

티타늄 표면조도가 조골세포의 부착 및 분화에 미치는 영향

김정식¹ · 이재관¹ · 고성희² · 엄홍식¹ · 장범석¹

¹강릉대학교 치과대학 치주과학교실

²강릉대학교 치과대학 약리학교실

I. 서론

1960년대 초 골유착 임플란트가 소개된 이후, 완전 무치악 환자와 부분 무치악 환자에서 골유착 임플란트는 장기간 성공적으로 사용되고 있다. 1981년 Adell 등¹⁾은 완전 무치악 환자의 15년 동안의 임상 연구에서 상악에서 81%, 하악에서 91%의 생존율을 보고하였고, 1999년 Lekholm 등²⁾은 부분 무치악 환자의 10년간 관찰기간에서 상악에서 90.2%, 하악에서 93.7%의 누적 성공률을 보고하였다. 완전 무치악과 부분 무치악에서 골유착 임플란트가 장기간의 높은 생존율을 보여준 이후, 단일 치아 결손 증례에서도 골유착성 임플란트를 이용하는 술식이 1986년 Jemt 등³⁾에 의해 처음 시도되어 현재에는 고정성 보철물을 대체할 수 있게 되었다.

다양한 임플란트 재료 가운데 티타늄은 표면에 불용성 산화막이 존재하기 때문에 티타늄 이온의 누출이 적고 부식의 가능성이 낮아 생체 적합성이 우수하다. 초기 임플란트들은 기계절삭한 면을 이용하였지만 골질이 나쁜 증례에서 기계절삭형 임플란트는

성공률이 상대적으로 낮았고⁴⁾, 1990년대 초반부터 티타늄 표면특성의 중요성이 대두되면서 다양한 표면조도 변화를 목표로 하는 표면처리 방안이 보고되었다. 표면조도를 증가시키는 방법으로는 표면에 특정 재료를 첨가하는 수산화인회석 피복, 티타늄 분사 피복법 및 beading법 등이 있고, 티타늄 표면으로부터 티타늄을 제거하여 표면조도를 증가시켜주는 방법으로는 산화티타늄 분사법, 산화알루미늄 분사법, 칼슘인산 분사법과 산 부식법, 산화알루미늄 분사 후 산 부식법 등이 이용되고 있다.

표면조도에 따라 세포 부착, 세포 증식, 세포 분화, 기질 생산, 석회화 등으로 진행되는 골유착의 각 단계에서 세포는 각기 다른 양상을 보인다^{5,6-10)}. 매끈한 표면에는 상피세포와 섬유아세포의 부착이 증가되고, 거친 표면에서는 조골세포양세포의 부착이 크게 향상되었으며⁵⁾, 조도를 증가시킨 표면이 주변 골 형성에 유리하였다^{6,7)}. 이후의 세포 증식, 분화 및 대사에 관한 연구에서 조도가 높은 임플란트 표면에서 골형성에 보다 유리한 미세 환경이 조성되어⁸⁾, 골세포의 알칼리성인산분해효소 활성이 증가되

*교신저자 : 장범석, 강원 강릉시 강릉대학교 120번지 강릉대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 210-320
E-mail : dentist@kangnung.ac.kr, 전화번호 : 033-640-3150

며, 세포외기질 및 osteocalcin의 생산도 증가되었으나 세포 증식은 감소한다고 하였다^{9,10)}.

또한 표면조도는 골형성에 관여하는 국소인자인 prostaglandin^{11,12)}, TGF- β 1^{11,13,14)}의 생산에도 영향을 준다고 하였으며, 표면이 거칠수록 파골세포의 형성 및 활성을 억제한다고 하였다^{15,16)}. Boyan 등⁷⁾은 거친 표면에서는 골대사에 중요한 전신 호르몬인 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ 와 서로 상승효과가 있었으나, 매끈한 표면에서는 효과가 없었다고 하였다. 조직학적 연구에서 조골세포는 금속 표면의 peak-to-peak 사이의 거리보다 세포체의 크기가 작으면 더 성숙한 분화형을 나타내고 매끈한 표면에서는 편평한 모양의 섬유아세포와 비슷한 형태를 나타내며¹⁷⁾, 표면조도를 증가시킨 임플란트에서 주변 골과의 더 높은 접촉률을 보였으며¹⁸⁻²¹⁾, 임플란트의 성공에 중요한 영향을 끼치는 것으로 알려진 초기 고정력을 평가하는 회전제거력 측정에서도 표면이 거칠수록 더 우수한 결과를 보여주었다¹⁸⁻²⁵⁾.

그렇지만 Linck 등²⁶⁾은 티타늄과 티타늄 합금을 이용한 실험에서 표면조도와 아울러 표면조성이 조골세포의 행동 양상에 중요하다고 하였으며, Stefano 등²⁷⁾은 불규칙한 표면의 깊이, 분포, 와동 형태 및 표면 처리 과정에서 남은 오염 요소의 존재여부가, 그리고 Lohmann 등²⁸⁾은 세포의 분화도가 조골세포양세포 행동양상에 영향을 준다고 하였다.

그러나 표면조도에 대한 조골세포양세포의 반응에 대한 현재까지의 연구결과는 매우 다양하다. 표면조도가 간엽세포의 평균 길이인 5~12 μ m 보다 클 경우 세포는 이 면을 거칠지 않다고 인식한다는 보고²⁹⁾와 조골세포양세포는 매끈한 면 보다는 거친 티타늄 면에 더 강하게 부착한다는 연구결과가 있다⁹⁾. 그리고 표면조도가 조골세포 크기 이내에서 표현될 정도로 미세하면 조골세포의 부착과 증식은 저하되고, 조골세포의 크기 이상이면 조골세포의 부착과 증식이 증가한다는 보고³⁰⁾와 표면조도가 세포의 부착에 영향을 주지 않는다는 보고도 있다³¹⁾. 이러한 차이는 실험 조건 즉, 사용한 임플란트 표면, 실험에 이용한 세포의 종이나 성숙도 등의 차이 때문일 수

있으며⁹⁾, 적절한 표면조도를 훨씬 넘거나 제대로 조절되지 않으면 임상적 성공률이 크게 떨어지는 것으로 보고되고 있다.

이 연구의 목적은 적절한 범위의 표면조도를 가지도록 블라스팅하여 얻은 티타늄 디스크와 표면처리를 하지 않은 티타늄 디스크에 대한 조골세포양세포의 부착, 증식, 분화를 비교 평가하는데 있었다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시편제작

순수 티타늄(ASTM grade 4)을 직경 10 mm, 두께 1 mm의 디스크로 제작하였다. 티타늄 디스크를 400 grit 사포와 800 grit 사포로 연달아 연마한 후 trichloroethylen과 100% 알코올을 이용하여 각각 2회 초음파 세척한 후 전용오븐을 이용하여 50°C에서 24시간 건조시켰다. 실험군의 시편은 0.25 Mpa의 압력에서 시편과 blasting gun을 150 mm 떨어뜨려 약 75 μ m의 Al $_2$ O $_3$ 입자로 시편을 4회 회전시키면서 블라스팅하였다. 블라스팅하지 않은 시편을 대조군으로 하였다.

2) 주사전자현미경 관찰 및 표면조도 측정

시편을 ion sputting coater(Eiko Engineering Co. IB-3, Japan)를 이용하여 0.1 Torr 진공 상태에서 4분간 금으로 피복시킨 후 주사전자현미경(Hitachi Co. S-3000, Japan)을 이용하여 25 kV 상태에서 관찰하였다. 분사 후 표면조도의 변화를 측정하기 위해 Mitutoyo사 모델 SURFTEST 301을 이용하여 Ra, Rq, Rt를 구하였다.

2. 세포 배양

세포는 사람 골육종에서부터 확립된 조골세포양세포주인 Saos-2 세포를 한국세포주은행(서울, 대한민국)으로부터 구입하여 사용하였다. Saos-2 세포를

100 mm 크기의 세포배양접시(Coring Co. Corning, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)과 100 U/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin이 함유된 α -MEM(Invitrogen, Gibco brand, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 공기혼합배양기(37°C, 100% 습도, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3. 세포 부착 및 세포 증식능 측정

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

4. 알칼리성인산분해효소의 활성측정

배양 1일과 6일째에 0.1% Triton X-100이 포함된 10 mM Tris-HCl 용액(pH7.4)과 cell scraper를 사용하여 세포를 모으고 얼음 위에서 초음파 분쇄기를 이용하여 1분간 초음파 처리하여, 일부는 알칼리성인산분해효소활성 측정에 일부는, 단백질

정량에 사용하였다. 알칼리성인산분해효소 활성은 0.05 M glycine-NaOH buffer(pH10.3)를 완충액으로 사용하고, 15 mM *p*-nitrophenol phosphate (*p*-NPP)(Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, USA)를 효소기질로 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 0.1 N NaOH로 반응을 중지시키고, 효소작용에 의해서 기질로부터 유리된 *p*-nitrophenol을 410 nm에서 spectrophotometer (amersham pharmacia biotech, Cambridge, England)로 비색 정량하였다. 총 단백질량은 bovine serum albumin을 표준 용액으로 사용하여 BCA protein assay reagent (Pierce Inc, Rockford, IL)로 정량하였다.

5. 통계 분석

초기 부착, 세포 증식능 그리고 알칼리성인산분해효소의 활성을 SPSS 12.0을 사용하여 통계 처리하였다. 실험군과 대조군 간의 세포 증식능 및 알칼리성인산분해효소 활성을 t-test를 이용하여 검증하였다($p < 0.05$).

III. 실험결과

1. 주사전자현미경 관찰 및 표면조도 측정

주사전자현미경 관찰에서 대조군에 비해 실험군에서 더 거친 상을 볼 수 있었다(Figure 1). SURF-TEST 301로 측정한 결과 대조군에 비해 Al₂O₃ 입자를 분사한 실험군에서 더 높은 표면조도 값을 얻었다(Figure 2, Table 1).

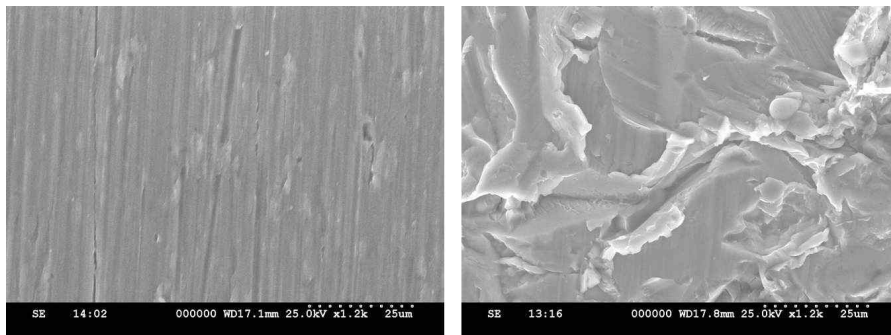


Figure 1. SEM images. machined surface(left), blasted surface(right).

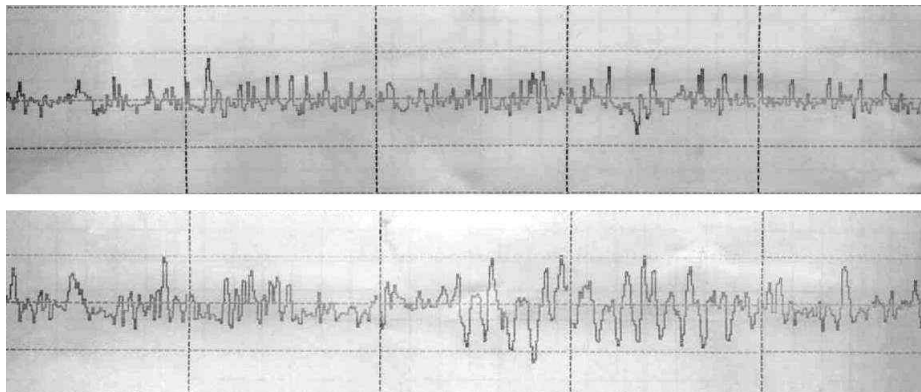


Figure 2. Surface roughness. upper) machined surface, lower) blasted surface.

Table 1. Surface Roughness (μm)

| Surface | Ra | Rq | Rt |
|----------|------|------|-------|
| Machined | 0.16 | 0.17 | 1.8 |
| Blasted | 1.30 | 1.72 | 12.46 |

2. 초기 부착 및 세포 증식

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

3. 알칼리성인산분해효소의 활성 측정

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

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

| Surface | 1 hour | 1 day | 6 days |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Machined | 3.241 \pm 0.080 | 2.058 \pm 0.198 | 5.463 \pm 0.725 |
| Blasted | 1.824 \pm 0.170* | 1.235 \pm 0.000* | 2.870 \pm 0.370* |

Values are Mean \pm S.D (n=4)

* Statistically significant difference at the p=0.05

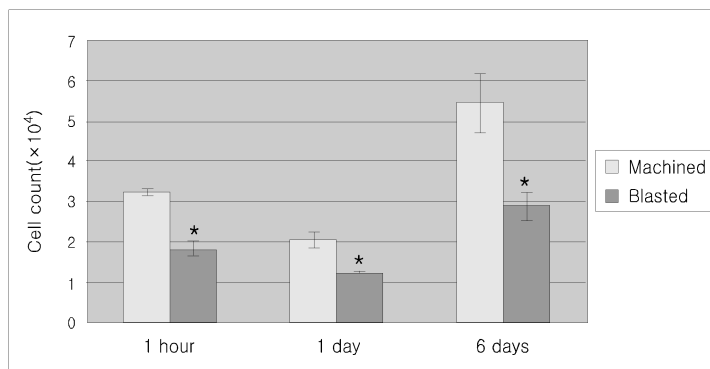


Figure 3. Cell adhesion and proliferation

Table 3. Alkaline phosphatase activity (nM/ μ g/min)

| Surface | 1 day | 6 days |
|----------|-------------------|--------------------|
| Machined | 3.196 \pm 0.291 | 6.362 \pm 0.130 |
| Blasted | 3.646 \pm 0.704 | 7.512 \pm 0.693* |

Values are Mean \pm S.D (n=4)

* Statistically significant difference at the p=0.05

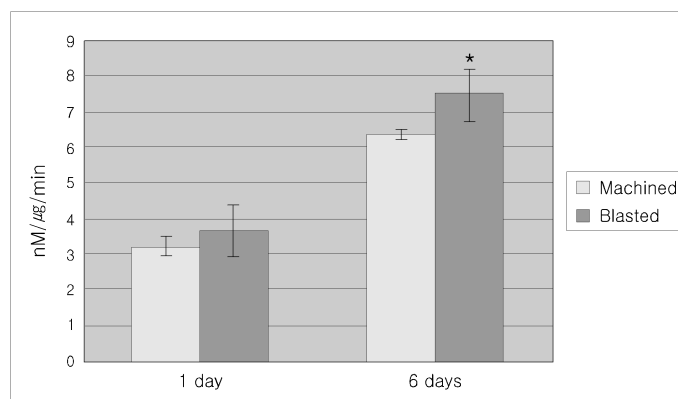


Figure 4. Alkaline phosphatase activity

IV. 고안

이 연구에서는 표면조도가 다른 두 티타늄 표면인 Saos-2 세포의 부착, 증식, 분화에 어떤 영향을 주는지 관찰하였다. 실험에 앞서 SURFTTEST 301을 이용하여 표면조도를 측정하였다. 측정한 3가지 값(Ra, Rq, Rt) 모두가 Al_2O_3 입자로 블라스팅한 티타늄 디스크에서 대조군에 비해 높았으며, Wennerberg 등³²⁾이 제시한 적절한 표면조도 범위에 들어갔다.

이전 연구에서 SEM과 TEM 관찰에서 세포가 디스크의 함요부로 이동하여 트립신 처리에 매우 저항성이 크다는 것을 보인 바 있으며, 트립신 처리를 두 번 하면, 표면조도가 높을수록 두 번째 트립신 처리에서 더 많은 수의 세포를 금속 표면에서 유리시킬 수 있음을 보였다⁹⁾. 이에 이 실험의 모든 과정에서 두 번의 트립신 처리 과정을 거쳤다. 초기 부착을 관찰하기 위해 세포를 배양하고 1시간 후에 각각의 디스크 표면에 부착한 세포수를 측정하였고, 세포 증식을 비교하기 위해 배양 후 1일째와 배양 6일째에 다시 티타늄 디스크에 부착한 세포 수를 구하였다. 배양 후 1시간에 측정한 세포 수에서 실험군보다 대조군에서 2배 가까이 많은 세포가 부착된 것을 볼 수 있었다. 세포 증식을 비교하기 위해 측정한 배양 1일째의 세포수가 배양 후 1시간 보다 더 적은 수를 보이는데 이는 초기에 부착한 모든 세포가 증식하는 것이 아니라 일부의 세포가 더 탈락하고 살아남은 세포만이 이후의 골유착 과정에 관여함을 보여준다. 배양 후 1일에서 6일 사이에서 대조군이 실험군보다 더 높은 증식률을 보여주었다. 이 결과는 이전의 여러 연구에서 보인 결과와 일치한다.

Martin 등⁹⁾의 실험에서도 titanium plasma spraying 처리를 한 거친 티타늄 표면보다 electropolishing 처리를 한 매끈한 표면에서 더 높은 세포 증식률을 보여주었고, Kieswetter 등¹³⁾의 연구에서도 거친 표면에서 적은 세포 증식을 보였으며, Links 등²⁶⁾의 MG 63 cell을 이용한 실험에서도 거친티타늄에서 보다 부드러운 티타늄 표면에서 더 많

은 세포 수를 보여주었다. 또한 Boyan 등⁷⁾의 실험에서도 더 높은 표면조도를 보이는 TPS 표면보다 더 낮은 표면조도를 보이는 SLA 표면에서 골아세포가 더 잘 자라는 것을 보였다. 그러나 거친 표면에서 더 높은 증식률을 보인 연구들도 있었다^{33,34)}.

Hatano 등³³⁾은 표면조도가 다른 polystyrene을 비교하였고, Degasne 등³⁴⁾의 연구는 티타늄 표면을 이용하였으나 세포 부착, 증식, 분화에 유리한 영향을 끼치는 fibronectin이나 vitronectin을 실험에 포함하였기 때문에 우리 실험과 다른 결과가 나왔을 것으로 생각된다.

골성 세포분화의 각 단계에서는 각기 다른 골기질 단백질이 발현된다고 보고되어 왔다. 조골세포의 초기분화단계에서 collagen type I이 최대로 발현되고 기질 성숙단계에서는 알칼리성인산분해효소가 최대로 발현된다³⁵⁾. 비록 골형성 과정에서 이 효소의 역할이 완전히 규명되지는 않았지만, 일반적으로 조골세포가 성숙함에 따라 이 효소의 활성이 높으므로, 알칼리성인산분해효소는 조골세포의 성숙도를 나타내는 지표로 이용된다³⁶⁾. 우리의 실험에서 알칼리성인산분해효소의 기능으로 평가한 세포 분화 역시 표면조도가 높은 표면에서 더 우수한 결과를 보여주었다. 특히 6일째의 결과는 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 활성을 보여주었다($p < 0.05$). 이번 결과는 이전의 여러 연구와도 일치한다^{7,9,13)}. Lincks 등²⁶⁾의 연구에서도 거친 티타늄 표면에서 세포 모양, 세포외기질 혹은 osteocalcin의 생산량, 알칼리성인산분해효소의 활성에서 더 분화한 특징을 보여주었다. 각기 다르게 표면 처리를 한 티타늄 표면을 대상으로 한 실험에서 표면이 거칠수록 알칼리성인산분해효소 활성이나 기질 생산이 증가하였다⁹⁾. Schwartz 등²³⁾의 실험에서는 거친 표면의 티타늄을 쥐 경골에 매식했을 때 기질 소포체의 알칼리성인산분해효소의 절대치가 세라믹을 매식했을 때보다 낮았고 석회화도 지연된 연구도 있었는데, Brugge와 Jansen 등³¹⁾은 실험에 사용한 세포유형, 표면조도의 정도, 표면조도에 대한 정의 및 측정 방법의 차이, 사용한 기구와 방법의 차이로 표면조

도와 관련된 실험결과에 상당한 차이를 야기한다고 하였다.

또한 Wennerberg³²⁾는 골전도성을 증가시키기에 적절한 표면조도에 대해 Sa 1.0~1.5 μ m 정도의 표면조도가 가장 좋은 골반응을 나타내며, 그 이하 혹은 그 이상의 표면조도에서는 골반응이 저하된다고 하였다. 그러나 표면조도 이외에도 여러 연구에서 표면 조성이나, 세포 분화도, 표면 처리 과정에서 남은 표면의 불순물 유무, 표면의 규칙성 등도 세포 반응에 영향을 준다고 한다.

여러 가지 방법을 이용하여 표면조도에 변화를 주는 이유는 골과 임플란트 사이의 기계적인 상호조정 효과를 증진시키고¹⁸⁻²⁴⁾, 임플란트 표면에서 골이 형성되는 과정에 표면조도가 크게 영향을 주기 때문이다⁵⁻⁷⁾. 임플란트는 식립 후 수 초 이내에 혈액과 접촉하여 단백질과 세포의 복잡한 생체막(complex bio-film)을 형성하며, 생체막은 세포 부착을 촉진하는 단백질인 integrin과 세포 활성 리간드로 구성된다³⁸⁻⁴⁰⁾. 이 중 integrin이 임플란트 표면에 붙은 단백질 및 세포의 기질층에 결합하여 다양한 경로를 통한 신호 전달을 시작하여 연쇄적인 세포반응들이 일어나게 된다⁴¹⁾. 그런데 표면특성에 따라 결합 단백질인 integrin의 표현양식이 변할 수 있고^{42,43)} 부착하는 단백질의 양과 유형, 그리고 부착하는 양상에도 변화가 올 수 있다⁴⁴⁾. 또한 각종 단백질 분자들이 표면에 부착하는 방식은 향후 부착하게 되는 세포의 종류와 부착양식에도 큰 영향을 나타낸다^{45,46)}. 그리고 표면조도의 변화는 PGE2, TGF- β 1과 같이 골생성에 관여하는 각종 국소인자들의 생산과 골대사에 중요한 전신 호르몬인 1 α , 25-(OH) $_2$ D $_3$ 에 대한 조골세포양세포의 반응에 영향을 준다. 그리고 알칼리성인산분해효소의 활성화도 거친 표면에서 배양된 조골세포나 연골세포에서 훨씬 크게 나타났고^{26,47)}, apatite crystal의 성장을 조율하는 세포의 기질 단백질인 osteocalcin도 표면조도가 높은 표면에서 훨씬 증가하였다^{9,48)}. Khosla¹⁵⁾과 Lossdorfer¹⁶⁾은 표면조도가 높은 표면에서만 RANK ligand regulatory system에서 과골세포의 활성을

감소시키는 osteoprotegerin이라는 수용체의 양을 증진시킬 수 있다고 하였다. 이처럼 표면조도는 단백질이 부착되는 과정에서부터 시작하여 골생성이 완성되는 시점까지 골생성 전 과정에 걸쳐서 영향을 나타낸다.

현재까지 표면조도를 증가시키기 위해 수산화인회석 및 티타늄 피복법 및 티타늄 분사법, 산 부식법, 분사 후 산 부식법 등의 방법들이 이용되고 있으나 피복법의 경우에는 피복된 입자들이 임플란트를 식립하는 도중 골과의 마찰에 의해 마모되어 떨어져 나가거나 시간 경과에 따라 임플란트 표면으로부터 분리되는 현상이 발생하였고⁴⁹⁾, 분사법의 경우에는 분사에 사용한 금속 입자가 표면에 잔류하거나 임플란트 표면성질에 변화를 야기하므로 골반응에 문제를 야기할 수 있다⁵⁰⁾. 임플란트의 표면조도 변화와 아울러 또 하나의 임플란트 표면 개질의 경향은 화학적 변화를 시도하는 것으로 보다 안정적인 화학적 개질 변화를 위해 1990년대 후반부터는 열처리 기술을 응용한 임플란트와 생체 반응, 간단한 표면 화학처리 및 패시베이션 처리와 생체 골조직 반응, sol-gel법에 의한 임플란트 표면처리, 전기화학적 임플란트 표면처리 등의 방법이 제시되고 있다.

우리의 연구에서 약 75 μ m 크기의 Al $_2$ O $_3$ 입자를 블라스팅하여 얻은 표면조도에서 조골세포양세포의 증식은 억제되었으나 알칼리성인산분해효소의 활성화는 증가되었다. 그러나 이번 실험은 조골세포의 초기분화단계에 대한 표면조도의 효과를 확인한 것에 불과하다. 따라서 osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein 등의 정량을 통해서 후기분화단계에 대한 표면조도의 효과의 관찰이 필요하다고 사료된다.

V. 결론

Al $_2$ O $_3$ 입자를 블라스팅하여 조도를 증가시킨 티타늄에 대한 세포반응을 평가하기 위해 시험관 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

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

VI. 참고문헌

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981; 10:387-416.
2. Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Steenberghe D. Survival of the Brånemark Implant in partially edentulous jaws. A 10-year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:639-645.
3. Jemt T. Modified single and short span restorations supported by osseointegrated fixtures in the partially edentulous jaw. *J Prosthet Dent* 1986;55: 243-247.
4. Cochran DL. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* 1999;70:1523-1539.
5. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:302-10.
6. Michaels CM, Keller JC, Stanford CM, Solursh M. In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. *J Dent Res* 1989;68:276.
7. Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG 63 osteoblast-like cells to $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$. *J Biomed Mater Res* 1998;39:77-85.
8. Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, Schwartz Z. Osteoblasts generate an osteogenic micro-environment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater* 2003;6:22-27.
9. Martin, JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells(MG63). *J Biomed Mater Res* 1995 ;29:389-401.
10. Cochran DL, Simpson J, Weber H, Buser D. Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough-titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:289-97.
11. Batzer R, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Prostaglandins mediate the effects of titanium surface roughness on MG63 osteoblast-like cells and alter cell responsiveness to $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$. *J Biomed Mater Res* 1998;41:489-96.
12. Sisk M, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson JP, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Inhibition of cyclooxygenase by indomethacin modulates osteoblast response to titanium surface roughness in a time-dependent manner. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:52-61.
13. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD,

- Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG63 cells. *J Biomed Mater Res* 1996;32: 55-63.
14. Schwartz Z, Lohmann CH, Sisk M, Cochran DL, Sylvia VL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1 α , 25-(OH) $_2$ D $_3$ is mediated via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways. *Biomaterials* 2001;22: 731-741.
15. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142: 5050-5055.
16. Lössdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res* 2004;70:361-369.
17. Brunette DM. Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 1986;164:11-26.
18. Thomas K, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation and direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 1985;19:875-901.
19. D Buser, R K Schenk, S Steinemann, JP Fiorellini, CH Fox, H Stich. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants: A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991;25:889-902.
20. L Carlsson, T Rostlund, B Albrektsson, T Albrektsson. Removal torques for polished and rough titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3:21-24.
21. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of remour in rabbits. *Bone* 1997;21:507-514.
22. Hansson S, Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A athematical model. *J Biomech* 1999;32:829-836.
23. A Rich, AK Harrisl. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci* 1981;50:1-7.
24. HJ Wilke, L Claes, S Steineman. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone, in *Clinical Implant Materials: Advances in Biomaterials*, Elsevier, Amsterdam 1990;9:309-314.
25. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants. A review of proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1: 11-25.
26. Lincks J, Boyan BD, Cochran DL, Liu Y, Blanchard CR, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *J Dent Res* 1998;2219-2232.
27. Stefano G, Carlo G, Desiree M, Alessandro R, and Renato S. Different titanium surface treatment influences human

- mandibular osteoblast response. *J Periodontol* 2004;75:273-282.
28. Lohmann CH, Bonewald LF, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1169-1180.
 29. Schwartz Z., Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Bone regulating mechanism on implant surfaces. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology. Implant Dentistry*. 1999;41-54.
 30. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-166.
 31. Brugge PJ, Jansen JA. Initial interaction of rat bone marrow cells with non-coated and calcium phosphate coated titanium substrates. *Biomaterials* 2002; 23:3269-3277.
 32. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:38-45.
 33. Hatano K, Inoue H, Kojo T, Matsunaga T, Tsujisawa T, Uchiyama C, Uchida Y. Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone* 1999;25:439-445.
 34. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells(Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 1999;64:499-507.
 35. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro : reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-30
 36. Carlo G, Stefano G, Giovanni P, Desiree M, Giovanni M. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. *J Periodontol* 2005;76:364-372.
 37. Schwartz Z, Amir D, Boyan BD, Cochavy D, Mai CM, Swain LD, Gross U, Sela J. Effect of glass ceramic and titanium implants on primary calcification during rat tibial bone healing. *Calcif Tissue Int* 1991;49:359-64.
 38. LL Hench. Paschall HA Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res* 1973;7:25-42.
 39. M Jarcho, Kay JF, Gumaer KI, Doremus RH, Drobeck HP. Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng* 1977 ;56:151-156.
 40. Hakan Nygren, Pentti Tengvall, and

- Ingemar Lundstrom. The initial reactions of TiO₂ with blood. *J Biomed Mater Res* 1997;34:487-492.
41. Schwartz Z, Lohmann CH, Vocke AK, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Osteoblast response to titanium surface roughness and 1 α , 25-(OH)₂D₃ is mediated through the mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway. *J Biomed Mater Res* 2001;56:417-426.
 42. Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res* 1996;14:878-887.
 43. Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 1996;18:451-457.
 44. Villareal DR, Sogal A, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J Oral Impl* 1998;24:67-73.
 45. Cowles EA, Brailey LL, Gronowicz GA. Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2000;52:725-737.
 46. El-Ghannam A, Starr L, Jones J. Laminin-5 coating enhances epithelial cell attachment, spreading and hemidesmosome assembly on Ti-6Al-4V implant material in vitro. *J Biomed Mater Res* 1998;41:30-40.
 47. Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan DD. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res* 1996;30:145-155.
 48. Mustafa K, Wennerberg A, Hultenby K, Lopez B, 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 Impl Res* 2001;12:515-525.
 49. Gottlander M, Albrektsson T, Carlsson LV. A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:485-490.
 50. Pioletti DP, Takei H, Kwon SY, Sung KL. The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1999;46:399-407.

Effect of titanium surface roughness on adhesion and differentiation of osteoblasts

Jung-sik Kim¹ · Jae-kwan Lee¹ · Sung-hee Ko² · Heung-sik Um¹ · Beom-seok Chang¹

¹Department of Periodontics, College of Dentistry, Kangnung National University

²Department of Phamacology, College of Dentistry, Kangnung National University
Jeong-Sik Kim, D.D.S.

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

Key words : Surface roughness; Alkaline phosphatase activity; Implant surface roughness