

## 생체활성물질 (rhBMP-2) 코팅을 위한 수산화 나트륨에 의한 티타늄 표면처리 Surface Activated Titanium by Sodium Hydroxide Treatment for Bioactive Material Coating (rhBMP-2)

한인호<sup>1,2,3</sup> · 흥경숙<sup>2,3</sup> · 최경희<sup>4</sup> · 김선종<sup>5</sup> · 박종철<sup>1</sup> · 신상완<sup>2,3\*</sup>

Inho Han<sup>1,2,3</sup>, Kyeong Sook Hong<sup>2,3</sup>, Kyung-Hee Choi<sup>4</sup>, Sun-Jong Kim<sup>5</sup>, Jong-Chul Park<sup>1</sup>, and Sang-Wan Shin<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 의과대학 의학교육과, <sup>2</sup>고려대학교 임상치의학연구소, <sup>3</sup>고려대학교 임상치의학대학원,

<sup>4</sup>(주) 코웰메디 조직생체기술연구소, <sup>5</sup>이화여자대학교 의학전문대학원 치과학교실

<sup>1</sup>Cellbiocontrol Laboratory, Department of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 152-703, Korea

<sup>2</sup>Institute for Clinical Dental Research, Korea University, Gurodong 80, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea

<sup>3</sup>Graduate school of Clinical Dentistry, Korea University, Anamdong 5, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

<sup>4</sup>Tissue Biotech Institute, Cowellmedi Co. Ltd., 155-4 Gamjeondong, Sasang-gu, Busan 617-801, Korea

<sup>5</sup>Department of Dentistry, School of medicine, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-Dong Seodaemun-Gu Seoul 120-750, Korea  
(Received June 25, 2010/Accepted August 09, 2010)

In order to activate dental implant surface for osseointegration, one of growth factor - recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) coating on surface modified titanium with sodium hydroxide was designed. The physico-chemical properties of surface modified titanium and the rhBMP-2 eluting characteristic of the modified titanium were evaluated. The longer sodium hydroxide exposition time, the less eluting of rhBMP-2 on sodium hydroxide treated titanium was observed.

**Key words:** Dental implant, surface modification, sodium hydroxide, hydrogen bonding, bone morphogenetic protein

### 1. 서 론

치과용 임플란트 연구의 역사는 근현대적 연구만으로도 200 여년가량 되며, 원시적 접근까지 포함하게 되면 1000 여 년에 이르는 매우 긴 역사를 갖고 있다. 여느 생체 재료 연구와 마찬가지로 임플란트의 연구는 기능적 요구 만족, 부작용 개선, 기계적 성능 개선, 정상 기능 기간 단축 등을 위한 연구개발의 과정을 거치고 있다. 20세기 중·후반의 ‘티타늄에 대한 골유착성 및 우수한 생체 친화성’의 발견은 치과 임플란트 대중화의 밑거름이 되었으며, 1980년대 이래로 많은 연구는 임플란트와 골조직 간의 유착력 강화(기계적 성능 개선 - 물리적 표면 개질)와 빠른 골유착 및 조직 회복(정상 기능 시기의 단축 - 화학적 표면 개질 및 생화학적 표면 개질)을 위한 표면 연구가 활발하게 진행되고 있다.<sup>1)</sup>

치과용 임플란트의 표면에 관한 연구는 크게 세 가지 방향으로 나뉜다. 강한 골유착(osseointegration)을 일으키기 위한 연구와 빠른 골전도(osseosynthesis)에 관한 연구 그리고 줄기세포의 조골세포로의 분화를 촉진하는 골유도(osseoinduction)

가 그것이다.

강한 골유착을 유도하기 위한 표면에 관한 연구는 그 목적을 임플란트와 골 간의 접촉 면적을 넓힘으로써 마찰력을 증가시켜 골유착 특성을 향상시키는 데에 두고 있으며, 1.5 내지 2.0 μm 가량의 표면 조도가 가장 바람직한 것으로 알려져 있으며, 블래스팅과 산에 의한 표면 개질 공정(sand-blasted large-grid material; SLA)과 용해성 입자를 사용한 블래스팅에 의한 표면 개질 공정(resorbable blasted media; RBM)이 임상적으로 널리 사용되고 있다.<sup>1-3)</sup>

SLA, RBM, 등에 의해 만들어진 표면으로도 충분한 골유착 특성이 확보되지만, 임상적으로는 악골(jaw bone)이 가늘거나 환자의 나이가 많아 골조직 재생에 시간이 많이 걸리는 케이스 등에 대한 대응을 위하여 보다 빠른 골유착 및 조직 회복을 위한 연구가 진행되었으며, 이것은 앞서 언급된 골전도와 골유도를 촉진하는 방법에 관한 연구로 이어진다. 특히 골전도에 관한 연구는 임플란트의 표면을 골의 화학적 특성을 모방하는 것으로 시도되었다.<sup>1,4-6)</sup>

골조직에 생체 재료가 삽입되면 해면골에 존재하는 혈액과 직접적으로 접촉하게 된다. 특히 악골에는 조골세포가 풍부하게 존재하는데, 이러한 조골세포의 삽입된 생체 재료 표면으로의

\*책임연락처: swshin@korea.ac.kr

이동 → 접촉 → 증식 → 골 무기질 분비 → 골조직 형성과 같은 일련의 프로세스에 의하여 골유착이 일어나는 것을 ‘골전도’라 한다. 골전도를 촉진하기 위하여 시도된 생체 모방은 수산화 아파타이트를 임플란트의 표면에 코팅하는 것으로, 1980, 90 년대에 매우 발달한 반도체 공정의 다양한 종류의 진공 증착 법이 시도되었다. 많은 문헌 보고에 의하면 수산화 아파타이트를 원재료로 하여 티타늄에 코팅하고, 그것에 대한 세포 실험 및 동물 실험 등의 결과, 유의할 만큼 향상되었다는 보고가 있으나, 아직 임상에 이르기까지 적용되지는 못하고 있다.<sup>4-6)</sup>

20세기 후반의 분자 세포학, 등 세포 생물학의 발전은 치과용 임플란트의 골전도 촉진과 골유도 촉진을 위한 연구에 적용되기에 이르렀다. 분자 세포학의 발전에 힘입은 골전도 촉진은 세포 접착성 물질을 임플란트의 표면에 화학적으로 코팅함으로써 조골세포의 부착 확률을 높임으로써 이후의 프로세스를 원활히 하는 데에 있다. 이에 대한 대표적인 후보 물질은 RGD sequence를 포함하는 펩타이드이다.<sup>1,7-10)</sup>

한편, 성장 인자는 줄기세포를 조골세포로 분화시키는 데에 큰 역할을 할 뿐만 아니라 세포의 증식과 분화, 등에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.<sup>11-13)</sup> 문헌연구에 의하면 PDGF<sup>14,15)</sup> (platelet-derived growth factor), TGF- $\beta$ 1<sup>16,17)</sup> (transforming growth factor- $\beta$ 1), IGF (insulin growth factor), BMP<sup>18-22)</sup> (bone morphogenetic proteins), 등과 같은 성장인자가 골조직의 재생을 촉진하는 것으로 보고되고 있으며 대표적으로 알려진 것이 BMP-2, BMP-7과 TGF- $\beta$ 1이다. 이들을 임플란트의 표면에 고정되어 식립되는 경우 골수에 존재하는 줄기세포의 분화를 촉진함으로써 골조직 재생의 시간을 단축시키게 될 것으로 예측<sup>1)</sup>된 바가 있으나, 성장인자의 사용에 가장 큰 어려움은 성장인자의 활성을 유지한 상태로 임플란트의 표면에 고정되어 환부에 전달해야 한다는 것과, 성장인자와 임플란트 간의 결합이 조절되어 성장인자의 방출 패턴이 적절해야 한다는 것이 관련 연구의 큰 걸림돌이다.

TGF super family에 속하는 BMP-2를 동물의 근육에 이식하면 새로운 골이 형성되는 것으로 보아 BMP-2를 적절히 전달한다면 임상에 활용할 가능성이 많아 보이며, 이에 본 연구에서는 앞서 서술한 분석연구를 바탕으로 stem cell의 osteoblast로의 분화를 잘 일으키는 것으로 알려진 BMP-2를 치과용 임플란트의 골유착/골전도능 향상을 위한 생체 활성 생화학 물질 코팅의 대상으로 채택하였다.

채택된 BMP-2를 1차 결합(공유결합, 이온결합, 금속결합, 등)이 아닌 2차 결합(van der Waals force, hydrogen bonding, 등)을 이용하여 BMP-2를 코팅하는 방법을 연구하였다. 1차 결합이 코팅 방법에 관한 고찰의 대상에서 벗어나 있는 이유는, 1차 결합을 하게 되면 코팅된 생체 활성 물질이 티타늄 표면으로부터 골조직으로 방출될 수 없기 때문에 유효 생체 활성 물질이 없는 것과 다름이 없기 때문이다.

현재까지 알려진 바에 의하면 치과용 임플란트, 스캐폴드 등에 대한 BMP의 코팅은 준비된 임플란트에 특별한 표면처리를 하지 않은 채 BMP 함유 액적을 떨어뜨리거나, BMP 함유 용액

에 침적 후 건조시킴으로써 BMP를 함유한 임플란트, 스캐폴드 등을 구현하였다.<sup>23,24)</sup> 본 연구에서는 2차 결합의 여러 메커니즘 가운데서 수소결합을 활용하고자 하였다. 이는 BMP 등과 같은 단백질의 주요 구성 인자에 -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, 등과 같이 수소 결합에 참여할 수 있는 여러 극성 작용기가 존재하기 때문에 임플란트 등의 표면에 이에 관련된 작용기를 코팅하여 수소 결합을 이용하고자 하는 것이다.

티타늄의 표면이 수소 결합에 참여함에 가장 손쉽게 접근할 수 있는 방법은 티타늄의 표면을 수화(hydrolysis)하는 것이다. 티타늄의 수화에 대해서는 표면을 수화시킴으로써 유사체액(simulated body fluid)에서 표면에 골 무기질을 원활하게 석출시킬 수 있으며, 이러한 표면이 임플란트 표면 개질에 활용될 수 있다는 연구가 보고된 바 있다. 이러한 ‘수화’의 방법에는 수산화나트륨 수용액에 티타늄을 침적하고 적절한 열처리를 함으로써 획득할 수 있다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 동일한 방법으로 티타늄의 표면을 수화하여 화학적으로 칼슘포스페이트의 석출이 잘 일어나는 표면을 획득할 수 있을 뿐만 아니라, 동시에 성장인자와의 수소결합을 이용한 성장인자의 코팅을 함께 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시편 준비

순수티타늄 (CP3, S-Tech co. Taiwan)을 지름 8 mm, 두께 2 mm의 디스크로 준비하였다. 준비된 티타늄 디스크를 아세톤 (HPLC solvent, J, T, Baker, U.S.A), 메틸알코올 (Anhydrous Reagent, J. T. Baker, U.S.A), 2차 증류수 (HPLC Grade, 덕산 화학, Korea)에 각각 10 분씩 담가 초음파 세척 후 N<sub>2</sub>로 분사 건조하였다. 티타늄 디스크를 정해진 시간동안 600°C로 유지된 5 M NaOH (Regent grade  $\geq$  98%, Aldrich co.) 수용액에 침적하였다. 처리된 티타늄 디스크는 2차 증류수에서 충분히 세척한 뒤 N<sub>2</sub>를 분사해 건조하였다. 수산화나트륨 처리된 티타늄 디스크를 관상로 에서 600°C로 1 시간동안 대기에서 열처리 한 뒤, 서냉 하였다. 코웰메디(Cowell medi; 부산, 한국)에서 생산하여 제공된 rhBMP-2를 1.5  $\mu$ g/ $\mu$ L로 희석하여 디스크당 90  $\mu$ g을 3회에 나누어 점적 및 건조하였다.

### 재료분석 방법

표면 거칠기(Roughness)

수산화나트륨 처리된 시편의 표면 거칠기를 표면조도계 TR-240(Time co., China)로 n = 5로 측정하였다.

표면 형상(SEM)

표면 처리된 티타늄 디스크의 표면 형상을 SEM (Hitachi S-4700 SEM, Japan)으로 관찰하였다. rhBMP-2로 코팅하지 않은 시편은 준비된 그대로, rhBMP-2로 코팅된 시편은 Pt로 얇게 코팅하여 관찰하였다.

### 친수성 평가(Contact angle)

수산화나트륨 처리된 시편의 친수성(접촉각)을 Phoenix 300 (SED, Korea)로 n = 5로 측정하였다.

### 표면 화학 특성(FTIR-ATR)

수산화나트륨 처리된 시편에 형성된 hydroxyl group의 특성을 평가하기 위해 FT-IR (Bruker IFS-66 flexy S, Germany)에 ATR (Attenuated Total Reflectance) mode로 분석하였다.

### rhBMP-2의 용출 특성 평가

넓은 표면적에서의 용출 특성을 평가함으로써 분석의 오류를 줄이기 위하여 서울티타늄에서 구입한 두께 0.4 mm의 티타늄 판재를 지름 13.5 mm로 재단하여 앞의 방법과 동일한 방법으로 세척, 알칼리 처리 및 rhBMP-2 코팅을 실시하였다. rhBMP-2가 코팅된 시편을 well plate에 넣고 증류수 0.2 mL를 첨가하여 1분간 rhBMP-2를 방출시킨 뒤 새로운 well plate로 옮겨 다시 증류수 0.2 mL를 첨가하여 30분간 rhBMP-2를 방출시킨 뒤 새로운 well plate로 옮겨 증류수 0.2 mL를 첨가하여 60분간 방출시킨 뒤 새로운 well plate로 옮겨 5분간 초음파 처리를 실시하였다. 용출량이 많을 것으로 예상되는 1분 용출 및 초음파 처리 후의 용출 특성은 Bradford법으로 Protein Assay kit (Bio-rad 미국)를 이용하여, 용출량이 미량일 것으로 예상되는 30분 및 60분 용출은 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)법으로 전기영동한 후 gel을 Silver Stain Kit (Bio-Rad, 미국)를 이용하여 silver staining법으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 표면 거칠기(Roughness)

수산화나트륨 처리 시간에 따른 표면의 거칠기 변화를 관찰하기 위하여 표면 조도계로 시편의 거칠기를 측정하여 물리적으로 거친 표면이 형성되었는지를 확인하였으며 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 수산화나트륨 처리 시간이 3 시간에서 6 시간으로 증가함에 따라 표면 거칠기가 감소되었으며, 6 시간에서 24 시간으로 수산화나트륨 처리 시간이 증가함에 따라 표면 거칠기가 증가 되는 현상이 관찰되었다. 초기의 표면 거칠기 감소는 기계적 절삭에 의해 형성된 거친 표면이 에칭에 의해서 완만해졌기 때문으로 판단되며, 6 시간 이후 침적 시간의 증가에 따라 표면 거칠기가 다시 증가되는 것은 시편 표면에 새로이 형성된 표면의 변화로 인한 것으로 판단된다.

### 표면 형상(SEM)

앞서 표면 거칠기 분석 결과로부터 예상되었던, 수산화나트륨 수용액 침적 시간에 따른 표면의 형상 변화를 확인하기 위하여, 시편의 표면을 SEM으로 관찰하였다. 티타늄 디스크의 가공에 의해 형성된 환형의 절삭면이 저배율(1,000배)에서 용이하게 관찰되었고(Figure 2), 표면 처리 시간의 증가에 따라 환형의

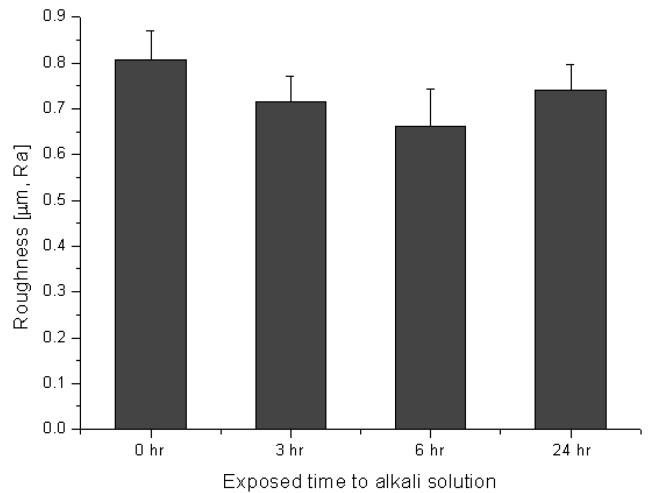


Figure 1. Surface roughness of NaOH treated titanium surfaces.

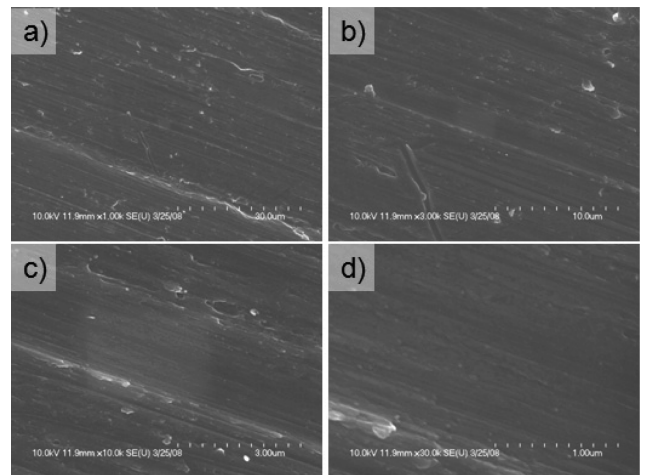


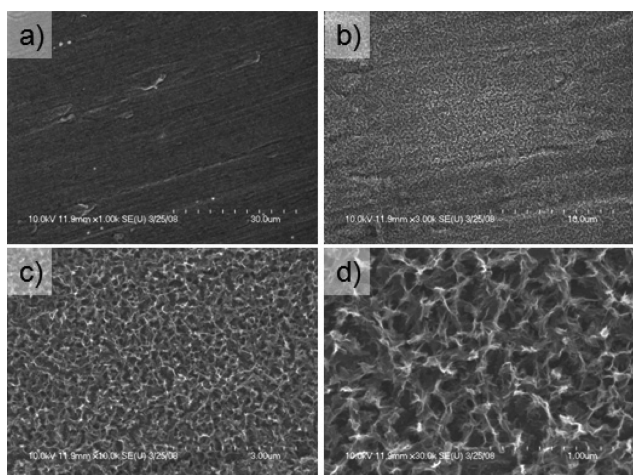
Figure 2. SEM photographs of the surface of the machined titanium disk. Magnification: a) 1,000; b) 3,000; c) 10,000; d) 30,000.

절삭면은 완만해지는 것이 관찰되었다(Figure 3, 4, 5). 이는 수산화나트륨 수용액에 의한 에칭에 기인한 것으로 판단된다.

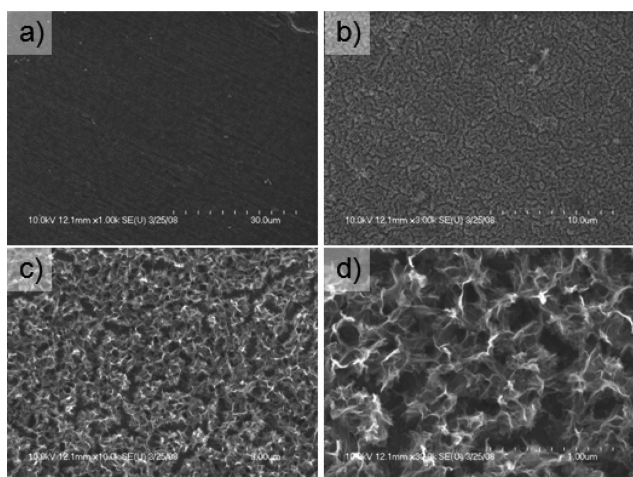
수산화나트륨 수용액에 의한 3 시간의 짧은 시간 동안의 표면 처리만으로도 시편의 표면에 매우 독특한 망상 구조가 형성되었다(Figure 3). 이와 같은 특유의 망상구조는 처리 시간의 경과에 따라 그 폭과 깊이가 성장하는 것이 관찰되었다(Figure 4, 5). 수산화나트륨 수용액에 의하여 발생하는 독특한 망상 구조는 표면적을 넓힘으로써 rhBMP-2와 같은 단백질, 등의 코팅 시 코팅되는 양을 급격하게 늘릴 수 있는 장점을 지닐 것으로 추정할 수 있었다.

### 친수성 평가

수산화나트륨 수용액으로 처리된 티타늄 표면의 친수성 평가를 위하여 접촉각을 측정하였다. 표면 처리되지 않은 티타늄의 표면에 대한 D.I. water의 접촉각은 평균 76°였으며 수산화나트륨에 침적하지 않고 열처리(600°C, 1 시간)한 경우 접촉각은



**Figure 3.** SEM photographs of the surface of the NaOH treated titanium surfaces subjected to heat treatments at 3 hr. Magnification: a) 1,000; b) 3,000 c) 10,000; d) 30,000.



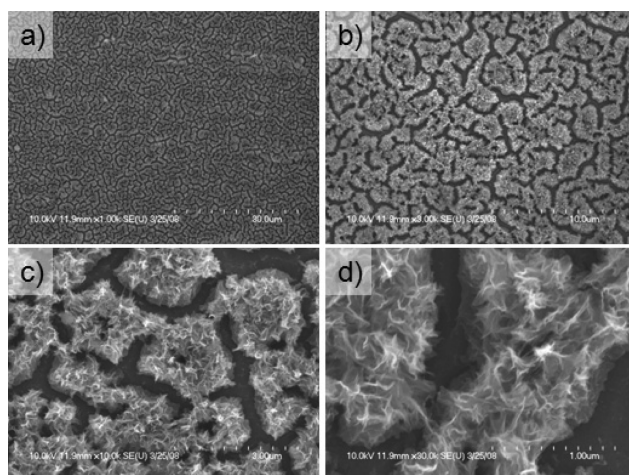
**Figure 4.** SEM photographs of the surface of the NaOH treated titanium surfaces subjected to heat treatments at 6 hr. Magnification: a) 1,000; b) 3,000 c) 10,000; d) 30,000.

평균 47°로 낮아졌다. 수산화나트륨으로 처리한 경우 3 시간 침적만으로도 접촉각을 측정할 수 없을 만큼 친수성의 표면이 형성되었다. 이는 문헌에 보고된 바와 같이 표면에 풍부한 수산화기가 형성(수화되었기 때문에 기인한 것으로 사료된다.

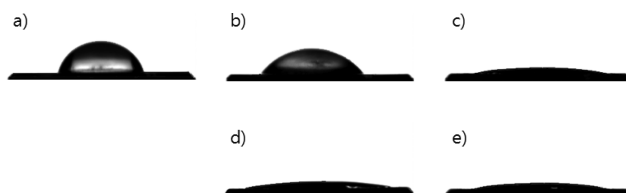
**표면 화학 특성 (FT-IR)**

수산화나트륨으로 처리 된 티타늄의 금속 표면의 수화 정도를 평가 하고자 표면 화학특성을 FT-IR을 이용하여 분석하였다. 티타늄 시편은 적외선이 투과하지 못하기 때문에 ATR (Attenuate Transmittance Reflectance) mode로 시편 표면에 IR beam을 반사시켜 분석하였다(Figure 7).

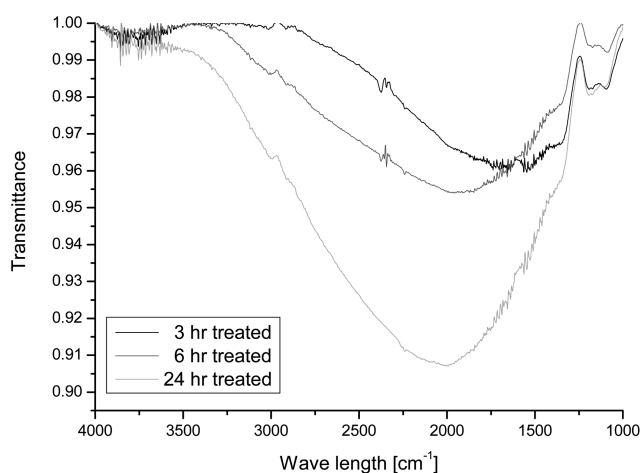
수산화나트륨 수용액으로 처리되지 않은 시편을 reference 시편으로 삼아 관찰하였을 때, 수산화나트륨에 의해 형성된 수산화기와 관련된 peak은 1500 cm<sup>-1</sup>에서 3500 cm<sup>-1</sup>에 이르는



**Figure 5.** SEM photographs of the surface of the NaOH treated titanium surfaces subjected to heat treatments at 24 hr. Magnification: a) 1,000; b) 3,000 c) 10,000; d) 30,000.

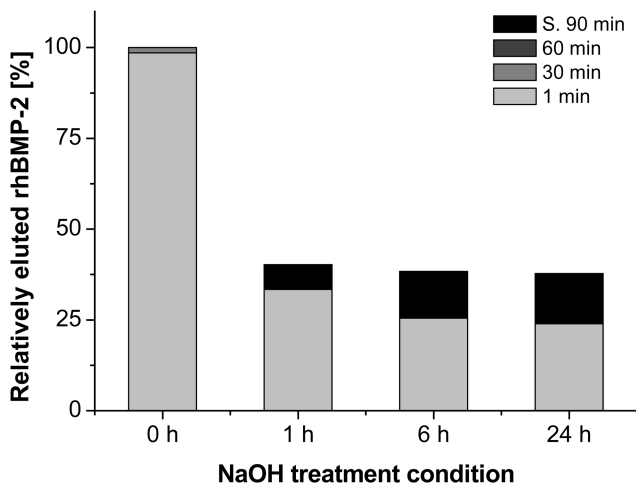


**Figure 6.** Contact angle of the surface of the NaOH treated titanium surfaces. a) machined surface; b) annealing only; c) 3 hr sodium hydroxide solution treated then annealed; d) 6 hr sodium hydroxide solution treated then annealed; e) 24 hr sodium hydroxide solution treated then annealed.



**Figure 7.** FT-IR (ATR) of the surface of the NaOH treated titanium surfaces, in comparison with that of Ti metal before treatment.

매우 넓은 영역에서의 강한 흡수 밴드로 관찰되었다. 넓은 영역에서 강하게 나타내고 있는 흡수 밴드는 수산화나트륨 처리 시간의 증가에 따라 그 흡수도가 크게 증가하였다. 이는 처리 시간의 증가에 의존하여 많은 수산화기가 티타늄의 표면에 형성 되었음을 의미한다. 한편, 표면 처리 시간의 증가에 따라 수산



**Figure 8.** Relative eluted rhBMP-2 on the surface of the NaOH treated titanium surfaces.

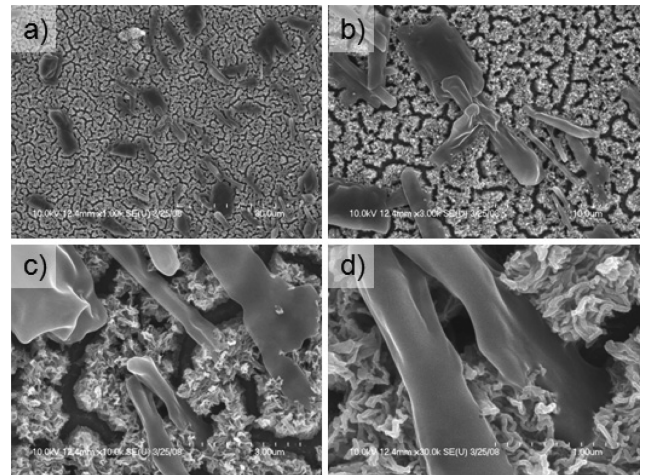
화기에 의한 밴드의 최고점이 high wave length 방향으로의 peak shift가 관찰되었다. 이는 표면에 형성된 수산화기의 증가에 따라, 주변 구조에 덜 구속된 수산화기(자유 수산화기)가 증가하고 있음을 의미한다. 따라서 수산화나트륨에 의한 표면 처리 시간의 증가는 티타늄 표면의 수화된 정도를 높이는 것으로 판단된다.

#### 표면에 흡착된 단백질의 용출 특성 평가

수산화나트륨 수용액으로 표면이 개질된 티타늄에 흡착된 단백질의 용출 특성을 일정 시간 동안 증류수에 노출시키어 증류수에 용출된 단백질의 양을 분석하였으며, 30분 및 60분 간 용출 특성을 분석하였을 때, silver staining 법으로도 단백질의 용출이 검출되지 않아, 수산화나트륨으로 인해 개질된 표면구조가 나노구조여서 정지된 조건에서 기포 등의 원인으로 용출이 되지 않을 수도 있다고 사려되어 강제로 용출시킬 수 있도록 초음파 처리를 하였다. 초음파 처리를 하여 초음파에 노출하여 용출되는 단백질의 양을 분석하였다(Figure 8).

무처리군에 비해 증류수에 침적 1분 만으로도 초기 도입량의 대부분인 98.55%의 단백질이 급격하게 용출되었다. 이후 30분간의 침적에서는 1.45% 만이 관찰되었다. 수산화나트륨 수용액에 의한 초기 변화를 확인하기 위하여 짧은 시간으로 표면처리한 - 1시간 처리 군은 침적 1분에서 단백질의 용출량이 33.40%로, 무처리군에 비하여 약 1/3 가량으로 현저히 늦추어진 단백질 용출 현상이 관찰되었으며, 수산화나트륨 수용액 처리시간이 6시간 처리, 24시간 처리로 증가 시 25.5%, 23.96%로 용출량이 감소하는 것이 관찰되었다. 또한 수산화나트륨 수용액 처리 시간 증가에 따른 용출량 감소폭은 차츰 줄어드는 현상이 관찰되었으며, 1분 용출의 초기 용출 이후에는 수산화나트륨 수용액 처리가 된 세 군 모두 이후의 용출 시간 부여에도 불구하고 단백질 용출이 검출 한계 이하였다.

수산화나트륨 처리군의 단백질 용출량이 일반적인 용출 평가



**Figure 9.** SEM photographs of the rhBMP-2 coated surface on NaOH treated surface for 24 hrs. Magnification: a) 1000; b) 3000; c) 10,000; d) 30,000.

시, 무처리군에 비하여 1/4 내지 1/3 정도로 밖에 단백질 용출이 이루어지지 않은 것에 대하여 앞서 FT-IR 분석에서 살펴볼 수 있었던 것처럼, 수산화나트륨 처리에 의하여 현저하게 증가된 수산화기와 단백질 간의 강한 수소 결합 및 독특한 미세구조로 인한 표면적 증가에 기인하여 단백질이 빠져 나오지 못할 가능성을 고려할 필요가 있었다. 이에 60분간의 용출 실험이 끝난 시편을 1회 5분씩 초음파로 강한 진동을 총 90분간 인가하여 용출된 단백질의 용출량을 분석하였다(Figure 8).

단순 기계 절삭면을 지닌 무처리군의 경우 초기에 모두 용출하였기 때문에 90분의 초음파 처리를 하여도 더 이상의 용출은 관찰되지 않았다. 그러나 앞서 예상했던 바와 같이 수산화나트륨 처리군에서는 단백질 용출이 검출되었다. 수산화나트륨 수용액으로 1시간 처리된 표면에서는 6.80%의 용출 패턴을 보였으며, 6시간 처리된 표면에서는 12.86% 그리고 24시간 처리된 표면에서는 13.84%의 지연된 단백질 용출 특성이 나타났으며, 용출된 단백질의 총량은 1, 6, 24시간 표면처리에 따라 40.21%, 38.35%, 37.80%로 수산화나트륨 표면처리시간의 증가에 따라 용출 총량의 감소 경향이 확인되었다. 총 90분간의 초음파 인가에도 불구하고 검출되지 않은 60% 안팎의 단백질은 표면에 강하게 결합되어있어 이번 용출 평가 방법에서 검출되지 않은 것으로 예상된다.

#### 단백질 코팅된 시편의 표면 형상

단백질(rhBMP-2)을 알칼리처리 및 열처리 된 시편에 떨어뜨려 시편 표면에 잘 부착되어 있는지 여부를 확인하고자 표면 형상을 관찰하였다. 매우 발달된 sub- $\mu\text{m}$  level의 미세한 망상구조와 수- $\mu\text{m}$  이상의 crevice가 관찰된, 수산화나트륨 수용액으로 24시간 표면 처리된 시편에 rhBMP-2를 코팅하였다(Fig 9). 이와 같은 표면에 결합된 rhBMP-2는 관찰된 미세한 망상구조의 표면에 매우 잘 결합하고 있을 뿐만 아니라, 발달된 crevice

**Table 1.** Contact angle of the NaOH treated titanium surface, in comparison with that of Ti metal before treatment

| Surface       | Machined | 0 hr + annealing | 3 hr + annealing     | 6 hr + annealing     | 24 hr + annealing    |
|---------------|----------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Contact angle | 76°      | 47°              | < 10°, not available | < 10°, not available | < 10°, not available |

의 내부로 침투하여 잘 결합된 것도 함께 관찰되었다. 이는 수산화나트륨 처리에 의하여 물리적으로 거친 표면, 화학적으로는 수화된 표면이 기대하였던 역할을 충분히 수행했기 때문으로 판단된다.

### 결 론

줄기 세포의 조골로의 분화를 잘 일으키는 것으로 알려진 rhBMP-2의 코팅을 위하여 티타늄 디스크를 수산화나트륨으로 표면 처리 하였다. 이러한 처리로 확인된 표면의 변화는 수산화나트륨으로 에칭되어 생기는 거친 표면에 의한 단백질의 기계적 결합력 향상과 수화된 표면에 의한 수소결합에 기인한 단백질의 화학적 결합력 향상이다.

티타늄을 수산화나트륨 수용액으로 표면 처리한 시편은 매우 독특한 표면 형상을 지니며 물리적으로 거친 표면, 화학적으로 수화된 표면 구조를 갖추어서 알칼리 처리된 티타늄에 rhBMP-2를 코팅하였을 때 코팅된 단백질이 매우 친화적이어서 용출 특성이 지연되는 것을 확인할 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-355-E00018).

### 참고문헌

- Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA., "Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review," *Clin. Oral Impl. Res.*, **20**(Suppl. 4), 185-206 (2009).
- Carine C, Grosgeat B, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L., "Biomaterial surface properties modulate in vitro rat calvaria osteoblasts response: Roughness and or chemistry?," *Mat. Sci. Eng. C.*, **28**, 990-1001 (2008).
- Pegueroles M, Aparicio C, Bosio M, Engel E, Gil FJ, Planell JA, Altankov G., "Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy," *Acta Biomater.*, **6**, 291-301 (2010).
- Chae G-J, Jung U-W, Jung S-M, Lee I-S, Cho K-S, Kim C-K, Choi S-H., "Healing of surgically created circumferential gap around nano-coating surface dental implants in dogs," *Surf. Interface Anal.*, **40**, 184-187 (2008).
- Li Y, Lee I-S, Cui F-Z, Choi S-H., "The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium," *Biomaterials.*, **29**, 2025-2032 (2008).
- Um Y-J, Song J-E, Chae G-J, Chung S-M, Lee I-S, Cho K-S, Kim C-K, Choi S-H., "The effect of post heat treatment of hydroxyapatite-coated implants on the healing of circumferential corneal defects in

- dogs," *Thin Solid Films.*, **517**, 5375-5379 (2009).
- Ma Z, Gao C, Ji J, Shen J., "Protein immobilization on the surface of poly-L-lactic acid films for improvement of cellular interactions," *Eur. Polym. J.*, **38**, 2279-2284 (2002).
- Rosengren A, Johansson BR, Danielsen N, Thomsen P, Ericson LE., "Immunohistochemical studies on the distribution of albumin, fibrinogen, fibronectin, IgG and collagen around PTFE and titanium implants," *Biomaterials.*, **17**, 1779-1786 (1996).
- Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S., "Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules," *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **73B**, 88-96 (2005).
- Morra M., "Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins," *Eur. Cells and Mat.*, **12**, 1-15 (2006).
- Rutherford RB, Sampath K, Rueger DC, Taylor T., "Use of bovine osteogenic protein rapid osseointegration of endosseous dental implants," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, **7**, 297-301 (1992).
- Robinson D, Bab I, Nevo Z., "Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells," *J. Bone Miner. Res.*, **10**, 690-696 (1995).
- Urist MR., "Bone: formation by autoinduction," *Science*, **150**, 893-899 (1965).
- Lynches SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN., "A combination of platelet-derived growth factors and insulin-like enhances periodontal regeneration," *J. Clin. Periodontol.*, **16**, 545-548 (2005).
- Antonaides HN., "Human platelet derived growth factors(PDGF) : Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced sub-units," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 7314-7317 (1981).
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrughe BE., "Some recent advances in the chemistry biology of transforming growth," *J. Cell Biol.*, **105**, 1039-1045 (1987).
- Massague J., "The transforming growth factors," *Trends in Biochemical Science.*, **10**, 237-240 (1985).
- Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA., "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants," *J. Periodontol.*, **70**, 139-150 (1999).
- Reddi AH, Cunningham NS., "Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins," *J. Bone Miner. Res.*, **8**, S499-502 (1993).
- Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, Ikeuchi M, Horiuchi K, Ichijima K, Sugimura M, Yonemasu K, Ohgushi H., "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites," *Artif. Organs.*, **25**, 201-208 (2001).
- Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh SP, Zegzula HD, John W., "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration," *J. Biomed. Mater. Res.*, **43**, 356-364 (1998).
- Kingsley DM., "The TGF-beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organism," *Genes Dev.*, **8**, 133-146 (1994).
- Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susni C, Wikesjo

UME., "Alviolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: radiographic observations," *Clin. Oral. Impl. Res.*, **19**, 1027-1033 (2008).

24. Wikesjo UME, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH,

Rohrer ME, Wozney JM, Hall J., "Alviolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations," *J. Clinical Periodontol.*, **35**, 1001-1010 (2008).