

## 치과용 임플란트 적용 비귀금속 코어와 관련된 전조골세포의 변화

박정현, 강신영, 김종우\*, 김장주\*\*, 김웅철, 김지환

고려대학교 대학원 보건과학과 치의기공학전공, 고려대학교 대학원 보건과학과 바이오의공학전공\*

광양보건대학교 치기공과\*\*

### Changes in pre-osteoblast cells associated with non-precious metal cores with dental implants: Pilot test

Jung-Hyun Park, Seen-Young Kang, Jong-Woo Kim\*, Jang-Ju Kim\*\*, Woong-Chul Kim, Ji-Hwan Kim

Department of Public Health Sciences, Graduate school, Korea University

School of Biomedical Engineering, Graduate school, Korea University\*

Department of Dental Laboratory Technology, Gwang-Yang Health Sciences University\*\*

#### [Abstract]

**Purpose:** The purpose of this study is to investigate the non-precious metal core materials used in the dental laboratory to fabricate the implant superstructure by CAD / CAM method. And to observe and compare the morphology and distribution of the osteoblasts in relation to implant osseointegration.

**Methods:** In this study, the mandibular right first molar tooth model was selected as an international standard to produce a single core. Using this model, the impression was made with the silicone rubber, the tooth model was scanned, and a single core was designed and 5-axis milling was performed. The materials used were Cobalt-Chromium and Nickel-Chromium, and the cores for dental implant top structures were fabricated according to the procedures of the dental labs. After the fabrication, the marginal area of the core was separated and cell culture experiment was performed. The osteoblast cells used MC3T3-E1, which is currently widely used. For morphological analysis of osteoblasts, cells were post-treated and observed using CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope) and compared.

**Results:** The cell adhesion behavior of the specimen surface measured by CLSM was uniformly distributed in specimen A (Cobalt-Chromium) than in specimen B (Nickel-Chromium). The distribution and changes of the cells were different in the two specimens.

**Conclusion :** It is possible to confirm that specimen A (Cobalt-Chromium) is suitable for the living body through adhesion and proliferation of osteoblasts related to implant osseointegration in the non-precious metal superstructure used after implantation. It is considered that it is preferable to use Co-Cr when fabricating the superstructure.

● **Key words:** Dental core, CLSM, Cell culture

Corresponding author	Name	김 지 환	Tel.	02-3290-5666	E-mail	kjh2804@korea.ac.kr
	Address	서울시 성북구 안암로 145 고려대학교 보건과학대학 치기공학과				
Received	2018. 5. 1	Revised	2018. 6. 25	Accepted	2018. 6. 26	

## I. 서론

수많은 연구 결과에 따르면 보철에 널리 사용되는 비귀금속 합금은 부식되기 쉽고 금속 이온이 방출되며, 외부 화합물에 의한 부식과 마찰, 피로와 같은 다양한 형태의 부식도 이루어지고 있다(Yamanaka et al, 2012). 방출된 금속 이온은 다른 세포 및 용해성 분자와 상호 작용하여 여러 가지 부작용 중 염증, 임플란트 골유착 손상 등을 유발할 수 있다(Schmalz, 1999).

생체 재료 분야에서 비귀금속합금 중 Co-Cr 치과용 합금은 뛰어난 내마모성과 내식성 및 우수한 생체 적합성으로 인하여 정형 외과 및 치과용으로 널리 사용되어 왔다. 그러나 임플란트 식립 후, Co-Cr 상부 구조물에서 Co이온이 방출되는 문제는 구강 주변에 생리적 환경과 상호 작용에 영향을 줄 수 있으므로 결국 임플란트 기능 장애를 초래할 수 있다고 보고 되어있다(Shirdar et al, 2015).

Ni-Cr 치과용 합금은 20% 이상 Cr을 함유 하면 상대적으로 내부식성이 있지만(Wang et al, 2010), 치과 가공 과정에서 주조 조건, 열처리 절차에 따라 합금의 부식 작용을 변화시키기도 한다. 이로 인해 Ni-Cr 합금의 수복물은 음식의 맛을 변화 시키거나, 심지어 치은염을 유발할 수 있다(Tai et al, 1992). Ni은 알레르기를 일으키는 금속 중 하나이며, 민감한 사람들에게 국소 및 전신 알레르기 반응을 일으킨다(Brune, 1986). 이러한 이유 때문에 모든 Ni이 함유된 치과용 합금은 임상 적용 전과 임상 적용 후에 철저히 확인 할 필요가 있다.

따라서, 금속 이온의 잠재적 방출로 인한 임플란트의 생체 적합성을 저해시킬 수 있는 비귀금속 합금 상부 구조물의 생물학적 특성을 향상시키기 위한 상당한 노력이 이루어지고 있다. 최근 비귀금속 합금 상부 구조물의 생체 적합성을 향상시키는 가장 보편적인 기술 중 하나는 Zirconia, Lithium disilicate 같은 생체 적합성 재료를 이용하는 것이다. 특히 뛰어난 부식 저항성을 갖는 Zirconia는 체외 및 생체 내에서 생체 적합성 및 생체 내 활성을 나타내는 것으로 입증되었다(Depprich et al, 2008). 또한 근본적으로 미세 구조, 표면, 결정 구조 및 화학적 조성 뿐만 아니라 임플란트에 대한 접착력에

도 크게 영향을 주고 있다(Deepthi et al, 2017). 하지만, 현재까지 임플란트 골유착에 관여하는 세포 실험은 완전히 연구 되어 있지 않았다.

본 연구에서는 임플란트 상부구조물인 비귀금속 합금 코어 제작 시 사용되는 기본 재료인 Co-Cr, Ni-Cr 합금이 임플란트 골유착에 관여하는지에 대한 생체 적합성을 사전조사하고 비교하는 것이다. 체내 생체 활성에 직접적인 적합성을 관찰하기 위해 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포 MC3T3-E1의 부착과 증식 및 분화의 측면에서 세포 형태학적 실험이 실시 되었다.

## II. 연구 방법

### 1. 시편 제작

#### 1) 납형 제작

본 연구를 위해 하악 우측 1대구치 치형 모델(AG-3 ZPVK 46; Frasco GmbH, Tettang, Germany)을 준비 하였다. 이 모델을 이용하여 제조사의 지시에 따라 Silicone rubber(Deguflex; Degudent GmbH, Germany)로 인상을 채득하고, 석고 모형을 제작하였다. 그 후, 석고 모형을 Blue light Scanner(Identica blue; Medit, Seoul, Korea)로 스캔한 후, STL 파일로 저장하였다. 그리고 저장된 STL파일을 캐드 디자인 프로그램(Exocad; GmbH, Darmstadt, Germany)으로 이동하여 두께 0.5mm, 내면 두께 30 $\mu$ m를 부여하여 single core를 디자인하였다. 납형을 제작하기 위해 밀링장비(DWX-50; Roland DG Corporation,

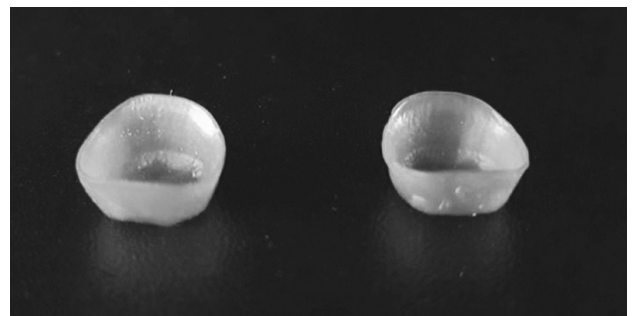


Figure 1. Wax core made by milling machine

Shizuoka, Japan)로 왁스 블럭(Vipi Block wax, Vipi, Pirassununga, Brazil)을 사용하여 5축밀링 가공을 하였다(Fig. 1).

2) 비귀금속 코어 제작

본 실험에서는 제작된 납형을 치과 기공 제작과정 순으로 매몰, 소환, 주조 하였다. 매몰은 매몰재(Bellavest SH; Bego GmbH, Germany)를 사용하였으며, 매뉴얼에 따른 혼수비로 매몰 하였고(Table. 1), 또한 소환시 매몰재 매뉴얼에 따라 소환 온도 250℃에서 1시간 계류 하고, 900℃ 온도 상승 후 2시간동안 계류 하였다. 주조는 고주파주조기(Dentaurum; Germany)를 이용하였으며, 주조에 사용 되어진 금속은 Co-Cr(StarLoy C; DeguDent, Hanau-Wolfgang, Germany), Ni-Cr(VeraBond 2V; Aalba Dent, Fairfield, CA, USA)을 사용하여 비귀금속 코어를 완성하였다(Table. 2).

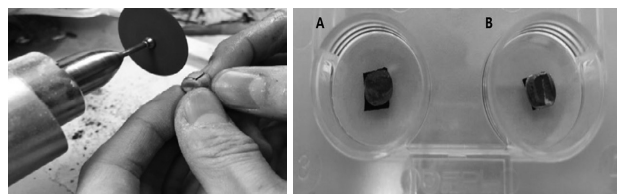


Figure 2. Samples Cutting & Trimming, Specimen A (Co-Cr) and B (Ni-Cr)

2. 세포 배양 및 후 처리

본 실험에서는 다듬어진 시편A(Co-Cr)와 시편B(Ni-Cr)를 가지고, CLSM(Confocal laser scanning microscopy)촬영을 하기 위한 준비단계로서 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포 MC3T3-E1(분주량 3 X 10<sup>4</sup>)을 이용하여, 70% 에탄올에 멸균 처리된 시편A(Co-Cr)와 시편B(Ni-Cr)을 클린 벤치에서 24시간 세포 배양을 실시하였다.

세포 배양 후 처리 공정은 우선 배지에 Suction 후 시

Table 1. Investing mixing ratio

Non-Precious	Made of wax without pressure	Bellavest-SH	HE / H <sub>2</sub> O
Co-Cr	75 ~ 85%	160g	32 / 8ml
Ni-Cr	70 ~ 75%	160g	28 / 12ml

Table 2. Composition of cobalt-chrome and nickel-chromium dental casting alloy

Metal Alloys	Purpose	Alloy composition (wt%)					
		Ni	Cr	Mo	Nb	Al	Si
StarLoy C	Dental Casting	71.85	12.8	9.0	4.0	2.5	0.5
		59.4	24.5	10.0	2.0	2.0	1.0

완성되어진 비귀금속 코어 변연 부위를 세포 배양 할 수 있는 크기인 가로 1cm X 세로 1cm(Hui Cheng et al, 2017)로 각 시편A(Co-Cr)와 시편B(Ni-Cr)를 잘라 내었고, Plate형태로 시편 표면과 모서리를 다듬어 주었다(Fig. 2).

편을 Culture plate 12Well로 옮겼으며, PBS(Posphate Buffered Saline; PBS, pH 7-7)용액으로 세척 3번 하여 FBS(Fetal Bovine Serum)를 제거하였다. 세포 고정 용액인 4% Paraformaldehyde 1ml로 실온에서 10분간 고정 후 고정액을 제거 하였고, 다시 한번 PBS(Posphate Buffered Saline; PBS, pH 7-7)으로 3번 세척 하였다. 그리고 세포벽을 깨기 위해 0.1% Triton X-100ml를 실

온에서 5분간 두었으며, Triton X용액이 남아 있으면 안 되므로 PBS(Posphate Buffered Saline; PBS, pH 7-7) 용액으로 3번 세척 하였다. 그 다음 단백질 안정화 과정으로 1% BSA(Bovine Serum Albumin)용액 1ml를 넣고 실온에서 30분간 유지 후 버리고, 세포질 염색 과정인 Paldoidin용액 1ml를 넣고 실온에서 20분 유지 후 PBS(Posphate Buffered Saline; PBS, pH 7-7)용액으로 세척 3번 하였다. 마지막으로 Well을 은박지로 포장하고 측정 전까지 냉장보관 하였다(Fig. 3).

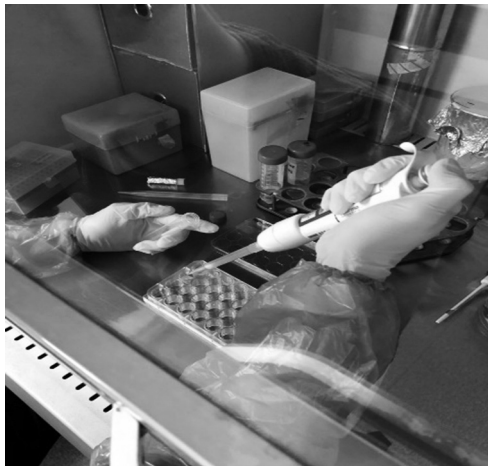


Figure 3. CLSM Post-Treatment Processing

### 3. 세포 형태 측정

본 실험에서는 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포

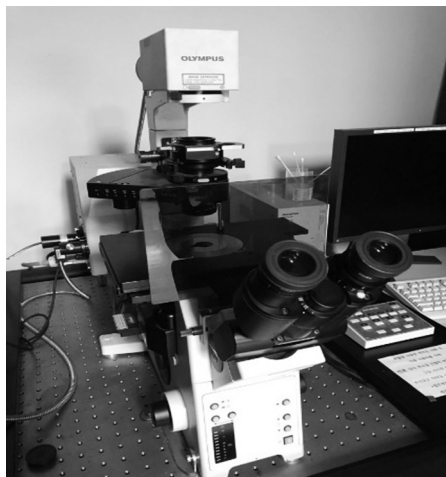


Figure 4. Cell morphology using CLSM(C1 Plus; Inverted IX81, Olympus, Japan)

MC3T3-E1으로 배양된 각 시편을 가지고, 공초점 광학 현미경CLSM으로 측정 하였다. 냉장 보관하였던 Culture plate를 꺼내어 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)용액을 사용하여 세포의 핵틴과 핵을 나타낼 수 있도록 시편 표면을 염색하였다. 그 다음 CLSM(C1 Plus; Inverted IX81, Olympus, Japan)을 사용하여 세포 형태를 측정하고 비교 관찰 하였다(Fig. 4).

### III. 결과

본 실험에서 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포 MC3T3-E1세포를 사용하여 24시간 배양 후 시편표면 관찰 실험한 결과는 배양 24 시간 후 전형적인 CLSM 이미지를 나타내며, 적색 및 청색은 핵틴 및 핵을 나타낸다(Fig. 5). Co-Cr 시편A 표면에서는 세포 부착 거동이 균일하게 잘 퍼지고 있는 세포 형태를 나타내었으며, Ni-Cr 시편B 표면에서의 세포 부착 거동은 세포가 증식 하지못하고 퍼져 있지 못한 세포 형태를 관찰 할 수 있었다.

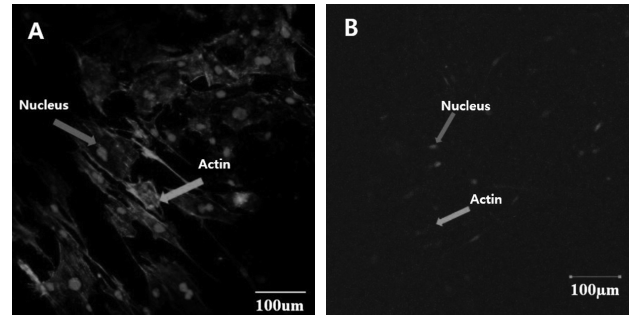


Figure 5. Cell morphology observation (A : Co-Cr and B : Ni-Cr Specimen surface Cell adhesion)

### IV. 고찰

본 연구에서는 임플란트 골유착에 관여하는 생체 적합성 선행 연구(Maria et al, 2017)를 바탕으로 비귀금속 합금의 기본 재료인 Co-Cr, Ni-Cr 합금을 임플란트 상부구조물인 코어를 제작하였다.

임플란트 상부 구조물은 비귀금속 합금 이외에 귀금

속, 폴리머, 세라믹등 다양한 생체 적합한 재료들이 존재 한다. 이러한 생체 적합한 치과용 재료를 이용함으로써 치아 수복물의 적합을 높일 수가 있다고 본다 (Altmann et al, 2013). 또한 최근 3D 프린팅 기술이 발전 하고 있는 시점에서 새로운 재료와 새로운 제작방식으로 생체 적합한 치과용 재료를 연구 함으로써 골유착에 관한 전조골세포 MC3T3-E1 이용으로 다양한 연구 실험을 할 수 있을 것으로 생각한다. 일반적으로 비귀금속 치과용 주조 합금은 보철 수복물의 약 80%를 차지한다고 한다(Quante et al, 2008). 그러나, 일반적인 치과용 비귀금속 주조 합금은 금속 이온의 방출 및 세포 독성은 완전히 연구되어지지 않은 실정이다.

본 실험에서는 비귀금속 합금인 Co-Cr, Ni-Cr 합금 변연 부위의 생체 적합성을 비교하기 위해 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포 MC3T3-E1을 이용 하였다. 이 전조골세포는 마우스 두개골 골아 세포의 세포주 이다 (Le-Guehenec et al, 2008). 세포 배양은 클린 벤치에서 배양 하였으며, 배양시 주위 환경 요구조건이 필요 하였다. 또한 후처리 공정시 프로토콜 과정을 거치면서 숙련된 기술을 가지고 있지 않으면 실험 과정에서 오류나 환경적 요인으로 인해 세포가 증식 될 수 없는 어려운 단점이 있었다.

본 연구에서 세포 형태 관찰 측정은 공초점 광학 현미경CLSM을 사용 하였다. 일반적으로 세포증식 정도는 생존 세포 증식 수를 비교해야 가능하지만, 세포 형태 관찰은 CLSM 외에도 주사전자현미경 SEM of Cell(Scanning Electron Microscope of Cell)으로 측정 관찰이 가능하다. 하지만 본 연구에서는 금속 이온에 관한 세포 부착 및 증식 관찰 연구이므로, SEM of Cell 보다는 CLSM을 선택 하였다. 주사전자현미경 SEM of Cell은 금속표면의 다공성을 관찰 할 때, 즉 세포의 형태 관찰 보다는 다공성이 있는 금속 표면에서의 세포의 부착 및 증식을 관찰 하고자 할 때 이용하는 것이다 (Casteilla et al, 2011).

구강에서 비귀금속으로 제작된 수복물은 오랫동안 지속되어 우발적으로 잇몸 조직과 이식 된 치아에서 합금 미세 입자로 부터 강한 부작용을 일으킬 수 있다 (Wataha et al, 1995). 또한 비귀금속 입자에서 이온이

더 많이 방출된다면 국소적인 세포 독성을 나타내며, 다른 생체 분자에 의해 입자의 식균 작용시 싸이토카인 및 식세포를 자극하여 유발되는 염증 반응을 일으킬 수 있다(Conserva et al, 2013). 특히 Ni-Cr 비귀금속 합금 코어 변연 부위에서는 세포 부착 거동의 세포 형태를 보면 세포가 증식하지 못한 것을 볼 수 있으며(Jimbo et al, 2011), 이것은 생체 적합성이 낮다고 볼 수도 있기 때문이다.

따라서 본 연구는 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포 MC3T3-E1을 이용하여 CLSM으로 시편 표면의 세포 형태를 관찰 하는 것으로, 임플란트 식립 후 치아 수복물이 구강에서의 마찰이나 오랜 기간 사용 후 코어 변연 부위에서 비귀금속의 이온 누출로 인한 생체 적합성을 판단 하기 위한 사전조사 연구이다.

## V. 결론

본 연구에서는 골 형성 전 골아 세포인 전조골세포 MC3T3-E1을 이용하여, 제작된 비귀금속 합금 코어 변연 부위의 조골세포 형태와 분포를 분석한 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시편A(Co-Cr)와 시편B(Ni-Cr)을 비교 하였을 때 시편A에서 시편B 보다 세포의 증식이 활발 하였다.
2. 시편A(Co-Cr)에서 세포의 증식 분포가 시편 B(Ni-Cr)보다 균일하고 활성화 되어 있는 것을 관련해 본 바 시편A(Co-Cr)는 시편B(Ni-Cr)보다 생체 적합한 가능성을 확인 할 수 있으므로 이는 가능한 임플란트 상부구조물 제작시 Co-Cr를 사용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

단, 이 결론은 여러가지 시험 조건과 경제적 여건을 고려하고 연구의 변창성을 정하기 위한 사전 조사의 성격을 지니고 있으므로 추후 연구가 더 진행된 후에 결과를 살펴 봐야 할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- Altmann B, Kohal BJ, Steinberg. Distinct cell functions of osteoblasts on uv functionalized titanium-and zirconia-based implant materials are modulated by surface topography, vol. 19, 11, 850-863, 2013.
- Brune D. Metal release from dental biomaterials. *Biomaterials*, 7, 163-175, 1986.
- Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cell*, 3, 25-33, 2011.
- Cheng H, Zhang Y, Zhang B, Cheng J. Biocompatibility of polypropylene mesh scaffold with adipose-derived stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6, 13-6, 2017.
- Conserva E, Menini M, Ravera G, Pera P. The role of surface implant treatments on the biological behavior of SaOS-2 osteoblast-like cells, An in vitro comparative study, *Clin Oral Implants Res*, 24, 880-889, 2013.
- Deepthi R, Sathyanarayanan S, Danyal A, Siddiqui, Pilar V, Danieli C. Rodrigues. Detoxification of Titanium Implant Surfaces: Evaluation of Surface Morphology and Bone-Forming Cell Compatibility. *Journal of Bio and Tribo-Corrosion*, 3, 4, 2017.
- Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med, J Oral Implantology*, 4, 30, 2008.
- Jimbo R, Fernandez-Rodriguez J, Sul YT, Johansson CB. Principal component analysis: A novel analysis to evaluate the characteristics of osseointegration of different implant surfaces. *Implant Dent*, 20, 364-368, 2011.
- Le-Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater*, 4(3), 535-43, 2008.
- Maria Menini, Paolo Pesco, Francesco Pera. Biological and mechanical characterization of carbon fiber frameworks for dental implant applications, *Materials Science and Engineering: C*, 70(1), 1, 646-655, 2017.
- Quante K, Ludwig K, Kern M. Marginal and internal fit of metal-ceramic crowns fabricated with a new laser melting technology. *Dent Mater*, 24, 1311-1315, 2008.
- Schmalz G. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Trans Acad Dent Mater*, 13, 97-114, 1999.
- Shirdar MR, Izman S, Taheri MM, Assadian M, Kadir MRA. Effect of post-treatment techniques on corrosion and wettability of hydroxyapatite-coated Co-Cr-Mo alloy, *Arab J Sci Eng*, 40, 1197-1203, 2015.
- Tai Y, De Long R, Good kind RJ, Douglas WH. Leaching of nickel, chromium, and beryllium ions from base metal alloy in an artificial oral environment. *J Prosthet Dent*, 68, 692-697, 1992.
- Wang X, Xia Y, Liu L, Liu M, Gu N, Guang H, Zhang F. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 95, 357-364, 2010.
- Wataha JC, Malcolm CT, Hanks CT. Correlation between cytotoxicity and the element release

by dental casting alloys, Int J Prosthodont,  
8, 9-14, 1995.

Yamanaka K, Mori M, Kurosu S, Matsumoto,  
Chiba, A. Origin of Significant Grain  
Refinement in Co-Cr-Mo Alloys Without  
Severe Plastic Deformation, Metall Mater  
Trans A, 43, 4875-4887, 2012.