

전기도금한 교정용 스테인레스스틸 선재의 세포독성에 관한 연구

이계형^a · 조진형^b · 이기현^c · 황현식^d

본 연구는 전기도금을 이용하여 교정용 스테인레스스틸 선재의 직경을 증가시킨 후 세포독성을 알아봄으로써 이의 임상적 적용 가능성을 알아보고자 시행되었다. 시판되고 있는 교정용 스테인레스스틸 선재에 전기도금 방법을 이용하여 니켈을 도금한 후, 이를 도금하지 않은 교정용 스테인레스스틸 선재 그리고 티타늄 또는 구리와 비교하기 위하여 이들을 배지에 넣고 72시간 배양하였다. 이 배양액을 금속 유리량 측정을 위해 ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer) 분석을 시행한 결과 전기도금한 선재에서 많은 양의 니켈 이온이 유리되었으며, 구리에서는 많은 양의 구리 이온이 유리되었다. Microplate에 Balb/c 3T3 mouse fibroblast를 넣고 각 선재를 배양한 배양액을 75%, 50%, 25%로 희석시켜 첨가한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석을 시행하여 이를 배지만을 첨가한 경우와 흡광도를 비교하였다. 티타늄은 모든 농도에서 배지만을 첨가한 경우에 비해 흡광도 차이를 보이지 않았지만 전기도금한 선재 ($p < 0.001$), 스테인레스스틸 선재 ($p < 0.05$), 구리 ($p < 0.001$) 는 배지만을 첨가한 경우보다 통계적으로 유의한 흡광도 감소를 보였다. ISO 10993, part 5에 따라 구리는 “강한 독성”을 보이는 반면 티타늄과 스테인레스스틸 선재는 “무독성”, 그리고 전기도금 선재는 “중등도 독성”으로 나타났다. 이상의 결과는 전기도금을 이용하여 교정용 선재의 직경을 증가시키는 방법이 임상에 적용되기 위해서는 세포독성을 줄이기 위한 추가의 연구가 필요함을 시사하였다.

(주요 단어: 전기도금, 교정용 스테인레스스틸 선재, 세포독성)

서 론

교정치료 시 필수적 재료인 교정용 선재는 금 합금과 스테인레스스틸 이후 TMA, Ni-Ti 등 지속적인

힘과 형상기억 효과가 있는 재료로 계속 개발되고 있다.^{1,2} 교정치료 시 여러 개의 교정용 선재가 교환 적용되는데 가는 호선에서 굵은 호선으로의 교환이 주를 이루고 있다. 이때 형태는 동일하나 직경만 증가시키기 위하여 새로운 호선으로 교환해야 할 경우가 있는데 이전의 호선과 완전히 동일한 형태의 호선 제작은 불가능하며 이에 따라 치아의 불필요한 이동이 불가피하게 나타나서 치근흡수나 치료기간 증가의 원인이 될 수 있다. 이러한 부작용을 방지하기 위한 한 방법으로 조 등³은 기존의 가는 호선을 그대로 이용하여 형태는 동일하나 그 굵기가 굵은 호선을 얻기

^a 대학원생, ^b 임상강사, 전남대학교 치과대학 교정학교실.

^c 조교수, ^d 교수, 전남대학교 치의학연구소, 치과대학 교정학교실.

교신저자: 황현식

광주광역시 동구 학동 8번지

전남대학교병원 치과 교정과 / 062-220-5486

hhwang@chonnam.ac.kr

원고접수일: 2004년 6월 15일 / 원고최종수정일: 2004년 12월 27

일 / 원고채택일: 2005년 1월 8일

Table 1. Grouping of samples

Classification	Group
Commercial 0.018 inch stainless steel wire	SS
Electroplated wire (0.016 to 0.018 inch)	EP
Titanium	Titanium
Copper	Copper

위해 도금이라는 방법을 처음으로 시도하였다. 조 등³은 시판되고 있는 교정용 스테인레스스틸 선재에 니켈을 전기도금하여 0.016 인치 원형선재를 0.018 인치로 증가시켰으며 이후 이 등⁴은 동일한 방법을 이용하여 0.016 × 0.016 각형선재를 0.017 × 0.017로 증가시킬 수 있음을 발표하였다.

구강 내에서 장기간 사용하여야 하는 교정용 선재는 변색이나 부식이 없어야 하지만 교정치료가 시행되는 구강은 습한 환경으로 쉽게 부식을 초래할 수 있다. 부식에 의해 유리된 금속은 인체에 악영향을 미칠 수 있으며 실제 과민 반응⁵⁻⁸이나 범랑질의 영구 변색⁹ 등이 보고된 바 있다. 따라서 전기도금법으로 직경을 증가시키는 방법이 실제 임상에서 사용되기 위해서는 전기도금을 이용하여 직경을 증가시킨 선재에서 부식에 따른 금속 유리량을 알아보고, 이에 따른 세포독성에 대한 연구가 선결되어야 한다.

본 연구는 시판되고 있는 교정용 스테인레스스틸 선재에 전기도금 방법을 이용하여 니켈을 도금하여 직경을 증가시킨 후, 이를 도금하지 않은 스테인레스스틸 선재 그리고 티타늄 또는 구리와 세포독성을 비교 분석하여 전기도금의 임상적 이용 가능성 여부를 알아보고자 시행되었다.

연구재료 및 방법

연구재료

기존의 교정용 스테인레스스틸 선재 (0.018 인치) 군과 0.016 인치 교정용 스테인레스스틸 선재에 전기도금 방법을 이용하여 니켈을 도금하여 0.002 인치의 직경이 증가된 군, 그리고 negative control 선재로 티타늄, positive control 선재로 구리 등 모두 4군을 본 연구의 재료로 사용하였다 (Table 1).

교정용 스테인레스스틸 선재와 전기도금한 선재는

Table 2. Composition of electroplating solution and plating conditions

Electroplating composition (g/L)	
Nickel sulfate (NiSO ₄ · 6H ₂ O)	100
Nickel chloride (NiCl ₂ · 6H ₂ O)	60
Boric acid (HBO ₃)	30
Ammonium chloride (NH ₄ Cl)	50
Condition	
Voltage (V)	1.7
Temperature (°C)	25-29
pH	3.1-3.3

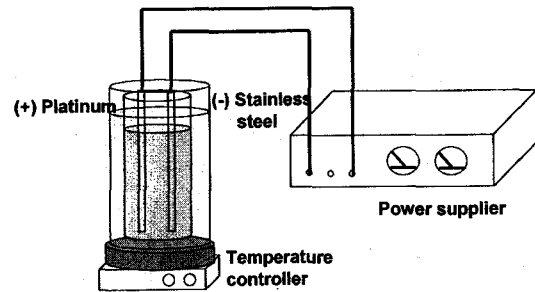


Fig 1. Schematic diagram of electroplating unit.

10 mm 길이로 절단하여 사용하였으며, 티타늄과 구리는 표면적이 동일하게끔 별도로 가공하여 사용하였다.

본 실험에서는 전기도금을 통한 직경 증가를 위해 0.016 인치 스테인레스스틸계 (Tru-Chrome®, Rocky Mountain Orthodontics, Denver, USA) 의 원형선재를 사용하였다.

선재와 도금금속 사이의 기계적 결합력을 증진시키기 위해 sandblaster (Microetcher II, Danville Engineering Inc., San Ramon, USA) 를 사용하였다.^{10,11} Sandblasting을 시행한 후 n-헥산과 99.9% 에탄올에 각각 침적 수세한 다음 화학적 결합력 증진을 위해 50-60°C의 PdCl₂ 용액 (1 g/L PdCl₂ + 1 ml/L HCl) 에 5초간 침적 수세하였다.¹⁰⁻¹²

전처리한 시편을 Table 2의 조건을 만족하는 전기도금 수조를 이용하여 직경이 0.018 인치로 0.002인치 (0.052 mm) 가 증가할 때까지 전기도금을 시행하였다.

직경 증가는 0.001 mm까지 측정 가능한 디지털 마

이크로미터 (Mitutoyo, Kanakawa, Japan) 를 이용하여 계측 확인하였다 (Fig 1).

전기도금된 시편은 선재와 도금층간의 밀착성을 증진시키기 위해 400°C 온도의 전기로에서 10분간 열처리를 시행하였다.^{13,14}

연구방법

본 실험을 위해 Balb/c 3T3 mouse fibroblast (CCL 163, clone A31, American Type Culture Collection) 를 사용하였다. Penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 mg/mL), 2 mmol/L L-glutamine, 5% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Paisley, UK) 을 첨가한 배지에서 상기 세포를 배양하였다.

선재들을 phosphate-buffered saline (pH 7.4) 에서 30분간 초음파 세척을 시행한 후 증류수에 씻어내고, 70% 에탄올에서 5분간 세척하고 다시 증류수에 씻어낸 후 아세톤에서 10분간 세척하고 증류수에서 씻어낸 후 건조시켰다.

이 선재들을 10 cm의 petri dish의 중앙에 위치시키고 배지를 첨가한 후 37°C에서 72시간 배양하였다. 배지의 부피는 시편 표면적에 대하여 1.25 ml/cm²로 하였다. 배양 후 배양액은 -20°C에서 얼린 상태로 보관하였다. 세포 독성실험에서 배양액의 농도에 따른 반응을 알아보기 위해 각 선재를 넣고 72시간 배양한 배양액을 각각 75%, 50%, 25%로 희석되도록 고정된 plate에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 기압으로 이산화탄소 배양기 (CO₂ incubator, II-X, Thermo Forma, Marietta, OH, USA) 에서 72시간 배양하였다.

희석시키지 않은 원액을 이용하여 금속 유리도를 유도 결합 플라즈마 원자 방출 분광기 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer: ICP-AES, ICP-1000III, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) 를 사용하여 조사하였다.¹⁵

무균 상자 (Clean bench, Hanwoo CB, Hanwoo Scientific, Seoul, Korea) 내에서 Balb/c 3T3 mouse fibroblast를 microtiter plate (96-well plate, 353047, Becton Dickinson labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 에 10⁴ cells/ml 농도로 준비하였다. 96-well plate 각각의 microtiter 마다 50 µl cell suspension 당 6 × 10³개의 세포들을 넣고 선재를 배양한 배양액을 희석시켜 각각 150 µl씩 첨가한 후 다시 72시간 동안 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 이때 세포의 변화를 역상 현미경 (Inverted microscope, Nikon

TMS, Nikon, Tokyo, Japan) 으로 촬영하였다.

시편은 각각 선재 군별로 75%, 50%, 25% 농도마다 12개씩 제작하였으며, 흡광도 감소를 비교하기 위해 배지만을 첨가한 군도 12개 제작하였다.

그 후 plate의 각 well에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg MTT/ml phosphate-buffered saline) (Sigma, St. Louis, USA) 을 20 µl씩 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂ 기압 하에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다.¹⁶

배양 종료 시 plate를 원심분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 배지를 30 µl 정도만 남기고 multidispenser를 이용하여 모두 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위해 acid isopropanol (4% 1 mol/L HCl in 2-isopropanol) 을 100 µl씩 가한 후 formazan 결정이 녹을 수 있도록 15분간 가볍게 진탕해 주고 바로 96-well plate용 Multiskan EX (microplate reader, MR-1, Labsystems, Turku, Finland) 를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 군의 평균 흡광도는 배지만의 흡광도에 대해 각 군의 흡광도를 퍼센트로 계산하였다.

SAS (Statistical Analysis System) 통계 처리용 프로그램을 이용하여 기존의 스테인레스스틸 선재군과 전기도금 방법을 이용하여 스테인레스스틸 고정 선재에 니켈을 도금하여 0.002 인치의 직경을 증가시킨 군, 티타늄 군, 구리 군 각각의 흡광도 차이를 알아보기 위해 one sample *t*-test를 시행하였고, 각 선재별로 농도에 따른 흡광도 변화를 알아보기 위해 one way ANOVA test를 시행하였다. 또, ISO 10993, part 5¹⁷에 따라 각 선재의 세포 독성도를 판단하였다.

연구성적

금속 유리량

ICP-AES로 각 선재의 금속 유리량을 검사한 결과 스테인레스스틸 선재군의 경우 코발트 이온이 0.01 mg/L, 망간 이온이 0.04 mg/L, 니켈 이온이 1.61 mg/L, 아연 이온이 0.02 mg/L 유리되었으며, 구리 이온은 검출되지 않았다. 전기도금한 선재군에서는 코발트 이온이 0.28 mg/L 유리되었으며, 구리, 망간, 아연 이온의 유리는 없었으나, 니켈 이온이 34.59 mg/L

Table 3. The ICP values measured for each wire (mg/L)

	Co	Cu	Mn	Ni	Zn
SS	0.01	-	0.04	1.61	0.02
EP	0.28	-	-	34.59	-
Titanium	-	-	-	-	0.01
Copper	-	133.63	-	-	-

- <0.01 mg/L.

Table 4. List of the MTT activity in percentage for each concentration of the eluates (means and standard deviations), and the significance level *p*

	75% eluate		50% eluate		25% eluate	
	Mean ± SD	<i>p</i> value [†]	Mean ± SD	<i>p</i> value	Mean ± SD	<i>p</i> value
SS	87.53 ± 16.37	0.023*	89.72 ± 12.62	0.017*	90.80 ± 12.07	0.023*
EP	35.21 ± 4.51	0.000***	37.32 ± 6.05	0.000***	40.07 ± 5.77	0.000***
Titanium	98.10 ± 12.60	0.611	99.61 ± 15.15	0.930	100.22 ± 13.38	0.955
Copper	7.64 ± 1.95	0.000***	8.94 ± 1.80	0.000***	9.09 ± 1.55	0.000***

[†]*p* value means the difference of MTT activity between each group and medium only; * *p* < 0.05; *** *p* < 0.001.

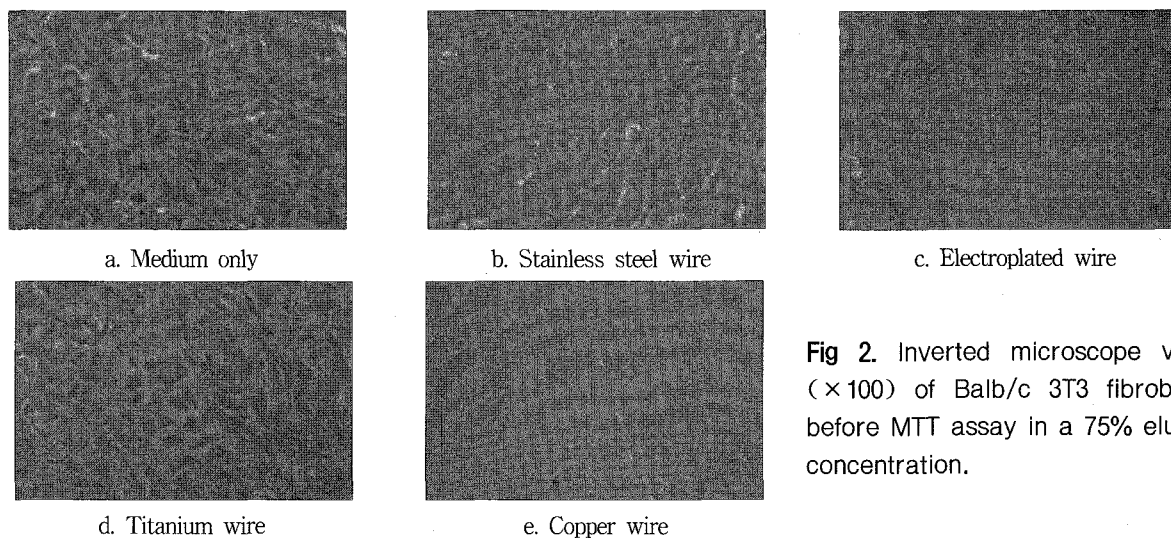


Fig 2. Inverted microscope view (×100) of Balb/c 3T3 fibroblast before MTT assay in a 75% eluate concentration.

나 유리되었다. 티타늄 선재군에서는 코발트, 구리, 망간, 니켈 이온의 유리는 없었으며, 아연 이온만 0.01 mg/L 유리되었다. 구리 선재군의 경우 코발트, 망간, 니켈, 아연 이온은 검출되지 않았으나, 133.63 mg/L의 구리 이온이 유리되었다 (Table 3).

역상 현미경 관찰 소견

각 배양액에 Balb/c 3T3 mouse fibroblast를 첨가한 후 세포 수 변화를 역상 현미경으로 관찰하여 배양액을 첨가하지 않고 배지만을 첨가한 경우와 비교

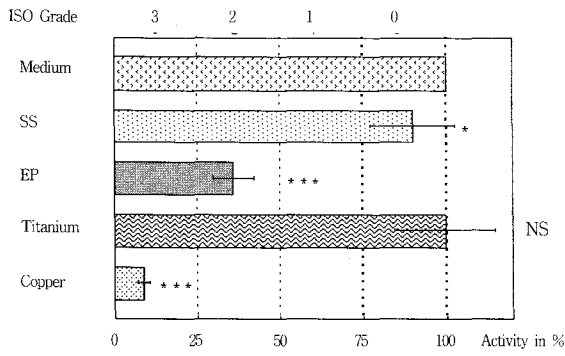


Fig 3. Comparison of the MTT activity and ISO classification after culturing in a 75% eluate concentration. *Medium*, Medium only; *SS*, commercial 0.018 inch stainless steel wire; *EP*, electroplated stainless steel wire. *NS*, not significant; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

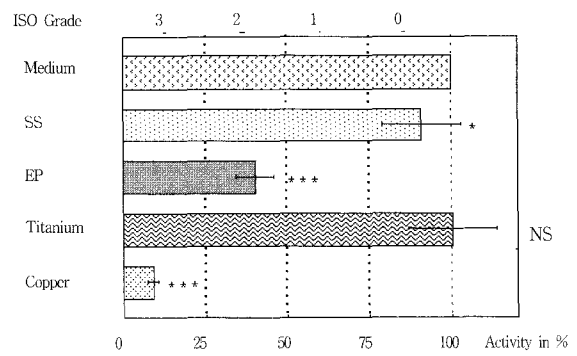


Fig 4. Comparison of the MTT activity and ISO classification after culturing in a 50% eluate concentration. *NS*, not significant; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

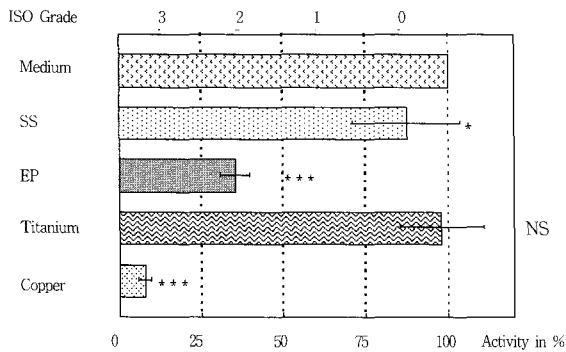


Fig 5. Comparison of the MTT activity and ISO classification after culturing in a 25% eluate concentration. *NS*, not significant; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

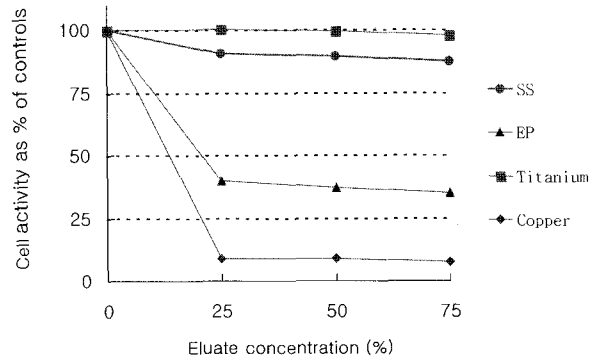


Fig 6. Dose dependent response of MTT activity of each group.

한 결과, 스테인레스스틸 선재군에서는 약간의 세포 수 감소를 보였으며, 전기도금한 선재군에서는 많은 양의 세포 수 감소를 보였다. 티타늄 선재군에서는 세포 수 차이를 보이지 않았으나, 구리 선재군에서는 매우 적은 세포 수를 보였다 (Fig 2).

각 선재의 MTT 검색

MTT 분석 결과 농도별 선재의 흡광도는 Table 4

와 같았다. 75%로 희석시킨 경우 티타늄의 흡광도는 98.10%로 배지만을 첨가한 경우에 비해 차이를 나타내지 않은 반면 나머지 세 군에서는 모두 통계적으로 유의한 흡광도 감소를 나타내었다. 스테인레스스틸 선재군은 흡광도가 87.53%로 비교적 적은 감소를 보인 반면 ($p < 0.05$) 전기도금한 선재군은 흡광도가 35.21%로 많은 감소를 보였다 ($p < 0.001$). 한편 negative control인 구리는 단지 7.64%의 흡광도만을 보였다.

ISO 10993, part 5¹⁷에 따라 각각 선재의 독성 정도를 평가한 결과 구리는 매우 “강한 세포독성”을 가진 반면, 티타늄, 스테인레스스틸 선재는 “무독성”을 그리고 전기도금한 선재군은 “중등도 세포독성”으로 나타났다 (Fig 3).

50%, 25%로 희석시킨 경우도 75%로 희석시킨 경

우와 유사한 결과를 보였다. 티타늄 선재군은 흡광도 변화가 거의 없었으며, 통계적으로도 유의한 차이가 없었다. 스테인레스스틸 선재군은 흡광도가 각각 89.72%, 90.80%로 감소하였으며, 통계적으로 유의한 감소를 보여주었다 ($p < 0.05$). 전기도금한 선재군은 흡광도가 각각 37.32%, 40.07%로 많이 감소하였으며, 통계적으로 유의한 감소가 있었다 ($p < 0.001$). 구리 선재군은 단지 7.64%, 9.09%의 흡광도만을 나타내었으며, 통계적으로도 유의한 감소를 보였다 ($p < 0.001$).

50%, 25%로 희석시킨 경우 ISO 10993, part 5¹⁷에 따른 세포독성 평가에서도 75%로 희석시킨 경우와 동일한 결과를 얻었다. 구리는 매우 “강한 세포독성”을 가진 반면, 티타늄, 스테인레스스틸 선재는 “무독성”을 그리고 전기도금한 선재군은 “중등도 세포독성”으로 나타났다 (Fig 4, 5).

각각 선재별로 희석액의 농도에 따른 흡광도의 차이를 알아본 결과, 모든 선재에서 희석액의 농도가 증가할수록 흡광도가 감소하였으나, 변화는 적었으며 통계적으로도 유의성이 없었다 (Fig 6).

총괄 및 고찰

도금은 금속 표면에 다른 금속피막을 입혀 금속의 부식을 방지하기 위한 목적으로 개발되었으며 전기도금, 화학도금, 용융도금, 진공도금, 침투도금 등 매우 다양한 방법이 소개된 바 있다.^{18,19} 그 동안 교정영역에서 도금은 주로 TiN 이온 도금을 이용 심미성이나 물성을 향상시키거나,²⁰⁻²⁵ oxygen과 nitrogen ion을 implantation시켜 마찰력을 감소시키고자²⁶ 행해졌다. 그렇지만 조 등³이 전기도금을 이용하여 0.016인치 원형선재를 0.018인치로 증가시킨 이후, 이 등⁴은 0.016×0.016 각형선재를 0.017×0.017 로 증가시킬 수 있음을 발표하였고, 김²⁷은 무전해도금을 이용하여 원형선재의 직경을 증가시킬 수 있다고 보고하여 교정영역에서 도금을 직경증가에 이용하는 길을 열었다. 이로써 동일한 형태에서 단지 직경만 증가시켜야 할 경우 이전 호선과의 동일한 형태의 호선제작이 가능해져 불필요한 치아이동과 치근흡수 등의 부작용을 방지할 수 있게 되었다. 새로운 치과 재료가 개발되면 우선 구강 내에서 일어날 수 있는 현상에 대한 기초 실험들 즉, 압축강도, 인장강도, 마모도 검사 등을 시행하여야 하며, 적절한 결과가 나오면 생체 안정성을 증명하는 과정이 필요하다. 본 연구는 전기도금을 이용하여 교정용 선재의 직경을 증가시킨 경우 세

포독성을 알아봄으로써 이의 임상적 적용 가능성을 알아보고자 시행되었다.

교정용 선재가 사용되는 구강 내는 온도, 타액의 양과 성질, 미생물, 음식물의 물리적·화학적 성질 등이 복합적으로 작용하여 여러 형태의 부식이 일어나며 이로 인한 금속 유리가 발생한다.²⁸ 여러 선학들에 의해 다양한 물리적 화학적 실험들을 통해 교정장치로부터의 금속 유리량이 측정된 바 있다. Park과 Shearer,²⁹ Barret 등³⁰은 고정식 모조교정장치로부터 니켈과 크롬의 유리량을 측정한 결과 음식물에 의한 1일 섭취량과 비교했을 때 매우 적은 양이라고 보고했으며, 국내에서도 박과 이,³¹ 김 등,²⁴ 류,³² 신³³ 등이 같은 결과를 보고하였다. 또한 Bishara 등³⁴은 실제 교정장치를 부착한 환자의 혈액내의 니켈 양을 측정하는 실험에서 혈액내 니켈의 증가는 보이지 않아 교정장치로 인한 금속 유리가 실제 체내에 유해하지 않음을 보고한 바 있다. 하지만 적은 유리량 일지라도 교정장치가 장기간 구강내에 위치하면 니켈에 대한 민감성이 증가되어 과민반응이 유발될 수 있다.³⁵⁻³⁷ 실제로 Rickles⁵와 Levy 등⁶은 교정장치물에 의한 니켈 알러지를 보고한 바 있었으며, Greig⁷과 Dickson⁸은 headgear의 사용으로 발생한 접촉성 피부염에 대해 보고하는 등 니켈 과민반응에 대한 여러 보고가 있어왔다. 이렇듯 니켈을 포함한 선재로 인한 과민반응의 여부, 과민반응을 지닌 환자의 교정치료에 의한 내성 및 재발 여부, 세포독성 반응 등은 아직 논란의 대상이며 앞으로 많은 연구가 필요하다.

본 실험에서 각 선재군의 금속 유리량은 ICP-AES를 이용하여 측정하였다. ICP-AES는 미량의 금속 이온을 측정하는 장치로 6000K 이상 고온의 Argon plasma로 원자를 들뜨게 하여 방출되는 빛을 분광하여 광전증배관으로 금속 이온양을 계산한다.¹⁵ 스테인레스스틸 선재군에 비해 스테인레스스틸 선재에 전기도금을 이용하여 니켈을 도금한 군에서 많은 양의 니켈 이온 유리를 보였다. 이는 니켈을 스테인레스스틸 선재에 전기도금 시 도금층과 기저 금속 사이의 불충분한 결합으로 도금 금속인 니켈이 유리된 것으로 생각된다. 조 등³은 전기도금 조건을 찾는 과정에서 가장 문제가 된 부분은 도금층의 탈락이며 이를 방지하기 위해 적절한 전처리와 도금속도의 조절이 중요하다고 한 바 있다. 또한 이런 도금층의 미세한 탈락은 물성의 저하도 가져올 수도 있어 향후 도금층의 밀착성 증가에 더 많은 연구가 필요함을 시사하였다. 아울러 코발트 이온도 전기도금을 시행한 군에서

더 많은 유리 (0.01 → 0.28) 를 보였는데, 이는 도금 과정 중 열처리 등의 과정이 스테인레스스틸 선재의 내식성 감소를 가져와 표면이 부식되어 스테인레스스틸 선재 내의 코발트 이온이 유리되었기 때문이라 생각된다.^{38,39}

유리된 금속 이온의 양뿐만 아니라 금속 이온 각각의 독성 정도도 유리된 금속 이온의 세포독성에 중요한 변수가 된다. 금속 이온의 독성 정도를 평가하기 위해 TC-50 growth inhibition value를 사용할 수 있다. 이 value는 세포 수를 50% 감소시킬 수 있는 금속 염의 농도를 나타내는데 이 value가 낮을수록 강한 독성을 가진 금속 이온임을 의미한다. Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺이온의 TC-50 value는 각각 2.4, 4.5, 6.2, 7.2, 10.7 mg/L 이다.⁴⁰ 본 연구에서 스테인레스스틸 선재군은 9.20 ~ 12.47%의 흡광도의 감소를 보여 주었는데 이는 유리된 니켈 이온의 양이 염화 니켈 TC-50 value의 22%에 달했기 때문이라 생각된다. 아울러 전기도금 선재의 경우 니켈 이온이, 구리 선재의 경우 구리 이온의 유리가 TC-50 value와 비교할 때 4.8배, 29.7배나 되어 많은 흡광도 감소를 가져온 것으로 생각된다.

치과 재료의 세포독성을 평가하는 *in vitro* 실험 시 실험방법을 표준화시키는 것은 매우 중요하다. 이렇게 실험방법을 표준화시킬 때 중요한 변수 중 하나는 어떤 cell line을 선택하느냐 하는 것이다.⁴¹ 치과 재료의 안정성을 평가할 때는 공인된 세포 저장소로부터 얻어진 특정한 continuous cell line의 사용이 추천된다.^{17,42} 이런 조건을 만족시키는 여러 cell line 중 본 실험에서는 Balb/c 3T3 mouse fibroblast (ATCC CCL 163) 를 사용하였는데, 이는 Wataha 등⁴³이 Balb/c 3T3 mouse fibroblast가 다른 ATCC (American Type Culture Collection) cell line들 보다 더 금속 이온에 예민하게 반응하여 금속 이온의 세포독성 평가에 가장 적절하다고 추천하였기 때문이다.

세포의 증식과 살아있는 세포를 정확하게 측정할 수 있는 기법은 생명과학 분야에서 필수적인 기법 중의 하나이다. 새로운 소재의 생체안정성을 알아보기 위하여 동물실험 등 생체 실험 이전에 생체 외에서 신소재가 세포의 성장을 억제하는지를 객관적으로 증명하는 과정이 선행되어야 한다.⁴⁴ 가장 직접적이고 이상적인 방법은 세포에 trypan blue 등을 처리한 후 현미경과 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포를 세는 것이지만 많은 시간과 노력이 요구되어 검체 수가 많을 경우에는 사용할 수가 없기 때문에 세포의

살아있는 정도를 간접적으로 측정하려는 여러 가지 방법들이 개발되어 왔다.

생체안정성은 세포의 형태나 세포의 증식률을 관찰하는 등 여러 방법으로 평가할 수 있다. Messer와 Lucas⁴⁵는 세포의 대사 활성도를 관찰하는 것이 세포의 형태나 생존도 자체를 보는 것보다 생체안정성 연구에 더 효과적이라고 하였으며, Bumgardner와 Lucas⁴⁶는 치과 합금으로부터 유리된 금속 이온의 세포 반응을 관찰한 결과 유리된 금속 이온은 세포의 형태나 생존도 보다는 세포의 증식 감소에 가장 많은 영향을 끼치므로 금속유리에 의한 세포독성을 검사 시 세포 증식 정도를 검사하는 것이 가장 효과적이라고 하였다. 그러므로, 본 연구에서는 세포 증식 정도를 검색하기 위해 MTT 검색법¹⁶을 사용하였다. MTT 검색법은 96-well plate를 사용하고 검사결과를 multiwell microplate reader를 이용하여 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판단할 수 있어 세포독성 및 세포 증식 검색법으로서 널리 사용되고 있다.⁴⁷⁻⁴⁹ 대사과정이 온전한 세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium 을 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. 이 MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하게 된다. 시편 추출물을 세포 배양 배지에 투여한 후 배양한 세포는 시편 추출물을 투여하지 않고 순수한 배지에서 배양한 세포에 비해 생존 세포의 비율이 감소한다. 그 감소되는 비율은 추출물의 종류와 농도, 추출물에 대한 세포의 감수성에 따라 달라지며, 사멸되지 않고 대사적 활성이 있는 세포는 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 알 수 있다.

본 실험에서 전기도금한 선재의 세포독성 정도를 알고자 스테인레스스틸 선재, 티타늄, 구리를 비교군으로 하였다. 티타늄은 여러 문헌에서 가장 생체안정성이 뛰어난 것으로 보고되어 negative control군으로 사용되었으며, 본 연구에서도 Balb/c 3T3 mouse fibroblast에 배지만을 첨가한 경우와 유사한 흡광도를 보였다. 구리는 매우 독성이 심하여 positive control군으로 사용⁴⁰하였는데, 예상과는 달리 아주 작지만 (7.64 ~ 9.09%) 확실한 세포의 증식을 관찰할 수 있었다. 이는 구리의 경우 표면이 공기 중에 노출될 경우 빠르게 산화막이 형성되는데 이것이 피막을 형성하여 약간의 독성 감소를 보인 것으로 사료된다.

선재의 독성도는 ISO 10993, part 5¹⁷에 따라 25%

이하의 세포 생존률 감소를 보인 경우를 무독성, 26 ~ 50% 세포 생존률 감소를 보인 경우를 약간의 독성, 51 ~ 75% 세포 생존률 감소를 보인 경우를 중등도 독성, 75%가 넘는 세포 생존률 감소를 보인 경우를 강한 독성으로 판단하였다. 스테인레스스틸 선재군은 흡광도 감소를 나타내었지만 희석액 농도에 따라 9.2 ~ 12.47%로 그 양이 적어 무독성으로 판단되었다. 하지만 스테인레스스틸 선재에 전기도금한 선재군은 흡광도가 59.03 ~ 64.79% 감소를 나타내 중등도 독성을 가진 것으로 판단하여 임상에 사용하기 위해 일부 보완이 필요하다는 것을 시사하였다.

스테인레스스틸 선재를 전기도금 한 후 MTT 검색법을 이용하여 세포독성을 관찰한 결과 중등도의 세포독성이 있는 것으로 밝혀진 바 전기도금 방법을 통하여 선재의 직경을 증가시키는 방법이 임상에 적용되기 위해서는 도금층의 밀착성을 증진시키는 등 부가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다. 아울러 티타늄 등 생체 친화성이 높은 금속으로 도금을 하든지, 또는 TiN 이온 코팅 등 부가적인 표면처리에 대한 연구가 시행되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

교정용 스테인레스스틸 선재에 니켈을 전기도금한 후, 이를 도금하지 않은 교정용 스테인레스스틸 선재 그리고 티타늄 또는 구리의 금속 유리량과 흡광도 측정 등을 통한 세포독성을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ICP-AES 분석 결과 전기도금한 선재에서 많은 양의 니켈이온이 유리되었으며, 구리에서는 많은 양의 구리이온이 유리되었다.
2. 역상 현미경으로 세포들을 관찰한 결과 전기도금한 선재와 구리에서 많은 양의 세포 수 감소를 보였다.
3. MTT 분석 결과 티타늄은 모든 농도에서 배지만을 첨가한 경우에 비해 흡광도 차이를 보이지 않았지만, 전기도금한 선재 ($p < 0.001$), 스테인레스스틸 선재 ($p < 0.05$), 구리 ($p < 0.001$) 는 배지만을 첨가한 경우보다 통계적으로 유의한 흡광도 감소를 보였다.
4. ISO 10993, part 5에 따라 구리는 “강한 독성”을 보이는 반면 티타늄과 스테인레스스틸 선재는 “무독성”, 그리고 전기도금 선재는 “중등도 독성”으로

나타났다.

이상의 결과는 전기도금을 이용하여 교정용 선재의 직경을 증가시키는 방법이 임상에 적용되기 위해서는 세포독성을 줄이기 위한 추가의 연구가 필요함을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Bursstone CJ. Application of bioengineering to clinical orthodontics. In: Graber TM, Vanarsdall RL Jr, editors. Current principles and techniques. St. Louis: Mosby; 2004. p. 269-92.
2. Matasa CG. Biomaterials in orthodontics. In: Graber TM, Vanarsdall RL Jr, editors. Current principles and techniques. St. Louis: Mosby; 2000. p. 305-38.
3. 조진형, 성영은, 이기현, 황현식. 전기도금을 이용한 스테인레스 스틸 선재의 직경 증가에 관한 실험적 연구. 대치교정지 2003;33:121-30.
4. 이정석, 이기현, 황현식. 전기도금을 이용한 스테인레스스틸 각형 선재의 굵기 증가 후 물성 변화. 대치교정지 2003;33:131-40.
5. Rickles NH. Allergy in surface lesions of the oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1972;33:744-54.
6. Levy A, Hanau D, Foussereau J. Contact dermatitis in children. Contact Dermatitis 1980;6:260-2.
7. Greig DGM. Contact dermatitis reaction to a metal buckle on a cervical headgear. Br Dent J 1983;155:61-2.
8. Dickson G. Contact dermatitis and cervical headgear. Br Dent J 1983;155:112.
9. Gwinnett AJ. Corrosion of resin-bonded orthodontic brackets. Am J Orthod 1982;81:441-6.
10. Mandich NV, Krulik GA. On the mechanisms of plating on plastics. Plat Surf Finish 1993;80:68-73.
11. Schwartz M. Deposition from aqueous solutions: an overview. In: Bunshah RF, editor. Deposition technologies for films and coatings. New Jersey: Noyes Publications; 1982. p. 385-449.
12. Mimani T, Mayanna SM. Electroless nickel plating from an acidic tartrate bath. Plat Surf Finish 1991;78:66-9.
13. Dhar S, Chakrabarti S. Electroless nickel plated contacts on porous silicon. Appl Phys Lett 1996;68:1392-3.
14. Gao LJ, Ma P, Novogradez KM, Norton PR. Characterization of permalloy thin films electrodeposited on Si (111) surfaces. J App Phys 1997;81:7595-9.
15. Boss CB, Fredeen KJ. General characteristics of ICP-AES. In: Boss CB, Fredeen KJ, editors. Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. The Perkin-Elmer Corporation; 1989. p. 22-9.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth 1983;65:55-63.
17. ISO 10993, part 5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Standards Organization; 1993.
18. 염희택, 이주성. 도금·표면처리. 서울: 문운당; 1989;1-170.
19. 김남일, 장시성. 무전해 도금. 서울: 동화기술; 1996;15-66.
20. Yoshinari H, Kiuchi M, Aoki, Umamura S. Some properties of ion-plated silver films. J Jpn Soc Dent Mat Device 1977;41:999-1006.
21. Yoshinari M. Studies on the application of ion-plating to dental resto-

- rations (Part 1) TiN ion-plating. J Jpn Soc Dent Mat Device 1984; 3:71-8.
22. Yoshinari M. Studies on the application of ion-plating to dental restorations type IV gold alloy ion-plating. J Jpn Soc Dent Mat Device 1985;4:97-105.
 23. Yoshinari M. Studies on the application of ion-plating to dental restorations (Part 3) application to aluminium alloys. J Jpn Soc Dent Mat Device 1986;5:17-25.
 24. 김명숙, 정재현, 권오원. TiN 피막처리된 스테인레스강 교정용 장치물의 금속 유리에 대한 연구. 대치교정지 1995;25:43-54.
 25. 김정민, 권오원, 김교한. TiN 피막처리된 Co-Cr계 교정용 선재의 물성. 대치교정지 1998;28:371-7.
 26. Burstone CJ, Farzin-nia F. Production of low-friction and colored TMA by ion implantation. J Clin Orthod 1995;29:453-61.
 27. 김재남. 교정용 선재의 직경 증가를 위한 전기도금법과 무전해도금법의 비교연구. 전남대학교 대학원 석사학위논문 2002.
 28. von Fraunhofer JA. Corrosion of orthodontic devices. Semin Orthod 1997;3:198-205.
 29. Park HY, Shearer TR. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. Am J Orthod 1983;84:156-9.
 30. Barrett RD, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1993;103:8-14.
 31. 박수병, 이병태. Bracket과 호선의 금속 유리. 대치교정지 1989;19:75-84.
 32. 류정현. 교정장치로부터의 니켈과 크롬의 유리에 관한 연구. 원광대학교 대학원 석사학위논문 1998.
 33. 신지수. 고정식 모조 교정 장치의 금속 유리량 및 표면 변화. 연세대학교 대학원 박사학위논문 2000.
 34. Bishara SE, Barrett RD, Selim MI. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1993;103:115-9.
 35. Bass JK, Fine H, Cisneros GJ. Nickel hypersensitivity in the orthodontic patient. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1993;103:280-5.
 36. Moffa JP. Biological effects of nickel-containing dental alloys. JADA 1982;104:501-5.
 37. Prystowsky SD, Allen AM, Smith RW, Nonomura JH, Odom RB, Akers WA. Allergic contact hypersensitivity to nickel, neomycin, ethylenediamine and benzocaine. Relationships between age, sex, history of exposure, and reactivity to standard patch tests and use tests in a general population. Arch Derm 1979;115:959-62.
 38. Schmalz G, Schuster U, Schweikl H. Influence of metals on IL-6 release in vitro. Biomaterials 1998;19:1689-94.
 39. Gjerdet NR, Herø H. Metal release from heat-treated orthodontic archwires. Acta Odontol Scand 1987;45:409-14.
 40. Rose EC, Jonas IE, Kappert HF. In vitro investigation into the biological assessment of orthodontic wires. J Orofac Orthop 1998;59:253-64.
 41. Hanks CT, Anderson M, Craig RG. Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems. J Oral Pathol 1981;10:101-12.
 42. ADA. ADA specification #41 for recommended standard procedures for biological evaluation of dental materials. JADA 1979;99:697-8.
 43. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. Dent Mater 1994;10:156-61.
 44. 강인규. 재료의 생체적합성 평가. (유지, 이일우 편: '생체조직공학 개념과 응용' 중에서) 서울: 고려의학; 1998;163-7.
 45. Messer RL, Lucas LC. Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: A study of individual ions' effects on fibroblasts. Dent Mater 1999;15:1-6.
 46. Bungardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. J Dent Res 1995;74:1521-7.
 47. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. Cancer Res 1987;47:943-6.
 48. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. Dent Mater 1992;8:65-70.
 49. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod 1998;24:91-6.

- ORIGINAL ARTICLE -

Evaluation of cytotoxicity of electroplated stainless steel orthodontic wire

Gye-Hyeong Lee, DDS, MSD,^a Jin-Hyoung Cho, DDS, MSD,^b Ki-Heon Lee, DDS, MSD, PhD,^c
Hyeon-Shik Hwang, DDS, MSD, PhD^d

The purpose of this study was to examine the cytotoxicity of orthodontic wire which had an increased diameter through electroplating, and to evaluate its possible clinical applications. First, nickel plating was carried out on the commercially available stainless steel wire using an electroplating technique. For the comparison of the electroplated wire with ready made stainless steel wire and titanium or copper, each wire was incubated for 72 hours in a medium. The release of the metal ion was measured using ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer). Balb/c 3T3 mouse fibroblast was put on a microplate and placed in an incubated medium of 75%, 50%, and 20% dilution. An MTT analysis was used to compare with the medium only. The change in absorbency value of each wire group and the difference of absorbency value according to the change of dilution was measured. The results of ICP-AES analysis showed that great amount nickel ion was isolated from electroplated orthodontic wires and great amount copper ion was isolated from copper. The results of the MTT analysis showed that there was no difference in the absorbency value of titanium at any dilution. However, the electroplated wires ($p < 0.001$), the stainless steel wires ($p < 0.05$) and the copper ($p < 0.001$) were statistically significantly lower than those of medium only at all dilutions. Assessment as per ISO 10993, part 5, showed that electroplated wire was allotted to "moderate cytotoxic", the titanium and stainless steel wire were "non-cytotoxic". The results of this study indicate that the electroplated orthodontic wires need additional efforts to decrease cytotoxicity for their clinical applications.

Korean J Orthod 2005;35(2):127-36

※ **Key words:** Electroplating, Stainless steel orthodontic wire, Cytotoxicity

^a Graduate Student, ^b Clinical Lecturer, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Chonnam National University
^c Assistant Professor, ^d Professor, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Dental Science Research Institute, Chonnam National University

Reprint requests: **Hyeon-Shik Hwang**

Department of Orthodontics, Chonnam National University Hospital, Hak-Dong 8, Dong-Gu, Gwangju, 501-757, Korea
+82 62 220 5486

hhwang@chonnam.ac.kr

Received June 15, 2004; Last Revision December 27, 2004; Accepted January 8, 2005