

인체 치은 섬유아세포의 성장과 부착에 관한 Chlorhexidine의 효과

전북대학교 치과대학 치주과학교실
이 호 · 이인규 · 김형섭

I. 서 론

치주질환의 일반적인 처치방법으로는 치은연상 및 연하세균총을 조절하는 것이다. 이러한 세균의 제거방법으로는 위생청결술식, 치석제거술, 치근면활택술 등의 기계적 치태조절방법과 항생제를 보조적으로 이용하는 화학적 치태조절방법이 있다¹⁾. 이러한 화학요법은 과거에서부터 주목을 받아왔다²⁾.

화학적 치태조절방법은 난발성 또는 재발성 질환을 보이는 부위의 통상적인 처치에 보조적으로 이용될 수 있다. 예를 들면 stannous fluoride, chlorhexidine (CHX), hydrogen peroxide를 이용한 치은연하세척은 짧은 기간동안에 치은연하세균총을 감소시킬 수 있다³⁻⁵⁾. 치태조절약제로서 CHX의 효과는 주로 substantivity에 기인하는데 이는 구강표면에 흡착한후 활성형으로 천천히 방출되어 작용한다.

이러한 항생제제중 CHX은 살균효과때문에 구강세정제로서 가장 많이 이용되고 상품화되었다. CHX은 polybiguanide군의 물질로써 염기이며 염기 상태에서 안정하다. 가장 흔히 이용되는 형태는 CHX digluconate로 수용성이며 physiologic pH에서 쉽게 용해된다. 이 약제의 살균효과는 약제의 cationic molecules이 음전하를 띠는 microbial cell wall과 extramicrobial complex에 결합해서 삼투압평형을 변경시켜서 작용한다⁶⁾. 그 외에도 Rolla와 Melsen⁷⁾은 salivary glycoprotein에 anionic acid group과 결합해서, 또 하나는 타액성 세균과 결합하여 치아에 세균이 흡착하는 것을 방해함으로써 치태형성과 pellicle형성을 억제한다고 보고했다.

많은 연구에서 CHX 구강세정제의 이용이 치태조

절과 치은염증에 양호한 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. Lindhe 등⁸⁾은 개를 대상으로 한 실험에서 치은염의 감소와 치태지수의 유의한 감소를 보인다고 하였고, Bakaeen과 Strahan⁹⁾의 연구에서는 치주수술후 CHX을 사용한 경우에 치태지수, 치은지수, 치은열구액양, 치주낭 깊이에서는 유의한 차이를 얻을 수 없었지만 수술후 동통을 감소시킨다는 보고를 했다. 엄 등¹⁰⁾에 의하면 치근활택술시 시행하는 CHX 치주낭 세척은 치주낭의 세균을 감소시켰고, 이 등¹¹⁾은 CHX와 tetracycline을 이용하여 치은연하세척을 1회 실시하고 그에 따른 임상적 세균학적 변화를 관찰한 바 운동성 세균의 비율이 감소됨을 주장했다.

이에 반하여, 환자가 깊은 치주낭을 CHX으로 매일 세척하거나^{12,13)} 주기적으로 전문가에 의한 치은연하세척을 했을때도 유의한 치료효과를 보지 못했다¹⁴⁾. 그러므로 치은연하세척시에 CHX이 치주치료에 있어 양호한 효과를 보인다는 확실한 증거는 아직까지 없다.

그와 더불어 인간세포와 육아조직에 대한 CHX의 독성효과를 여러 연구에서 지적하고 있는데, Paunio 등¹⁵⁾과 Bassetti와 Tallenberger¹⁶⁾는 육아조직형성을 지연시킨다고 하였고, 또한 다형핵백혈구에 대한 독성도 보고되었다^{17,18)}. Hegeland 등¹⁹⁾은 사람의 상피세포와 적혈구에 대한 독성을, Knuutila와 Sonderling²⁰⁾은 대식세포에 대한 유해작용을 보고했다.

CHX이 섬유아세포부착에 미치는 영향을 평가한 연구들을 살펴보면, Alleyn 등²¹⁾은 CHX이 치근면에 섬유아세포의 부착을 방해하여 치주조직의 재생을 방해할 수 있다고 하였고, Cline과 Layman²²⁾은 0.12

% CHX이 전치치된 치근에 대한 섬유아세포의 부착은 억제되지 않았지만 직접 노출시에는 용량비례적으로 성장이 억제된다는 것을 보고했다. 이외에도 임상적으로 발견할 수 있는 부작용에는 치아와 혀의 착색, 구강점막의 상피탈락, 혀의 작열감 및 쓴맛 등이 나타날 수 있다.

그러므로, 치은연하세척시에 CHX이 작용하는 치근면과 wounded sulcus의 섬유아세포에 대한 작용을 나누어 살펴볼 필요가 있다. 이에 저자는 표준화시킨 치근절편을 CHX으로 전치치한 후 치은섬유아세포에 대한 작용을 실험실상으로 살피기 위하여 치근절편을 통해 유리되는 약제에 의한 효과와 직접적인 투여에 의한 효과를 알아보고자 한다.

II. 실험대상 및 방법

1. 실험대상

전북대학교 치과병원 교정과에 교정을 위해 내원한 환자를 대상으로 했으며 연령군은 16-20세군의 여자를 선택하였고 하악 제2소만을 실험에 이용했다. 치은지수, 치태지수, 탐침깊이 등의 지표가 정상범주내에 있는 건강한 치아를 대상으로 했으며, 발치전 3개월내에 항생제를 복용한 경우는 실험에서 제외되었다.

2. 실험방법

(1) 치근절편 제작 : 8개의 치아를 얻은 후 stereomicroscope로 확인하며 gracey curette으로 cementum layer를 제거한다. PBS(phosphate buffered saline)로 여러번 수세한다. 백아법랑경계부에서 1mm 그리고 치근침에서 2mm의 치근부분은 치근절편에서 제외하고 나머지의 치근을 rotary diamond saw를 이용하여 300 μ m 두께의 표준화된 치근절편 36개를 제작한다. 여러번 PBS로 수세한다. 절편을 autoclaving 한후, sterile PBS로 수세하고, 0.25% Trypsin-1mM EDTA(Gibco), 3mg/ml collagenase(Sigma) 혼합액에 치아절편을 넣고 30분간 magnetic stirrer 상에서 stirring 한후 fresh microwell로 치아절편을 옮겨서 상기 혼합액으로 37 $^{\circ}$ C, 72시간동안 배양함으로써 연조직 잔사를 완전히 제거한다. 다시 PBS에 여러번 수세한다.

(2) 세포배양

치은조직적출 : 전북대학교 치과병원에 하악 3대구치의 발치를 위해 내원한 환자의 3대구치를 외과적으로 발치한후 비염증성 협측치은을 절제하였다.

치은섬유아세포의 배양 : 절제한 치은을 100 units/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin(Sigma) 및 2 μ g/ml Fungizone(Gibco)이 첨가된 Dulbecco's modified essential medium(DMEM, Gibco)으로 3회 세척한 후 치은조직을 소독된 scissor와 pincette을 이용하여 1mm³크기로 세절하여 이것을 상기 배양액을 사용하여 2회 원심분리하고 재부유시킨후, 60mm 세포배양요 petri dish로 옮겨놓은후, 각 dish당 2ml의 배양액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 배양액으로는 10% fetal bovine serum(Hyclone), penicillin 100 μ g/ml, streptomycin 100 μ g/ml이 첨가된 DMEM을 사용하고, 단일세포층이 형성될때까지 3일간격으로 교환해준다. 2주후에 충분히 자라서 배양접시를 띄게하는 단층이 형성된후 세포들을 0.25% trypsin-EDTA(Gibco) 1mM로 dissociation을 통해서 100mm 세포배양용접시를 이용하여 계대배양한다. 5-10계대의 세포를 이용하였다.

실험 1

37 $^{\circ}$ C에서 sterile aqueous CHX 농도를 0.05, 0.12, 1%로 하면서 각각 30초, 3분, 5분간 시간을 달리 하면서 담근다. 각 조건에 3개의 치근절편을 적용시킨다. 조절군으로는 식염수를 30초, 3분, 5분 시행한다. 여러번 PBS로 수세한다. fresh microwell에 위치시키고 24시간 동안 실온에서 말린다. 24-microwell에 각 well당 5 \times 10⁴개의 cell을 위치시킨후 부착을 위해 24시간동안 배양시킨 후, 각 well에 1개의 절편을 위치시킨다. 2일후에 위상차 현미경으로 사진을 찍는다. 바로 각 well에서 well과 %편에 부착되지 못한 세포는 제거하고 부착되어 있는 세포들은 trypsinization을 하여 hemocytometer로 세포수를 측정한다.

실험 2 : [³H]-thymidine incorporation test

96-microwell plate의 well에 치은섬유아세포 3.5 \times 10³ cells/well을 위치시키고 24시간동안 배양시켜 부착되게 한다. 각기 다른 농도의 CHX이 포함된

배양액으로 교환한후 12시간동안 배양시킨다. 배양하는 각각에 [³H]-thymidine (NEN) 1 μCi/well을 첨가하고 8시간동안 더 배양한다. 그 다음 cell harvester로 harvest한후 Liquid Scintillation Counter로 radioactivity를 count한다.

III. 실험성적

표준화시킨 dentin slices를 시간을 달리하면서 0.05, 0.12, 1%로 전처리한후 5×10⁴ cells이 있는 well에 위치시키고 2일 후의 상태를 위상차 현미경으로 관찰했다(Fig. 1). 조절군은 생리식염수로 처리했다. 결과에 따르면 조절군, 0.05% 군에서는 거의

비슷하게 culture dish의 flat surface상에 치은섬유아세포가 부착되고 dentin slice의 circumference에도 부착되는 양상이 관찰되고 있다(Fig. 1 A, B). 특징적인 stellate fibroblast morphology를 보여주고 있다. 그러나, 0.12% 군에서는 dentin slice의 인접한 부위의 cell들은 dish에 부착되지않고 세포의 형태는 round up하며 irregular한 형태를 보여주고 있다(Fig. 1 C). 1% 군에서는 dentin slice와 dish에 더 부착되지 않고 형태도 더 irregular한 양상을 보여준다(Fig. 1 D). 시간변화에 따른 차이는 관찰할 수 없었다.

부착되지 않은 세포를 제거하고 dentin slice와 dish에 부착된 세포수를 배양 2일 후에 평가하였다

Fig. 1 A

Fig. 1B

Fig. 1 C

Fig. 1 D

Fig. 1 Phase contrast photomicrographs of monolayer human gingival fibroblast and dentin slices after 2 days culture with different CHX-pretreated dentin slices(×10)

Fig. 1 A—control group Fig. 1 B—0.05% group

Fig. 1 C—0.12% group Fig. 1 D—1% group

(Table 1). 결과에 따르면 모든 pretreated time에 있어서 조절군과 0.05% 군에 대해 0.12, 1% 군에서는 유의하게 부착된 세포수가 감소되었다($P < 0.05$). 3분간 처치한 군에서는 조절군에 대해 전 실험군에서 유의한 부착된 세포수의 감소를 보였다(Fig. 2). CHX을 전처치한 시간에 따른 부착된 세포수의 유의한 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

실험 2는 CHX을 직접투여한 경우에 치은섬유아 세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위한 것이다. 그러나, 임상적으로 사용되는 0.1%에

서는 거의 성장이 억제되었으므로 더 낮은 농도에서의 연구가 필요하였다. 세포를 0.001%, 0.0025%, 0.005%, 0.01% 농도로 배양시킨후, 세포증식여부를 판단할 수 있는 [^3H] thymidine incorporation test를 시행하였는데 결과에 따르면 조절군에 비하여 모든 실험군에서 성장이 억제되었다(Table 2). 그러나, 나머지 실험군 사이에는 유의한 차이를 발견할 수 없었다. Fig. 4에서처럼 용량비례적으로 세포성장이 억제되는 것을 판단할 수 있었다.

Table. 1 Cell numbers of human gingival fibroblast attachment after 2 days culture with CHX-pretreated dentin slices ($\times 10^4$)

CHX (%)	pretreated time of dentin slices		
	0.5 min	3 min	5 min
Saline	5.66 ± 0.57	6.83 ± 0.76	6.66 ± 1.25
0.05	6.00 ± 1.73	4.66 ± 0.57 ^a	5.66 ± 1.15
0.12	2.33 ± 0.57 ^{a, b}	2.16 ± 0.57 ^{a, b}	2.16 ± 0.76 ^{a, b}
1.00	1.00 ± 0.50 ^{a, b}	1.33 ± 0.76 ^{a, b}	2.00 ± 0.50 ^{a, b}

Mean ± S. D

a : $P < 0.05$ when compared with control

b : $P < 0.05$ when compared with 0.05% CHX group

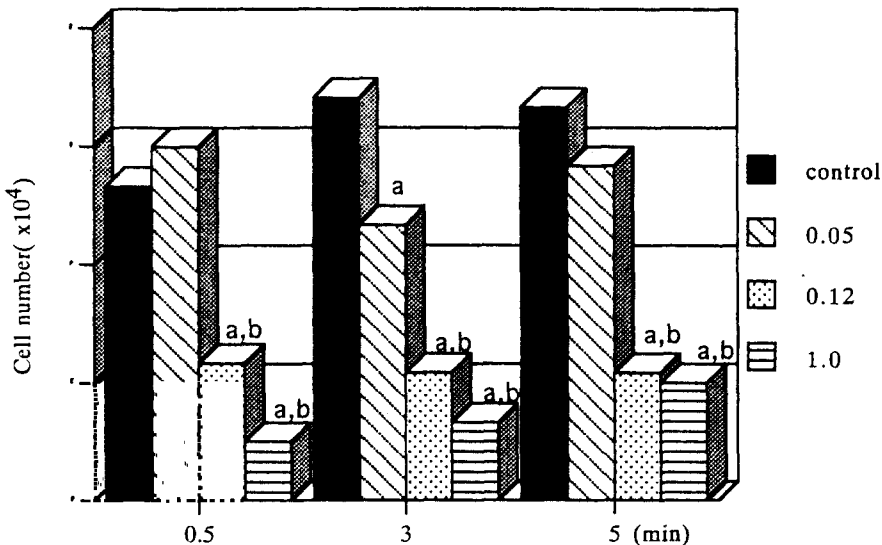


Fig. 2 Cell numbers of human gingival fibroblast attachment after 2 days culture with CHX-pretreated dentin slices following different CHX concentrations.

a : $P < 0.05$ when compared with control.

b : $P < 0.05$ when compared with 0.05% CHX group.

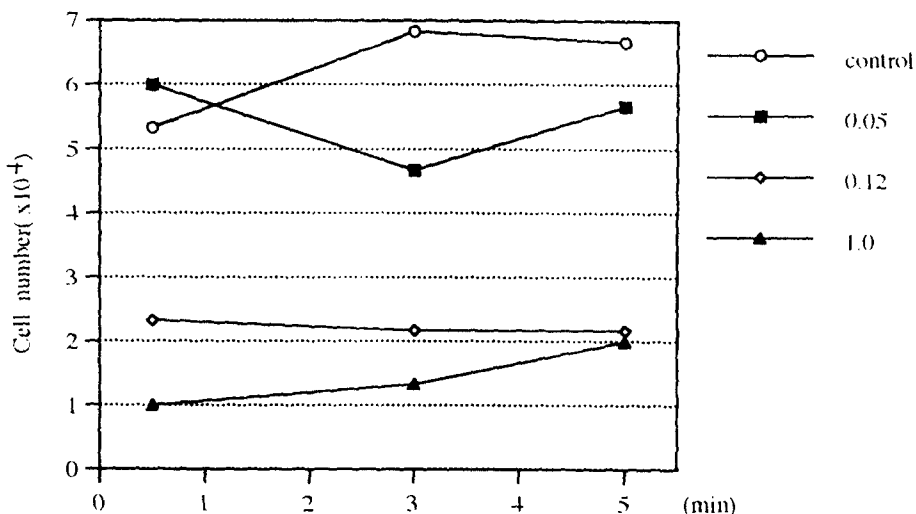


Fig. 3 Cell numbers of human gingival fibroblast attachment after 2days culture with CHX-pretreated dentin slices following diferent CHX-pretreated time.

Table. 2 Radioactivity incorporated into gingival fibroblast treated with various concentrations of CHX.

CHX (%)	(³ H) thymidine incorporated (CPM)	% Inhibition
	1527 + 168	0
0.001	274 + 32 ^a	82.06
0.0025	258 + 26 ^a	83.11
0.005	126 + 16 ^a	91.75
0.01	106 + 0 ^a	93.26

Mean ± S. D (n=3)

a : P<0.05 when compared with control

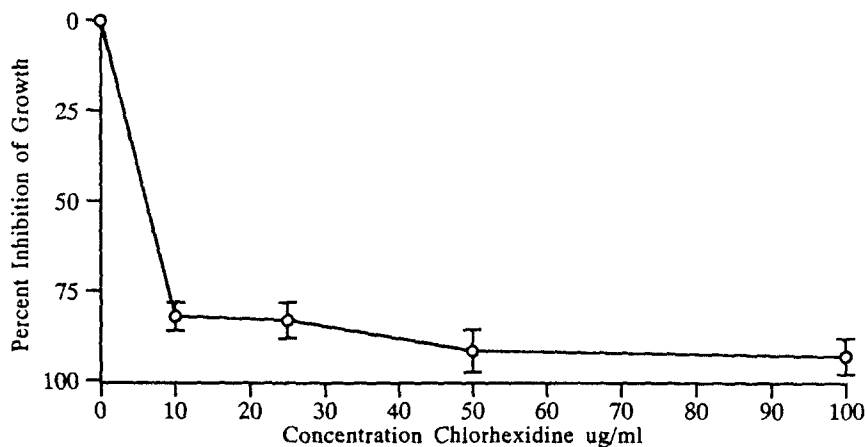


Fig. 4 Dose-response curve of chorhexidine treatment on tritiated thymidine uptake by cultured human gingival fibroblasts.

IV. 총괄 및 고찰

이번 연구에 따르면 CHX이 치은섬유아세포에 독성이 있다는 것을 확인시켜 주었다. 실험 1은 표준화시켜 전처리한 CHX의 substantivity에 의한 세포 독성때문에 나타나는 부착에 대한 유해작용을 알아보고자 한 것이었다. 결과에 따르면 조절군과 0.05% 군 사이에서는 유의한 차이가 없었고, 0.12%와 1% 군에서는 조절군과 0.05% 군에 비해 유의하게 부착하는 세포수가 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 그러므로 위상차현미경으로 사진화한 Fig. 1의 0.12%와 1% 군에서는 조절군과 0.05% 군에 비하여 dentin slice와 dish에 부착을 이루고 있는 세포들이 감소했으며, 형태에 있어서도 rounding up한 형태로 부착을 이루지 못하는 세포들이 관찰되었고 불규칙한 형태들의 세포가 많이 관찰되었다. Dentin slice에서 유리되는 CHX의 작용에 의해 독성이 작용하므로 dentin slice에서 가까울수록 부착이 감소되고 세포의 형태가 round up하고 불규칙하게 관찰되었다. 시간변화에 따른 부착정도, 세포의 형태에서의 유의한 차이는 발견할 수 없었다.

이번 실험에서는 가능한한 substantivity에 의해 유리되는 양을 표준화시키기 위하여 dentin slice를 같은 두께로 잘랐으며 표면적도 표준화시키기 위하여 나이, 성별, 실험에 이용될 치아들을 한정시켰다. 이번 결과에서는 3분에서만 조절군과 0.05% 사이의 유의성이 관찰되었는데 이유는 알 수 없었다.

Bonesvoll²³⁾의 연구에 의하면 0.2% CHX 10ml를 1분간 rinse한후 substantivity를 조사한 결과 30%가 구강내와 결합하여 8-12시간동안 방출된다고 보고했고 실제로 24시간까지도 타액에서 발견된다고 한다. 그러므로 이번 실험에서는 충분히 2일동안 배양하여 substantivity에 의해 유리되는 CHX의 세포에 대한 효과를 가능한한 얻으려 하였다.

시간에 따른 부착세포수의 변화는 30초, 3분, 5분군에 있어서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이는 Allyn 등이 dentin chip를 대상으로 했던 결과와 동일했다. 이러한 결과를 보면 30초간 CHX를 노출시키면 상아질 또는 organic matrix(collagen)내의 CHX 결합부위를 포화시킬 수 있다고 생각할 수 있다. Cline과 Layman이 행한 연구에서 0.12%까지 전처리한 군에서는 세포가 특징적인 섬유아세포의

형태를 보인다고 보고했다. 그러나, 그 연구에서는 root slice가 아닌 root halves로 해서 크기가 상당히 다른 상태로 했으며 부착된 세포수를 통계화 하지도 않았다. 또한 scanning electron microscopy(SEM)을 이용하여 관찰하였으므로 부착되어있는 것의 형태만 관찰했다. 따라서 CHX의 substantivity 때문에 부착되지 못한 세포는 제거하고 부착된 세포수를 측정할 본 연구의 결과와는 다소 차이가 있는 것으로 생각된다.

실험 2에서는 substantivity에 의한 것이 아니라 세포에 대한 CHX의 직접적인 효과를 보기 위한 것이었다. 우리가 통상적으로 사용하는 0.12%에서는 매우 세포독성이 심하였으므로 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01% 군에서 관찰하였다. 결과에 따르면 조절군에 비하여 모든 실험군에서 ³H-thymidine incorporation 양이 현저하게 감소되었다. 그러므로 세포 성장이 현저히 억제되었다는 것을 알 수 있었지만, 실험군 사이에서 유의한 차이는 발견할 수 없었다. 이 결과는 Cline과 Layman이 행한 실험에서와 보다 0.001, 0.0025, 0.005%에서는 훨씬 심한 성장억제를 보이다가 0.01%에서는 비슷한 성장억제 정도를 보였다. 가능한 이유로는 CHX와 배양한 시간이 이번 실험에서는 훨씬 길고, 그후에 ³H-thymidine(NEN) 1μCi/well를 넣고 배양한 시간은 짧았기 때문에 오랫동안 CHX의 독성에 노출되어 같은 농도에서도 훨씬 심한 성장억제를 보인 것으로 보인다.

실험 1의 전처리한 군에서 유의한 감소를 보인 것보다 실험 2에서처럼 아주 적은 농도에서도 세포성장이 억제된다는 결과로 볼때 CHX이 전처리한 dentin slice의 표면에 강하게 결합되어 있지않을 가능성이 있다. 이는 아마도 전처리후 PBS로 수세한 것과 묻어나오는 CHX을 배제시키기 위하여 하루간 dry한 것을 부분적인 원인으로 볼 수 있다.

Pucher와 Daniel²⁴⁾의 연구에 의하면 섬유아세포를 배양하는 dish에 직접 CHX를 노출 배양한 후 세포수를 평가하였는데, 결과에 따르면 0.002%에서는 90% survival하여 최소한의 독성을 보였지만 같은 농도에서 세포분열은 효과적으로 억제시켰다고 보고했다. 이는 실험 1과 실험 2와의 결과와도 유사한 점을 보여주고 있다. 실험 2는 ³H-thymidine incorporation test를 이용하여 저농도의 CHX이 세포성장을 억제한다는 결과를 보였으므로 CHX이 섬유아

세포와 상피세포에서 DNA 합성을 억제한다는 다른 연구결과²⁵⁾를 증명해줄 수 있었다.

이러한 실험실상에서의 유해작용에도 불구하고 CHX는 치주건강의 지표로 이용되는 임상지표들을 호전시키는 것으로 보고되고 있다. Newman과 Addy²⁶⁾는 CHX 구강세정제를 한 경우 치태침착, 치은열구출혈, 불편감등이 감소된다고 하였으며, CHX이 함유된 gel 또는 dressing을 이용한 경우 염증, 불편감이 감소되었다고 보고했다^{27, 28)}. 이러한 양호한 효과는 여러가지로 설명할 수 있다. 치주낭내에서 발견되는 CHX 농도는 원래 농도보다 아주 적은 농도로 존재하고, 사용하는 방법에 따라 차이는 있지만 구강세정제²⁹⁾ 또는 pulse irrigation³⁰⁾이 치주낭으로 충분히 도달할 수 없다고 하고, 타액이 CHX를 불활성화시켜 세포독성을 억제하고³¹⁾ 전반적인 세균수를 감소시켜 치주창상치유에 좋은 영향을 미칠 수 있다는 가능성에 대하여 보고하고 있다³²⁾. 실험실상에서는 세균이 없는 상태이고, 세균이 작용하는 생체와는 환경이 다르다. 그러므로 세균과 CHX이 결합하기 때문에 숙주세포와 결합할 수 있는 양을 감소시킬 수 있다.

이번 연구는 CHX 구강세정제 또는 치은연하 세척시에 CHX에 의해 노출되는 치은섬유아세포의 효과를 치근면의 substantivity에 의해 나타나는 것과 직접적인 노출시의 효과를 실험실상에서 표준화시킨 dentin slice를 이용해 본 것이다.

결과에 따르면 임상적으로 이용되는 CHX 농도(0.12%)에서는 부착이 감소되었고, 직접적인 노출에 있어서는 아주 적은 농도에서도 세포성장이 유의하게 감소되었다. 그러므로 임상적으로 CHX이 양호한 효과를 보이지만, 치주수술 초기의 wounding sulcus내에 CHX의 노출은 치주조직의 부착을 방해하고 치유를 늦출수 있으므로 조심스럽게 시행해야 한다. 이번 실험에서는 2일후에 부착된 세포수를 평가했는데 substantivity에 기인한 효과를 측정하는데 적절한 시간이었는지 결정되지 않았다. CHX을 직접 노출한 경우에 있어서 농도를 조절군과 0.001%군 사이의 농도에서 유의성을 알아볼 필요가 있었다. 더불어 CHX의 유해작용을 덜 받으면서 양호한 효과들이 주로 발현될 수 있는 치유단계를 결정하고 술후 사용시기를 결정하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

표준화시킨 36개의 dentin slices를 0.05, 0.12, 1%의 실험군, 생리식염수를 조절군으로 30초, 3분, 5분간 전처치한후 5×10^4 세포가 함유된 dish에 위치시키고 2일간 배양한 후의 결과와 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01%의 CHX를 치은섬유아세포가 들어있는 culture dish에 직접노출배양 시킨후 ³H-thymidine incorporation test를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험 1에서는 모든 노출시간군에 있어서 조절군과 0.05% 전처치한 군에 대해 0.12, 1% 군에서 부착된 세포수의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다.
2. 실험 2에서 조절군과 0.05% 군에서는 어느정도의 부착과 특징적인 섬유아세포의 형태를 관찰할 수 있었지만 0.12, 1% 군에서는 세포형태가 불규칙하고 부착이 떨어져 round up하는 양상을 보여주고 있다.
3. 실험 2군에서는 조절군에 비하여 0.001, 0.005, 0.0025, 0.01%의 모든 군에서 유의하게 용량비례적으로 세포성장이 억제되는 것이 관찰되었다.

참고문헌

1. Kornman, K. S. : The role of antimicrobials in the prevention and treatment of periodontal disease. In Perspectives on Oral Antimicrobial Therapeutics. The American Academy of Periodontology. Chicago. 43, 1987.
2. Ciancio, S. G. : Non-surgical periodontal treatment, Proceedings of the world workshop in clinical periodontics. The American Academy of Periodontology. Chicago. I-1/I-12, 1989.
3. Mazza, J. E., Newman, M. G., Sims, T. N. : Clinical and antimicrobial effect of stannous fluoride on periodontitis. J. Clin Periodontol, 8 : 203-212, 1981.
4. Westling, M., Tynelius-Bratthall, G. : Microbiological and clinical short-term effects of repeated intracrevicular chlorhexidine rinsings. J. Perion. Res., 19 : 202-209, 1984.

5. Lander, P. E., Newcomb, G. M., Seymour, G. J., Powell, R. N. : The antimicrobial and clinical effects of a single subgingival irrigation of chlorhexidine in advanced periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 74-1986.
6. Greenstein, Gary., Berman, Charles., Jaffin, Robert. : Chlorhexidine. An Adjunct to Periodontal Therapy. *J. Periodontol.*, 57 : 370-377, 1986.
7. Rolla, G., Melsen, B. : On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J. Dent. Res.*, 54 : 1357, 1975.
8. Lindhe, J., Hamp, S., Löe, H., Rindom-Schiott, C. : Influence of topical application of chlorhexidine on chronic gingivitis and gingival wound healing in the dog. *Scand. J. Dent. Res.*, 78 : 471, 1970.
9. Bakaee, G., Strahan, J. : Effects of a 1% chlorhexidine gel during the healing phase after inverse bevel mucogingival flap surgery. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 20, 1980.
10. 임홍식, 한수부 : Chlorhexidine을 이용한 치주낭 세척이 치주염에 이환된 치근에 침투세균에 미치는 영향. *대한치주과학회지*, Vol. 19, No. 2, 1989.
11. 이명은, 조규성, 채중규, 김종관 : 클로르헥시딘 및 테트라사이클린 치은연하 치주낭세척이 만성 치주질환에 미치는 효과에 대한 연구. *대한치주과학회지*, Vol. 20, No. 1, 1990.
12. Braatz, L., Garrett, S., Claffey, N., Engelberg, J. : Antimicrobial irrigation of deep pockets to supplement non-surgical periodontal therapy. II. Daily irrigation. *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 630-638, 1985.
13. MacAlpine, R., Magnusson, L., Kiger, R., Crigger, M., Garrett, S., Egelberg, J. : Antimicrobial irrigation of deep pockets to supplement oral hygiene instruction and root debridement. I. Biweekly irrigation. *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 568-577, 1985.
14. Wennström, J.L., Heijl, L., Grondahl, K. : Periodic subgingival antimicrobial irrigation of periodontal pockets. I. Clinical observations. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 541-550, 1987.
15. Paunio, K., Knuttila, M., Mielityinen, H. : The effect of chlorhexidine gluconate on the formation of experimental granulation tissue. *J. Periodontol.*, 49 : 92, 1978.
16. Bassetti, C., Tallenburger, A. : Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 443, 1980.
17. Gabler, W., Bullock, W., Creamer, H. : The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human neutrophils. *J. Periodont. Res.*, 22 : 445, 1987.
18. Watts, T., Addison, T., Johnson, B. : Effects of chlorhexidine solution on neutrophil locomotion in vitro. *J. Dent.*, 17 : 287, 1989.
19. Hegeland, K., Heyden, G., Rolla, G. : Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scand. J. Dent. Res.*, 79 : 209, 1971.
20. Knuutila, M., Sonderling, E. : Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta. Odontol. Scand.*, 39 : 285-289, 1981.
21. Alleyn, CD., O'Neal, RB., Strong, SL., Scheidt, MJ., Van Dyke, TE., McPherson, JC. : The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.*, 62 : 434-438, 1991.
22. Cline, V., Layman, L. : The effects of chlorhexidine on the Attachment and Growth of cultured Human Periodontal cells. *J. Periodontol.*, 63 : 598-602, 1992.
23. Bonesvoll, P., Lokken, P., Rolla, G., and Pavs, P. : Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinsing. *Arch. Oral. Biol.*, 19 : 209, 1974.
24. Pucher, J., Daniel, C. : The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblasts In Vitro. *J. Periodontol.*, 63 : 526-532, 1992.
25. Goldschmidt, P., Cogen, R., Taubman, S. : Cytotoxic effects of chlorhexidine on human

- cells. *J. Periodontol.*, 48 : 212–215, 1977.
26. Newman, PS., Addy, M. : Comparison of hypertonic saline and chlorhexidine mouthrinses after the inverse bevel flap procedure. *J. Periodontol.*, 53 : 315–318, 1982.
 27. Asboe-Jorgensen, V., Attstrom, R., Lang, NP., Løe, H. : Effect of a chlorhexidine dressing on the healing after periodontal surgery. *J. Periodontol.*, 45 : 13–17, 1974.
 28. Pluss, EM., Engelberger, PR., Rateitschak, KH. : Effect of chlorhexidine on dental plaque formation under periodontal pack. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 20–25, 1980.
 29. Pitcher, G., Newman, H., Strahan, J. : Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinse and direct irrigation. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 300, 1980.
 30. Eakle, W., Ford, C., Boyd, R. : Dept of penetration in periodontal pockets with oral irrigation. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 39, 1986.
 31. Spijkervet, FKL., Van Saene, JJM., Van Saene, HKF., Pansers, AK., Vermey, A., Fidler, V. : Chlorhexidine inactivation by saliva. *Oral Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.*, 69 : 444–449, 1990.
 32. Rosling, B., Nyman, S., Lindhe, J., Jern, B. : The healing potential of the periodontal tissues following different techniques of periodontal surgery in plaque-free dentitions. *J. Clin. Periodontol.*, 3 : 233–250, 1976.

THE EFFECTS OF CHLORHEXIDINE ON THE ATTACHMENT AND GROWTH OF CULTURED HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS IN VITRO

Ho Lee, In-Kyu Lee, Hyung-Seop Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonbuk National University

The Chlorhexidine(CHX) has been a widely used adjunct in periodontal therapy due to its bactericidal effect. In spite of the effects of CHX exhibits cytotoxic to human cells and delays granulation tissue formation. Therefore, understanding the effects of CHX on fibroblast attachment and cell growth will provide the rationale for its use during healing phase of periodontal surgery. This study was undertaken to examine the effects of standardized CHX-pretreated dentin slices and direct CHX exposure on human gingival fibroblasts.

The results were as follow :

1. In experiment 1, there was a significant reduction in the number of fibroblast attachment in 0.12, 1% -pretreated groups relative to the control, 0.05% -pretreated groups($P < 0.05$).
2. In experiment 1, the control, 0.05% -pretreated groups showed considerable attachment and typical fibroblastic morphology, but 0.12, 1% -pretreated groups showed irregular, round-up (unattached) fibroblastic morphology.
3. In experiment 2, it appeared that all experimental groups exhibits significant inhibition of cell growth when compared with the control group.