

임플란트 표면특성에 따른 세포반응(문헌고찰)

박지선¹, 임영준²

¹서울대학교 치의학대학원 치의학과, ²서울대학교 치의학대학원 치의학과 치과보철과

Effect of implant surface characteristics on cellular response: 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

Cell adhesion to implant biomaterials has become of great importance to the prosthetic success of implants because it plays a major role during the initial phase of the biological response to implants. It is reported that this cellular process is mediated by the absorbed protein layer. In particular, many previous studies have revealed that surface characteristics of implants influence the cellular behavior associated with integration to the surrounding tissue. Therefore, the surface of an implant is a critical factor for determining its biocompatibility and osseointegration. This literature review investigates various implant surface characteristics such as chemical composition, wettability, surface charge and topography and discusses their synergistic effect on the cellular response to implants.

Key words: dental implant, surface treatment, surface characterization, cellular response

I. 서론

생체에 매식된 물질의 표면에서는 부착 단백질을 매개로 하여 세포와 표면과의 상호작용이 일어난다. 특히 표면의 물리적, 화학적 특성은 이러한 상호작용을 매개하는 데 중요한 요소로 인식되고 있다^{1,2}. 그 동안의 많은 연구들을 바탕으로 현재 의학에서 사용되는 재료들은 미세한 물리적, 화학적인 표면 특성까지 조절되어 보다 긍정적인 방향으로 세포의 반응을 유도할 수 있게 되었다. 특히 정형외과와 치과에서 사용되는 임플란트는 골유착과 이후 연조직 반응이 치료의 예후를 결정하므로, 임플란트의 표면을 코팅하거나 다른 표면 처리를 통해 특성을 변화시키는 방법이 현재 관심의 대상이 되고 있으며³, 이 분야의 많은 연구가 조골세포와 티타늄 표면 사이에 골유착 반응을 촉진할 수 있는 형태적, 화학적 성질을 가지는 표면을 가공 제작하는 것을 목표로 한다. 이 종설에서는 표면의 화학적 조성의 변화, 친수성/소수성, 전기적 성질, 지형적 특성을 조사하고 각 요소가 세포반응에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

II. 표면 특성에 따른 세포반응

1. 표면의 화학적 조성의 변화

임플란트가 식립 되었을 때 표면의 화학적 조성은 세포의 부착(attachment)과 확장(spreading)을 변화시킬 수 있는 중요한 요소이다. 예를 들어 표면의 작용기는 각 유형의 세포에 특정반응을 도모하는 데 중요한 역할을 한다. 조골세포(osteoblast)의 경우 $-CH_3$ 은 세포의 부착과 광화(calcification)를 유도하고, $-OH$ 와 $-NH_2$, $-COOH$ 역시 부착과 광화에 관여한다^{4,5}. 아미노산은 조골세포의 확장과 관계가 있고⁶, RGD 펩타이드는 세포의 확장과 형태, 세포골격의 조직에 관여한다⁷. 표면의 화학적 특성을 통해 세포의 신호전달과정(signal pathway)을 조절하는 과정의 중요성은 세포 부착에 있어서 단백질의 흡착이 얼마나 필수적인 역할을 하는가를 보면 잘 알 수 있다⁴.

물질의 표면은 다양한 방법으로 변화시킬 수 있다. 표면에 화학적 농도차를 부여할 수도 있고, 자가조립형단일층(self-assembled monolayers: SAMs)을 입힐 수도 있으며, 표면에 생물학적 활성을 갖는 물질을 입혀 화학반응을 유도할 수도 있다. 원하는 표면조성을 갖도록 하기 위하여 자주 이용되는 자가조립형단일층의 말단기를 변화시키는 방법을 이용하여, Houseman and Mrksich⁸는 RGD 혼합물과 oligo(ethylene glycol) group으로 이루어져 있으면서 단백질의 불특정 흡착에 저항성을 가지는 시스템을 고안하였다. 펩타이드의

표면밀도는 $17-0.7 \text{ pmol/cm}^2$ 로 확인되었다. 펩타이드 사이의 간격은 각각 tri-, tetra-, penta-, hexa(ethylene glycol)을 표지하는 티올 그룹으로 조절하였고, 나머지 특성은 동등하게 두었다. 이 실험에서 단일층에 대한 세포의 부착은 oligo(ethylene glycol)의 길이가 증가함에 따라 감소하였고, 고정된 펩타이드의 밀도가 낮을수록 세포부착의 감소가 두드러졌다. 세포의 부착과 신장(growth)은 tri(ethylene glycol)을 사용한 경우에는 펩타이드의 농도에 영향을 받지 않았고, 보다 긴 글라이콜 올리고머를 포함한 경우 펩타이드의 농도에 높은 민감성을 보였다.

이 실험은 표면 작용기들 사이의 거리가 세포부착도에 영향을 미칠 수 있음을 보여주었다는 점에서 중요하다. 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol)을 바탕으로 하는 물질은 생물학적으로 안정되고 세포부착에 저항성을 가지는 것으로 알려져 있기 때문에⁹, 이것을 표면의 펩타이드 사이 공간에 기저물질로 사용하여 세포부착과 대사활동도를 살펴보았다. 그 결과 $58-73 \text{ nm}$ 의 간격에서 focal adhesion이 가장 활발하게 생성되는 것으로 나타났으며, 그 이상의 간격에서는 세포 부착이 억제되는 경향을 보였다¹⁰. 이는 인테그린이 결합할 장소의 밀도가 충분하지 않기 때문인 것으로 추정된다¹¹. 4 nm 간격을 갖고 배열된 RGD 펩타이드와 그의 함께 작용하는 리간드(ligand)인 PHSRN(Pro-His-Ser-Arg-Asn) 역시 세포부착을 유도하는 것으로 나타났다¹². 이러한 결과는 펩타이드 리간드의 미세환경이 인테그린과의 친화도에 영향을 미친다는 것을 명백하게 보여준다.

서로 다른 작용기를 가진 자가조립형단일층에 대한 다양한 세포들의 반응도 연구되어 왔다. 표면의 메틸 그룹과 수산화기는 각각 중립적 pH와 소수성, 그리고 친수성 특성을 대변하는 것으로 나타났다. 아미노기와 카르복실기가 존재하는 표면은 각각 음전하와 양전하의 특성을 보여 준다. 메틸기나 수산화기, 아미노기, 카르복실기 등 다양한 작용기로 변화된 표면은 실제로 생체 내 표면에서도 관찰된다. 달라진 표면의 화학적 특성에 대한 세포반응의 차이는 세포의 부착을 매개하는 단백질 층에 변화가 일어났기 때문이라고 추정된다. 이러한 표면의 화학적 특성은 focal adhesion의 조성을 변화시키고 세포의 신호전달도 조정하며¹³, 세포의 표현형과 기능을 조절할 수 있다¹⁴. 또한 세포의 증식과 분화에 영향을 미치고¹⁵, 다른 세포의 신호전달체계의 조정에도 영향을 미친다¹⁶. 이와 같은 화학적 변화는 자가조립형단일층의 일부분을 다른 기능적 활성을 갖는 두 번째 분자로 대체하는 방법으로 응용될 수 있으며, 이는 표면이 화학적으로 특정 패턴을 이룰 수 있게 한다¹⁷. 표면을 화학적으로 패턴화(patterning)하는 것은 세포의 이동과 성장을 조절할 수 있는 한 가지 방법이 될 수 있는데, 예를 들어 소수성 부분은 세포부착으로부터

배제되고, 이웃의 친수성 부분에서 세포의 부착과 신장이 일어난다¹⁸.

기질 표면의 화학적 조성을 변화시키는 방법 중 현재 가장 활발히 연구되고 있는 분야는 생리적 기능을 가진 생체분자(biomolecules)를 결합시키는 것이다. 이는 단백질이나 또는 단백질의 기능에 핵심적 역할을 담당하는 일부분을 펩타이드 상태로 티타늄 등에 결합시킴으로써 생체에서 우호적 반응을 유도하는 방법이다. 이 때 사용되는 단백질 또는 펩타이드는 대개 인테그린이나 피브로넥틴처럼 부착 관련 기능을 담당하거나, 콜라겐처럼 조직 구성 분자를 이용하기도 하고, BMP(bone morphogenetic protein)와 같이 조골반응을 유도하는 물질이기도 하다.

인테그린 수용체에 특정하게 결합하는 RGD 펩타이드도 빼놓을 수 없는데, RGD를 포함하도록 합성한 펩타이드 만으로도 원래의 분자와 마찬가지로 인테그린과 상호작용하여 세포의 부착력을 재현할 수 있는 것으로 잘 알려져 있기 때문이다¹⁹. 펩타이드는 그 화학적 조성을 정확히 조절할 수 있고 합성이 비교적 용이할 뿐 아니라, 고분자 단백질에 비해 pH나 열에 의한 변성에도 더 강하다. 이 같은 장점 덕분에 이를 이용한 매우 많은 연구가 이루어져 왔고 현재까지도 활발히 진행 중이다.

최근의 경향을 보여주는 몇몇 연구만 보면 다음과 같다. 1996년에 Dee et al.²⁰은 유리표면에 RGD를 고정시켜 조골세포에 미치는 영향을 관찰하였다. 이어진 연구에서²¹ RGD 펩타이드는 조골세포의 부착에만 관계하는 것이 아니고, 세포막의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulphate proteoglycans)과 세포외기질 단백질의 헤파란 결합부위와의 결합도 돕는 것으로 나타났다. 그래서 골접촉 촉진 활성을 가지는 재료를 설계하려면 RGD 펩타이드와 함께 헤파란 설페이트의 결합 서열인 라이신-아르기닌-세린-아르기닌(KRSR)을 포함시켜야 한다.

이후 RGD 펩타이드를 결합시키는 다양한 방법이 등장했다. Xiao et al.²²은 3-aminopropyltriethoxysilane로 활성화시킨 티타늄 표면에 RGD 펩타이드를 결합시켰고, De Giglio et al.²³은 polypyrrole로 코팅된 티타늄에 펩타이드를 연결하였다. Polypyrrole은 금속기질에서 직접 전기화학적으로 성장하여 주목할 만한 추가적인 층을 형성한다.

Le guilloou-Buffello et al.²⁴은 티타늄 표면에 각각 수산화인회석, 제 1형 콜라겐, 그리고 RGD peptide를 결합시키고, 사람의 조골선조세포(human osteoprogenitor cell, HOP)의 부착을, Quartz Crystal Resonator와 Confocal Laser Scanning Microscopy를 이용해 확인하였다. 그 결과 RGD 펩타이드를 처리한 표면에서만 배양 후 빠른 시간 안에 HOP 세포 부착의 증가를 보였으며, 수산화인회석 층에 RGD 펩타이드를 처리한

경우 수산화인회석 층만 존재할 때보다 focal adhesion이 증대되었다. 이는 세포 배양 시작 후 초기부터 RGD 펩타이드가 조골세포의 신장, 분화를 촉진시키는 효과를 발휘함을 보여준다.

Balasundaram et al.²⁵은 Bone morphogenetic proteins-2(BMP-2)의 일부인 20 개의 아미노산으로 구성된 펩타이드도 세포 부착의 향상을 위해 이용될 수 있음을 보였다. 이들은 양극 산화된 티타늄 표면에 BMP-2의 knuckle epitope(73-92)으로 알려진 부착관련 부위의 아미노산 서열과 일치하는 펩타이드를 합성하여, 양극산화과정을 통해 나노튜브 구조를 갖게 한 티타늄 표면에 고정시켰다. 사람의 조골세포를 시편에 배양한 결과, 양극 산화되지 않은 티타늄이나 또는 양극산화만 한 경우, 그리고 양극산화 후 아민기를 결합시킨 경우보다 펩타이드를 고정시킨 경우에 조골세포의 부착이 가장 향상되었다.

Maddikeri et al.²⁶은 골융합을 유도하는 것이 아닌 세균 감염을 예방하는 측면에서 접근하였다. 이들은 음으로 대전된 티타늄 산화막 표면에 섬유아세포, 조골세포, 상피세포의 부착을 감소시키는 것으로 알려져 있던 PLL-g-PEG(poly(L-lysine)- grafted-poly(ethylene glycol))을 흡착시켰다. PLL-g-PEG는 RGD와 같은 생체리간드(bioligand)에 의해 활성화되면 세포의 부착력은 회복시키지만, 불특정 단백질의 부착에는 여전히 저항력을 보인다. 또한 PLL-g-PEG는 RGD의 결합여부와 상관없이 티타늄 표면에 *Staphylococcus aureus*의 부착을 방지한다고 알려져 있었다²⁷. 이 실험에서는 *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* 같은 다른 임플란트 관련 감염 유발 세균에도 같은 효과를 보이는지 조사하였는데, PLL-g-PEG로 코팅된 티타늄 표면에서 24 시간 후 세균 부착이 88-98%까지 감소하였으며 섬유아세포나 조골세포의 부착은 방해하지 않아, 선택적으로 작용하는 표면을 고안할 수 있는 방법으로 제안하였다.

한편 생물학적 기능을 그대로 발휘할 수 있는 온전한 상태의 부착 단백질을 표면에 미리 처리하는 방법도 비교적 간단한 실험방법 덕분에 일찍부터 많은 실험에 이용되었다. 생물학적 물질을 이용한 티타늄 표면의 개선방법에 관한 초기의 논문들은 대부분 임플란트와 연조직 사이의 부착을 개선하는 데 초점을 두었다. 표면에 미리 부착한 단백질의 도움으로 초점부착의 수가 증가하면, 임플란트와 그를 둘러싼 연조직이 보다 밀접한 접합과 안정한 폐쇄를 이루어 박테리아가 빠져 접촉하고 있는 부분으로 침입하는 것을 막고자 했다. 그러한 개념을 가지고 Lowenberg et al.²⁸은 1988년에 다공성의 Ti-6Al-4V(티타늄-6%알루미늄-4%바나듐) 디스크를 각각 콜라겐과 혈소판 유래 성장인자가 함유된 콜라겐으로

코팅하였다. 이 디스크들은 대조군에 비해 월등히 높은 세포부착과 일관성 있는 배열을 보였으며, 혈소판 유래 성장인자를 포함한 경우에는 그 효과가 더욱 증가하였다. 생물학적 분자를 이용하여 티타늄 표면을 개선하는 방법이 임상적으로 유용하게 응용될 수 있음을 소개한 실험이라 할 수 있다.

Dean et al.²⁹은 티타늄 표면에 피브로넥틴을 코팅했을 때 치은조직의 섬유아세포의 결합이 두 배 내지 세 배까지 증진되고, 상피세포에서는 그 효과가 덜했다는 내용을 발표하였다. 라미닌을 코팅한 경우 치은 상피세포에서는 모든 임플란트 표면에 대해 세 배 내지 네 배 향상된 세포부착을 보였으나 섬유아세포에서는 그 효과가 더 적었다. 이는 서로 다른 단백질 분자를 이용하면 특정 세포 유형에 대한 선택성을 가지는 티타늄 표면을 만들 수 있음을 의미한다고도 볼 수 있다.

Tamura et al.³⁰과 El Ghannam et al.³¹은 라미닌-5 코팅에 대한 보다 상세한 연구를 수행하였다. 전자는 치과용 임플란트의 막관통 부분의 주변에 생물학적 봉쇄를 형성하는 것에 초점을 두었다. 라미닌 이형체의 하나인 라미닌-5는 세포 기저막의 구성요소로서 헤미데스모솜(hemidesmosome)의 조립과 유지에 결정적인 역할을 한다. 헤미데스모솜은 치은의 상피와 임플란트를 연결하는 구조로 세포가 경질의 표면에 결합하는데 사용되는 부착기구의 한 종류이다. 이 논문의 in vitro 결과들은 티타늄 합금표면에 생물학적 활성을 부여하는 인자로서 라미닌-5를 코팅했을 때 치은 상피 세포와 IHGK(immortalized human gingival keratinocyte)의 부착을 촉진시킴을 보여준다. IHGK 세포들은 라미닌-5를 코팅한 티타늄 합금에서는 부착 후 24 시간 이내에 헤미데스모솜을 구성했지만, 라미닌-5가 코팅되지 않은 티타늄 합금에서는 헤미데스모솜을 만들지 않았다. El Ghannam의 연구에서는 XPS, ToF SIMS, AFM을 이용해 표면 성질을 과학적으로 검사하였고, DNA 분석에서는 라미닌-5가 normal human epidermal keratinocyte(NHEK)의 Ti-6Al-4V에 대한 부착을 라미닌-10이나 대조군보다 더 강화했다는 결과를 내놓았다. 이 결과는 티타늄 금속 표면의 전처리 여부(패시베이션과정)에도 영향을 받았다.

위의 실험들은 단백질의 수동적 흡착을 기반으로 하고 있다. 즉 이 실험들에서는 기질표면이 단백질을 포함하고 있는 용액에 잠기도록 하여 자연스러운 과정에 의해 흡착이 일어나도록 하였다. 이와는 달리 단백질을 표면에 공유결합으로 부착시켜 본 연구도 있다. Endo^{32,33}는 사람 혈장의 피브로넥틴(human plasma fibronectin: pFN)을 gamma-aminopropyltriethoxysilane(gamma-APS)로 코팅된 NiTi 기질에 글루타알데하이드와 함께 공유결합으로 연결하였다. 단계마다 표면의 화학적 특성의 변화를 관찰하기 위해 XPS 분석을 사용하였고,

고정된 pFN의 양은 형광을 이용한 활성 측정 방법인 Fluorometric assay를 이용해 측정하였다. pFN은 1.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 표면밀도로 고정되었고 섬유아세포의 신장을 상당 수준 촉진하였다. Nanci et al.³⁴도 aminosilane spacer molecule을 티타늄 산화막에 공유결합 시킨 뒤 alkaline phosphatase 또는 알부민을 아미노 자유 말단기(free terminal NH_2 groups)에 글루타알데하이드와 함께 공유결합으로 연결시켜 단백질의 농도를 측정할 결과 이 부착방법이 예상보다도 더 우수한 부착능을 보였다고 보고했다.

Matsumura³⁵와 동료들은 티타늄 표면 변화를 위해 이용된 재료 중 하나인 콜라겐을 표면에 고정시켜보았다. 콜라겐은 티타늄 임플란트에 코팅된 poly(ethylene-co-vinyl alcohol : EVA)에 빠르게 결합했다. 이렇게 만들어진 표면이 치주인대 세포의 부착과 증식을 촉진한다는 결과도 있다. 콜라겐은 인체에 가장 많은 섬유상 단백질로, 세포의 성장과 분화를 조절하는데 핵심적인 역할을 하는 것이 알려져 있다. 골조직에서 세포 외기질은 85% 정도가 제1형 콜라겐으로 구성되어있고 기질 성분과 세포의 상호작용이 조골세포의 표현형을 조절하는데 중요한 것으로 나타났다. 따라서 콜라겐은 충분히 티타늄 표면의 개선을 위해 사용해 볼 만한 생체분자이다. Geissler et al.³⁶은 제1형 콜라겐으로 코팅된 티타늄과 그렇지 않는 티타늄에서 24 시간 동안 쥐 두개골의 조골세포를 관찰했다. 콜라겐은 Ti-6Al-4V 표면에 수동적으로 흡착되었으며, 표면특성은 SEM, ELISA, 염색검사를 사용해 조사하였다. 실험결과, 제 1형 콜라겐은 fetal calf serum이 있을 때 초기 조골세포의 부착을 가속화하였으나, 한 시간이 지난 뒤에 부착한 세포의 비율은 두 표면에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 용해시킨 펩타이드를 이용한 검사는 조골세포가 제 1형 콜라겐이 코팅된 티타늄 합금 표면에 결합할 때에는 RGD 펩타이드가 아닌 인테그린 $\beta 1$ 이 사용되었고, 코팅되지 않은 티타늄 합금에 결합할 때에는 인테그린 $\beta 1$ 은 사용되지 않고 RGD 펩타이드가 사용되었다.

Roehlecke et al.³⁷은 섬유상의 콜라겐과 트로포 콜라겐(tropocollagen: 콜라겐 원섬유의 기본 구성단위)을 Ti-6Al-4V에 코팅한 표면에서 조골세포의 행동을 관찰했다. 세포부착, 신장, 세포골격 조직, focal adhesion 형성, 증식, 분화된 표현형의 발현 등 다양한 항목을 평가하였는데, 코팅되지 않은 티타늄 합금에 비해 콜라겐으로 코팅된 합금에서 신장이 증가되었고, 더 신속하게 focal adhesion과 관련 섬유들이 형성되었다. 조골세포의 증식력과 오스테오폰틴의 세포내 발현도 더 증가된 결과를 보였다. Becker³⁸의 연구에서는 반대되는 결과가 나왔다. 마찬가지로 제 1형 콜라겐 피막을 티타늄 합금에 형성시키고 세포의 증식, 분화, 광화능력을

평가하였는데, 콜라겐 코팅이 세포의 증식이나 alkaline phosphatase의 활동도, 콜라겐 합성, 칼슘 축적, 오스테오펀틴, 오스테오칼신, MMP-2의 mRNA 수준 등에 영향을 미치지 않았다.

비슷한 결과가 Van den Dolder et al.³⁹의 실험에서도 나타났다. 이들은 티타늄 섬유망(fiber mesh)에 피브로넥틴과 제 1형 콜라겐을 코팅하여 쥐 골수세포의 증식과 조골세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보려 했다. 아무 처리를 하지 않은 티타늄 섬유망 외에 피브로넥틴 코팅, 제1형 콜라겐 코팅, 제1형 콜라겐 코팅 위에 피브로넥틴 코팅을 한 네 가지 그룹이 실험에 이용되었다. 1, 4, 8, 16 일을 배양한 후 DNA 정량분석을 이용해 세포 증식을 비교하였으나 이들 사이에 의미 있는 차이가 없었다. 피브로넥틴 항체와 제 1형 콜라겐에 대한 인테그린을 사용한 경우에는, 피브로넥틴이 코팅된 실험군을 제외한 나머지에서 세포증식의 확연한 감소가 일어났다. Alkaline phosphatase의 활동도도 표면에 따른 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과들은 피브로넥틴과 제 1형 콜라겐이 티타늄 섬유망 표면에 쥐의 골수세포가 분화를 자극하지 못한다는 것을 보여준다. 안타깝게도 이런 서로 다른 결과들에 대한 평가와 비교는 쉽지가 않은데, 이런 유형의 실험논문에서는 표면처리 과정만을 언급한 경우가 많아 각 실험에서의 표면상태에 대한 객관적인 정보를 얻을 수가 없기 때문이다. 다행히 근래에 와서는 XPS, ESCA, AFM, XRD 등 분석기기의

발달로 객관적인 표면 상태의 분석이 용이해져, 위에서 언급했던 Ghannam³¹ 등의 예에서 볼 수 있듯이 많은 실험에서 일정 단계를 거친 후에 정확한 표면 상태를 확인하고 있어 앞으로의 연구를 기대해 볼 만 하다.

2. 표면의 친수성/소수성

세포의 부착과 이후의 활동은 친수성 표면에서 더 우수한 것으로 알려져 있다⁴⁰. 따라서 골조직과 결합할 수 있는 티타늄이나 수산화인회석같은 물질들이 큰 작은 친수성을 띠는 것은 비교적 합리적인 현상으로 여겨진다. Takebe et al.⁴¹은 티타늄 표면(cpTi)에 수열작용을 통한 양극산화(hydrothermal anodization) 방법을 이용하여 수산화인회석 층을 형성시켰는데(HA/cpTi), 이때 접촉각을 조사한 결과 cpTi와 HA/cpTi가 각각 $64.5^\circ \pm 8.5^\circ$, $22.1^\circ \pm 2.0^\circ$ 로 수산화인회석의 처리가 친수성을 증가시킨 것으로 나타났다. 쥐(rat)의 골수세포를 각 시편에 부착시킨 결과, 세포 가장자리에서 액틴섬유로 구성되어 수산화인회석과 결합하는 filopodia와 유사한 돌출부가 생성되었다. 이들은 수산화인회석의 처리로 표면의 친수성이 증가하고, 젖음성이 좋아진 표면에서 세포의 부착이 개선된 것이라 결론지었다. HA/cpTi 표면에 쥐의 골수 기질세포가 부착한 모습을 SEM으로 확인하였다 (Fig. 1).

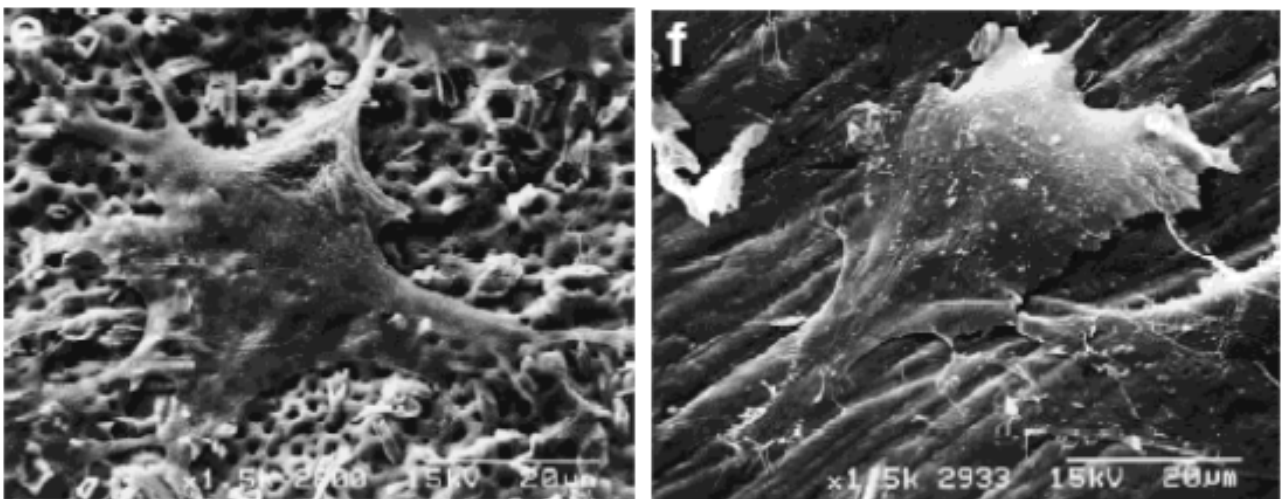


Fig. 1. HA/cpTi 표면에 rat bone marrow stromal cell이 부착한 모습⁴¹

이 실험에서는 cpTi의 경우 접촉각을 볼 때 친수성이라고 단정하기 어렵다고 언급하였는데, 실로 여러 연구에서 티타늄의 접촉각의 범위는 33° ⁴²에서 70° ⁴³에 이르기까지 다양하다. 실제적으로 같은 cpTi 시편이라도 운반과정이나 측정 환경에 따라 결과가 달라질 수 있다. 실험의 기본내용이 같더라도 실험실마다 실험방법에 조금씩 차이가 존재하기 마련인데, 특히 임플란트 표면 처리법의 경우 현재 새로운 방법들이 고안, 시도 중이므로 아직 규격화되지 않은 경우가 많다는 점을 실험의 결과를 비교할 때 고려해야 한다.

친수성 표면이 소수성 표면과 비교하여 세포반응을 증진시키는 이유는 친수성 표면과 소수성 표면에서 혈액 성분으로부터 흡수된 단백질의 배열 차이이다⁴⁴. 특히 친수성 표면에서는 비트로넥틴이 보다 우월한 흡착 능력을 보이는 것으로 나타났는데^{45,46}, 실제로 혈장에 노출되었을 때 친수성의 산화된 폴리스티렌에는 아무 처리도 하지 않은 소수성의 폴리스티렌에서보다 더 많은 비트로넥틴이 흡착되었고, 이것은 세포부착의 향상과 조골세포의 이동으로 나타났다⁴⁷. 비트로넥틴과 피브로넥틴 모두 순수한 용액으로부터도 흡착될 수 있고, 친수성, 소수성 표면에 모두 흡착될 수도 있다는 점을 고려해보면, 비트로넥틴이 혈장으로부터의 흡착 경쟁에서 우월함을 알 수 있다.

비트로넥틴의 기능적 특성은 흡착 표면의 친수성에 따라 달라지지 않았으며⁴⁸ 친수성 표면과 소수성 표면에서 비슷한 정도의 β sheet 구조의 상실을 보였다⁴⁹. 반면에 피브로넥틴은 소수성 표면에서 세포 부착 기능이 상당량 소실되는 것으로 나타났다⁵⁰. 피브로넥틴이 친수성 표면에서 기능적 특성을 유지하는 능력은 세포 반응을 개선하기 위한 방법으로 고려할 수 있을 것이다.

세포와 표면 사이의 상호작용에 관한 실험과정에서 짚고 넘어가야 할 사항은 세정, 멸균의 방법이 결과에 영향을 미친다는 점이다. 티타늄과 Ti-6Al-4V를 이용한 많은 연구에서 오염에 의해 표면의 화학적 특성, 표면에너지, 이온 방출 등에 변화가 생겼다⁵¹⁻⁵³. 이로 인해 세포의 활동도 역시 영향을 받는데, 티타늄 표면에 자외선 살균과 EO gas(ethylene oxide), 고압증기멸균법을 비교한 실험에서는 자외선 살균에서 가장 적은 표면 특성의 변화가 나타났고, 고압증기멸균법에서 가장 많은 표면의 변질이 일어났으며, 이는 세포부착의 감소와도 관계가 있었다⁵⁴. 에탄올을 이용한 멸균과정은 표면의 소수성을 증가시키는 경향이 있는 것으로 확인되었다⁴⁴.

3. 전기적 특성

사실상 거의 모든 계면은 수용액 상태에서 전하를 띠며⁵⁵, 세포막이 음전하를 띠고 있다고 했을 때, 정전기적

상호작용이 임플란트에 대한 생물학적 작용에 중요한 역할을 할 수 있음을 쉽게 짐작해 볼 수 있다. 그러나 음으로 대전된 상태인 세포막과 전하를 띤 기질 사이의 상호작용이 중요하기는 하지만, 음전하를 가진 표면과 양전하를 가지는 표면 모두에서 이것만으로는 세포의 부착과 이동을 설명하기에는 부족하다⁵⁶.

세포부착의 방식은 음전하를 띤 표면과 양전하를 띤 표면에서 분명히 구별된다. 양전하로 대전된 표면에는 세포막이 전체적으로 밀접하게 부착되지만, 거의 중립적인 표면이나 음전하로 대전된 표면은 특정 점에서만 접촉이 일어난다^{57,58}. Shelton의 연구⁵⁷는 이 차이가 일차적으로 정전기적 인력과 척력(electric attraction and repulsion)에서 기인한다고 하였을 뿐 아니라 단백질 흡착의 차이가 세포의 형태나 이동에서도 마찬가지로 나타난다고 하였다. 피브로넥틴일 것으로 추정되는 220 kDa의 세포부착 단백질은 양전하를 띤 표면에서만 발견되는 데 비해 밝혀지지 않은 30 kDa의 부착 관련 단백질은 고도로 음전하로 대전된 표면에서만 검출되었다⁵⁹. 65-70 kDa 범위의 또 다른 부착 매개 단백질은 모든 표면에서 찾을 수 있었는데, 그 크기나 부착기능, 그리고 보편적인 흡착양상으로 미루어 볼 때 비트로넥틴일 것으로 생각된다.

피브로넥틴은 다른 연구에서도 대전된 표면에서 발견할 수 있었다^{60,61}. 그러나 티타늄 표면에 일련의 처리를 한 MacDonald의 실험⁶⁰을 보면, 전하보다는 소수성이 부착에 영향을 미치는 더 중요한 요소인 것으로 보인다. 피브로넥틴은 조직배양용 폴리스티렌에서보다 질소를 함유하고 있는 표면(Primaria tissue culture surface, Falcon, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA)에서 더 향상된 부착능을 보였다⁶². Primaria는 질소 성분으로 인해 극성 내지는 양으로 대전된 그룹이 노출되어 있고, 산화된 조직배양용 폴리스티렌은 생리적 pH에서 음전하를 띠므로 이 결과는 합리적인 것으로 보인다.

다른 연구들에서 언급된 것과는 반대로 Scotchford의 실험에서는⁶³ 음으로 대전된 표면에서 피브리노겐 흡착이 가장 많이 일어났고, 수산화기로 기능화 되어 극성이고 전하를 띠지 않는 표면에서는 피브리노겐의 흡착이 감소되었으며, 메탈기로 기능화 된 무극성이고 전하도 띠지 않는 표면에서는 피브리노겐이 검출되지 않았다고 보고했다. 이러한 경향은 골유래성 세포들의 부착과 성장 양상에도 반영되어 나타났다. 또한 그들이 시행한 다른 실험에서도 양으로 대전된 알루미늄 옥사이드 표면에서 다른 음으로 대전된 산화금속의 표면에서보다 피브린이 덜 검출되었으며 조골세포는 패턴화 된 표면에서 알루미늄 영역을 피하는 방향으로 이동하였다.

Shelton은⁵⁷ 서로 다르게 대전된 표면에서의 단백질 흡착양상의 변화를 관찰하였으며, Qui⁶⁴는 양으로 대전된

인동-주석 옥사이드에서 세포부착이 강화되었다고 보고하였는데 이는 혈장의 영향을 받지 않았다. 양으로 대전된 표면에서 부착은 증가했지만 세포의 신장이나 분화는 저해되는 것으로 나타났다. 이는 세포와 표면 사이의 정전기적 인력이 세포의 부착은 향상시켰지만, 이는 비정상적인 범주여서 세포의 기능을 돕지는 못하기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 아마도 음으로 대전된 표면에서 수용체와 리간드를 매개로 부착이 이루어지는 것이 보다 정상적인 상태로, 정상적인 세포골격의 구성을 가능하게 하는 것으로 생각된다.

티타늄, Ti-6Al-4V, Co-Cr-Mo, 스테인리스 스틸을 포함한 대부분의 외과적으로 이용되는 금속들은 산화막 때문에 생리적 pH에서 전체적으로 음전하를 띠게 된다^{60,65}. 수산화인회석나 β -tricalcium phosphate(β -TCP)도 불포화된 산소결합 때문에 전체적으로 음전하를 띤 표면-수용액 계면을 형성하며 이는 제타포텐셜(zeta potential)로 특징지어진다⁶⁶. 제타포텐셜이란 두 표면 사이의 좁은 간격을 액체가 압력을 받아 흐를 때 생성되며, 액체의 pH에 영향을 받는다. Cai 등⁶⁷은 SAM layer를 이용하여 티타늄 표면에 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 와 $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ 를 각각 결합시킨 후 zeta potential을 측정하고, 그에 따른 단백질 부착과 세포반응의 차이를 살펴보았다. Ti-COOH 실험군은 가장 낮은 접착각과 pH 7.0에서의 제타포텐셜을 보였으며, 피브리노겐 흡착량도 가장 적었다. 또한 이 표면에서는 세포의 증식도 가장 억제된 것으로 나타나 표면의 전기적 특성이 세포반응에 미치는 영향을 보여준다.

4. 표면 지형적 특성

기질의 표면지형적 특성의 변화는 세포행동에 영향을 줄 수 있다. 많은 연구에서 이용한 표면 처리방법은 나노미터에서 밀리미터에 단위에 이르기까지 무작위적인 다양한 범위의 표면지형을 형성한다. 예를 들면 길쭉한 홈(grooves)이 나노미터 수준인지 마이크로미터 수준인지, 또는 어떤 특징적 지형이 규칙적으로 배열되어 있는지 무작위적으로 배열되어 있는지, 함몰부(pits)나 솟아오른 부분(spikes)은 없는지 등에 따라 세포반응이 달라질 수 있다⁶⁸⁻⁷⁰. Massia와 Hubbell⁷¹은 리간드의 밀도에 대한 반응이 표면 지형적 특성에 따라 달라질 수 있다는 결과를 보고했다. 이들은 마이크로미터 수준의 표면특성을 부여한 경우에는 그렇지 않을 때보다 콜라겐의 함성이 없더라도 세포부착이 200% 향상되었다고 보고하였다. 이 연구에서는 변수로 마이크로미터 수준의 표면특성과 vinculin을 이용한 생물학적 활성 요인을 두었는데 두 변수는 함께 영향을 미치는 것으로 나타났다. 1-100 μm 단위의 표면 특성이 세포의 부착과 경조직 형성에 영향을 줄 수 있음이 확인된 바 있고⁷², 1 μm 이하의 표면 특성은

세포의 방향성과 이동성, 부착, 형태에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁷³. 특히 근래에 나노미터 수준의 표면 가공이 가능해지면서 이 스케일에서의 표면의 기하학적 특성이 세포반응에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 세포가 직접 나노미터 수준의 표면지형학적 특성을 인지하는 것인지, 또는 나노 스케일의 표면 변화가 초기 단백질 흡착에 영향을 미치기 때문에 세포반응을 변화시키는 것인지는 정확히 알 수 없다.

나노미터 수준에서의 표면특성이 생물학적으로 어떤 영향을 미치는지 아직 정립된 사실은 부족한데, 이는 우선 나노미터 수준에서 반복적으로 조절된 표면지형-일정한 지름과 깊이를 갖는 구멍이나 모양이 일정한 선과 같은-을 갖는 표면을 만들기 어려웠기 때문이다. 그러나 최근 photolithography, electron-beam lithography와 같은 방법을 이용해 재현가능하고 조절된 나노미터 수준의 표면특성을 구현하는 것이 가능해짐에 따라 나노미터 수준의 기하학적 특성이 세포반응에 미치는 영향에 관한 실험들이 많이 이루어지고 있다. Photolithography는 평평한 표면에 마이크로 스케일의 패턴을 형성하기 위해 사용되는 방법으로, 표면에 틀 역할을 할 코팅막을 입힌 뒤 여기에 패턴을 UV로 각인시킨 뒤, 해당부위를 산으로 부식시킨 뒤 코팅막을 제거한다 (Fig. 2)⁷⁴.

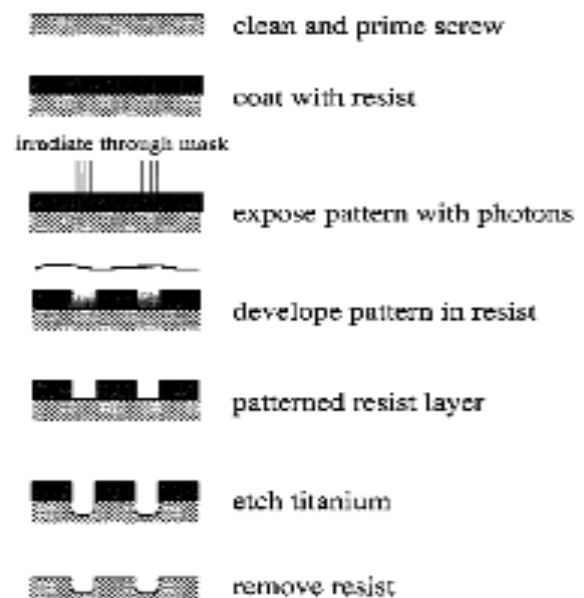


Fig. 2. photolithography의 과정⁷⁴

Lim et al.⁷⁵은 poly(L-lactic acid)와 polystyrene를 혼합하여 나노미터 수준의 기하학적 특징을 갖는 얇은 막(nanotopographic film)을 형성시킴으로써 세포의 인위적 배열을 유도하였다. PLLA의 비율이 증가할수록 표면은 함몰부가 주도적이던 구조에서 돌출부가

주도적인 형태로 변화하였으며, 깊이 또는 높이는 3-29 nm 범위였고, 생성된 막의 최상층은 분자량이 작은 PLLA가 0.2nm 두께로 존재하였다. 조골세포를 부착시킨 결과, 나노미터의 표면특성이 부여된 경우 평평한 PLLA 표면일 때보다 세포부착이 증가하였고, 이러한 경향은 함몰부가 많은 경우보다 돌출부가 주도적인 경우에 더욱 두드러지는 것으로 나타났다고 밝혔다. Lim et al.의 또 다른 나노미터 수준의 표면특성에 관한 연구⁷⁶는 표면지형적 특성이 인테그린에 의해 매개되는 초점 부착에 미치는 영향에 관해 알아보았다. 이 연구에서는 14, 29, 45nm의 함몰부(pit)를 갖는 polystyrene 계열의 표면에서 인테그린 소단위의 발현, 초점부착 기구의 형성, 세포의 부착과 신장을 비교해보았을 때 14, 29nm일 때에 45nm에서보다 활발한 부착활성을 보였다고 하였다.

한편 Biggs 등⁷⁷은 위의 결과와는 다소 상반되는 결과들을 보고했다. electron- beam lithography를 이용해 polycarbonate에 다양한 크기의 나노미터 수준의 함몰부를 형성시킨 실험에서 조골세포의 신장과 부착은 오히려 감소한 것으로 나타났다. 이들은 또 다른 논문⁷⁸에서 120nm 지름과 100nm 깊이의 나노미터 함몰부를 300nm의 간격으로 위치시키고 조골세포의 부착을 확인하였는데, 나노미터의 함몰부는 사각형, 육각형, 그리고 거의 사각형과 유사한(near-square) 세 가지 종류의 패턴으로 배열되었다. Bromodeoxyuridine을 이용한 면역형광법으로 사람의 조골세포의 부착양상을 확인한 결과, 오히려 표면이 기하학적 특성을 가질 때 부착의 거리와 숫자는 더 불균일해지는 경향을 보이며 감소하였다. 다만 조절된 불규칙성이라 할 수 있는 near-square 배열의 경우 초점 부착의 형성이 증가한 것으로 나타났다. 규칙적인 표면형태는 세포의 신장에도 영향을 미쳐 세포가 연장되는(elongated) 결과를 가져왔으며, 이는 세포의 이동성이 증가했음을 의미한다. 반면 near-square 배열의 경우 조골세포의 spreading을 가져왔다. 이들은 보다 최근의 연구⁷⁹에서 또한 nano-crater와 nano-island가 존재할 경우 평평한 대조군 기질에서 보다 부착형성이 잘 일어났고, nano-pits의 경우 직접적으로 크기가 큰 부착기구의 형성을 방해하며, 세포의 유전자 발현 양상에도 변화를 가져왔다고 보고하였다.

세포외기질 내의 섬유소들은 마이크로미터 이하의 크기수준을 가지고 있고, 실제 생체 내에서 무기물의 구조도 나노미터 수준의 표면 지형적 특성을 보이므로, 나노미터 수준의 환경 조절을 통해 세포 행동에 영향을 줄 수 있을 것이라 예상되고 있다. 비록 아직 작은 크기의 특성들이 세포에 영향을 미치는 실제적 방법은 명확히 알려져 있지 않지만, 실제로 서로 다른 크기 차원에서 발생하는 일들을 매개하는 연결고리가 필요하며 그것은 크기나 기능으로 미루어 볼 때 세포부착을 매개하는 단백질의 역할일 가능성이 크다. 즉, 표면 특성의 변화는

부착 단백질의 변화를 통해 세포 반응에 변화를 가져오는 것으로 생각되고 있다.

세포가 나노미터 수준의 표면지형을 인지하는가라는 질문에 대해, 나노미터 수준에서 다양한 고도를 가지는 표면지형을 갖도록 화학물질의 배열을 변화시켜보는 실험이 있었다. 서로 다른 화학적 특성을 갖는 물질을 공간적으로 특정 규칙에 따라 배열하는 화학적 무늬화(chemical patterning)는 달라지는 높이로 인한 작은 규모의 표면 지형적 변화를 가져왔는데 이는 처음에 결합시킨 화학물질 층 내에서의 차이 뿐 아니라 그에 부착하는 단백질의 차이까지 만들었다. 세포들은 500nm 이하의 깊이를 갖는 홈이 파여진 표면에서 마치 화학적 줄에 맞춰 서듯이 배열되었다. 그러나 5μm와 같이 깊은 홈이 있는 표면에서는 80%정도에 달하는 대다수의 세포들이 표면의 특성과는 그다지 연관관계가 없는 상태로 배열되었다. 앞서 논의했듯이 그간의 연구를 통해 10-100μm 정도의 지름을 갖는 표면 특성이 분명한 세포반응을 이끌어 낼 수 있음이 알려져 있다⁸⁰. 그러나 모든 유형의 세포들이 같은 방식으로 표면특성에 반응하는 것은 아니다⁷³. 예를 들어 마이크로미터 수준과 나노미터 수준의 표면지형 특성을 가지도록 개량된 PLGA 표면에서 상피세포는 증식과 이동이 억제된 반면 조골세포의 증식과 이동은 촉진되었다는 결과가 있다⁸¹.

조직공학은 어떻게 세포가 특정 배양조건에서 부착 가능 물질의 2 차원적인 표면만을 인지하는 것이 아니라 세포를 둘러싸고 있는 주변 환경인 기질에 따라 다르게 반응할 수 있는지를 이해하고자 했다⁸². In vitro와 in vivo 실험에서 세포들은 2 차원과 3 차원 골격구조(scaffold)에서 서로 다르게 반응했는데, 그는 아마도 3 차원 구조에서는 세포외기질의 단백질이 세포의 전 방향에서 영향을 미칠 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 세포와 세포사이의 상호작용과 혈관화 과정도 3 차원적 환경을 제공하는 기질의 다공성 여부에 따라 매우 달라졌다. 따라서 최적의 임플란트 다공도(porosity)는 단순히 결정된 수 없으며, 사용된 물질과 미세공(micropore) 사이의 연관도, 서로 다른 세포 유형에 따른 행동 범주의 차이 등에 따라 달라질 수 있다. 이들의 영향은 다공도의 변화와 밀접하게 연관되어 있고 세공의 내부 곡률과 같은 일종의 표면지형도 영향을 미친다⁸³. 수산화인회석 세라믹과 같은 다공성 물질에서 매크로 수준에서의 크기는 같으나 마이크로 수준의 조도가 다른 세공을 갖는 경우를 비교한 결과, 마이크로 수준의 특정 표면지형은 세포의 부착을 향상시켰다⁸⁴.

임플란트의 단기적, 장기적 골유착을 개선하기 위해 현재 많은 시도가 이루어지고 있는 표면 조도 변화 역시 위와 같이 조절되고 일종의 표준화된 표면을 만들어 내는 방향으로 진행되고 있다. Bigerelle et al.⁸⁵은 Ti-6Al-4V와 순수티타늄에서 사람의 조골세포 반응에

표면조도가 미치는 영향을 분석했다. 세포의 크기보다 더 큰 매크로 수준과 세포 크기 이하의 마이크로 수준의 거칠기를 형성했는데, 등방성의 표면을 만들기 위한 새로운 방법으로 전기부식(electro-erosion)을 이용했다. 이를 연마과정을 통해 얻어진 등방성 표면과 기계절삭된 이방성 표면과 함께 비교한 결과, 21 일의 조골세포 배양 후 전기부식한 표면에서 보다 높은 조골세포의 반응을 확인할 수 있었다. 또한 이 표면에서의 조골세포의 다각형 모양은 실제 사람의 골소주 내에서의 조골세포의 형태와 매우 유사했다. 이 표면의 표면지형을 분석해 본 연구팀은 세포 수준 이하에서는 등방성의 평활한 면이 조골세포와 결합하기에 유리하지만, 표면지형이 매크로 수준일 때는 거친 등방성 환경이 세포 부착과 성장에 유리하다고 결론지었다. Anselme K et al.⁸⁶도 티타늄 표면에 매크로 수준과 마이크로 수준의 거칠기를 부여하되 방향성을 갖도록 조직된 표면지형을 형성하였다.

사람의 조골세포를 이용한 in vitro 실험에서 마이크로 수준에서는 낮은 반복성을 갖는 표면이, 매크로 수준에서는 높은 표면 거칠기를 갖는 표면이 더 유리한 것으로 나타났다. 조골세포의 장기적 반응을 관찰한 이들의 최근 연구⁸⁷에 의하면 전기부식에 의해 형성된 등방성의 거친 표면에서 세포부착의 강도가 강한 것으로 나타나, 이들은 조골세포가 표면조도의 크기보다는 표면지형의 조직성과 형태에 더 민감한 것으로 결론지었다. Zhu X. et al.의 연구⁸⁸는 보다 명확하게 기전을 짐작할 수 있게 해준다. 이들은 양극산화로 마이크로미터 단위와 그 이하의 수준의 구조를 양극산화를 통해 만들었다. 평균적인 세공의 크기는 각각 0.5, 2 μm 의 지름과 0.2, 0.4 μm 정도의 깊이였다. 두 스케일의 구조에서 모두 향상된 조골세포의 부착이 관찰되었다. 이들은 잘 발달된 filopodia들이 직접 나노미터 크기의 세공으로 들어가 조골세포의 초기 부착에 기여하고 있음을 관찰하였으며 반면에 평활한 티타늄 면에서는 초점 접합을 통해 세포 부착이 일어나고 있었는데, 이는 filopodia의 형성이 용이하지 않았기 때문인 것으로 추정하였다. 이를 바탕으로 나노미터 수준의 구조들이 임플란트 표면에 조골세포가 선택적으로 부착하도록 유도하는 역할을 할 수 있을 것이라고 이 연구는 결론짓고 있다.

III. 결 론

이 종설에서 표면의 물리, 화학적 특성이 세포반응에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다. 표면특성에 따른 세포반응에 대한 연구들에서도 단백질의 흡착이 유리한 화학적 특성을 지닌 표면에서 향상된 세포부착을 보였다.

기질 표면의 화학적 조성을 변화시키는 방법 중 현재 가장 활발히 연구되고 있는 분야는 생리적 기능을 가진 생체분자(biomolecules)를 결합시키는 것으로 부착 관련 기능을 담당하거나 콜라겐처럼 조직 구성 분자를 이용하거나 BMP와 같은 단백질 또는 펩타이드로 표면을 코팅할 경우 세포부착이 개선되었다. 또 서로 다른 단백질 분자를 이용하면 특정 세포 유형에 대한 선택성을 가지는 티타늄 표면을 만드는 연구들을 하고 있다.

세포의 부착과 이후의 활동은 친수성 표면에서 더 우수한 것으로 알려져 있다. 세포와 표면 사이의 상호작용에 관한 실험과정에서 세정, 멸균의 방법이 결과에 영향을 미친다는 점이다. 사실상 거의 모든 계면은 수용액 상태에서 전하를 띠며, 음으로 대전된 상태인 세포막과 전하를 띤 기질 사이의 상호작용이 중요하다.

세포외기질 내의 섬유소들은 마이크로미터 이하의 크기수준을 가지고 있고, 실제 생체 내에서 무기물의 구조도 나노미터 수준의 표면 지형적 특성을 보이므로, 나노미터 수준의 환경 조절을 통해 세포 행동에 영향을 줄 수 있을 것이라 예상되고 있다. 임플란트의 단기적, 장기적 골유착을 개선하기 위한 표면 처리는 일종의 표준화된 표면을 만들어 내는 방향으로 진행되고 있다. 조골세포가 표면조도의 크기보다는 표면지형의 조직성과 형태에 더 민감한 것으로 보이며, 나노미터 수준의 구조들이 임플란트 표면에 조골세포가 선택적으로 부착하도록 유도하는 역할을 할 수 있을 것이라고 여겨진다. 세포반응의 상관관계에 대해서는 일관된 결론을 얻기에는 아직 더 많은 연구가 필요하다.

References

1. Lohmann CH, Sagun R, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, et al. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)₂D₃ through regulation of phospholipase A2 activity and activation of protein kinase A. *J Biomed Mater Res*. 1999;47:139-151.
2. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7:329-45.
3. Macdonald W, Campbell P, Fisher J, Wennerberg A. Variation in surface texture measurements. *J Biomed Mater Res*. 2004;70B:262-9.
4. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface

- chemistry effects on cell differentiation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005;26:5953-7.
5. Keselowsky BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*, 2004;25:5947-54.
6. Rawsterne RE, Todd SJ, Gough JE, Farrar D, Rutten FJ, Alexander MR, et al. Cell spreading correlates with calculated log P of amino acid-modified surfaces. *Acta Biomater*, 2007;3:715-21.
7. Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Rubner B. Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces. *Langmuir*, 2004; 20:1362-8.
8. Houseman BT, Mrksich M. The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials*, 2001; 22:943-55.
9. Elbert DL, Hubbell JA. Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2001;2:430-41.
10. Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blümmel J, Eck W, Kantlehner M, et al. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem*, 2004;19:383-8.
11. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 2001;3:466-72.
12. Benoit DS, Anseth KS. The effect on osteoblast function of colocalized RGD and PHSRN epitopes on PEG surfaces. *Biomaterials*, 2005;26:5209-20.
13. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselme K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials*, 2006;27:2829-44.
14. Curran JM, Chen R, Hunt JA. Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials*, 2005;26:7057-67.
15. Lan MA, Gersbach CA, Michael KE, Keselowsky BG, García AJ. Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries. *Biomaterials*, 2005;26:4523-31.
16. Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Fujimori H, Goto S, Ohgushi H. Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, 2005;26:779-85.
17. Benoit DS, Anseth KS. The effect on osteoblast function of colocalized RGD and PHSRN epitopes on PEG surfaces. *Biomaterials*, 2005;26:5209-20.
18. Scotchford CA, Gilmore CP, Cooper E, Leggett GJ, Downes S. Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res*, 2002;59:84-99.
19. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1984;309:30-3.
20. Dee KC, Rueger DC, Andersen TT, Bizios R. Conditions which promote mineralization at the bone implant interface: a model in vitro study. *Biomaterials*, 1996;17:209-15.
21. Dee KC, Andersen TT, Bizios R. Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. *J Biomed Mater Res*, 1998;40:371-7.
22. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J Mater Sci Mater Med*, 1997;8:867-72.
23. De Giglio E, Sabbatini L, Colucci S, Zamboni G. Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2000;11:1073-83.
24. Le Guillou-Buffello D, Bareille R, Gindre M, Sewing A, Laugier P, Amédée J. Additive effect of RGD coating to functionalized titanium surfaces on human osteoprogenitor cell adhesion and spreading. *Tissue Eng Part A*, 2008;14:1445-55.
25. Balasundaram G, Yao C, Webster TJ. TiO₂ nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increases osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A*, 2008;84:447-53.
26. Maddikeri RR, Tosatti S, Schuler M, Chessari S, Textor M, Richards RG, et al. Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces. *J Biomed Mater*

- Res A. 2008;84:425-35.
27. Harris LG, Tosatti S, Wieland M, Textor M, Richards RG. Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*. 2004;25:4135-48.
28. Lowenberg BF, Pilliar RM, Aubin JE, Sodek J, Melcher AH. Cell attachment of human gingival fibroblasts in vitro to porous-surfaced titanium alloy discs coated with collagen and platelet-derived growth factor. *Biomaterials*. 1988;9:302-9.
29. Dean JW 3rd, Culbertson KC, D' Angelo AM. Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10:721-8.
30. Tamura RN, Oda D, Quaranta V, Plopper G, Lambert R, Glaser S, et al. Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants. *J Periodontol Res*. 1997;32:287-94.
31. El-Ghannam A, Starr L, Jones J. Laminin-5 coating enhances epithelial cell attachment, spreading, and hemidesmosome assembly on Ti-6Al-4V implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:30-40.
32. Endo K. Chemical modification of metallic implant surfaces with biofunctional proteins (Part 1). Molecular structure and biological activity of a modified NiTi alloy surface. *Dent Mater J*. 1995;14:185-98.
33. Endo K. Chemical modification of metallic implant surfaces with biofunctional proteins (Part 2). Corrosion resistance of a chemically modified NiTi alloy. *Dent Mater J*. 1995;14:199-210.
34. Nanci A, West JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res*. 1998;40:324-35.
35. Matsumura K, Hyon SH, Nakajima N, Peng C, Iwata H, Tsutsumi S. Adhesion between poly(ethyleneco-vinyl alcohol) (EVA) and titanium. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:309-15.
36. Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K. Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:752-60.
37. Roehlecke C, Witt M, Kasper M, Schulze E, Wolf C, Hofer A, et al. Synergistic effect of titanium alloy and collagen type I on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs*. 2001;168:178-87.
38. Becker D, Geissler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, et al. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res*. 2002;59:516-27.
39. Van den Dolder J, Bancroft GN, Sikavitsas VI, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Effect of fibronectin- and collagen I-coated titanium fibre mesh on proliferation and differentiation of osteogenic cells. *Tissue Eng*. 2003;9:505-15.
40. Kasemo B. Biological surface science. *Surface Sci*. 2002;500:656-77.
41. Takebe J, Itoh S, Okada J, Ishibashi K. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:398-407.
42. Walivaara B, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Tengvall P. Titanium with different oxides: In vitro studies of protein adsorption and contact activation. *Biomaterials*. 1994;15:827-34.
43. Kilpadi DV, Weimer JJ, Lemons JE. Effect of passivation and dry heat-sterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Aspects*. 1998;135:89-101.
44. Nygren H. Initial reactions of whole blood with hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 1996;6:329-33.
45. Fabrizio-Homan DJ, Cooper SL. Competitive adsorption of vitronectin with albumin, fibrinogen, and fibronectin on polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1991;25:953-71.
46. McFarland CD, Thomas CH, DeFilippis C, Steele JG, Healy KE. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:200-10.
47. DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol*. 1993;122:729-37.

48. Underwood PA, Steele JG, Dalton BA. Effects of polystyrene surface chemistry on the biological activity of solid phase fibronectin and vitronectin, analysed with monoclonal antibodies. *J Cell Sci*. 1993;104:793-803.
49. Pitt WG, Fabrizio-Homan DF, Mosher DF, Cooper SL. Vitronectin adsorption on polystyrene and oxidized polystyrene. *J Colloid Interface Sci*. 1989;129:231-39.
50. 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;141:334-45.
51. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: on the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res*. 1998;22:145-58.
52. Callen BW, Lowenberg BF, Lugowski S, Sodhi RN, Davies JE. Nitric acid passivation of Ti6Al4V reduces thickness of surface oxide layer and increases trace element release. *J Biomed Mater Res*. 1995;29:279-90.
53. Kilpadi DV, Raikar GN, Liu J, Lemons JE, Vohra Y, Gregory JC. Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: Spectroscopic analyses. *J Biomed Mater Res*. 1998;40:646-59.
54. Vezeau PJ, Koorbusch GF, Draughn RA, Keller JC. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 54:738-746.
55. Haynes CA, Norde W. Globular proteins a solid/liquid interfaces. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*. 1994;2:517-66.
56. Davies JE. The importance and measurement of surface charge species in cell behaviour at the biomaterial interface. In: Ratner BD ed. *Surface Characterization of Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Science, 1988, pp. 219-234.
57. Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials*. 1988;9:24-9.
58. Davies JE, Causton B, Bovell Y, Davy K, Sturt CS. The migration of osteoblasts over substrata of discrete surface charge. *Biomaterials*. 1986;7:231-3.
59. Anselme K, Bigerelle M, Noël B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:529-40.
60. MacDonald DE, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials*. 2002;23:1269-79.
61. Margel S, Vogler EA, Firment L, Watt T, Haynie S, Sogah DY. Peptide, protein and cellular interactions with self-assembled monolayer model surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1993;27:1463-76.
62. Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA. Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts. *Biomaterials*. 1995;16:1057-67.
63. Scotchford CA, Ball M, Winkelmann M, Voros J, Csucs C, Brunette DM, et al. Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-interactions. II. Protein adsorption and early cell interactions. *Biomaterials*. 2003;24:1147-58.
64. Qiu Q, Sayer M, Kawaja M, Shen X, Davies JE. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998;42:117-27.
65. Hallab NJ, Bundy KJ, O' Connor K, Clark R, Moses RL. Cell adhesion to biomaterials: Correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology. *J Long Term Eff Med Implants*. 1995; 5:209-231.
66. Lopes MA, Monteiro FJ, Santos JD, Serro AP, Saramago B. Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *J Biomed Mater Res*. 1999;45:370-5.
67. Cai K, Frant M, Bossert J, Hildebrand G, Liefelth K, Jandt KD. Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006;50:1-8.
68. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*. 1999;20:573-88.
69. Martinez E, McGhee K, Wilkinson C, Curtis A. A

- parallel-plate flow chamber to study initial cell adhesion on a nanofeatured surface. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2004;3:90-5.
70. Wan Y, Wang Y, Liu Z, Qu X, Han B, Bei J, et al. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide). *Biomaterials*. 2005;26:4453-9.
71. Massia SP, Hubbell JA. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin V3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J Cell Biol*. 1991;114:1089-100.
72. Chehroudi B, Mc Donnell D, Brunette DM. The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Res*. 1997;34:279-90.
73. Curtis A, Wilkinson C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem Soc Symp*. 1999;65:15-26.
74. Hallgren C, Reimers H, Gold J, Wennerberg A. The importance of surface texture for bone integration of screw shaped implants: an in vivo study of implants patterned by photolithography. *J Biomed Mater Res*. 2001;57:485-96.
75. Lim JY, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, Cheng J, Winograd N, et al. Osteoblast adhesion on poly(L-lactic acid)/polystyrene demixed thin film blends: effect of nanotopography, surface chemistry, and wettability. *Biomacromolecules*. 2005;6:3319-27.
76. Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials*. 2007;28:1787-97.
77. Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CD, Dalby MJ. The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18:399-404.
78. Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CD, Dalby MJ. Regulation of implant surface cell adhesion: characterization and quantification of S-phase primary osteoblast adhesions on biomimetic nanoscale substrates. *J Orthop Res*. 2007;25:273-82.
79. Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, McMurray RJ, Affrossman S, Wilkinson CD, et al. Interactions with nanoscale topography: Adhesion quantification and signal transduction in cells of osteogenic and multipotent lineage. *J Biomed Mater Res A*. 2008;Sep 23. [Epub ahead of print].
80. Mrksich M. What can surface chemistry do for cell biology. *Curr Opin Chem Biol*. 2002;6:794-7.
81. Owen GR, Jackson J, Chehroudi B, Burt H, Brunette DM. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. *Biomaterials*. 2005;26:7447-56.
82. Stevens MM, Mayer M, Anderson DG, Weibel DB, Whitesides GM, Langer R. Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. *Biomaterials*. 2005;26:7636-41.
83. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26:5474-91.
84. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1999;20:1799-1806.
85. Biggerelle M, Anselme K, Noël B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials*. 2002;23:1563-77.
86. Anselme K, Biggerelle M, Noël B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:529-40.
87. Anselme K, Biggerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomater*. 2005;1:211-22.
88. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs*. 2004;178:13-22.