

## P-11 Titanium표면의 Thermal oxidation이 osteoblast-like cell의 부착, 증식에 미치는 영향

김도영<sup>1</sup>, 허성주<sup>2</sup>, 최용창<sup>4</sup>, 한종현<sup>3</sup>, 류인철<sup>1</sup>, 한수부<sup>1</sup>, 최상묵<sup>1</sup>, 정종평<sup>1</sup>  
서울대학교 치과대학 치주과학교실<sup>1</sup>  
서울대학교 치과대학 보철학교실<sup>2</sup>  
연세대학교 치과대학 보철학교실<sup>3</sup>  
카톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 치과학교실<sup>4</sup>

### 서론

Titanium은 다른 금속재료와 비교하여 우수한 생체친화성을 가지고 있어 생체내 이식재료로 널리 사용되고 있는 금속 중 하나이다. Titanium의 생체친화성은 표면에 형성되는 oxide layer에 의해 얻어지는 것으로 알려져 있다. Titanium표면에 형성되는 oxide layer는 대략 5nm정도의 두께로 nonstoichiometric TiO<sub>2</sub>로 구성되어 있으며, amorphous 또는 low crystallinity를 가진다. 또한 titanium표면처리에 따라 oxide layer의 특성을 변화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

Titanium implant는 뛰어난 생체친화성에도 불구하고 osseointegration이 일어나는 과정이 느리게 진행되고, 기능중에 osseointegration이 파괴되기도 한다. 이러한 이유들로 인해 implant표면을 물리적, 화학적으로 변화시켜 osseointegration을 질적으로 향상시키려는 연구들이 진행되고 있다.

본 실험에서는 titanium표면을 thermal oxidation함으로써 oxide layer의 변화를 유도하여, 이런 변화가 생체친화성에 미치는 영향을 기존에 이용되고 있는 표면처리방법과 비교하고자 하였다.

### 연구재료 및 방법

#### 1. 세포배양

백서의 경골과 장골에서 채취한 osteoblast-like cells을 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제를 포함한  $\alpha$ -MEM(minimal essential medium)을 이용하여 배양하였다.

#### 2. Titanium disc 제작

표면처리를 위한 실험재료로 pure titanium disc를 준비하여, 실험목적에 따라 다음과 같이 군을 나누어 표면처리를 시행하였다. (1) machined (2) sandblasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (3) sandblasted and etched (4) blasted and thermal oxidation at 400°C, 2hr (5) blasted and thermal oxidation at 600°C, 2hr (6) blasted and thermal oxidation at 800°C, 2hr.

#### 3. 조골세포의 부착에 미치는 영향

초기 밀생상태의 조골세포를 각각의 disc당  $1 \times 10^5$  cell로 접종하고, 37°C에서 4, 8, 24시간 배양하였다. 측정은 전체세포수에 대한 부착세포수의 백분율로 나타내었다. 먼저 부유액을 흡입하여 미부착세포의 수를 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. 시편 표면에 부착된 세포는 0.05% trypsin-EDTA용액으로 30분간 처리하여 세포부유액을 만든 다음 hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

#### 4. 조골세포의 증식에 미치는 영향

조골세포를 접종한 시편을 1, 4, 7, 13일에 걸쳐 배양한 후 세포부착에서와 같은 방법으로 시편에 부착된 세포의 수를 측정하였다.

#### 5. Alkaline phosphatase 활성도

4, 7, 13일간 배양한 조골세포를 0.05% trypsin-EDTA용액으로 30분간 처리하여 세포부유액을 만든 다음, 원심분리하여 DDW에 부유시켜 초음파분쇄하였다. 분쇄된 세포부유액 50  $\mu$ l에 0.1M glycine-NaOH buffer 100  $\mu$ l, 15mM p-NPP(p-nitrophenolphosphate) 50  $\mu$ l, 0.1% triton X-100/saline 50  $\mu$ l, DDW 50  $\mu$ l를 가하여 30분간 반응시킨후 0.1N NaOH 125  $\mu$ l를 가하여 반응을 중지시켜 분해된 p-NP(p-nitrophenol)을 410nm에서 비색정량하였다.

#### 6. SEM 관찰

1, 11일간 배양한 시편을 PBS(phosphate buffer solution)로 세척한 후 0.01M HBSS하에서 2.5% glutaraldehyde로 60분간 고정하였다. 그리고 1% osmium tetroxide로 2차고정한 후 critical point drying을 하고 gold sputter coating을 시행하였다. SEM 관찰은 조골세포의 부착형태에 관해서 시행하였다.

### 결론

1. 시간경과에 따라 모든 군에서 세포부착이 증가하였다. 배양시간에 따른 군간 부착수준은 유사하였다.
2. 조골세포의 증식은 시간의 경과에 따라 machined surface에서 크게 증가하였으며, 나머지 군들에서는 thermal oxidation at 600 $^{\circ}$ C군이 13일째 더 높은 세포증식을 나타내었다.
3. 4일 후 thermal oxidation at 600 $^{\circ}$ C군이 높은 ALP활성도를 나타냈으며, 7일 후는 machined, sandblasted surface군에서 ALP활성도가 높게 나타났다.
4. machined surface의 경우 다른 군들과 비교하여 1일 후, 11일 후 두 시편 모두에서 우수한 세포부착 양상을 보였다. 표면처리를 한 다른 다섯 군에서는 비교적 유사한 양태의 세포부착을 볼 수 있었으며, 초기 밀생부위에서 가장자리로 증식해나가는 양상을 나타내었다.
5. 기존에 이용되고 있는 sandblasted 또는 sandblasted and etched 표면과 비교할 때 thermal oxidation at 400 $^{\circ}$ C, 600 $^{\circ}$ C 처리를 한 군에서 유사한 생체친화성을 나타내었다.