더 작은 것처럼 보였다.

역전사효소 분석결과를 Fig. 5에 제시하였다. GAPDH의 발현 정도가 네 군에서 비슷하기 때문에 결과의 신뢰도가 증명되었다. D군에서 osteonectin과 c-fos mRNA가 다른 군에 비해 더 많이 발현되었지만 다른 요소들인 osteocalcin, collagen IαI, β3 Intergrin mRNA의 발현은 모든 군에서 비슷하게 나타났으며 osteopontin mRNA는 관찰할 수 없었다.

세포의 분화 정도를 알아보기 위하여 알칼리성인산분해효소의 활성도를 관찰한 결과가 Table II에 있다. 4군 모두에서 비슷한 정도의 활성도를 나타내며 통계적으로 유의한 차이는 발견할 수 없었다.

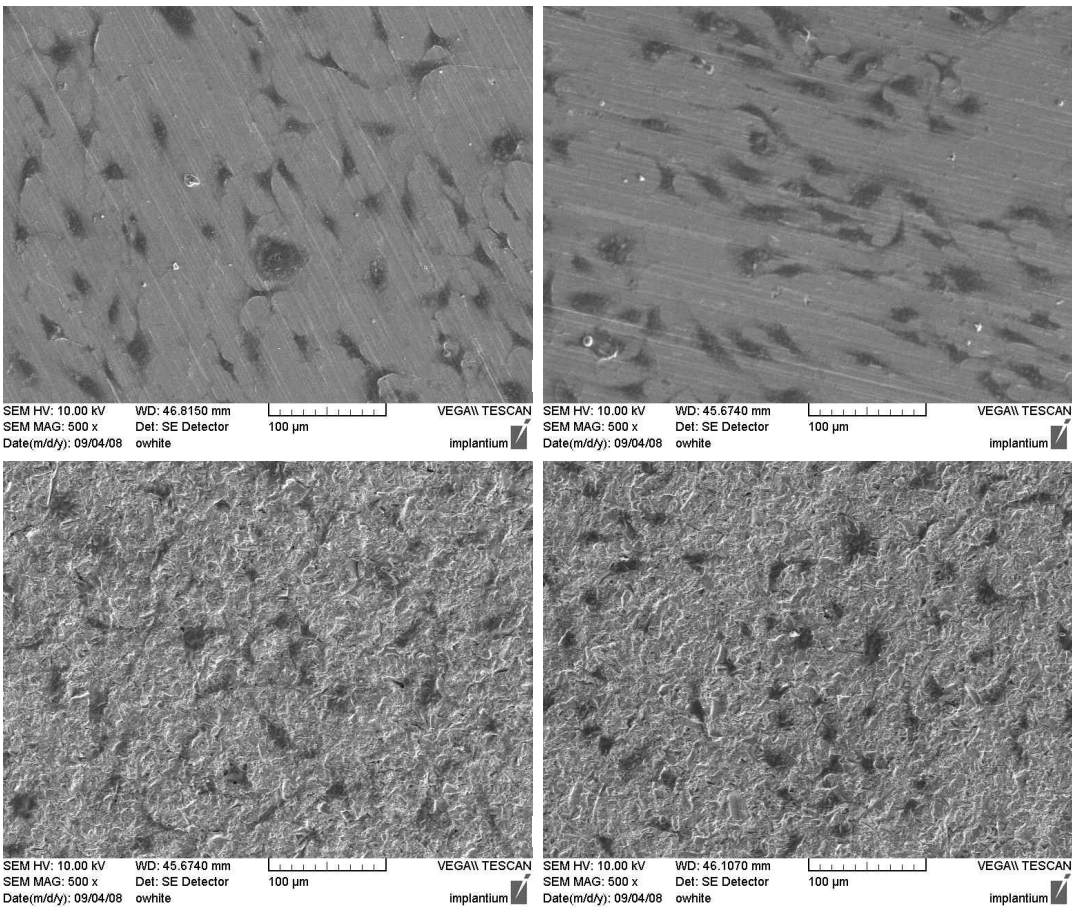


Fig. 3. SEM images of MC3T3-E1 cells on each surfaces at 4h (magnification, X 500).
Upper left : A, ground surface, control. Upper right : B, Mg-implanted on ground surface. Lower left : C, sandblasted surface. Lower right : D, Mg-implanted on sandblasted surface.

Table II. ALP assay (Mean(SD)), The optical density measured after culture for 24h. (n=8 per group)

	Group	24h
A	ground surface, control	0.0606(0.0114) ^{A}
B	Mg-implanted on ground surface	0.0609(0.0055) ^{A}
C	sandblasted surface	0.0604(0.0090) ^{A}
D	Mg-implanted on sandblasted surface	0.0545(0.0049) ^{A}

The same superscript letters indicate the values that are not significantly different (P> .05)

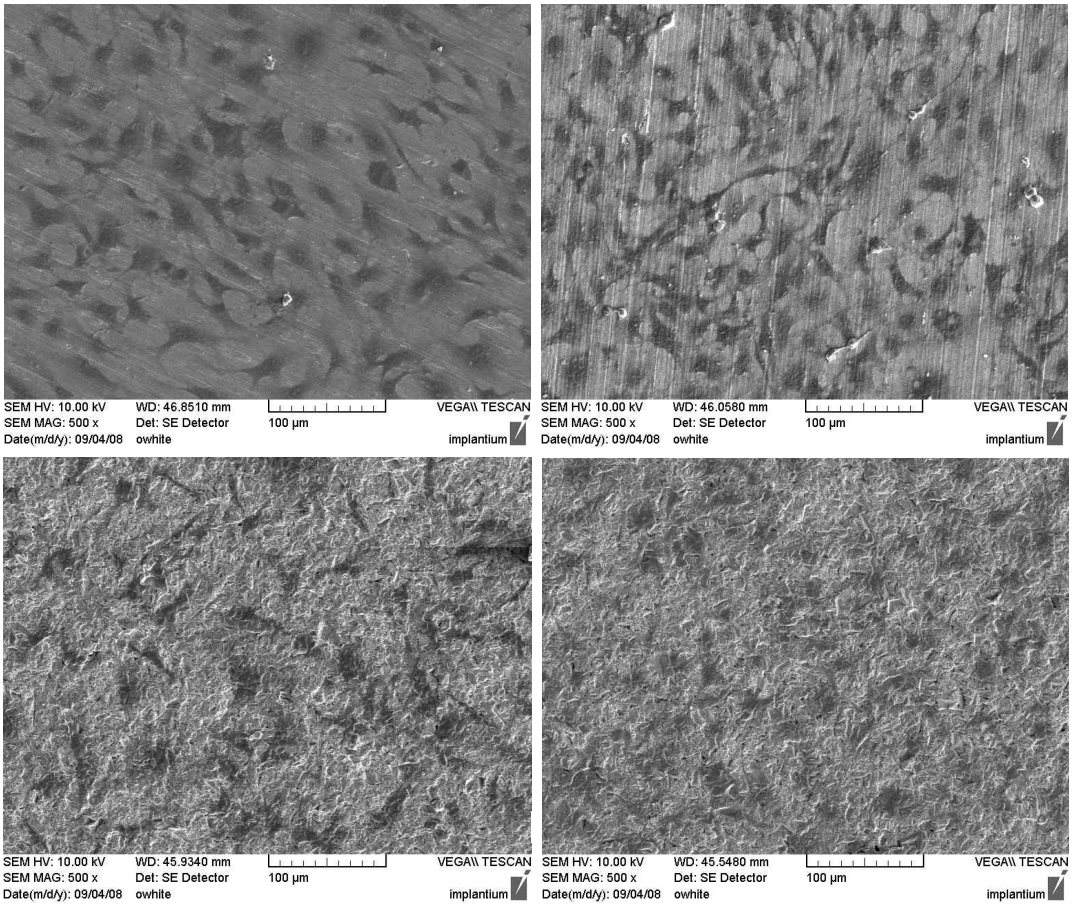
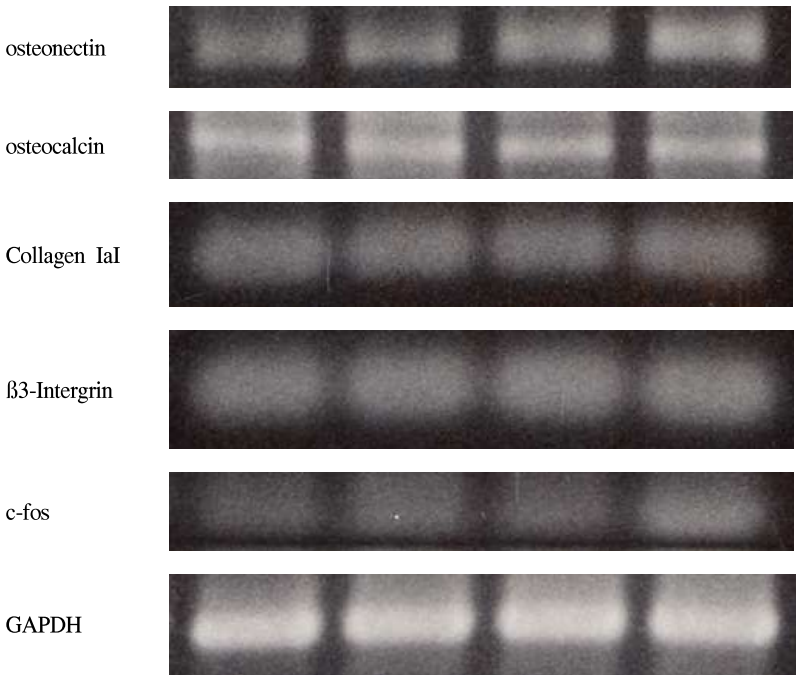


Fig. 4. SEM images of MC3T3-E1 cells on each surfaces at 24h (magnification, X 500).
Upper left : A, ground surface, control. Upper right : B, Mg-implanted on ground surface. Lower left : C, sandblasted surface. Lower right : D, Mg-implanted on sandblasted surface.

고 찰

세포 부착, 증식 및 분화는 표면의 특성에 따라 민감하게 영향을 받는다고 알려져 있다.[20] 본 연구에서는 네 개의 다른 표면 즉, 디스크에 실제 임플란트 삭제시의 기계절삭 형태를 재현하기 위한 연마군, 샌드블라스팅군과 각 군에 Mg 이온을 주입한 두 군에 대한 초기 세포반응을 비교함으로써 표면조도와 표면의 화학적 성질이 세포반응에 어떤 영향을 끼치며 그 중 세포반응에 더 결정적인 인자가 무엇인지를 규명하고자 하였다.

골유착을 이루는 기전으로는 기계적 결합에 의한 골유착과 생화학적 결합을 들 수 있는데 강력한 생화학적 결합을 유도하는 것으로 알려진 Mg 함입 양극산화 임플란트의 경우 양극산화 과정에 의해 용액 속의 이온이 티타늄 표면에 함입되는 효과를 얻을 수 있지만,[18] 티타늄 산화막의



두께 증가 및 기공형성 및 표면조도 향상과 같은 표면형태의 변화를 동반하기 때문에 이러한 향상된 골유착의 결과가 표면형태에 의한 기계적 결합의 효과인지 아니면 함입된 이온에 의한 생화학적 결합의 효과인지 규명하기 어렵다. 반면 이온주입법을 이용하면 표면의 형태나 조도의 변화 없이 표면의 화학적 성질만을 변화시킬 수 있기 때문에 향상된 골유착이 기계적 결합에 의한 것인지 생화학적 결합에 의한 것인지를 판단할 수 있는 주요한 방법이 된다.

본 연구에서도 주사전자현미경 관찰 결과 3,000배의 고배율에서도 이온주입 전과 후의 표면 형태는 거의 비슷하다고 판단되며 일반적으로 사용하는 500배 정도의 배율에서는 A군과 B군 사이 및 C군과 D군 사이의 형태 차이를 감지할 수 없었다. 다만 3,000배의 고배율에서 관찰하면 이온주입과정이 전기장을 이용하여 주입하고자 하는 이온들을 높은 운동에너지를 갖도록 가속시켜서 고체 상태인 재료의 표면에 충돌시킴으로써 이온을 주입시키는 과정이기 때문에 A군의 표면에서의 이온 충돌로 인한 미세한 긁힘 현상이 B군에서 관찰되었다. 하지만 A군에 비해 더 복잡한 형태를 가지는 C군에서는 D군과의 형태 차이를 거의 식별하기 어려웠다. 이렇게 이온주입에 의해 표면의 형태나 조도가 달라지지 않았다는 것은 Ra 값에서도 알 수 있는데 A군과 B군 모두 Ra 값이 0.53㎛인데 반해 C군과 D군은 모두 1.1.㎛여서 표면조도나 형태에 있어서는 크게 두 가지 군으로만 나누어지므로 A군과 B군의 결과 차이나 C군과 D군의 세포 반응 차이는 이온주입이라는 표면의 화학적 성질 변화에 의해서만 기인함을 추측할 수 있다. Mg 이온주입의 조건을 동일하게 한 후 B군과 D군에서의 AES profile을 통해 추정한 이온 농도가 B군에 비해 D군에서 더 높다는 것은 샌드블라스팅 처리에 의해 표면적이 증가하므로 표면의 외부에서 주입되는 이온양이 더 증가한다는 것을 알 수 있다. 이렇게 전처치에 따라 이온이 주입되는 양이 달

라지면 추후 생체내에서 지속적으로 방출되는 이온의 양도 달라지기 때문에 최종적인 이온 주입양은 표면의 전처리에 따라 다른 조건을 설정해야 할 것으로 사료된다.

각각의 표면에 세포를 배양하여 세포의 부착과 증식을 관찰하기 위해 주사전자현미경 관찰을 이용하였다. 관찰 결과 4시간에 비해 24시간이 경과하면 세포의 증식이 확연하여 전체 표면을 덮는 양상을 4군 모두 관찰할 수 있었다. 이는 기계절삭형 표면을 재현하기 위한 연마군을 포함한 4군 모두 우수한 생체 적합성을 가진다는 것을 나타낸다. 하지만 초기의 부착정도도 A군에 비해 B군이 높으며 C군에 비해 D군이 높아 표면의 화학적 성질을 개질하기 위한 2가 Mg 이온 주입이 세포의 부착 및 증식에 긍정적인 영향을 줌을 알 수 있었다.

초기 4시간 세포 배양 후 연마군인 A군과 B군에서는 연마과정에 의해서 생긴 구를 따라 MC3T3-E1 세포가 배열되어 contact guidance 현상을 나타내었다. Walboomers와 Jansen[21]의 연구에 의하면 마이크론 단위의 구나 융기형태를 가진 표면은 조섬유세포의 행동에 영향을 주는데 세포의 위족 (filopodium)이 구나 융기를 따라 배열되고 이러한 형태를 따라 이동하는 현상이 contact guidance 현상이라고 하였다. 본 연구에서는 조골세포가 구를 따라 배열하고 이동하는 현상을 보여 표면의 형상이 조골세포의 반응에도 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

연구의 방법으로 반정량 RT-PCR 법을 사용하였는데 면역화학염색방법에 비해서 정량화 하기가 쉬우며 항체의 종류에 따른 차이가 없는 장점이 있다. 반면 RT-PCR 법에 의한 mRNA의 발현에 대한 검사는 실제적인 mRNA와 세포단백질의 발현에 차이가 있을 수 있다는 것이다. 즉 많은 mRNA가 나올수록 단백질이 많이 만들어지는 것이 이론적이나, 실제로는 다를 수가 있다는 것이다. 또한 면역화학검사법은 각각의 인테그린이 조직 중에서 어느 세포에서 발현이 되는지 알 수 있으나 RT-PCR 법은 조직의 어느 세포에서 발현이 되든 검출이 될 수 있으나 어느 세포에서 발현이 증가하는지는 알 수가 없다. In situ hybridization 방법은 이 두 가지를 만족시킬 수 있으나 비용이 고가라는 단점이 있다. 연구자는 검사의 수월성과 정량화가 쉬운 점을 고려하여 RT-PCR 법을 이용하였다.

RT-PCR 분석에 사용한 지표들 중 Integrin-β3는 세포의 부착정도를 알아보기 위해, c-fos는 세포의 증식을 평가하기 위해, osteocalcin, osteopotin, osteonectin, type I collagen은 세포분화를 평가하기 위해 분석하였다. Integrin은 세포외 기질 단백질의 부착을 매개하는 막관통 당단백질인데, integrin superfamily는 18개의 단백질과 8개의 단백질로 구성되어 약 20개의 다양한 이형복합체(heterodimer)가 알려져 있다. 처음에는 세포를 세포외 기질에 고정시키는 역할을 하는 세포 표면의 수용체 군으로 알려졌으나, 점차 세포의 이동, 증식, 분화와 매개되는 신호전달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. Sinha and Tuan[22]은 조골세포의 세포막에서 β3 integrin의 발현을 발표하였기 때문에 이 연구에서는 지표를 조사하였다. 하지만 디스크의 표면처리에 따라 발현 정도는 크게 다르지 않았다.

c-fos 유전자는 쥐의 육종 바이러스에서 발견된 형질전환 유전자인 v-fos의 세포 동종 유전자이며 세포외 신호에 즉각적으로 반응하여 발현이 증가되는 유전자군이다. 실제로 c-fos 유전자는 세포 증식과 분화를 조절할 수 있는 양성 및 음성 자극의 목표가 된다.[23] 본 연구에서 c-fos는 A군보다 B군에서 높았으며, C군보다 D군에서 더 높았을 뿐 아니라 D군에서 가장 높은 결과를 보였다. 하지만 A군과 C군에서는 큰 차이를 발견할 수 없었다. 전체적인 발현은 D군에서 가장 높았다. 즉, 표면의 조도도 c-fos 발현에 영향을 미치기는 하지만 표면의 화학적 성분이 더 큰 영향을 미치며 표면의 조도와 화학적 성분은 시너지 역할을 하는 것으로 생각된다.

분화과정 동안 조골세포는 osteocalcin, osteopontin과 osteonectin 및 type I collagen,

alkaline phosphatase, matrix metalloproteinases와 같은 분화지표 단백질을 합성한다.[24,25] 조골세포가 생산하는 콜라젠이 아닌 단백질 중 osteocalcin은 가장 많이 합성되는 단백질로서 성숙한 조골세포의 발현을 반영하는 지표가 된다. Osteopontin은 초기 골양조직에 있는 당단백으로서 광화되기 전의 유기물 기질의 바탕이 된다. Osteonectin은 칼슘, 수산화 인회석 및 콜라젠과 결합하는 당단백으로서 수산화인회석이 침전되는 핵역할을 한다. 본 연구에서는 다른 지표에서는 뚜렷한 차이가 나지 않았으나 osteonectin은 A, B군보다 C, D 군에서 더 높게 발현되어 표면조도가 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이상과 같이 높은 osteonectin과 c-fos의 발현으로 보아 Mg 이온 주입에 의해 표면이 더욱 세포의 증식에 적절한 조건이 되는 것으로 사료된다. 하지만 다른 지표들의 발현으로 보아 시간이나 조건을 달리한 역전사효소분석이 필요할 것으로 생각된다.

세포의 분화정도를 설명하기 위해 ALP를 측정하였다. ALP 발현이 증가하면 조골세포와 골형성이 증가할 수 있는 바탕이 된다.[23] 하지만 본 연구에서는 ALP 발현이 표면의 성질에 따라 다르지 않은 결과를 나타내었는데 이는 표면조도가 높은 표면에서 표면조도가 높은 표면에서 ALP 발현이 증가한다는 Boyan 등[26]의 연구와는 다른 결과이다. 하지만, Castellani 등[27]은 쥐의 골수세포를 이용하여 표면조도에 따라 세포분화가 어떤 영향을 받는지 조사하였으나 차이를 발견할 수 없다고 하였다. Brugge와 Jansen[28]은 표면조도가 세포 부착이나 분화의 차이에 영향을 미치는 정도가 매우 다양한 이유는 사용한 세포의 종류, 적용한 표면의 종류, 측정 기구 및 기법과 같은 실험조건의 차이 때문이라고 하였다. 그러므로 다양한 이견을 해소하기 위해서 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표면조도가 증가하면 세포나 골과의 접촉 면적이 증가할 뿐 아니라 세포부착 및 증식이 증가하고 주변골에서의 응력분산이 양호해지며 골과의 생역학적 반응도 유리한 여러 가지 장점이 있다.[29] 특히 주변골이 마이크론 단위의 표면형태 속으로 자라들어가면서 기계적 결합이 이루어지기 때문에 주변골의 형성 및 재형성에 상당한 시간이 필요하다. 하지만 표면의 화학적 성질에 의한 골유도성은 식립 즉시 개시되므로 식립 직후나 식립 즉시 그 장점을 얻을 수 있다. 이전의 연구[19]에서도 Mg 이온주입에 의해 골반응이 향상되어 강력한 골유착을 얻을 수 있었는데 그 결과는 6주 후의 골형성 기간에 본 것이므로 골유착의 초기에 어떤 반응이 시작되는지 규명하기 어려웠다. 본 연구에서는 Mg 이온을 주입한 표면에 대한 세포반응을 관찰하였기 때문에 이와 같은 초기의 골유착 기전에 대한 설명이 가능하리라 생각하고 본 실험을 진행하였다. 주입된 Mg 이온은 세포 표면에 integrin이 부착되는 것을 도우며 fibronectin, vitronectin, fibrinogen과 같은 ligand 단백질 및 세포 간의 부착에도 도움을 준다는 것이 여러 연구로부터 입증되어 있다.[15,16] 또한 티타늄 산화막 내에 주입된 Mg 이온은 주변의 미성숙 골로 유출되며 주변골에 있던 P, Ca 이온이 티타늄 산화막으로 이동된다고 한다.[16] 이러한 선학들의 연구를 바탕으로 하여 본 연구의 결과를 설명할 수 있는데 Mg 이온에 의해 integrin, osteonectin 등의 ligand 단백질의 도움을 받아 초기에 세포부착의 향상이 있으며 서서히 주변으로 Mg 이온이 유출되면서 수산화인회석의 기질을 형성하는데 도움을 주는 것으로 사료된다. 또한 표면조도의 변화도 세포부착 및 증식에 영향을 주지만 표면의 화학적 성질이 보다 크게 세포반응에 영향을 주는 것이라 할 수 있다. 이상과 같은 연구의 결과를 뒷받침하기 위한 임상연구 및 Mg 이온의 체내유출에 따른 장기간의 평가도 필요할 것이라 사료된다.

결 론

티타늄 표면을 연마 및 샌드블라스팅한 후 PSII를 이용하여 Mg-이온을 주입한 표면에 대한

세포의 초기반응을 평가하기 위해 주사전자현미경 관찰, 역전사효소 분석 및 알칼리성 인산분해효소의 활성도를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 주사전자현미경 관찰 결과 Mg 이온이 주입된 군에서 세포의 부착 및 증식이 더욱 활발하게 이루어졌으며 연마군에서는 세포가 연마과정에서 형성된 구를 따라 배열하는 양상을 나타내었다.
2. 역전사효소 분석 결과 osteonectin과 c-fos mRNA가 Mg 이온이 주입된 군에서 더 많이 발현되었다.
3. 알칼리성인산분해효소의 활성도는 표면처리에 따라 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

4가지 표면처리 군 모두에서 우수한 생체적합성을 나타내었으나 Mg 이온을 주입한 군에서 세포의 부착 및 증식이 우수하게 나타남에 따라 Mg 이온의 생체내 활성도를 증명할 수 있었다.

연구비 지원 및 사의

이 논문은 2008학년도 강릉대학교 치과병원 협동임상연구비 지원으로 이루어졌음

참 고 문 헌

1. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO_2 blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. Clin Oral Implants Res 2001;12:515-525.
2. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials 1996;17:137-146.
3. Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. Adv Dent Res 1999;13:38-48.
4. Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK, Lazzara RJ. Osseointegration of Osseotite and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. Clin Oral Implants Res 2004;15:54-61.
5. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO2 blasted and turned titanium microimplants in humans. Clin Oral Implants Res 2001;12:128-134.
6. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. Clin Oral Implants Res 2002;13:252–259.
7. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. J Biomed Mater Res 1996;32:409-417.
8. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to- implant contact with fluoride-modified titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2004;19:659–666.
9. Byon E, Moon S, Cho S, Jeong C, Jeong Y, Sul YT. Electrochemical property and apatite formation of metal ion implanted titanium for medical implants Surf. Coat. Technol 2005; 200: 1018-1021.
10. Maitz MF, Poon RW, Liu XY, Pham MT, Chu PK. Bioactivity of titanium following sodium plasma immersion ion implantation and deposition. Biomaterials 2005; 26:5465-5473.
11. Johansson C, Lausmaa J, Röstlund T, Thomsen P. Commercially pure titamium and Ti6Al4V implants with and without nigrogen ion- implantation: surface characterization and quantitative studies in rabbit cortical bone. J Mater Sci-Mater Med 1993;4:132-141.
12. Sawase T, Wennerberg A, Baba K, Tsuboi Y,

Sennerby L, Johansson CB, Albrektsson T.Application of oxygen ion implantation to titanium surfaces: effects on surface characteristics, corrosion resistance, and bone response.Clin Implant Dent Relat Res 2001;3:221-229.

13. Hanawa T, Kamiura Y, Yamamoto S, Kohgo T, Amemiya A, Ukai H, Murakami K, Asaoka K. Early bone formation around calcium-ion- implanted titanium inserted into rat tibia. J Biomed Mater Res 1997;36:131-136.
14. Mändl S, Krause D, Thorwarth G, Sader R, Zeihofer F, Horch HH, Rauschenbach B. Plasma immersion ion implantation treatment of medical implants. Surf Coat Tech 2001; 142:1046-1050.
15. Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. J Biomed Mater Res 2002;62:175-184.
16. Mould AP, Akiyama SK, Humphries MJ. Regulation of integrin alpha 5 beta 1-fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+},Mg^{2+},and Ca^{2+}. J Biol Chem 1996;270:26270-26277.
17. Krause A, Cowles EA, Gronowicz G. Integrin-mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials. J Biomed Mater Res 2000;52: 738-747.
18. Sul YT, Johansson P, Chang BS, Jeong BY. Bone tissue responses to Mg-incorporated oxidized implants and machine-turned implants in the rabbit femur. J of appl Biomaterials and Biomechanics 2005;3:18-28.
19. Cho LR, Kim DG, Kim JH, Byon ES, Jeong YS, Park CJ. Bone response of Mg ion implanted clinical implants with plasma source ion implantation method. Clin Oral Impl Res In press 2009.
20. Linez Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, Hildebrand HF. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. Biomol Eng 2002;19:133-141.
21. Walboomers XF, Jansen JA. Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. Odontology 2001;89:2-11.
22. Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. Bone 1996;18:451-457.
23. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. San Diego: Academic press; 1996.
24. Suzuki H, Nezaki Y, Kuno E, Sugiyama I, Mizutani A, Tsukagoshi N. Functional roles of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP 3) during ascorbate induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biosci Biotechnol Biochem 2003;67:1737-1743.
25. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. Crit Rev Oral Biol Med 1999;10:40-57.
26. Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast like cells to 1 alpha,25 (OH)2D3. J Biomed Mater Res 1998;39:77-85.
27. Castellani R, de Ruijter A, Renggli H, Jansen J. Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. Clin Oral Implants Res 1999;10:369-78.
28. ter 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.
29. 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;17:536-543.

Cell study on the Magnesium ion implanted surface with PSII

[1]Hyeong-Joo Shin, [1]Dae-Gon Kim, [1]Chan-Jin Park, [1]Lee-Ra Cho, [2]Hee-Su Lee, [3]Min-Sang Cha*

[1]Department of Prsothodontics, [2]Department of oral Anatomy, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, [3]Department of Prosthetic Dentistry, Gangneung Asan Hospital, College of Medicine, University of Ulsan

For successful osteogenesis around the implants, interaction between implant surface and surrounding tissue is important. Biomechanical bonding and biochemical bonding are considered to influence the response of adherent cells. But the focus has shifted surface chemistry. The purpose of this study is to evaluate the MC3T3-E1 osteoblast like cell responses of magnesium (Mg) ion implanted titanium surface produced using a plasma source ion implantation method.

Commercially pure titanium disc was used as substrates. The discs were prepared to produce four different surface, A: Machine turned surface, B: Mg implanted surface, C: sandblasted surface, D: sandblasted and Mg implanted surface. MC3T3 El osteoblastic like cells were cultured on the disc specimens. Cell adhesion, proliferation, differentiation, and synthesis of extracellular matrix were evaluated. The cell adhesion morphology was evaluated by SEM. RT PCR assay was used for assessment of cell adhesion, proliferation and differentiation. ALP activity was measured for cell differentiation.

The results of this study were as follows:

1. SEM showed that cell on Mg ion groups was more proliferative than that of non Mg ion groups. On the machine turned surface, cell showed some degree of contact guidance in aligning with the machining grooves.
2. In RT PCR analysis, osteonectin and c-fos mRNA were more expressed on sandblasted and Mg ion implanted group.
3. ALP activity was not significantly different among all groups.

Within the limitations of this study, the following conclusions were drawn: It might indicate Mg ion implanted titanium surface induce better bone response than non Mg ion groups.

Key word: Mg ion, Ion implantation, Plasma Source Ion Implantation, Cell response

Correspondence to : Prof. Lee-Ra Cho
Department of Prosthodontics, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, 1, GangneungDaehangno, Gangneung, Gangwon-Do, 210-702, Korea.
Fax: + 82-33-640-3103. e-mail: lila@gwnu.ac.kr
Received : September 25, 2009, Last Revision : November 15, 2009, Accepted : December 25, 2009