

Modified simulated body fluid에 침전한 티타늄 표면에서 침전 기간에 따라 나타나는 파골 세포의 분화억제 양상

장현민 · 허성주 · 김성균 · 곽재영*

서울대학교 치과대학 치과보철학교실

Inhibition of Osteoclast differentiation based on precipitation time of titanium surfaces immersed in modified simulated body fluid

Hyun-min Chang, Seong-Joo Heo, Seong-Kyun Kim, Jai-Young Koak*

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

Purpose: The purpose of this study is to investigate the changes of osteoclast differentiation inhibition according to the period of precipitation when titanium disks were immersed in Modified simulated body fluid (mSBF). **Materials and methods:** Titanium alloy (Ti grade III) disks with machined surfaces and anodized surfaces were immersed in distilled water and mSBF, respectively. The immersion periods were 7 days, 14 days, 21 days and 28 days, and the control group was immersed in distilled water for each period. RAW 264.7 cells capable of differentiating into osteoclasts were used to measure the number of adherent cells, the measurement of TRAP activity, and the expression pattern of NFATc1 by western blotting. **Results:** The degree of inhibition of osteoclast differentiation was found to be statistically significant when the disks were immersed in mSBF for more than 14 days on both machined surfaces and anodized surfaces. There was no correlation between immersion time and cell attachment. When the disks were immersed for more than 14 days, TRAP activity was decreased and NFATc1 expression was inhibited. Furthermore, the decrease in TRAP activity and the inhibition of NFATc1 expression remained unchanged. **Conclusion:** Immersion of titanium disks in mSBF for more than 14 days can prevent RAW 264.7 cells from differentiating into osteoclasts. Inhibition activity does not change even if the immersion period is for more than 14 days. (*J Korean Acad Prosthodont* 2019;57:142-9)

Keywords: Modified simulated body fluid (mSBF); Titanium alloy disk; Osteoclast differentiation; TRAP; NFATc1

서론

치과용 골내 임플란트는 무치악 및 부분 무치악 환자의 치아 상실 부위 수복을 위해 보편적으로 사용하고 있다. 임플란트의 골 유착(Osseointegration)은 광학현미경으로 관찰하였을 때 임플란트의 표면과 골이 섬유조직의 개재 없이 직접적으로 접촉하는 상태이다.¹ 성공적으로 골 유착된 임플란트로 수복한 치아는 임상적으로 저작력을 견딜 수 있으며, 장기간 성공적으로 기능

할 수 있다. Brånemark 등²이 티타늄 임플란트의 골 유착 현상을 보고한 이후 현재는 더욱 신속하고 밀접한 골 유착을 얻기 위한 연구가 지속되었다.

임플란트의 성공적인 골 유착에 영향을 미치는 요소는 임플란트를 식립 부위의 골조직 상태, 수술 방식, 임플란트와 골 사이의 적합도 등 생물학적인 요인과 함께, 임플란트 재료의 생적합성(biocompatibility), 임플란트의 형태적 특성, 표면 거칠기 및 표면처리 방법 등 매식체의 특성에 영향을 받는다.³ 특히 식립된 임

*Corresponding Author: Jai-Young Koak

Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Seoul National University
101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Republic of Korea
+82 (0)2 2072 2661; e-mail, young21c@snu.ac.kr

Article history: Received March 25, 2019 / Last Revision April 15, 2019 / Accepted April 18, 2019

© 2019 The Korean Academy of Prosthodontics

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

※ This study was supported by Seoul National University Dental Hospital Research Center (04-2014-0079).

플란트의 표면은 골 유착에 관여하는 주변 조직 및 세포들과 직접적인 상호작용을 하는 부위로서, 골 유착의 속도 및 강도와 질 모두에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 보다 효율적인 골 유착을 이루기 위해, 임플란트 표면을 변화시키기 위한 많은 시도가 있었다. Grit-blasting, 화학적인 산 부식, 전기 화학적인 부식 등의 방법을 통해 거친 표면을 가진 임플란트는 보다 빠르고 질 높은 골 유착 양상을 보여주었다. 거친 표면을 가진 임플란트는 이미 상용화된 임플란트 표면에 적용되었으며, 임상적으로 효과적임이 증명되었다.⁴

최근에 이루어지는 임플란트의 표면에 대한 연구는 임플란트 표면의 생물학적 특성을 변화시키는 방법이다. 임플란트 표면의 생물학적 특성을 변화시키는 잘 알려진 방법 중 하나는 임플란트 표면의 친수성을 증가시키는 것이다.⁴ 표면에너지를 증가시켜서 친수성이 증가한 임플란트 표면은 혈액, 조직액의 접합도가 증가하게 된다. 임플란트를 골 내에 위치시키면, 조직액 내의 Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- 등의 이온이 표면에 정전기적인 힘을 통해 결합한다. 결합한 이온을 매개로 알부민 등의 단백질, 세포외 기질 (Extracellular matrix)과의 상호 작용하게 되고, 이러한 연결 고리를 통해 세포들의 부착하고, 분열하여 증가하게 된다. 세포의 분열과 분화가 진행되면서 신생골이 형성되고, 골 유착이 일어나게 된다. 이러한 과정은 임플란트 표면에서 일어나며, 임플란트 표면의 생화학적, 생리화학적 특성과 밀접하게 연관되어 있다.⁵ 친수성 표면을 가진 임플란트는 그렇지 않은 임플란트와 비교하였을 때, 수술부위 주변 골 형성이 보다 촉진되는 것이 보고되었다.⁶

임플란트 표면의 친수성을 증가시키는 방법으로 개발된 방법 중 한 가지는 거칠게 처리된 임플란트 표면을 세척할 때 공기 중에 노출되지 않도록 Nitrogen protection을 하는 것이다 (SLActive, Straumann, Waldenburg, Switzerland).⁷ 다른 방법으로는 티타늄 임플란트 표면에 UV를 조사하여 임플란트 표면의 친수성을 증가시키는 방법이 있다.⁸

임플란트 표면의 친수성을 증가시키는 방법 중 하나는, Biomimetic deposition을 통해 티타늄 표면에 Calcium Phosphate (CaP)를 침착시키는 방법이다.⁹ Biomimetic deposition 이란, 37°C pH 7.4에서 Simulated body fluid (SBF)에 담가두면, 생체 활성화 능력이 있는 아파타이트(apatite) 층이 형성되는 현상이다.¹⁰ Kokubo 등¹⁰이 소개한 SBF는 인간 혈장과 비슷한 이온 조성을 가진 용액으로 아파타이트 결정을 형성할 수 있는 과포화 용액이다. Bohnert와 Lemaitre¹¹는 SBF를 이용한 Biomimetic depositon을 보다 안정적으로 일어나도록 SBF의 이온의 조성 및 제조 방법을 개선하였다. 개선한 용액을 Modified simulated body fluid (mSBF)라 하는데, 불안정한 과포화 용액인 SBF를 두 개의 용액으로 나누어 제조하고, 침전반응시키기 전, 혼합하였을 때, CaP 침전이 일어나도록 하였다. mSBF에 침전시킨 machined surface와 anodized surface 티타늄의 표면에서 친수성이 증가하고, 표면에너지가 증가하는 것이 발견되었다. 주사 전자현미경으로 관찰결과 티타늄 표면에는 CaP 침전이 관찰되었

다.¹²

임플란트에 가해지는 기능적 하중이 기저 골에 제대로 전달되려면, 임플란트 주변으로 생성된 신생골이 기존의 골과 구분 없이 하나가 되어야 한다. 이러한 과정은 리모델링을 통해서 일어난다.¹³ 세포(osteoblast)에 의한 신생골의 생성과 파골 세포(osteoclast)에 의한 기존 골의 흡수를 통해서 리모델링이 일어나는데, 이 과정은 정밀한 조절이 필요하다. 균형을 잃어 어느 한 쪽이 지나치게 강화되면, 골화석증이나, 골다공증이 일어나게 된다. 임플란트의 골 유착 과정에서 조골 세포와 파골 세포의 작용은 필수적이며, 임플란트 표면의 변화에 따른 세포의 반응은 골 유착에 직접적인 영향을 미칠 수 있다.⁹

거친 표면을 가진 티타늄을 mSBF에 침전 시켜, CaP가 침전된 표면을 가지게 되면, 조골 세포와 파골 세포의 기능에 영향을 미치게 된다. 조골 세포 기원의 Cell line의 경우, mSBF에 침전시킨 티타늄 표면에서 세포의 부착 및 분화가 촉진 되는 효과가 관찰되었다.¹² 파골 세포로 분화할 수 있는 RAW264.7 세포는 mSBF에 침전시킨 티타늄 디스크에서 세포의 부착에는 영향이 없었으나, 파골 세포로의 분화가 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 효과는 machined surface 보다 anodized surface를 가진 티타늄 디스크에서 더 크게 관찰되었다.¹⁴ 임플란트 표면에서 조골 세포의 분화는 촉진 되고, 파골 세포의 분화는 억제되는 현상은 신생골 생성을 촉진하는 결과를 예상할 수 있다.

mSBF에 단순히 침전시키는 것만으로 임플란트 표면의 변화를 주는 것이 가능하며, 이러한 변화가 세포와의 상호작용에 변화를 주는 것을 알 수 있다. mSBF에 침전시킨 기간에 따라 세포에 미치는 영향이 어떻게 달라지는지는 알려져 있지 않다. Biomimetic deposition은 매우 천천히 일어나는 과정이며, 불안정한 과정으로 알려져 있다.¹¹ 따라서 침전 시간에 따라 티타늄 디스크가 세포에 미치는 영향이 어떻게 달라지는지 확인해 볼 필요가 있다. 침전 시간에 따라서 티타늄 표면에서 나타나는 파골 세포 분화를 억제시키는 현상이 어떻게 달라지는지 알 수 있다면, 최적화된 효과를 낼 수 있는 침전 시간을 알 수 있다. 본 연구에서는 mSBF의 침전 시간에 따른 파골 세포의 부착 및 분화와 활성화도에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 티타늄 디스크

25 mm diameter의 티타늄 합금 강봉(Ti grade III)을 1 mm 두께로 잘라서 원판형으로 제작하였다. Machined surface는 초음파로 20분간 세척 후 99% 에탄올로 20분간 세척 시행하여, 증류수에 보관하였다. Anodized surface는 직류 70 A/m², 300 V로 3분간 시행하였고, 전해질로는 0.15 M calcium acetate monohydrate와 0.02 M calcium glycerophosphate 사용하였다. 양극산화 후 99% 에탄올로 세척 후 증류수에 보관하였다. Ethylene oxide gas로 멸균 시행하였다.

2. Modified simulated body fluid (SBF) 침전

mSBF의 조성은 Bohner와 Lamitres가 제시한 방법대로 mSBF를 제작하였으며, 조성은 Table 1과 같다.¹¹ 과포화된 용액 내에서 우발적인 CaP 침전물 형성을 막기 위해서 안정적인 두 개의 용액을 제작한다. 티타늄 디스크에 침전하기 직전 두개의 용액을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 각각의 solution은 제작 후 0.2 µm NALGENE filter로 ultrafiltration을 진행하였다. 티타늄 디스크를 4개의 군으로 나눠서 침전 시켰다. Table 2와 같이 나누어서 정해진 시간만큼 침전 시행하였으며, 침전이 끝난 디스크에는 세포 배양을 실시하였다.

3. 세포 배양

RAW 264.7 macrophage/monocyte cells (TIB-71, ATCC)를 티타늄 디스크 표면에서 배양하였다. 6-well plate에 티타늄 디스크를 하나씩 넣어 mSBF로 침전 시킨 후, 증류수를 mSBF와 동일한 양으로 5회 세척 하였다. 세척 후 5×10^4 cells/well로 점주 하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Rockville, MD, USA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin을 포함한 Minimum Essential Medium Alpha (α-MEM, Gibco, NY, USA)을 사용하였다. 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 점주 후 1일 경과하여 100 ng/ml의 mouse

RANKL을 넣어 분화를 유도하였다.

4. Cell counting assay

각각 주어진 시간만큼 mSBF에 침전시킨 티타늄 디스크를 넣은 6-well plate에 RAW264.7 세포를 5×10^4 cells/well로 점주 한 후 RANKL을 처리하지 않고 3일간 cell culture를 진행하였다. 이 후 티타늄 디스크를 새로운 6-well disc로 옮겨, 디스크에 붙어있는 세포들만을 CCK-8 kit (Sigma aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 그룹별로 3번의 test를 진행하였으며, 3회 측정하였다.

5. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity assay

mSBF에 침전시킨 디스크를 6-well plate에 옮겨 RAW264.7 세포를 5×10^4 cells/well로 점주 한 후 세포 배양을 시행하였다. 1일 후 RANKL을 첨가하여 분화신호를 준 후 6일간 배양하였다. TRACP assay kit (Takara, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 무색의 p-nitrophenol phosphate (pNPP)가 유색 물질인 p-nitrophenol로 변하는 반응을 통해 효소의 활성도를 측정하며, 분화된 파골세포의 활성도를 측정하는 데 사용된다. 흡광도는 spectrophotometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 405 nm에서 측정하였다.

Table 1. Dual solution preparation of modified SBF (amounts to a final mixture of 2L)

Starting materials			Weights of starting materials (g/L)	
Formula	MW [g/mol]	purity [-]	Modified SBF	
			Sol. A	Sol. B
NaCl	58.44	99.5%	6.213	6.213
NaHCO ₃	84.01	99.5%	5.948	
KCl	74.55	99.5%	0.450	
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	228.22	99.0%	0.462	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203.31	98.0%	0.622	
CaCl ₂	110.99	95.0%		0.584
Na ₂ SO ₄	142.04	99.0%	0.144	
Volumes of HCl solution (ml/L)				
HCl 1.00 M	Aq. Sol.	[mL/L]	0.850	0.850

SBF: simulated body fluid.

Table 2. 4 Groups according to treatment method

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Surface	Machined	Machined	Anodized	Anodized
Solution	DW	mSBF	DW	mSBF

mSBF: Modified simulated body fluid, DW: distilled water.

6. Western blot

RAW264.7 세포를 점주한 후 1일 뒤에 RANKL을 투여하고, 3일간 배양 하였다. PBS로 washing 후 디스크에 붙어있는 세포를 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 10 μM PMSF, 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 1% NP-40)로 떼어낸 뒤에 20분간 lysis를 진행하였다. 이후 8% SDS-PAGE를 통해 protein을 크기 별로 분리한 후 nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany)에 이동시킨 후 NFATc1 antibody에 반응시켰다. 이후 enhanced chemiluminescence (ECL) reagent를 이용하여 해당 단백질의 양을 측정하였다. 단백질 양의 대조군으로 β -actin을 사용하였다.

결과

1. Cell adhesion test

mSBF에 침전 시킨 기간에 따라 RAW264.7 세포가 티타늄 디스크에 부착하는 정도에 영향을 미치는지 여부를 알아보았다. mSBF에 7, 14, 21, 28일간 침전 시킨 티타늄 디스크에 붙어있는 세포들의 수를 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. Anodized surface나 machined surface, 사이에 유의한 차이는 없었으며, 침

전 기간에 따라서도 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

2. TRAP activity assay

TRAP 활성도는 파골 세포의 분화 정도에 따라 증가한다. TRAP 활성도를 측정하여, mSBF에 침전 시킨 기간에 따라 티타늄 디스크에서 파골 세포의 분화 정도를 알 수 있다. mSBF를 침전 시킨 기간에 따른 TRAP 활성도는 Fig. 2와 같다. 14일 이상 침전 시킨 티타늄 디스크에서는 machined surface, anodized surface 모두에서 TRAP activity가 감소하는 것이 관찰되었다. 7일을 침전 시킨 디스크에 대비해서 14일 침전 시킨 디스크에서 TRAP 활성도의 감소가 통계적으로 유의한 수준으로 감소하였다. 14일 이상 침전 시킨 디스크들 사이에서는 TRAP 활성도는 큰 차이가 나타나지 않았다. 28일 침전 시켰을 때, 14일, 21일 침전 시킨 디스크 보다 TRAP 활성도가 다소 증가하였으나, 통계적으로 유의한 수준은 아니며, 7일간 침전 시킨 디스크나, 침전 시키지 않은 디스크에 비해서는 TRAP 활성도가 통계적으로 유의한 수준으로 감소하였다.

3. Western blot for osteoclast differentiation marker

RAW264.7 세포에 RANKL을 처리하고 나서 약 6일 정도 지

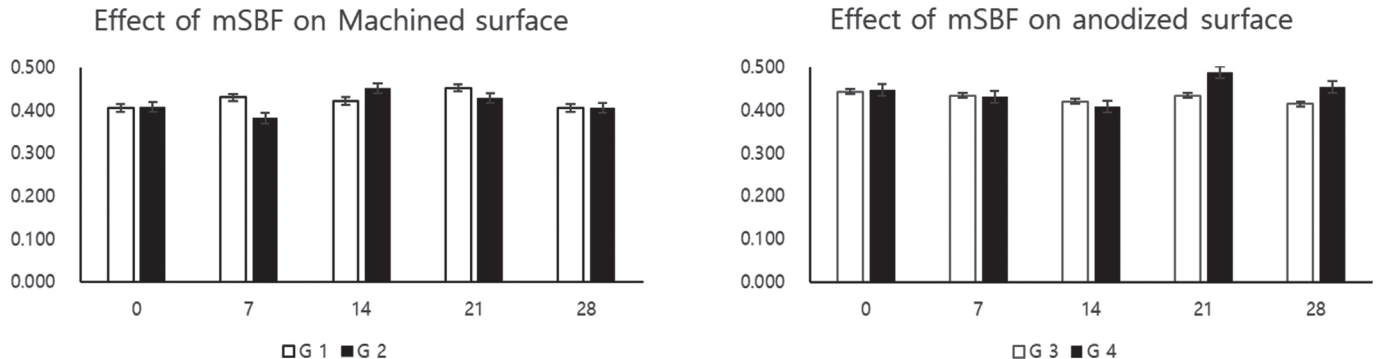


Fig. 1. Cell counting test. There is no significant difference among the groups. Deposition period dose not affect cell adhesion.

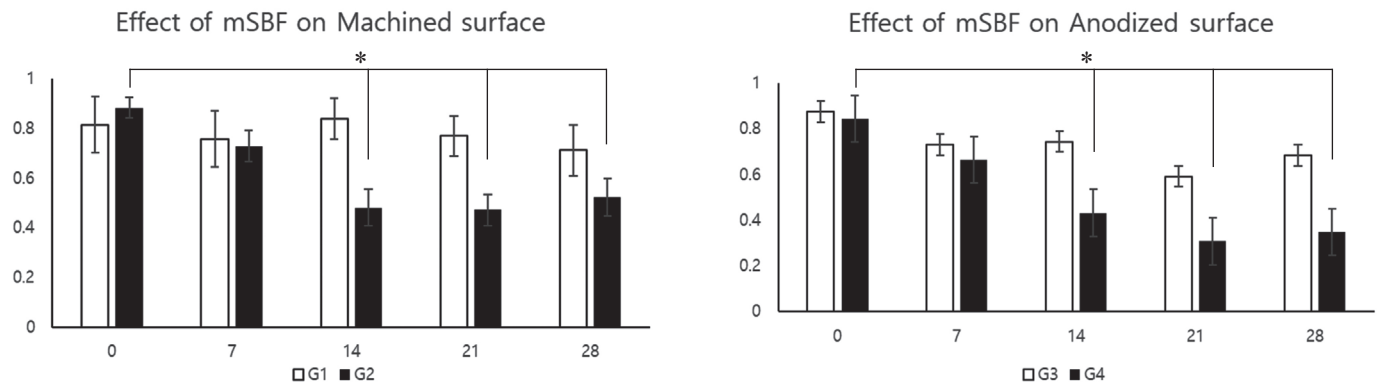


Fig. 2. TRAP activity on Ti disc. More than 14 days deposition period, TRAP activity was reduced regardless of surface roughness. * $P < .05$

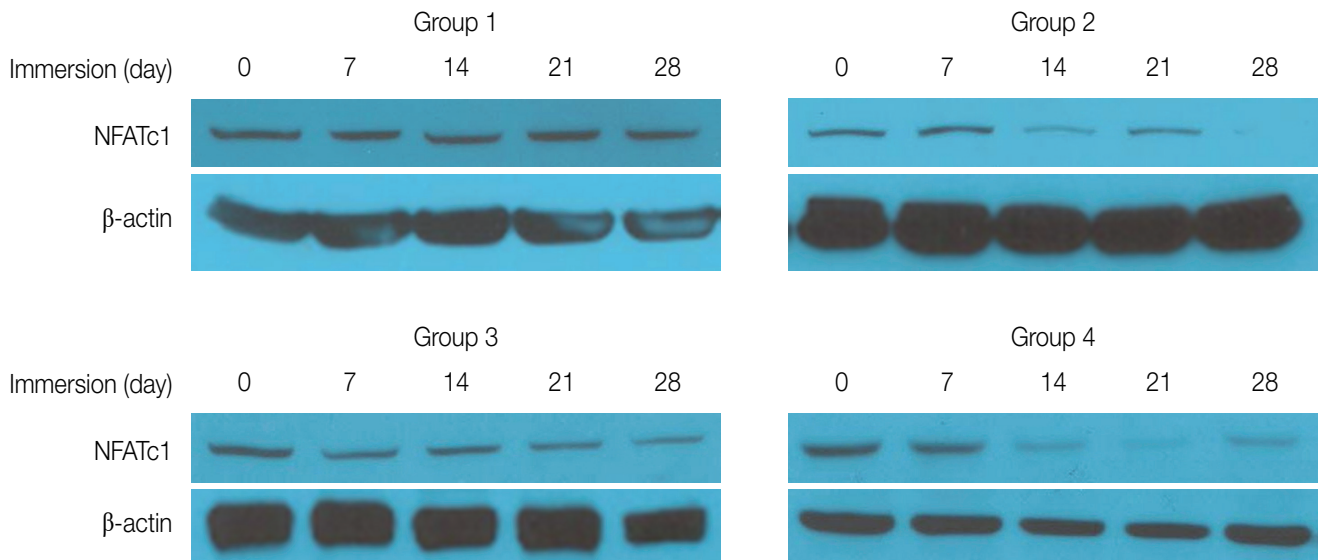


Fig. 3. Western blot of NFATc1, β -actin. Group 2, 4 show decreased expression of NFATc1 after 14 days deposition. NFATc1 expression of 0, 7 days deposition were not different among group 1 - 4. Group 1, 3 show constant expression of NFATc1. NFATc1 is a final signal transducer of osteoclast differentiation. β -actin is a control of protein expression.

난 후에 NFATc1의 발현을 관찰할 수 있다. mSBF에 침전시킨 티타늄 디스크에서 NFATc1의 발현 양상은 Fig. 3과 같다. TRAP assay와 유사하게 14일 이상 침전 시킨 디스크는 machined surface, anodized surface 모두에서 NFATc1의 발현이 감소한 것이 관찰된다. 7일간 침전 시킨 디스크에서는 각 그룹간에 차이가 나타나지 않는다. 14일 이상 침전 시킨 디스크에서는 NFATc1의 발현량의 약간의 변화는 관찰되나, 0, 7일 침전 시킨 디스크에 비해서는 발현량이 감소한 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 TRAP 활성도와 일치하는 양상을 보여준다.

고찰

mSBF에 침전 시킨 Ti disc의 표면은 친수성이 증가하며, 표면 에너지가 증가한다.¹² mSBF에 의한 표면 성질의 변화는 정도의 차이는 있으나, Machined surface와 Anodized surface 모두에서 공통적으로 나타난다. 이러한 변화는 조골 세포의 분화와 활성을 증가시키고, 파골세포의 분화를 억제하는 특성을 보인다.¹⁴ mSBF에 침전 시킨 시간의 변화에 따라서 티타늄 표면에서 파골 세포의 분화 양상이 어떻게 변화하는 지에 대해서는 알려진 바가 없었다.

티타늄 표면에 따라서 Machined surface와 Anodized surface 그리고 증류수에 침전시킨 실험군과 mSBF에 침전시킨 군 등 총 4개의 처리군으로 나누어 연구를 진행하였다 (Table 2). mSBF에 침전하는 것이 파골 세포의 부착 및 생존에 미치는 영향을 알아보았다. RAW264.7 세포는 파골 세포의 전구 세포인 Macrophage, monocyte로 RANKL을 배양액에 첨가하면, 파골

세포로 분화하는 능력을 가진 세포이다. 파골 세포의 분화 과정 및 분화에 영향을 미치는 요인에 대한 연구를 하기에 적절한 세포주이다.¹⁵ 분화 신호를 주지 않은 상태의 세포의 표면 부착 및 생존에 mSBF의 침전 시간이 영향을 미치는지 여부를 알아보았다. Fig. 1에 보이는 바, mSBF에 침전시키는 것은 RAW264.7 세포의 부착 및 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. mSBF를 처리하지 않은 상태의 machined surface와 anodized surface를 가진 티타늄 디스크 사이에서도 유의한 차이는 보이지 않았다. 침전 시간에 따른 변화 양상도 일관되지 않는 양상을 보였다.

RAW264.7 세포가 RANKL에 의해 성공적으로 파골 세포로 분화하게 되면, TRAP activity가 증가한다. 파골 세포는 기존의 골을 흡수하는 역할을 하며, 이때 중요한 역할을 하는 효소가 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 이다.¹³ TRAP의 활성도의 측정은 곧 파골 세포의 활성화 정도와 밀접하게 연관된다. mSBF에 침전 시킨 시간에 따른 TRAP 활성은 Fig. 2와 같다. machined surface, anodized surface 모두에서 침전 14일 이상 된 group에서 TRAP 활성의 감소가 보였다. 침전 7일차에도 TRAP 활성 감소가 관찰되었으나, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없다. 14일 이상 침전 시킨 그룹들 간의 차이는 크지 않았으며, 더 오래 침전 시킨다 해도 TRAP 활성이 그에 비례하여 감소하지는 않았다. 28일 침전시킨 anodized surface 티타늄 디스크에서는 14일차 보다 TRAP 활성이 증가하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이를 통해 mSBF에 티타늄 디스크를 14일 이상 침전시키면 생물학적인 활성이 충분히 나타나며, 더 오랫동안 침전 시켜도 특성의 변화는 없다는 것을 알 수 있다.

RAW264.7 세포에 RANKL이 작용하면, 여러 가지 신호전달

과정을 통해 많은 전사인자가 유도된다.¹⁶ NFATc1은 이러한 전사 인자들과 결합하여 파골 세포에 특징적인 유전자의 발현을 일으키는 전사 인자이다. 그래서 NFATc1의 발현은 RAW264.7 세포가 파골 세포로 성공적으로 분화하는 것을 알 수 있는 표지자 중 하나이다.¹⁷ mSBF에 침전 시킨 티타늄 디스크에서 배양한 RAW 264.7 세포에 RANKL을 작용시키고 western blot을 통해 NFATc1의 발현 양상을 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. machined surface와 anodized surface 모두에서 성공적으로 NFATc1의 발현이 관찰된다. mSBF에 14일 이상 침전 시킨 그룹에서 NFATc1의 발현량이 감소하는 것이 관찰된다. 7일 침전시킨 그룹에서 발현량은 크게 감소하지 않는 것으로 보인다. 아울러 14일 이상 침전 시킨 그룹에서는 발현량의 감소된 양상이 그대로 유지된다. Group 2의 21일, Group 4의 28일 침전 시킨 곳에서 다소 발현량이 증가가 보이지만, 대조군과 비교하였을 때, 발현량은 충분히 감소한 것으로 보인다.

mSBF에 단순히 침전 시킨 것만으로 파골세포를 분화할 수 있는 능력이 나타낼 수 있는 것이 확인되었다. 티타늄 표면의 CaP 침착되면서 친수성 증가, 표면에너지 증가와 함께, 나타나는 변화이다. 이런 변화를 유도할 수 있는 이상적인 침전 조건을 찾는 것이 필요하다. 만약 침전 시간이 길어지면서 이런 특성이 변화한다면, 특정 시간을 침전 시킨 후 mSBF를 제거하고 다른 저장 방식을 찾아야 할 필요가 있다. 이번 연구를 통해서 mSBF에 침전 시키는 시간에 따른 파골세포 분화 억제 능력은 14일이라는 특정 시점에서 급격하게 변화하는 것으로 보인다. 충분한 양의 CaP 결정이 침착하는데 필요한 시간이 14일 정도라고 예상할 수 있다. 과포화된 mSBF로부터 CaP 결정이 침착하는 속도를 알 수 없으나, 14일 이상 37°C에서 침전시켰을 때, 충분한 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 그리고, 14일 이상 침전 시켰을 때에도 더 이상의 변화는 나타나지 않는 것으로 보아 약 14일 정도 침전 시켰을 때, CaP 결정의 침착이 평형에 다다른 것이라 추측해 볼 수 있다. 그리고 28일까지 침전 시켰을 때까지 파골 세포 분화 억제 능력에 변화가 없는 것으로 보아, mSBF에 장기간 보관하는 것이 문제가 되지 않을 것으로 생각된다.

7일간 mSBF에 침전시킨 티타늄 표면에서는 생물학적 활성이 크게 변화하지 않다가 14일 이상 침전시키게 되면서 활성의 변화 강력하게 나타난다. mSBF에 의한 티타늄 표면의 변화에 14일 이상의 시간이 필요하며, 이러한 변화는 CaP 결정의 침착 속도와 관련이 있을 것으로 생각된다. 침착에 영향을 미칠만한 요인으로는 온도가 있다. 본 연구에서는 세포 배양 온도인 37°C에서 침착을 진행하였으나, 이 온도를 낮추거나 높이면서 결정 침착속도가 달라지는 지 알아볼 필요가 있다.

결론

mSBF에 침전 시키는 시간은 RAW 264.7 세포의 부착 및 생존에는 영향을 미치지 않는다. 14일 이상 mSBF에 침전시킨 티타늄 디스크 표면에서는 RAW 264.7 세포의 분화가 억제되며,

TRAP의 활성이 감소된다. 이러한 효과는 machined surface와 anodized surface에서 동일한 양상을 보인다.

ORCID

Hyun-min Chang <https://orcid.org/0000-0001-6121-1483>

Seong-Joo Heo <https://orcid.org/0000-0003-0699-4141>

Seong-Kyun Kim <https://orcid.org/0000-0001-8694-8385>

Jai-Young Koak <https://orcid.org/0000-0002-0190-0778>

References

1. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundström I, McQueen DH, Skalak R. The interface zone of inorganic implants. In vivo: Titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng* 1983;11:1-27.
2. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3:81-100.
3. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1:11-25.
4. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844-54.
5. de Jonge LT, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res* 2008;25:2357-69.
6. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:349-56.
7. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorf J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49-58.
8. Hori N, Ueno T, Suzuki T, Yamada M, Att W, Okada S, Ohno A, Aita H, Kimoto K, Ogawa T. Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:49-62.
9. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:185-206.
10. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* 1990;24:721-34.
11. Bohner M, Lemaire J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 2009;30:2175-9.
12. Kim MH, Lee SY, Kim MJ, Kim SK, Heo SJ, Koak JY. Ef-

- fect of biomimetic deposition on anodized titanium surfaces. *J Dent Res* 2011;90:711-6.
13. Minkin C, Marinho VC. Role of the osteoclast at the bone-implant interface. *Adv Dent Res* 1999;13:49-56.
 14. Kim MH, Lee SY, Heo SJ, Kim SK, Kim MJ, Koak JY. Osteoclastic response on titanium surfaces in modified simulated body fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017;32:337-43.
 15. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3540-5.
 16. Takayanagi H. Osteoimmunological insight into bone damage in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2005;15:225-31.
 17. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 2005;202:1261-9.

Modified simulated body fluid에 침전한 티타늄 표면에서 침전 기간에 따라 나타나는 파골 세포의 분화억제 양상

장현민 · 허성주 · 김성균 · 곽재영*

서울대학교 치과대학 치과보철학교실

목적: 본 연구의 목적은 티타늄 디스크를 Modified simulated body fluid (mSBF)에 침전시켰을 때, 침전 시킨 기간에 따른 파골 세포 분화 억제 변화 양상을 알아보는 것이다.

재료 및 방법: Machined surface와 anodized surface를 가진 티타늄 합금(Ti grade III)디스크를 각각 증류수와 mSBF에 침전 시켰다. 침전 기간은 7일, 14일, 21일, 28일 진행하였으며, 각각의 기간 동안 대조군은 증류수에 침전하였다. 파골 세포로 분화 가능한 RAW 264.7 세포를 점주하여 침전 기간에 따른 부착된 세포 수 측정, TRAP 활성 측정, western blot을 통한 NFATc1의 발현양상을 측정하였다.

결과: Machined surface와 anodized surface 모두에서 mSBF에 14일 이상 침전하였을 때, 파골 세포의 분화를 억제하는 능력이 통계적으로 유의하게 나타났다. 침전 기간과 세포의 부착은 상관관계가 없었다. 14일 이상 침전시켰을 때, TRAP 활성은 감소되었으며, NFATc1의 발현은 억제되었다. 14일 이상 침전 시켰을 때, TRAP활성 감소 및 NFATc1 발현 억제 양상은 변함이 없었다.

결론: 티타늄 합금 디스크를 14일 이상 mSBF에 침전시키면 RAW 264.7 세포가 파골 세포로 분화하는 것을 막을 수 있다. 침전기간이 증가해도 분화 억제 양상은 변화하지 않는다. (대한치과보철학회지 2019;57:142-9)

주요단어: Modified simulated body fluid (mSBF); 티타늄 합금 디스크; 파골 세포 분화; TRAP; NFATc1

*교신저자: 곽재영

03080 서울 종로구 대학로 101 서울대학교 치과대학 치과보철학교실

02 2072 2661: e-mail, young21c@snu.ac.kr

원고접수일: 2019년 3월 25일 / 원고최종수정일: 2019년 4월 15일 / 원고채택일: 2019년

4월 18일

© 2019 대한치과보철학회

© 이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 4.0 대한민국 라이선스에 따라 이용할 수 있습니다.

※본 연구는 서울대학교 치과병원 연구비(04-2014-0079)의 지원을 받아 시행하였다.