



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의과학석사학위논문

타이타니아 나노튜브의 지름 변화에  
따른 인간 치은아세포의 형태 및  
기능 연구

2016년 2월

서울대학교 치의학대학원

치의과학과 치주과학전공

황 재 호

타이타니아 나노튜브의 지름 변화에  
따른 인간 치은아세포의 형태 및  
기능 연구

A study on morphology & function of human  
gingival fibroblast according to the titania  
nanotube diameter

지도교수 김 성 태

이 논문을 치의과학석사학위논문으로 제출함

2015년 12월

서울대학교 대학원  
치의과학과 치주과학전공  
황 재 호

황 재 호의 석사학위논문을 인준함

2015년 12월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)  
부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)

국문 초록

# 타이타니아 나노튜브의 지름 변화에 따른 인간치은아세포의 형태 및 기능 연구

황 재 호

서울대학교 치의학대학원

치위과학과 치주과학전공

## 1. 목 적

이 연구의 목적은 임플란트 지대주 주변 연조직의 타이타니아 나노튜브의 효과를 평가하기 위하여 사람 치은섬유아세포의 나노튜브의 지름에 따른 형태와 기능변화를 관찰하고자 한다.

## 2. 방 법

2014년 8월부터 9월에 걸쳐 서울대학교 치과병원 치주과에서 건강한 20대의 2명의 자원자로부터 임상치관연장술중에 치은을 제공받았다. 이 치은으로부터 섬유아세포를 분리하였다.

총 144개의 타이타니아 나노튜브박막을 전기연마군, 지름30나노미터, 지름70나노미터, 지름100나노미터 4가지군으로 나누었다. 각각의 접촉 각과 거칠기를 측정 한 후에 치은아세포를 각 군에 배양하였다. 세포의 방향성을 면역화학적 분석법으로 24시간과 7일 후에 평가하였으며 세포의 증식을 MTT분석법으로 24시간, 3일, 7일후에 평가하였다. 세포의 부착을 평가하기 위하여 하루동안 배양한 후 느슨하게 부착된 세포를

제거한 후 Live-Dead bacterial vitality 분석법으로 분석하였다. 비모수적인 방법으로 평가하였으며 두 군사이의 차이를 Mann-Whitney test로 세군이상의 차이를 Kruskal-Wallis test로 평가하였다.

### 3. 결 과

나노튜브의 직경이 늘어남에 따라 접촉각은 감소하는 양상이 보였으며 거칠기와 세포의 증식, 방향은 나노튜브군과 전기연마군이 유의한 차이를 보였다.

### 4. 결 론

나노튜브상의 배양은 사람 치은섬유아세포의 형태와 기능에 변화를 주는 것 같다. 그것이 임플란트 주위 연조직에 긍정적인 영향을 주는지는 명확하지 않다.

---

주요어 : 임플란트, 연조직, 타이타니아 나노튜브, 사람 치은아세포  
학 번 : 2013-21802

# 목 차

1. 서론	1
2. 재료와 방법	2
2. 1. 세포 획득 및 배양	4
2. 2. 타이타늄 호일의 준비	5
2. 3. 거칠기 측정	5
2. 4. 접촉각 측정	5
2. 5. 세포의 배열방향 평가	5
2. 6. 세포의 부착	6
2. 7. 통계적 처리	6
3. 결과	7
3. 1. 거칠기와 접촉각	7
3. 2. 세포의 방향성	7
3. 3. 세포의 증식	9
3. 4. 세포의 부착	10
4. 고찰	10
5. 결론	13
6. 참고문헌	14
7. 영문초록	19

## 표 목 차

표 1. 거칠기와 접촉각	7
---------------	---

## 그림 목 차

그림1. 1일째의 면역형광염색현미경사진(세포의 배열 및 형상)	8
------------------------------------	---

그림2. 7일째의 면역형광염색현미경사진(세포의 배열 및 형상)	8
------------------------------------	---

그림3. MTT 분석결과	9
---------------	---

그림4. 면역형광염색현미경사진(세포의 부착)	10
--------------------------	----

# 1. 서론

1987년 Mombelli 등[1]이 1년 이상 유지된 오버텐처 착용 환자의 임플란트 중 6밀리미터 이상의 치주탐침깊이를 가지고 농과 함께 골소실이 방사선적으로 관찰된 군을 실패한 군으로 정의 한 후에 세균분석을 시행한 결과 이러한 병증을 임플란트 주위염이라는 단어로 정의하였다. 그 후에 여러 학자들에 의해 세부적으로 연구되어 2013년 미국치주과학회에서는 임플란트 주위질환이라는 큰 범주아래 임플란트 주위 연조직에 염증이 있는 임플란트주위점막염과 연조직과 함께 치조골의 소실까지 있는 임플란트주위염으로 분류하였다.[2] 그 분류에 의하면 임플란트 주위점막염은 탐침깊이 4밀리미터 이상과 탐침시 출혈이 일어나며 방사선 사진상 골소실이 보이지 않는 경우이고 가역적이며 임플란트 주위염은 탐침시 출혈과 함께 골소실이 동반된 경우이다. 임플란트주위조직질환의 진행은 치주병원균의 부착에 의한 염증반응에 의해 시작된다. 이러한 염증반응은 임플란트 주위조직의 방어막을 상실케하고 세균들이 임플란트 표면을 따라내려가 지속적인 염증과 골소실을 유발하게 된다.

Berglundh등[3]은 동물실험에서 치아주위조직과 임플란트 주위조직을 비교한 결과 두 조직 모두 높은 정도로 각화된 상피를 가지고 있고 접합상피가 에나멜질이나 티타늄표면에 부착되어 있는 것을 보여주었다. 그러나, 임플란트주위조직의 교원섬유는 치아 주위조직과 다르게 임플란트 식립체에 평행하게 주행한다고 하였다. 두 조직 모두 거의 같은 형상을 지니고 있고 정기적인 치태제거로 잘 유지되는 것으로 보아 정상치은과 임플란트 주위점막이 치은연하치태의 형성을 방해하는 잠재적인 능력이 있는 것으로 보인다고 보고하였다. 임플란트의 점막관통부위의 조직은 정상치은조직과는 다르게 교원섬유의 주행방향이 다르고 결합조직부의 혈관과 섬유아세포의 수도 적다. 따라서, 임플란트 주위 조직은 연약한 연조직부착을 지니게 된다. 이러한 약하게 부착된 연조직은 세균침입에 취약점이 된다. 이러한 연조직부착을 Abrahamsson등[4]이 연조직장막(mucosal barrier)이라고 언급하였다.



연조직장막의 중요성은 여러 연구에서 보여주고 있다. Tonetti등[5]은 자연치아주위조직과 임플란트 주위조직의 면역화학적 분석결과 모두에서 비슷한 정도의 면역세포수와 종류, 염증정도를 가지고 있는 것으로 보였고 기능적으로 두 부위가 비슷하며 임플란트의 장기간의 성공을 위해서는 임플란트 주위조직의 국소적 면역반응이 중요하다고 하였다. Adonogianaki등[6]도 치은열구액과 임플란트 주위 열구액을 비교 분석한 결과 비슷한 결과를 얻었다. Lindhe등[7]은 임플란트 주위조직이 자연치은과 비슷한 국소적인 면역반응을 보이는 것으로 보아 임플란트의 장기적 유지에 중요한 역할을 한다고 하였다.

연조직 장막의 견고함을 향상시키기 위하여 재료, 거칠기, 표면처리 같은 여러 차원에서의 접근이 이루어졌다. 임플란트 지대주 재료의 경우 Abrahamsson등[8]은 금합금은 염증세포 침윤이 많고 기저골의 소실이 있어 연조직장막에 좋지않고 타이타늄과 세라믹은 적절한 연조직 부착이 일어났다고 하였다. 그리고 Welander등[9]는 타이타늄과 지르코니아는 좋은 부착을 보였으나 금합금이 좋지 않다는 연구결과를 보고 하였다. Linkenvicus등[10]이 시행한 systematic review에서 9개의 연구가 채택되었는데 금합금과 타이타늄은 어느 것이 더 우월하진 명확하지 않으며 조직학적 소견으로는 지르코니아가 가장 우수하게 나왔다고 결론 지었다.

재료의 차이와 함께 표면의 거칠기 또한 변수가 될 수 있다. Quirynen 등[11]은 거칠기가 낮아 질수록 세균의 부착도 낮아지나 상피나 결합조직의 부착도 낮아진다고 기술하였고 그 균형점을 찾아 역치 거칠기로 명명하였다. Norowski등[12]은 임플란트 주위조직질환을 피하기 위한 여러가지 표면처리법의 연구를 몇가지로 분류하였다. 첫번째로, 세균의 부착을 막기위한처리법으로 강한 친수성의 표면, 결정화된 티타늄 표면, 여러가지 이온처리법을 제시하고 그 한계점을 소개하였다. 두번째로 표면에 약제를 공유 결합시켜 항상 항균성을 유지 시키는 것으로 장시간의 항균성을 지니지만 이러한 특성 자체가 조직반응에 좋지 않을수 있다고 하였다. 세번째로 타이타니아( $TiO_2$ )표면 자체가 가지고 있는 항균성을

이용하는 것인데 타이타니아 표면에 자외선을 8분 이상 쬐면 75-95%의 세균이 사멸하는 것으로 나타났다. 그러나, 빛의 투과성에 따른 도달 범위때문에 그 적용에 한계가 있다. 네번째, 미량의 은이온이나 아연이온은 항균효과를 가지고 있으나 세포독성을 가지고 있지 않은 것을 이용하는 것인데 화학적 증기 침착법으로 임플란트 표면에 침착시킬수 있다. 그러나 이 방법은 효과가 명확하지 않다. 다섯번째로 항생제를 지속적으로 방출시키는 표면처리법이다. 생체 내에서 녹는 물질을 운반자로 지속적으로 항생제를 유리시키는 방식이다. 지속시간에 한계가 있기 때문에 임플란트 주위질환이 발병했을때 기능하지 않을 수 있고 병원성이 아닌 정상세균총까지 영향을 받을 수 있다. 마지막으로 나노 또는 마이크로 수준에서 물리학적 구조를 두는 방법이다. Nevins등[13,14]은 Laser-Lok®이라고 명명한 마이크로 레벨의 표면처리의 임플란트 지대주를 사람과 동물에 적용한 결과에 대하여 보고하였다. 그것은 레이저로 음각한 마이크로 단위의 틈을 가지고 있는데 그것은 변연골 흡수를 야기하는 상피세포의 치근단 이동을 방해하는 유익한 교원섬유의 진행방향 가지게 한다고 하였다.

나노단위의 구조물들은 세포레벨에서 여러가지 행동을 제어하는 것으로 나타났다.[15] 임플란트의 골유착과 관계하여 조골세포에서의 연구가 많이 이루어졌는데 세포의 분화, 부착, 증식에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 나노크기의 구조물을 만드는 방법이 여러가지가 소개되고 있다.

티타늄 표면의 산화막인 타이타니아는 20년이상 재료공학 분야에서 연구된 재료이다. 태양광발전, 전기염색, 김서림방지, 자가세척등 넓은 분야에서 폭넓게 적용되어 왔다. 이러한 특징적인 효과를 지닌 타이타니아의 표면적을 넓게하기 위하여 나노크기의 구조물을 만드는것이 넓게 사용되기 시작하였고 나노구조물간의 크기 차이를 만들어 주위를 둘러싸고 있는 물질의 전기적, 물리, 화학적 변화를 제어하게 되었다. 전기화학적 방법으로 타이타니아를 처리할경우 여러가지 정도의 표면성상을 지니게 되는데 전기연마, 조밀한 산화층, 정렬된 산화층(nanotube,

nanopore), 불규칙한 정리되지 않은 나노튜브등으로 나눌 수 있다. 다른 규칙적인 나노구조물을 만드는 방법과와는 다르게 전기화학적 산화방법으로 간단하게 스스로 생성되어 만드는 장점이 있어 대규모로 생산할 수 있는 영역에 유리하다.[16]

2008년 연구[17]에서 나노튜브의 직경을 조절함으로써 세포의 상호작용을 조절함을 발견했는데 간엽세포를 나노튜브상에 배양한 결과 15나노미터크기에서는 강한 세포부착, 증식, 분화를 보여주었고 100나노미터에서는 세포사멸을 나타냈다. 같은 연구자들의 다른연구에서는 간엽세포뿐만 아니라 혈관내피세포[18], 조골세포[19]에서도 직경에 따라 상호작용을 보여주었다. 또한, 타이타니아 나노튜브의 성상은 무엇을 담을 수 있는 캡슐모양으로 제안되어 연구가 진행되었다. 약제를 튜브상에 저장하여 튜브를 막은 후 빛, 전기, 방사선등 여러가지 자극으로 약제의 적용시기를 조절할 수 있고 튜브를 막는 재질을 다양하게 하여 약제의 해리를 일정하고 길게 가져가게 하는 방법도 소개되고 있다.[20]

본 연구의 목적은 타이타니아 나노튜브를 치과용 임플란트의 지대주에 적용하여 임플란트 주위 연조직의 견고성을 향상시킬 수 있는 가능성을 알아보고 여러가지 직경에서의 사람치은섬유아세포의 행동과 기능을 평가하여 필요한 자료를 얻고자 한다.

## 2. 재료와 방법

### 2. 1. 세포 획득 및 배양

2014년 8월부터 9월 사이에 서울대학교 치과병원 치주과에서 임상치관 연장술을 시행한 환자 2명을 대상으로 치은조직을 채취하여 분리하였다. 이러한 과정은 서울대학교 치과병원의 실험윤리위원회의 승인을 받았다. 섬유아세포는 10% Fetal bovine serum과 1% 항생제를 넣은 MEM alpha(Life technology, Grand Island, NY, USA) 배양액에서 배양하였다.

## 2. 2. 타이타늄 호일의 준비

타이타늄 호일표면에 다음과 같이 양극처리하였다. 0.2mm두께의 타이타늄(10mm x 10mm,Hyundai Titanium, 99.5%, South Korea)시트를 사용하였다. 이 시트를 아세톤과 탈이온화 증류수로 세척한 후 0.5 w/v% 불산(Merck, 48 w/v%, NJ, USA)을 가진 아세트산 (JT Baker, 98 w/v%, NJ, USA; Volumetric Ratio=7:1)용액 안에서 5,15,20 V의 전압으로 1시간동안 처리하였다. 백금 전극을 반대편에 설치하였고 이러한 시편은 탈이온화 증류수로 세척한 후 60℃에서 말린 후 500℃에서 2시간동안 놓아 무정형의 결정질을 아나타제(Anatase) 형태로 바꾸었다.

## 2. 3. 거칠기 측정

Confocal laser scanning microscopy (LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 거칠기를 측정하였다. 한 시편에서 3군데의 측정치를 계측하여 평균 내어 사용하였다.

## 2. 4. 접촉각 측정

각각의 시편을 아세톤, 에탄올과 탈이온화 물에 넣어 초음파세척기로 각각 30분씩 처리한 후 탈이온화 증류수를 사용하여 측정하였다. 물방울은 마이크로단위의 주사기를 사용하여 놓았으며 즉시 사진을 찍어 접촉각 측정을 하였다,(FTA-125, First Ten Angstroms, Portsmouth, VA, USA) 각각의 값은 최소한 3번이상 독립되어 측정하였다.

## 2. 5. 세포의 배열방향평가

세포의 모양과 방향성을 평가하기 위하여 각군(30나노미터,70나노미터,100나노미터,전기연마)과 조건(1일,7일)당 6개씩의 시편 위에 조건에 맞추어 5000개씩 분주후 배양하였다.

F-actin염색을 위한 phalloidin염색과 핵염색을 DAPI 염색을 행한후 620나노미터(red)과 350나노미터(blue)의 파장으로 confocal laser scanning microscopy(LSM700, Carl ZeissOber, kochan, Germany) 관찰하여 평가하였다.

## 2. 6. 세포의 증식

세포의 증식 정도를 평가하기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)분석법을 사용하였다. 각 군(30나노미터,70나노미터,100나노미터,전기연마)과 조건(1일,3일,7일)당 6개씩의 시편위에 조건에 맞추어 5000개씩 분주후 배양하였다. 각 시편에서 세포를 떼어낸 후 생리 식염수로 용해한 MTT 용액 50 $\mu$ l를 첨가한 후 4시간 동안 방치하였다. 96 well plate로 옮겨 반응액을 제거하고 200 $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해한 후 ELISA reader로 파장 570나노미터에서 흡광도를 측정하였다.

## 2. 7. 세포의 부착

세포의 부착은 세포를 각군당 6개씩 초기에 2500씩 배양한후에 24시간이 지난후 배양액은 빨아낸 후 HBSS(Life technology, Grand Island, NY, USA)액을 500 $\mu$ l씩 넣은 후 shaker에 100rpm정도의 속도로 5분간 2번씩 느슨하게 붙은 세포를 제거하였다.

LIVE/DEAD® BacLight Bacterial viability kit(Molecular Probes,Eugene, OR, USA)를 사용하여 처리 한후 510~540나노미터(green)과 620~650나노미터(red)의 파장으로 confocal laser scanning microscopy(LSM700, Carl Zeiss, Oberkochan, Germany) 관찰하여 각각의 총 세포수를 계산하였다.

## 2. 8. 통계적 처리

통계처리는 정규성 검정결과 비모수적으로 평가하였다. 두군 간의 비교

는 Mann-Whitney test을 세군 이상의 비교는 Kruskal-Wallis test를 시행 하였다. SPSS22 (IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하였다.

### 3. 결과

#### 3. 1. 거칠기와 접촉각

표 1. 거칠기(Ra) 와 접촉각(° )

	30나노미터	70나노미터	100나노미터	대조군
Ra( $\mu\text{m}$ )	0.128	0.101	0.143	0.142
접촉각(° )	11	7	4	54

거칠기 값은 모든 군에서 큰 차이를 보이지 않았지만 접촉각에서는 전기연마를 한 군과 나노튜브군들 사이에서 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 나노 튜브직경 값이 증가할수록 접촉각이 낮아지는 경향을 보였다. 30나노미터에서는 거칠기 값인  $Ra=0.128$ , 접촉각은  $11^\circ$  였고 70나노미터에서는  $Ra=0.101$ , 접촉각은  $7^\circ$  였으며 100나노미터에서는  $Ra=0.143$ , 접촉각은  $4^\circ$  전기연마군에서는  $Ra=0.142$ , 접촉각은  $54^\circ$  로 측정되었다.

#### 3. 2. 세포의 방향

##### 3. 2. 1. 배양 후 1일

1일째에는 나노튜브의 직경이 커질수록 세포가 길어지는 양상이지만 전체적인 배열의 규칙성은 보이지 않았다,

##### 3. 2. 2. 배양 후 7일

7일째에서는 세포의 형태는 관찰하기 어렵지만 전체적인 배열양상이 전기연마군은 불규칙하지만 타이타니아 나노튜브군은 일정한 방향성을

지니고 있는 것을 알 수 있다, 하지만, 이 방향성이 무엇을 기준으로 형성되는지는 알 수 없다.

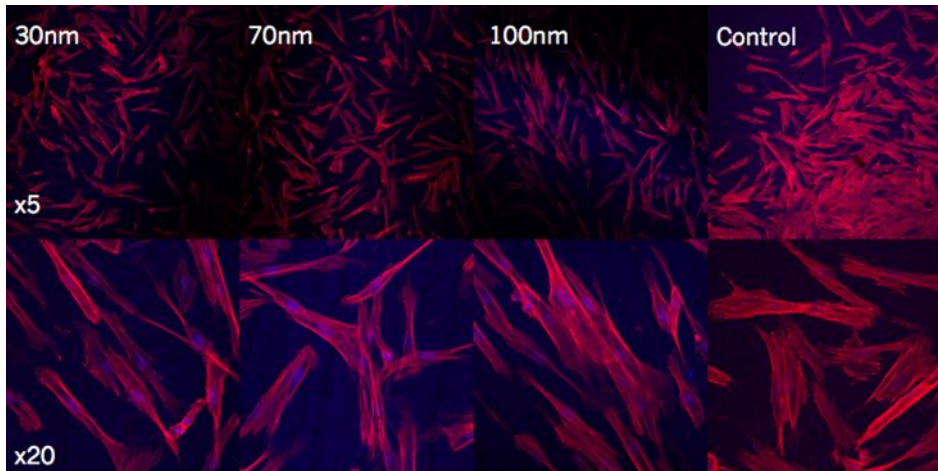


그림 1. 1일째의 면역형광염색현미경사진(세포의 배열 및 형상)

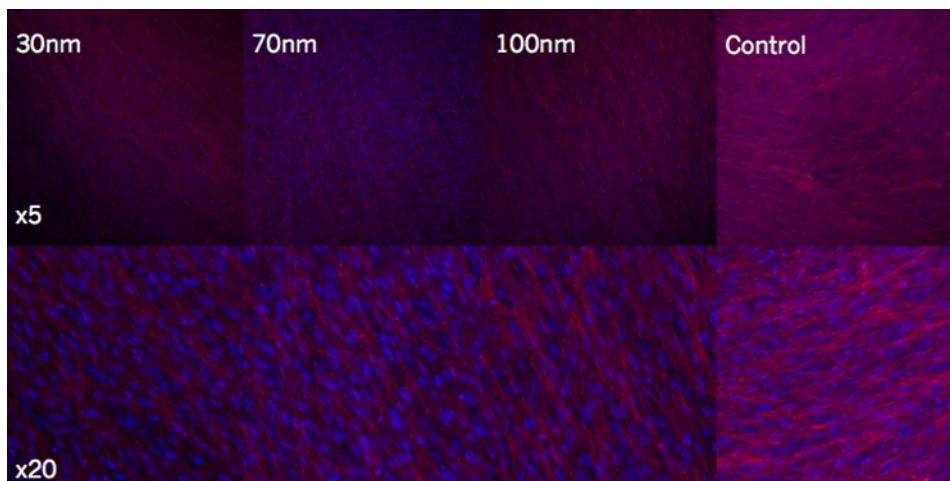


그림 2. 7일째의 면역형광염색현미경사진(세포의 배열 및 형상)

### 3. 3. 세포의 증식

세포의 증식 평가 결과 1일째에는 모든 군이 차이가 없었지만 3일에는 70나노미터와 100나노미터군이 전기연마군과 차이를 보였고( $p < 0.05$ ) 7일째에는 나노튜브군 모두가 전기연마군과 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 하지만, 어떤 시간대에서도 나노튜브간의 통계학적 유의성이 보이지 않았다.

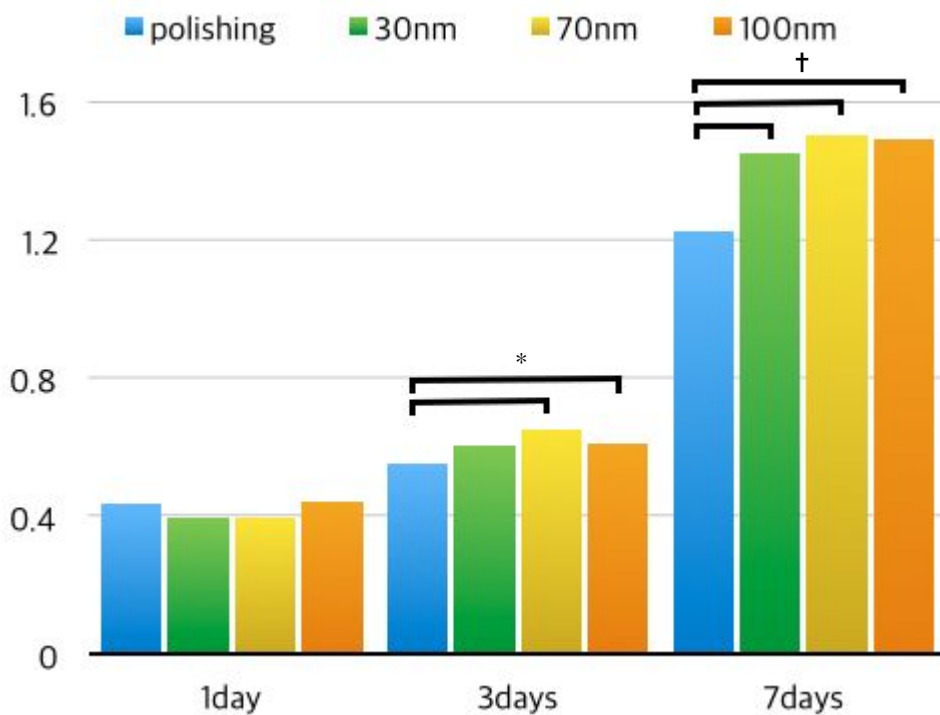


그림 3. MTT 분석 후 3일(\*)에는 70나노미터, 100나노미터이 전기연마군과 차이를 보였고( $p < 0.05$ ) 7일(+)에는 나노튜브군 모두가 전기연마군과 차이를 보인다.( $p < 0.05$ )



### 3.4 세포의 부착

세포의 부착은 전 군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

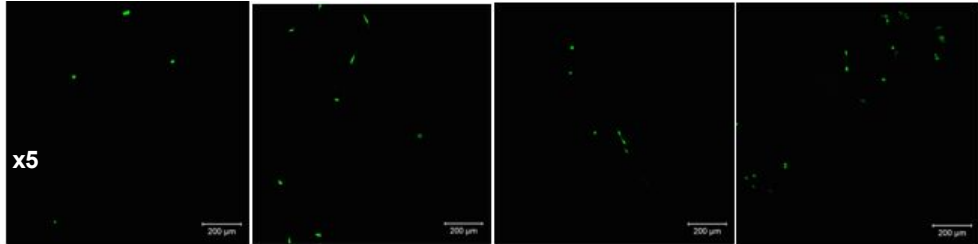


그림 4. 면역형광염색현미경사진(세포의 부착)

## 4. 고찰

접촉각과 거칠기 실험에서 거칠기는 비슷하나 접촉각에서는 나노튜브의 직경이 증가할수록 접촉각이 낮아지는 경향이 보였다. 점막임플란트 관통부위에서 거칠기는 세균부착과 연조직부착의 균형점을 찾을수 있다는 점에서 중요하다. Weber등[21]은 너무 연마된 표면의 경우 연조직이 지대주에 부착되지 않고 상피가 근단이동하는 현상이 심화된다고 보고하였고 앞에서 언급한바와 같이[11] 그 균형점을 거칠기 값이 0.2 마이크로미터로 기술하였다. 이 실험에서는 대체적인 거칠기 값이 균형점 아래로 형성되어 연조직 부착에 도움이 된다고 볼 수는 없고 결과에서 거칠기 값으로 인한 차이는 없다고 볼 수 있다.

접촉각은 나노튜브의 직경이 커질수록 낮아지는 경향을 보였다. 접촉각으로는 표면자유에너지와 젖음성을 평가할 수 있다. 세포나 세균이 표면에 붙기 위해서는 거칠기와 더불어 이 두가지가 중요한 요인이다. Hallab 등[22]은 여러가지 표면에서 거칠기와 표면자유에너지중 어느 것이 더 우세한 요인인지 알아보는 실험에서 폴리머같은 낮은 표면에너지를 가지는 물질에서는 거칠기가 중요한

요인이고 금속같은 높은 표면에너지를 가지는 물질에서는 거칠기가 중요하지 않다고 보고하였다. 그리고, 세포외기질을 관찰한 결과 낮은 표면에너지를 가지는 물질에서 분비량과 기질과 세포사이의 간격이 넓게 나타나 거칠기를 조절하는 것보다 표면에너지를 조절하는 것이 더 효율적이라고 말하였다. Altankov등[23]은 젖음성이 다른 표면에서 세포의 성장을 본결과 젖음성이 큰 친수성인 표면에서 더 부착과 성장이 잘 일어난다고 보고하였고 세포의 부착을 담당하는 fibronectin이 친수성이 큰 표면에서 더 많이 형성되었다. Ponsonnet등[24]은 조성을 달리한 타이타늄 합금표면에서 섬유아세포의 부착과 성장을 관찰하여 거칠기, 젖음성, 표면에너지와 관찰하였는데 표면에너지가 가장 중요한 요인이나 거칠기가 세포의 성장과 표면에너지 관계를 강하게 간섭할 수 있다고 결론 내렸다. 접촉각이 낮아지면 친수성이 증가하게 되고 세포의 부착이 잘되는 경향이 있다. Legeay[25]는 친수, 소수성 표면에 따른 세균 부착에 관해 연구하였는데 너무 강한 친수성 표면은 표면에 자발적인 물분자막이 형성되어 다른 세포나 세균들의 부착을 막게 된다고 보고하였다. 본 실험에서는 동일한 거칠기에서 나노튜브를 처리한 표면의 젖음성이 높아지는 것을 보여주었다. 이것은 표면에너지의 변화로 인한 결과로 볼 수 있는데 친수성이 높은 표면을 형성되었기 때문에 세포의 부착에는 더 유리할 것으로 보인다.

세포의 모양은 대조군에 비하여 실험군들이 전체적으로 형태가 길어지고 일정한 방향으로 배열되는 특징을 보였다. Smith등[26]은 피부상피세포와 피부섬유아세포를 대상으로 나노튜브상에서 배양한 결과 규칙적으로 배열되고 세포의 형상이 길어지는 것을 보고 하였다. 이 실험에서는 70나노미터-90나노미터의 직경을 가지는 표면에서는 상피세포의 부착은 좋지 않고 섬유아세포의 부착이 좋아지는 것을 보여주었다. 그 이유로 저자는 상피세포의 경우 그것의 크기가 나노튜브의 직경에 맞지 않아서이고 섬유아세포의 경우 모양이 길어지는 것은 세포의 범위가 넓어지기 때문에 부가적인 부착능을 얻을 수 있을 것이라 하였다.

규칙적인 미세구조를 가진 타이타늄 표면위에서 세포들이 정렬하는 것은 많은 연구에서 볼 수 있었다. Loesberg 등 [27]은 다양한 너비의 나노단위의 홈을 평행하게 형성한 폴리스티렌 표면에 섬유아세포를 배양한 결과 일정한 방향성을 가지는 것을 보여주었고, Kim 등 [28]은 타이타늄 표면에 여러가지 너비를 가진 홈을 평행하게 형성하여 섬유아세포를 배양한 결과 일정한 방향성을 가지고 세포의 부착에 관계되는 단백질 발현을 조사한 결과 특정 크기에서 발현정도가 높아지는 것을 보여주었다. Chou 등 [29]은 표면의 물리적인 형태 변화가 세포의 크기나 모양을 변화 시킬 수 있고 기능까지 변화시킬 수 있는 것은 보여주었다. Kearns 등 [30]은 Polytetrafluoroethylene 표면에 나노단위의 섬유를 배열하여 섬유아세포를 배양하여 세포의 방향성을 조정하고 그것의 생성물인 교원섬유의 방향을 일정하게 배열하는 것을 보여주었다. 저자는 이러한 방향성은 자연치와 섬유주행방향을 만드는데 도움이 될 것이라고 하였다. 본 실험에서는 세포의 성상이 길어지고 배열이 일정해지는 것으로 보아 부착에 도움이 되고 교원섬유의 방향을 조정할 수 있는 가능성을 보였다.

세포의 증식은 나노튜브군들 사이에서는 큰 차이를 보이지 않았는데 선행연구 [26,31]에서도 대부분의 결과가 같았다. 조골세포를 이용한 Brammer 등 [32]의 연구에서도 세포의 증식차이는 크지 않았다. 따라서 직경의 크기에 따라 기능적 지표가 다르게 나온다면 이것은 세포의 증식에 의해서하기보다는 세포 자체의 기능활성변화에 의한 것으로 가정할 수 있다. 70나노미터에서 가장 긍정적인 결과가 나왔으나 통계학적 유의성을 찾을 수 없었다.

세포의 부착을 평가 했을때 모든 군에서 차이가 없는 것으로 나왔다. Oh 등 [33]은 여러가지 직경의 나노튜브상에 사람중배엽기원줄기세포를 배양한 결과 나노튜브의 크기에 따라 분화정도나 부착정도가 달라진다고 보고하였다. 구강내 환경에서는 세균이 존재하기 때문에 세균 또한 중요한 고려 요소가 될 수 있는데 Perez-Jorg 등 [34]은 두 가지 직경을 가

지고 불소의 유무를 달리한 나노튜브를 처리한 표면위에 Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis를 배양한 결과 불소에 유무에는 반응을 하였으나 직경에는 차이가 없었다. Puckett등 [31]은 통상적인 타이타늄과 생성방법이 다른 세가지의 나노구조물 (nanorough, nanotubular, nanotextured)상에 Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa 의 부착을 보았다. 표면의 조성을 본 결과 타이타니아가 결정형과 무정형 차이를 보였고 그 차이로 인하여 세균의 부착이 틀려진다고 보고 하였다. 위의 두 연구 모두 아무것도 함유하지 않은 타이타니아 나노튜브의 경우 세균의 부착이 많은 것을 관찰 할 수 있었다. 나노튜브의 직경에 따라 세포의 부착이 틀려지는 것은 맞으나 아직 세포의 종류에 따른 권장되는 직경크기는 연구마다 조금씩 다르다. 특히, 세균의 부착도 같이 늘어나는 경우도 있는 것으로 보아 임플란트 지대주의 재료로 쓰기 위해서는 보완이 필요하다.

이 연구의 한계로는 실험 군수가 충분하지 않아 나노튜브 직경간의 차이를 충분히 나타내지 못했을 수 있다. 세포형태의 변화에 의한 세포기능을 고려하여 유전자, 단백질평가가 있어야하며, 연조직 장막의 다른 요소인 각질세포와의 관계를 고려하지 않았다. 연조직 장막에서는 결합조직의 부착이 더 중요하기 때문에 섬유아세포가 더 빨리 증식, 부착되며 적절한 정도의 각질세포부착을 얻을 수 있는 조건을 찾아야한다. 또한, 임플란트주위염을 유발시키는 것으로 알려진 몇몇 세균에 대한 부착정도도 고려해야한다.

## 5. 결론

타이타니아 나노튜브는 섬유아세포의 형태와 기능에 영향을 주는 것 같다. 이러한 변화는 연조직 장막에 도움이 되는지는 확실하지 않다.

## 6. 참고문헌

1. Mombelli A, Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiology and Immunology* 1987;2:145-51.
2. Academy Report: Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis: A Current Understanding of Their Diagnoses and Clinical Implications. *Journal of Periodontology* 2013;84:436-43.
3. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thornsén P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clinical Oral Implants Research* 1991;2:81-90.
4. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. The mucosal barrier following abutment dis/reconnection. *Journal of Clinical Periodontology* 1997;24:568-72.
5. Tonetti MS, Imboden M, Gerber L, Lang NP. Compartmentalization of inflammatory cell phenotypes in normal gingiva and peri-implant keratinized mucosa. *Journal of Clinical Periodontology* 1995;22:735-42.
6. Adonogianaki E, Mooney J, Wennstrom JL, Lekholm U, Kinane DF. Acute-phase proteins and immunoglobulin G against *Porphyromonas gingivalis* in peri-implant crevicular fluid: a comparison with gingival crevicular fluid. *Clinical Oral Implants Research* 1995;6:14-23.
7. Lindhe J, Berglundh T. The interface between the mucosa and the implant. *Periodontology* 2000 2006;17:47-54.
8. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The

- mucosal attachment at different abutments. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 1998;25:721–7.
9. Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clinical Oral Implants Research* 2008;19:635–41.
  10. Linkevicius T, Apse P. Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. *The International journal of oral and maxillofacial implants* 2008;23:449–56.
  11. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 1996;11:169–78.
  12. Norowski J, P Andrew, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009;88B:530–43.
  13. Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schupbach P, Kim DM. Connective tissue attachment to laser-microgrooved abutments: a human histologic case report. *The International journal of periodontics and restorative dentistry* 2012;32:385–92.
  14. Nevins MM, Kim DMD, Jun S-HS, Guze KK, Schupbach PP, Nevins MLM. Histologic evidence of a connective tissue attachment to laser microgrooved abutments: a canine study. *The International journal of periodontics and restorative dentistry* 2010;30:245–55.

15. Thakral GK. Nanosurface - The Future of Implants. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014 ;8(5):ZE07-10.
16. Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie International Edition* 2011;50:2904-39.
17. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009;90A:225-37.
18. Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S. Enhanced cellular mobility guided by TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces. *Nano letters* 2008;8:786-93.
19. Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Finones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2006;78:97-103.
20. Moseke C, Hage F, Vorndran E, Gbureck U. TiO nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents. *Applied Surface Science* 2012;258:5399-404.
21. Weber HP, Cochran DL. The soft tissue response to osseointegrated dental implants. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1998;79:79-89.
22. Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue engineering* 2001;7:55-71.

23. Altankov G, Grinnell F, Groth T. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 1996;30:385–91.
24. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering* 2003;23:551–60.
25. Legeay G, Poncin-Epaillard F, Arciola CR. New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no)bioadhesion. *The International journal of artificial organs* 2006;29:453–61.
26. Smith BS, Yoriya S, Johnson T, Popat KC. Dermal fibroblast and epidermal keratinocyte functionality on titania nanotube arrays. *Acta Biomaterialia* 2011;7:2686–96.
27. Loesberg WA, te Riet J, van Delft FCMJM, Schöen P, Figdor CG, Speller S, et al. The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials* 2007;28:3944–51.
28. Kim S-Y, Oh N, Lee MH, Kim S-E, Leesungbok R, Lee SW. Surface microgrooves and acid etching on titanium substrata alter various cell behaviors of cultured human gingival fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research* 2009;20:262–72.
29. Chou L, Firth JD, Uitto VJ, Brunette DM. Substratum surface topography alters cell shape and regulates



- fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. *Journal of cell science* 1995;108 ( Pt 4):1563–73.
30. Kearns VR, Williams RL, Mirvakily F, Doherty PJ, Martin N. Guided gingival fibroblast attachment to titanium surfaces: an in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology* 2012;40:99–108.
  31. Puckett SD, Lee PP, Ciombor DM, Aaron RK, Webster TJ. Nanotextured titanium surfaces for enhancing skin growth on transcutaneous osseointegrated devices. *Acta Biomaterialia* 2010;6:2352–62.
  32. Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3215–23.
  33. Oh S, Brammer KS, Li YSJ, Teng D, Engler AJ, Chien S, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:2130–5.
  34. Pérez-Jorge C, Conde A, Arenas MA, Pérez-Tanoira R, Matykina E, de Damborenea JJ, et al. In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti–6Al–4V alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012;100A:1696–705.

## Abstract

# A study on morphology & function of human gingival fibroblast according to the titania nanotube diameter

Jaeho Hwang

Program in Periodontology, Department of Dental Science,  
Graduated School, Seoul National University

### 1. Purpose

The aim of this study was to observe the functional and morphological change of human gingival fibroblast on the titania nanotube according to the diameter.

### 2. Materials and Methods

Gingival tissue was obtained from 2 patients who experienced clinical crown lengthening at department of periodontology, Seoul National University Dental Hospital.

Total 144 titanium foils (10 x 10 mm) were prepared. They divided into 4 groups; electropolished (n=6), 30nm titania nanotube (n=6), 70nm titania nanotube (n=6), 100nm titania nanotube (n=6). Roughness and contact angle were measured. Fibroblasts from gingival tissue were cultured on each titanium

disc. We evaluated the orientation and proliferation of cells by immunofluorescence microscopy (24hours,7days) and MTT assay (24 hours,3day,7days). The adhesion of cells were estimated by Live–dead assay with 3 repeated loosening of attached cells.

After test of normality was tried, non–parametric Mann–Whitney test between 2 groups, Kruskal–Wallis test among 3 groups were performed.

### 3. Result

Roughness and adhesion of the cells were not significant different among all the groups. Contact angel, orientation and proliferation of fibroblast showed significant difference between control and nanotube groups. Difference among nanotube groups with different diameter was not found.

### 4. Conclusion

Culturing on the titania nanotubes might be related the functional and morphological change of human gingival fibroblast. However, It is not clear that this change positively affect soft tissue as a mucosal barrier around implant.

Key words: implant, soft tissue, titania nanotube, human gingival fibroblast

Student Number: 2013–21802