

임플란트 표면특성에 따른 단백질의 흡착

박지선¹, 임영준²

¹서울대학교 치의학대학원 치의학과, ²서울대학교 치의학대학원 치의학과 치과보철과

Effect of implant surface characteristics on protein adsorption: a literature review

Ji-Sun Park¹, Young-Jun Lim²

¹Department of Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University

²Department of Prosthodontics and Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University

Corresponding author : Young-Jun Lim, DDS, MSD, PhD

Department of Prosthodontics and Dental Research Institute School of Dentistry,

Seoul National University 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea

Tel : +82-2-2072-2940 Fax : +82-2-2072-3860 E-mail : limdds@snu.ac.kr

Abstract

Along with advances in implant technology and surgical techniques, the interaction between implant materials and the surrounding biological tissues has become of great interest for achieving optimal osseointegration. Protein adsorption to the implant surface, in particular, is the first biological reaction that triggers the cascade of events of osseointegration upon implant placement. The adsorbed protein layer mediates cell adhesion to implant biomaterials, which ultimately determines biocompatibility of the implants. As a result, this process is affected by implant surface properties such as wettability, roughness, surface charge, and chemical composition. This review discusses current knowledge of the effect of implant surface characteristics on protein adsorption in the context of the physical and chemical properties of the implant surface.

Key words: dental implant, protein adsorption, surface characterization, wettability

I. 서론

임플란트가 구강내에 식립 되었을 때 생체와의 상호 작용은 임플란트의 표면이 생체의 혈액과 조직액을 만나면서 시작된다. 특히 체액 내에 함유된 단백질을 비롯한 분자들이 임플란트의 표면에 흡착되는 과정은 이어지는 생물학적 반응에 신호로 작용한다¹. 특히 분자 수준의 연구 결과 임플란트 산화막 표면과 조골세포의 상호작용은 단백질기반의 특이적이고 역동적인 신호생성 활동을 하는 것으로 나타났다². 이는 조골세포가 임플란트 표면에서 활동을 하기 위해서는 초기에 부착하는 단백질의 흡착 속도와 수용력이 임플란트의 생체적합성을 결정하는데 중요한 요소로 작용함을 의미한다. 이 종설에서는 초기에 임플란트 표면에 흡착되는 단백질에 초점을 맞추어, 표면의 화학적 조성의 변화, 표면의 친수성/소수성, 표면 지형적 특성에 따른 반응과 단백질의 분자 구조의 변화가 주는 영향에 대해 알려진 사실들을 고찰하였다.

II. 표면 특성에 따른 단백질의 흡착

1. 표면의 화학적 조성의 변화

단백질의 흡착(Protein adsorption)이 표면의 물리적 화학적 특성에 따라 서로 다른 양, 밀도, 구조, 방향성을 나타냄을 보여주는 많은 연구들이 있다. Taborelli M et al.³은 아민기나 메틸기를 가지고 있는 화학적 자가조립형단일층(chemical self-assembled monolayers: SAMs)을 이용해 표면특성을 변화시켰다. 이 실험에서는 티올기(thiol group)를 금의 표면에 촘촘히 배열하여, 실리카 기질 표면에서의 실레인(silanes)과 비슷하게 작용하도록 하고⁴, 그 위에 원하는 작용기를 결합시켰다. 기질 표면에 화학적 자가조립형단일층을 형성시키는 것은 표면의 화학적 변화를 일으키기 위해 많이 사용되는 방법이다^{5,6}. 아민기(-NH₂)로 이루어진 표면에서 알부민은 균일한 하나의 층을 형성하였으나, 메틸기(-CH₃)로 이루어진 표면에서는 시간의 경과에 따라 군집을 이루거나 개별분자가 따로 존재하였다. 양쪽 표면에서 알부민 분자의 넓이는 비슷했지만 높이는 메틸표면보다 아민표면에서 훨씬 낮았다. 이는 알부민의 위치배분이 결합하는 하부기질에 따라 달라진다는 것을 보여주며, 또한 아민기를 처리한 고분자에 알부민을 처리하면 세포 부착이 향상되는 현상을 설명해준다.

Pitt WG et al.⁷은 2, 10, 18개의 탄소 원자를 가지는 선형(linear)의 알킬분자를 고분자의 표면에 결합시키고 여러 조건에서 알부민의 초기흡착속도와 1 시간 동안의 흡착량, 탈락속도를 측정하였다. 초기 흡착속도를 측정한 결과에서 대조군을 포함한 네 가지 조건의 실험군 모두에서 불특정흡착의 속도는 비슷했다. 인간혈장알부민과 알킬분자의 특정 결합은 18개 탄소원자를 가진 고분자에서 많은 것으로 나타났으며, 인간혈장알부민의 구조적 안정성도 흡착속도에 영향을 미쳤다. 1시간 경과 후 총 흡착량은 알킬분자의 길이가 증가함에 따라 감소하였고, 탈락속도도 감소하였다. 이 결과는 알킬분자의 길이가 알부민과 알킬기가 접목된 고분자시스템 사이의 상호작용에 영향을 미칠 것이라는 가설을 확인시켜 주었다.

한편 이들은 유사한 실험⁸에서 폴리우레탄에 탄소원자가 18개인 알킬분자를 첨가하면 탈지된(delipidized) 인간혈장알부민의 초기흡착속도를 증가시킬 수 있음을 보였다. 알킬분자의 존재여부는 1시간 동안 알부민 용액에 노출시켰을 때 흡착된 총량에 영향을 미치지 않았고, 이후 알부민의 탈락에도 마찬가지였다. 초기흡착속도는 단백질 농도에 비례했으며, 고분자 표면의 알킬화는 활성화 에너지를 증가시켰다.

위에서 언급된 실험결과에 따라, 기질의 표면특성을 변화시킴으로써 단백질의 흡착과정을 조절하는 것이 가능함을 예상할 수 있으며 이를 뒷받침하는 결과들이 발표되었다. Ta TC et al.⁹은 주사력현미경(Scanning Force Microscopy)을 사용하여 흡착된 단백질의 분자구조 또는 방향성을 조사하였다. 이 실험은 alkanethiolate 단일층에 메틸기(-CH₃)와 카르복실기(-COOH)를 특정 패턴을 따라 결합시키고 그 위에 단백질을 흡착시켜 각 작용기의 효과를 관찰하였다. 한 가지 성분으로 이루어진 단일층에 대한 bovine fibrinogen(BFG)의 흡착을 조사한 결과 BFG의 완전한 막이 각각의 작용기에서 형성되었다. BFG가 흡착된 뒤에 friction image에서 서로 다른 점을 관찰할 수 있었는데, 이는 두 작용기에 의해 단백질의 분자구조나 방향성이 서로 다르게 유도되었기 때문이었다. 다른 흡착된 단백질에서도 막의 frictional contrast를 관찰할 수 있었다. 즉 하부의 작용기가 부착하는 단백질의 공간적 상태에 영향을 미치는 것이 확인되었다.

표면의 화학적 패턴화에서 추가적으로 고려해 볼 사항으로 각 화학적 영역의 경계에서 추가적인 표면-지형적 효과를 들 수 있다. 단백질은 둘 중 어느 한 영역에만 선택적으로 결합하기 때문에 양쪽의 단백질 층에 높이 차이가 생김으로써, 또 하나의 표면-지형적

특성을 부여하는 결과를 가져온다. 이러한 단백질 층의 높이 차이는 나노미터 정도의 수준일 것으로 생각되나, 이런 현상이 두 화학적 영역의 경계에서의 세포 반응에 어떤 영향을 미치는지는 아직 밝혀지지 않았다.

2. 표면의 친수성/소수성

생체의 모든 환경은 기본적으로 물로 이루어져 있으므로, 표면의 젖음성(wettability), 즉 친수성/소수성 특성은 단백질의 흡착에 영향을 미치는 가장 중요한 요소 중 하나이다¹⁰. 물 분자는 극성을 띠며, 서로 간에 수소 결합을 이루고 있기 때문에 비극성 용질이나 표면과는 쉽게 반응하지 않는다. 따라서 수용액 환경과 비극성 표면의 접촉이 일어나면, 표면 근처에서는 물 분자의 밀도가 낮아지고 이웃한 물 분자끼리의 수소 결합에 의한 자가결합이 증가된다. 이는 무질서도가 감소하는 것으로 엔트로피 측면에서 불리하게 작용한다. 한편 친수성 표면의 경우 수용액 환경에 접했을 때 물 분자끼리의 수소결합이 표면과의 수소결합으로 대체되는 양상으로 물 분자가 배열되기 때문에 이는 엔트로피 면에서 큰 변화를 가져오지 않아 유리하다.

Vogler는 표면의 젖음성을 표면부착장력(surface adhesion tension)으로 나타내고 이를 정량화하였다¹⁰. 물과 접촉하고 있는 면의 표면 부착 장력 τ 는 다음과 같이 정해진다.

$\tau = \gamma \cos \theta$ (γ : 물의 표면장력, θ : contact angle)
Yoon et al.¹¹은 실험을 통해 Fig.1과 같은 경향을 밝혀냈다. 여기서 BECB limit는 Berg et al.¹²이 제안한 측정 가능한 소수성 힘의 한계범위로 위 표에서 거리가 0이 될 때 접촉각의 범위와 거의 일치한다. 이 범위에서는 표면에 근접한 부분에서 물 분자들의 수소결합이 방해받거나 또는 표면과의 더 강한 수소결합으로 대체되지도 않아, 표면 부근에서도 물 분자의 배열에 큰 변화를 가져오지 않는 중립적인 상태라고 할 수 있다. 이를 바탕으로 Vogler는 이보다 접촉각이 작을 때, 즉 $\tau < 30$ dyn/cm 일 때를 소수성으로, $\tau > 30$ dyn/cm일 때를 친수성으로 구분하였다.

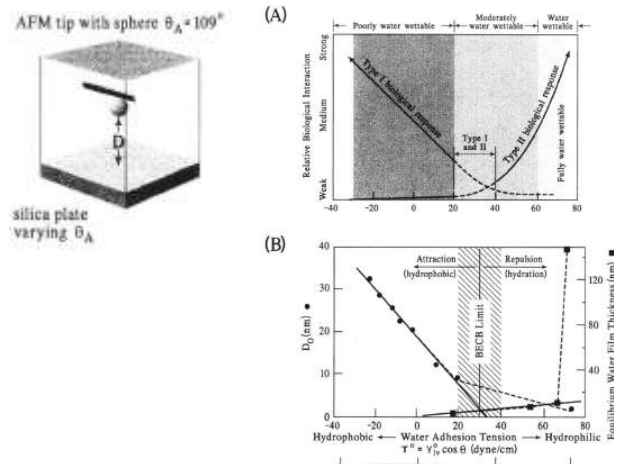


Fig.1. 왼쪽과 같은 장치를 고안하여 표면장력과 표면의 친수성의 관계를 측정하였다. 실리카 판의 친수성 정도를 변화시키면서 그에 따라 결정되는 tip과의 거리, 즉 tip과의 척력/인력을 측정한다. (A),(B) 표면의 접촉각이 변화할 때, 크게 두 영역(친수성표면/소수성표면)에서 서로 다른 상관관계가 나타남을 보여준다¹⁰.

두 범위에서 표면에 직면한 위치에서 작용하는 힘의 양상과 물 분자의 배열이 다르기 때문에 Fig.1의 (A)에서와 같이 그에 따른 생물학적 반응의 종류도 두 가지로 구분할 수 있다. Vogler는 이전의 연구에서 유리, SAM(self-assembled monolayer)층을 갖는 실리콘, 고분자, 표면 처리된 고분자 등 주로 표면에 전자가 풍부한 작용기를 가져 수소결합을 하기 좋은 조건에서 부착 장력을 독립변수로 하는 실험들을 해왔다. 이를 바탕으로 단백질의 흡착에서 나타나는 경향성은 주로 type 1의 생물학적 반응이 일어났다고 보고하였다. 즉 다른 조건이 같을 때 단백질의 흡착은 소수성 표면에서 보다 용이하게 일어난다는 것이다.

단백질은 저마다 극성 또는 비극성 잔기를 갖는 아미노산으로 이루어져 있다. Norde¹³에 의하면 작은 단백질의 접근 가능한 표면 중 40-50%에 비극성 작용기가 위치해 있어, 이들은 소수 단백질이 흡착되기 위해서는 우선 흡착물과 표면이 부분적으로라도 탈수화(dehydration)되어야 한다. 소수성 표면에서 이 과정은 물의 엔트로피를 증가시키기 때문에 열역학적으로 유리하다. 반면 친수성 표면에서는 물 분자가 분리되는 단계가 단백질 흡착 과정에서 상당한 에너지 장벽으로 작용한다¹⁴. 실제로 물이 강하게 결합하고 있는 표면에서는 단백질의 흡착이 매우 저조한 것으로 나타났다¹⁵. 그러나 전하 간 상호작용이나 단백질 구조의 변화 등이 필요한 추진력을 제공하면 친수성

표면에서도 충분히 단백질의 흡착이 일어날 수 있다. 또한 친화도가 전하에 많은 영향을 받는 표면에서는 소수성, 친수성 표면에 거의 대등한 양의 단백질의 흡착이 일어나기도 한다.

Roach, P의 단백질과 표면에 관한 최근의 연구¹⁶에서는 소의 혈장 알부민(bovine serum albumin)과 피브리노겐(fibrinogen)의 흡착을 소수성과 친수성 표면에서 관찰하였다. 여기에서 알부민은 한 번에 표면에 흡착되지만 피브리노겐의 흡착은 보다 여러 단계를 거치는 복잡한 과정임을 알게 되었다. 알부민은 소수성 표면의 메틸기에 강한 친화도를 가지고 있었다. 피브리노겐은 친수성, 소수성 표면 모두에 더 빨리 결합하지만, 친수성 표면에 조금 더 높은 친화도를 가지고 있었다.

흡착된 단백질의 구조적 측면을 적외선 분광법(Infrared Spectroscopy)을 이용해 조사한 결과, 첫 한 시간 동안에는 시간에 따른 변화가 관찰되지 않았다. 두 단백질 모두 친수성 표면에 결합했을 때보다 소수성 표면에 결합했을 때 보다 덜 조직된 이차구조를 보였고, 알부민에서 그 차이가 더 두드러졌다. 이 연구는 단순한 하나의 화학물질 층이 단백질의 결합속도와 결합된 구조에 영향을 미친다는 것을 보여준 것이다.

3. 분자구조의 변화

근본적으로 생체의 반응은 생체재료들과 표면의 단백질 분자들의 상호작용을 통해 유도된다. 이 과정에서 초기에는 단백질 분자들이 흡수되어 동역학적인 흡수산물을 만들어 내지만, 상호작용이 매우 활발해지면 단백질의 변성이 일어나 에너지면에서 유리한 열역학적 흡착산물이 만들어진다. Relaxation이라 불리는 이러한 과정은 흡수되었을 때 바로 일어나기도 하고, 단백질과 표면의 상호 작용이 증대되고 수용액과의 상호작용이 감소하는 과정이 필요할 경우, 이런 과정이 진행되는 동안 약간의 시간이 지연된 뒤 일어나기도 한다.

단백질의 중심부에 존재하는 부분과는 달리 용액을 향해 노출되어 있는 작용기들은 물질의 표면과 상호작용하기가 더 용이하다. 단백질의 풀림이나 변성은 내부에 가려져 있던 아미노산 작용기들이 외부환경에 접근할 수 있게 해 줌으로써 외부와의 상호작용이 가능하도록 한다. 단백질의 변성은 표면과의 상호작용을 통해서 유도될 수 있는데, 이는 정전기력(electrostatic force)과 엔트로피 효과, 소수성 상호작용과 단백질의 구조 변화(conformational change)를 포함하는 몇몇 요인들에 의해 영향을 받는다¹⁷.

소수성 부분이 수용액성 환경으로부터 멀어지도록 하는 것은, 기질과 외부 단백질 표면 모두에게 유리한 과정으로 단백질의 변성을 야기한다. 이러한 흡착 단백질 내부의 구조적 변화에 의해 계의 엔트로피가 증가될 수도 있다¹⁸. α 나선 구조가 무작위 코일이 되는 것과 같은 이차구조의 상실은 결합의 이동성을 증가시키고 따라서 분자 내에 엔트로피가 증가한다. 또한 폴리펩타이드 골격(backbone)의 유연성이 증가하여 이차구조가 느슨해지면, 흡착된 근처의 단백질 분자와 결합하여 소수성 부분이 수용액성 환경으로부터 가려진 상태로 남아있을 수 있다. 반데르 발스 작용이나 전기적 상호작용, 수소결합 등도 단백질 사이에 형성되어 엔탈피적으로 유리한 조건을 만들어 준다. 이러한 구조적 재배열은 단백질과 표면의 접촉을 증가시켜 단백질이 머무는 시간 동안 부착을 더 강화하고, 흡착의 가역성과 단백질의 용출성(elutability)에 변화를 가져 온다¹⁹. 또한 단백질 구조의 유연성과 안정성은 흡착의 동역학에도 기여하는데 고도로 수화된 유연한 분자는 표면과 빠르게 많은 비공유결합을 형성하는 반면, 보다 조밀한 구조의 안정한 단백질은 소수성 결합이나 정전기적 힘의 영향을 더 많이 받는다^{20,21}.

단백질의 분자구조 변화는 친수성이거나 같은 전하를 띠는 단백질처럼 흡착이 일어나기 어려운 경우에도 반응이 일어날 수 있도록 하는 원동력이 된다. 다양한 단백질과 표면을 이용한 연구들을 보면 전부는 아니라도 대부분의 단백질 흡착반응에서 약간의 단백질 분자구조의 변화가 일어나는 것으로 나타났다. Norde와 Giacomelli의 연구에^{22,23} 따르면 흡착된 단백질은 완전히 풀려서 변성되어 있는 상태가 아니라 상당한 정도의 이차구조를 유지하고 있으며 보통 용해된 상태보다 더 안정하다. 단백질이 탈락될 때 원래의 구조로 돌아갈 수 있는가의 여부는 표면의 소수성과 단백질의 내부적 안정화 능력에 달려있다. 예를 들어 유연한 단백질에 속하는 bovine serum albumin은 친수성 실리카에 흡착될 때는 원래와 다른 분자구조를 가졌다가 탈락되면 다시 원래의 구조로 돌아간다. 또한 경질의 단백질에 속하는 계란의 리소자임(lysozyme)은 소수성의 polytetrafluoroethylene에 흡착되었다가 탈락되면 원래의 구조로 돌아간다. 단백질의 재배열은 불연속적인 단계로 진행되어 흡착된 단백질들의 분자구조의 분배 상태는 균일하지 않다.

단백질의 기능은 분자 내 특정 영역(domain)에 의해 지배되기 때문에 단백질의 방향성과 분자적 구조는 흡착된 단백질이 실제로 얼마나 고유의 기능을 발휘하는가를 나타내는 활동도를 결정한다. 많은 연구들에서 피브리노겐이나 피브로넥틴이

흡착될 때 일어나는 분자 구조적 변화로 인해 기능이 손상되거나 강화됨이 알려져 있는데, 피브로넥틴은 소수성 폴리스티렌 표면에서보다 같은 재료의 친수성 표면에 흡착되었을 때 더 향상된 세포부착과²⁴ 조골 세포로의 분화능력²⁵을 보였다. 또한 피브로넥틴은 용해된 상태에서는 세포 결합능력이 감소되어 있어서 표면에 의한 활성화를 필요로 하는 것으로 나타났다. Schwarz et al.²⁶은 피브로넥틴의 효소분해산물 중 부착력을 가진 부분만을 이용해 피브로넥틴 분자가 표면에 부착되어 있지 않은 상태를 실험적으로 설정하고, 그러한 상황에서는 세포부착이 일어나지 않음을 보였다. 마찬가지로 인테그린이 피브로넥틴에 결합할 때도 피브로넥틴의 부분적 풀림과 자가 조합에 의해 반응이 용이해진다²⁷. 피브리노겐의 표면 활성화는 가장 많이 연구된 부분 중 하나로, 피브리노겐은 흡착된 상태에서만 비활성화 된 혈소판에 결합할 수 있다²⁸.

표면과의 접촉을 증가시키기 위해 흡착된 단백질은 용액에 존재하는 단백질과 결합부위를 경쟁해야 한다. 따라서 용액 내 단백질의 농도가 높거나²² 다른 단백질과 함께 흡착이 일어나야 하면 표면 활성화가 억제될 수 있고, 이는 단백질의 고유기능을 보존하는 기전으로 이용될 수 있다²⁹.

4. 표면 지형적 특성

마이크로미터 수준의 표면특성은 개개의 단백질 분자에 의해 인식되기에는 너무 크다. 그러나 표면 특성이 단백질 분자 자신의 크기 수준과 같은 범위에서 부여된다면 흡착된 단백질의 모양이나 형태를 조절하는 것이 가능할 수 있다. 표면의 곡률로써 단백질 분자의 배열판을 형성한다든지, 단백질 분자의 농도를 조절하는 것이 가능한가와 같은 질문에 답할 수 있게 된다면 표면 단백질의 구조를 통해 활성을 조절하는 것이 가능해질 것이다. 특히 치과용 임플란트로 이용되는 티타늄의 경우 다양한 표면 처리법이 개발되어 이것이 단백질의 흡착과 세포반응에 미치는 영향이 활발히 연구되고 있다.

Sela et al.³⁰은 연구에서 티타늄 디스크를 몇 가지 방법으로 처리하여 서로 다른 표면특성, 특히 표면의 기하학적 상태를 달리 한 뒤 혈장 단백질의 부착을 관찰하였다. 이들은 티타늄 디스크를 각각 기계절삭, 산부식, 산부식 후 블라스팅한 뒤 표면특성을 SEM, AFM, XPS, 접촉각 측정 등으로 조사하고, 사람의 혈장에 24시간 동안 담근 후 흡착된 단백질을 조사하였다. 표면조도는 산부식 후 블라스팅한 시편에서 가장 높게 나타났는데, 이 시편의 표면은 매우 불규칙한 상태로 20-50 μm 와 0.5-1 μm 정도의

함요부가 모두 나타났으며 5-50 μm 의 알루미늄 입자도 박혀 있는 것으로 확인되었다. 표면의 형태는 블라스팅으로 생성된 넓은 분화구 형태와 산부식으로 인한 작은 함몰부들이 관찰되었다. 이러한 삼차원적 변화는 표면적의 증가를 가져옴으로써, 단백질의 흡착이 산부식 후 블라스팅한 표면에서 가장 높게 나타난 이유가 되었을 것이라 추정된다. 표면 검사 결과 산부식과 블라스팅은 티타늄 표면의 화학적 조성에는 별다른 변화를 가져오지 않고, 표면조도나 기하학적 특성에 주된 변화를 가져온 것으로 나타났다.

표면조도의 변화는 표면에너지와 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 표면에너지는 앞서 다루었던 접촉각(contact angle)이나 젖음성(wettability)과 같은 지표로 측정 되는데, 티타늄 표면을 처리함으로써 발생하는 표면조도의 변화가 이들에게도 영향을 미친다는 매우 흥미로운 연구가 있다. Rupp et al.³¹은 티타늄 표면을 large grit blasting 후 산부식까지만 한 경우(GA), 이후에 중화시킨 경우(GAN), 또는 산화시킨 경우(GAO)에 표면의 물리적 특성과 그에 따른 피브로넥틴의 부착 차이를 알아보았다. 이 연구에서 주목할 점은 Dynamic Contact Angle analysis(DCA)의 사용으로, 시간에 따른 접촉각, 즉 표면의 친수성의 변화에 대한 정보를 제공한다는 점이다. Fig. 2는 DCA의 원리를 간단히 보여준다.

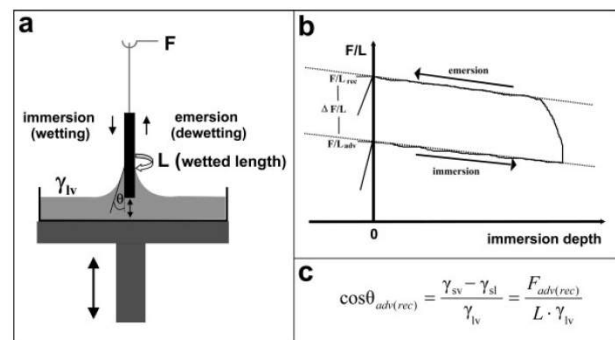


Fig. 2. dynamic contact angle analysis의 원리³¹

대조군으로 사용된 macrostructured surface를 갖는 표면에서는 immersion depth와 횡수에 따른 접촉각의 결과가 일관성을 가졌다. 그러나 실험군 중 GAO는 처음에는 소수성이었던 표면이 immersion 횡수가 증가함에 따라 점진적으로 친수성으로 변했으며, GAN과 GA는 맨 처음 immersion에서만 소수성을 보인 뒤 두 번째부터는 확연한 친수성으로 변해 그 상태가 유지되었다. 또한 표면조도의 측정 시에도 흔히 사용하는 지표 인 Ra(average roughness; Rmax 등과 함께 표면 고도, z축 특성을

나타냄) 대신 xy 평면에서 표면의 입체적 구성을 나타내는 지표인 hybrid parameter를 측정하였는데, Ra나 Rmax에서는 유의미한 차이가 나타나지 않은 반면 hybrid parameter는 실험군이 대조군에 비해 높게 나타나 표면적의 증가를 암시하였다. 이 같은 결과는 SEM으로 확인한 실험군의 표면상태를 설명하는데 도움이 된다. SEM에서 나타난 GAN의 표면은 특징적으로 각각 100 μ m 크기의 함몰부 내부에 12-75 μ m 크기의 함몰부가 여럿 존재하고, 그 안에 다시 1-5 μ m의 스케일을 갖는 함몰부가 존재하는, 위계적(hierarchical)인 구조로 나타났다 (Fig.3).

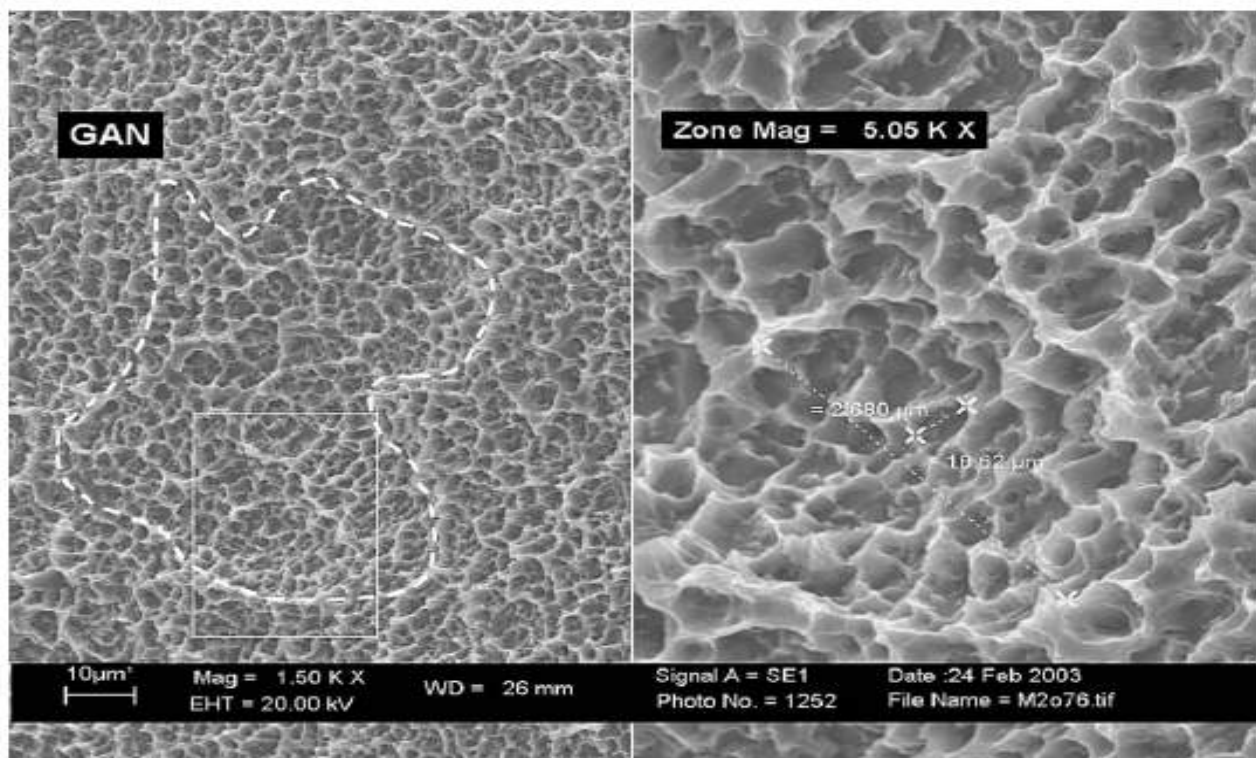


Fig. 3. GAN(grit-blasting/acid-etching/ neutralization) 시편의 SEM observation: 위계적 구조를 갖는 여러 스케일의 함몰이 확인된다³¹.

Rupp et al.³²은 이와 같은 특성으로 DCA(dynamic contact angle analysis) 분석에서 나타난 결과를 설명하기 위해서, Herminghaus가 식물체 잎의 초소수성을 설명하기 위해 제안한 이론을 도입하였다. 먼저 위계적인 구조로 함몰부가 존재하고, 접촉각이 90도 이하일 때 최소한의 돌출부가 존재함을 기본적으로 가정하였다. 처음에 액체를 밀어내는 상태에서는 액체가 함몰부 위에 걸쳐있는 양상으로 macroscopic contact angle이 증가되다가, 액체가 함몰부 내부를 채우고 들어가면 표면은 접촉각이 0에 가까워져 확인한 친수성 상태로 나타나는 것이다. 이 때 처음에 일시적으로 나타나는 소수성 상태를 roughness-induced hydrophobicity라

하였다. 이 같은 연구를 기반으로 이후에 Rupp et al.³²은 티타늄 표면 가공 시 protective gas condition에서 표면을 거칠게 한 뒤 액체를 처리하여 소수성이 유도되지 않도록 함으로써, 탄화수소에 의한 오염을 줄이고 표면에너지 높이는 방법을 고안하기도 하였다.

피브로넥틴을 흡착시킨 결과도 흥미롭다. 이전에도 cp(commercially pure)-Ti에 흡착된 피브로넥틴은 표면의 친수성을 상당히 감소시킨다는 보고가 있었다³³. 면역학적 방법으로 실험군 표면의 피브로넥틴 양을 측정한 결과 GA와 GAN에서 가장 많은 피브로넥틴이 확인되었고 DPS가 그 다음이었으며, GAO는 가장 낮은 흡착량을 보였다. DCA로 측정한

결과는 흡착이 진행됨에 따라 표면의 친수성이 증가하였음을 보여준다. GAO의 낮은 흡착률이 친수성으로 변하기까지 상대적으로 오랜 시간이 걸린 결과라고 해석한다면, 표면의 성질이 단백질의 흡착에 영향을 준 것이라고 볼 수 있다.

산부식과 SLA(sandblasted/acid-etched)를 사용한 Zhao³⁴의 실험은 표면 조도와 표면 에너지 사이에서 synergistic effect를 가진다고 보고했다. 이 실험에서는 각각 0.2 μ m, 0.83 μ m, 3-4 μ m의 표면조도를 갖는 평활면, 산부식면, SLA표면의 티타늄 시편과, 산부식면과 SLA면에 추가로 표면처리를 가해 부동태화(passivation)가 덜 되어 표면에너지가 높은 채로 남아있는 산부식-추가 처리면과 SLA-추가 처리면까지 다섯 종류의 시편을 사용하였다. 사람의 조골세포를 대표한다고 할 수 있는 세포주인 MG63 세포를 각 시편에서 배양하여 세포의 형태와 분화도, 활동도를 확인하였다. Osteoprotegerin의 생성량을 비교한 결과 평활면과 산부식면은 큰 차이가 없었고, 산부식면과 비교할 때 추가 처리된 산부식면은 30%, SLA면은 70%의 증가가 나타났고, 추가 처리된 SLA면은 250%의 증가가 나타났다. 이 같은 경향은 TGF-beta1, PGE-2에서도 유사하게 나타나, 높은 표면에너지와 마이크로미터 이하의 표면조도가 synergistic effect를 보임이 확인되었다.

양극 산화는 티타늄 시편을 전해질 용액에 담근 뒤 전압을 걸어 산화가 일어나도록 하는 것으로 티타늄 표면에 산화티타늄(TiO₂) 층이 형성된다. 앞서 언급했듯이 티타늄은 공기 중에서 바로 자발적으로 산화막을 형성하지만, 양극 산화를 거친 산화티타늄 층은 다공성의 특성을 갖게 되어 골조직과 유사한 구조를 갖게 되기 때문에, 표면의 기하학적 형태의 변화가 생물학적 활성에 미치는 영향이 주목받고 있다. 양극 산화와 관련하여 최근에 많은 실험이 이루어지고 있는데, 주로 조골세포의 반응을 살펴보는 실험들이 많으며, 최근에는 부착 단백질과의 관계에 관한 연구도 이루어지고 있다. Yao et al.³⁵에 따르면 나노튜브 구조의 표면을 갖는 양극산화된 티타늄 면에 칼슘 침착이 눈에 띄게 증가하였고, Yang et al.³⁶은 양극산화된 티타늄 표면에 형성된 산화막이 수산화인회석의 침착을 용이하게 하여 생물학적 활성도에 영향을 미친다고 하였다.

III. 결론

임플란트 표면의 물리, 화학적 특성은 표면기질의 작용기와 단백질의 작용기 사이에 일어나는 상호작용을 통해 흡착이 일어나는 속도와 흡착되는

양, 그리고 흡착된 단백질의 구조에도 영향을 미친다. 표면의 화학적 특성을 변화시켜 전기적 상호작용이나 소수성 상호작용이 달라지게 함으로써 단백질이 표면에 더 큰 친화성을 갖도록 할 수 있다. 흡착될 단백질의 외면의 특성은 단백질이 어떻게 결합하는지를 결정하는 중요한 요소이다. 표면의 특성을 나타내는 각 변수가 미치는 영향을 완전히 분리하기는 어려우나, 부착 관련 단백질의 기능을 촉진하는 표면은 대개 친수성이며 음전하로 대전된 경우였다. 표면의 기하학적 특성에 변화를 가져오는 표면처리 방법들은 대개 표면조도를 증가시켜, 표면 에너지와 표면적의 증가를 통해 단백질의 흡착을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보인다.

표면의 화학적 패턴화를 통해 단백질의 부착양상을 변화시킬 수 있음이 알려져 있긴 하지만, 흡착된 단백질의 구조나 방향성에 대해 어느 정도의 조절능력을 갖는지는 아직까지 구체적으로 알려져 있지 않다. 단백질과 표면의 상호작용이 단백질의 변성을 유도한다는 제안이 있었지만 흡착된 단백질의 초박막을 조사하는 방법으로도 아직까지는 단백질 구조의 정확한 확인이 이루어지지는 못했고 다만 구조적, 방향적 변화가 있음이 확인되는 수준이었다. 더 많은 연구가 필요하다.

References

1. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):1-18.
2. Collier TO, Jenney CR, DeFife KM, Anderson JM. Protein adsorption on chemically modified surfaces. *Biomed Sci Instrum.* 1997;33:178-83.
3. Taborelli M, Eng L, Descouts P, Ranieri JP, Bellamkonda R, Aebischer P. Bovine serum albumin conformation on methyl and amine functionalized surfaces compared by scanning force microscopy. *J Biomed Mater Res.* 1995;29:707-14.
4. Scotchford CA, Gilmore CP, Cooper E, Leggett GJ, Downes S. Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on goldself-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res.* 2002;59:84-99.
5. Mrksich M. What can surface chemistry do for cell biology? *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6(6):794-7.
6. Murphy WL, Mercurius KO, Koide S, Mrksich

- M. Substrates for cell adhesion prepared via active site-directed immobilization of a protein domain. *Langmuir*, 2004;20:1026-30.
7. Pitt WG, Grasel TG, Cooper SL. Albumin adsorption on alkyl chain derivatized polyurethanes. II. The effect of alkyl chain length. *Biomaterials*, 1988;9:36-46.
8. Pitt WG, Cooper SL. Albumin adsorption on alkyl chain derivatized polyurethanes: I. The effect of C-18 alkylation. *J Biomed Mater Res*, 1988;22:359-82.
9. Ta TC, McDermott MT. Mapping interfacial chemistry induced variations in protein adsorption with scanning force microscopy. *Anal Chem*, 2000;72:2627-34.
10. Vogler EA. Water and the acute biological response to surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999;10:1015-45.
11. Yoon RH, Flinn DH, Rabinovich YI. Hydrophobic Interactions between Dissimilar Surfaces. *J Colloid Interface Sci*, 1997;185:363-70.
12. Berg JM, Eriksson LGT, Claesson PM, Borge KGN. Three-component Langmuir-Blodgett films with a controllable degree of polarity. *Langmuir*, 1994; 10:1225-1234.
13. Haynes CA, Norde W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 1994;2:517-566.
14. Vogler EA. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*, 1998;74:69-117.
15. Hanein D, Geiger B, Addadi L. Fibronectin adsorption to surfaces of hydrated crystals: An analysis of the importance of bound water in protein substrate interactions. *Langmuir*, 1993;9:1058-1065.
16. Roach P, Farrar D, Perry CC. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc*, 2005;127:8168-73.
17. Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 2004;20:6800-7.
18. Horbett TA. Proteins: Structure, properties, and adsorption to surfaces. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE eds. *Biomaterials Science*. San Diego, CA: Academic Press, 1996;pp.133-141.
19. Slack SM, Horbett TA. Changes in the strength of fibrinogen attachment to solid surfaces: An explanation of the influence of surface chemistry on the vroman effect. *J Colloid Interface Sci*, 1989;133:148-165.
20. Arai T, Norde W. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces. 2. Sequential and competitive adsorption. *Colloids and surfaces*, 1990;51:17-28.
21. Arai T, Norde W. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces. 1. Adsorption from single protein solutions. *Colloids and surfaces*, 1990;51:1-15.
22. Norde W, Giacomelli CE. Conformational changes in proteins at interfaces: From solution to the interface and back. *Macromol Symp*, 1999;145:125-136.
23. Giacomelli CE, Norde W. The adsorption-desorption cycle: Reversibility of the BSA/silica system. *J Colloid Interface Sci*, 2001;233:234-240.
24. Steele JG, McFarland C, Dalton BA, Johnson G, Evans MD, Howlett CR, Underwood PA. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: The effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1993;5:245-273.
25. Schwartz Z, Bell BF, Wang L, Zhao G, Olivares-Navarrete R, Boyan BD. Beta-1 integrins mediate substrate dependent effects of 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ on osteoblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007;103:606-609.
26. Schwarz MA, Juliano RL. Surface activation of the cell adhesion fragment of fibronectin. *Exp Cell Res*, 1984;153:550-555.
27. Seiffert D, Smith JW. The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic. *J Biol Chem*, 1997;272:13705-13710.
28. Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem*, 1991; 266:11227-11233.
29. Lewandowska K, Balachander N, Sukenik CN, Culp LA. Modulation of fibronectin adhesive functions for fibroblasts and neural cells

- by chemically derivatized substrata. *J Cell Physiol*, 1989;141:334-345.
30. Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*, 2007; 18:630-638.
 31. Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials*, 2004;25:1429-1438.
 32. Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*, 2006;76:323-334.
 33. MacDonald DE, Markovic B, Allen M, Somasundaran P, Boskey AL. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J Biomed Mater Res*, 1998;41:120-130.
 34. Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*, 2007;28:2821-2829.
 35. Yao C, Slamovich EB, Webster TJ. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J Biomed Mater Res A*, 2008;85:157-166.
 36. Yang B, Uchida M, Kim HM, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials*, 2004;25:1003-1010.