

쥐치아 치근면의 치주인대세포의 활성도를 평가하는 방법으로 MTT검색법의 적절성에 대한 조직학적인 검증

김현기 · 김의성 · 최인복 · 김 진 · 이승종*

연세대학교 치과대학 보존학교실

ABSTRACT

THE VERIFICATION OF THE MTT ASSAY ON THE VIABILITY OF PERIODONTAL LIGAMENTAL CELLS IN RAT MOLARS THROUGH THE HISTOLOGIC EXAMINATION

Hyun-Ki Kim, Eui-Seoung Kim, In-Bok Choi, Jin Kim, Seung-Jong Lee*

Department of Conservative Dentistry, College of dentistry, Yonsei University

The purpose of this study is to examine the viability of PDL cells in rat molars by using MTT assay and to verify the MTT assay through the histologic observation. Thirty of Sprague Dawley white female rats of 4 weeks old with a body weight of about 100 grams were used. Groupings are as follows:

Immediate Group : Positive control group(n=10) after extraction immediately.

Dried Group : Negative control group(n=10) after drying for an hour under warm dry.

ViaSpan® Group : 1hour ViaSpan® group(n=10) after storing in ViaSpan® at 4℃ for 1hour.

Ten teeth of each group were treated as same as above and replanted to the original socket of experimental animals. After two weeks of replantation, all the experimental animals were sacrificed. And after fixation, extracted maxillary jaw was demineralized. After it was embedded in paraffin, serial section by 5μm was carried out and for construction of specimen, hematoxylin eosin dye was used.

The mean MTT measurement of immediate group(positive control) is 2.81 and the mean measurement of dried group(negative control) is 0.98 which is significant differnt(P<0.05). The mean measurement of ViaSpan® group is 2.65 and there is significant difference between dried group and ViaSpan® group(P<0.05). However, there is no difference between immediate group and ViaSpan® group. The average resorption points of immediate group is 3.03 points. In the dried group, average 6.44 points resorption and 2.68 points showed resorption in the ViaSpan® group. Unlike with MTT assay, there was no significant difference between the immediate group and ViaSpan® group.

The usage of MTT assay as a viable cell marker may give us a better indication of the maintenance of periodontal ligament cell vitality.

Key words : MTT assay, Root resorption, ViaSpan®

I. 서 론

치아 재식술은 외상성으로 완전 탈구된 경우나 해부학적 으로 통법의 치근단 수술이 불가능한 경우에 시행되며, 치 아이식술은 치아 결손부위에 공여치아를 이식함으로써 그 결손 부위를 회복하기 위해 시행되는 술식이다¹⁾. 이러한 술

식에는 치아의 발거 시 치주조직의 손상정도와 발거된 치근 면의 치주인대세포의 활성도가 성패를 좌우하는 중요한 요 소로 작용한다²⁾. 치근면의 치주인대세포 활성도를 높게 유 지하기 위해서는 발거에서부터 치아 재식 혹은 이식이 이루어지기까지의 시간을 최소화 하는 것이 중요하며³⁾, 특히 외 상성 손상으로 인한 치아의 완전 탈구 시 이러한 술식들은

*본 연구는 2002년도 보건 의료기술 연구개발사업 (01 PJ5 PG3 20507 0002)에 의해 이루어 졌음.

가능한 빠른 시간에 이루어지도록 노력하여야 한다^{4,9)}. 그러나 임상적으로 이러한 술식들이 항상 즉시 이루어 질 수는 없으므로 발거된 상태에서 어떻게 보관하느냐에 따라 치근면의 치주인대세포 활성화도는 달라진다. 결국 이러한 활성화도 유지 정도에 따라 재식된 치아의 치근 흡수양상이 달라 질 수 있으며⁶⁾, 따라서 치주인대세포의 활성화도를 유지할 수 있는 적절한 보관용액에 발거된 치아를 재식 혹은 이식이 이루어질 때까지 보관하는 것이 치료에 가장 중요한 요소라고 할 수 있다.

치아보관용액으로 우유, Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco BRL, Life technologies, Grand Island, NY, USA), Viaspan[®](Dupont Pharmaceutical, Wilmington, DE, USA), conditioned medium, culture medium(Eagle's medium), Optisol GS[®](Chiron Intra Optics, Inc., Irvine, California, USA) 혹은 Likorol[®](Laboratories Chauvin OPSIA, France) 같은 각막 보존용액 등이 사용되고 있으나^{7,8)}, 그 결과에 변이가 많으며, Harkacz 등⁹⁾은 기능성 음료를 이용하여 치주인대세포의 활성화도를 측정하였으나 우유에 비해 좋지않은 결과를 보였다고 하였다.

이렇게 연구자들마다 일치된 결과가 나타나지 않은 이유 중 하나는 실험 방법상의 여러 변수때문이라고 할 수 있다. 세포의 활성화도를 평가하는 방법으로 흔히 이용되는 방법은 직접 살아있는 세포의 수를 세는 방법이다. 이는 치근표면으로부터 trypsin과 collagenase를 이용하여 치주인대 세포를 채취하고 이를 neutral red나 trypan blue¹⁰⁾ 혹은 fluorescein diacetate¹¹⁾로 살아있는 세포만 염색함으로써 hemocytometer로 염색된 세포 수를 세어 측정하는 것이다. 이 방법이 비교적 쉽고 간편하기는 하나 세포의 채취 과정에서 치근면의 모든 세포가 채취된다는 증거가 없으며 세포가 비록 살아있다 하더라도 그 수의 약 70%만이 세포분열능력이 있어¹²⁾ 실제 살아있는 세포 수와 치주조직의 치유능력과는 차이가 날 수 있다. Lekic 등¹³⁾은 단일세포에서 배양되어 형성된 세포군의 숫자를 세어 세포의 증식능력을 비교하여 보관용액을 평가하였다. 또한 Hupp 등¹⁴⁾은 치근면으로부터 채취된 세포를 배양하고 tritiated thymidine를 부착하여 labeling index로 비교 평가하였다. 이는 tritiated thymidine이 세포가 DNA 복제 시에만 흡수된다는 원리를 이용한 것이다. 그러나 이러한 방법들은 치근면에서 채취된 세포를 배양한 것으로 원 세포(primary cell)와는 다른 많은 변수가 작용하므로 원 세포를 이용하는 것이 더 바람직하다고 할 수 있다.

Tetrazolium based colorimetric(MTT) 검색법은 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독 할 수 있어 배양된 세포에 세포독성에 관한 연구에 주로 사용되어져 왔다¹⁴⁾. 이 방법은 대사과정인 온전한 세포의 미토콘드리아 탈 수소

효소가 노란색 수용성 tetrazolium salt 3,4(4,5 dimethylthiazol 2 yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA)을 자주색을 띄는 비수용성의 formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용한 것이며, 570nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하게 된다.

보관용액의 치주인대세포 활성화도 유지능력을 평가하기 위해서는 발치 후 보관시간에 따른 치근면의 세포 활성화도를 평가하는 것이 가장 바람직하므로 배양된 세포가 아닌 발거된 치아 자체를 MTT 검색법을 이용하여 세포 활성화도를 평가할 수 있다면 실험실에서 간편하면서도 유용한 방법이 될 것이다. 이러한 방법이 아직까지 in vivo 실험에서는 이용된 적이 없지만 쥐 치아의 크기가 96 well plate에 담길 정도로 충분히 작으며 예비실험에서 MTT 검색법을 발거 후 즉시 시행한 군과 발거 후 1시간 동안 건조 시켜 시행한 군에서 통계적으로 유의할 만한 차이를 보임으로써 이용가능성을 보였다. 본 연구의 목적은 MTT 검색법이 쥐 치아 치근면의 치주인대세포의 활성화도를 평가하는 방법으로 적절한지를 조직학적인 관찰을 통해 검증하기 위한 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물의 전 처치

본 실험에 사용된 동물은 생후 4주된 체중 100mg 내외의 암컷 Sprague Dawley계 흰쥐 30마리를 이용하였다. 발치를 용이하게 하기 위해 0.4% β aminopropionitrile (β APN, Sigma, St Louis, MO, USA)를 함유한 Purina 분말과 물을 사료로서 발치 전 3일간 공급하였다. Ketamine (0.1ml/100mg) 마취 하에 접근이 가장 용이한 좌, 우측 상악 제1, 2대구치를 발거하였다. MTT 검색법에는 제 1, 2 대구치를 모두 사용하였으며 광학현미경 관찰을 위해 치아를 재식 할 경우에는 제 1대구치만을 사용하였다. 날카로운 탐침으로 peritomy를 시행한 후 치아주위조직에 최소한의 외상을 가하면서 발거 하였으며 이때 발치와의 출혈은 면봉으로 조절하고 발치 후에는 모든 치근의 건전성을 확인하였다.

2. MTT 검색

96 well plate에 노란색의 MTT solution (0.05mg/ml, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) 200 μ l을 넣고 다음의 각 군당 10개 치아를 MTT solution이 있는 각 well에 담구었다. 이때 혈구세포의 개재 가능성을 최소화하기 위하여 식염수로 치근면을 깨끗이 세척하였다.

즉시 시행군: 음성 대조군

치아 발거 후 즉시 MTT 시행하였다.

1시간 건조군: 양성 대조군

발거된 치아를 1시간 동안 따뜻한 공기 중에서 건조 시킨 후 MTT 시행하였다.

Viaspan 보관군: 발거된 치아를 1시간동안 ViaSpan® (Dupont Pharma, Willmington, DE, USA) 용액에 4℃에서 보관한 후 시행하였다. 이는 양성 대조군과 음성 대조군의 중간반응을 보기 위함이다.

알루미늄 foil로 96 well plate를 싸서 3시간 동안 37℃에서 배양하여 MTT가 환원되도록 했다. 배양 후 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) 150μl를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 녹여내고 각 well에서 치아를 제거한 후 ELISA(Benchmark microplate reader: BIO RAD, California, USA)에 넣고 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3. 조직학적 검사

MTT 검색에서와 같이 각 군당 10개 치아를 발거 한 후 원래의 발치와에 재식하고 2주 후 희생시켰다. Ketamine 마취 하에 실험동물의 가슴을 절개하고 심장을 노출시킨 후 하대정맥과 동맥을 결찰을 이용하여 절찰 하고 양쪽 목 정맥을 절개하였다. 좌심실에 23G 주사기를 삽입시키고 0.9% 생리식염수로 실험동물의 피를 흘려버린 뒤 10% formalin 40ml를 심장을 통해 관류 고정한 후 상악 턱뼈를 적출하였다. 상악 턱뼈는 5% nitric acid에 6일간 탈회한 후 0.1M sodium cadodylate buffer로 세척하고 50%에서 100% ethanol로 단계적으로 탈수 시킨 다음 Xylene으로 침착 시키고 paraffin에 포매하였다. 광학현미경 관찰을 위해 microtome을 이용하여 4μm 두께로 치아 장축에 수평 절단하여 표본을 제작하고 hematoxylin eosin으로 염색하였다. 광학현미경 하에서 각 치근의 흡수정도를 관찰하였다.

Table 1. Mean and standard deviation of the optical density(OD)

Group	OD/tooth weight
Negative control	2.81±0.45
Positive control	0.98±0.35*
1 hour Viaspan®	2.65±0.49

* Statistically significant at the 95% level of confidence

각 치근의 이미지를 광학현미경(X 40)에 연결된 컴퓨터에 Matrox Intellicam® (Matrox Graphics Inc., Quebec, Canada) 프로그램을 이용하여 저장하고 Microsoft Powerpoint®(Microsoft Co., USA) 프로그램으로 옮긴 후 치근단면의 정 중앙을 지나는 4개의 사선을 그어 치근면과 만나는 점점 8곳에서의 흡수여부를 관찰하여 흡수 빈도를 기록하고 흡수 부위는 흡수 양상을 관찰하였다.

4. 실험자료의 분석

MTT 검색법에서 얻은 흡광도를 one way ANOVA로 시행하였으며 각 군간의 통계분석법은 95% 신뢰수준으로 Student Newman Keuls 방법을 사용하였다. 광학현미경을 이용한 관찰에서는 치근흡수가 일어난 포인트 수를 세어 같은 방법으로 통계 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. MTT 검색

음성대조군의 MTT 평균 측정치는 평균 2.81 이었고 양성대조군은 0.98, 중간단계를 보기위해 ViaSpan®에 1시간 동안 보관했던 군의 측정치는 2.65였다. 통계분석결과 음성대조군과 1 시간 ViaSpan®군은 통계적으로 유의할 만한 차이를 보이지 않았으며 양성 대조군은 다른 두 군에 비해 통계적으로 유의할 만한 차이를 보였다(Table 1)(p< 0.05).

2. 조직학적 검사

가. 즉시 시행군 : 음성 대조군

8개 점점에서 치근 흡수된 포인트는 평균 3.03 이었으며 흡수 양상은 모두 표면 흡수 혹은 대체성 흡수 양상을 보였다. 29개의 치근 중에서 8개 점점 모두에서 흡수가 일어난 치근은 없었으며 3개의 치근에서는 전혀 흡수가 일어나지

Table 2. The mean number of resorption points

Group	# of Resorption point
Negative control	3.03
Positive control	6.50*
1 hour Viaspan®	2.75

* Statistically significant at the 95% level of confidence

않았다(Fig 1, 2).

나. 1시간 건조군 : 양성 대조군

평균 치근 흡수된 포인트는 평균 6.50 이었으며 32개의 치근 중 10개의 치근이 염중성 흡수 양상을 보이고 나머지 22개에서는 표면 흡수 혹은 대치성 흡수 양상을 보였다. 14개의 치근에서 거의 모든 치근이 흡수되어 8개 점점 모두에서 흡수 양상을 보였고 흡수가 하나도 일어나지 않은 치근

은 없었다(Fig 3, 4).

다. Viaspan 보관군 : Viaspan®에 1시간 동안 보관군

평균 2.75개의 포인트에서 흡수가 일어났으며 28개의 치근 중 5개의 치근에서 전혀 흡수가 일어나지 않았고 8개 모든 포인트에서 흡수가 일어난 치근은 없었다. 흡수 양상은 8개의 치근에서는 염중성을 나머지 15개의 치근에서는 표면 혹은 대치성 흡수 양상을 나타냈다(Table 2, Fig 5, 6).

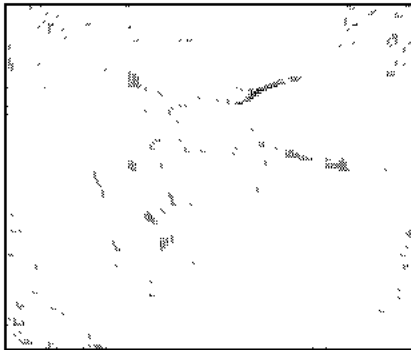


Fig. 1. 즉시 시행군에서의 photomicrograph. 1곳에서 치근흡수가 관찰된다.

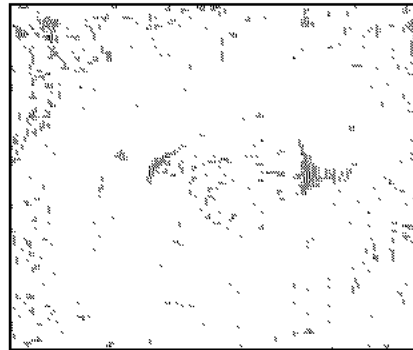


Fig. 2. 즉시 시행군에서의 photomicrograph. 치근흡수가 관찰되지 않았다.

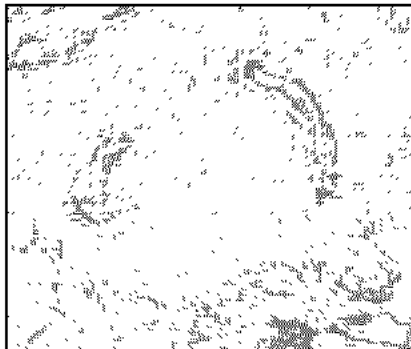


Fig. 3. 1시간 건조군에서의 photomicrograph. 7곳에서 치근흡수가 관찰된다.

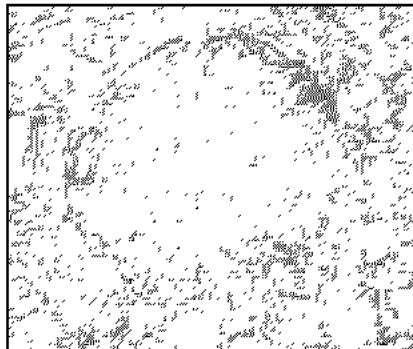


Fig. 4. 1시간 건조군에서의 photomicrograph. 8곳모두 에서 치근흡수가 관찰된다.

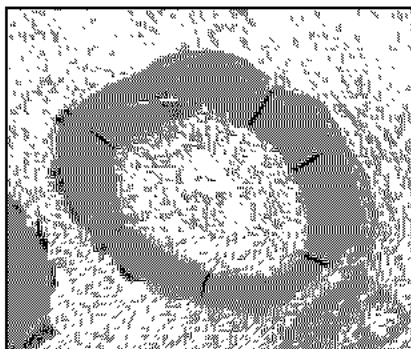


Fig. 5. Viaspan® 1시간 보관군에서의 photomicrograph. 2곳에서 치근흡수가 관찰된다.

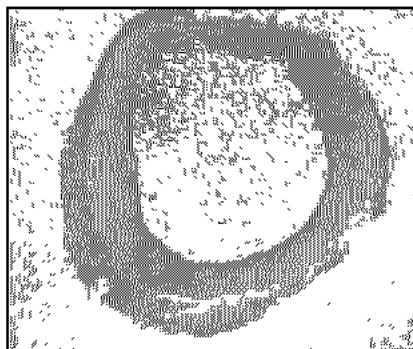


Fig. 6. Viaspan® 1시간 보관군에서의 photomicrograph. 3곳에서 치근흡수가 관찰된다.

IV. 고 찰

치아의 재식이나 이식 후 치주조직의 치유를 평가하기 위한 연구에서 중요한 점은 어떻게 하면 일관성 있고 재현성이 있는 결과를 얻느냐 하는 점이다. 지금까지 이러한 연구에서는 주로 동물실험 모델들이 사용되었다. Andreasen은 *vervet monkey*의 전치를 발치하고 30분간 건조시킨 후 다시 재식 한 결과 세 종류의 흡수유형이 8주 후에 보였다고 보고하고 염증성 흡수는 근관치료를 시행함으로써 예방할 수 있었으며 표면흡수 및 대치성 흡수의 발생은 치주인대 세포의 생활력 여부에 좌우된다고 보고하였다^{15,16}. 즉 이 모델을 통하여 치주인대에 가하는 손상 정도와 근관치료 여부가 이후에 따라 발생하는 치근 흡수 유형에 영향을 끼치게 된다는 것을 알 수 있었다. 이처럼 *vervet monkey*를 사용한 모델은 비교적 잘 정립되어 있지만 구입비용과 사육비용이 너무 높다는 문제가 있으며 또 치아의 주위조직이 너무 견고하여 발치과정이 힘들다는 단점이 있다. 이에 비해 쥐와 같은 작은 동물들은 다루기도 더 쉽고 사육비용이 저렴해서 충분한 수의 동물을 이용할 수 있다. 또한 개체간의 유전적인 일관성도 성견과 원숭이에 비해 쥐가 더 우수하여 일관성 있는 실험 결과를 기대할 수 있다. 그러나 쥐를 이용하여 재식 한 경우 또한 사육의 어려움과 결과를 얻기까지 시간이 오래 걸리며, 조직병리학적 평가가 치주질환이나 실험 상의 오류로 인하여 일관성 있게 나오지 않는다는 단점을 가지고 있다. 따라서 가장 이상적인 것은 발치된 치아의 치근 표면에 부착되어 있는 치주인대세포의 활성도를 직접 측정하는 것이나 이러한 방법은 지금까지 보고된 바가 없다. 본 연구에서 사용된 MTT 검색법은 세포의 활성도를 보는데 있어 방사능 물질을 사용하지 않아 안전하며 96 well plate를 이용하므로 짧은 반응시간에 많은 시료를 검사할 수 있으며 그 과정이 반 자동으로 이루어 짐으로 상당히 정확하다고 할 수 있다. 또한 쥐 치아는 96 well plate의 well에 잠길 정도로 충분히 작아 MTT 검색을 하기엔 적당 하였다. 그러나 이와 같이 발치된 치아를 직접 MTT 검색법을 이용할 경우 치근표면에 붙어 있는 세포수가 일정치 않아 치아간에 차이가 있을 수 있다. 본 연구의 예비 실험에서 쥐 치아를 대상으로 즉시 시행한 군과 1시간 건조군에서 MTT 측정치의 결과를 비교했을 때 즉시 시행한 군에서는 높은 MTT 측정치를, 또 1시간 건조한 군에서는 낮은 MTT 측정치를 보임으로서 MTT 검색법의 유용성에 대한 가능성을 제시하였다. 그리고 본 실험에서 조직학적인 관찰과 MTT 검색법의 측정치를 비교하였을 때, 쥐 치아를 즉시 또는 건조 재식한 후 MTT 측정치의 결과를 조직학적 결과와 비교했을 때 즉시 시행군에서는 높은

MTT 측정치와 낮은 치근흡수를 또 1시간 건조 군에서는 낮은 MTT 측정치와 높은 치근흡수를 보였으며 Viaspan®에 한 시간 보관하였다가 재식한 군에서도 즉시 재식한 군과 비교하였을 때 MTT 측정치와 치근 흡수 정도에 있어 모두 동일하게 통계학적 유의차가 없었으며 건조 재식한 군과 비교하였을 때에는 모두 통계학적 유의차가 있어 쥐 치아에서 MTT 검색법을 이용하여 치근의 치주인대세포 활성도를 측정하는 것이 유용한 방법임을 알 수 있었다. 다만 통계학적 유의차에는 영향을 주지 않았지만 한 시간 동안 Viaspan®에 보관한 경우 MTT 측정치는 음성 대조군에 비해 낮았으나 치근 흡수 정도는 오히려 더 낮게 나타났다. 이는 표본수의 부족으로 인한 오차일 수도 있으며 아니면 Viaspan®에 1시간 동안 보관하였을 때 세포가 더욱 왕성한 대사 활동을 할 수 있는 조건을 만들어 줄 수 있는 상황도 배제할 수 없으므로 앞으로 이에 대한 연구도 계속 필요하리라 사료된다.

이러한 MTT 측정법은 동물 치아표면의 치주인대세포의 활성도를 배양이라는 과정 없이 직접 측정할 수 있는 방법으로써 *in vivo*와 *in vitro*의 중간단계라고 할 수 있어 *in vitro* 실험에서 초래되는 세포에 대한 많은 변수를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

그러나 치아에서의 직접적인 MTT 측정법은 피 측정 부위에서의 세포 수가 *in vitro*에서와는 달리 일정하지 않을 수 있고 MTT 측정에 필요한 충분한 수의 세포를 얻을 수 있는지 의문이고 또 혈구세포 등 순수한 치주인대 세포 외의 요소들이 개재될 수 있는 가능성이 있어 효용성에 대한 지속적인 연구도 필요할 것으로 본다.

치아 재식을 위한 실험동물 모델에 있어 발치과정 중에 치아와 주위조직에 가해지는 외상은 치주조직의 치유에 큰 영향을 미치므로 발치의 용이성은 대단히 중요하다고 할 수 있다. Birkedal Hansen은 Wistar 쥐의 제1대구치를 elevator로 탈구만 시켜도 압력을 받은 부위에 표면 흡수가 발생함을 보고하였고 염증성 흡수는 elevator가 위치할 제1 및 제2 대구치 사이에 발생한다고 하였다¹⁷. 본 연구에서도 발치되지 않았던 22개의 제2 대구치 치근을 관찰하였을 때 2개의 치근에서 각각 1 파 2 포인트의 치근 흡수를 관찰할 수 있었고, 평균 흡수 포인트는 0.13이었다. 이를 통해 본 연구에서 시행된 쥐치아 제 1대구치의 발치시 주변조직에 가해지는 외상의 정도는 매우 경미했음을 알 수 있었다. Andreasen은 *vervet monkey* 전치의 재식후에 나타나는 표면흡수와 염증성 흡수의 topographic study에서 발치에 소요된 시간과 발치시의 힘의 영향이 흡수 정도에 영향을 미친다고 하였다^{15,16}. 따라서 발치 시 최소의 자극은 일관성 있는 결과를 얻기 위해 매우 중요하다. 본 연구에서는 발치를 시행하기 전에 β APN을 처치하고 발치 시 주위조직에

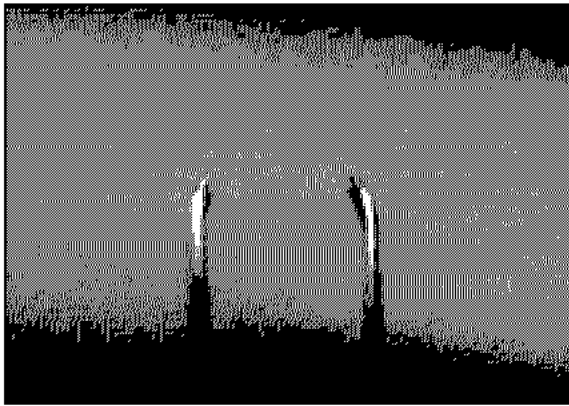


Fig. 7. 쥬치아를 최소한의 외상으로 발거할 수 있도록 고안된 발치감자

최소의 자극이 가해지도록 특수 고안된 발치감자(Fig. 7)를 사용하였으므로 상악 제1 혹은 2 대구치를 최소의 자극으로 발치할 수 있었다.

이는 발치되지 않았던 인접 제 2 대구치의 치근 흡수가 2개의 치근만 제외하고는 전혀 없었다는 것으로도 증명된다. β APN은 치근인대 섬유층의 인장력을 감소시켜 발치를 용이하게 하여 치조골이나 주위 연조직에 가해지는 자극을 최소로 줄여준다. β APN은 amine oxidase를 억제하여 콜라겐의 α 사슬에서 lysyl derived aldehyde group의 형성을 저지하여 반응력이 있는 알데히드군의 감소로 콜라겐 분자와 교차결합이 일어나지 않고 콜라겐 섬유의 인장력이 감소하게 된다²⁰. 이런 작용은 특히 힘을 많이 받는 관절 부위, 근육 섬유의 중시점과 교합 되는 치아의 치주 인대에 두드러지게 나타난다. Barrington과 Meyer는 β APN을 중지한 3일 후부터 치주인대가 다시 회복됨을 보고하였고 섬유 또는 세포에 비가역적인 변화가 초래하지 않는다고 관찰하였고 인장력 또한 교차 결합이 다시 형성되면서 원 상태로 회복되었다고 보고하였다²⁰. Cho와 Garant^{20,21}는 이러한 사실을 바탕으로 하여 β APN을 처치 후 발치를 시행할 경우 치아도 건전하며 치조골 내에도 균일한 두께의 치주인대가 잔존한다고 보고하였다.

재식 모델에서 고려해야 할 또 하나의 요소는 치수의 처리 여부이다. 성견과 원숭이를 이용한 실험에서는 염증성 흡수를 예방하기 위해 재식 후 1-2주내로 근관치료를 시행하였다. 흰쥐의 치아에서 재식된 상태에서의 근관치료는 거의 불가능하다고 할 수 있다. 재식 하기 전에 근관치료를 시행할 순 있지만 근관치료를 시행하는 중에 치근면에 자극이 가하게 되어 치주인대세포에 손상을 입히게 되고 근관치료를 시행하는 시간을 일정하게 조절할 수 없어 치유과정에서 변수로 작용할 수 있으며 또 치수조직이 치아보관 용액에 노출된다 하더라도 치수조직의 반응도 치주인대세포와의 마찬가지로 일 것이므로 본 연구에서는 근관치료를 시행하지 않았다.

Viaspan[®]은 Pentafraction 50g/L, Adenosine 1.34g/L, Allopurinol 136mg/L, Glutathione 992mg/L, Lactobionic acid 35.83g/L, Raffinose · 5H₂O 17.83g/L 등으로 이루어져 있으며 320 mOsmkg⁻¹ 정도의 삼투압과 7.4 정도의 pH를 유지한다. 본 연구에서는 1주일간 보관 하였을 때까지 높은 세포 활성도를 유지하는 실험 용액 중 유일한 용액이었다. 본 실험은 외상성 치아 재식 뿐 아니라 치아이식을 고려해 미래의 치아은행 운영에 적절한 장기 보관용액 개발을 위해 1주일정도 보관하였으므로 다른 실험들과 직접 비교하는 것은 어렵지만 대체로 이전의 연구 결과들과 일치한다^{22,23}. 아직까지 어떤 기전으로 Viaspan[®]이 치주인대 세포의 생활력을 비교적 오랫동안 유지할 수 있는지는 정확히 알려지지 않았다. 하지만 일반적으로 세포 손상은 허혈로 인한 free radical의 생성이 관여하는 것으로 알려져 있다^{24,25}. Free radical은 반응성이 좋아 계속되는 산화작용에 의해 연쇄 반응이 일어나고 이러한 연쇄 반응이 세포손상의 가능성을 증가시킨다²⁷. 따라서 free radical의 생성을 억제하거나 생성된 free radical을 없애므로써 세포손상을 줄일 수가 있는데, Viaspan[®]의 구성 성분 중에 하나인 Glutathione이 이러한 역할을 하는 항산화제인 것으로 생각된다. 이러한 점에 착안하여 Buttke과 Trope은 HBSS에 Glutathione을 첨가 시킨 용액이 Viaspan[®]과 유사한 결과를 나타냄을 보고하였다²⁸. Hyon 등은 또 다른 항산화제인 polyphenol을 처리함으로써 췌장도(pancreatic islet) 세포의 생존율을 현저하게 향상시킴을 보고하였고²⁹ Chung은 MTT 검색과 유식세포 계측을 이용한 실험에서 강력한 항산화제인 클로로필린 500nM을 HBSS에 첨가 시켜 배양된 사람의 치주 인대 세포의 생활력 유지능력을 현저히 향상시킬 수 있음을 보고하였다³⁰.

V. 결 론

본 연구는 MTT 검색법이 쥬치아 모델에서 치주인대세포의 활성도를 측정하는 방법으로 유용한가를 조직학적인 관찰을 통해 입증하기 위한 것이었다. 알컷 Sprague Dawley계 흰쥐 30마리를 이용하여 β APN 전 처치 후 상악 제1, 2대구치를 발치하여 즉시 혹은 1시간 건조 시키거나 Viaspan[®]에 1시간 보관 후 MTT 검색법을 적용하였고, 이러한 결과를 조직학적으로 입증하기 위해 MTT 검색법과 동일한 조건하에서 재식 하여 2주뒤 희생시키고 치근의 흡수정도를 관찰하였다.

조직학적 관찰 결과와 MTT 측정치의 결과를 비교하였을 때 MTT 검색법이 조직학적 평가와 일치하여 치주인대세포의 활성도 평가에 유용한 방법이 될 수 있음이 제시 되었다. 그러나 피 측정부위의 일정한 세포 수를 유지 할 수 없고 순수한 치주인대 세포 외의 요소 들이 개재할 수 있는 가능성

등의 의문점이 존재하므로 이에 대한 향후 유식세포 계측(flow cytometer)등의 방법을 비롯한 다른 형태의 검증이 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Lee SJ, Jung IY, Lee CY, Choi SY and Kum KY : Clinical application of computer aided rapid prototyping for tooth transplantation. *Dent Traumatol* 17:114 119,2001.
2. Andreasen JO and Kristerson L : The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 39: 1 13,1981.
3. Soder PO, Otteskog P, Andreasen JO and Modeer T : Effect of drying on viability of the periodontal membrane. *Scand J Dent Res* 85:164 168,1977.
4. Andreasen JO and Hjorting Hansen E : Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odontol Scand* 24:263 286,1966a.
5. Andreasen JO and Hjorting Hansen E : Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand* 24:287 306, 1966b.
6. Blomlof L : Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J Suppl* 8:1 26,1981.
7. Krasner P and Rankow HJ : New philosophy for the treatment of avulsed teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79:616 623,1995
8. Layug ML, Barrett EJ and Kenny DJ : Interim storage of avulsed permanent teeth. *J Can Dent Assoc* 64: 357 363,365 359,1998.
9. Harkacz OM, Sr., Carnes DL, Jr and Walker WA, 3rd : Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 23:687 690,1997.
10. Ashkenazi M, Sarnat H and Keila S : In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol* 15:149 156,1999
11. Patel S, Dumsha TC and Sydiskis RJ : Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int Endod J* 27:1 5,1994.
12. Hupp JG, Trope M, Mesaros SV and Aukhil I : Tritiated thymidine uptake in periodontal ligament cells of dogs' teeth stored in various media for extended time periods. *Endod Dent Traumatol* 13:223 227,1997.
13. Lekic PC, Kenny DJ and Barrett EJ : The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J* 31:137 140,1998.
14. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55 63, 1983.
15. Andreasen JO : Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 4:231 240,1980a.
16. Andreasen JO : Analysis of topography of surface and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 4:135 144,1980b.
17. Birkedal Hansen H : External root resorption caused by luxation of rat molars. *Scand J Dent Res* 81:47 61, 1973.
18. Bornstein P : The cross linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Is there a relation to the aging process? *Am J Med* 49:429 435,1970.
19. Barrington EP and Meyer J : Recovery of the rat dental organ from experimental lathyrism. *J Periodontol* 37: 453 467,1966.
20. Cho MI and Garant PR : The effect of beta aminopropionitrile on the periodontal ligament. I. Ultrastructure of fibroblasts and matrix. *J Periodontal Res* 19:247 260,1984a.
21. Cho MI and Garant PR : The effect of beta aminopropionitrile on the periodontal ligament: II. Radioautographic study of collagen secretion from fibroblasts. *Anat Rec* 209:41 52,1984b.
22. Ashkenazi M, Marouni M and Sarnat H : In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. *Endod Dent Traumatol* 16:63 70,2000.
23. Hiltz J and Trope M : Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol* 7:69 72,1991.
24. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF and Keshavjee S : Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1932 1939,2000.
25. Hyon SH and Kim DH : Long term preservation of rat pancreatic islets under physiological conditions. *J Biotechnol* 85:241 246,2001.
26. Sitasawad SL and Patole MS : Effect of cryopreservation on lipid peroxidation in chick cornea. *Indian J Exp Biol* 36:1025 1027,1998.
27. Santanam N, Ramachandran S and Parthasarathy S : Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin Reprod Endocrinol* 16:275 280,1998.
28. Buttke TM and Trope M : Effect of catalase supplementation in storage media for avulsed teeth. *J Endod* 28: 237,2002.
29. Chung WG : In vitro assessment on viability of human periodontal ligament cells after storage in chlorophyllin added medium. Doctorial thesis, Yonsei University, Seoul, 2002.

이 승 종

연세대학교 치과대학 치과보존학교수

서울시 서대문구 신촌동 134

Tel : 02-361-8701~2 Fax: 02-313-7575

E-mail : sjlee@yumc.yonsei.ac.kr