

## Ti-Nb계 합금의 세포독성에 관한 연구

광주보건대학 치기공과  
박 효 병

[Abstract]

### A study on cytotoxicity of Ti-Nb alloys

Hyo-Byeong, Park

*Dept. of Dental Laboratory Technology, Kwangju Health college, 506-306*

The use of titanium alloys as biomaterials is increasing due to their superior biocompatibility and enhanced corrosion resistance compared to conventional stainless steels and cobalt-based alloys. Ti-6Al-4V ( $\alpha+\beta$  type) alloy instead of pure titanium ( $\alpha$  type) is being widely used as biomaterials has some characteristics such as high fatigue strength, tensile strength and corrosion resistance. It also has similar characteristics to Ti in inducing bony ingrowth. But it has been reported recently that the vanadium element expresses cytotoxicity and carcinogenicity and the aluminium element is related with dementia of Alzheimer type and neurotoxicity. In order to overcome their detrimental effects,  $\beta$ -phase stabilizer Nb was chosen in the present study.

CP-Ti(ASTM grade 2), Ti-3wt.%Nb( $\alpha$  type), Ti-20wt.%Nb ( $\alpha+\beta$  type) and Ti-40 wt.%Nb( $\beta$  type) alloys were melted by vacuum arc furnace. Biocompatibility of Ti-Nb alloys was evaluated by cytotoxicity test.

The results can be summarized as follows:

1. For the cytotoxicity test, Ti-Nb alloys showed excellent biocompatibility compared to CP Ti(ASTM grade 2), 316L STS and Co-Cr alloys.

• Key Words : Ti, Nb, Ti-Nb, Cytotoxicity

교신  
저자

•성명 : 박 효 병

•전화 : 062)958-7691

•E-mail : hbpark@www.kjhc.ac.kr

•주소 : 광주광역시 광산구 신창동 683-3 광주보건대학 치기공과

## I. 서론

근래에 Ti 합금에 대한 생체재료로 적합함이 알려지면서 골절된 뼈의 접합이나 손상된 무릎의 인공관절 및 인공장기, 인공치아 등과 같은 인공대체물의 사용량은 증가하고 있다. 그 동안 생체용 재료로 이용되는 오스테나이트계 18Cr-8Ni 스테인레스 강, Co-Cr계 합금 등은 염소이온에 대한 내식성이 좋지 못하며, Co, Cr 등의 금속원소 이온의 용출로 인해 인체에 유해성이 있는 것으로 알려졌다. 또한 기계적 강도가 우수한 Ti-6Al-4V합금은 V이 세포독성 및 발암성 문제, Al이 알츠하이머형 치매와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고 되었으며(Okazaki et al, 1995, Ahmed et al, 1995, Steinemann 1980, Landsberg 1992, Yumoto et al, 1992, Farrar et al 1990, Ratner et al, 1996), Davidson에 의해 V의 유해성과 Al의 신경계 독성 가능성에 대한 문제점이 제기되었다. (Davidson et al, 1994)

생체용 금속재료 개발에는 기계적 특성 및 생체 적합성, 동물실험과 최종적으로 인체실험을 통한 인체적합성을 검증 받아야 함으로 오랜 시간과 막대한 연구비가 소요될 뿐만 아니라 고도의 기술 축적과 고가의 장비가 소요된다.

그러므로 현재 국내에서 사용되는 생체용 Ti 및 Ti 합금은 Ti의 용해, 주조, 가공이 어려워 소재를 전량 수입하여 screw나 plate 부품들을 가공하여 사용하는 단계이며, 일부 대학의 Ti 연구 역시 Al, V의 문제점이 알려진 기존의 Ti-6Al-4V 합금에 열처리를 통한 조직 변화 및 기계적 성질에 대한 연구나(조 등: 1994, 이 등:1991, 조 등: 1998) CP

Ti에 수산화아파타이트(hydroxyapatite)를 이용한 표면개질로 골과의 결합력을 증진시키고자 하는 연구가 주로 진행되었다. 그러나 금속모체와 수산화아파타이트의 박리현상이 문제점으로 지적되고 있다.(박 등, 2000; 신 등, 2001)

따라서 본 연구에서는 CP Ti(ASM grade 2)에  $\beta$ 형 안정화 원소인 Nb을 첨가하여  $\alpha$ 형(Ti+3wt.%Nb),  $\alpha+\beta$ 형(Ti+20wt.%Nb) 및  $\beta$ 형(Ti+40wt.%Nb) Ti-Nb계 합금을 제작하였으며, 기존에 생체용 재료로 이용되고 있는 CP Ti, 316L 및 Co-Cr합금과 비교, 분석하여 인체에 유해한 Al과 V이 포함되지 않은 Ti-Nb계 합금이 생체용 재료로서 적합한지에 대한 연구를 하였다.

## II. 실험 방법

### 1. 실험재료

시험 시편으로는 본 실험을 위하여 제작된 CP Ti, Ti-Nb계 합금과 대조군을 포함하여 9가지의 금속을 직경 5mm×높이 5mm의 원통형으로 3개씩 방전가공하여 제작하였다. 대조군 종류로는 양성 대조군으로 Fe 금속을 사용하였고 음성대조군은 현재 생체용 재료로 이용되는 316L과 Co-Cr계 합금 및 다른 시편과 동일한 조건에서 금속시편을 집어넣지 않은 배양접시에 세포를 배양시킨 대조군을 포함하여 총 4종류를 이용하였다.

균일한 크기로 방전가공 된 시편의 불순물을 제거하기 위하여 SiC 연마지를 이용하여 습식 연마하고 소독용 알콜로 세척한 후 vapour steam damp로 각각 포장하여 멸균소독(121°C, 15기압, 20min)을 시행하였으며 처리된 금속시편들은

오염방지를 위해서 Ti 포셋만을 이용하였다.

Ti-Nb계 합금은 각각의 조성을 무게 비(wt%)로 칭량한 후 비소모성 진공아크용해로의 수냉동(Cu)하스(hearth)에 장입하여  $10^{-3}$  torr의 진공분위기를 형성한 후 정제된 아르곤가스를 챔버에 충전하고, 다시 진공을 유지하는 방법으로 챔버 내의 분위기를 아르곤 가스 분위기를 하였다.

또한 챔버 내에 존재하는 산소를 최소화하기 위하여 합금 용해 시 시료를 용해하기 전에 스폰지 상 Ti을 용해하여 잔존하는 산소량을 최소화하였다. 그 후 합금의 균질한 용해를 위하여 텅스텐 전극봉을 회전시켜 시편을 6회 반복하여 용해하고 용해 전과 후의 중량차가 0.1% 이하인 것만을 선택하여 실험을 수행하였다.

## 2. 시편추출액의 준비

시편으로 제작된 CP Ti 및 Ti-Nb계 합금과 기존에 이용되는 생체용 합금인 STS 316L, Co-Cr계 합금과의 세포독성을 비교하기 위하여 동일한 크기로 제작한 시편을 무혈청 배지에 담구어 37°C 배양기에서 15일 동안 보관하였다. 그 후 시편을 제거하고 금속이온이 용출된 추출 용액에 세포를 배양시키는 간접 세포독성실험(indirect method)을 수행하였다.

## 3. 세포분리 및 배양

본 연구에서는 L929 섬유아세포(fibroblast)의 세포독성을 관찰하였다. 세포는 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 가스조건의 배양기에서 배양하였고 세포가 80% 정도 증식되면 이를

단세포하여 세포수를 측정하였다. 조직배양용 폴리스틸렌 접시(96-well plate)의 각 well에  $2 \times 10^4$  cell을 분주하고 각 추출 희석액을 100 $\mu$ l 씩 첨가하였다. 이렇게 추출액에 노출한 세포를 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양하였다. 대조군으로는 신선한 배양액에 노출된 L929 세포를 이용하였다.

## 4. MTT assay

추출 희석액에 노출된 세포에 Methylthiazolotetrazolium(MTT:Sigma,USA)를 처리하여 2~4시간 배양한 후 570nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 측정하였다. 이는 세포의 mitochondria innermembrane의 succinate dehydrogenase의 활성도를 측정하여 생존 세포의 선택적인 활성을 보라빛의 침전형성을 통하여 분석하는 방법으로 세포 생존율을 측정하여 시편의 독성을 검사하였다. 48시간동안 배양된 세포에 MTT 용액을 처리하고 4시간 동안 동일한 환경에서 배양하였다. 이 과정은 빛을 차단하여 MTT 처리효과를 증대하고 배양 후 세포배양 상층액을 제거하여 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가한 후 Glycine buffer를 첨가하여 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 비교 분석하였다.

# Ⅲ. 실험 결과 및 고찰

## 1. 세포형태학적 특성

CP Ti과 Ti-Nb계 합금의 생체 적합성을 검토하기 위하여 세포배양실험을 통하여 평가하였다. 그림 1은 생체에 미치는 영향을 관찰하기 위하여

세포배양액에 시편에서 추출한 액을 노출하여 48시간 배양시킨 후 위상차 현미경 (inverted microscope)을 이용하여 세포의 형태학적 변화를 관찰한 것이다. 그림에서 (a)는 control의 경우로 세포자체만을 배양한 것이고, (b)는 임플란트로 널리 이용되고 있는 CP Ti이며, c), d), e)는 본 연구의 합금조성이다. 또 (f)와 (g)는 뼈의 플레이트 등 생체재료로 이용되고 있는 316L과 Co-Cr에 대한 것이고 (h)는 순수 Fe로 기존재료와의 비교를 위해 시험한 것이다. 그림에서 시편 추출액을 처리하지 않은 대조군의 경우 세포배양용 폴리스티렌 접시는 고도로 수산화된 표면구조와 높은 표면에너지를 가져 적절한 세포 성장을 가능하게 하는 특징이 있어 활성화되지 않은 구형의 세포양상을 나타내었으며, CP Ti의 경우 세포의 형태 및 생존에 의미 있는 차이를 나타내지 않았으며 다소 활성화된 마름모 및 다각형의 양상을 나타내었다. Ti-Nb계 합금 추출액 처리군에서도 세포는 활성화 된 다각형의 세포독성을 나타내었으나 대조군과 거의 유사한 세포형태를

나타내었다. 현재 생체재료로 많이 사용되는 316L의 경우 세포가 추출액에 존재하는 미세입자에 대한 거부반응을 하고 있는 것과 같은 양상을 나타내었으며 많은 세포가 괴사가 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. Co-Cr 합금의 추출액 처리군에서도 미세한 세포의 괴사를 관찰할 수 있는데 이러한 결과는 성분 중 Co가 주된 세포독성을 야기 시키고 Ti에 비해 높은 독성을 가진다는 보고와 일치하는 내용이다(오 등: 1998). 또한 Fe의 경우 시편 추출액을 준비하는 과정에서 이미 15일간의 soaking만으로 갈색의 녹을 형성하며 침전을 이루었다. 이러한 Fe 추출액을 처리한 결과 대부분의 세포가 손상을 받아 생존하지 못하고 괴사되고 있는데 이는 Fe이 체내에 존재할 경우 상당한 세포독성을 나타낼 것임 추정할 수 있는 증거이다. 이 결과로 본 연구에서 조사된 Ti-Nb계 합금의 경우 기존의 생체용 금속재료에 비하여 비교적 우수한 세포안정성을 가지고 있다고 생각된다.

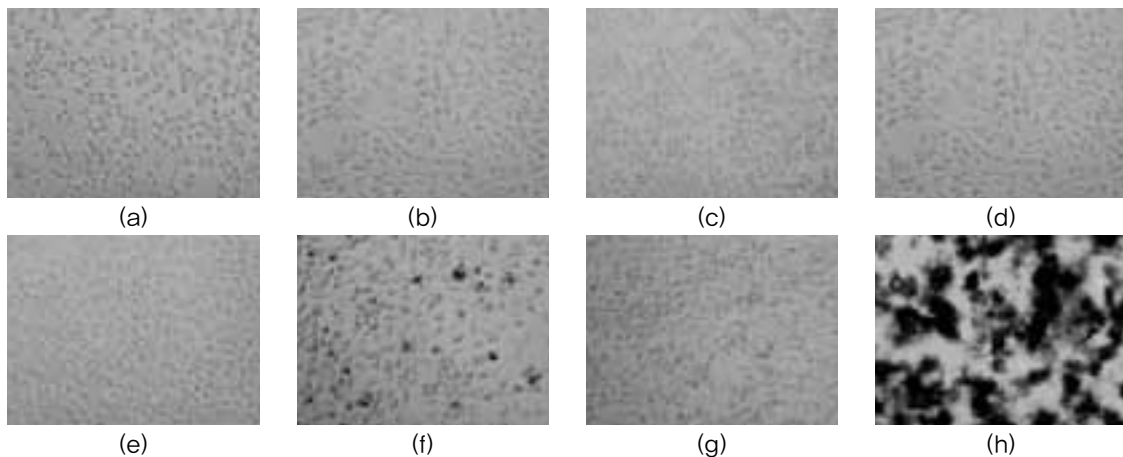


Figure 1. Morphological cell change as a function of the specimen extractions : a) Control, b) P Ti, c) Ti-3Nb, d) Ti-20Nb, e) Ti-40Nb, f) 316L, g) Co-Cr and h) Fe.

## 2. MTT assay에 의한 세포 생존율

그림 2는 시편 추출액을 처리한 세포의 생존율은 MTT를 처리하여 세포의 Mitochondria Innermembrane에 존재하는 Succinate dehydrogenase의 활성도를 측정하여 세포의 생존율을 비교한 결과이다. 신선한 배지에서 배양한 대조군을 Optical density 측정결과 96%의 세포 생존율을 나타내었으며, CP-Ti은 89%, Ti-3Nb계 합금은 93%, Ti-20Nb계 합금은 94%, Ti-40Nb계 합금은 95%의 생존율로 거의 대조군과 같은 우수한 생존율을 보였다. 그러나 316L의 경우 60%의 생존율을 보였으며 Co-Cr 경우 51%의 낮은 세포생존율을 나타내어 형태학적 소견과 동일한 결과로 48시간의 자극에서도 세포의 생존율에 영향을 주고 있음을 알 수 있었으며, Fe의 경우 심각한 녹을 형성하여 흡광도 측정이 불가능하였다. 이러한 결과로 Ti-Nb계 합금이 기존 생체재료로 사용되는 다양한 생체용 금속재료보다 세포안정성이 높음을 알 수 있으며, Ti-Nb계 합금을 생체 내에 이식할 경우 골 유착 형성에 유리하리라 생각되며 금속에 대한 결합조직의 부착 및 증식 가능성이 있는 것으로 생각된다.

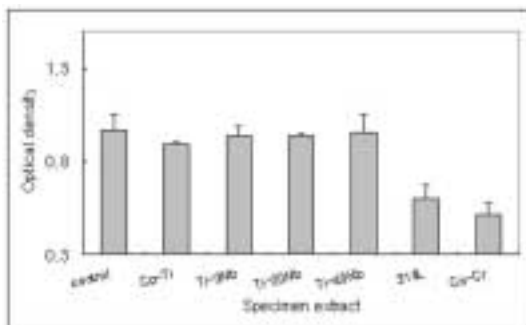


Figure 2. Cytotoxicity by MTT assay

## IV. 결 론

CP Ti에 Nb을 첨가하여 Ti-Nb계 합금의 세포독성을 실험 결과, Nb이 첨가된 합금의 경우 기준에 사용 중인 생체용 금속재료에 비하여 비교적 우수한 세포안정성을 나타냈다.

## 참 고 문 헌

- 박은진, 김도균, 김교한, Takao Hanawa, 김형일, 정용수. Ti-6Al-4V합금의 표면개질에 의한 calcium phosphate의 형성, 대한치과기재학회지, 27(1), 43, 2000.
- 신지훈, 이규환, 이창희. 생체용 Ti합금의 생체활성 표면개질에 관한 연구, J Kor Inst. Met. & Mater., 39, 2, 206, 2001.
- 오근택, 김철생, 강근, 박용수. 생체용 초내식성 스테인리스강(S32050)의 생체적합성, Biomaterials Research, 2(4), 170, 1998.
- 이종수, 김성주, 배기만. 티타늄합금의 기계적 및 물리적 성질에 대한 기초연구, KOSEF 893-0608-005-2, 1991.
- 조용성, 장우길, 김상식, 서성문, 최승주. Ti-6Al-4V합금의 가공열처리조건에 따른 기계적 특성의 변화(I) : 인장 및 파괴 거동, 대한금속학회지, 36, 12, 2043, 1998.
- 조형준, 이준희, 이상윤. Ti-6Al-4V합금의 결정립 성장 및 용체화처리에 의한 상의

- 미세조직 변화, 대한금속학회지, 32, 12, 1467, 1994.
- Ahmed T, Long M, Silvestri J, Ruiz C, Rack HJ. A new modulus, biocompatible titanium alloy, Titanium 95 science and technology, 2, 1760, 1995.
- Davidson, J. A., Mishra, A. K. and Poggie, R. A. New surface hardened, low modulus, corrosion-resistant Ti-13Zr-13Nb alloy for total hip arthroplasty, Biomed. Mat. Eng., 4, 231, 1994.
- Farrar G. et al. Defective Gallium-transferrin binding in Alzheimer disease and Down syndrome, possible mechanism for accumulation of aluminum in brain, Lancet, 335, 747, 1990.
- Landsberg JP, McDonald B. and watt F. Absence of Aluminum in neurotic plaque cores in Alzheimer's disease, Nature (London), 360, 65, 1992.
- Okazaki Y, Kyo K, Ito Y, Tateishi T. Effect of Mo and Pd on corrosion resistance of V-free titanium alloys for medical implantation. J. Japan Inst. Metals 59, 10, 1061, 1995.
- Ratner, Hoffman, Schoen, Lemons, Biomaterials science, academic Press, 1996
- Steinemann SG. Corrosion of Surgical Implants in-vivo and on-vitro Tests, Evaluation of Biomaterials, John Wiley & Sons Ltd., 1, 1980.
- Yumoto S. et al. Aluminum neurotoxicity in the rat brain, International Journal of PIXE, World scientific Publishing Company, 2, 4, 493, 1992.