



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

금속소재의 표면전하가, 양이온의 가수 및
농도가 알부민 부착에 미치는 영향

2015년 1월

서울대학교 대학원
바이오엔지니어링 전공
신혜영

초 록

재료의 표면전하, 수용액 중 양이온의 가수 및 농도가 단백질 부착 양에 미치는 영향을 조사했다. 티타늄(commmercially pure titanium, grade 2)과 스테인리스강(stainless steel, 316L)을 다이아몬드 슬러리로 연마해 표면조도를 동일하게 한 후 사용했다. 상대적으로 음으로 크게 하전된 티타늄에서 알부민(bovine serum albumin)의 부착 양이 증가한다는 것을 마이크로 BCA 법으로 측정했다.

pH 7.4에서 동일한 양이온을 사용했을 때 스테인리스강(등전점 6.0)보다 크게 음으로 하전된 티타늄(등전점 4.4)에서 역시 음으로 하전된 알부민(등전점 4.8)의 부착 양이 더 많았다. 한편 동일한 금속 재료를 사용했을 때 표면에 부착될 때 부착을 매개하는 양이온이 1가 양이온인 경우보다 2가 양이온일 때 알부민 부착 양이 증가했다. 이는 1가와 2가 양이온이 혼합된 용액에서 특정 이온의 농도를 고정시키고 다른 이온의 농도를 증가시키면서 알부민 부착 양을 비교함으로써도 알 수 있었다. 또한 양이온의 가수를 고정시킨 후 농도를 변화시켰을 때 농도가 증가함에 따라 알부민 부착 양이 증가했다. 양이온의 전하가와 재료의 표면전하가 알부민의 부착 거동에 미치는 영향을 시간에 따른 제타전위의 측정을 통해 확인했다. 2가 양이온이 용해되어 있는 경우 1가 양이온의 경우보다 알부민이 빨리 부착되어 제타전위 값이 더 빨리 증가하였다.

이상의 결과들로부터 스테인리스강에 비해 상대적으로 더 큰 음의 표면전하를 갖는 티타늄 표면에 양이온 흡착 양이 더 많았고 이로 인해 알부민의 부착 양이 증가함을 알 수 있었다. 또한 동일한 재료표면에서는 매개되는 양이온의 가수 및 농도가 증가할수록 알부민 부착 양이 증가했다. 따라서 이는 음으로 하전된 단백질이 역시 음으로 하전된 재료에 부착 시 재료의 표면전하에 따라 그 부착 양이 달라지는 것을 알 수 있었다. 본 실험은 재료의 표면전하가 낮

아질수록 양이온의 부착량이 증가되고 골전도도가 증가될 가능성이 높아짐을 의미한다.

.....
주요어 : 티타늄, 스테인리스강, 알부민(BSA), 표면전하, 양이온의 가수, 이온농도

학 번 : 2013-21037

목 차

초록	i
I. 서론	1
II. 실험방법	3
II-1. 시편준비	3
II-2. 단백질 부착 실험	3
II-3. 양이온 및 단백질의 거동 확인 실험	4
II-4. 통계분석	5
III. 실험 결과	6
IV. 고찰	15
V. 결론	20
VI. 참고문헌	21
Abstract	25

I. 서론

임플란트 재료에 대한 세포 반응은 단백질의 종류 및 구조에 영향을 받는다.^{1,2} 특히 조골세포는 재료에 부착 시 vitronectin, fibronectin 등 접착 단백질을 매개로 하는데² 이러한 접착 단백질의 부착 양이 증가할수록 세포의 증식 및 분화가 증가한다고 보고되고 있다.³⁻⁵

재료의 표면조도^{6,7}, 형상^{8,9}, 조성¹⁰⁻¹² 및 표면전하는¹³ 단백질이 부착될 때 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다. 그 중 표면전하는 재료의 극성 용매와의 접촉, 재료 표면의 이온화 혹은 표면에 이온 부착 등에 의해 발생하는데¹⁴ 이는 제타전위(ζ)를 측정함으로써 알 수 있다. 제타전위는 정전기적 이중층(electric double layer)에 의해 발생하는데 이는 전해질 용액 안에서 전하를 띤 재료에 이온이 흡착되어 발생한다. 정전기적 이중층은 재료의 표면에 하전된 전하와 반대전하를 갖는 이온만 흡착되어 형성되는 고정층(stern layer)과 반대전하를 갖는 이온 뿐 아니라 동일 전하를 갖는 이온도 흡착되는 확산층(diffuse layer)으로 구성된다.¹⁴ 이 때 제타전위는 확산층에서의 전위를 의미하고¹⁵ 제타전위 값은 유동전류(streaming current) 또는 유동전위(streaming potential) 변화를 측정하여 계산된다.^{16,17}

한편 체내에서 임플란트 표면에 흡착되는 것으로 알려진 vitronectin과 fibronectin은³⁻⁵ 등전점이 각각 4.75-5.25와¹⁸ 5.2로¹⁹ 체액과 같은 pH 7.4에서 음으로 하전 되는데도 pH 7.4에서 역시 음으로 하전 된 임플란트 표면에도 부착된다.¹ 이때 음으로 하전 된 단백질이 음으로 하전 된 임플란트 표면에 부착되는 원인이 이온의 매개 때문이라는 보고가 있었으나²⁰⁻²² 이온의 가수 및 농도가 단백질 부착에 미치는 영향에 대해 보고된 바는 없었다.

본 연구에서는 금속 소재의 표면전하 및 단백질 부착에 매개가 되는 양이온의 가수 및 농도가 단백질의 부착 양에 미치는 영향에 대해 조사했다. 실험에는 등전점이 각각 4.4²³와 6.0²⁴으로 pH 7.4에

서 상대적으로 표면전하가 상대적으로 낮은 티타늄과 높은 스테인 리스강을 사용했다. 모델 단백질로는 등전점이 4.7인 알부민을²⁵ 사용해서 재료의 표면전하 및 매개 이온이 단백질 부착에 미치는 영향을 조사했다.

II. 실험 방법

II-1. 시편 준비

단백질 부착 양의 차이를 알아보는 실험을 위해 지름 12mm, 높이 3mm인 디스크 형태의 스테인리스강(stainless steel, 316L)과 티타늄(commmercially pure titanium, grade 2)을 사용했다. 표면 조도를 동일하게 하기 위해 레진(Epofix, Struers)에 포매 시키고 연마기(tegrapol-35, Struers)를 이용하여 연마하였다. 연마된 시편은 증류수, 99.8% 아세톤, 99.8% 에탄올, 증류수 순서로 초음파 세척기(SH-2100, Saehan)을 이용하여 각각 10분씩 세척하였다.

재료 표면에서의 알부민 및 이온 거동을 확인하기 위해 사용한 제타전위 측정용 시편은 가로 2cm, 세로 1cm, 높이 0.1cm의 직육면체 형태의 스테인리스강(stainless steel, 316L)과 티타늄(commmercially pure titanium, grade 2)을 사용했다. 연마하는 방법과 세척 방법은 단백질 부착 양을 측정하기 위해 사용한 디스크 시편과 동일했다.

II-2. 단백질 부착 실험

생체 내에서의 알부민 농도와 동일하게 만들기 위해 알부민(albumin from bovine serum, Sigma)을 NaCl 0.0, 70, 140, 280mM과 CaCl₂ 0.0, 1.0, 2.5, 5.0mM 용액에 각각 녹여 34mg/ml 용액이 되게 만들었다. 이 때 각 용액은 Tris-Cl 완충용액 20mM을 이용하여 pH를 7.4로 맞췄다. 그 뒤 연마된 스테인리스강과 티타늄 시편 위에 200 μ l 가하여 인큐베이터에 넣고 1시간 동안 인큐베이션 시켰다. 전해질 농도는 동일하고 알부민은 용해되지 않은 NaCl 0.0, 70, 140, 280mM과 CaCl₂ 0.0, 1.0, 2.5, 5.0mM 용액을 사용하여 각각의 시편을 3회 수세하여 금속표면에 비특이적으로 부착된 단백질을 제거하였다. 그 후 EDTA가 없는 lysis buffer(0.15M NaCl, 1% Triton

X100, 10mM Tris-Cl, 0.05% sodium dodecyl sulfate)를 100 μ l씩 가지고 다시 30분간 인큐베이션하여 시료 표면의 단백질을 추출했으며 이 과정을 1회 더 반복했다.

단백질의 총량은 micro bicinchoninic acid assay(micro BCA assay)측정법을 이용하여 분석했다. 이 때 단백질 시료를 150 μ l씩 96 well plate(BD-Falcon)에 분취한 뒤 micro BCA assay kit(Thermo)를 이용하여 ELISA plate reader(Bio rad-550, Bio rad)에서 560nm 파장의 흡광도로 측정했다.

1가와 2가 이온이 혼합되어 있는 실험의 경우 알부민의 부착 양을 비교하기 위한 실험을 위해 NaCl 140mM 용액에 CaCl₂ 0.0, 1.0, 2.5, 5.0mM을 혼합한 용액과 CaCl₂ 2.5mM 용액에 NaCl 0.0, 70, 140, 280mM을 혼합한 용액을 만들었다. 이 용액에 각각 알부민을 34mg/ml씩 녹여 위와 동일한 과정을 반복했다.

II-3. 양이온 및 단백질의 거동 확인 실험

NaOH(100mM)와 HCl(100mM)을 사용하여 pH 7.4로 맞춘 NaCl과 CaCl₂ 용액(각각1mM) 500ml를 이용했다. 제타전위 측정은 Electrokinetic Analyzer(Anton Paar GmbH)를 사용했고 시간변화에 따른 제타전위 값은 Attract(Anton Paar GmbH, ver. 1.1)프로그램을 이용했다. 전해질 용액만으로 측정을 시작하고 700초 후에 알부민을 용액에 가하여 3.4 μ g/ml 농도가 되도록 한 뒤 1600초까지 매초마다 제타전위를 측정하였다.

티타늄 직육면체 시편으로 NaCl과 CaCl₂ 전해질 용액의 농도를 1.5mM에서 0.25mM씩 증가시켜 가면서 최종적으로 3.5mM이 될 때까지 제타전위를 측정했다. 제타전위 측정기기는 위와 동일한 기기를 사용하였고 SurPASS 프로그램(Anton Paar GmbH)을 이용하였다. 각각의 경우를 총 5회 반복하여 평균값을 계산하였다. 위와 동일한 전해질 농도에서 알부민을 3.4 μ g/ml 농도로 혼합하여 동일한 방법으로 측정하였다.

II-4. 통계분석

통계분석은 Excel 프로그램(Microsoft office excel 2010)을 이용했다. 측정값은 평균과 표준편차 값으로 나타내었고 t-test분석으로 통계적 유의성을 확인했다.

Ⅲ. 실험 결과

그림 1은 음으로 하전된 표면전하가 상대적으로 높고 낮은 스테인리스강과 티타늄에서 양이온의 농도 증가에 따른 알부민의 부착량의 변화를 마이크로 BCA 로 측정된 결과이다. 1가 양이온인 소듐이온이 포함된 NaCl용액의 농도가 증가함에 따라 알부민 부착량이 증가했으며, 스테인리스 강 보다 티타늄의 경우 알부민 부착량은 최소 0.3 μ g(NaCl 0mM)에서 최대 2.2 μ g(NaCl 280mM)까지 더 많았다.[그림 1(a)] 2가 양이온인 칼슘이온이 포함된 용해된 CaCl₂용액의 농도가 증가함에 따라 부착된 알부민 단백질 양은 최소 1.3 μ g(CaCl₂ 0mM)에서 최대 2.5 μ g(CaCl₂ 5.0mM)까지 더 높은 것으로 측정됐다.[그림 1(b)]

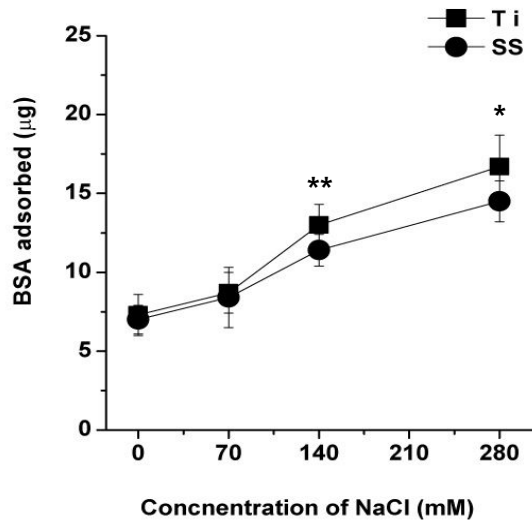
그림 2는 그림 1의 결과를 재료에 따라 다시 분류한 것이다. 이온 농도는 생체 내에서의 각각의 이온 농도를 기준으로 배수로 나타냈으며 티타늄과 스테인리스강 모두 1가 양이온이 포함된 NaCl 수용액보다 2가 양이온이 포함된 CaCl₂ 수용액에서 알부민의 부착량이 많았다.

그림 3(a)는 CaCl₂ 농도를 2.5mM로 고정하고 NaCl 용액의 농도를 증가시켰을 때이고 (b)는 NaCl용액의 농도를 140mM로 고정하고 CaCl₂의 농도를 2.5mM씩 증가시켰을 때 스테인리스강과 티타늄 표면에 부착한 알부민의 양을 나타낸 결과이다. (a)의 경우 스테인리스강보다 티타늄에서 최소 1.3 μ g(NaCl 70mM) 최대 2.8 μ g(NaCl 280mM)까지 부착량이 더 많았다. 그림 3(b)의 경우 티타늄이 최소 1.6 μ g(CaCl₂ 1.0mM), 최대 4.9 μ g(CaCl₂ 5.0mM)까지 알부민이 많이 부착됐다.

그림 4는 (a)소듐이온 또는 (b)칼슘이온과 알부민 유무에 따른 스테인리스강과 티타늄에서의 제타전위 변화를 측정된 결과이다. 처음엔 NaCl 1mM 용액으로만 제타전위를 측정하다가 3.4 μ g/ml 농도의 알부민을 첨가했을 때(700초) 티타늄에서 제타전위 값이 약

9mV(15%)증가하였으며 스테인리스강의 경우 약 5mV(12%) 증가했다. 반면 시작시 CaCl₂ 1mM용액으로 제타전위를 측정하다 동일한 농도의 알부민을 첨가했을 때 티타늄의 경우 제타전위는 약 2mV(12%), 스테인레스강의 경우도 약 1.8mV(11%)

(a)



(b)

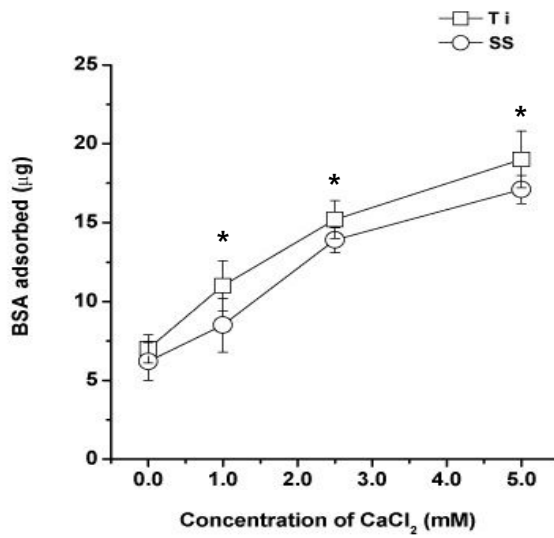


그림 1. 스테인리스강과 티타늄 표면에 (a) 소듐 이온 및 (b) 칼슘 이온의 농도 변화에 따라 부착하는 알부민의 양 변화. (■, □ : 티타늄 ●, ○ : 스테인리스강, **p<0.01, *p<0.05)

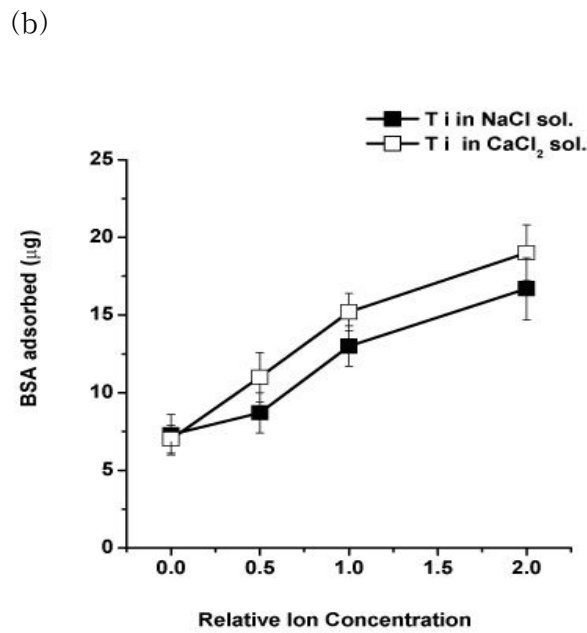
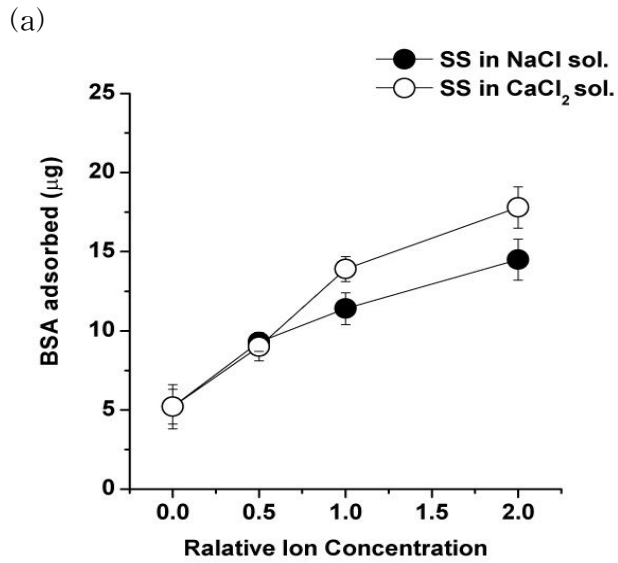


그림 2. (a) 스테인리스강과 (b)티타늄 표면에서 소듐이온과 칼슘이온의 상대적인 농도 및 가수 차이에 따른 알부민의 부착 양 변화. (■, □ : 티타늄 ●, ○ : 스테인리스강)

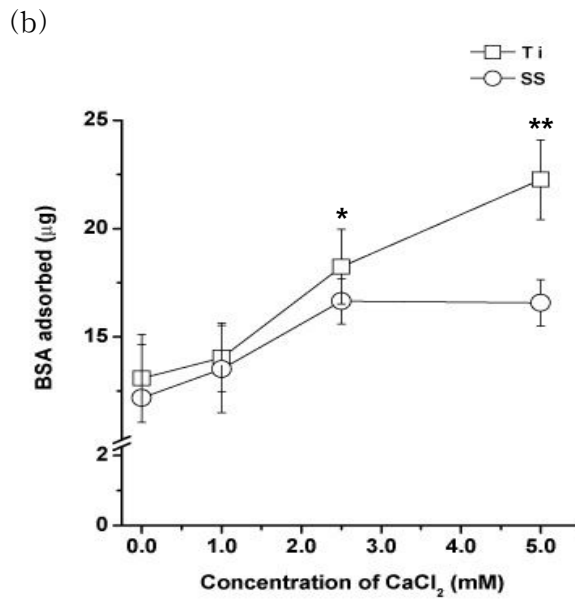
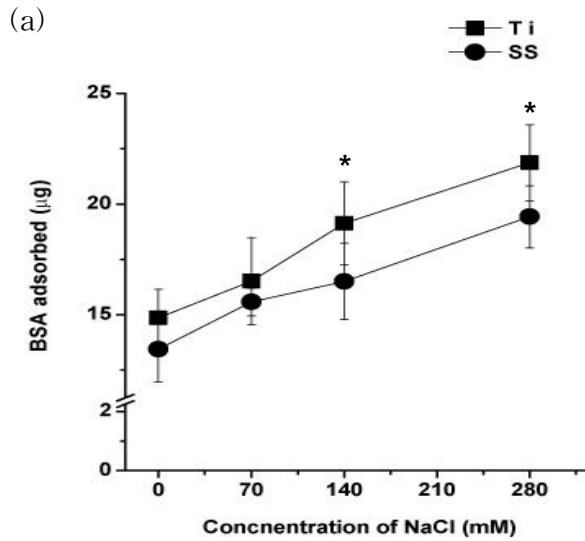
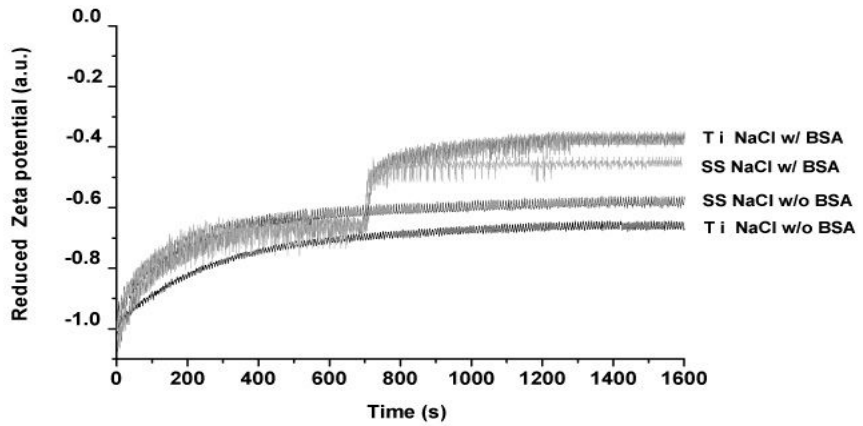


그림 3. (a) CaCl₂ 2.5mM로 고정하고 NaCl 농도를 변화시켰을 때와 (b) NaCl 140mM로 고정하고 CaCl₂ 농도를 변화시켰을 때 양이온의 가수 및 농도 변화에 따른 알부민의 부착 양 변화. (■, □ : 티타늄 ●, ○ : 스테인리스강, **p < 0.01, *p < 0.05)

(a)



(b)

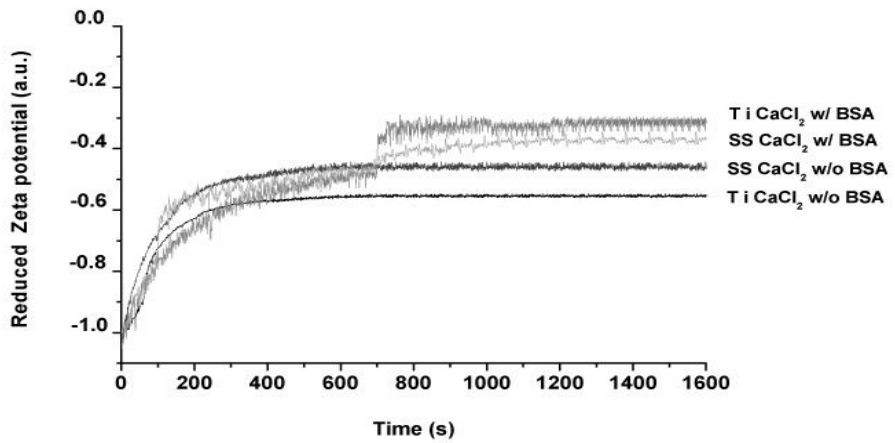


그림 4. (a) 염화소듐 및 (b) 염화칼슘 용액 내에서 서로 다른 재료의 표면 전하와 알부민의 유무에 따른 제타전위의 시간에 대한 변화.

정도 증가했다.

그림 5는 가수가 서로 다른 소듐이온과 칼슘이온의 농도를 각각 증가시켰을 때 단백질 유무에 따른 티타늄의 제타전위 변화를 나타낸 것이다. 알부민이 첨가되지 않은 경우, CaCl_2 와 NaCl 용액의 농도가 증가함에 따라 제타전위도 증가하는 경향을 보였으나 알부민이 첨가된 경우 CaCl_2 용액의 농도가 2.5-3.0mM 범위 일 때 1.9mV 감소하였다가 그 이후 다시 증가했다. 하지만 이런 현상은 NaCl 용액에 알부민이 첨가된 경우에는 나타나지 않았다.

그림 6은 CaCl_2 용액의 농도가 2.5-3.0mM에서 제타전위가 일시적으로 감소할 때 알부민의 재료에 대한 부착 양을 평가한 것이다. 칼슘 이온의 농도가 2.5-3.0mM인 부근을 세분화 하여 재료에 부착되는 알부민의 양을 마이크로 BCA 측정법으로 확인했다. 이때 CaCl_2 에서 알부민 부착 양이 같은 농도의 NaCl 에서 보다 2.1 μg 감소하였다.

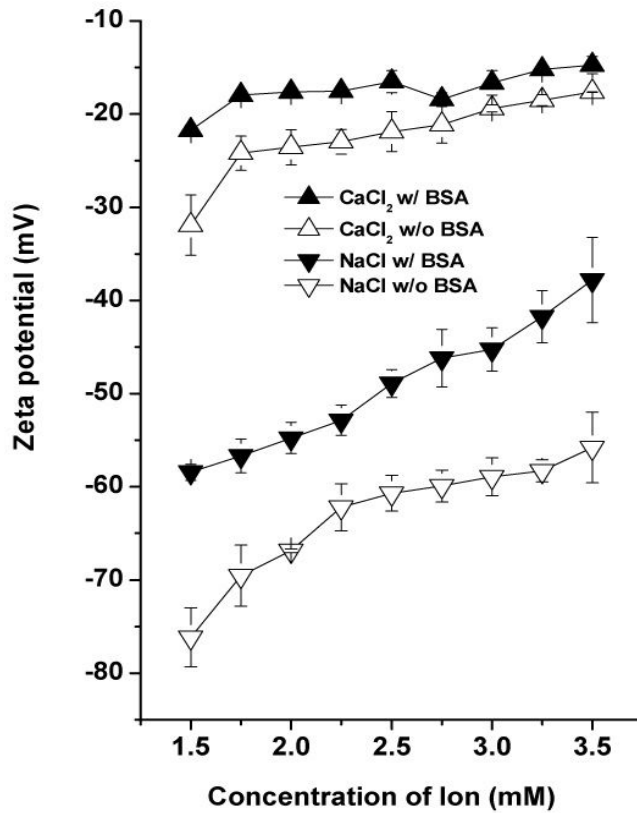


그림 5. 티타늄 시편에서 양이온의 가수, 농도변화 및 알부민의 유무에 따른 제타전위 변화.(▲: 칼슘이온과 알부민이 혼합된 용액, △: 칼슘이온 용액, ▼: 소듐이온과 알부민이 혼합된 용액, ▽: 소듐이온 용액)

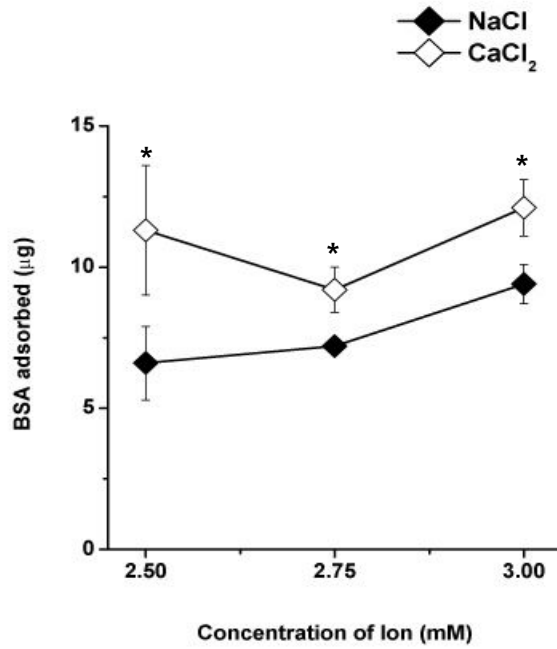


그림 6. 소듐 및 칼슘 이온 농도 범위가 2.5-3.0mM 일 때 이온의 가수에 따른 티타늄 표면의 알부민 부착 양 변화. (BSA 농도 : 34mg/ml, ◆ : NaCl, ◇ : CaCl₂, *p<0.05)

IV. 고찰

금속 재료의 표면전하와 재료 표면에 단백질 부착 시 매개 되는 양이온의 가수 및 농도가 알부민의 부착에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

표면전하와 단백질 부착의 관계에 대한 연구는 이전부터 다른 연구진들에 의해 수행돼 왔다. 음으로 하전된 단백질이 역시 음으로 하전된 재료 표면에 부착되는 원인은 이온이 매개되기 때문이라는 연구와¹⁸ 2가 이온만이 단백질의 재료 표면 부착에 영향을 미칠 것이라는 연구가^{19,20} 그것이다. 그러나 단백질 부착에 이온이 관여하는 기작은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 특정 pH에서 음의 전하를 가진 알부민이 역시 음의 표면전하를 가진 금속 재료에 부착될 때 양이온이 개제되는 것을 마이크로 BCA 측정법과 제타전위 측정을 통해 확인했다.

용액의 양이온 농도를 증가시키면서 알부민 부착 양을 측정했을 때 스테인리스강보다 티타늄의 경우에 부착 양이 많았는데(그림 1) 이는 재료가 음으로 크게 하전 될수록 단백질의 부착이 증가하는 것을 의미한다. 또한 2가 양이온인 칼슘이온이 개제될 때에 1가 양이온인 소듐이온이 개제될 때 보다 알부민 부착 양이 50배 증가했다.(그림 2) 이는 음으로 하전된 알부민이 음으로 하전된 재료에 부착될 때 2가 양이온에 의해 더 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 기존 보고에 의하면^{21,22} 1가 양이온은 개제되지 않는다고 하였으나 본 연구 결과에 의하면 2가 양이온 보다는 상대적으로 덜하지만 1가 양이온도 단백질 부착에 어느 정도 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다. 이는 재료의 제타전위가 낮을수록 양이온이 재료 표면에 상대적으로 더 잘 흡착되고 이를 개개로 부착되는 단백질 양 역시 증가하는 것이라고 해석 할 수 있다. 이러한 결과는 1가와 2가 양이온이 혼재하는 용액에서 2가 양이온인 칼슘이온 농도가 2.5mM로 고정되어 있음에도 불구하고 1가 양이온인 소듐의 농도가 증가함에

따라 알부민 부착 양 역시 증가하는 결과를 통해서도 알 수 있었다.[그림 3(a)]

제타전위 측정을 통해서도 2가의 양이온이 1가의 양이온 보다 단백질이 재료에 부착될 때 더 영향을 끼친다는 사실을 확인할 수 있었다. 2가 양이온은 1가 양이온보다 이온세기(ionic strength)가 더 크기 때문에 제타전위 값은 2가 양이온이 존재할 때 0값에 더 가까워지는데(그림 4) 이는 Debye-Hückel 근사법[식 (1)과 (2)]에 의해서도 확인된다.

x 가 표면으로부터의 거리, ψ 가 x 에서의 전위값, e 는 전하량, ϵ 은 용매의 유전상수, k 는 볼츠만 상수, T 는 용액의 온도, z_i 는 이온의 가수, n_{i0} 는 이온의 농도라고 할 때 표면으로부터 떨어진 거리에서의 전위에 대한 식은 식 1과 같다.

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{e^2\psi}{\epsilon kT} \sum_i z_i^2 n_{i0} \quad (1)$$

이때 확산층의 두께($1/\kappa$)와 관련된 κ 는 (2)와 같다.

$$\kappa^2 = \frac{e^2\psi}{\epsilon kT} \sum_i z_i^2 n_{i0} \quad (2)$$

(2)를 (1)에 대해 정리하면 다음 식 (3)과 같다.

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \kappa^2 \psi \quad (3)$$

이는 다시 식 (4)와 같이 표현할 수 있다.

$$\psi = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (4)$$

Debye-Hückel 근사법을 이용하면 이온의 가수가 증가할수록 κ 값이 증가하고 이때 전위의 변화량 ψ/ψ_0 은 감소하기 때문에 최종적으로 NaCl용액에서 보다 CaCl₂ 용액에서 제타전위 값이 0에 가까워진다.

그런데 양이온만 있을 때에 비해 알부민이 첨가 됐을 때 제타전위 값이 더 0값에 가까워졌는데(그림 4) 이는 단백질이 주입될 때

재료 표면 근처의 확산층에 단백질 및 양이온의 농도변화가 생겼고 이것이 이온세기의 변화를 유발했기 때문이라고 추측할 수 있다. 즉, pH 7.4의 수용액 중에서 음으로 하전된 알부민에 양이온이 부착하고 그 상태로 재료표면에 부착되는 것이기 때문에 알부민이 첨가됐을 때 확산층에 양이온이 더 증가하는 것으로 생각된다.

한편 1가 양이온 혹은 2가 양이온이 첨가됐을 때 확산층에서 알부민의 거동이 달라진다는 사실을 그림 5, 6을 통해서 확인할 수 있었다. 즉, 전해질 용액의 농도가 2.75mM 부근일 때 2가 양이온이 용해된 용액의 경우에서만 제타전위 값이 감소하는 경향을 보였다. 이는 3.4 μ g/ml의 알부민 농도에서는 용액에 용해된 양이온 농도 대비 알부민의 농도가 앞선 실험들에서 보다 낮아져 여분의 칼슘이온에 의해 알부민끼리 결합되면서 하전량이 줄어들고 결과적으로 정전기적 인력에 의해 재료 표면에 부착되는 알부민이 줄어들게 돼 제타전위가 감소한 것으로 추측된다.

한편 알부민이 주입되기 전엔 티타늄의 제타전위 값이 스테인리스강의 그것보다 더 낮지만 알부민이 주입되면 티타늄의 제타전위 값이 오히려 더 높아진다는 결과를 확인할 수 있었는데(그림 4) 이는 티타늄에 양이온이 더 잘 흡착되고 이를 매개로 부착 되는 알부민 양 역시 증가하기 때문이라고 생각된다.

이상의 결과에서부터 체액의 pH에서 음으로 하전된 단백질이 음으로 하전된 재료에 부착되는 모습을 개략적으로 표현하면 그림 7과 같다.

즉, 음으로 하전된 티타늄 표면에 양이온이 가장 먼저 흡착되어 고정층을 이룬 뒤 알부민이 양이온을 매개로 재료에 부착되면서 양이온, 음이온 및 양이온이 결합된 상태의 알부민이 확산층을 이룬다. 이때 알부민과 양이온의 관계는 하나의 이온이 단백질과 재료에 하나의 전하씩 나눠서 결합된 것이라기^{19,20} 보다는 이온이 재료 표면에 정전기적 이중층을 형성할 때 알부민에 부착된 양이온도 단일 양이온과 마찬가지로 확산층을 이루게 돼 음의 전하를 띤 알부민이

역시 음으로 하전된 재료 표면에 부착될 수 있는 것이라 생각된다. (그림 7) 따라서 2가 양이온 뿐 아니라 1가 양이온도 어느 정도 단백질이 재료에 부착될 때 영향을 줄 수 있다고 생각된다.[그림 1(a)]

이상의 실험결과로부터 서로 다른 제타전위를 갖는 두 금속에 음으로 하전된 단백질이 부착될 때 양이온이 단백질에 먼저 부착되고 이를 매개로 재료 표면에 부착되는 것을 알 수 있었다. 이때 양이온은 더 큰 음의 전하로 하전된 티타늄 표면에 더 많이 흡착되므로 상대적으로 적은 음의 전하로 하전된 스테인리스강보다 티타늄 표면에서 알부민 부착 양이 많은 것이라고 추측할 수 있었다. 또한 같은 재료에서도 양이온의 가수와 농도가 높아질수록 단백질 부착 양이 증가하는 것을 알 수 있었다.

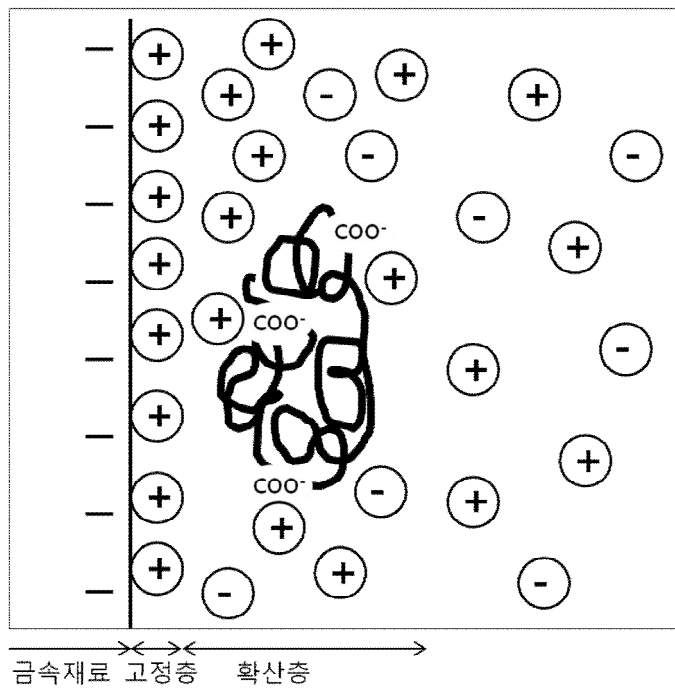


그림 7. 금속재료 표면에 이온과 단백질 부착 양상 모식도

V. 결론

스테인리스강과 티타늄의 표면전하와 수용액 중 양이온의 가수 및 농도가 알부민 부착에 미치는 영향에 대해 조사했다. 양이온을 매개로 알부민의 부착이 발생하기 때문에 동일한 표면조도를 가질 때 더 크게 음으로 하전된 티타늄에서 상대적으로 적게 음의 전하로 하전된 스테인리스강에서 보다 알부민 부착 양이 많았다. 또한 동일 재료에서도 양이온의 가수 및 농도가 증가할수록 알부민 부착 양이 더 증가하였다. 이는 재료마다 달리 하전된 표면전하가 단백질 부착 양상의 차이를 발생시키고 이러한 재료를 매식 시 서로 다른 조직 반응이 발생할 수 있을 것이라 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-681.
2. Cameron J. W., Richard E. C., David I. L., and Mark J. P. Mediation of biomaterial - Cell interactions by adsorbed proteins, A review. *Tissue Eng* 2005;11:1-18.
3. Steele J.G., McFarland c., Dalton B.A., Johnson G., Evans M.D., Howlett C.R., Underwood P.A. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: The effect of surface chemistry upon intial cell attachment. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;5:245-257.
4. Howlett C.R., Evans M.D., Walsh W.R., Johnson G., Steele J.G. Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture. *Biomaterials* 1994;15:213-222.
5. Kilpadi K.L, Chang P.L., Bellis S.L. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 2001;57:258-267.
6. Zhang F., Kang E., Neoh K., Wang P., Tan K., Surface modification of stainless steel by grafting of poly(ethylene glycol) for reduction in protein adsorption. *Biomaterials* 2001;22:1541 - 1548.
7. Deligianni D., Katsala N., Ladas S., Sotiropoulou D., Amedee J., Missirlis Y. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001;22:1241 - 1251.
8. Bowers K.T., Keller J.C., Randolph B.A., Wick D.G.,

- Michaels C.M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implant* 1992;7:302-310.
9. Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 2000;21:1567-1577.
 10. Wang C., Duan Y., Markovic B., Barbara J., Howlett C.R. Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions. *Biomaterials* 2004;25:2507 - 2514.
 11. Orban J. M., Marra K. G., Hollinger J. O. Composition options for tissue-engineered bone. *Tissue eng* 2002;8: 529-539.
 12. Le Guéhennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844-854.
 13. Kaiyong C., Marion F., Jörg B., Gerhard H., Klaus L., Klaus D. J. Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids Surf B* 2006;25:1-8.
 14. Duncan J. S. Introduction to colloid and surface chemistry. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford 4th ed;1991.
 15. Compendium of Chemical Terminology, Compiled by McNaught A. D. Wilkinson A.. Blackwell Sci Publ, Oxford 2nd ed; 1997.
 16. Werner C., Zimmermann R., Kratzmüller T, Streaming potential and streaming current measurements at planar solid/liquid interfaces for simultaneous determination of zeta

- potential and surface conductivity. *Colloids Surf A* 2001; 192:205-213.
17. Roesslera S., Zimmermann R., Scharnweber D., Werner C., Worch H. Characterization of oxide layers on Ti6Al4V and titanium by streaming potential and streaming current measurements. *Colloids Surf B* 26;2002:387-395.
 18. Klaus T. P., Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Bioi* 7: 1991: 275-310.
 19. Nancy M. T., Michael W. M., David L. A., James F. H., Joseph S. W., Solution and surface effects on plasma fibronectin structure. *J Cell Biol* 97;1983:1686-1692.
 20. Willem N., Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. *Macromol Symp* 1996;103:5-18.
 21. Fuminori I., Norio H., Takeshi U., Hajime M., Masahiro Y., Takahiro O. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials* 2010;31:2717 - 2727.
 22. Klinger A., Steinberg D., Kohavi D., Sela M.N. Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997;36:387-392.
 23. Joseph W. Bullard and Michael J. Orientation dependence of the isoelectric point of TiO₂ (Rutile) surfaces. *Langmuir* 2006;22:10264-10271.
 24. Vignal V., Olive J. M., Desjardins D. Role of Molybdenum on the structure of passive films by using ex-situ AFM/STM. Passivity met semicond; proceedings electrochem soc 99-42;2001:275-278.
 25. Carla E. G., Marcelo J. A., Carlos P. de P. Adsorption of Bovine Serum Albumin onto TiO₂ Particles. *J Coll Interf*

Sci 1997;188:387-395.

Abstract

Effect of Metal Surface Charge, Electronic Valency and Concentration of Cation on Albumin Adsorption

Hye Young Shin

Interdisciplinary Program of Bioengineering, College of Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Effect of surface charges(zeta potential), electronic valency and concentration of metal ions in solution on protein adsorption onto polished metal surface were examined. We studied the adsorption of bovine serum albumin(BSA) onto titanium (commercially pure titanium, grade 2) and stainless steel(stainless steel, 316L) which depended on zeta potential were evaluated using micro BCA assay.

Negatively charged albumin(isoelectric point : 4.8) adsorption were enhanced on titanium(isoelectric point : 4.4) and stainless steel(isoelectric point : 6.0) surfaces when the electronic valency and concentration of cation in solution increased. Besides, the amount of albumin adsorption onto titanium and stainless steel surfaces increased remarkably, as increasing the concentration of electrolytes under the same electronic valency of ions. Adsorption kinetics of albumin and metal surfaces were dependent on electronic valency of metal ions were evaluated by measuring zeta potential dependent on time. The amount of adsorbed

albumin increased more rapidly when there was calcium ion rather than sodium ion in solution.

From the results, it can be known that the adsorption amount of albumin increased as decreasing the surface charge due to higher adsorption amount of positively charged metal ions by electronic attraction. The practical implication of these results are the higher the adsorption amount of serum proteins, which are induced higher the chance of osteoconductivity.

.....

Keywords : titanium, stainless steel, bovine serum albumin,
surface charge, valency of ion, concentration
of ion

Student Number : 2013-21037