

# Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면처리에 의한 백서 두개관 세포의 반응

김해진<sup>1</sup>, 손미경<sup>2</sup>, 박지일<sup>3</sup>, 정현주<sup>1</sup>, 김영준<sup>1\*</sup>

1. 전남대학교 치의학전문대학원 치주과학교실, 전남대학교 치의학 연구소

2. 조선대학교 치과대학 보철학교실

3. 광주보건전문대학 치위생과

## Biological response of primary rat calvarial cell by surface treatment of Ti-8Ta-8Nb alloy

Hae-Jin Kim<sup>1</sup>, Mee-Kyoung Son<sup>2</sup>, Ji-Il Park<sup>3</sup>, Hyun-Ju Chung<sup>1</sup>, Young-Joon Kim<sup>1\*</sup>

1. Department of Periodontology, School of Dentistry, Chonnam National University

2. Department of Prosthodontics, College of Dentistry, Chosun University

3. Department of Dental hygiene, Gwangju Health College

### ABSTRACT

**Purpose:** Ti-6Al-4V alloy is widely used as an implant material because of its good biocompatibility and good mechanical property compared with commercial pure titanium. Otherwise, toxicity of aluminum and vanadium in vivo has been reported. Ti-8Ta-3Nb alloy is recently developed in the R&D Center for Ti and Special Alloys and it was reported that this alloy has high mechanical strength, no cytotoxicity and similar biocompatibility to commercial pure titanium, but many studies are needed for its clinical use. In these experiment, we carried out different surface treatment on each Ti-8Ta-3Nb alloy disks, then cultured cell on it and assessed biological response.

**Materials and Methods:** cpTi, Ti-6Al-4V, Ti-8Ta-3Nb alloy disks were prepared and carried out sandblasting and acid etching (SLA) or alkali-heat treatment (AH) on the Ti-8Ta-3Nb alloy disks. We cultured primary rat calvarial cells on each surface and assessed early cell attachment and proliferation by scanning electron microscopy, cell proliferation, alkaline phosphatase activity.

**Result:** The rates of cell proliferation on the cpTi, Ti-8Ta-3Nb AH disks were higher than others ( $p<0.05$ ) and alkaline phosphatase activity was significantly enhanced on the Ti-8Ta-3Nb AH disks ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Most favorable cell response was shown on the Ti-8Ta-3Nb AH surfaces. It is supposed that alkali-heat treatment of the Ti-8Ta-3Nb alloy could be induced earlier bone healing and osseointegration than smooth surface.

(J Korean Acad Periodontol 2008;38:595-602)

**KEY WORDS:** Ti-8Ta-3Nb; alkali-heat treatment.

## 서론

순수 티타늄과 티타늄 합금은 우수한 기계적 성질, 부식 저항성을 지닌 생체친화성 재료로서 정형 외과나 치과 임플란트 영역에서 널리 사용되고 있는 금속 중 하나이다<sup>1)</sup>.

순수 티타늄(commmercially pure titanium, cpTi)은 우수한 생체적합성을 가진 안정된 금속으로 평가받고 있지만 생의학적 임플란트 재료로 사용되기 위해서는 보다 높은 기계적 성질이 필요하다. 따라서 현재 임플란트 재료로서 생체적합성, 골유착성 그리고 순수 티타늄보다 우수한 기계적 성질을 갖는 Ti-6Al-4V 합금이 많이 사용되고 있다. 그러나 근래에 들어서는 이 합금의 구성성분인 알루미늄(aluminum)과 바나듐(vanadium)이 체액 내에서 부식되고 방출되어 각각 신경성 장애와 세포독성을 일으킨다는 생체안정성에 대한 문제가 제기되고 있다<sup>2-4)</sup>. Ti-6Al-4V 합

Correspondence: Young-Joon Kim

Department of Periodontology, School of Dentistry, Chonnam National University, 333, Yong Bong Ro, Buk-gu, Gwangju, 500-757, Korea, E-mail: youngjun@chonnam.ac.kr, Tel: 82-62-220-4450,

Fax: 82-62-226-5449.

Received: Aug. 25, 2008; Accepted: Sep. 22, 2008

금은  $\alpha+\beta$ 형 티타늄 합금 중의 하나로 피질골(최대30GPa)보다 훨씬 큰 탄성계수(약 120GPa)를 가진다<sup>5)</sup>. 따라서 기능 중에 임플란트 주위 치조골에 부적절한 부하가 가해지게 되고 잠재적으로는 골흡수와 임플란트 실패를 가져올 수 있다<sup>6)</sup>. 그러므로 최근에는 낮은 탄성계수, 좋은 기계적 강도와 가공성을 가진 비독성 요소로 구성된 Ti-8Ta-3Nb 합금 등의 새로운 티타늄 합금에 대한 개발이 진행되고 있다. Ti-8Ta-3Nb 합금은 전임상 단계에 있는 새롭게 개발된  $\beta$ 형 티타늄 합금 중의 하나로 탄탈륨 (tantalum), 니오븀 (niobium)과 같은 비독성 요소로 구성되어 있으며  $\alpha$ - 또는  $\alpha+\beta$ 형 티타늄 합금보다 낮은 탄성계수와 우수한 기계적 성질을 보인다<sup>5,6)</sup>. 또한 이 합금의 생체적합성을 평가한 연구에서는 순수 티타늄과 유사한 생체적합성을 나타내었다고 보고되었다<sup>7)</sup>.

초기 티타늄 임플란트는 평탄한 면(smooth surface)을 이용하였는데 골질이 나쁜 경우에는 성공률이 상대적으로 낮고 골유착이 천천히 진행되므로, 티타늄 표면을 물리적 또는 화학적으로 변형하여 골유착을 질적으로 향상시키려는 연구들이 계속 진행되고 있다<sup>8,9)</sup>.

여러 보고들에 의하면 표면의 거칠기가 *in vitro*에서 세포의 부착, 증식, 분화, 단백질 합성 등과 같은 생물학적 반응에 영향을 주며, 임상적으로는 표면 조도가 증가할수록 뒤틀림제거력이나 골접촉면적이 증가한다고 하였다<sup>10-17)</sup>. 따라서 골조직과 임플란트 간의 계면에서 양질의 접촉을 얻기 위하여 표면 조도를 증가시키는 방법을 사용하며, 이러한 방법들 중에서 분사 후 산 부식(sandblasting and acid etching, SLA)은 현재 가장 널리 사용되고 있는 방법이다. SLA 표면의 골유착에 대한 여러 학자들의 연구결과, SLA 표면에서 세포의 활성이 촉진되어 골과 임플란트의 접촉이 더욱 빠르게 됨으로써 치료기간이 단축되었고, 임상적인 성공률도 매우 높았다고 하였다<sup>18)</sup>.

표면 조도뿐만 아니라 표면의 화학적 특성도 임플란트 주위의 골형성에 영향을 미치는 중요한 요소로서, 알칼리-열처리(alkali and heat treatment)를 통한 임플란트 표면처리방법은 표면의 화학적 특성을 변화시키는 방법 중 하나라 할 수 있다. Kokubo 등<sup>19-21)</sup>은 티타늄 표면의 알칼리-열처리가 강한 골과의 결합, 골친화성을 유도한다고 하였으며, 알칼리-열처리 후 사람의 체액과 같은 이온 농도를 갖는 유사체액(simulated body fluid)에서 티타늄 성분의 금속주위에 골과 유사한 apatite가 형성된다고 하였다.

따라서 이러한 티타늄 표면의 물리적, 화학적인 변화를 통해 임플란트 식립 후 빠른 골치유와 골융합을 유도하여 전체적인 임플란트 치료기간을 단축시킬 수 있으며, 임플란트의 임상적인 성공률도 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

티타늄의 표면특성이 어떤 방식으로 세포에 전달되는 지에 대해서는 거의 알려져 있지 않지만, 골아세포가 골형성과 개조에 있어서 중추적인 역할을 하므로 티타늄 표면 변화의 유용성을 평가하기 위하여 *in vitro*에서 일어나는 생물학적 반응에 대한 고찰이 필요하다. 따라서 이번 연구에서는 Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면에 SLA와 알칼리-열처리를 시행하고 이들의 표면에서 백서 두개관 세포를 배양하여 세포의 초기 부착 정도를 주사 전자 현미경으로 관찰하고 세포 증식도 및 알칼리 인산 분해 효소 활성도를 평가하여 세포의 활성도를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 티타늄 합금 준비

이 실험에서 다음의 서로 다른 표면 특성을 갖는 티타늄 합금을 준비하였다.

- (1) 순수 티타늄(grade II, commercially pure titanium, cpTi)
- (2) Ti-8Ta-3Nb 합금  
(중량 백분율: 8% tantalum, 3% neobium, titanium-8tantalum-3neobium)
- (3) Ti-6Al-4V 합금  
(중량 백분율: 6% aluminum, 4% vanadium, titanium-6aluminum-4vanadium)
- (4) 분사 후 산부식(sandblasting and acid etching, SLA)한 순수 티타늄
- (5) 분사 후 산부식한 Ti-8Ta-3Nb 합금
- (6) 알칼리-열처리(alkali-heat treatment, AH)한 Ti-8Ta-3Nb 합금

실험에서 사용된 순수 티타늄과 티타늄 합금들은 전남대학교 부설 티타늄 연구소(R&D Center for Ti and Special Alloys)에서 직경 12 mm, 두께 1 mm의 디스크로 제작되었다. 순수 티타늄과 Ti-8Ta-3Nb 합금, Ti-6Al-4V 합금 디스크들은 240, 400, 600 grit silicon carbide paper를 순서

대로 사용하여 연마하였고 아세톤과 에탄올에 초음파를 사용하여 각각 10분간 용해시켰으며 각 용매의 적용 전에 증류수로 세척하였다. 순수 티타늄과 Ti-8Ta-3Nb 합금의 SLA 표면처리는 150 $\mu$ m 크기의 산화알루미늄입자로 분사하고 황산으로 산부식하여 시행하였다. Ti-8Ta-3Nb 합금의 알칼리-열처리를 위해서, 8시간동안 60도 온도에서 10 M NaOH에 적신 다음 증류수에 세척하고 40도에서 24시간동안 건조하였다. 그 다음 500, 600, 700도까지 분당 5도의 비율로 온도를 상승시켜 각각의 온도에서 1시간씩 가열하고 화로 내에서 실온까지 서냉하였다. 그리고 각각의 방법으로 제작된 표본들의 표면 조도를 atomic force microscopy로 측정하였다(Table 1).

## 2. 표본 준비

순수 티타늄, Ti-8Ta-3Nb 합금, Ti-6Al-4V 합금, SLA 표면의 순수 티타늄, SLA 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금, 알칼리-열처리 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금 디스크들을 무균상태에서 12- or 6-well 배양 접시에 위치시킨 다음 70% 에탄올로 3번 세척하고 자외선에 1시간동안 노출시킨 후 무균 작업대에서 공기로 건조시켰다.

## 3. 백서 태자 두개관 세포 배양

세포는 임신 21일째의 백서 태자 두개관(Sprague-Dawley fetal calvaria)에서 연속적인 교원질 효소의 분해 과정을 통해 얻었다(Type II; Invitrogen, U.S.A). 수집된 세포를 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), 100 mg/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin이 첨

가된 BGJb media(Life Technologies, U.S.A)에 넣어 37도, 5% 이산화탄소하에서 배양하였다.

## 4. 주사 전자 현미경 관찰

주사 전자 현미경으로 세포의 부착과 증식을 보기 위해 백서 태자 두개관 세포를 관찰하였다. 10% FBS 를 포함하는 BGJb medium(Life Technologies, U.S.A)에  $1 \times 10^5$  cells/ml 밀도로 세포를 분주하였다. 3일 동안 배양한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 세척하고 100 mM cacodylate buffer를 포함한 2.5% glutaraldehyde에 고정하였다. 표본은 에탄올의 농도를 30%, 60%, 95%, 100%로 증가시켜가며 탈수시키고 hexamethyldisilazane (Sigma, U.S.A)에 15분 동안 처리한 후, 공기로 건조시키고 carbon으로 피복시켰다. 그리고 주사 전자 현미경 관찰을 하였다.

## 5. 세포 증식도 측정

세포 증식도는 세포독성실험(MTT assay)으로 측정하였다. 10% FBS가 첨가된 BGJb medium(Life Technologies, U.S.A)과 함께  $1 \times 10^5$  cells/ml 밀도로 12-well 배양접시에 순수 티타늄, Ti-8Ta-3Nb 합금, Ti-6Al-4V 합금, SLA 표면의 순수 티타늄, SLA 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금, 알칼리-열처리 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금 위에 세포를 배양하였다. 세포를 3일간 배양하였고 배양 후에 세포 증식도를 평가하였다. 측정된 Fomazan은 490 nm에서 enzyme-linked immunoabsorbent assay(ELISA) plate reader로 정량화하였다. 실험은 세 번 반복 시행하였다.

**Table 1.** Summary of Surface Roughness of Titanium Alloys

Type of Ti-based alloys	RMS Roughness (nm)
cp-Ti	3.3
Ti-8Ta-3Nb	29.0
Ti-6Al-4V	7.7
cp-Ti SLA	1200
Ti-8Ta-3Nb SLA	1300
Ti-8Ta-3Nb AH	19.1

AH : alkali-and heat- treatment.

RMS : Root Mean Square

## 6. 알칼리 인산 분해 효소 활성 평가

알칼리 인산 분해 효소 활성 평가는 Breaudiere과 Spillman<sup>22)</sup>의 방법에 준해 시행되었다. 이를 위해 10% FBS, ascorbic acid 40 µg/ml와 20 µg/ml β-glycerol phosphate가 포함된 BGJb medium(Life Technologies, U.S.A)에서 12 well 배양 접시 위에  $1 \times 10^5$  cell/ml 밀도로 세포를 분주하였다. 알칼리 인산 분해 효소 활성의 평가는 다음과 같이 시행하였다.

7일째 세포를 PBS로 세척하고, PBS가 포함된 Triton 0.1%(Triton X-100)로 용해시킨 후 -20도에 냉동하였다가 녹였다. 세포 용해물 100 µl를 10 mM p-nitrophenyl phosphate 200 µl, 1.5 M 2-amino-2-methyl-1-prop-anol buffer 100 µl와 혼합하였다. 그 다음 표본을 1시간동안 37도에서 배양하였다. 각 표본의 알칼리 인산 분해 효소 활성은 490 nm에서 spectrophotometer(SmartSpec™, BioRAD, U.S.A)로 측정하여 비색 정량화하였다.

## 7. 통계 분석

본 연구의 유의성 검정을 위하여 측정 자료를 SPSS 12.0 program을 사용하여 one way ANOVA로 분석하였고 Duncan's multiple comparison을 시행하였다.

## 결과

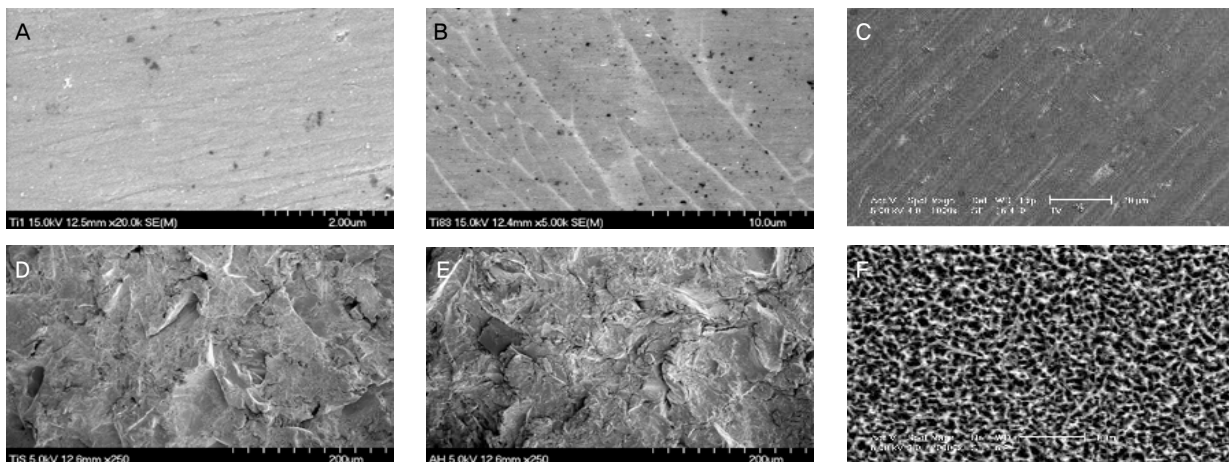
### 1. 주사 전자 현미경 관찰

Fig. 1은 각각의 티타늄 디스크 표면(cpTi, Ti-8Ta-3Nb, Ti-6Al-4V, cpTi SLA, Ti-8Ta-3Nb SLA, Ti-8Ta-3Nb AH)의 주사 전자 현미경 사진이고 Fig. 2는 디스크 표면에서 세포 배양 3일 후 주사 전자 현미경 사진이다.

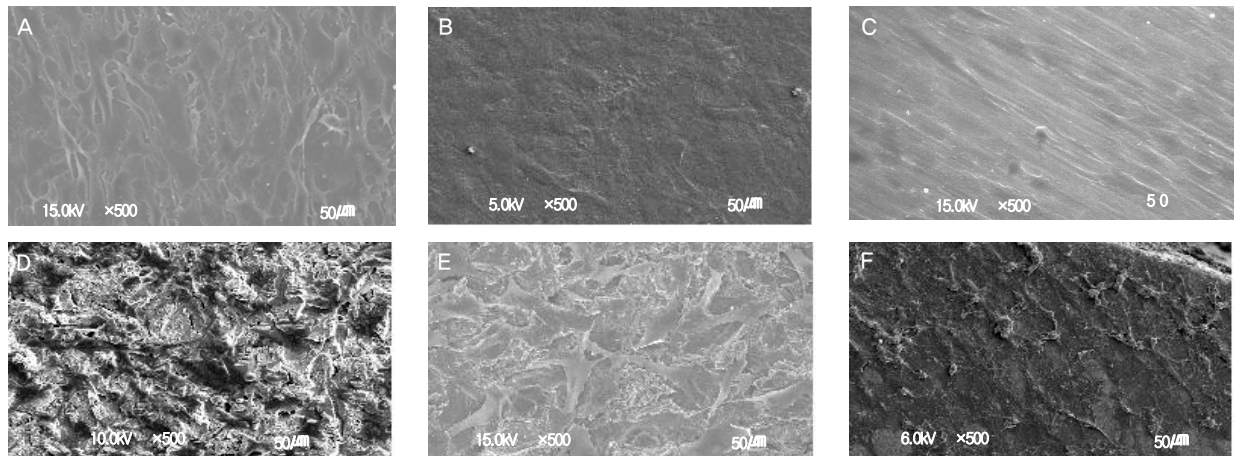
순수 티타늄, Ti-8Ta-3Nb 합금, Ti-6Al-4V 합금, SLA 표면의 순수 티타늄, SLA 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금, 알칼리-열처리 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금에서 편평하고 가늘고 긴 방추형 또는 다각형의 세포가 관찰되었다.

### 2. 세포 증식도 측정

배양 3일 후 순수 티타늄과 알칼리-열처리 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금 디스크에서 Ti-6Al-4V 합금, SLA 표면의 순수 티타늄, SLA 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금과 비교 시 높은 세포 증식도를 보였으며( $p < 0.05$ ), Ti-8Ta-3Nb 합금 디스크에서는 SLA 표면의 순수 티타늄, SLA 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금과 비교 시 높은 세포 증식도를 보였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).



**Figure 1.** SEM surface morphologies of each Ti and Ti alloy surface  
(A) cpTi, (B) Ti-8Ta-3Nb, (C) Ti-6Al-4V, (D) cpTi SLA, (E) Ti-8Ta-3Nb SLA, (F) Ti-8Ta-3Nb AH.



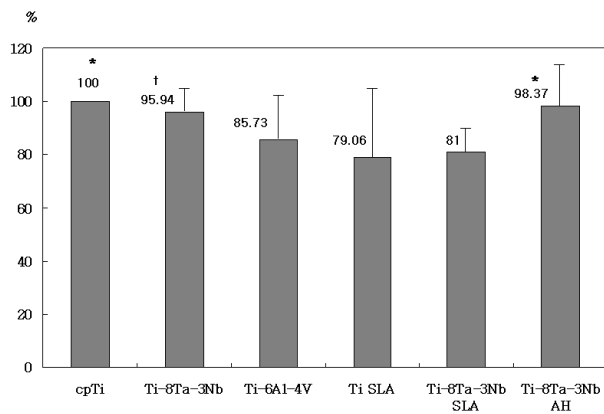
**Figure 2.** Photomicrographs of SEM finding after 3 days ( $\times 500$ )

(A) cpTi, (B) Ti-8Ta-3Nb, (C) Ti-6Al-4V, (D) cpTi SLA, (E) Ti-8Ta-3Nb SLA, (F) Ti-8Ta-3Nb AH.

### 3. 알칼리 인산 분해 효소 활성 평가

알칼리-열처리 표면의 Ti-8Ta-3Nb 합금은 다른 티타늄 합금보다 높은 알칼리 인산 분해 효소 활성을 나타냈다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4). SLA 표면(cpTi SLA, Ti-8Ta-3Nb SLA)

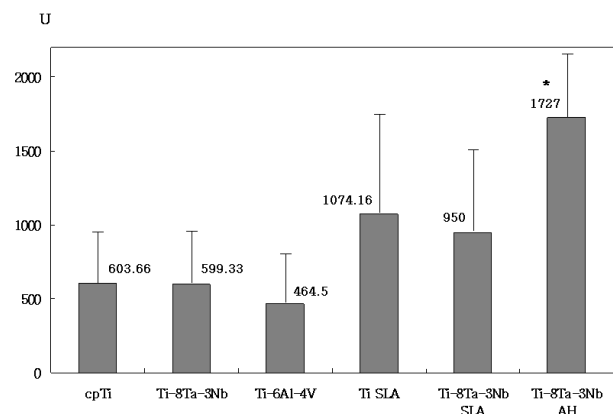
은 통계적으로 유의하지 않지만, 평탄한 면(cpTi, Ti-6Al-4V, Ti-8Ta-3Nb)에 비해 높은 알칼리 인산 분해 효소 활성을 나타냈다.



**Figure 3.** Cell proliferation assay after 3 days on each titanium alloy surface (%)

\* Significantly higher than Ti-6Al-4V, Ti SLA, Ti-8Ta-3Nb SLA ( $p < 0.05$ )

† Significantly higher than Ti SLA, Ti-8Ta-3Nb SLA ( $p < 0.05$ )



**Figure 4.** Alkaline phosphatase activity of primary rat calvarial cells after 7 days on each titanium alloy surface (U/100,000 cells)

\* Significantly different compared to the others ( $p < 0.05$ )

## 고찰

식립된 임플란트가 성공적으로 골유착되기 위해서는 초기에 일어나는 조골세포의 부착, 증식 및 분화 과정이 중요하다<sup>13)</sup>. 따라서 이 연구에서는 Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면을 물리적 혹은 화학적인 방법으로 처리하고 이에 따른 표면 특성의 변화가 백서 두개관 세포의 반응에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

최근 전남대학교 부설 티타늄 연구소에서 개발한 Ti-8Ta-3Nb 합금은 세포독성이 없는 탄탈륨(tantalum)과 네오비움(neobium)을 티타늄에 첨가하여 순수 티타늄과 유사한 생체 적합성을 갖으며 순수 티타늄에 비해 강도가 높고 보다 골조직과 유사한 낮은 탄성계수를 갖는 등 여러 가지 장점이 있다고 보고되었다<sup>7)</sup>. 그러나 이 합금을 실제 임상에서 사용하기 위해서는 앞으로도 많은 연구가 시행되어야 한다.

이번 실험에서 Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면 특성을 변화시키기 위해 두 가지 표면처리방법을 사용하였는데, 먼저 기존에 많이 이용되고 있는 분사 후 산부식하는 방법으로 합금의 표면 거칠기를 변화시켰고, 이와 다른 표본에서는 표면의 화학적 특성을 변화시키기 위해 알칼리 열처리하는 방법을 시행하였다.

초기의 티타늄에 대한 실험실적 연구는 금속 자체의 생체 적합성의 평가에 중점을 두고 시행되었으나 최근에는 이러한 생체적합성의 측정과 함께 금속 표면의 계면에서 발생하는 세포 반응과 그 특성에 대한 연구가 강조되고 있다. 생체 재료의 경우, 이의 성패는 조직 내에 삽입되었을 때 발생하는 세포 반응에 의해 결정된다. 따라서 원하는 세포 반응을 유도하는 것이 무엇보다도 중요하다. 적절한 세포 반응을 유도하는 인자는 다양한 형태의 부착 단백질로서 이들 부착 단백질들이 생체 재료의 표면에 흡착하여 세포의 부착, 성장 및 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 본 실험에서는 Ti-8Ta-3Nb 합금의 SLA, 알칼리 열처리 표면에 대한 백서 두개관 세포의 반응을 평가하기 위해 세포의 부착 및 증식률을 측정하였다.

또한 조골세포로서의 특성을 확인하는 조직학적·생화학적 기준으로 세포의 형태, 증식률과 분화율, 석회화물질의 형성능력, 제1형 교원질 합성능력, 알칼리 인산 분해 효소의 활성도, 그리고 osteocalcin의 합성 등을 들 수 있으므로<sup>24)</sup>

이 실험에서는 알칼리 인산 분해 효소의 활성도를 평가하여 조골세포로서의 특성을 확인하였다.

여러 연구들에 의하면 표면 조도, 표면 조성이나, 세포 분화도, 표면 처리 과정에서 남은 표면의 불순물 유무, 표면의 규칙성 등이 세포 반응에 영향을 주는데, 이 중 표면 조도의 증가가 세포 부착이나 증식에 미치는 영향에 대해서는 상반된 보고들이 많다. Michaels, Bowers 등<sup>10,11)</sup>은 임플란트의 표면이 거칠수록 부착된 세포의 비율이 높았다고 하였으며, 반면에 Lincks 등<sup>12)</sup>은 표면 조도가 증가할수록 낮은 세포 증식을 보였다고도 보고하였다. 그리고 Wennerberg<sup>15)</sup>는 Sa 1.0-1.5 $\mu$ m 정도의 표면 조도에서 가장 좋은 골반응을 나타내며 그 이하 혹은 그 이상의 표면 조도에서는 골반응이 저하된다고 하였다. 그러나 동물 실험에서 조직형태학적 분석 시 표면 조도가 증가할수록 임플란트 골 접촉 면적이 증가되며 뒤틀림 제거력이 증가한다는 데에 대해서는 별다른 이견이 없다<sup>15-17)</sup>. 이렇게 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 얻어지는 결과가 상이한 이유는 식립된 임플란트가 골유착을 하는 과정은 많은 요인들이 포함된 동적 상태이기 때문이며<sup>25)</sup>, 초기에 세포 부착이나 증식이 감소된 양상을 보이더라도 알칼리 인산 분해 효소의 활성도나 광화(mineralization)가 증가된다면 결과적으로 우수한 골유착을 이룰 수 있다<sup>13,26)</sup>.

티타늄 표면의 화학적 변형을 위한 방법으로 표면에 다양한 인산 칼슘 박막을 형성하는 방법이 제안되고 있다. Kokubo 등<sup>19-21)</sup>은 처음으로 알칼리처리에 대해 소개하였는데, 티타늄 표면에 알칼리-열처리를 시행했을 때 주위에 얇은 활성층이 형성되고, 이는 생활성형 유리와 유리-세라믹 처럼 유사체액에서 골과 유사한 apatite를 형성하게 하여 강한 골과의 결합, 골 친화성을 유도한다고 하였다. 알칼리-열처리 표면에서의 apatite 형성에 대한 기전은 Kim 등<sup>27)</sup>에 의해 보고된 바 있으며, 알칼리-열처리에 의해 형성된 무정형의 sodium titanate는 체액 내에서  $\text{Na}^+$ 가  $\text{H}_3\text{O}^+$ 로 치환되어 hydrated titania를 형성하고 이의 Ti-OH group은 apatite 결정 형성을 유도한다고 하였다.

이 실험에서는 각각의 표본에서의 세포 형태를 주사 전자 현미경으로 관찰하였다. 모든 티타늄 합금 표본에서 세포가 납작한 방추형 또는 다각형 형태로 넓게 퍼져 있었고, 이렇게 세포가 특별한 모양의 변형을 나타내지 않았다는 것은 이번 실험에 사용된 티타늄과 티타늄 합금이 세포 독성이 없거나 무시할 정도임을 의미한다.

세포 증식도 평가에서는 순수 티타늄과 알칼리-열처리한 Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면에서 Ti-6Al-4V 합금, SLA 처리한 순수 티타늄과, SLA 처리한 Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면과 비교 시 높은 세포 증식률을 보였으며( $P<0.05$ ), Ti-8Ta-3Nb 합금은 순수 티타늄의 SLA 표면, Ti-8Ta-3Nb 합금의 SLA 표면과 비교 시 높은 세포 증식률을 보였다( $P<0.05$ ). SLA 표면이 다른 티타늄 합금의 표면보다 낮은 세포 증식률을 보인 것은 Lincks 등<sup>12)</sup>이 표면의 거칠기가 증가할수록 낮은 세포 증식을 보였다고 보고한 바와 일치하는 결과이다. 반면 알칼리-열처리 표면에서는 다른 티타늄 합금에서보다 더 높은 세포 증식률을 보였는데, 이는 알칼리-열처리 표면에 생체적합성과 골전도성이 우수하며 골조직과 유사한 화학성분을 갖는 인산칼슘 박막이 형성되어, 이 부위에 부착 단백질의 흡착이 증진되고 세포 부착이 유도되었기 때문으로 생각된다<sup>23)</sup>.

골성 세포 분화의 각 단계에서 각기 다른 골기질 단백질이 발현된다고 보고되어 왔다. 조골 세포의 초기분화단계에서 제1형 교원질이 최대 발현되고 기질 성숙 단계에서는 알칼리 인산 분해 효소가 최대 발현된다<sup>28)</sup>. 일반적으로 조골 세포가 성숙함에 따라 알칼리 인산 분해 효소의 활성이 높으므로 이 효소 활성은 조골세포의 성숙도를 나타내는 지표로 이용된다<sup>29)</sup>. 이번 실험에서 알칼리-열처리한 Ti-8Ta-3Nb 합금의 표면은 다른 표면에 비해 높은 알칼리 인산 분해 효소 활성을 나타냈는데( $p<0.05$ ), 이는 표면에 형성된 apatite층이 백서 두개관 세포가 골아세포로 분화되는 과정을 촉진시킨 결과로 생각된다.

이번 연구 결과로 볼 때, Ti-8Ta-3Nb 합금의 알칼리-열처리 표면이 순수 티타늄과 티타늄 합금의 여러 다른 표면들 중에서 가장 좋은 세포 반응을 보였으며, 따라서 티타늄 합금에 알칼리-열처리를 시행함으로써 임플란트 식립 시 보다 빠른 골치유와 골융합을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 이를 임상에서 사용하기 위해서는 더 많은 실험적 연구와 생체 내 실험이 필요할 것이다.

## 참고문헌

1. Lausmaa J. Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 1996;81:343-361.
2. Okazaki Y, Gotoh E, Manabe T, Kobayashi K. Comparison of metal concentration in rat tibia tissues with various metallic implants. *Biomaterials* 2004;25:5913-5920.
3. Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials* 2005;26:11-21.
4. Hallb NJ, Anderson S, Caicedo M, Brasher A, Mikeez K, Jacobs JJ. Effects of soluble metals on human peri-implant cells. *J Biomed Mater Res* 2005;74A:124-140.
5. Gordin DM, Gloriant T, Texier G, Thibon I, Ansel D, Duval JL, Nagel MD. Development of a  $\beta$ -type Ti-12Mo-5Ta alloy for biomedical applications: cytocompatibility and metallurgical aspects. *J Mat Sci* 2004;15:885-891.
6. Niinomi M. Recent metallic materials for biomedical applications. *Metal Master Trans* 2002;33A:477-486.
7. In Goo Cho, De Zhe Cui, Young Joon Kim, Kyung Ku Lee, Doh Jae Lee. Biocompatibility of Ti-8Ta-3Nb alloy with fetal rat calvarial cell. *J Kor Acad Periodontol* 2006;36:849-861.
8. Nanci A, Wuest JD, Peru L et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* 1998;40:324-335.
9. Tadorelli M, Jobin M, Francois P et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clin Oral Impl Res* 1997;8:208-216.
10. Michaels C, Keller J, Stanford C, Solursh M. In vitro cell attachment of osteoblast-like cells to titanium. *J Dent Res* 1989;68:276-281.
11. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1992;7:302-310.
12. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy os dependent of surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219-2232.
13. Martin JY, Dean DD, Cochran DL et al. Proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells(MG63) cultured on previously used titanium surfaces. *Clin Oral Impl Res* 1996;7:27-37.
14. Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, Yliheikkila P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1999;14:

- 37-47.
15. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Impl Res* 1995;6:24-30.
  16. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1996;11:38-45.
  17. Wennerberg A, Ektesabi A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1997;12:486-494.
  18. Piattelli A, Manzon L, Scarano A, Paolantonio M, Piattelli M. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: An experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 1998;13:805-810.
  19. Nishiguchi S, Nakamura T, Kokubo T et al. The effect of the heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials* 1999;20:491-500.
  20. Nishiguchi S, Kato H, Fujita H et al. Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implant. *Biomaterials* 2001;22:2525-2533.
  21. Nishiguchi S, Kobayashi M, Kim HM et al. Biology of alkali- and heat-treated titanium implants. *J Biomed Mater Res* 2003;67A:26-35.
  22. Bretaudivere JP, Spillman T, Alkaline phosphatase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*, vol 4. Weinheim: Verlag Chemica 1984;75-92.
  23. Sung-Wook Kim and Woo-Kul Lee. Surface modification of biomaterials for hard tissue substitutes to improve biocompatibility and osteoconductivity. *J Korean Ind Eng Chem* 2005;6:725-730.
  24. Vrouwenvelder WCA, Groot C. and de Groot K. Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxyapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J Biomed Mater Res* 1993;27:465-474.
  25. Nygren H, Tengvall P, Lundstrom I. The initial reactions of TiO<sub>2</sub> With blood. *J Biomed Mater Res* 1997;34:487-492.
  26. Lohmann CH, Sagun R, Sylvia V et al. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> through regulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity and activation of protein kinase A. *J Biomed Mater Res* 1999;47:139-151.
  27. Kim H-M, Miyaji F, Kukubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *J Biomed Mater Res* 1996;32:409-17.
  28. Dion L, Baquey C, Monties J.R. and Havlik P. Haemocompatibility of Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials* 1993;14:122-126.
  29. Katsikeris N, Listrom RD, and Symington JM. Interface between titanium-6,4 alloy implants and bone. *Int J oral Maxillofac Surg* 1987;16:473-476.