

## <sup>51</sup>Cr방출과 MTT 및 LD활성도를 이용한 역충전재의 세포독성에 관한 연구

원광대학교 치과대학 치과보존학교실  
최라영 · 임미경

### I. 서 론

외과적 근관치료는 통상적인 근관치료가 실패한 경우와 보존적인 근관치료만으로는 완벽한 치료효과를 기대하기 어려운 경우에 시행되는데, 치근단 절제후에 역충전을 하는 경우가 많다. 이때 사용하는 역충전재로는 아말감, gutta-percha, polycarboxylate cement, gold foil, 복합레진, 글라스아이오노머 시멘트 등 거의 모든 종류의 충전재들이 사용되고 있다<sup>1)</sup>. 이중 아말감은 다른 역충전재와 비교시 치근단 폐쇄효과가 우수하고 수술중 사용이 편리하여 장기간에 걸쳐 사용되어 왔으나<sup>2,3)</sup> 치근단부 생활조직과 직접 접촉시 부식으로 인한 변연 파괴 및 계면의 전류발생이 보고되었고<sup>4,5)</sup> 장기간에 걸친 임상증례의 추적조사에서 실패도 다수 보고된 바 있다<sup>6)</sup>. 이러한 아말감의 단점 때문에 여러가지 다른 수복재를 역충전재로 사용하기 시작하였으며, 근래 개발된 글라스아이오노머 시멘트는 치아구조에 화학적으로 결합하므로 수술시 유지형태를 부여하기 어려운 부위에 사용하기 편리하며, 생체적합성이 비교적 우수한 장점이 있으나<sup>7,8)</sup> 시멘트 고유의 용해성과 글라스아이오노머 시멘트가수분에 조기 접촉시에는 물성이 현저히 감소되고 시간 경과에 따라 변연의 폐쇄효과가 불확실한 단점이 있다<sup>9)</sup>. 최근 활발히 연구되고 있는 상아질 결합제를 이용한 복합레진은 상아질 결합제의 결합력이 증대됨에 따라 역충전재로서 사용되기

시작하였다<sup>10,11)</sup>. 그러나 상아질 결합제와 복합레진은 Bis-GMA와 관련된 methacrylate유도체로 인하여 세포독성을 나타내며, 우식와동에 충전재로 사용하는 경우에는 변연 폐쇄 효과가 현저히 낮은 것으로 보고된 바 있다<sup>12)</sup>.

역충전재가 구비하여야 할 요구조건으로는 여러가지를 생각할 수 있으나, 역충전재는 치근단의 생활조직과 장기간 직접 접촉하므로 생체적합성이 가장 중요하며 생체적합성은 임상적으로 사용하는 경우에 그 선택의 기준이 된다고 볼 수 있다. 생체재료의 독성평가에 사용되는 방법은 생체의(in vitro)와 생체내(in vivo) 실험방법으로 대별할 수 있다. 생체의 방법은 실험조건을 통제할 수 있어 재현성이 우수할 뿐 아니라 신속하고 실험 조건을 표준화할 수 있다. 생체의 방법은 주로 세포 배양을 이용하여 각 재료가 세포에 대하여 나타내는 독성을 연구하는 방법이 사용되고 있는데, 이 경우 한 종류의 세포만을 대상으로 하기 때문에 실제 생체내에서 일어나는 여러가지 세포와 조직간의 대사나 염증, 면역 반응과 같은 상호작용을 고려할 수 없는 불리한 점이 있다. 생체내 방법은 수복재를 검사하려고 할 때는 최소한 생체의 실험에 비하여 장기간이 소요되는 불리한 점이 있으며 생체의 방법과 생체내 방법의 연구 결과는 상관성이 없는 경우가 많다<sup>13,14)</sup>.

생체재료의 독성 평가는 1982년 ANSI/ADA가 규정한 치과재료의 독성 평가방법에 따르면<sup>15)</sup>

세포배양을 이용한 독성 평가방법<sup>16-21)</sup>과 피하나 끝에 매식하여 조직반응을 관찰하는 방법이 사용되었다<sup>22-26)</sup>. 세포배양을 이용한 독성 평가 방법에는 세포막의 투과도 변화를 측정하는 agar overlay방법과 radiochromium(<sup>51</sup>Cr)방출량의 측정방법이 있으며, 세포내 대사의 변화를 측정하는 방법으로 염색한 후 현미경하에서 관찰하는 millipore filter방법이 있다. 발색을 이용한 측정방법(colorimetric assay)은 생존세포의 수를 평가하는 방법으로서 acid phosphatase(AP), neutral red(NR), crystal violet dye elution(CVDE), tetrazolium dye(3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl dimethyltetrazolium bromide (MTT) 방법과 sulforhodamine B(SRB)방법이 있다<sup>27)</sup>. 이 중 가장 많이 사용되는 방법은 agar overlay 방법과 radiochromium 방출량의 측정방법이다.

Radiochromium방출은 1973년 Spangberg<sup>28)</sup>가 소개한 방법으로 고형 형태의 재료의 독성을 평가하는 방법으로서 검사하고자 하는 재료를 반드시 세포에 직접 접촉시켜야 한다. 이 방법은 재료와 접촉된 후 나타나는 세포의 변화를 직접 관찰하기 어려울 때 사용되는 방법이며 세포의 손상을 정량적으로 평가할 수 있는 방법으로 아주 예민하고 대부분의 독성 물질에 대하여 독성이 증가함에 따라 세포내 <sup>51</sup>Cr의 방출도 증가한다<sup>29)</sup>. 이러한 독성 평가에 사용된 실험에는 여러가지 종류의 세포가 사용되었으나 쥐의 섬유아세포인 L929세포가 가장 자주 사용되었는데 인체내에서 실제로 접촉되는 세포가 아닌 영구 세포주인 L929 세포를 이용하는 것은 실험자간에 실험 조건을 동일하게 부여함으로써 다른 연구자의 결과와 상호 비교를 쉽게 하기 위한 것이다.

MTT방법은 세포의 생활력과 증식 및 활성을 측정할 수 있는 예민한 방법으로서 정량적인 측정이 가능하며, 생존 세포내의 미토콘드리아의 dehydrogenase가 노란색의 MTT를 불용성인 formazan으로 전환할 수 있는 능력을 이용한 방법으로 형성되는 formazan의 양은 생존세포의 수에 비례한다<sup>30,31)</sup>. MTT방법은 과정이 간단하고 96-well plate를 사용하기 때문에 동

시에 많은 실험을 할 수 있고 방사능 물질을 취급하지 않기 때문에 방사능의 노출이나 폐기에 따른 문제도 없다. 세포의 손상 정도가 심할수록 방출된 방사능(cpm)의 수치가 큰 <sup>51</sup>Cr의 방법과는 달리 MTT법은 formazan을 형성하여 흡광도가 클수록 세포의 활성도가 우수하다고 할 수 있다<sup>32)</sup>.

Lactate dehydrogenase(LD)를 이용한 방법은 세포질내에 존재하는 효소인 LD가 역충전재의 독성에 의하여 세포가 손상될 때 유리되는 것을 측정하는 방법으로 LD활성도가 클수록 세포 독성이 크다고 할 수 있다. LD는 세포가 죽거나 파괴된 경우에 그 활성이 나타나는데 이에 영향을 미치는 요인으로는 LD효소 자체의 안정성과 pH, 용해된 산소의 양, 배지의 조성 및 배양 상태등이 있으며 방사능 물질을 사용하지 않고 자동화된 기기에 의하여 검사하고자 하는 물질이 대량인 경우에도 신속하고 정확하게 그 활성도를 측정할 수 있다<sup>33,34)</sup>.

현재 역충전재로 여러가지 재료가 사용되고 있으나, 이들 재료의 생체 적합성에 관한 연구는 적고 특히 최근에 개발된 광중합 충전용 글라스아이오노머 시멘트와 복합 레진을 포함한 역충전재에 관한 포괄적인 연구가 필요하다고 사료되어 본 연구에서는 L929세포를 사용하여 각 역충전재의 독성을 비교하고자 하였다. 검사 방법으로는 <sup>51</sup>Cr방출량 측정법 이외에 발색법인 MTT, 생체 효소인 LD활성도 측정법을 사용하여 각 검사 방법에 따른 세포 독성을 조사하여, 방사능 오염과 폐기등의 문제가 있는 <sup>51</sup>Cr방출량 측정법 대신 비교적 안전하고 간단한 발색법 혹은 효소 측정법으로 실험방법을 대체할 수 있는지를 모색하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 역충전재로는 아말감 alloy인 Bestalloy(동명합금, 한국), 광중합 복합레진인 Prisma APH(Densply International Inc., U. S. A.), 화학 중합 복합레진인 Clearfil FII(Kuraray Co., Japan), 화학중합 글라스아

이오노머 시멘트인 Fuji II(GC Co., Japan), 광중합 글라스아이오노머 시멘트인 Fuji II LC (GC Co., Japan), IRM(Densply Co., U. S. A.) 등 6종이었으며 세포는 영구세포주인 L929세포 (한국세포주은행)를 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 실험재료의 준비

고형재료의 독성평가를 위하여 각 역충전재를 직경이 16mm인 24-well 세포 배양용 plate(Corning, NY, U. S. A.)의 바닥으로부터 높이가 약 1.5mm가 되도록 혼합하였다. 재료를 혼합한 즉시 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기 (비전과학, Model No. VS-9108 MS, 한국)에서 24시간, 일주일 동안 경화시켰다.

역충전재를 추출한 용액(이하 추출용액)의 평가를 위하여 24 well plate에 높이가 약 1.5 mm가 되도록 역충전재를 혼합한 후 혼합직후 배양액 2ml을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 24시간 동안 방치하여 독성성분을 추출하였다. 또한 각 재료를 혼합하여 24시간, 1주일간 배양기에 방치하여 경화시킨 후 배양 배지를 첨가하여 24시간 동안 추출하였다. 실험용액은 0.2µm(Nalgene, U. S. A.)의 여과주사기(syringe filter)로 여과시킨 후 추출용액으로 사용하였다.

### 2) 세포의 준비

L929 세포를 Earle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium(MEM)에 10% (vol/vol) fetal calf serum, 2mM L-glutamine, sodium bicarbonate 2.2mg/ml, streptomycin 50 ug/ml, penicillin 100U/ml을 첨가하였다. 세포의 증밀도(confluency)가 약 80-90%일 때 계대하여 실험에 사용하였으며, 배양배지는 실험하기 3일과 하루전에 각각 새로운 배지로 교환하였다. 실험 당일에 배양액이 든 75cm<sup>2</sup> 플라스크의 배양액을 버리고 인산완충용액으로 2회 세척하였는데 1회 세척시에는 20ml, 2회 세척시에는 10ml을 사용하고 전여액은 파이펫으로 제거하였다. 플라스크 바닥에서 세포를 제거하기 위하여 0.25% trypsin 5ml을 넣고 30초간 실온에 방치한 후 trypsin용액을 버린

후 플라스크를 CO<sub>2</sub>배양기에 5분간 두었다. 배양액 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거한 후 세포를 배양액으로 부유시켜 세포수를 조정하였다.

### 3) Radiochromium 방출법

<sup>51</sup>Cr은 멸균 등장식염수에 든 sodium chromate(specific gravity, 428.12mCi/mg, New England Nuclear/Dupont, DE, USA)를 사용하였는데, 실험시작 24시간 전에 단층세포(monolayer)에 약 100µCi/8×10<sup>5</sup>cells으로 <sup>51</sup>Cr을 표지한 후 0.25% trypsin(Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>가 없는 인산완충용액)으로 플라스크의 바닥에서 떼 다음 사용하기 전에 Eagle's MEM으로 3회 세척하여 3-4×10<sup>5</sup> cells /ml이 되도록 세포수를 조정하였다.

고형재료의 독성평가를 위하여 표지된 세포액 2ml을 고형역충전재가 든 8개의 well에 넣었으며, 5개의 빈 well에 표지된 세포액을 2ml을 넣어 대조군으로 사용하였고 6개의 시험관에 세포액 0.5ml씩을 취하여 참고치(reference)로 사용하였다. 실험군과 대조군 plate를 CO<sub>2</sub>배양기에서 4시간과 24시간 동안 배양한 후 각 well에서 1ml씩 취하여 500g에서 8분간 원심분리하여 각 상청액의 0.5ml을 새로운 시험관에 옮기고 1분간 gamma particle counter(Gamma 5500, Beckman Instruments, Wakefield, MA, USA)에 옮겨서 분당 방사능 양(count per minute, cpm)을 측정하였다.

추출용액의 독성평가를 위하여 추출용액 1ml과 <sup>51</sup>Cr으로 표지된 세포액 1ml을 혼합한 후 1ml을 취하여 8분간 500g에서 원심분리하여 각 상청액의 0.5ml을 새로운 시험관에 옮기고 gamma particle counter에 옮겨서 cpm을 측정하였다.

실험군과 대조군에서 <sup>51</sup>Cr의 방출량은 참고치로 나누어 다음과 같이 백분율을 계산하였다.

$$^{51}\text{Cr release}(\%) = \frac{^{51}\text{Cr release in the test sample}}{^{51}\text{Cr release in the reference sample}} \times 100$$

#### 4) MTT법

MTT실험에서는 세포수를  $2 \times 10^6$  cells/ml로 조정하여 사용하였다.

추출용액의 독성평가를 위하여 96-well plate (Corning, NY, U. S. A.)에 well당 100 $\mu$ l씩 세포를 분주하여 CO<sub>2</sub>배양기에서 24시간동안 배양하였으며 각 역충전제 당 8개의 well을 사용하였고 역충전제와 접촉시키지 않은 세포액이 든 8개의 well을 대조군으로 하였다.

추출용액은 각 well에 50 $\mu$ l씩 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 배양하였다.

tetrazolium dye(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl dimethyltetrazolium bromide (MTT, 98%, MW 414, C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S, Jensen Chemical, Belgium)를 인산완충용액에 2mg/ml가 되도록 녹인 후에 각 well에 50 $\mu$ l씩 첨가하여 4시간 동안 CO<sub>2</sub>배양기에서 배양한 후 MTT용액을 버리고, dimethyl sulfoxide (DMSO, SO(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MW 78.1, Merck)용액을 well당 50 $\mu$ l씩 넣고 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA Reader II(Behring, Serial No. 350160, Germany)에서 측정파장 570nm, 참고파장 650nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군에 대하여 실험군에서 생성된 formazan결정의 흡광도를 다음과 같이 계산하여 세포의 활성도를 측정하였다.

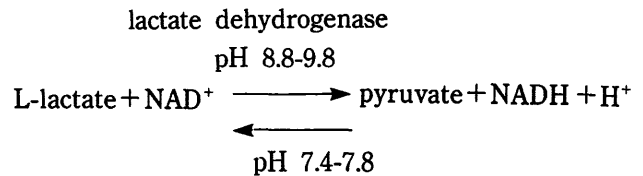
Cell viability(%) =

$$\frac{\text{Absorbance of experimental wells}}{\text{Absorbance of control wells}} \times 100$$

#### 5) Lactate dehydrogenase(LD) 측정법

고형재료의 독성평가를 위하여 세포수를  $2 \times 10^6$  cells/ml로 조정하여 역충전제가 든 well에 세포액 2ml을 첨가하고 CO<sub>2</sub>배양기에서 24시간 동안 배양한 후 각 well에서 1ml씩 취하여 시험관에 옮긴 후 500g에서 8분간 원심분리한 후 상청액 300 $\mu$ l을 취하여 sample cup에 넣고 생화학 자동분석기(Dimension autoanalyzer, Dupont, USA)로 lactate dehydrogenase(LD)효소의 활성도를 측정하였는데 대조군으로는 동량의 세포 배양액만을 넣은 것을 사용하였다.

LD활성도의 원리는 기질인 lactate와 NAD<sup>+</sup>로부터 용액내의 LD효소에 의해 형성되는 pyruvate와 NADH가 형성되는 것을 이용해 NADH의 발색정도를 측정하여 LD의 활성도 (IU/ml)를 평가하는 방법이다.



#### 6) 실험결과의 분석

<sup>51</sup>Cr 방출법에서는 각 실험군 및 대조군의 <sup>51</sup>Cr방출량을 각각 실험 직후 측정된 참고치로 나누어 백분율을 계산하였고 MTT법과 LD측정법에서는 실험군과 대조군을 설정하여 각각 흡광도 및 LD활성도를 측정, 비교하였다.

대조군에 대한 실험군의 세포독성에 관한 통계적 유의성은 Student's t-test를 시행하였고, 각 역충전제간의 유의성은 ANOVA를 시행하였으며, 유의수준 p<0.05인 경우에서 유의하다고 판정하였다.

### III. 실험성적

#### 1. <sup>51</sup>Cr 방출법

##### 1) 고형재료와 4시간 직접 접촉군

<sup>51</sup>Cr으로 표지한 L929세포를 각 충전제에 4시간 동안 직접 접촉시킨 후 방출된 <sup>51</sup>Cr의 양으로 세포독성을 평가한 결과는 Table 1과 같다. 아말감에서는 혼합한 직후에 배지를 첨가한 군(이하 즉시군)에서는 참고치(reference sample)에 대한 <sup>51</sup>Cr방출량이 4.7%로서 대조군(4.1%)과 비슷하였다. 그러나 24시간과 168시간 경화시킨 후에 배지를 첨가한 군(이하 각각 1일군과 7일군)에서는 대조군과 비교시 독성이 약간 증가하였지만 유의성은 나타나지 않았다. 화학중합 복합레진은 세 군에서 모두 대조군과 유의한 차이를 보여 세포 독성을 나타내었다

( $p < 0.05$ ). 광중합 복합레진은 즉시군, 1일군, 7일군에서 모두 대조군에 비하여 독성이 강하였다. 7일군 (26.3%)은 즉시군(14.9%)과 1일군(11.8%)에 비하여 유의하게 높은  $^{51}\text{Cr}$ 의 방출을 보였다( $p < 0.05$ ). 화학중합 글라스아이오노머 시멘트는 세군 모두에서 독성이 없었다. 광중합 글라스아이오노머 시멘트는 7일군 (25.2%)에서 즉시군(5.8%)이나 1일군(6.7%)에 비하여 세포독성이 강하였다( $p < 0.05$ ). IRM에서도 7일군 (12.0%)은 대조군과 1일군에 비하여 독성이 강하였다( $p < 0.05$ ).

6종의 재료에 대하여  $^{51}\text{Cr}$ 방출량을 비교해 보면 즉시군과 1일군에서는 화학중합 복합레진과 광중합 복합레진이 나머지 4종의 역충전

재와 비교시 강한 독성을 보였다( $p < 0.05$ ). 그러나 7일군에서는 화학중합형 복합레진과 광중합 복합레진 이외에 광중합 글라스아이오노머 시멘트의 독성도 현저히 증가되었으며, IRM의 독성도 증가하였고 아말감과 화학중합 글라스아이오노머 시멘트 2가지 재료는 계속 낮은 독성을 보였다.

## 2) 고형재료와 24시간 직접 접촉군

L929세포에 각 재료를 24시간 동안 직접 접촉시킨 후 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 의 참고치에 대한 백분율은 Table 2와 같다. 아말감에서 대조군의 방출량은 20.3% 이었으며, 즉시군은 32.4%로 나타나 대조군보다 약간 증가하였으며 1일군에서 7일군으로 가면서 방출량은 30.1%과 28.

Table 1. Radiochromium release(%) from L929 cells after 4-hour direct contact with six retrograde filling materials\*

Materials	Preparation			
	Freshly mixed	24-hour setting	168-hour setting	Control
Amalgam	4.7±0.2	5.6±1.7	7.4±2.1	4.1±0.3
Composite	10.3±0.6	14.1±2.1	17.2±1.5	4.4±0.3
Light curing composite	14.9±4.4	11.8±3.5	26.3±2.4	4.2±0.2
Glass ionomer cement	4.8±0.8	5.4±0.6	5.1±0.8	4.4±0.3
Light curing glass ionomer cement	5.8±0.8	6.7±2.2	25.2±3.8	4.0±0.3
IRM	5.8±0.5	3.3±0.8	12.0±3.2	3.8±0.2

\* Direct cell/material contact, mean±SD.

Table 2. Radiochromium release(%) from L929 cells after 24-hour direct contact with six retrograde filling materials

Materials	Preparation			
	Freshly mixed	24-hour setting	168-hour setting	Control
Amalgam	32.4±4.5	30.1±3.4	28.9±2.5	20.3±1.8
Composite	67.1±6.9	84.5±2.2	82.9±6.9	20.8±0.4
Light curing composite	79.1±3.6	79.1±7.6	63.4±8.2	19.3±0.8
Glass ionomer cement	23.5±2.3	31.6±4.5	26.0±2.4	20.5±0.7
Light curing glass ionomer cement	62.1±8.4	69.6±2.7	50.2±7.5	15.9±6.4
IRM	68.5±4.2	66.8±5.0	59.3±2.7	18.8±1.6

9%로 각각 감소되어 경화후에는 오히려 아말감의 독성 발현이 감소되는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 화학 중합 복합레진에서는 즉시군의 방출량은 67.1%로서 대조군(20.8%)에 비하여 세포손상의 정도가 매우 강하게 나타났다( $p < 0.05$ ). 1일군과 7일군에서도 방출량은 84.5%와 82.9%로 강하게 유지되었다( $p < 0.05$ ). 광중합 복합레진은 대조군의 19.3%에 비하여 즉시군은 79.1%로서 L929세포의 손상정도가 심하였다. 이러한 독성은 1일군과 7일군에서 방출량이 79.1%와 63.4%로 대조군에 비하여 여전히 강한 세포 손상을 나타내었다( $p < 0.05$ ). 화학 중합 글라스아이오노머 시멘트는 대조군과 비슷한 방출량을 보여 6가지 역충전재 중 가장 독성이 낮았다. 광중합 글라스아이오노머 시멘트에서는 즉시군에서 방출량이 62.1%로서 대조군(15.9%)에 비하여 독성이 매우 강하였으며( $p < 0.05$ ), 1일군(69.6%)과 7일군(50.2%)에서도 이러한 독성은 지속되었다. IRM에서는 즉시군의 방출량은 68.5%로서 대조군에 비하여 유의하게 높았고 1일군(66.8%)과 7일군(59.3%)에서도 독성이 높게 유지되었다( $p < 0.05$ ).

### 3) 추출용액과 4시간 접촉군

각 실험 재료를 혼합한 즉시, 24시간과 일주일 경화시킨 후 배양액으로 24시간 동안 추출하여 그 추출액과 L929세포를 4시간 동안 접촉시킨 후에 각 군에서 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 의 양을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 아말감 추출

액에서 대조군의 방출량은 5.6%임에 비하여 즉시군에서는 3.6%로 대조군에 비하여 오히려 낮은 수치를 나타냈다. 1일군과 7일군에서는 방출량이 3.1%와 2.7%로 감소되어 오히려 독성효과가 점차 낮아지는 경향을 보였다. 화학 중합 복합레진에서도 즉시군의 방출량은 대조군의 7.0%보다 낮아서 독성을 보이지 않았다. 즉시군에서 1일군과 7일군으로 갈수록 방출량은 점차 감소하였다. 광중합 복합레진에서도 즉시군과 1일군, 7일군 모두 대조군에 비하여 방출량이 높아서 독성을 보이지 않았다. 화학 중합과 광중합 글라스아이오노머 시멘트에서도 세 군 모두에서 대조군에 비하여 방출량이 낮아서 세포손상을 보이지 않았다. 또한 IRM® 역시 세군에서 모두 독성을 보이지 않았다. 이상 6종류의 재료 모두에서 추출 용액에 4시간 동안 접촉된 경우에는 모든 군에서 세포 독성이 나타나지 않았다.

### 4) 추출 용액과 24시간 접촉군

각 실험재료의 추출용액과 L929세포를 24시간 접촉시킨 후에 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 을 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 이 결과는 전체적으로 Table 3과 비슷한 양상을 나타내었다. 6가지 재료 모두에서 즉시군, 1일군과 7일군 모두 대조군보다 낮은 값으로서 독성이 나타나지 않았다.

### 5) 실험조건에 따른 역충전재 독성의 비교

혼합 즉시군의 아말감에서 대조군에 대한 상대적인  $^{51}\text{Cr}$  방출을 각 실험조건에 따라 나타낸 결과는 Fig.1과 같다. 고탄 재료를 세포와

Table 3. Radiochromium release(%) from L929 cells affected for 4 hours by elution solutions of six retrograde filling materials

Materials	Preparation			
	Freshly mixed	24-hour setting	168-hour setting	Control
Amalgam	3.6±0.9	3.1±0.2	2.7±0.1	5.6±0.5
Composite	3.0±0.5	2.7±0.2	2.5±0.2	7.0±0.4
Light curing composite	3.0±0.3	2.2±0.2	2.6±0.2	4.7±0.1
Glass ionomer cement	2.9±0.5	2.8±0.2	2.1±0.1	5.7±0.7
Light curing glass ionomer cement	2.9±0.4	2.5±0.2	2.5±0.1	5.3±0.4
IRM	2.6±0.2	2.7±0.9	• 2.6±0.2	5.0±0.4

Table 4. Radiochromium release(%) from L929 cells affected for 24 hours by elution solutions of six retrograde filling materials

Materials	Preparation			
	Freshly mixed	24-hour setting	168-hour setting	Control
Amalgam	10.6±1.4	11.3±1.3	9.2±1.7	16.7±3.0
Composite	7.6±0.6	8.2±0.4	8.7±0.5	30.0±3.6
Light curing composite	8.9±0.6	6.2±0.9	10.5±0.1	15.5±1.0
Glass ionomer cement	8.6±0.8	9.8±0.5	9.7±0.1	19.6±1.7
Light curing glass ionomer cement	8.4±1.1	9.0±1.3	8.5±1.1	21.8±3.3
IRM	13.2±2.7	11.7±2.1	18.1±1.3	18.1±1.3

Relative release of cpm value

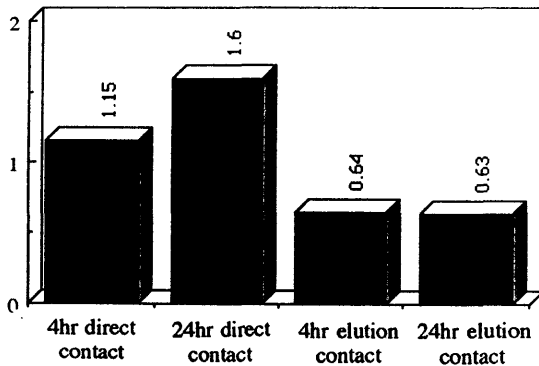


Fig.1. Relative release of radiochromium of freshly mixed amalgam compared to control group.

4시간 동안 직접 접촉시킨 경우는 대조군에 비하여  $^{51}\text{Cr}$ 의 방출이 1.15배 증가하였으며 24시간 접촉시킨 경우는 1.6배 증가하여 세포독성이 강하였다. 그러나 추출 용액과 접촉시켜 실험한 경우는 대조군에 비하여  $^{51}\text{Cr}$ 의 방출이 낮아서 독성을 관찰하지 못하였다. 혼합 즉시군의 화학 중합 복합레진에서 대조군에 대한 상대적인  $^{51}\text{Cr}$  방출을 각 실험 조건에 따라 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다. 고형 재료를 세포와 4시간 동안 직접 접촉시킨 경우는 대조군에 비하여  $^{51}\text{Cr}$  방출이 2.34배로 증가되었으며, 24

Relative release of cpm value

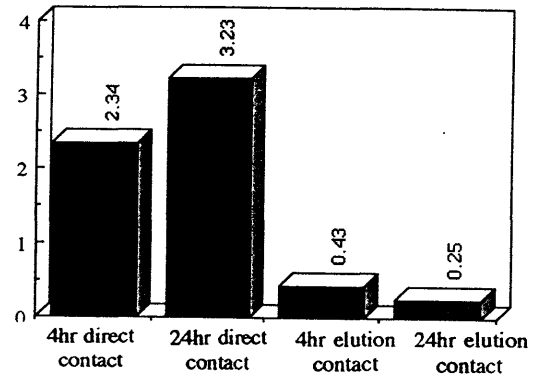


Fig.2. Relative release of radiochromium of freshly mixed composite compared to control group.

시간 접촉시켜 실험한 경우는 3.23배로 증가되어 가장 강한 독성을 보였으나 추출 용액과 4시간, 24시간 동안 각각 접촉시킨 경우에는 독성을 보이지 않았다. 혼합 즉시군의 광중합 복합레진에서 대조군에 대한 상대적인  $^{51}\text{Cr}$  방출을 각 실험조건에 따라 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다. 고형재료를 세포와 4시간 동안 직접 접촉시킨 경우는 대조군에 비하여  $^{51}\text{Cr}$  방출이 3.5배 증가하고 24시간 접촉시킨 경우는 4.1배로 증가하여 심한 세포의 손상을 보였다. 그러나 추출용액과 4시간, 24시간 동안 접촉시킨 경

Relative release of cpm value

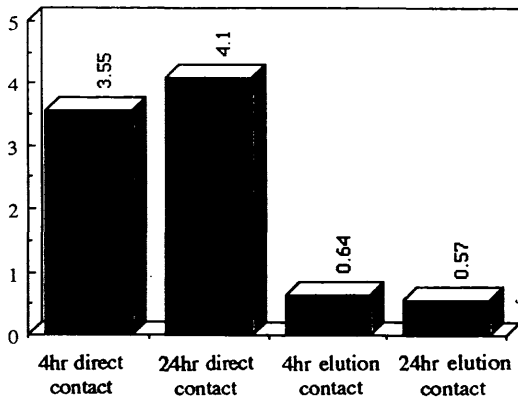


Fig.3. Relative release of radiochromium of freshly mixed light curing composite compared to control group.

Relative release of cpm value

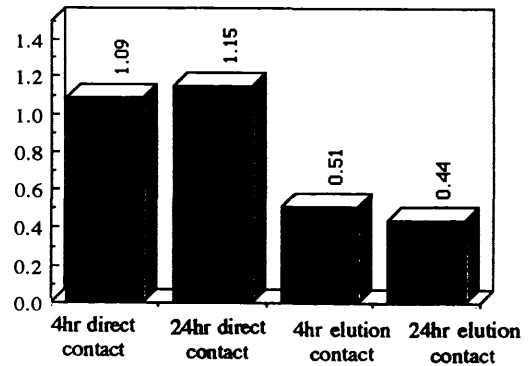


Fig.4. Relative release of radiochromium of freshly mixed glass ionomer cement compared to control group.

Relative release of cpm value

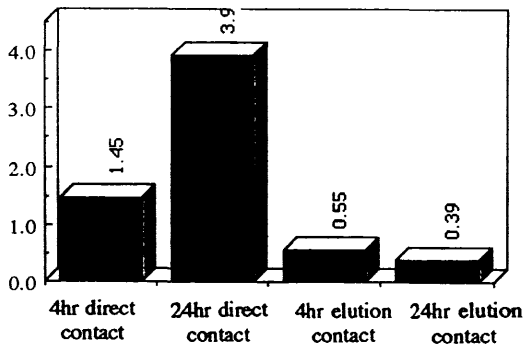


Fig.5. Relative release of radiochromium of freshly mixed light curing glass ionomer cement compared to control group.

Relative release of cpm value

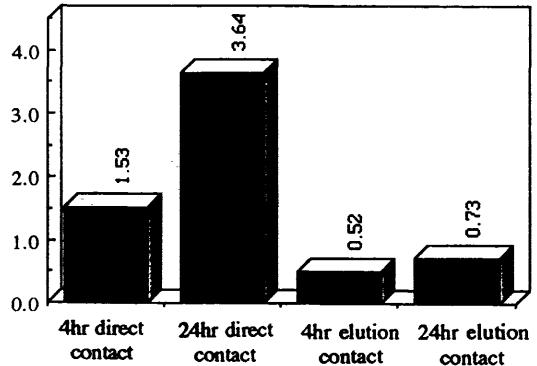


Fig.6. Relative release of radiochromium of freshly mixed IRM compared to control group.

우에는 0.64, 0.57로  $^{51}\text{Cr}$  방출이 낮았다.

혼합 즉시군의 화학 중합 글라스이오노머 시멘트에서 대조군에 대한 상대적인  $^{51}\text{Cr}$  방출을 각 실험조건에 따라 나타낸 결과는 Fig.4와 같다. 고형재료를 세포와 4시간 동안 직접 접촉시킨 경우는 대조군에 비하여  $^{51}\text{Cr}$  방출이 1.09배 증가하고 24시간 동안 접촉시킨 경우는 1.15배 증가하였으나 추출용액과 접촉시킨 경우에는  $^{51}\text{Cr}$  방출이 낮았다. 혼합즉시군의 광중

합 글라스이오노머 시멘트에서 대조군에 대한 상대적인  $^{51}\text{Cr}$  방출을 각 실험조건에 따라 나타낸 결과는 Fig.5와 같다. 고형재료를 4시간 동안 직접 접촉시킨 경우는  $^{51}\text{Cr}$  방출이 1.45배로 증가하였고 24시간 동안 접촉시킨 경우는 3.9배로 현저히 증가하여 독성이 강하였다. 그러나 추출용액과 접촉시킨 경우는  $^{51}\text{Cr}$  방출이 대조군보다 낮았다. 혼합즉시군의 IRM에서 대조군에 대한 상대적인  $^{51}\text{Cr}$  방출을 각 실험



조건에 따라 나타낸 결과는 Fig.6과 같다. 고형재료를 4시간 동안 직접 접촉시킨 경우는  $^{51}\text{Cr}$  방출이 1.53배 증가하였고 24시간 동안 접촉시킨 경우는 3.64배로 현저히 증가하여 강한 독성이 나타났다. 그러나 추출용액과 4시간, 24시간동안 각각 접촉시킨 경우는  $^{51}\text{Cr}$  방출이 대조군보다 낮았다.

## 2. MTT법

추출용액이 L929세포에 미치는 독성효과를 MTT방법으로 평가한 결과는 Table 5와 같다. 아말감에 대한 독성 효과를 보면 즉시군에서는 대조군에 비하여 formazan 결정의 형성 비율은 86.8%로 나타났다. 1일군과 7일군에서는 108%와 111.4%로 증가되어 24시간 경과 후에는 대조군에 비하여 formazan결정 형성이 증가하였으며, 혼합 직후 배지를 첨가한 군에 비하여 독성의 발현이 유의하게 감소되었다( $p < 0.05$ ). 화학 중합 복합 레진은 즉시군에서는 대조군에 비하여 93.9% 정도의 높은 세포 활성도를 보여서 독성이 낮았으며 1일군과 7일군에서도 세포의 활성도는 110.5%와 102.3%로 나타나서 독성효이 없었다. 광중합 복합 레진은 즉시군에서는 대조군에 비하여 89.4%의 세포 활성도가 나타나 독성이 나타났으나( $p < 0.05$ ),

1일군과 7일군에서도 112.1%와 109.8%로 독성을 보이지 않았다. 1일군과 7일군은 즉시군에 비하여 독성이 강하였다( $p < 0.05$ ).

화학 중합형 글라스아이오노머 시멘트는 즉시군에서는 대조군에 비하여 12.3%의 세포활성도가 나타나서 독성이 강하였다( $p < 0.05$ ). 이러한 독성은 1일군과 7일군에서도 감소되지 않고 강하게 지속되었다. 광중합형 글라스아이오노머 시멘트는 혼합즉시 배지를 첨가한 군에서 대조군과 비슷한 정도인 103.2%의 세포활성도를 보여 독성이 나타나지 않았으며, 1일군과 7일군에서도 독성은 나타나지 않았다. IRM은 즉시군에서 대조군에 비하여 15.0%의 세포활성도가 관찰되어 독성이 강하였으며 1일군과 7일군에서도 18.3%와 17.9%로 대조군에 비하여 강한 독성이 지속되었다( $p < 0.05$ ). 즉시군과 1일군 7일군 모두에서 화학중합 글라스아이오노머 시멘트와 IRM이 기타 4종의 재료에 비하여 각각 독성이 강하게 나타났다( $p < 0.05$ ).

각 역충전제의 대조군 용액에 대한 실험군 추출 용액의 흡광도비의 결과는 Fig.7과 같다. 화학 중합 글라스아이오노머 시멘트와 IRM의 경우 흡광도의 비율이 0.12, 0.15로 각각 나타나서 기타 4종의 재료에 비하여 세포독성이 강하였다( $p < 0.05$ ).

1일군 아말감의 추출 용액은 세포와 24시간 동안 접촉시킨 경우(사진부도 2)에서 세포의 형태는 대조군(사진부도 1)과 유사한 소견을 보여서 독성이 나타나지 않았다. 화학 중합 복합레진의 경우는 세포의 형태가 다소 변형되어 나타났으나(사진부도 3), 광중합 복합 레진에서는 대조군 세포와 비슷한 소견으로 세포의 독성이 관찰되지 않았다(사진부도 4). 글라스아이오노머 시멘트의 추출 용액과 24시간 접촉시에는 세포는 수가 크게 감소되었으며, 세포의 형태도 심하게 손상되었으나(사진부도 5), 광중합 글라스아이오노머 시멘트는 세포의 수와 형태에서 변화가 나타나지 않았다(사진부도 6). IRM에서는 세포의 수도 감소되고 형태도 변형되어 심한 세포 독성이 관찰되었다(사진부도7).

Table 5. Absorbance\*(%) in MTT test affected for 24 hours by elution solutions of six retrograde filling materials

Materials	Preparation		
	Freshly mixed	24-hour setting	168-hour setting
Amalgam	86.8± 9.0	108.0± 4.0	111.4± 16.5
Composite	93.9± 3.6	110.5± 7.2	102.3± 12.0
Light curing composite	89.4± 4.2	112.1± 8.0	109.8± 9.6
Glass ionomer cement	12.3± 1.4	15.6± 1.8	18.7± 2.2
Light curing glass ionomer cement	103.2± 11.6	117.0± 11.3	95.6± 8.4
IRM	15.0± 0.7	18.3± 1.6	17.9± 0.9

Absorbance of sample/absorbance of control × 100(%)

Relative absorbance

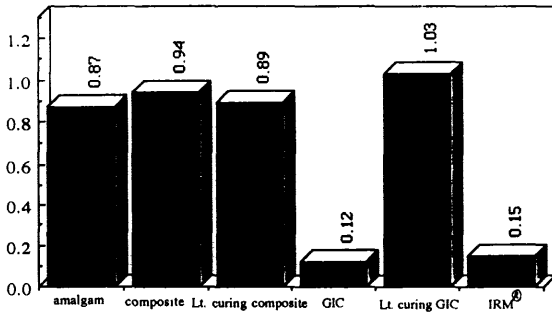


Fig.7. Relative absorbance of elution solutions compared to control group in MTT test.

3. Lactate dehydrogenase 활성도 측정법  
L929세포에 각 재료를 24시간 동안 직접 접촉시킨 후 lactate dehydrogenase(LD)의 활성도를 측정한 결과는 Table 6과 같다. 아말감에서 대조군(38.5 IU/ml)에 비하여 즉시군은 48.3 IU/ml로서 대조군에 비하여 높은 수치를 보였으나, 유의한 차이는 아니었다. 1일군과 7일군에서도 46.5 IU/ml와 50.4 IU/ml의 활성도를 보여서 시간 경과에 따른 독성의 차이는 나타나지 않았다. 화학 중합 복합 레진의 LD 값은 대조군(39.0 IU/ml)에 비하여 즉시군은 100.0 IU/ml으로 나타나서 매우 강한 독성을 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 1일군과 7일군에서도 LD 값은 104.6 IU/ml과 105.6 IU/ml로서

독성은 강하게 나타났다. 광중합 복합레진에서 즉시군의 LD 값은 91.9 IU/ml로서 대조군의 39 IU/ml에 비하여 유의하게 높아서 역시 강한 독성을 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 1일군과 7일군에서도 이러한 독성의 효과는 그대로 지속되었다. 화학중합 글라스아이오노머 시멘트에서 즉시군의 LD 값은 43.9 IU/ml로서 대조군(38.6 IU/ml)에 비하여 약간 높은 수치를 보였으나, 이들간의 차이는 인정되지 않았다. 1일군과 7일군에서도 LD 값은 52.1 IU/ml과 44.1 IU/ml로서 독성은 없었다. 광중합 글라스아이오노머 시멘트에서 즉시군의 LD 값은 84.4 IU/ml로서 대조군 (38.0 IU/ml)에 비하여 유의한 차이를 보여 독성이 강하게 나타났으며 1일군과 7일군에서도 그대로 유지되어 경화 후에도 독성이 나타났다( $p < 0.05$ ). IRM에서 즉시군의 LD 값은 71.3 IU/ml로서 독성 효과가 강하였으며 1일군과 7일군에서도 이러한 독성은 지속되었다.

Fig. 8은 LD수치를 세포독성 발현효과의 지표로 사용하였는데, 즉시군의 LD 값은 6종의 역충전제에서 아말감과 화학 중합 글라스아이오노머 시멘트와 비교하여 나머지 4종의 역충전제에서 세포독성이 유의하게 높게 나타났다( $p < 0.05$ ).

Table 6. Lactate dehydrogenase activity(IU/ml) of L929 cells after 24-hour direct contact with six retrograde filling materials

Materials	Preparation			Control
	Freshly mixed	24-hour setting	168-hour setting	
Amalgam	48.3±4.0	46.5±4.5	50.4±5.1	38.5±0.8
Composite	100.0±2.8	104.6±2.0	105.6±5.1	39.0±0.5
Light curing composite	91.9±2.5	94.8±6.1	81.6±7.2	39.0±0.9
Glass ionomer cement	43.9±2.9	52.1±5.8	44.1±2.0	38.6±1.1
Light curing glass ionomer cement	84.4±4.2	67.7±9.4	60.3±9.9	38.0±0.7
IRM	71.3±8.7	73.9±4.6	74.4±4.1	38.3±1.0

Relative LD activity

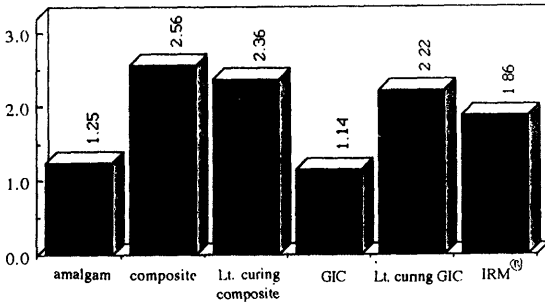


Fig.8. Relative LD. activity of six retrograde filling materials

#### IV. 총괄 및 고찰

이상적인 역충전재는 변연누출이 적고 화학적으로 안정하며, 조직에 내성이 우수하고 적용하기 쉬워야 하며 장기간 치근단 부위의 조직에 직접 접촉하므로 생체 적합성도 우수해야 한다. 1915년 Ottesen<sup>35)</sup>이 아말감을 역충전재로 사용하여 근단부 수술을 시행한 이래로 많은 연구와 시술이 이루어졌으나, 치근단 절제시 역충전재를 반드시 병용하여야 하는지에 대한 논란은 아직도 계속되고 있다<sup>36,37)</sup>. 아말감은 역사적으로 오랜 기간 동안 역충전재로 사용되어 왔으며, 현재도 가장 많이 사용되는 재료로서 다른 재료를 역충전재로 사용하고자 할때 그 효과를 평가하기 위해 비교군으로 사용되고 있다. 사용되는 아말감의 유형은 여러 가지이며, 부식에 대한 감수성은 아말감 alloy의 조성중 구리와 아연의 양에 따라 다양하게 나타나는데 근래에는 아말감 이외의 여러가지 재료를 역충전재로 사용하기 시작하여 이들 재료의 생체 적합성이 관심의 대상이 되고 있다<sup>4,5,38)</sup>.

복합레진은 충전재의 입자 크기가 다양한 여러 유형이 사용되는데 상아질 결합제가 개발되기 이전부터 역충전재로서 사용 가능성이 보고되었으며<sup>6)</sup>, 최근에 개발된 상아질 결합제를 병용하면 근단부 폐쇄능이 증진되어 역충전재로 사용시 유리하다<sup>10,11,39)</sup>. 그러나 상아질 결합제는

치근단 수술시 필연적으로 접하게 되는 수분과의 접촉으로 인하여 결합력이 감소될 수밖에 없으며, Bis-GMA와 관련된 methacrylate 유도체가 복합레진과 상아질 결합제의 주요한 독성 성분으로 지목되고 있다<sup>12)</sup>.

Zinc oxide eugenol 시멘트는 아말감에 비하여 역충전시에 사용하기가 쉬운 장점이 있으나<sup>40)</sup> 시간 경과에 따라 흡수되므로 역충전재로 사용시에는 심한 변연 누출을 예상할 수 있어서 이 시멘트 자체보다는 이를 강화한 형태를 사용해야 한다고 제안된 바 있다<sup>41,42)</sup>. 이에 따라 methyl methacrylate polymer를 강화한 IRM의 사용이 거론되었으나, 이 재료도 역시 흡수되는 단점을 극복하지 못하였다<sup>43)</sup>.

글라스아이오노머 시멘트를 역충전재로서 사용하게 된 것은 상아질과 화학적으로 결합하므로 폐쇄능이 탁월하리라고 가정하였기 때문이지만<sup>7,8,44)</sup>, 수화나 탈수에 민감하므로 치근단 수술과 같은 상황에서 실제 사용시 이러한 물성을 충분히 발휘하기가 어렵다<sup>45)</sup>. 그 결과 역충전재로 글라스아이오노머 시멘트는 사용하지 말아야 한다는 주장도 있으나, 최근 개발된 광중합 충전용 글라스아이오노머 시멘트는 종래의 이러한 단점을 보완하였다고 하여 아직 그 사용 가능성은 남아있다<sup>46)</sup>.

생체 재료의 생체적합성에 관하여는 많은 문헌이 있으나, 역충전재에 관한 보고는 상대적으로 적으며 측정 방법에 따른 독성의 차이에 관한 포괄적인 연구가 이루어져 있지 않다. 일반적으로 세포 배양을 이용한 독성 검사의 결과를 적절히 해석하는데는 많은 문제점이 있지만, 생체 적합성을 결정하는데 비교적 간단한 방법으로서 추후 검사한 재료에 대하여 정밀하게 검사를 계속할 것인지, 그 재료를 임상에서 배제시킬지의 여부를 결정한다<sup>27)</sup>.

실험 방법의 차이에 의하여 세포 독성의 검사 결과가 다르게 나타나는 경우가 많은데, 그 일례로서 수복재에 포함되어 있는 zinc oxide eugenol은 eugenol을 용해시키는 방법과 용매에 따라서도 다양한 결과가 나타날 수 있다<sup>47-49)</sup>. 또한 독성 실험에 사용된 세포의 종류에 따라서도 독성의 정도와 순위는 영향을 받을 수

있다. Peltola등<sup>50)</sup>은 아말감, 글라스아이오노머 시멘트, 복합레진과 titanium의 독성 평가를 치은섬유아 세포와 영구 세포주인 UMR을 이용하여 검사하였다. 치은 섬유아 세포와 UMR 세포 모두에서 titanium, 복합레진, 아말감, 글라스아이오노머 시멘트 순으로 독성이 증가되었다. 또한 UMR 주위의 세포성장은 아말감과 글라스아이오노머 시멘트가 복합레진과 titanium에 비하여 유의하게 억제되었다. Pettersen등<sup>51)</sup>은 레진 수복재의 독성을 사람의 3가지 다른 세포주에 대하여 검사하면서 4가지 방법을 사용하였는데, 사용한 세포와 방법에 따라 각각 다른 결과가 나타남을 보고하였다.

<sup>51</sup>Cr 방출법에서는 hexavalent인 Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>내의 <sup>51</sup>Cr은 세포에 흡착되어 단백질 및 세포의 구성 성분과 결합되어 trivalent형태로 환원된다. Trivalent <sup>51</sup>Cr은 다른 세포에 의하여 재사용될 수 없으므로 배지내의 <sup>51</sup>Cr의 방사능 활성도는 세포의 파괴를 측정하는 지표가 된다. 이 실험방법은 일반적으로 phenol을 독성이 강한 양성 대조군으로 사용하고 배양배지를 음성대조군으로 사용하는 경우가 많은데, 결과의 판독은 비독성, 경도의 독성, 독성, 강한 독성 등의 4가지 수준으로 요약하기도 한다<sup>27)</sup>.

세포 독성 검사시 사용되는 발색법의 유용성은 well당 감지할 수 있는 최소 세포수와 1×10<sup>4</sup>세포의 변화당 흡광도의 변화로 나타내는 예민도로 평가할 수 있는데 이러한 점에서 MTT방법은 다른 발색 방법에 비하여 예민도가 낮고 MTT시약은 발암성이 있다<sup>52)</sup>. 한편 세포내 효소의 방출을 검사함으로써 세포의 생존 능력을 평가할 수 있는데 이때 가장 흔히 사용하는 방법이 LD를 측정하는 방법이다. 이 검사 방법에서는 세포내 효소는 세포막이 손상된 후에만 나타나며 이 효소의 모든 활성이 손상된 세포에서만 급속히 증가된다고 가정하므로 세포 대사의 변화가 아닌 배양 세포의 생존능을 측정할 수 있는 장점이 있다<sup>53-54)</sup>.

본 실험에서는 <sup>51</sup>Cr방출법에서 세포액과 역충전재간에 직접 접촉법에서는 세포 독성이 뚜렷하게 나타났다. 직접 접촉법의 경우 4시간이나 24시간 반응시켰을 때 대개는 비슷한

결과를 보였는데, 광중합 글라스아이오노머 시멘트와 IRM은 즉시 군과 1일군에서 4시간 접촉에 비해 24시간 접촉시 cpm이 매우 높게 나타나 접촉시간에 따라 유의한 차이가 있었다. 아말감과 화학중합 글라스아이오노머 시멘트는 세포 독성을 거의 나타내지 않았다. 경화 시간에 따른 세포 독성 효과는 4시간 동안 접촉시킨 경우 아말감과 화학 중합 복합 레진 및 광중합 글라스아이오노머 시멘트에서는 경화 시간에 비례하여 세포 독성이 증가했지만, 나머지 재료에서는 이러한 경향이 나타나지 않았다. 또한 24시간 접촉시에도 경화 시간에 따른 세포의 독성은 일정한 양상을 보이지 않았는데, 주로 1일군이 가장 세포 독성이 높게 나타나고 7일군이 낮게 나타났다. 고행인 아말감과 글라스아이오노머 시멘트를 4시간과 24시간 접촉시킨 경우에는 모두 복합레진에 비하여 세포 독성이 낮게 나타나 Peltola등<sup>50)</sup>의 연구 결과와 일치하였다. 광중합 글라스아이오노머 시멘트는 직접 접촉시킨 경우에 세포독성이 강하여 단시간에 경화 반응을 완결하고 물성이 향상된다는 점은 우수하나 생체 적합성의 측면에서는 불리하게 나타났다. IRM의 강한 독성은 zinc oxide eugenol 계통의 시멘트의 주요한 독성 성분인 eugenol이 원인일 것으로 사료되며 일주일 경화 후에도 여전히 강한 독성을 보이는 것은 eugenol의 지속적인 유리과 아울러 기타 성분인 phenol과 formaldehyde도 독성에 기여한 것으로 사료된다.

<sup>51</sup>Cr방출법에서 역충전재의 추출 용액과 세포액을 접촉시켰을 때에는 세포 독성이 전혀 없었으며, 오히려 대조군에 비하여 추출 용액에서는 <sup>51</sup>Cr방출이 적어서 세포 독성보다는 세포의 증식 효과가 나타났다. 이러한 현상의 원인에 대하여 cpm이 매우 낮은 경우에는 방사능 면역 검사법에서 직선성이 없어져 측정된 방사능 값이 부정확한 수 있으나, 본 실험에 사용한 <sup>51</sup>Cr은 반감기가 28일 정도로 비교적 길고 구입 즉시 사용하여 방사능의 양도 충분하여 이러한 가능성은 거의 없다고 사료되었다. 따라서 역충전재를 추출한 용액에 독성 성분이 거의 추출되지 않고 추출 용액 속의 독성 성분중

오히려 미량의 미지의 성분이 용액내로 추출되어 세포가 증식되는 효과로 나타났다고 사료되었다. 또한  $^{51}\text{Cr}$ 방출법이 세포막의 손상 정도를 측정함으로써 세포 독성을 평가한다는 관점에서 보면 세포막의 투과성을 억제시키는 인자가 각 추출 용액에 포함되어 있음을 가정할 수 있다. 일반적으로  $^{51}\text{Cr}$ 방출을 이용한 독성 실험은 고형재와 액체 상태의 실험재료를 모두 평가할 수 있는데 본 실험의 결과로 미루어 볼 때 역충전재는 실제 임상에서 사용하는 형태인 고형 상태로 실험해야 하며 이 경우의 결과는 다른 연구자의 연구 결과<sup>15,50)</sup>와 일치하였다.

MTT검사에서도 비슷한 소견을 보였는데 화학중합 글라스아이오노머 시멘트와 IRM®의 경우 세포 독성이 크게 나타났지만(Fig. 7) 나머지 역충전재의 경우 formazan결정의 형성이 대조군과 거의 비슷하거나 더 증가된 경우도 있어서 재료내에 세포 독성 물질 이외에 세포의 활성을 촉진시키는 인자가 있음을 시사하였다. MTT검사는 본 실험에 사용한 3가지 방법 중 96-well plate에서 검사하기 때문에 다른 두 검사 방법보다 용이하고 결과의 판독도 빠르게 형성된 formazan결정은 육안으로 직접 관찰이 가능하므로  $^{51}\text{Cr}$ 방출법이나 LD측정법과는 달리 손상된 세포의 정도를 예측할 수 있는 장점이 있다. MTT검사는 반드시 생활 세포가 plate의 바닥에 부착한 경우에만 실험할 수 있으므로 각 역충전재의 실험 용액을 첨가하여 세포 독성을 검사하였고, 직접법은 적용할 수 없었으며 예비실험에서 4시간 반응시킨 경우에는 실험군과 대조군의 차이가 나타나지 않아 제외하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 글라스아이오노머 시멘트와 IRM만이 기타 4종의 재료에 비하여 독성이 강하게 나타나서 기존의 연구 결과<sup>15,50)</sup>와는 상이하였다. 글라스아이오노머 시멘트는 생체적합성이 비교적 우수한 것으로 인정되고 있으므로 MTT는 역충전재의 독성을 평가하는 방법으로는 부적절하다고 사료되며 MTT법은 충전재 자체의 색이 생성된 formazan결정의 흡광도에 영향을 줄수 있으므로 MTT를 실험 방법으로 사용하는 경우는 이 점을 고려하여야 할 것으로 사료되었다. 이러한 점

에서  $^{51}\text{Cr}$ 방출법은 방사능의 오염과 폐기의 단점을 제외한다면, pH나 온도, 용액의 색조에 영향을 받지 않는 장점이 있어서 유용한 검사로 평가할 수 있었다.

24시간 동안 세포에 역충전재를 직접 접촉시킨 경우는  $^{51}\text{Cr}$ 방출법과 LD활성도 측정방법을 이용하였는데 두 검사간에는 세포 독성의 결과가 비교적 잘 일치하였는데 두 검사에 사용한 세포액이 같은 실험 기간에 준비한 재료에 대하여 접촉시킨 것도 한 요인으로 사료된다. LD측정법은  $^{51}\text{Cr}$ 방출법과 마찬가지로 고형재와 액체 상태를 모두 실험할 수 있는데 본 실험에서는 고형재를 직접 접촉시켰다. 6가지 역충전재 중 아말감과 글라스아이오노머 시멘트만이 세포 독성이 낮게 나타나  $^{51}\text{Cr}$ 방출법의 결과와 일치되어 세포 독성의 판정에 유용하다고 사료되었다.

방사능 물질인  $^{51}\text{Cr}$ 은 반감기가 있고 실험하는 과정에서 방사능에 노출되는 위험이 있으며 폐기물을 버리기 어려운 단점이 있다. 또한 cpm이 매우 낮은 경우나 높은 경우 직선성이 없어질 수도 있어서 cpm과  $^{51}\text{Cr}$ 농도가 반드시 일치한다고 볼 수 없다. 그러나  $^{51}\text{Cr}$ 방출법은 고전적으로 가장 많이 사용되어 온 방법이며 측정 기기를 구비하고 방사능 물질 취급인가가 있는 실험실이면 비교적 간단한 실험 방법이라고 할 수 있으며, 용액내에서 방출된  $^{51}\text{Cr}$ 의 양을 예민하고 특이하게 측정할 수 있는 장점이 있다. 이에 비하여 LD의 측정방법은 이 효소의 농도가 너무 낮거나 용액의 pH와 온도에 영향을 받아 실제의 LD값보다 낮게 나올 수 있는 단점이 있다<sup>50)</sup>.

본 실험의 결과  $^{51}\text{Cr}$ 방출법, LD측정법과 MTT법에 따른 각 역충전재의 독성효과가 다르게 나타난 것은 각 실험 방법에 따른 차이도 원인이지만, 각 실험에서 실험 재료와 추출 용액을 준비하는 과정에서 충전재의 양을 동일하게 하고 혼합 비율을 일정하게 유지해야 하며 충전재를 용액에 추출하는 비율이 표준화되어야 하는데 이 과정을 일정하게 유지하는 것이 어려워 독성이 다르게 나타날 수도 있다. 또 이들 재료 중 금속 성분인 아말감은 다른

재료에 비하여 비중이 크므로 부피를 동일하게 한 본 실험의 결과와 무게를 동일하게 한 다른 연구 결과와는 다를 것이다. 추출 용액의 경우 pH의 변화가 세포의 활성도에 영향을 미치므로 재료의 독성이라기보다는 pH의 변화에 의하여 독성이 나타날 수도 있으므로 각 재료의 정량화 혹은 일정한 혼합 비율을 유지하는 것이 중요하며 추출 용액을 사용할 때 각 재료의 성분이 균일하게 잘 추출되는 용매를 선택하여야 할 것이다. 치근단은 주변의 생활 조직과 접촉하는 환경에 있으므로 단일 세포를 이용한 독성 실험의 결과를 실제 임상에서의 상황에 그대로 적용할 수는 없다. 또한 역충전재의 독성 실험에는 임상에서 사용하는 형태와 동일한 형태인 고형 상태를 사용하는 것이 비교적 정확히 세포 독성을 평가할 수 있으며, 추출 용액을 사용하여야만 하는 경우에는 용액의 pH 및 용액에서 추출된 성분을 분석하여 세포 독성 성분과 활성 촉진 인자를 규명하는 노력도 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 광중합 글라스아이오노머 시멘트를 비롯한 아말감, 화학 중합 복합레진, 광중합 복합레진, 화학 중합 글라스아이오노머 시멘트, IRM 등 6종의 재료가 L929세포에 미치는 독성을 비교하였다. 실험 방법으로는 치과 생체재료의 독성 평가시 주로 사용되는 L929세포에서 방출되는 radiochromium의 측정과 생존세포가 MTT를 이용하여 formazan결정을 생성하는 정도 및 손상된 세포에서 유리되는 lactate dehydrogenase효소의 활성도를 측정하는 방법을 사용하여 실험 방법에 따른 세포 독성을 관찰하였다.

역충전재에 4시간 동안 세포를 직접 접촉시킨 경우  $^{51}\text{Cr}$ 의 방출은 혼합후 즉시 배지를 첨가한 경우에는 화학중합 복합레진과 광중합 복합레진에서 기타 4종의 재료에 비하여 높은 방출량을 보였다( $p < 0.05$ ). 24시간 동안 역충전재와 세포를 직접 접촉시킨 경우 화학중합 복합레진과 광중합 복합 레진 이외에 광중합 글라

스아이오노머 시멘트 및 IRM에서  $^{51}\text{Cr}$ 의 방출이 높게 나타났다. 역충전재에서 추출된 용액을 각각 4시간과 24시간동안 세포에 접촉시킨 경우는 실험군 모두에서 독성이 나타나지 않았다. MTT법에서는 화학중합 글라스아이오노머 시멘트와 IRM 추출용액이 기타 4종의 재료에 비하여 세포의 활성도가 낮았다( $p < 0.05$ ). LD법에서는 세포와 재료를 24시간 직접 접촉시켰는데 화학 중합 복합레진, 광중합 복합레진, 광중합 글라스아이오노머 시멘트 및 IRM<sup>®</sup>은 기타 2종의 재료에 비하여 LD값이 높았다( $p < 0.05$ ).

역충전재의 세포 독성은 실험 방법에 따라 약간씩 상이한 결과를 보였는데, 가장 보편적으로 사용되는 아말감은 모든 실험방법에서 세포 독성이 낮은 것으로 평가되었으며, 광중합 글라스아이오노머 시멘트는 24시간 직접 접촉시  $^{51}\text{Cr}$ 방출과 LD활성도 검사에서 세포 독성이 높게 나타났다.

## 참고문헌

1. Friedman S : Retrograde approaches in endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 7 : 97-107, 1991.
2. Tronstad L, Trope M, Doering A, and Hasselgren G : Sealing ability of dental amalgams as retrograde fillings in endodontic therapy. *J Endod* 9 : 551-3, 1983.
3. Abdal AK, Retief DH, and Jamison HC : The apical seal via retrosurgical approach. II. An evaluation of retrofilling materials. *Oral Surg* 54 : 213-8, 1982.
4. Jorgensen KD, and Saito T : Structure and corrosion of dental amalgams. *Acta Odontol Scand* 28 : 129-42, 1970.
5. Kimura JT : A comparative analysis of zinc and non-zinc alloys used in retrograde endodontic surgery. Part I : Apical seal and tissue reaction. *J Endod* 9 : 551-3, 1983.
6. Frank AL, Glick DH, Pertesson SS and

- Weine FS : Long-term evaluation of surgically placed amalgam fillings. *J Endod* 18 : 391-7, 1992.
7. Zetterqvist L, Andneroth G, Danin J, and Roding K : Microleakage of retrograde fillings -a comparative investigation between amalgam and glass ionomer cement in vitro. *Int Endod J* 21 : 1-8, 1988.
  8. Zetterqvist L, Andneroth G, and Nordenram A : Glass ionomer cement as retrograde filling material. An experimental investigation in monkeys. *Int J Oral Maxillofac Surg* 67 : 734-9, 1989.
  9. Beltes P, Zervas P, Lambrianidis T, and Molyvdas I : In vitro study of the sealing ability of four retrograde filling materials. *Endod Dent Traumatol* 4 : 82-4, 1988.
  10. Dumsha T, and Biron G : Inhibition of marginal leakage with a dentin bonding agent. *J Dent Res* 63 : 1247-55, 1984.
  11. McDonald MJ, and Dumsha TC : A comparative retrofill leakage study utilizing a dentin bonding material. *J Endod* 13 : 224-7, 1987.
  12. Brannstrom M and Vojinovic O : Response of the dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. *J Dent Traumatol* 43 : 83-89, 1976.
  13. Browne RM : The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does it have a role ? *Int Endod J* 21 : 50-8, 1988.
  14. Mjor IA, Hensten-Pettersen A and Skogedal O : Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int Endod J* 27 : 124-9, 1977.
  15. Addendum to American National Standards Institute/American Dental Association Document No. 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. New York : American Standards Institute. 10-6, 1982.
  16. Tronstad L, and Wennberg : A In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J* 13 : 131-8, 1980.
  17. Al-Nazhan S, Sapounas G, Spangberg L : In vitro study of the toxicity of a composite resin, silver amalgam, and Cavit. *J Endod* 11 : 236-8, 1988.
  18. Safavi KE, Spanberg I, and MacAlister TJ : In vitro evaluation of biocompatibility and marginal adaptation of root retrofilling materials. *J Endod* 14 : 538-42, 1988.
  19. Wennberg A, and Hasselgren G : Cytotoxicity evaluation of temporary filling materials. *Int Endod J* 14 : 121-4, 1981.
  20. Millerding P, Wennberg A, and Hasselgren G : Cytotoxicity of corroded and non-corroded dental silver amalgam. *Scand J Dent Res* 93 : 76-83, 1985.
  21. Kawahara H, Imanishi Y, Oshima H : Biological evaluation on glass ionomer cement. *J Dent Res* 58 : 1080-6, 1979.
  22. Flanders DHM, James GA, Burch B, and Dockum N : Comparative histopathologic study of zinc free amalgam and Cavit in connective tissue of rat. *J Endod* 1 : 65-8, 1975.
  23. Blackman R, Gross M, Seltzer S : An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod* 15 : 76-9, 1989.
  24. Lehtinen R : Tissue reaction to glass ionomer cement and dental amalgam in the rat. *Proc Finn Dent Soc* 82 : 144-7, 1986.
  25. Zmener O : Tissue response to a glass ionomer used as an endodontic cements, A preliminary study in dogs. *Oral Surg* 56 : 198-205, 1983.
  26. Zartner RJ, James GA, and Burch BS :

- Bone tissue response to zinc polycarboxylate cement and zinc free amalgam. *J Endod* 2 : 203–8, 1976.
27. Hensten-Pettersen A : Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 21 : 89–99, 1988.
  28. Spangberg L : Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg* 35 : 389–401, 1973.
  29. Sapngberg LSW and Al-Nazahn SA : The radiochromium release method for evaluation of cytotoxicity in vitro. *Int Endod J* 21 : 72–8, 1988.
  30. Mosman T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Method* 65 : 55–63, 1983.
  31. Gerlier D and Thomasset N : Use of MTT colorimetric assay to measure cell cultivation. *J Immun Method* 94 : 57–63, 1986.
  32. Grailer A, Sollinger HW and Burlingham WJ : A rapid assay for measuring both colony size and cytolytic activity of limiting dilution microcultures. *J Immun Method* 107 : 111–7, 1988.
  33. Vassault A : Lactate dehydrogenase : UV-method with pyruvate and NADH. In : Bergmeyer HU, Bergmeyer J and Grassl M(eds) *Methods of Enzymatic analysis, III. Enzymes 1 : Oxidoreductases, Transferases*, 3rd edn, pp.118–26, Verlagchemie, Weinheim.
  34. Wagner A, Marc A, Engasser JM and Einsele A : The use of lactate dehydrogenase(LDH) release kinetics for evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors. *Biotechnol Bioengin* 39 : 320–5, 1992.
  35. Garvin Mh : Root resection. *J Can Dent Assoc* 8 : 126–9, 1942.
  36. Seltzer S : Endodontology. Biologic considerations in endodontic procedures. pp 369–74, Philadelphia, Lea & Febiger, 1988.
  37. Harrison JW and Todd MJ : The effect of root resection on the sealing property of root canal obturations. *Oral Surg* 50 : 264–72, 1980.
  38. Mattison GD, von Fraunhofer A, Delivanis PD and Anderson AN : Microleakage of retrograde amalgams. *J Endod* 11 : 340–5, 1985.
  39. McDonald MJ, and Dumsha TC : An evaluation of the retrograde apical seal using dentin bonding materials. *Int Endod J* 23 : 156–62, 1990.
  40. Nicholls E : Retrograde filling of the root canal. *Oral Surg* 15 : 463–73, 1962.
  41. Oynick J, and Oynick T. : A study of a new material for retrograde fillings. *J Endod* 4 : 203–6, 1978.
  42. Dorn So, and Gartner AH. : Retrograde filling materials : A retrospective success-failure study of amalgam, EBA, and IRM. *J Endod* 15 : 157–160, 1989.
  43. Smee G, Bolanos OR, Morse DR, Furst ML, and Yesilsoy C : A comparative leakage study of P-30 resin bonded ceramic, Teflon, amalgam, and IRM as retrofilling. *J Endod* 13 : 117–21, 1987.
  44. Barkhordar RA, Pelzner RB, and Stark MM : Use of glass ionomers as retrofilling materials. *Oral Surg* 67 : 734–9, 1989.
  45. Mount GJ, and Makinos of : Glass-ionomer restorative cements : Clinical implications of the setting reaction. *Oper Dent* 7 : 134–41, 1982.
  46. Atkinson AS, and Pearson GJ : The evaluation of glass-ionomer cements. *Br Dent J* 159 : 335–7, 1985.
  47. Hanks CT, Diehl ML, Craig RG, Makinen PL, and Pashley DH : Characterization of

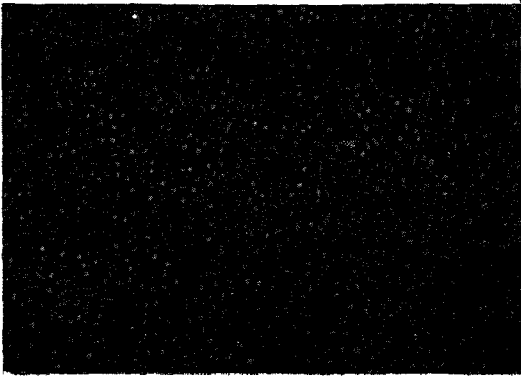


- the "in vitro pulp chamber" using the cytotoxicity of phenol. *J Oral Pathol Med* 18 : 97–107, 1989.
48. Fotos PG, Woolverton CJ, Van Dyke K, and Powell RL : Effects of eugenol on polymorphonuclear cell migration and chemoluminescence. *J Dent Res* 66 : 774–7, 1987.
  49. Lindqvist L, Otteskog P : Eugenol : Liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand J Dent Res* 89 : 552–6, 1981.
  50. Peltola M, Salo T, and Oikarinen K : Toxic effects of various retrograde root filling materials on gingival fibroblasts and rat sarcoma cells. *Endod Dent Traumatol* 8 : 120–4, 1992.
  51. Pettersen AH, and Hegeland L : Sensitivity of different cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res* 89 : 102–7, 1981.
  52. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Mayo JG, Shoemaker RH and Boyd MR : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48 : 589–601. 1988.
  53. Cook JA and Mitchell JB : Viability measurement in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179 : 1–7, 1989.
  54. Marc A, Wagner A, Martial A, Goergen JL, Engasser JM, Geaurgey V and Pinton H : Potential and pitfalls of using LDH release for the evaluation of animal cell death kinetics. IN : Spier R, Griffiths JB and Meigner B(eds) *Production of biologicals from animal cells in culture*, pp 569–75. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1991.

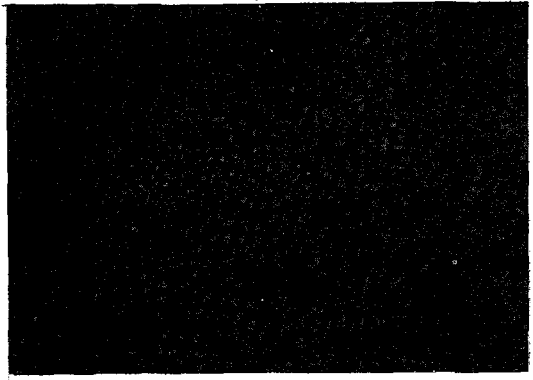
## <EXPLANATION OF FIGURES>

- Photo. 1. L929 cells of control well in the MTT test.
- Photo. 2. L929 cells treated with freshly mixed amalgam showing normal growth pattern in the MTT test.
- Photo. 3. L929 cells treated with freshly mixed composite showing somewhat damaged cellular pattern in the MTT test.
- Photo. 4. L929 cells treated with freshly mixed light curing composite showing normal growth pattern in the MTT test.
- Photo. 5. L929 cells treated with freshly mixed glass ionomer cement showing markedly damaged cellular pattern in the MTT test.
- Photo. 6. L929 cells treated with freshly mixed light curing glass ionomer cement showing normal growth pattern in the MTT test.
- Photo. 7. L929 cells treated with freshly mixed IRM showing markedly damaged cellular pattern in the MTT test.

사진부도



사진부도 1.



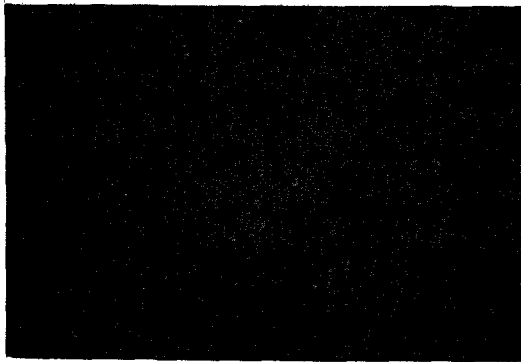
사진부도 2.



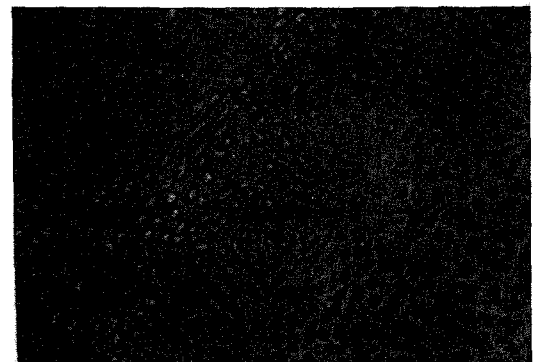
사진부도 3.



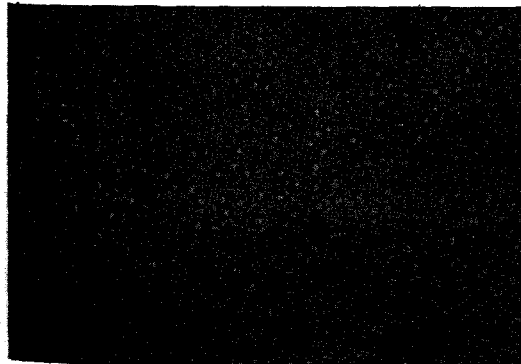
사진부도 4.



사진부도 5.



사진부도 6.



사진부도 7.

## CYTOTOXICITY OF RETROGRADE FILLING MATERIALS TESTED BY $^{51}\text{Cr}$ RELEASE, MTT AND LD ACTIVITY

La-Young Choi, D. D. S., M. S. D., Mi-Kyung Im, D. D. S., M. S. D., Ph. D.  
*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University*

Endodontic surgery is performed when conventional endodontic therapy fails or is contraindicated. In such cases, retrograde filling materials including amalgam, composite resin, and various cements have been used.

Biocompatibility and margin sealing ability of retrograde filling materials are important for the long term success of endodontic surgery. In vitro cell culture is frequently used as the method of measuring the biocompatibility of dental materials.

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of six kinds of retrograde filling materials including newly developed light curing glass ionomer cements. Each material was mixed according to the manufacturer's instruction and evaluated as : freshly mixed, 24-hour after mixing, and 168-hour after mixing respectively. The elution solution was extracted after 24-hour contact with materials using media. Cytotoxicity was evaluated by direct contact, or elution contact.

Test results of radiochromium( $^{51}\text{Cr}$ ) release, cell viability using tetrazolium dye (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl dimethyltetrazolium bromide(MTT) test and lactate dehydrogenase(LD) of damaged L929 cells were analyzed.

In the  $^{51}\text{Cr}$  release of direct contact, all experimental retrograde filling materials except amalgam and glass ionomer cement showed increased cytotoxicity compared to control. In the  $^{51}\text{Cr}$  release of elution solution, the released  $^{51}\text{Cr}$  was so minimal that it was impossible to evaluate the cytotoxicity exactly. The elution solutions of glass ionomer cement and IRM showed marked cytotoxicity in MTT test. LD enzyme activity was highest in tests of direct contact with composite, light curing composite, and light curing glass ionomer cement and IRM. Amalgam revealed least cytotoxicity while IRM showed cytotoxicity using all three methods. Composite, light curing composite and light curing glass ionomer cement were cytotoxic in the tests of  $^{51}\text{Cr}$  release and LD activity. Glass ionomer cement showed cytotoxic effect only in the MTT method. From these results it is suggested that the standardization and optimization of cytotoxicity testing, especially using elution solutions, should be strongly advised.