

양극산화처리된 티타늄 표면에 이온빔보조증착방식을 이용한 수산화인회석 코팅시 소결온도의 차이가 조골세포에 미치는 영향

배아란 · 원현두 · 이성복 · 김형섭 · 우이형*

경희대학교 치의학전문대학원 보철학교실

연구 목적: 이 연구의 목적은 수산화인회석 코팅 결정도가 조골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위함이다.

연구 재료 및 방법: 제작된 모든 시편은 양극산화과정을 거치면서 티타늄 표면에서 산화막을 형성하여 표면 거칠기를 증가시켰고 각 시편의 표면을 IBAD (ion beam-assisted deposition) 시스템을 이용하여 HA (hydroxyapatite) 코팅하였다. HA의 코팅이 완료된 시편들은 전기가열로(AJ-SB3, AJEON Heating Industrial Co., Ltd, Seoul, Korea)에 넣어 각 실험군별로 100℃, 300℃, 500℃, 800℃까지 온도를 상승시켜 열처리하였다. HA 코팅을 실시하지 않은 군은 대조군으로 설정하고(control) 소결된 각각의 그룹은 HA100, HA300, HA500, HA800으로 구분하여 설정하였다. 시편 표면의 물리적 성질은 표면 거칠기 테스트, XRD, SEM으로 평가되었다. 수산화인회석 코팅의 결정도의 효과는 조골세포의 분화에 의해 연구되었는데 1, 3, 5, 7일 후에 평가되었다. 성장과 분화 역학은 세포증식능평가, ALP (alkaline phosphatase) 활성능 평가에 의해 조사되었다.

결과: 표면 거칠기는 양극산화 처리 후 IBAD 방식으로 HA를 코팅하여도 그 거칠기에는 별 다른 차이가 없음을 보였다. X선 회절분석 결과 100℃와 300℃에서 소결한 시편은 HA의 결정화가 없는 무정형상태이며 500℃와 800℃에서소결한시편의 HA에서는 결정화 상태가 나타났다. 표면에 배양된 조골 세포의 증식능을 측정한 결과 1일과 3일에서는 각 실험군간의 유의할만한 차이가 있었으나, 5일과 7일에는 각 대조군과 실험군 모두 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. ALP 활성능은 HA100과 HA300보다 HA500과 HA800이 더 높았다.

결론: 본 연구의 결과에서 양극산화처리된 티타늄표면에 이온빔보조증착법을 이용하여 수산화인회석을 코팅 후 소결할 때 500℃의 소결온도가 수산화인회석코팅층의 결정화와 HOS (human osteosarcoma cells) 세포의 증식과 분화에 효과가 좋은 것으로 나타났다. (대한치과보철학회지 2011;49:333-40)

주요단어: 수산화인회석; 이온빔보조증착법; 양극산화처리; 결정도; 세포분화; 알칼리성 인산분해효소

서론

임플란트가 성공적으로 골과 유착되기 위한 중요한 요소로는 임플란트의 재료, 형태, 그리고 표면 처리 등을 들 수 있다.¹ 따라서, 임플란트의 개발 또한 임플란트의 재료, 형태의 개선과 더불어 임플란트의 표면처리 방식 등에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

임플란트의 표면처리 방식으로는 표면 거칠기를 증가시키는 방법과 임플란트 표면을 골조직과의 생체친화성이 높은 물질로 코팅하여 골유착에 보다 유리한 조건을 부여하는 방법이 사용되고 있다. 임플란트의 표면 거칠기를 증가시키는 방법으로는 grit blasting, acid etching, titanium plasma spraying 등의 방식이 주로 사용되어 왔으며 양극산화(Micro Arc Oxidation, Anodizing) 방식이 새로이 주목을 받고 있다.^{2,3} 양극산화방식은 표면 거칠기를 증가시킬 뿐만 아니라 표면 산화막내에 칼슘(Ca)과 인(P)을 함유함으로써 골조직과 생체친화성에 보다 좋은 환경을 만들어준다.⁴ 골조직과 생체친화성이 높은 물질로 임플란트의

표면을 코팅하는 방법으로는 골조직과 유사한 수산화인회석 (Hydroxyapatite, 이하 HA)을 주로 사용한다.

임플란트의 표면에 HA를 코팅하기 위해 여러 가지 방법을 사용하였으나, 임플란트 표면으로부터 HA의 분리, 무정형상태의 HA가 조직액내에서의 용해, 임플란트 표면으로부터 HA의 점진적인 분리로 인한 후기 고정실패 등 여러 단점들이 보고되었다.^{5,9} 따라서, 임플란트의 표면에 HA를 코팅할 때 코팅층의 안정성을 얻는 것이 임플란트 시술의 성공에 중요한 요소가 되었으며 이러한 안정된 코팅층을 얻기 위해 최근에는 이온빔보조증착(Ion beam-assisted deposition, 이하 IBAD)방식을 이용하여 HA를 코팅하는 방법이 주목을 받고 있다.^{10,11}

Overgaard 등¹²은 임플란트의 표면에 코팅된 HA의 결정화도가 HA가 갖는 생체활성에 있어 중요한 요소라고 보았다. Oh 등¹³은 임플란트 표면의 50, 70, 90%의 결정화도의 HA 코팅층을 갖는 임플란트가 30%의 결정화도의 HA 코팅층의 임플란트와 HA 코팅을 하지 않은 임플란트에 비해 식립 3주 후의 골과 임플란트의 결합력이 더 우수함을 보였다. IBAD 방식으로 임플

*교신저자: 우이형

130-701 서울 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 치의학전문대학원 치과보철학교실 02-958-9340; e-mail, yhwu@khu.ac.kr

원고접수일: 2011년 10월 12일 / 원고최종수정일: 2011년 10월 20일 / 원고채택일: 2011년 10월 24일

란트의 표면에 코팅된 HA는 무정형의 상태로 존재하며 열처리 과정을 거쳐 결정화 상태로 변하게 된다. 이 과정에서 열처리 온도에 따라 임플란트 표면에 코팅된 HA의 결정화도는 달라진다.

본 연구에서는 양극산화 방식을 이용해 티타늄 표면에 TiO_2 층을 형성하여 거칠기를 증가시킨 후, IBAD 시스템을 이용하여 HA를 100-300nm로 초박막 코팅하였다. 코팅된 시편을 각기 다른 온도로 열처리 과정을 시행하여 온도에 따라서 HA의 결정화도의 차이를 부여한 뒤 각 시편의 표면에 대한 물리적인 특성과 이에 대한 조골세포 반응을 살펴보고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1) 양극산화처리(Anodizing Treatment)

실험에 사용할 티타늄 시편(Cp-Ti, Grade 4, TMS Co. Ltd, USA)을 직경 10 mm, 두께 2 mm의 크기로 제작하였다. 각 시편은 사포(400- grit)를 이용하여 표면을 매끄럽게 한 뒤 아세톤과 에탄올을 이용하여 초음파 세척하였다.

제작된 모든 시편은 양극산화과정을 거치면서 티타늄 표면에 산화막을 형성하여 표면 거칠기를 증가시켰다. 양극 산화를 위해서 0.15 mol의 calcium acetate monohydrate $\{\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}\}$ 와 0.02 mol의 calcium glycerophosphate $(\text{CaC}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P})$ 를 전해질로 사용하였다. (+)극에 실험에 사용할 시편을 부착하였고 (-)극에는 다른 종류의 티타늄(Grade 2) 막대를 부착하였다. 충분한 두께의 산화막을 얻기 위해서 250 - 300 V 전압하에서 3분간 전류를 흐르게 하여 양극산화를 시켰다. 모든 과정은 아크릴로 제작된 냉각수조내에서 진행되었다.

2) 이온빔보조증착(Ion beam-assisted deposition)

양극산화과정을 통해 시편표면의 거칠기를 증가시킨 뒤 각 시편의 표면을 IBAD 시스템을 이용하여 HA를 코팅하였다. 증발원으로 HA를 사용하였으며, mechanical rotary pump를 이용하여 10-2 torr까지 저진공상태를 만들고 cryopump를 이용하여 10-6 torr의 고진공상태를 만들었다. HA의 원활한 코팅을 위해 아르곤(Ar) 가스환경에서 이온빔을 이용하여 시편의 표면을 세척 후 전자빔을 이용하여 HA를 증발시켜 시편의 표면에 300 nm 두께로 증착되도록 하였다.

HA의 코팅이 완료된 시편들은 전기가열로(AJ-SB3, AJEON Heating Industrial Co., Ltd, Seoul, Korea)에 넣어 각 실험군별로 100, 300, 500, 800℃까지 온도를 상승시켜 열처리하였다. 온도상승조건은 5℃/min으로 하였다.

3) 실험군의 분류

양극산화와 HA 코팅이 완료된 시편들은 5개의 군으로 분류하였다. 대조군으로 사용할 군은 HA 코팅을 실시하지 않았으며 나머지 네 개의 실험군의 시편들은 이온빔보조증착방식을 이용하여 HA를 코팅한 후 각 그룹별로 100, 300, 500, 800℃로 소

Table 1. Classification of the test groups

Name	Treatment conditions
Control	Anodizing only
HA100	Anodizing + IBAD + Heat treatment at 100℃
HA300	Anodizing + IBAD + Heat treatment at 300℃
HA500	Anodizing + IBAD + Heat treatment at 500℃
HA800	Anodizing + IBAD + Heat treatment at 800℃

결하였다. 소결된 각각의 그룹을 HA100, HA300, HA500, HA800으로 구분하여 설정하였다(Table 1).

4) 세포 배양

양극산화와 이온빔보조증착방식으로 HA를 코팅한 티타늄 시편의 생체적합성을 알아보기 위한 실험에는 사람뼈육종세포(Human osteosarcoma cells, 이하 HOS 세포)를 사용하였다. HOS 세포를 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Rockville, USA)과 1% 항생제(100 unit/ml streptomycin, 100 µg/ml penicillin; Gibco, Rockville, USA)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; WelGENE Co, Dae-gu, Korea)으로 37℃, 5% CO_2 배양기에서 계대 배양하여 실험에 필요한 세포를 얻었다. 이중 3 - 5대의 세포군을 실험에 사용하였다.

5) 표면 거칠기(Surface roughness) 측정

실험군과 대조군 시편의 표면거칠기는 표면조도측정기 SE3500 (Kosaka Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 측정(탐침봉)으로 시편의 표면을 탐색하여 중심선평균조도(Centerline average roughness, Ra), 최대높이조도(Maximum height roughness, Ry) 10점 평균조도(Ten point median height roughness, Rz), 요철간격(Spacing of surface peaks, Sm), 평균산간격(mean spacing of local peaks of the profile, S) 등을 측정하였다. 각 시편은 주사전자현미경(VEGA TS 5130LS, TESCAN, Brno city, Czech Republic)을 통해 표면 형상을 관찰하였다.

6) X선회절 분석(X-ray diffraction test)

표면의 결정구조를 분석하기 위해 X-ray diffractometer (Geigerflex, Rigaku Denki, Tokyo, Japan)를 이용하여 X선회절 분석을 시행하였다. 각 시편을 슬라이드판에 고정하여 장비에 장착한 뒤 1.5418 Å, 40 kV, 20 mA의 $\text{CuK}\alpha$ 선을 투과하여 20°에서 60° 범위에서 측정하였다.

7) 세포증식능평가(MTT assay)

24 well 배양판에 각 well당 한 개의 시편을 넣은 후, 각 well 당 5 × 10개의 세포를 분주하고, 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium에 24시간 배양하여 세포가 시편 위에 잘 부착되도록 하였다. 2일 간격으로 배지를 교환하며

배양하였다. 1, 3, 5, 7일째에 각각 MTT assay를 실시하였다. 0.01 M Phosphate Buffered Saline (PBS)에 5 mg/ml로 용해시킨 MTT (Sigma, Yongin, Korea) 용액을 0.2 μ m필터로 여과하여 각 well 당 30 μ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 dimethyl sulphoxide (Sigma, Yongin, Korea)를 각 well당 300 μ l씩 첨가하였다. 96 well 배양판에 각 well당 100 μ l씩 분주하여 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Hercules, USA)에서 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

8) 알칼리성 인산분해효소 활성도 평가

HOS 세포의 분화도를 평가하기 위해 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, 이하 ALP)의 활성도를 평가하였다. 24 well 배양판에 각 well당 한 개의 시편을 넣고 각 well당 세포를 5×10^4 개씩 분주한 후, 세포를 배양하였다. 2일 간격으로 배지를 교환하며 7일간 배양하였다. 1, 3, 5, 7일째에 각각 알칼리성 인산분해효소의 활성도를 검사하였다. 세포배양액을 제거한 후 PBS로 2회 세척하였다. 0.1% Triton X-100 (Polyscience, Niles, USA)을 각 well당 300 μ l씩 첨가하고 상온에서 30분간 방치하였다. p-Nitrophenylphosphate (Alkaline Phosphatase Kit; Bio-rad, Hercules, USA)를 용해시킨 1 \times diethanolamine buffer를 150 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, 1 N NaOH 50 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이렇게 얻어진 용액을 96 well 배양판에 100 μ l씩 분주하고 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, Hercules, USA)로 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과

1. 표면 거칠기 측정

HA를 코팅한 시편의 표면 거칠기를 조사한 결과 Table 2와 같은 결과를 얻었다. 표면 거칠기의 평균값(Ra)을 볼 때 양극산화처리 후 IBAD 방식으로 HA를 코팅하여도 그 거칠기에는 별다른 차이가 없음을 보였다.

2. SEM 분석

전자현미경소견에서도 양극산화처리만 실시한 대조군과 IBAD 방식으로 HA를 코팅한 실험군의 표면양상은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 다만 HA 코팅 후 800 $^{\circ}$ C의 온도에서 소결한 시편에서는 HA코팅층의 균열이 발견되었다(Fig. 1E).

Table 2. The results of surface roughness tests

	Control	HA100	HA300	HA500	HA800
Ra (μ m)	0.36	0.34	0.37	0.37	0.30
Ry (μ m)	2.62	2.57	2.26	2.46	2.28
Rz (μ m)	2.07	1.90	1.91	2.03	1.72
Sm (μ m)	0.069	0.068	0.076	0.06	0.044
s (μ m)	0.018	0.019	0.018	0.018	0.016

Ra = Average roughness, Ry = Rmax (maximum height roughness), Rz = 10 points median height, Sm = Spacing of surface peaks, s = Mean spacing of local peaks of the profile

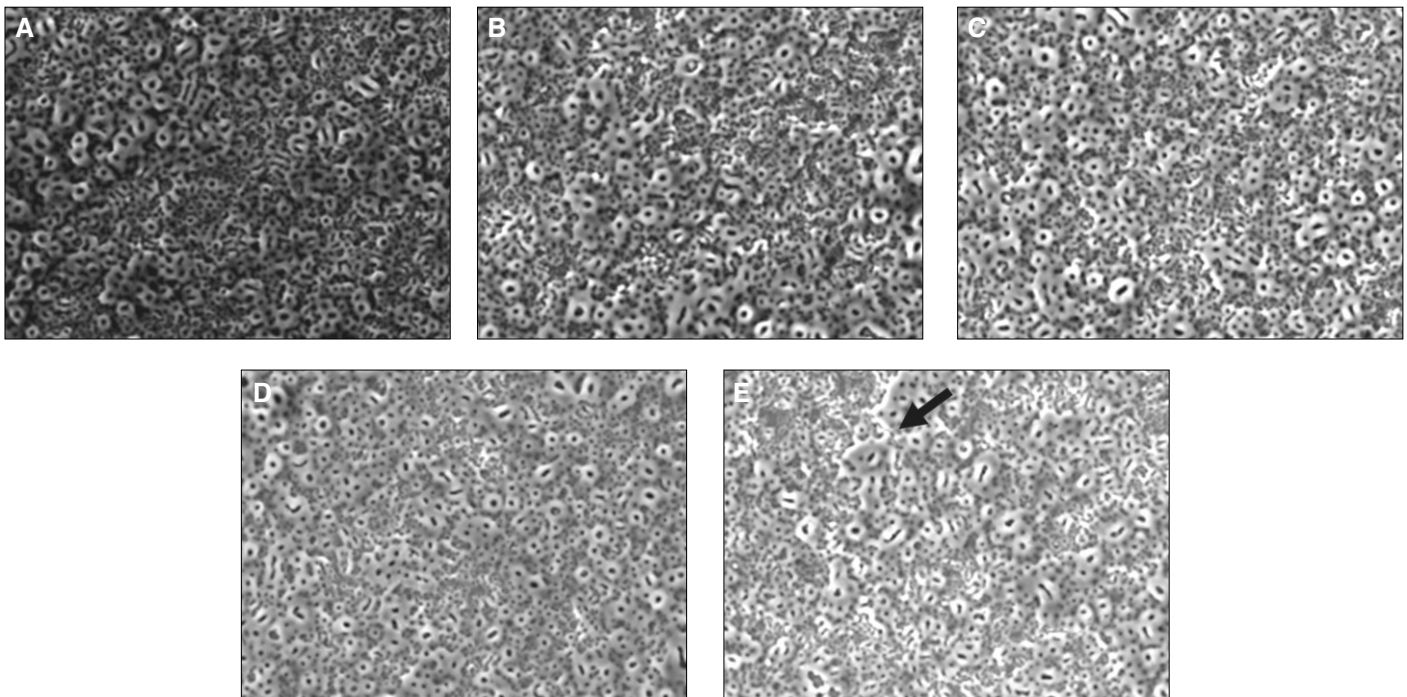


Fig. 1. SEM morphologies ($\times 2,000$). A: anodizing treated (control group), B: HA100, C: HA300, D: HA500, E: HA800 group shows some cracks (indicated arrows).

3. X선회절분석

HA100군과 HA300군에서는 HA의 결정형태가 검출되지 않았으나 HA500 군과 HA800군의 X선회절분석 결과에서는 HA peak가 나타났다. HA100군과 HA300군은 HA가 무정형상태로 존

재하여 X선회절분석에서 HA Peak이 나타나지 않았다. HA500 군에서 미약한 형태로 HA peak가 보이며 HA800군에선 뚜렷한 형태의 HA peak가 관찰되었다($2\theta = 31.773^\circ$). X선회절분석 결과 500 $^\circ\text{C}$ 이상에서 소결한 시편에는 코팅층 내에 HA가 결정상태로 존재한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

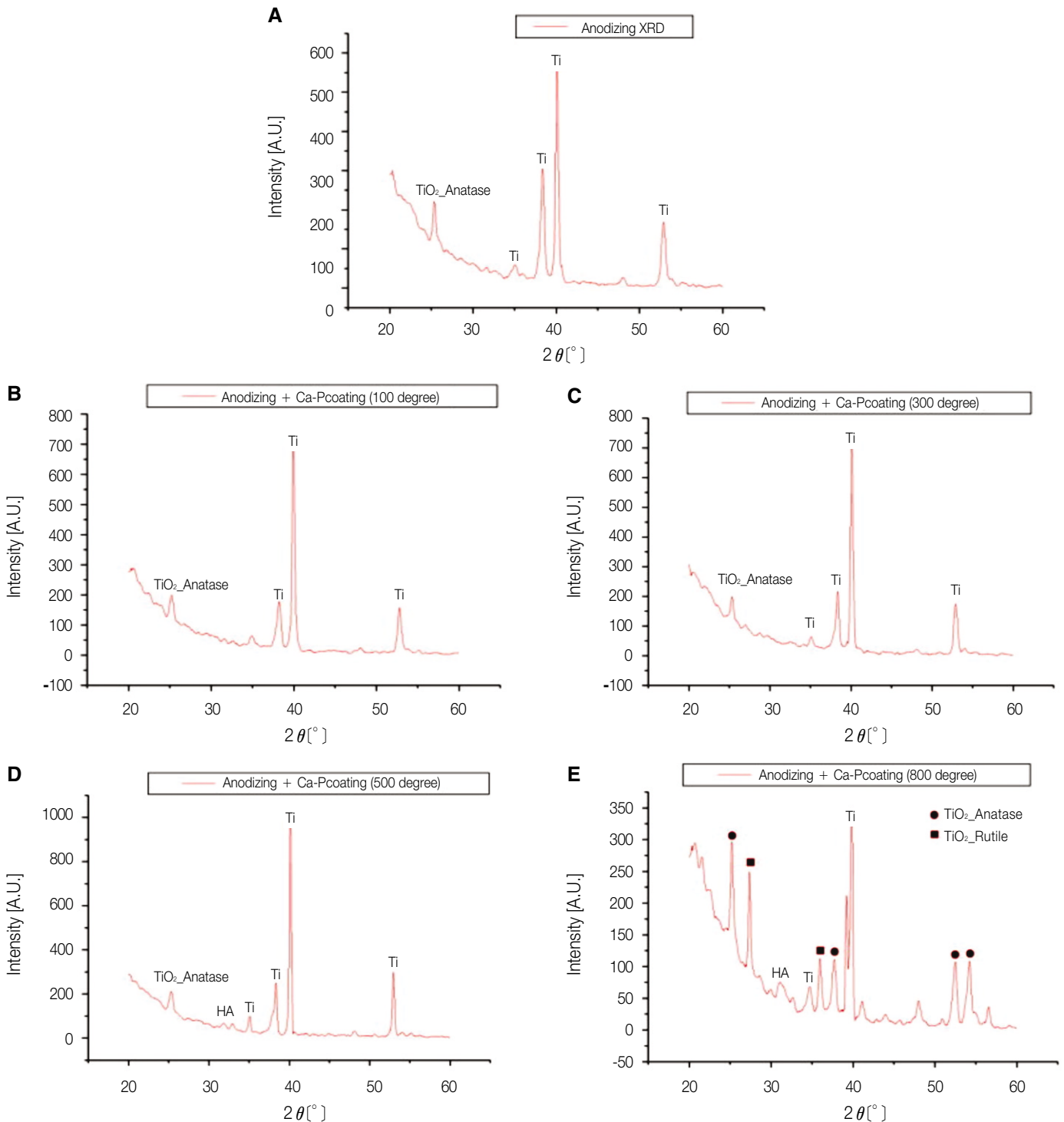


Fig. 2. The results of X-ray diffraction (XRD) test. At HA500 and HA800 group, HA peak appeared but there is no appearance of HA peak at HA100 and HA300 group. A: control group, B: HA100, C: HA300, D: HA500, E: HA800.

4. 세포증식능 평가

1일째에는 대조군과 HA100군과 HA300군에 비해 HA500군과 HA800군에서 비교적 높은 증식능을 보였다. 3일째까지는 이러한 차이가 유지되었으나 5일 이후부터는 별다른 차이 없이 비슷한 증식능을 나타내었다. 통계적 유의성 검증을 위한 ANOVA test 결과 HOS 세포의 증식능은 1일과 3일에서는 유의할 만한 차이를 보였으나($P<.05$) 5일 이후에는 유의할만한 차이를 보이지 않았다($P>.05$)(Table 3).

이에 대한 사후검정(Scheffé's test) 결과 유의차를 보인 1일의 경우대조군과 HA100, HA200군에 비해 HA500군과 HA800 군이 더 좋은 결과를 보였으며 HA500군과 HA800군간의 유의차는 없었다. 3일의결과에서는 HA800군이 가장 좋은 결과를 보였으나 사후검정결과 HA500군과 HA300군과의 유의차는 없었다(Table 3).

5. 알칼리성 인산분해효소 활성도 평가

ALP 활성도 결과는 1, 3일에 비해 5, 7일에서 더 뚜렷이 나타났다(Table 4). ANOVA test 결과 HOS 세포의 ALP 활성도는 3일을 제외한 1, 5, 7일에서 유의할만한 차이를 보였다($P<.05$). 이에 대한 사후검정(Scheffé's test)을 실시한 결과 1일에서는 HA300군에서 가장 높은 ALP활성도를 보였으나, HA500군과 대조군간의 유의차는 없었다. 5일째의 결과에서는 HA800군이 가장 좋은 결과를 보였으며, HA500군이 그 다음으로 좋은 결과를 보였다. 7일째의 결과에서는 HA500군이 가장 좋은 결과를 보였다.

그러나, 7일째의 결과에서 HA500군과 HA800 군간의 유의차는 없었다(Table 4).

고찰

티타늄이 갖는 생체적합성은 티타늄 표면에 형성되는 산화막과 밀접한 관련이 있다. 자연적으로 얻어지는 산화막 외에 티타늄의 생체적합성을 높이기 위해 여러 가지 방법을 이용하여 인위적으로 산화막을 형성해준다. 최근에는 전기화학적방법을 이용하여 티타늄 표면에 산화막을 형성시키는 양극산화법(Micro arc oxidation; Anodizing) 양극산화법을 통해 티타늄 표면에는 다공성의 산화막을 형성한다.² 이렇게 얻어진 다공성의 거친 산화막은 *in vitro* 실험에서 세포의 활성을 증가시키고, *in vivo* 실험에서는 골과 임플란트의 결합을 현저하게 증가시키는 것으로 알려졌다.^{14,15} 이는 표면 거칠기의 증가 외에도 산화막에 Ca와 P가 포함되는 것에도 기인한다. 양극산화법으로 산화막을 형성시킬 때, 전해질로 사용되는 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{CaC}_2\text{H}_3\text{O}_6\text{P}$ 로부터 각각 Ca와 P가 산화막내로 함입되고,¹⁴ Ca와 P는 조골세포의 반응을 향상시켜 골유착을 증진시킨다.¹⁵

산화막의 성질 즉, 산화막의 두께, 미세구조, 거칠기, Ca와 P의 함유 등은 양극산화과정에서 사용되는 전해질의 종류, 농도, 전압, 전류, 시간 등을 조절함으로써 조절 가능하다.¹⁶⁻¹⁸ 양극산화과정에서 전압을 높여주면 생성되는 산화막의 두께도 증가하며 산화막내에 함입되는 Ca, P의 양도 증가한다. 그러나, 계속적으로 두께를 증가시키면 산화막에 균열이 발생하게 되므로 산화막의 두께를 증가시키는 것에는 한계가 있다.⁴

Table 3. Mean (O.D 570) of the MTT assay results

	1 day		3 day		5 day		7 day	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	0.144 ^a	0.005	0.442 ^{c,d}	0.012	1.103	0.014	1.282	0.011
HA100	0.141 ^a	0.003	0.418 ^c	0.014	1.099	0.032	1.274	0.010
HA300	0.140 ^a	0.006	0.458 ^{c,d,e}	0.015	1.098	0.034	1.278	0.016
HA500	0.166 ^b	0.002	0.471 ^{d,e}	0.008	1.105	0.036	1.292	0.040
HA800	0.168 ^b	0.001	0.487 ^{d,e}	0.019	1.107	0.034	1.287	0.014

*Scheffé's test for variable ($P<.05$)

Groups with the same letter are not significantly different.

Table 4. Mean (O.D 405) of the ALP assay results

	1 day		3 day		5 day		7 day	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Control	0.181 ^{abc}	0.002	0.387	0.015	0.535	0.025	0.792	0.017
HA100	0.177 ^{ab}	0.005	0.381	0.061	0.468	0.004	0.576 ^c	0.013
HA300	0.192 ^c	0.006	0.431	0.061	0.466 ^d	0.023	0.616 ^c	0.056
HA500	0.185 ^{bc}	0.004	0.418	0.009	0.592	0.020	1.040 ^f	0.021
HA800	0.169 ^a	0.004	0.435	0.021	0.668	0.014	1.014	0.078

*Scheffé's test for variable ($P<.05$)

Groups with the same letter are not significantly different.

HA는 골과 화학적, 구조적으로 유사한 유기물질로 구성되어 있으며 주변골과 화학적 결합에 대한 생체 활성도를 갖는다. 따라서, 임플란트 표면에 HA를 코팅함으로써 임플란트의 생체적합성을 향상시킬 수 있다. 임플란트로 사용되는 금속표면에 HA를 코팅하는 방법으로는 electrophoretic deposition,¹⁹ dipping,²⁰ hot isostatic pressing,¹⁹ flame spraying,²¹ plasma spraying,²² pulsed laser deposition²³ 등이 있다. 그 동안 가장 광범위하게 사용되었던 plasma spraying 방식은 앞서 언급되었던 금속 표면의 임플란트를 사용할 경우 야기되는 생리적, 면역학적, 화학적 결합에 관한 문제점들을 해결할 수 있는 방식으로 생각되었다. 그러나 plasma spraying 방식은 HA 코팅층이 균일하지 못하고, 인체내에서 HA가 유리되거나 흡수된다는 점과 금속과 HA간의 결합력이 부족하다는 단점을 갖고 있다.²⁴

또한 임플란트의 표면에 HA를 코팅함에 있어 HA의 bioactivity 외에도 코팅층의 결합력이 중요한 요소가 된다. 체내에 식립된 상태에서 임플란트의 표면으로부터 코팅층이 분리되면 이는 임플란트나 그 주위조직에 대해 장기적인 결과에 대해 부정적인 영향을 미칠 수 있다.²⁶

임플란트 표면의 코팅층이 가져야 할 또 다른 중요한 요소는 체내에서의 용해도가 낮아야 한다는 것이다. 이러한 단점들을 극복하기 위해 개발된 방법들 중 IBAD 방식이 새로운 가능성을 보여주고 있다.^{10,11} IBAD 방식을 이용하여 HA를 코팅한 경우 그 결합력은 35 - 70 MPa를 보인다.²⁶ 본 연구에 사용된 IBAD 방식에 의한 HA 코팅층의 두께는 300nm 정도로 기존에 사용된 다른 HA 코팅방식에 의한 두께에 비해 매우 얇은층을 형성한다. 코팅층의 두께를 300 nm의 초박막으로 형성함으로써 양극산화처리에 의해 얻어진 다공성의 표면상태를 유지할 수 있다. 양극산화처리를 통해 얻어진 표면 거칠기의 평균값(Ra)은 0.36 μ m에 불과하므로 코팅층의 두께를 더 증가시킨다면 양극산화처리를 통해 얻어진 표면의 pore가 막힐 수 있으며 거칠기도 감소하게 된다. Martin 등²⁷과 Mustafa 등²⁸은 각각 그들의 실험에서 티타늄 표면의 거칠기를 증가시킬 경우 세포들의 증식능과 분화능이 증가한다는 것을 보였다. 사용된 시편에 대한 표면 거칠기 측정에서 양극산화처리만 실시한 대조군의 거칠기에 비해 HA를 코팅한 후의 표면 거칠기가 별다른 차이를 보이지 않음을 알 수 있다. 이는 주사전자현미경사진에서도 관찰 가능하다. 따라서, 본 연구에 사용된 시편의 표면처리에 있어 양극산화처리를 통해 증가된 표면 거칠기의 장점을 HA 코팅층의 형성 후에도 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

IBAD 방식으로 얻어진 무정형상태의 HA는 수용액 내에서 결정화 상태의 HA에 비해 높은 용해도를 보인다. 코팅된 HA의 용해도는 HA의 결정화 상태에 영향을 받는다. 따라서, HA의 용해도를 개선시키기 위해서는 HA를 결정화 상태로 바꿔줄 필요가 있으며 이를 위해 HA의 소결 과정을 거치게 된다.

각 실험군에 대한 X선회절분석 결과를 보면 HA100군과 HA300군은 HA의 결정상이 보이지 않으나 HA500군과 HA800군은 HA의 결정상이 나타남을 알 수 있다. Yang 등²⁹은 소결 온도

에 따른 HA 코팅층의 결정화 정도를 측정하였는데 400℃에서 소결한 경우 결정화도는 $1.9 \pm 0.4\%$ 이고 600℃에서 소결한 경우 결정화도는 $66.4 \pm 2.8\%$ 였다. 따라서, HA100군과 HA300군의 경우 코팅된 HA층은 무정형 상태로 존재하고 HA500군과 HA800군에서는 무정형 상태와 결정형 상태가 혼재된다고 생각된다. 그러나, HA의 결정화를 얻기 위해 소결하는 경우 소결온도가 높아질수록 HA 코팅층은 결정화가 일어남과 동시에 코팅층과 금속간의 열팽창계수의 차이로 인해 HA의 균열이 발생할 수 있다.³⁰ 이러한 균열은 코팅층의 결합력을 감소시키는 원인이 된다. HA800군의 주사전자현미경사진에서 HA층내의 미세한 균열을 발견하였다. 양극산화과정 중 전압을 높여 주면 산화막의 균열이 일어날 수 있다. 그러나, 주사전자현미경사진상에서 HA800군에서만 균열이 발생한 것으로 보아 이는 높은 소결 온도에 의한 균열로 판단된다.

본 실험결과 결정화된 HA가 존재하는 HA500군과 HA800군에서 다른 두 그룹에 비해 높은 ALP 활성도와 단백질합성을 나타냈다. de Bruijn 등³¹은 높은 용해도를 갖는 HA 코팅층이 낮은 용해도를 갖는 코팅층에 비해 더 우수한 골형성능을 보인다고 하였으며 무정형의 HA 코팅층에서 배양된 세포들이 결정화된 코팅층에서 배양된 세포들에 비해 더 높은 osteogenic differentiation을 보였다. 반면에 Ferraz 등³²의 *in vitro* 실험에서는 HA의 용해가 골형성과 osteogenic differentiation을 방해하는 것으로 밝혀졌다.

본 실험은 비교적 단기간에 걸쳐 세포의 반응을 평가하였으며 배양된 세포를 이용한 제한된 환경에서의 실험이었으므로, 생체내에서 반응을 예측하기 위한 기본 정보로 활용할 수 있으나, 장기간에 걸친 생체반응을 평가하는 데는 미흡할 것으로 생각된다. 따라서, *in vivo* 실험을 통한 더 깊은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

결론

티타늄 시편의 표면을 양극산화방식으로 산화막을 형성한 후 IBAD 방식으로 HA를 코팅하고, 각각 100℃, 300℃, 500℃, 800℃에서 소결하여 HA 코팅층의 결정화도를 조골세포의 증식능과 분화도를 측정하였다. 양극산화 처리된 티타늄 표면에 이온빔보조증착법을 이용하여 수산화인회석을 코팅 후 소결할 때 500℃의 소결온도가 수산화인회석 코팅층의 결정화와 HOS 세포의 증식과 분화에 효과가 좋은 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 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;17:536-43.
2. Ishizawa H, Ogino M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. J Biomed Mater Res

- 1995;29:65-72.
3. Yerokhin AL, Nie X, Leyland A, Matthews A, Dowey SJ. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surf Coat Technol* 1999;122:73-93.
4. Li LH, Kim HW, Lee SH, Kong YM, Kim HE. Biocompatibility of titanium implants modified by microarc oxidation and hydroxyapatite coating. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:48-54.
5. Brossa F, Cigada A, Chiesa R, Paracchini L, Consonni C. Post-deposition treatment effects on hydroxyapatite vacuum plasma spray coatings. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:855-7.
6. Rohrer MD, Sobczak RR, Prasad HS, Morris HF. Postmortem histologic evaluation of mandibular titanium and maxillary hydroxyapatite-coated implants from 1 patient. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:579-86.
7. Hanisch O, Cortella CA, Boskovic MM, James RA, Slots J, Wikesjö UM. Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. *J Periodontol* 1997;68:59-66.
8. Liao H, Fartash B, Li J. Stability of hydroxyapatite-coatings on titanium oral implants (IMZ). 2 retrieved cases. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:68-72.
9. Watson CJ, Tinsley D, Ogden AR, Russell JL, Mulay S, Davison EM. A 3 to 4 year study of single tooth hydroxylapatite coated endosseous dental implants. *Br Dent J* 1999;187:90-4.
10. Jung YC, Han CH, Lee IS, Kim HE. Effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the osseointegration of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:809-18.
11. Le IS, Kim DH, Kim HE, Jung YC, Han CH. Biological performance of calcium phosphate films formed on commercially pure Ti by electron-beam evaporation. *Biomaterials* 2002;23:609-15.
12. Overgaard S, Bromose U, Lind M, Bünger C, Søballe K. The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants. Mechanical and histomorphometric results. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:725-31.
13. Oh S, Tobin E, Yang Y, Carnes DL Jr, Ong JL. In vivo evaluation of hydroxyapatite coatings of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:726-31.
14. 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;24:3893-907.
15. Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, Koak JY. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* 2004;25:2867-75.
16. Ishizawa H, Ogino M. Characterization of thin hydroxyapatite layers formed on anodic titanium oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1071-9.
17. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Med Eng Phys* 2001;23:329-46.
18. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 2002;23:491-501.
19. Hirai T, Ishijima T, Hashikawa Y, Yajima T. Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. *J Prosthet Dent* 1993;69:49-56.
20. Lacefield WR. Hydroxyapatite coatings. *Ann N Y Acad Sci* 1988;523:72-80.
21. Dunn B, Reisbick MH. Adherence of ceramic coatings on chromium-cobalt structures. *J Dent Res* 1976;55:328-32.
22. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process-an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 2005;26:327-37.
23. Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxyapatite-coated titanium for orthopedic implant applications. *Clin Orthop Relat Res* 1988;232:225-43.
24. Cui FZ, Luo ZS, Feng QL. Highly adhesive hydroxyapatite coatings on titanium alloy formed by ion beam assisted deposition. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:403-5.
25. Wang S, Lacefield WR, Lemons JE. Interfacial shear strength and histology of plasma sprayed and sintered hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 1996;17:1945-70.
26. Choi JM, Kong YM, Kim S, Kim HE, Hwang CS, Lee IS. Formation and characterization of hydroxyapatite coating layer on Ti-based metal implant by electron-beam deposition. *J Mater Res* 1999;14:2980-5.
27. 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.
28. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:515-25.
29. Yang Y, Bumgardner JD, Cavin R, Carnes DL, Ong JL. Osteoblast precursor cell attachment on heat-treated calcium phosphate coatings. *J Dent Res* 2003;82:449-53.
30. Chen J, Tong W, Cao Y, Feng J, Zhang X. Effect of atmosphere on phase transformation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings during heat treatment. *J Biomed Mater Res* 1997;34:15-20.
31. de Bruijn JD, Bovell YP, van Blitterswijk CA. Structural arrangements at the interface between plasma sprayed calcium phosphates and bone. *Biomaterials* 1994;15:543-50.
32. Ferraz MP, Fernandes MH, Santos JD, Monteiro FJ. HA and double-layer HA-P2O5/CaO glass coatings: influence of chemical composition on human bone marrow cells osteoblastic behavior. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:629-38.

The effect of different crystallization temperature of the hydroxyapatite coating produced by ion beam-assisted deposition on anodizing-treated titanium disks on human osteosarcoma cells

Ahran Pae, DMD, MSD, PhD, Hyun-Du Won, DMD, MSD, PhD, Richard Leesungbok, DMD, MSD, PhD,

Hyeong-Seob Kim, DMD, MSD, PhD, Yi-Hyung Woo*, DMD, MSD, PhD

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Purpose: The aim of this study was to study the effect of hydroxyapatite (HA) coating crystallinity on the proliferation and differentiation of human osteosarcoma cells. **Materials and methods:** Surface roughness of the titanium disks increased by anodizing treatment and then HA was coated using ion beam-assisted deposition (IBAD). HA coating was crystallized by heat-treated at different temperature (100°C, 300°C, 500°C, 800°C). According to the temperature, disks were divided into four groups (HA100, HA300, HA500, HA800). With the temperature, crystallinity of the HA coating was different. Anodized disks were used as control group. The physical properties of the disk surface were evaluated by surface roughness tests, XRD tests and SEM. The effect of the crystallinity of HA coating on HOS cells was studied in proliferation and differentiation. HOS cells were cultured on the disks and evaluated after 1, 3, 5, and 7 days. Growth and differentiation kinetics were subsequently investigated by evaluating cell proliferation and alkaline phosphatase activity. **Results:** Regardless of the heat-treated temperature, there is no difference on the surface roughness. Crystallinity of the HA was appeared in the groups of HA500, HA800. HOS cells proliferation, ALP activity were higher in HA500 and HA800 group than HA100 and HA300. **Conclusion:** Within the results of this limited study, heat treatment at 500°C of HA coating produced by IBAD has shown greater effect on proliferation and differentiation of HOS cells. It is considered that further *in vivo* study will be necessary. (*J Korean Acad Prosthodont* 2011;49:333-40)

Key words: Cell proliferation; Alkaline phosphatase activity

*Corresponding Author: Yi-Hyung Woo

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul, 130-701, Korea

+82 2 958 9340: e-mail, yhwuoo@khu.ac.kr

Article history

Received October 12, 2011 / Last Revision October 20, 2011 / Accepted October 24, 2011