

## 레진 배양액의 세포독성에 관한 연구

원광대학교 치과대학 치과보존학교실<sup>1</sup>, 구강병리학교실<sup>2</sup> 및 구강미생물학교실<sup>3</sup>

임미경<sup>1</sup> · 김은철<sup>2</sup> · 유수경<sup>3</sup> · 김강주<sup>3</sup>

### I. 서 론

복합레진은 1960년대에 실리케이트 시멘트와 direct resin의 대응으로 소개된 이래 심미수복물로 널리 사용되어 왔다(Bowen, 1962). 불완전 중합된 레진 수복물은 완전히 중합된 레진보다 쉽게 분해되는데 대부분의 경우 dimethacrylate monomer의 methacrylate group 전부가 경화반응에 관여하는 것은 아니다(Ruyter와 Svendsen, 1978). Crosslinked polymer로 구성된 레진에서는 반응에 참여하지 않은 methacrylate group이 30-50%에 이르며(Ruyter, 1984), 반응하지 않은 성분 뿐 아니라 분해산물, formaldehyde와 같은 산화물과 레진 자체의 초기 불순물 등이 독성이나 부작용을 일으킬 수 있는 물질로 알려져 있다(Bergman, 1990).

복합레진은 경화시 수축하고 와동벽에 결합상태가 불완전하므로 변연누출이 심하여 개선되어야 할 점으로 지적되어 왔다. 적절히 복합레진을 충전하면 치수에 위해작용은 거의 없다고 보고되고 하였으나(Mjör와 Wennberg, 1985), 수산화칼슘이나 기타 이장재를 사용하지 않은 경우에서는 치수손상을 유발할 가능성이 있다.

치과에서 사용되는 재료의 평가방법은 생체의 실험실 방법과 생체내 방법으로 대별할 수 있는데, 실험실 방법은 실험의 재현성과 표준화의 면에서 생체내 방법에 비하여 우수하다. 그러나 생체의 방법은 실험에 사용하는 재료를 용매에 녹여서 사용하는 경우 재료자체의 독성때문이 아니라 희석농도에 의하여 독성이 전혀 없는 결과로부터 강한 독성을 나타내는 결과까지 나타날 수 있다(Mjör 등, 1977).

전통적인 치과용 수복재료의 생물학적인 효과를 평가하는 방법으로 실험동물의 적절한 부위에 재료를 놓은 후 시료 및 주위조직을 제거하여, 조직화적인 검사가 행해지고 있다(Stanley, 1985). 최근 생체의 실험실에서 치과에 사용되는 수복재의 독성평가의 한 방법으로 세포배양법을 이용하여 새로운 재료나 개량된 재료의 임상적용을 위해 사용하는 초기검사의 하나로 세포독성 실험에 널리 사용되고 있다(Feigal 등, 1985; Guess 등, 1965; Hensten-Pettersen과 Helgeland, 1977; Imai 등, 1982; Kasten 등, 1989; Spanberg, 1973; Spanberg 등, 1973).

본 연구의 목적은 광중합형 복합레진을 중합시킨 후 증류수 용액에 침적시켜 수거한 레진 배양액을 실험용액으로 사용하여 실험실내 및 생체내 세포독성을 비교하여 레진의 독성발현 효과를 관찰하고자 하였다.

### II. 실험재료 및 방법

#### 1. 실험관내 세포독성

##### 1) 치은 조점유세포의 준비

##### (1) 일차배양

교정치료를 위하여 원대병원 교정과에 내원한 십세 여아의 제일 소구치를 발치하면서 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은은 40% FBS(fetal bovine serum, GIBCO Co., U.S.A.)와 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., U.S.A.)가 첨가된  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -minimum essential medium, L-glutamine 포함, GIBCO Co., U.S.A.)

에서 3회 세척하였다. 세척된 치은조직을 60mm 세포배양용 Petri dish(Corning Co., U.S.A.)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No.15 scalpel 2개를 이용하여 1mm<sup>2</sup>로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 퍼 놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100% 배양기 (Shel-Lab, USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 1% 항생제를 첨가한 α-MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 교환해주었다.

#### (2) 이차배양

Petri dish내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's buffered salt solution, GIBCO Co., U.S.A.)로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위하여 HBSS를 제거하고, 0.25% Trypsin-EDTA(GIBCO Co., U.S.A.)를 dish당 2ml씩 넣고, 3분간 bench 상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 이회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 분주하였다. 분주 비율은 1:3 내지 1:4로 하고 같은 방법으로 5회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

#### (3) 실험 용액의 준비

수중 광중합 레진을 광중합으로 경화시켜 실온에서 24시간 방치한 후 뚜껑이 있는 비이커에 넣고 증류수에 침적시켰다. 약 3개월이 경과된 후 상층액을 수거하여 0.45µm syringe filter(German Sciences, lot No.4184, U.S.A.)로 여과시킨 뒤, 실험용액으로 사용하였다.

#### (4) 세포 독성 실험

계대배양한 치은 섬유아세포를 0.25% Trypsin-EDTA 용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로 세포부유액을 만들었다. 표준 혈구계산 방법을 이용하여 2.5×10<sup>4</sup> cells/wall이 되도록 micro test plate wall(Nunc, Denmark)에 옮겨 10% FBS가 포함된 1ml 배양액에서 배양하였다.

다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거해서 HBSS로 세척하였다. well당 실험용액을 각각 10µl, 100µl씩 첨가한 후 신선한 배양액을

1ml씩 다시 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100% 배양기에서 24시간 배양하고 배양이 끝난 후 생리 식염수에 용해한 MTT(methyl thiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)용액 (Sigma Co., St. Louis, U.S.A., 1mg/ml) 50µl를 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT 용액을 버리고, formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 50µl씩 첨가하였다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(Bio-tek Instruments, Inc., Model EL 308)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 MEM 배양액 well(control)을 사용하였다. 모든 실험 결과는 대조군에 대한 백분율로 다음과 같이 계산하였다.

세포활성도(%) = 실험 well의 흡광도/대조 well의 흡광도 × 100

#### (5) 통계분석

실험 well의 수는 각 군당 두 개씩으로 하였고, Mann-Whitney U test로 분석하고, 만약 p<0.05이면 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

### 2. 생체내 세포독성

레진배양액을 100µl를 응성 백서의 배면 정중성 외방 1cm에 주사하여 이를 후 조직을 채취한 후, Hematoxylin & Eosin 염색 후 염증세포의 침윤 정도를 관찰하였다.

### III. 실험성적

1) 배양 섬유아세포에 미치는 영향: Resin 배양액을 가하여 인체 치은 조섬유세포의 세포활성을 관찰한 결과 100µl를 가한 경우의 세포활성은 대조군 및 10µl를 가한 경우 보다 높았다(Table 1).

Table 1. Cell activity of human gingival fibroblast by resin solution

Concentration	CV± (standard deviation)
Control	100.00 ± (38.28)
Resin 10	109.13 ± (13.59)
Resin 100	174.22*± (35.79)

CV: Cell viability

\*P<0.05, statistically significant

## 2) 배양상청액에 의한 생체내 독성실험

실험군의 조직병리학적 소견에서 모든 군은 피하층에 염증세포침윤 및 세포부종이 관찰되고 출혈 및 근육층의 파괴가 보였다. 먼저 염증세포 침윤 정도를 각 실험군과 비교한 결과 레진군이 가장 염증세포 침윤이 심하였고,  $\alpha$ -MEM과 증류수군은 정도의 침윤상태를 보였으나 증류수군이 약간 더 많았으며 염증세포는 주로 만성 염증세포로 임파구 및 조직구의 침윤반응을 보였다. 간질조직의 부종은 전반적으로 미약하였으나 레진 군에서만 경도로 나타났고, 간질조직내의 출혈소견은 전반적으로 미미해서 각 군간의 차이가 없었다.

근육층의 단절 및 근육층의 파괴도 레진군이 가장 심하게 나타났고 증류수군과의 차이는 크지 않았으나  $\alpha$ -MEM보다는 많았다(Fig.1-3, Table 2).

Table 2. Histopathologic finding of cultured supernatant.

Group	$\alpha$ -MEM	D. W.	Resin
Inflammatory cell infiltration	+	+/++	+++
Interstitial edema	+/-	+/-	+
Hemorrhage	+/-	+/-	+/-
Muscle destruction	+	++	++/+++

+/- : Trace, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe

## IV. 총괄 및 고찰

복합레진은 성분이 개선되어 1면 와동의 수복에 사용한 경우는 수명이 6-7년으로 연장되었지만 (Mjör 등, 1990) 실패원인으로 분해와 변색, 파절 등이 가장 빈번하게 보고된 바 있다(Mjör, 1989). 또한 초기의 복합레진은 중합이 불완전하다는 점이 주요한 단점으로 인식되고 있는데, 중합도는 60-75% 정도로 보고된 바 있다(Ruyter와 Svendsen 등, 1978; Ferracane와 Greener 등, 1984; Ruyter와 Øysaed, 1987). 광중합레진에서도 이와 같은 불완전한 중합은 개선되지 않아서 (Davis와 Mayhew 등,

1986) 수복물 내에는 반응하지 않은 monomer가 잔존하여 구강내에서 용해될 수 있다. 또다른 가능성은 이중결합과 같은 반응부위(reactive site)는 수화 혹은 산화에 민감하므로 쉽게 복합레진이 분해되는 요인이 된다. 일반적으로 반응하지 않고 남은 성분의 용해는 확산계수에 의해 결정되어 나타난다. 확산은 polymer의 종류, 충전제 입자의 표면처리, 용매의 종류 등에 따라 다르게 나타나는데, 용해 가능한 성분의 50%가 초기 3시간 이내에 용해되며, 24시간이면 거의 모두 용해된다고 알려져 있다(Ferracane와 Condon, 1990). Polymer와 잔여 monomer는 산화나 수화에 의해 분해되는데, 분해 성분중 formaldehyde는 총 0.1-0.5 $\mu$ m/cm<sup>2</sup> 정도로 분해되며 시간 경과에 따라 감소하지만 115일이 경과해도 여전히 존재한다고 보고되었다(Øysaed 등, 1988). 충전제 입자중 boron과 silicon이 주로 물에 녹아나오며, 이 중 boron은 유전충전제(glass filler)에서 유리된 것이며, silicon은 충전제를 표면처리한 성분에서 기인한 것이다(Söderholm 1983; Øysaed와 Ryuter 1986). 또한 반응개시제인 benzoyl peroxide가 수화되어 benzoic acid가 수용액 중에서 검출되며, 기타의 분해물질은 catalyst, 억제제, 촉진제, UV-stabilizer 등으로 추정되고 있다(Ruyter와 Øysaed, 1987).

레진은 Buonocore(1970)가 적외선을 이용하여 소와열구전색제로 사용한 이래 수복재로 널리 사용되어 왔으나 과도한 치수손상을 보였으며 이는 레진의 불완전한 중합에 기인한 것으로 설명하였다. 치수손상을 최소화하기 위하여 수복물을 완전히 중합시키는 것이 중요하며 (Stanley, 1984) incremental layering technique을 사용하고 적외선이나 가시광선을 반복조사하여 중합을 최대화하려는 노력이 필요하다. Brännström 등은 복합레진 수복이후 나타나는 치수손상에 관하여 수복재 자체의 독성보다는 변연누출에 의한 세균의 침입의 결과로 해석하였다 (Brännström과 Nyborg, 1971; Brännström과 Vojinovic, 1976). 그러나 수복물을 장착한 후 1주 경과 후에 나타나는 치수병변은 변연누출과 세균으로 생각할 수 있으나, 단기간에 나타나는 심한 치수손상은 수복재의 독성을 연관시키지 않고는 설명하기가 어렵다. Bergenholtz 등(1982)이 지적한 바와 같이 세균이 수복물 하방에서 치수반응을 유발할 수는

있으나 장기간동안 생존하여 치수에 자극을 가한다는 것은 불가능하다.

깊은 와동에서 레진이 불완전하게 중합되면 잔여의 미중합 monomer가 치수에 근접하게 되어 독성을 유발하며, 이러한 경우가 레진 자체의 독성이 가장 큰 문제가 되는 경우이다. 레진 수복물을 충전하기 위해서는 와동형성이 선행되어 와동내의 절단된 상아세관에는 치수액(pulpal fluid)이 존재하므로 레진과 접촉하여 만성적인 자극을 유발할 가능성이 있다(Myers 등, 1976). 따라서 가시광선 중합형 레진은 layering technique으로 사용하고 치수에 손상을 주는 성분을 제거한 제품으로 개선되었다고 해도, 중합수축에 의한 변연누출이나 미중합 monomer, 구강내에 용해되어 나오는 formaldehyde 등의 유해성분이 존재하며, 와동에 적합시 matrix의 압력에 의한 상아세관내로의 유해성분의 유입 등으로 인하여 치수병변을 유발할 수 있다.

세포배양법은 새로운 재료나 개량된 재료의 임상 적용을 위해 사용하는 초기검사의 하나로 널리 사용되고 있다(Stanley, 1985; Feigal 등, 1985; Guess 등, 1985; Hensten-Pettersen과 Helgeland, 1977; Imai 등, 1982; Kasten 등, 1989; Spanberg, 1973; Spanberg 등, 1973).

본 실험에서는 가시광선 중합형 레진을 가시광선을 이용하여 중합하고, 실온에서 24시간 이상 방치하여 중합시켜 증류수 용액에 3개월 정도 침전시킨 후 상청액을 취하여 실험용액으로 사용하였다. 증류수에 침전시킨 시간은 충분히 길어서 수용성인 성분이 대부분 용해되었으리라 사료된다. 실험실내 세포독성 실험에서는 실험용액의 양을 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l로 각각 정하여 이들간의 차이를 관찰하였는데 100 $\mu$ l를 가한 경우에는 대조군과 10 $\mu$ l를 가한군에 비해 통계적으로 유의하게 세포활성이 증가됨을 나타내었다. 이와 같은 세포활성의 증가효과는 Ca(OH)<sub>2</sub> 용액이 폐지의 치수섬유아세포의 DNA 합성능을 증가시킨 경우가 보고된 바 있어서(Torneck 등, 1983) 실험실내에서 실험용액의 어떤 농도에서는 오히려 세포활성 증가효과가 나타나서, 세포가 비정상적인 상태에 도달함을 추론할 수 있다.

레진 배양액을 배양된 치은섬유아세포에 가하여 실험실내 세포독성을 검사하여 세포독성을 관찰하였는데, 레진배양액의 차지하는 비율이 증대될수록

세포활성의 증대가 나타났는데, 레진배양액내에 치은섬유아세포의 활성을 증대시키는 요소가 존재함을 알 수 있다. 그러나 생체내에서의 경우 염증세포 및 근육층의 파괴가 심하게 나타나는 양상을 보였는데, 생체내에서는 숙주에 이물반응을 일으키는 작용을 유발함을 알 수 있다. 이러한 실험실 및 생체내에서의 독성의 차이는 세포수준의 연구와 조직수준의 연구 차이로 생각되는데, 레진 배양액의 세포에 미치는 효과가 선택성이 존재함과 관련이 있는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Resin 배양액을 가하여 인체 치은 섬유아세포의 세포활성을 관찰한 결과 100 $\mu$ l를 가한 경우의 세포활성은 대조군 및 10 $\mu$ l를 가한 경우보다 높았으며, 조직병리학적 관찰에서는 레진 군이 가장 염증세포 침윤이 심하였고, 염증세포는 주로 만성 염증세포로 임파구 및 조직구의 침윤반응을 보였다. 간질조직의 부종은 경도로 나타났고, 심한 근육층의 단절 및 근육층의 파괴가 심하였다.

## 참 고 문 헌

1. Bergenholtz G. Relationship between bacterial contamination of denin and restorative success. In : Rowe N, editor. Proceedings of symposium on dental pulp : Reaction to restorative materials in the presence or absence of infection. Ann Arbor(MI) : University of Michigan, 93-107, 1982.
2. Bergman. Side-effects of amalgam and its alternatives ; local, systemic and environmental. Int Dent J 40 : 4-10, 1990.
3. Bowen RL. Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bis phenol and glycidyl acrylate. us patent3 066 : 112, 1962.
4. Brännström M, Vojinovic O. Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. J Dent Child 43 : 83-89,

- 1976.
5. Brännström, Nynorg H. The presence of bacteria in cavities filled with silicate cement and composite resin materials. *Swed Dent J* 64 : 149–155, 1971.
  6. Buonocore M. Adhesive sealing of pits and fissures for caries prevention with use of ultraviolet light. *J Am Dent Assoc* 80 : 324–328, 1970.
  7. Davis RD, Mayhew RW. A clinical comparison of 3 anterior restorative resins after three years. *J Am Dent Assoc* 112 : 659–663, 1986.
  8. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Archs Oral Biol* 30 : 609–613, 1985.
  9. Ferrancane JL, Condon R. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater* 6 : 282–287, 1990.
  10. Ferrancane JL, Greener EH. Fourier transform infrared analysis of degree of polymerization in unfilled resins. Method comparison. *J Dent Res* 63 : 1993–1095, 1984.
  11. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmiat B, Autian J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J Pharm Sci* 54 : 1545–1547, 1965.
  12. Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85 : 291–269, 1977.
  13. Imai Y, Watanabe A, Chang RI, Masuhara E. Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J Dent Res* 61(8) : 1024–1027, 1982.
  14. Kasten FH, Fineda LF, Schneider PE, Pawls HR, Foster TA. Biocompatibility testing of an experimental fluoride releasing resin using human gingival epithelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 25 : 57–62, 1989.
  15. Mjör IA, Jolstad A, Qvisit v. Amalgam and composite resin restorations : longevity and reasons for replacement. In : Anusavice KJ, editor. *Quality evaluation of dental restorations : Criteria for placement and replacement*. Chicago : Quintessence publishing Co., Inc., 95–108, 1989.
  16. Mjör IA, Wennberg A. Biocompatibility considerations of composite resins. A discussion paper. In : Vanherle G, Smith DC, editors. *Posterior composite resin dental restorative materials*. Amsterdam (The Netherlands) : Peter Szulc Publishing, 83–90, 1985.
  17. Myers CL, Stanley HR, Heyde JB, Chamberlain J. Primate pulpal response to ultraviolet light. Polymerized direct-bonding material systems. *J Dent Res* 55 : 1118–1124, 1976.
  18. Ruyter E, Svendsen SA. Remaining methacrylate groups in composite restorative materials. *Acta Odontol Scand* 36 : 75, 1978.
  19. Ruyter E. Kompositte tannfyllingsmaterialer. *Tandlakartidnigen* 76 : 1207, 1984.
  20. Ruyter IE, Øysaød H. Composites for use in posterior teeth : Comparison and conversion. *J Biomed Mater Res* 21 : 11–233, 1987.
  21. Ruyter IE, Øysaød H. Composites for use in posterior teeth : Composition and conversion. *J. Biomed Mater Res* 21 : 11–23, 1987.
  22. Spanberg L, Rodrigues H, Langeland K. Biologic effects of dental materials toxicity of anterior tooth restorative materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg* 36 : 713–724, 1973.
  23. Spanberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg* 35 : 389–401, 1973.
  24. Stanley HR. Pulpal responses. In Burns RC, Cohen S, editors. *Pathways of the pulp*, 3rd ed., Chap 14, St. Louis(MO) : C.V. Mosby. 465–489, 1984.
  25. Stanley HR. Toxicity testing of dental materials, CRC, 1985. Söderholm KJ. Leaking of fillers in dental composites. *J Dent Res* 62 : 126

— 30, 1983.

26. Torneck CD, Moe H, Howley TP. The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endod* 9 : 131–6, 1983.
27. Øysaød H, Ruyter IE, Kleven IJS. Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res* 67 : 1289–1294, 1988.
28. Øysaød H, Ruyter IE. Water sorption and filler characteristics of composite for use in posterior teeth. *J Dent Res* 65 : 1315–1318, 1986.

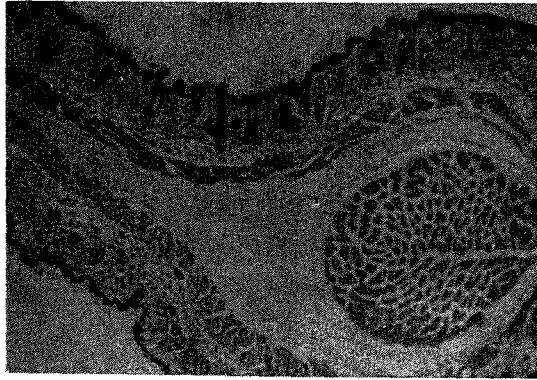


Fig 1. Histopathologic features of  $\alpha$ -MEM injected group(Hematoxyline & Eosin, Magnification  $\times 40$ ). There were mild inflammatory cell infiltration & muscle destruction, and trace interstitial edema & hemorrhage.

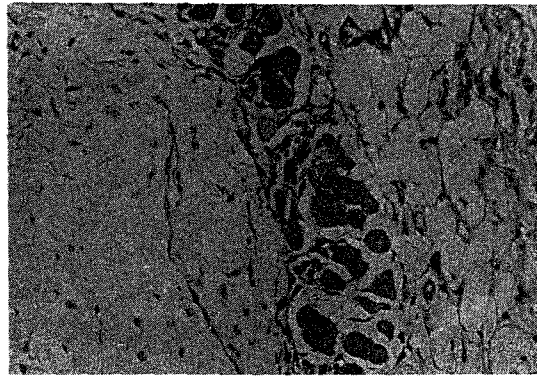


Fig 2. Histopathologic features of D.W injected group(Hematoxyline & Eosin, Magnification  $\times 40$ ). There were mild or severe inflammatory cell infiltration, moderate muscle destruction, and trace interstitial edema & hemorrhage.



Fig 3. Histopathologic features of resin solution injected group(Hematoxyline & Eosin, Magnification  $\times 40$ ). Resin solution injected group. There were severe inflammatory cell infiltration, mild interstitial edema, trace hemorrhage, and moderate or severe muscle destruction.

## A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF THE INCUBATED RESIN SOLUTION

Mi Kyung Im<sup>1</sup>, Eun Chul Kim<sup>2</sup>, Soo Kyung Yoo<sup>3</sup>, Kang Ju Kim<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>Dept. of Conservative Dentistry, <sup>2</sup>Dept of Oral Pathology and*

*<sup>3</sup>Dept. of Oral Microbiology, College of Dentistry, Wonkwang University*

To know the in vitro and the in vivo cytotoxicity of resin solution, resin solution was applied to cultured fibroblast and was injected into the mouse. The cytotoxic effect of resin solution was measured by MTT assay and in vivo cytotoxicity was examined after Hematoxylin and Eosin staining. The cell activity of resin solution in the concentration of 50% was significantly decreased compared to control group and 5% group. In histopathologic study of resin solution, there were severe inflammatory cell infiltration, mild interstitial edema, trace hemorrhage, and moderate or severe muscle destruction in resin injected group.

These results suggested that there might be some differences between the cell viability of fibroblast and in vivo cell cytotoxicity. Further study is needed to clarify the cytotoxicity by direct implanting of resin mass.