

# 티타늄 표면에 대한 배양 골수세포와 치은 섬유아세포의 생체적합성

오충영 · 박준봉 · 권영혁 · 이만섭

경희대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서 론

티타늄이 체내의 골과 긴밀하게 융합된다는 사실이 밝혀진 이래<sup>1, 2)</sup>, 치과 임플란트학은 빠르게 발전하여 근래에 이르러서는 상실된 치아의 회복 및 재건을 위한 방법으로 자리잡고 있다. 재료는 생체적합성을 가지고 강도와 인성이 높아야 한다.<sup>3)</sup> 다양한 설계를 갖는 여러 임플란트는 대개 순수 티타늄 또는 티타늄 합금으로 제작되며, 이러한 금속은 전술한 여러 가지 조건을 갖추고 있는 것으로 알려져 있다.

Melcher (1988)<sup>4)</sup>는 임플란트의 매식 후에 발생하는 창상의 치유과정을 이해하기 위해서는 임플란트의 주위조직, 임플란트 재료와 표면 특성이 숙주세포에 미치는 영향, 그리고 임플란트에 가해지는 응력 등에 대하여 구명되어야 한다고 하였으며, Kasemo와 Lausmaa (1988)<sup>5)</sup> 그리고 Natiella (1988)<sup>6)</sup>는 임플란트 표면에 대한 세포적 수준에서의 반응이 갖는 의미를 강조하였다.

최근까지의 치과용 임플란트에 대한 생물학적 연구는 티타늄의 골유착과 관련된 골과 임플란트 계면의 특성 및 성상을 관찰하고, 세포 반응으로서 조골세포에 대한 생체적합성을 평가하는 방향으로 대부분 진행되어 왔다.<sup>1, 2, 7-9)</sup>

그러나 골내 임플란트는 골로부터 치은을 관통하여 외부 환경과 교통하는 구조를 가지므로 이러한 관통부에서 나타나는 임플란트는 골로부터 치은을 관통하여 외부 환경과 교통하는 구조를 가지므로 이러한 관통부에서 나타나는 임플란트의 표면과 치은 결합 조직과의 상호작용을 파악하는 것 또한 매우 중요하다.<sup>10-14)</sup> 이러한 관점에서 임플란트에 대한 조직과 세포의 반응은 경조직에 대한 반응으로서 조골세포의 반응, 그리고 연조직의 반응으로서 치은 상피세포와 섬유아세포의 반응으로 크게 대별할 수 있으며, 연구의 방향 또한 이 두 조직과 세포의 반응에 대한 평가로 이루어지고 있다.

먼저 치과용 생체재료에 대한 골조직 반응의 연구로서 조골세포에 대한 연구동향을 살펴보면, Matsuda와 Davies(1987)<sup>15)</sup>는 생활성 재료인 bioactive glass에 대한 조골세포의 반응을 실험실적 방법을 통하여 연구하였고, Naji와 Harmand(1990)<sup>16)</sup>는 코발트-크롬-몰리브덴 합금(Cobalt - Chrome - Molybdenum alloys, CO - Cr - Mo) 합금의 표면 조도에 따른 사람의 조골세포의 생물학적 반응을 평가하였으며, Vrouwen - velder등(1993)<sup>17)</sup>은 생후 약 20일 된 백서의 두개골에서 분리·배양한 조골세포를

이용하여 치과용 생체재료의 생체합성을 평가하였다. 또한 Boyan등(1993)<sup>18)</sup>은 동물실험과 실험학적 연구를 통하여 다양한 치과용 생체재료에 대한 조골세포와 연골 세포의 반응을 다각적으로 비교·연구하여, 실험실적 방법을 통한 세포활성도의 감소나 증가가 반드시 생체내에서도 동일한 양상으로 반영되지는 않으나, 시료의 전반적인 생체적합성의 평가는 가능하다고 하였다.

한편 임플란트에 대한 연조직의 반응은 상피부착부를 형성하는 치은 상피세포와 결합조직 부착을 담당하는 치은 섬유아세포로 대별할 수 있다.<sup>12, 14)</sup> 먼저 임플라톤 표면에 대한 상피세포의 부착에 관한 연구에서 Baum-hammers등(1978)<sup>19)</sup>과 Gould등(1981)<sup>20)</sup>은 티타늄 표면에 상피세포를 배양한 후 투과전자현미경으로 관찰하여, 자연치아에서 비슷한 기저판과 반교소체가 형성된다고 하였으며, Kasten등(1990)<sup>21)</sup>은 주사전자현미경 관찰을 통하여 최근에 사용되는 임플란트 재료에 대한 치은 상피세포의 상대적 부착정도를 측정하여 생체적합성의 평가에 이용하였다. 그리고 티타늄에 대한 결합조직의 부착에 필수적인 역할을 담당하는 섬유아세포에 대한 세포적 수준에서의 실험실적 연구는 티타늄이 치은 섬유아세포의 부착, 전개 및 증식에 있어서 우수한 생체적합성을 보인다는 결론에 이르고 있으며<sup>10, 23, 24)</sup>, 동물실험을 통하여 티타늄과 결합조직 사이에 직접적인 접촉 또는 부착을 확인하여 자연치아에서와 유사한 결합조직의 부착이 가능하다고 보고하고 있다.<sup>24-27)</sup>

이상에서 살펴본 바와 같이, 현재까지 진행된 실험실적 연구와 동물실험을 통하여 순수 티타늄은 다른 종류의 생체재료에 비하여 우수한 생체적합성을 지니며, 생체내에서의 조직적합성 또한 임플란트 재료로서 적합하다는 사실을 확인할 수 있다. 그러나 최근에 우수한 기계적 특성을 바탕으로 치과 임플란트학과 정형외과학 분야에서 이용이 증가되고 있는

합금 형태의 티타늄은 연구분야에서 강조되지 않았으며, 특히 순수 티타늄과 티타늄 합금의 직접적인 비교에 대한 연구는 제한적으로 이루어져 있다.<sup>28-32)</sup> Lausmaa등(1989)<sup>28)</sup>은 순수 티타늄과 합금 형태의 티타늄을 통법에 따라 표면처리한 후, 형성되는 산화막의 성질을 평가하여 이들의 동일성과 차이점을 구명하였고, Johansson등(1989)<sup>29)</sup>은 순수 티타늄과 티타늄 합금 사이의 차이점을 임플란트 재료의 계면에서 나타나는 미세구조적 분석으로 연구하여, 골유착은 티타늄 합금에서도 발생하나 순수 티타늄에서보다 자연스러운 조직 반응으로 골유착이 형성된다고 하였다. 보다 최근에 Orr등(1992)<sup>30)</sup>은 동물실험을 통하여 이들 양 금속의 골계면에서 서로 비슷한 양상의 조직반응을 일으킨다고 하였으며, Keller등(1994)<sup>31)</sup>은 양 금속의 산화막 표면은 형성된 두께를 제외하고 대부분의 양상에서 비슷한 성질을 보이며 이러한 동질성은 세포반응에 그대로 반영될 것이라 예상하였다. 또한 Shina등(1994)<sup>32)</sup>은 티타늄 합금과 Co-Cr-Mo 합금의 표면에 조골세포를 배양한 후 초기의 부착양상을 평가하여, 초기의 양상이 이후에 발생하는 모든 세포적 반응에 영향을 미치며, 생체내에서의 골성장에 의한 골유착의 양상을 간접적으로 확인할 수 있다고 하였다. 지금까지의 여러 연구에서 순수 티타늄과 티타늄 합금의 동질성과 차이점이 구명되고 있으나, 양 금속의 생체적합성의 차이와 세포반응에 대한 영향은 여전히 논란의 대상이 되고 있으며 이에 대한 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.

또한 현재까지의 연구동향을 종합하여 보면, 초기의 티타늄에 대한 실험실적 연구는 금속 자체의 생체적합성의 평가에 중점을 두고 시행되었으나,<sup>1, 2, 7-10, 19, 20, 23-27)</sup> 최근에는 이러한 생체적합성의 측정과 함께 금속표면의 계면에서 발생하는 세포적 반응과 특성에 대한 연구가 강조되고 있다.<sup>5, 6, 15, 18, 21, 28-32)</sup> 이에 본 연구에서는 지금까지 진행된 여러 선행들의 연구

를 기초로 하여 순수 티타늄과 합금 형태의 티타늄 표면에 대한 치은 섬유아세포와 골수 세포의 부착 및 증식률을 평가하여, 양 금속의 초기 부착에서 장기간의 증식에 걸친 세포의 반응을 비교·분석하였다. 또한 티타늄 표면에 대한 조골세포의 반응을 양적으로 평가하고 결합조직 부착과 관련된 섬유아세포의 반응을 평가하여, 양 세포의 타타늄에 대한 세포반응을 비교함으로써 이상적인 임플란트 재료를 얻기 위한 기초적 자료를 얻고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 시편의 준비

#### 1) 시편의 제작 및 구성성분

제1실험군은 시판용 순수 티타늄(99.8%, Kobe Steel, JIS 2종)으로서 기계적 특성을 증진시키기 위해 소량의 철(0.078%), 수소(0.001%)원자 등이 첨가된 금속이었으며, 직경 20.0mm의 금속봉의 형태를 두께가 약 1.0mm 되도록 절단하여 이용하였다.

한편 코발트-크롬-몰리브덴 합금(Cobalt - Chrome - Molybdenum alloy, Biosil, Degussa)과 12-Well의 조직 배양용 폴리스티렌 접시(12-well tissue culture polystyrene plate, Corning, USA)를 각각 양성대조군과 음성대조군으로 설정하였다. 양성 대조군은 64.8%의 코발트, 28.5%의 크롬, 5.3%의 몰리브덴, 그리고 규소, 망간, 탄소 등이 소량 포함된 금속으로서 직경 20.0mm, 두께 1.0mm의 원반의 형태로 주조하여 이용하였으며, 음성대조군의 조직배양용 접시는 실험군과 동일면으로 환산하여 이용하였다. 위의 모든 시편을 각각 9개씩 준비하였다.

#### 2) 시편의 표면 처리 및 멸균

각 군 사이에 일정한 표면의 상태를 얻기 위하여 #180, #220, #320, #400, #600, #800, #1,000, #1,200, #1,500, #2,000의 순차적

인 silicone carbide sandpaper를 이용하여 세포가 부착될 면을 연마하였다. 이후 각 시편에 에탄올 용제가 들어 있는 초음파 세척기에서 1시간동안 세척하였으며, 자외선 멸균기(15watt, 250mm)에서 24시간 동안 멸균처리한 후 12-well 배양접시(Corning, 미국)의 각 well 내에 한 개씩의 시편을 넣어 준비하였다. 이상의 모든 조작 과정은 티타늄 핀셋(DIB 034, Sweden)을 이용하여 이종 금속에 의한 표면의 오염을 최소화하였다.

### 2. 세포의 분리 및 배양

#### 1) 백서 골수세포의 분리 및 배양

생후 5일 이내의 웅성 백서를 무게 100mg당 5mg의 Pentobarbital sodium(東京化成藥品株式會社, 일본)으로 복강내 마취하여 희생시킨 후, 대퇴골을 무균적으로 채취하였다. 수술도로 경골단을 절단하고 절단면을 통해 골수조직을 채취한 다음, 이를 수거하고 10%의 우태 아혈청(fetal bovine serum, Gibco, 미국), 200unit/ml Streptomycin(Gibco, 미국)에 섞어 1,500rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 남아 있는 골수조직 덩이에 배양액을 첨가하여 재현탁액으로 만들고, 이를 35mm의 배양접시(Falcon, 미국)에 골고루 분산시킨 다음, 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub>와 공기의 혼합 배양기(비전과학, 한국)에서 배양하였다. 골수세포가 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층의 밀생이 형성된 후에는 0.05% trypsin/ 0.02% EDTA(Gibco, 미국)에 계대배양하였고, 7-10일 간격으로 1 : 3 계대배양하였으며, 2일 간격으로 배양액을 교환하여 주었다. 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기 위하여 5-7세대의 세포를 사용하였다.

#### 2) 사람의 치은 섬유아세포의 분리 및 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자의 제1 소

구치 받치시 건강한 치은조직을 일부 채취하여, 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco, 미국), 200unit/ml Penicillin(Gibco, 미국), 200 $\mu$ g/ml Streptomycin(Gibco, 미국)과 200  $\mu$ g/m Streptomycin(Gibco, 미국)과 1 $\mu$ g/m Am - photericin - B(Gibco, 미국)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, 미국)으로 5회 세척하고 약 1mm<sup>3</sup>의 크기로 세절하였다. 세절된 조직편 10-15개를 35mm 세포 배양용 접시(Falcon, 미국)에 넣은 다음, 배양액을 첨가하고 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub>와 공기의 혼합 배양기(비전과학, 한국)에서 배양하였다.

치은 섬유아세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층의 밀생이 형성된 후에는 0.05% trypsin/0.02% EDTA(Gibco, 미국)로 처리하여 100mm세포배양용 접시(Falcon, 미국)에 계대 배양하였다. 이후 7-10일 간격으로 배양액을 교환하였고, 세포의 균일한 특성을 얻기 위하여 5-7세대의 세포를 사용하였다.

### 3. 연구방법

#### 1) 백서 골수세포의 증식률 측정

시편이 담긴 12-Well 배양접시(Corning, 미국)의 각 Well을 1M의 인산완충식염수(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 다음, 잔여 수분을 제거하고 37°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub>와 공기의 혼합 배양기(비전과학, 한국)에 약 30분 동안 보관하였다. 준비된 골수세포로 배양액내 3 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml의 세포가 포함된 세포부유액을 형성한 다음, 배양기에 보관된 배양접시의 각 Well에 2.0ml씩을 주입하고 2일, 5일, 9일 동안 배양기내에서 각각 배양하였다. 설정된 시간에 따라 세포를 배양한 후, 배양액을 제거하고 0.1M 인산완충식염수로 세척하였다. 이후 0.05% trypsin / 0.02% EDTA(Gibco, 미국)로 처리하고 각 시편에 부착된 세포를 완전히

분리해 낸 다음, 이를 수거하여 도립현미경 상에서 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 설정된 배양기간 동안에는 매 2일마다 배양액을 교환하였다. 실험이 완료되면 상기의 시편 멸균과정을 동일하게 시행하였고, 같은 실험을 1회 더 반복하였다.

#### 2) 치은 섬유아세포의 증식률 측정

시편이 담긴 12-Well 배양접시(Corning, 미국)의 각 well을 1M의 인산완충식염수로 3회 세척한 다음, 잔여 수분을 제거하고 배양기에 약 30분간 보관하였다. 준비된 섬유아세포로 배양액내 3 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml의 세포가 포함된 세포부유액을 형성한 다음, 배양기에 보관된 배양접시의 각 Well에 2.0ml씩을 주입하고, 2일, 5일, 9일 동안 배양기내에서 각각 배양하였다. 설정된 시간에 따라 세포를 배양한 후, 배양액을 제거하고 0.1M 인산완충식염수로 세척하였다. 이후 0.05% trypsin/ 0.02% EDTA(Gibco, 미국)로 처리하여 각 시편에 부착된 세포를 완전히 분리해 낸 다음, 이를 수거하여 도립현미경 상에서 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 설정된 배양 기간동안에는 매 2일마다 배양액을 교환하였다. 실험이 완료되면 상기의 시편멸균과정을 동일하게 시행하였고, 같은 실험을 1회 더 반복하였다.

#### 4. 각 세포의 증식률에 대한 통계학적 분석

각 세포에 대하여 동일한 2회의 실험을 실시한 후, 각각의 시편에 부착·배양된 세포수를 산정하여 평균하였고, 음성대조군과 양성대조군에 대한 각 실험군간의 유의성을 검증하기 위해 일원분산분석법(one-way ANOVA)으로 5%의 유의수준에서 검증하였다. 한편 제 1실험군과 제2실험군사이의 유의성 검증을 위하여 unpaired Student's t-test로 5%의 유의수준에서 검증하였다.

### Ⅲ. 연구성적

#### 1. 백서 골수세포의 각 군별 배양 시간에 따른 세포수

##### 1) 각 군의 표면에 2일 동안 부착된 세포수

각 군의 표면에서 2일 동안 배양되어 부착된 세포의 수는 음성대조군에서 가장 높게 나타났으며, 제2실험군, 제1실험군, 양성대조군의 순으로 감소되는 양상을 보였다(Table 1). 각 군간 통계학적 비교에서 양 실험군 모두 양성대조군에 비해 유의하게 높은 부착률을 나타내었으나 ( $P < 0.05$ ), 음성대조군과는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ )(Fig 1).

##### 2) 각 군의 표면에 5일 동안 증식된 세포수

각 군의 표면에서 5일 동안 배양되어 증식한 세포의 수는 2일의 표면에서 5일 동안 배양되어 증식한 세포의 수는 2일의 결과와 마찬가지로 음성대조군에서 가장 높게 나타났으며, 제2실험군, 제1실험군, 양성대조군의 순으로

로 감소되었다(Table 2). 각 군간 통계학적 비교에서 양성대조군에 비해 양 실험군 모두 유의하게 높은 성장률을 나타내었으나( $p < 0.05$ ), 음성대조군과는 유의한 차이를 보이지 않았다( $P > 0.05$ )(Fig 2).

##### 3) 각 군의 표면에 9일 동안 증식된 세포수

각 군의 표면에서 9일 동안 배양되어 증식한 세포의 수는 음성대조군에서 가장 높게 나타났으며, 제1실험군, 제2실험군, 양성대조군의 순으로 감소되는 경향을 보였다(Table 3). 각 군간 통계학적 비교에서 양성대조군에 비해 양 실험군 모두 유의하게 높은 성장률을 나타내었으나( $P < 0.05$ ), 음성대조군과는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ )(Fig 3).

##### 4) 각 군의 표면에 배양된 골수세포의 증식의 추이(Fig 4)

제1실험군, 제2실험군, 그리고 음성대조군에서는 배양 2일 동안에 대부분의 세포가 부착되어 이 후 9일까지 높은 증식률로 증식하였다. 그러나 양성 대조군의 경우 배양 2일에 일

Table 1. Cell number of rat bone marrow cells cultured during 2 days( $\times 10^4$ 개)

	1st. Exp.	2nd. Exp.	Total Average	S.D.
T1	5.63	5.50	5.56 <sup>¶</sup>	0.70
T2	5.57	5.92	5.83 <sup>¶</sup>	0.67
PC	3.04	3.25	3.15	0.50
NC	6.30	6.37	6.34	0.46

T1 : 1st. test group,

T2 : 2nd. test group

PC : positive control group

NC : negative control group

S.D. : standard deviation

¶ : significantly different from PC( $p < 0.05$ )

† : significantly different from NC( $p < 0.05$ )

Table 2. Cell number of rat bone marrow cells cultured during 2 days( $\times 10^4$ 개)

	1st. Exp.	2nd. Exp.	Total Average	S.D.
T1	19.29	20.88	20.08 <sup>¶</sup>	1.32
T2	20.96	20.79	20.88 <sup>¶</sup>	1.91
PC	8.17	9.17	8.67	1.01
NC	22.83	21.35	22.09	2.36

T1 : 1st. test group,

T2 : 2nd. test group

PC : positive control group

NC : negative control group

S.D. : standard deviation

¶ : significantly different from PC( $p < 0.05$ )

† : significantly different from NC( $p < 0.05$ )

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from PC(p<0.05)

Fig 1. Number of rat bone marrow cells cultured for 2 day

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from PC(p<0.05)

Fig 2. Number of rat bone marrow cells cultured for 5 day

Table 3. Cell number of rat bone marrow cells cultured during 9 days( $\times 10^4$ 개)

	1st. Exp.	2nd. Exp.	Total Average	S.D.
T1	38.75	39.96	39.35 ¶	2.31
T2	40.92	37.38	39.15 ¶	3.04
PC	18.92	17.88	18.40	2.91
NC	42.49	41.39	41.94	3.48

T1 : 1st. test group,  
 T2 : 2nd. test group  
 PC : positive control group  
 NC : negative control group  
 S.D. : standard deviation  
 ¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from NC(p<0.05)

부의 세포가 부착에 실패하였으며 부착된 세포의 9일까지의 증식률 또한 실험군에 비해 저하되는 양상을 보였다.

제1, 2실험군은 공히 양성대조군에 비해 유의하게 높은 성장 양상을 보이고 있으나(P<0.05), 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 없는 성장 양상을 나타내었다(p>0.05). 제1 실험군과 제2실험군은 비슷한 양상의 성장 곡

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from PC(p<0.05)

Fig. 3. Number of rat bone marrow cells cultured for 9 day

선을 보이고 있으며, 양 구간에는 유의한 차이가 인정되지 않았다(p>0.05).

## 2. 사람의 치은 섬유아세포의 각 군별 배양 시간에 따른 세포수

### 1) 각 군의 표면에 2일 동안 부착된 세포 수

각 군의 표면에서 2일 동안 배양되어 부착된 세포의 수는 음성대조군, 제1실험군과 제2 실험군, 양성대조군의 순으로 감소되어 나타났다(Table 4), 각 구간 통학계적 비교에서

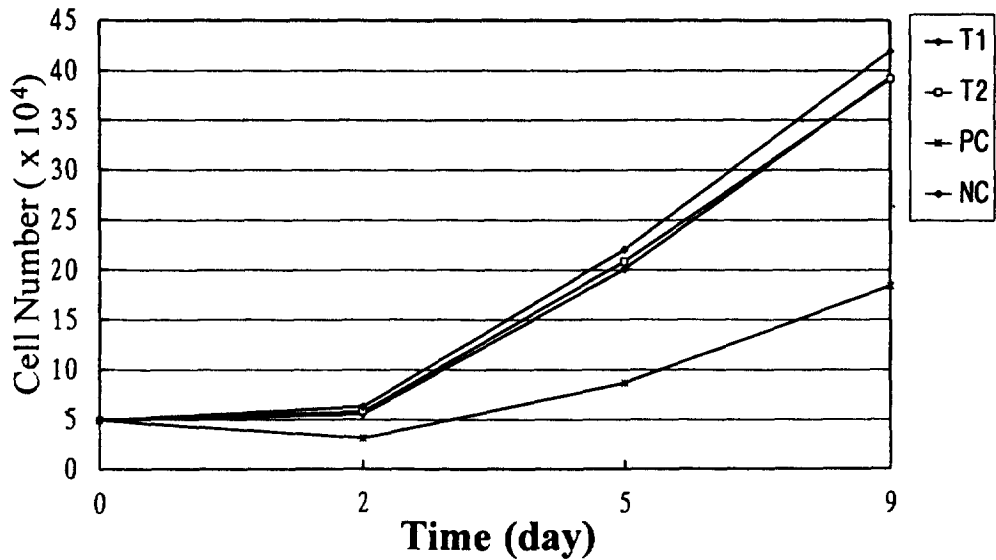


Fig 4. Growth curve of rat bone marrow cells on each group

Table 4. Cell number of human gingival fibroblasts cultured during 2 days( $\times 10^4$ 개)

	1st. Exp.	2nd. Exp.	Total Average	S.D.
T1	4.42	4.25	4.33 <sup>¶</sup>	0.65
T2	4.58	4.08	4.33 <sup>¶</sup>	0.63
PC	4.08	4.13	4.10	0.46
NC	4.82	5.10	4.96	0.48

T1 : 1st. test group,  
 T2 : 2nd. test group  
 PC : positive control group  
 NC : negative control group  
 S.D. : standard deviation

¶ : significantly different from PC( $p < 0.05$ )

† : significantly different from NC( $p < 0.05$ )

군간의 차이는 인정되지 않았다( $P > 0.05$ )(Fig. 5).

## 2) 각 군의 표면에 5일 동안 증식된 세포수

각 군의 표면에서 5일 동안 배양되어 증식한 세포의 수는 제1실험군에서 가장 높게 나

Table 5. Cell number of human gingival fibroblasts cultured during 5 days( $\times 10^4$ 개)

	1st. Exp.	2nd. Exp.	Total Average	S.D.
T1	8.79	8.71	8.75 <sup>¶</sup>	0.83
T2	6.79	9.63	8.21 <sup>¶</sup>	1.65
PC	6.08	6.83	6.46	1.10
NC	8.37	8.54	8.45	1.02

T1 : 1st. test group,  
 T2 : 2nd. test group  
 PC : positive control group  
 NC : negative control group  
 S.D. : standard deviation

¶ : significantly different from PC( $p < 0.05$ )

† : significantly different from NC( $p < 0.05$ )

타났으며, 음성대조군, 제2실험군, 양성대조군의 순으로 감소되어 나타났다(Table 5). 각 군간 통계학적 비교에서 양성대조군에 비해 양 실험군 모두 유의하게 높은 성장률을 나타내었으나( $p < 0.05$ ), 음성대조군에 비해서는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ )(Fig 6).

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from PC(p<0.05)

Fig. 5. Number of rat human gingival fibroblasts cultured for 2 days

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from PC(p<0.05)

Fig. 6. Number of human gingival fibroblasts cultured for 5 days

Table 6. Cell number of rat bone marrow cells cultured during 5 days( $\times 10^4$ 개)

	1st. Exp.	2nd. Exp.	Total Average	S.D.
T1	10.42	11.08	10.75 ¶†	1.48
T2	11.00	11.29	11.15 ¶†	1.46
PC	9.17	7.92	8.54	1.05
NC	12.57	13.19	12.88	1.28

T1 : 1st. test group,  
 T2 : 2nd. test group  
 PC : positive control group  
 NC : negative control group  
 S.D. : standard deviation

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from NC(p<0.05)

### 3) 각 군의 표면에 9일 동안 증식된 세포수

각 군의 표면에서 9일 동안 배양되어 증식한 세포의 수는 음성대조군에서 가장 높게 나타났으며, 제2실험군, 제1실험군, 양성대조군의 순으로 감소되는 경향을 보였다(Table 6). 각 군간 통계학적 검증에서 양 실험군 모두 양성대조군에 비해 유의하게 높은 성장률을 나타내었으며(p<0.05), 음성대조군과의 비교에서는

¶ : significantly different from PC(p<0.05)  
 † : significantly different from PC(p<0.05)

Fig. 7. Number of human gingival fibroblasts cultured for 9 days

유의하게 낮은 성장률을 보였다(p<0.05)(Fig 7).

### 4) 각 군의 표면에 배양된 섬유아세포의 증식의 추이(Fig 8).

모든 군에서 배양후 2일 동안 일부의 세포가 부착에 실패하는 경향을 보였으나, 이후 부착에 성공한 세포는 일정한 증식률을 보이며 9일까지 성장하였다. 그러나 양 실험군과 음성대조군은 모두 높은 증식률로 증식하는 반면, 양성대조군은 낮은 증식률을 보였다.



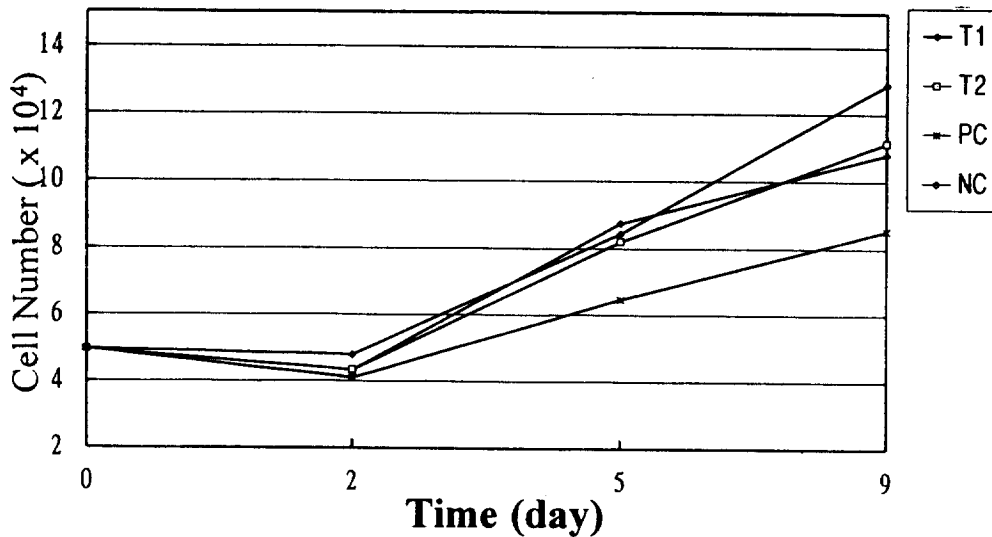


Fig. 8. Growth curve of human gingival fibroblasts on each group

제1, 2실험군은 공히 양성대조군에 비해 유의하게 높은 성장률을 보였으며( $p < 0.05$ ), 음성대조군과 비교시 유의한 차이가 없는 성장 양상을 나타내었다( $p > 0.05$ ). 2일 동안 배양하여 나타나는 부착된 세포수에서 음성대조군을 제외한 세 군에서는 초기 부착률이 저조하였으나 이후 정상적인 성장 양상으로 증식되는 경향을 나타내었다.

#### IV. 총괄 및 고찰

현재 임플란트 재료로서 주로 이용되고 있는 티타늄은 주기율표상에서 원자번호 22에 위치하며 47.9의 원자량을 갖는 금속이다. 화학적으로 순수한 티타늄은 공기중에서 연소되고 인체의 골과 가장 유사한 탄성률을 지니며, 공기와 접촉하는 즉시 표면에 금속산화막이 형성된다.<sup>3, 33</sup> 따라서 티타늄의 독특한 화학적 성질과 생물학적 특성은 금속 자체에 의한 것이라기 보다는 표면에 형성된 금속산화막의 특성에 의해서 결정된다고 할 수 있다.<sup>34</sup> 이러한 산화막으로 인해 티타늄은 부식에 대한 저항

성이 강하고 생체내에서 안정적인 상태를 유지하는 독특한 특성을 지나게 된다.<sup>35</sup> 순수 티타늄은 소량의 탄소, 산소, 질소, 철 등을 첨가하면 기계적 특성이 뚜렷하게 증진될 수 있으며, 시중에 판매되는 대부분의 순수 티타늄 제품에는 이러한 원소가 포함되어 있다.

한편 순수 티타늄은 여러 가지 다른 금속과 반응하여 합금을 형성할 수 있는데, 치과용 임플란트에서 가장 많이 사용되는 합금의 형태는 Ti-6Al-4V이다. 이 합금을 생체내에서 비교적 우수한 적합성을 가지며<sup>35</sup>, 순수 티타늄과 비슷한 양상의 골유착을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>. 순수 티타늄과 티타늄 합금의 표면에 형성되는 산화막은 근본적으로 동일한 TiO<sub>2</sub>의 화학적 구조를 가지며, 표면은 산소, 탄소, 질소 등의 원자에 의해 오염되어 있다는 점에서 비슷한 특성을 지닌다<sup>28</sup>. 그러나 Ti-6Al-4V합금의 표면에는 알루미늄이 존재하는 반면 순수 티타늄에는 반면 순수 티타늄( $\alpha$ 상)과 Ti-6Al-4V( $\alpha\beta$ 상)의 미세구조적 차이에 기인된다.<sup>37</sup> 일반적으로 세포 독성이 강한 것으로 알려진 바나듐은 Ti-6Al-4V의 표면에서

관찰되지 않아 티타늄 합금은 표면 구조 및 성분에서 동질성과 이질성을 동시에 지니므로 금속 표면의 특성이 세포 및 조직반응에 미치는 영향을 예측하기는 어렵다.

따라서 본 연구에서는 순수 티타늄과 티타늄 합금의 세포반응에 대한 영향의 차이를 구명하고자 순수 티타늄과 티타늄 합금을 실험군으로 코발트-크롬-몰리브덴 합금(Co-Cr-Mo 합금)을 양성대조군으로, 세포배양용 폴리스티렌 접시를 음성대조군으로 설정하였다. Co-Cr-Mo 합금은 1930년대 이래 정형외과 및 구강외과 영역의 매식재로서 이용되어 왔던 금속으로, 여러 학자들에 의해 재료 자체의 독성과 생체적합성이 연구되었다.<sup>16, 38-40)</sup> 일반적으로 Co-Cr-Mo 합금과 세포배양용 폴리스티렌 접시에 5일동안 골수세포의 증식률을 평가한 예비실험의 결과에서 세포배양용 폴리스티렌 접시에서 5배 이상의 증식률을 보여 각각을 양성대조군과 음성대조군으로 설정하였다.

이를 바탕으로 본 연구에서는 임플란트 재료의 조성이 골수세포와 치은 섬유아세포의 부착과 증식에 미치는 영향에 대하여 평가하였다. 골수세포는 생체내에서 임플란트의 골유착에 필수적인 역할을 담당하는 조골세포의 특성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>17, 18)</sup> 조골세포로서의 특성을 확인하는 조직학적·생화학적 기준으로 세포의 형태, 증식률과 분화율, 석회화물질의 형성능력, 제 1형의 교원질 합성능력, alkaline phosphatase의 활성화, 부갑상선 호르몬에 대한 세포의 반응, 그리고 osteocalcin의 합성 등을 들 수 있다<sup>17)</sup>. 본 연구에서는 백서 대퇴골의 골수로부터 세포를 배양하였으며, 이로부터 얻은 세포가 형태, 증식률, alkaline phosphatase의 활성화 및 석회화물질의 합성 등의 측면에서 조골세포로서의 특성을 지닌다는 사실은 이전의 연구에서 확인되었다.<sup>42)</sup> 한편 임플란트의 장기간의 유지와 성공에 필수적인 외부환경에 대한 장벽의 역

할을 담당하는 연결합조직의 반응이 중요한 요소이며, 그 중 치은 섬유아세포는 결합조직 부착에 의해 생물학적 장벽을 형성하는 기본적인 세포로 알려져 있다.<sup>12, 14)</sup> 따라서 본 연구에서는 티타늄을 기본으로 하는 임플란트 재료에 대한 골수세포와 치은 섬유아세포의 부착 및 증식률을 측정하여 생체적합성을 평가하는 한편, 임플란트의 골유착과 결합조직 부착의 가능성을 실험실적 연구를 통하여 평가하였다.

본 연구에서 조골세포와 치은 섬유아세포의 시간별 증식률은 순수 티타늄과 티타늄 합금이 Co-Cr-Mo 합금과 비교하여 유의하게 높은 양상을 나타내고 있어, 티타늄 금속이 Co-Cr-Mo합금에 비하여 우수한 생체적합성을 지니는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 티타늄 합금(Ti-6Al-4V)과 Co-Cr-Mo 합금이 사람의 조골 세포의 부착과 전개에 미치는 영향을 평가하여 티타늄 합금이 보다 우수한 세포반응을 보인다는 Shina등<sup>32)</sup> (1994)의 의견과 일치하고 있으며, 또한 여러 생체재료에 대한 섬유아세포의 부착률에 있어서 티타늄이 다른 생체재료에 비하여 유의하게 높다는 여러 연구들과 일치하고 있다.<sup>10, 11, 23, 24)</sup> 이렇게 티타늄 금속이 Co-Cr-Mo 합금에 비하여 우수한 생체적합성을 보이는 이유는 아마도 합금의 성분 자체가 갖는 세포적합성의 차이, 즉 세포독성을 지니는 이온의 방출<sup>37, 39, 40)</sup>과 표면 에너지에 따른 단백질 흡착성이 차이<sup>43)</sup>로 인하여 나타나는 것이라 사료된다. 그런데 본 연구에서는 2일간 배양된 사람의 치은 섬유아세포의 부착률이 음성대조군, 제1, 2실험군, 양성대조군의 순으로 나타났으나 군간의 통계학적으로 유의성은 없이 유의성이 인정된 골수세포의 결과와는 차이가 있었다. 이러한 결과는 아마도 치은 섬유아세포가 골수세포에 비해 배양면의 독성에 대한 민감성이 떨어지기 때문에 나타나는 것으로 판단된다.

Shina등(1994)<sup>32)</sup>은 티타늄 합금(Ti-6Al-

4V)과 세포배양용 폴리스티렌 접시에 12시간 동안 사람의 조골세포를 배양한 후 부착률을 평가하여 티타늄 합금이 세포 배양용 접시보다 유의하게 높은 부착률을 보인다고 보고하였다. 본 연구의 전체적인 세포의 성장곡선에서는 양 세포 모두 음성대조군으로 설정된 세포배양용 폴리스티렌 접시와 비교하여 순수 티타늄과 티타늄 합금에서의 성장양상이 우수하지는 않았으나 유의한 차이는 없는 비슷한 양상을 나타내고 있다. 이러한 결과는 티타늄 금속이 배양접시보다 우수한 세포반응을 야기한다는 Shina등(1994)<sup>32)</sup>의 보고와는 정확히 일치하지 않으나, 본 연구의 결과로부터 순수 티타늄과 티타늄 합금이 적절한 세포의 증식을 허용하는 세포배양용 접시에 필적하거나 보다 우수한 표면의 특성을 지닌다는 사실을 추론할 수 있다. 이러한 사실은 또한 Hambleton등(1994)<sup>44)</sup>이 티타늄을 비롯한 여러가지 임플란트 재료와 대조군으로 이용된 세포배양용 플라스틱 접시를 연골세포의 형태와 증식률, 단백질의 합성 및 alkaline phosphatase 활성도의 측면에서 비교하여, 티타늄만이 대조적으로 이용된 플라스틱 배양접시에서의 양상과 비교시 비슷하거나 우수한 세포반응을 야기한다고 보고한 연구결과에 의해 뒷받침되고 있다. 한편 Riccio등(1994)<sup>45)</sup>은 티타늄 합금, Co-Cr-Mo 합금, 폴리스티렌 배양용접시 등을 포함한 여러하여 실험에 이용된 모든 시편이 조골세포에 대하여 어떠한 유의한 억제 작용도 나타내지 않았다고 하였다. 이러한 연구 결과는 본 연구의 음성대조군에 대한 실험군의 비교 결과와는 일치하고 있으나, 양성대조군으로 이용된 Co-Cr-Mo 합금평가방에 대한 비교 결과와는 차이가 인정된다. 이러한 양상은 시편에 대한 세포반응의 평가방법에 있어서 세포의 형태와 생존율로 평가한 Riccio등(1994)의 방법과 본 연구의 시간별 증식률에 의한 평가방법의 차이에서 비롯된 것으로 판단된다.

본 연구에서는 또한 순수 티타늄과 티타늄

합금(Ti-6Al-4V)에 대한 골수세포와 치은 섬유아세포의 세포반응을 증식률의 측면에서 비교·평가하여 양 금속간에 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 인전의 실험실적 연구<sup>31)</sup>와 동물실험<sup>30, 46)</sup>의 결과와 대체로 일치하고 있으며, 이러한 결과를 근거로 합금 형태의 티타늄 또한 순수 티타늄과 비슷한 생체적합성을 지닌다는 사실을 짐작할 수 있다. Keller등(1994)<sup>31)</sup>은 순수 티타늄과 Ti-6Al-4V 합금을 표면의 성분과 구조, 시편에 대한 물의 접촉각, 그리고 산화막의 두께를 제외한 모든 분석에서 비슷한 양상을 보인다고 보고하였으며, 이러한 결과는 조골세포의 초기 부착률과 부착 형태에도 반영되어 양 금속간에 세포반응의 차이를 나타내지 않는다고 하였다. 그리고 Orr등(1992)<sup>30)</sup>은 생후 4주의 쥐를 이용한 실험에서 순수 티타늄과 티타늄 합금의 골계면에는 1 $\mu$ m이하의 얇은 부착층이 비슷하게 존재한다고 하였으며, 또한 임플란트 재료의 표면 구조에 있어서 양 금속간에 약간의 불분명한 차이는 있었으나 이들 금속에 대한 골의 반응은 매우 비슷한 양상을 보인다고 주장하였다. 한편 Therin등(1991)<sup>46)</sup>은 순수 티타늄과 여러 가지 티타늄 합금을 쥐의 근육내에 매식한 후 조직 계층학적 생체적합성을 평가한 결과, 순수 티타늄과 티타늄 합금의 생체적합성에는 유의한 차이가 없다고 하였다. 그러나 Johansson등(1989)<sup>29)</sup>은 순수 티타늄과 티타늄합금의 골계면에서 발생하는 조직반응의 차이점을 보고하여 본 연구의 실험실적 연구 결과와는 일치하지 않고 있다. 그들은 광학 현미경에 의한 관찰을 통해 티타늄 합금 표면의 계면에서 아직 조직화되지 않은 불안정한 교직골(woven bone)이 침착되는 반면, 순수 티타늄의 계면에서는 미세구조적 관찰을 통하여 티타늄 합금의 계면에서는 약 500-1000Å 두께의 교원질이 없는 당단백층(proteoglycan layer)이 존재하는 것을 확인하였으며, 200-400Å 두께를 보이는 순수 티타늄의 계면과 비교하여

약 2-3배에 달한다고 하였다. 그들은 양 금속의 조직반응 사이에 유의성있는 차이를 보고하고 있으나 이러한 차이가 지니는 의미에 대해서는 결론 내리지 못하였다.

본 연구의 결과에서 지점 논의되지는 않았지만 골수세포와 섬유아세포간의 전반적인 성장곡선을 비교하여 볼 때, 섬유아세포에 비해 골수세포의 성장률이 현격하게 높은 것을 알 수 있으며, 또한 Co-Cr-Mo 합금의 세포증식에 대한 저하효과가 골수세포에서 보다 현저히 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig 4, 8). 이러한 사실은 세포의 주기가 빠른 골수세포가 섬유아세포에 비해 세포의 외부환경에 보다 쉽게 영향을 받아서 나타나는 것으로 판단되며, 이러한 양상은 Naji 와 Harmand (1990)<sup>16)</sup>에 의해 확인된 바 있다.

결론적으로 순수 티타늄과 티타늄 합금은 모두 조골세포와 치은 섬유아세포에 대하여 우수한 세포적합성을 보이며, 순수 티타늄과 티타늄 합금의 세포반응은 유의한 차이가 없었다. 이러한 사실로 순수 티타늄과 티타늄 합금은 생체내에 매식되었을 때 임플란트 계면에 골유착 형성에 유리하리라 생각되며 또한 티타늄 금속에 대한 결합조직의 부착 및 증식의 가능성을 가지는 것으로 사료된다. 한편 본 실험에서의 결과와 여러 선학들의 연구를 종합하여 볼 때 티타늄은 구성에 따른 세포반응은 유의한 차이를 보이지 않으며, 최근에 대두되고 있는 금속 표면의 물리적 성상에 따른 세포반응은 유의한 차이를 보이지 않으며, 최근에 대두되고 있는 금속 표면의 물리적 성상에 따른 세포의 반응과 특성에 미치는 영향<sup>13, 47, 48)</sup>에 관심을 집중해야 한다고 판단된다.

임플란트의 새로운 개념은 임플란트의 표면의 특성에 따라 세포적 수준에서 다른 반응이 야기되며 결과적으로 임플란트 주위에서의 조직 반응 또는 다르게 나타난다는 사실의 인식에 있다. 그러나 아직 이러한 표면의 특성에 따른 여러 세포의 반응은 확립되어 있지 않

며 보다 지속적인 연구를 통하여 생체내에 적용하였을 때 특정 세포의 특성을 가장 잘 표현하며 또한 자극할 수 있는 임플란트 재료의 개발이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 임플란트 재료로서 널리 이용되는 순수 티타늄과 티타늄 합금에 대한 섬유아세포와 조골세포의 반응을 성장률의 측면에서 평가하는 한편, 티타늄 표면에 배양된 양 세포 사이의 성장양상을 비교하여 이상적인 임플란트 재료에 대한 기초적 자료를 얻기 위하여 시행하였다. 이를 위해 순수 티타늄을 제1 실험군으로, 티타늄 합금을 제2 실험군으로, Co-Cr-Mo 합금을 양성대조군으로 그리고 세포배양용 폴리스티렌 접시를 음성대조군으로 설정하였으며, 각 군에 대한 사람의 섬유아세포와 백서 골수세포의 증식률을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 순수 티타늄과 티타늄 합금상에 배양된 골수 세포는 Co-Cr-Mo 합금에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 부착률 및 증식률을 보였다( $P < 0.05$ )
2. 순수 티타늄과 티타늄 합금상에 배양된 골수 세포의 부착률 및 증식률은 세포배양용접시와 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ )
3. 순수 티타늄, 티타늄 합금, 그리고 세포배양용 접시에 배양된 골수세포는 초기 2일 동안에 대부분의 세포가 부착되어 이후 높은 증식률로 성장한 반면, Co-Cr-Mo 합금에서는 많은 세포가 초기 부착에 실패하였으며 다른 군에 비하여 낮은 증식률로 성장하였다.
4. 순수 티타늄과 티타늄 합금상에 배양된 치은 섬유아세포의 증식률은 Co-Cr-Mo 합금과 비교하여 제 2일에는 통계적

으로 유의한 차이가 없었으나( $p>0.05$ ), 제 5일과 9일에는 유의하게 낮은 증식률을 보였다( $p>0.05$ ).

5. 순수 티타늄과 티타늄 합금상에 배양된 치은 섬유아세포의 증식률은 세포배양용 접시와 비교하여 제 2일과 5일에는 통계적으로 유의한 차이가 없었으나( $p>0.05$ ), 제 9일에는 유의하게 낮은 증식률을 보였다( $p>0.05$ ).
6. 치은 섬유아세포는 모든 군에서 일부의 세포가 초기 부착에 실패되는 양상을 나타내었으나, 이 후의 성장양상에서는 순수 티타늄, 티타늄 합금, 그리고 세포배양용 접시군에서 Co-Cr-Mo 합금군에 비하여 유의하게 높은 증식률로 성장하였다.
7. 티타늄 합금상에 배양된 골수세포와 치은 섬유세포의 각 기간별 증식률은 순수 티타늄과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다( $p>0.05$ ).

결론적으로 순수 티타늄과 합금은 실험에 이용된 양 세포 모두에서 우수한 생체적합성을 보였으며 양 금속간에 생체적합성의 차이는 인정되지 않았다. 그리고 조골세포는 섬유아세포에 비하여 모든 실험군에서 높은 증식률을 보였으며 각 군에 대한 세포의 반응이 보다 민감하게 나타났다. 한편 생체적합성에 있어서 티타늄 금속의 조성은 큰 영향을 미치는 것은 않은 것으로 생각되며 표면의 변화에 따른 세포반응에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

### 참고문헌

1. Brånemark, P. I., Adell, R., Albrektsson, T., Lekholm, U., Lundkvist, S. and Rockler, B.: Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness.

Biomaterials, 4 : 25-28, 1983.

2. Adell, R., Eriksson, B., Lekholm, U., Brånemark, P. I. and Jemt, T.: A long term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. Int. J : Oral Maxifac. Implants, 5 : 347-358, 1990.
3. Parr, G. R., Gardner, L.K. and Toth R. W.: Titanium: The mystery of implant dentistry. Dental materials aspects. J. Prosthet. Dent., 54 : 410-414, 1985.
4. Melcher, A.H.: Summery of biological considerations. J. Dent. Educ., 52 : 812-814, 1988.
5. Kasemo, B. and Lausmaa, J.: Biomaterials and implant surfaces: A surface science approach. Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 3 : 247-259, 1988.
6. Natiella, J.R.: The use of animal models in research on dental implants. J. Dent. Educ., 52 : 792-797, 1988.
7. Brånemark, P.I.: Osseointegration and its experimental background. J. Prostho. Dent., 50 : 399-409, 1983.
8. Schroeder, A., van der Zypen, E., Stich, H., and Shutter, F.: The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. J. Maxillofac. Surg., 9 : 15-25, 1981.
9. Albrektsson, T., Jansson, T. and Lekholm, U.: Osseointegrated dental implants. Dent. Clin. North Am., 30 : 151-174, 1986.
10. Lowenberg, B.F., Pillar, R.M., Aubin, J.E., Fernie, G.R. and Melcher, A.H.: Migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to root slices, naked and porous-surfaced titanium alloy discs, and zircalloy 2 discs in vitro. J.

- Dent. Res., 66(5) : 1000–1005, 1987.
11. Guy, S.C., McQuade, M.J., Scheidt, M.J., Mcpherson, J.C., Rossmann, J.A. and Van Dyke, T.E.: In vitro attachment of human gingival fibroblasts to endosseous implant materials. *J. Periodontol.*, 64 : 542–546, 1993.
  12. Lavella, C.L., : Mucosal seal around endosseous dental implants. *J. Oral Implantol.*, 9 : 357, 1981.
  13. Cochran, D.L., Simpson, J., Weber, H. P., and Buser, D.: Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *J. Oral Maxillofac. Implants*, 9 : 289–297, 1994.
  14. Donley, T.G. and Gillette, W.B.: Titanium endosseous implant–soft tissue interface: A literature review. *J. Periodontol.*, 62 : 153–160, 1991.
  15. Matsuda, T. & Davies, J.E.: The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass. *Biomaterials*, 8 : 275–284, 1987.
  16. Naji, A. & Harmand, M.F.: Study of the effect of a Co–Cr–alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 24 : 86–71, 1990.
  17. Vrouwenvelder, W.C.A., Groot, C.G. and de Groot, K.: Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxyapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J. Biomed. Mater. Res.*, 27 : 465–474, 1993.
  18. Boyan, B.D., Schqartz, Z. and Hambleton, J.C. : Response of bone and cartilage cells to biomaterials in vivo and in vitro. *J. Oral Implantol.*, 19 : 116–122, 1993.
  19. Baumhammers, A., Langkamp, H.H., Matta, R.K. and Kilbury, K.: Scanning electron microscopy of epithelial cells grown on enamel, glass and implant materials. *J. Periodontol.*, 49 : 592–597, 1978.
  20. Gould, T.R.L., Brunett, D.M. and Westbury, L.: The attachment mechanisms of epithelial cells to titanium in vitro. *J. Periodont. Res.*, 16 : 611–616, 1981.
  21. Kasten, F.H. Solieau, K. and Meffert, R.M.: Quantitative evaluation of human gingival epithelial cell attachment to implant surfaces in vitro. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 10 : 69–79, 1990.
  22. Dmytryk, J.J., Fox, S.C., and Moriarty, J.D.: The effects of scaling titanium implant surfaces with metal and plastic instruments on cell attachment. *J. Periodontol.*, 61 : 491–496, 1990.
  23. Inoue, T., Cox, J.E., Pillar, R.M. and Melcher, A.H.: Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21 : 107–126, 1987.
  24. James, R.A.: Peri-implant considerations. *Dent. Clin. North Am.*, 24 : 415–420, 1980.
  25. Buser, D., Weber, H.P., Donath, K., Fiorellini, J.P., Paquette, D.W. and Williams, R.C. : Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J. Periodontol.*, 63 : 226–235 1992.
  26. Listgarten, M.A., Buser, D. and Steinemann, S.G.: Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva.

- J. Dent. Res., 71 : 364-371 1992.
27. Kurashina, K., de Lange, G.L., de Putter, C. and de Groot, K.: Reaction of surrounding gingiva to permucosal implants of dense hydroxyapatite in dogs. *Biomaterials*, 5 : 215 1984.
  28. Lausmaa, J., Ask, M., Rolander, U. and Kasemo, B.: Preparation and analysis of Ti and alloyed Ti surfaces used in the evaluation of biological response. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 110 : 647-653, 1989.
  29. Johansson, C., Lausmaa, J., Ask, M., Hansson, H.A. and Albrektsson, T.: Ultrastructural differences of the interface Zone between bone and Ti-6Al-4V or commercially pure Ti. *J. Biomed. Eng.*, 11 : 3-8, 1989.
  30. Orr, R. D., de Bruijn, J.D., and Davies, J. E.: Scanning electron microscopy of the bone interface with titanium, titanium alloy and hydroxyapatite. *Cells Mater.*, 2 : 241-245, 1992.
  31. Keller, J.C., Stanford, C.M., Wightman, J.P., Draughn, R.A. and Zaharias, R.: Characterizations of titanium implant surfaces. III. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28(8) : 939-946, 1994.
  32. Shina, R.K., Morris, F., Shah, S.A. and Tuan, R.S.: Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblast in vitro. *Clin. Orthop.* 305 : 258-272, 1994.
  33. Ong, J.L., Prince, C. W. and Lucas, L.C: Cellular response to well-characterized calcium phosphate coatings and titanium surfaces in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29(2) : 165-172, 1995.
  34. Kasemo, B.: Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *J. Protho. Dent.*, 49 : 832-837, 1983.
  35. Dion, I., Baquey, C., Monties, J.R. and Havlik, P.: Haemocompatibility of Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials*, 14 : 122-126, 1993.
  36. Katsikeris, N., Listrom, R.D., and Symington, J.M.: Interface between titanium-6, 4 alloy implants and bone. *Int. J. oral Maxillofac. Surg.*, 16 : 473-476, 1987.
  37. Maurer, A.M., Merritt, K. and Brown, S. A.: Cellular uptake of titanium and vanadium from addition of salts or fretting corrosion in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28 : 241-246, 1994.
  38. Arvidson, K., Cottler-Fox, M., Hammarlund, E. and Friberg, U.: Cytotoxic effects of Co-Cr alloys on fibroblasts derived from human gingiva. *Scand. J. Dent. Res.* 95 : 356-363, 1986.
  39. Maloney, W.J., Smith, R.L., Castro, F. and Schurman, D. J.: Fibroblast response to metallic debris in vitro. Enzyme induction cell proliferation, and toxicity. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 75 : 835-844, 1993.
  41. Amstein, C.F. and Hartman, P.A.: Adaptation of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge. *J. Clin. Microbiol.*, 2 : 46-54, 1975.
  42. 김석용, 권영혁, 박준봉: 백서 골수세포의 석회화 과정에 미치는 치은 섬유아세포의 영향. *대한치주과학회지*, 25(2) : 210-221, 1995.
  43. Baier, R.E., Meryer, A.E., and Natiella, J. R.: Surface properties determine

- bioadhesive outcomes : Methods and results. *J. Biomed. Mater. Res.*, 18 : 337 – 355, 1984.
44. Hambleton, J., Schwartz, Z., Khare, A., Windeler, S.W., Luna, M., Brooks, B.P., Dean, D.D. and Boyan, B.P.: Culture surfaces coated with various implant materials affect chondrocyte growth and metabolism. *J. Orthop. Res.*, 12(4) : 542 – 552, 1994.
45. Riccio, V., Della Ragione, F, Marrone, G., Palumbo, R., Guida, G. and Oliva, A.: Cultures of human embryonic osteoblasts. A new in vitro model for biocompatibility studies. *Clin. Orthop.*, 308 : 73 – 78, 1994.
46. Therin, M., Meunier, A. and Christel, P.: A histomorphometric comparison of the muscular tissue reaction to stainless steel, pure titanium and titanium alloy implant materials. *J. Mater. Sci.*, 2 : 1 – 8, 1991.
47. Thomas, K.A. & Cook, S.D.: An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J. Biomed. Mater. Res.*, 19 : 875 – 901, 1985.
48. Brunette, D.M.: The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 3 : 231 – 246, 1988.



## The Biocompatibility Of Cultured Bone Marrow Cells And Gingival Fibroblasts On The Titanium Surfaces

Choong - Young Oh, Joon - Bong Park, Young - Hyuk Kwon, Man - Sup Lee  
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Kyung - Hee University

The purpose of this study was to evaluate the response in aspect of attachment and growth rate of osteoblasts and growth rate of osteoblasts and human gingival fibroblasts to the commercially pure titanium (CP titanium) and titanium alloy (Ti-6Al-4V) that are used widely as implant materials, and to obtain the basic information to ideal implant materials. In the study, commercially pure titanium in first test group, titanium alloy (Ti-6Al-4V) in second test group, cobalt-chromium-molybdenum alloy (Co-Cr-Mo alloy) in positive control group, and tissue culture polystyrene plate in negative control group were used.

The results of this study were as follows :

1. Bone marrow cells cultured on CP titanium and Ti-6Al-4V showed significantly greater attachment and growth rate ( $p < 0.05$ ) compared to Co-Cr-Mo alloy in each time.
2. There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in attachment and growth rate of bone marrow cells cultured on CP titanium and Ti-6Al-4V or tissue culture plate.
3. Most bone marrow cells cultured on CP titanium, Ti-6Al-4V and tissue culture plate were attached well to each substratum in first 2 days, and then, grew at higher growth rate. On the other hand, some cells cultured on Co-Cr-Mo alloy failed to attach in first 2 days, and then, attached cells grew at lower growth rate than other groups.
4. Attachment and growth rates of gingival fibroblasts cultured on CP titanium and Ti-6Al-4V showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) compared to Co-Cr-Mo alloy in 2 days, but significantly greater increase ( $p < 0.05$ ) in 5 and 9 days.
5. There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between growth rates on gingival fibroblasts cultured on CP titanium, Ti-6Al-4V and tissue culture plate in 2 and 5 days, but a significant lower growth rate ( $p < 0.05$ ) on CP titanium and Ti-6Al-4V versus tissue culture plate.
6. Some gingival fibroblasts cultured on all specimen groups failed to attach, but attached cells grew well, especially on CP titanium, Ti-6Al-4V and tissue culture plate.

7. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between growth rates of both bone marrow cells and gingival fibroblasts cultured on CP titanium and Ti-6Al-4V.

As a result of this study, both commercially pure titanium and Ti-6Al-4V showed excellent biocompatibility and there was no significant difference in the cellular response to the both metals. Bone marrow cells cultured on each substratum showed significantly greater growth rate and responded sensitively to cytotoxic effects of metal surfaces compared to gingival fibroblasts. Considering cell response to the substrate, it was likely that the composition itself of titanium metals have no significant effect on the biocompatibility. Further study need to be done to evaluate the influence of surface characteristics on cellular responses.