

치과 임플란트용 티타늄의 나노구조
표면에 대한 MG-63 조골세포의
생물학적 반응

(Biological Response of MG-63 Osteoblast on
Nanostructured Surface of Titanium for Dental
Implant)

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 서 영

치과 임플란트용 티타늄의 나노구조
표면에 대한 MG-63 조골세포의
생물학적 반응

지도 김 경 남 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 서 영

이서영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

치의학 전공

2007년 12월 일

감사의 글

부족하나마 한 편의 논문을 완성하였습니다. 본 논문이 완성되기까지 지도와 격려를 아끼지 않으신 김경남 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 부족한 저에게 많은 가르침을 주시고 격려를 해 주신 김광만 교수님, 이용근 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 처음 접해본 실험을 끝까지 해 낼 수 있도록 조언과 배려를 베풀어 주신 김진 교수님께 감사를 드립니다.

바쁜 중에도 시편 제작과 실험을 도와주느라 고생한 문승균 선생님께 감사드립니다. 또한 여러 가지 질문에 귀찮아 않은 탁창우 선생님,께 감사드리며 항상 반갑게 맞아주시고 세포 나누어주시고 실험실을 차지하고 불편을 주어도 인내해 주신 치과생체재료공학 교실의 모든 선생님들께 감사드립니다. 밤늦게까지 실험을 할 수 있도록 배려해주시고 사소한 질문에 항상 성의 있게 답해 주신 구강병리 교실의 권정아 선생님, 김진민 선생님, 류주경 선생님, 차충민 선생님, 홍준철 선생님께도 감사드립니다.

항상 제게 힘이 되어 주고 따뜻한 격려를 해주신 부모님과 가족들에게도 감사를 드리며 바쁘고 힘든 중에도 언제나 웃음을 잃지 않고 또 웃음을 전해주는 막내 동생에게도 고마움을 전합니다.

2007년 12월

이서영 드림

차 례

그림차례	iii
표 차례	V
국문요약	Vi
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	4
1. 연구재료	4
가. 티타늄	4
나. 조골세포	4
2. 실험방법	4
가. 시편제작	4
(1) 연마표면	4
(2) micro arc oxidation	5
(3) 저전압 양극산화	5
나. MG-63 조골세포의 부착 관찰	6
다. 역전사 중합효소 연쇄반응	6
라. 표면분석	7
III. 결과	9
1. 시편 표면 관찰	9
2. 조골세포의 부착	9
3. 조골세포의 분화	14
4. 조골세포 배양 후의 표면 분석	18

IV. 고찰	19
V. 결론	24
참고문헌	26
영문요약	31

그림 차례

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of (a) polished surface (X5,000), (b) micro roughness surface (X5,000), (c) nanotube surface (X5,000), and (d) nanotube surface (X50,000)	10
Fig. 2. Scanning electron microscopy images on polished surface(a,d), micro roughness surface(b,e), nanotube surface(c,d) after 1 h(a, b, c; X 200, d, e and f; X 2,000)	11
Fig. 3. SEM images MG-63 osteoblasts on polished surface(a,d,g), micro roughness surface(b,e,h), nanotube surface(c,f,i) after 3 hrs (a, b and c; X 200, d, e and f; X 1,000, g, h, and i; X 2,000)	12
Fig. 4. SEM images showing filopodia and lamellipodia of osteoblast on nanotube surface after 1 h	13
Fig. 5. RT-PCR analysis of the bone associated genes expressed by MG-63 osteoblasts on polished, micro roughness surface and nanotube surface after cultured for 1 day	15
Fig. 6. RT-PCR analysis of the bone associated genes expressed by MG-63 osteoblasts on polished surface, micro roughness surface and nanotube surface after cultured for 9 days	16
Fig. 7. RT-PCR analysis of the bone associated genes expressed by MG-63 osteoblasts on polished surface, micro roughness surface and nanotube surface after cultured for 11 days	17
Fig. 8. EDS spectra of nanotube surface before cell culture	18
Fig. 9. EDS spectra of nanotube surface after cell culture	18
Fig. 10. Schematic representaion of protein-mediated cell adhesion on biomaterial(Anselme, 2000; Huinan, 2006)	22

Fig. 11. SEM images of the attachment process of osteoblast on titanium

surface 23

표 차례

Table 1. Experimental groups according to surface treatment	6
Table 2. Oligonucleotide primers for PCR amplification	8

국문 요약

치과 임플란트용 티타늄의 나노구조 표면에 대한 MG-63 조골세포의 생물학적 반응

골 유착에 기초한 임플란트가 1969년 스웨덴에서 최초로 시술된 이래 우수한 임상결과를 보이고 있다. 하지만 티타늄에는 생체활성이 없기 때문에 골형성을 적극적으로 유도하지 못하여 치유기간이 길고, 골질이 불량한 부위에서는 성공률이 감소하는 단점이 있다. 이러한 결점을 해결하기 위하여 임플란트의 표면적을 늘리고 표면형상을 변화시키거나 물리적, 화학적 표면처리를 통하여 골결합력을 향상시키고자 하는 연구가 꾸준히 이루어지고 있다.

이에 본 연구에서는 상용 순수 티타늄을 0.5 wt% 불산용액에서 20 V 저전압으로 60분간 양극산화하여 표면에 나노튜브구조를 형성하여 MG-63 조골세포의 초기 부착 양상을 관찰하고 조골세포로의 분화를 나타내는 지표인 alkaline phosphatase, osteocalcin, Type I collagen의 유전자 발현을 역전사 중합효소 연쇄 반응으로 조사하였다. 또한 세포 배양 후 표면의 성분을 분석하여 칼슘 침착을 관찰하여 연마 표면 및 마이크로 거칠리기 표면과 비교하였다.

1. MG-63 조골세포의 초기 부착을 1시간과 3시간 후에 각각 주사전자현미경으로 관찰한 결과 나노구조를 갖는 표면에서 MG-63 조골세포의 부착이 연마 표면과 마이크로 거칠기를 갖는 표면보다 현저히 빠르고 넓게 이루어졌고 밀착된 양상을 보였다.

2. 조골세포로의 분화를 나타내는 지표(alkaline phosphatase, osteocalcin, Type I Collagen과 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)의 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응으로 평가한 결과 세포 배양 1일 째에 alkaline phosphatase와 Type I Collagen이 세 개 군에서 모두 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 가장 많이 발현되었다.

3. 세포 배양 9일 쯤에 osteocalin은 마이크로 거칠기를 갖는 표면 군과 나노구조 표면 군에서 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 더 뚜렷하게 발현되었다. Type I Collagen은 3 개 군에서 모두 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 가장 많이 발현되었다.

4. 세포 배양 11일 쯤에는 alkaline phosphatase는 희미하게 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 더 뚜렷하게 발현됨을 볼 수 있었다. osteocalin은 나노구조 표면 군에서만 발현되었다. Type I Collagen은 3 개 군에서 모두 발현되었으며 모든 군에서 비슷한 정도를 보였다.

5. MG-63 조골세포를 11일간 배양하고 lysis한 후 표면을 Energy Dispersive Spectroscopy로 분석한 결과 나노구조 표면 군에서만 조골세포 배양전과 달리 칼슘과 인의 침착을 보였다. 즉 조골세포에 의한 무기질의 침착이 나노구조 표면에서 이루어졌다.

이상의 결과 나노 단위의 거칠기를 갖는 티타늄 표면에 세포의 초기 부착이 더 빠르게 진행되며 이어지는 세포 분화도 연마 표면이나 마이크로 거칠기의 표면에서 보다 더 활발히 이루어진다고 보여졌다. 또한 조골세포 활동의 결과인 칼슘 침착도 더 잘 이루어진 결과로 보아 치과 임플란트용 티타늄 표면에 나노구조를 형성함으로써 매식 후 더 빠른 골 유착을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 치과 임플란트, 나노튜브 표면, 저전압 양극산화, MG-63 조골세포,

치과 임플란트용 티타늄의 나노구조 표면에 대한 MG-63 조골세포의 생물학적 반응

<지도교수 김정남>

연세대학교 대학원 치의학과

이 서 영

I. 서 론

1950년대에 Bränemark이 골치유과정의 미세혈류에 관한 동물실험 중 골과 티타늄 간에 강한 결합이 형성된다는 것을 발견하였다. 골 유착에 기초한 임플란트가 1969년 스웨덴에서 최초로 시술된 이래 티타늄과 티타늄 합금이 가장 우수한 임상결과를 보이고 있다. 티타늄은 내식성과 생체적합성이 우수하고, 비중이 스테인리스강이나 Co-Cr 합금의 거의 반 정도로 매우 가벼운 장점을 가지고 있으며, 대기 중에서 자연적으로 생성되는 표면 산화층은 열역학적으로 안정한 rutile TiO_2 상이 주를 이루며 이 산화막은 생체 내에서 불활성의 특성을 나타낸다.

하지만 티타늄에는 생체활성이 없기 때문에 골형성을 적극적으로 유도하지 못하여 치유기간이 길고, 골질이 불량한 부위에서는 성공률이 감소하는 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 임플란트의 표면적을 늘리고 표면형상을 변화시키거나 물리적, 화학적 표면처리를 통하여 골 결합력을 향상시키고자 하는 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. Sul 등(2001)은 골과 임플란트의 결합이 microporous 표면에 의한 기계적 결합과 표면화학조성에 의한 화학적 결합이 복합적으로 작용한

다고 설명하였다. 표면 거칠기는 세포의 다양한 반응을 결정짓는 주요인자이다. 단백질 흡착 뿐 아니라 세포부착, 증식, 분화, 사멸 등 전반적인 세포활동에 중요한 역할을 하게 되며, 따라서 생체재료의 표면성질은 재료표면-부착분자-세포막 수용체간의 일련의 반응을 일으키는 시작점으로서, 생체재료의 가장 중요한 성질이다. 표면을 변화시키기 위한 표면처리 기술은 골 유착에 최적의 표면조도와 구조를 가진 임플란트 표면을 형성하는 방법과 임플란트 표면을 생체활성의 물질로 코팅하는 방법의 두 가지의 범주로 나눌 수 있다. 표면처리 방법으로는 산부식, 알카리 처리, 화학적 또는 전기화학적 부식, 미세한 입자로 blasting 하는 방법이 있고, 물질첨가 방법에는 수산화인회석 코팅, 이온주입법 등이 있다. 그러나 기계적 처리 방법은 정확한 조절과 재현이 어렵고 불순물 함유 등의 문제가 있으며 산부식 처리법도 표면구조 조절이 어렵고 산이 표면에 남아 있을 수 있다. 또한 수산화인회석 코팅은 결합이 약한 문제가 있다.

최근에는 biomimic한 재료에 관심이 집중되면서 티타늄 표면에 나노 구조를 형성시키기 위한 연구가 이루어지고 있다. 1999년 처음으로 nanograined 재료에 조골세포가 더 잘 부착한다고 발표되었다. 나노재료는 직경이 1-100 nm 정도 범위이며 임플란트의 표면과 결합하는 골 조직(수산화인회석 결정; 길이 20-40 nm, 두께 4-6 nm) 및 collagen(길이 300 nm, 넓이 0.5 nm, 둘레 67 nm)이 나노단위의 구조를 이루고 있기 때문에 임플란트 표면에 나노단위의 거칠기를 형성하는 것이 골 유착에 유리할 것으로 보고 있다(Zhu 등, 2004). Poly(lactide-co-glycolide) acid를 나노구조를 갖도록 형성하면 섬유아세포의 부착은 감소한 반면 조골세포의 부착은 증가하였다. 알루미늄에서도 조골세포: 섬유아세포 부착비율이 기존의 알루미늄에서는 1 : 1 인 반면 nanophase alumina에서는 3 : 1 이었다. 알루미늄, 티타니아, 수산화인회석 같은 세라믹에서도 그들의 결정크기를 나노스케일로 형성한 결과에서 세포의 부착과 증식이 우수하였다(Webster 등, 2000). 또한 Ti, Ti6Al4V, CoCrMo와 같은 금속재료에서도 결정크기를 나노단위로 형성한 결과 기존의 마이크로 구조를 지니는 것보다 세포의 부착과 증식이 우수하였다(Webster와 Ejiófor, 2004).

티타늄 표면에 나노구조를 생성하기 위하여 양극산화를 이용하는 연구가 이루어지고 있는데 1990년 Zwilling이 저전압에서 나노-porous구조형성에 불소이온

이 필요함을 처음 보고하였고 Gong 등(2001)은 0.5 또는 1.5% HF 전해액에서 10-40 V 전압 하에서 self-ordered nano-tube가 형성됨을 보고하였다. Choi 등(2004)은 ethanolic HF 전해액에서 10 V하에서 내경 500 nm인 나노 구조 형성을 보고하였다. Schmuki(2005)는 HF/H₂SO₄를 전해액으로 사용하여 연구하였다. Grimes 그룹(2005)은 4.4 μ m 길이의 나노 튜브형성을 보고하였다. NaF 또는 KF(pH 4.5)에서 2.3 μ m 두께로 형성되는 반면에 Schmuki 그룹은 중성 불소용액에서 2.5 μ m 두께로 형성됨을 보고하였다. 김 등(2006)은 1 M H₃PO₄와 1.5 wt% HF 전해액에서 20 V 정전압으로 상온에서 2시간 양극산화 처리하여 기공크기 약 100 nm, 두께 300 nm의 산화피막을 형성하였다고 보고하였다.

나노튜브의 직경, 두께는 양극산화조건에 의해 정확하게 조절 가능하며 내경 크기는 전압에 의해 수십 나노미터에서 100 nm까지 형성시킬 수 있다. 두께는 pH, 전해액의 종류와 농도에 의해 수백 nm에서 수 μ m까지 조절 가능하며 일반적으로 한 샘플에서 나노튜브 구조의 직경은 균일하다(Yao 와 Webster, 2006).

이러한 나노구조 표면을 갖는 티타늄을 생체 내에 적용하기 위하여 조골세포를 이용한 연구들이 행하여지고 있다. 박 등(2006)은 약 100 nm의 나노구조 칼슘을 도포한 티타늄에서 조골세포 활성화와 증식이 현저히 증가하였고 배양초기에 조골세포로의 분화를 나타내는 지표인 alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin mRNA발현이 현저히 증가하였다고 보고하였다. Webster 등(2007)은 10 V, 0.5% HF에서 20분 양극산화시킨 나노 입자 표면에서 조골세포가 가장 잘 부착하였고 조골세포에 의한 칼슘침착에서는 나노튜브 표면(20 V 0.5 % HF 20 분)에서 가장 높았다고 보고하였다.

그러나 현재까지 마이크로 단위의 거칠기를 갖는 표면 연구에 비해 나노크기로 형성된 산화피막에 대한 생물학적 연구는 매우 미미한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 티타늄의 표면적을 증가시키고 골 유착을 향상시킬 수 있는 임플란트 표면처리법인 양극산화법으로 표면에 나노구조의 산화피막을 형성하고 그에 따른 조골세포의 반응을 조사하고자 한다. 본 연구에서는 0.5 wt% 불산 용액에서 20 V 저전압 하에서 60분간 양극산화 후 초기 조골세포 부착을 관찰하였고 역전사 증합효소 연쇄반응으로 조골세포로의 분화를 평가하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

가. 티타늄

상용 순수 티타늄(ASTM F67, gradeⅢ)을 미국의 Dynamet사로부터 구입하였으며 시편을 10×10×1 mm 크기로 절삭하여 제작하였다.

나. 조골세포

MG-63 조골세포(KCLB No.21427)는 한국세포주은행에서 구입하여 배양하였다. 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco Eagle's minimum essential medium(DMEM, Gibco, USA)을 배지로 사용하여 37℃, 5% CO₂, 100% 습도를 유지하는 CO₂ 배양기(VS-9180MS, Vision Scientific Co., Korea) 내에서 배양하였다. 3일마다 새 배지로 교환하면서 세포가 들어차면 계대배양을 실시하여 2-9세대의 세포를 사용하였다.

2. 실험방법

가. 시편제작

시편은 연마 표면(Polished surface, P), micro arc oxidation 표면(Micro-roughness, MAO) 및 저전압 양극산화 표면(Nano-roughness, Nano) 등 3군으로 준비하였다(Table 1).

(1) 연마 표면

티타늄 시편의 균일한 면을 얻기 위하여 polisher(ECOMET III GRINDER,

BUEHLER, Illinois, USA)를 이용하여 연마하였다. 실리콘 카바이드 연마지(SiC paper)로 순차적으로 #1200까지 연마하였다. 연마한 시편의 표면은 아세톤, 에탄올, 그리고 증류수에 각각 10분 씩 순서대로 초음파 세척하였고 air-spray (DR-88, 중외휴먼텍, 서울, 한국)를 이용하여 표면에 물기를 제거한 후 50°C 진공 건조기에서 24시간 건조시켰다.

(2) micro arc oxidation

마이크로 단위의 거칠기를 갖는 표면은 시편을 0.04 M의 Beta-glycerol phosphate와 0.4 M의 calcium acetate를 전해질로 사용하여 실온에서 250 V의 전압 하에서 3분간 양극산화 처리를 하였다. 양극에는 티타늄 시편을 연결하고 음극에는 백금(pt) 박을 연결하였으며, 교반기를 이용하여 전해질 용액을 섞어 주었다. 양극산화 처리 이후 증류수로 세척하고 상온의 건조기에 보관하였다.

(3) 저전압 양극산화

나노 단위의 거칠기를 갖는 표면은 시편을 직류전원 공급장치(Genesys 600-2.6, Densi-Lambda, Japan)로 0.5 wt% 불산 수용액에서 20 V 하에서 60분간 양극산화 처리를 시행하였다. 시험에 사용된 전해조는 불산의 영향을 막기 위해 테프론(teflon)을 이용하였다. 양극에는 티타늄 선을 이용하여 시편을 연결하고 음극에는 백금박(20 × 20 × 0.3 mm)을 납땀하고 레진에 포매 후 사용하였다. 이때 두 시편간 거리는 20 mm로 일정하게 유지한 후 시행하였으며 양극산화과정 중 stirrer를 이용하여 전해액을 계속 교반하였다.

양극산화 처리 후 증류수에서 세척 하고 air-spray를 이용하여 표면에 수분을 제거한 후 350°C에서 3 시간 열처리하였다.

Table 1. Experimental groups according to surface treatment

Type	Methods	code
Polished surface	Procedure (1)	P
Micro-roughness	Procedure (1) + (2)	MAO
Nano-roughness	Procedure (1) + (3)	Nano

나. MG-63 조골세포의 부착 관찰

MG-63 조골세포의 초기 부착을 관찰하기 위하여 모든 시편을 고압 증기 멸균기로 멸균 처리하고 배양한 MG-63 조골세포를 시편 당 1×10^5 개씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간, 3시간 배양하였다. PBS로 미부착 세포를 제거하고 Karnovsky 고정액(2% Glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.5% CaCl₂)으로 고정한 후 여분의 1차 고정액을 0.1 M PBS로 30분씩 2회 수세하였다. 지질의 성분을 보호해 주면서 시료를 안정화(경화)시키기 위하여 1% OsO₄(osmium tetroxide)로 1시간 동안 고정하고 OsO₄와 알코올이 직접 만나면 시료 내외에 검은 염색성이 나타나는 것을 방지하고자 0.1M PBS로 다시 10분간 수세하였다. 수세과정 후 세포를 탈수시키기 위하여 저 농도 알코올부터 무수알코올까지 탈수과정을 거쳤다. CPD(Criticalpointdryer, HCP-2Hitachi, Japan)에서 임계점 건조를 한 다음 시료의 전도성을 높이고 2차 전자를 많이 발산 할 수 있도록 하기 위해서 Ion Coater(EikoIB-3, Japan)를 이용하여 300 Å 두께로 코팅을 하였다. 코팅이 끝난 시료는 주사전자현미경(FE-SEM, S-800, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

다. Gene expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)

MG-63 조골세포의 특정 단백질의 발현을 관찰하기 위하여 모든 시편을 고압 증기 멸균기로 멸균 처리하고 MG-63 조골세포를 시편 당 1×10^5 개 씩 분주 후

37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1일, 9일, 11일 동안 배양하였다.

각각의 배양이 끝나는 시점에 ALP, osteocalcin, Type I collagen, GAPDH의 발현 정도를 평가하기 위하여 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 시행하였다.

Trizol(Invitrogen TM, Carlsbad, CA)을 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA를 분해되지 않은 상태로 추출하고 추출조작과정에서 ribonuclease(RNase)의 혼입을 피하기 위해 멸균한 기구를 사용하였다. 추출한 RNA를 자외선 분광기(UV spectrophotometer; Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 순도를 검증하고 정량하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응은 Maxime RT-PCR Premix Kit(iNtRon BIOTECHNOLOGY)를 사용하여 45°C에서 30분 간 reverse transcription 반응을 거쳐 RNA로부터 cDNA를 합성하고 연이어 중합효소반응을 다음 조건에서 시행하였다. 94°C에서 5분을 1회 시행 후 94°C 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 32회 시행 후 72°C에서 5분 간 반응 산물을 연장하였다. PCR primer는 Homo sapiens mRNA gene sequences(Pubmed)를 기초로 하여 합성하였다(Table 2).

증폭산물을 ethidium bromide로 염색한 1.5% agarose gel에 주입하고 100 V에서 30 분간 전기영동한 후 Biorad Chemi-Doc(Biorad; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에서 UV 광으로 시각화 하였다.

라. 표면 분석

11일 간 배양 후 세포활동에 의한 칼슘 및 인의 침착이 이루어졌는지를 확인하기 위하여 세포를 lysis하고 표면을 Energy Dispersive Spectroscopy(EDS; Inca, Oxford, UK)로 표면 조성분 분석을 시행하였다.

Table 2. Oligonucleotide primers for PCR amplification

Genes	Primer sequence	bp
Alkaline phosphatase	5-ATCGCCTACCAGCTCATG-3 (sense)	291
	5- GTTCAGCTCGTACTGCATGTC-3 (antisense)	
Osteocalcin	5-CTCACACTCCTCGCCCTATT-3 (sense)	247
	5-GGTCAGCCAACCTCGTCCAG-3 (antisense)	
Type I Collagen,	5-ATGTCTAGGGTCTAGACATGTTCA-3 (sense)	219
	5-CCTTGCCGTTGTGCGCAGACG-3 (antisense)	
GAPDH	5-TGACATCAAGAAGGTGGTGA-3 (sense)	210
	5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3 (antisense)	

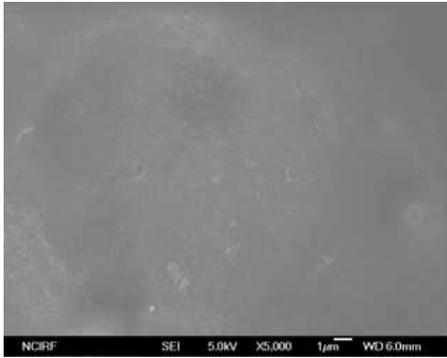
Ⅲ. 결 과

1. 시편 표면 관찰

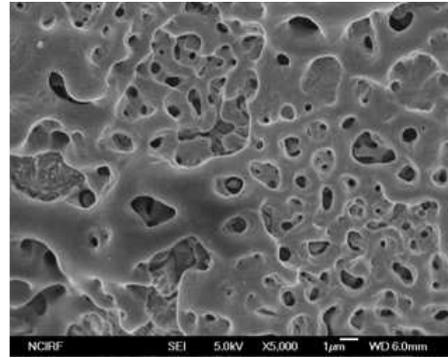
시편 제작 후 표면상태를 주사전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 1). 실리콘 카바이드 연마지(SiC paper)로 순차적으로 #1200까지 연마한 표면은 5,000배에서 평활한 표면을 보였다(Fig. 1.a). 0.04 M의 Beta-glycerol phosphate와 0.4 M의 calcium acetate를 전해질로 사용하여 실온에서 250 V의 전압 하에서 3분간 양극산화 처리를 한 시편의 표면에는 마이크로 단위의 거칠기가 형성되었음을 확인하였다(Fig. 1.b). 0.5 wt% 불산 수용액에서 20 V 하에서 60분 간 양극산화 처리를 시행한 후 열처리한 시편의 표면에는 100 nm 이하 직경을 갖는 나노튜브가 균일하게 수직 배열한 형태를 관찰하였다(Fig. 1.c, d).

2. 조골세포의 부착

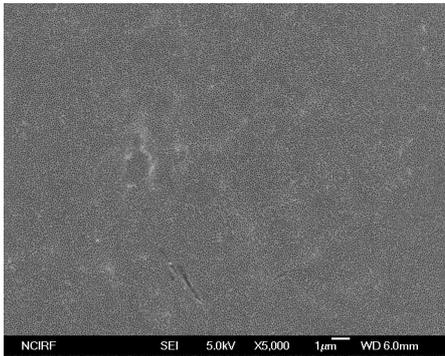
시편에 세포를 분주하고 1시간 후와 3시간 후에 각각 주사전자현미경으로 세포의 부착상태를 관찰하였다. 배양 1시간 후 연마 표면에서는 세포가 아직 둥근 형태로 부착이 이루어지지 않았고 마이크로 단위의 거칠기를 갖는 표면에서는 부분적으로 사상족(filopodia)과 박판족(lamellipodia)이 발달한 세포의 부착된 형태가 관찰되었다. 반면에 나노 구조를 갖는 표면에는 거의 대부분의 세포가 표면에 부착되어 사상족과 박판족이 발달한 형태로 관찰되었다. 또한 마이크로 거칠기의 표면 군보다 나노구조 표면 군에서 보다 더 세포의 크기가 크게 성장 한 것을 관찰하였다(Fig. 2). 배양 3시간 후 연마 표면 군에서도 세포 부착이 원활히 이루어져 마이크로 거칠기 표면 군과 유사하였다. 그러나 대부분의 세포가 아직 타원형의 형태로 표면에 밀착되지는 않았고 나노구조 표면의 세포보다 크기가 작았다(Fig. 3). 나노 구조 표면에서는 세포가 시편의 표면을 따라 완전히 밀착된 양상을 보였고 세포 성장도 다른 두 군보다 뚜렷하게 컸다(Fig. 4).



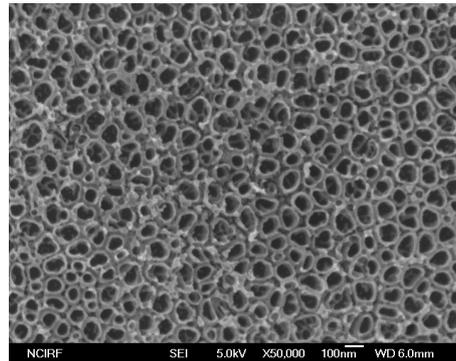
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of (a) polished surface (X 5,000), (b) micro roughness surface (X 5,000), (c) nanotube surface (X 5,000), and (d) nanotube surface (X 50,000).

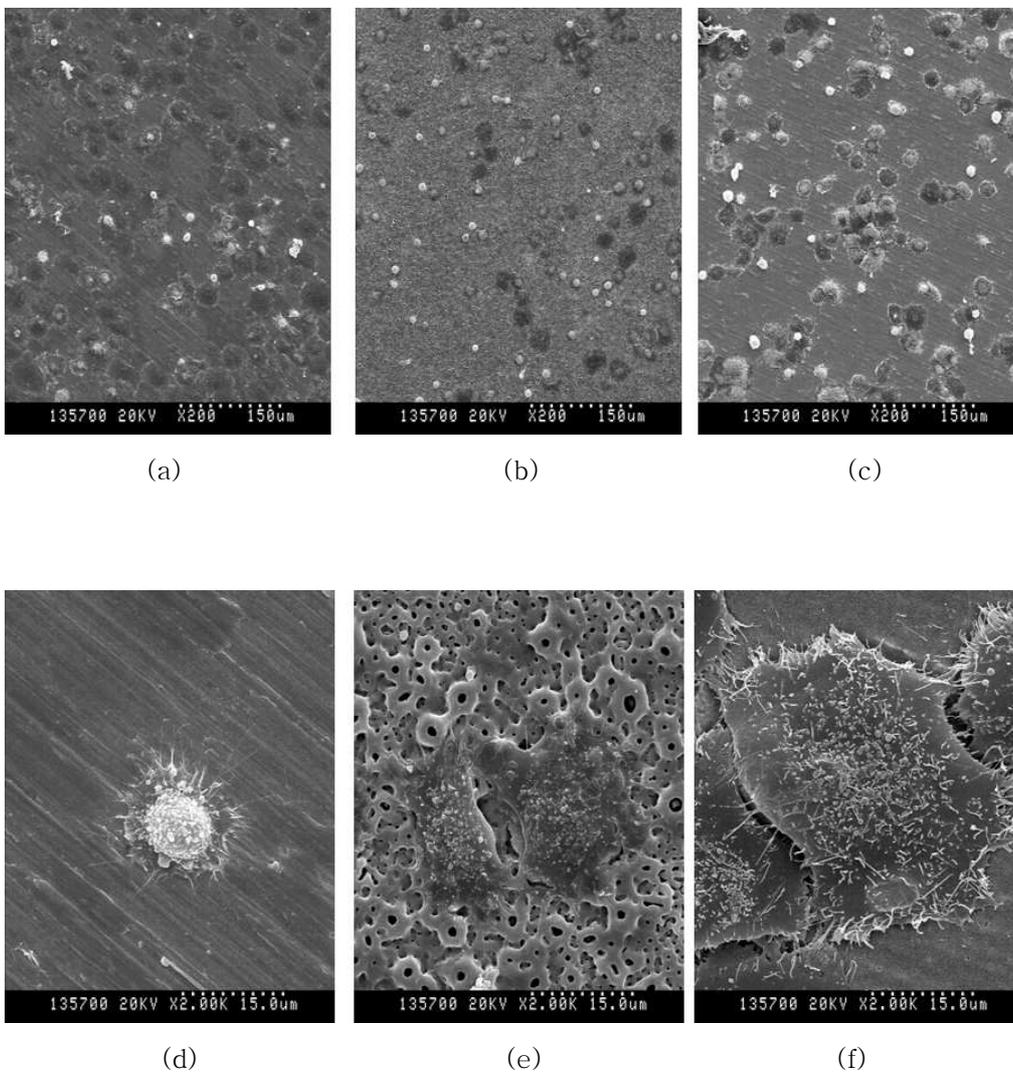


Fig. 2. Scanning electron microscopy images on polished surface(a, d), micro roughness surface(b, e), and nanotube surface(c, d) after 1 h(a, b and c; X 200, d, e and f; X 2,000).

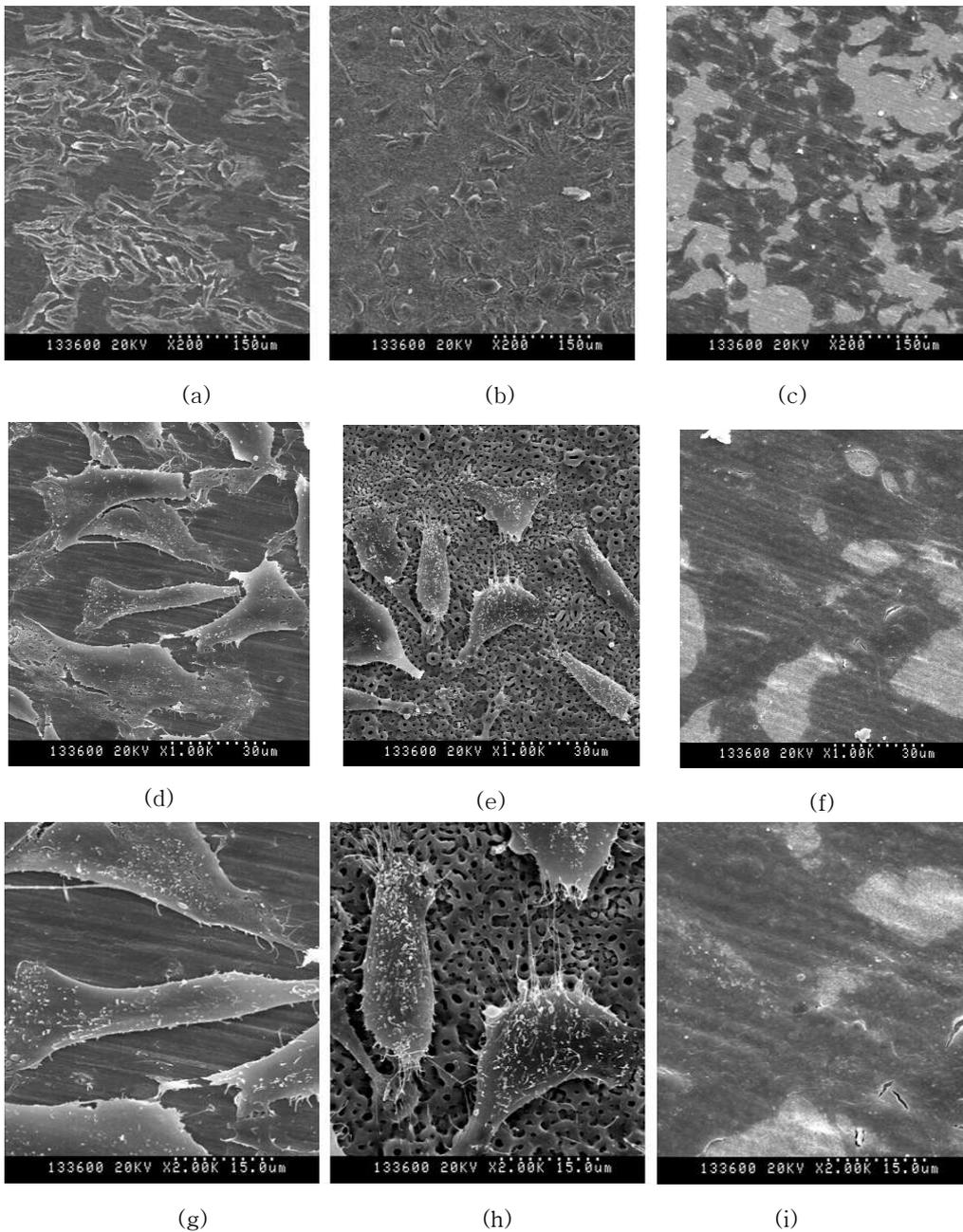
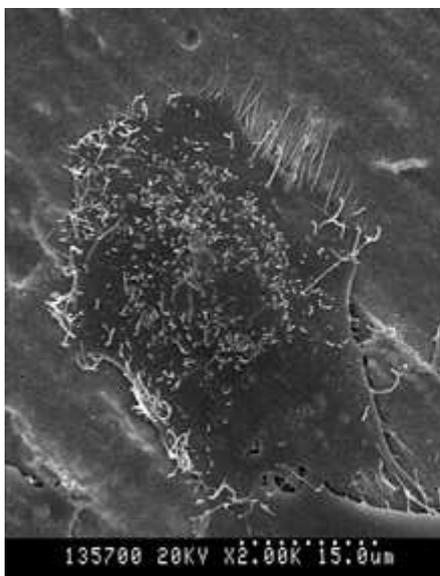
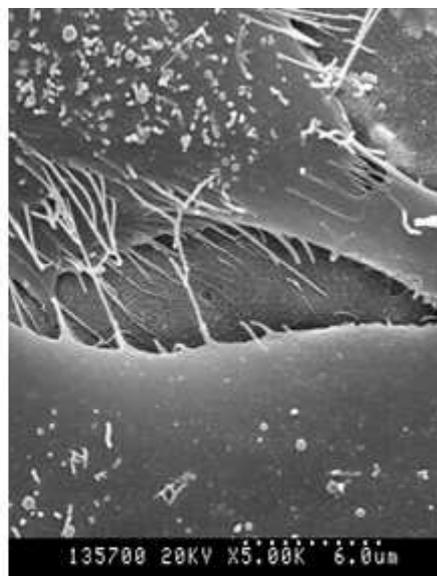


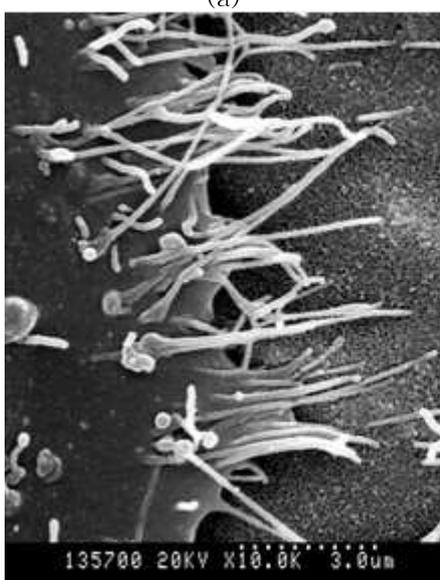
Fig. 3. SEM images MG-63 osteoblasts on polished surface(a, d, g), micro roughness surface(b, e, h), and nanotube surface(c, f, i) after 3 hrs(a, b and c; X 200, d, e and f; X 1,000, g, h, and i; X 2,000).



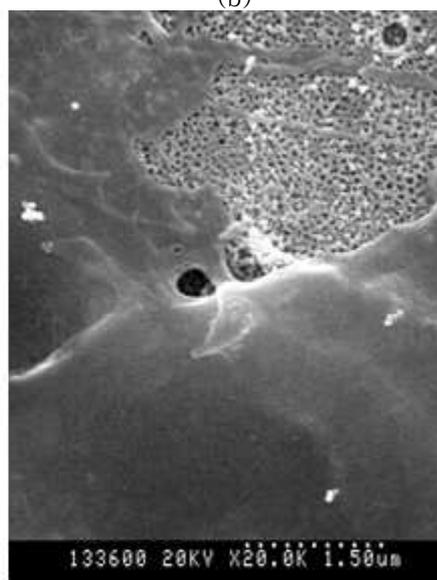
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 4. SEM images showing filopodia and lamellipodia of osteoblast on nanotube surface after 1 h (a; X 200, b; X 5,000, c; X 10,000, d; X 20,000).

3. 조골세포의 분화

시편에 세포를 분주하고 1일, 9일, 11일간 배양한 세포의 RNA로 시행한 역전사-중합효소 연쇄반응을 통해 ALP, Osteocalcin, Type I collagen의 발현양상이 Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7과 같았다. ALP는 1일째에 모든 군에서 나타났으며 나노구조의 표면에서 가장 뚜렷하게 발현되었다(Fig. 7). 9일과 11일째에도 모든 군에서 나타났으며 나노 구조의 표면에서 가장 뚜렷하였다(Fig. 8, Fig. 9). osteocalcin은 나노 구조의 표면을 갖는 시편에서는 9일 째에 다른 군에 비해 현저히 뚜렷하게 발현되었으며 11일 째에도 발현되었다. 반면에 연마 표면 군에서는 계속 나타나지 않았다. Type I collagen은 1일째, 9일째, 11일째에 모든 시편에서 발현되었다. 그 중 나노구조 표면을 갖는 시편에서 가장 뚜렷이 발현되었다.

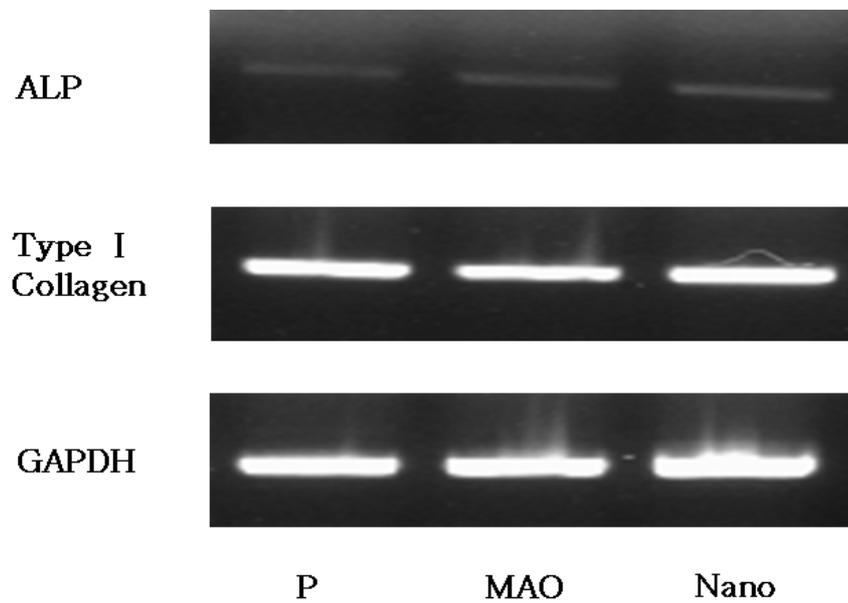


Fig. 5. RT-PCR analysis of the bone associated genes expressed by MG-63 osteoblasts on polished surface, micro roughness surface and nanotube surface after cultured for 1 day.

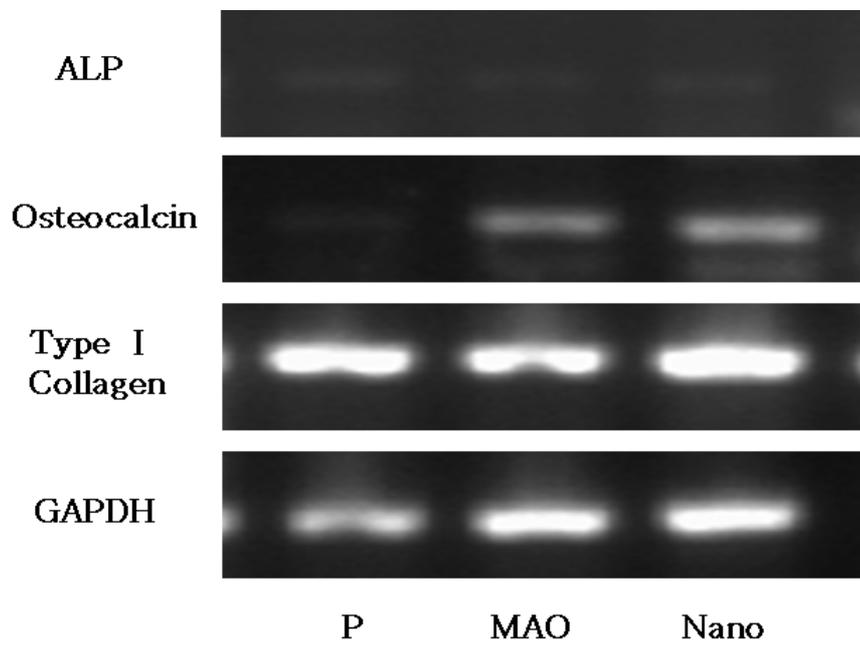


Fig. 6. RT-PCR analysis of the bone associated genes expressed by MG-63 osteoblasts on polished surface, micro roughness surface and nanotube surface after cultured for 9 days.

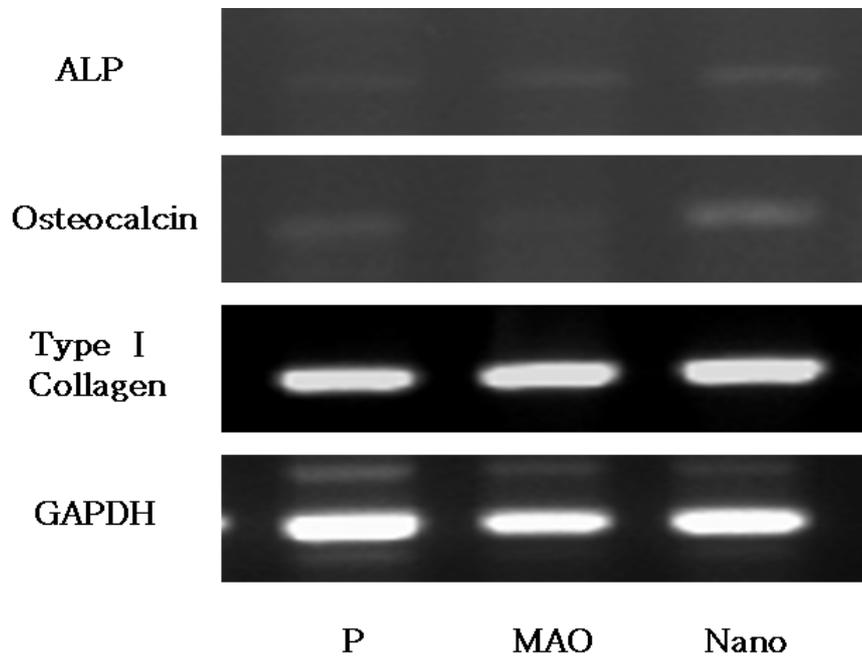


Fig. 7. RT-PCR analysis of the bone associated genes expressed by MG-63 osteoblasts on polished surface, micro roughness surface and nanotube surface after cultured for 11 days.

4. 조골세포 배양 후의 표면분석

배양 11일 후 MG-63 조골세포를 lysis 시킨 후의 표면을 Energy Dispersive Spectroscopy(EDS; Inca, Oxford, UK)로 분석한 결과 나노튜브구조를 갖는 표면의 균에서만 조골세포 배양전과 달리 칼슘과 인의 침착을 보였다.

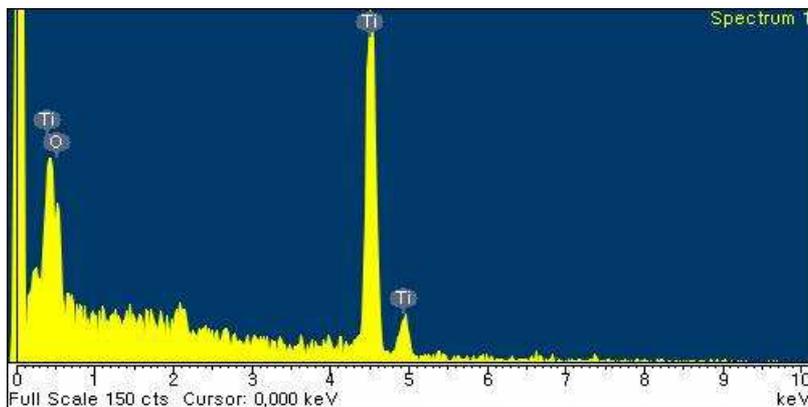


Fig. 8. EDS spectra of nanotube surface before cell culture.

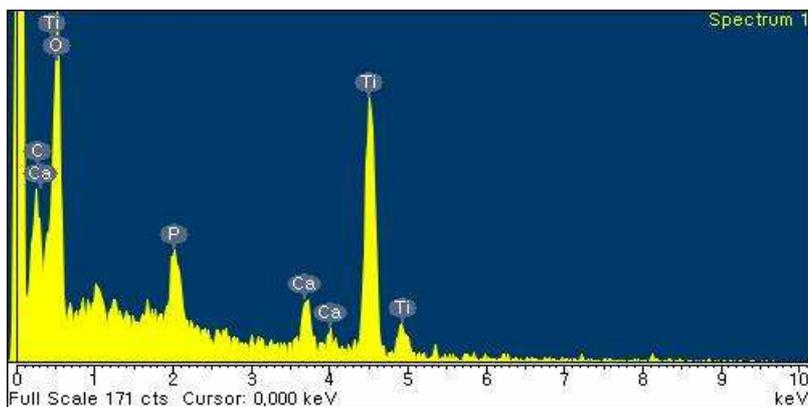


Fig. 9. EDS spectra of nanotube surface after cell lysis.

IV. 고 찰

1999년 처음으로 nanograined 재료에 조골세포 부착이 증가함이 발표된 이후로 나노재료의 독특한 생물학적 특성에 대한 연구가 20여년 간 진행되어 오고 있다. 나노재료는 직경이 1-100 nm 정도 범위이다. 아직 세포반응이 왜 달라지는지에 대한 연구는 많지 않지만 나노 재료의 증가된 표면적과 세포의 부착에 관여하는 vitronectin(길이 15 nm), fibronectin(길이 130 nm)과 laminin 같은 단백질이 나노 구조이어서 나노 단위의 표면 거칠기는 단백질 흡착에 더 많은 site를 제공하여 세포 부착에 유리하게 작용하는 것으로 설명되어진다. 임플란트의 표면과 결합을 하는 골 조직(hydroxyapatite 결정; 길이 20-40 nm, 두께 4-6 nm) 및 collagen(길이 300 nm, 넓이 0.5 nm, 둘레 67 nm)들이 나노단위의 구조를 이루고 있기 때문에 임플란트 표면에 나노단위의 구조를 형성하는 것이 골 유착에 유리할 것으로 보고 있다(Zhu 등, 2004). 또한 topography의 변화는 세포 반응에 영향을 주는 표면 젖음성과 potential에도 영향을 미칠 수 있다. 표면에너지가 높은 표면에 세포가 더 잘 부착한다고 보고되었다. 일반적으로 표면 젖음성은 거친 표면이 매끈한 표면보다 친수성이라고 연구되어왔다. Zhu 등(2004)은 0.2 M H_3PO_4 & 0.03 M calcium glycerophosphate/0.15 M calcium acetate 전해액에서 양극산화하여 나노 구조를 갖는 티타늄 표면의 접촉각이 60°와 90°로 양극산화를 하지 않은 것보다 친수성을 갖는다고 하였다. Webster(2004)는 5-15 nm 단위의 표면 거칠기를 갖는 금속표면(Ti, Ti6Al4V, CoCrMo)에 조골세포 부착이 향상되었다고 보고하였다.

본 연구에서도 세포 배양 1시간 후와 3시간 후의 전자현미경 관찰에서 나노구조의 표면에서 더 넓은 세포 부착을 보였다.

빠르고 많은 세포의 부착은 이어지는 증식과 분화에도 영향을 주는 것으로 예측된다(Miller, 2006). 표면 거칠기는 세포의 다양한 반응을 결정짓는 주요인자이다. 조골세포가 재료의 표면에 부착하기 위해서는 fibronectin, vitronectin, 세포외기질 등과 같은 단백질의 흡착이 선행되어야 한다. 여기에 세포의 세포막 관통 수용체인 인테그린이 강하게 결합하면서 부착된다. 따라서 생체재료의 표면성질은 재료표면-부착분자-세포막 수용체간의 일련의 반응을 일으키는 시작점으로서, 생

체재료의 가장 중요한 성질이다(Fig. 10). 세포모양을 지지하고 세포가 부착 사이트를 찾아 이동하는 데에는 cytoskeleton(세포골격)이 관여하는데 이는 단백질 미세 필라멘트로 intermediate filament, microtubule, actin filament 세 종류가 있다. 이들 중에서 부착은 액틴 필라멘트에 의해 이루어지는데 세포가 분주된 후 부착 사이트를 찾아 액틴 필라멘트가 신장하면서 세포막을 외부로 밀어내면서 돌출부위를 형성한다. 이것이 사상족(filopodia)와 박판족(lamellipodia)으로 부착할 때까지 초당 1 μm 속도로 형성되고 사라지는 역동적인 구조이다(Fig. 11). 즉 생체재료의 표면은 단백질 흡착 뿐 아니라 세포부착, 증식, 분화, 사멸 등 전반적인 세포활동에 중요한 역할을 하게 된다. 조골세포 증식과 장기간 기능 연구(collagen과 alkaline phosphate같은 세포 내 기질과 세포 외 기질 단백질 합성을 측정)에서 100 nm 크기 이하의 알루미늄, 티타니아와 수산화인회석 같은 나노세라믹에서 더 증진한 것으로 보고되었다. 본 연구에서 조골세포의 초기 분화 표지인자로 인식되며 기질의 무기질화에 관여하는 alkaline phosphatase 발현을 1일, 9일, 11일 째에 역전사 중합효소 연쇄반응으로 조사하였다. 1일 째에 모든 군에서 발현되었으며 나노 튜브 구조의 표면에서 다른 표면보다 뚜렷하게 발현되었다. 9일과 11일 째에 흐릿하게 발현되었으며 나노 튜브 표면에서 가장 많이 발현하였다. 골 형성에 관여하는 osteocalcin은 9 일째에 마이크로 거칠기의 표면과 나노튜브 구조의 표면에서 발현되었으며 나노 튜브 구조 표면에서 더 많이 발현되었다. 11일 째에는 나노 튜브 구조 표면에서만 발현하였다. 골의 유기질 성분의 대부분을 차지하는 Type I collagen은 1일 째에 모든 군에서 발현하였다. 1일, 9일, 11일 째에 Type I collagen이 나노구조 표면에서 더 발현되었다. RT-PCR법은 미량 분자의 검출 감도 면에서 다른 방법들보다(Northern blot analysis, dot blot analysis, nuclease protection method, in situ hybridization) 조작이 빠르고 간편하며 우수하다고 평가된다. RT-PCR법은 RNA 조제, 역전사 효소반응(RT), PCR의 단계를 거친다.

calcium-containing 무기질 침착에서 기존의 알루미늄에 비해 4배, 티타니아의 3배, HA의 2배였다고 보고되었다. 이는 골의 무기질 성분인 하이드록시아파타이트 크기가 나노단위이기 때문으로 설명되고 있다. Oh 등(2005)은 인공체액에 담그어 둔 후 EDXA 분석으로 나노구조를 갖는 티타늄 표면에서 연마한 표면에서보다 하이드록시아파타이트의 성장이 더 많음을 보고하였다. 또한 3주간 조골세포를 배

양 후 시편 표면을 분석한 결과 나노튜브와 유사한 구조를 갖는 저전압 양극산화표면에서 양극산화 처리를 하지 않은 티타늄 군보다 조골세포에 의한 칼슘침착이 더 많았다고 보고되었다(Webster, 2007). 본 연구에서는 11일째 세포를 떼어낸 후 시편 표면을 분석한 결과 나노튜브구조의 표면에서 세포를 배양하기 전의 시편에서는 존재하지 않았던 칼슘과 인의 침착이 관찰되었다. 반면에 연마된 시편에서는 전혀 나타나지 않아 나노튜브구조의 표면에서 조골세포의 분화가 더 활발히 진행되며 세포활동에 의한 칼슘과 인의 침착도 진행됨을 볼 수 있었다.

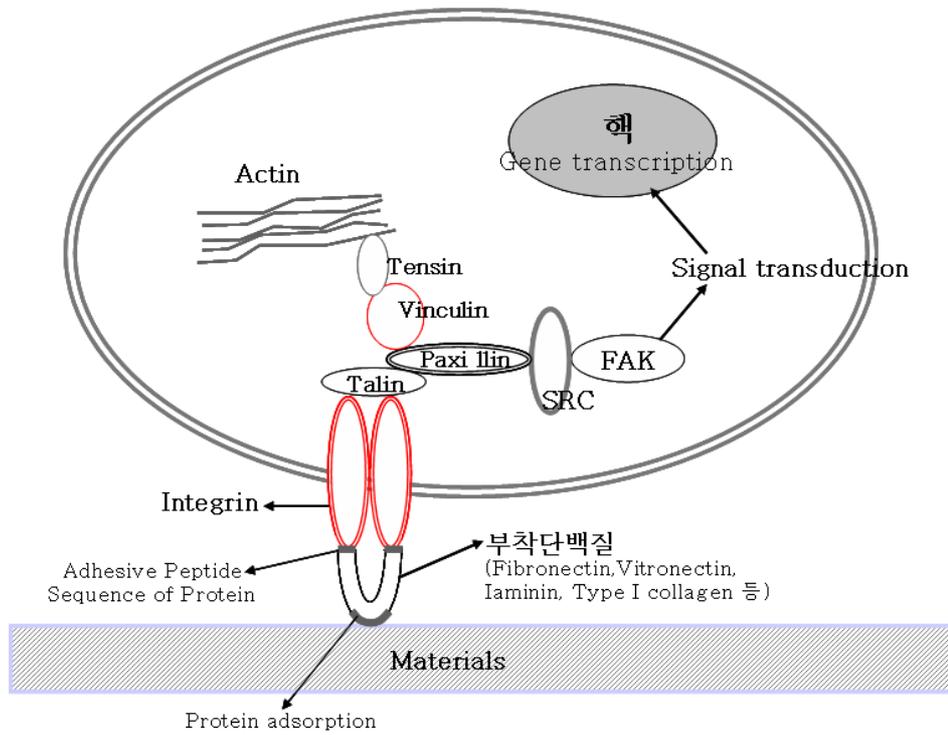


Fig. 10. Schematic representation of protein-mediated cell adhesion on biomaterial(Anselme, 2000; Huinan, 2006).

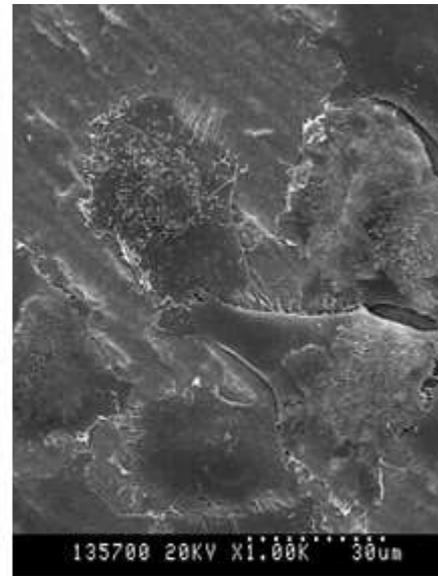
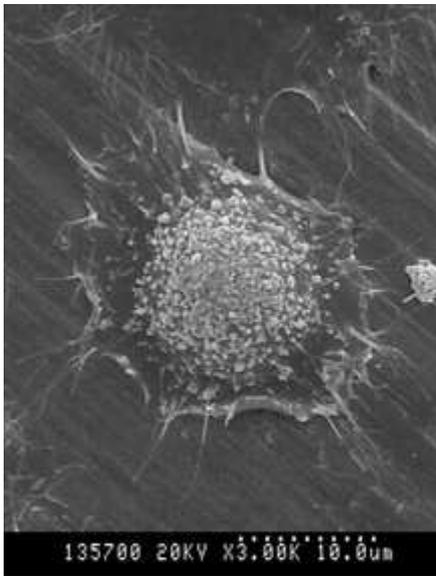
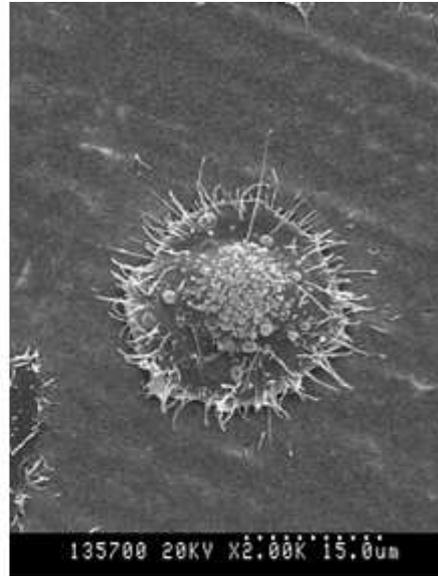
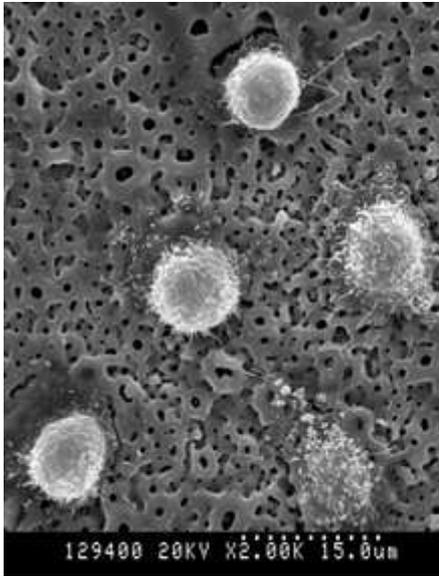


Fig. 11. SEM images of the attachment process of osteoblast on titanium surface.

V. 결 론

본 연구에서는 티타늄의 표면적을 증가시키고 골 유착을 향상시킬 수 있는 임플란트 표면처리법인 양극산화 법으로 표면에 나노구조의 산화피막을 형성하고 그에 따른 조골세포의 반응을 연마 표면 및 마이크로 거칠기 표면과 비교 평가하였다. 0.5 wt% 불산 용액에서 20 V 저전압으로 60분간 양극산화하여 나노튜브구조를 형성하였다. 조골세포의 부착과 분화를 관찰하기 위하여 MG-63 조골세포를 이용하였다. 시편에 세포를 분주 1시간 후와 3시간 후에 MG-63 조골세포의 부착을 전자현미경으로 관찰하고 배양 9일과 11일 후에 RT-PCR 방법으로 골 형성 관련 유전자 발현을 평가 하였다. 세포 배양하고 떼어낸 후 표면의 성분을 분석하여 칼슘 침착을 관찰하였다.

1. MG-63 조골세포의 초기 부착을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 나노튜브구조를 갖는 표면에서 연마 표면, 마이크로 거칠기를 갖는 표면에서 보다 MG-63 조골세포의 부착이 현저히 넓게 이루어졌고 밀착된 양상을 보였다.

2. 조골세포로의 분화를 나타내는 지표(alkaline phosphatase, Osteocalcin, Type I Collagen과 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)의 발현을 역전사 증합효소 연쇄반응으로 평가한 결과 세포 배양 1일 째에 alkaline phosphatase와 Type I Collagen이 3개 군에서 모두 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 가장 많이 발현되었다.

3. 세포 배양 9일 째에 osteocalcin은 마이크로 거칠기를 갖는 표면 군과 나노구조 표면 군에서 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 더 뚜렷하게 발현되었다. Type I Collagen은 3개 군에서 모두 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 가장 많이 발현되었다.

4. 세포 배양 11일 째에는 alkaline phosphatase는 희미하게 발현되었으며 나노구조 표면 군에서 더 뚜렷하게 발현됨을 볼 수 있었다. osteocalcin은 나노구조 표

면 군에서만 발현되었다. Type I Collagen은 세 개 군에서 모두 발현되었으며 모든 군에서 비슷한 정도를 보였다.

5. MG-63 조골세포를 11일간 배양하고 lysis한 후 Energy Dispersive Spectroscopy로 표면을 분석한 결과 나노구조 표면 군에서만 조골세포 배양전과 달리 칼슘과 인의 침착을 보였다. 즉 조골세포에 의한 무기질의 침착이 나노구조 표면에서 이루어졌다.

이상의 결과 나노 단위의 거칠기를 갖는 티타늄 표면에 세포의 초기 부착이 더 빠르게 진행되며 이어지는 세포 분화도 연마 표면이나 마이크로 거칠기의 표면에서 보다 더 활발히 이루어진다고 보여졌다. 또한 조골세포 활동의 결과인 칼슘 침착도 더 잘 이루어진 결과로 보아 치과 임플란트용 티타늄 표면에 나노구조를 형성함으로써 매식 후 더 빠른 골 유착을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 김현승, 민동렬, 이경구, 이광민, 박상원, 이도재(2006): 양극산화법에 의해 형성된 나노튜브 타이타늄 산화 피막의 표면특성. *대한치과기재학회지* 33(2): 163-170.
- 박진우 (2007); 칼슘이온이 결합된 나노구조의 타이타늄 산화막표면 임플란트의 평가. *대한치과 의사협회지* 45(4):217-222.
- 변응선, 정용수(2004): 금속 임플란트의 생체활성 표면개질 기술현황. *기계와 재료* 10:37-52.
- 임영준, 이용근, 임범순, 김철위(2004): 티타늄 표면처리에 따른 조골세포의 반응. *대한치과기재학회지* 31(1):1-10.
- 황재선, 오근택, 김경남, 김광만(2006): 골친화성 임플란트 표면처리를 위한 티타늄 표면에 나노 마이크로 구조 형성. *대한치과기재학회지* 33(1):1-11.
- Anselme K: Review(2006); Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667-681.
- Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Dalby MJ(2007): The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J Mater Sci* 18:399-404.
- Colnot C, Romero DO, Huang S, Rahman S, Currey JA, Nanci A, Brunski JA, Helms JA(2007): Molecular Analysis of Healing at a Bone-Implant. *Int J Dent Res* 86(9):862-867.
- Francesco C, Furio P, Stefano V, Francesca F, Diego A, Jlenia M, Elisabetta C, Adriano P (2004) ; Analysis of MG63 osteoblastic-cell response to new nanoporous implant surface by means of microarray technology. *Clin Oral Impl Res* 15:180-186.
- Ganesan B, Webster TJ (2007): Increased osteoblast adhesion on nano grained Ti modified with KRSR. *J Biomed Mater Res Part A* 80A:602-611.
- Genesan B, Yao C, Webster TJ (2007): TiO₂ nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increases osteoblast adhesion.

- J Biomed Mater Res Part A* 84A:447-453.
- Gong D, Grimes CA, Varghese OK, Hu W, Singh RS, Chen Z, Dickey EC (2001): Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *J Mater Res* 16(12):3331-4.
- Gopal KM, Oomman KV, Maggie P, Karthik S, Craig AG (2006) ; A review on highly ordered, vertically oriented TiO₂ nanotube arrays Fabrication, material properties, and solar energy applications. *Solar Energy Mater Solar Cells* 90;2011-2075.
- Hideki S, Yoshiko D, Hajime O, Masako I, Masanori O, Akika K, Tadaaki K, Kunio Y(2003): Recombinant growth/differentiation factor-5(GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal stem cells in porous hydroxyapatite ceramic. *Wiley Periodicals, Inc.*
- Hiroaki T, Jan M. Macak, Lenka M, Julia K, Frank M, Peter G, Sannakaisa V, Patrik S(2006): Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res Part A* 77A:534-541.
- Hiroaki T, Jan MM, Andrei G, Arlindo SR, Luciano T, Patrik S (2007); Characterization of electronic properties of TiO₂ nanotube films. *Corrosion Sci* 49:203-210.
- Huinan L, Webster TJ(2007): Nanomedicine for implants : A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 28:354-369.
- Hunter A, Archer CW, Walker PS, Blunn GW (1995); Attachment and Proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials* 16:287-295.
- John E, Davies(2005): Understanding Peri-implant Endosseous Healing. *J Dent Edu* 67(8):932-949.
- Kakoli D, Sumita B, Amit B(2007): Surface modifications and cell materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomater* 3: 573-585.
- Kern P, Zinger O(2006): Purified titanium oxide with novel morphologies upon spark anodization of Ti alloys in mixed H₂SO₄/H₂PO₄ electrolytes. *J*

Biomed Mater Res Part A 80A(2):283-296.

- Ketul CP, Lara L, Craig A, Tejal AD (2007); Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials* 28:3188-3197.
- Kim HW, Lee EJ, Kim HE, Vehid Salih, Jonathan C, Knowles(2005): Effect of fluoridation of hydroxyapatite in hydroxyapatite-polycaprolactone composites on osteoblast activity. *Biomaterials* 26:4395-4404.
- Kim MJ, Kim CW, Lim YJ, Heo SJ(2006): Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res Part A* 79A(4):1023-1032.
- Maria B, Ralf JK(2004): A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, different titanium surfaces on proliferation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Impl Res* 15:683-692.
- Murugan R, Ramakrishna S(2005): Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos Sci Technol* 65:2385-2406.
- Oh SH, Jin SH(2006): Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth. *Mater Sci Eng C* 26:1301-1306.
- Oh SH, Rita R. Finones, Chiara D, Chen LH, Jin SH(2005): Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* 26:4938-494.
- Rupp F, Scedeler L, Olshanska N, M. de Wild, Wieland, MJ. Geis G(2005): Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Wiley Periodicals Inc.*
- Satoshi K, Yongsheng C, Paul W, John C(2007): Fabrication of uniform size titanium oxide nanotubes: Impact of current density and solution conditions. *Scripta Materialia* 56:373-376.
- Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J(2007): Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified

- (SLActive) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *J Clin Periodont* 34:78-86.
- Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J(2007): Histological and immunohistochemical analysis of initial and early subepithelial connective tissue attachment at chemically modified and conventional SLA titanium implants. A pilot study in dogs. *Clin Oral Invest* 11(3):245-255.
- Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Roser K, Wennerberg A, Albrektsson T (2001): Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med* 12(10-12):1025-31.
- Sumant SK, Reid O, Mauro F, Nicanor IM(2004); Micropatterning of endothelial cells by guided stimulation with angiogenic factors. *Biosen Bioelec* 19: 1401-1407.
- Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Samuel C, Chen SC (2006); Direct effect of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg Res* 1:1-10.
- Webster TJ, Ejirofor JU(2004): Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 25:4731-4739.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R(2000): Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 21:1803-1810.
- Xiaolong Z, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Juergen GC, Kern D(2004): Cellular reactions of osteoblasts to micro- and submicron-scale porous structures of Titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 178:13-22.
- Yan Li, Aimen Li, Karen Strait, Hongying Zhang, Mark S Nanes, M Neale Weitzmann(2007): Endogenous TNF α Lowers Maximum Peak Bone Mass and Inhibits Osteoblastic Smad Activation Through NF- κ B: *J Bone Mineral Res* 22(5):646-655.

- Yao C, Elliott B, Slamovich, , Webster TJ(2007): Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J Biomed Mater Res Part A* in press.
- Yao C, Webster TJ(2006): A promising Nano-Modification Technique of Titanium Implants for Orthopedic Applications. *J Nanosci Nanotechnol* 6:2682-2692.
- Zhe Qu, Xiaohui Rausch-Fan, Marco Wieland, Michael Matejka, Andreas Shedle(2007): The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. *J Biomed Mater Res Part A* 82A(3):658-668.
- Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D(2004): Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 178:3-22.

Abstract

Biological response of MG-63 Osteoblast on Nanostructured Surface of Titanium for Dental implant

Seo-Young Lee

*Department of Dentistry
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyoung-Nam Kim, D.D.S., Ph.D.)

Titanium based implants have a long and successful history of application since the first clinical application in 1969. However the titanium is not bioactive enough to form a fast and direct bond with bone, which may translate into a lack of osseointegration in poor quality bone.

To improve osseointegration into bone, various surface treatments such as mechanical methods(e.g. sandblasting), chemical methods(e.g. acid etching) and coatings with biomaterial have been utilized to improve the bioactivity of implant surface and enhance osseointegration. One of recent approach to attain faster and better osseointegration is to create unique nanometer topography by anodization.

The aim of this study was to investigate the influence of nanotubular surface on the behavior of MG-63 osteoblasts through determination of cell attachment, gene expression and calcium deposition. In this study titanium oxide nanotubes were prepared by anodization in 0.5 wt % hydrofluoric acid solution for 60 min at 20 V.

1. Osteoblast attachment was enhanced on anodized nanotubular surface compared to polished surface and micro-roughness surface.

2. The expression level of bone associated genes(alkalinephosphatase, type I collagen) detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was highest on the nanotubular surface after 1 day of incubation.

After 9 days of culture, the expression of osteocalcin was highest on the nanotubular surface and not appeared on the polished surface. The expression of type I collagen was highest on the nanotubular surface.

After 11 days of culture, the expression of osteocalcin was appeared only on the nanotubular surface and the expression of ALP was highest on the nanotubular surface.

3. The result of this study showed the deposition of calcium and phosphate by osteoblasts cultured on anodized titanium with nanotubular surface after 11 days.

In conclusion osteoblast attachment and differentiation were promoted by unique nanotubular surface features. And osteoblasts deposited calcium onto anodized nanotubular surface. For these reasons this study suggests that faster and better osseointegration might be attained on the anodized nanotubular surface.

key words: dental implant, nanotubular surface, anodization, MG-63 osteoblast