치과용 임플란트 주위 뼈모세포에 대한 전기자극의 영향에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치과보철학교실

우경엽·권긍록·최부병

The Effect of Electrical Stimulation on Osteoblast Surrounding Dental Implant

Kyung-Yeup Woo, Kung-Rock Kwon, Boo-Byung Choi

Department of Prosthodontics, Division of dentistry, Graduate school,Kyung hee University

Several factors can affect the formation of bone tissues surrounding implants. One of the factors is electrical stimulation. It is known to change the movement of cells, form and destroy cells, and alter concentration and chemical component of soft tissues and bones. The effect of electrical stimulation on bone formation can vary according to the intensity of electric currents, stimulating time, the method of sending electric currents, and tissues and cells currents are applied to.

This study examines how various enviroments affect osteoblasts.

(1) effect on osteoblast with varying intensity of currents

Osteoblast-like cells were raised on four plates where implants can be placed. A constant current sink (MC3T3-E1) that can adjust the intensity and stimulating time of electric currents was used. The four plates were stimulated with 0㎂, 10㎂, 20㎂, and 40㎂, respectively. After 24 hours of stimulation, the number and distribution of cells surrounding implants were examined.

(2) effect on osteoblast with varying conditions

The 3 study was performed with same method.

① The change of attached cell number 72-hour after application of various currents

② The change of attached cell number 72-hour after application of various interval

③ The comparison of attached cell number by implant surface texture

The following are the results:

1. The distribution and density of cells surrounding implant is highest under the intensity of electric currents of 20㎂.
2. The number of cells attached implants is highest under the intensity of electric currents of 20㎂.
3. The number of cells attached implants is highest under continous electric currents
4. The number of cells attached implants is not different by implant surface texture

치과용 임플란트 주위 뼈모세포에 대한 전기자극의 영향에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치과보철학교실

우경엽·권긍록·최부병

Ⅰ. 서 론

전기 자극은 세포의 움직임을 변화 시킬 수 있고, 세포의 증식이나 파괴를 촉진하며 연조직이나 뼈에서 구성이나 농도를 변화시킬 수 있다. 최근에는 전기 자극이 pseudoarthrosis, delayed fracture, fresh fracture 그리고 bone graft에서 뼈 형성에 효과가 있다는 연구결과가 발표되었다. 그러나 이러한 전기 자극에 의해 뼈 형성을 촉진시키는 기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

전자기장은 전기장과 자기장의 총칭으로 전기장과 자기장이 서로 연관되어 나타낼 때 양쪽을 합쳐서 전자기장이라고 한다. 전기장은 정전하의 주위에, 자기장은 자극 주위에 생기는 것으로 각각 독립된 물리대상이지만, 전하가 운동하여 전기장이 시간적으로 변동하는 곳에서는 반드시 자기장이 생기고, 역으로 자기장이 변동하면 전기장이 동반되는 등, 일반적으로 양쪽이 동시에 나타나는 경우가 많으므로 이를 전자기장이라고 한다.

이러한 전자기장을 의약에서 이용하려는 시도는 Volta가 건전지를 개발할 때부터 있어왔다. 1812년에 유합되지 않은 환자의 경골(tibia)에 전기적 자극을 이용하여 성공적으로 치료한 기록이 있다. 그러나 전기 자극을 사용하는데 있어서 근본적인 원리는 밝혀지지 않은 상태였다.

과거의 실험(in vitro)[1] 에서 전기자기장 자극에 의해서 세포가 증식한다는 간접적인 증거가 있었다. 또 Matsunaga등[2]의 실험에서도 전기적 자극에 의해서 뼈모세포의 증식뿐만 아니라, 간엽 세포의 뼈모세포로의 분화도 증진시킨다는 결과가 기술되어 있다. 하지만 어떤 실험(in vitro)[3] 에서는 전기자기장 자극에 의해서 세포의 증식이 억제된다는 보고도 있다.

한편, 치과분야에서는 교정, 치주 분야에 주로 사용되었으나[4-6], 임플란트(Implants)가 널리 보급되면서 임플란트의 뼈 유착 기간을 단축시키려는 의도하에, 전자기장(Electromagnetic Field)을 이용한 임플란트 주위의 뼈형성(Osteogenesis) 및 뼈성장(Bone Growth)에 미치는 영향에 대해서 활발한 연구가 진행되었다.

만약 뼈형성 및 성장을 인위적으로 조절할 수 있다면, 뼈조직의 파괴 및 소실 시에 뼈재생을 도모하고 또한 최근에 많이 시행되는 임플란트 매식후의 뼈조직의 재생을 촉진시키는 등의 다양한 임상 적용이 가능하리라 여겨진다.

본 연구는 전기자극을 이용하여 임플란트와 뼈의 유착(osseointegration) 기간을 단축시켜 조기에 임플란트가 기능할 수 있도록 하는데 궁극적인 목적이 있다. 이를 위해 전기자극에 대하여 많은 문헌고찰과 예비실험을 시행하였으며[7),8)], 이번 연구는 전기자극이 임플란트 주위 뼈모세포에 미치는 영향을 규명하는 일련의 실험으로, 우선 전기 자극의 세기에 따른 임플란트 주위의 뼈모세포의 수와 분포의 변화를 관찰하였고, 그 다음에 전기자극의 세기, 간격, 임플란트 표면 처리를 달리하였을 때 임플란트 표면에 붙는 뼈모세포의 수를 측정함으로써 뼈모세포의 활성에 적절한 전류의 세기, 간격, 임플란트 표면 처리를 파악하고자 하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

본 실험은 전기자극을 주었을 때 임플란트 주위의 세포 분포를 관찰한 실험과 임플란트에 부착된 세포의 수를 측정한 실험으로 나누어 시행하였다.

1. 전기 자극 세기를 변화시켰을 때 임플란트 주위의 뼈모세포의 분포 관찰 실험

1) 실험재료

가) 실험 세포

mouse의 두개골에서 얻은 뼈모유사세포(osteoblast-like cell)인 MC3T3-E1(E1)세포

나) 임플란트

두께 3.3mm, 길이 10mm의 machined surface implant(AVANA , SooMin Co, LTD, Korea)

다) 세포배양판

직경 3.5cm의 세포배양판(Falcon, USA)의 뚜껑에 순금으로 된 두 개의 봉을 장착하였다. 1개는 임플란트를 유지할 수 있도록 '기역자' 모양으로 제작하였고 다른 1개는 세포배양판 바닥에 접촉할 수 있도록 끝 부분을 납작하게 제작하였다. 바깥쪽으로는 전류를 공급하는 기판과 연결할 수 있는 전선을 부착하였다(Fig.1).

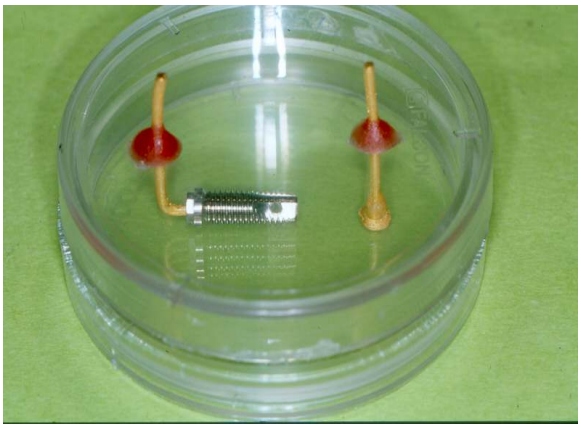

Fig. 1. Cell culture plate(Falcon, USA) which connected to machined surface implant (AVANA , SooMin Co, LTD, Korea)

라) Constant current sink(power supply pack)

회로 내에 흐르는 전기 저항치가 일정치 않기 때문에 이에 따른 전류조절을 위하여 feedback 회로를 가진 power supply pack을 제작하여 항상 일정한 Ampere를 흘려줄 수 있도록 하였다.(Fig.2).

① 전류 선택

회로의 JP1 S/W로 8가지 전류 또는 조합하여 여러 가지 전류를 선택할 수 있도록 했다. 이것은 실험에 필요한 전류를 가변 저항으로 했을 경우, 전류의 양을 정확하게 조절할 수 없을 것이라 판단되었기 때문이다. 전류용량만큼 저항의 크기를 변화시키면 원하는 전류를 선택할 수 있다.

② 시간 선택

회로의 JP2 S/W로 전류의 공급시간을 6가지로 선택할 수 있도록 하였다. 즉, 계속 전류를 공급하거나, 10분, 30분, 1시간, 6시간, 12시간 주기의 선택이 가능하다.

③ 회로의 동작확인

회로의 동작을 확인하기 위해 D3의 LED를 부착했다. 이 LED는 시간을 선택하면 그 시간에 맞게 on/off된다. 이로써 배터리의 기능 유무를 확인 할 수 있다.

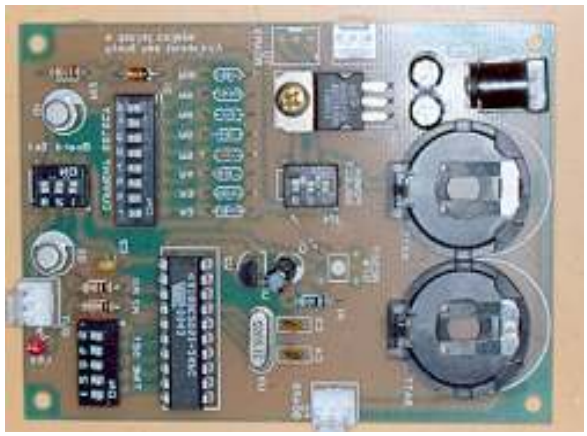

Fig. 2. Constant current sink(power supply pack)

마) 광학현미경

Inverted microscope(Olympus, Japan)(Fig.3)로 세포의 분포와 수를 관찰하였다.

2) 실험방법

가) 세포배양

E1세포는 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Gibco, USA)과, Penicillin(100 unit/㎖)- Streptomycin(100㎍/㎖)(Gibco, USA)이 포함된 α-Minimum Essential Medium(α-MEM; Gibco)을 배양액으로 하여 배양하였다. 10^5/㎖의 세포농도로 4개의 세포배양판(Falcon, USA)에 2㎖ 씩 분주하였다.

나) implant 의 연결

미리 제작해둔 세포배양판 뚜껑에 두께 3.3mm, 길이 10mm의 machined surface implant(AVANA , SooMin Co, LTD, Korea)를 연결한다. 뚜껑을 세포가 담겨있는 세포배양판에 덮고 움직이지 않도록 양쪽을 고정하였다(Fig.1).

다) 전기 자극

한 군에는 전류를 가하지 않고 다른 군에는 임플란트에 음극을 연결하여 3개의 세포배양판에 각각 10㎂, 20㎂, 40㎂의 직류(direct current) 전류를 계속적으로 24시간동안 가하였다. 모든 군은 3회씩 배양하고 관찰하였다.

라) 세포분포 관찰

24시간 후 세포배양판을 Inverted microscope (Olympus, Japan)로 옮겨서 10배율로 하여 임플란트의 3번째와 4번째 thread 사이와 임플란트의 바닥부위의 사진을 촬영하여 사진 상에 나타나는 뼈모세포의 분포를 관찰, 비교하였다.

마) 세포 농도 측정

세포배양판에서 배지(10%FBS와 P/S가 포함된 α-MEM)를 제거한 후 Hanks balanced salt solution(HBSS) 2㎖를 첨가하여 수세하고 0.05% trypsin-0.53mM tetrasodium ethylendiaminetetraactic acid(EDTA;Gibco, USA) 400㎕를 첨가한 다음 5분 후에 세포가 바닥에서 분리되는 것을 확인하였다. 10% FBS와 P/S가 포함된 α-MEM 1㎖를 첨가하였다. 그 후 Ependorf tube 에 18㎕를 옮긴 후 2㎕ 의 Trypan blue를 첨가하였다. counter chamber(Hausser Scientific Blue Bell, Pa)에 약간을 옮겨서 세포 농도를 측정하였다.



Fig. 3. Inverted Microscope (Olympus, Japan)

2. 전기 자극의 세기, 간격, 임플란트 표면을 다르게 하였을 때의 임플란트 표면에 부착된 뼈모세포의 수 측정 실험

1) 실험 재료

가) 실험 세포

뼈모유사세포(osteoblast-like cell)인 MC3T3-E1(E1)세포

나) 임플란트

① 전기 자극의 세기, 간격에 관한 실험인 경우

- 두께 3.3mm, 길이 10mm의 machined surface implant(AVANA , SooMin Co, LTD, Korea)

② 임플란트 표면에 관한 실험인 경우

- 두께 3.3mm, 길이 10mm의 rough surface implant(AVANA , SooMin Co, LTD, Korea)

다) 세포배양판

24well 세포배양판(Falcon, USA)의 뚜껑에 순금으로 된 두 개의 봉을 10mm 간격으로 장착하였다. 두 개 모두 임플란트가 장착될 수 있는 형태로 제작하였다. 바깥쪽으로는 전류를 공급하는 기판과 연결할 수 있는 전선을 부착하였다(Fig.4).

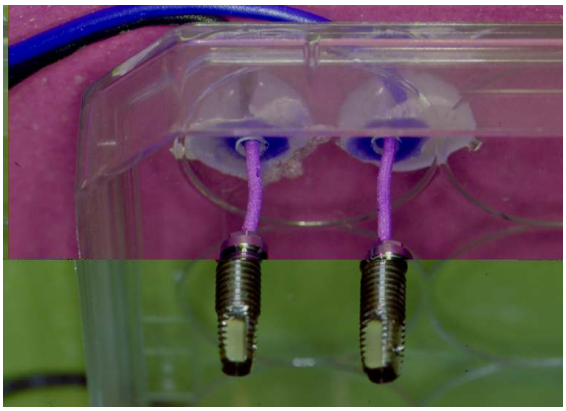

Fig. 4. Two-implant connected to cell culture plate



Fig. 5. Cell culture with electrical stimuli

라) Constant current sink(power supply pack)(Fig.2).

마)Inverted microscope(Olympus, Japan) (Fig.3).

2) 실험 방법

가) 세포배양

세포는 위의 실험에서 사용한 것과 같은 뼈모유사세포(osteoblast-like cell)인 MC3T3-E1을 사용하였다. 위와 같은 방법으로 배양하고 1.5×10^5/㎖의 세포농도로 1.4㎖씩 세포배양판에 분주하였다.

나) implant 의 연결

미리 제작해둔 세포배양판 뚜껑의 두 개의 봉에 machined surface implant(AVANA , SooMin Co, LTD, Korea) 두 개(전기 자극의 세기, 간격에 관한 실험인 경우) 혹은 rough surface implant(AVANA , SooMin Co, LTD, Korea) 두 개 (임플란트 표면에 관한 실험인 경우)를 각각 연결한다. 이 경우 rough surface implant가 음극과 연결되도록 하였다. 뚜껑을 세포가 담겨있는 세포배양판에 덮고 움직이지 않도록 양쪽을 고정하였다(Fig.5).

다) 전기 자극

① 전기 자극의 세기에 따른 임플란트와 뼈모세포의 부착에 관한 실험

한 군에는 전류를 가하지 않고 다른 군에는 각각 10㎂, 20㎂, 40㎂의 직류(direct current) 전류를 계속적으로 72시간동안 가하였다. 모든 군을 5회씩 배양하였다.

② 전기 자극의 간격에 따른 임플란트 표면과 뼈모세포의 부착에 관한 실험

한 군에는 20㎂의 전류를 계속적으로 72시간동안 가하고 다른 군에는 30분과 12시간 간격으로 72시간 동안 가하였다. 모든 군을 5회씩 배양하였다.

③ 임플란트 표면의 종류에 따른 표면과 뼈모세포의 부착에 관한 실험

한 군은 machined surface implant에 20㎂의 전류를 계속적으로 72시간 동안 가하였고 다른 군에는 rough surface implant에 20㎂의 전류를 계속적으로 72시간 동안 가하였다. 모든 군을 5회씩 배양하였다.

라) 부착 세포수의 관찰

세포배양판에서 음극에 연결되었던 임플란트를 꺼내어 Hanks balanced salt solution (HBSS) 1.5ml에 2회 수세한 후 0.05% trypsin-0.53mM tetrasodium ethylendiaminete- traactic acid(EDTA;Gibco, USA) 1.5ml에 4분간 담가 임플란트에 부착된 뼈모세포를 모두 털어내었다. 임플란트를 제거 한 후 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Gibco, USA)을 0.5ml 첨가 한 후 10분간 세포가 침전되길 기다렸다. 그 후 Inverted Microscope(Olympus, Japan)로 옮겨서 10배율로 하여 현미경 시야에 보이는 세포의 수를 관찰, 비교 하였다(Fig.3).

3. 통계 분석

통계 처리는 SAS program(release 7.5)을 이용하여 시행하였다. 부착된 세포 수의 평균과 표준편차를 계산하였다. 일원배치법의 분산분석법(One-way analysis of variance)과 DUNCAN에 의한 다중 비교법(DUNCAN's multiple range test)을 통해 통계분석을 시행하였다.

Ⅲ. 연구 성적

1. 전기 자극 세기를 변화시켰을 때 임플란트 주위의 뼈모세포의 분포 관찰 실험

1) 세포 분포 관찰

전류를 가하지 않은 군과 10㎂, 20㎂, 40㎂의 각각 다른 전류량 하에 24시간 배양한 군의 세포 분포를 관찰, 비교한 결과 20㎂에서 뼈모세포가 가장 많이 발견되었다. (Fig.6-11).

2) 세포 농도의 측정

전류를 가하지 않은 군과 10㎂, 20㎂, 40㎂의 각각 다른 전류량 하에 24시간 배양한 군의 세포 농도를 관찰, 비교한 결과 20㎂의 전류에서의 임플란트 주위의 뼈모세포 농도가 다른 전류에서보다 높게 나타났고 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보였다 ($p<0.05$) (Table 1, Fig.12).

Fig. 6. cell distribution of control groupno application of currents (the base of implant, ×10)

Fig. 7. cell distribution of control group 24-hours after no application of currents(the space between 3rd and 4th thread of implant, ×10)

Fig. 8. cell distribution of control group 24- hours after application of 20㎂ currents(the base of Implant, ×10)

Fig. 9. cell distribution of control group 24- hours after application of 20㎂ currents(the space between 3rd and 4th thread of implant, ×10)

2. 전기 자극의 세기, 간격, 임플란트 표면을 다르게 하였을 때의 임플란트 표면에 부착된 뼈모세포의 수 측정 실험

1) 전기 자극의 세기에 따른 임플란트와 뼈모세포의 부착에 관한 실험

전류를 가하지 않은 군과 10㎂, 20㎂, 40㎂의 각각 다른 전류량 하에 72시간 배양한 군의 세포 부착 정도를 관찰, 비교한 결과 20㎂의 전류에서의 임플란트에 부착되는 뼈모세포 수가 다른 전류에서보다 높게 나타났고 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보였다 ($p<0.05$)(Table 2, Fig. 13).

Fig. 10. cell distribution of control group 24-hours after application of 40㎂ currents (the base of implant, ×10)

Fig. 11. cell distribution of control group 24-hours after application of40㎂ currents the space between 3rd and 4th thread of implant, ×10)

2) 전기 자극의 간격에 따른 임플란트 표면과 뼈모세포의 부착에 관한 실험

20㎂ 의 전류를 지속적으로 72시간 동안 가한 군과 20㎂ 의 전류를 30분 간격, 12시간 간격으로 72시간 동안 전류를 가한 군의 세포 부착 정도를 관찰, 비교한 결과 지속적으로 전류를 가한 군에서 임플란트에 부착된 세포의 수가 가장 높게 나타났으며 통계학적으로 유의성 있는 차이를 보였고 ($p<0.05$), 12시간과 30분 간격으로 전기 자극을 준 경우 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다 ($p>0.05$)(Table 3, Fig. 14).

Table 4. The change of cell density 24-hour after application of various currents (×1/9×105/㎖)(the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

Number of test	Control Group	10㎂ Group	20㎂ Group	40㎂ Group
1st	36	91	118	101
2nd	46	72	125	74
3rd	47	21	102	112
Average (S.D.)	43 (6.1)	61.3 (36.2)	115 (11.8)	95.7 (19.6)
Sig	C	B,C	A	A,B

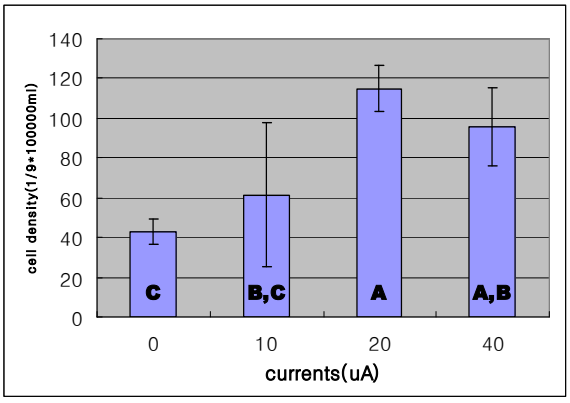

Fig. 12. The change of cell density 24- hour after application of various currents(the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

Table 2. The change of attached cell number 72-hour after application of various currents (the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

Number of test	Control Group (no-stimuli)	10㎂ Group	20㎂ Group	40㎂ Group
1st	6	17	57	33
2nd	11	39	58	20
3rd	18	41	48	19
4th	19	56	48	20
5th	13	56	72	63
Average(S.D.)	13.4(5.3)	41.8(16)	56.6(9.8)	31(18.8)
Sig	C	A,B	A	B,C

Table 3. The change of attached cell number 72-hour after application of various interval(the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

Number of test	Control Group	30min interval	12hour interval
1st	55	19	32
2nd	48	36	28
3rd	51	28	28
4th	42	12	24
5th	31	14	31
Average(S.D.)	45.4(9.3)	21.8(10.1)	26.6(4.2)
Sig	A	B	B

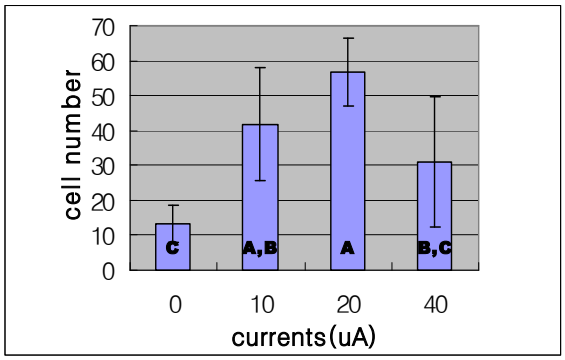

Fig. 13. The change of attached cell number 72-hour after application of various currents (the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

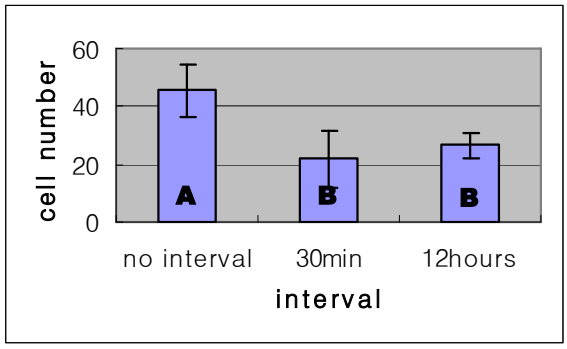

Fig. 14. The change of attached cell number 72-hour after application of various interval (the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

3) 임플란트 표면의 종류에 따른 표면과 뼈세포의 부착에 관한 실험

machined surface의 임플란트와 rough surface의 임플란트에 20㎂의 전류를 72시간 동안 계속적으로 흐르게 하였을 때 machined surface의 임플란트와 rough surface의 임플란트 사이에서 세포 부착에 유의성 있는 차이를 발견 할 수 없었다($p>0.05$)(table 4).

Ⅳ. 총괄 및 고안

오랜 기간 연구자들은 전기적 자극이 임플란트와 뼈 사이의 결합과 찢김 강도(shear strength) 에 미치는 영향을 연구하였다. 개의 대전자(greater trochanter)에 porous Al_2O_3 임플란트를 식립하고 10 ㎂ 의 전류를 적용한 Weinstein 등의 실험[9] 에서, 2-4주후에 접촉 부위의 찢김 강도(shear strength)가 증가한다고 하였다.

Salman등[10] 은 polymethyl-methacrylate와 cobalt-chromium-molybdenum alloy로 제작한 임플란트를

Table 4. The comparison of attached cell number by implant surface texture(the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

Number of test	Control Group (smooth surface)	rough surface
1st	53	49
2nd	61	59
3rd	48	57
4th	55	54
5th	49	57
Average(S.D.)	53.2(5.2)	55.2(3.9)
Sig	A	A

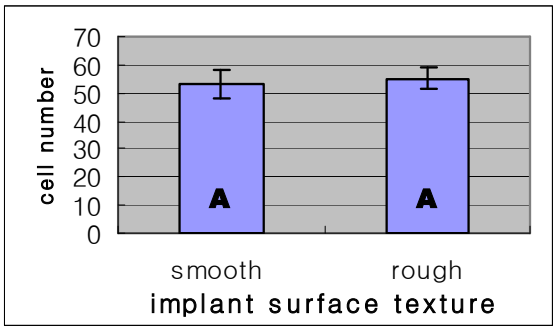

Fig. 15. The comparison of attached cell number by implant surface texture (the same letters are not significantly different, $p<0.05$)

개의 대퇴골(femur)에 식립한 결과, 전기적인 자극이 뼈형성의 활성도(osteogenic activity)를 증가시켜서 골과 임플란트 사이의 결합을 강하게 해준다고 보고하였다. Park등[11]은 PMMA 임플란트를 개의 구치부에 식립하고 건전지 주머니(battery pack)를 장착해서, 다공성(porous)의 임플란트와 구강조직과의 결합강도가 전기적 자극에 의해 증가된다는 결과를 보고하였다. Shimizu등[12]은 토끼의 경골(tibia)에서 porous hydroxyl-apatite 와 porous tricalcium phosphate 임플란트를 3-4주 동안의 전기적 자극을 주고 비교하였던 바, hydroxyl- apatite를 포함한 임플란트에서 자극을 가하지 않은 그룹과 비교하였을 때 많은 양의 골과 두꺼운 골소주(trabecula)의 증가를 관찰할 수 있었으며, tricalcium phosphate 임플란트에서는 자극을 주었을 때 주목할 만한 증가를 보이지 않았다.

하지만 전류의 세기의 강약, 직류 또는 교류, 전류의 흐름이 일정한지 혹은 간헐적인지에 따른 세포의 영향에 관한 결과는 언급되어 있지 않았다. 또한 machined surface와 rough surface 사이의 차이에 대해 언급된 자료 또한 발견하기가 쉽지 않았다. 따라서 본 연구에서는 전류의 세기, 전류의 간격, 그리고 임플란트 표면의 차이에 따른 뼈모세포의 부착 정도를 알아보고자 하였다. 본 실험을 구성하는데 있어서 여러 가지 고려할 점이 있는데 첫 번째는 Kohzoh, Kubota 등[13]이 생물체에 사용되는 전자기장(EMF)을 분류한 직류(direct current), capacitively coupled, magnetically induced fields 중에서 어떠한 것을 사용하는 것이다. 이 중 직류(direct current)가 많은 연구자들에 의해 실험에 사용되어져 뼈형성 증진에 성공적인 효과를 보였고 가장 쉽게 적용이 가능하기 때문에 본 연구에서도 직류(direct current)를 사용하였다.

두 번째로 고려할 점은 임플란트에 음극과 양극 중에서 어떠한 전극을 적용하는 것이다. Ferrier 등[14]은 세포 이동에 전류(electric current)가 미치는 영향을 연구하면서 파골세포(osteoclast cell)와 뼈모유사세포(osteoblast- like cell)에 계속적인 직류(direct current)를 적용하였던 바, 파골세포(ostoclast cell)는 양극(positive electrode)을 향해 빨리 이동하였고 뼈모유사세포(osteoblastic-like cell)는 음극(negative electrode)을 향해 이동하였다. 이런 이유로 본 연구에서는 임플란트를 음극(negative electrode)으로 하여 임플란트 주위로 뼈세포가 이동하도록 하거나 음극과 양극, 양쪽 다 임플란트를 장착 한 경우에는 음극의 임플란트를 세포의 수를 분석하는데 이용하였다.

세 번째로 고려할 점은 실험하는 전류의 범위이다. 이미 많은 연구자들이 가장 효과적인 전류는 수 microampere 정도와 수 volt 정도의 세기라는 것을 밝혀냈다[15]. Friedenberg 등[16]은 1, 5, 20, 50, 100㎂의 다양한 직류(direct current)를 주어서 그 효과를 비교하였던 바, 임플란트에 계속적인 전류를 10일 동안 공급한 후, 현미경상 소견에서 많은 뼈모세포

를 포함한 골(osteoblastic bone)의 형성을 관찰하였다. 그들은 낮은 전류는 생리적인 범위에 있으나 높은 전류는 음극(cathode)과 양극(anode) 양쪽에서 모두 뼈를 파괴하므로, 전류(current)의 적절한 범위는 5-20㎂ 라고 결론을 지었다. 또한, 개의 대전자(greater trochanter)에 porous Al_2O_3 임플란트를 식립하고 10㎂의 전류를 적용한 Weinstein 등의 실험[17]에서, 2-4주 후에 임플란트 접촉 부위의 찢김 강도(shear strength)가 증가한다고 결론을 내렸다. 이것은 특정한 범위의 전류는 뼈형성에 도움이 되지만, 그 이상의 전류에서는 효과가 없거나 오히려 뼈를 파괴한다는 것을 시사한다. 이러한 이유로, 본 연구에서는 뼈형성에 최대의 효과를 주는 전류의 세기를 찾고자 0, 10, 20, 40㎂의 전류를 적용하였다. 20㎂의 전류에서 가장 높은 효과를 나타내었기 때문에 40㎂이상의 전류에서는 효과가 더 떨어질 거라는 것을 예상할 수 있다.

네 번째로 고려해야 할 점은 자극을 주는 기간이다. 계속적인 직류(direct current)를 토끼에 부여하였을 때 뼈형성의 시간적인 변화를 연구한 Esterhai 등[18]의 결과를 살펴보면, 3일부터 뼈형성이 일어나서 21일간 계속 진행되었으며, 대조군은 5일부터 뼈형성이 증가되어 9일째 최고를 이루었다가 그 이후로 흡수가 되었다. 본 연구에서는 실험 대상이 동물이 아니고 뼈모세포이었으므로 세포 배양 72시간 후에 관찰, 비교하였다. 하지만 더 정확한 실험을 위해서는 배양 시간에 따른 세포 부착 정도의 평가를 통해 적절한 배양 시간을 찾아야 할 것이다.

본 실험들의 결과를 살펴보면 첫 번째 세포 분포 실험과 두 번째 실험인 세포 부착 실험에서 모두 20㎂의 전류에서 최고의 효과를 나타내었으나 95%의 신뢰도로 통계 분석 하였을 때 세포 분포실험에서는 20㎂의 전류에서와 40㎂의 전류에서 그리고, 세포부착 실험에서는 10㎂의 전류에서와 20㎂의 전류에서 유의성 있는 차이를 발견하지 못했다. 이러한 결과를 볼 때 20㎂의 전류가 대조군(0㎂)보다 임플란트에 뼈세포가 모이는 점에 효과적인 것은 확실하지만 10㎂, 40㎂과 유의성 있는 차이가 없기 때문에 보다 더 많은 횟수의 실험과 정밀한 계측이 필요하다.

전기 자극의 간격에 따른 효과를 연구한 실험에서 계속적으로 전류를 가한 것이 가장 높은 효과를 나타내었다. 이것은 전류를 가하는 실제적인 시간이 임플란트와 뼈모세포의 부착에 중요하다는 것을 나타낸다. 과거의 문헌에서 Ejiri등[19]은 임플란트 주위 뼈에 전자기장이 미치는 효과에 관한 연구에서 하루 10시간의 전기 자극이 5시간보다 뼈형성을 더 많은 정도로 증진시킨다고 보고하였다. 그러나 Matsumoto등[20]은 하루 4시간과 8시간 전기자극을 주었을 때 많은 차이를 보이지는 않는다고 하였다.

그리고, 30분 간격과 12시간 간격으로 전류를 준 경우의 결과를 비교해보면 12시간 간격으로 전류를 준 쪽이 효과가 좋은 듯 하나 통계 분석 결과 유의성 있는 차이가 나지 않았다. 이것에 대한 추가 실험 및 연구가 필요할 것으로 사료된다.

임플란트 표면 성상에 따른 뼈세포의 부착 실험에서 smooth surface implant와 rough surface implant 간에 효과가 유의성 있는 차이가 나지 않았다. 하지만 과거의 문헌들을 살펴볼 때 smooth surface implant 보다 rough surface implant에서 osseointegration이 더 활발하다는 것을 알 수 있다. Groessner-Schreiber & Tuan[21]은 임플란트 중에 거친 면(rough surface)이나 다공성 표면(porous surface)에서 형성되는 뼈의 양은 같으나 매끈한 면(smooth surface) 보다는 훨씬 많다고 보고하였다. 그럼에도 불구하고 본 실험에서 유의성 있는 차이가 나지 않은 이유는 임플란트 표면에 붙어 있는 세포를 직접 관찰한 것이 아니기 때문일 수 있다. 즉, smooth surface implant 에 붙어 있던 세포들은 EDTA(Gibco, USA)에 잘 떨어지지만 rough surface implant에 붙어 있는 세포는 잘 떨어지지 않을 거라는 가정을 해볼 수도 있다. 또 다른 이유로는 실험 방법의 문제로 인해 전류를 가하지 않아도 smooth surface implant 와 rough surface implant 의 세포 부착 정도가 비슷할 수 있다는 것이다. 이 문제는 실험 방법의 변경이나 동물 실험 같은 추가 실험을 통해 더 연구해야 할 것으로 사료되는 바이다.

Ⅴ. 결 론

다양한 환경에서 전기 자극이 임플란트 주위 뼈모세포에 미치는 영향을 살펴보고자 다른 세기의 전류, 다른 간격의 전류, 임플란트의 다른 표면에서 전류를 흐르게 하여 임플란트 주위와 표면에 붙는

뼈모세포의 수를 측정, 비교하였다.

이를 위해 임플란트를 장착할 수 있는 세포배양판에 osteoblast-like cell(MC3T3-E1)을 배양하였으며 전기 자극을 위해 전류와 시간의 조절이 가능한 constant current sink(power supply pack)를 제작해서 사용했다. 첫 번째로 전류의 세기를 다르게 하면서 광학 현미경으로 임플란트 주위 뼈모세포의 농도와 수를 측정, 비교하였고 두 번째로 전류의 세기, 간격, 임플란트의 표면을 다르게 하면서 전류를 흐르게 한 다음 임플란트에 부착되는 뼈모세포의 수를 측정, 비교 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뼈모세포를 다른 전류량 하에서 배양시 20㎂의 전류 하에서 세포 분포와 수가 가장 높게 나타났으며 유의성있는 차이를 보였다($p<0.05$).
2. 뼈모세포를 다른 전류량 하에서 배양시 20㎂의 전류 하에서 부착된 세포의 수가 가장 높게 나타났으며 유의성있는 차이를 보였다($p<0.05$).
3. 뼈모세포를 다른 시간 간격에서 배양시 지속적으로 전류를 준 경우에 부착된 세포의 수가 가장 높게 나타났으며 유의성있는 차이를 보였다($p<0.05$).
4. 뼈모세포를 다른 임플란트 표면에서 배양시 machined surface와 rough surface사이에 부착된 세포의 유의성있는 차이를 발견하지 못하였다($p>0.05$).

이상의 결과로 보아 적절한 전기적 자극은 임플란트와 뼈모세포의 부착을 증진시키며 임상적으로 임플란트 주위 뼈 생성이 증진 되는 효과가 기대된다. 하지만 임상에 적용하기에는 아직까지 많은 연구들이 필요하다. 더 다양한 세포 실험과 동물을 이용한 임플란트와 뼈 간의 결합강도 측정 등이 그 내용이 될 수 있다. 또한 실제 인체에서 사용할 수 있도록 구강내외에 위치하면서 정상 기능을 할 수 있는 적절하게 작은 장치의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Batista.U., Miklavcic.D., and Sersa.G. The Effect of low level direct current on V-79 cell line in vitro. *Period Biol*1991;93:225 -226Korenstein.R., Somjen.D.,Fischer. H.,and Binderman.I. Capacitative pulsed electric stimulation of bone cells. Induction of cyclic-AMP and DNA synthesis. *Biochem Biophys Acta* 1984;803: 302-307
2. Matsunaga.S., Ijiri.K., Sakou.T., and Morimoto.N. Immunohistochemical study of activating osteoblasts from undifferen -tiated mesenchymal cells by electrical stimulation. *Bone* 1993;14:327-332
3. Jones.D.B.,Pedley.R.R., and Ryaby.J.T. The effects of pulsating electromagnetic fields on differentiation and growth in Cloudman S91 murine melanoma cells oin vitro. *J Bioelect* 1986;5:145-169
4. Basset CAL, Pawluk RJ, Pilla AA.: Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science* 1974;184:575-577
5. Jacobs JD, Norton LA.: Electrical stimulation of osteogenesis in pathological osseous defects. *J Periodontal* 1976;47: 311-319
6. Kawata T, Hirota K , Sumitani K et al.: A new orthodontic force system of magnetic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 92,241-248,1987.
7. 우경엽, 최대균, 권긍록. 전기작극이 치과용 임플란트 주위 골세포에 미치는 영향에 관한 연구(Ⅰ):전기자극이 골형성에 미치는 영향에 관한 문헌적 고찰. 대한치과이식학회지 2001;20(1):58-67
8. 우경엽, 최영철, 이백수, 권긍록. 전기자극이 치과용 임플란트 주위 골세포에 미치는 영향에 관한 연구(Ⅱ):전기자극의 세기에 따른 골세포의 영향. 대한치과이식학회지 2001;20 (1):68-74
9. Weinstein, A.M. ,Klawitter ,J.J., Cleveland, T.W.and Amoss. D.C. Electrical stimulation of bonr growth into Porous Al2O3. *J Biomed Mater Res* 1976;10:231 -247
10. Salman, N.N., Park, J.B., Kenner, G.H. and Vonrecum, A.F. Effect of electrical stimulation on bone growth into porous PMMA and Co-Cr-Mo alloy, *Trans 11th Int Biomater Symp* 1979;3:33
11. Park, J.B., Young, S.O. and Keener, G.H. Alveolar bone ingrowth into porous dental implants by electrical stimulation. In: Electrical properties of bone and cartilage, C.T. Brighton, J. Black, and S.Pollack, Eds., New York: Grune and Stratton, pp.225-247
12. Shimizu, T., Zerwekh,K.E.,Videman,T., Gill, K.,Mooney, V.,Gholmes, R.E. and Hagler, H.K. Bone growth into porous calcium phosphate ceramics: Influence of pulsing electromagentic field, *J Ortho Res* 1988; 6:248-258

13. Kohzoh Kubota, Naoki Yoshimura, Makota, Robert J. Fitzsimmons, and Ulf M.E. Wikesjo. Oveview of Effects of Electrical Stimulation on Osteogenesis and Alveolar Bone. *J Periodontol* 1995;66:2-6
14. Ferrier, J., Ross, S.M., Kanehisa, J., and Aubin, J.E. Osteoclasts and Osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electric field, *J Cell Physiol* 1986;129:283-288
15. Kohzoh Kubota, Naoki Yoshimura, Makota, Robert J. Fitzsimmons, and Ulf M.E. Wikesjo. Oveview of Effects of Electrical Stimulation on Osteogenesis and Alveolar Bone. *J Periodontol* 1995;66:2-60)
16. Friedenberg, Z.B., Andrews. E.T., Smolenski, B.T., Pearl. B.W. and Brighton, C.T. Bone reaction to varying amounts of direct current, *Surg Gynecol Obstet* 1970; 131:894-899
17. Weinstein, A.M. ,Klawitter ,J.J., Cleveland, T.W.and Amoss. D.C. Electrical stimulation of bonr growth into Porous Al2O3. *J Biomed Mater Res* 1976;10:231 -247
18. Esterhai,J.L., Friedenberg, Z.B., Brighton, C.T., and Black, J. Temporal course of bone formation in response to constant direct current stimulation. *J Orthop Res* 1985;3:137-139
19. Ijiri, K., Matsunaga, S., Fukuyama, K., Yoshikuni, N. & Sakou, T. The effect of pulsing electromagnetic fields on bone ingrowth into a porous coating implant. *Journal of Japanese Bio-electrical Research Society* 1993;7:79-82
20. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into femur of rabbheits. *Cln Oral Impl Res* 2000;11:354-360
21. Groessner-Schreiber, B. & Tuan, R.S. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *Journal of Cell Science* 1992;101:209-217